بررسی خواب بذر و تولید بذر مصنوعی در گیاه دارویی کلپوره (*Teucrium polium* L.)

سعیده سعادت[۱]، احمد مجد[۲]، لطفعلی ناصری[۳]، علیرضا ایرانبخش*[۴]، مراد جعفری[۵]

۱- دانشجوی دوره دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد تمام، گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳ - دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴*- استاد تمام، گروه زیست شناسی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: iranbakhsh@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷

چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاه دارویی مهم از خانواده نعنا (Lamiaceae) است که در معرض انقراض بوده و خواب بذر و جوانه‌زنی ضعیف آن از مشکلات اصلی زراعی آن می‌باشد. در این پژوهش اثر ۱۴ تیمار مختلف متشکل از جیبرلیک اسید، اسید سولفوریک و سرمادهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی شکستن خواب بذر کلپوره مطالعه شد. نتایج نشان داد بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشته و بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور در تیمار با اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و محلول اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و کمترین آن در تیمارهای خیساندن در آب و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته و کشت در محیط کشت MS مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تیمار اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک به همراه سرمادهی منجر به بیشترین درصد جوانه‌زنی بذور کلپوره شده که دال بر آن است که خواب بذر در کلپوره از نوع فیزیکی- فیزیولوژیک است. نتایج نشان داد که بذرهای مصنوعی با خاستگاه مریستم نسبت به بذرهای مصنوعی با خاستگاه رویان سوماتیکی تحت شرایط نگهداری اتاق رشد و یخچال از نظر درصد جوانه‌زنی، تولید ریشه و ساقه بهتر بوده است. بنابراین با روش‌های مذکور می‌توان مشکل زراعی این گیاه را برطرف نموده و با تولید بذر مصنوعی، از انقراض آن جلوگیری کرده و مواد اولیه‌ی کافی برای تولید داروهای مختلف با منشأ این گیاه را تأمین کرد.

.

واژه‌های کلیدی: بذر مصنوعی، جوانه‌زنی بذر، رکود بذر، *Teucrium polium* L.

مقدمه

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاه دارویی مهمی از خانواده نعناعیان است که برای بیش از ۲۰۰۰ سال در طب سنتی به علت خواص دارویی فراوان آن استفاده شده است (۱). کلپوره در طب سنتی به عنوان یک گیاه ضد دیابت و ضد باکتری شناخته شده و در درمان بی‌نظمی‌های روده‌ای-معده‌ای نیز کاربرد دارد (۲). اثرات آنتی اکسیدانت عصاره کلپوره (۳, ۴) و اثرات ضدسرطانی عصاره آن (۵-۷) گزارش شده است. این گیاه در صنایع دارویی به دلیل اثر ضد توموری به شدت مورد توجه قرار گرفته است (۸) و عصاره این گیاه می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی ریوی انسان را متوقف نماید (۹) و برای درمان سرطان روده بزرگ مفید است (۱۰) و نانوذرات نقره بیوسنتز شده از این گیاه بر سلول‌های سرطان معده انسان تاثیر درمانی خوبی دارد (۱۱). براساس تحقیقات اخیر ساجدی و همکاران در سال ۲۰۲۳، این گیاه دارویی دارای خاصیت ضدباکتری می‌باشد (۱۲). این گیاه دارویی و معطر در مقیاس صنعتی قابل ارزیابی بوده و به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی بررسی شده در تحقیقات اخیر، در صنایع مختلف از جمله داروسازی و آرایشی و بهداشتی می‌توان مورد استفاده قرار داد (۱۳). از سوی دیگر تجزیه و تحلیل ترکیبات مختلف فیتوشیمیایی (فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ساپونین ها) عصاره *Teucrium polium* نشان داد که این گیاه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی مناسبی است (۱۴, ۱۵).

از موانع رایج در زمینه کاشت گیاهان دارویی از جمله کلپوره این است که به دلیل داشتن خواب بذر، جوانه‌زنی بذرها در شرایط آزمایشگاهی یا زراعی مطلوب نبوده و بنابراین زراعت و اهلی‌سازی آنها با مشکل مواجه شده و همچنین در رویشگاه‌های طبیعی نیز در معرض انقراض قرار دارند (۲, ۱۶). خواب بذر، استراحت یا وقفه موقت در رشد گیاه بوده که در این وضعیت با وجود مناسب بودن شرایط برای جوانه‌زنی، بذر به مدت نامعلومی در حالت استراحت باقی می‌ماند. خاستگاه خواب ممکن است مواد شیمیایی درون پوشش بذر، داخل رویان و یا از هر دو مسیر به بذور تحمیل گردد (۱۷, ۱۸). خواب ناشی از پوشش بذر ممکن است به دلیل نفوذناپذیری لایه‌های کوتینی موجود در پوسته به آب و گازها یا به دلیل وجود بازدارنده‌های شیمیایی در پوسته باشد و خیساندن بذور در آب تا حدی در شکستن این خواب موثر است (۱۷, ۱۹, ۲۰). خواب و جوانه‌زنی بذور به ساختار بذر و فاکتورهای موثر بر جوانه‌زنی رویان وابسته است. اساس خواب بذر در گونه‌های گیاهی مختلف متنوع بوده، ولی به طور کلی به گروه‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی، مورفو-فیزیولوژیکی، فیزیکی و یا ترکیب فاکتورهای فیزیکی و فیزیولوژی دسته‌بندی می‌شود (۲۳-۲۱). وجود خواب بذر در گیاهان دارویی مانعی جدی برای جوانه‌زنی آنها بوده و بنابراین توسعه راهکارهایی جهت شکستن آن ضروری است. برای مطالعه اثر عوامل مختلف بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر لازم است که خواب بذر به صورت آزمایشگاهی و با روش‌های ساده، کم هزینه، سریع و اثربخش از بین رود. به عبارت دیگر برای به دست آوردن درصد بالایی از جوانه‌زنی در یک دوره زمانی کوتاه، ضروری است که کاربرد پیش تیمارهای ویژه، مورد بررسی قرار گیرد (۱۶). معمولاً دوره سرمادهی باعث حذف خواب اولیه در بسیاری از گونه‌های گیاهی نیمکره شمالی می‌شود، در واقع سرمادهی باعث افزایش غلظت جیبرلیک اسید و غلبه بر خواب بذر می‌شود (۲۴). از مشکلات مربوط به زراعت کلپوره، درصد و سرعت جوانه‌زنی ضعیف آن است که احتمالاً مربوط به حضور خواب بذر در آن باشد. دشتی و همکاران سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای به منظور شکستن خواب بذر گیاه دارویی *Allium hirtifolium* از سه تیمار اسید سولفوریک، تیمار سرمادهی و جیبرلیک اسید و ترکیب آنها استفاده کردند (۲۵). این محققان گزارش نمودند که بیشترین میزان جوانه‌زنی در ترکیب تیماری غوطه‌ورسازی ۵ دقیقه در اسید سولفوریک و به دنبال آن ۶۰ روز تیمار سرمادهی حاصل شد.

در مطالعه‌ای به منظور شکستن خواب بذر گیاه دارویی *Ferula assa foetida* L. گزارش شد که ترکیب تیماری شستشوی بذرها به مدت ۶ ساعت، نگهداری آنها به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد، در محیط MS/2 حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید به طور معنی‌داری منجر به افزایش جوانه‌زنی آن شد (۲۶). محققان گزارش نمودند که ترکیب خراش‌دهی مکانیکی و پراکسید هیدروژن ۵ درصد به منظور شکستن خواب و بهبود جوانه زنی بذر گیاه دارویی *Teucrium marum* موثر بوده است (۲۷).

