نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۲۷۸-۲۶۹

Journal of Plant Protection
Vol. 32, No. 2, Summer 2018, P. 269-278

نقش دما و نور بر جوانه‌زنی و کمون ثانویه بذر کلزای (*Brassica napus* L.) خودرو

علی شایان فر[۱]- فرشید قادری فر[۲*]- رحمت الله بهمرام[۳]- افشین سلطانی[٤]- حمیدرضا صادقی پور[٥]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۸

چکیده

بذرهای کلزا پس از ریزش در بانک بذر خاک، کمون ثانویه در آنها القا می‌شود. در فصل زراعی بعد با رفع کمون آنها، تهدیدی برای گیاهان زراعی بعد درنتیجه تظاهر کلزای خودرو خواهند بود. در این مطالعه بذرهای با سطوح کمون ثانویه کم (Gor-H-4 و Gor-O-16)، متوسط (زرفام و RGS003) و زیاد (Gor-O-4 و Gor-O-6) کلزا ابتدا در معرض شرایط القای کمون ثانویه و سپس تحت تیمارهای مختلف دما و نور قرار گرفتند. پس از القای کمون ثانویه، حداکثر درصد جوانه‌زنی در بذرهای با کمون کم در دمای ثابت در تاریکی و نور ثبت گردید و کاهش درصد کمون ثانویه در بذرهای با سطوح کمون متوسط با افزایش دما از ۲۰ به ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی مشاهده شد که روند کاهشی بیشتری را در تیمار نور نشان داد. در بذرهای با سطوح کمون بالا، روند کاهشی مشابه با بذر کمون متوسط در تاریکی و نور بود، اما در بذر با کمون بالا (Gor-O-6) بیشتر ناشی از پاسخ آنها به افزایش دما و در دیگری (Gor-O-4) بیشتر متأثر از پاسخ به نور بود. رفع کامل کمون ثانویه بذرهای با کمون بالا، در تیمار ۳-۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی بیانگر جایگزین شدن دمای متناوب با نیاز نوری آنها بود، اما عدم رفع کامل کمون در تیمار ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان دهنده رفع کمون برخی از بذرها توسط دمای متناوب و نیاز نوری کسری از بذرها به نور است. نتایج حاکی از فتوبلاستیک شدن بذرهای کلزا پس از القای کمون است که بر نقش فیتوکروم‌ها بر رفع کمون ثانویه بذر کلزا اشاره دارد.

واژه‌های کلیدی: بانک بذر خاک، فیتوکروم‌ها، علف هرز

مقدمه

بذرها تحت تأثیر عوامل مختلفی کمون در آنها القا می‌شود. دو نوع کمون در بذرهای شناخته شده است که عبارتند از کمون اولیه که به بذرها در زمانی که بر روی گیاه مادری قرار دارند، القا می‌شود و کمون ثانویه که پس از جدا شدن بذر از گیاه مادری و قرارگیری در شرایط محیطی در آنها القا می‌شود (۴). در رابطه با عوامل محیطی تأثیرگذار بر کمون ثانویه، شرایط محیطی مختلفی مشخص شده است که تأثیر می‌گذارند. در علف‌های هرز موجود در بانک بذر خاک دو سناریو در رابطه با اثر عوامل محیطی بر کمون آنها وجود دارد که عبارتند از: الف) آنهایی که درجه کمون هر بذر در جمعیت را تغییر می‌دهند (مانند دما و اثرمتقابل آن با شرایط آبی خاک)، و ب) آنهایی که موانع پایانی برای جوانه‌زنی بذرهایی که درجه کمون آنها به میزان زیادی کاهش پیدا کرده است، را حذف می‌کنند (مانند نور، دماهای متناوب و غلظت نیترات) (۵).

بذرهای موجود در بانک بذر خاک با سطوح کمون متفاوت، زمان تظاهر آنها به میزان زیادی به تغییرات پویای فصلی بستگی دارد (۵). دما یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در تظاهر گیاهان علف هرز است (۲۱ و ۴۶). مشخص شده است که محدوده دماها و پتانسیل‌های آب مجاز برای جوانه‌زنی در جمعیت‌های بذری دارای کمون، ناچیز است که با رفع کمون، بذرها در طیف‌های متنوعی از دما و پتانسیل آب جوانه‌زنی می‌کنند (۴)، اما از طرف دیگر، تیمار بذرهای گیاهان تاج خروس *Amaranthus palmeri* و علف هفت‌بند *Polygonum aviculare* در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، سبب القای کمون ثانویه بذرها شده است (۳ و ۲۸). در کنار دمای ثابت، دمای متناوب بر تعدادی از فرآیندهای مرتبط با جوانه‌زنی تأثیر دارد که می‌توان به نفوذپذیری غشا و آنزیم‌های سیتوسلی غشا اشاره کرد (۲۸ و ۵۲). مشخص شده است که دما از سه راه جوانه‌زنی را کنترل می‌کند، ۱) تعیین ظرفیت و درصد جوانه‌زنی، ۲) کاهش کمون اولیه و یا ثانویه و ۳) القای کمون ثانویه (۹). دما به عنوان یک دریچه موقتی برای

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: farshidghaderifar@yahoo.com)
۳- استادیار مؤسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان
۵- دانشیار گروه زیست، دانشگاه گلستان
DOI: 10.22067/jpp.v32i2.64985

جوانه‌زنی محسوب می‌شوند و بر روی میزان درصد کمون بذرها و حساسیت به سیگنال‌های محیطی از جمله نور و نیترات تأثیر می گذارند (۱۱ و ۱۴)، در صورتی‌که این سیگنال‌ها دریافت نشوند، بذرها دوباره کمون را کسب خواهند کرد و به کمون ثانویه وارد خواهند شد و تا زمانی‌که بذرها در شرایط محیطی مناسب قرار نگیرند، کمون آنها رفع نخواهد شد (۲۰).

گزارش شده است که دماهای ثابت و متناوب با عامل محیطی دیگری به نام نور اثر متقابل دارند که بر جوانه‌زنی تأثیر می‌گذارند (۱۳، ۳۰ و ۵۱). جوانه‌زنی بذرهای نیازمند نور را مرتبط به فعالیت فیتوکروم دانسته‌اند که برای نخستین بار توسط بورث‌ویک و همکاران (۱۹۵۲) به آن اشاره شده است (۱۰). نیاز جوانه‌زنی بذر گیاهان مختلف متفاوت است به‌گونه‌ای که برخی از گیاهان برای جوانه‌زنی به دمای ثابت و نور، برخی به دمای متناوب همراه با نور یا تاریکی نیاز دارند (۱). در بذرهای نیازمند به نور، شکست کمون به شرایط کمون بذرها، تیمار نوری (ترکیب طیف نوری، شدت تابش و مدت زمان) و شرایط محیطی دیگر بستگی دارد که درنهایت می‌تواند به جوانه‌زنی یا عدم جوانه‌زنی یا عدم تأثیرپذیری از نور در بذر منجر شود (۱۱). بذرهای گیاه سلمه‌تره *Chenopodium bonus-henricus* که در محلول‌های پتانسیل پایین آب قرارگرفتند، توانایی خود را برای جوانه زنی در تاریکی از دست دادند (۳۲)، بلعکس ممانعت از جوانه‌زنی ناشی از قرارگیری طولانی مدت در نورکه نسبت بالایی از نور قرمز دور دارد، سبب تحریک نیاز نوری ثانویه در بذرها می‌شود (۱۸).

