

نمو کیسه‌های ترش‌حی در پرتقال رقم والنسیا (*Citrus sinen-* *sis var. Valencia*): اثر پوتریسین و متیل‌جاسمون‌ات بر ساختار کیسه‌ها در میوه‌های انبار شده

سهیلا محمدرضاخانی^{۱*}، فرخنده رضانژاد^۲، زهرا پاک کیش^۲، وحید رضا صفاری^۳

تاریخ دریافت ۹۴/۴/۲۱

تاریخ تصویب ۹۴/۱۲/۱۱

چکیده

کیفیت میوه یک ویژگی خیلی پیچیده است که تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد. به طور معمول، در دوره پس از برداشت، تیمارهای مختلفی از جمله سرما یا برخی مواد شیمیایی استفاده می‌شود تا پیری میوه را به تاخیر بیندازد و نیز کیفیت میوه را حفظ نماید. در پژوهش حاضر، تشکیل حفرات ترش‌حی در تخمدان جوان و اثر تیمارهای پوتریسین ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار و متیل‌جاسمون‌ات با غلظت ۱۰، ۲۰ میکرومولار روی ساختار بافت‌های ترش‌حی در میوه رسیده و انبار شده‌ی پرتقال

* دانشجوی دکتری رشته باغبانی دانشگاه تبریز (نویسنده مسئول smohammadrezakhani@yahoo.com)

۲ استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳ دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴ دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

رقم والنسیا (*C. sinensis* var. *Valencia*)، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. برش‌های میکروتومی و دستی از تخمدان در مراحل اولیه نمو به منظور مطالعه کیسه و از فرابر میوه‌های بالغ انبار شده برای مطالعه اثر تیمار روی ساختار کیسه، تهیه و مطالعه شدند. تغییرات تکوینی تشکیل کیسه‌ها (حفرات) دارای ۴ مرحله شامل شروع بنیان‌گذاری کیسه، مرحله تشکیل فضای بین سلولی، مرحله گسترش حفره‌ها و مرحله بلوغ می‌باشد. کیسه‌ها هم در لایه‌های زیر اپیدرمی و هم عمقی‌تر تشکیل می‌شود. در ابتدا تشکیل کیسه‌ها به صورت شیزوژن و در نهایت لیزوژن می‌باشد. ساختار کیسه‌های تشکیل شده، تعداد آنها و نیز اندازه محور طولی و عرضی، در میوه‌های شاهد و تیمار شده تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان ندادند. مطالعه تعداد کیسه‌ها، محور طولی و عرضی آن در اگزوکارپ (فلاویدو) با استفاده از استرنئومیکروسکوپ نتایج مشابه نتایج حاصل از برش‌های میکروتومی و دستی را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از تیمارهای ذکر شده هیچگونه تغییری در ساختارهای ترش‌چی ایجاد نمی‌کند.

واژه های کلیدی: تکوین، پرتقال، شیزوژن، لیزوژن

مقدمه

دارای سلول‌های پارانشیمی با فضای سلولی بزرگ است که اغلب بی‌رنگ ولی گاهی اوقات در پرتقال‌های رنگی و یا در گریپ‌فروت‌های قرمز مختصر رنگی دارد (Fahn, (1990); Fahn, (1988); Evert, (2006); Ding et al., (2015).

ضخامت آن در گونه‌های مختلف متفاوت است، برای مثال ۱ تا ۲ میلی‌متر در لایم (*C. aurantifolia*) و تانگرین (*C. reticula*)، ۲ تا ۵ میلی‌متر در پرتقال شیرین (*C. ta sinensis*) و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر در پوملو (*C. maxim Merr*) می‌باشد. اگزوکارپ یا فلاویدو با مزوکارپ اسفنجی سفید به همپیوسته هستند. کیسه‌های ترش‌حی در همه گونه‌های خانواده Rutaceae به طور طبیعی وجود دارند و در بخش‌های مختلف از جمله ساقه، مزوفیل برگ، میوه و در همه اجزای گل به جز پرچم تشکیل می‌شوند. در *Citrus*، این کیسه‌ها بطور معمول غده‌های روغنی نامیده می‌شوند که محل سنتز و تجمع اسانس بوده و بیشتر در قسمت برون‌بر و به تعداد کمتر در میان‌بر وجود دارند (Bennici and Tani, (2004). در رابطه با چگونگی تکوین کیسه‌های ترش‌حی اسانس در گونه‌های مختلف جنس *Citrus* اختلاف نظر وجود دارد. تشکیل کیسه‌های ترش‌حی در میوه‌های *Citrus* یا ناشی از تشکیل فضای حاصل از جدا شدن سلول‌ها

تخمندان چند برچه‌ای مرکبات که دارای تمکن محوری می‌باشد، پس از لقاح و تکوین اجزای مختلف به میوه تبدیل می‌شود. رشد و نمو فرابر میوه پرتقال والنسیا در سه مرحله رخ می‌دهد: مرحله اول بعد از افتادن گلبرگ‌ها است که چندین ماه طول می‌کشد، در این مرحله با انجام تقسیمات سلولی ضخامت فرابر (پری‌کارپ) افزایش می‌یابد. مرحله دوم تغییر رنگ در میوه‌ها است که با بزرگ شدن و تمایز سلول‌های فرابر همراه است. در طی مرحله سوم، سرعت رشد کاهش یافته و میوه به رنگ اصلی خود در می‌آید (Knight et al., (2001). میوه مرکبات نوعی سته بنام hes-peridium است، که دارای دو بافت مشخص شامل بخش گوشتی (درون بر یا پالپ) و پوست (فرابر یا پیل) می‌باشد. بخش گوشتی بخش خوراکی اغلب میوه‌های *Citrus* بوده و شامل وزیکول‌های شیره (عصاره) میوه و غشای آنها و دستجات آوندی می‌باشد. پری‌کارپ یا فرابر به دو بخش تقسیم می‌شود: برون‌بر (فلاویدو) که لایه‌ی رنگی بیرونی غنی از کروموپلاست می‌باشد. گروه‌هایی از سلول‌های آن تشکیل کیسه‌های ترش‌حی را می‌دهند که از روغن‌های فرار از جمله مونوترپن‌ها پر شده‌اند. بخش دوم میان بر یا مزوکارپ (آلبیدو) یا بخش سفید میوه است که

