نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۳۸-۱۳۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 130-138
ISSN: 2008 - 4730

اثر تیمارهای ضدعفونی سطحی و چینه‌سرمایی بر جوانه‌زنی بذر انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) در شرایط درون شیشه‌ای

راحله خطیب‌زاده[۱*]- مجید عزیزی[۲]- حسین آرویی[۳]-محمد فارسی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۸

چکیده

کشت درون شیشه‌ای توانسته است گیاهان باهمیت و نادر را به نحو مؤثرتری در مقایسه با روش‌های سنتی ازدیاد رویشی، تکثیر و حفظ نماید. انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) متعلق به تیره Apiaceae گونه مهم، در حال انقراض و فراموش شده‌ای از گیاهان دارویی ایران است که دارای خواص متعدد دیورتیک، ضداسپاسم و ضدنفخ می‌باشد. به منظور دستیابی به ماده گیاهی کافی برای ریزازدیادی و مطالعه اثر روش‌های مختلف ضدعفونی و سطوح متفاوت سرمادهی بر جوانه‌زنی بذور در کشت درون‌شیشه‌ای، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل، برای استقرار گیاهچه‌های استریل از کشت بذر ترتیب داده شد. کاربرد پیش سرمای مرطوب به مدت ۳ ماه بیشترین درصد جوانه‌زنی به میزان۹۲ درصد و حداکثر سرعت جوانه‌زنی را درپی داشت. بهترین تیمار استریلیزاسیون، شستشو با اتانول۷۰ درصد برای ۳۰ ثانیه، سپس کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه ۳ بار آبشویی با آب مقطر استریل تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: *Levisticum officinale*، گیاهان دارویی، جوانه‌زنی بذر، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

گیاهان دارویی، از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز، از آن‌ها استفاده نموده و امروزه نیز اهمیت آن‌ها رو به فزونی است. طبق برآوردسازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد مردم جهان هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. مطالعه روی طب سنتی و گیاهان دارویی، در سراسر جهان و به‌خصوص هند، ژاپن، ایران، پاکستان، سریلانکا و تایلند در دست انجام می‌باشد. در ارتباط با گیاهان دارویی، سه مقوله انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های مهم از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند وکشت درون‌شیشه‌ای به عنوان ابزاری در خدمت این اهداف به کارگرفته می‌شود.از این رو صنایع دارویی استفاده از کشت بافت گیاهی و جایگزین کردن آن در بعضی موارد به جای گیاهان طبیعی را در دستور کار خود قرار داده‌اند (۴، ۲۴، ۳۰، ۳۶).

انجدان رومی (*Levisticumofficinale*) از تیره Apiaceae (Umbelliferae) و تنها گونه در جنس خود و بوته‌ای چندساله با ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر است (۲۵). گیاهان از سال دوم به‌ساقه می‌روند. این گیاه بومی منطقه ایرانی-تورانی و پراکندگی جغرافیایی آن اروپا، ایران و افغانستان را در بر می‌گیرد. انجدان رومی در جنوب شرق ایران، در کرمان، شیب جنوبی کوه هزار با ارتفاع ۳۲۰۰ متر از سطح دریا رویش دارد. نام عمومی این گیاه Lovage بوده، در زبان محلی آن را کاشم رومی، کرفس وحشی، کرفس رسمی و زیره کوهی نیز می‌خوانند (۱، ۲، ۳، ۵). بقایای گیاهان کشت شده انجدان رومی در قرن پنجم قبل از میلاد و در قرون وسطی یافت شده است. این گیاه در صنایع آرایشی و غذایی استفاده می‌شود و اثرات خلط‌آور، مسکن و ضد اپاسم آن نشان داده شده است. فتالیدها اجزای خاص اسانس ریشه بالغ هستند، در حالی که اسانس اندام‌های هوایی بیشتر مرکب از ترپنوئیدهاست (۱، ۵، ۱۶، ۲۰).

طبق گزارش الیس و همکاران (۱۲) از انجمن بین المللی آزمون

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیارگروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: khatibzadeh_rahele@yahoo.com)
۴- استاد گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

بذر[1]، بذرهای این گیاه دارای خفتگی است.در حقیقت این گیاه به یک یخبندان زمستانه برای شکستن خواب بذر نیاز دارد. قوه نامیه به شدت با افزایش سن کاهش می‌یابد. تلاش سازمان‌یافته کمی در زمینه بهبود فرآیند جوانه‌زنی و رفع رکود بذر صورت گرفته است. تعداد روز تا جوانه‌زنی ۱۰ تا ۱۲ روز در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد است. در برخی منابع، اشاراتی به راندمان پایین جوانه‌زنی و خفتگی فیزیولوژیک بذر انجدان رومی وجود دارد. در گزارش دانشگاه ایالتی کانزاس[2]، برای جوانه‌زنی مطلوب، ۱ تا ۲ هفته چینه‌سرمایی[3] و استفاده از بذور ریز توصیه شد. جوانه‌زنی در ۲ هفته و تنها به میزان ۵ درصد به وقوع پیوست (۱، ۷، ۱۷، ۱۸).

