فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۳، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ٤٠٤-۳۹۱ (۱۳۸٦)

اثر جیبرلیک اسید و سرمادهی بر جوانه‌زنی بذر آنغوزه (*Ferula assa-foetida L.*)

طیبه رجبیان*[۱]، عذرا صبورا[۲]، بتول حسنی[۲] و حسن فلاح حسینی[۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، پست الکترونیک: rajabian@shahed.ac.ir
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)
۳- گروه پژوهشی فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
* نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸٦ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸٦

چکیده

آنغوزه (*Ferula assa-foetida*) گیاهی دارویی، بومی ایران و متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) است. بذرهای گیاه آنغوزه دارای دوره خواب طولانی هستند، بنابراین کوتاه کردن دوره خواب و افزایش میزان جوانه‌زنی بذرها توسط روشهای آزمایشگاهی می‌تواند در احیاء این گیاه مؤثر باشد. اثر جیبرلیک اسید (GA_3) به صورت پیش تیمار (با غلظتهای زیاد در کوتاه مدت و در دمای ($23\pm2^{\circ}C$) و تیمار (با غلظتهای کم در بلند مدت و در دماهای $4^{\circ}C$ و $23\pm2^{\circ}C$) بر روی جوانه‌زنی بذر دو جمعیت شیرکوه و طبس در محیط کشت پایه MS بررسی شد. تغییر چندانی در سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده و پیش تیمار شده با GA_3 هر دو جمعیت در دمای $23\pm2^{\circ}C$ مشاهده نشد. کاربرد تیمار سرمادهی ($4^{\circ}C$) برای بذرهای هر دو جمعیت سبب افزایش درصد جوانه‌زنی در آنها شد. پس از ۱۲ هفته حداکثر میزان درصد جوانه‌زنی در جمعیتهای شیرکوه و طبس به ترتیب ۸٤ و٥٦ درصد بود. همچنین تأثیر عامل دما بر روی جوانه‌زنی بذرها به تنهایی در دو سطح دمای $4^{\circ}C$ و $23\pm2^{\circ}C$ روی کاغذ صافی مرطوب آزمون گردید. بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها (جمعیت شیرکوه ۹۰٪ و جمعیت طبس ٦۷٪) در نتیجه سرمادهی روی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۸ تا ۹ هفته حاصل گردید. افزایش غلظت GA_3 درون‌زا در نتیجه تیمار سرمادهی عامل مؤثر بر افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنغوزه، خواب بذر، جوانه‌زنی بذر، جیبرلیک اسید، سرمادهی.

مقدمه

یکی از موانع عمده استفاده بهینه از گیاهان دارویی در خارج از رویشگاه طبیعی، محدودیت میزان جوانه‌زنی و طولانی بودن خواب بذر آنها می‌باشد (Gupta, 2003). طی دوره خواب حتی اگر شرایط مناسب محیطی (رطوبت، دما و...) نیز فراهم باشد، جوانه‌زنی صورت نمی‌گیرد. این امر در شرایط نامساعد رویشی سودمند است، زیرا بذر غیرفعال است و در نتیجه بسیاری

Archive of SID
www.SID.ir

از تنشهای محیطی و شرایط نامناسب اقلیمی را بهتر تحمل کرده، تداوم نسل و بقای گونه گیاهی تضمین می‌گردد (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). با این وجود، گاهی خواب بذرها یک وضعیت نامطلوب در نظر گرفته می‌شود، به ویژه اگر هدف تولید انبوه یک گیاه با ارزش اقتصادی یا دارویی بالا باشد. بنابراین پژوهشگران تلاش می‌نمایند تا با بررسی علل خواب بذرها، به روشهایی مناسب برای شکست خواب و افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها دست یابند.

خواب اولیه بذر از نظر منشأ و عوامل مؤثر در ایجاد آن به دو منشأ درونی و بیرونی تقسیم می‌شود. بر طبق قوانین انجمن بین‌المللی آزمون بذر، ISTA (International Seed Testing Association) مشکل بذر بیشتر گونه‌های تیره چتریان، خواب اولیه درونی از نوع فیزیولوژیکی است (عموآقایی، ۱۳۸٤). هورمونها در ایجاد و کنترل خواب فیزیولوژیکی بذر نقش کلیدی دارند. در بین هورمونهای مورد بررسی، GA_3 از طریق القاء جوانه‌زنی خواب بذر را کنترل می‌نماید. گاهی تیمار سرمادهی به تنهایی یا همراه با تیمارهای دیگر از جمله GA_3 برای شکست خواب و افزایش جوانه‌زنی بذرها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nadjafi *et al.*, 2006). سرمادهی (٤° C) سبب افزایش بیان ژن GA3ox1 (آنزیم تولیدکننده شکل فعال GA_3) در ریشه‌چه و لایه آلرون می‌شود (Yamauchi *et al.*, 2004).

آنغوزه با نام علمی *Ferula assa-foetida* L. از گیاهان دارویی مهم تیره چتریان (Apiaceae) می‌باشد. این گیاه چند ساله، دارای برگهای کرکدار و ساقه‌ای به طول ۲۰۰-۱۰۰ سانتیمتر است. گل‌آذین کم و بیش فشرده، گلبرگها زرد رنگ و فاقد کرک هستند. میوه شیزوکارپ مسطح می‌باشد (Chamberlain & Rechinger, 1987). این گیاه بومی ایران و قسمتهایی از افغانستان است. استانهای فارس، کرمان، خراسان، یزد، سمنان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، اصفهان، لرستان، کهکیلویه و بویراحمد و بوشهر به عنوان رویشگاههای اصلی این گیاه می‌باشند (زرگری، ۱۳۷۵ ؛ پیرمرادی، ۱۳۸۱).