در هنگام تقسیم سلولی (-Schizogony) و یا حاصل تجزیه و خرد شدن برخی سلول‌های مرکزی طی تشکیل حفره می‌باشد (Lysigeny) یا ترکیبی از هر دو پدیده (Schizolysigeny) باشد که ابتدا فضا به وسیله جدا شدن سلول‌ها تشکیل و سپس حفره‌ی ایجاد شده، بر اثر تجزیه و خرد شدن سلول‌های حفره در بخش مرکزی، بزرگ‌تر می‌شود (Ding et al., (2015); Fahn, (1990); Evert, (2006). نوع اخیر، در تمایزیابی غده‌های روغنی در برگ و میوه انواع مرکبات گزارش شده است (Buvat, (1989); Liu et al., (2012). مشاهدات محققین نشان داده است که تشکیل کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های جوان نارنگی مدیترانه‌ای به صورت لیزوژن Bosabalidis and Tsekos, (1982) در *Citrus unshiu* و در Marc Ding et al., (2015) و در پرتقال واشنگتن ناول، در ابتدا به صورت شیزوژن و در اواخر مرحله رشد میوه به صورت لیزوژن (Ford, (1942), Burns et al., (1992) و در *C. limon*، از نوع شیزوژن‌می‌باشد (Turner et al., (1998). در باره زمان تشکیل ساختارهای ترش‌چی، برخی محققین شروع تشکیل در ابتدای مرحله رشد و نمو میوه گزارش کرده‌اند و برخی دیگر بیان نمودند که با رشد و نمو میوه، تشکیل کیسه ادامه پیدا می‌کند

و بزرگ می‌شوند (Bain, (1958). گزارش شده است که کیسه‌های ترش‌چی در لمون یورکا (*C. limon var. Eureka*)، نارنگی مدیترانه‌ای (*C. reticulata var. Mediteranean*)، در *C. aurantifolia Swingle* و پرتقال واشنگتن ناول (*Navel*) در مراحل اولیه رشد تخمدان به وجود آمده‌اند (Bo-sabalidis and Tsekos, (1982); Rafiei and Rajaei, (2007); Ding et al., (2015) به منظور حفظ بیشتر میوه‌ها، پس از برداشت، نگهداری آن‌ها در دمای پایین انجام می‌شود. همچنین برای حفظ و بقای بیشتر آن‌ها، علاوه بر انبارداری، استفاده از تیمارهای شیمیایی که بتوانند در فاصله‌ی زمانی بین برداشت و استفاده توسط مصرف‌کنندگان، کیفیت و ساختار میوه را تا حد ممکن حفظ کنند از ارزش و اهمیت خاصی برخوردار است (Siboza et al., (2014). به هر حال، این تیمارها، نیز ممکن است برخی تغییرات را در کیفیت میوه یا ساختار و نمو میوه ایجاد کنند. بدین منظور در این پژوهش، اثر تیمار پوتریسین و متیل‌جاسمونات که به عنوان عوامل موثر در حفظ کیفیت میوه در طی انبارداری، گزارش شده‌اند و مطابق مطالعات مروری، هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ای درباره اثر آن‌ها روی تمایز بافت پوست میوه (فرابر) و ساختار کیسه‌های ترش‌چی در گونه مورد مطالعه وجود ندارد. پوتریسین به

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گل‌های در حال باز شدن به منظور مطالعه نمو حفرات ترش‌حی جمع‌آوری شدند. میوه‌های سالم و یکنواخت در زمان بلوغ تجاری برداشت و برای حذف مواد زائد و عوامل بیماری‌زای احتمالی، با آب معمولی شست‌شده و پس از خشک شدن با مواد شیمیایی مورد نظر تیمار شدند. تیمارهای استفاده شده غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار در لیتر پوتریسین، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، به مدت ۵ دقیقه با روش غوطه‌ور کردن، بودند. بعد از تیمار، میوه‌ها از محلول خارج، در شرایط آزمایشگاه خشک و سپس در سردخانه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰-۹۰ درصد قرار داده شدند. بعد از ۳ ماه انبارداری، مطالعات ساختاری و تشریحی فرابر و کیسه‌های ترش‌حی انجام شد.

روش تهیه برش‌های میکروسکوپی

به منظور مطالعات ساختاری پوست میوه (برون‌بر، میان‌بر)، قطعات پوست میوه در ابعاد ۲×۲×۲ سانتیمتری جدا و پس از شستشوی اولیه، در محلول FAA، با نسبت‌های ۸۵، ۱۰ و ۵ درصد به ترتیب اتانول ۷۰ درصد، اسید استیک، فرمالدئید به مدت ۱۲-۲۴ ساعت تثبیت شدند. پس از شستشو با آب جاری و سپس آب

عنوان یک پلی‌آمین طبیعی تقریباً در همه موجودات زنده یافت می‌شود و در طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله رشد و نمو گیاهان، تحریک تقسیم سلولی، سنتز DNA و پروتئین‌ها، جوانه‌زنی بذور، کنترل ریشه‌زایی، جنین‌زایی، پیری و ریزش بافت‌ها و اندام‌ها، گل‌انگیزی و نمو اندام‌های زایشی، تشکیل، رشد و رسیدن میوه‌ها، واکنش به تنش‌های محیطی (زیستی و غیر زیستی) و ... نقش ایفا می‌کند (Takahashi and Kakehi, 2010). تحقیقات صورت گرفته حاکی از آن است که تعادل بین اتیلن و پلی‌آمین‌ها در تسریع یا کند نمودن فرآیند پیری نقش تعیین‌کننده دارد. به طور معمول غلظت پلی‌آمین‌ها طی پیری بافت کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد این کاهش دلیل شروع یا تشدید تولید اتیلن باشد. بنابراین، ممکن است پلی‌آمین‌ها (با احتمال در ارتباط با سایر مواد تحریک‌کننده رشد) در جلوگیری از تولید اتیلن در میوه‌ها مورد نیاز باشند و در نتیجه پیری را عقب می‌اندازند (Tiburcio et al., 1997). متیل‌جاسمونات هم به طور معمول در برگ‌های جوان، گل و میوه وجود دارد، در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش مهمی داشته و موجب کاهش خسارت ناشی از تنش‌های محیطی از جمله سرما در گیاه می‌شود (Nilprapruck et al., 2008); (Siboza et al., 2014).

با روش مضاعف هماتوکسیلین- ائوزین الکی انجام شد. پس از شفاف کردن نهایی با زایلن، لام‌ها با چسب انتالن چسبانده شده و پس از مطالعه با میکروسکوپ نوری، از نمونه‌های مناسب عکسبرداری شد (Graham and Joshi, 1995). همچنین، برای مطالعه‌ی آشکارتر ساختار کیسه‌ها، برش‌های دستی نیز تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با سافرانین با میکروسکوپ نوری مطالعه و بررسی شدند. برای مطالعه برون‌بر و ساختارهای ترش‌چی آن، میان‌بر سفید را جدا کرده، بخش باقیمانده (فلاویدو) با میکروسکوپ استریو (لوپ) مطالعه و بررسی شد. در همه‌ی انواع برش‌های تهیه شده پارامترهای کمی از جمله تعداد کیسه‌ها در مراحل مختلف نمو، قطر و فاصله آن‌ها از یکدیگر مطالعه و اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار (شاهد، پوتریسین با دو غلظت ۲/۵ و ۵ میلی مولار، متیل‌جاسمونات با دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و سه تکرار انجام شد. برای هر تکرار یک میوه، که در هر میوه ۶ نمونه (قطعات پوست) برای مطالعه انتخاب شد. همچنین در هر برش، مطالعات در ۱۰ میدان دید میکروسکوپ انجام گرفت. تجزیه آماری نتایج بدست آمده به کمک

مقطر، بمنظور آب‌گیری (Dehydration) و پارافین‌دهی از اتانول و TBA (Tertiary Butyl Alcohol) بصورت زیر استفاده شد: اتانول ۵۰ درصد؛ مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳۵ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ مخلوط ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد و ۷۵ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ ۱۰۰ میلی‌لیتر بوتیل الکل؛ مخلوط ۵۰ میلی‌لیتر بوتیل الکل و ۵۰ میلی‌لیتر پارافین خالص و سرانجام پارافین خالص.

