

مقاله پژوهشی

## اثر تیمارهای شکست خواب بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم آلfa آمیلاز بذر سه اکوتیپ گون مرتعی (*Astragalus cyclophyllus*)

اکرم رستمی‌پور<sup>۱</sup>، علی مرادی<sup>۲\*</sup>، حمیدرضا عیسوند<sup>۳</sup>

چکیده مبسوط

مقدمه: حالت خواب به‌عنوان یک شیوه اجتناب از تنش‌های اقلیمی اهمیت زیادی در حفظ گونه‌های گیاهی دارد که شامل خواب فیزیولوژیکی، فیزیکی، مورفولوژیکی و مورفوفیزیولوژیکی می‌باشد. سختی پوسته بذر یکی از دلایل اصلی بروز خواب در گیاهان خانواده لگومینوز است. یکی از سازوکارهای اصلی شکست خواب بذر در گیاهان خانواده لگومینوز استفاده از تیمارهای خراش‌دهی است. از آنجایی که کمبود اکسیژن از عوامل القاء‌کننده خواب است، تیمار خراش‌دهی به‌واسطه تسهیل در تبادل گازها به‌ویژه اکسیژن و دی‌اکسید کربن، سبب برطرف شدن خواب بذر و در نهایت افزایش درصد جوانه‌زنی می‌گردد. پرایمینگ با اسید جیبرلیک نیز در شکست خواب فیزیولوژیکی در گونه‌های گیاهی که دچار خواب می‌باشند مؤثر واقع شده و موجب جوانه‌زنی می‌شود. بدین منظور هدف از این تحقیق بررسی شکست خواب، جوانه‌زنی و یافتن مناسب‌ترین تیمار جهت برطرف نمودن خواب بذر سه اکوتیپ گون مرتعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به‌صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول شامل سه اکوتیپ گون مرتعی سمیرم، دماوند و زنجان و عامل دوم شامل تیمارهای شکست خواب بود. تیمارهای اعمال شده عبارت بودند از: شاهد، خراش‌دهی مکانیکی (خراش‌دهی با سمباده) به‌همراه سرمادهی به‌مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس، خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک با غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت زمان ۴۸ ساعت، خراش‌دهی شیمیایی با اسید سولفوریک ۹۶ درصد به‌مدت زمان‌های ۲ و ۴ دقیقه، خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه نیترات پتاسیم ۲ درصد به‌مدت زمان ۷۲ ساعت، خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت زمان ۴۸ ساعت با سرمادهی ۲۰ روز. صفات اندازه‌گیری شده شامل درصد جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی، طول گیاهچه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و فعالیت آنزیم آلfa آمیلاز بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که برهم‌کنش اکوتیپ در تیمار شکست خواب بذر برای کلیه صفات معنی‌دار گردید. بر مبنای نتایج مقایسه میانگین اکوتیپ دماوند در اکثر مؤلفه‌های جوانه‌زنی نسبت به دو اکوتیپ سمیرم و زنجان برتر بود. در مقایسه بین تیمارهای اعمال شده، تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر افزایش برخی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای بیشترین تأثیر را داشت. تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سرمادهی ۲۰ روز نسبت به دیگر تیمارهای اعمال شده سبب افزایش درصد جوانه‌زنی کل در اکوتیپ سمیرم با میانگین ۸۴/۶۷ درصد شد و بر افزایش فعالیت آنزیم آلfa آمیلاز تأثیر بیشتری داشت.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد خواب بذر گون از نوع فیزیولوژیکی نباشد و افزایش جوانه‌زنی می‌تواند ناشی از خراش‌دهی مکانیکی در شکست خواب فیزیکی به‌علاوه اثر پرایمینگ در اثر دو عامل سرما و اسید جیبرلیک باشد.

واژه‌های کلیدی: آلfa آمیلاز، تیمارهای شکست خواب بذر، گون مرتعی

جنبه‌های نوآوری:

- ۱- تأثیر تیمارهای مختلف شکست خواب بر جوانه‌زنی بذر گون بررسی شد.
- ۲- فعالیت آنزیم آلfa آمیلاز بذر گون تحت تأثیر تیمارهای شکست خواب افزایش یافت.



## مقدمه

و زمان برداشت بستگی زیادی دارد. نتایج نشان می‌دهد تنوع بالا در طول سال‌ها در خواب فیزیکی گونه‌ها می‌تواند به علت عوامل محیطی مانند خشکسالی یا سن گیاه مادری باشد (سگورا<sup>۸</sup> و همکاران، ۲۰۱۵). با این وجود، گاه خواب بذر به صورت ویژگی نامطلوبی به نظر می‌رسد، زیرا مطالعه چگونگی فرآیند جوانه‌زنی و یا امکان کشت و زرع ساده به وسیله بذر گیاه را بسیار مشکل می‌سازد (گوپتا<sup>۹</sup>، ۲۰۰۳). سختی پوسته بذر یکی از دلایل اصلی بروز خواب در گیاهان خانواده لگومینوز می‌باشد (فینچ‌سواگ و لیوینزگر<sup>۱۰</sup>، ۲۰۰۶).

پوسته بذر از سه طریق باعث ایجاد خواب می‌شود: تداخل در جذب آب، تداخل در تبدلات گازی و مقاومت مکانیکی (اسمیتز<sup>۱۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از سازوکارهای اصلی شکست خواب بذر در گیاهان خانواده لگومینوز استفاده از تیمارهای خراش‌دهی است (مارتین و دلاکوادر<sup>۱۲</sup>، ۲۰۰۴). اعمال تیمار پیش‌سرما برای برطرف شدن خواب، در بذرهایی که آب جذب می‌کنند، اما جوانه نمی‌زنند، مفید خواهد بود (بیولی<sup>۱۳</sup>، ۱۹۹۷).

در بذرهایی دارای خواب، با سنتز اسید آسزیک در چنین فعالیت آلفا آمیلاز از طریق کاهش میزان اسید جیبرلیک متوقف می‌شود (فری<sup>۱۴</sup> و همکاران، ۲۰۰۴). افزایش جوانه‌زنی با اعمال تیمارهای خراش‌دهی مکانیکی (کاغذ سمباده) و شیمیایی (اسید سولفوریک)، سرمادهی و اسید جیبرلیک در بذرهایی سه نوع گون و یونجه گزارش شده است (بلوچی و مدرس‌ثانوی<sup>۱۵</sup>، ۲۰۰۶؛ عیسوند<sup>۱۶</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). از آنجایی که کمبود اکسیژن از عوامل القاء کننده خواب است، شاید تیمارهای خراش‌دهی به واسطه تسریع در جذب آب و تسهیل در تبادل گازها به ویژه اکسیژن و دی‌اکسید کربن و تیمار سرمادهی به واسطه اثری که در برطرف نمودن عوامل بازدارنده جوانه‌زنی دارد، سبب برطرف

گون مرتعی با نام علمی (*Astragalus cyclophyllus*) از خانواده بقولات<sup>۱</sup> است. در جنس گون ترکیباتی نظیر پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها، ساپونین‌ها و ترکیبات سمی مثل آلکالوئیدهای ایندوزیلیدین، کاستانوسپرمین، آستراگالوزوئید، ترکیبات نیتروآلیفاتیک و سلنیوم وجود دارند (معصومی<sup>۲</sup>، ۲۰۰۵). گیاهان جنس گون دارای موارد استفاده درمانی متعددی هستند، این گیاهان همچنین مولد کتیرای سفید می‌باشد که در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و دارویی کاربرد دارد.

