

## روشهای مؤثر در شکست خواب و افزایش جوانه‌زنی بذر ریواس (*Rheum ribes L.*)

معصومه نبئی<sup>۱\*</sup>، پرتو روشندل<sup>۲</sup> و عبدالرحمان محمدخانی<sup>۳</sup>

\*- نویسنده مسئول، فوق لیسانس فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک

پست الکترونیک: mnabaei168@yahoo.com

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۹

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۸۹

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۸

### چکیده

ریواس (*Rheum ribes L.*) یکی از گونه‌های خانواده ترشک (Polygonaceae) می‌باشد که در ایران می‌روید و در طب سنتی از جایگاه ارزشمندی برخوردار است. بذره‌های ریواس به علت خواب به سختی جوانه می‌زنند. در پژوهش حاضر یافتن مناسبترین روش برای برطرف نمودن خواب بذر این گیاه مورد مطالعه قرار گرفته است. برای این هدف تیمارهای مختلفی جهت غلبه بر خواب بذر مورد استفاده قرار گرفت، از جمله: آب داغ (۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه)، سرمادهی مرطوب در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز)، اسید سولفوریک (۵ و ۱۵٪)، نیترات پتاسیم (۰/۲٪، آب جاری، اسید جیبرلیک، کینتین، اکسین (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰)، هورمون ۲۴-اپی‌براسینولید (۰/۵ و ۱ ppm) (همگی در دو سطح تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت) و تیمار تلفیقی اسید جیبرلیک (۵۰۰ ppm) و سرمادهی (برای مدت زمان ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز). نتایج نشان داد که خواب بذره‌های مذکور از نوع فیزیولوژیک است، زیرا بیشترین درصد جوانه‌زنی بذرها (۹۶٪) در اثر اعمال تیمار تلفیقی پیش سرمادهی مرطوب (به مدت ۲۵ روز) و اسید جیبرلیک (۵۰۰ ppm) بدست آمد. علاوه بر این، تأثیر سرمادهی مرطوب (به‌تنهایی) نیز بر شکست خواب بذره‌های ریواس (افزایش جوانه‌زنی تا ۸۹٪) قابل توجه بود. به طوری که تأثیر هورمون‌های استفاده شده (در مؤثرترین غلظت و مدت زمان تیمار) اگرچه از نظر آماری بر شکست خواب این بذرها معنی‌دار ارزیابی شد ولی در مقایسه با تأثیر چشمگیر تیمار همزمان سرما و اسید جیبرلیک چندان در خور توجه نبود. از طرف دیگر عدم تأثیر نیترات پتاسیم، آب جاری، آب داغ و اسید سولفوریک بر شکست خواب بذره‌های مذکور مؤید آن است که خواب این بذرها از نوع فیزیکی یا تجمع مواد بازدارنده رشد در پوسته دانه نمی‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی: ریواس (*Rheum ribes L.*)، شکست خواب بذر، پیش سرمادهی مرطوب، اسید جیبرلیک.

### مقدمه

ریواس یکی از گونه‌های تیره ترشک می‌باشد. این گیاه علاوه بر داشتن خواص دارویی مهم، از نظر منابع طبیعی نیز به علت رویدن در عرصه‌های سرد- استپی ایران ارزشمند است. ریواس گیاهیست چند ساله با برگهای بسیار بزرگ و پهن، ساقه‌ی خزنده‌ی زیرزمینی و گل‌های

نر- ماده که تولید میوه فندقه سه گوش می‌کند. ریواس به دلیل دارا بودن ویتامین‌های C و A و املاح کلسیم، سدیم و پتاسیم و همچنین ترکیب‌های آنترکینونی و اسید اگرالیک دارای اثرهای دارویی برای انسان می‌باشد. خوردن ریواس برای درمان بیماریهایی مانند یرقان و وسواس مفید بوده و مقوی قلب، اعصاب، معده و کبد

به‌عنوان یک گروه جدید از تنظیم‌کننده‌های رشد با اثرهای زیستی قابل توجه در نظر گرفته می‌شوند. براسینواستروئیدها از جمله هورمون‌های مؤثر بر جوانه‌زنی بذرهای می‌باشند. گزارش شده است که تیمار بذرهای تره‌تیزک (Held *et al.*, 1996)، اکالیپتوس (Sairam *et al.*, 1996)، گندم (Sasse *et al.*, 1995)، تنباکو (Leubner-Metzger, 2001) و گل جالیز (Takeuchi *et al.*, 1995) با BRs باعث بهبود و افزایش درصد جوانه‌زنی آنها می‌شود. از طرف دیگر، تیمار بذرهای با BRs باعث جوانه‌زنی موتانت‌هایی می‌شود که در مسیر سنتز جیبرلین نقص دارند (Steber & McCourt, 2001). گزارش شده است که براسینواستروئیدها در غلظت (0/01 ppm) باعث افزایش تجزیه اندوسپرم دانه‌های خیس خورده تنباکو در نور می‌شود. البته براسینواستروئیدها باعث مهار اثرهای منفی ABA روی جوانه‌زنی نیز می‌شوند (Birgit *et al.*, 2005). منابع متعددی به اثر سیتوکینین‌ها در بر طرف نمودن خواب اشاره داشته‌اند (Aberlence-Bertossi *et al.*, 1999؛ Bialek *et al.*, 1992؛ Naidu & Rajendrudu, 2001). در بررسی خواب بذر کرفس نقش بازدارنده‌های جوانه‌زنی در خواب بذر این گیاه مشخص شده و نشان داده شده است که سیتوکینین‌ها قادرند عمل بازدارندگی ABA را برطرف نمایند (Thomas *et al.*, 1975). سیتوکینین‌ها با تحریک سنتز DNA و RNA در دانه‌ها رشد و تقسیم سلولی در رویان دانه را تسهیل نموده و به جوانه‌زنی کمک می‌کنند (Chiwocha *et al.*, 2005) و یا با افزایش فعالیت  $\alpha$ -آمیلاز و هیدرولیز نشاسته و یا با افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی و در نتیجه انتقال سریعتر مواد بر روی جوانه‌زنی اثرگذار هستند (Li & Leung, 2000).

