مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۳، شماره ۴، ۱۳۹۱ (۶۱۹-۶۱۱)

اثر تیمارهای شکست خواب بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز در بذر توده‌های مرزنگوش (*Origanum vulgare*)

هادی دهقانپور فراشاه[۱]، رضا توکل افشاری[۲*] و فرزاد شریف زاده[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۵ - تاریخ تصویب:۹۱/۷/۶)

چکیده

خواب بذر ناتوانی موقت بذر زنده در جوانه‌زنی تعریف شده است. روش‌های متفاوتی برای غلبه بر خواب بذر استفاده شده است که بسته به گونه گیاهی و نوع خواب متفـاوت می‌باشد. به منظور شکست خواب و بهبود جوانه زنی بذرهای مرزنگوش در سه توده بومی اصفهان، سمنان و فارس، تیمارهای خراشدهی مکانیکی و شیمیایی، سرمادهی مرطوب، اسید جیبرلیک و پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد جوانه زنی توده اصفهان در پاسخ به تیمارها افزایش معنی داری نشان نداد. ولی میانگین زمان جوانه زنی بذرهای این توده با کاربرد پتانسیل ۱۰- بار محلول پلی اتیلن گلیکول به میزان زیادی کاهش یافت (۱/۵۵ روز). در توده سمنان و فارس طیف وسیعی از تیمارها، شاخص های جوانه زنی را افزایش دادند. بالاترین درصد جوانه زنی (۴۷/۹۷) و کمترین میانگین زمان جوانه زنی (۲/۲۶ روز) در توده سمنان با کاربرد سطح ۱۴- بار پلی اتیلن گلیکول حاصل شد. در توده فارس، سطوح ۱۰- و ۱۴- بار تیمار پلی اتیلن گلیکول و ترکیب تیمارهای سرمادهی و پلی اتیلن گلیکول، شاخص های جوانه‌زنی را نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش دادند، ولی با هم تفاوت معنی داری نداشتند. اما از آنجا که بالاترین درصد جوانه‌زنی در این توده (۶۴ درصد) با تیمار ترکیبی سرمادهی و پلی اتیلن گلیکول حاصل گردید، برای بهبود جوانه زنی این توده توصیه شد. به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز، بذرهای هر توده در معرض تیمارهای توصیه شده قرار گرفتند. در هر سه توده، فعالیت آنزیمی بذرهایی که در معرض تیمارهای شکست خواب قرار گرفته بودند، به طور معنی داری از بذرهای شاهد بیشتر بود. پاسخ های متفاوت به تیمارهای استفاده شده در توده های مختلف بذر مرزنگوش نشان داد که میزان خواب بذر بسته به اقلیم و زادگاه بذر تغییر می‌کند و به طور قابل ملاحظه‌ای از توده‌ای به توده دیگر متفاوت است.

واژه های کلیدی: **مرزنگوش، خواب بذر، تیمارهای شکست خواب بذر، آلفا آمیلاز، بتا-۱و۳- گلوکاناز**

مقدمه

مرزنگوش (*Origanum vulgare*) گیاهی متعلق به تیره Lamiaceae می باشد. جنس *Origanum* شامل ۳۹ گونه بوده که به طور گسترده‌ای در مناطق مدیترانه ای انتشار دارند (Kintzios, 2002). گیاه مرزنگوش منبع باارزشی از ترکیبات طبیعی برای حفظ سلامتی انسان از گذشته تا به امروز محسوب می‌شود (Force et al., 2000). در پزشکی سنتی از روغن فرار مرزنگوش برای درمان نارسایی‌های تنفسی، سوء هاضمه، پوسیدگی دندان و التهاب مفاصل استفاده می‌شود (Chaudhary et al., 2007). امروزه مرزنگوش پرفروش‌ترین گیاه برای استفاده در آشپزی محسوب می‌شود (Kintzios, 2002).

* نویسنده مسئول: رضا توکل افشاری تلفن: ۰۹۱۵۱۸۲۶۲۰۹ E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