باید اشاره نمود که فن‌آوری تولید بذر مصنوعی از موضوعات نوین در علوم گیاهی بوده که در دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است و تکثیر گیاهان با این روش چشم اندازهای جدیدی را در کشاورزی باز نموده است. بذر

مصنوعی عبارت است از یک پروپاگول گیاهی پوشش‌دار شده در یک ماده زمینه‌ای یا بستره (ماتریکس)، که توانایی رشد به صورت یک گیاه کامل را دارد. پروپاگول گیاهی ممکن است شامل رویان‌های پیکری، جوانه‌های رأسی، جوانه‌های جانبی، کالوس‌های رویانی و اندام‌زا و پرتوکورم یا اجسام شبیه پرتوکورم باشد که در شرایط سترون در کشت بافت رشد کرده است. این پروپاگول‌ها به آسانی می‌توانند در محیط کشت رشد کرده و تبدیل به گیاهچه گردند (۲۸). اولین بار، این کار توسط Kitto و Janick در ۱۹۸۲ از رویان‌های سوماتیکی هویج انجام شد که بذرهای مصنوعی خشک به دست آوردند (۲۹). بعد از آن در ۱۹۸۴ Redenbaugh و همکاران موفق به تولید بذر مصنوعی با استفاده از کپسولی کردن با آلژینات هیدروژل در گیاه یونجه شدند (۳۰). بعد از آن دانشمندان زیادی موفق به تولید بذر مصنوعی در گونه‌های مختلف گیاهی شدند (۳۱). مزیت کپسوله کردن واحدهای تکثیری تک قطبی مشابه با ریزازدیادی است. راندمان تولید بالا، پتانسیل ذخیره، اندازه کوچک آنها و شرایط استریل تولید از مزیت‌های مهم این نوع بذور برای آسانی تبادلات می‌باشد. البته تنوع سوماکلونال کاهش می‌یابد زیرا موتاسیون اغلب در طی فرآیند تمایززدایی و تمایززایی مجدد رخ می‌دهد. در گیاه یونجه از جوانه‌های مریستمی برای کپسوله کردن استفاده شده و شاخص موتاسیون بسیار پایین بود، اما جوانه‌های‌بخش های مختلف یک گیاه ممکن است از نظر پاسخ به رشد مجدد، خواب و همچنین فقدان سیستم نوک ریشه متفاوت باشند. نوک شاخه‌های کپسوله شده عموماً مواد بهتری برای تبادلات ژرم پلاسم محسوب می‌شود (۳۲). پوشش‌گذاری مریستم حاصل از کشت درون شیشه گیاهان با آلژینات در توسعه فن‌آوری بذر مصنوعی به عنوان یک جایگزین مناسب برای رویان‌های سوماتیکی به کار گرفته شده است (۳۳, ۳۴). با وجود قدرت جوانه‌زنی ضعیف بذرهای کلپوره مطالعات محدودی بر روی آن در ایران انجام شده و تاکنون هیچ گونه گزارشی بر روی توده بومی ارومیه و تولید بذر مصنوعی در آن صورت نگرفته است، بنابراین ضروری است که جوانه‌زنی بذر و همچنین تولید بذر مصنوعی در کلپوره بررسی گردد. لذا اهداف تحقیق حاضر مطالعه‌ی اثر تیمارهای مختلف متشکل از جیبرلیک اسید، اسید سولفوریک و سرمادهی جهت یافتن روشی برای شکستن خواب بذر گیاه دارویی کلپوره و همچنین ارزیابی اثر خاستگاه بذر مصنوعی (مریستم، رویان سوماتیکی)، روش نگهداری (اتاق رشد، یخچال ۴ درجه سانتی گراد، فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد) و مدت زمان نگهداری (یک هفته، دو هفته، سه هفته، چهار هفته) بر تولید بذر مصنوعی در آن به منظور اجرای گام نخست در راستای اهلی‌سازی کلپوره است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در قالب دو آزمایش شکستن خواب بذر و تولید بذر مصنوعی در گیاه دارویی کلپوره اجرا شد.

جمع‌آوری نمونه ها

گیاه کلپوره به همراه بذور آن در شهریور ماه ۱۳۹۳ از استان آذربایجان غربی و منطقه دره شهدا واقع در جنوب شهر ارومیه و ارتفاع حدود ۱۴۰۰ متر بالاتر از سطح دریا جمع‌آوری شد. بذرها در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی شناسایی (کد ۹۵۲۸) و ذخیره شد.

آزمایش اول: شکستن خواب بذر

به منظور اجرای این آزمایش در مجموع ۲۹ تیمار مختلف برای شکستن خفتگی بذر و جوانه‌زنی بذور گیاه کلپوره مورد استفاده قرار گرفت که در پانزده تیمار هیچگونه جوانه‌زنی مشاهده نگردید، بنابراین از آنالیز آنها صرفنظر شد. سایر تیمارهای اعمال شده (۱۴ تیمار) که جوانه‌زنی بذر در آنها مشاهده گردید، در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول۱- ۱۴ تیمار اعمال شده که جوانه‌زنی بذر در آنها مشاهده گردید.

مرحله کشت	مراحل مختلف ضدعفونی و تیمار				نام تیمار
	مرحله چهارم	مرحله سوم	مرحله دوم	مرحله اول	
کشت در محیط MS			ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد (به مدت ۴ دقیقه)	ضدعفونی با اتانول ۷۰ درصد (به مدت۱ دقیقه)	A (تیمار شاهد)
کشت در محیط MS	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با اتانول۷۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	تیمار با هورمون اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 به مدت ۱۲۰ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد)	تیمار با اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه	B
کشت در محیط MS	تیمار با آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)	تیمار با آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت (در دمای آزمایشگاه)	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	C
کشت در محیط MS		تیمار با اسید جیبرلیک GA3 (۲۵۰ppm) استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	D
کشت در محیط MS		تیمار با اسید جیبرلیک GA3 (۱۵۰۰ppm) استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	E
کشت در محیط MS	تیمار با اسید جیبرلیک GA3 (۱۵۰۰ppm) استریل به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال	تیمار با اسید جیبرلیک GA3 (۱۵۰۰ppm) استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	F
کشت در محیط MS	تیمار با آب استریل به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال	تیمار با آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	G
کشت در محیط MS	تیمار با هورمون اسید جیبرلیک (۱۵۰۰ppm) GA3 استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	تیمار با اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۵ دقیقه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	H
کشت در محیط MS	تیمار با آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	تیمار با اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۵ دقیقه	شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	I
گذاشتن بذرها در پتری دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی استریل و مرطوب در در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد		شستشو با آب دیونیزه استریل (به مدت ۵ دقیقه)	تیمار با اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 به مدت ۲۴ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال)	تیمار با اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	J

گذاشتن بذرها در پتری دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی استریل و مرطوب در در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد			تیمار با اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 به مدت ۲۴ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد)	تیمار با اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	K
گذاشتن بذرها در پتری دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی استریل و مرطوب و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد	تیمار با آب استریل به مدت ۲۴ ساعت (در دمای آزمایشگاه)	خراش دهی مکانیکی و با آب استریل به مدت ۲۴ ساعت (در دمای آزمایشگاه)	تیمار با اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 به مدت ۲۴ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد)	تیمار با اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	L
کشت در محیط MS	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد (به مدت ۵ دقیقه)	ضدعفونی با اتانول ۷۰ درصد (به مدت یک دقیقه)	تیمار با اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 به مدت ۱۲۰ ساعت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد)	تیمار با اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۵ دقیقه	M
کشت در محیط MS	تیمار با آب استریل (داخل پتری‌دیش استریل) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	تیمار با آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه	ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم۱۰ درصد (به مدت۸ دقیقه)	ضدعفونی با اتانول۸۰ درصد (به مدت۱ دقیقه)	N

در مطالعه حاضر، هر پتری‌دیش به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و در هر کدام ۲۵ عدد بذر کشت گردید. به مدت ۷۰ روز و هر ۲۴ ساعت بذوری که ریشه چه آنها قابل رویت بود، شمارش و از پتری‌دیش خارج گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، به منظور بررسی نرمال بودن توزیع آنها از آزمون اسمیرنف-کلموگراف استفاده شد. جهت محاسبه درصد جوانه‌زنی، تعداد بذور جوانه‌زده در هر پتری را به تعداد کل بذور کشت شده در آن را تقسیم نموده و در عدد ۱۰۰ ضرب شد و بدین روش درصد جوانه‌زنی بذر برآورد گردید. به منظور برآورد سرعت جوانه‌زنی بذور در تیمارهای مورد مطالعه نیز از رابطه زیر استفاده گردید.

$$Rs=\sum_{i=1}^{n} Si/Di$$

که در آن، Rs سرعت جوانه زنی، Si تعداد بذرهای جوانه زده در هر شمارش، Di تعداد روز تا شمارش iام و n دفعات شمارش می‌باشد (۳۵). آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ تیمار و سه تکرار اجرا شد و به منظور مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی از روش دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel، SPSS Ver.16و SAS 9.2 صورت پذیرفت.