مدت زمان لازم برای هر مرحله ۲-۱ ساعت می‌باشد، در مرحله آخر پارافین به تدریج وارد سلول‌ها گردیده و بوتیل الکل از آنها خارج شد. بمنظور نفوذ بهتر پارافین، نمونه‌ها بمدت حداقل دو هفته در پارافین مذاب جدید قرار گرفتند. سپس قالب‌گیری انجام شده و پس از تهیه‌ی پیرامیدهای مناسب از قالب‌های تهیه شده، برش‌های پیاپی ۸-۱۲ میکرومتری میکروتوم دستی تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی در زایلن به مدت ۳۰ دقیقه، آب‌دهی با درجات اتانولی رو به کاهش (۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۶، ۱۰۰) هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه، انجام شد. رنگ آمیزی

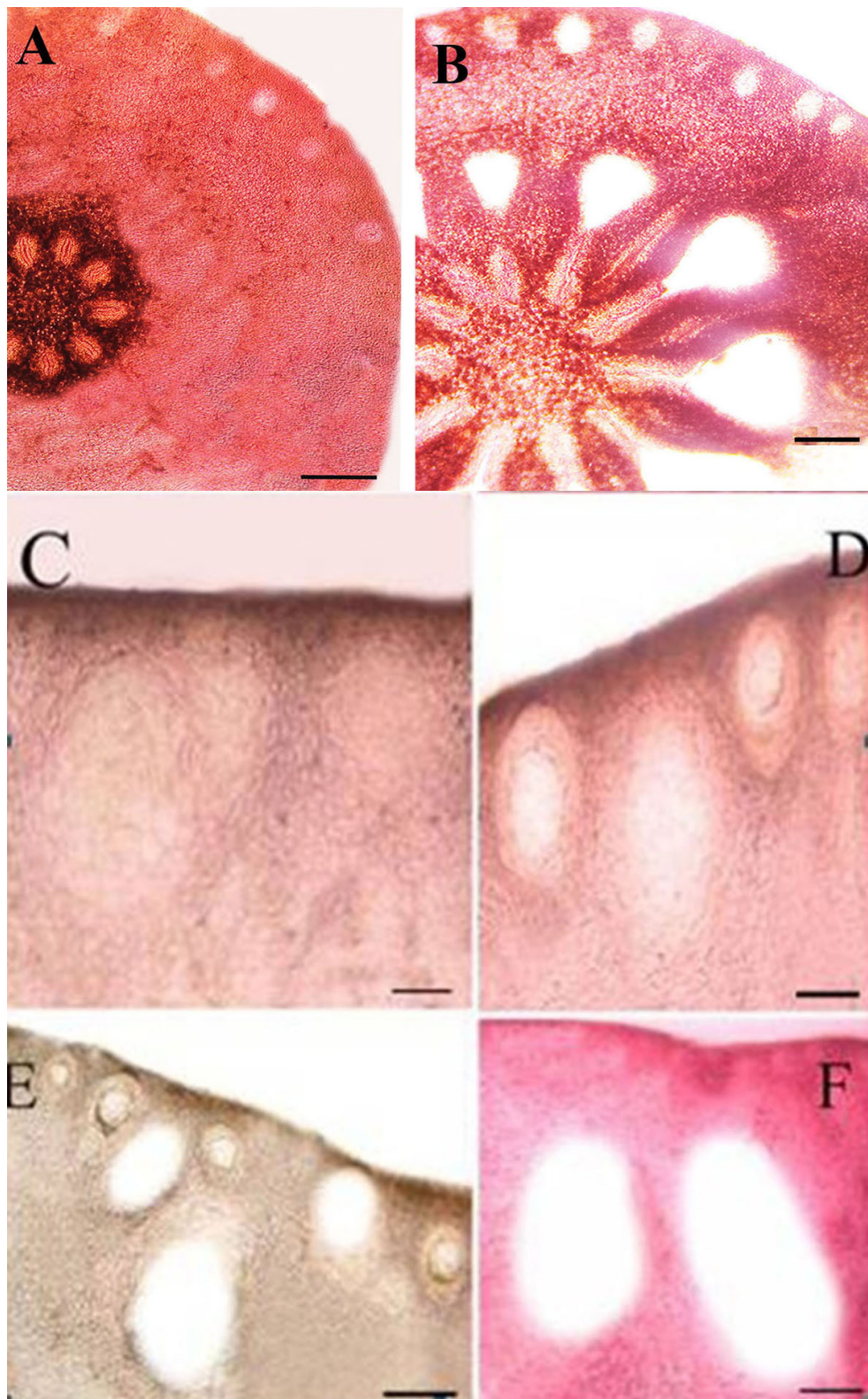
نرم افزار SAS انجام شد. رسم نمودار با استفاده از Excel و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد صورت گرفت.

نتایج

ابتدا تعدادی از سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی تخمدان جوان شروع به تقسیم نمودند، که این تقسیمات سلولی همراه با افزایش ابعاد، تا زمانی ادامه یافت که یک توده سلولی کروی تا بیضی شکل متصل به سلول‌های اپیدرمی یا زیر اپیدرمی پدید آمد. مطالعه مراحل نمو ساختار کیسه‌های ترش‌حی میوه‌های بالغ هم در برش‌های دستی و هم میکروتومی نشان داد که این ساختار در پرتقال رقم والنسیا با بنیان‌گذاری منطقه (حد) کیسه ترش‌حی، تقسیم سلولی در بخش پیرامونی و سپس با بزرگ شدن، تجزیه تدریجی و شفاف شدن منطقه مرکزی (محل حفره آبی) در ارتباط است (شکل ۱ A-E). بنابراین، ابتدا حد کیسه ترش‌حی مشخص شده، سلول‌های این منطقه در بخش پیرامونی پررنگ‌تر و به نسبت کوچک‌تر هستند که نشانه فعالیت بیشتر آنها می‌باشد، این بخش خاستگاه سلول‌های احاطه کننده اطراف کیسه می‌باشد. در بخش مرکزی، که بخش عمده‌ی این ساختارهای در حال نمو را تشکیل می‌دهد آثار بزرگ شدن سلولی و