گیاه کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی در دنیا محسوب می‌شود. بذرهای این گیاه در مرحله برداشت، به میزان زیادی مستعد ریزش هستند. تخمین زده شده است که میانگین ۳۰۰ تا ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار خلا عملکرد یا معادل ۱۰۰۰۰ بذر بر مترمربع ریزش می‌کنند (۳۶ و ۴۳). به مانند بسیاری از گیاهان اهلی شده، این گیاه کمون اولیه اندکی دارد و بیشتر بذرهای ریزش یافته در بانک بذر خاک می‌توانند جوانه‌زنی کنند، اما برخی از بذرها در نتیجه قرارگیری در شرایط خشک و تاریک خاک ماه‌های تابستان، کمون ثانویه در آنها القا می‌شود و بذرها می‌توانند برای مدت حتی ۱۰ سال در خاک زنده باقی بمانند (۳۶).

با شروع فصل زراعی بعد، برخی از بذرهای کلزای موجود در بانک بذر خاک، کمون ثانویه آنها رفع می‌شود و به‌صورت کلزای خودرو در مزرعه نمایان می‌شوند. کلزای خودرو می‌تواند مشکلات عدیده‌ای را ایجاد نماید که از جمله می‌توان به علف هرز بودن آن در محصول بعد (۲)، انتقال ژن‌های هدف از گیاه زراعی به سایر گیاهان خویشاوند و علف‌های هرز طی گرده‌افشانی (۴۹)، کاهش کیفیت و عملکرد بذر تولیدی (۴۳) و در نهایت کاهش خلوص بذر (۱۲) اشاره کرد. بنابراین در این مطالعه دو عامل مهم دخیل در رابطه با کمون ثانویه بذر کلزا شامل دما (ثابت و متناوب) و نور بررسی شد. فرضیه مطالعه این است که بذرهای کلزای موجود در بانک بذر خاک می توانند پس از القای کمون ثانویه با درجه حرارت‌های مختلف اعم از کم، بالا و متناوب مواجه شوند، همچنین قرارگیری بذرها در سطوح مختلف خاک، می‌تواند تاثیر نور و یا تاریکی در تغییرات دمایی طی شبانه روز را بیشتر آشکار سازد، لذا در این مطالعه به ارزیابی عوامل محیطی مذکور بر روی پاسخ جوانه‌زنی بذرهای کلزا با سطح کمون متفاوت در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شد تا بتوان فهم مناسبی را از پاسخ جوانه‌زنی و کمون ثانویه بذر کلزا بدست آورد و از این اطلاعات در مدیریت پاسخ‌های فیزیولوژیک بذر کلزا در مزرعه استفاده کرد و در کنار اطلاعات حاصل از مزرعه، بتوان با مشکل ناشی از کلزای خودرو مقابله کرد.

مواد و روش‌ها

براساس آزمایش‌های قبلی بر روی تنوع ژنتیکی کمون ثانویه بذرهای ۴۶ لاین و رقم کلزا، جمعاً تعداد شش لاین و رقم کلزا با سطح کمون ثانویه متفاوت انتخاب شدند (۵۰). بذرهای مورد مطالعه شامل دو لاین به نام‌هایGor-H-4 و Gor-O-16 با کمون کم، دو رقم به نام‌های RGS003، زرفام با کمون متوسط و همچنین از دو لاین Gor-O-4 و Gor-O-6 با کمون زیاد استفاده شد (۵۰). بذرهای این شش لاین و رقم از مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی استان گلستان تهیه شدند. قبل از شروع آزمایش، بذرهای خالی یا بذرهای با نشانه‌های بیماری از نمونه‌ها با استفاده از بینوکولار حذف شدند و تنها بذرهای سالم برای این مطالعه استفاده شدند. جهت بررسی کمون اولیه بذرهای لاین‌ها و رقم‌های کلزا، تحت آزمون جوانه‌زنی استاندارد اولیه قرار گرفتند. بدین منظور تعداد ۳ تکرار ۵۰ بذری از هر لاین و یا رقم کلزا در ظرف‌های پتری ۱۵ سانتی‌متری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی درون انکوباتور قرار داده شدند و جوانه‌زنی نهایی آنها پس از هشت روز یادداشت شد. بذرهایی جوانه زده محسوب شدندکه ریشه‌چه آنها حداقل ۲ میلی‌لیتر بود (۴۹).

روش القای کمون ثانویه در لاین‌ها و ارقام کلزا

جهت القای کمون ثانویه در بذرهای کلزا، از روش گروبر و همکاران، ۲۰۰۴ (۲۴) استفاده شد. مقدار ۳۵۴/۳۷ گرم پلی اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ در یک لیتر آب مقطر (پتانسیل ۱۵- بار)، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد حل شد. سه تکرار یکصد بذری به ازای هر نمونه در ظرف‌های پتری ۱۰سانتی‌متری با دولایه کاغذ صافی قرار داده و ۸ میلی‌لیتر از این محلول به هر پتری اضافه شد. این مرحله در تاریکی و نور سبز (۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر) انجام شد. سپس ظرف‌های پتری به جعبه‌ای مهر و موم شده به انکوباتور با دمای کنترل شده ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۱۴ روز منتقل گردید. پس از ۱۴ روز از

القای کمون ثانویه، سطح بذرها با آب مقطر شسته و به ظرف‌های پتری جدید با دولایه کاغذ صافی حاوی ۶ میلی‌لیتر آب مقطر در تاریکی و نور سبز منتقل شدند.

پس از انتقال بذرها به بستر جوانه‌زنی استاندارد، در مرحله بعد در تیمارهای مختلف دمای ثابت یا متناوب همراه با نور و یا تاریکی قرار گرفتند که در زیر به آن اشاره شده است.

روش‌های تیمار دما و نور/تاریکی

سه تکرار ۱۰۰ بذری از بذرهای مذکور، پس از القای کمون ثانویه که در بالا به آن اشاره شد، تحت تیمارهای دمایی مختلف۲۰ (تاریکی)، ۲۰ (نور)، ۲۵ (تاریکی)، ۲۵ (نور)،۳۰ (تاریکی)، ۳۰ (نور)، ۳-۳۰ (تاریکی، (۱۲/۱۲ ساعت))، ۳-۳۰ (تاریکی- نور (۱۲/۱۲ساعت))، ۲۰-۳۰ (تاریکی، (۱۲/۱۲ ساعت)) و ۲۰-۳۰ (تاریکی- نور (۱۲/۱۲ ساعت)) درجه سانتی‌گراد، روی دو لایه کاغذ صافی ۹ سانتی‌متری در ظرف‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری قرار گرفتند و ۶ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ظرف پتری اضافه شدند. در جهت محاسبه میزان کمون ثانویه بذرهای جوانه نزده پس از اعمال تیمارهای مختلف دما و نور یا تاریکی، در معرض دمای متناوب ۳۰ و ۳ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب نور/ تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت)) قرار داده شدند. قرارگیری بذرها در این تیمار دمایی- نوری سبب رفع کمون ثانویه بذرهای باقی مانده شد و بذرهای جوانه‌زده در این مرحله به عنوان بذرهای دارای کمون ثانویه محسوب شدند. لازم به‌ذکر است تیمار ۳-۳۰ درجه سانتی‌گراد (تاریکی-نور (۱۲/۱۲ ساعت)) براساس مطالعات قبل به عنوان تیمار رفع کمون در کلزا مشخص گردیده است (۲۴) و در این مطالعه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد تا دیگر شرایط نور و دمایی با آن مقایسه شود.