آزمایش دوم: تولید بذر مصنوعی

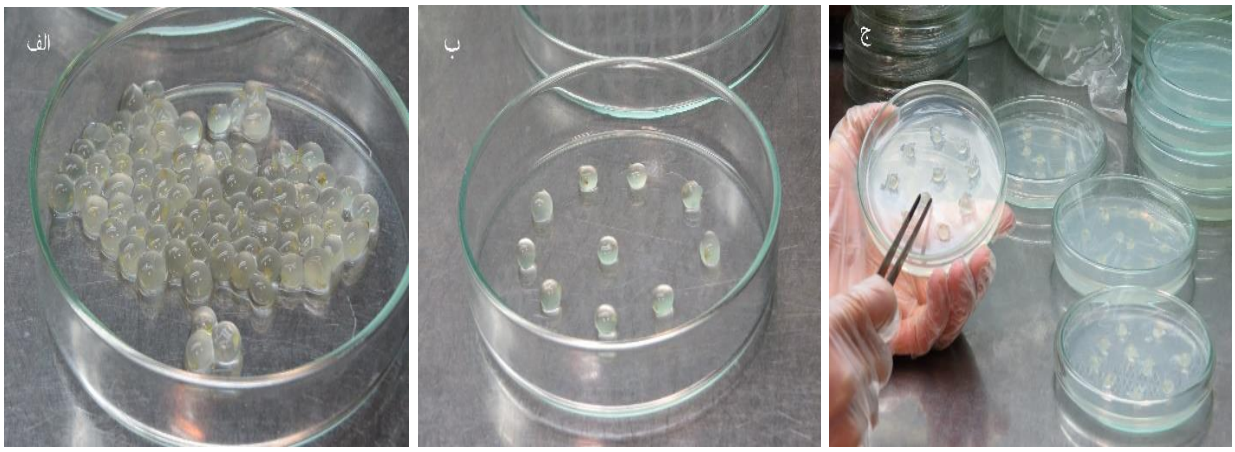
آماده‌سازی بافت‌های گیاهی

در این آزمایش به منظور تولید بذر مصنوعی کلپوره، از دو بافت مختلف گیاهی شامل مریستم گیاهچه استریل کلپوره و رویان حاصل از کالوس رویان‌زا استفاده گردید. به منظور دستیابی به گیاهچه‌های استریل، بذرهای ضدعفونی شده کلپوره در محیط کشت جامد MS کشت شده و سپس در اتاق رشد با شرایط نوری (۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس)، ۸ ساعت تاریکی) و دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری و پس از رشد کافی مریستم از آنها جدا گردید. رویان حاصل از کالوس رویان‌زا نیز در مرحله کوتیلدونی از کالوس جدا و پوشش‌گذاری هر دو بافت گیاهی با استفاده از ماده آلژینات صورت پذیرفت (۳۶).

نحوه پوشش‌گذاری و تولید بذر مصنوعی

به منظور پوشش‌دار نمودن بافت‌های گیاهی از جمله مریستم گیاهچه‌های استریل و رویان حاصل از کالوس رویان‌زا، ابتدا این بافت‌ها با محلول ۳ درصد سدیم آلژینات مخلوط و سپس به طور جداگانه درون محلول کلریدکلسیم منتقل شدند. این ذرات آلژینات که هر کدام حاوی یک

مریستم یا رویان بودند، برای پلیمریزاسیون و تکان دادن آرام، به مدت حدود ۲۰ دقیقه به محلول کلرید کلسیم منتقل و روی شیکر با دور آرام نگهداری شدند. سپس مهره‌های آلژیناتی به دست آمده (مریستم و رویان پوشش‌دار شده) با آب مقطر استریل شستشو و به عنوان بذر مصنوعی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل۱).



شکل ۱- بافت‌های گیاهی پوشش‌دار شده جهت تولید بذر مصنوعی و نگهداری در پتری خالی و کشت در MS

اثر نوع بافت گیاهی، روش نگهداری و مدت زمان نگهداری بر جوانه‌زنی بذور مصنوعی از طریق انتقال بذرهای مصنوعی به ظروف خالی استریل، مسدود کردن آنها با پارافیلم و سپس در شرایط مختلف از جمله فریزر (۲۰- درجه سانتی گراد)، یخچال (۴ درجه سانتی گراد) و دمای اتاق رشد (۲۵ درجه سانتی گراد) در شرایط تاریک و برای دوره‌های زمانی یک هفته، دو هفته، سه هفته و چهار هفته نگهداری شدند. سپس بذور مصنوعی در محیط MS کشت شده و در اتاق رشد در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی گراد و ۷۵ درصد رطوبت نسبی نگهداری شدند. بعد از گذشت حدود یکماه، درصد جوانه‌زنی بذور، طول ریشه و طول ساقه گیاهچه یک ماهه برای هر تیمار ثبت گردید.

تبدیل بذرهای مصنوعی تهیه شده به گیاهچه کامل

بذرهای مصنوعی که در پتری‌های خالی و استریل ذخیره شده بودند، پس از اتمام مدت زمان لازم برای هر دوره نگهداری، جهت تبدیل به گیاهچه‌های کامل در شرایط درون شیشه در محیط کشت‌های MS جامد بدون هورمون کشت و سپس به اتاق رشد منتقل شدند (شکل۱). در هر پتری ۱۰ عدد بذر مصنوعی استفاده و هر آزمایش بصورت سه بار تکرار انجام شد. تمامی کشت‌ها در اتاق رشد دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی گراد با ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی کپسوله شده و تشکیل ریشه و ساقه هر بذر مصنوعی یک ماه بعد از هر کشت ثبت شد.

آنالیز آماری

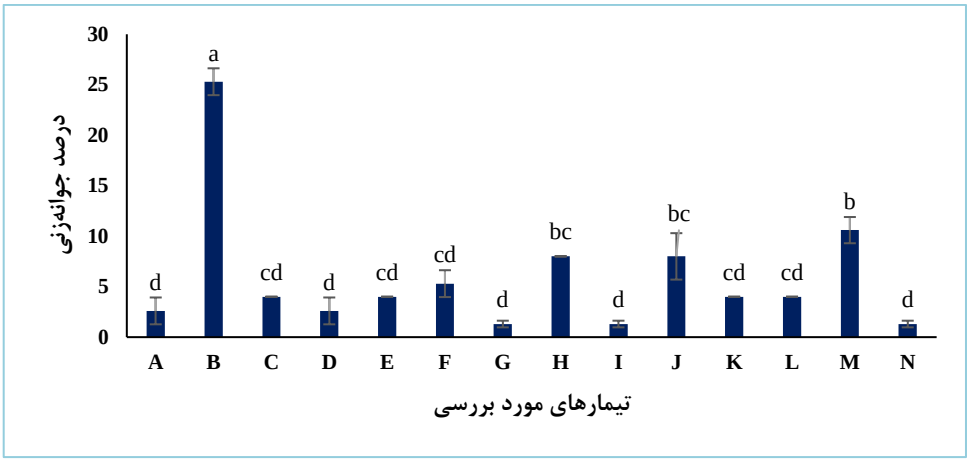
تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش، بعد از بررسی نرمال بودن با آزمون کولمینگروف اسمیرنف به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح بلوک کامل تصادفی با سه فاکتور نوع بافت گیاهی (مریستم و رویان)، روش نگهداری (اتاق رشد ۲۵ درجه سانتی گراد، یخچال ۴ درجه سانتی گراد، فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد) و مدت زمان نگهداری (یک هفته، دو هفته، سه هفته و چهار هفته)، با استفاده از نرم افزار SPSS، SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، به منظور انجام مقایسه میانگین از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ $p \leq$ استفاده شد و به منظور ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

