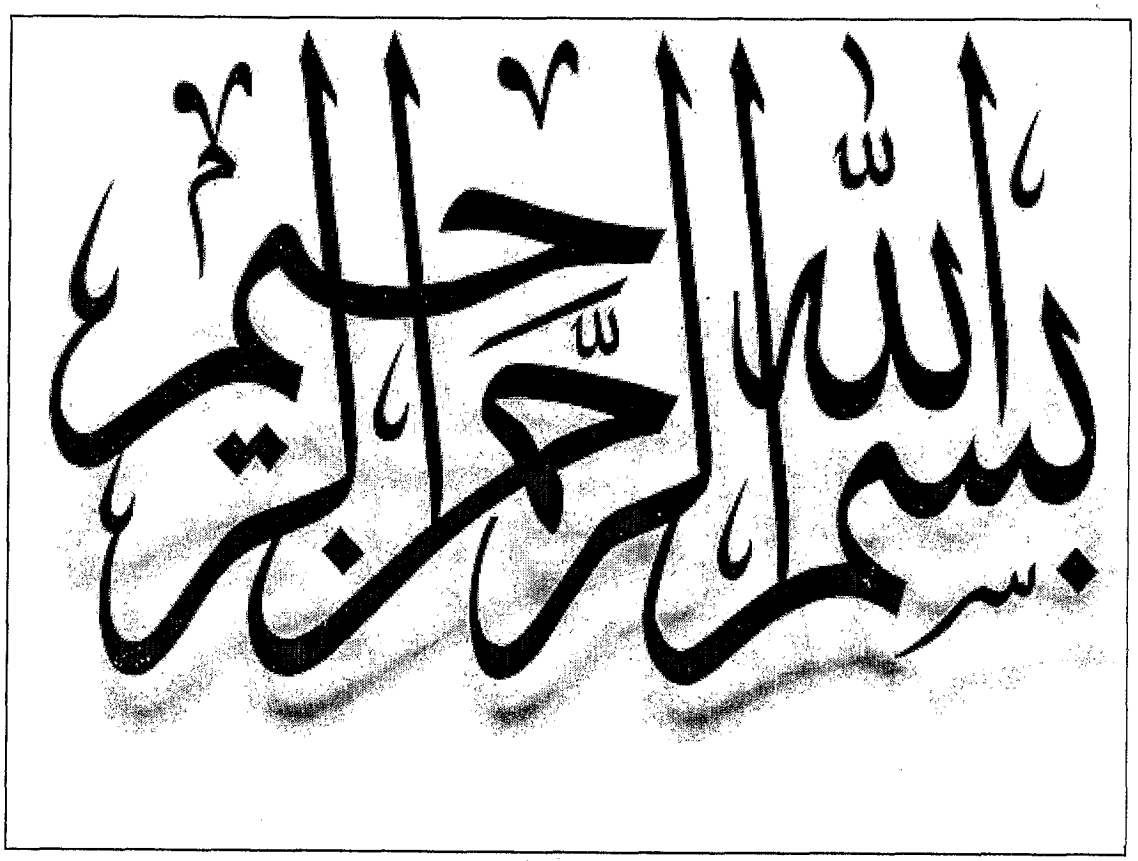

٨١٩٤

دانشگاه تربیت معلم تهران

دانشکده علوم پایه - زیست شناسی

پایان‌نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- علوم گیاهی

(گرایش فیزیولوژی گیاهی)

۱۳۸۵ /۹/ ۱ -

عنوان:

تاثیر تیمار دمایی و هورمون جیبرلیک اسید بر جوانه زنی و رشد متعاقب گیاه خشخاش(*Papaver somniferum* L.)

۱۳۸۵ /۹/ ۱ -

استاد راهنما:

جناب آقای دکتررمضانعلی خاوری نژاد

نگارش:

مرضیه فلاح

۱۳۸۵

۱۱۴۲۶

تقدیم به پدر و مادرم که همواره راهنما و
حامی من در راه علم و دانش بوده اند.

تشکر و قدر دانی

سپاس بیکران خداوند متعال را که مرا توان بخشید تا در راه علم استوار و پابر جا باشم و بتوانم مراحل سخت و پر مشقت علم و دانش را پله پله طی کنم.

