

تأثیر اسید جیبرلیک، دما و کشت جنین بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر در گونه‌های مختلف زرشک (*Berberis spp.*)

زینب تقی‌نژاد^۱، مسعود دهداری^{۲*}، امین میرشکاری^۲، حسین زینلی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات

^۲ دانشیار و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

^۳ استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: adehdari@yu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۰۴)

چکیده

گیاه دارویی زرشک، متعلق به تیره زرشک است. بذرهای گیاه زرشک دارای دوره خواب طولانی هستند؛ بنابراین، غلبه بر خواب و افزایش میزان جوانه‌زنی بذرها به روش‌های مختلف می‌تواند مفید واقع گردد. این مطالعه به‌صورت دو آزمایش جداگانه انجام گردید. در آزمایش اول، تأثیر سطوح مختلف اسید جیبرلیک در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد (۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و دما (۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ روز) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در آزمایش دوم تأثیر غلظت‌های مختلف محیط کشت ام اس (ام اس کامل، یک‌دوم و یک‌چهارم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر کشت جنین بذر چهار گونه زرشک بومی ایران (زرافشان، معمولی، راست خوشه و زالزالکی) بررسی شد. بر اساس نتایج حاصله در آزمایش اول، تیمار سرمادهی بذرها در مقایسه با تیمار اسید جیبرلیک، بیشترین اثر را در افزایش درصد جوانه‌زنی (۸۸ درصد) بذرها نشان داد. در آزمایش دوم، بهترین ترکیب عناصر غذایی جهت کشت جنین، محیط کشت ام اس کامل بود. به‌گونه‌ای که در هر چهار گونه بعد از دو یا سه روز جوانه‌زنی ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. در مجموع بهترین روش برای جوانه‌زنی سریع زرشک، در همه گونه‌های مورد مطالعه استفاده از کشت جنین در محیط کشت ام اس کامل تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: جیبرلیک اسید، خواب بذر، گیاه دارویی، محیط کشت

مقدمه

بذرها، به روش‌های مناسب برای شکست خواب و افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها دست یابند. خواب اولیه بذر از نظر منشأ و عوامل مؤثر در ایجاد آن به دو منشأ درونی و بیرونی تقسیم می‌شود (رجبیان و همکاران، ۱۳۸۶).

خواب بذر در شرایط نامساعد رویشی سودمند است، زیرا بذر غیرفعال است و در نتیجه بسیاری از تنش‌های محیطی و شرایط نامناسب اقلیمی را بهتر تحمل کرده و تداوم نسل و بقای گونه گیاهی را موجب می‌گردد.

یکی از موانع عمده کاشت گیاهان دارویی در خارج از رویشگاه طبیعی، محدودیت میزان جوانه‌زنی و طولانی بودن خواب بذر می‌باشد. طی دوره خواب حتی اگر شرایط مناسب محیطی (رطوبت، دما، نور و غیره) نیز فراهم باشد، جوانه‌زنی صورت نمی‌گیرد. با این وجود، به‌ویژه اگر هدف تولید انبوه یک گیاه با ارزش اقتصادی یا دارویی بالا باشد، خواب بذر یک ویژگی نامطلوب در نظر گرفته می‌شود (رجبیان و همکاران، ۱۳۸۶)؛ بنابراین پژوهشگران تلاش می‌نمایند تا با بررسی علل خواب

توسعه‌نیافته ذکر نمود؛ بنابراین توصیه کرد که بایستی گیاهان مادری در شرایط کنترل‌شده یا گلخانه کشت شوند تا باعث نمو بهتر آندوسپرم جنین در گیاه مادری شده و در نتیجه باعث رشد بهتر جنین شود.

از زمانی که توکی طی سال‌های ۱۹۳۳ تا ۱۹۳۴ توانست جنین بدون آندوسپرم گیاهان هسته‌دار را نجات داده و دانه‌های زنده از آن‌ها به دست آورد، کشت جنین پیشرفت قابل‌ملاحظه‌ای کرده و تاکنون ارقام متعددی در دنیا با استفاده از این روش تولید شده‌اند (سوسان^{۱۰} و همکاران، ۱۹۹۶).

از طرفی دیگر با توجه به طولانی بودن مراحل جوانه‌زنی بذر زرشک که شامل برداشت میوه در فصل رسیدن میوه، حذف میان‌بر و برون‌بر میوه‌ها، سرما‌دهی بذرها در دمای پائین به مدت چندین ماه در طول زمستان و یا یخچال (۲ الی ۶ درجه سانتی‌گراد) و جوانه‌زنی بذرها در بهار آینده است، دانه‌های چندین ماه بعد از برداشت میوه به دست می‌آید و تقریباً بیشتر بذر به‌دست‌آمده تلف می‌شوند. همچنین با توجه به اینکه در بیشتر گیاهان هسته‌دار تعداد کمی از گل‌های گرده‌افشانی شده به میوه تبدیل می‌شوند (فتحی و همکاران، ۱۳۸۸)، بهره‌گیری از روش کشت جنین و کمک به جوانه‌زنی جنین‌ها در شرایط درون شیشه‌ای به‌منظور غلبه بر این مشکلات و دستیابی به دانه‌های موردنیاز، یک امر ضروری است. با این روش دانه‌ها در یک دوره زمانی کوتاه به‌دست‌آمده و طول دوره رویشی کاهش می‌یابد، به‌طوری که می‌توان بذرهای جمع‌آوری‌شده در طول همان فصل (به‌شرط رسیدگی کامل) را وادار به جوانه‌زنی کرد.