در گیاهان دارویی، بذر برداشت شده از عرصه معمولاً علاوه بر مشکل خفتگی عمیق‌تر، آلودگی‌های سطحی و پنهان بیشتری نیز دارد، لذا افت کمی و کیفی جوانه‌زنی قابل‌ملاحظه خواهد بود. هر جمعیت بذری بنابر شرایط قبل و پس از برداشت و نوع آلودگی‌ها، نیاز به یک روش ضدعفونی سطحی مؤثر دارد. از سویی، با در نظر گرفتن اثر سوء مواد ضدعفونی‌کننده بر جوانه‌زنی، غلظت و زمان بهینه ضدعفونی سطحی باید تعیین گردد. در انجدان رومی همچون بسیاری از گیاهان دارویی، میزان کم تشکیل میوه و جوانه‌زنی ضعیف مانع از تشکیل کلونی‌های انبوه و یکنواخت گیاهان می‌شود. خفتگی بذر این گیاه از نوع خفتگی عمیق فیزیولوژیکی است، که دربرگیرنده کنترل‌هایی در درون خود جنین به همراه خفتگی ناشی از پوشش‌های بذر است. این نوع خفتگی ترکیبی از فراخفتگی[4] و درون‌خفتگی[5] است و ویژگی آن، نیاز به یک دوره سرمای ۱ تا ۳ ماهه است که در طی آن امکان آبگیری و دسترسی به هوا نیز وجود داشته باشد. بذور رسیده در سرمای پاییز و زمستان در لاشبرگ یا لایه‌های زمین زمستان‌گذرانی می‌کنند تا در بهار آماده جوانه‌زنی شوند. از جمله عملیات باغبانی برای اعمال این سرمادهی مرطوب، چینه‌سرمایی یا استراتیفیه نمودن است، که قرار دادن بذرها در لایه‌های کاغذ یا ماسه مرطوب، در معرض دماهای سرد طبیعی یا مصنوعی را شامل می‌شود. در شرایط کشت استریل، این عملیات می‌تواند به صورت کشت بذور در محیط کشت جامد و سپس قرار دادن در دمای یخچال صورت پذیرد.سرما نیاز جنین به اکسیژن را کمتر و میزان اکسیژن در دسترس را بیشتر می‌سازد. اصولاً در بذرهایی که دارای سازوکار خواب هستند، دلیلفیزیولوژیکی شکستن خواب از بین رفتن مواد بازدارنده و فعال شدنآنزیم‌ها جهت جوانه‌زنی می‌باشد. چنین برداشت می‌شود که در همه بافت‌ها، از جمله بذر، سرما در تغییر تعادلات هورمونی به سمت حذف عوامل خفتگی و تحریک متابولیسم دخالت دارد برداشتن مکانیکی پوشش‌های بذر می‌تواند دوره چینه‌سرمایی را کوتاه سازد. با این حال جنین جداشده به‌طور طبیعی جوانه نمی‌زند و حتی ممکن است دانهال‌های حاصله غیرعادی باشند (۱۵، ۲۸، ۳۱).

جوانه‌زنی و صرفه اقتصادی نسبتاً اندک، موجب استقبال کمتر زارعین از چنین محصولی شده است. به دلیل خشکسالی و بهره‌برداری بی‌رویه و با توجه به جمعیت و گسترش جغرافیایی محدود این گونه، لزوم حفظ این ژرم‌پلاسم و تکثیر آن بیش از پیش احساس می‌شود.مقاله حاضر بخشی از نتایج پروژه کشت بافت و ریزازدیادی این گیاه ارزشمند بوده است که متأسفانه مطالعات و منابع علمی اندکی در مورد آن وجود دارد. از آنجا که تیمار سرمادهی و خیساندن جهت شکستن زودهنگام خواب بذر در بیشتر اعضای تیره چتریان مفید است، در پژوهش حاضر با هدف دستیابی به ماده گیاهی کافی برای کشت درون‌شیشه‌ای، تأثیر تیمارهای مختلف چینه‌سرمایی و ضدعفونی بر جوانه‌زنی بذر و بهینه‌سازی استقرار گیاهان استریل انجدان رومی، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور بهینه‌سازی پروتکل ضدعفونی و رفع مشکل رکود بذر و بهبود جوانه‌زنی در انجدان رومی توده بومی کرمان، انجام گرفت. بذور سالم و رسیده، به رنگ زرد یا زیتونی و متوسط طول ۵ میلی‌متر جدا گردیده، ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه درون صافی در زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس بذرها درون فالکن‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از اضافه کردن اتانول ۷۰٪ (نسبت حجمی) به مدت ۳۰ ثانیه با تکان دادن، شستشو و ضدعفونی شدند. در ادامه از محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس تجاری محتوی ۵ درصد NaOCl) برای ضدعفونی سطحی استفاده گردید. در این مرحله بذرها با استفاده از شیکر به خوبی تکان داده شدند. به منظور کاهش کشش سطحی و تماس بهتر آن با سطح نمونه، دو قطره مایع ظرفشویی به این محلول اضافه شد. در نهایت بذور به مدت ۱۰ دقیقه، ۳ تا ۴ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و به شکل فاکتوریل با ۲ فاکتور روش ضدعفونی سطحی (۸ سطح) و طول دوره سرمادهی مرطوب (۴ سطح) اجرا شد (به عبارتی با مجموع ۳۲ تیمار). استریلیزاسیون سطحی با استفاده از اتانول۷۰ درصد به مدت۳۰ثانیه، سپس استفاده از هیپوکلریت سدیم (۱ یا ۲ درصد به مدت ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) و آنگاه ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. پس از آن بذور با رعایت اصول استریل در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت استریل متشکل از محلول ۰/۷ درصد آگار-آگار کشت گردیدند (در هر پتری ۱۰ بذر). روش‌های چینه‌سرمایی عبارت