در آغاز وظیفه خود می دانم از جناب آقای دکتر خاوری نژاد استاد گرانقدر که راهنمایی این پایان نامه را بعهده گرفتند صمیمانه تشکر کنم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر قهرمانی نژاد مدیر محترم گروه زیست شناسی به خاطر مساعدت در تهیه مواد آزمایشگاهی و همچنین قبول داوری پایان نامه ام کمال تشکر را دارم.

از استاد ارجمند آقای دکتر احمد مجد نماینده محترم تحصیلات تکمیلی که افتخار شاگردی ایشان را داشته ام کمال تشکر را دارم.

مراتب تشکر خود را از سرکار خانم دکتر فرزانه نجفی که در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی اینجانب را از راهنماییهای خود بهره مند فرمودند تقدیم می نمایم.

از دوستان و همکلاسی هایم که مرا در انجام این پژوهش یاری داده اند تشکر و قدردانی می کنم. در پایان خالصانه ترین مراتب سپاس خود را تقدیم خانواده ام می نمایم که با حمایت های بی دریغشان راه تحصیل را برایم هموار نموده اند.

چکیده:

تاثیر تیمار دمایی (۰°C، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۳۰) و GA۳ ($\mu g\ l^{-1}$ ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، و ۱۰۰۰) بر شکستن خواب، جوانه زنی و رشد متعاقب گیاه خشخاش، طی ۲۰ روز دوره رشد مورد بررسی قرارگرفت. نتایج بدست آمده نشان می دهد که دانه گیاه خشخاش در دمای°C ۱۲ بیشترین درصد جوانه زنی ودر دماهای °C ۶ و ۳۰ کمترین درصد جوانه زنی را داشته است.در تیمارGA۳ در غلظت $\mu g\ l^{-1}$ ۱۰۰۰ بیشترین درصد جوانه زنی و در غلظت های $\mu g\ l^{-1}$ ۱۰ و ۵۰ کمترین درصد جوانه زنی مشاهده شده است.در بررسی اثرات دو تیمار ذکر شده بر روی قندهای محلول و نا محلول دانه رست مشخص شد که دماهای پایین تر (°C ۶ ، ۱۲ و ۱۸) و غلظت های بالایGA۳ ($\mu g\ l^{-1}$ ۵۰۰ و ۱۰۰۰) باعث افزایش قند محلول و کاهش قند نا محلول در دانه رست ها می شوند. در بررسی تاثیر دو تیمار ذکر شده در بالا بر رشد متعاقب گیاه مشخص شد که سطوح دمایی (°C ۱۲ و ۱۸) و غلظت $\mu g\ l^{-1}$ ۱۰۰۰ و ۵۰۰ از GA۳موجب افزایش قند نا محلول و کاهش قند محلول و کاهش پروتئین کل می شود.میزان رشد نسبی (RGR)، رشد نسبی برگ (RLGR) و سطح ویژه برگی (SLA) با کم شدن دما و با افزیش سطح GA۳، افزایش می یابند. در سطوح دمایی(°C ۱۲ و۱۸) وغلظت های GA۳($\mu g\ l^{-1}$ ۵۰۰ و۱۰۰۰) که درصد جوانه زنی بیشتر مشاهده شد، میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز نیز در بیشترین مقدار بوده است. در این پژوهش میزان رنگیزه های کلروفیل،کاروتنوئید و گزانتوفیل در اثر این تیمارها دستخوش تغییر نشدند.