سرآبادانی تفرشی و همکاران (۱۳۸۷) با کشت جنین در محیط کشت 1/4 MS توانستند خواب بذر در گیاه باریجه (*Ferula gumosa* Boiss) را برطرف نمایند. قاسمیان و همکاران (۱۳۹۰) در گیاه وشا (*Dorema ammoniacum*) با استفاده از کشت جنین، به نتایج مطلوبی در محیط 1/4 MS دست یافتند. مرتضوی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی بر روی گیاه چویل (*Ferulago angulata*) گزارش کردند که یکی

تحقیقات نشان داده است که بسیاری از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از جمله اکسین، جیبرلین، سیتوکینین، اتیلن و اسید آسبیزیک شاید از مسیرهای مشخصی که منجر به کنترل عملکرد اسید نوکلئیک‌ها می‌شوند، در تحریک جوانه‌زنی و یا خواب بذر نقش دارند. توماس و سامبورکس^۱ (۱۹۸۵) نشان دادند که جیبرلین‌ها در بذور کرفس سایر تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین جریان برخی یون‌ها از جمله پتاسیم و کلسیم از خلال غشاها را تغییر می‌دهند و این تحولات موجب انتقال پیام‌های ویژه و تحریک سنتز یا فعالیت متابولیت‌ها و آنزیم‌های محرک جوانه‌زنی بذر می‌شود (نقل از عموآقایی، ۱۳۸۴).

دیتریچ^۲ در سال ۱۹۲۴ از کشت جنین به‌عنوان تولید مصنوعی^۳ یاد کرده است. لایبیچ^۴ در سال‌های ۱۹۲۵ و ۱۹۲۹ توانست جنین بذر کتان را کشت داده و گیاه زنده به دست آورد. توکی^۵ در سال ۱۹۳۳ توانست جنین‌های سقط شده هسته‌دارها را نجات داده و دانه‌های^۶ زنده به دست آورد (نقل از مارک^۷، ۱۹۹۴). استانیس^۸ (۱۹۹۸) نشان داد که استقلال جنین‌های جداد شده زمانی محقق می‌شود که تمایز جنین، انجام و مرحله دوم رشد میوه سپری شده باشد. جنین‌هایی که در شرایط طبیعی به این مرحله رشدی نرسیده باشند، در شرایط درون شیشه‌ای نمی‌توانند رشد کنند. همچنین با افزایش زمان پس از رسیدن گل در گیاهان، میزان جوانه‌زنی جنین‌های جداد شده بیشتر می‌شود که این مسئله به تکامل جنین مربوط می‌شود. براک^۹ (۱۹۷۸) یکی دیگر از عوامل محدودکننده رشد جنین در کشت درون شیشه‌ای را، مرحله رشدی جنین دانسته و اعتقاد دارد که دانه‌های سالم از جنین‌هایی به دست می‌آید که رشد کافی داشته باشند. ایشان دمای پائین محیط و دیر گلدهی را نیز از عوامل تولید جنین‌های

¹ Tomas and Samborress

² Dietrich

³ Artificial birth

⁴ Laibach

⁵ Tukey

⁶ Seedling

⁷ Mark

⁸ Stanys

⁹ Beraak

¹⁰ Susan

آزمایش اول: تأثیر اسید جیبرلیک و دما بر ویژگی‌های جوانه‌زنی گونه‌های زرشک

در این آزمایش شش تیمار شامل محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد و سه تیمار دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (به صورت مجزا یعنی در مجموع شش تیمار) بر جوانه‌زنی چهار گونه زرشک (زرافشان، معمولی، راست خوشه و زالزالکی) در سه تکرار بررسی شد. برای تیمارهای اسید جیبرلیک، ۲۵ عدد از بذره‌های گندزدا شده از هر چهار گونه را در هر کدام از محلول‌های فوق غوطه‌ور و به مدت ۱۰ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. پس از آن بذرها از محلول‌ها خارج و در ظروف پتری محتوی کاغذ صافی و ۵ میلی‌لیتر آب در شرایط سترون در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد درون ژرمیناتور در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۵۰ روز نگهداری گردیدند.

برای اعمال تیمار دمایی، بذره‌های گندزدا شده چهار گونه زرشک را درون ظرف پتری و روی کاغذ صافی حاوی ۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل قرار داده شدند، سپس در سه تیمار دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ژرمیناتورهای جداگانه در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی به مدت ۵۰ روز نگهداری گردیده و سپس صفات طول و وزن خشک اندام هوایی، طول و وزن خشک ریشه و درصد جوانه‌زنی اندازه‌گیری شدند. معیار جوانه‌زنی زمانی بود که طول ریشه‌چه دو میلی‌متر رسیده باشد.