این جنس دارای ۲۵۰۰ گونه می‌باشد. گونه‌های این جنس در مناطق استپی، زیستگاه‌های خشک و نیمه خشک در آمریکای شمالی و جنوبی، اروپا، آسیا و مناطق حاره‌ای آفریقا رشد می‌کنند (مابری<sup>۳</sup>، ۲۰۰۸؛ اسپیرسون<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۰۸). بیش از ۵۵۰ گونه از جنس گون در ایران رشد می‌کنند (مظفریان<sup>۵</sup>، ۱۹۹۶). گون *Astragalus cyclophyllus* بومی ایران می‌باشد و تنها گونه این جنس است که در طولات ۲۶۰۰-۱۷۰۰ متر با میانگین بارندگی سالانه ۵۰۰-۲۰۰ میلی‌متر می‌روید (پارسا<sup>۶</sup>، ۱۹۸۴).

بدیهی است که حالت خواب در بذر برای گیاهان سودمند است، زیرا در این حالت بذر روی گیاه مادری جوانه نخواهد زد و فرصت پراکنش دارد. از سوی دیگر بذر در این حالت غیرفعال است و در نتیجه بسیاری از تنش‌های محیطی و شرایط نامناسب اقلیمی را بهتر تحمل می‌کند که این امر تداوم نسل و بقای گونه گیاهی را تضمین می‌کند (باسکین و باسکین<sup>۷</sup>، ۲۰۰۴). طول دوره خواب و شرایط بهینه جوانه‌زنی بذرها به ساختار ژنتیکی و شرایط اقلیمی که گیاه مادری از آن منشأ گرفته است، موقعیت بذر روی گیاه مادری، لایه ستا و نوع اپیدرم، اندازه و وزن بذر، سن گیاه، طول روز

<sup>8</sup> Segura<sup>9</sup> Gupta<sup>10</sup> Finch-Savage and Leubner-Metzger<sup>11</sup> Schmitz<sup>12</sup> Martin and De la Cuadra<sup>13</sup> Bewley<sup>14</sup> Frey<sup>15</sup> Balouchi and ModarresSanavy<sup>16</sup> Eisvand<sup>1</sup> Fabaceae<sup>2</sup> Masoumi<sup>3</sup> Mabblerley<sup>4</sup> Scherson<sup>5</sup> Mozaffarian<sup>6</sup> Parsa<sup>7</sup> Baskin and Baskin

شد. فاکتور اول شامل سه اکوتیپ سمیرم (طول متوسط ۲۴۰۰ متر از دریا)، دماوند (طول از سطح دریا ۱۹۶۰ متر) و زنجان (طول ۱۶۶۳ متر از سطح دریا) و فاکتور دوم شامل تیمارهای شکست خواب بود. بذره‌های مورد استفاده سه اکوتیپ که در سال ۱۳۹۱ برداشت شده بودند، از بانک ژن مؤسسه جنگل‌ها و مراتع کشور در سال ۱۳۹۲ تهیه شدند. تیمارهای اعمال شده عبارت بودند از: شاهد، خراش‌دهی مکانیکی (خراش‌دهی با سمباده) به همراه سرمادهی به مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس، خراش‌دهی مکانیکی به همراه اسید جیبرلیک با غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت زمان ۴۸ ساعت، خراش‌دهی شیمیایی با اسید سولفوریک ۹۶ درصد به مدت زمان‌های ۲ و ۴ دقیقه، خراش‌دهی مکانیکی به همراه نیترات پتاسیم ۲ درصد به مدت زمان ۷۲ ساعت، خراش‌دهی مکانیکی به همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت زمان ۴۸ ساعت با سرمادهی ۲۰ روز.

بذرها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. ویژگی‌های اولیه آن‌ها شامل وزن هزار دانه، درصد خلوص فیزیکی، درصد جوانه‌زنی اولیه و میزان زنده‌مانی بذر تعیین شدند (جدول ۱). جهت ارزیابی میزان زنده بودن بذر از آزمون تترازولیوم طبق دستورالعمل ایستا<sup>۴</sup> (۲۰۱۳) استفاده شد. قبل از شروع آزمایش جهت حذف بذره‌های پوک، به مدت یک ساعت در بشر حاوی آب مقطر قرار گرفته و هر ۱۵ دقیقه هم زده شدند و در نهایت بذرهایی که بعد از یک ساعت در سطح آب باقی ماندند، حذف شدند. جهت دقت بیشتر و به حداقل رساندن خطا تا حد ممکن بذرهایی انتخاب شدند که از نظر اندازه یکنواخت به نظر می‌رسیدند. قبل از اعمال تیمارها بذرها به مدت ۱۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند. شمارش و ثبت بذره‌های جوانه‌زده به صورت روزانه و تا زمانی که در سه شمارش متوالی افزایش در جوانه‌زنی مشاهده نشد، انجام گرفت. یک بذر هنگامی جوانه‌زده فرض شد که نوک ریشه‌چه از پوسته

شدن خواب بذر و در نهایت افزایش درصد جوانه‌زنی می‌گردد (باسکین و باسکین، ۱۹۹۸).

طوبلی<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی با مقایسه تأثیر روش‌های مختلف شکست خواب بذر گیاه دم گاوی (*Simrnovia iranica*) از خانواده بقولات، بیان کرد که بیشترین میزان جوانه‌زنی بذرها در اثر اعمال تیمار خراش‌دهی با کاغذ سمباده به دست آمد. پرایمینگ بذر با اسید جیبرلیک نیز در شکست خواب گونه‌های گیاهی که دچار خواب می‌باشند مؤثر واقع شده و موجب جوانه‌زنی می‌شود. اسید جیبرلیک باعث فعال‌سازی متابولیسم، هضم مواد ذخیره‌ای و انتقال به جنین، تقسیم و رشد سلولی شده و پدیده جوانه‌زنی القا می‌شود (نجفی<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). مرادی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۰) (۲۰۱۰) اثر هالوپرایمینگ بر شکست خواب و بهبود جوانه‌زنی بذر ارغوان (*Cercis siliquastrum*) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد خراش‌دهی پوسته بذر و به دنبال آن هالوپرایمینگ با نیترات پتاسیم ۷۵۰ میلی‌مولار نقش به‌سزایی در شکست خواب، تحریک و تقویت درصد جوانه‌زنی بذر ارغوان دارد، به طوری که سبب بهبود مشخصه‌های جوانه‌زنی این گونه در مدت زمان کمتری در مقایسه با بذره‌های پرایم نشده می‌شود؛ بنابراین با توجه به اهمیت ویژه گون‌ها از نظر دارویی، علوفه‌ای و اقتصادی و گسترش وسیع آن‌ها در کشور انجام بررسی‌های مختلف در زمینه‌های شکست خواب، کشت بافت و تکثیر بر روی گونه‌های مهم این جنس به خصوص گونه‌های در حال انقراض حائز اهمیت می‌باشد. بدین منظور هدف از این تحقیق بررسی شکست خواب، جوانه‌زنی و یافتن مناسب‌ترین تیمار جهت برطرف نمودن خواب بذر سه اکوتیپ گون مرتعی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام

<sup>1</sup> Tavili

<sup>2</sup> Najafi

<sup>3</sup> Moradi

<sup>4</sup> ISTA

جدول ۱. صفات اندازه‌گیری شده بذر اکوتیپ‌های سمیرم، دماوند و زنجان

صفات مورد بررسی	اکوتیپ Ecotype		
	سمیرم Semirom	دماوند Damavand	زنجان Zanjan
وزن هزار دانه (گرم) 1000 grain weight (g)	4.18	4.32	4.11
بنيه بذر (%) Vigor index (%)	84	91	90
درصد جوانه‌زنی اولیه (%) Primary germination percentage (%)	13	15	10
خلوص فیزیکی (%) Physical purity (%)	99	99	98.5

میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار سرد با اسیدیته ۷/۲ به بذرهای پودر شده اضافه و به خوبی مخلوط شد و به مدت ۲۵ دقیقه در سانتیفریوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و بلافاصله محلول رویی جدا و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. فعالیت آلفا آمیلاز در عصاره بذرهای توسط روش بیکر<sup>۲</sup> (۱۹۹۱) و برنفلد<sup>۳</sup> (۱۹۹۱) تعیین شد و جذب با طول موج ۵۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر قرائت شد (فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول بر دقیقه بر بذر می‌باشد).

تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۵ انجام گرفت.

#### نتایج و بحث

##### درصد جوانه‌زنی کل

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده اکوتیپ (بجز وزن خشک گیاهچه) و تیمارهای شکست خواب بذر و اثر متقابل آن‌ها بر همه صفات جوانه‌زنی در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها حاکی از اثر معنی‌دار اغلب تیمارها بر بهبود جوانه‌زنی بذر گون بود (جدول ۳) و بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه

بذر خارج شده بود (۲ میلی‌متر بر اساس استاندارد ایستا). پس از اتمام آزمون جوانه‌زنی صفات درصد جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی، طول گیاهچه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد جوانه‌زنی کل از رابطه ۱ به‌دست آمد:

$$\%GP = \frac{n}{N} \times 100 \quad (1)$$

که در این رابطه، Gp درصد جوانه‌زنی کل، n تعداد بذرهای جوانه زده و N تعداد کل بذرهای کشت شده می‌باشند.

##### اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

برای اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلاز از بذرهای تیمارهای با میانگین مطلوب شاخص‌های جوانه‌زنی استفاده شد. بدین منظور، بذرهای تیمار شده و تیمار نشده به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت ماسه قرار گرفتند تا فرایندهای جوانه‌زنی در بذر آغاز شود. پس از آن نمونه‌های بذری از تیمارهای مورد نظر درون میکروتیوپ قرار گرفتند و بلافاصله درون نیتروژن مایع ریخته شدند، سپس تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ۰/۵ گرم از بذرها که بعد از مدت زمان ۴۸ دقیقه آبنوشی جمع‌آوری شده بودند در هاون سرد با نیتروژن مایع به خوبی پودر شدند برای استخراج عصاره آنزیم از روش بیسواس<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۷) استفاده شد. بر این اساس ۱۰

<sup>2</sup> Baker

<sup>3</sup> Bernfeld

<sup>1</sup> Biswas

جدول ۲. تجزیه واریانس تیمارهای شکست خواب بذر برای برخی صفات جوانه‌زنی گون

**Table 2.** Analysis of variance for seed dormancy breaking treatments on some germination traits of *Astragalus cyclophyllus*

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی کل Total germination percentage	میانگین زمان جوانه‌زنی Mean germination time	طول گیاهچه Seedling height	وزن تر گیاهچه Seedling fresh weight	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight
اکوتیپ (A) اکوتیپ‌های تیمارهای شکست خواب بذر	2	177.73**	9.13**	16.31**	0.05**	0.02 <sup>ns</sup>
Dormancy breaking treatments (B)	9	2635.90**	24.08**	1212.26**	1.15**	4.48**
اکوتیپ × تیمارهای شکست خواب بذر B × A	18	381.38**	4.06**	100.77**	0.20**	0.66**
Error خطای آزمایشی	60	17.53	0.21	1.14	0.004	0.013
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	-	8.22	8.94	2.01	7.93	10.03

\*\* و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و غیرمعنی‌داری را نشان می‌دهند.

\*\*and ns., significant at 1% and not significant probability levels, respectively.

سمیرم جوانه‌زنی بالاتری داشت. در هر سه اکوتیپ اعمال تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک به مدت زمان ۴ دقیقه در مقایسه با اعمال این تیمار در زمان ۲ دقیقه بر افزایش درصد جوانه‌زنی دو اکوتیپ زنجان و دماوند تأثیر بیشتری داشت. با توجه به این‌که اکوتیپ‌های مورد مطالعه دارای مبدأ با اقلیم سرد هستند، بنابراین به منظور افزایش جوانه‌زنی نیاز به تیمار سرمادهی بیشتر از ۱۰ روز دارند. به نظر می‌رسد بذر گونه‌های رشد یافته در مناطق با زمستان سردتر در مقایسه با مناطق دارای زمستان ملایم نیاز به سرمادهی بیشتری دارند (وستوود و جورنستید<sup>۳</sup>، ۲۰۰۲). تأثیر تیمار خراش‌دهی مکانیکی به همراه اسیدجیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سرمادهی ۲۰ روز بر افزایش درصد جوانه‌زنی در برخی گونه‌های گون مانند *Astragalus cicer* L. (خیاط مقدم<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۱۵) و *Astragalus tribuloides* (فاتح<sup>۵</sup> و همکاران، ۲۰۰۵) نیز گزارش شده است.

همچنین تأثیر سرمادهی ۲۰ روز بر درصد جوانه‌زنی اکوتیپ دماوند و زنجان نسبت به اکوتیپ سمیرم بیشتر بود.

اسیدجیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سرمادهی ۲۰ روز در اکوتیپ سمیرم با میانگین ۸۴/۶۷ درصد بود. این درحالی است که کمترین جوانه‌زنی مربوط به بذرهای تیمار نشده هر سه اکوتیپ با میانگین تقریبی ۱۸/۷ درصد بود.

بذرهای با خراش‌دهی مکانیکی به همراه سرمادهی به مدت ۲۰ روز به طور متوسط درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به اعمال همین تیمار با سرمادهی ۱۰ و ۳۰ روز داشتند. بررسی‌های فیزیولوژیکی نشان داده است که تیمار سرمادهی در مورد بذرهای منجر به تغییر نسبت هورمون‌های درونی بذر به نفع اسید جیبرلیک، تغذیه جنین و در نهایت جوانه‌زنی می‌شود، متخصصان مسائل بذری معتقدند که این هورمون می‌تواند جانشین مناسبی برای برطرف نمودن نیاز سرمایی بذر یا حتی فراتر از آن کلیه عوامل مؤثر بر جوانه‌زنی بذر باشد (رضوانی<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۱۴).

خراش‌دهی مکانیکی به همراه سرما و اسید جیبرلیک مهم‌ترین عامل شکستن خواب بذر و افزایش جوانه‌زنی در گیاهان تیره لگوم می‌باشد (ماچیا<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۱). در میان سه اکوتیپ مورد مطالعه اکوتیپ

<sup>3</sup> Westwood and Jornstad

<sup>4</sup> Khayat Moghadam

<sup>5</sup> Fateh

<sup>1</sup> Rezvani

<sup>2</sup> Macchia

جدول ۳. مقایسه میانگین برهم‌کنش اکوتیپ و تیمارهای شکست خواب بذر برای برخی صفات جوانه‌زنی در گون (در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند).