برخی منابع تأثیر اکسین (IAA) را بر شکست خواب بذر ناچیز می‌دانند، اما برخی دیگر معتقدند اکسین نیز می‌تواند در تحریک جوانه‌زنی بذرهای داشته باشد. به‌نظر می‌رسد اکسین نقش مهمتر را در جنین‌زایی ایفا

است (زرگری، ۱۳۷۵). بذر ریواس به‌علت خواب به سختی جوانه می‌زند. بنابراین بررسی روشهای شکست خواب آن به منظور کشت وسیع آن به‌عنوان یک گیاه دارویی و یا احیای گستره‌های طبیعی آن حائز اهمیت است. روشهای متفاوتی برای شکست خواب بذر گونه‌های مختلف تیره ترشک و تسریع در جوانه‌زنی آنها توسط دانشمندان پیشنهاد شده است، از جمله بکارگیری تیمارهای مربوط به پوست دانه، شستشو در آب، پیش‌سرمادهی، نترات پتاسیم، نور و تناوب‌های دمایی (Ellis *et al.*, 1985).

هورمون‌های گیاهی یا مواد تنظیم‌کننده رشد در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاه شرکت دارند. تحقیقات نشان می‌دهد که بسیاری از هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین، جیبرلین، سیتوکینین، اتیلن و اسید آبسزیک (ABA) احتمالاً از راههای مشخصی که منجر به کنترل عملکرد اسیدهای نوکلئیک می‌شود، در تحریک جوانه‌زنی و یا خواب بذر نقش دارند (Koorneff *et al.*, 2002). بسیاری از پژوهشگران معتقدند که برطرف شدن خواب از طریق تعادل بین مواد بازدارنده رشد مانند ABA و مواد تحریک‌کننده رشد گیاه مانند جیبرلین (GA)، حاصل می‌شود. طبق نظریه تعادل هورمونی که بیان می‌دارد ABA و GA در مراحل مختلف تکوین دانه نقش‌های متفاوتی را ایفا می‌کند، ABA القاء‌کننده خواب طی بلوغ دانه است و GA نقشی کلیدی در شکست خواب و شروع جوانه‌زنی دارد. به تعبیر دیگر، نسبت GA: ABA، کنترل‌کننده پدیده جوانه‌زنی دانه‌هاست. بررسی منابع نشان می‌دهد (رحیمیان و خسروی، ۱۳۷۵) که در بسیاری از بذرهای نیازمند به سرما مانند فندق و افرا چناری، سرما منجر به کاهش مقادیر ABA و افزایش مقادیر اسید جیبرلیک در بذر می‌شود و جوانه‌زنی را تحریک می‌کند. تضاد عمل این دو هورمون می‌تواند مربوط به تشابه ساختاری آن دو باشد، زیرا اسید آبسزیک یک سزکوئی‌ترین است. براسینواستروئیدها (BRs)

ساعت تاریکی و دمای  $21 \pm 1$  °C نیز رعایت گردید (برای کلیه بذرها و در تمامی تیمارها). برای ایجاد شرایط مربوط به تاریکی از دستگاه انکوباتور (مدل Memmort ساخت کشور آلمان) و برای ۸ ساعت روشنایی ظروف پتری در محیط آزمایشگاه و در مجاورت نور خورشید قرار داده شدند. همچنین قابل ذکر است که برای اعمال تیمارهای هورمونی، بذرها ریواس برای دو مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت درون هورمون‌های مذکور داخل انکوباتور (دمای  $21 \pm 1$  °C) و شرایط تاریکی قرار گرفتند. آزمایشها در قالب طرح کامل تصادفی و به صورت فاکتوریل با سه تکرار (تعداد ۳۰ عدد بذر در هر تکرار) و تیمارهای زیر انجام گردید.

۱- تیمار تلفیقی اسید جیبرلیک (در غلظت ۵۰۰ ppm، زیرا در این مجموع آزمایشها مؤثرترین میزان اسید جیبرلیک، غلظت ۵۰۰ ppm بود) و سرمادهی (به مدت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز).

۲- پیش‌سرمادهی مرطوب بذرها در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد در پنج سطح زمانی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز).

۳- خیساندن بذرها در هورمون اسید جیبرلیک با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

۴- خیساندن بذرها در هورمون کینتین با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

۵- خیساندن بذرها در هورمون اکسین با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

۶- خیساندن بذرها در هورمون ۲۴-اپی‌براسینولید با غلظت‌های ۰/۵ ppm و ۱ (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

۷- خیساندن بذرها در اسید سولفوریک ۷۵٪ (به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه).

می‌کند. اکسین بیان کاتالاز را در اسکوتلوم دانه‌های ذرت جوانه‌زده تنظیم می‌کند (Guan & Scandalios, 2002). وابستگی بین اکسین، خواب دانه و جوانه‌زنی در گیاه گندم گزارش شده است (Steber & McCourt, 2001). حداکثر میزان اکسین آزاد، قبل از شروع رشد ریشه بوده و همزمان با شروع تورم و طی جذب آب می‌باشد (Bialek *et al.*, 1992). گزارش شده است که اکسین طی جوانه‌زنی دانه‌های گیاه کاج اسکاتلندی از جایگاه‌های ذخیره‌ای خود آزاد می‌گردد (Li & Leung, 2000).

هدف از تحقیق حاضر تعیین تأثیر مواد شیمیایی نظیر هورمون‌های گیاهی (۲۴-اپی‌براسینولید، کینتین، اکسین و اسید جیبرلیک) و نترات پتاسیم، اسکاریفیکاسیون اسیدی (با اسید سولفوریک) و اسکاریفیکاسیون مکانیکی (با آب داغ، آب جاری و سرمادهی مرطوب) روی جوانه‌زنی و یافتن روشهای مؤثر برای شکست خواب بذرها گیاه ریواس به‌عنوان قدمی آغازین در اهلی کردن این گیاه است، زیرا به‌رغم اهمیت دارویی-خوراکی و اکولوژیکی گیاه ریواس در ایران، تاکنون تحقیق جامعی پیرامون غلبه بر خواب بذر آن انجام نشده است.