در اثر تیغ‌زدن پایین ساقه و ریشه تازه آنغوزه، صمغی به نام آنغوزه از نوع اولئوگام رزین (oleo gum-resin) به رنگ زرد روشن یا قهوه‌ای تراوش می‌شود. نوع مرغوب آنغوزه دارای ٦۲ ٪ رزین، ۲۵ ٪ صمغ، ۷-۳٪ اسانس، ۱/۲۸٪ فرولیک اسید (ferulic acid) آزاد و به مقدار بسیار جزیی وانیلین می‌باشد (زرگری، ۱۳۷۵). همچنین دو ترکیب جدید آزافوئتیدین (assa-foetidin) و فروکولیسین (ferocolicin) از گروه کومارینهای سزکوئی‌ترپنوئیدی از رزین صمغ آنغوزه جداسازی گردیده است (Lopez, 1998). آنغوزه جهت تهیه داروهای ضد انگل، ضد تشنج، قاعده‌آور و مقوی قلب مورد استفاده قرار می‌گیرد و در رفع بیماریهای دارای منشأ عصبی دستگاه تنفسی، اسپاسم حنجره، آسم، دستگاه گوارش و رفع یبوست افراد مسن مؤثر است (زرگری، ۱۳۷۵).

به دلیل بهره‌برداری بی‌رویه و بیش از حد گیاه آنغوزه، نسل آن در معرض انقراض قرار دارد، بنابراین حفظ این گونه گیاهی ضروری است. تکثیر آنغوزه در طبیعت از طریق رویش بذر و پس از طی مرحله خواب صورت می‌گیرد. یکی از راهکارهای مفید برای تکثیر این گیاه دستیابی به تیمارهای فیزیکی و شیمیایی مناسبی است که شکست خواب

Archive of SID
www.SID.ir

بـذر را تسـهیل و در کوتـاهترین زمـان بیشـترین درصـد جوانه‌زنی را فـراهم نمایـد. طبـق بررسـی منـابع موجـود، تـاکنون اطلاعـات مـدون و جـامعی دربـاره شکسـتن خواب بـذر ایـن گیـاه ارائـه نگردیـده اسـت. در تحقیـق حاضـر، بـرای دسـتیابی بـه روشـهای مناسـب شکسـت خـواب بـذر ایـن گیـاه دارویـی ارزشـمند، اثـرات غلظتهای بالای GA_3 به شـکل پـیش تیمـار کوتـاه مـدت و غلظتهـای کمتـر آن در دوره‌هـای زمـانی بلنـد مـدت در محـیط کشـت پایـه MS (Murashige & Skoog, 1962) آزمـون گردیـد. همچنـین کشـت بـذرها روی کاغـذ صـافی مرطـوب در دو دمـای ٤°C و۲۳±۲°C مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

موادگیاهی

بذرهای گیاه آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.) در شهریور ۱۳۸۵ از جمعیتهای طبیعی در دامنه‌های ارتفاعات شیرکوه و طبس (استان یزد) با ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری شدند. این نواحی دارای آب و هوای تقریباً کویری و متوسط بارندگی ۵۵ میلیمتر در سال می‌باشند. میانگین حداکثر دمای این نواحی ٤٥°C-٤٠ در تیر ماه و حداقل آن ۳°C- در دی ماه می‌باشد.

سترون سازی بذرها

بذرها ابتدا ۱۵ دقیقه با آب جاری شستشو و پس از آن در آب صابون به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس در جریان هوای هود لامینار توسط الکل ۷۰٪ (۳-۲ دقیقـه) و هیپوکلریت سدیم ۱٪ محتوی ۳-۲ قطره تـوئین ۲۰ (۲۰-۱۵ دقیقه) سترون شدند. پس از هر مرحله، بذرها چنـدین بار با آب مقطر سترون شستشو شدند.

پیش تیماربا GA_3

محلولهـــایی بـــا غلظتهـــای ۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 تهیه و در اتوکلاو در دمـای ۱۲۱°C و فشـار ۱۰۳ کیلوپاسـکال سـترون شـدند. سـپس ۳۵ عـدد از نمونه‌های سترون شده بذر هر دو جمعیت در ۵۰ میلی‌لیتر از محلولهای فوق به مـدت ٤٨ و ۷۲ سـاعت غوطـه‌ور و روی شیکر (Shaker) قرار داده شدند. پس از آن بذرها از محلولها خارج و در ظروف پتری‌دیش محتوی محیط کشت پایه MS در شرایط سترون کشت داده شدند. ظروف کشت بـه مـدت ۱۲ هفته در دمای ۲۳±۲°C در شرایط روشنایی در اتاق رشد نگهداری گردیدند.

تیمار بلند مدت بذرها با GA_3

بذرهای سترون شـده در ظـروف پتـری‌دیـش حـاوی محیط کشت پایه MS با غلظتهـای ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 کشت شدند و در دو تیمـار دمـایی ٤°C و ۲۳±۲°C بـه مـدت ۱۲ هفتـه نگهـداری و نتـایج جوانه‌زنی آنها ثبت شد.

تیمار دمایی از طریق خیساندن (imbibition)

بذرهای سترون شده جمعیتهـای شـیرکوه و طـبس در ظروف پتری‌دیش و روی کاغذ صافی حاوی ۵ میلـی‌لیتـر آب مقطـر سـترون قـرار داده شـدند، سـپس در دو تیمـار دمایی ٤°C و ۲°C ± ۲۳ به مدت ۱۲ هفته در تاریکی و در اتاق رشد نگهداری شدند.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایشها بـر اسـاس طـرح آمـاری بلوکهـای کامـل تصادفی اجرا گردید. درصد و سرعت جوانه‌زنی بـذرها طـی ۳ ماه و در پایان هر هفته از طریق روابط زیر محاسبه شد:

Archive of SID

www.SID.ir

[(تعداد کل بذر / تعداد بذر جوانه‌زده)×۱۰۰] = درصد جوانه‌زنی

$\{(n_1/w_1)+(n_2/w_2)+(n_3/w_3)+(n_n/w_n)\}$ = سرعت جوانه‌زنی

n_n معرف تعداد بذرهای جوانه زده در هفته n ام و w_n هفته n ام را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طریق بررسی اثر متقابل عوامل جمعیت، زمان، دما و غلظت هورمون GA_3 با استفاده از روش تجزیه واریانس دو طرفه انجام شد. گروه‌بندی تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ توسط نرم‌افزار SPSS (version 12) انجام گردید. سپس نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel 2003 رسم شدند.