آزمایش دوم: کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای

به منظور انتخاب مناسب‌ترین غلظت محیط کشت MS از محیط کشت پایه MS کامل (موراشیگ و اسکوگ^۱، ۱۹۶۲)، $1/2 MS$ و $1/4 MS$ استفاده شد. در این مرحله با استفاده از بهترین محلول گندزدا، ریز نمونه‌های بذری (بذر با پوسته، بذر بدون پوسته و جنین) کاملاً گندزدا شده در محیط کشت‌های فوق

از بهترین روش‌ها جهت جوانه‌زنی سریع این گیاه، کشت جنین است.

بذر زرشک دارای خواب طولانی و از نوع فیزیولوژیکی است. سرمادهی تا حد زیادی می‌تواند به رفع این خواب کمک کند. رضایی و بالندری (۱۳۹۱)، گزارش دادند بهترین تیمار جهت شکست خواب بذور زرشک حداقل ۴۵ روز سرمادهی با دمای ۴ الی ۶ درجه سانتی‌گراد است. راه‌حل دیگر رفع این مشکل، کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای است زیرا با برداشتن پوسته و آندوسپرم اطراف جنین، عوامل بازدارنده رشد برطرف شده و جوانه‌زنی سریع‌تر صورت می‌گیرد (سرآبادانی تفرشی و همکاران، ۱۳۸۷، در گیاه باریجه، قاسمیان و همکاران، ۱۳۹۰، در گیاه وشا، مرتضوی و همکاران، ۱۳۹۲ در گیاه چویل). به هر حال گزارش‌های کمی در خصوص بهبود جوانه‌زنی بذر گیاه زرشک به‌ویژه از طریق کشت جنین و اسید جیبرلیک در دسترس است، به همین دلیل این پژوهش با به‌کارگیری چهار گونه زرشک و روش‌های مختلف شکستن خواب بذر طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذره‌های چهار گونه زرشک بومی ایران در سال ۱۳۹۱ از مشهد (پژوهشکده گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد) و اصفهان (مرکز تحقیقات شهید فوزوه) جمع‌آوری شدند.

بذور به مدت یک دقیقه در محلول اتانل ۷۰ درصد قرار گرفتند، سپس برای گندزدایی، شستشو با جریان آرام آب لوله، غوطه‌ور کردن در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در ترکیب با توئین ۲۰ درصد (دو قطره) به مدت ۳۰ ثانیه و شستشو با آب شهری و در نهایت گندزدایی با محلول کلرید جیوه ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ دقیقه در زیر دستگاه لامینار ایرفلو صورت گرفت. سپس دو آزمایش به شرح زیر در دانشکده کشاورزی یاسوج اجرا گردیدند:

¹ Murashige and Skoog

کشت گردیدند. بعد از کشت ریز نمونه‌ها، ظروف کشت در قفسه‌های اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ به ۸ (به ترتیب ساعت روشنایی و ساعت تاریکی) در دمای ۲ ± ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با میزان نور ۹۵۰۰ لوکس قرار داده شدند.

چهار الی پنج هفته پس از کاشت ریزنمونه (جنین سالم)، صفات درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه، طول اندام هوایی (سانتی‌متر)، وزن تر اندام هوایی (میلی‌گرم)، وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم)، درصد ریشه‌زایی، طول ریشه (سانتی‌متر)، وزن تر ریشه (میلی‌گرم) و وزن خشک ریشه (میلی‌گرم) اندازه‌گیری و ثبت گردیدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول: تأثیر اسید جیبرلیک و سرما بر ویژگی‌های جوانه‌زنی گونه‌های زرشک

جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که گونه‌های مختلف تأثیر معنی‌داری بر روی همه صفات اندازه‌گیری شده داشت. اثرات تیمار و برهمکنش بین تیمار و گونه نیز در سطح یک درصد برای تمامی صفات مورد بررسی معنی‌دار شد.

نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد که برای صفت طول اندام هوایی، بلندترین طول (۱۴/۵۰ سانتی‌متر) در تیمار دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد و در گونه زرشک زالالکی مشاهده شد در حالی که کوتاه‌ترین طول (۰/۵ سانتی‌متر) در گونه زرشک زالالکی در تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. برای صفت وزن خشک اندام هوایی، بیشترین وزن خشک (۰/۰۹۹ گرم) در گونه زرشک زالالکی در تیمار دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین آن (۰/۰۱ گرم) در تیمارهای بدون جیبرلین و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در چهار گونه مورد مطالعه بود.

در قفسه‌های اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ به ۸ (به ترتیب ساعت روشنایی و ساعت تاریکی) در دمای ۲ ± ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با میزان نور ۹۵۰۰ لوکس قرار داده شدند.

چهار الی پنج هفته پس از کاشت ریزنمونه (جنین سالم)، صفات درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه، طول اندام هوایی (سانتی‌متر)، وزن تر اندام هوایی (میلی‌گرم)، وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم)، درصد ریشه‌زایی، طول ریشه (سانتی‌متر)، وزن تر ریشه (میلی‌گرم) و وزن خشک ریشه (میلی‌گرم) اندازه‌گیری و ثبت گردیدند.