1- ISTA
2- Kansas State University (KSU)
3- Stratification
4- Paradormancy
5- Endodormancy

Archive of SID

www.SID.ir

بودند از: ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ هفته سرمای ۲±۴ درجه سانتی‌گراد. در پایان این دوره، کشت‌ها به اتاق رشد با شرایط کنترل‌شده (دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، فتوپریود ۸ ساعت تاریکی، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۴۰۰۰ لوکس) انتقال یافتند. پس از ظهور دانه‌رست‌ها، سرعت جوانه‌زنی به روش ماگویر (۲۳) اندازه‌گیری و درصد نهایی جوانه‌زنی ثبت شد و سپس دانه‌رست‌ها در محیط MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۹ گرم بر لیتر آگار واکشت گردیدند. پیش از تحلیل آماری، داده‌های غیرکمی نرمال‌سازی شدند، بدین ترتیب که از سرعت جوانه‌زنی (داده نسبی) جذر و از داده‌های درصد آرک‌سینوس گرفته شد. داده‌های حاصل با کمک نرم‌افزار SPSS، MSTATC و Excel 2003 آنالیز شدند.

فرمول ۱- محاسبه سرعت جوانه‌زنی به روش ماگویر

$$GR = \sum_{i}^{n_i} \frac{n_i}{t_i}$$

در فرمول مزبور GR سرعت جوانه‌زنی، t_i تعداد روز از آغاز آزمایش تا روز iام، و n_i تعداد بذر جوانه زده تا روز iام می‌باشد.

لازم به ذکر است که کلیه مراحل ضدعفونی و کشت در زیر اتاقک تمیز (هود لامینار) که از پیش با تابش UV و سپس با اتانول ضدعفونی شده بود، صورت می‌گرفت. ظروف و ابزار مورد استفاده توسط آون ۱۸۰°C به مدت ۲ ساعت یا اتوکلاو ۱۲۱°C با فشار ۱۵۲ کیلوپاسکال به مدت ۲۰ دقیقه استریل و در موارد لزوم در زیر اتاقک تمیز با اتانول و شعله ضدعفونی می‌شد. محیط کشت آگار- آگار و نیز محیط کشت MS در دمای ۱۲۱°C و با فشار ۱۵۲ کیلوپاسکال به مدت ۱۸ دقیقه اتوکلاو شده بود. پس از انتقال دانه‌رست‌ها به محیط MS، کشت‌ها تا تشکیل برگ‌های اصلی ۳ برگچه‌ای و رسیدن به نمو بیشتر (مرحله‌ای که بتوان ریزنمونه‌های مناسبی از آن‌ها تهیه کرد) در همان شرایط حفظ و در فواصل ۴ هفته‌ای در محیط کشت تازه، واکشت شدند.

نتایج و بحث

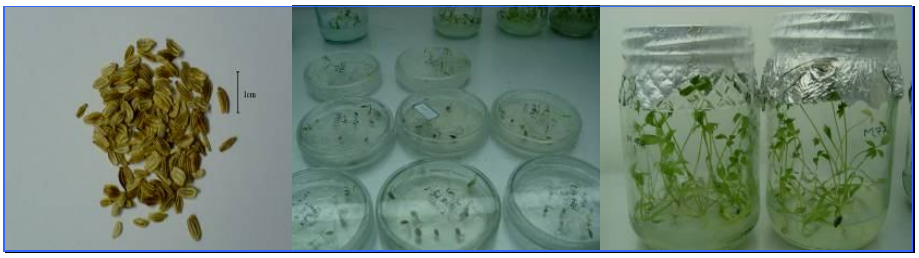
با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه، اثر مستقیم دو فاکتور روش استریلیزاسیون و روش چینه‌سرمایی (استراتیفیکاسیون) و اثر متقابل آن دو بر روی میانگین درصد جوانه‌زنی بررسی شد. نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح مختلف تیمارهای استریلیزاسیون و چینه‌سرمایی و نیز وجود اثرات متقابل معنی‌دار از نظر درصد جوانه‌زنی در سطح ۰/۰۱ بود (جدول ۱). آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای بررسی اثر سطوح استریلیزاسیون و چینه‌سرمایی بر درصد جوانه‌زنی بذور، بهترین تیمار استریلیزاسیون را کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه یا هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه نشان داد (نمودار ۱). بر اساس این نتایج، کاربرد هیپوکلریت سدیم (۱ یا ۲ درصد) به مدت ۲۵ دقیقه کاهش چشمگیر درصد جوانه‌زنی را به‌دنبال داشت. تحلیل داده‌های سرعت جوانه‌زنی به صورت تجزیه واریانس دوطرفه، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار سطوح استریلیزاسیون و استراتیفیکاسیون و اختلاف معنی‌دار اثر متقابل این دو عامل در سطح ۵ درصد بود (جدول ۱). به منظور تعیین مؤثرترین تیمارهای ضدعفونی بر سرعت جوانه‌زنی از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌دست آمده کاهش بسیار معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی را در تیمار هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۵ دقیقه نشان داد، در حالی که بیشترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد (نمودار ۲).