گونه‌های مرزنگوش را می‌توان از طریق بذر، قلمه و تقسیم زیاد نمود و انتخاب بهترین روش به عادت رشدی گیاه و تغییرپذیری آن بستگی دارد. تکثیر از طریق تقسیم گیاهان استقرار یافته یا قلمه مطلوب‌تر می‌باشد، در حالی که تولید گیاهچه‌های مرزنگوش از طریق کاشت بذر به دلیل وجود خواب در بذرهای این گیاه چندان قابل اعتماد نیست (Dehghanpour et al., 2011). مطالعات جوانه‌زنی میان جمعیت‌های مختلف گیاهی، راهنمای سودمندی برای ساختمان ژنتیکی گونه مورد نظر و هویت آن در جمعیت طبیعی فراهم می کند. دانستن این قبیل تفاوت‌ها در جوانه‌زنی گونه‌ها برای انتخاب بهترین زادگاه و گزینش ممتازترین جمعیت‌ها مفید می باشد. خواب بذر ناتوانی موقت بذر زنده در جوانه‌زنی تعریف شده است (Vleeshouwers et al., 1995) و از اهمیت اکولوژیکی بالایی برخوردار می‌باشد. به طور کلی توانایی بذرها در به تاخیر انداختن جوانه‌زنی تا زمانی که مکان و زمان برای استقرار آنها مساعد شود را می‌توان یکی از سازوکارهای مهم بقا در گیاهان قلمداد کرد. برای تحریک فرایند جوانه‌زنی باید بر خواب بذر غلبه شود. روش‌های متفاوتی برای این منظور استفاده شده است که بسته به گونه گیاهی و نوع خواب متفاوت می‌باشد (Koyunku, 2005). پیش تیمار بذرها با اسید سولفوریک غلیظ از گسترده‌ترین روش‌های مورد استفاده برای غلبه بر سختی پوسته بذر می‌باشد. تیمار اسید سولفوریک سبب خراشیدگی پوسته بذر و در نتیجه آن نفوذپذیری بیشتر پوسته به آب می‌شود. این تیمار همچنین در کنترل قارچ‌های بذرزاد و در نتیجه بهبود نتایج جوانه‌زنی موثر است. زمان کاربرد این تیمار از چند دقیقه تا چند ساعت متغیر بوده و در اکثر موارد محدوده یک تا ۲۰ دقیقه‌ای برای اعمال این تیمار استفاده شده است (Wang et al., 2007). سرمادهی مرطوب نیز به طور گسترده‌ای به عنوان یک تیمار پیش کاشت برای غلبه بر خواب بذر و بهبود سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای خفته شماری از گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Baskin et al., 1992). پلی اتیلن گلیکول از رایج‌ترین مواد برای اجرای تیمار اسموپرایمینگ محسوب می‌شود. در این تیمار بذرها در معرض پلی اتیلن گلیکول آب مورد نیاز برای شروع فرایندهای جوانه زنی را جذب می‌کنند. اما پتانسیل اسمزی محلول از ظهور ریشه چه جلوگیری می‌کند (Bradford, 1986). این تیمار همچنین قادر به برطرف کردن خواب دمایی[1] در گیاهانی از قبیل کاهو می‌شود که افزایش دامنه دماهایی که گیاه قادر به جوانه‌زنی است را به همراه دارد (Valdez & Bradford, 1987). خواب بذر و جوانه‌زنی فرایندهای پیچیده فیزیولوژیکی هستند که توسط دامنه‌ای از پیام‌های رشدی و خارجی کنترل می‌شوند. جوانه‌زنی با جذب آب توسط بذر آغاز و با شروع طویل شدن محور جنینی پایان می‌یابد (Ogawa et al., 2003). برخی از آنزیم‌ها و هورمون‌ها در حذف خواب و جوانه‌زنی بذر نقش اساسی دارند (Xie et al., 2007; Ogawa et al., 2003). نشاسته ذخیره شده نقش مهمی در توسعه جنین طی جوانه زنی بذرها ایفا می‌کند. افزایش در فعالیت متابولیک بذرهای در حال جوانه‌زنی نتیجه تحریک برخی از آنزیم‌های تجزیه کننده[2] می‌باشد. آمیلاز و اینورتاز دو آنزیم تجزیه کننده مهم هستند که قند را در بذرهای در حال جوانه زنی برنج افزایش می‌دهند. نشاسته توسط آنزیم‌های آمیلولیتیک تجزیه می‌شود تا منابع انرژی را برای رشد جنین فراهم کند (Kashem et al., 1995). عقیده بر این است تولید آلفا آمیلاز در لایه آلورون که به شدت توسط سنتز جیبرلین در جنین کنترل می‌شود، برای جوانه‌زنی بذر غلات ضروری است (Xie et al., 2007; Ogawa et al., 2003). در ابتدا، بیوسنتز جیبرلین فعال در جنین آغاز می‌شود. جیبرلین‌ها از جنین به لایه آلورون منتقل می‌شوند و آنزیم آلفا آمیلاز را بیان می‌کنند. سپس آلفا آمیلاز از لایه آلورون به اندوسپرم ترشح می‌شود تا فرایند تجزیه مولکول‌های نشاسته ذخیره شده در اندوسپرم را سرعت ببخشد و انرژی لازم برای رشد ریشه چه و ساقه چه را فراهم کند (Kaneko et al., 2002). در مقابل، آبسیزیک اسید از تولید آلفا آمیلاز جلوگیری کرده و جوانه‌زنی را متوقف می‌کند (Xie et al., 2007; Ogawa et al., 2003). آنزیم بتا- ۱و۳- گلوکاناز از دیگر آنزیم‌های مهم در جوانه‌زنی بذرها می‌باشد. بتا- ۱و۳-

