علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هشتم/ شماره چهارم/ ۱۴۰۰ (۴۱۱ - ۳۹۷)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2021.5288

تأثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنزیمی در بذر حنا (*Lawsonia inermis* L.)

ابوالقاسم حمیدی‌مقدم

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۲

چکیده

حنا (*Lawsonia inermis*L.) یکی از درختچه‌های زینتی-دارویی ارزشمند است که در برخی از مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیری ایران کشت می‌گردد. برخی از گزارش‌ها حاکی از وجود رکود و درصد جوانه‌زنی بسیار پایین بذرهای آن می‌باشد. به‌منظور بررسی تاثیر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر رکود و ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر حنا، دو آزمایش جداگانه بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. در آزمایش اول تیمارها شامل آب جاری (به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، خیساندن در آب داغ (به‌مدت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ ثانیه)، خراش‌دهی مکانیکی به‌وسیله کاغذ سمباده، خراش‌دهی شیمیایی با اسید سولفوریک غلیظ (به‌مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه)، غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، آماده‌سازی اسمزی با پلی اتیلن گلایکول (۸- بار)، تاریکی کامل (در تمام طول دوره آزمایش) و شاهد به‌کار گرفته شد. در آزمایش دوم موثرترین تیمارهای آزمایش اول به‌همراه شاهد انتخاب و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و میزان ترکیبات فنولی کل موجود در بذر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار تاریکی به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش جوانه‌زنی بذرهای حنا شد. از سوی دیگر خیساندن بذور در آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت موثرترین تیمار با درصد جوانه‌زنی برابر با ۹۴/۷ درصد بود. در آزمایش دوم نتایج نشان داد که یک همبستگی منفی و بسیار معنی‌دار (r= -0/99) بین میزان ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز وجود دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق تیمار آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت به‌عنوان موثرترین تیمارجهت شکست خواب بذرهای حنا قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آماده‌سازی اسمزی، اسید جیبرلیک، خراش‌دهی، رکود دوگانه، فعالیت آلفاآمیلاز

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.
*نویسنده مسئول: h_moghaddam@ujiroft.ac.ir

مقدمه

حنا (*Lawsonia inermis* L.) گیاهی خودگرده-افشان متعلق به خانواده Lythraceae و تنها گونه موجود در این جنس می باشد (Lal and Singh, 2008). از جنبه زینتی در خیلی از مناطق گرمسیر به‌عنوان گیاهی پرچینی مورد کشت قرار می‌گیرد، همچنین از مواد موثره این گیاه به‌عنوان ماده‌ای آرایشی استفاده می‌شود. منشأ این گیاه را مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر آفریقا، جنوب آسیا و شمال استرالیا ذکر کرده‌اند و تاریخچه استفاده از آن به بیش از ۹۰۰۰ سال می‌رسد (Lal and Singh, 2008; Chaudhary *et al.,* 2010). اگرچه تاریخچه دقیق کشت حنا در ایران مشخص نیست، اما قرن‌هاست که در برخی از نواحی گرم جنوب و جنوب شرق کشور به خصوص در بلوچستان، بم، شهداد و جنوب کرمان مورد کشت قرار می‌گیرد. مهم‌ترین ماده موثره حنا، لاوسون[1] یا ۲- هیدروکسی - ۱، ۴ - نفتاکینون[2] بوده و این ماده عامل اصلی رنگ در گیاه می‌باشد. گل‌های آن معطر و دارای اسانس بوده و ماده اصلی تشکیل‌دهنده اسانس آنآلفا و بتاآیونون[3]است (Lal and Singh, 2008; Chaudhary *et al.,* 2010; Varghese *et al.,* 2010) از مهم‌ترین خواص دارویی حنا می‌توان به خاصیت ضد درد، ضد التهاب، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، آنتی‌اکسیدانت، ضد باروری، ضد سرطان و غیره اشاره کرد (Chaudhary *et al*., 2010; Varghese *et al*., 2010).

برخی ازگزارش‌ها حاکی از کندبودن سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی بسیار پایین (کم‌تر از ۲۰ درصد) بذور حنا است (Hajizadeh. and Babaie, 2014; Shuba *et al.*, 2018; Ambika *et al.*, 2019). بیان شده است که بذرهای حنا کوچک، هرمی‌شکل، دارای آندوسپرم و جنین خطی بوده به‌طوری‌که قسمت اعظم بذر را آندوسپرم در بر می‌گیرد. پوسته بذر به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد و سرشار از لاوسون است (Parihar *et al*., 2016). همچنین بذرها حاوی پروتئین (پنج درصد)، کربوهیدرات‌ها (۳۳/۶۲ درصد)، فیبر (۳۳/۵ درصد) و اسیدهای چرب (۱۰-۱۱ درصد)، مقادیر فراوان ترکیبات فنولی کل (۴۵۷ گرم در کیلوگرم وزن خشک)، فلاونوئید (۱۹۹/۹ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) و تانن (۹۳/۷ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) می‌باشند (Chaudhary *et al*., 2010; Chaibi *et al*., 2017). یکی از علت کم‌بودن درصد جوانه‌زنی بذرهای حنا می‌تواند وجود ترکیبات مختلف فنولی، ترپنی، کینونی، کومارینی (El-Araby *et al.,* 2006; Lal and Singh, 2008; Chaudhary *et al.,* 2010; Varghese *et al.,* 2010) در بذرها باشد، به‌طوری‌که بیان شده است که مقدار زیاد این ترکیبات سبب کاهش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز می‌شوند (Imam *et al.,* 2013; Shah *et al.,* 2018) که یکی از آنزیم‌های حیاتی در فرایند جوانه‌زنی بذرها بوده و کاهش فعالیت آن منجر به کاهش تجزیه نشاسته به قندها و متعاقباً عدم تامین انرژی لازم برای فرایند جوانه‌زنی بذر می‌شود (Varner, 1964; Hartman *et al.,* 1990). همچنین عامل دیگر آن، احتمالاً مرتبط با پوسته ضخیم و سخت بذر باشد که بدین منظور تیمارهای مختلف جهت رفع رکود بذور حنا از قبیل خراش‌دهی فیزیکی بذور (Lal *et al*., 2008)، خیساندن در آب (Lal *et al*., 2008) یا آب گرم (Hajizadeh and Babaie, 2014)، توصیه شده است.

علت رکود بذر اکثر گیاهان مرتبط با سازگاری اکولوژیک آن‌ها با شرایط سخت محیطی می‌باشند که ممکن است از طریق عواملی در پوشش‌های بذر و یا عواملی در درون رویان و یا هر دو آن‌ها به بذر تحمیل گردد. رکود ایجاد شده به‌وسیله پوشش‌های پیرامونی رویان در بین گونه‌های گیاهی شایع‌تر است (Foley, 2001; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). این نوع رکود ممکن است به‌دلیل نفوذناپذیری لایه‌های کوتینی موجود در پوسته به آب و گازها و یا به علت وجود بازدارنده‌های شیمیایی در پوسته‌ها باشد. جهت رفع این‌گونه رکود در گیاهان مختلف از جمله حنا (Lal *et al.,* 2007)، Pedicularis (Li *et al,*. 2007)، روناس[4] و مورد[5] (Makkizadeh Tafti *et al.,* 2006) استفاده از تیمارهای خراش‌دهی مکانیکی که منجر به حذف بخشی از پوسته بذر و تسریع در جوانه‌زنی بذور می‌گردد، توصیه شده است. همچنین خراش‌دهی شیمیایی توسط اسید سولفوریک منجر به حذف بخشی از

[1]- Lawsone
[2]- 2-hydroxy-1,4 napthaquinone
[3]- beta-ionone
[4] - *Rubia tinctorum*
[5]- *Myrtus communis* L.