علائم اختصاری:

GA3: Gibberellic acid	جیبرلیک اسید
RGR: Relative Growth Rate	میزان رشد نسبی
RLGR: Relative Leaf Growth Ratio	نسبت وزن برگی
SLA: Specific Leaf Area	سطح ویژه ی برگی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
شعبه مدارک

فهرست عناوین | شماره صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تاریخچه ۳
۱-۲- مشخصات بذر ۳
۱-۳- مرحله جوانه زنی ۴
۱-۴- مشخصات دارویی ۴
۱-۵- آلکالوئید های خشخاش ۵
۱-۵-۱آلکالوئید مورفین ۵
۱-۶- هدف پژوهش ۵
۱-۷- خواب دانه ۶
۱-۷-۱- انواع خواب در دانه ۷
۱-۱-۷-۱- وجود پوشش های جنینی ۷
۱-۲-۷-۱- خواب جنینی ۸
۱-۷-۱-۲- روش های بر طرف کردن خواب دانه ۹
۱-۷-۲- خواب ناشی از پوشش های جنین ۹
۱-۷-۲-۲-- خواب ناشی از جنین های نارس ۹
۱-۸- نقش دما در جوانه زنی ۹
۱-۸-۱- استراتیفیکاسیون ۱۰
۱-۹- تاثیر هورمونGA۳ بر جوانه زنی ۱۱
۱-۱۰- تاثیر توام هورمون GA۳ و سرما بر جوانه زنی ۱۲
۱-۱۱-تاثیر هورمونGA۳ بر رشد ونمو گیاه ۱۲

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱-مشخصات گیاه شناسی گیاه خشخاش ۱۴
۲-۲- ابزار مورد نیاز ۱۵
۲-۳-مواد شیمیایی مورد نیاز ۱۶
۲-۴- تیمار جوانه زنی ۱۸
۲-۵-نحوه کاشت و نگهداری گیاه ۱۸
۲-۶-خصوصیات اتاق کشت ۱۹
۲-۷- آنالیز رشد ۱۹
۲-۷-۱-سطح ویژه برگی(SLA) ۲۰
۲-۷-۲-میزان رشد نسبی(RGR) ۲۰
۲-۷-۳-نسبت وزن برگی(RLGR) ۲۱
۲-۸- سنجش رنگیره های فتوسنتزی ۲۱

۲-۸-۱-سنجش کلروفیل a و b ۲۱
۲-۸-۲- سنجش کاروتنوئید ها ۲۲
۲-۹- سنجش مقدار پروتئین ۲۴
۲-۱۰- سنجش کربوهیدرات ها ۲۶
۲-۱۱- سنجش میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ۲۸
۲-۱۲- سنجش آلکالوئید مورفین ۳۰

فصل سوم:نتایج

۳-۱-نتایج مربوط به درصد جوانه زنی ۳۲
۳-۳-نتایج مربوط به آنالیز رنگیزه های فتوسنتزی ۳۲
۳-۳-نتایج مربوط به آنالیز بیوشیمیایی ۳۳
۳-۳-۱-غلظت قندهای محلول ونا محلول دانه رست ۳۳
۳-۳-۲- غلظت قندهای محلول ونا محلول برگ ۳۴
۳-۳-۳- غلظت پروتئین دانه رست ۳۵
۳-۴-نتایج مربوط به آنالیز رشد ۳۵
۳-۵- نتایج مربوط به فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ۳۶
جدول ها ۳۸
نمودار ها ۴۴

فصل چهارم:بحث و تفسیر

۴-۱-تاثیر دما وGA۳ بر غلظت قند های محلول و نا محلول دانه رست ۵۷
۴-۲-تاثیر دما وGA۳ بر درصد جوانه زنی ۵۸
۴-۳-تاثیر دما وGA۳ بر میزان فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز ۵۸
۴-۴- تاثیر دما وGA۳ بر غلظت رنگیزه ها ۵۹
۴-۵- تاثیر دما وGA۳ بر غلظت قند های محلول و نا محلول برگ ۵۹
۴-۶- تاثیر دما وGA۳ بر غلظت پروتئین برگ ۶۰
۴-۷- تاثیر دما وGA۳ بر آنالیز رشد ۶۲

فصل پنجم: منابع ۶۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تاریخچه

خشخاش یکی از معدود گونه‌هایی است که از زمان‌های ما قبل تاریخ تاکنون کشت شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه برای غارنشینانی که در سرزمین‌های اسپانیا، فرانسه، آلمان و مجارستان در ۴ الی ۵ هزار سال قبل از میلاد مسیح زندگی می‌کردند، شناخته شده بود. خشخاش در حدود ۳ الی ۶ هزار سال قبل از میلاد توسط سومریان، بابلیان و آشوریان هم کشت می‌شده است. بر روی لوح‌های رسی سومریان، روش تولید عصاره خشخاش توضیح داده شده است (Jeno, 1988)