**Table 3.** Mean comparisons of amphidiarthrodial ecotype and seed dormancy breaking treatments on some germination traits of *Astragalus cyclophyllus* (in each column means having the same letter are not significantly different from each other according to Duncan 0.05).

اکوتیپ	تیمار شکست خواب	جوانه‌زنی (درصد)	میانگین زمان جوانه‌زنی (روز)	طول گیاهچه (سانتی‌متر)	وزن تر گیاهچه (گرم)	وزن خشک گیاهچه (گرم)
Ecotype	Dormancy breaking treatment	Total germination percentage (%)	Mean germination time (d)	Seedling height (cm)	Seedling Fresh weigh (g)	Seedling Dry weight (g)
سمیرم Semirom	t1	20j	9.36a	4.03 r	0.14 l	0.03 o
	t2	20 j	8.44 b	5.76 hi	0.4 k	0.04 n
	t3	64fg	4.61gh	5.51 kl	1.15 cd	0.14 d
	t4	50.67ef	7.46 c	5.89gh	0.94e	0.13 d
	t5	54.67 e	4.21 hi	6.61 c	0.94 e	0.09i
	t6	45.33fg	4.67gh	5.55jk	0.59 hi	0.05i
	t7	51.33ef	3.19jk	4.84m	0.62gh	0.07 k
	t8	51.33ef	4.01 hi	3.15 t	0.52ij	0.09i
	t9	50ef	3.99 hi	6.89 b	1.24bc	0.09i
	t10	84.67 a	3.24jk	4.62 n	1.49 a	0.37a
دماوند Damavand	t1	18.33 j	8.26bc	3.98 r	0.14 l	0.03 o
	t2	18.67 j	5.33ef	4.55 no	0.39 k	0.04 n
	t3	70bc	6.09de	6.57 c	1.33 b	0.17 c
	t4	66.67bc	7.83bc	7.37 a	1.47 a	0.17 c
	t5	68bc	4.13 hi	7.04 a	1.44 a	0.14 d
	t6	53.33ef	6.28 d	5.33 l	0.71fg	0.08i
	t7	52.67ef	4.58gh	4.27pq	0.66fg	0.07 j
	t8	72.33bc	1.9 m	3.12 t	0.43jk	0.08i
	t9	49.33ef	6.28 d	6.34 d	0.93 e	0.1 h
	t10	67.33bc	4.76gh	3.95 r	1.3 b	0.28 b
زنجان Zanjan	t1	18 j	7.51 c	4.43 op	0.17 l	0.04no
	t2	34.67i	3.49ij	6.23 de	0.69fg	0.06 lm
	t3	68bc	4.83gh	6.01fg	1.08 d	0.27 b
	t4	53.33ef	5.85 de	5.63ij	0.67fg	0.09i
	t5	71.33bc	3.43ij	6.74bc	1.31b	0.13 e
	t6	37.67 hi	4.81gh	5.5 kl	0.67fg	0.07 j
	t7	64.67 cd	2.53 lm	5.72 hi	1.13 d	0.12 f
	t8	74 b	4.48gh	3.66s	0.74 f	0.11gh
	t9	43.33gh	5.24fg	6.12ef	1.07 d	0.08i
	t10	33.33i	2.79 kl	4.12qr	0.61gh	0.15 d

t1: بیانگر بذر تیمار نشده، t2 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+۱۰ روز سرمادهی، t3 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+۲۰ روز سرمادهی، t4 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+۳۰ روز سرمادهی، t5 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، t6 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+اسید جیبرلیک ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، t7 تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک ۹۶ درصد به مدت ۲ دقیقه، t8 تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک ۹۶ درصد به مدت ۴ دقیقه، t9 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+نترات پتاسیم ۲ درصد، t10 تیمار خراش‌دهی مکانیکی+اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر+سرمادهی ۲۰ روز).

t1: Control, t2: Mechanical scarification+10 days stratification, t3: Mechanical scarification+20 days stratification, t4: Mechanical scarification+30 days stratification, t5: Mechanical scarification + gibberellic acid 400 mg/liter, t6: Mechanical scarification + gibberellic acid 500 mg/liter, t7: Scarification with sulfuric acid 96% for 2 minutes, t8: Scarification with sulfuric acid 96% for 4 minutes, t9: Mechanical scarification+2% potassium nitrate, t10: Mechanical scarification + gibberellic acid 400 mg/liter+20 days stratification).

۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر همین تیمار بر افزایش درصد جوانه‌زنی اکوتیپ دماوند و زنجان با میانگین ۶۹/۶۶

تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت

سانتی‌متر بود. اختلاف طول گیاهچه در اکوتیپ زنجان نسبت به اکوتیپ‌های دماوند و سمیرم ۳/۱۱ درصد بود. در خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه سرما، خراش‌دهی مکانیکی بیشترین تأثیر را در تولید گیاهچه‌های عادی داشت، در صورتی‌که سرما نسبت مواد تحریک کننده جوانه‌زنی را به مواد بازدارنده افزایش داد (کرمود و فینچ‌ساواج<sup>۳</sup>، ۲۰۰۲). با حذف پوسته بذرهای تحت تیمار سرمادهی مرطوب، فرایند جوانه‌زنی در آن‌ها رخ می‌دهد، به‌دنبال آن گیاهچه‌های تولید شده دارای میانگره‌های بلند و رشد سریع خواهند بود. همچنین کاربرد اسید جیبرلیک باعث افزایش طول میانگره‌ها و در نهایت افزایش طول ساقه‌چه می‌شود (تیلور و ویرینگ<sup>۴</sup>، ۱۹۹۷). در اکوتیپ زنجان تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه سرمادهی ۱۰ روز در مقایسه با مدت زمان ۲۰ و ۳۰ روز این تیمار بیشترین تأثیر را بر افزایش طول گیاهچه با میانگین ۶/۲۳ سانتی‌متر داشت، تیمار خراش‌دهی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر این تیمار به ترتیب در هر سه اکوتیپ سمیرم (۶/۶۱ سانتی‌متر)، دماوند (۷/۰۴ سانتی‌متر) و زنجان (۶/۷۴ سانتی‌متر) تأثیر بیشتری بر افزایش طول گیاهچه نشان داد. اسید جیبرلیک با تحت تأثیر قرار دادن فرآیندهای سلولی از جمله تحریک تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها سبب افزایش رشد رویشی می‌گردد. اسید جیبرلیک با افزایش کشش دیواره سلولی یعنی انبساط دیواره از طریق هیدرولیز نشاسته به قند که کاهش پتانسیل آب سلول را به‌دنبال دارد، سبب ورود آب به درون سلول و طویل شدن سلول می‌شود (استوارت و جانسون<sup>۵</sup>، ۱۹۹۷). تیمار اسید سولفوریک گرچه سبب افزایش درصد جوانه‌زنی گردید، اما اثرات مضر آن نیز بالا بوده به‌طوری‌که مدت زمان ۴ دقیقه این تیمار بیشترین درصد گیاهچه‌های کوتاه (غیر نرمال) را در هر سه اکوتیپ با میانگین ۳/۳۱ سانتی‌متر ایجاد کرد، اما تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک در مدت زمان ۲ دقیقه بر افزایش طول گیاهچه در هر سه اکوتیپ به ترتیب

درصد بیشترین تأثیر را داشت. در دمای پایین اکسیژن بیشتری در آب حل می‌شود، بنابراین نیازهای اکسیژنی جنین بهتر جبران می‌گردد (یانگ و یانگ<sup>۱</sup>، ۱۹۸۶).