پوشش بذر و متعاقباً جذب آب و افزایش جوانه‌زنی بذور سنا[۶] (Bhattacharya and Saha, 1990; Al-Menaie *et al.,* 2010)، مورد (Makkizadeh Tafti *et al.,* 2006)، گونه‌های اقاقیا[۷] (Asl *et al.,* 2011; Zoghi *et al,* 2011) می‌شود.

همچنین رکود و جوانه‌زنی بذر تحت کنترل ترکیبات هورمونی است، به‌طوری‌که ترکیباتی مانند اسید آبسزیک، هیدروکسید مالیک، کومارین‌ها، سیانامیدها و ترکیبات فنولی بازدارنده جوانه‌زنی بذر و در مقابل ترکیباتی مانند جیبرلین‌ها و سایتوکینین‌ها برطرف‌کننده رکود بذر بوده و جوانه‌زنی را تحریک می‌کنند (Olmez *et al.*, 2004). به‌طوری‌که برای حذف اثر ترکیبات فنولی از قبیل کومارین بر جوانه‌زنی بذر، کاربرد اسید جیبرلیک پیشنهاد شده است (Hamilton and Carpenter, 1976; Khan and Ungar, 1986). در گیاهان مختلف از جمله حنا (Ambika *et al.,* 2019)، بارهنگ[۸] (Sarihan *et al.*, 2005)، سنا (Al-Menaie *et al.,* 2010)، درمنه دشتی[۹] (Tavili and Saberi, 2010) و گیاه *Puccinellia distans* (Saberi and Tavili, 2010) کاربرد غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک سبب افزایش جوانه‌زنی بذر شده است.

از سوی دیگر نور به‌عنوان یک عامل کنترل‌کننده جوانه‌زنی در برخی از بذرها تشخیص داده شده است (Baskin and Baskin, 2001). در بذور فوتوبلاست مثل کاهو و تنباکو نور قرمز سنتز جیبرلیک اسید را تحریک و منجر به جوانه‌زنی بذر می‌شود، ولی در مقابل نور مادون قرمز رکود در بذر را القا می‌کند (Pons, 2000;Yamaguchi and Kamia, 2002). نقش نور در شکست خواب بذ ر بسیاری از گونه‌ها از جمله حنا (Marzougui *et al.,* 2018)، سرخارگل (Baskin *et al.,* 1992)،گونه‌ای ریحان[۱۰] (Obembe and Agboola, 2008)، گونه‌های *Pedicularis* (Li *et al.,* 2007) و گل راعی[۱۱] (Clrak *et al.,* 2007) تایید شده است. با توجه به اهمیت اقتصادی حنا و همچنین کندبودن سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی بسیار پایین بذور آن، که کم‌تر از ۲۰ درصد گزارش شده است، این پژوهش جهت شناخت بیش‌تر عوامل موثر بر رکود و جوانه‌زنی بذورحنا به‌ویژه فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و ترکیبات فنولی کل تحت تاثیر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تاثیر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر حنا، دو آزمایش جداگانه اجرا گردید.

آزمایش اول:تأثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر حنا

آزمایش نخست بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۷ تیمار و سه تکرار بود که تیمارهای اعمال‌شده جهت شکستن خواب در بذر حنا شامل خیساندن در آب جاری به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، خراش‌دهی پوسته بذر با کاغذ سمباده به‌مدت ۲۰ ثانیه، خراش‌دهی پوسته بذر با آب گرم ۹۰ درجه سلسیوس به‌مدت۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ ثانیه، اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ درصد) به‌مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه، اسید جیبرلیک به‌غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۴۸ ساعت، آماده اسمزی اسمزی با محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول ۸- بار به‌مدت ۷۲ ساعت، تاریکی کامل (در تمام طول دوره آزمایش) و شاهد بودند.

پس از گندزدایی بذور با محلول هیپوکلریت سدیم (۱۰ درصد) به‌مدت یک دقیقه و سپس شستشوی آن‌ها با آب مقطر تیمارهای مورد نظر اعمال گردید. هر تیمار حاوی ۲۵ عدد بذر بود که بر روی کاغذ صافی واتمن (شماره یک) داخل پتری‌دیش (قطر ۹۰ میلی‌متر) قرار داده شدند. جهت اجرای تیمارهای آب جاری، پس از گذاشتن بذرها درون پارچه نازک در مسیر آب قرار داده شدند. به‌منظور اجرای تیمار خراش‌دهی مکانیکی، بذرها توسط کاغذ سمباده به‌مدت ۲۰ ثانیه سایده شدند. برای اجرای تیمارهای آب گرم، ابتدا دمای آب توسط حمام بن ماری به ۹۰ درجه سلسیوس رسید، سپس بذرها به‌مدت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ ثانیه در آب قرار گرفتند. برای اعمال تیمار خراش‌دهی شیمیایی بذرها به‌مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه درون اسید سولفوریک غلیظ ۹۸ درصد قرار داده شدند. در ارتباط با تیمارهای جیبرلیک اسید، پس از قرار دادن بذرها داخل پتری‌دیش‌ها، به‌هر ظرف به‌مقدار یکسان

6- *Cassia fistula* L. *and C. nodosa*
7- *Gleditschia triacanthos* and *G. caspica*
8- *Plantago lanceolata* L.
9- *Artemisia sieberi* Boiss.
10- *Occimum gratissimum*
11- *Hypericumaviculariifolium*

از محلول‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه گردید و بعد از ۴۸ ساعت بذور از پتری‌دیش‌ها خارج شدند. به‌منظور اعمال تیمار آماده اسمزی، پس از قراردادن بذور بر روی کاغذ صافی به هر پتری‌دیش محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول ۸- بار که بر اساس روش میچل و کافمن تهیه شد، اضافه گردید (Michel and Kaufmann, 1973). پس از اتمام مدت زمان آماده‌سازی اسمزی (۷۲ ساعت)، بذور از پتری‌دیش‌ها خارج شدند. پس از اعمال تیمارها و سپس شستن بذرها چندین بار با آب مقطر، بذرهای هر تکرار در پتری‌دیش‌های جدید و بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند و به آن‌ها به مقدار یکسان آب مقطر اضافه گردید. سپس کلیه تیمارها همراه با شاهد (آب مقطر) در دستگاه ژرمیناتور با درجه حرارت ۲۷ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (به استثناء تیمار تاریکی کامل) و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار داده شدند. سپس شمارش بذور جوانه‌زده به‌صورت روزانه تا روز هفدهم، هنگامی‌که در تعداد بذرهای جوانه‌زده تغییری مشاهده نگردید، انجام شد. برای محاسبه درصد جوانه‌زنی،سرعت جوانه‌زنی بذور و میانگین مدت زمان جوانه‌زنی از رابطه‌های زیر استفاده گردید (Hartman *et al.*, 1990).

(رابطه ۱) $GP=(\sum G/N)\times 100$

GP[12]: درصد جوانه‌زنی

G: تعداد بذرهای جوانه‌زده

N: تعداد کل بذرها

(رابطه ۲) $GR=\sum_{i=1}^{n}\frac{Si}{Di}$

GR[13]: سرعت جوانه‌زنی (تعداد بذر جوانه‌زده در روز)

S_i: تعداد بذر جوانه‌زده در هر شمارش

D_i: تعداد روز تا شمارش nام

(رابطه ۳) $MGT=\frac{\sum f_i x_i}{x_i}$

MGT[14]= میانگین مدت زمان جوانه‌زنی بر حسب روز

f_i= فواصل زمانی از شروع آزمایش

x_i= تعداد بذرهای جوانه‌زده در فواصل زمانی مشخص

آزمایش دوم: تأثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در بذر حنا

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش نخست، هفت تیمار (آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت، خراش‌دهی پوسته بذر با کاغذ سمباده، اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۱۰ دقیقه، اسید جیبرلیک به‌غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۴۸ ساعت، آماده‌سازی اسمزی با محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول ۸- بار به‌مدت ۷۲ ساعت،تاریکی کامل و شاهد)که اثر قابل توجه‌ای بر جوانه‌زنی بذرهای حنا داشتند انتخاب و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و میزان ترکیبات فنولی کل موجود در بذر آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش نیز بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا شد.