مشخصات بذر *Papaver somniferum*:

دانه ها باریک یا کمی پهن وکلیه ای شکل هستند در حدود ۱ میلی متر طول و۶ میلی متر پهنا دارند وسطح خارجی شان طرح لانه زنبوری دارد(Roder,1960). رنگ دانه خاکستری می باشد.رنگ دانه ها ممکن است در درون یک کپسول متنوع باشد (Shijifsma et al., 1960)

پوشش دانه شامل ۶ لایه ی سلولی است که عبارتند از:

۱- اپیدرم بیرونی با یک کوتیکول مومی.

۲- لایه کریستالین که شامل کریستال اگزالات کلسیم است.

۳- لایه فیبری که شامل سلول های مخروطی با دیواره ی سلولزی ضخیم است.

۴- یک لایه پارانشیمی با سلول هایی با دیواره ی نازک.

۵- یک لایه با سلول های رتیکولی با دیواره ی ضخیم و پروتوپلاسمی غنی از رنگیزه.

۶- یک لایه پارانشیمی خیلی نازک که از پوشش درونی منشا گرفته است.

دانه ی *Papaver somniferum* در تقسیم بندی خواب دانه، دارای خواب دمایی (thermo dormancy) می باشد و از طریق استراتیفیکاسیون شکسته می شود.

مرحله جوانه زنی دانه ی خشخاش *Papaver somniferum*:

جوانه زنی دانه ی *Papaver somniferum* از پاره شدن پوسته ی دانه تا ظهور اولین برگها می باشد و تحت شرایط مطلوب ،این مرحله ۱۵-۲۰ روز طول می کشد که بعد از این مدت دانه رست ها در سطح خاک ظاهر می شوند.(Bernath & Dones 1978).

مشخصات دارویی

تمام گیاهان تیره Papaveraceae شیرابه‌دار هستند و تولید یک شیره آبکی زرد یا قرمز می‌کنند. ۶ آلکالوئید که به طور طبیعی به مقدار زیاد در این گیاه وجود دارد عبارتند از: مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین، نارسنین و نارکوتین. به این۶ آلکالوئید" مورفینان" ها گفته می شود (Weid et al., 2004).

از بین مورفینان ها همه به جز تبائین، خاصیت دردکشی، ضد اسهال، ضد سرفه، دندان‌درد، سرماخوردگی دارند و از زمان باستان مورد استفاده قرار می‌گرفتند. تبائین خاصیت دردکشی ندارد اما برای تولید آنالوگ‌های مورفین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مورفین، کدئین و تبائین تحت کنترل بین‌المللی می‌باشند و در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند(Morimoto et al., 2001).

حدود ۲۰ آلکالوئید در خشخاش وجود دارد که تا به امروز دارای اهمیت کم یا بدون اهمیت از لحاظ اقتصادی یا پزشکی هستند اما آنها مستقیما از شیره خشخاش گرفته نمی‌شوند بلکه حاصل تبدیل مورفین، کدئین و تبائین هستند(Weid et al., 2004).

آلکالوئید های خشخاش

آلکالوئید های خشخاش از مشتقات بنزو ایزوکوئینولین می باشند و در ساختارشان دارای حلقه ی B آروماتیک هستند. ۵ آنزیم در تولید مورفینان ها نقش دارند. گزارش شده است که جایگاه تجمع آنزیم های سازنده آلکالوئید های مورفینان در نوک ریشه، دایره محیطیه ی

استوانه مرکزی و در سلول های پارانشیم بشره ی ریشه می باشد. جایگیری تخصصی آنزیم ها یک ارتباط منطقی در مورد توزیع فضایی - مکانی بیو سنتز آلکالوئید های خشخاش را فراهم می کند که آلکالوئید های خشخاش در سلول های ترشحی درونی تخصص یافته ای که لوله های شیرابه ای نا میده می شود تجمع می یابند. شیرابه ها در نوک ریشه تجمع نمی یابند. آلکالوئید های مورفینان هم در ریشه و هم در بخش های هوایی گیاه یافت می شود و مخصوصاً درون فولیکول های درون شیرابه ای تجمع می یابند(Weid et al., 2004).