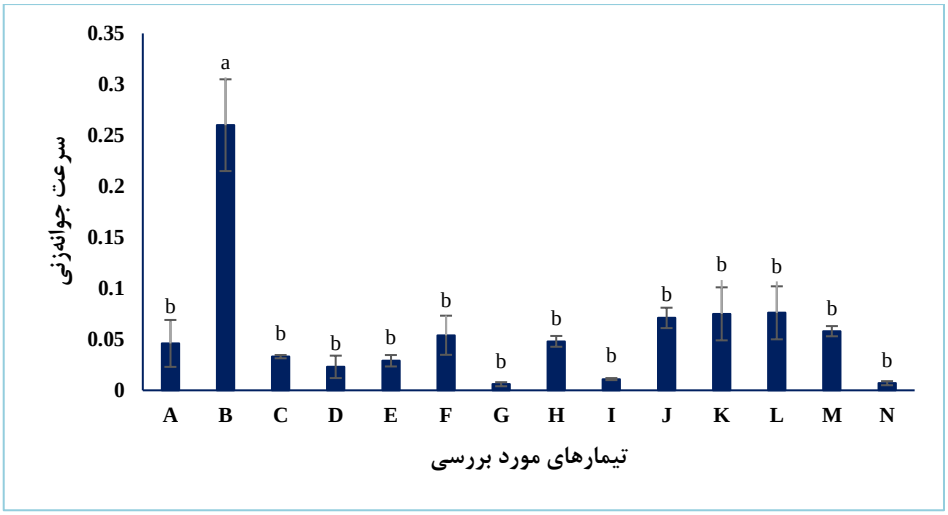
شکستن خواب بذر

نتایج حاصل از بررسی تیمارهای مختلف بر روی درصد و سرعت جوانه‌زنی بر روی بذر کلپوره نشان داد که بین تیمارهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۲ و ۳). در مطالعه حاضر، کمترین میزان جوانه‌زنی در تیمارهای G: نگهداری بذور در آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه و سپس انتقال به دمای۴ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته و انتقال به محیط کشتMS، تیمار I: خیساندن در اسید سولفوریک ۷۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه و انتقال به محیط کشتMS، تیمار N: خیساندن در آب استریل داخل پتری‌دیش به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه و با آب استریل داخل پتری‌دیش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. تیمار شاهد (A) نیز با ضعیف‌ترین تیمارها تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۱ و ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار سرما به تنهایی اثر قابل توجهی بر روی جوانه‌زنی بذور کلپوره نداشته و این رخداد دال بر آن است که عوامل ایجاد کننده خواب بذر به گونه‌ای است که تیمار سرما به تنهایی نتوانسته سبب شکستن آن شود. شاکری و همکاران نیز اظهار نمودند که تیمار سرمادهی بر جوانه‌زنی بذرهای گیاه دارویی مریم نخودی تاثیری نشان نداده است (۳۷).

گرچه برخی از محققان اذعان دارند که خیساندن بذور در آب و متعاقب آن تیمار سرمادهی بدون کاربرد اسیدهای جیبرلیک و سولفوریک منجر به شکستن خواب بذر در برخی گیاهان شده است (۳۸)، ولی در مطالعه حاضر اعمال این تیمارها با مدت زمان‌های مختلف (تیمارهای G و N) اثر قابل توجهی در شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی نداشته که ناشی از پوسته بذر کلپوره و خواب فیزیکی است (شکل ۲ و ۳).

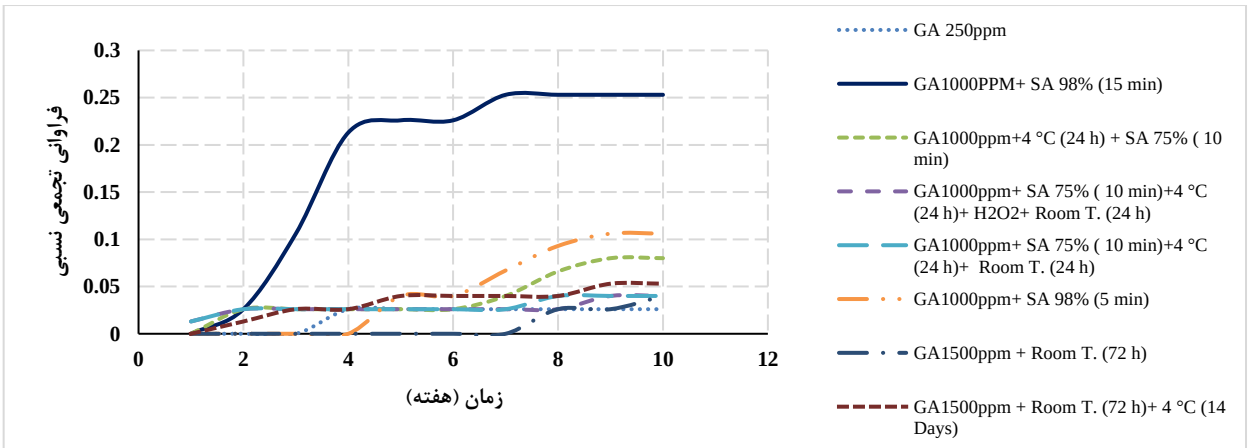


شکل۲- مقایسه میانگین تیمارهای مطالعه شده بر روی درصد جوانه‌زنی بذور کلپوره به روش دانکن. وجود حداقل یک حرف مشترک بر روی هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد در بین تیمارهاست. در تیمارهای G و N سرمادهی بذرها بدون کاربرد اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک و در تیمار I که صرفا از اسید سولفوریک ۷۵ درصد استفاده شد، کمترین میزان درصد جوانه زنی بذر مشاهده شد. تیمار B که بذرها تحت تیمار اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 و سرمادهی قرار گرفتند، نسبت به سایر تیمارها دارای تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است و بیشترین میزان درصد جوانه زنی بذر را دارد.



شکل۳- مقایسه میانگین تیمارهای مطالعه شده بر روی سرعت جوانه‌زنی بذور کلپوره به روش دانکن. وجود حداقل یک حرف مشترک بر روی هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد در بین تیمارهاست. در تیمارهای G و N سرمادهی بذرها بدون کاربرد اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک و در تیمار I که صرفا از اسید سولفوریک ۷۵ درصد استفاده شد، کمترین سرعت جوانه زنی بذر مشاهده شد. تیمار B که بذرها تحت تیمار اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) GA3 و سرمادهی قرار گرفتند، نسبت به سایر تیمارها دارای تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است و بیشترین سرعت جوانه زنی بذر را دارد.

در مطالعه حاضر مشاهده گردید بذوری که صرفاً با اسید سولفوریک ۷۵ درصد تیمار شده بودند (تیمار I) جوانه‌زنی ضعیفی در آنها رخ داده است (شکل ۲ و ۳). با توجه به تاثیر ضعیف اسید سولفوریک در جوانه‌زنی بذر کلپوره این احتمال را تقویت می‌کند که خواب بذر در کلپوره تنها به دلیل موانع فیزیکی از جمله پوسته غیرقابل نفوذ آن به آب و گازها نبوده و احتمالاً مواد شیمیایی بازدانده جوانه‌زنی در گیاه دارویی کلپوره در رویان بذر نیز حضور دارد، بنابراین تیمار اسید سولفوریک به تنهایی موثر نبوده است. در دیگر مطالعات نیز گزارش شده که تاثیر اسید سولفوریک در شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی ضعیف است (۳۹).