نتایج

پیش تیماربا GA_3

نتایج حاصل از تجزیه واریانس دو طرفه داده‌ها با توجه به عوامل جمعیت، زمان و غلظت GA_3 نشان داد که پیش تیمار بذر جمعیتهای شیرکوه و طبس به مدت ٤٨ و ۷۲ ساعت، تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را از نظر سرعت جوانه‌زنی ایجاد می‌کند. سرعت جوانه‌زنی بذر هر دو جمعیت در پیش تیمارهای شاهد که ۷۲ ساعت در آب مقطر خیسانده شده بودند نسبت به نمونه‌های پیش تیمار شده به مدت ٤٨ ساعت افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱ و جدولهای ۱و ۲).

در بیشتر پیش تیمارها، با افزایش غلظت GA_3 سرعت جوانه‌زنی بذرها بدون تغییر باقی ماند یا اندکی افزایش یافت. همبستگی بالایی بین افزایش غلظت GA3 و افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرهای جمعیت شیرکوه در تیمار ٤٨ ساعت وجود داشت، در حالی که در مورد بذر جمعیت طبس این رابطه مشاهده نشد (شکل ۱).

مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی بین نمونه‌های پیش تیمار شده با GA3 و شاهد نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بیشترین تأثیر را دارد. برخلاف نمونه‌های شاهد، پیش تیمار بذرها با GA_3 به مدت ٤٨ ساعت نسبت به پیش تیمار ۷۲ ساعت سرعت جوانه‌زنی آنها را تا دو برابر افزایش داد (شکل ۱).

یک ماه پس از پیش تیمار بذرها با GA_3، خواب آنها شکسته شد و شروع به جوانه‌زنی کردند (شکل۲). به طوری که افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها تا پایان ماه دوم روند صعودی خود را حفظ نمود و پس از آن ثابت باقی ماند. پس از ۱۲ هفته، بیشترین درصد جوانه‌زنی در هر دو جمعیت در نمونه‌هایی که با محلولهای حاوی ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به مدت ٤٨ ساعت و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به مدت ۷۲ ساعت تیمار شده بودند، مشاهده شد (شکل ۲). حداکثر میزان جوانه‌زنی بذرهای جمعیت طبس (٤۱٪) در پیش تیمار ۷۲ ساعته آنها در محلول حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به دست آمد و افزایش غلظت GA_3 اثر تحریکی محسوسی بر جوانه‌زنی بذرها نداشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه میانگینهای سرعت جوانه‌زنی آنغوزه تحت تیمار غلظتهای مختلف GA3 و دما

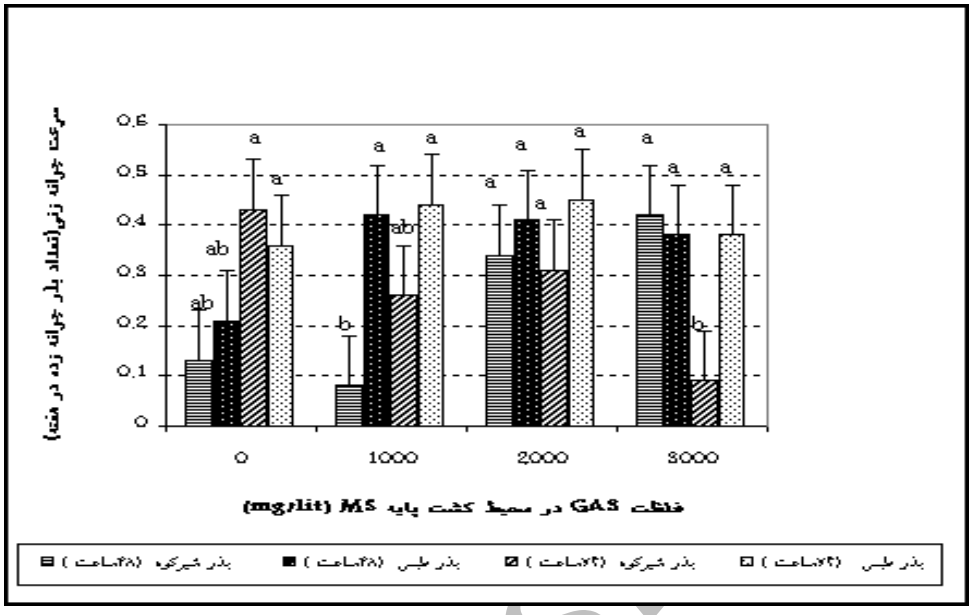
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
پیش تیمار کوتاه مدت GA3:		(mg/l)۰	(mg/l)۱۰۰۰	(mg/l)۲۰۰۰	(mg/l)۳۰۰۰	
بین گروهها	۳	*٤٠٥/٩٥	*٩٧٠/١٩	ns٤٠/٨٢	*٦٩٤/٤٥	
درون گروهها	۱۲	۲۲۳/۹۸	۵۷۵/۵۸	٦٠/٧	٤٨٥/١٢	
کل	۱۵					
تیمار بلند مدت GA3 :		۰(mg/l)	۲۵ (mg/l)	۵۰(mg/l)	۷۵ (mg/l)	۱۰۰(mg/l)
بین گروهها	۳	۰/۲۵**	۰/٤٣*	۰/٧٦٢*	۰/۲۷ *	۰/۲۱*
درون گروهها	۱۲	۰/۰۱۲	۰/۱٦	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۰۲
کل	۱۵					
تیمار دمایی روی کاغذ صافی:						
بین گروهها	۳	۱۱/٦٨**				
درون گروهها	۲۰	۰/٧٦٣				
کل	۲۳					

ns= اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

* و **: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 و P<0.01 را نشان می‌دهند.