1. Thermodormancy
2. Hydrolytic enzymes

گلوکاناز به طور گسترده‌ای در گیاهان آلی وجود دارد و فعالیت آن در جوانه‌زنی بذرهای نخود، جو، ذرت و گندم مشاهده شده است. بتا- ۱و۳- گلوکاناز دسته ای از PR پروتئین‌ها بوده که به خانواده PR-2 تعلق دارد (Wu et al. 2001). نشان داده شده است که بتا- ۱و۳- گلوکاناز قبل از جوانه‌زنی در منطقه میکروپیلار اندوسپرم بذر توتون تجمع می‌یابد (Leubner-Metzger et al., 1995) و گمان بر این است که این آنزیم در هیدرولیز ترکیبات دیواره سلولی در نتیجه فرایند شل شدن اندوسپرم در محل خروج ریشه چه بذر توتون نقش دارد (Wu and Bradford, 2003). همچنین مشاهده شده است که فعالیت بتا-۱و۳- گلوکاناز در بذرهای گوجه فرنگی، به ویژه در منطقه میکروپیلار اندوسپرم، افزایش یافته است (Morohashi & Matsushima, 2000). مطالعات جوانه زنی میان جمعیت‌های مختلف، راهنمای سودمندی برای ساختمان ژنتیکی گونه مورد نظر و هویت آن در جمعیت طبیعی فراهم می‌کند. دانستن این قبیل تفاوت‌ها در جوانه‌زنی گونه‌ها برای انتخاب بهترین زادگاه و گزینش ممتازترین جمعیت‌ها مفید می‌باشد (Bhatt et al, 2005). ثابت شده است که مطالعه جوانه‌زنی گیاهان دارویی می‌تواند در توسعه راهکارهای مناسب حفاظت از منابع طبیعی نیز مفید باشد (Kandari et al., 2008). گیاه مرزنگوش به دلیل وجود خواب در بذرهای آن علی رغم اهمیت بالای دارویی در کشور ما گسترش کمی یافته است و مطالعات اندکی در مورد سازوکارهای خواب و چگونگی شکست آن انجام شده است. در این پژوهش ضمن آزمون تیمارهای مختلف شکست خواب بذر به منظور بهبود جوانه‌زنی، به بررسی رفتار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز که دو آنزیم تاثیر گذار در فرایند جوانه زنی می‌باشند پرداخته شده و فعالیت این دو آنزیم در بذرهای شاهد (دارای خواب) و فاقد خواب مورد مطالعه قرار گرفته است. از سوی دیگر، میزان خواب بذر بسته به اقلیم و زادگاه بذر تغییر می‌کند و به طور قابل ملاحظه‌ای از توده‌ای به توده دیگر و حتی در میان بذرهای یک توده متفاوت است (Koyuncu, 2005). لذا به منظور مطالعه اثر اقلیم و منشأ تشکیل بر خواب بذرهای مرزنگوش، نمونه‌های بذر از سه استان کشور با اقلیم متفاوت جمع آوری شدند تا از نظر خواب بذر مورد مقایسه قرار داده شوند.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه خواب بذر در توده های مرزنگوش، آزمونی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشکده علوم زراعی و دامی دانشگاه تهران انجام شد. توده‌های بذر مرزنگوش جمع آوری شده از سه استان اصفهان، سمنان و فارس در شهریور ۱۳۸۷ از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شدند و در طول دوره آزمایش در دمای اتاق (محدوده ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. قوه نامیه بذرها قبل از آغاز آزمون با استفاده از تترازولیوم یک درصد تعیین شد (AOSA, 2000) که بیانگر درصد بذرهای زنده موجود در توده بذر می باشد. سپس بذرها در شرایط جوانه زنی (ISTA, 1996) به منظور برآورد درصد جوانه زنی اولیه توده بذر قرار گرفتند. از آنجا که در آزمون جوانه زنی تنها بذرهایی جوانه می زنند که زنده بوده و فاقد خواب باشند، بنابراین تفاوت دو شاخص قوه نامیه بذر و درصد جوانه زنی اولیه نشان دهنده میزان خواب موجود در توده‌ها می باشد. مشخصات توده‌های استفاده شده به طور خلاصه در جدول ۱ نمایش داده شده است.