## مواد و روشها

بذر گیاه ریواس از فروشگاه گیاهان دارویی در شهر اصفهان خریداری شد. پس از جدا کردن بذرها یکسان از نظر اندازه، بذرها با سدیم هیپوکلریت ۱۰٪ ضدعفونی شدند و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل برای اعمال تیمارها مورد استفاده قرار گرفتند. با انجام آزمایش‌های اولیه (در شرایط رطوبت کافی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) معلوم شد که بذرها تازه و دارای قوه نامیه در شرایط معمولی قادر به جوانه‌زنی نیستند (بیش از ۹۸٪ بذرها مذکور در این شرایط جوانه نزدند) و به‌عبارت دیگر این بذرها در مرحله خواب به سر می‌برند. در این تحقیق به منظور افزایش جوانه‌زنی بذرها تناوب نوری و دمایی (۸ ساعت نور و دمای  $16/27 \pm 2$  °C

درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ bar به مدت ۲ ساعت استریل شدند.

نخستین شمارش جوانه‌زنی در سومین روز و آخرین شمارش ۲۴ روز پس از اعمال تیمارها انجام گردید. بذرهایی که ریشه‌چه آنها قابل رؤیت بود (یعنی طولی در حدود ۲ میلی‌متر داشت)، به‌عنوان بذر جوانه‌زده شمارش و نتایج یادداشت شد. سپس با استفاده از دو فرمول زیر به‌ترتیب درصد و سرعت جوانه‌زنی محاسبه گردید (علیزاده و عیسوند، ۱۳۸۳):

$$100 \times (\text{تعداد کل بذرها} / \text{تعداد بذر جوانه‌زده}) = \text{درصد جوانه‌زنی}$$

$$(\text{روز n} / \text{تعداد بذر جوانه‌زده در روز n}) = \text{سرعت جوانه‌زنی}$$

تا در سطح تیمار ۲۵ روز به حداکثر خود رسید (یعنی ۹۶٪ جوانه‌زنی و ۵ عدد بذر جوانه‌زده در روز) (شکل ۱).

#### تیمار پیش‌سرمادهی مرطوب

بررسی تأثیر سطوح مختلف سرمادهی در ۲ درجه سانتی‌گراد و در پنج سطح زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز بر گیاه ریواس نشان داد که این تیمار باعث افزایش معنی‌داری بر درصد و سرعت جوانه‌زنی می‌شود ( $P < 0/01$ ). با افزایش مدت زمان سرمادهی از ۵ روز به ۲۵ روز مرتباً و به‌طور همگام بر درصد و سرعت جوانه‌زنی افزوده شد، به‌طوری‌که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۸۹٪) و سرعت جوانه‌زنی (۶ عدد بذر جوانه‌زده در روز) در سرمادهی ۲۵ روزه مشاهده شد (شکل ۲).

#### تیمار هورمونی اسید جیبرلیک

طبق نتایج حاصل از اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون  $GA_3$  (۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) و مدت زمان فرو بردن در هورمون (۲۴ و ۴۸ ساعت) در گیاه ریواس، مشخص شد که از لحاظ صفات مورد

۸- خیساندن بذرها در آب داغ ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱۵ دقیقه).

۹- قرار دادن بذرها در آب جاری (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

۱۰- خیساندن بذرها در نیترات پتاسیم ۰/۲٪ (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت).

در هر مرحله، ابتدا ظروف پتری، بالن ژوژه و کلیه وسایل و همچنین آب مقطر در اتوکلاو در دمای ۱۸۰

تجزیه و تحلیل‌های آماری براساس طرح کامل تصادفی (تیمار همزمان اسید جیبرلیک و سرمادهی) و طرح فاکتوریل کامل تصادفی (دیگر تیمارها) صورت گرفت. برای ارزیابی پیش‌تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق روی پارامترهای اندازه‌گیری شده (درصد و سرعت جوانه‌زنی)، همه داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel و SAS تحت آنالیز ANOVA قرار گرفتند و اختلاف میانگین‌ها با روش LSD ( $P < 0/05$  و  $P < 0/01$ ) مقایسه شدند.

#### نتایج

##### تیمار تلفیقی اسید جیبرلیک و سرمادهی مرطوب

نتایج حاصل از داده‌های تأثیر تلفیقی اسید جیبرلیک (در غلظت ۵۰۰ ppm) و سرمادهی مرطوب به مدت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز بر شکست خواب بذره‌های ریواس نشان داد که تأثیر این تیمار بر درصد و سرعت جوانه‌زنی کاملاً معنی‌دار است ( $P < 0/01$ ). در این مجموع آزمایشها با افزایش مدت زمان سرما مرتباً به‌طور صعودی بر میزان جوانه‌زنی (اعم از سرعت و درصد جوانه‌زنی) افزوده شد

۲۴ و ۴۸ ساعت)، بر گیاه ریواس نشان داد که تأثیر این تیمار بر درصد و سرعت جوانه‌زنی کاملاً معنی‌دار است ( $P < 0/01$ ). همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است بیشترین درصد جوانه‌زنی (۲۳٪) و سرعت جوانه‌زنی (۰/۶ عدد بذر جوانه زده در روز) در اثر تیمار با غلظت ۲۵۰ ppm و مدت زمان ۴۸ ساعت بدست آمد. در غلظت‌های بالاتر از ۲۵۰ ppm از درصد و سرعت جوانه‌زنی کاسته شد. در این مجموع آزمایشها نیز روند مشابهی بین افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای ریواس مشاهده شد.

#### تیمار هورمون ۲۴-آپی‌براسینولید

نتایج مربوط به اثرهای اصلی و متقابل هورمون ۲۴-آپی‌براسینولید (در دو غلظت ۰/۵ ppm و ۱) و مدت فرو بردن در هورمون (در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت) بر بذرهای ریواس نشان داد که از نظر درصد و سرعت جوانه‌زنی بین تیمارها اختلاف کاملاً معنی‌دار است ( $P < 0/01$ ). به‌طوری که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۷٪) در اثر تیمار با این هورمون در غلظت ۰/۵ ppm و مدت زمان ۲۴ ساعت بدست آمد (شکل ۶). از این رو بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۷ تعداد بذر جوانه زده در روز) هم مربوط به همین تیمار بود (شکل ۶).