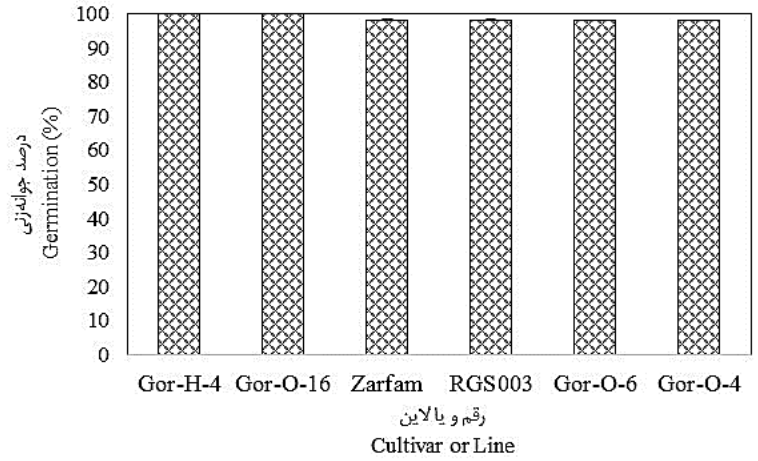
روش‌های آماری

داده‌های درصدهای جوانه‌زنی، کمون ثانویه در تیمارهای مختلف دمای ثابت و یا متناوب به همراه نور و یا تاریکی با نرم افزار R آنالیز شدند. جهت آنالیز داده‌ها از پکیج *agricolae ()* استفاده شد. داده‌ها با *Shapiro.test* در نرم افزار R، نرمال بودن آن‌ها بررسی شد. رسم شکل‌ها با نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها براساس خطای استاندارد مشخص شد.

نتایج

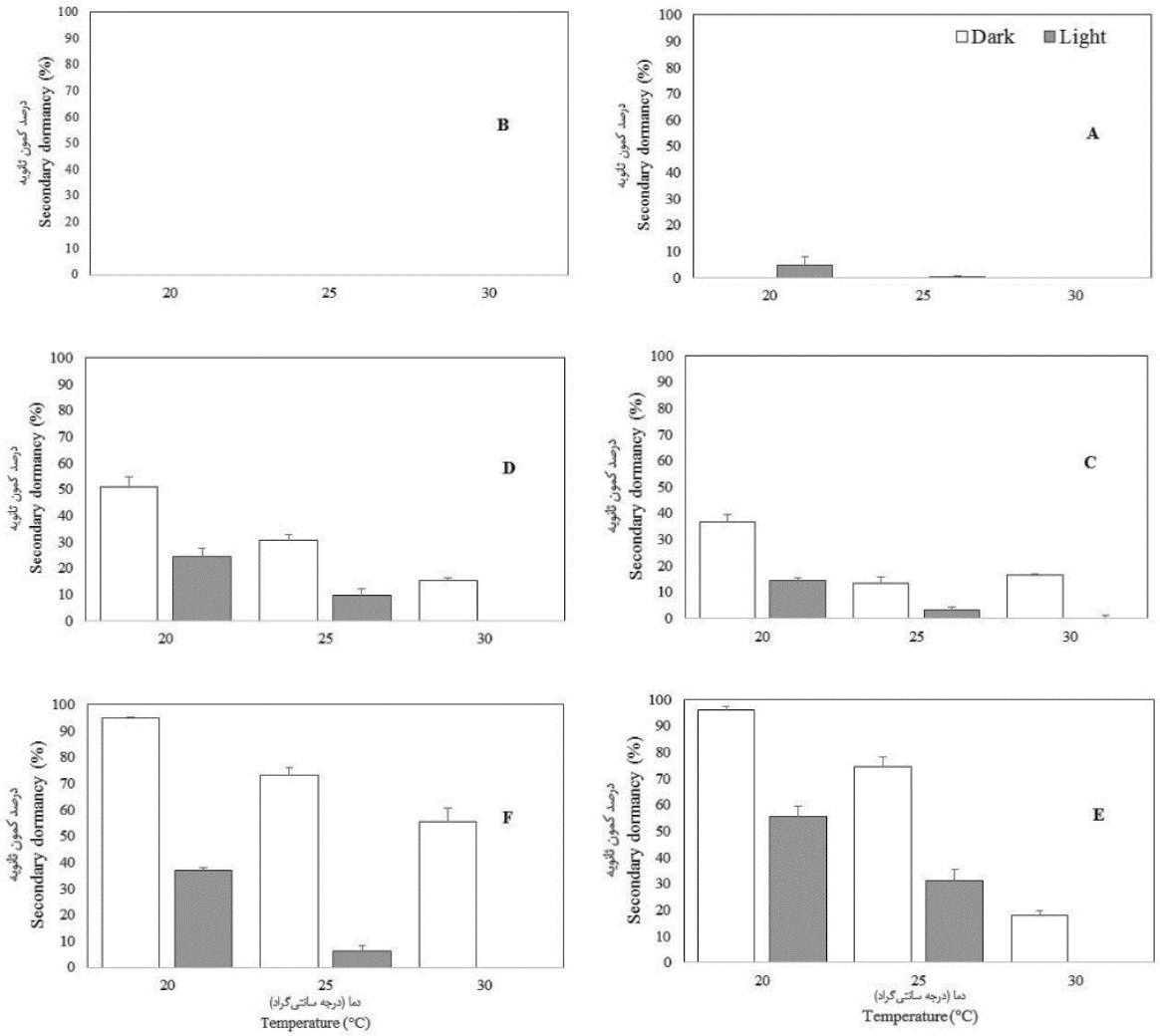
میانگین جوانه‌زنی اولیه پیش از القای کمون ثانویه در تمامی بذرهای رقم‌ها و لاین‌های کلزا مورد مطالعه بالای ۹۸ درصد بود که بیانگر عدم کمون اولیه در تمامی بذرهای کلزای مورد بررسی در این مطالعه بود (شکل ۱).

در این مطالعه پاسخ‌های جوانه‌زنی متفاوتی را از شش بذر کلزا پس از القا کمون و قرارگیری در معرض دماهای ثابت یا متناوب و به همراه نور یا تاریکی مشاهده شد که بیانگر رفتارجوانه‌زنی متفاوت آنها به تیمارهای دمایی و نوری بعد از شرایط القای کمون ثانویه بود (شکل ۲ و ۳)، همچنین برای درک بهتر و ساده‌تر واکنش کمون ثانویه ارقام یا لاین‌های کلزا با سطوح مختلف کمون به تیمارهای مختلف دمایی و نوری، دیاگرامی در شکل ۴ رسم شد.