1. Endosperm weakening

جدول ۱- مشخصات توده‌های بذر مرزنگوش مورد استفاده در آزمایش

توده بذر	سال جمع آوری	وزن هزاردانه (میلی گرم)	قوه نامیه (درصد)	جوانه زنی اولیه بذر (درصد)
توده اصفهان	۱۳۸۶	۲۳۰	۹۰	۲۵
توده سمنان	۱۳۸۵	۲۳۸	۸۲	۲۱
توده فارس	۱۳۸۵	۲۴۶	۸۶	۲۱

آزمون جوانه‌زنی بذر

ضدعفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت پنج دقیقه انجام شد و پس از شستشو، بذرها روی دو لایه کاغذ صافی در ظروف یک بار مصرف نه سانتی-متری و در چهار تکرار ۲۵ بذری کشت شدند. آبیاری با آب مقطر استریل انجام می‌شد و هر روز بذرهای جوانه زده شمارش و یادداشت برداری می‌شدند. برای جوانه‌زنی از تناوب دمایی ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت تاریکی و هشت ساعت روشنایی استفاده شد (ISTA, 1996).

تیمارهای شکست خواب

خراشدهی پوسته بذر به دو روش مکانیکی با استفاده از کاغذ سمباده و شیمیایی انجام شد. در خراشدهی شیمیایی بذرها به مدت یک، سه و پنج دقیقه در معرض اسید سولفوریک غلیظ (۷۵ درصد حجمی) قرار داده شدند. در تیمار سرمادهی مرطوب بذرها در دوره‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه بین حوله مرطوب و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرما دیدند. تیمار اسید جیبرلیک با غوطه ور کردن بذرها در غلظت های ۱۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون GA_3 به مدت ۴۸ ساعت و در دمای اتاق انجام شد و برای تیمار پلی اتیلن گلیکول، محلول‌های ۶-، ۱۰- و ۱۴- بار پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. در تیمارهای ترکیبی، بذرها در معرض برترین سطح هر تیمار در هر توده قرار گرفتند. بر این اساس، در تیمار ترکیبی خراشدهی و سرمادهی، بذرها بعد از خراشدهی، به مدت ۷ روز در سرمای مرطوب ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در تیمار ترکیبی سرمادهی با اسید جیبرلیک، بذرها بعد از ۷ روز سرمادهی در سرمای مرطوب ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۸ ساعت در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک برای توده اصفهان و محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای توده‌های سمنان و فارس غوطه ور شدند. همچنین در تیمار ترکیبی سرمادهی و پلی اتیلن گلیکول، چون توده های اصفهان، سمنان و فارس به ترتیب در پتانسیل های ۶-، ۱۴- و ۱۰- بار پلی اتیلن گلیکول بهترین پاسخ را نشان داده بودند، بعد از اعمال سرما، در محلول های پلی اتیلن گلیکول با پتانسیل های ذکر شده به مدت ۷۲ ساعت تیمار گردیدند. بعد از انجام کلیه این تیمارها، بذرها به خوبی با آب مقطر دو بار استریل شستشو شدند.

محاسبه شاخص های جوانه زنی

درصد جوانه زنی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Fang et al, 2006). بذرهایی جوانه زده محسوب شدند که ریشه چه به اندازه دو میلی‌متر قابل مشاهده بود.

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه زده در پایان آزمون}}{\text{تعداد کل بذرهای استفاده شده برای آزمون}} \times ۱۰۰$$

میانگین زمان جوانه زنی از طریق فرمول زیر محاسبه شد که در آن ni تعداد بذرهای جوانه زده در پایان هر روز (di) و N تعداد کل بذرهای جوانه زده در پایان آزمایش می باشد (Manjkhola et al., 2003).

$$\text{میانگین زمان جوانه‌زنی (روز)} = \frac{\sum(ni \times di)}{N}$$

اندازه گیری آنزیم

به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم، تیماری که بهترین پاسخ را در بین تیمارهای مختلف شکست خواب نشان داده بود به همراه بذرهای شاهد به مدت ۱۲ ساعت در شرایط جوانه‌زنی قرار گرفتند تا فرایند تولید آنزیم و جوانه‌زنی در آن‌ها آغاز گردد. فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز بعد از استخراج عصاره آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج مناسب اندازه گیری شد (Dehghanpour et al., 2011).

آنالیز و تجزیه داده‌ها

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت. تبدیل داده‌های درصد جوانه‌زنی از طریق محاسبه $Arcsin\sqrt{x}$ انجام شد. میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. برای رسم نمودارها از EXCEL 2007 استفاده شد.

