بررسی مشکلات جوانه‌زنی و روشهای شکستن خواب بذر سیاه‌گینه (*Dendrostellera lessertii* Van Tiegh)

مه‌لقا قربانلی[1]، عباس قمری زارع[2] و شیدا حسینی[3]

چکیده

سیاه‌گینه (*Dendrostellera lessertii* Van Tiegh) گونه‌ای بوته‌ای است که در عرصه‌های مراتع ایران گسترده است. از آنجا که این گیاه برای دام غیرخوشخوراک است، مورد توجه محققان و مرتعداران قرار نگرفته است. عصاره سمی برگهای سیاه‌گینه به‌طور قابل توجهی تکثیر سلولهای سرطانی را کاهش می‌دهد و از تکثیر تصاعدی آنها جلوگیری می‌کند. اثر ترکیب خالص عصاره سلولهای برگ این گیاه بر روی فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در چهار نوع سلولهای سرطانی انسان مؤثر است. برای تولید وسیع، اهلی کردن و اصلاح این گیاه دارویی، شناخت و بررسی روشهای تکثیر از طریق بذر آن ضروری است. یکی از عوامل مهم در ارزیابی کیفیت بذر، بررسی چگونگی جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی بذر است. بذرهای مورد نیاز این تحقیق از چند رویشگاه مختلف، از استانهای مرکزی و اصفهان جمع‌آوری شد. تیمارهای اعمال شده بر روی بذرها شامل پیش تیمار سرما، نیترات پتاسیم (KNO_3)، اسید جیبرلیک (GA_3)، شن گلدانی، اسید سولفوریک ۹۵٪ (H_2SO_4) و شاهد بودند. برای ضدعفونی کردن نمونه‌های بذری هر تیمار از محلول ضدعفونی کننده محلول ویتاواکس به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. آزمون اولیه در دو دمای ثابت (۲۵°C) و دمای متناوب (۲۰°C- ۲۵) انجام پذیرفت. میزان جوانه‌زنی و رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه با تیمارهای مذکور در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی انجام و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ = α مورد تجزیه قرارگرفتند. در میان تیمارهای بکار گرفته شده، بیشترین جوانه‌زنی در تیمار اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه بدست آمد. دشوار بودن جوانه‌زنی بذرهای سیاه‌گینه احتمال دارد که ناشی از بازدارندگی پوسته‌ای آن باشد که می‌توان با روشهای خراش‌دهی شیمیایی یا مکانیکی آنرا برطرف نمود. لازم به ذکر است که در طبیعت پوسته سخت و غیر قابل نفوذ بذرهای سیاه‌گینه به عنوان مزیتی ارزشمند از این گیاه برای حفظ و تداوم نسل این گونه دارویی در شرایط خشک و نیمه خشک ایران به شمار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: سیاه‌گینه (*Dendrostellera lessertii*)، گیاه دارویی، جوانه‌زنی، پیش سرمادهی، بازدارندگی پوسته‌ای، خراش‌دهی شیمیایی و مکانیکی.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۲- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران ص. پ ۱۱۶ ف ۱۳۱۸۵
۳- دانشگاه پیام نور تهران

مقدمه

سیاه‌گینه (*Dendrostellera lessertii* Van Tiegh)، گیاهی بوته‌ای خشبی و از گونه‌های تیره مازریون (Thymelaeceae)است که به صورت طبیعی و خودرو در قسمت عمده‌ای از مراتع ایران می‌روید. گونه‌های این تیره بیشتر درختچه‌ای یا بوته‌ای و به‌ندرت علفی و دارای بیش از ۵۰ جنس و ۵۰۰ گونه می‌باشد که اغلب در نیمکره جنوبی مانند استرالیا و جنوب آفریقا یافت می‌شوند (اخیانی، ۱۳۷۴). در میان گیاهان این تیره، گونه‌های مهم دارویی نیز وجود دارد که بسیاری از آنها هنوز شناخته نشده است (زرگری، ۱۳۶۹).