#### تیمارهای اسید سولفوریک، آب داغ، آب جاری و نیترات پتاسیم

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دیگر تیمارهای بکار رفته یعنی نیترات پتاسم ۰/۲٪، آب جاری، آب داغ و اسید سولفوریک ۰/۷٪ برای شکست خواب بذرهای ریواس فاقد هر گونه تأثیر معنی‌دار و قابل ملاحظه است.

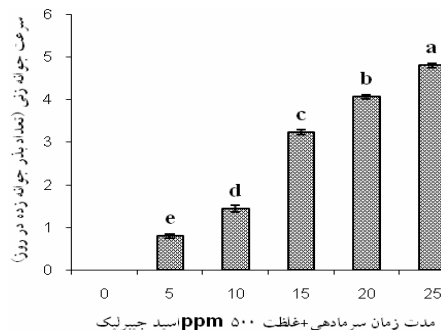
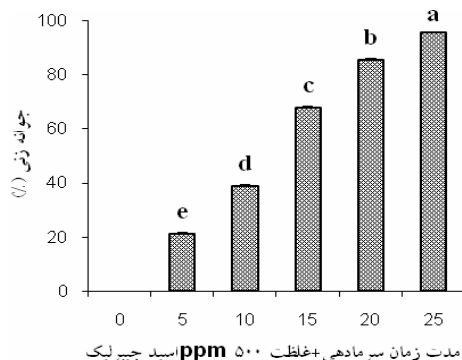
ارزیابی (درصد و سرعت جوانه‌زنی)، بین تیمارها اختلاف کاملاً معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0/01$ ). همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است با افزایش غلظت این هورمون از ۱۰۰ ppm تا ۵۰۰ ppm مرتباً بر درصد جوانه‌زنی بذرهای ریواس افزوده شد، به‌گونه‌ای که در غلظت ۵۰۰ ppm به حداکثر خود یعنی ۶۵٪ رسید. اما پس از آن با افزایش غلظت هورمون به ۱۰۰۰ ppm از میزان آن کاسته شد (۴۹٪). بنابراین در تمامی تیمارها با غلظت‌های مختلف این هورمون، بهترین نتایج برای سطح زمانی تیمار برای ۴۸ ساعت بدست آمد. مطابق با شکل ۳ بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۳ عدد بذر جوانه زده در روز) برای غلظت ۲۵۰ ppm و تیمار ۴۸ ساعته بدست آمد.

#### تیمار هورمون کینیتین

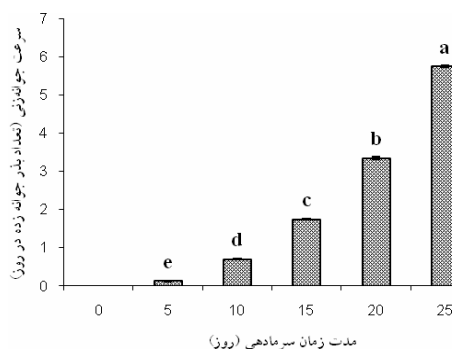
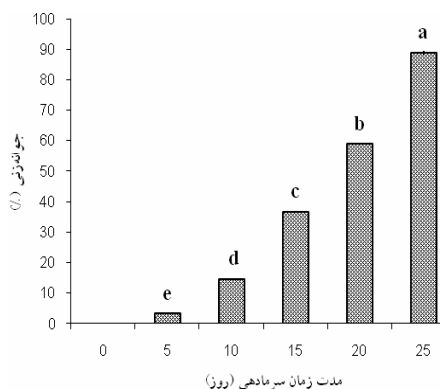
بررسی نتایج حاصل از غلظت‌های مختلف هورمون کینیتین (۰ ppm، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) (در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت) بر گیاه ریواس نشان داد که افزایش سطوح این تیمار باعث افزایش معنی‌داری بر درصد و سرعت جوانه‌زنی می‌شود ( $P < 0.01$ ). با افزودن غلظت کینیتین از ۱۰۰ تا ۵۰۰ ppm مرتباً به‌طور مشخصی بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای ریواس افزوده شد، به‌طوری که بیشترین درصد (۴۳٪) و سرعت جوانه‌زنی (۲ عدد بذر جوانه زده در روز) در تیمار ۴۸ ساعت خیساندن در غلظت ۵۰۰ ppm این تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد (شکل ۴). اما با بالا رفتن غلظت از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ ppm به شدت از درصد و سرعت جوانه‌زنی کاسته شد.

#### تیمار هورمون اکسین

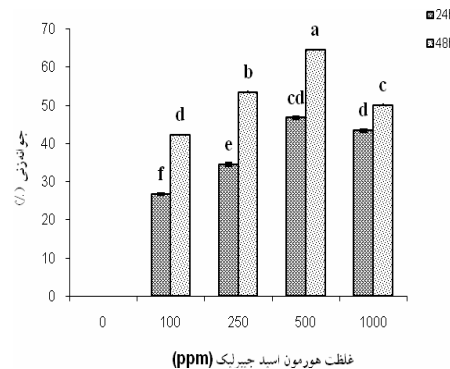
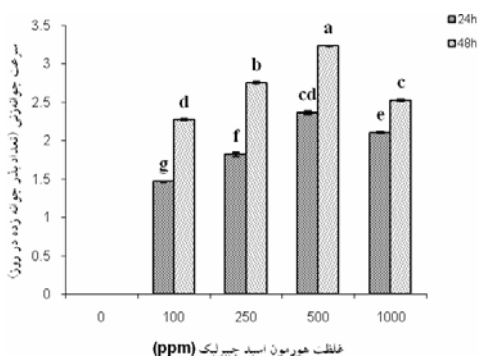
آزمایشهای مربوط به غلظت‌های مختلف هورمون اکسین (۰ ppm، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) (در دو زمان