روش به‌کار گرفته شده با گزارش‌های قبلی مبنی بر کاربرد اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و ۱۵ دقیقه ضدعفونی با محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم برای بذور آنیسون (*Pimpinellaanisum*)، کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه درجنس اکتینوتوس از چتریان (*Actinotusleucocephalus*) برای کاهش آلودگی قارچی بذر و استفاده از اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱/۷ درصد به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه برای استریلیزاسیون بذرهای کرفس تا حدودی تطابق دارد (۸، ۱۳، ۲۲). طبق گزارش پیکنز و همکاران (۲۰۰۳) از بررسی اثر سطوح و زمان‌های مختلف تیمار با الکل و هیپوکلریت سدیم روی جوانه‌زنی آناناس گرمسیری (*Tillandsiaeizii*)، بهترین نتیجه با استفاده از تیمار اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۶ درصد به مدت ۴۰ دقیقه به دست آمد (جوانه‌زنی ۹۴ درصد). همچنین ایشان بیان نمودند گیاهانی که در اثر خفتگی یا علل دیگر در شرایط طبیعی جوانه‌زنی کمتری دارند در شرایط درون‌شیشه‌ای کارآیی بسیار قابل ملاحظه‌ای برای جوانه‌زنی دارند (۲۶). البخیط و همکاران (۲۰۰۷) نیز عنوان نمودند که تیمارهای استریلیزاسیون نه فقط آلودگی را کاهش می‌دهند، بلکه گاهی به بهبود درصد جوانه‌زنی هم می‌انجامند (۶).

از سوی دیگر، مدت تیمار استریلیزاسیون به نوبه خود نه تنها روی درصدجوانه‌زنی، بلکه روی رشد بعدی دانه‌رست‌ها می‌تواند اثر مثبت یا منفی داشته باشد (۳۵). می‌توان اثر افزایشی مدت و غلظت بیشتر هیپوکلریت سدیم بر روی جوانه‌زنی تجمعی را به کاهش جمعیت و کلونیزاسیون قارچ‌ها روی پوسته بذر و در نتیجه کاهش مرگ و میر رویان‌های جوانه زده نسبت داد (۳۷). اروین و وتزل (۲۰۰۲) در بررسی اثرات متقابل استریلیزاسیون با هیپوکلریت سدیم و نگهداری در انبار سرد بر جوانه‌زنی سازو (*Juncuseffusus*) دریافتند که اثرات ساده هر دو تیمار و نیز اثر متقابل این دو معنی‌دار بود، به گونه‌ای که کمترین جوانه‌زنی برای بذور غیراستریل نگهداری شده به مدت ۲ هفته در انبار سرد به دست آمد، در حالی که بذور استریل در تمام تیمارهای انبار سرد بهتر و سریع‌تر جوانه می‌زدند و در این بین بذور استریلی که به مدت ۵۲ هفته در انبار سرد مانده بودند، بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی را داشتند (۱۴).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- کشت درون‌شیشه‌ای انجدان رومی (*Levisticum officinale*) و استقرار گیاهان استریل

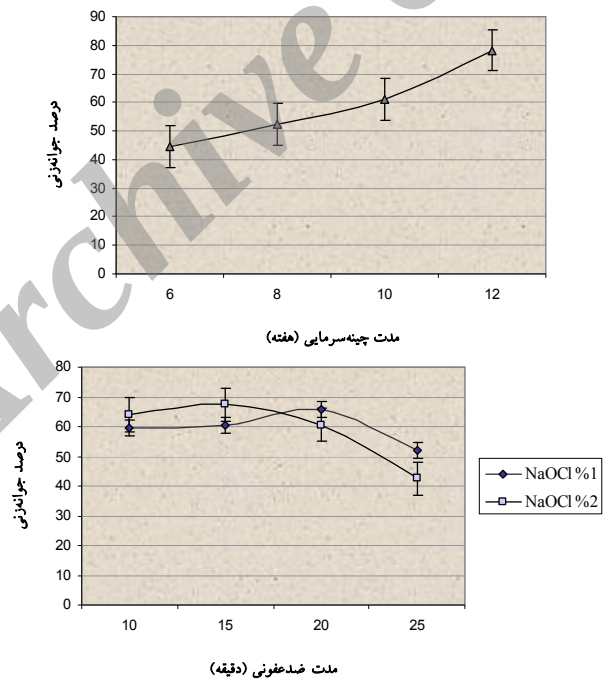
جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف ضدعفونی و چینه‌سرمایی بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر انجدان رومی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		F	
		درصدجوانه‌زنی[۱]	سرعت‌جوانه‌زنی[۲]	درصدجوانه‌زنی	سرعت‌جوانه‌زنی
روش ضدعفونی سطحی	۷	۶۱۲/۲۶۹	۲/۷۲۱	۹/۷۹۲**	۹/۰۶۸**
روش چینه‌سرمایی	۳	۳۹۵۲/۴۲۲	۳۵/۷۷۵	۶۳/۲۰۸**	۱۱۹/۲۲۱**
ضدعفونی سطحی × چینه‌سرمایی	۲۱	۱۲۷/۵۰۶	۰/۵۱۵	۲/۰۳۹**	۱/۷۱۵*
خطا	۱۲۸	۶۲/۵۳۰	۰/۳۰۰		
ضریب تغییرات (%CV)		۱۳/۳۹	۹/۰۱		

* معنی‌داری در سطح ۰/۰۵، ** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱

[۱] داده‌های درصد جوانه‌زنی پیش از تحلیل آماری به آرک‌سینوس تبدیل شدند.

[۲] داده‌های سرعت جوانه‌زنی پیش از تحلیل آماری به ریشه دوم تبدیل شدند.