شکل ۱- درصد جوانه‌زنی اولیه بذرها یا ارقام کلزا

Figure 1- Seed germination percentage of rapeseed lines or cultivars



شکل ۲- درصد کمون ثانویه در لاین‌ها و ارقام مختلف کلزا در شرایط نور یا تاریکی در دمای ثابت. تفاوت تیمارهای مختلف با خطای استاندارد نشان داده شده است. پاسخ کمون ثانویه بذرهای دو لاین با کمون کم (A) Gor-H-4، (B) Gor-O-16، دو رقم با کمون متوسط (C) زرفام، (D) RGS003 و دو لاین با کمون بالا (E) Gor-O-6 و (F) Gor-O-4 ارائه شده است

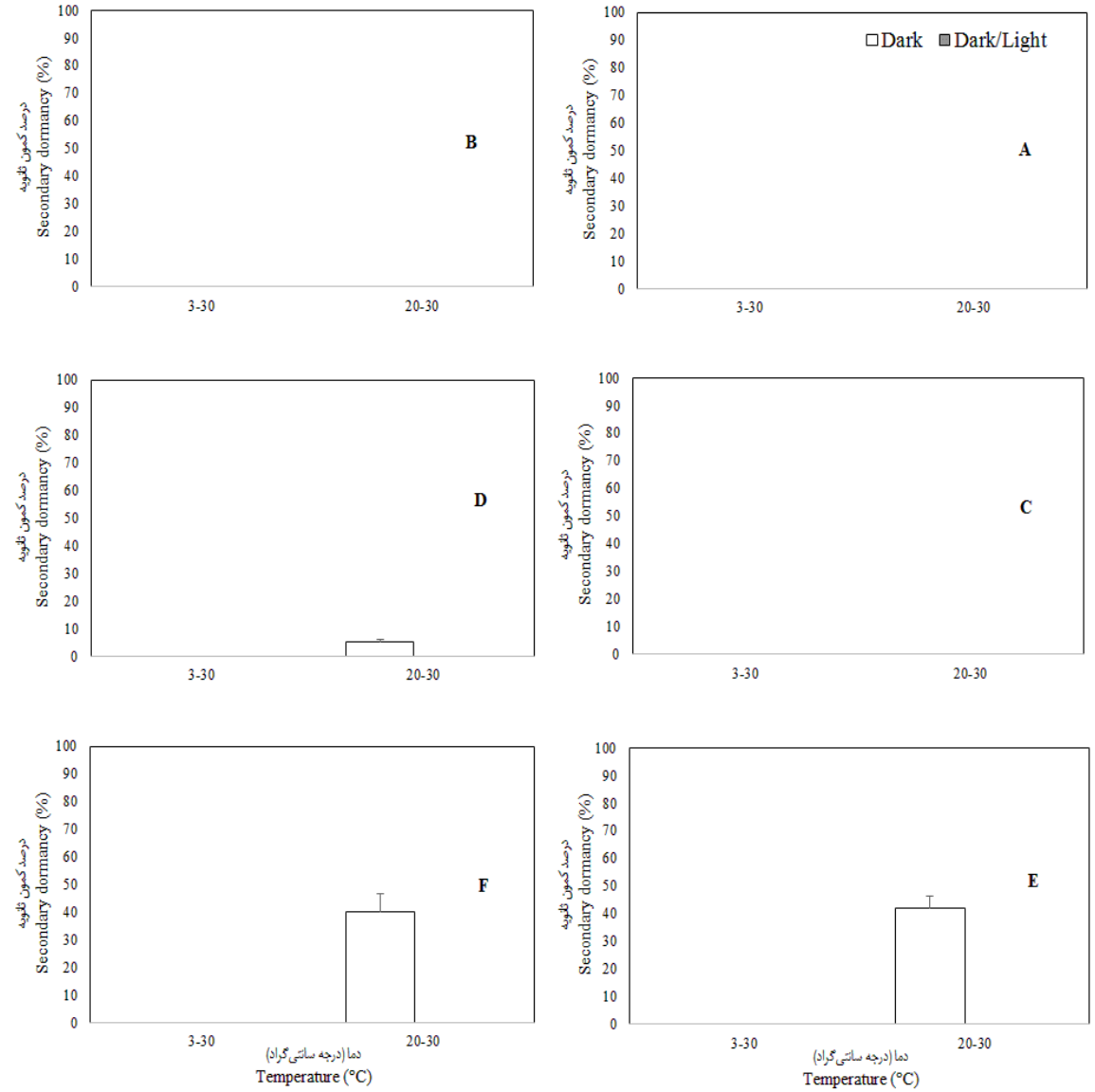
Figure 2- Seed secondary dormancy of different rapeseed lines and cultivars under constant temperatures. Difference between treatments are shown with standard error. Secondary dormancy responses of two lines with low secondary dormancy, Gor-H-4 (A) and Gor-O-16 (B), two cultivars with medium secondary dormancy, Zarfam (C) and RGS003 (D) and two lines with high secondary dormancy, Gor-O-6 (E) and Gor-O-4 (F) are shown

پاسخ جوانه‌زنی بذرها به دمای ثابت و متناوب تحت شرایط تاریکی. بذرهای دو لاین با سطح کم کمون، Gor-H-4 و Gor-O-16، پاسخ مشابهی را به تمامی تیمارهای دمایی (ثابت و متناوب) پس از شرایط القای کمون در تاریکی، نشان دادند و تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد و حداکثر درصد جوانه‌زنی در آنها دیده شد (شکل ۲ و۳، B-A)، به عبارت دیگر، این دو لاین در تمامی تیمارها جوانه‌زنی نزدیکی بهم داشتند و کمون ثانویه بسیار پایینی داشتند و تحت تأثیر شرایط دمایی و تاریکی قرار نگرفتند. واکنش بذرهای با سطح کمون متوسط، زرفام و RGS003 با سطح بالا کمون، Gor-O-4 و Gor-O-6، به شرایط دمایی ثابت و متناوب در شرایط تاریکی متفاوت بود (شکل ۲ و ۳، F-C). در دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، بیشترین درصد کمون ثانویه در بذرهای با سطح کمون متوسط و بالا مشاهده شد که با افزایش دمای ثابت از ۲۰ به ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصد کمون ثانویه به‌طور معنی داری کاهش یافت، به جز در رقم زرفام که تفاوتی کمی بین دمای ثابت ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد. پاسخ بذرهای دو لاین با کمون بالا به دمای ثابت متفاوت بود، با افزایش دما از ۲۰ به ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، درصد کمون ثانویه لاین Gor-O-6 از ۹۶ به ۱۸ درصد رسید، اما در لاین Gor-O-4، از ۹۴ به ۵۵ درصد رسید که بیانگر این موضوع بود که رفع کمون ثانویه در بذرهای لاین

Gor-O-6 متأثر از افزایش دما بود (شکل ۲، F-C).

درصد کمون ثانویه در هر دو سطح کمون متوسط و بالا در شرایط ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به صفر رسید، اما در دمای متناوب ۲۰–۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصد کمون در دو رقم با کمون متوسط کاهش یافت، اما تفاوت معنی‌داری را با تیمار دمای متناوب ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان نداد، اما در بذرهای با کمون بالا در دمای ۲۰–۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصد کمون ثانویه نسبت به ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی بیشتر بود و در این دما کمون ثانویه بذرها به‌طور کامل رفع نشد (شکل ۳ F-C).

پاسخ کمون ثانویه بذرها به دمای ثابت و متناوب تحت شرایط نور یا تاریکی/ نور. بذرهای با سطح کمون کم، درصد کمون ثانویه آنها در تمام تیمارهای دمایی و نوری، صفر بود و تنها در شرایط نور و دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ و ۰/۳ درصد کمون مشاهده شد (شکل ۲ B-A).