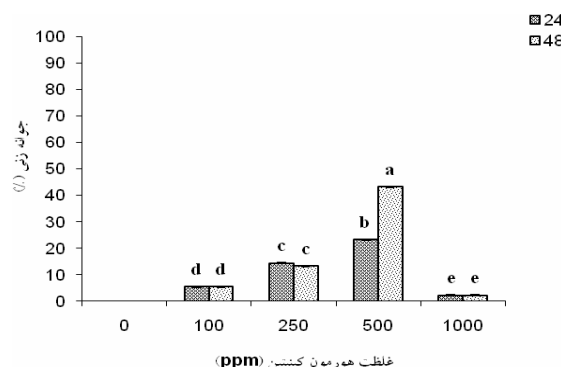
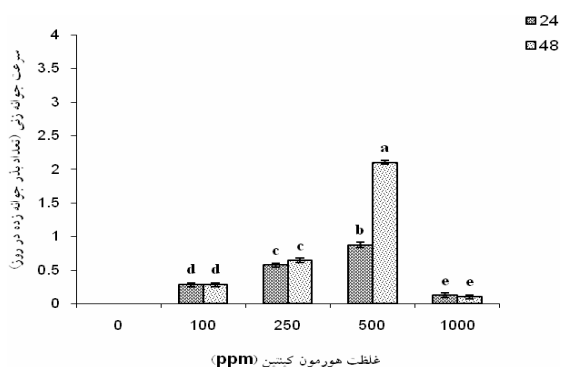
شکل ۱- اثر همزمان سرمادهی و اسید جیبرلیک بر درصد و سرعت جوانه زنی بذره‌های خفته ریواس حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).



شکل ۲- اثر پیش سرمادهی مرطوب بر درصد و سرعت جوانه زنی بذره‌های خفته ریواس حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).

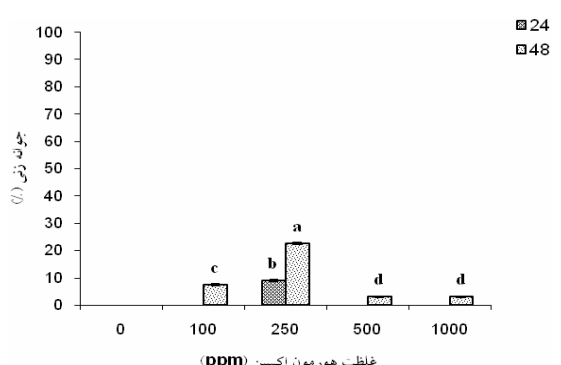
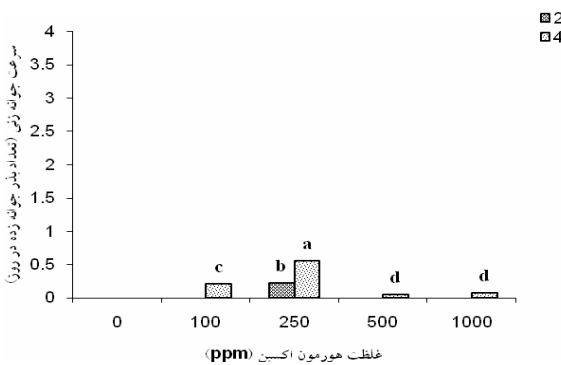


شکل ۳- اثر متقابل هورمون اسید جیبرلیک و زمان بر درصد و سرعت جوانه زنی بذره‌های خفته ریواس حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).



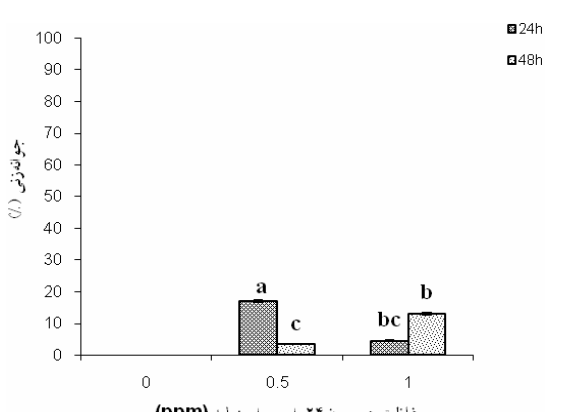
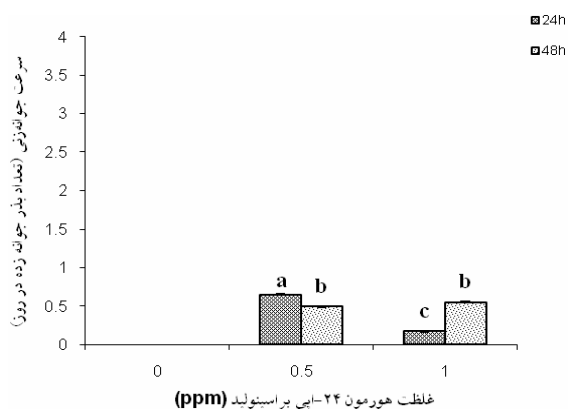
شکل ۴- اثر متقابل هورمون کینتین و زمان بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای خفته ریواس

حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).



شکل ۵- اثر متقابل هورمون اکسین و زمان بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای خفته ریواس

حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است. (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).



شکل ۶- اثر متقابل هورمون اکسین و زمان بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای خفته ریواس

حروف غیریکسان بر روی ستون‌ها بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD است (بار عمودی: میانگین سه تکرار ± خطای معیار).