جهت استخراج عصاره آنزیمی پس از اعمال هر یک از تیمارها، بذرها به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط جوانه‌زنی همانند آزمایش نخست قرار گرفتند تا فرایند فعالیت آنزیم آغاز گردد. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم از بذرهای هر تکرار توزین و در داخل هاون با نیتروژن مایع کاملاً خرد شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی‌مولار (pH =۷/۲) هموژن گردید. سپس نمونه‌های هموژنیزه‌شده به‌مدت ۲۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند (Dehghanpour Farashah *et al.*, 2011) و از محلول رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز استفاده گردید. به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم بتاآمیلاز عصاره‌های حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۷۵ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره به ۵۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته یک درصد افزوده و پس از ورتکس‌کردن، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیترو سالیسیک اسید به مخلوط و قراردادن آن در حمام آب‌گرم (دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس) به‌مدت ۵ دقیقه واکنش متوقف گردید. پس از سردشدن مخلوط واکنش، شدت جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰نانومتر خوانده شد (Adda *et al.*, 2014). در نهایت میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز و بر اساس میکرومول مالتوز بر گرم وزن‌تر بیان گردید.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی کل پس ار اعمال تیمارها، ۲۰۰ میلی‌گرم از بذور هر تیمار در مرحله پیش از قرارگرفتن در دستگاه ژرمیناتور توزین و با استفاده از نیتروژن مایع داخل هاون کاملاً خرد و با

[12]- Germination percentage
[13]- Germination rate
[14]- Mean germination time (MGT)

۱۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری انجام شد و میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش سینگلتون و همکاران (Singleton *et al*., 1999) و با استفاده از معرف فولین-سیکالتو تعیین شد.

به‌دلیل این‌که همه تیمارهای آب گرم در آزمایش نخست منجر به مرگ رویان شده بودند جوانه‌زنی مشاهده نشد، بنابراین در نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها آورده نشدند. همچنین داده‌های حاصل از درصد جوانه‌زنی به‌روش تبدیل زاویه‌ای $\text{Arcsin}\sqrt{X/100}$ و داده‌های حاصل از میانگین روز به‌روش Log تبدیل شدند، اما مقادیر واقعی آن‌ها در متن نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (HSD) در سطح ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج:

آزمایش اول: تأثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذرحنا

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر تمامی شاخص‌های مورد ارزیابی در آزمایش اول اثر معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد دارند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر برخی از شاخص‌های جوانه‌زنی بذور حنا

Table 1. Analysis of variance of mechanical and chemical treatments on some seed germination characteristic of Henna (*Lawsonia inermis* L.)

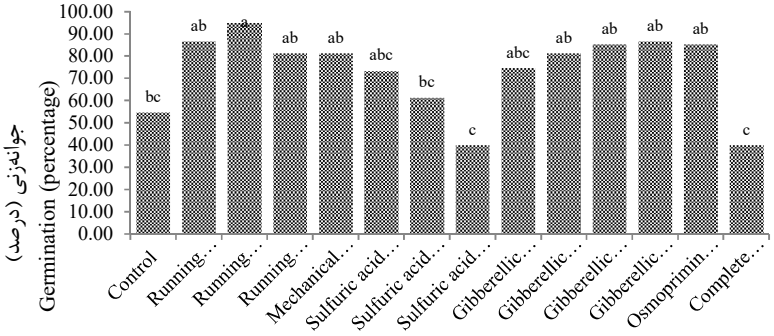
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	درصدجوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	مدت زمان جوانه‌زنی Mean germination time	طول ریشه‌چه Radicle length	طول ساقه‌چه Shoot length	وزن‌تر گیاهچه Fresh weight
تیمار Treatment	13	411.19**	13.93**	0.087**	17.75**	29.94**	37.82**
خطا Error	28	52.07	1.28	0.004	1.74	2.01	5.57
ضریب تغییرات CV (%)		11.96	23.4	9.3	13.6	15.8	13.96

*، **و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns are statistically significant at the probability of 1%, 5% and not significant

درصد جوانه‌زنی

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر درصد جوانه‌زنی بذور حنا نشان داد که تیمارهای آب جاری، اسید جیبرلیک، آماده‌سازی اسمزی با پلی‌اتیلن‌گلایکول، خراش‌دهی با کاغذ سمباده و اسید سولفوریک به‌مدت ۱۰ دقیقه اثر بسیار معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی داشتند و تفاوت معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشد (شکل ۱). بیش‌ترین میزان درصد جوانه‌زنی در تیمار آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت (۹۴/۷ درصد) مشاهده شد، به‌طوری که سبب افزایش ۷۸/۴ درصدی بذرهای جوانه‌زده حنا نسبت به شاهد (۵۴/۶ درصد) شد. اما بذرهای تیمارشده با اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۲۰ دقیقه (۴۰ درصد) و تاریکی (۴۰ درصد) کم‌ترین درصد جوانه را به خود اختصاص دادند.



شکل ۱- تاثیر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر درصد جوانه‌زنی بذور حنا

Figure 1. Effect of mechanical and chemical treatments on seed germination percentage of Henna (*Lawsonia inermis* L.)

سرعت جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی دارای اثر قابل توجه‌ای بر سرعت جوانه‌زنی بذور حنا بودند و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. مقایسه میانگین بین تیمارها، نشان داد که تیمارهای آب جاری به‌مدت ۴۸ (۸/۰۹ بذر در روز) و ۷۲ ساعت (۷/۱۶ بذر در روز) دارای بیش‌ترین تاثیر بر سرعت جوانه‌زنی، نسبت به تیمارهای تاریکی (۰/۶۸ بذر در روز)، شاهد (۱/۵۹ بذر در روز) و اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۲۰ دقیقه (۲/۴ بذر در روز) بودند (جدول ۲).

مدت زمان جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که تمام تیمارها به استثنا تیمار تاریکی کامل سبب کاهش مدت زمان جوانه‌زنی بذور حنا شدند. به‌طوری‌که بیش‌ترین و کم‌ترین مدت زمان جوانه‌زنی به‌ترتیب مربوط به تیمارهای تاریکی (۱۵/۰۱ روز) و آب جاری به‌مدت ۷۲ ساعت (۳/۴۸ روز) بود (جدول ۲). همچنین تفاوت بسیار معنی‌داری بین سایر تیمارها با شاهد (۸/۵۳ روز) مشاهده شد.

جدول ۲- تاثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر برخی از شاخص‌های جوانه‌زنی بذور حنا

Table 2. Effect ofmechanical and chemical treatments on some seed germination characteristic of Henna (*Lawsonia inermis* L.)