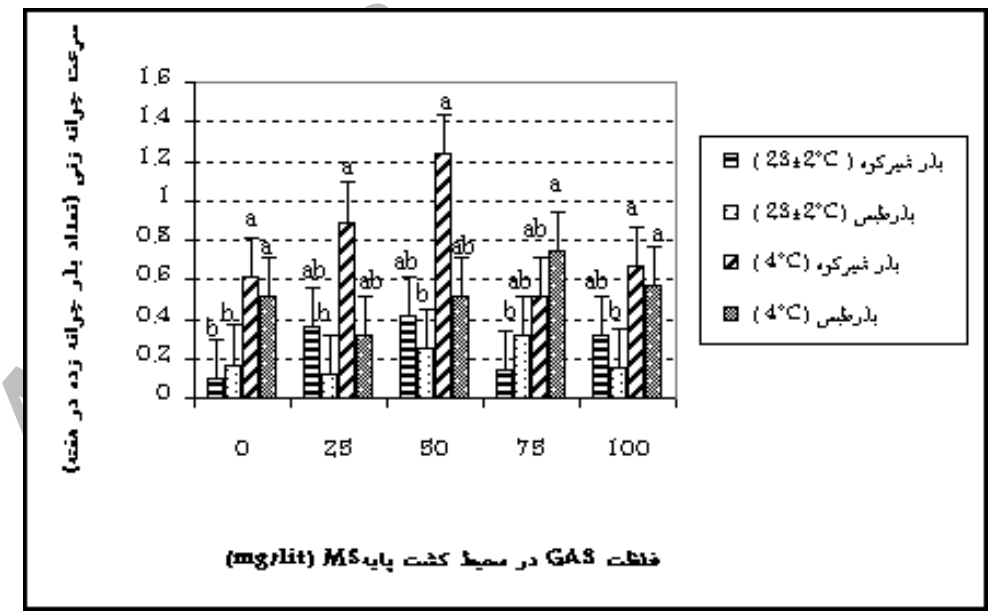
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مقایسه سرعت جوانه‌زنی بذرهای دو جمعیت شیرکوه و طبس در غلظتهای متفاوت GA_3 و مدت زمان پیش تیمار (٤٨ و ٧٢ ساعت)

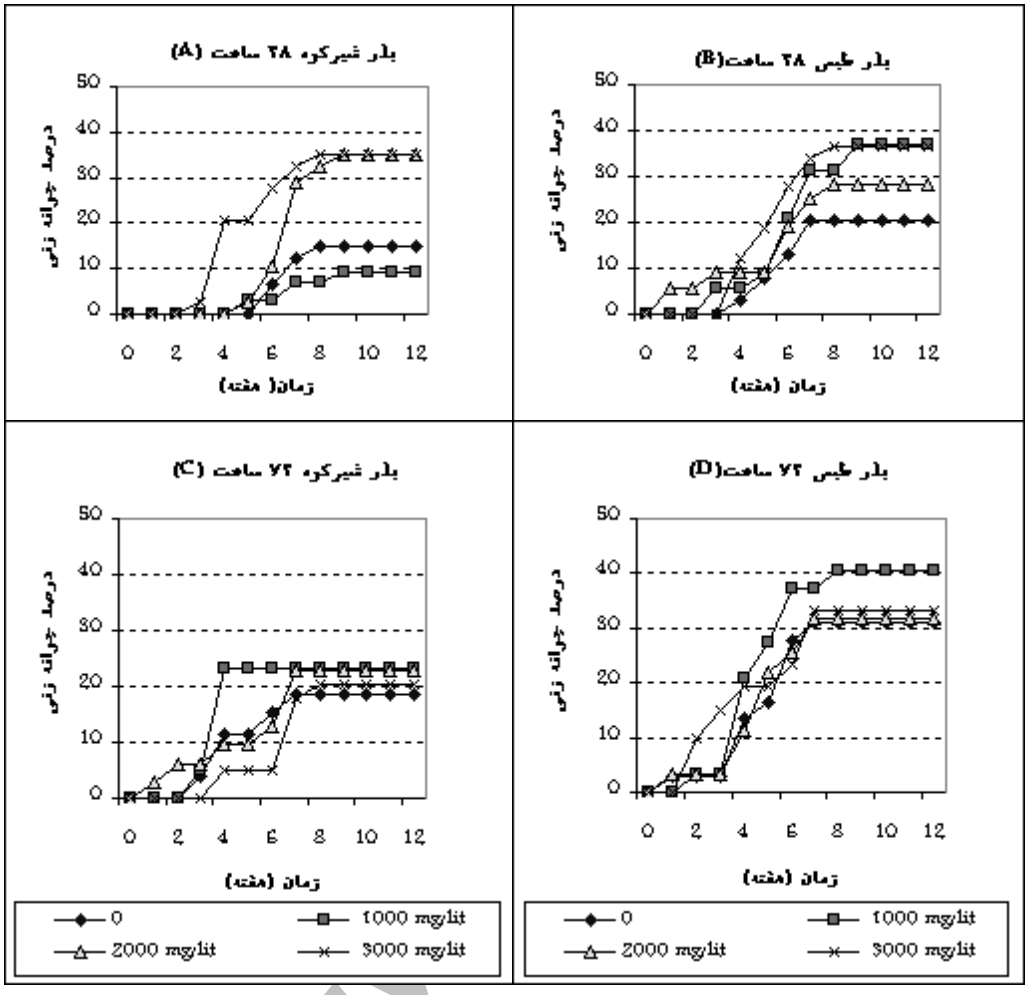
(حروف یکسان، نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگینها در سطح ۰/۰۵ >p بر اساس آنالیز واریانس ANOVA می‌باشند)



شکل۳- مقایسه سرعت جوانه‌زنی بذر جمعیتهای شیرکوه و طبس آنغوزه در غلظتهای متفاوت GA_3 در دماهای ٤°C و ۲°C± ۲۳. گروه‌بندی تیمارها در هر غلظت GA_3 بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن محاسبه شد.

(حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگینها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند)

www.SID.ir



شکل۲- بررسی اثر متقابل غلظت GA_3 و مدت زمان پیش تیمار بر درصد جوانه‌زنی بذرهای جمعیتهای شیرکوه و طبس به ترتیب در دوره زمانی ٤٨ ساعت (A و B) و ۷۲ ساعت (C و D)

تیمار بلند مدت بذرها با GA_3 در محیط کشت پایه MS

تجزیه واریانس دو طرفه، اثر غلظتهای متفاوت GA_3 در دماهای ٤˚C و ۲˚C± ۲۳، به صورت تیمار طولانی مدت در محیط کشت پایه MS روشن ساخت که اثر عامل دما به تنهایی بر روی دو صفت اندازه‌گیری شده یعنی سرعت و درصد جوانه‌زنی معنی‌دار ($p<0/05$) بود. اما عامل غلظت به تنهایی و اثر متقابل آن با دما اثر معنی‌داری ($p<0/05$) را بر روی سرعت و درصد جوانه‌زنی نشان نداد. مقایسه میانگینهای سرعت جوانه‌زنی بذر جمعیتهای شیرکوه و طبس در هر یک از غلظتهای به کار برده شده GA_3، اثر معنی‌داری را ($p<0/05$) بین تیمارهای دمایی آشکار کرد (شکل ۳ و جدول ۱و۲).

همچنین، اثر متقابل دو عامل جمعیت و غلظت GA_3 نیز بر سرعت جوانه‌زنی بذرها معنی‌دار بود. روند تغییرات سرعت جوانه‌زنی در دماهای ٤˚C و ۲˚C± ۲۳ طی ۱۲ هفته مشخص نمود که دماهای کم در شکست خواب بسیار مؤثرتر از عوامل دیگر عمل می‌کنند (شکل ۳).

Archive
www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگینهای سرعت جوانه‌زنی بذر آنغوزه تحت تیمارهای مختلف شکست خواب

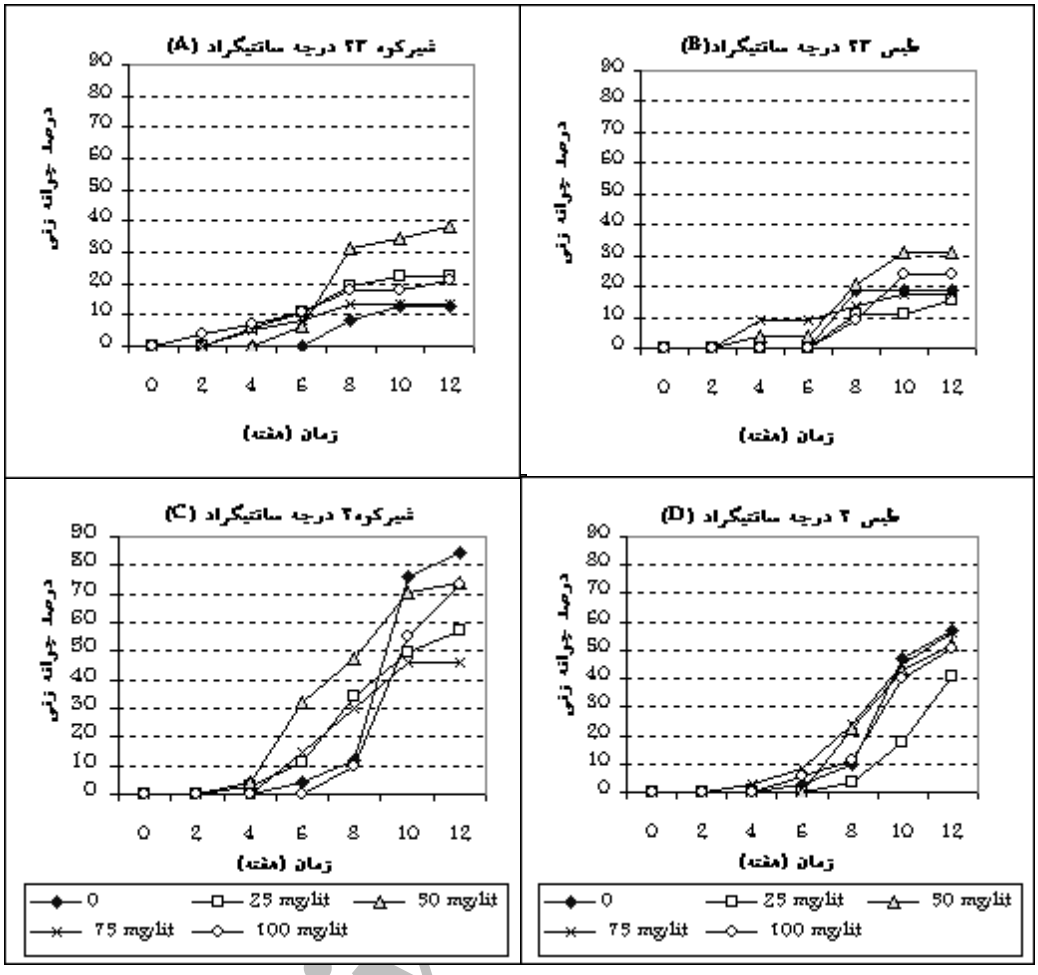
تیمار/جمعیت	میانگین سرعت جوانه‌زنی			
پیش تیمار کوتاه مدت GA3:	۰(mg/l)	۱۰۰۰(mg/l)	۲۰۰۰(mg/l)	۳۰۰۰(mg/l)
بذر شیرکوه (۴۸h)	۱۵/۴۷ ab	۸/۵۷ b	۲۹/۳ a	۳۲/۵ a
بذر شیرکوه (۷۲h)	۳۸/۳۳ a	۲۳/۳۳ ab	۲۸/۵۷ a	۱۱/۲۵ b
بذر طبس (۴۸h)	۲۵/۲۹ ab	۳۸/۸ a	۳۱/۵۴ a	۴۲/۲۶ a
بذر طبس (۷۲h)	۳۳/۸ a	۴۲/۵ a	۳۱/۶۹ a	۳۳/۳ a
تیمار بلند مدت GA3:	۰(mg/l)	۲۵ (mg/l)	۵۰ (mg/l)	۷۵ (mg/l)	۱۰۰(mg/l)
بذر شیرکوه (۲۳±۲°C)	۰/۰۹ b	۰/۳۵ ab	۰/۴۱ ab	۰/۱۳ b	۰/۳۱ ab
بذر شیرکوه (۴°C)	۰/۶۱ a	۰/۸۹ a	۱/۲ a	۰/۵۱ ab	۰/۶۶ a
بذر طبس (۲۳±۲°C)	۰/۱۶ b	۰/۱۲ b	۰/۲۵ b	۰/۳۱ ab	۰/۱۵ b
بذر طبس (۴°C)	۰/۵۱ a	۰/۳۱ a	۰/۵۱ ab	۰/۷۴ a	۰/۵۷ a
تیمار دمایی روی کاغذ صافی:					
بذر شیرکوه (۲۳±۲°C)	۰/۵۴ b				
بذر شیرکوه (۴°C)	۲/۹۳ a				
بذر طبس (۲۳±۲°C)	۰/۳۷ b				
بذر طبس (۴°C)	۲/۸ a				