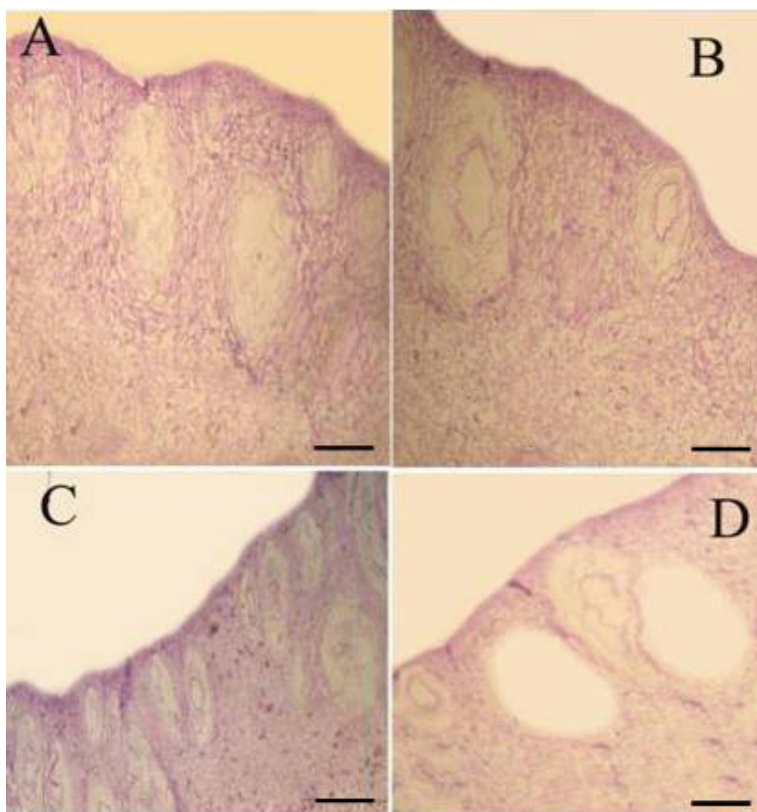
در نتیجه تا حدودی بزرگ شدن فضای بین سلولی (شیزوژنی) دیده می‌شود، بطوری که این منطقه نسبت به بخش‌های اطراف تا حدودی شفاف‌تر به نظر می‌رسد (شکل ۱ A, B). سپس تقسیم سلولی در سلول‌های کناری ادامه پیدا می‌کند و بر تعداد لایه‌های احاطه‌کننده افزوده می‌شود (شکل ۱ A, B). در بخش مرکزی نیز شفافیت بیشتری دیده می‌شود. بطوری که حد سلول‌ها از هم قابل تشخیص نیست (شکل ۱ A, C). سپس تجزیه شدن سلولی در بخش مرکزی رخ می‌دهد بطوری که آثار بخش‌های تجزیه نشده پیرامونی در برخی از نمونه‌ها نیز دیده می‌شود (شکل ۱ D, E). در ادامه نمو، تجزیه کامل بخش مرکزی انجام شده و کیسه‌ها با ابعاد و اندازه‌های متفاوت تشکیل می‌شود (شکل ۱ E, F).

در برش‌های میکروتومی بدلیل نازک بودن برش‌ها، حد کیسه، حد سلول‌ها و تجزیه سلولی بطور آشکار مشاهده می‌شود (شکل ۲ A-C). محل تشکیل کیسه‌های ترش‌حی هم در لایه‌های سطحی زیر اپیدرمی (اگزوکارپ) و هم در لایه‌های عمقی‌تر (بخش‌های بیرونی مزوکارپ) مشاهده می‌شود. اگرچه در بخش‌های درونی مزوکارپ هیچ ساختار ترش‌حی در حال نمو دیده نمی‌شود (شکل ۳ A). در برخی برش‌ها، همه مراحل نمو با هم

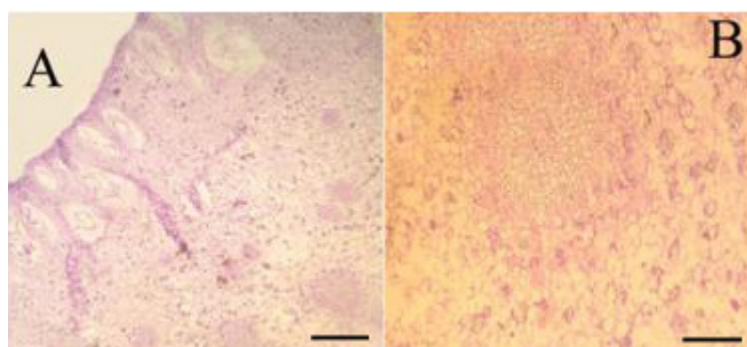


شکل ۱ (A-F). برش‌های دستی مراحل تشکیل کیسه‌های ترش‌چی در فرابر تخمدان پرتقال رقم والنسیا در مرحله باز شدن گل، A، B، بنیان‌گذاری حد کیسه و تقسیم سلولی در بخش پیرامونی؛ بزرگ‌شدن، افزایش فضای بین‌سلولی و شروع تجزیه‌ی سلولی در بخش مرکزی، C- E، ادامه تجزیه سلولی (مرگ برنامه‌ریزی شده)، F، کیسه ترش‌چی بالغ. مقیاس در D-F برابر با 0.5 mm و در A-C برابر با 0.4 mm است.

در یک نمونه (برش) دیده می‌شوند (شکل E ۲). انشعابات آوندی در بخش‌های مختلف مزوکارپ دیده می‌شوند که بویژه پراکنش آن‌ها در بخش‌های درونی بیشتر است (شکل A ۳). در شکل B ۳ مقطع عرضی یکی از این آوندها دیده می‌شود.

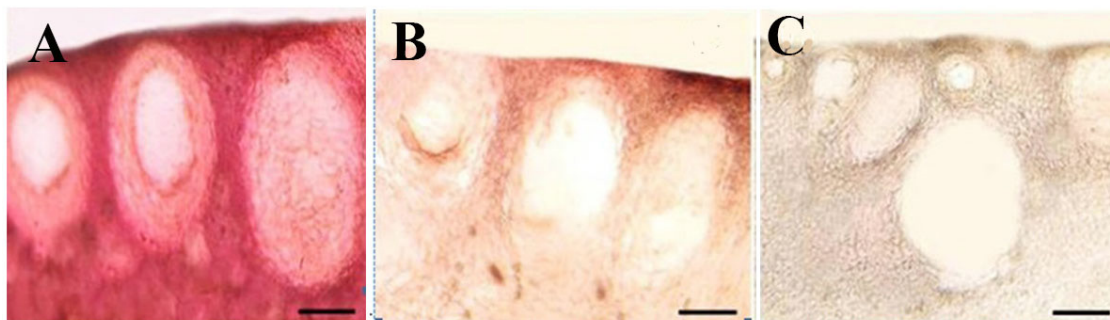


شکل A-D ۲ برش‌های میکروتومی محل تشکیل و نحوه پراکنش کیسه‌های ترش‌حی در تخمدان جوان (گل در حال باز شدن) پرتقال رقم والنسیا. A. بنیان گذاری حد کیسه و تقسیم سلولی در بخش پیرامونی؛ بزرگ‌شدن، افزایش فضای بین سلولی و شروع تجزیه‌ی سلولی در بخش مرکزی. B, C. تحلیل سلولی. D. کیسه‌های در حال تجزیه و کیسه‌های کامل. مقیاس‌ها برابر با ۰/۵ mm است.