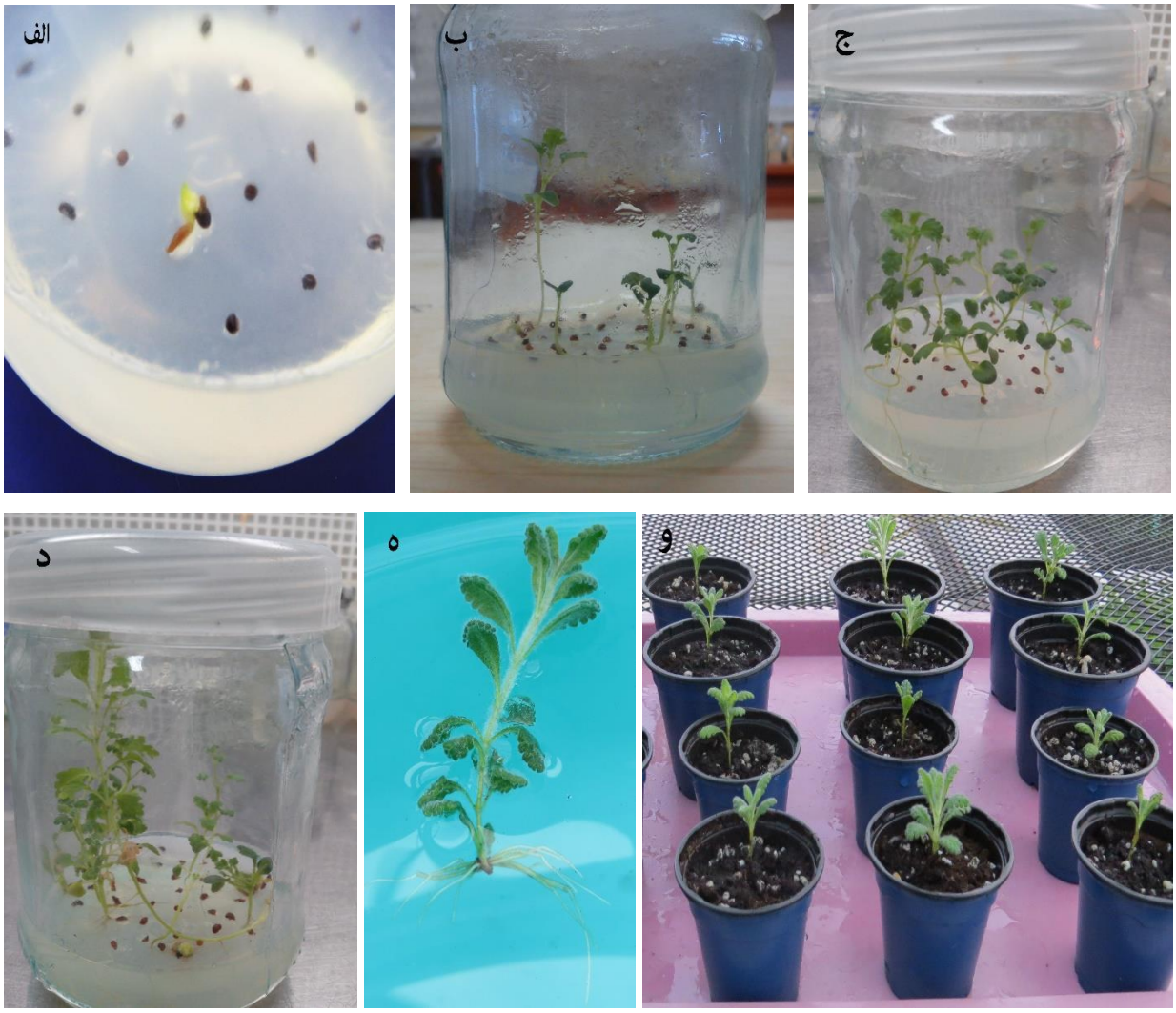


شکل۴- فراوانی تجمعی نسبی جوانه‌زنی در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک.

نتایج نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۲۵ درصد) و بیشترین سرعت جوانه‌زنی زمانی حاصل شد که بذور پس از ضدعفونی درون اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه خیسانده و سپس به درون محلول اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) به مدت ۱۲۰ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. همچنین قابل ذکر است بیشترین فراوانی تجمعی نسبی جوانه‌زنی نیز در همین تیمار مشاهده گردید (شکل ۲، ۳، ۴ و ۵). کاربرد این دو اسید در غلظت‌های ذکر شده علاوه بر نفوذ پذیر نمودن پوسته‌ی بذر به آب و گازها منجر به تسریع فعل انفعالات شیمیایی ضروری جوانه‌زنی بذر شده است (شکل۲، ۳ و ۴). محققان اظهار نمودند که خواب فیزیولوژی معمولا بوسیله سرما و اسید جیبرلیک قابل کنترل است. در واقع سرما باعث تغییر نسبت هورمون‌های درونی بذر از جمله جیبرلین شده و این هورمون پس از فعال‌سازی آنزیم‌های تجزیه کننده ذخیره غذایی منجر به فراهم‌سازی این مواد، تغذیه رویان و در نهایت جوانه‌زنی بذر می‌شود (۲۲). مطالعات نشان داده که اسید جیبرلیک نیز از طریق القا جوانه‌زنی خواب بذر را کنترل نموده و همچنین در شکستن خواب بذر حاصل از پوسته بذر نیز موثر است، در واقع این اسید قادر است با القا جوانه‌زنی تمام خصوصیات جوانه‌زنی را ارتقا دهد (۴۰). از آنجایی که اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک به ترتیب در شکستن خواب‌های ناشی از عوامل فیزیکی و فیزیولوژی موثر می‌باشند و اعمال این دو اسید در مطالعه حاضر منجر به بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شده است، بنابراین می‌توان اظهار نمود که خواب بذر در کلپوره از نوع فیزیکی-فیزیولوژی بوده است. جعفری و عبدالهی مندولکانی گزارش نمودند که در خانواده‌های گیاهی Lamiaceae و Myrtaceae تیمار ترکیبی خراش‌دهی با اسید سولفوریک به همراه جیبرلیک اسید نسبت به حالت جداگانه آنها اثر تحریک‌کنندگی بهتری برای جوانه‌زنی بذور دارد که منطبق با نتایج این مطالعه است (۱۶). لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر تیمار B و تیمار M اعمال شده بر روی بذور گرچه از نظر ترکیبات شیمیایی (اسید سولفوریک ۹۸ درصد و اسید جیبرلیک ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) مشابه بودند، ولی در تیمار B مدت زمان خیساندن بذور در اسید سولفوریک بیشتر بوده که موجب پاسخ بهتر سرعت و درصد جوانه‌زنی بذور شده است (شکل ۲، ۳ و ۴).

در واقع با افزایش مدت زمان تماس اسید با بذور نفوذپذیری آن نسبت به آب و گازها بیشتر شده و جوانه‌زنی آنها به طور موثری تحت تاثیر قرار گرفته است. در این مطالعه بذور جوانه زده در تیمارهای مطلوب از جمله تیمار B تا تولید گیاهچه کامل نگهداری شدند و بر طبق نتایج دیگر محققان (۲, ۴۱) فرآیند سازگارسازی آنها انجام گردید (شکل ۵). Sharma و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه خود گزارش نمودند که بیشترین میزان جوانه‌زنی در گیاه دارویی *Viola sp.* در تیمار سرمادهی همراه با اسید جیبرلیک با غلظت (۱۰۰۰ppm) مشاهده گردید (۴۲). بررسی غلظت تیمارهای اعمال شده در این مطالعه حاکی از آن بود که اسید سولفوریک در غلظت ۹۸ درصد نسبت به غلظت ۷۵ درصد در شکستن خواب بذر بهتر عمل نموده است. اسید جیبرلیک در غلظت‌های مختلف علاوه بر تاثیر روی شکستن خواب بذر به عنوان یک اسید ضعیف نیز بر روی رویان اثر منفی دارد، به طوری که در مطالعه حاضر غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام برای شکستن خواب بذر مطلوب نبوده و بهترین اثر خود را در غلظت (۱۰۰۰ppm) نشان داده است. لازم به ذکر است که غلظت بهینه اسید جیبرلیک از طریق تجزیه ذخایر غذایی بذر و جایگزینی نیاز سرمایی آن در شکستن خواب بذر تاثیر به سزایی داشته و منجر به تحریک جوانه‌زنی بذر می‌شود (۴۳).

کوچکی و عزیزی در مطالعه خود گزارش نمودند که اسید جیبرلیک در غلظت (۵۰۰ppm) منجر به بیشترین درصد جوانه‌زنی در گیاه مریم نخودی شده است (۳۹). به طور کلی با توجه به اینکه شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی قابل توجهی در تیمارهایی که سرمادهی و یا اسید سولفوریک به تنهایی اعمال شده بود مشاهده نگردید و از طرف دیگر بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت اعمال اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و متعاقب آن انتقال به درون محلول اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) به مدت ۱۲۰ ساعت و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد مشاهده گردید، لذا می‌توان نتیجه گرفت که خواب بذر در کلپوره از نوع فیزیکی-فیزیولوژی بوده و با اعمال این تیمار موانع جوانه‌زنی آن برطرف شده تا در روند زراعی نمودن آن تسریع حاصل گردد.



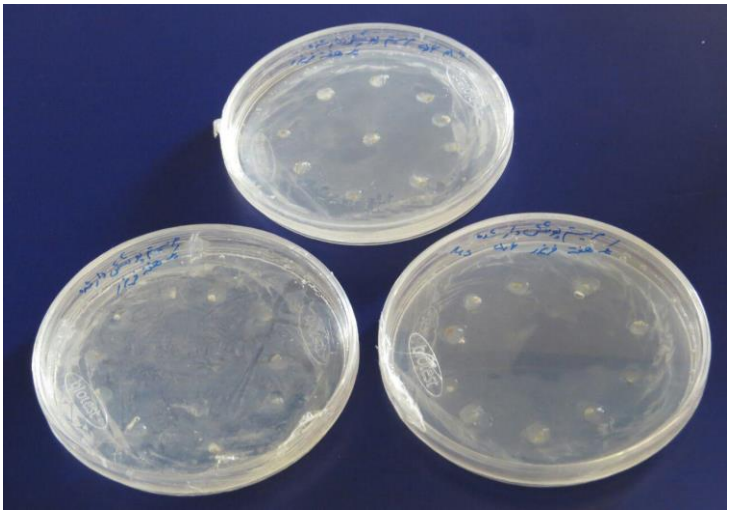
شکل۵- مراحل مختلف جوانه‌زنی بذر تا گیاه کامل در کلپوره تحت اعمال تیمار B: خیساندن در اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و نگهداری در اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و انتقال به محیط کشت موراشیگ-اسکوگ (MS).