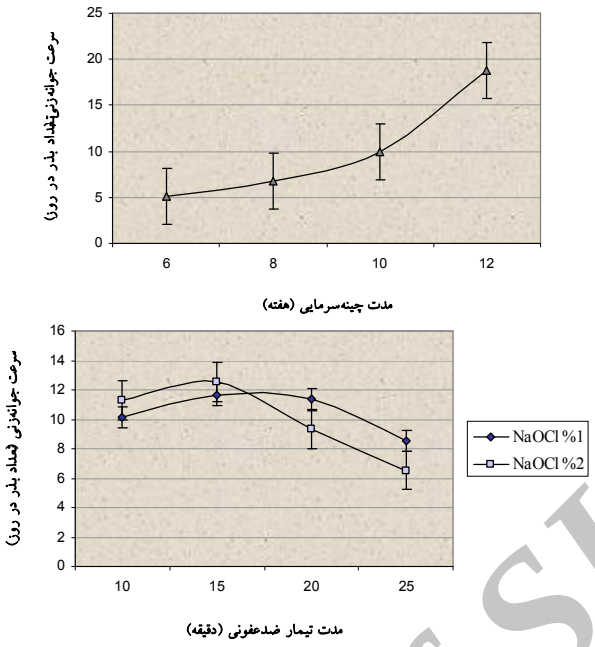


نمودار ۱- اثر ساده روش‌های ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم و زمان چینه‌سرمایی بر درصد جوانه‌زنی بذر انجدان رومی

(بار در نمودارها نشان‌دهنده میانگین± خطای معیار است.)

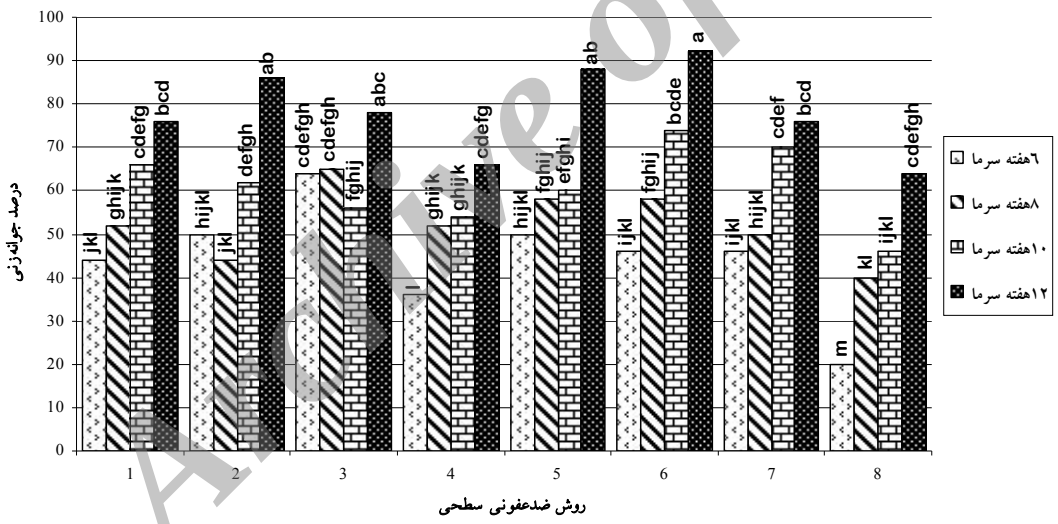
Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲- اثر ساده روش‌های ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم و زمان چینه‌سرمایی بر سرعت جوانه‌زنی بذر انجدان رومی

(بار در نمودارها نشان‌دهنده میانگین ± خطای معیار است.)



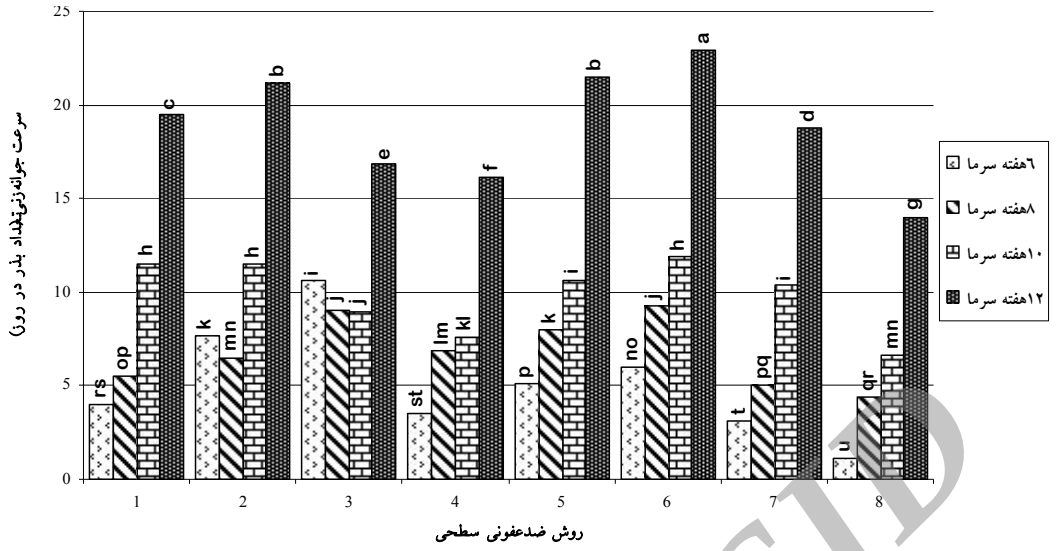
نمودار ۳- اثر متقابل چینه‌سرمایی (شامل ٦، ٨، ١٠ و ١٢ هفته سرمای ٤°C) و ضدعفونی بر درصد جوانه‌زنی بذر انجدان رومی؛ (سطوح مختلف ضدعفونی عبارتند از هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ دقیقه (به ترتیب ١، ٢، ٣ و ٤) و هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ دقیقه (به ترتیب ٥، ٦، ٧ و ٨))

