نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال چهاردهم، شماره ۵۶، زمستان ۱۳۹۸ / صفحات: ۱۲ -۱

بررسی جوانه‌زنی بذر و تغییرات فیتوشیمیایی دو توده گل‌گاوزبان ایرانی (*Echium amuenum* Fisch & C.A.Mey) تحت تاثیر منطقه کشت

منیژه خورسندی آقایی[۱]، عظیم قاسم نژاد[۱*]، سیدجوادموسوی‌زاده[۱]، اسماعیل باباخان‌زاده سجیرانی[۲]

[۱]گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۱۹

چکیده

گل گاو زبان (*Echium amoenum*) از مهمترین گیاهان تیره *Boragicaceae* است. به منظور تعیین مناسب‌ترین روش برای شکستن خواب بذر، تحقیق حاضر در قالب دو آزمایش انجام شد. آزمایش اول با بذور دو جمعیت گل گاوزبان جمع آوری شده از مشهد و جواهرده در قالب آزمایش فاکتوریل با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای پیش رویشی استفاده شده در این تحقیق عبارتنداز: تیمار بذور مرطوب شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷، ١٤ و ۲۱ روز متوالی در دمای یخچال، تیمار بذور با اسید جیبرلیک ۵۰۰ پی‌پی‌ام به مدت ٢٤ ساعت و تیمار بذور با اسید سولفوریک ۵۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه. آزمایش دوم در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در مکان و زمان در دو فصل زراعی با چهار تکرار، با استفاده از دو توده به صورت همزمان در گرگان و مشهد کشت شد تا اثر اقلیم بر خصوصیات کمی و کیفی گل مورد بررسی قرار گیرد. نتایج نشان داد که خواب بذر گل گاوزبان ایرانی از نوع فیزیولوژیک است، زیرا بیشترین درصد جوانه‌زنی بذرها در اثر اعمال تیمار پیش سرمای مرطوب در ۷ روز به دست آمد. مقایسه توده‌های مذکور در دو منطقه نشان داد که عملکرد گل و میزان متابولیت‌های ثانویه (آنتوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی) گیاهان کشت شده در مشهد نسبت به گرگان مطلوب‌تر بود. لذا با توجه به مقاومت نسبی گیاه به کم آب پیشنهاد می‌گردد که گسترش کشت این گیاه در خراسان رضوی مورد ارزیابی بیشتری قرار گیرد. همچنین پیش تیمار ۷ روز سرمادهی مرطوب برای تسهیل و یکنواختی جوانه زنی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، جوانه‌زنی بذر، خواب فیزیولوژیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گل گاوزبان ایرانی، گیاهان دارویی

مقدمه

گل گاوزبان با نام علمی *Echium amoenum* L. از خانواده *Boraginaceae* است. این گیاه بومی فلات ایران و محدود به حاشیه شمالی ایران، قفقاز و مناطق کوهستانی ایران است. نوع گیاه بوته‌ای بوده و گل‌ها در این گیاه ارزش دارویی دارند (Abed et al., 2010). جوانه‌زنی سریع بذرها و استقرار سریع بوته‌ها در مزرعه در راستای افزایش سرعت رشد اولیه بوته‌ها، دستیابی سریع‌تر به پوشش کامل زمین و در نتیجه افزایش بازدهی استفاده از عوامل محیطی مانند تشعشع، تقویت قدرت رقابت گیاه با علف‌های هرز و کاهش احتمال فرسایش خاک دارای نقش بسزایی است (Hall and Wiesner, 1991; Tekroni and Egli, 2002; Soltani, 2002). لذا ضرورت دارد که