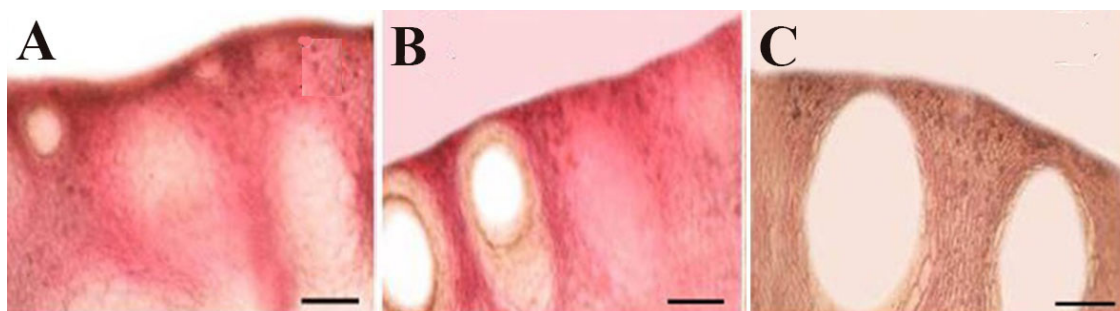


شکل A-B ۳ برش‌های میکروتومی فرابر تخمدان جوان (گل در حال باز شدن) پرتقال رقم والنسیا. A. پراکنش ساختارهای ترش‌حی در برون‌بر و بخش‌های بیرونی میان‌بر، فقدان کیسه‌ها در بخش‌های درونی میان‌بر دیده می‌شود، B. ساختار مقطع عرضی یکی از دستجات آوندی واقع در فرابر. مقیاس در A برابر با ۰/۵ mm و در B برابر با ۰/۴ mm است.

ساختار کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های تیمار شده با پوتریسین و متیل‌جاسمونات (شکل‌های ۴ و ۵). تفاوت و تغییر آشکاری در ساختار دیده می‌شود (شکل‌های ۴ و ۵). مشابه میوه‌های شاهد می‌باشد و هیچ

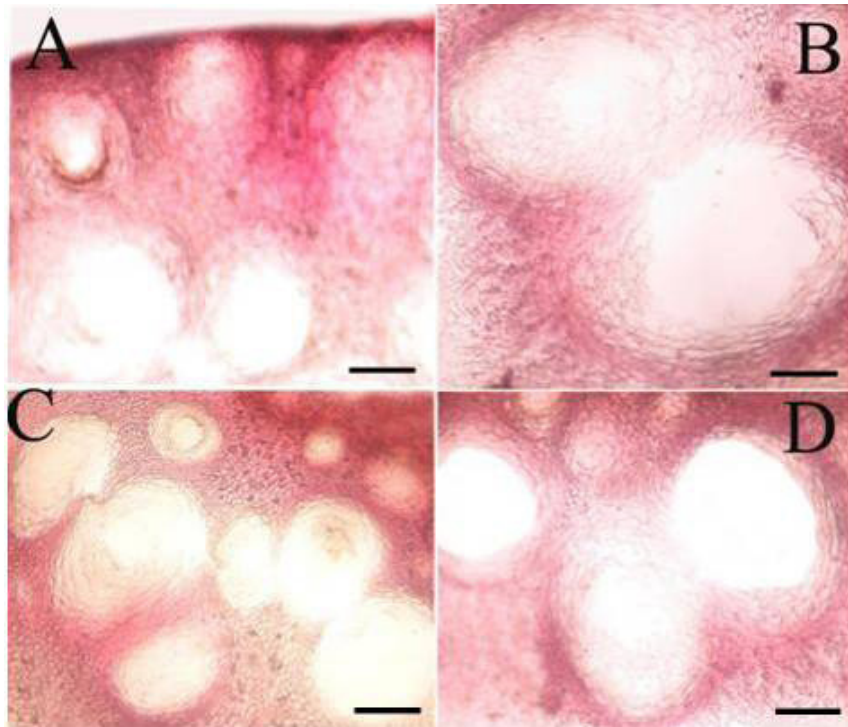


شکل ۴ A-C. برش‌های دستی ساختار کیسه‌های ترش‌چی در برابر میوه پرتقال تیمار شده با پوتریسین، در این برش‌ها همچنین محل تشکیل و پراکنش کیسه‌های ترش‌چی هم نشان داده شده است که در برخی برش‌ها در ردیف‌های منظم و در عده‌ای دیگر به طور نامنظم پخش شده‌اند. هیچ تغییری قابل ملاحظه‌ای در ساختار کیسه‌ها دیده نمی‌شود. مقیاس در A-C برابر با ۰/۵ mm است.



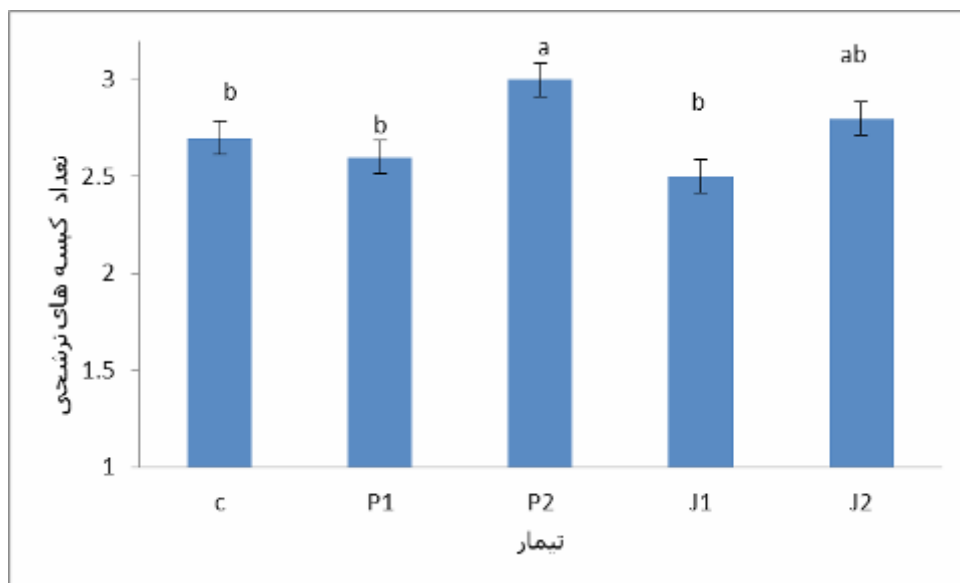
شکل ۵ A-D. برش‌های دستی مراحل تشکیل کیسه‌های ترش‌چی در برابر میوه پرتقال تیمار شده با متیل‌جاسمونات، تغییری قابل ملاحظه‌ای در ساختار کیسه‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد دیده نمی‌شود. مقیاس در A-C برابر با ۰/۵ mm است.