سیاه‌گینه از جمله گیاهانی است که عصاره سمی برگهای آن خاصیت دارویی و اثر ضد توموری دارد. اثر عصاره برگهای این گیاه بوته‌ای، روی فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز[1] در چهار سری از سلولهای سرطانی انسان بررسی شده است (Sadghi و همکاران، ۲۰۰۲). از برگهای این گیاه یک استردی‌ترپن[2] جدا کرده‌اند. با استخراج این استر جدید، اثر این عصاره سمی برگی را روی چهار سری سلول لوسیمیایی، سلول سرطانی پروستات و سلول سرطانی تیروئید مورد بررسی قرار دادند. این ترکیب خالص عصاره سلولی به طور قابل توجهی تکثیر سلولهای سرطانی را کاهش داد و همچنین از پیشرفت و ازدیاد سلولهای سرطانی در مرحله عبور از G_1 به S نیز جلوگیری کرد (Sadghi و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین برای تولید انبوه این گیاه با خواص یکسان و حفظ ذخایر ژنتیکی، تداوم تولید سیاه‌گینه و همچنین جلوگیری از تخریب منابع طبیعی، مطالعه تکثیر جنسی (جوانه‌زنی) این گیاه دارویی ضروری به‌نظر می‌رسد. برای ارزیابی کیفیت بذر، جوانه‌زنی، سرعت تجمعی جوانه‌زنی و شاخص بهینه بذر سه عامل مهم هستند. آزمون جوانه‌زنی یا به‌طور مصنوعی‌تر آزمایش ترازولیوم (که زنده بودن

1- Alkalin phosphatase
2- Ester diterpen

بذر را نشان می‌دهد)، آزمونهایی برای تعیین قوه نامیه بذرها هستند (علیزاده و عیسوند، ۱۳۸۰).

اولین نشانه‌های قابل رؤیت جوانه‌زنی بذر، خروج ریشه‌چه از پوسته بذر است. در موارد خاصی نیز، اولین نشانه‌های قابل رؤیت، خروج ساقه‌چه است که در بذر علف شور (*Salsola* spp.) مشاهده می‌شود (Mayer و Mayber– Poljakaff، ۱۹۸۹). به دنبال خروج ریشه‌چه، ساقه‌چه به‌صورت یک اندام زیرزمینی که هنوز قادر به فتوسنتز نیست، رشد می‌کند. آماده‌سازی اولیه بذر برای آزمون جوانه‌زنی شامل: خیساندن بذر، بر طرف کردن هر نوع رکود بذر (مکانیکی، شیمیایی یا مورفولوژیکی) و استفاده از مواد رشد گیاهی (هورمونها) است. جوانه‌زنی، به مواد رشد گیاهی درونی و شرایط محیطی حساس است. گزارشهای متعددی نشان می‌دهد که جیبرلین‌ها اثر تحریک کننده، سایتوکنین‌ها نقش تنظیم کننده و اسید آبسیزیک (ABA) اثر باز دارنده در جوانه‌زنی بذرها دارند (Qamaruddin، ۱۹۹۱). از سایر مواد نیز نیترات پتاسیم، تیواوره[1]، فوزیکوکسین، کاتی‌لنین[2]، براسینولید و استریگول نیز در شرایط ویژه، اثر تحریک کننده بر جوانه‌زنی دارند (Ellist و همکاران، ۱۹۸۵).