نتایج و بحث

توده‌های مورد آزمایش پاسخ‌های متفاوتی به تیمارهای شکست خواب نشان دادند. این تفاوت‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲). در پاسخ به تیمار خراشدهی مکانیکی، اختلاف جوانه‌زنی توده‌های

اصفهان و سمنان با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. در حالی که بذرهای توده فارس به طور معنی‌داری جوانه‌زنی بالاتری از بذرهای شاهد داشتند. ولی میانگین زمان جوانه‌زنی در این تیمار از شاهد بالاتر بود و کاربرد این تیمار سرعت جوانه‌زنی بذرهای توده فارس را کاهش داد (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس برمبنای میانگین مربعات برای درصد و میانگین زمان جوانه زنی بذر توده‌های مرزنگوش

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)					
		توده اصفهان		توده سمنان		توده فارس	
		درصد جوانه زنی	میانگین زمان جوانه زنی	درصد جوانه زنی	میانگین زمان جوانه زنی	درصد جوانه زنی	میانگین زمان جوانه زنی
تیمار	۱۷	۵۲۳/۴۸ **	۲۵/۷۹ **	۲۹۹/۹۱ **	۲۳/۸۶ **	۳۱۲/۱۲۱ **	۲۶/۳ **
خطا	۵۱	۲۶/۳۰	۲/۳۲	۲۲/۷۳	۲/۴۱	۱۶/۴۲	۱/۳۵
CV (%)		۱۶/۵۵	۲۸/۴۵	۱۴/۷۴	۲۶/۷۲	۱۰/۴۲	۱۹/۱۸

** نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح یک درصد و ns به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

بالاترین درصد جوانه‌زنی در توده اصفهان (۴۷ درصد) با اعمال سه دقیقه خراشدهی اسیدی حاصل شد که نشان دهنده ممانعت پوسته بذر در جوانه‌زنی این توده می‌باشد. زمان بیشتر از سه دقیقه در این توده به بذرها آسیب رسانیده و جوانه‌زنی را متوقف کرد. توده سمنان به سطح یک دقیقه و توده فارس به سه دقیقه کاربرد اسید پاسخ بهتری دادند. در این دو توده، هر چند جوانه‌زنی در زمان بالای تیمار خراشدهی اسیدی کاهش پیدا کرد ولی به صفر نرسید (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر تیمارهای شکست خواب بر شاخص‌های جوانه‌زنی سه توده مرزنگوش (*Origanum vulgare*)

تیمار	توده اصفهان		توده سمنان		توده فارس	
	درصد جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی (روز)	درصد جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی (روز)	درصد جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی (روز)
خراشدهی مکانیکی	۳۱/۸۴bcd	۱۰/۱a	۲۰/۸۴g	۹/۸۵a	b۴۸/۹۹	a۹/۷۵
			خراشدهی شیمیایی			
یک دقیقه	۳۷abc	۹/۱ab	۳۷/۵۶b-e	۷/۶۳ab	bc۳۷/۹۵	a۱۰
سه دقیقه	۴۷a	۷/۶۲bc	۳۴/۸۳b-f	۹/۴۵a	bc۴۱/۹۷	a۸/۸
پنج دقیقه	۰h	۰g	۲۱/۸۳g	۱۰a	de۲۶/۸۴	a۸/۴۲
			سرمادهی مرطوب			
هفت روز	۳۸abc	۷/۵۶bc	۴۱/۹۷abc	۶/۹۵bc	bc۳۸/۹۲	a۹/۳۴
چهارده روز	۲۱/۸۴de	۶/۸۵bcd	۳۰/۹۱c-g	۴/۷۵c-f	ef۲۳/۸	bcd۵/۴۱
بیست و یک روز	۱۶/۵۱ef	۴/۸۷de	۲۵/۹۷efg	۹/۴۶a	ef۲۲/۷۴	a۸/۷۲
			اسید جیبرلیک			
۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۲۵/۶۵cde	۵/۴۷cde	۳۹/۹۱bcd	۵/۱c-f	b۴۷/۹۲	bc۵/۷۵
۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۴۲ab	۳/۳ef	۲۴/۶۶fg	۳/۲۹efg	cde۳۱/۹۴	def۳/۵۷
۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۲۶/۷cde	۳/۹۸ef	۳۴/۵۱c-f	۵/۱۹c-f	bc۴۱/۹۵	c-f۴/۲۳
۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۴۰/۹ab	۴/۷۳de	۳۹/۸۶bcd	۵/۰۳c-f	cd۳۵/۹۸	b-e۵
			پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰			
۶- بار	۳۷abc	۳/۶۲ef	۲۷/۹۵d-g	۲/۸fg	bc۳۹	f۲/۵۸
۱۰- بار	۲۸b-e	۱/۵۵fg	۲۷/۹۵d-g	۴/۸c-f	a۶۰	ef۳/۴۲
۱۴- بار	۳۴a-d	۳/۱۹ef	۴۷/۹۷ab	۲/۲۶g	a۶۰	def۳/۵۷
خراشدهی+سرمادهی	۱۰/۸f	۵/۰۴de	۳/۷i	۵/۷۵b-e	f۱۵/۸	b-e۵/۲
سرمادهی+جیبرلین	۳g	۳/۷۵ef	۹/۷۷h	۴/۵۸c-g	f۱۶/۸۶	c-f۴/۲۵
سرمادهی+PEG	۴۲ab	۶/۶۳cd	۵۳/۰۱a	۴/۰۳d-g	a۶۴	ef۳/۴۷
شاهد	۳۸abc	۵/۳cde	۲۲/۹۱fg	۵/۹۳bcd	e۲۵/۸۷	b۶/۴۶