## بحث

در مطالعه حاضر برای یافتن بهترین روشهای شکست خواب بذر ریواس از تیمارهای گوناگون هورمونی-شیمیایی (اسید جیبرلیک، کینتین، اکسین، ۲۴-آپی-براسینولید، نترات پتاسیم)، استراتیفیکاسیون سرد (۲°C)، اسکاریفیکاسیون (اسید سولفوریک و آب داغ) و آب جاری استفاده شد. از این میان تیمار تلفیقی سرمادهی و اسید جیبرلیک و پیش سرمادهی مرطوب (به ترتیب ۹۶٪ و ۸۹٪) بیشترین اثر را بر شکست خواب بذرهای ریواس نشان داد. با توجه به این که تأثیر تیمار اسید جیبرلیک تنها، فقط توانست درصد جوانه زنی بذرهای این گیاه را تا ۶۵٪ افزایش دهد پس می توان نتیجه گیری کرد که نقش سرمادهی مرطوب (۲°C) برای بذرهای این گیاه از اهمیت بیشتری برخوردار است. همسو با نتایجی که از بررسی حاضر بدست آمد تحقیقات مختلف بر روی گونه های متفاوت نیز حکایت از نقش مؤثر تیمار سرمادهی مرطوب بر شکست خواب بذرها دارد. گزارش شده است که معمولاً دمای ۵ درجه سانتی گراد یا اندکی کمتر برای گیاهانی که در اقلیم های سرد می رویند بیشترین تأثیر را در رفع خواب بذر دارد (Koornneff et al., 2002). مشخص شده است (Garcia-Gusano et al., 2004) که ارقام Desmayo و Ramillete گیاه بادام نیاز به ۶ هفته و ۲ رقم Mono و Wawona نیاز به ۸ هفته تیمار سرمایی دارند. برای شکست خواب بذر گیاه مریم نخودی (*Teucrium polium*) نیز یک دوره ۱۴ روزه سرمادهی (۵°C) بسیار مؤثر می باشد (Nadjafi et al., 2006). در تحقیقی دیگر، تیمار ۷ و ۱۴ روز سرمادهی باعث افزایش میزان جوانه زنی (۹۷-۹۶٪) بذرهای گیاه گون شده است (فاتح و همکاران، ۱۳۸۴). افزایش جوانه زنی بذرها به واسطه پیش تیمار سرمادهی ناشی از شکافته شدن پوسته بذر در اثر سرماست که از مقاومت مکانیکی پوسته دانه بر رویان می کاهد. همچنین این احتمال وجود دارد که عامل سرما علاوه بر سنتز اسید جیبرلیک درونزا، محرک های دیگری

را نیز فعال می کند که موجب افزایش سرعت و درصد جوانه زنی بذرها می گردد. به نظر می رسد که تیمار سرما سبب کاهش تراز هورمون های بازدارنده و افزایش تراز هورمون های محرک شده و به این ترتیب سبب افزایش پتانسیل جوانه زنی بذر می شود. این رویدادها به طور همزمان رخ داده و جوانه زنی در بذرها نتیجه توازن بین هورمون ها می باشد (Tipirdamaz & Gomurgen, 2000). کاهش تراز اسید آبسزیک سبب افزایش حساسیت رویان به اسید جیبرلیک در مرحله گذر از حالت خواب به حالت غیرخواب در بذر بسیاری از گونه ها می شود (Kucera et al., 2005).

از طرفی اثر تیمار هورمونی اسید جیبرلیک (به تنهایی یا تشدید شده با تیمار سرمادهی) بر شکست خواب بذرهای گیاه ریواس را هم نمی توان از نظر دور داشت. یکی از دلایل اثر مثبت محرک های شیمیایی مانند اسید جیبرلیک بر جوانه زنی احتمالاً مربوط به تعادل رسیدن نسبت هورمونی در بذر و کاهش مواد بازدارنده های رشد مانند اسید آبسزیک است. به عبارت دیگر، اسید جیبرلیک به عنوان یک محرک شیمیایی می تواند سبب شکستن خواب فیزیولوژیک بذر شود. اسید جیبرلیک از طریق القاء سنتز آنزیم آلفا-آمیلاز باعث شروع جوانه زنی و در نتیجه شکست خواب بذر گیاهان می شود. در دانه در حال جوانه زنی، اسید جیبرلیک توسط رویان ساخته می شود و از رویان به اسکوتلوم می رود و به درون اندوسپرم منتشر می شود تا به لایه آلورون برسد. در آنجا اسید جیبرلیک باعث آزاد شدن آنزیم های هیدرولیتیکی، از جمله آلفا-آمیلاز می شود که متعاقباً این آنزیم ها باعث شکسته شدن نشاسته به الیگوساکاریدها می شوند. سپس الیگوساکاریدها طی مراحل بیوشیمیایی به گلوکز شکسته می شوند. بررسی ها در سطح مولکولی آشکار کرده است که اسید جیبرلیک توسط گیرنده های موجود بر روی غشاء سیتوپلاسمی درک و با G- پروتئین موجود در غشاء ارتباط برقرار می کند و به دنبال آن GTP به G- پروتئین



نتیجه آزمایشهای حاضر که به منظور بررسی تأثیر هورمون اکسین بر شکست خواب بذرهای ریواس انجام شد نشان داد که این هورمون نیز می‌تواند اثر مثبتی بر شکست خواب این گونه گیاهی داشته باشد (افزایش ۲۳٪ در غلظت ۲۵۰ ppm به مدت ۴۸ ساعت). گزارشهای زیادی مبنی بر اثر مثبت هورمون اکسین بر افزایش درصد جوانه‌زنی وجود دارد که با نتیجه حاصل از این تحقیق همسو است (Sankhla & Chiwocha *et al.*, 2005; Mathur, 1968; Sidorenko, 1989; Singh, 1990). مشخص شده است که اکسین‌ها در تحریک جوانه‌زنی نقش دارند. این دسته از هورمون‌ها با کمک در طول نمودن کلئوپتیل و کلئوریز (در گندمیان) و نیز با فعال نمودن زمین‌گرایی و نورگرایی، رشد رویان و نهایتاً جوانه‌زنی را تنظیم می‌کنند.

نتایج ما حکایت از آن داشت که تیمار بذرهای خفته ریواس با ۲۴- اپی‌براسینولید (۰/۵ ppm برای ۲۴ ساعت) برای شکست خواب بذرهای مذکور تا اندازه‌ای مفید است. با توجه به این‌که غلظت بالای ۰/۵ ppm از درصد جوانه‌زنی بذرهای می‌کاهد، مطلوب است در آزمایشهای آینده مقادیر بسیار کمتر این هورمون (۰/۵ ppm <) در آزمایشهای شکست خواب بذر استفاده شود. با بررسی پژوهش‌های انجام شده می‌توان دریافت که مجموعه تحقیقات پیرامون تأثیر براسینواستروئیدها بر شکست خواب بذر گیاهان هیچ یا بسیار ناچیز است و تنها اطلاعات نسبتاً محدودی در مورد اثر این هورمون‌ها بر تحریک جوانه‌زنی دانه‌های غیرخواب وجود دارد. از این میان می‌توان به نتایج آزمایشهای Steber و McCourt (2001) اشاره کرد. آنها هنگام مطالعه بر روی گیاه آراییدوپسیس دریافتند که هورمون ۲۴- اپی‌براسینولید می‌تواند نقشی مشابه با جیبرلین در افزایش جوانه‌زنی بذر داشته باشد و احتمالاً کاهش بیوستتوز و حساسیت به اسید آبسزیک یا افزایش بیوستتوز و حساسیت به جیبرلین، دلیل افزایش جوانه‌زنی بذرهای خیس‌انده شده در محلول حاوی