تیمارها Treatments	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	مدت زمان جوانه‌زنی Mean germination time (days)	طول ریشه‌چه(میلی‌متر) Radicle length (mm)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر) Shoot length (mm)	وزن تر گیاهچه (میلی‌گرم) Fresh weight (mg)
شاهدControl	1.59^{de}	8.53 ^{b}	7.60^{cd}	7.13^{c}	14.66^{bcd}
آب جاری (۲۴ ساعت) Running water (for 24 h.)	6.13^{ab}	3.89^{cd}	13.40 ^{a}	6.87^{c}	18.33 ^{abc}
آب جاری (۴۸ ساعت) Running water (for 48 h.)	8.09 ^{a}	4.25^{cd}	13.67 ^{a}	7.93^{c}	17.33^{abc}
آب جاری (۷۲ ساعت) Running water (for 72 h.)	7.16^{a}	3.48^{d}	10.33^{abc}	8.47 ^{bc}	18.00 ^{abc}
خراش‌دهی با کاغذ سمباده Scarification with sandpaper	3.73^{bcde}	5.70^{bc}	11.13^{abc}	8.67 ^{bc}	16.00^{abcd}
اسید سولفوریک (۹۸ درصد، ۱۰ دقیقه) Sulfuric acid (98% for 10 min.)	4.96^{abcd}	4.06^{cd}	10.60^{abc}	7.76^{c}	15.67^{abcd}
اسید سولفوریک (۹۸ درصد، ۱۵ دقیقه) Sulfuric acid (98% for 15 min.)	3.56^{bcde}	4.67 ^{cd}	8.23^{cd}	6.33^{c}	14.33^{bcd}
اسید سولفوریک (۹۸ درصد، ۲۰ دقیقه) Sulfuric acid (98% for 20 min.)	2.41^{cde}	4.62 ^{cd}	8.53^{cd}	6.53^{c}	12.66^{cd}
اسید جیبرلیک (GA_3؛ ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) Gibberellic acid (GA_3; 250 ppm)	6.13^{ab}	3.65 ^{d}	8.80^{cd}	12.47 ^{ab}	19.33 ^{abc}
اسید جیبرلیک (GA_3؛ ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) Gibberellic acid (GA_3; 500ppm)	6.03^{ab}	4.22^{cd}	8.20^{cd}	14.66 ^{a}	22.67 ^{a}
اسید جیبرلیک (GA_3؛ ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر) Gibberellic acid (GA3; 750 ppm)	6.11^{ab}	4.19^{cd}	8.37^{cd}	14.20 ^{a}	21.00 ^{ab}
اسید جیبرلیک (GA_3؛ ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) Gibberellic acid (GA_3; 1000 ppm)	5.88^{ab}	4.37^{cd}	8.86^{cd}	12.56 ^{ab}	20.00 ^{ab}
آماده‌سازی اسمزی (۸- بار - ۷۲ ساعت) Osmopriming (-8 bar - 72 h)	5.38^{abc}	4.40^{cd}	12.80 ^{ab}	7.17^{c}	17.67 ^{abc}
تاریکی کامل Complete darkness	0.68^{e}	15.01 ^{a}	5.10^{d}	4.73 ^{c}	9.00^{d}

میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر ستون بر اساس آزمون توکیHSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Different letters in each column indicate statistical differences between treatments using HSD ($P\leq0.05$)

طول ریشه‌چه

مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر طول ریشه‌چه نشان می‌دهد که در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). بیش‌ترین طول ریشه‌چه از بذرهای تیمارشده در آب جاری به‌مدت ۴۸ (۱۳/۷ میلی‌متر) و ۲۴ ساعت (۱۳/۴ میلی‌متر)

و آماده‌سازی اسمزی با پلی‌اتیلن‌گلایکول (۱۳/۳ میلی‌متر) حاصل گردید (جدول ۲). به‌طوری‌که تیمار آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت سبب افزایش ۸۰/۳ درصدی طول ریشه‌چه نسبت به شاهد (۷/۶ میلی‌متر) گردید. کم‌ترین طول ریشه‌چه مربوط به گیاهچه‌های حاصل از تیمار تاریکی (۵/۱ میلی‌متر) بود.

طول ساقه‌چه

مقایسه میانگین نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری میان تیمارهای اسید جیبرلیک با سایر تیمارها در شاخص طول ساقه‌چه وجود دارد (جدول ۲). بیش‌ترین طول ساقه‌چه مربوط به بذور تیمار شده با اسید جیبرلیک با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۴/۷ میلی‌متر) و کم‌ترین آن مربوط به بذور تحت تیمار تاریکی کامل (۴/۷ میلی‌متر)بود. مقایسه میانگین نشان داد که تفاوت معنی‌داری میان شاهد با دیگر تیمارها وجود ندارد.

وزن تر گیاهچه

نتایج نشان داد که تیمارهای اسید جیبرلیک، آب جاری و آماده‌سازی اسمزی سبب افزایش وزن تر گیاهچه شدند (جدول ۲).بیش‌ترین وزن تر گیاهچه مربوط به اعمال تیمارهای اسید جیبرلیک با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۲۲/۶۷ میلی‌گرم) بود، درحالی‌که کم‌ترین وزن تر گیاهچه از تیمارهای تاریکی (۹ میلی‌گرم) و اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۲۰ دقیقه (۱۲/۶۶ میلی‌گرم) حاصل شد (جدول ۲).

آزمایش دوم: تأثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر ترکیبات فنولی کل و فعالیت آلفاآمیلاز در بذرحنا: نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم نشان می‌دهد که تیمارهای منتخب مکانیکی و شیمیایی بر ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دارند (جدول ۳).

فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در بذور حنا نشان داد که کلیه تیمارها به غیر از تیمار تاریکی سبب افزایش فعالیت آنزیم شدند. بذور تحت تیمارهای آب جاری (۴/۶۹ میکرومول بر گرم در دقیقه) و اسید جیبرلیک (۴/۴۰ میکرومول بر گرم در دقیقه) دارای بیش‌ترین میزان فعایت آنزیم نسبت به تیمار تاریکی کامل (۱/۳۴ میکرومول بر گرم در دقیقه) و شاهد (۱/۵۸ میکرومول بر گرم در دقیقه) بودند، به‌طوری‌که تیمار آب جاری سبب افزایش ۲/۹۷ و ۳/۵ برابری فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز نسبت به شاهد و تیمار تاریکی کامل شد (شکل ۳).

ترکیبات فنولی کل

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی بر میزان ترکیبات فنولی کل بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ترکیبات فنولی کل به‌ترتیب در بذور گیاهان شاهد (۱۱۴/۲۷ میلی‌گرم بر گرم) و تیمار آب جاری (۴۰/۹۴ میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شدند (شکل ۴). به‌طوری‌که میزان ترکیبات فنولی کل در بذور شاهد تقریبا ۲/۸ برابر، بیش‌تر از بذور تحت تیمار آب جاری بود. اگرچه تفاوت معنی‌داری میان شاهد و تیمار تاریکی کامل وجود (۱۱۳/۲ میلی‌گرم بر گرم) نداشت، اما سایر تیمارها اثر بسیار معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی کل در بذور نسبت به شاهد داشتند.

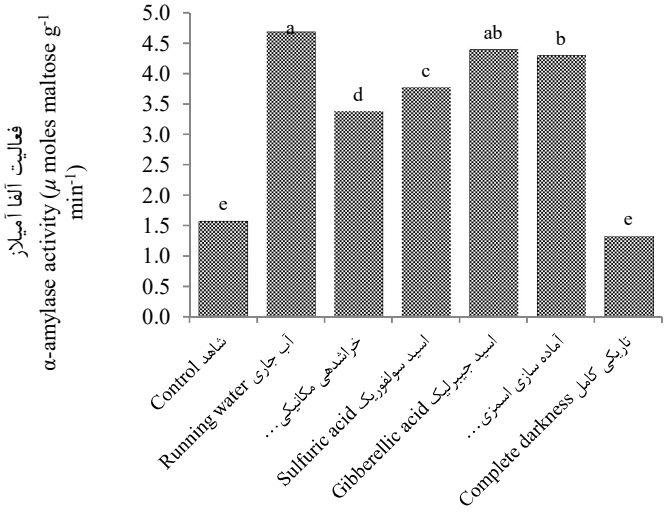
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر میزان ترکیبات فنولی کل و فعالیت آلفاآمیلاز

Table 3. Analysis of variance ofmechanical and chemical treatments on total phenolic compounds (TPC) and α-amylase activity

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	ترکیبات فنولی کل Total phenolic compounds	آنزیم آلفاآمیلاز α-amylase activity
تیمار Treatment	6	2538.23**	5.57**
خطا Error	14	7.54	0.05
ضریب تغیرات (%) CV		3.75	6.45