### میانگین زمان جوانه‌زنی

میانگین زمان جوانه‌زنی (معادل ۹ روز) در بذرهای تیمار نشده اکوتیپ سمیرم بالاترین مقدار بود و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی مربوط به تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک به‌مدت زمان ۴ دقیقه (معادل ۲ روز) در اکوتیپ دماوند و مدت زمان ۲ دقیقه این تیمار در اکوتیپ زنجان بود (جدول ۳). ابوقاعد<sup>۲</sup>، (۲۰۰۷) با بررسی تأثیر تیمارهای سرمادهی و اسید جیبرلیک بر بذرهای سه گونه بنه (*P. atlantica* Desf.)، *P. palaestina* Bioss. و *P. lentiscus* L. نشان دادند که شاخص میانگین زمان جوانه‌زنی تحت تیمار سرمادهی و اسید جیبرلیک کاهش یافت. با توجه به پایین‌تر بودن میانگین زمان جوانه‌زنی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک نسبت به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آن، می‌توان گفت افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده با اسید جیبرلیک ممکن است از طریق کوتاه کردن مدت زمان سوخت و ساز باعث تسریع جوانه‌زنی شده و به دنبال آن منجر به کاهش میانگین زمان جوانه‌زنی شود (باسکین و باسکین، ۲۰۰۴).

### طول گیاهچه

مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که بیشترین طول گیاهچه مربوط به تیمارهای خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه سرمادهی ۳۰ روز در اکوتیپ دماوند و تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در همین اکوتیپ با میانگین ۷/۳۷ سانتی‌متر و کمترین طول گیاهچه مربوط به تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک به‌مدت ۴ دقیقه در اکوتیپ‌های سمیرم و دماوند با میانگین ۳/۱۵ و ۳/۱۲

<sup>3</sup> Kermod and Finch-Savage

<sup>4</sup> Taylor and Wearing

<sup>5</sup> Stuart and Jones

<sup>1</sup> Young and Young

<sup>2</sup> Abu-Qaoud.

وزن تر گیاهچه تأثیر به‌سزایی داشته باشند (جایورون<sup>۱</sup>، ۲۰۰۰). همچنین در هر سه اکوتیپ اعمال مدت زمان ۲۰ روز این تیمار در مقایسه با مدت زمان ۱۰ روز تأثیر بیشتری در افزایش وزن تر این اکوتیپ‌ها داشت و در اکوتیپ دماوند با میانگین ۱/۳۳ گرم این تأثیرگذاری بیشتر بود. در هر سه اکوتیپ تأثیر تیمار اسید سولفوریک در مدت زمان ۲ دقیقه بر افزایش وزن تر در مقایسه با مدت زمان ۴ دقیقه بیشتر بود.

### وزن خشک گیاهچه

مطابق نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) بیشترین میزان وزن خشک گیاهچه مربوط به تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سرمادهی ۲۰ روز در اکوتیپ سمیرم با میانگین ۰/۳۷ گرم بود و کمترین میزان وزن خشک گیاهچه در بذره‌های تیمار نشده اکوتیپ‌های سمیرم، دماوند و زنجان با میانگین ۰/۳ گرم مشاهده شد. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و مدت زمان‌های سرمادهی بر جوانه‌زنی بذر انجیر (*Ficus carica* L.) گزارش شده است که تیمار اسید جیبرلیک با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲۱ روز سرمادهی نقش مؤثری بر افزایش جوانه‌زنی داشتند (کالیسکان<sup>۲</sup>، ۲۰۱۲). تأثیر تیمار خراش‌دهی به‌همراه سرمادهی با مدت زمان ۱۰ روز بر وزن خشک گیاهچه در هر دو اکوتیپ سمیرم و دماوند یکسان و به اندازه بذره‌های تیمار نشده بود. مدت زمان ۲۰ و ۳۰ روز این تیمار بر افزایش وزن خشک گیاهچه دو اکوتیپ سمیرم و دماوند یکسان عمل کرده و بیشترین تأثیر مدت زمان ۲۰ روز این تیمار بر افزایش وزن خشک گیاهچه اکوتیپ زنجان با میانگین ۰/۲۷ گرم مشاهده شد. در بررسی تأثیر تیمار سرمادهی بر پارامترهای جوانه‌زنی در گیاه ماگنولیا (*Magnolia grandiflora* L.) مشخص شد که تیمار سرمادهی به‌مدت ۹۰ روز نسبت به ۳۰ و ۱۲۰ روز بیشترین وزن خشک گیاهچه در این گیاه را به دنبال داشت (فتوح و حسن<sup>۳</sup>، ۲۰۱۴). تأثیر تیمار خراش‌دهی

سمیرم (۴/۸۴ سانتی‌متر)، دماوند (۴/۲۷ سانتی‌متر) و زنجان (۵/۷۲ سانتی‌متر) مؤثرتر بود. دلیل این امر به احتمال زیاد می‌تواند مربوط به غیر یکنواخت بودن ضخامت پوسته و مقاومت توده بذری در برابر اسید باشد؛ زیرا چنین توده‌های بذری از نظر خصوصیات کنترل‌کننده خواب، غیر یکنواخت هستند. اگر مدت زمان نگهداری بذرها در اسید کم باشد تعدادی از آن‌ها جذب آب نخواهند داشت و اگر مدت افزایش یابد، چنین بذرهایی که دارای پوسته ضعیف‌تری هستند خسارت می‌بینند و این امر سبب از بین رفتن بذر یا تولید گیاهچه غیر عادی می‌شود (عیسوند و همکاران، ۲۰۰۶). خراش‌دهی مکانیکی بیشترین تأثیر را در تولید گیاهچه‌های عادی داشت، خراش‌دهی مکانیکی اثرات نامطلوبی روی جنین و ساختار بذر وارد نمی‌کند و به دلیل نزدیکی بیشتری که به شرایط طبیعی دارد، برای جوانه‌زنی بذره‌های گون مناسب‌تر است (عیسوند و همکاران، ۲۰۰۶).

### وزن تر گیاهچه

همان‌طور که نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سرمادهی ۲۰ روز در اکوتیپ سمیرم با میانگین ۱/۴۹ گرم دارای بیشترین تأثیر در افزایش وزن تر گیاهچه و کمترین میزان وزن تر گیاهچه مربوط به بذره‌های تیمار نشده هر سه اکوتیپ با میانگین ۰/۱۴ گرم بود. اثر سرمادهی با جیبرلین در بذرهایی که در نهایت جوانه‌زنی در آن‌ها صورت می‌گیرد به‌دلیل افزایش در مرحله اول و دوم آب‌نوشی بر فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده ذخایر غذایی در بذر و سوخت و ساز سلولی تأثیر می‌گذارد. از عوامل محرک جوانه‌زنی می‌توان به عنوان عوامل کمکی و مکمل استفاده نمود زیرا فرایند جوانه‌زنی بذره‌های دارای پوشش سخت در نتیجه اثر متقابل مجموعه‌ای از عوامل درونی و بیرونی هدایت خواهد شد. تلفیق تیمارهای سرمادهی، حذف پوسته بذر و به‌کارگیری هورمون‌های محرک می‌توانند از طریق تأثیر بر رشد گیاهچه در افزایش وزن خشک و