میانگین‌های دارای حرف و یا حروف مشترک در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

با مقایسه اثر سطوح مختلف چینه‌سرمایی بر درصد جوانه‌زنی، مؤثرترین روش ، ۱۲ هفته سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد معرفی گردید (نمودار ۱). حداکثر جوانه‌زنی (۹۲ درصد) در روش ۱۵ دقیقه استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به همراه تیمار ۱۲ هفته چینه‌سرمایی و حداقل جوانه‌زنی (۲۰ درصد) در روش ۲۵ دقیقه استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به همراه تیمار ۶ هفته چینه‌سرمایی به دست آمد (نمودار ۳). همچنین از نظر سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری بین هر یک از سطوح چینه‌سرمایی وجود داشت و تیمار ۱۲ هفته سرمادهی از این نظر، بهترین گزینه بود (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ٤-اثر متقابل چینه‌سرمایی (شامل ٦، ٨، ١٠ و ١٢ هفته سرمای ٤°C) و ضدعفونی بر سرعت جوانه‌زنی بذر انجدان رومی؛ سطوح مختلف ضدعفونی عبارتند از هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ دقیقه (به ترتیب ١، ٢، ٣ و ٤) و هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ دقیقه (به ترتیب ٥، ٦، ٧ و ٨)

میانگین‌های دارای حرف و یا حروف مشترک در سطح ٠/٠٥=α اختلاف معنی‌داری ندارند.

همان طور که نمودار ۴ نشان می‌دهد، کمترین سرعت جوانه‌زنی (۱/۱۲ بذر در روز) در روش ۲۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به همراه ۶ هفته چینه‌سرمایی و بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۲۲/۹۳ بذر در روز) در روش ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به همراه ۱۲ هفته چینه‌سرمایی به‌دست آمد ($p<0.05$). تحقیقات متعدد بهبود جوانه‌زنی بذر بسیاری از گونه‌های دارویی را پس از تیمار چینه‌سرمایی نشان داده است که آسونگیا (*Amsoniatabernaemontana*)، گون (*Astragalusmembranaceus*)، سرخارگل (*Echinacea* spp.)، *Eucomisautumnalis* و *Schisandrachinensis* از آن جمله‌اند. به عنوان مثال در *Hippophaerhamnoidesturkestanica* کاربرد ۳ ماه چینه‌سرمایی و در *Crataeguslaevigata* و *Hamamelisvirginiana* ۱۸ ماه چینه‌سرمایی برای رفع خفتگی بذر پیشنهاد شد.در *Gentianalutea*، یک گیاه دارویی ریشه‌ای و چندساله، با شرایط اگرواکولوژیکی مشابه انجدان رومی، ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش برای غلبه بر رکود بذر استراتیفیکاسیون شناخته شد (۲۷، ۲۹). همچنین در تناظر با مشاهدات ما، سودمندی دمای پایین (چینه‌سرمایی) در رفع خفتگی بذر جمعیت‌هایزیره سیاه ایرانی (*Buniumpersicum*)، زیره سیاه اروپایی (*Carumcarvi*) نشان داده شد. در کرفس نیز، سرما می‌تواند جایگزینی برای استفاده از هورمون‌ها باشد.نیاز سرمایی بذر در زیره سیاه و *Inularacemosa* با کاربرد GA_3 جایگزین شد، ولی اثر یک ماه چینه‌سرمایی از اثر GA_3 و KNO_3 بیشتر بود. در زیره سیاه ایرانی،کاربرد حداقل ۲ ماه چینه‌سرمایی تنها تیمار مؤثر بر جوانه‌زنی بود. این مسئله بر پاسخ خاص‌گونه حتی در بین گونه‌های بسیار نزدیک دلالت دارد. علی‌رغم اینکه عدم کارآیی GA_3 در برطرف کردن خفتگی بذر زیره سیاه ایرانی نشان داده شده است، کاربرد GA_3 پس از اعمال چینه‌سرمایی یا تیمار با اسید منجر به افزایش چشمگیر جوانه‌زنی شد. در بذرهای *Saussureacostus*اثر یک ماه چینه‌سرمایی از کاربرد GA_3 یا KNO_3 بیشتر بود. در *Podophyllumhexandrum* سرما اثر بازدارنده و در *Hyoscyamusniger* اثری کمتر از اثر GA_3 و بیشتر از اثر KNO_3 داشت (۱۱، ۱۹، ۲۱، ۳۲).