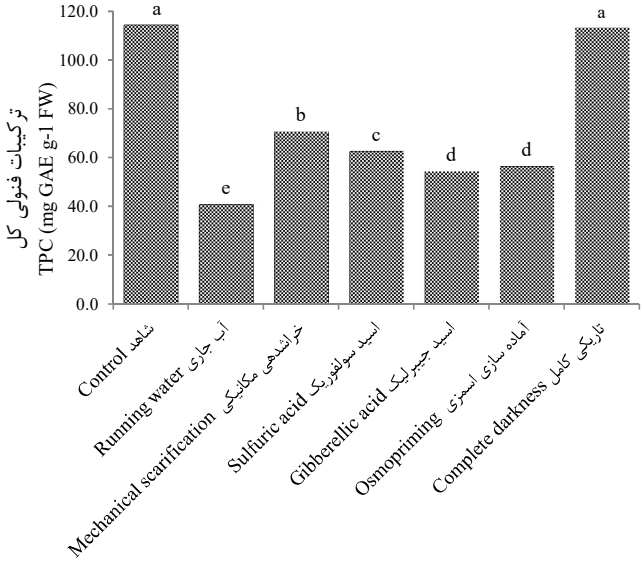
*، **و nsبه ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns are statistically significant at the probability of 1%, 5% and not significant



شکل ۳- تاثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز

Figure 3. Effect of mechanical andchemical treatments onα-amylase activity



شکل ۴- تاثیر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی بر ترکیبات فنولی‌کل بذر

Figure4. Effect of mechanical and chemical treatments on total phenolic compounds (TPC)

بحث

با توجه به آن‌که همبستگی منفی بین درصد جوانه‌زنی و ترکیبات فنولی کل (r= -0/95) و همچنین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین درصد جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (r= 0/96) مشاهده شد (جدول ۴)، می‌توان استنباط کرد که افزایش درصد جوانه‌زنی بذور تحت تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی نسبت به شاهد می‌تواند نشانگر وجود مواد بازدارنده از قبیل ترکیبات فنولی کل در پوسته بذر و در نتیجه رکود شیمیایی باشند. بیان شده است که تولید و تجمع برخی مواد شیمیایی بازدارنده رشد از قبیل انواع فنول‌ها، کومارین و اسید آبسیزیک در پوسته بذر در طی نمو و باقی‌ماندن آن‌ها در بذر حتی پس از برداشت، می‌تواند عاملی تاثیرگذار بر جوانه‌زنی بذرها باشد.

این احتمال نیز وجود دارد که بازدانده‌های جوانه‌زنی در بذر همانند بلوک‌کننده جایگاه آنزیم[15] عمل کرده و از جوانه‌زنی بذرها جلوگیری می‌کنند (Booth and Sowa, 2001; Obembe and Agboola, 2008). بیان شده است که خیساندن بذرهای گونه‌ای سلمه[16] در آب سبب شستشوی ترکیبات فنولی بذر به‌میزان ۴۵ تا ۸۴ درصد می‌گردد (Khan and Ungar, 1986). در این تحقیق نیز خیساندن بذرهای حنا به‌مدت ۴۸ ساعت در آب جاری سبب کاهش میزان ترکیبات فنولی کل و افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز گردید که در نهایت منجر به شکست خواب و افزایش درصد جوانه‌زنی بذور (۸۰/۲ درصد) نسبت به شاهد شد. کاهش مختصر درصد جوانه‌زنی در تیمار آب جاری به‌مدت ۷۲ ساعت نسبت به‌مدت زمان ۴۸ ساعت آبشویی، می‌تواند به‌دلیل شسته‌شدن ناخواسته مواد تسریع-کننده جوانه‌زنی از قبیل جیبرلین‌ها همراه با مواد بازدارنده جوانه‌زنی باشد (Obembe and Agboola, 2008; Nabaee *et al.,* 2013). در سایر مطالعات نیز خیساندن بذور گیاهان حنا (Lal *et al*., 2007; Hajizadeh. And Babaie, 2014; Shuba *et al*., 2018; Ambika *et al*., 2019)، سنا[17] (Suryawanshi *et al.,* 2001)، مشگک[18] (Ashtari *et al*., 2013)، باباآدم[19] (Nabaee *et al.,* 2013)، گونه‌ای ریحان (Obembe and Agboola, 2008) و گل راعی (Clrak *et al.,* 2007) در آب مقطر یا آب جاری بر شکستن خواب و افزایش درصد جوانه‌زنی بذور موثر بوده است.

در خصوص تیمارهای آب گرم همان‌طور که پیش‌تر در قسمت مواد و روش‌ها ذکر گردید، هیچگونه جوانه‌زنی در تیمارهای آب گرم (۹۰ درجه سلسیوس) مشاهده نشد و پس از به‌کارگیری آزمون تترازولیوم به‌منظور ارزیابی زنده‌بودن بذور جوانه‌نزده مشخص شد که تیمارهای آب گرم منجر به آسیب‌دیدگی رویان شده است. نتایج حاصله از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده از تحقیق روی آکاسیا[20] (Rincon-Rosales *et al*., 2003)، گیاه *Adenanthera pavonina* L (Thilakar and Rathi, 2013) و بامیه[21] (Mohamadi *et al*., 2012) مطابقت دارد. به‌هرحال حاجی‌زاده و بابایی (Hajizadeh and Babaie, 2014) بیان کرده‌اند که تیمار آب گرم سبب افزایش درصد جوانه‌زنی بذرهای حنا می‌شود، که این احتمالاً به‌دلیل تفاوت در نحوه اعمال تیمار و دمای آب می‌باشد. علاوه بر این، برخی دیگر نیز گزارش کرده‌اند که تیمار آب گرم سبب افزایش جوانه‌زنی بذور و رفع رکود ناشی از سختی پوستهٔ بذر بامیه (Mohammadi *et al*., 2012)، آکاسیا (Rehman *et al.,* 1999; Rincon-Rosales *et al.,* 2003) و گیاه *Tamarindus indica* (Mohammad and Amusa, 2003) می‌شود. در خصوص تیمار خراش‌دهی با کاغذ سمباده بیان شده است که احتمالاً این تیمار موجب نازک‌شدن پوسته بذر و در نتیجه کاهش مقاومت مکانیکی پوسته در برابر خروج گیاهچه و همچنین سبب افزایش نفوذپذیری پوسته بذرها به آب و اکسیژن می‌شود، همچنین حذف بخشی از پوسته بذر احتمالاً سبب کاهش مواد بازدارنده موجود در پوسته بذر از قبیل ترکیبات فنولی کل گردیده است. تا کنون نقش کاربردی خراش‌دهی مکانیکی در شکست خواب بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی از قبیل حنا (Lal *et al.,* 2007)، گاوپنبه (Leon and Owen, 2003)، یونجه (Uzen and Aydin, 2004)، گونه‌های از جنس *Pedicularis* (Li *et al*., 2007)، روناس و مورد (Makkizadeh Tafti *et al*., 2006) تائید شده است.

تیمار اسیدسولفوریک اثر قابل توجه‌ای بر درصدجوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و مدت زمان جوانه‌زنی جوانه‌زنی داشت. به‌طوری‌که بیش‌ترین تاثیر را تیمار اسید سولفوریک به‌مدت ۱۰ دقیقه داشت و با افزایش مدت زمان از میزان درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی کاسته شد. با این وجود تفاوت معنی‌داری بین شاهد و تیمارهای اسید سولفوریک بر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه مشاهده نشد. بیان شده است که خراش‌دهی شیمیایی توسط اسید سولفوریک احتمالاً منجر به تجزیه مواد پوسته بذر و در پی آن افزایش جذب آب و اکسیژن

15- Blocking the enzymes sites
16- *Atriplex triangularis*
17- *Cassia angustifolia*
18- *Ducrosia anethifolia DC*
19- *Arctium lappa*

20- *Acacia salicina and A. angustissima*
21- *Abelmoschus esculentus* L.