شکل ۳- درصد کمون ثانویه در لاین‌ها و ارقام مختلف کلزا در شرایط تاریکی/ نور یا تاریکی در دمای متناوب. تفاوت تیمارهای مختلف با خطای استاندارد نشان داده شده است. پاسخ کمون ثانویه بذرهای دو لاین با کمون کم (A) Gor-H-4، (B) Gor-O-16، دو رقم با کمون متوسط (C) زرفام، (D) RGS003 و دو لاین با کمون بالا (E) Gor-O-6 و (F) Gor-O-4 در شکل بالا ارائه شده است

Figure 3- Seed secondary dormancy of different rapeseed lines and cultivars under alternative temperatures. Difference between treatments are shown with standard error. Secondary dormancy responses of two lines with low secondary dormancy, Gor-H-4 (A) and Gor-O-16 (B), two cultivars with medium secondary dormancy, Zarfam (C) and RGS003 (D) and two lines with high secondary dormancy, Gor-O-6 (E) and Gor-O-4 (F) are shown

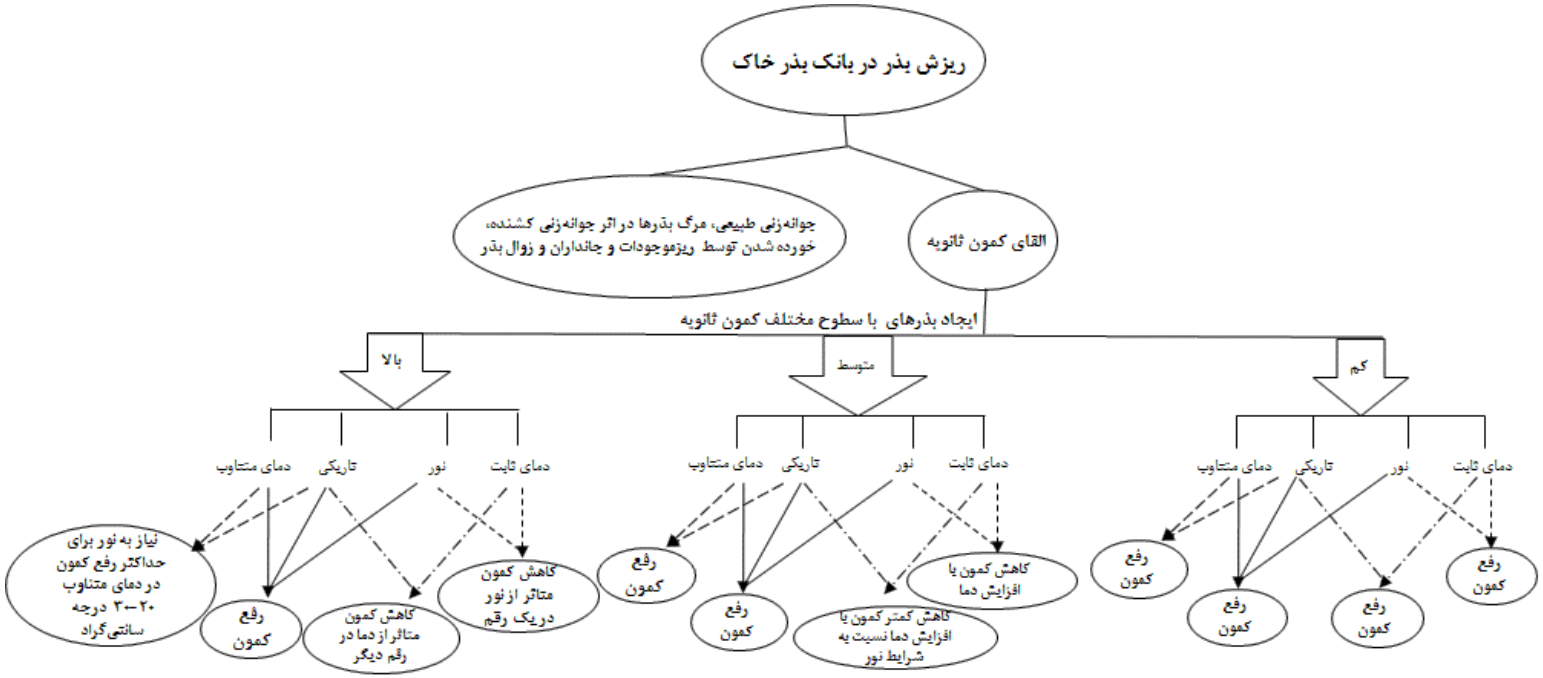
در شرایط نور، بیشترین درصد کمون ثانویه در بذرهای با کمون متوسط و بالا، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و بیشترین درصد کمون ثانویه در این شرایط در دو لاین Gor-O-4 و Gor-O-6 با ۵۵/۷ و ۳۷/۰ درصد مشاهده شد (شکل ۲ F-C). با افزایش دمای ثابت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد، از درصد کمون ثانویه بذرهای دو سطح کمون متوسط و بالا کاسته شد تا در نهایت در دیگر تیمار دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صفر رسید (شکل ۲، F-C). همانند شرایط تاریکی، کاهش معنی‌دار با افزایش دما از ۲۰ به ۳۰ درجه سانتی‌گراد (دمای ثابت) در شرایط نور در دو رقم با کمون بالا مشاهده شد. عدم کمون ثانویه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در لاین Gor-O-4، بیانگر این موضوع است که رفع کمون در این لاین وابستگی بیشتری به نور نسبت به Gor-O-6 داشته است (شکل ۲، F-E).

در شرایط دمای متناوب، بذرهای با کمون کم، در پاسخ به تیمار تاریکی/ نور، کمون ثانویه ناچیز آنها به‌طور کامل رفع شد و هیچ‌گونه کمون ثانویه در بذرهای آنها مشاهده نشد (شکل ۳ B-A). در بذرهای با کمون متوسط (زرفام و RGS003)، کمون ثانویه آنها به‌طور چشمگیری در هر دو تیمار دمای متناوب ۳۰-۳ و ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد در نور کاهش یافت و به صفر رسید، همچنین در بذرهای با کمون ثانویه بالا، در پاسخ به تیمار تاریکی/ نور در دمای متناوب، کمون ثانویه آنها به‌طور کامل رفع گردید (شکل ۳ F-C).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که بذرهای کلزا پس از جداشدن از گیاه مادری، کمون اولیه اندکی دارند که در اثر قرارگرفتن در سطح خاک و وجود شرایط محیطی مناسب، جوانه‌زنی می‌کنند (شکل ۱). دیگر محققان نیز بر عدم وجود کمون اولیه در بذرهای کلزا، پس از جداشدن از گیاه مادری اذعان داشته‌اند (۲۶، ۲۷، ۳۵، ۳۶ و ۳۷). مشخص شده است که هورمون آبسیزیک اسید در مراحل نموی و به ویژه در مرحله پسابش بذر و در انتهای نمو بر کنترل القای کمون اولیه در رسیدگی بذرهای کلزا تاثیر شایان توجهی را دارد (۱۵ و ۱۹) و یکی از دلایل افزایش جوانه‌زنی و کاهش کمون اولیه در بذرهای کلزا را کاهش احتمالی آبسزیک اسید درونی گزارش کرده‌اند (۳۹).