اندازه‌گیری صفات طول اندام هوایی و ریشه با استفاده از خط‌کش (دقت ۱ میلی‌متر)، وزن تر اندام هوایی و ریشه با استفاده از ترازوی دیجیتال (دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) صورت پذیرفت. در نهایت برای به دست آوردن وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه آون خشک قرار داده شدند و سپس توزین گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

هر دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا و تجزیه واریانس داده‌ها صورت پذیرفت. مقایسه میانگین اثرهای اصلی به روش LSD و در صورت معنی‌دار شدن برهمکنش‌ها از رویه

جدول ۱- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد بررسی زرشک در تیمار غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و دما

منابع تغییر	درجه آزادی	طول اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	طول ریشه	وزن خشک ریشه	درصد جوانه‌زنی
تیمار	۵	۲۰۳/۵۰**	۰/۰۰۸۳**	۲۴۹/۶۳**	۰/۰۰۵۱**	۸۹۵۴/۱**
گونه	۳	۳/۴۳**	۰/۰۰۰۱**	۱۰۰/۰۹**	۰/۰۰۰۱**	۱۵۵/۳**
تیمار×گونه	۱۵	۶/۹۳**	۰/۰۰۰۴**	۳/۵۰**	۰/۰۰۰۲**	۲۰۰/۷**
خطا	۴۸	۰/۲۴	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۹	۰/۰۰۰۰۱	۱۱/۳
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۱۱	۷/۸۳	۷/۵۱	۱۶/۷۵	۹/۷۱

** و NS به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد و غیرمعنی‌دار را نشان می‌دهند.

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش تیمار غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و دما و چهار گونه زرشک برای صفات مورد بررسی

تیمار	گونه زرشک	طول اندام هوایی (سانتی‌متر)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	طول ریشه (سانتی‌متر)	وزن خشک ریشه (گرم)	درصد جوانه‌زنی
(۰)	زرافشان	۱/۳a	۰/۰۱a	۰/۵۰a	۰/۰۰۴a	۱۴/۷a
	معمولی	۲/۰a	۰/۰۱a	۰/۷۵a	۰/۰۱۰a	۱۶/۰a
	راست خوشه	۱/۰a	۰/۰۱a	۰/۵۰a	۰/۰۱۰a	۱۳/۳a
	زالزالکی	۱/۰a	۰/۰۱a	۰/۵۰a	۰/۰۰۳a	۹/۳b
(۶۰۰)	زرافشان	۳/۸a	۰/۰۳a	۱/۳۳a	۰/۰۱۰a	۲۵/۳b
	معمولی	۲/۲b	۰/۰۴b	۱/۰۰a	۰/۰۱۰a	۳۳/۳a
	راست خوشه	۳/۵a	۰/۰۵c	۱/۰۰a	۰/۰۱۰a	۳۰/۷a
	زالزالکی	۴/۲a	۰/۰۳d	۰/۵۰b	۰/۰۱۰a	۲۲/۷c
(۹۰۰)	زرافشان	۷/۰b	۰/۰۴c	۳/۶۷a	۰/۰۴a	۴۴/۰c
	معمولی	۵/۰c	۰/۰۳c	۲/۱۷b	۰/۰۲b	۶۶/۰a
	راست خوشه	۴/۳d	۰/۰۵b	۱/۳۳c	۰/۰۱۰c	۲۴/۰d
	زالزالکی	۸/۳a	۰/۰۶a	۱/۳۳c	۰/۰۱۰c	۵۴/۰b
(۲۵)	زرافشان	۱/۲a	۰/۰۰۹a	۱/۰۰a	۰/۰۱۰a	۶/۷c
	معمولی	۰/۸a	۰/۰۱a	۰/۴۲a	۰/۰۱۰a	۱۴/۷b
	راست خوشه	۰/۶a	۰/۰۱a	۰/۶۷a	۰/۰۰۱b	۱۷/۳a
	زالزالکی	۰/۵a	۰/۰۱a	۰/۵۰a	۰/۰۰۲bn	۵/۳d
دما (درجه سانتی‌گراد)	زرافشان	۶/۳a	۰/۰۶a	۱۰/۱۷a	۰/۰۲۰a	۳۴/۷a
	معمولی	۶/۸a	۰/۰۴b	۷/۱۷b	۰/۰۳۰a	۲۶/۷b
	راست خوشه	۵/۲b	۰/۰۴b	۶/۵۰b	۰/۰۲۰a	۲۱/۳bc
	زالزالکی	۳/۲c	۰/۰۲c	۵/۵۰c	۰/۰۳۰a	۱۸/۷c
(۵)	زرافشان	۱۱/۲c	۰/۰۷c	۱۴/۱۷a	۰/۰۵a	۸۸/۰a
	معمولی	۹/۲d	۰/۰۶d	۱۱/۶۷b	۰/۰۵a	۸۷/۷ab
	راست خوشه	۱۳/۳b	۰/۰۸b	۱۰/۵۰c	۰/۰۶a	۸۲/۷b
	زالزالکی	۱۴/۵a	۰/۱۰a	۱۴/۵۰a	۰/۰۸a	۸۸/۰a

حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD است

گونه زرشک زالزالکی در تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد دیده شد. به‌طور متوسط با افزایش غلظت اسید جیبرلیک در دمای ۸ درجه درصد جوانه‌زنی افزایش یافت. همچنین با کاهش دما نیز درصد جوانه‌زنی به‌طور چشمگیری افزایش نشان داد. در مجموع، تیمار دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد نتیجه موفق‌تری نسبت به دیگر تیمارهای مورد بررسی نشان داد. همچنین گونه زرشک زالزالکی نسبت به دیگر گونه‌ها، برتر بود. این نتایج با یافته‌های فتحی و همکاران (۱۳۸۸) مبنی بر این‌که جنین‌ها پس از گذر از مرحله دوم میوه به دوره خواب وارد می‌شوند مطابقت دارد.