تولید بذر مصنوعی

در سال‌های اخیر فن‌آوری تولید بذر مصنوعی به عنوان یک کاربرد مهم تکنیک‌های کشت سلول و بافت مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر متقابل سه‌گانه عوامل مورد بررسی از جمله خاستگاه بذر مصنوعی * روش نگهداری * زمان نگهداری بر روی صفات مورد مطالعه از جمله درصد جوانه‌زنی بذور مصنوعی، طول ریشه و طول ساقه گیاهچه معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که ترکیب تیماری (خاستگاه مریستم+ شرایط اتاق رشد+ نگهداری به مدت چهار هفته، مریستم+ شرایط اتاق رشد+ نگهداری به مدت دو هفته، مریستم+ شرایط دمای اتاق رشد+ نگهداری به مدت یک هفته، مریستم+ شرایط یخچال+ نگهداری به مدت سه هفته و مریستم+ شرایط یخچال+ نگهداری به مدت چهار هفته) بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشته است (جدول ۲).

مشاهده‌ی مقاومت نسبی بالا به سرما در شرایط نگهداری یخچال در مریستم‌ها و رویان‌های پوشش‌دار شده را می‌توان به نقش محافظتی مرتبط با کپسول آلژینات نسبت داد (۴۴). سونجی و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که حدود ۴۷-۷۵ درصد از جوانه‌های آناناس پوشش‌دار شده پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جوانه زده‌اند (۴۵). در مطالعه‌ی حاضر کمترین مقدار جوانه‌زنی بذور

مصنوعی در ترکیبات تیماری متشکل از هر دو خاستگاه گیاهی از جمله رویان سوماتیکی و مریستم و تحت شرایط نگهداری فریزر در زمان‌های نگهداری مختلف مشاهده گردید (جدول ۲ و شکل ۶).



شکل۶- بذرهای مصنوعی کلپوره (*Teucrium polium* L.) با خاستگاه رویان که در شرایط استریل به مدت دو هفته در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند، نتوانستند جوانه بزنند.

می‌توان اظهار نمود که شرایط نگهداری فریزر اثر منفی بر جوانه‌زنی بذور مصنوعی با هر دو منبع بافت گیاهی مریستم و رویان سوماتیکی داشته و لذا این شرایط برای نگهداری و جوانه‌زنی بذور مصنوعی مطلوب نیست. از آنجایی که جوانه‌زنی بذور مصنوعی در شرایط نگهداری در فریزر با مشکل روبرو شده، از این رو می‌توان گفت که برای دستیابی به موفقیت بیشتر در شرایط نگهداری فریزر، باید از بروز کمبود آب در بافت‌های گیاهی تا رسیدن آن به شرایط رشد طبیعی جلوگیری شود (۴۶). لذا به نظر می‌رسد که بستر آلژینات پوشش دهنده رویان و مریستم، فشار مکانیکی لازم را در این شرایط نداشته و به طور موثری روند خشک شدن را کند ننموده تا بافت گیاه بتواند در حین ذخیره در داخل کپسول زنده بماند (۴۶).

جدول۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری مطالعه شده بر روی درصد جوانه زنی، طول ریشه و ساقه گیاهچه‌های یک ماهه.

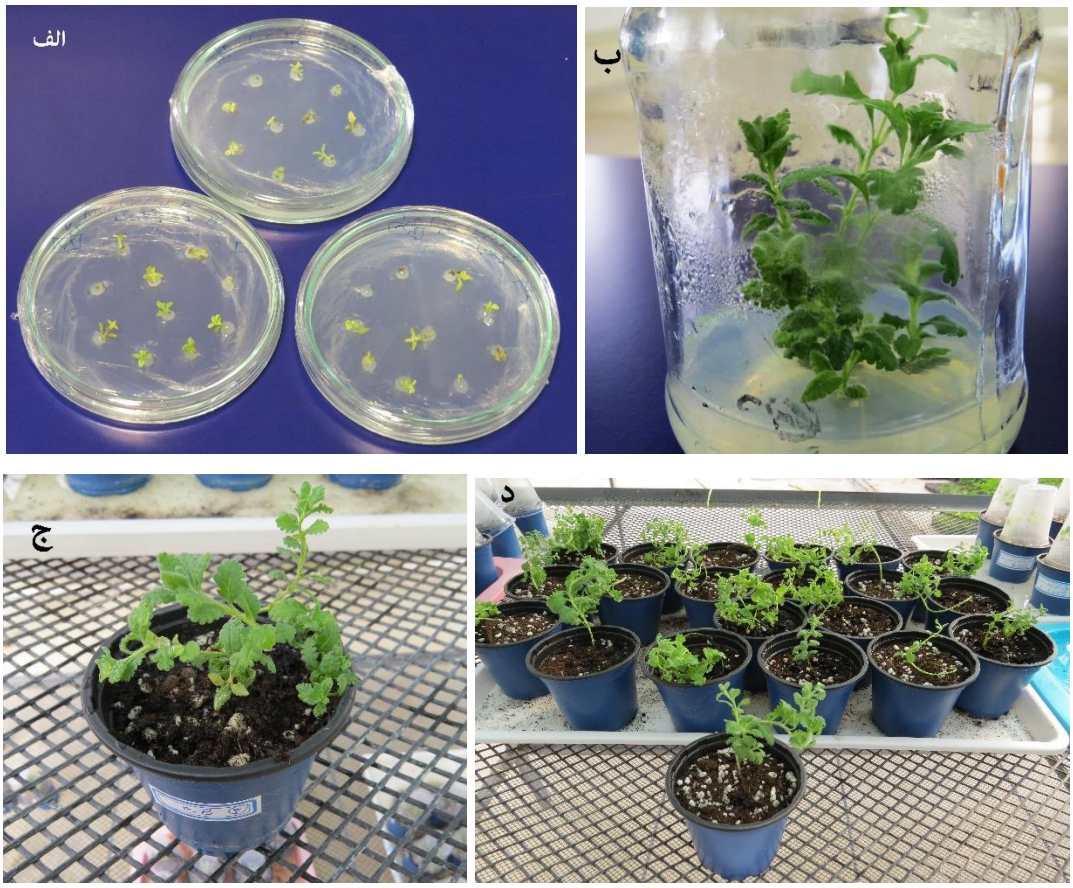
ترکیبات تیماری	درصد جوانه‌زنی (۳۰ روزه)	طول ساقه (۳۰ روزه)	طول ریشه (۳۰ روزه)
خاستگاه مریستم + اتاق رشد + یک هفته	۹۳/۳۳ ± ۵/۷۷ a	۰/۸۳ ± ۰/۱۹ bc	۳/۲۶ ± ۳/۰۷ a
خاستگاه مریستم + اتاق رشد + دو هفته	۹۳/۳۳ ± ۵/۷۷ a	۰/۹۷ ± ۰/۳۳ ab	۲/۳۸ ± ۰/۹۹ a
خاستگاه مریستم + اتاق رشد + سه هفته	۹۰/۰ ± ۱۰/۰۰ ab	۰/۶۳ ± ۰/۰۳ c	۰/۲۳ ± ۰/۴ b
خاستگاه مریستم + اتاق رشد + چهار هفته	۹۶/۶۶ ± ۵/۷۷ a	۰/۸۸ ± ۰/۱۲ bc	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + یخچال + یک هفته	۸۰ ± ۱۰/۰۰ b	۰/۶۳ ± ۰/۱۸ c	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + یخچال + دو هفته	۸۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰ b	۰/۷۳ ± ۰/۱۷ c	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + یخچال + سه هفته	۹۶/۶۶ ± ۵/۷۷ a	۱/۱۳ ± ۰/۱۳ a	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + یخچال + چهار هفته	۹۳/۳۳ ± ۵/۷۷ a	۰/۷۶ ± ۰/۱۹ c	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + فریزر + یک هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + فریزر + دو هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c

خاستگاه مریستم + فریزر + سه هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه مریستم + فریزر + چهار هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + اتاق رشد + یک هفته	۸۶/۶۶ ± ۵/۷۷ ab	۰/۲۳ ± ۰/۰۸ d	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + اتاق رشد + دو هفته	۸۰/۰ ± ۱۰/۰۰ b	۰/۲۷ ± ۰/۱۹ d	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + اتاق رشد + سه هفته	۸۶/۶۶ ± ۵/۷۷ ab	۰/۲۳ ± ۰/۰۱۷ d	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + اتاق رشد + چهار هفته	۹۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰ ab	۰/۲۹ ± ۰/۰۸ d	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + یخچال + یک هفته	۷۳/۳۳ ± ۱۱/۵۴ bc	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + یخچال + دو هفته	۷۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰ bc	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + یخچال + سه هفته	۶۶/۶۶ ± ۲۰/۸۱ cd	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + یخچال + چهار هفته	۵۳/۳۳ ± ۵/۷۷ d	۰/۲۱ ± ۰/۳۷ d	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + فریزر + یک هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + فریزر + دو هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + فریزر + سه هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c
خاستگاه رویان + فریزر + چهار هفته	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ e	۰/۰ ± ۰/۰ c

وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد است.