بذرهای سیاه‌گینه پوشش سخت و غیر قابل نفوذی دارند. به‌نظر می‌رسد که این سختی و مقاومت مکانیکی پوسته بذر باعث شود تا جوانه‌زنی بذرها با مشکل مواجه گردد. هدف از این پژوهش رفع این مقاومت‌ها با استفاده از روشهای مختلف مکانیکی (خراش دادن پوسته با سوهان یا اسکالپل) یا مواد شیمیایی (استفاده از اسید سولفوریک، اتر و تیمار آب داغ) می‌باشد. به منظور شکستن خواب بذرهای گونه‌های درختچه‌ای یا بوته‌ای و تحریک جوانه‌زنی آنها با توجه به شرایط رویشگاهی و نیازهای

1- Thiourea
2- Catinglenin

اکولوژیکی، تیمارهای مختلفی از جمله سرمادهی[1] در دماهای مختلف با دوره‌های متفاوت، خراش‌دهی[2] با عوامل مکانیکی یا شیمیایی، قرار دادن بذر در آب داغ، استفاده از مواد شیمیایی نظیر نیترات پتاسیم و اسید جیبرلیک در محیط جوانه‌زنی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نتیجه تیمارهای مختلف برای جوانه‌زنی بذرهای سیاه‌گینه (*D. lessertii*)، به‌منظور رفع عوامل بازدارنده جوانه‌زنی و امکان ایجاد مزرعه یکنواخت برای بذرهای این گیاه بکار خواهد رفت.

مواد و روشها

بذرهای مورد نیاز این تحقیق از مناطق گلپایگان (کوه حاجی قارا)، شازند (قره کهریز) و قشلاق (جاده گوار) از استانهای مرکزی و اصفهان در سال ۱۳۸۲ جمع‌آوری شد. برای تعیین قوه نامیه[3] بذرها از محلول تترازولیوم ۰/۵ درصد استفاده شد لیکن به‌رغم تازه بودن بذرها (بذرهای سال جاری)، به‌دلیل پوسته سخت و پوشش شبه موسیلاژ اطراف لپه‌های بذرها، فقط ۲۶/۶ درصد بذرها واکنش مثبت نشان دادند. بنابراین بررسی در قالب یک طرح بلوکهای کاملا تصادفی با ۵ تیمار پیش سرمادهی[4] به مدت ۴ هفته، نیترات پتاسیم ۰/۲٪ (KNO_3)، اسید جیبرلیک ۱۰۰ و PPM،۲۰۰ به‌مدت ۲۴ ساعت، شن گلدانی، اسید سولفوریک ۹۵٪ به‌مدت ۵ دقیقه در ۳ تکرار مورد آزمون قرار گرفت. قبل از شروع و کشت بذرها در پتری‌دیش، برای ضدعفونی نمودن بذرها، آنها را در محلول ضدعفونی کننده محلول ویتاواکس به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور نموده و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس تعداد ۲۰ عدد بذر بر روی دو لایه کاغذ صافی وایتمن در داخل پتری‌دیش قرار گرفتند. به هر پتری‌دیش مقدار کافی آب

1- Stratification
2- Scarification
3- viability
4- Prechiling

مقطر (۵ میلی‌لیتر) اضافه شد و در دستگاه ژرمیناتور با دمای متناوب (۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی، دمای دوره روشنایی۲۵°C و دوره تاریکی ۲۰°C) و دمای ثابت (۲۰°C)، رطوبت نسبی محیط ۷۰٪ و شدت نور ۱۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. در اعمال تیمار پیش سرمادهی، مدت اعمال سرما برای بذرها به‌ترتیب یک هفته، دو هفته، سه هفته و چهار هفته سرمادهی در دمای ۵°C و سپس انتقال به شرایط طبیعی در دو دمای ثابت و متناوب بود. بذرهای جنین‌دار سایر تیمارها (به غیر از شن گلدانی) نیز پس از ضدعفونی در دو لایه کاغذ صافی برای تیمار مربوطه قرار گرفتند. پتری‌دیش‌ها یا گلدانهای حاوی بذر واقع در ژرمیناتور به طور روزانه سرکشی می‌شدند و ضمن تأمین رطوبت آنها در حد مطلوب (به گونه‌ای که هیچ لایه‌ای از آب در اطراف بذر تجمع پیدا نکند) تغییرات جوانه‌زنی آنها ثبت می‌شد.