در هر ستون، داده هایی که دارای حروف مشترک نیستند در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

نتایج مطالعات دیگر نشان داده اند که افزایش زمان اعمال تیمار اسید سولفوریک باعث کاهش شاخص بنیه بذر، سرعت و میانگین زمان جوانه‌زنی در بذرهای باریجه (*Ferula gummosa*) شد

(Rahnama & Tavakkol-Afshari, 2007). هنگـــامی کـــه بذرهای رونـاس (*Rubia tinctorum* L.) به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اسید سولفوریک ۳۶ نرمال تیمار شدند، جوانه‌زنی به بالاترین میزان خود رسید. زمان‌های بیشتر از ۱۵ دقیقه جوانه‌زنی را کاهش داد (Sadeghi et al., 2009). درصد جوانه‌زنی توده‌های سمنان و فارس با قرار دادن بذرها در سرمای مرطوب به مدت ۷ روز افزایش معنی‌داری نشان داد. با افزایش زمان اعمال تیمار سرما، جوانه‌زنی هر سه توده کاهش یافت (جدول ۳). بهترین پاسخ جوانه‌زنی توده اصفهان به تیمار اسید جیبرلیک با کاربرد غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر این هورمون به دست آمد، هرچند تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. در توده سمنان غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و در توده فارس غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون با داشتن تفاوت معنی‌دار با شاهد، بهتر از سایر غلظت‌ها بود (جدول ۳). در تیمار پلی اتیلن گلیکول، توده اصفهان در پتانسیل ۶- بار، توده سمنان در پتانسیل ۱۴- بار و توده سمنان در پتانسیل ۱۰- بار بالاترین درصد جوانه‌زنی را نشان دادند (جدول ۳). تفاوت‌های نشان داده شده در پاسخ توده‌های مرزنگوش به تیمارهای بهبود جوانه‌زنی (جدول ۳)، در سطح خواب جمعیت‌ها و توده‌های مختلف، پدیده شناخته شده‌ای است. علاوه بر این، در تعدادی از گونه‌ها، سطح خواب در بذرهای متعلق به یک گیاه نیز تفاوت دارد. جوانه‌زنی همچنین می‌تواند بین بذرهایی که در سال‌هـای مختلف جمع آوری شده‌اند، تفاوت داشته باشد (Andersson & Milberg, 1998). برای نمونه، تیمارهای پس رسی، گرما و اسید نیتریک اثرات متفاوتی بر خواب بذر چهار کولتیوار بومی برنج (*Oryza sativa*) داشتند (Hor & Mohamed Noor, 1986). در مورد دیگر، سطح خواب و درصد جوانه‌زنی بذر به طور معنی‌داری میان جمعیت-های مختلف گونه‌های *Sinapis arvensis* و *Spergula arvensis* متفاوت بود (Andersson and Milberg, 1998). همچنین تفاوت زیادی در درصد و میانگین زمان جوانه‌زنی در جمعیت‌های مختلف *Swertia angustifolia* با کاربرد تیمارهای متفاوت مشاهده شد (Bhatt et al, 2005). در آزمایش حاضر، فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای بهبود جوانه‌زنی قرار گرفت (جدول ۴). فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بذرهای تیمار شده هر سه توده بیشتر از بذرهای شاهد (بدون تیمار) بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). در کرب‌گراس (*Digitaria sanguinalis*) گزارش شده است که بذرهای خفته فاقد فعالیت آلفا آمیلاز بوده یا فعالیت کمی دارند. در حالی که بذرهای بدون خواب، فعالیت آنزیمی قابل قبولی را نشان دادند. در این مطالعه، افزایش فعالیت آلفا آمیلاز بذرهای خفته در دوره‌های مختلف جذب آب پایین بود. اما بذرهای فاقد خواب، افزایش سریعی را در فعالیت آنزیم نشان دادند و به ۹۰ واحد در ۷۶ ساعت رسیدند (Biswas et al., 1978).