سینگ و همکاران گزارش نمودند که کاهش قابل توجهی در رشد مریستم پوشش‌دار شده در *Eclipta alba* L. و *Spilanthes acmella* پس از نگهداری در دمای پایین وجود داشت (۳۴, ۴۷). دیگر محققان معتقدند که کاهش در تبدیل مریستم پوشش‌دار شده به دنبال افزایش دوره نگهداری، به علت مهار تنفسی بافت‌های گیاهی ناشی از پوشش آلژیناتی و یا بر اثر از دست دادن رطوبت به علت خشکی در طی ذخیره باشد (۴۸). نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که اثر متقابل سه‌گانه خاستگاه بذر مصنوعی* روش نگهداری* زمان نگهداری بر روی طول ساقه و ریشه گیاهچه یک ماهه معنی‌دار بوده است، به طوری که بیشترین میزان طول ساقه در ترکیب تیماری خاستگاه مریستم + یخچال + سه هفته و بیشترین میزان طول ریشه در ترکیبات تیماری خاستگاه مریستم + اتاق رشد + یک هفته و خاستگاه مریستم + اتاق رشد + دو هفته مشاهده گردید (جدول۲). نتایج نیز نشان داد که کمترین میزان طول ساقه در ترکیبات تیماری مشاهده شد که غالباً متشکل از هر دو خاستگاه مریستم و رویان و تحت شرایط نگهداری فریزر در زمان‌های مختلف نگهداری بوده که دال بر اثر نامطلوب فریزر بر روی خصوصیات جوانه‌زنی بذر مصنوعی است (جدول۲). از طرفی نتایج حاکی از آن بود که درصد جوانه‌زنی و میزان رشد ساقه و ریشه در ترکیبات تیماری متشکل از مریستم نسبت به ترکیبات تیماری متشکل از رویان سوماتیکی بهتر بوده است (جدول۲).

به طوری که ترکیب تیماری خاستگاه مریستم + شرایط اتاق رشد + چهار هفته و خاستگاه مریستم + شرایط یخچال + سه هفته بیشترین میزان جوانه‌زنی و طول ساقه را به خود اختصاص داده بودند (جدول۲). محققان معتقدند که مریستم‌های پوشش‌دار شده از نظر تولید ارزان و حمل و نقل و کشت آسان می‌توانند برای تبادل ژرم پلاسم ژنوتیپ‌های خاص و مواد گیاهی عاری از میکروب بین آزمایشگاه‌ها استفاده گردد (۴۷). باید اشاره نمود که در مطالعه حاضر بیشترین میزان طول ریشه نیز در تیمارهای متشکل از مریستم مشاهده گردید، در حالی که تیمارهای متشکل از رویان سوماتیکی قادر به تولید ریشه نبودند. صالحی کاتوزی و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی آفتابگردان گزارش نمودند که تشکیل ریشه در اغلب گیاهچه‌های حاصل از رویان‌های سوماتیکی، ضعیف بود و در نتیجه از تبدیل به گیاهچه کامل تا حد زیادی ممانعت شد (۴۹). به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که بذرهای مصنوعی با خاستگاه مریستم نسبت به بذرهای مصنوعی با خاستگاه رویان و تحت شرایط نگهداری یخچال و اتاق رشد از لحاظ جوانه‌زنی، تولید ریشه و ساقه موفق‌تر بوده است (شکل ۷).



شکل۷- جوانه‌زنی بذر مصنوعی در ترکیب تیماری مریستم+اتاق رشد+ دو هفته و سازگاری گیاهچه‌های حاصل

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشته و بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور در تیمار با اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و محلول اسید جیبرلیک (۱۰۰۰ppm) به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و کمترین آن نیز در تیمارهای خیساندن در آب و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته و کشت در محیط کشت MS مشاهده گردید. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای سرمادهی و یا اسید سولفوریک به تنهایی در شکستن خواب بذر موثر نبوده و اعمال تیمار اسیدهای سولفوریک و جیبرلیک به همراه سرمادهی منجر به بیشترین درصد جوانه‌زنی بذور کلپوره شده، لذا می‌توان نتیجه گرفت که خواب بذر در کلپوره از نوع فیزیکی-فیزیولوژیک است و با اعمال این تیمار موانع جوانه‌زنی آن برطرف شده تا در روند زراعی نمودن آن تسریع حاصل گردد. نتایج نشان داد که بذرهای مصنوعی با خاستگاه مریستم نسبت به بذرهای مصنوعی با خاستگاه رویان سوماتیکی تحت شرایط نگهداری اتاق رشد و یخچال از نظر درصد جوانه‌زنی، تولید ریشه و ساقه بهتر بوده است، ولی شرایط نگهداری فریزر برای تولید بذر مصنوعی مطلوب نبوده است

.

Refrences

1. Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Aqueous extracts of Teucrium polium possess remarkable antioxidant activity in vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2006;3:329-38.
2. Rad FA, Jafari M, Khezrinejad N, Miandoab MP. An efficient plant regeneration system via direct organogenesis with in vitro flavonoid accumulation and analysis of genetic fidelity among regenerants of Teucrium polium L. Horticulture, Environment, and Biotechnology. 2014;55:568-77.
3. Bahramikia S, Ardestani A, Yazdanparast R. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. Food Chemistry. 2009;115(1):37-42.
4. Yazdanparast R, Ardestani A. Suppressive effect of ethyl acetate extract of Teucrium polium on cellular oxidative damages and apoptosis induced by 2-deoxy-D-ribose: role of de novo synthesis of glutathione. Food chemistry. 2009;114(4):1222-30.
5. Khodaei F, Ahmadi K, Kiyani H, Hashemitabar M, Rezaei M. Mitochondrial effects of Teucrium polium and Prosopis farcta extracts in colorectal cancer cells. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2018;19(1):103.
6. Eskandry H, Rajabalian S, Yazdi T, Eskandari M, Fatehi K, Ganjooei N. Evaluation of cytotoxic effects of Teucrium polium on a new glioblastoma cell line (REYF-1) using MTT and soft agar clonogenic assays. Int J Pharmacol. 2007;3:435-7.
7. Roumi S, Tabrizi MH, Eshaghi A, Abbasi N. Teucrium polium extract-loaded solid lipid nanoparticles: A design and in vitro anticancer study. Journal of food biochemistry. 2021;45(9):e13868.
8. Jafarnia S KS, Ghasemi, M. A comprehensive and illustrated guide to the properties and uses of medicinal plants: Sokhon Gostar 2017. [In Persian]
9. Alachkar A, Al Moustafa A-E. Teucrium polium plant extract provokes significant cell death in human lung cancer cells. Health. 2011;3(06):366.
10. Hashem-Dabaghian F, Shojaii A, Asgarpanah J, Entezari M. Anti-Mutagenicity and Apoptotic Effects of Teucrium polium L. Essential Oil in HT29 Cell Line. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2020;15(3).
11. Hashemi SF, Tasharrofi N, Saber MM. Green synthesis of silver nanoparticles using Teucrium polium leaf extract and assessment of their antitumor effects against MNK45 human gastric cancer cell line. Journal of Molecular structure. 2020;1208:127889.
12. Sajadi F, Shokrizadeh M, Sharifi M, Aftabi R. Evaluating the Effects of Camellia Sinensis (Green Tea) and Teucrium Polium Extracts on Salivary Streptococcus Mutans Levels in Children. Journal of Dentistry. 2023;24(1):19.
13. DÖNMEZ İ. Volatile oil composition of Teucrium species of natural and cultivated origin in the lake district of Turkey. Applied Ecology & Environmental Research. 2022;20(3).
14. Sharifi-Rad M, Pohl P, Epifano F, Zengin G, Jaradat N, Messaoudi M. Teucrium polium (L.): phytochemical screening and biological activities at different phenological stages. Molecules. 2022;27(5):1561.
15. Candela RG, Rosselli S, Bruno M, Fontana G. A review of the phytochemistry, traditional uses and biological activities of the essential oils of genus Teucrium. Planta Medica. 2020;87(06):432-79.