نتایج

نظر به اینکه هیچ بذری در دمای متناوب جوانه نزد، بنابراین فقط نتایج جوانه‌زنی در دمای ثابت ۲۰°C مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پنج تیمار شامل پیش سرمادهی در دمای ۴°C به مدت ۴ هفته، نیترات پتاسیم ۰/۲٪ (KNO_3)، اسید جیبرلیک با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ PPM، شن گلدانی و اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه اختلاف معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی بذر سیاه‌گینه داشتند (جدول شماره ۱). مقایسه میانگین‌ها برای تیمارها اعمال شده بر بذرهای سیاه‌گینه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ = α نشان داد که تیمار اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها برتر بود و سبب افزایش درصد جوانه‌زنی شد. اما میان تیمارهای پیش سرمادهی در دمای ۴°C به مدت ۴ هفته، نیترات پتاسیم ۰/۲٪ (KNO_3)، اسید جیبرلیک با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ PPM و شن گلدانی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و همگی آنها در یک دسته (b) قرار گرفتند. کمترین درصد

جوانه‌زنی به تیمارهای اسید جیبرلیک و نیترات پتاسیم تعلق داشت که در آنها هیچ بذری سبز نکرد (جدول شماره ۲). همچنین استفاده از تیمار اسید سولفوریک ۹۵٪ به‌مدت بیش از ۵ دقیقه در آزمایشهای مقدماتی سبب آسیب رساندن به جنین و عدم ظهور گیاهچه گردید.

جدول شماره ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر پنج تیمار شامل پیش سرمادهی در دمای۴°C به مدت ۴ هفته، نیترات پتاسیم ۰/۲٪ (KNO_3)، اسید جیبرلیک با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ PPM، شن گلدانی و اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه بر جوانه‌زنی سیاه‌گینه (*D. lessertii*)

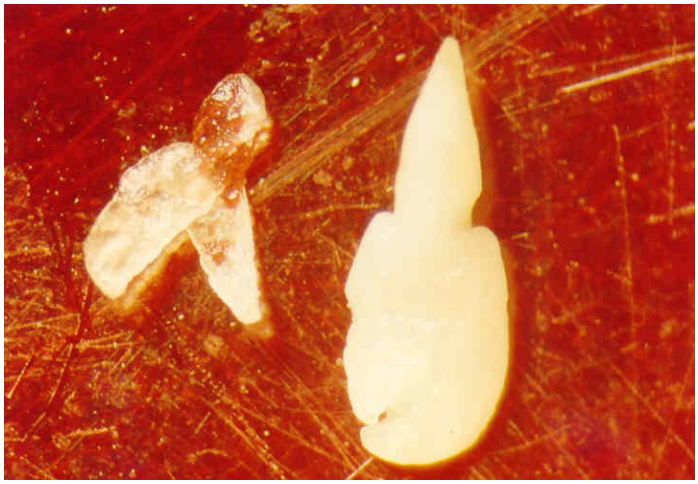
منابع تغییرات	df	مجموع مربعات SS	میانگین مجموع مربعات MS	F
تکرار	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۰ ns
تیمار	۴	۱۰۷/۰۰۰۰	۲۶/۷۵۰۰	/۶۷۰۰** ۳۵
اشتباه	۴	۳/۰۰۰۰	۰/۷۵۰۰	-
کل	۹	۱۱۰/۰۰۰۰	-	-

ns: تفاوت میان تیمارها معنی دار نیست و **: تفاوت میان تیمارها در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