حروف یکسان در هر ستون و در هر تیمار بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگینها در سطح $p<0.05$ می‌باشد.

تغییر سرعت جوانه‌زنی بذر جمعیت شیرکوه (شکل ۳) در هر دو تیمار دمایی از غلظت صفر تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 افزایش و در غلظتهای بیشتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر جمعیت طبس تا غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 در هر دو دما معنی‌دار بود. تیمار این بذرها با غلظتهای بیشتر GA_3 سبب کاهش جوانه‌زنی آنها گردید. اگر چه غلظتهای ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به ترتیب در بذرهای جمعیتهای شیرکوه و طبس در هر دو تیمار دمایی سرعت جوانه‌زنی را به حداکثر رساند، اما اثر کاهش دما بر افزایش سرعت جوانه‌زنی شاخص‌تر بود. به طوری که سرعت جوانه‌زنی بذرها در دمای ۴°C به میزان ۳-۲ برابر دمای ۲۳ ±۲°C افزایش یافت (شکل ۳).

Archive of SID

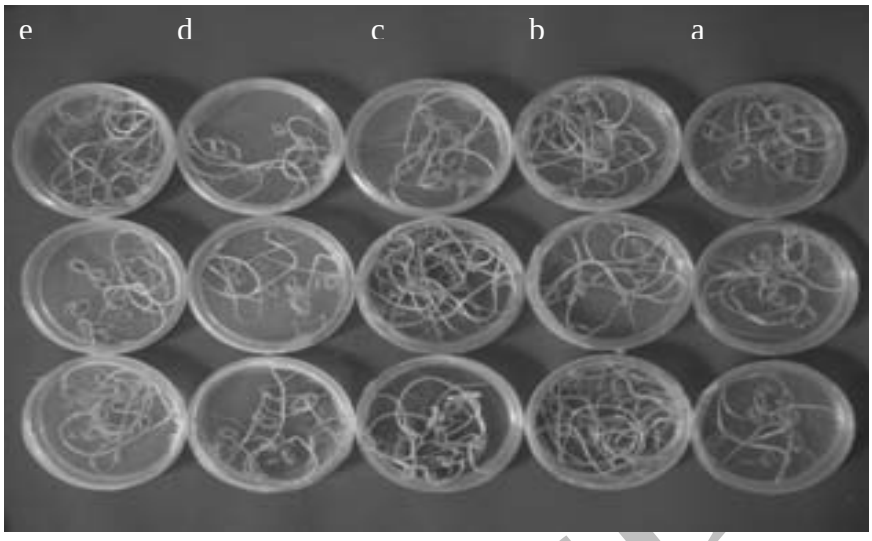
www.SID.ir



شکل٤- بررسی اثر متقابل غلظت GA_3 و دما بر درصد جوانه‌زنی بذرهای جمعیتهای شیرکوه و طبس به ترتیب در دماهای ۲۳±۲°C (A و B) و ٤°C (C و D).

بررسی درصد بذرهای جوانه‌زده در طول سه ماه نشان داد که در ۲ هفته اول درصد جوانه‌زنی هر دو جمعیت صفر است (شکل ٤)، اما بتدریج در اواخر ماه اول تیمار بلند مدت بذرها با محلولهای با غلظت بیشتر GA_3 سبب شکست خواب بذرها گردید. در ماههای دوم و سوم حداکثر درصد جوانه‌زنی در بذرهای تیمار شده با غلظتهای کمتر GA_3 مشاهده شد. در بین تیمارهای مورد استفاده، بیشترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۲°C ± ۲۳ در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 مشاهده شد و در دمای ٤°C غلظتهای کم و زیاد GA_3 اثری مشابه داشتند (شکلهای ٤ و ٥).

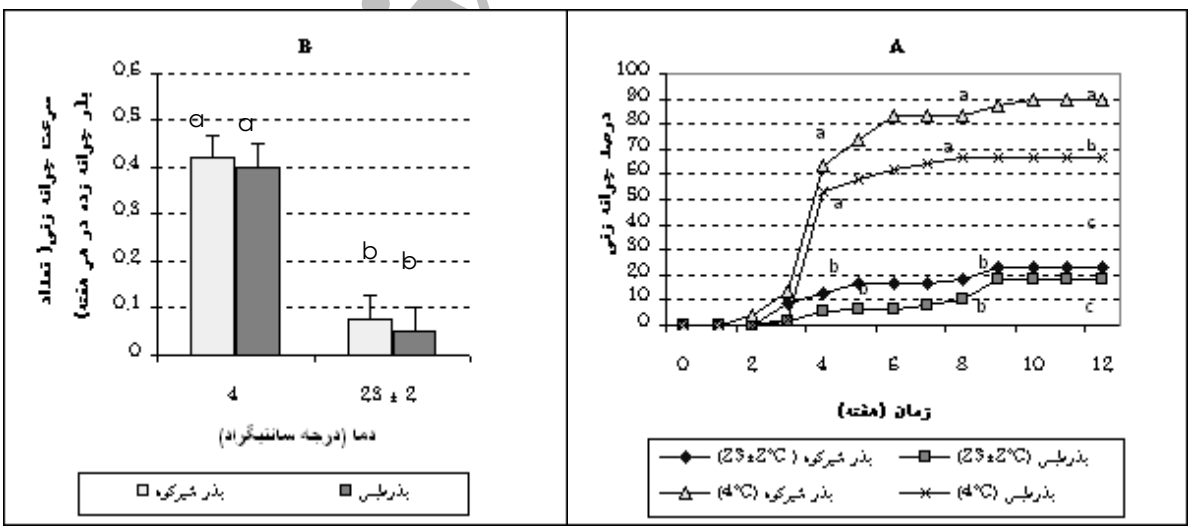
Archive
www.SID.ir



شکل ٥- تیمار جوانه‌زنی بذرهای جمعیت شیرکوه در غلظتهای ٠ (a)، ٢٥ (b)، ٥٠ (c)، ٧٥ (d) و ١٠٠ میلی‌گرم در لیتر GA_3 (e).