می‌شود و به این ترتیب نقش بازدارندگی پوسته در فرآیند جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (Bhattacharya and Saha, 1990; Makkizadeh Tafti *et al.,* 2006; Al-Menaie *et al.,* 2010; Asl *et al.,* 2011; Zoghi *et al.,* 2011). با این وجود افزایش مدت زمان تیمار اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۲۰ دقیقه نه تنها سبب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شد، بلکه سبب بروز آثار سوختگی بافتی نیز گردید، که علت آن می‌تواند به‌دلیل آسیب‌دیدگی رویان در اثر نفوذ اسید سولفوریک به داخل بذر باشد (Nabaee *et al.,* 2013; Ashtari *et al.,* 2013).

تیمارهای اسید جیبرلیک اثر بسیار معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، مدت زمان جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، وزن تر گیاهچه و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز داشتند. به‌طوری‌که تیمارهای اسید جیبرلیک منجر به افزایش ۴۰ تا ۶۴ درصدی در جوانه‌زنی بذرهای حنا نسبت به شاهد شدند. بیان شده است که اسید جیبرلیک در هنگام جوانه‌زنی بذر هم از طریق نسخه‌برداری و هم تاثیر بر تولید و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز منجر به تجزیه نشاسته به قند و متعاقباً تامین انرژی مورد نیاز برای فرایند جوانه‌زنی می‌گردد (Varner,1964; Hartman *et al.,* 1990). علاوه بر این، اسید جیبرلیک با تاثیر بر طویل‌شدن سلول‌ها می‌تواند سبب افزایش طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه‌ها نیز شود (Nascimento and West, 1999). در مطالعات دیگر نیز کاربرد غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای گیاهان حنا (Ambika *et al.,* 2019)، بارهنگ (Sarihan *et al.,* 2005)، سنا (Al-Menaie *et al.,* 2010)، درمنه دشتی (Tavili and Saberi, 2010) و گیاه *Puccinellia distans* (Saberi and Tavili, 2010) شده است.

تیمار آماده‌سازی اسمزی محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول (۸- بار به‌مدت ۷۲ ساعت) تاثیر بسیار معنی‌داری بر درصدجوانه‌زنی (شکل ۱)، سرعت جوانه‌زنی، میانگین روز لازم برای جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، وزن تر گیاهچه (جدول ۳) و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (شکل ۳) داشت. به‌طوری‌که این تیمار سبب افزایش (۶۱/۴ درصد) جوانه‌زنی بذرها نسبت به شاهد شد.

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین تعدادی از صفات مورد مطالعه

Table 4. The correlation coefficient between some of the traits

صفات Traits	(1)	(2)	(3)	(4)
(1) درصد جوانه‌زنی Germination percentage	1.00			
(2) سرعت جوانه‌زنی Germination rate	0.91**	1.00		
(3) فعالیتآلفا آمیلاز α-amylase activity	0.96**	0.95**	1.00	
(4) ترکیبات فنولی کل Total phenolic compounds	-0.95**	-0.93**	-0.99**	1.00

*، **و ns،به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns are statistically significant at the probability of 1%, 5% and not significant

به‌نظر می‌رسد در طی آماده‌سازی بذر یکسری تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی از قبیل سنتز ماکرومولکول‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و تشکیل متابولیت‌های مختلف در درون بذر افزایش یافته (Parera and Cantiliff, 1994; Khan, 1992) و منجر به بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور می‌گردد. از سوی دیگر با افزایش سرعت جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها فرصت بیش‌تری برای رشد در اختیار داشته و طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و وزن‌تر آن‌ها افزایش می‌یابد (Nascimento and West, 1999). آماده‌سازی اسمزی همچنین سبب بهبود درصد جوانه‌زنی و میانگین روزهای جوانه‌زنی بذرهای گیاهان گاوزبان[۲۲] (Makkizadeh Tafti *et al.,* 2006)، رازیانه[۲۳] (Neamatollahi *et al*., 2009) و مرزنگوش (Dehghanpour *et al*., 2013) نیز شده است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بذور حنا برای جوانه‌زنی نیاز به نور دارند، به‌طوری‌که بذرهای تحت تیمار تاریکی کامل علاوه بر این‌که دارای کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز بودند، از سرعت و درصد جوانه‌زنی کم‌تری نیز برخوردار بودند و فقط ۴۰ درصد بذور پس از ۱۵روز از آغاز آزمایش جوانه زدند. علاوه بر این، سایر پارامترهای

[22]- *Borago officinalis* L.

[23]- *Foeniculum vulgare*

مورد ارزیابی از قبیل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه نیز کاهش بسیار معنی‌داری تحت تیمار تاریکی کامل نشان دادند. بنابراین می‌توان بیان کرد که بذور حنا علاوه بر رکود شیمیایی دارای رکود فیزیولوژیک نیز می‌باشند. نقش نور در شکست خواب بذر بسیاری از گونه‌ها از جمله حنا (Marzougui *et al*., 2018)، سرخارگل (Baskin *et al.,* 1992)،گونه‌ای ریحان (Obembe and Agboola, 2008)، گونه‌های *Pedicularis* (Li *et al.,* 2007) و گل راعی (Clrak *et al.,* 2007)، قبلاً تایید شده است. مکانیزم اساسی حساسیت به نور در بذرها به‌واسطه یک رنگیزه واکنش‌پذیر از نظر فتوشیمیایی به نام فیتوکروم می‌باشد که مواجه بذور آبگیری‌کرده با نور قرمز منجر به تغییر فیتوکروم سرخ (P_r) به فرو سرخ (P_{fr}) و در پی آن سنتز جیبرلیک اسید و تحریک جوانه‌زنی می‌شود (Hartman *et al.,* 1990; Pons, 2000; Yamaguchi and Kamia, 2002). همچنین بیان شده است پروتئین‌های PIL5 و SPT که از عوامل محرک خواب و مانع جوانه‌زنی هستند، در تاریکی مانع سنتز اسید جیبرلیک و در نتیجه کاهش پتانسیل جوانه‌زنی می‌شوند (Pons, 2000).کاهش سرعت جوانه‌زنی در اثر تاریکی سبب می‌شود گیاهچه‌ها فرصت کم‌تری برای رشد در اختیار داشته و در نتیجه منجر به کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌ها و همچنین وزن تر آن‌ها می‌گردد (Nascimento and West, 1999).

اگرچه مقادیر کم ترکیبات فنولی سبب افزایش جوانه‌زنی بذر می‌شود (Ray and Laloraya, 1984; El-Araby *et al.,* 2006)، اما مقادیر زیاد آن مانع جوانه‌زنی بذر می‌گردد (Khan and Ungar, 1986). که این ممعانت ممکن است از طریق مهار فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز باشد (Imam *et al.,* 2013; Shah *et al.,* 2018).کاهش میزان ترکیبات فنولی می‌تواند به‌دلیل آبشویی یا تجزیه و حذف بخشی از پوسته بذر در اثر اعمال تیمارهای مختلف مکانیکی و شیمیایی باشد. به‌طوری‌که بیان شده است این مواد خاص بازدارنده جوانه‌زنی، در اکولوژی بعضی از گیاهان مناطق کویری و گرمسیری نقش داشته و توسط باران‌های سنگین که بقای دانهال را تضمین می‌کند، شسته می‌شوند (Hartman *et al.,* 1990). بنابراین با توجه به آن‌که یک همبستگی منفی (r= -0.99) بین مقدار ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز مشاهده گردید (جدول ۴)، می‌توان استنباط کرد که کاهش میزان ترکیبات فنولی کل در اثر اعمال تیمارهای مختلف سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای حنا گردیده است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق می‌توان استنباط کرد که بذور حنا دارای رکود دوگانه شیمیایی و فیزیولوژیک می‌باشند و جهت رفع خواب بذرها تیمار آب جاری به‌مدت ۴۸ ساعت موثرترین تیمار است و به‌منظور بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور این گونه گیاهی ارزشمند و قابل توصیه می‌باشد. علاوه بر این نتایج این تحقیق بر این دلالت می‌کند که بذور حنا برای جوانه‌زنی نیازمند نور هستند و از کاشت عمیق بذرها باید خودداری کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین دانشگاه جیرفت قدردانی می‌گردد.