متصل می‌گردد. در حضور اسید جیبرلیک، GTP- پروتئین به‌عنوان بخشی از اجزاء اولیه پیام‌رسانی اسید جیبرلیک در سلول‌های آلرونی وارد عمل می‌شود. GTP- پروتئین باعث تولید cGMP می‌شود. این مولکول حدواسط باعث تحریک فرایندهای دیگر مانند فعال شدن پروتئین کینازها، افزایش  $Ca^{2+}$ ، باز شدن کانال‌های یونی و ... خواهد شد که همه این اجزاء به نوعی در پیام‌رسانی اسید جیبرلیک به هسته دخالت دارند. پس از ارسال حضور این هورمون به درون هسته، ژن GA-MYB رونوشت‌برداری می‌شود تا پروتئین آن که یک فاکتور رونویسی و باعث فعال شدن ژن آلفا-آمیلاز می‌شود، ساخته شود. بنابراین در استفاده از هر دوی این تیمارها شاهد افزایش چشمگیری در درصد جوانه‌زنی بذرهای ریواس خواهیم بود. همان‌طور که نتایج نشان دادند بهترین تیمار برای شکست خواب بذرهای ریواس استفاده همزمان از سرمادهی و اسید جیبرلیک (۵۰۰ ppm به مدت ۲۵ روز) می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کینتین (از سیتوکینین‌ها) (۲۵۰ ppm به مدت ۴۸ ساعت) نیز باعث افزایش درصد جوانه‌زنی (تا ۴۳٪) بذرهای خفته ریواس می‌شود. کینتین باعث افزایش فعالیت آلفا-آمیلاز و در نتیجه هیدرولیز نشاسته می‌شود (Yakimova *et al.*, 2000) و این فرایند لازمه جوانه‌زنی است. علاوه بر این، ممکن است سیتوکینین‌ها نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی (Tipirdamaz & Gomurgen, 2000) و انتقال مواد از غشاء را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین به نظر می‌سد که رفع خواب بذرهای توسط کینتین احتمالاً با افزایش نفوذپذیری غشاء و تبادلات مواد ذخیره‌ای مرتبط باشد. همچنین سیتوکینین‌ها با تحریک سنتز DNA و RNA فرایند تقسیم سلولی در رویان را افزایش و از این طریق جوانه‌زنی بذر را تسهیل می‌کنند (Chiwocha *et al.*, 2005). به این ترتیب سیتوکینین‌ها برای تکمیل القای جوانه‌زنی توسط GA لازم و به‌طور غیرمستقیم موجب کاهش اثر مواد بازدارنده رشد (مانند ABA) می‌شوند.

به‌طورکلی می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که خواب بذرهای ریواس از نوع فیزیولوژیک است و یکی از مناسبترین شیوه‌ها برای تحریک جوانه‌زنی آنها استفاده همزمان از پیش‌سرمادهی مرطوب و اسید جیبرلیک (۵۰۰ ppm) به مدت ۲۵ روز است. علاوه بر این، در این مجموع آزمایشها (صرف‌نظر از نوع تیمار) اکثراً همبستگی مثبت بین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای ریواس مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بنابراین جوانه‌زنی سریع با درصد جوانه‌زنی بالاتر همگام بوده است.

### منابع مورد استفاده

- رحیمیان، ر. و خسروی، م.، ۱۳۷۵. فیزیولوژی بذر (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۹۶ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران.
- فاتح، ا.، مجنون‌حسینی، ن.، مداح عارفی، ح. و شریف‌زاده، ف.، ۱۳۸۴. بررسی روشهای شکست خواب بذر در گون (*Astragalus tribuloides*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۳(۴): ۳۶۰-۳۴۵.
- Aberlenc-Bertossi, F., Noirot, M. and Duval, Y., 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56(1): 53-57.
- Bialek, K., Michalczyk, L. and Cohen, J.D., 1992. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 100(1): 509-517.
- Birgit K., M Alan Cohn and G. Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. 15: 281-307.
- Chiwocha, S.D., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R. and Kermod, A.R., 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist chilling and germination. *Plant Journal*, 42(1): 35-48.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. and Roberts, E.H., 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 667p.

۲۴- اپی‌براسینولید است. همچنین ممکن است تحریک جوانه‌زنی توسط براسینواستروئیدها به‌علت تحریک هیپوکوتیل و نمو رویان باشد. نتایج مشابهی در گیاهانی مانند گندم، برنج، کلزا، بادام‌زمینی و اکالیپتوس بدست آمده است (Nadjafi et al., 2006). براسینواستروئیدها می‌توانند باعث افزایش تجزیه اندوسپرم بذرهای تنباکو (که آب جذب کرده‌اند) در نور شوند و آغازگر جوانه‌زنی و طویل شدن دانه‌رست باشند. به‌عبارت دیگر، براسینواستروئیدها و جیبرلین‌ها (هر دو گروه) می‌توانند تأثیر اسید آبسزیک را در دانه‌های خواب بی‌نیاز از نور تحت شرایط تاریکی، مهار کنند (Guan & Scandalios, 2002). اگرچه هنوز مکانسیم عمل هورمون ۲۴- اپی‌براسینولید به خوبی شناسایی نشده است، ولی احتمال می‌رود ۲۴- اپی‌براسینولید و اسید جیبرلیک به‌وسیله مسیرهای انتقال پیام نزدیک به هم و مکانسیم‌های مشابه، آغازکننده جوانه‌زنی در گیاهان باشند. بنابراین با توجه به عدم وجود یا وجود بسیار اندک تحقیقات پیرامون تأثیر هورمون ۲۴- اپی‌براسینولید بر شکست خواب بذر، می‌توان اذعان کرد که تحقیق حاضر می‌تواند به‌عنوان جزئی از اولین گزارشهای مربوط به تأثیر هورمون ۲۴- اپی‌براسینولید بر شکست خواب بذر تلقی شود.