بین کیسه‌ها تعدادی از سلول‌های پارانشیمی وجود دارند که آنها را از هم جدا می‌کنند اما در بعضی نمونه‌ها، طی مراحل نمو این سلول‌ها از بین رفته و کیسه‌های ترش‌چی بهم متصل می‌شوند. مقایسه این حالت در نمونه‌های شاهد و تیمار نیز اختلاف آشکاری را نشان نداد و در همه نمونه‌ها این پیوستگی‌ها دیده شد (شکل ۶ A-D).

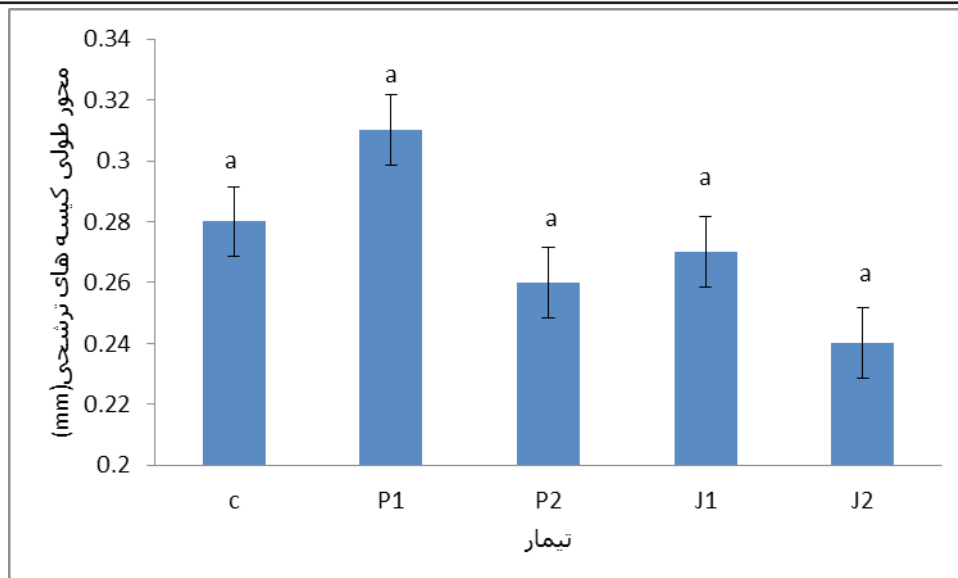


شکل ۶ A-D. به هم پیوستگی کیسه‌های ترش‌چی به ترتیب در میوه‌های شاهد (A, B) و تیمار شده با پوتریسین (C) و متیل‌جاسمونات (D). مقیاس در B برابر با ۰/۴ mm و در A, C, D برابر با ۰/۵ mm است.

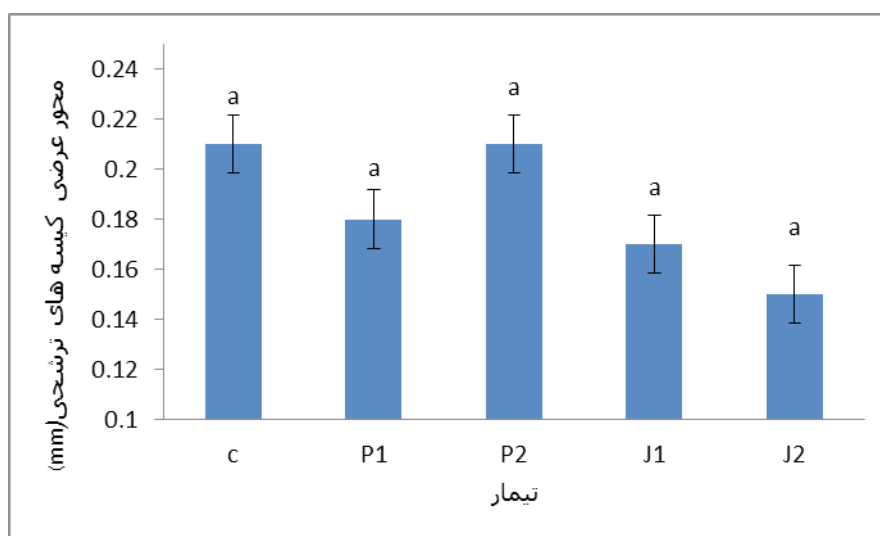
در تایید نتایج بافت‌شناختی، مطالعه‌ی تعداد، اندازه محور طولی و عرضی کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های شاهد و تیمار، نیز تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان نداد (شکل‌های ۷-۹).



شکل ۷. مقایسه تعداد کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های شاهد و تیمار شده. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P > 0.1/0$ است. C شاهد، P1 پوتریسین ۵/۲ میلی مولار. P2 پوتریسین ۵ میلی مولار، J1 متیل‌جاسمونات ۱۰ میکرومولار. J2 متیل‌جاسمونات ۲۰ میکرومولار.

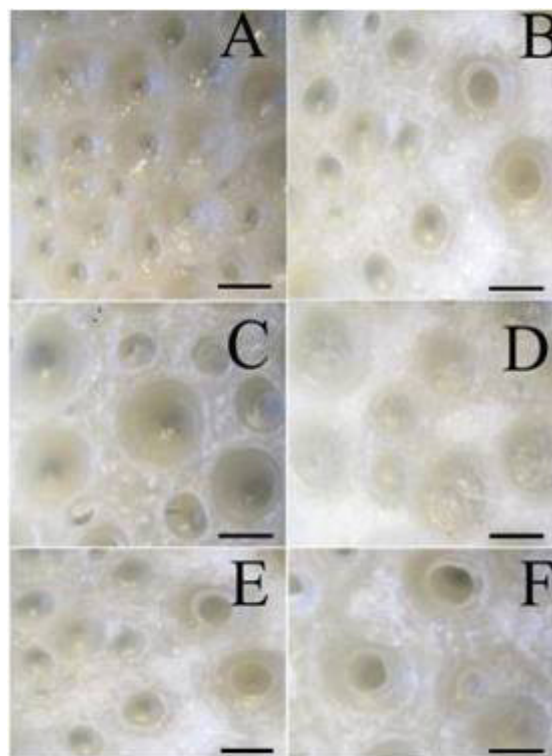


شکل ۸. مقایسه محور طولی کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های شاهد و تیمار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P > 0.01$ است. C شاهد، P۱ پوتریسین ۵/۲ میلی مولار. P۲ پوتریسین ۵ میلی مولار، J۱ متیل‌جاسمون‌ات ۱۰ میکرومولار. J۲ متیل‌جاسمون‌ات ۲۰ میکرومولار.