<sup>۱</sup>Jauron

<sup>۲</sup>Caliskan

<sup>۳</sup>Fotooh and Hasan



وی‌پرا<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند در بذرهایی که دارای خواب زیاد هستند به دلیل عدم تعادل دو هورمون اسید آبسزیک و اسید جیبرلیک به نفع اسید آبسزیک، میزان فعالیت آلفا آمیلاز کمتر است. نتایج حاصل از بررسی تأثیر تیمار خراش‌دهی مکانیکی به همراه سرمادهی به مدت ۴ ماه و اسید جیبرلیک ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر جوانه‌زنی بذر سرخ‌دار (*Taxus chinensis*) نشان داد که فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بعد از اعمال این تیمار افزایش معنی‌داری یافت (ژانگ<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۱۲). در بذرهایی مرزنگوش (*Origanum vulgare*) فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از ۲۰ درصد در بذرهایی تیمار نشده به ۹۵ درصد در بذرهایی تیمار شده با سرمادهی به مدت ۷ روز و اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسید (توکل‌افشاری<sup>۳</sup> و همکاران، ۲۰۱۲). سرمادهی کوتاه مدت در دماهای زیر صفر به‌عنوان یک شوک سرمایی به بذر است تا علاوه بر شکست خواب بذر، زمان جوانه‌زنی نیز کاهش و فعالیت آنزیم‌ها افزایش یابد (رضوانی و حاجی بلند<sup>۴</sup>، ۲۰۰۹). جیبرلین اثر مطلوبی در راه اندازی بسیاری از واکنش‌های آنزیمی مربوط به جوانه‌زنی دارد (ال-دینگاوی<sup>۵</sup>، ۲۰۰۵). بررسی‌های فیزیولوژیک نشان داده که تیمار سرمادهی در مورد بذرها منجر به افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز و جوانه‌زنی می‌شود (اسمیتز و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای دیگر تغییرات فعالیت آلفا آمیلاز در طی جوانه‌زنی ارزن انگشتی (*Eleusine coracana*) نشان داد که فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهایی تیمار شده با اسید جیبرلیک نسبت به شاهد افزایش یافت (دوروت و ناوفومی<sup>۶</sup>، ۲۰۰۲).

آنچه مسلم است سرما باعث ترشح هورمون جیبرلین در بذر شده و با افزایش این هورمون میزان اسید آبسزیک کاهش می‌یابد. سپس اسید جیبرلیک به لایه آلورون رفته و آنزیم‌های مختلفی را فعال می‌کند. یکی از این آنزیم‌ها آلفا آمیلاز است که موجب شکسته شدن

مکانیکی به همراه اسید جیبرلیک با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آن بر افزایش وزن خشک گیاهچه در هر سه اکوتیپ بیشتر بود. تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک در هر دو زمان ۲ و ۴ دقیقه تأثیر یکسانی بر افزایش وزن خشک گیاهچه در هر سه اکوتیپ نشان داد.

### فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس حاکی از تأثیر معنی‌دار برهم‌کنش اکوتیپ و تیمارهای شکست خواب بذر بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در سطح یک درصد بود (جدول ۴). به‌طور کلی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهایی تیمار شده افزایش پیدا کرد. مطابق نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش اکوتیپ و تیمارهای شکست خواب بذر (جدول ۵) بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار خراش‌دهی مکانیکی به اضافه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سرمادهی ۲۰ روز در اکوتیپ سمیرم به میزان ۲۳/۹۹ میکرومول بر میلی‌گرم وزن تر بذر و کمترین فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز مربوط به بذرهایی تیمار نشده اکوتیپ‌های زنجان با میانگین ۴/۷۶ میکرومول بر میلی‌گرم وزن تر بذر بود. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهایی تیمار نشده اکوتیپ سمیرم نسبت به اکوتیپ‌های دماوند و زنجان بیشتر بود. تأثیر تیمار خراش‌دهی مکانیکی به همراه سرمادهی ۱۰ روز در هر سه اکوتیپ از لحاظ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز نسبت به دیگر تیمارهای اعمال شده کمتر بود. تیمار خراش‌دهی مکانیکی به همراه اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را بر افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهایی اکوتیپ دماوند بر جای گذاشت و تأثیر آن در دو اکوتیپ دیگر به یک اندازه بود. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک به مدت زمان ۴ دقیقه در دو اکوتیپ زنجان و سمیرم به یک اندازه افزایش یافت. با توجه به بررسی میزان فعالیت این آنزیم در بذرهایی تیمار نشده و تیمار شده می‌توان گفت فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهایی خواب و غیر خواب که آب‌نوشی کرده بودند، افزایش داشت.

<sup>1</sup> Vieira

<sup>2</sup> Zhang

<sup>3</sup> Tavakol-Afshari

<sup>4</sup> Razavi and Hajiboland

<sup>5</sup> El-Dengawy

<sup>6</sup> Doroth and Naofumi

جدول ۴. تجزیه واریانس تیمارهای شکست خواب بذر بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در گون

**Table 4.** Analysis of variance of seed dormancy breaking treatments on the activity of  $\alpha$ -amylase in the *Astragalus cyclophyllus*.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	آلفا آمیلاز $\alpha$ -amylase
اکوتیپ Ecotype (A)	2	43.54**
تیمارهای شکست خواب بذر Dormancy breaking treatments (B)	5	69.24**
اکوتیپ $\times$ تیمارهای شکست خواب بذر B $\times$ A	10	52.06**
خطای آزمایشی Error	36	0.22
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	-	5.95

\*\*معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد را نشان می‌دهد.

\*\*significant at 1% probability level

گون بایستی سختی و نفوذناپذیری پوسته بذر توسط تیمارهای خراش‌دهی مکانیکی یا شیمیایی رفع شود و چنین استنباط می‌شود که خواب بذر این گونه گیاهی از نوع فیزیکی می‌باشد زیرا با حذف پوسته بذر قادر به جوانه‌زنی خواهند بود.

#### تشکر و قدردانی

از همکاری مسئولین محترم آزمایشگاه زراعت و گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، دانشگاه یاسوج و تمامی کسانی که به‌نحوی در پیشبرد این تحقیق مشارکت داشتند، نهایت سپاس و تشکر را داریم.

قندها و نشاسته بذر شده و آن‌ها را به مواد قابل استفاده جنین تبدیل می‌کند.

آمیلازها نشاسته را هیدرولیز و قندهای لازم برای جوانه‌زنی را فراهم می‌کنند. آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌همراه سلولازها در تخریب دیواره سلولی به‌کار می‌روند که اولین گام ضروری برای سست کردن پوسته قبل از خروج ریشه‌چه است (کاپلند و مک‌دونالد<sup>۱</sup>، ۱۹۹۵).

#### نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک به‌مدت زمان ۴ دقیقه بیشترین تأثیر را در افزایش صفات جوانه‌زنی در هر سه اکوتیپ داشت. به‌نظر می‌رسد خواب بذر گون از نوع فیزیولوژیک نباشد و تیمار خراش‌دهی مکانیکی به‌همراه اسید جیبرلیک با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سرمادهی ۲۰ روز که توانسته بیشترین تأثیر را در صفت درصد جوانه‌زنی داشته باشد می‌تواند ناشی از تأثیر تیمار خراش‌دهی مکانیکی در شکست خواب به‌علاوه اثر پرایمینگ دو عامل سرما و اسید جیبرلیک باشد (اسید جیبرلیک و سرمادهی با بهبود قوه نامیه بذر و افزایش کیفیت فیزیولوژیکی با طولانی کردن مرحله اول و دوم آب‌نوشی سبب شد تا فعالیت‌های آنزیمی به‌خوبی صورت گرفته و در نهایت منجر به افزایش جوانه‌زنی گردد). برای جوانه‌زنی بذر

<sup>1</sup> Copeland and McDonald

جدول ۵. مقایسه میانگین برهم‌کنش اکوتیپ و تیمارهای شکست خواب بذر برای فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در گون (میانگین‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند).