منابع

Adda, A., Regagba, Z., Latigui, A. and Merah, O. 2014. Effect of Salt Stress on (X-amylase Activity, Sugars Mobilization and Osmotic Potential of*Phaseolus vulgaris* L. Seeds Var. 'Cocorose' and 'Djadida' During Germination. Journal of Biological Sciences, 14 (5): 370-375. **(Journal)**

Al-Menaie, H.S., Al-Ragam, O., Al-Shatti, A., Mathew, M. and Suresh, N. 2010. The effects of different treatments on seed germination of the *Cassia fistula* L. and *Cassia nodosa* Buch.-Ham. ex Roxb. in Kuwait. African Journal of Agricultural Research, 5(3). **(Journal)**

Ambika, S., Sujatha K. and Balakrishnan, K. 2019. Seed priming treatments on seedling quality of henna (*Lawsonia inermis* L.) seeds. Acta Hortic. DOI: 10.17660/Acta Hortic. 2019.1241.54. **(Conference)**

Ashtari, R., Heidari, M., Omidi, M. and Zare, A.R. 2013. Seed germination and dormancy breaking techniques for *ducrosia. anethifolia* (DC.). Trakia Journal of Sciences, 11 (1): 82-87. **(Journal)**

Asl, M.B., Sharivivash, R. and Rahbari, A. 2011. Effect of Different Treatments on Seed Germination of Honey Locust (*Gleditschia triacanthos*). Modern Applied Science, 5 (1): 200-204. **(Journal)**

Baskin, C.C., Baskin, J.M. and Hoffman, G.R. 1992. Seed dormancy in the prairie forbs *Echinaceaangustifolia* (Asteraceae): after ripening patternduring cold stratification. Journal of Plant Science, 153: 239-243. **(Journal)**

Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2001. Seeds, Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego. **(Book)**

Bhattacharya, A. and Saha, P.K. 1990. Ultra-structure of seed coat and wateruptake pattern of seeds during germination in Cassia sp. Seed Sci. and Technol, 18: 97-103.**(Journal)**

Booth, D.T. and Sowa, S. 2001. Respiration in dormant and non-dormant bitterbrush seeds. Journal of Arid Environment, 48: 35-39. **(Journal)**

Chaibi, R., Drine, S. and Ferchichi, A. 2017. Chemical study and biological activities of various extracts from *lawsonia inermis* (Henna) seeds. Acta Medica Mediterranea, 33: 981. **(Journal)**

Chaudhary, G., Goyal, S. and Poonia, P. 2010. *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 2(2): 91-98.**(Journal)**

Clrak, C., Kevseroglu, K. and Ayan, A.K. 2007. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum avicullariifolium* subsp.*depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. Journal of Arid Environments, 68: 159–164. **(Journal)**

Dehghanpour Farashah, H., Tavakkol Afshari, R., Sharifzadeh, F. and Chavoshinasab, S. 2011. Germination improvement and α-amylase and β-1,3-glucanase activity in dormant and nondormantseeds of Oregano (*Origanum vulgare*). Australian Journal of Crop Science, 5(4): 421-427. **(Journal)**

Dehghanpour, H., Tavakol Afshari, R. and Sharifzadeh, F. 2013. The Role of Seed Dormancy Breaking Treatments on Germination and Alpha-Amylase and Beta 1,3-Glucanase Activity in Different Ecotypes of *Origanum vulgare*, Iranian Journal of Field Crop Science, 43 (4): 611-619. (In Persian)**(Journal)**

El-Araby, M.M., Moustafa, S.M.A., Ismail, A.I. and Hegazi, A.Z.A. 2006. Hormone and phenol levels during germination and osmopriming of tomato seeds, and associated variations in protein patterns and anatomical seed features. Acta Agronomica Hungarica, 54(4): 441–457. **(Journal)**

Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. Tansley Review - New Phytologist, 171: 501-523. **(Journal)**

Foley, M.E. 2001. Review article: seed dormancy: an update on terminology, physiological, genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. Weed Science, 49: 305-317. **(Journal)**

Hajizadeh, K. and Babaie, Z. 2014. Effects of different methods of physical scarification on seed germination and early growth of henna seedling (*Lawsonia inermis*).The 3rd National Congress on Organic and Conventional Agriculture, 20-21 August, Ardabil, Iran. (In Persian)**(Conference**)

Hamilton, D.F. and Carpenter, P.L. 1975. Regulation of seed dormancy in Elaeagnus umbellata by endogenous growth substances. Canadian Journal of Botany, 53: 2303-2311. **(Journal)**

Hartman, H., Kester, D. and Davis, F. 1990. Plant Propagation, Principle and Practices. Prentice Hall International Editions. **(Book)**

Imam, H., Mahbub, N.U., Forhad Khan, M.D., Hana, H.K. and Sarker, M.R. 2013. Alpha amylase enzyme inhibitory and anti-inflammatory effect of *Lawsonia inermis* L. Pakistan Journal of Biological Sciences, 16 (32): 1796-1800. **(Journal)**

Khan, A.A. 1992. Preplant physiological seedconditioning. In: Janick. J. (Eds.) Horticultural Reviews, John Wiley, New York. pp. 131-181. **(Book)**

Khan, M.A. and Ungar, I.A. 1986. Inhibition of germination in *atriplex triangularis* seeds by application of phenols and reversal of inhibition by growth regulators. International Journal of Plant Sciences, 147 (2): 148-151. **(Journal)**

Lal, G., Roy, P.K. and Singh, Y.V. 2007. Effect of different treatments on germination behavior of henna (*lawsonia inermis* L.) seeds. SAARC Journal of Agriculture, 5 (2): 69-76.**(Journal)**

Lal, P. and Singh, Y.V. 2008. Effect of auxins on rooting and sprouting behaviour of stem cuttings of henna *(Lawsonia inermis*).Indian Journal of'Agricultural Sciences,78 (12): 1013-17. **(Journal)**

Leon, R.G., and Owen, M.D.K. 2003. Regulation of weed seed dormancy throughlight and temperature interaction. Weed Sciences, 51: 752-758. **(Journal)**

Li, A.R., Guan, K.Y. and Probert, R.J. 2007. Effects of Light, Scarification, and Gibberellic Acid on Seed Germination of Eight Pedicularis Species from Yunnan, China. Hort Science, 42(5): 1259-1262. **(Journal)**

Makkizadeh Tafti, M., Tavakol Afshari, R., Majnoon Hosseini, N., Naghdi Badi, H. and Mehdizadeh, A. 2006. Effect of Osmopriming on Seed Germination of Borage (*Borago officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 22(3): 216-222. (In Persian)**(Journal)**

MakkizadehTafti, M., Farhoudi, R., Naghdibadi, H. and Mehdizadeh, A. 2006. Assigning the Best Treatment for Increasing Germination of Three Medicinal Plants Seeds: *Rubia tinctourum* L., *Echinacea angustifolia* D.C. and *Myrtus communis* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 22(2): 105-116. (In Persian)**(Journal)**

Marzougui, N., Sabbahi, S., Guasmi, F., Hammami, A., Haddad, M. and Rejeb, S. 2018. Effects of wastewater quality on Henna (*Lawsonia inermis* L.) germination and seedlinggrowth: a case study, Tunisia. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 3(1): 147-157. **(Journal)**