جدول ۴- تجزیه واریانس بر مبنای میانگین مربعات برای فعالیت آنزیمی بذرهای تیمار شده و شاهد سه توده مرزنگوش

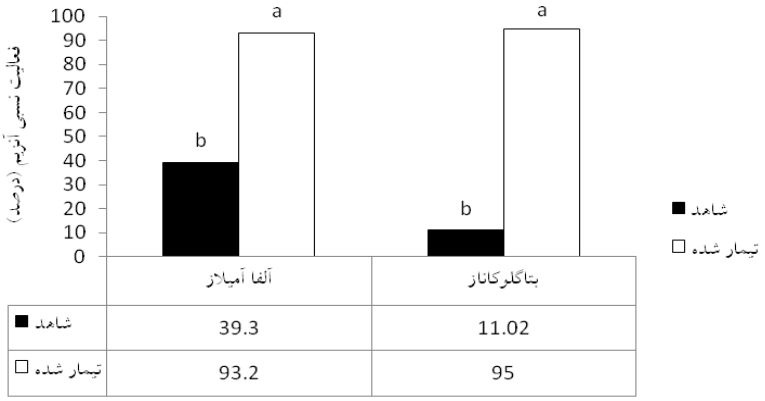
منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات(MS)					
		توده اصفهان		توده سمنان		توده فارس	
		فعالیت آلفاآمیلاز	فعالیت بتاگلوکاناز	فعالیت آلفاآمیلاز	فعالیت بتاگلوکاناز	فعالیت آلفاآمیلاز	فعالیت بتاگلوکاناز
تیمار	۱	۰/۰۰۰۳۲ *	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۴۱ **	۰/۰۰۱۶ **	۰/۰۰۷ **	۰/۰۰۰۴۶ **
خطا	۴	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۲۹	۰/۰۰۰۰۰۱

** و * به ترتیب اختلاف در سطح ۱و ۵ درصد

افزایش فعالیت بتا- ۱و۳- گلوکاناز بذرهای تیمار شده نسبت به بذرهای شاهد در هر سه توده معنی‌دار شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). در بذرهای گوجه فرنگی، تکمیل فرایند جوانه‌زنی به فعالیت بتا- ۱و۳- گلوکاناز بستگی دارد (Morohashi & Matsushima, 2000). ۳۶ ساعت بعد از جذب آب در بذر گوجه فرنگی، افزایش دو

برابری در فعالیت بتا- ۱و۳- گلوکاناز مشاهده شد که این افزایش دست کم تا ۶۰ ساعت ادامه پیدا کرد. این افزایش تنها در منطقه میکروپیلار رخ داد و در بقیه قسمت‌های بذر گوجه فرنگی مشاهده نشد (Wu et al., 2001).

شکل ۱- فعالیت آلفا آمیلاز و بتا-۱و۳- گلوکاناز در بذرهای تیمار شده و شاهد توده اصفهان



شکل ۲- فعالیت آلفا آمیلاز و بتا-۱و۳- گلوکاناز در بذرهای تیمار شده و شاهد توده سمنان

شکل ۳- فعالیت آلفا آمیلاز و بتا-۱و۳- گلوکاناز در بذرهای تیمار شده و شاهد توده فارس

در مجموع، در توده اصفهان افزایش معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی در مقایسه با شاهد مشاهده نشد. اما برخی از تیمارها مانند سطح ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک و ۶- بار پلی اتیلن گلیکول به دلیل

کاهش معنی‌دار در میانگین زمان جوانه‌زنی و نبود تفاوت معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی در مقایسه با شاهد، قابل توصیه هستند.

توده سمنان و فارس با ترکیب تیمارهای سرمادهی و پلی اتیلن گلیکول بالاترین درصد جوانه‌زنی را داشتند. در توده فارس میانگین زمـان جوانه‌زنی نیز با اعمال این تیمار به طور مطلوبی بهبود یافت. ولی در توده سمنان مطلوب‌ترین میانگین زمان جوانه‌زنـی در سطـح ۱۴- بار پلی اتیلن گلیکول به دست آمد و درصد جوانه‌زنی نیز در این تیمـــار تفـــاوت معنی‌داری با ترکیب سرما و پلی اتیلن گلیکول نداشت. بنابراین برای بهبود جوانه‌زنی در توده سمنان سطـح ۱۴- بار پلی اتیلن گلیکول و در توده فارس ترکیب تیمارهای سرمادهی و پلی اتیلن گلیکول توصیه می شود. با کاربرد این تیمارها فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتا- ۱و۳- گلوکاناز نیز به طور معنی‌داری نسبت به بذرهای شاهد افزایش یافت.