اشتوتامایر (۳۳) اشکالات جوانه‌زنی گونه‌های ارکیده دارای مکانیسم خفتگی را در شرایط درون‌شیشه به چهار عامل مرتبط دانست: ۱) فقدان قابلیت جوانه‌زنی بذر نگهداری‌شده، ۲) حساسیت جنین به ضدعفونی سطحی، ۳) فقدان هورمون‌های مورد نیاز برای جوانه‌زنی و ۴) فقدان یا کافی نبودن تیمار چینه‌سرمایی؛ که به تفسیر نتایج پژوهش حاضر کمک می‌کند. کوچک بودن جنین، احتراز از رسیدن مواد ضدعفونی‌کننده به جنین یا تشکیل کالوس از بذر و پوسته آن و سعی در حفظ و بهره‌وری حداکثری از موجودی اندک بذر، مانع از آزمودن گزینه حذف مکانیکی پوسته و نجات جنین شد. با توجه به تمام نکات فوق، می‌توان گفت در این آزمایش، کنترل دقیق و یکنواخت شرایط محیطی و چینه‌سرمایی کافی از عوامل موفقیت بالای جوانه‌زنی در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- روند استقرار گیاهان استریل انجدان رومی و مراحل مختلف رشد: الف) پیدایش برگ‌های لپه‌ای؛ ب) انتقال به محیط غذایی MS و پیدایش برگ‌های اصلی؛ ج) رشد و تشکیل برگ بعدی؛ د) گیاهان آماده برداشت ریزنمونه.

نتیجه‌گیری

با کشت درون‌شیشه‌ای و دستیابی به توانایی‌های ذاتی گیاهان می‌توان روند طولانی رویش گیاه را کوتاه کرد. از سویی، توده‌های گیاهی بومی، ذخایر ملی هر کشور و دارای پتانسیل‌های بالقوه می‌باشند. انجدان رومی، گیاهی دارویی و معطر است که هم‌اکنون سهم چشمگیری در هیچ بازاری ندارد، اما دامنه مصارف گوناگونی از فضای سبز تا پخت و پز، آرایشی و دارویی دارد که موارد کاربرد آن، چندین بازار را پوشش می‌دهد. متأسفانه در دهه‌های اخیر، برداشت بی‌رویه و نامناسب از عرصه و خشکسالی، باعث شده تا این گونه در معرض تهدید و حتی انقراض قرار گیرد. (۹، ۱۰، ۱۶، ۳۴).

نتایج اولیه پروژه در بخش استقرار گیاهان استریل از بذر، حاکی از این است که با توجه به فاکتورهای درصد و سرعت جوانه‌زنی، بهترین پروتکل ضدعفونی سطحی شستشو با اتانول ۷۰ درصد برای ۳۰ ثانیه و سپس کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، و مؤثرترین روش چینه‌سرمایی اعمال ۱۲ هفته سرمای مرطوب در شرایط کنترل‌شده کشت بود. میزان گوناگونی زیادی از نظر نیاز سرمایی و زمان جوانه‌زنی هر بذر درون یک توده بذری و نیز بین توده‌های بذری مختلف یک گونه که در سال‌ها یا مکان‌های مختلف برداشت شده‌اند، می‌تواند وجود داشته باشد. بدیهی است بررسی رفتار هر جمعیت خاص برای حفاظت گونه و کشت تجاری آن ضروری است (۱۵، ۳۲). لذا نتایج ما اصولاً برای جمعیت مورد نظر قابل استفاده است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی پروژه نهایت قدردانی را دارند.

منابع

۱- امیدبیگی ر. ۱۳۷۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی، ج۳. به نشر. تهران.۴۰۰ صفحه.

۲- حاجیشریفیا. ۱۳۸۳.اسرارگیاهاندارویی؛راهنمایشناختوکاربردگیاهانطبیودرمان بیماری‌هایمختلف.انتشاراتحافظنوین.تهران.۹۶۰ صفحه.

۳- دینیم. ۱۳۸۴.اسامیعلمیگیاهانداروییمورددمصرفدرطبسنتی.مؤسسهتحقیقاتجنگل‌هاو مراتع.تهران.۴۲۰ صفحه.

۴- رهاییم. ۱۳۸۴.پتانسیلبیوتکنولوژیدرافزایشبهره‌وریازگیاهاندارویی.شبکهتحلیلگران تکنولوژیایران. http://bio.itan.ir/?Mode=print&ID=24. تاریخبازدید: ۱۳۸۷/۲/۸.

۵- میرحیدر ح. ۱۳۷۲. معارف گیاهی؛ کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. ج. ۲. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. تهران.۵۴۸ صفحه.

6- Al-Bakhit A.A.M., Sawwan J.S. and Al-Mahmoud M.S. 2007. *In vitro* propagation of two*Lavandula*species:*Lavandulaangustifolia*and*Lavandulalatifolia*L. *medica*. Jordan Journal of Agricultural