تغییرات دمایی با تفاوت بین حداقل و حداکثر دما، میانگین دما و مدت زمان قرارگیری در آن دما در رابطه با جوانه‌زنی بذرها در ارتباط است (۴۷). دما عامل مهمی در فرآیند جوانه‌زنی جمعیت‌های بذری کلزا است (۲۴). دما بر کمون بذر موجود در بانک بذر از طریق موازنه بیوسنتز آبسزیک اسید/جیبرلیک اسید تأثیر می‌گذارد (۲۰ و ۳۱). نتایج این تحقیق نشان داد که در دمای متناوب ۳۰-۳ درجه سانتی‌گراد (تاریکی/ نور)، کمون به‌طور کامل رفع می‌گردد (شکل ۳، B-A)، که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (۲۴، ۳۶ و ۴۳)، اما نکته مهم در تحقیق این بود که در دمای ۳۰-۳ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نیز، کمون به‌طور کامل حذف گردید. در واقع بذرهای کلزا برای رفع کمون، تنها به دمای متناوب ۳۰-۳ درجه سانتی‌گراد نیاز داشتند. دماهای متناوب ممکن است جوانه‌زنی در تاریکی را تحریک کند و این حالت از طریق تولید شکل فعال فیتوکروم (*Pfr*) رخ دهد (۴۴ و ۴۵). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، دماهای متناوب ممکن است، جایگزین نیاز نوری بذر برای جوانه‌زنی شوند (۶). دمای متناوب ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، نیز باعث کاهش کمون ثانویه در بذرهای کلزای با کمون ثانویه متوسط و زیاد نسبت به دماهای ثابت شد، اما در قیاس با دمای ۳۰-۳ درجه سانتی‌گراد در تاریکی که سبب رفع کامل کمون گردید، به‌طور کامل نتوانست کمون را در بذرهای با کمون بالا، رفع کند (شکل ۳ F-C)، که می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که با افزایش دما و در تاریکی درصد کمون ثانویه کاهش می یابد، اما برای رفع کامل کمون، بذرها به نور نیاز داشتند. همچنین دو پاسخ متفاوت بذرهای با کمون بالا که یکی (Gor-O-6) به افزایش دما و دیگری (Gor-O-4) به نور، در کاهش کمون پاسخ دادند، بیانگر این موضوع می‌تواند باشد که شاید در لاین Gor-O-6، نیاز نوری آن از طریق قرارگیری در دماهای بالا کاهش یافته باشد، اما بذرهای Gor-O-4 برای کاهش کمون خود، نیاز به قرارگیری در دماهای بالا به‌همراه نور داشتند. بنابراین بذرهای Gor-O-6 در صورت قرارگیری در بانک بذر خاک و دریافت دماهای بالای سطح خاک، جوانه‌زنی بیشتری خواهند داشت. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که نیاز نوری بذرهای توتون قرارگرفته در دمای بالا، در نتیجه سنتز دونوو پروتئین‌های شوک حرارتی رفع شده است (۳۳). در نتیجه بذرهای با کمون بالای قرارگرفته در دمای متناوب ۲۰-۳۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای رفع کامل کمون خود نیازمند نور شده‌اند. مشخص شده است که برخی بذرهای با سطح کمون بالاتر، برای رفع کمون خود نیاز به قرارگیری در معرض نور دارند (۱۶ و ۱۷). پس از قرارگیری بذرها در معرض نور قرمز مشخص شده است که سبب تغییر شکل فیتوکروم از حالت غیرفعال (*Pr*) به فعال (*Pfr*) می‌شود که بر روی پروتئین PIL5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5) DELLA پروتئین‌ها تأثیر گذاشته که سبب ممانعت از فعالیت آن می-شود، این پروتئین با افزایش بیان ژن‌های دخیل در غیرفعال‌سازی جیبرلیک اسید از جمله (*GA2ox*)، بیوسنتز آبسزیک اسید (*NCED6*) و توقف بیوسنتز GA (*GA3ox*) و غیرفعال‌سازی آبسزیک اسید (*CYP707A2*)، بر موازنه هورمونی جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید تأثیر می‌گذارد (۳۸، ۴۱ و ۴۲). در بذرهای جو (*Hordeum vulgare* ’Betzes‘) مشخص شده است که بذرهای دارای کمون قرارگرفته در تاریکی نسبت به بذرهای قرار گرفته در نور، میزان آبنوشی بالاتر، همچنین میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز ABA بیشتر و سنتز GA کمتری داشتند (۲۵).



شکل ٤- سرنوشت بذرهای کلزای ریزش‌یافته در بانک بذر خاک و تاثیر نور و دما بر پاسخ‌های جوانه‌زنی، رفع و یا القای کمون ثانویه سه سطح از بذرهای با کمون ثانویه مختلف

Figure 4- Fate of shattered rapeseed into soil seed bank and temperature and light effects on germination, elimination and/or induction of secondary dormancy responses in three levels of rapeseed secondary dormancy

مشخص شده است که نور سطح بیان ژن‌های آنابولیکی جیبرلیک اسید (GA)، *GA3ox1* و *GA3ox2* را افزایش و بیان ژن کاتابولیسم GA، *GA2ox2* را متوقف می‌کند. پنج نوع فیتوکروم در بذرها شناخته شده است، اما به نظر می‌رسد بیش از یک نوع فیتوکروم در رابطه با رفع و یا القای کمون در هر دمایی نقش داشته باشد (۹، ۲۲ و ۲۳). در مطالعه دیگر ژن *BnaDOG1* نیز در القای کمون ثانویه در بذرهای *Brassica napus* L. شناسایی شده است (۴۰)، از آنجایی‌که این ژن در پایین‌دست فیتوکروم B قرار دارد، محتمل است بر فعالیت فیتوکروم تأثیرگذار باشد (۲۹). دمای کمینه در تیمار ۲۰–۳۰ در مقایسه با تیمار ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۷ درجه سانتی‌گراد بالاتر است، در مطالعه‌ای مشخص شده است که در بذرهای کلزا هر چه تفاوت بین دمایی که القای کمون در آن انجام گرفته است با دمای بستر جوانه‌زنی پس از القای کمون بیشتر باشد، درصد کمون ثانویه کمتر و یا درصد جوانه‌زنی بیشتری مشاهده می‌شود (۴۳). بذرهای گیاه خوشه افشان *Leptochloa chinensis* با افزایش فاصله دو دمای متناوب اعمال شده، جوانه‌زنی آنها در تاریکی افزایش یافت (۷ و ۸). بیشترین میزان القای کمون ثانویه در بذرهای کلزا پس از قرارگیری آنها در معرض نور مادون قرمز نسبت به تاریکی در پلی اتیلن گلایکول مشاهده شد که بیانگر نقش سیستم فیتوکروم در جوانه‌زنی بذرهای کلزا می‌باشد و تحریک کمون ثانویه در بذرهای قرارگرفته در پلی اتیلن گلایکول تحت شرایط تاریکی یا نور مادون قرمز، ممکن است به علت تبدیل *Pfr* به *Pr* باشد (۳۴).