شکل ۹. مقایسه محور عرضی کیسه‌های ترش‌چی در میوه‌های شاهد و تیمار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P > 0.01$ است. C شاهد، P۱ پوتریسین ۵/۲ میلی مولار. P۲ پوتریسین ۵ میلی مولار، J۱ متیل‌جاسمون‌ات ۱۰ میکرومولار. J۲ متیل‌جاسمون‌ات ۲۰ میکرومولار.

با استفاده از تراشیدن بخش‌های درونی (شکل ۱۰ A-F). مطالعه تعداد و اندازه‌ی مزوکارپ و مطالعه بخش باقیمانده شامل اگزوکارپ و بخش‌های بیرونی مزوکارپ، کیسه‌ها بطور جالب توجه آشکار شدند. نتایج بدست آمده از داده‌های حاصل از برش‌های دستی و میکروتومی بود.



شکل ۱۰. A-F. ساختار کیسه‌ها در نمونه‌های شاهد (A, B)، تیمار پوتریسین (C, D) و متیل‌جاسمونات (E, F) در برش‌های گرفته شده با استفاده از تراشیدن و حذف بخش‌های درونی مزوکارپ با استفاده از استریومیکروسکوپ. مقیاس در A-F برابر با ۰/۵ mm است.

بحث

ابتدایی نمو رخ می‌دهد. بطوری‌که مراحل نموی شامل، بنیان‌گذاری منطقه (حد) کیسه ترش‌حی، تقسیم سلولی در بخش‌های پیرامونی مناطق بنیان‌گذاری شده و سپس تجزیه سلولی و تشکیل حفره‌ی مرکزی دیده می‌شود. سلول‌های پیرامونی سرانجام در تشکیل سلول‌های جداری کیسه دخالت می‌کنند که هم در حفاظت و هم در ترشح مواد بدرون کیسه موثرند. بخش درونی نیز حفره کیسه را تشکیل می‌دهد که بصورت کرووی و نیز بیضی شکل دیده می‌شود. کیسه‌های ترش‌حی در مرکبات بعنوان یک مکان اولیه برای سنتز، دفع و جمع‌آوری

حفره‌ها یا کیسه‌های ترش‌حی، فضاها و ویژه درون بافت‌های گیاهی از جمله پارانثیم هستند که فرآورده‌های ترش‌حی یاخته‌های اطراف، به درون آن‌ها ریخته می‌شود، این فضاها ابتدا کوچک هستند سپس بر اثر افزایش مواد درونی، به حفره وسیع و کیسه‌مانندی تبدیل می‌شوند (Esau, 1965), (Fahn, 1990), Ding et al., (2015). مطالعه مراحل نموی ساختار کیسه‌های ترش‌حی تخمدان‌های جوان در گل‌های در حال باز شدن نشان داد که تشکیل این حفرات مانند اغلب گیاهان تیره Rutaceae در مراحل

روغن‌های ضروری (اسانس‌ها) عمل می‌کنند (Evert, 2006). در برخی مطالعات، محققین زمان تشکیل کیسه‌های ترش‌چی را در مراحل اولیه‌ی رشد میوه می‌دانند و طی بلوغ فقط اندازه کیسه‌ها افزایش می‌یابد (Ford, (1942); Bain, (1958); Bosabalidis and Tsekos, (1982); Knight et al., (2001); Rafiei and Rajaei, (2007); Ding et al., (2015). مطالعات نمو گل و میوه لیموترش نشان داد که نمو کیسه‌های ترش‌چی در مراحل ابتدایی نمو تخمدان و نیز طی نمو میوه انجام می‌شود اما پس از آن فقط بزرگ شدن کیسه رخ می‌دهد و تشکیل جدید کیسه انجام نمی‌شود (رفیعی و رجایی، ۱۳۹۰). در این مطالعه، بنیان‌گذاری و تشکیل کیسه در مراحل اولیه یعنی در مرحله باز شدن گل دیده شد اما در دوره انبارداری و استفاده از تیمارهای شیمایی، اگر چه کیسه‌هایی با اندازه متفاوت دیده شد، بطوری که بنظر می‌رسد انواع کوچک کیسه‌ها در مراحل بلوغ میوه تشکیل شده‌اند و هنوز به مراحل نهایی رشد نرسیدند، اما هیچکدام از مراحل بنیان‌گذاری و تشکیل حفرات در این دوره دیده نشد. روش تشکیل کیسه‌های ترش‌چی در ابتدا بصورت شیزوژنی و در مراحل نمو بعدی به شکل لیزوژنی بود. در این مورد نیز بین محققین مختلف و نیز در گونه‌های مختلف تفاوت وجود دارد. مطالعات انجام شده، نشان داد که تشکیل کیسه‌های

ترش‌چی در میوه‌های جوان نارنگی مدیترانه‌ای به صورت لیزوژنی است (Bosabalidis and Tsekos, (1982). برخی محققین در مطالعه برخی ارقام پرتقال گزارش کردند، تشکیل کیسه در ابتدا به صورت شیزوژن است و در اواخر مرحله رشد میوه به صورت لیزوژن می‌باشد (Knight et al., (2001); Liu et al., (2012). در *C. limon* هم کیسه‌های ترش‌چی در اثر پدیده شیزوژنی بوجود می‌آیند (Turner et al., (1998). در اغلب موارد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول باعث تشکیل کیسه‌های ترش‌چی می‌شود (Ying and Hong, (2010). در مطالعه‌ی حاضر، تشکیل کیسه به هر دو روش شیزوژنی و لیزوژنی دیده شد. محل تشکیل کیسه‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه در زیر اپیدرم و بخش‌های عمقی‌تر یعنی در فلاویدو و بخش‌های بیرونی آلبیدو دیده شد. مطالعات محققین متعدد هم در این مورد مشابه است و آنها نیز محل تشکیل را بیشتر در قسمت برون‌بر و به تعداد کمتر در میان‌بر گزارش کردند (Bennici and Tani, (2004). ساختار کیسه‌های ترش‌چی در پوست میوه‌های شاهد و تیمار شده در این تحقیق از الگوی یکسان و ثابتی پیروی می‌کند. در هیچ یک از گونه‌های مرکبات تاکنون گزارش مقایسه‌ای ارائه نشده است، اما با توجه به الگوی تمایزیابی کیسه‌های ترش‌چی در برگ لیموترش (Turner et al., (1999)، میوه‌ی