تیمارهای دیگر یعنی نترات پتاسم ۰/۲٪، آب جاری، آب داغ و اسید سولفوریک ۷۰٪ فاقد هر گونه تأثیر معنی‌دار و قابل ملاحظه بر شکست خواب بذرهای ریواس بودند. عدم تأثیر اسکاریفیکاسیون (آب داغ و اسید سولفوریک ۷۰٪) نشانگر آن است که خواب این بذرها ناشی از سختی و غیرقابل نفوذ بودن پوسته دانه نمی‌تواند باشد. علاوه بر این نمی‌توان اذعان داشت که خواب این بذرها به‌علت تجمع بازدارنده‌های رشد نظیر فنل‌ها و کومارین است چون شستشو در آب جاری نیز نتوانست خواب آن‌ها را برطرف کند.

- Sasse, J.M., Smith, R. and Hudson, I., 1995. Plant growth regulators. *Planta*, 22: 136-141.
- Sankhla, H.C. and Mathur, R.L., 1968. Effect of growth regulating substances, inorganic fertilizers, seed oil cakes and soil pH on germination of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds. *Indian Journal of Agriculture Science*, 38: 270-274.
- Sidorenko, T.V., 1989. Effect of gibberellic acid on germination of seed having different types of dormancy. *Ukrains' Kii Botanichnii zhurnal*, 46: 66-68.
- Singh, V., 1990. Influence of indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) on seed germination of spruce. *The Indian Forester*, 116(6): 450-455.
- Steber, C.M. and McCourt, P., 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 125(2): 763-769.
- Takeuchi, Y., Omigava, Y., Yonegama, K. and Konnai, M., 1995. Effects of brassinolide on germination of *Orabanchae minor* seeds. *Physiologia Plantarum*, 16: 153-160.
- Thomas, T.H., Palevitch, D., Biddington, N.L. and Austin, R.B., 1975. Growth regulation and the phytochrome-mediated dormancy of celery seeds. *Physiologia Plantarum*, 35: 101-106.
- Tipirdamaz, R. and Gomurgen, N., 2000. The effects of temperature and gibberellic acid on germination of *Eranthis hyemalis* Salisb. *Turkish Journal of Botany*, 24: 143-145.
- Yakimova, E., Kapchina, V., Groshkoff, I. and Ivanova, G., 2000. Effects of BA and CPPU on protease and  $\alpha$ -amylase activity of invitro cultured explants of *Rosa hybrida* L. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 26(1-2): 9-47.
- Garcia-Gusano, M., Martinez-Gomez, P. and Dicenta, F., 2004. Breaking seed dormancy in almond (*Prunus dulcis*). *Scientia Horticulturae*, 99: 363-370.
- Guan, L.M. and Scandalios, J.G., 2002. Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum*, 114(2): 288-295.
- Held, J.S., Doren, V. and Lookwood, T.J., 1996. Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth. *Plant Growth Regulation*, 15: 63-67.
- Koornneff, M., Bentsink, L. and Hilhorst, H., 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 33-36.
- Kucera, B., Cohn, M.A. and Leubner-Metzger, G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281-307.
- Leubner-Metzger, G., 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathway. *Planta*, 213: 758-763.
- Li, M., and Leung, D.W.M., 2000. Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyls cutting of *Pinus radiata*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(4): 423-42.
- Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M., 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments*, 64(3): 542-547.
- Naidu, C.V. and Rajendrudu, G., 2001. Influence of kinetin and nitrogenous salts on seed germination of red sanders (*Pterocarpus santalinus*). *Seed Science and Technology*, 29:669-672.
- Sairam, R.K., Shukla, D.S. and Deshmuk, P.S., 1996. A role of brassinosteroids in germination of Wheat. *Indian. Journal Plant Physiology*, 1: 141-144.

## Effective techniques to break seed dormancy and stimulate seed germination in *Rheum ribes* L.

M. Nabaei<sup>\*1</sup>, P. Roshandel<sup>2</sup> and A. Mohammadkhani<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

E-mail: mnabaei168@yahoo.com

2- Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: October 2009

Revised: October 2010

Accepted: October 2010

### Abstract

*Rheum ribes* is a plant species in Polygonaceae family which grows in Iran and is considered as a valuable medicinal species in traditional medicine. *Rheum ribes* seeds hardly germinate because of seed dormancy and may cause difficulties for its massive industrial cultivations. This study was performed to determine the best treatment for seed dormancy breaking. To achieve this goal, several treatments were applied comprising: Hot water (70 and 90 °C) for 15 minutes, moist chilling (at 2 °C) for 5, 10, 15, 20 and 25 days, sulfuric acid 75% (5 and 15 minutes), KNO<sub>3</sub> (0.2%), gibberellic acid, kinetin, auxin (100, 250, 500 and 1000 ppm) and 24-epibrassinolid (0.5 and 1 ppm), for 24 and 48 h washing (for 24 and 48 h), and finally a combined treatment of gibberellic acid (500 ppm) and chilling at 2 °C for 5, 10, 15, 20 and 25 days. According to the results, seed dormancy in *Rheum ribes* is physiological since the highest germination percentage (96%) was obtained by using the combined treatment of gibberellic acid (500 ppm) and pre-chilling (for 25 days). In addition, the effect of moist chilling treatment –by itself- on breaking seed dormancy was remarkable in this plant as germination increased up to 89%. Effects of hormones were also statistically significant on increasing seed germination but compared with the salient effect of combined chilling and gibberellic acid treatment was not so remarkable. On the other hand, other applied treatments had no effects on breaking seed dormancy in *Rheum ribes* which indicates that the type of seed dormancy in *Rheum ribes* is not physical or due to the accumulation of inhibitory substance in seed coat.

**Key words:** *Rheum ribes* L., seed dormancy, moist-pre chilling, gibberellic acid.