آلکالوئید مورفین

مورفین مهم ترین آلکالوئید خشخاش از لحاظ مقدار است که در پزشکی دارای اهمیت بسیار می‌باشد. ساختار مورفین دارای یک حلقه اتری اضافه است.

وجود مورفین در آلکالوئیدهای خشخاش در قسمت مرطوب شیره خشخاش (شیرابه ها) می‌باشد. این آلکالوئید مختص Papaveracea است که با نام علمی (۵- آلفا و ۶ آلفا دی هیدرو-۴- اکسپوکسی- ۱۷- متیل مورفینان- ۳ و بی- دی ال و نام)- ۷ و ۸ ونام تجاری دی‌کوتین، دورومورف، مورفین به وزن مولکولی ۲۸۵/۳۴ مشخص می‌شود.

هدف پژو هش

گیاه خشخاش در اواخر پاییز کشت می شود و در اوایل بهار جوانه می زند پس از گذراندن یک دوره سرمایی، خواب دانه شکسته شده و جوانه می زند(Jeno, 1998). همچنین ثابت شده که هورمون جیبرلیک اسید، جوانه زنی را در دانه های خفته تسریع می کند. (Bewley & Black, 1982. and Villiers, 1982). هدف از این پژوهش بررسی دمای بهینه و غلظت بهینه جیبرلیک اسید ونیز بررسی اثر بر همکنش آنها در شکستن خواب دانه و جوانه زنی و اثرات تیمار اعمال شده بر روی رشد رویشی گیاه و میزان تولیدآلکالوئید مورفین می باشد.

خواب دانه

دانه‌های بسیاری از گونه‌های گیاهی پس از تشکیل وارد یک دوره توقف تکوینی که اصطلاحاً خواب نامیده می‌شود، می‌گردند. خواب دانه به عنوان یک استراتژی برای اجتناب از جوانه‌زنی تحت شرایطی که بقا دانه رست کم می‌باشد در نظر گرفته می‌شود و نیز پاسخی به شرایط محیط بیرونی می‌باشد که در طبیعت توسط یک اتفاق خاص محیطی شکسته می‌شود.(Hartman et al.,1997).

در یک تعریف کلی خواب را به عنوان مهار اعمال شده بر تداوم فرآیندهای رشدی در مراحل مختلف تکوینی گیاه دانسته‌اند که این فرآیند می‌تواند همراه با تغییرات مورفولوژیکی یا بدون آن صورت پذیرد. خواب را نه فقط به عنوان تعلیق موقتی رشد در ساختارهای دارای بخشهای مریستمی (Lang et al.,1987) تعریف کرده‌اند، بلکه خواب شامل تغییرات پویایی در رشد پریموردیوم ها برای تشکیل اندامهای ویژه خواب قبل ازتعلیق موقتی رشد می‌باشد(Okubo,2000).

بقای گونه‌های گیاهان دانه دار نیازمند رویش دانه در شرایط مساعد زمانی و مکانی است. در گونه‌هایی که تعداد قابل ملاحظه‌ای دانه تولید می کنند، رویش تعداد کمی از این دانه‌ها میتواند بقای این گونه‌ها را تضمین کند. این در حالتی است که در بقیه گونه‌ها، جوانه‌زنی در شرایط نا مطلوب توسط یک مکانیسم که بطور معمول خواب(dormancy) نامیده می‌شود ممانعت میگردد. بنابراین خواب بذر را می‌توان ناتوانی جنین در جوانه‌زنی به دلیل برخی موانع درونی که مانع از خروج ریشه چه در شرایط مساعد می‌شوند دانست (Black et al.,1987).

دانه ی در حال خواب نیاز به پیش‌تیمارهایی برای غلبه بر خواب دارد. دانه‌هایی که پیش‌تیمار مناسب نداشته باشند، ممکن است نتوانند بر خواب غلبه کنند و در پی آن احتمال جوانه‌زنی هم پایین می آید. هدف از پیش‌تیمار هم ایجاد اطمینان از اینکه دانه‌ها جوانه

خواهند زد و هم اینکه جوانه‌زنی سریع و یک‌شکل خواهد بود، می‌باشد. پیش‌تیمار معمولا اندکی قبل از کاشتن دانه صورت می‌گیرد(Leadem ,1997).