نتایج این تحقیق، رفتار متفاوت لاین‌ها و ارقام کلزا با کمون ثانویه مختلف را نشان داد که به شرایط محیطی خاک بعد از برداشت و ریزش بذرها در خاک بستگی دارد. به‌طور کلی، بذرهای فاقد کمون، به‌دلیل عدم القای کمون در آنها، در صورت مناسب بودن دیگر فاکتورهای مورد نیاز برای جوانه‌زنی، جوانه‌زنی کرده و بذر در مواجه با شرایط نامناسبی محیطی محتمل، از بین می‌روند، اما بذرهایی که دارای کمون ثانویه می‌باشند، کمون ثانویه در آنها القا می‌گردد و پاسخ متفاوتی به شرایط محیطی حاکم نشان می‌دهند. بذرهای که در عمق خاک قرار دارند، کمتر جوانه‌زنی می‌کنند، اما بذرهای موجود در سطح خاک، دمای متناوب و نسبت بالاتری از نور قرمز به مادون قرمز دریافت می‌کنند، لذا کمون آنها بیشتر رفع می‌شود و جوانه‌زنی می کنند (شکل ۴). همچنین بذرهای کلزا پس از ریزش در سطح خاک، نور کافی برای جوانه‌زنی در اختیار دارند، اما رطوبت مناسب برای جوانه‌زنی در ماه‌های تابستان پس از برداشت را در اختیار ندارند، با وجود اینکه *Pfr* کافی برای جوانه‌زنی در بذر وجود دارد، اما جوانه‌زنی نمی‌کنند، با عملیات شخم خاک، بذرها در خاک خشک قرار گرفته و شرایط تاریک و خشک خاک، می‌تواند سبب تبدیل *Pfr* به *Pr* شود که منجر به القای کمون ثانویه در بذرها خواهد شد (۳۴). بنابراین شرایط محیطی خاک پس از قرارگیری بذرها در بانک بذر خاک به میزان زیادی می‌تواند در پاسخ‌های جوانه‌زنی، رفع و یا القای کمون ثانویه آنها تأثیر بگذارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه پاسخ‌های متفاوت بذرهای با سطوح مختلف کمون پس از قرارگیری در بانک بذر خاک، در شرایط آزمایشگاه با تأکید بر دو عامل محیطی مهم دما و نور بود. نتایج این مطالعه نشان داد که بذرهای با سطوح مختلف کمون در کلزا، در پاسخ به افزایش دمای ثابت در شرایط تاریکی، پاسخ مشابهی را می‌دهند که کاهش کمون در آنها مشهود بود، بنابراین قراگیری بذرها در سطوح بالای بانک بذر خاک و با افزایش دمای تابستان، می‌تواند جمعیت بسیاری از بذرها را درنتیجه رفع کمون ثانویه و در نهایت جوانه‌زنی کاهش دهد. رفع کامل کمون ثانویه بذرها در پاسخ به دمای متناوب ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد، چه در شرایط تاریکی و چه در شرایط تاریکی/ نور رخ داد. به نظر می‌رسد دمای متناوب ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی می تواند نیاز نوری بذرها را پس از القای کمون ثانویه رفع کند، اما دماهای ۲۰–۳۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، تنها کمون بخشی از بذرها را رفع می‌کند و کسری از بذرهای موجود برای رفع کمون خود، نیاز به قرارگیری در شرایط نوری را دارند، بنابراین درصورتی‌که بذرها تنها تیمار دمایی دماهای ۲۰–۳۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی در بانک بذر خاک را دریافت کنند، کمون ثانویه در آنها به‌طور کامل رفع نمی‌شود. براساس نتایج موجود می‌توان این‌گونه استنباط کرد که بذرهای کلزا برای رفع کمون ثانویه خود، نیاز به نور دارند و پس از القای کمون ثانویه در آنها، فتوبلاستیک می‌شوند و رفع کامل کمون در آنها در وهله اول منوط به قرارگیری در شرایط دمای ثابت بالا (۳۰ درجه سانتی‌گراد) به همراه نور است، اما قرارگیری در دماهای متناوب ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، نیز می‌تواند جایگزین نیاز نوری بذرها شود. به نظر می‌رسد که در هر دو شرایط مذکور، رفع کامل کمون وابسته به فعالیت فیتوکروم‌ها باشد. دمای متناوب ۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی محتمل است به مانند دیگر تیمارهای (۳–۳۰ درجه سانتی‌گراد (تاریکی/ نور)، ۳۰ درجه سانتی‌گراد (نور) و ۲۰–۳۰ درجه سانتی‌گراد (نور))، که کمون را به‌طور کامل رفع کردند، از طریق تأثیر بر سیستم فیتوکروم، سبب تبدیل *Pr* به *Pfr* در بذرها شود که نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه وجود دارد.

منابع

1- Amritphale D., Iyengar S., and Sharma R.K. 1989. Effect of light and storage temperature on seed germination in *Hygrophila auriculata* (Schumach.) Haines. Journal of Seed Technology, 13:39-43.
2- Anderson R.L., and Soper G. 2003. Review of volunteer wheat (*Triticum aestivum*) seedling emergence and seed longevity in soil. Weed Technology, 17:620–626.
3- Batlla D., Grundy A., Dent K.C., Clay H.A., and Finch-Savage W.E. 2009. A quantitative analysis of temperature-dependent dormancy changes in *Polygonum aviculare* seeds. Weed Research, 49:428-438.
4- Batlla D., Kruk B.C., and Benech-Arnold R.L. 2004. Modelling changes in dormancy in weed soil seed banks: implications for the prediction of weed emergence. In: Benech-Arnold R.L., and Sanchez R.A. (Eds.), Handbook of Seed Physiology. Applications to Agriculture. Haworth Press, Inc., New York, pp. 245–264.
5- Benech-Arnold R.L., Sanchez R.A., Forcella F., Kruk B.C., and Ghersa C.M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. Field Crops Research, 67:105–122.
6- Benítez-rodrígues J., Orozco-segovia A., and Rojasaréchiga M. 2004. Light effect on seed germination of four Mammillari species from the Tehuacán-cuicatlán valley, central Mexico. Southwest. Nationalist Journal, 49(1):11-17.
7- Benvenuti S., and Macchia M. 1995. Effect of hypoxia on buried weed seeds germination. Weed Research, 35:343-351.
8- Benvenuti S., Dinelli G., and Bonetti A. 2004. Germination ecology of *Leptochloa chinensis*: a new weed in the Italian rice agroenvironment. Weed Research, 44:87-96.
9- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M., and Nonogaki H. 2013. In Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. Springer. Chapter, 6:287-288.
10- Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H., and Toole V.K. 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. Proceedings of National Academy of Sciences (USA), 38:662-666.
11- Botto J.F., Sanchez R.A., and Casal J.J. 1998. Burial conditions affect light responses of *Datura ferox* seeds. Seed Science Research, 8:423-429.
12- Chadoeuf R., Darmency H., Maillet J., and Renard M. 1998. Survival of buried seeds of interspecific hybrids between oilseed rape, hoary mustard and wild radish. Field Crops Research, 58:197-204.
13- Cristaudo A., Gresta F., Lucianai F., and Restuccia A. 2007. Effects of after-harvest period and environmental factors on seed dormancy of *Amaranthus* species. Weed Research, 47:327-334.
14- Derkx M.P.M., and Karssen C.M. 1993. Changing sensitivity to light and nitrate but not to gibberellins regulates seasonal dormancy patterns in *Sisymbrium officinale* seeds. Plant, Cell and Environment, 16:469-479.
15- Fei H., Tsang E., and Cutler A.J. 2007. Gene expression during seed maturation in *Brassica napus* in relation to the induction of secondary dormancy. Genomics, 89:419-428.
16- Finch-Savage W.E., and Footitt S. 2012. To germinate or not to germinate: a question of dormancy relief not germination stimulation. Seed Science Research, 22:243–248.
17- Finch-Savage W.E., and Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 171:501– 523.
18- Finch-Savage W.E., Cadman C.S.C., Toorop P.E., Lynn J.R., and Hilhorst H.W.M. 2007. Seed dormancy release in Arabidopsis Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. The Plant Journal, 51:60–78.
19- Finkelstein R.R. 2010. The role of hormones during seed development and germination. Pages 549–573. In Davies PJ, ed. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Ithaca, New York: Springer.
20- Footitt S., Douterelo-Soler I., Clay H., and Finch-Savage W.E. 2011. Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:20236–20241.
21- Forcella F., Benech-Arnold R.L., Sanchez R.A., and Ghersa C.M. 2000. Modeling seedling emergence. Field Crops Research, 67:123–139.
22- Goggin D.E., Powles S.B., Toorop P.E., and Steadman K.J. 2011. Dark mediated dormancy release in stratified *Lolium rigidum* seeds is associated with higher activities of cell wall modifying enzymes and an apparent increase in gibberellin sensitivity. Journal of Plant Physiology, 168:527–533.
23- Goggin D.E., Steadman K.J., and Powles S.B. 2008. Green and blue light photoreceptors are involved in maintenance of dormancy in imbibed annual ryegrass (*Lolium rigidum*) seeds. New Phytologist, 180:81–89.
24- Gruber S., Pekrun C., and Claupein W. 2004. Population dynamics of volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) affected by tillage. European Journal of Agronomy, 20: 351–361.
25- Gubler F., Hughes T., Waterhouse P., and Jacobsen J. 2008. Regulation of Dormancy in Barley by Blue Light and After-Ripening: Effects on Abscisic Acid and Gibberellin Metabolism. Plant Physiology, 147:886–896.
26- Gulden R.H., Shirtliffe S.J., and Thomas A.G. 2003. Secondary seed dormancy prolongs persistence of volunteer canola in western Canada. Weed Science, 51:904-913.
27- Haile T.A., and Shirtliffe S.J. 2014. Effect of Harvest Timing on Dormancy Induction in Canola Seeds. Weed