**Table 5.** Mean comparisons of amphidiarthrodial ecotype and seed dormancy breaking treatments for  $\alpha$ -amylase enzyme activity of *Astragalus cyclophyllus* (means having the same letter are not significantly different from each other according to Duncan 0.05).

اکوتیپ	تیمار شکست خواب	آلفا آمیلاز (میکرومول بر میلی‌گرم بذر)
Ecotype	Dormancy breaking treatment	$\alpha$ -amylase ( $\mu\text{m}/\text{mg}$ seed)
سمیرم Semirom	t1	7.13 e
	t2	6.51 f
	t5	7.83d
	t8	8.11 d
	t10	23.99 a
دماوند Damavand	t11	5.42 h
	t1	5.59 h
	t2	5.55 h
	t5	10.87b
	t8	9.5c
زنجان Zanjan	t10	9.05 c
	t11	8.13d
	t1	4.76i
	t2	5.63 h
	t5	7.61 d
زنجان Zanjan	t8	7.28d
	t10	6 g
	t11	5.14 h

t<sub>1</sub> بیانگر بذر تیمار نشده، t<sub>2</sub> تیمار خراش‌دهی مکانیکی+۱۰ روز سرمادهی، t<sub>5</sub> تیمار خراش‌دهی مکانیکی+اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، t<sub>8</sub> تیمار خراش‌دهی با اسید سولفوریک ۹۶ درصد به مدت ۴ دقیقه، t<sub>9</sub> تیمار خراش‌دهی مکانیکی+نیترات پتاسیم ۲ درصد، t<sub>10</sub> تیمار خراش‌دهی مکانیکی+اسید جیبرلیک ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر+سرمادهی ۲۰ روز، t<sub>11</sub> بذر خشک  
(t<sub>1</sub>: Control, t<sub>2</sub>: Mechanical scarification+10 days stratification, t<sub>5</sub>: Mechanical scarification + gibberellic acid 400 mg/liter, t<sub>8</sub>: Scarification with sulfuric acid 96% for 4 minutes, t<sub>9</sub>: Mechanical scarification+2% potassium nitrate, t<sub>10</sub>: Mechanical scarification + gibberellic acid 400 mg/liter + 20 days stratification, t<sub>11</sub>: Dry seed).

#### منابع

- Abu-Qaoud, H. 2007. Effect of scarification, gibberellic acid and stratification on seed germination of three *Pistacia* species. *Research Natural Science*, 21:2-11.
- Baker, J.E. 1991. Purification and partial characterization of Alpha-amylase Allozyme from the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*, 21: 303-311. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90020-F](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90020-F)
- Balouchi, H.R. and Modarres Sanavy, S.A.M. 2006. Effect of gibberellic acid, prechilling, sulfuric acid and potassium nitrate on seed germination and dormancy of annual Medics. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (15): 2875-2880. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2875.2880>
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. 1998. *Seeds Ecology, Biogeography, Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. San Diego. CA, USA: Academic Press.

- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14:1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>
- Bernfeld, P. 1991. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1: 149-151.
- Bewley, D.J., and Black, M. 1985. *Seeds Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. New York, 445p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1747-4>
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Biswas, P.K., Devi, A., Roy, P.K. and Paul, K.B. 1987. Enzyme activity in dormant and non-dormant larg crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) seeds following hydration. *Weed Science*, 26(1): 90-93. <https://doi.org/10.1017/S0043174500032744>
- Caliskan, O., Maviand K. and Polat, A. 2012. Influences of presowing treatments on the germination and emergence of fig seeds (*Ficus carica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, 34(3): 294-297. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i3.13392>
- Copeland, L.O. and McDonald, M.B. 1995. *Principals of seed science and technology*. Third Edition. Chapman and Hall. New York. 236p.
- Doroth, M. and Naofumi, K. 2002. Changes in alpha- and Beta-amylase activities during seed germination of African finger millet. *Food Science and Biotechnology*, 52(6): 481-488. <https://doi.org/10.1080/09637480220164361>
- Eisvand, H.R., Arefi, H.M. and Tavakol-Afshari, R. 2006. Effects of various treatments of breaking seed dormancy of *Astragalus siliquosus*. *Seed Science and Technology*, 34(3): 747-752. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.3.22>
- El-Dengawy, E.F.A. 2005. Promotion of seed germination and subsequent seedling growth of loaquat (*Eriobotrya japonica*) by moist-chilling GA3 applications. *Scientia Horticulturae*, 105(3): 331-342. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.027>
- Fateh, E., Majnoonhosseini, N., Arefi, H.M. and Sharif-Zadeh, F. 2005. Seed dormancy methods breakage in *Astragalus tribuloides*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 13(4): 345-360 [In Persian with English Summary].
- Fetouh, M. I. and Hassan, F.A. 2014. Seed germination criteria and seedling characteristics of *Magnolia grandiflora* L. trees after cold stratification treatments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3): 235-241.
- Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3): 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Frey A., Godin, B., Bonnet, M., Sotta, B. and Marion-Poll, A. 2004. Maternal synthesis of abscisic acid control seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 218(6): 958-964. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1180-7>
- Gupta, V. 2003. Seed germination and dormancy breaking techniques for indigenous medicinal and aromatic plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science*, 25: 402-407.
- Harberd, N.P. and Peng, J. 2002. The role of GA-mediated signaling in the control of germination. *Weed Science*, 5: 376-381. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00279-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00279-0)
- International Seed Testing Association. 2013. Guide to ISTA-Association overview [Electronic] Basserdorf: ISTA secretariat, [brochure] Access. <http://www.Seed test.Org/upload/cms/user/Guide to ISTA new web>.
- Jauron, R. 2000. Germination of tree seed, maples (*Acer* species). Department of Horticulture Iowa State University. 102-103.