برای صفت طول ریشه، در تیمار دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد در گونه‌های زرشک زرافشان و زالزالکی، بلندترین طول با اندازه ۱۴/۵ سانتی‌متر و کوتاه‌ترین طول با اندازه ۰/۴ سانتی‌متر در تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زرشک معمولی ملاحظه گردید؛ و در نهایت برای صفت وزن خشک ریشه، در تیمار دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد در زرشک زالزالکی بیشترین وزن خشک (۰/۰۸ گرم) و در گونه زرشک راست خوشه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کمترین وزن خشک (۰/۰۱ گرم) مشاهده شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی (۸۸ درصد) در گونه‌های زرشک زرافشان و زرشک زالزالکی و کمترین درصد جوانه‌زنی (۵/۳۳ درصد) در

خود توجیهی برای شکستن بذر می‌باشد. هدایتی^۵ و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی اثر سه تیمار سرما، گرما و جیبرلیک اسید بر روی شکستن خواب بذر گیاه *Symphoricarpos orbiculatus* مؤثرترین تیمار را سرما معرفی نمودند.

آزمایش دوم: غلبه بر خواب بذر از طریق کشت جنین

۲ تا ۳ روز پس از کشت، کلیه جنین‌ها در هر چهار گونه جوانه زدند و ۲۰ تا ۳۰ روز پس از کشت جنین گیاهچه‌هایی کامل با بنیه مناسب تولید شدند (شکل ۱). بر اساس جدول تجزیه واریانس، برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده (وزن تر و خشک اندام هوایی، طول اندام هوایی، تعداد ساقه، تعداد برگ، وزن تر و خشک



شکل ۱- تولید گیاهچه کامل با استفاده از کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای. الف) رشد گیاهچه حاصل از کشت جنین پس از ۱۰ روز، ب) گیاهچه حاصل از کشت جنین پس از ۲۱ روز و ج) رشد گیاهچه حاصل از کشت جنین پس از ۵۰ روز را نشان می‌دهند.

مقایسه نتایج به دست آمده از تیمارهای اسید جیبرلیک (در دمای ۸°C) و دمای بذره‌های چهار گونه زرشک نشان داد اثر دمای پائین بر افزایش درصد جوانه‌زنی بذره‌های این گیاه بیشتر از سطوح هورمونی مورد استفاده مؤثر است. با توجه به این نتایج احتمال داده می‌شود که عامل سرما علاوه بر تحریک سنتز جیبرلیک اسید درون‌زا، محرک‌های دیگری را فعال می‌کند که موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرها می‌گردد (عموآقایی، ۱۳۸۴). به نظر می‌رسد تیمار دمای پائین سبب کاهش تراز هورمون‌های بازدارنده و افزایش تراز هورمون‌های محرک شده و بدین ترتیب سبب افزایش پتانسیل جوانه‌زنی بذر می‌شود. این رویدادها به‌طور هم‌زمان رخ می‌دهد یعنی جوانه‌زنی در بذرها نتیجه توازن هورمون‌ها می‌باشد (تی‌پیرداماز و گومورژن^۱، ۲۰۰۰). تیمار سرمادهی بذرها در مقایسه با پیش تیمار جیبرلیک اسید (در دمای ۸°C)، بیشترین اثر را در افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها نشان داد. همان گونه که مشاهده شد بذره‌های زرشک بومی ایران خواب فیزیولوژیک از خود نشان داد و سرمادهی تا حد زیادی می‌تواند به رفع این نوع خواب‌ها کمک نماید (عموآقایی، ۱۳۸۴). معمولاً دمای ۵ درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر برای گیاهانی که در اقلیم‌های سرد می‌رویند بیشترین تأثیر را در شکستن خواب بذر دارد (کورنف^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). ویی^۳ و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی تیمارهای مختلف شکستن خواب بر روی بذر *Solanum rostratum* گزارش کردند که خواب مکانیکی به‌وسیله تیمار اسید سولفوریک ۱۴ مولار به مدت ۱۵ دقیقه، خواب فیزیولوژیکی به‌وسیله نیترات پتاسیم با غلظت ۲۰-۴۰ میلی‌مولار و جیبرلیک اسید ۲/۴ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت مرتفع می‌گردد. ویرا^۴ و همکاران (۲۰۰۲) تأثیر سطوح مختلف جیبرلیک اسید بر خواب بذر برنج مطالعه نمودند. آن‌ها نتیجه گرفتند که خیساندن بذر در محلول جیبرلیک اسید با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۶ ساعت برای شکستن بذر بهترین تیمار می‌باشد. بعلاوه طی این مدت فعالیت آلفا-آمیلاز افزایش یافت که