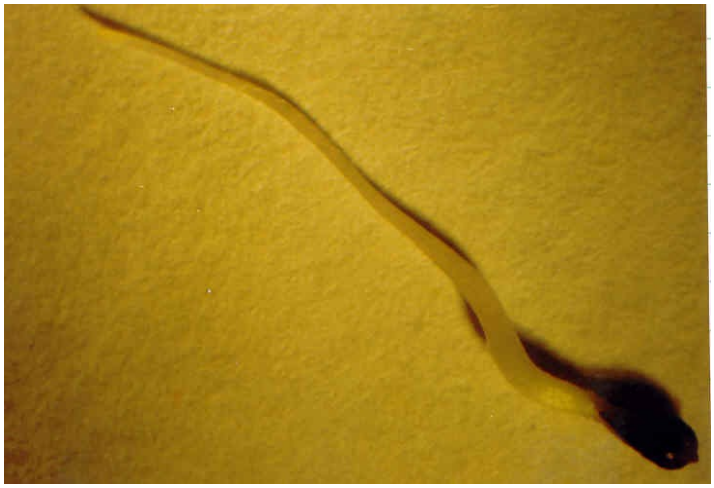
جدول شماره ۲- مقایسه میانگین ۵ پیش تیمار مختلف بر جوانه‌زنی بذرها سیاه‌گینه (*D. lessertii*) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

ردیف	پیش تیمار جوانه‌زنی بذر	درصد جوانه‌زنی
۱	اسید سولفوریک ۹۵٪	۳۱/۳۳a
۲	پیش سرمادهی	۴/۶۷b
۳	شن گلدانی	۲/۳۳b
۴	اسید جیبرلیک	۰/۰۰۰b
۵	نیترات پتاسیم	۰/۰۰۰b

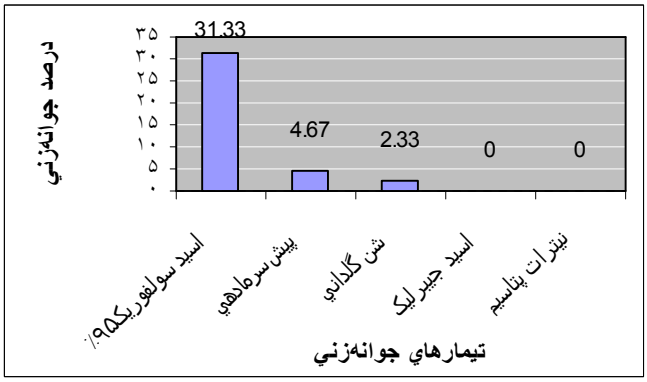
میانگین‌ها با حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵٪ = α اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل شماره ۱- مقایسه بذرهای جنین‌دار (سمت راست) و بدون جنین (سمت چپ) سیاه‌گینه



شکل شماره ۲- جوانه‌زنی بذرهای سیاه‌گینه در پیش تیمار جوانه‌زنی اسید سولفوریک ٪۹۵ به مدت ۵ دقیقه



شکل شماره ۳- اثر تیمارهای مختلف بر درصد جوانه‌زنی بذرهای سیاه‌گینه

بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد که این اولین مطالعه در مورد جوانه‌زنی سیاه‌گینه است. زیرا به‌علت سمیت برگها و عدم خوشخوراکی، این گیاه کمتر مورد توجه بوده و تحقیقات اندکی در مورد آن انجام یافته است. سختی بذرهای (hard seeds) گونه‌های گیاهی وحشی جزء خواص مفید آنان محسوب شده و موجب بقاء اینگونه گیاهان در شرایط نامسائد می‌گردد. برای بر طرف نمودن خواب بذر سیاه‌گینه (به سبب سختی پوشش)، اعمال تیمار خراش‌دهی مناسب و سودمند می‌باشد (جدولهای شماره‌های ۱ و ۲). سختی پوشش بذر بسیاری از گونه‌های نخودیان (Fabaceae) باعث می‌شود که جوانه‌زنی بذر آنها با مشکل مواجه شود (Dais، ۱۹۷۰). در مطالعاتی که در مورد بذرهای شب خسب (*Albizia julibrissin*) و خرنوب (*Ceratonia siligna*) صورت گرفته است نشان داده شد که برای برطرف کردن خواب بذر شب خسب (به سبب سختی پوشش) نیز اعمال تیمار خراش‌دهی شیمیایی مناسب و سودمند بوده است. اما در مورد بذر خرنوب چنین تیماری به‌رغم کاهش ممانعت فیزیکی پوشش، مضر بوده و توصیه نمی‌شود. اما برای خواب بذر شب خسب به واسطه سختی پوشش کاربرد