16. Jafari M AMB. *Teucrium polium* L. native to West Azerbaijan. Final report of the research project of Urmia University Faculty of Agriculture; 2013. [In Persian]
17. Penfield S. Seed dormancy and germination. Current Biology. 2017;27(17):R874-R8.
18. Thompson K, Ooi MK. To germinate or not to germinate: more than just a question of dormancy. Seed Science Research. 2010;20(4):209-11.
19. Zare A, Solouki M, Omidi M, Irvani N, Abasabadi AO, Nezad NM. Effect of various treatments on seed germination and dormancy breaking in Ferula assa foetida L.(Asafetida), a threatened medicinal herb. Trakia journal of sciences. 2011;9(2):57-61.
20. Çırak C, Kevseroğlu K, Ayan A. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic Hypericum species: Hypericum aviculariifolium subsp. depilatum var. depilatum by light and some pre-soaking treatments. Journal of Arid Environments. 2007;68(1):159-64.
21. Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. New phytologist. 2006;171(3):501-23.
22. Ahmadloo F, Kouchaksaraei MT, Goodarzi GR, Salehi A. Effects of gibberellic acid and storage temperature on the germination of hawthorn seeds. Journal of forest science. 2017;63(9):417-24.
23. Oliveira PG, Garcia QS. Germination characteristics of Syngonanthus seeds (Eriocaulaceae) in campos rupestres vegetation in south-eastern Brazil. Seed Science Research. 2011;21(1):39-45.
24. Tieu A, Dixon K, Meney K, Sivasithamparam K. The interaction of heat and smoke in the release of seed dormancy in seven species from southwestern Western Australia. Annals of botany. 2001;88(2):259-65.
25. Dashti F, Ghahremani-Majd H, Esna-Ashari M. Overcoming seed dormancy of mooseer (Allium hirtifolium) through cold stratification, gibberellic acid, and acid scarification. Journal of Forestry Research. 2012;23:707-10.
26. Nowruzian A, Masoumian M, Ebrahimi MA. Effect of Breaking Dormancy Treatments on Germination of Ferula assa-foetida Seed. Iranian Journal of Seed Research. 2017;3(2):155-69.
27. Chauhan K, Natarajan S, Webb M. Dormancy breaking and germination of cat thyme Teucrium marum (Labiatae). African Journal of Biotechnology. 2018;17(4):91-5.
28. Ara H, Jaiswal U, Jaiswal V. Synthetic seed: prospects and limitations. Current science. 2000:1438-44.
29. Kitto S, Janick J. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1985;110(2):283-6.
30. Redenbaugh K, Fujii J, Slade D, Viss P, Kossler M. Artificial seeds—encapsulated somatic embryos. High-Tech and micropropagation I. 1991:395-416.
31. Rai MK, Asthana P, Singh SK, Jaiswal V, Jaiswal U. The encapsulation technology in fruit plants—a review. Biotechnology Advances. 2009;27(6):671-9.
32. Sharifi A MN, Bagheri A. Applied plant tissue culture: University of Mashhad; 2009. [In Persian]
33. Lata H, Chandra S, Khan IA, ElSohly MA. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of Cannabis sativa L.—an important medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2009;15:79-86.
34. Singh SK, Rai MK, Asthana P, Pandey S, Jaiswal V, Jaiswal U. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of Spilanthes acmella (L.) Murr., a medicinally important and herbal

pesticidal plant species. Acta physiologiae plantarum. 2009;31:649-53.
35. Bagheri H QKY, Andalibi B, Azimi Moghadam M, Zangani I, Jamshidi S. Studying the indices of seed germination and initial growth of safflower seedlings with different 1000 seed weight under drought stress. Sustainable Agriculture New Knowledge Quarterly. 2011;8. [In Persian]
36. Naz R, Anis M, Alatar AA, Ahmad A, Naaz A. Nutrient alginate encapsulation of nodal segments of Althaea officinalis L., for short-term conservation and germplasm exchange. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 2018;152(6):1256-62.
37. Shakeri M MAM, Yazdan Parast R. Effects of different treatments on seed dormancy of *Teucrium polium*. Genetic research and improvement of pasture and forest plants of Iran. 2018;17(1):100-11. [In Persian]
38. Amooaghaie R. The effect of soaking, temperature and duration of pre-chilling on seed dormancy breaking of *Ferula ovina*. Iranian Journal of Biology. 2014;18(4):350-9. [In Persian]
39. Khoocheki A AG. Effect of different treatments on breaking dormancy of Teucrium polium. Iranian Agricultural Research. 2014;3(1):81- 8. [In Persian]
40. Nadjafi F, Bannayan M, Tabrizi L, Rastgoo M. Seed germination and dormancy breaking techniques for Ferula gummosa and Teucrium polium. Journal of Arid Environments. 2006;64(3):542-7.
41. Bahmankar M, Mortazavian SMM, Tohidfar M, Noori SAS, Darbandi AI, Salehi M, Rao R. Physio-biochemical characters, embryo regeneration and limonene synthase gene expression in cumin. Industrial Crops and Products. 2018;121:195-205.
42. Sharma N, Shivesh S. Standardised cultivation method for Viola species-an AIDS curing agent. Journal of Tropical Medicinal Plants. 2000;1(1/2):109-14.
43. Macchia M, Angelini LG, Ceccarini L. Methods to overcome seed dormancy in Echinacea angustifolia DC. Scientia Horticulturae. 2001;89(4):317-24.
44. Hatzilazarou S, Kostas S, Economou AS. Plant regeneration of Nerium oleander L. from alginate-encapsulated shoot explants after short-term cold storage. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2019;94(4):441-7.
45. Soneji JR, Rao P, Mhatre M. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (Ananas comosus L., Merr.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2002;77(1):28-32.
46. West TP, Ravindra M, Preece JE. Encapsulation, cold storage, and growth of Hibiscus moscheutos nodal segments. Plant cell, tissue and organ culture. 2006;87:223-31.
47. Singh SK, Rai MK, Asthana P, Sahoo L. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of Eclipta alba (L.). Acta physiologiae plantarum. 2010;32:607-10.
48. Danso K, Ford-Lloyd B. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. Plant cell reports. 2003;21:718-25.
49. Salehi Katouzi SS, Majd A, Bernard F. The effect of salicylic acid on preservation of the synthetic seeds in sunflower. 19th National and 7th International Congress of Biology; University of Tabriz, Iran2016. [In Persian]

Evaluation of seed dormancy and Artificial seed production in the medicinal plant Teucrium polium L.

Saideh Saadat 1, Ahmad Majd2, Lotfali Naseri3, Alireza Iranbakhsh4*, Morad Jafari 5

1- PhD student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Full Professor, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Associate Professor, Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, Iran.

4- Full Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

* Corresponding Author: iranbakhsh@iau.ac.ir

Received: 11/11/2023, Accepted: 17/3/2023

Abstract

Teucrium polium L. is an important medicinal plant from the Lamiaceae which is endangered and its seed dormancy and poor germination are its main agricultural problems. In this research, the effect of 14 different treatments consisting of gibberellic acid, sulfuric acid, and chilling was studied based on a completely randomized design with three replications on breaking seed dormancy. There was a significant difference between different treatments. The best seed germination performance was observed in the seeds treated with sulfuric acid 98% for 15 minutes and gibberellic acid solution (1000 ppm) for 120 hours at 4 degrees Celsius, while the lowest was found in seeds soaked in water and kept at 4°C for two weeks and cultured in MS culture medium. The results of this research showed that the treatment of sulfuric acid and gibberellic acid along with cooling led to the highest percentage of seed germination, implying seed dormancy in these plants is a physical-physiological type. The results showed that artificial seeds with meristem origin were better than artificial seeds with somatic embryo origin under the conditions of growth room and refrigerator in terms of germination percentage, root and stem production. Therefore, with the mentioned methods, it is possible to solve the agricultural problem of this plant and prevent its extinction by producing artificial seeds and provide enough raw materials for the production of different medicines with the origin of this plant.

Keywords: Artificial Seed, Seed Germination, Seed Dormancy, *Teucrium polium* L.