Archive of SID

www.SID.ir

Sciences, 3 (1):16-25.
7- Atal C.K. and Kapur B.M. 1982. Cultivation and Utilization of Medicinal Plants.Regional Research Laboratory, Jammu Tawi, India. P: 877.
8- Baker K.S., Steadman K.J., Plummer J.A., Merritt D.J. and Dixon K.W. 2005. Thechanging window of conditions that promotes germination of two fire ephemerals,*Actinotusleucocephalus* (Apiaceae) and *Tersoniacyathiflora* (Gyrostemonaceae). Annals of Botany, 96:1225-1236.
9- Blank I. and Schieberle P. 1993. Analysis of the seasoning-like flavour substances of acommerciallovage extract (*Levisticumofficinale* Koch.). Flavour and FragranceJournal, 8 (4):191-195.
10- Connolly J.D. and Butcher D.N. 1977. Secondary products in tissue cultures. pp. 684-685. In: ReinertJ. and Bajaj Y.P.S. (eds.), Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissueand Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
11- Durrani M.J., Qadir S.A., Farrulch H. and Hussain F. 1997. Germination ecology of*Buniumpersicum* (Boiss.) Fedtsch. And*Ferula oopoda* (Boiss. &Bulse.) Boiss. HamdardMedicus, 40:86-90.
12- Ellis R.H., Hong T.D. and Roberts E.H. 1985. Handbooks for Genebanks- No. 3, Handbook of Seed Technology for Genebanks- Vol. II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR Publication. www2.bioversityinternational.org/publications/Web_version/52/ch57.htm. Visited on 2007.09.24
13- Ernst T. 1989. *Pimpinellaanisum* L. (anise): Cell culture, somatic embryogenesis and theproduction of anise oil. pp. 381-397. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), Biotechnology in Agriculture andForestry: Medicinal and Aromatic Plants II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork.
14- Ervin G.N. and Wetzel R.G. 2002. Effects of sodium hypochlorite sterilization and dry cold storage on germination of *Juncuseffusus*L. Wetlands, 22 (1):191-195. http://www.bioone.org/doi/full/ 10.1672/0277-5212%282002%29022%5B0191%3AEOSHSA%5D2.0.CO%3B2. Visited on 2007.06.23.
15- Hartmann H.T.andKester D.E. 1983. Plant Propagation: Principles andPractices, 4th ed. Prentice-Hall International Editions, New York.p: 727.
16- Hogg C.L., Svoboda K.P. Hampson J.B. and Brocklehurst S. 2001. Investigation intothe composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticumofficinale* W.D. J. Koch). The International Journal of Aromatherapy, 11 (3):567-575.
17- Jevdović R., Filipović V., Jevdović J. and Pavlović R. 2005. Germination of the lovageseed in respect of fraction size and temperature at investigation. Journal of AgriculturalSciences, 50 (2):117-122.
18- Kansas State University. 2007. Germination Requirements of Herbs Grown in KSU Trials.http://www.oznet.ksu.edu/ksherbs/ksu_green_house.htm. Visited on 2007.09.24.
19- Kauth P. 2005. In vitro seed germination and seedling development of *Calopogontuberosus* and *Sacoilalanceolata* var. *lanceolata* – two Florida native terrestrialorchids. M.Sc. Thesis, University of Florida.p: 102.
20- Kroll H. 1999. Literature on archaeological remains of cultivated plants. Journal of Vegetation History and Archaeobotany, 8: 129-163.
21- Kulkarni M.G., Sparg S.G. and Staden J.V. 2006. Dark conditioning, cold stratificationand a smoke-derived compound enhance the germination of *Eucomisautumnalis* ssp.*autumnalis* seeds. South African Journal of Botany, 72 (1):157-162.
22- Leatherwood W.R. 2005. Influence of salt stress on germination, root elongation andcarbohydrate content of five salt tolerant and sensitive taxa. M.Sc. Thesis, NorthCarolina State University.p: 73.
23- Maguire J.D. 1962. Speed of germination. Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Journal of Crops Science, 2:176-177.
24- Mills S. and Bone K. 2000. Principles and Practice of Phytotherapy. ChurchillLivingston, Edinburgh. 643 pages.
25- Natural Resources Conservation Service (NRCS). 2001. The PLANTS Database, Version3.1., Plant distribution map complements of USDA. National Plant Data Center, BatonRouge. http://plants.usda.gov. Visited on 2007/11/28.
26- Pickens K.A., Affolter J.A. and Wetzstein H.Y. 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsiaeizii*In *vitro*. HortScience, 38(1):101-104.
27- Plants For Future.2004. Plants For A Future database reports. Plants for a future charitable company, England and Wales. http://www.pfaf.org/rich_home.html. Visited on 2007/05/19.
28- Puga-Hermida M.I., Gallardo M. and Matilla A.J. 2003. The zygotic embryogenesis andripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alternations in the levels of freeand conjugated abscisic acid and polyamins. PhysiologyPlantarum, 111:279-288.
29- Radanović D., Nastovski T., Pljevljakušić D. and Jevdović R. 2006. Growing results ofsome map species at mountainous region of Serbia. p. 84-93. In: *Proceedings from the ThirdConference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, December 31, 2004. Belgrade, Serbia. www.amapseec.org. Visited on 2007/06/23.
30- Ramawat K.G. and Merillon J.M. 1999. Biotechnology; Secondary Metabolites. NH. USA. Science Publisher.p:

Archive of SID

www.SID.ir

393.
31- Schmuths H., Bachmann K., Weber W.E., Horres R. and Hoffmann M.H. 2006.Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessionsof*Arabidopsis thaliana*. Annals of Botany, 97:623-634.
32- Sharma R.K., Sharma S. and Sharma S.S. 2006. Seed germination behaviour of somemedicinal plants of Lahaul and Spiti cold desert Himachal Pradesh: Implications forconservation and cultivation. Current Science, 90(8):1113-1118.
33- Stoutamire, W.P. 1964. Seeds and seedlings of native orchids. Michigan Botanist, 3:107-119.
34- Thomann R.J., Ehrich J. and Bauermann U. 1993. Distillation and use of essential oilsfrom dill, celery, lovage and parsley, made in Germany. ActaHorticultura, 333:101-111.
35- Tomita M. 1998. Effects of Sterilization time. Medium composition and temperature on germination of *Calypso bulbosa* (L.) Oakes var. *bulbosa* (Orchidacea) *in vitro*. Plant Biotechnology, 15(2):83-86.
36- Tripathi L. and Tripathi J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmacy Research, 2(2):243-253.
37- Wenny D.L. and Dumroese R.K. 1987. Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. Tree Planters Notes, 38(3):18-21.

Archive of SID

www.SID.ir