- Kermode, A.R. and Finch-Savage, B.E. 2002. In: Black, M., Pritchard, H.W. (eds.). Desiccation and survival in plants: Drying without Dying. Wallingford: CABI, PP: 149-184.
- Khayat Moghadam, M., Agah F. and Sadrabadi Haghghi, R. 2015. Evaluation of seed dormancy breaking methods in *Astragalus parrowianus*. International Journal of Farming and Allied Sciences, 4(5): 473-476.
- Mabberley, D.J. 2008. Mabberley's Plant-Book. A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Macchia, M., Angelini, L.G. and Ceccarini, L. 2001. Methods to overcome seed dormancy in *Echinacea angustifolia* DC. Scientia Horticulturae, 89(4): 317-324. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00268-5)
- Martin, I. and De la Cuadra, C. 2004. Evaluation of different scarification methods to remove hardseededness in *Trifolium subterraneum* and *Medicago polymorpha* accessions of the Spanish base genebank. Seed Science Technology, 32(3): 671-681. <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.3.03>
- Masoumi, A. 2005. Astragalus of Iran. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, V: 5-1. [In Persian].
- Mc Donald, M.B. and Kwong, F.Y. 2005. Flower seeds longevity and deterioration. Flower seeds biology and technology. CABI Publishing, 187. <https://doi.org/10.1079/9780851999067.0000>
- Moradi, A., Sharifzadeh, F., Tavakol Afshari R. and Maali Amiri, R. 2010. Seed priming effects on germination and seedling growth of tall wheat grass (*Agropyron elongatum*) under control and drought stress conditions. Journal of Rangeland, 4(3): 462-473. [In Persian with English Summary].
- Mozaffarian, V. 1996. A Dictionary of Iranian Plants Names, Farhang-e Moaser, Tehran, 228-230. [In Persian].
- Najafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. Journal of Arid Environment, 64: 542-547. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.06.009>
- Parsa, A. 1984. Flora of Iran. Publisher Tehran University, 2: 801-905. [In Persian].
- Razavi, S.M. and Hajiboland, R. 2009. Dormancy breaking and germination of *Prangos ferulacea* seeds. Journal of Biosciences (Eur Asian), 3: 78-83. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2009.3.0.11>
- Rezvani, M., Zaefarian, F. and Amini, V. 2014. Effects of chemical treatments and environmental factors on seed dormancy and germination of shepherds purse (*Capsella bursa-pastoris* L.) Medic.). Acta Botanica Brasilica, 28(4): 495-501. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3337>
- Scherson, R.A., Vidal, R. and Sanderson, M.J.U. 2008. Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of New World Astragalus (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. American Journal of Botany, 95: 1030-1039. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800017>
- Schmitz, N., Xia, J.H. and Kermod, A.R. 2001. Dormancy of yellow cedar seeds is terminated by gibberellic acid in combination with fluridone or with osmotic priming and moist chilling. Seed Science and Technology, 29: 331-346.
- Schmitz, O., Krivan, V. and Ovadia, O. 2007. Trophic cascades: the primacy of trait-mediated indirect interactions. Ecology Letters, 7(2): 153-163. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2003.00560.x>
- Segura, F., Vicente, M.J., Franco, J.A. and Martínez-Sánchez, J.J. 2015. Effects of maternal environmental factors on physical dormancy of *Astragalus nitidiflorus* (Fabaceae), a critically endangered species of SE Spain. Flora, 216: 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.09.001>

- Stuart, D.I. and Jones, R.L. 1997. Roles of extensibility and turgor in gibberellins-and dark-stimulated growth. *Plant Physiology*, 59: 61-68. <https://doi.org/10.1104/pp.59.1.61>
- Tavakol-Afshari, R., Sharifzadeh, F. and Chavoshinasab, S. 2012. Germination improvement and  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -1,3-glucanase activity in dormant and non-dormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). *Australian Journal of Crop Science*, 5(4): 421-427.
- Tavili, A., Saberi, M., Nasser, H. and Etemad, V. 2008. Comparison effect of different methods of seed dormancy on seed germination of *Simrnovia iranica*. *Scientific Journal of Rangeland*, 4: 410-402.
- Taylor, J.S. and Wearing, P.E. 1997. The effect of stratification on the endogenous levels of gibberellins and cytokinins in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco.) and sugar pine (*Pinus ambertiana* Doug). *Plant Cell Environment*, 2(2): 165-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1979.tb00789.x>
- Vieira, A.R., Oliveira, J.A., Guimaraes, R.M., Vonpinho, E.V.R., Pereira, C.E. and Clemente, A.C. S. 2008. Marcador isoenzimático de dormência em sementes de arroz. *Revista Brasileira de Sementes, Lavras*, 30(1): 81-89. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222008000100011>
- Westwood, N.N. and Bjornstad, H.O. 2002. Chilling requirements of dormant seeds on 14 pear species as related to their climatic adaptation. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 92: 141-149.
- Young, J.A. and Young, C.G. 1986. *Seeds of Woody Plants in North America*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Zhang, Y., Lu, S.H. and Gao, H. 2012. Effects of stratification and hormone treatments on germination and physio-biochemical properties of *Taxus chinensis*. *Genes and Development*, 19: 1532-1543.

Research Article

## Effect of Seed Dormancy Breaking Treatments on Germination and $\alpha$ -amylase Enzyme Activity in Seeds of Three Ecotypes of *Astragalus* (*Astragalus cyclophyllus*)

Akram Rostamipoor<sup>1</sup>, Ali Moradi<sup>2,\*</sup>, Hamid Reza Eisvand<sup>3</sup>

### Extended Abstract

**Introduction:** Seed dormancy, as a technique to avoid environmental stress, is important in preserving plant species and could be of various types including physiological, physical, morphological and morpho-physiological dormancy. Seed testa hardness is one of the main causes of dormancy in leguminous family plants. A common method for breaking seed dormancy in leguminous plants is the use of scarification treatments. Given that oxygen deficiency is a factor that induces dormancy, scarification treatments through acceleration of gas exchanges, especially oxygen and carbon dioxide, can reduce seed dormancy and finally increase germination percentages. In addition, priming with gibberellic acid can help dormancy breaking in plant species that have physiological dormancy, finally leading to germination. Therefore, the present study investigated seed dormancy and germination to find the most appropriate treatment for the elimination of seed dormancy in three ecotypes of *Astragalus cyclophyllus*.

**Materials and Methods:** A factorial experiment based on a completely randomized design with three replications was carried out at Agriculture Laboratory of Lorestan University in 2013. The first factor was three ecotypes of *Astragalus* Semirom, Damavand and Zanjan, and the second factor was seed dormancy breaking treatments. The applied treatments were: control, (mechanical scarification plus chilling time with 10, 20 and 30 days prechilling at 4°C, mechanical scarification + gibberellic acid at concentrations of 400 and 500 ppm for 48 hours, scarification with sulfuric acid 96% for 2 and 4 min, mechanical scarification and 2% potassium nitrate for 72 h, mechanical scarification and gibberellic acid 400 ppm for 48 h and 20 days prechilling. The measured indices included germination percentage, mean germination time, seedling length, seedling fresh weight, seedling dry weight and alpha-amylase activity.

**Results:** The results showed that the interactions between seed dormancy breaking treatments and ecotype were significant for all the traits. Based on the results of mean comparison, Damavand ecotype exhibited better performance in terms of most of the traits studied, as compared with Semirom and Zanjan ecotypes. Compared with the treatments applied, mechanical scarification plus gibberellic acid 400 ppm was more effective in germination parameters and seedling vigor index. Mechanical scarification and gibberellic acid 400 ppm for 48 h along with 20 days prechilling increased total germination percentage by an average of 67.68% in Semirom ecotype and was more effective in increasing the activity of  $\alpha$ -amylase enzyme.

**Conclusion:** It seems that seed dormancy of *Astragalus cyclophyllus* is not of physiological type and increased germination can be due to mechanical scarification in physical dormancy breaking and priming effect of prechilling and gibberellic acid.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, Seed dormancy breaking treatments, *Astragalus cyclophyllus*

### Highlights:

- 1- The effect of different dormancy breaking treatments on seed germination was investigated.
- 2- Alpha-amylase activity of *Astragalus* Seed increased under dormancy breaking treatments.

<sup>1</sup> Graduated M.Sc. Student, Department of Agronomy, Yasouj University, Yasouj, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department, of Agronomy, Yasouj University, Yasouj, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Agronomy, Lorestan University, Lorestan, Iran

\*Corresponding author E-mail: [amoradi@yu.ac.ir](mailto:amoradi@yu.ac.ir)