تیمار دمایی از طریق خیساندن

بررسی اثر تیمار خیساندن با قرار دادن بذرها روی کاغذ صافی مرطوب نشان داد که تأثیر عامل دما بر تفاوت میانگینهای درصد و سرعت جوانه‌زنی در سطح $p<٠/٠١$ و اثر عامل جمعیت (شیرکوه و طبس) بر روی درصد جوانه‌زنی در سطح $p<٠/٠٥$ معنی‌دار بود (جدولهای ١ و ٢).



شکل٦- مقایسه اثر متقابل دما و زمان بر درصد جوانه‌زنی (A) و سرعت جوانه‌زنی (B) بذرهای دو جمعیت شیرکوه و طبس پس از ٣ ماه (١٢ هفته)

(حروف غیر مشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگینها در سطح احتمال $p<٠/٠٥$ می‌باشد. مقایسه میانگینها بر اساس آزمون دانکن صورت گرفته است)

www.SID.ir

تفاوت در القای جوانه‌زنی بذرها بین دو تیمار دمایی کاملاً محسوس بود، به طوری که سرعت جوانه‌زنی در دمای ۴°C تقریبا ۶ برابر مقدار آن در دمای ۲۳±۲°C بود (شکل 6B). بذر هر دو جمعیت در هفته چهارم افزایش محسوسی را در درصد جوانه‌زنی نشان دادند و از هفته نهم به بعد تغییر چندانی در افزایش تعداد بذرهای جوانه‌زده مشاهده نشد (شکل 6A). پس از ۱۲ هفته، میزان جوانه‌زنی بذرهای جمعیتهای شیرکوه و طبس در دمای ۴°C به ترتیب ۹۰ و ۶۷ درصد بود. این مسئله نشان داد که اثر تیمار سرما بر افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای جمعیت شیرکوه نسبت به جمعیت طبس محسوس‌تر است.

بحث

مقایسه نتایج بدست آمده از تیمار بلند مدت و کوتاه مدت بذرهای دو جمعیت شیرکوه و طبس آنغوزه با غلظتهای متفاوت GA_3 و همچنین تیمار آنها در دماهای ۴°C و ۲۳ ±۲°C نشان داد که اثر دمای پایین بر افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای این گیاه بیشتر از سطوح هورمونی مورد استفاده مؤثر است. از آنجا که در برخی تیمارهای مورد استفاده، کاربرد غلظتهای متفاوت GA_3 اثر معنی‌داری را بر پارامترهای اندازه‌گیری شده فوق نداشت، احتمال داده می‌شود که عامل سرما علاوه بر تحریک سنتز GA_3 درون‌زا، محرکهای دیگری را فعال می‌کند که موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرها می‌گردد. به نظر می‌رسد تیمار سرما سبب کاهش تراز هورمونهای بازدارنده و افزایش تراز هورمونهای محرک شده و بدین ترتیب سبب افزایش پتانسیل جوانه‌زنی بذر می‌شود. این رویدادها به طور همزمان رخ داد و جوانه‌زنی در بذرها نتیجه توازن بین هورمونها می‌باشد (Tipirdamaz & Gomurgen, 2000). درصد جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت MS فاقد GA_3 تا هفته هشتم کمتر از تیمارهای حاوی غلظتهای متفاوت GA_3 بود. اما با شکست خواب، بیشتر بذرها به طور همزمان شروع به رویش نمودند و در پایان هفته دوازدهم درصد جوانه‌زنی بذرها در دمای ۴°C در تیمار شاهد بیشتر از تمام تیمارهای حاوی GA_3 بود. شیب نمودارهای خطی تغییرات درصد جوانه‌زنی نسبت به زمان مشخص می‌کند که جذب تدریجی GA_3 در تیمارهای هورمونی القاء تدریجی جوانه‌زنی را با یک سرعت ثابت به پیش می‌برد. اما در تیمار شاهد فرایندهای فیزیولوژیکی ناشی از تأثیر سرما سبب راه‌اندازی مسیرهای علامت‌دهی هورمونی گردید که در پایان آن جوانه‌زنی به طور ناگهانی و به صورت تصاعدی افزایش فوق‌العاده‌ای پیدا کرد (Kucera *et al.*, 2005). سرعت بروز پاسخ در این نمونه‌ها از منحنیهای لگاریتمی پیروی می‌کند (شکلهای 4C و 4D).

هورمون GA_3، خواب ناشی از رویان و پوشش بذر را می‌شکند و اثرات بازدارنده آبسیزیک اسید را به طور مستقیم یا غیر مستقیم مهار می‌کند(Kucera *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد اثر هورمون GA_3 برون‌زا در تیمارهای بلند مدت بر روی افزایش جوانه‌زنی دارای غلظتهای بحرانی است و غلظتهای بیشتر از حد آستانه، اثر بازدارندگی بر جوانه‌زنی دارند.