در طی نمو میوه لیموترش افزایش یافت (رفیعی و رجایی، ۱۳۹۰)، این موضوع قبلاً در مورد ناول پرتقال گزارش شده است، با شمارش کیسه‌های ترش‌چی در پوست میوه پرتقال ناول هنگام نمو، مشخص شد در طی افزایش اندازه میوه، تعداد کیسه‌های ترش‌چی نسبتاً ثابت می‌ماند (Knight et al., 2001). مطالعات مروری انجام شده در باره اثر این دو هورمون روی ساختارهای ترش‌چی، هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ای را نشان نداد. بنابراین به دلیل فقدان مطالعات در این زمینه، امکان مقایسه و بحث با نتایج محققین دیگر وجود ندارد. بطور کلی در اغلب موارد، ویژگی‌های تشریحی دیرتر از ویژگی‌های فیزیولوژیکی ظاهر می‌شوند، زیرا تغییرات تشریحی انعکاس تغییرات فیزیولوژیکی می‌باشند و طبیعی است که دیرتر ظاهر شوند. به علاوه، در بسیاری موارد، به جز در مورد تنش‌های شدید و در اندام‌های حساس گیاه از جمله گل، ظاهر نمی‌شود. بنابراین، احتمال می‌دهیم که ممکن است نوع گونه‌ی گیاهی و یا غلظت‌های استفاده شده، در گیاهان مختلف اثرات متفاوتی داشته باشند و پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی غلظت‌های متفاوت دیگر (کمتر و بیشتر از غلظت‌های استفاده شده در این مطالعه) نیز مورد بررسی قرار گیرد.

آن (Bennici and Tani, 2004) و مقایسه آنها با نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که الگوی تمایزیابی جزء ویژگی‌های ذاتی بوده، در تمام اندام‌های رویشی و زایشی یک تاکسون مشخص ثابت است. احتمال می‌دهیم در مرحله تیمار، حفرات ترش‌چی تمایز خود را کامل کرده‌اند و به این دلیل تیمارها روی آنها اثر نداشته‌اند و یا اینکه غلظت‌های مورد استفاده برای تحت تاثیر قرار دادن ویژگی‌های ساختاری و تشریحی کافی نیستند زیرا صفات تشریحی نتیجه‌ی تغییرات شیمیایی هستند و پس از تغییرات فیزیولوژیکی یا بیوشیمیایی بروز می‌کنند. بهر حال، بر خلاف مطالعات برخی از محققین که غده‌های روغنی تخمدان را در نزدیکی اپیدرم بیرونی و اغلب آنها را بدون پایه (بدون اتصال به اپیدرم) و تعداد کمتری را نیز پایه‌دار گزارش کردند (Knight et al., 2001)، این مطالعه، تعداد زیادی نیز در لایه‌های عمقی زیر اپیدرمی مشاهده شدند و همچنین در انواع زیر اپیدرمی نیز هیچ پایه یا بخش اتصال دیده نشد. مطالعه تشریحی ساختارهای ترش‌چی نمونه‌های شاهد با تیمار تفاوت آشکار و قابل توجهی نشان نداد. بطور مشابه در مطالعات آماری انجام شده روی تعداد و اندازه محور طولی و عرضی کیسه‌های ترش‌چی، نیز تفاوت معنی‌داری را مشاهده نشد. اندازه کیسه‌های ترش‌چی

منابع

- رفیعی م. و رجایی، ه. ۱۳۹۰. تمایزیابی کیسه‌های ترش‌چی اسانس و رابطه آن با تکوین گل و میوه. لیموترش. زیست شناسی گیاهی، ۸: ۵۹-۶۸.
- Bain, J. M. (1958). Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Australian Journal of Botany 6: 1-24.
- Bennici, A. and Tani, C. (2004). Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora- Morphology Distribution Functional Ecology of Plant 199(6): 464-475.
- Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982). Ultrastructural studies on the Secretory cavity of *Citrus deliciosa* Ten. Development of the essential oil accumulating central space of the gland and process of active secretion. protoplasma vol 63-70.
- Burns, J., Achor, D. S., Echeverria, E. (1992). Ultrastructural studies on the Ontogeny of Grapefruit Juice Vesicles (*Citrus paradisi Macf.* CV Star Ruby). International Journal of Plant Sciences 153 (1): 14-25
- Buvat, R. (1989). Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants. Springer Verlag, Berlin.
- Ding, Y., Chang, J., Ma, Q., Chen, L., Liu, S., Jin, S., Han, J., Xu, R., Zhu, A., Guo, J., Luo, Y., Xu, J., Xu, Q., Zeng, Y., Deng, X., Cheng, Y. (2015). Network Analysis of Postharvest Senescence Process in Citrus Fruits Revealed by Transcriptomic and Metabolomic Profiling. Plant Physiology,
- Evert, R. F. (2006). Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. New phytology 108: 229-257.

- Fahn, A. (1990). Plant Anatomy. 4th edition, pergamon press., New York.
- Ford, E. S. (1942). Anatomy and histology of the Eureka lemon. Botanical Gazette 104: 288-305.
- Graham, E.T. and Joshi, P.A. (1995). Novel fixation of plant tissue, staining section in the paraffin with alcian blue and hematoxylin and improved slide preparation. Bitotechnology and Histochemistry 70: 263-266.
- Knight, T. G., Klieber, A. and Sedgley, M. (2001). The relationship between oil gland fruit development in Washington Navel orange. Annals of Botany 88:1039-1047.
- Liu, P., Liang, S., Yao, N., Wu, H. (2012). Programmed cell death of secretory cavity cells in fruits of *Citrus grandis* cv. Tomentosa is associated with activation of caspase 3-like protease. Trees 26:1821-1835.
- Liang, S J., Wang, H Y. and Yang, M. (2009). Sequential actions of pectinases and cellulases during secretory cavity formation in citrus fruits. Trees 23: 19-27.
- Moreial, M. R., Ponce. A. G., del Valle, C. E. and Roura. S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborn pathogen. LWT-Food Science and Technology, 38: 565-570.
- Nilprapruck, P., Authanithe, F. and P. Keebjan. (2008). Effect of exogenous methyl-jasmonate on chilling injury and quality of pineapple. Silpakorn University Science and Technology 2, 33-42.
- Rafiei, M and Rajaei, H. (2007). Structural and Developmental studies on Oil producing reproductive organs in Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). Journal of Biological Sciences 7 (6): 848-853.
- Siboza, X. I., Bertling, I and Odindo, A. O. (2014). Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). Journal Plant Physiology 171(18):1722-31.
- Tiburcio, A. F., Altabella, T., Borrell, A. and Masgrau, C. (1997). Polyamine Metabolism and its regulation. Physiology Plantarum 100: 664-679.
- Takahashi, T and Kakehi, J. I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. Annals of Botany 105: 1-6.

- Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y. and Martinez, J. R. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* 697: 501-513.
- Turner, G. W., Berry, A. M. and Gifford, E. M. (1998). Schizogenously secretory cavities of citrus limon. *Journal Plant Science* 159: 75-88.
- Ying, C. and Hong, W. (2010). Programmed cell death involved in schizogenously formation of the secretory cavity in *Citrus sinensis* L. *Chinese Science Bulletin* 55: 2160-2168.