¹ Tipirdamaz and Gomurgen

² Koornneff

³ Wei

⁴ Vieira

⁵ Hidayati

همچنین کم‌ترین وزن خشک (۰/۰۰۵ گرم) نیز در گونه زرشک زالزالکی به ترتیب در تیمارهای MS کامل و MS $\frac{1}{4}$ مشاهده شد. در صفات مربوط به ریشه‌زایی کوتاه‌ترین طول (۰/۵۲ سانتی‌متر) و وزن خشک (۰/۰۰۱ گرم) ریشه به ترتیب در گونه‌های راست خوشه در MS $\frac{1}{2}$ و زرشک زرافشان (تیمار MS کامل) و زرشک زالزالکی (تیمار MS $\frac{1}{4}$) مشاهده شد.

از لحاظ ساقه، تعداد برگ و وزن خشک اندام هوایی تیمار MS کامل و همچنین برای صفت طول اندام هوایی تیمار MS $\frac{1}{2}$ نسبت به دیگر تیمارها برتر بودند. همان‌گونه که نتایج نشان داد گیاهچه‌ها در تیمار MS کامل و همچنین در تیمار MS $\frac{1}{4}$ از نظر تمام صفات اندازه‌گیری شده نسبت به محیط‌های دیگر به کاررفته در آزمایش، به ترتیب بهترین و ضعیف‌ترین پاسخدهی را داشتند. همچنین گیاهچه‌های تولیدی در محیط MS $\frac{1}{4}$ از لحاظ کیفی مطلوب نبودند و دارای برگ‌های گوشتی، کوچک و ساقه کوتاه بودند. دو تا سه روز پس از قرار گرفتن جنین‌ها در محیط کشت، جوانه‌زنی انجام شد که در مقایسه با روش کشت بذر (پوسته‌دار و بدون پوسته) تیمار شده با غلظت‌های مختلف هورمونی (مثل اسید جیبرلیک) و سرما حداقل زمان لازم برای شکست خواب بذر را ۵۰ روز نشان می‌دهد، سرعت قابل توجهی داشتند. بنابراین، نتایج حاصل از آزمایش کشت جنین بذور زرشک نشان داد که با برداشتن پوسته و آندوسپرم اطراف جنین، عوامل بازدارنده رشد برطرف شده و جوانه‌زنی سریع‌تر انجام می‌گیرد؛ که این نتایج با یافته‌های مرتضوی و همکاران (۱۳۹۲) در گیاه چویل، سرآبادانی تفرشی و همکاران (۱۳۸۷) در گیاه باریجه، قاسمیان و همکاران (۱۳۹۰) در گیاه وشا (Dorma ammoniacum)، قاسمی (۱۳۹۲) در گیاه هندوانه ابوجهل (Citrullus colocynthis) و آقایی (۱۳۹۳) در گیاه دارویی سیاه‌دانه (Nigella sativa). همخوانی داشت.

جدول ۳- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات ارزیابی‌شده در کشت درون شیشه‌ای جنین زرشک

منابع تغییر	درجه آزادی	طول اندام هوایی	تعداد ساقه
محیط کشت	۲	۲۱/۰۹**	۰/۴۴۸**
گونه	۳	۲۱/۳۹**	۱/۷۲۸**
محیط کشت×گونه	۶	۶/۴۹**	۱/۲۵۱**
خطا	۲۲	۰/۰۹	۰/۱۳۲
ضریب تغییرات		۷/۵۴	۱۵/۶۱

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

ادامه جدول ۳-

منابع تغییر	تعداد برگ	وزن خشک اندام هوایی	طول ریشه	وزن خشک ریشه
محیط کشت	۶۲۷/۷۵**	۰/۰۱۰**	۱۲/۷۲**	۰/۰۱۲**
گونه	۷۸۶/۷۶**	۰/۰۰۱**	۱۰/۱۰۷**	۰/۰۰۳**
محیط کشت×گونه	۱۸۱/۹۳**	۰/۰۰۳**	۱۱۷/۵۴**	۰/۰۰۵**
خطا	۲/۸۱	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۱۳	۰/۰۰۰۰۰۷
ضریب تغییرات	۹/۶۱۷	۴/۲۴	۶/۴۹	۶/۸۵

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

ریشه و طول ریشه) اثر محیط کشت، گونه و برهمکنش آن‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد تیمار MS $\frac{1}{2}$ بلندترین طول اندام هوایی (۶/۴ سانتی‌متر) و تیمار MS $\frac{1}{4}$ کوتاه‌ترین طول اندام هوایی (۰/۴۳ سانتی‌متر) را در گونه زرشک نشان داد.

برای صفت تعداد ساقه، بیشترین تعداد ساقه (۳/۳ عدد) و کمترین آن (یک عدد) در گونه زرشک راست خوشه نیز به ترتیب در تیمارهای MS کامل و MS $\frac{1}{4}$ بود. زرشک زرافشان بیشترین تعداد برگ (۴۱/۶ عدد) و گونه زرشک زالزالکی کمترین آن را (سه عدد) به ترتیب در تیمارهای MS کامل و MS $\frac{1}{4}$ نشان دادند. بیشترین وزن خشک (۰/۱۱ گرم) در گونه زرشک زرافشان و

تقی نژاد و همکاران: تأثیر اسید جیبرلیک، دما و کشت جنین بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذرها...