تیمارهای مکانیکی و شیمیایی سودمند است (نصیری و عیسوند، ۱۳۸۰). مطالعاتی هم که در زمینه ریزازدیادی سیاه‌گینه انجام شد (داده‌ها منتشر نشده است)، نشان داد که خراش‌دهی مکانیکی (با سوهان و اسکالپل) برای جوانه‌زنی سریع بذرها مفید است. سایر تیمارهای اعمالی از جمله پیش سرمادهی و اسید جیبرلیک برای غلبه بر بازدارندگی پوسته بذر، تفاوت معنی‌داری با شرایط طبیعی ندارند. با اینکه در بذر بسیاری از گونه‌ها اعمال تیمار پیش‌سرمادهی باعث اثر بر مواد بازدارنده موجود در پوسته و یا جنین شده و آنها را به موادی تبدیل می‌کند که خاصیت بازدارندگی ندارند، در نتیجه فرایند جوانه‌زنی در اینگونه بذرها پس از اعمال تیمار پیش سرمادهی تحریک می‌شود یا اثر اسید جیبرلیک که باعث کاهش غلظت اسید آبسیزیک (ماده بازدارنده) شده و عمل جوانه‌زنی را تسریع می‌کند (علیزاده و عیسوند، ۱۳۸۰). لیکن در بذر سیاه‌گینه هیچ کدام از تیمارهای مذکور اثری بر حذف بازدارندگی پوسته سخت بذر نداشت و از داده‌های حاصل از این بررسی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تیمار با اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه می‌تواند جانشین مناسبی برای همه تیمارهای فوق باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در بخش تحقیقات بانک ژن منابع طبیعی ایران با همکاری بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع انجام گرفت. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه همکاران بخش‌های فوق به‌خصوص آقایان مهندس عیسوند و دکتر عارفی قدردانی می‌گردد.

منابع

اخیانی، خدیجه ۱۳۷۴. فلور ایران تیره مازریون. شماره ۱۵، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، ایران.

زرگری، علی ۱۳۶۹. گیاهان دارویی. جلد چهارم، چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ایران.

علیزاده، محمدعلی و حمیدرضا عیسوند ۱۳۸۰. بررسی درصد جوانه‌زنی، سرعت تجمعی جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر ۹ گونه دارویی تحت شرایط آزمایشگاهی مطلوب و پیش سرما. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران (۷)، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، ایران.

نصیری، محسن و حمید رضا عیسوند ۱۳۸۰. بررسی اثر اسید سولفوریک بر شکستن خواب و جوانه‌زنی بذرهای شب خسب و خرنوب. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران (۸)، انتشارات مؤسسه تحقیقاتی جنگلها و مراتع، تهران، ایران.

Dais SC, P.H. 1970 Flora of Turkey and the Eat Aegean Islands. Edinburgh University Press.

Ellis, R.H., Hong, T.D. and Roberts, E.H. 1985. Hand Book of Seed Technology for Gene Bank. V. 2. P, 475. Rome. International board for plant genetic resources.

Mayer, A.M. and Poljakoff–Mayber, A. 1989. The Germination of Seeds. Fourth Edition, Pergamon Press, London.

Qamaruddin, M. 1991. Appearance of the zeatin riboside type of cytokine in *Pinus sylvestris* seeds after red light treatment. Scand. JF or Res, 6:41-46.

Sadghi, H., Yazdanparast, R., Smith, D.L. 2002. Isolation and structure elucidation of a new potent antineophastic diterpene from *Dendrostellera lessertii.*