Science, 62:548–554.
28- Jha P., Norsworthy J.K., Riley M.B., and Bridges Jr.W. 2010. Annual changes in temperature and light requirements for germination of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) seeds retrieved from soil. Weed Science, 58:426-432.
29- Jiang Z., Xu G., Jing Y., Tang W., and Lin R. 2015. Phytochrome B and REVEILLE1/2-mediated signaling controls seed dormancy and germination in Arabidopsis. Nature Communications, 1:10.
30- Kambizi L., Adebola P.O., and Afolayan A.J. 2006. Effects of temperature, pre-chilling and light on seed germination of *Withania somnifera*; a high value medicinal plant. South African Journal of Botany, 72:11-14.
31- Kendall S.L., Hellwege A., Marriot P., Whalley C., Graham I.A., and Penfield S. 2011. Induction of dormancy in Arabidopsis summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. Plant Cell, 23:2568–2580.
32- Khan A.A., and Karssen C.M. 1980. Induction of secondary dormancy in *Chenopodium bonus-henricus* L. seeds by osmotic and high temperature treatments and its prevention by light and growth regulators. Plant Physiology, 66:175-181.
33- Koo H.J., Park S.M., Kim K.P., Pill K., Suh M.C., Lee M.O., Lee S-K., Xinli X., and Hong C.B. 2015. Small Heat Shock Proteins Can Release Light Dependence of Tobacco Seed during Germination. Plant Physiology, 167:1030–1038.
34- López-Granados F., and Lutman, P.J.W. 1998. Effect of Environmental Conditions on the Dormancy and Germination of Volunteer Oilseed Rape Seed (*Brassica napus*). Weed Science, 46(4):419-423.
35- Lutman P.J.W. 1993. The occurrence and persistence of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). Aspect of Applied Biology, 35:29-36.
36- Lutman P.J.W., Freeman S.E., and Pekrun C. 2003. The long-term persistence of seeds of oilseed rape (*Brassica napus*) in arable fields. Journal of Agricultural Science, 141:231-240.
37- Mallory-Smith C., and Zapiola M. 2008. Gene flow from glyphosate-resistant crops. Pest Management Science, 64:428–440.
38- Martin R.C., Pluskota W.E., Nonogaki H. 2010. Interaction of ABA and GA metabolism. In: Pua EC, Davey MR (eds) Plant developmental biology: biotechnological perspectives. Springer, Heidelberg, 383–404.
39- Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K., Yano R., Seo M., and Kamiya Y. 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. Seed Science Research, 20:55–67.
40- Nee G., Obeng-Hinneh E., Sarvari P., and Nakabayashi K. 2015. Secondary dormancy in *Brassica napus* is correlated with enhanced *BnaDOG1*transcript levels. Seed Science Research, 25(2):221-229.
41- Oh E., Yamaguchi S., Hu J., Yusuke J., Jung B., Paik I., Lee H-S., Sun T., Kamiya Y., and Choia G. 2007. Phytochrome downstream signaling. Plant Cell, 19:1192–1208.
42- Oh E., Yamaguchi S., Kamiya Y., Bae G., Chung W-I., and Choi G. 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. The Plant Journal, 47:124–139.
43- Pekrun C., Lutman P.J.W., and Lopez-Granados F. 1996. Population dynamics of volunteer rape and possible means of control. Proceedings of the Second International Weed Control Congress. Copenhagen, 1–6.
44- Pons T.L. 2000. Seed responses to light. In Seeds: the ecology of regeneration in plant communities (Fenner M., ed.). CABI, London, p. 237-260.
45- Probert R.J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In Seeds: the ecology of regeneration in plant communities (M. Fenner, ed.). CABI, London, p. 261-292.
46- Rizzardi M.A., Luiz A.R., Roman E.S., and Vargas L. 2009. Effect of cardinal temperature and water potential on Morning Glory (*Ipomoea triloba*) seed germination Planta Daninha, 27:13-21.
47- Roberts H.A., and Lockett P.M. 1978. Seed dormancy and field emergence in *Solanum nigrum* L. Weed Research, 18:231-241.
48- Saatkamp A., Affre L., Baumberger T., Dumas P.J., Gasmi A., Gachet S., and Arene F. 2011. Soil depth detection by seeds and diurnally fluctuating temperatures: different dynamics in 10 annual plants. Plant and Soil, 349:331–340.
49- Schatzki J., Allam M., Kloppel C., Nagel M., Borner A., and Mollers C. 2013. Genetic variation for secondary seed dormancy and seed longevity in a set of black-seeded European winter oilseed rape cultivars. Plant Breeding, 132:174–179.
50- Shayanfar A., Ghaderi-Far F., Behmaram R., Soltani A., and Sadeghipour, H.R. 2017. Assessment of germination and secondary dormancy behaviours of lines and cultivars of canola. Agricultural Crop Management, (In Presian with English abstract). In Press.
51- Singh K.K., Gurung B., Rai L.K., and Nepal L.H. 2010. The influence of temperature, light and pre-treatment on the seed germination of critically endangered Sikkim Himalayan Rhododendron (*R. niveum* Hook. f.). Journal of American Science, 6:172-177.
52- Tlig T., Gorai M., and Neffati M. 2008. Germination responses of *Diplotaxis harra* to temperature and salinity. Flora, 203:421-428.