جدول ۴- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف محیط کشت اماس و چهار گونه زرشک برای صفات مورد بررسی در کشت درون شیشه‌ای جنین زرشک

غلظت محیط کشت MS	گونه زرشک	طول اندام هوایی (سانتی‌متر)	تعداد ساقه (عدد)	تعداد برگ (عدد)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	طول ریشه (سانتی‌متر)	وزن خشک ریشه (گرم)
MS	زرافشان	۵/۲b	۲/۶bc	۴۱/۶a	۰/۱۲a	۸/۲۶c	۰/۱۵۸a
	معمولی	۵/۳b	۳b	۱۱e	۰/۱۱a	۴/۲۷e	۰/۰۵۸d
	راست خوشه	۴/۴c	۳/۳ab	۱۶/۶cd	۰/۰۴e	۲/۲۸f	۰/۰۶۵c
	زالزالکی	۴/۰cd	۳b	۱۲/۳e	۰/۰۲fg	۳/۶۶e	۰/۰۰۹g
$\frac{1}{2}$ MS	زرافشان	۴/۱c	۲/۶bc	۳۹a	۰/۰۵d	۲/۳۳f	۰/۰۲۲f
	زرشک معمولی	۳/۳d	۱/۶de	۱۷/۳c	۰/۰۲f	۲/۵۱f	۰/۰۰۷g
	راست خوشه	۴/۱c	۱/۹cd	۱۰/۳ef	۰/۰۶c	۱۱/۶۴b	۰/۰۸۲b
	زالزالکی	۶/۴a	۴a	۲۴b	۰/۰۷b	۵/۱۶d	۰/۰۴۲e
$\frac{3}{4}$ MS	زرافشان	۴/۵c	۲cd	۱۳/۳de	۰/۰۱g	۲۰/۵۰a	۰/۰۰۸g
	معمولی	۱/۹e	۱e	۱۳/۶cde	۰/۰۲fg	۳/۴۷e	۰/۰۱۸f
	راست خوشه	۲/۴e	۱e	۶/۶fg	۰/۰۱h	۲/۱۶f	۰/۰۰۰۱h
	زالزالکی	۰/۴f	۱/۶de	۳g	۰/۰۰۵i	۰/۵۲g	۰/۰۰۰۱h

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری بر اساس آزمون L.S.Means در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

مختلف اما در اکثر مواقع راهکارهای ارائه شده مثل اعمال تیمارهای سرما نیاز به مدت زمان طولانی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای دستیابی سریع به گیاهچه زرشک استفاده از کشت جنین درون شیشه‌ای در محیط MS کامل می‌باشد. بنابر نتایج حاصله، می‌توان از این روش در هر فصلی از سال گیاهچه تولید و استفاده کرد. مثلاً با به‌کارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی طول دوره اصلاحی را کاهش داد.

یک عامل محدودکننده در موفقیت کشت جنین، اندازه کوچک جنین‌ها در زمان انتقال آن‌ها به محیط کشت است زیرا دانه‌های زنده فقط از جنین‌های تمایز یافته رشد می‌کنند که بر روی درخت به تمایز رسیده باشند و اندازه‌شان کمتر از نصف تا یک‌سوم اندازه نهایی جنین نباشد (نقل از فتحی و همکاران، ۱۳۸۸). همچنین جنین‌های بزرگ‌تر، علاوه بر سهولت در استخراج جنین، در قدرت و قابلیت جوانه‌زنی آن‌ها مؤثر است (نتایج نشان داده نشدند). بالا بودن درصد جوانه‌زنی برای تولید گیاهچه‌های سالم و یکنواخت در کشت بافت بسیار حائز اهمیت است (ساخانوخوا^۱ و همکاران، ۲۰۰۱).

نتیجه‌گیری

با وجود مطالعات گسترده در خصوص اعمال تیمارهای مختلف برای غلبه بر خواب بذور گیاهان