REFERENCES

1. Andersson, L. & Milberg, P. (1998). Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Science Research*, 8, 29–38.
2. Association of Official Seed Analysts (2000). *Tetrazolium testing handbook*. AOSA publication.
3. Baskin, C. C., Chester, E. W. & Baskin, J. M. (1992). Deep complex morphological dormancy in seeds of *Thaspium pinnatifidum*. *International Journal of Plant Science*, 153, 565-571.
4. Bhatt, A., Rawal, R. S. & Dhar, U.(2005). Germination improvement in *Swertia angustifolia*: a high value medicinal plant of Himalaya. *Current Science*, 89(6), 1008-1012.
5. Biswas, P. K., Devi, A., Roy, P. K. & Paul, K. B. (1978). Enzyme activity in dormant and nondormant larg crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) seeds following hydration. *Weed Science*, 26, 90- 93.
6. Bradford, K. J. (1986). Manipulation of seed water relation via osmotic priming to improve germination under stress condition. *Horticultural Science*, 21, 1105-1112.
7. Chaudhary, N. M., Saeed, S. & Tariq, P. (2007). Antibacterial effects of Oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative bacilli. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 609- 613.
8. Dehghanpour Farashah, H., Tavakkol-Afshari R., Sharifzadeh F. & Chavoshinasab S. (2011). Germination improvement and α-amylase and β-1,3-glucanase activity in dormant and nondormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 421-427.
9. Fang, S., Wang, G., Wei, Z. & Zhu, Z. (2006). Methods to break seed dormancy in Cyclocarya paliurus (Batal)Iljinskaja. *Scientia Horticulturae*, 110, 305–309.
10. Force, M., Sparks, W. S. & Ronzio, R. A. (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of Oregano *In vivo*. *Phytotherapy Research*, 14, 213-4.
11. Hor, Y. L. & Mohamed Noor, H. J. (1986). The effects of after-ripening, heat and nitric acid on seed dormancy of four local cultivars of padi (*Oryza sativa* L.). *Pertanika*, 9(1), 57-63.
12. ISTA(1996). International Rules for Seed Testing, *Seed Science and Technology*, 13: 299–513.
13. Kandari, L. S., Rao, K. S., Maikhuri, R. K. & Chauhan, K. (2008). Effect of pre-sowing, temperature and light on the seed germination of *Arnebia benthamii* (Wall. ex G. Don): An endangered medicinal plant of Central Himalaya, India. *African Journal of Plant Science*, 2, 5-11.
14. Kaneko, M., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M. & Matsuoka, M. (2002). The α-amylase Induction in Endosperm during Rice Seed Germination Is Caused by Gibberellin Synthesized in Epithelium. *Plant Physiology*, 168, 1264-1270.
15. Kashem, M. A., Sultana N., Samanta S. C. & Kamal A. M. A. (1995). Starch, Sugar, Amylase and invertase activity in the germinating seeds of modern Wheat varieties. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*, 23 (2), 55-61.
16. Kintzios, S. E. (2002). *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 281 pages.
17. Koyunku, F. (2005). Breaking seed dormancy in black mulberry (*Morus nigra* L.) by cold stratification and exogenous application of gibberellic acid. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 23-26.
18. Leubner-Metzger, G., Frundt, C., Vogeli-lange, R. & Meins, J. F. (1995). Class I β -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology*, 109, 751-759.
19. Manjkhola, S., Dhar, U. & Rawal, R. S. (2003). Treatments to improve seed germination of Arnebia benthamii: an endangered medicinal herb of high altitude Himalaya. *Seed Science and Technology*, 31, 571-577.
20. Morohashi, Y. & Matsushima, H. (2000). Development of β -1,3- glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1381-1387.
21. Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin

biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *The Plant Cell*, 15, 1591-1604.
22. Rahnama, A. & Tavakkol-Afshari, R. (2007). Methods for dormancy breaking of Galbanum seeds (*Ferula gummosa*). *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 611-616.
23. Sadeghi, S., Yaghobi Ashrafi, Z., Fakhr Tabatabai, M. & Alizadeh, H. M. (2009). Study methods of dormancy breaking and germination of common madder (*Rubia tinctorum* L.) seed in laboratory conditions. *Botany Research International*, 2(1), 7-10.
24. Valdez, V. M. & Bradford K. J. (1987). Effects of seed coating and osmotic priming on the germination of lettuce seeds. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 112, 153-156.
25. Vleeshouwers, L. M., Bouwmeester, H. J. & Karssen, C. M. (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*, 83, 1031-1037.
26. Wang, Y. R., Hanson, J. & Mariam, Y. W. (2007). Effect of sulphuric acid pretreatment on breaking hard seed dormancy in diverse accessions of five wild Vigna species. *Seed Science and Technology*, 35, 550-559.
27. Wu, C. & Bradford, K. J. (2003). Class I chitinase and β-1,3- glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiology*, 133, 263-273.
28. Wu, C., Leubner-Metzger, G., Meins, F. & Bradford, K. J. (2001). Class I β-1,3-Glucanase and Chitinase Are Expressed in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. *Plant Physiology*, 126, 1299-1313.
29. Xie, X., Zhang, Z. & Hanzlik, S. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid inducible WRKY gene. *Plant Molecular Biology*, 64, 293–303.