Michel, B.E. and Kaufmann, M.R. 1973. The Osmoticpotential of Polyethylene Glycol 6000. Plant Physiology, 51: 914-916. **(Journal)**

Mohammad, S. and Amusa, N.A. 2003. Effects of sulphuric acid and hot water treatment on seed germination of *Tamarindus indica*. African Journal of Biotechnology, 2: 270-274.**(Journal)**

Mohammadi, G., Khah, E.M., Honarmand, S.J., Shirkhani, A. and Shabani, G. 2012. Effects of Seedhardness Breaking Techniques on Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) Germination. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4(6): 264-273. **(Journal)**

Nabaee, M., Roshandel, P. and Mohammadkhani, A.R. 2013. Effect of chemical treatments, pre-moist chilling, hot and tap water on seed dormancy breaking in *Arctium lappa*, Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 26(2): 217-225. (In Persian)**(Journal)**

Nascimento, W.M. and West, S.H. 1999. Muskmelon transplant production in response to seed priming. HorTechnology, 9: 53-55. **(Journal)**

Neamatollahi, E., Mohammad, B., Chanbari, A., Haydari, M. and Ahmadian, A. 2009. Dose Hydro and Osmo-Priming Improve Fennel (*Foeniculum vulgare*) Seed Germination and Seedlings Growth. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(2): 190-194. **(Journal)**

Obembe, O. and Agboola, D.A. 2008. Seed pretreatments enhance germination in *Occimum gratissimum* (lameaceae). Life Science Journal, 5(1): 46-48. **(Journal)**

Olmez, Z., Yahyaoglu, Z. and Ucler, A.O. 2004. Effect of H_2SO_4, KNO_3 and GA_3 Treatments on Germination of caper (*Capparis ovata Desf*.) seeds. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7 (6):879-882. **(Journal)**

Parera, C.A. and Cantiliff, D.J. 1994. Presowing seed treatment. In: Janick, J. (Eds.) Horticultural Reviews. John Wiley, New York. pp. 109-141. **(Book)**

Parihar, S.S., Dadlani, M., Debarati M. and Sandeep, K.L.A.L. 2016. Seed dormancy, germination and seed storage in henna (*Lawsonia inermis*). Indian Journal of Agricultural Sciences, 86(9): 1201–1207. **(Journal)**

Pons, T.L. 2000. Seed responses to light. In: Fenner M. (Eds.) Seeds: the ecology of regeneration in plant communities. Wallingford.UK: CAB Interational, pp. 237-260. **(Book)**

Rehman, S., Loescher, R.N.J. and Harris, P.J.C. 1999. Dormancy breaking andgermination of *Acacia salicina* Lindl. Seeds. Seed Science and Technologhy, 27: 553-557. **(Journal)**

Rincon-Rosales, R. Culebro-Espinosa, N.R., Gutierrez-Miceli, F.A. and Dendoven, L. 2003. Scarification of seeds of *Acacia angustissima* and its effect on germination, seed science and technology, 31: 301-307. **(Journal)**

Saberi, M. and Tavili, A. 2010. Evaluation defferent priming treatments influences on *Puccinellia distans*germination characteristics. Iranian Journal of Range and Desert Research, 17(1): 51-60. (In Persian)**(Journal)**

Sarihan, E.O., Ipek, A.R.I.F., Khawar, K.M., Atak, M. and Gurbuz, B. 2005. Role of GA_3 and KNO_3 in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L. Pakistan Journal of. Botany, 37(4): 883-887. **(Journal)**

Shah, S.B., Sartaj, L., Ali, F., Shah, S.I.A. and khan, M.T. 2018. Plant extracts are the potential inhibitors of α-amylase: a review. MOJ Bioequivalence and Bioavailability, 5(5):270-273. **(Journal)**

Shuba, A.C., Channnakeshava, B.C., Bhanuprakash, K. and Arvind, K. 2018. Study on seed quality performance and enzymatic activity after dormancy breaking in henna. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(1): 105-108. **(Journal)**

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152–178. **(Journal)**

Suryawanshi, Y.B., Patil, R.B. and Moholkar, N.D. 2001. Study on seed germination procedures in some medicinal plant spicies. Seed Research, 2: 141-144. **(Journal)**

Tavili, A. and Saberi, M. 2010. Effect of Different Treatments on Improvement of SeedGermination and Seedlings Initial Growth Characteristics in*Artemisia sieberi* Boiss. Journal of Range and Watershed Management, Iranian Journal of Natural Resources, 62(4): 515-525. (In Persian)**(Journal)**

Thilakar, S.J. and Rathi, J. 2013. Study on the effect of physical and chemical treatments on breaking the dormancy of *Adenanthera pavonina* L. seeds. Journal of natural product and plant resources, 3(5):55-63. **(Journal)**

Uzen, F. and Aydin, I. 2004. Improwing germination rate of Medicago and Trifolium species. Asian Journal of Plant Science, 3(6):714-717. **(Journal)**

Varghese, J., Silvipriya, K.S., Resmi, S. and Jolly, C.I. 2010. *Lawsonia Inermis* (Henna): A Natural Dye of Various Therapeutic Uses - A Review. Inventi Journals, 1(1): **(Journal)**

Varner, J.E. 1964. Gibberlic acid controlled synthesisof α-amylase in barley endosperm. Plant Physiology. 39:413-415. **(Journal)**

Yamaguchi, S. and Kamia, Y. 2002. Gibberllins and light-stimulated seed germination. Jurnal of plant Growth Regulation, 20: 369-376. **(Journal)**

Zoghi, Z., Azadfar, D. and Kooch, Y. 2011. The Effect of Different Treatments on Seeds Dormancy Breaking and Germination of Caspian Locust (*Gleditschia caspica*) Tree. Annals of Biological Research, 2(5): 400-406. **(Journal)**

Effect of mechanical and chemical treatments on germination characteristic, total phenolic compound and enzyme activity of henna seeds (*Lawsonia inermis* L.)

Abolghasem Hamidi Moghaddam

Received: January 13, 2021 Accepted: May 2, 2021

Abstract

Henna is one of the valuable ornamental and medicinal shrubs that is cultivated in some tropical and subtropical regions of Iran. Its seeds have dormancy and don't germinate rapidly. To investigate the effect of different mechanical and chemical treatments on dormancy and germination characteristics of henna seeds, two separate experiments were conductedbasedon two completely randomized designs with three replications. In the first experiment, various treatments including running water (for 24, 48 and 72 h.), soaking in hot water (90° C, for 150, 300 and 450 sec.), mechanical scarification with sandpaper (for 20 sec.), chemical scarification with concentrated sulfuric acid (98% for 10, 15 and 20 min.), different concentrations of gibberellic acid (GA_3; 250, 500, 750 and 1000 ppm), osmopriming with polyethylene glycol (-8 bar for 72 h), complete darkness and control were tested for breaking seed dormancy. In the second experiment, the most effective treatments of the first experiment along with control were selected, and then α-amylase activity and the amount of total phenolic compounds (TPC) were evaluated in the seeds. Results revealed that seed germination percentage was significantly decreased when incubated in complete darkness. Among other treatments, soaking in running water for 48 h. was more effective and increased the germination percentage up to 94.7%. In the second experiment, results showed that there was a negative and significantcorrelation (r= -0/99) betweentotal phenolic compounds and α-amylase activity. According to the obtained results running water (48 h.) would be suggested as the most efficient treatment to break seed dormancy of Henna.

Key words: Double dormancy; Gibberellic acid; Osmopriming; Scarification; α-amylase activity

How to cite this article

Hamidi Moghaddam, A. 2022. Effect of mechanical and chemical treatments on germination characteristic, total phenolic compound and enzyme activity of henna seeds (*Lawsonia inermis* L.). Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(4): 396-410. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms. 2021.5288

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

*Corresponding author: h_moghaddam@ujiroft.ac.ir