انواع خواب در دانه‌ها:

بطور کلی خواب دانه را ناشی از دو عامل میدانند: وجود پوشش های جنینی اعم از پوست دانه یا سایر پوشش ها همچون اندوکارپ و خواب مربوط به خود جنین(Bradbeer,1988).

وجود پوشش های جنینی:

این پوشش ها از تبادل گازها بین جنین با محیط اطراف یا از جذب آب توسط جنین ممانعت می کنند. برخی از دانه‌ها در حالی که نسبت به اکسیژن نفوذپذیرند، ممکن است نسبت به دی اکسیدکربن نفوذناپذیر باشند. بنابراین دی اکسیدکربن تنفسی انباشته شده در درون پوست دانه و در پیرامون جنین از رویش دانه ممانعت می‌کند (Bewely and Black,1994). دانه‌های سخت مثل دانه‌های متعلق به خانواده بقولات (*Fabaceae*) قدرت آبنوشی (imbibition) را ندارند که این حالت ناشی از غیر قابل نفوذ بودن پوشش دانه نسبت به آب است. این پوشش ها همچنین می‌توانند با ایجاد محدودیت های مکانیکی مانع رشد جنین شوند(Bradbeer,1988). بعنوان مثال خواب دانه در گیاه کاهو ناشی از پوشش های سخت جنین است که علیرغم تراوایی نسبت به آب و گازها به دلایل مکانیکی مانع رشد جنین می‌شوند(Bewely and Black,1994) یا در موارد دیگر به دلیل دارا بودن مواد بازدارنده، مانع از رویش جنین هایی شوند که در مرحله خواب نیستند. بعنوان مثال چنین وضعیتی در گیاه *Prunus domestica* گزارش شده است (Bewely and Black,1994).

خواب جنینی:

به طور عمده خواب مربوط به جنین بر دو نوع است(Noggle and Fritz,1983).

الف-خواب ناشی از جنین های نارس(immature embryo):

در این حالت رشد و نمو مورفولوژیکی جنین به هنگام بلوغ دانه(seed maturity) به طور کامل روی نمی دهد.از این رو لازم است که جنین طی یک دوره خواب به نمو ادامه داده تا بعدا بتواند رویش موفقیت آمیزی انجام دهد. این حالت که به آن خواب فیزیولوژیکی نیز گفته می‌شود (Copeland,1988) یکی از متداول ترین دلایل خواب جنینی است. این نوع خواب می‌تواند در سرتاسر محور جنینی، در اپی کوتیل ویا فقط در ریشه چه وجود داشته باشد. مثالی از این نوع خواب در گیاه *Avena fatua* گزارش شده است (Bewely and Black,1994).

ب-ناتوانی جنین در شکستن ذخایر غذایی(metabolic failure):

دراین حالت جنین ها از لحاظ مورفولوژیکی، ظاهری کاملاً تکوین یافته دارند ولی به دلایلی قادر به رویش در شرایط مساعد نیستند. به طور عمده این نوع خواب را ناشی از عدم توانایی جنین در شکستن ذخایر غذایی دانه شامل ذخایر خود جنین یا بخش های غیر جنینی دانه مثل مگاگامتوفیت یا اندوسپرم می دانند. شکستن ذخایر غذایی دانه در این حالت نیازمند سنتز و یا فعال شدن یکسری از آنزیم ها است.

در مواردی دیگر کمبود تنظیم کننده‌های رشد همچون اسید جیبرلیک (GA) یا وجود ممانعت کننده‌هایی مثل اسیدآبسیزیک (ABA) درجنین را از عوامل خواب جنینی در نظر می‌گیرند(Bradbeer,1988). بعنوان مثال در گیاه فندق مشخص شده است که اضافه کردن اسید جیبرلیک سبب برطرف شدن خواب در این دانه‌ها می‌شود(Williams *et al.*,1974).