تفاوت میانگینهای سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای خیسانده شده در آب مقطر در دو دوره زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت برخلاف نمونه‌های پیش تیمار شده با GA_3 معنی‌دار بود. خیساندن طولانی مدت بذرها در آب خالص سبب خروج هر چه بیشتر بازدارنده‌ها از پوسته یا رویان

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود. مهمترین ماده بازدارنده بذرها آبسیزیک اسید است که مقدار آن با خیساندن یا شستشو تا حدی کاهش می‌یابد (عموآقایی، ۱۳۸٤). کاهش تراز آبسیزیک اسید سبب افزایش حساسیت رویان به GA_3 در مرحله گذر از حالت خواب به حالت غیر خواب در بذر بسیاری از گونه‌ها می‌شود (Kucera *et al.*, 2005).

اگرچه پیش تیمار بذرها با GA_3 به مدت ٤٨ ساعت نسبت به نمونه‌های شاهد درصد جوانه‌زنی را افزایش داد، اما به نظر می‌رسد که مقدار GA_3 جذب شده هنگام پیش تیمار کوتاه مدت بذرها برای تحریک جوانه‌زنی آنها کافی نمی‌باشد. بنابراین برای بدست آوردن حداکثر درصد جوانه‌زنی باید از تیمارهایی که سبب افزایش غلظت GA_3 درون‌زا یا افزایش جذب هورمونی سلولهای رویان می‌شوند، استفاده کرد. همان گونه که در تیمار سرمادهی در پژوهش حاضر نتایج مطلوبی از نظر جوانه‌زنی بذرها بدست آمد. تیمارسرمادهی بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب در مقایسه با تیمارهای کوتاه و بلند مدت با GA_3 بیشترین اثر را بر افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها نشان داد. بذرهای تیره چتریان اشکال مختلفی از الگوی خواب فیزیولوژیکی را از خود نشان می‌دهند و سرمادهی تا حد زیادی می‌تواند به رفع این نوع خوابها کمک نماید (عموآقایی، ۱۳۸٤). معمولاً دمای $5^{\circ}C$ یا اندکی کمتر برای گیاهانی که در اقلیمهای سرد می‌رویند بیشترین تأثیر را در رفع خواب بذر دارد (Koornneff *et al.*, 2002).

به طور کلی، از اطلاعات به دست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ساده‌ترین و مناسبترین شیوه برای شکست خواب بذر آنغوزه کشت بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۹-۸ هفته در دمای $4^{\circ}C$ می‌باشد. همچنین نتایج نشان دادند که عامل سرما سبب افزایش غلظتهای GA_3 درون‌زا در جوانه‌زنی بذر گردید.

سپاسگزاری

با تشکر و قدردانی از گروه‌های زیست شناسی دانشکده‌های علوم پایه دانشگاه شاهد و الزهرا (س) به منظور تأمین هزینه مالی و امکانات آزمایشگاهی و همچنین با سپاسگزاری از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی که در تهیه نمونه‌های بذر مورد مطالعه ما را یاری نمودند.

منابع مورد استفاده

- پیرمرادی، م.ر.، ۱۳۸۱. بررسی روشهای مختلف تیغزنی ریشه و برخی فاکتورهای دیگر بر عملکرد و بقای گیاه دارویی آنغوزه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، ۸۰ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۷٦ صفحه.
- عموآقایی، ر.، ۱۳۸٤. تأثیرخیساندن بذور، مدت زمان و دمای پیش سرمای مرطوب بر شکست خواب بذر کما (*Ferula ovina* Boiss). مجله زیست شناسی، ۱۸(٤)، ۳۵۹-۳۵۰.
- Chamberlain, D.F., Rechinger, K.H. 1987. "*Ferula assa-foetida*", In: Rechinger KH (ed.) Flora Iranica. Akad. Druck- und Verlagsanstalt, Graz, Austria, Vol. 162, 555 p.
- Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination.. New Phytologist, 171: 501–523.
- Gupta, V., 2003. Seed germination and dormancy breaking techniques for indigenous medicinal and aromatic plants. Journal of Medicinal and Aromatic Plants Science, 25: 402-407.
- 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

Archive of SID
www.SID.ir

dormancy release and germination. Seed Science Research, 15: 281-307.
- Lopez, A., 1998. Assa-foetidin and ferocolicin, two sesquiterpenoid cumarins from *Ferula assa foetida*. Tetraherdon Letters, 29 (13): 1557-60.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiolagia Plantarum, 15: 473-497.
- Nadiafi, 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: 542-547.
- 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: 143-145.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S., 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. Plant Cell, 16: 367-378.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of GA_3 and chilling on seed germination of *Ferula assa-foetida,* as a medicinal plant

T. Rajabian[1], A. Saboora[2], B. Hassani[2] and H. Fallah Hosseini[3]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahed University, P.O. Box: 18155-159, Tehran, Iran, E-mail: rajabian@shahed.ac.ir
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Department of Pharmacology, Institute of Medicinal Plants (ACECR), Tehran, Iran

Abstract

Ferula assa-foetida L. is an Iranian endemic medicinal plant that belongs to Apiaceae family. Seeds of this plant have a long period of dormancy. Therefore, experimental methods, which decrease seed dormancy period, could be effective in the seed germination rate and also in revival of the plant. The effect of GA_3 as a pre-treatment (at high concentrations in a short time period at 23±2°C) and treatment (low concentrations in a long time period at 23±2 and 4°C) on germination of two Tabas and Shirkooh population seeds on MS medium was analyzed. Comparative analyses on treated and pre- treated seeds from two populations with GA_3 at 23±2°C temperature did not show any significant changes in both the germination percentage and rate. However, seeds chilling treatment (4°C) indicated increased germination rate and percentage. So, after 12 weeks the maximum germination percentages were 84 and 56% for Tabas and Shirkooh populations. Also the effect of the temperature was investigated on seed germination on the wet filter paper in two levels of 23±2 and 4°C. According to results, maximum seed germination percentage obtained for Shirkooh were (90%) and Tabas (67%) populations by soaking the seeds on the wet filter papers in Petri dishes within 8 to 9 weeks. Finally, it seems that increasing endogenous GA_3 concentration, which is provided mostly by chilling treatment, is the most effective factor for breaking the seed dormancy.

Key words: *Ferula assa-foetida*, seed dormancy, seed germination, GA_3, chilling treatment.

Archive of SID

www.SID.ir