¹ Sakhanokho

منابع

- آقایی، م. ۱۳۹۳. ریز ازدیادی گیاه دارویی سیاهدانه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد واحد جهرم. ۹۰ صفحه.
- رجبیان، ط.، صبورا، ع.، حسنی، ب. و فلاح حسینی، ح. ۱۳۸۶. اثر جیبرلیک اسید و سرمادهی بر جوانه‌زنی بذر آنغوزه. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۳(۳): ۴۰۴-۳۹۱.
- رضایی، م. و بالندری، ا. ۱۳۹۱. بررسی اثرات استراتیغه سرمایی، اسید جیبرلیک و پوست‌برداری با اسید سولفوریک روی جوانه‌زنی بذور سه ژنوتیپ زرشک ایرانی. مجله علوم و تکنولوژی بذر، ۲(۳): ۱۱-۱۸.
- سرآبادانی تفرشی، ر.، امیدی، م.، بی‌همتا، م.ر. و میرزایی، ر. ۱۳۸۷. اثر ریزنمونه و سطوح مختلف هورمونی در کال‌زایی و ساقه‌زایی گیاه باریجه. مجله نهال و بذر، ۲۴(۴): ۷۶۶-۷۳۶.
- عموآقایی، ر. ۱۳۸۴. تأثیر خیساندن بذور، مدت‌زمان و دمای پیش‌سرمای مرطوب بر شکست خواب بذر کما. مجله زیست‌شناسی، ۱۸(۴): ۳۵۹-۳۵۰.
- فتحی، ح.، ارزانی، ک.، عبادی، ع.، و خلیفی، ا. ۱۳۸۸. تولید گیاهان دورگ گیلاس (سیلز دلامار و زرد دانشکده) با استفاده از کشت جنین. مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۲۵(۱): ۶۴-۵۱.
- قاسمی، ز. ۱۳۹۲. باززایی گیاهچه در تعدادی از توده‌های ایرانی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه یاسوج. ۷۷ صفحه.
- قاسمیان، خ.، ناظری، س. و میرزایی‌اصل، ا. ۱۳۹۰. کشت جنین گیاه وشا و تأثیر محیط کشت و هورمون بر روی رشد آن. اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی.
- مرتضوی، ر.، دهداری، ا.، معصومی‌اصل، ا. و فیاض، ب. ۱۳۹۲. بررسی کشت جنین گیاه چویل در شرایط درون شیشه‌ای جهت غلبه بر خواب بذر. هشتمین همایش ملی بیونکتولوژی ایران. ۱۷-۱۵ مردادماه. تهران، ایران.
- Beraak, J.P. 1978. The effect of flowering date and temperature on embryo development in sweet cherry. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 26: 13-30.
- Hidayati, S.N., Baskin, J.M., and Baskin, C.C. 2001. Dormancy-breaking and germination requirements for seeds of *Symphoricarpos orbiculatus* (Caprifoliaceae). *American Journal of Botany*, 88(8): 1444-1451.
- Koornneff, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opininion in Plant Biology*, 5(1): 33-36.
- Mark, P.B. 1994. A review of plant embryo culture. *Horticulturæ Science*, 29(11): 1243-1246.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant*, 15(3): 473-497.
- Sakhanokho, H.F., Zipf, A., Rajasekaran, K., Saha, S., and Sharma, G.C. 2001. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in upland and pima cotton. *Crop Science*, 41: 1235-1240
- Stanys, V. 1998. Invitro techniques to increase the output of cherry seedling from earlyipening parents. *Acta Horticulturæ*, 468: 203-208.
- Susan, K., Borwn, A., Iezzoni, A.F., and Harold, W.F. 1996. *Cherries* spp. *Horticulturæ Science*, 23: 213-225.
- Tipirdamaz, R., and Gomurgen, N. 2000. The effects of temperature and gibberellic acid on germination of *Eranthis hyemalis* (L.) salisb seeds. *Turkish Journal of Botany*, 24(2): 143-145.

- Vieira, A.R., Vieira, M.G., Fraga, A.C. Oliveira, J.A., and Santos, C.D. 2002. Action of gibberellic acid (GA₃) on dormancy and activity of α-amylase in rice seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 24(2): 43-48.
- Wei, S., Zhang, C., Chen, X., Li, X., Sui, B., Huang, H., Cui, H., Liu, Y., Zhang, M., and Guo, F. 2010. Rapid and effective methods for breaking seed dormancy in buffalobur (*Solanum rostratum*). *Weed Science*, 58(2): 141-146.

Effect of Gibberellic Acid, Temperature and Embryo Culture on Seed Germination of Four Native Species of Barberry (*Berberis* spp.)

Zaynab Taghinezad¹, Massoud Dehdari^{2,*}, Amin Mirshkari², Hossain Zaynali³

¹ Graduated Student of Plant Breeding, University of Yasouj

² Associate and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran

³ Assistant Professor, Research center of Agriculture of Isfahan, Isfahan, Iran

*Corresponding author, E-mail address: adehdari@yu.ac.ir

(Received: 17.02.2015 ; Accepted: 26.08.2015)

Abstract

Medicinal barberry plants, belong to Berberidaceae family. Seeds of barberry have long period dormancy. Therefore, overcome to seed dormancy and increasing germination rate of seeds due to different methods will be useful. In this regard, two separate experiments were designed. In the first experiment, effect of different levels of Gibberellic acid (0, 600 and 900 mg.l⁻¹ at 8°C) and temperatures (25 (control), 10 and 5 °C at 50 days) in a factorial experiment based on the completely randomized design with three replications and in the second experiment, effect of different nutrition concentrations of MS medium (full strength MS, 1/2MS and 1/4 MS) in a completely randomized design with three replications on embryo culture of four native species of barberry (*Berberis integrima*, *B. vulgaris*, *B. crataegina* and *B. orthotrys*) were investigated. Based on the results obtained from the first experiment, chilling treated seeds showed the greatest effect (88%) on seed germination in comparison with gibberellic acid treatment. The results of the second experiment showed that the best MS concentration for embryo culture was full strength MS medium with%100 seed germination in four above mentioned barberry species after 2-3 days. In general, the best method to overcome barberry seed dormancy was an embryo culture in full-strength MS nutrition.

Keywords: *Gibberellic acid, Seed dormancy, Medium culture, Medicinal plant*