*نویسنده مسئول: aghasemnajad@hotmail.com

پیش تیمارهای لازم برای بهبود شرایط بذر در مرحله اول و قبل از جذب آب صورت گیرد (Maki zade tafty et al., 2006). بذرهای بسیاری از گیاهان مرتعی، دارویی و علف‌های هرز در رویشگاه طبیعی با داشتن یکی از انواع خواب از طریق گسترش زمان و مکان جوانه‌زنی، بقای خود را برای سال‌های طولانی تضمین می‌کنند (Asadi et al., 2015). جوانه زنی حداکثر و یکنواخت بذر در کشت گیاهان اهمیت زیادی دارد (Baskin, Koornnef et al., 2002; 2004). حال آن که پس از شناخت بهترین جمعیت از لحاظ جوانه‌زنی یکی دیگر از عوامل قابل توجه در گیاهان متابولیت‌های ثانویه در جمعیت‌های مختلف گل گاوزبان ایرانی است. متابولیت‌های ثانویه مهمترین مواد گیاهی در ساختار داروهای گیاهی به شمار رفته و تولید آن‌ها در گیاه تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد. در بخش عوامل محیطی، زیست بوم نقش مهمی در بیوسنتز این مواد ایفا می‌کند. بنابراین، همواره باید به مطالعه تأثیر تغییرات زیست‌بوم بر تولیدات متابولیتی گیاهان پرداخت. از مهمترین عواملی که بر میزان عصاره و مواد مؤثرهٔ گیاهان اثر دارند، ویژگی‌های محل رویش و موقعیت گیاه در طبیعت است. محققان وجود ارتباط بین محل رویشگاه و تأثیر آن را بر میزان ترکیبات شیمیایی گیاهان بیان کرده‌اند (Omidbeigie, 2005). عوامل محیطی می‌توانند شامل عوامل مختلف بوم‌شناختی، ارتفاع از سطح دریا، جغرافیایی، اقلیمی و خاکی باشند که این عوامل در سه محور بر مواد مؤثرهٔ دارویی تأثیر می‌گذارد: ۱-تأثیر بر مقدار کلی ماده مؤثره گیاهان دارویی، ۲- تأثیر برعناصر تشکیل دهندهٔ مواد مؤثره، ۳- تأثیر بر مقدار تولید وزن خشک گیاه (Kazemizadeh et al., 2010). ساختار شیمیایی متابولیت‌های ثانویه با توجه به موقعیت جغرافیایی، محل رشد گیاه (نوع خاک، آب و هوا، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود) می‌تواند متفاوت باشد. حتی فصل، برای نمونه پیش یا پس از گل‌دهی و ساعت چیدن گل‌ها بر ساختار شیمیایی متابولیت‌های ثانویه اثرگذار است. عامل مهم تأثیرگذار دیگر ساختار ژنتیکی گیاه است. از این‌رو تمام عوامل شامل ژنتیک یا محیط بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در یک گیاه خاص اثر می‌گذارد. بدین‌صورت که یک گونه گیاهی در شرایط مختلف محیطی می‌تواند متابولیت‌هایی با ترکیبات مؤثره مختلف با فعالیت دارویی متفاوت را تولید کند. لذا می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که گوناگونی در ساختار شیمیایی منجر به ایجاد تنوع در ترکیبات شیمیایی می‌شود (Andria et al., 2011). برخلاف گیاهان زراعی و صنعتی‌که ارقام اصلاح شده فراوانی دارند، اغلب گیاهان دارویی که در حال حاضر تجارت می‌شوند یا مستقیم از منابع طبیعی جمع‌آوری می‌گردند و یا توده‌های وحشی جمع‌آوری شده در مزارع کشت می‌شوند. لذا تحقیق و بررسی در خصوص اهلی‌سازی این گیاهان اعم از جوانه زنی بذر تا پرورش گیاه به ویژه برای گیاهان ارزشمند امری ضروریست. لذا در تحقیق حاضر سعی شده است تا با بررسی جوانه زنی بذر و اثر منطقه بر خصوصیات کیفی و کمی گل گاوزبان نسبت به معرفی به مناطق جدید و تسهیل کشت این گیاه ارزشمند اقدام گردد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول

مواد گیاهی: بذور جمعیت‌های گل گاوزبان ایرانی (*Echium ammonium*) از ۲ منطقه کشور شامل مشهد در ارتفاع ۱۱۵۰ متری از سطح دریا با عرض جغرافیایی ۳۶/۳۷۷۰۶۷۸۴ و طول ۵۹/۶۲۸۹۸۲۵۴ و آب و هوای گرم وخشک، و جواهرده (رامسر) در ارتفاع ۲۰۰۰ متری از سطح دریا با موقعیت جغرافیایی

عرض ۳۶/۸۵۲۰۸۳۱ و طـول ۵۰/٤٥٤٤٦٥ بـا آب و هوای معتـدل کوهسـتانی در سـال ۱۳۹۵ جمـع‌آوری شدند. **آزمایش‌های جوانه‌زنی:** آزمایش اول در قالـب طرح فاکتوریل با ۳ تکرار با ۲۵ عدد بذر در هر تکرار در آزمایشگاه دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم منابع طبیعی و کشاورزی گرگان در سال ۱۳۹٦ اجرا و برای این منظور واکنش جوانی زنی بذور جمعیت‌های مشهد و جواهرده در شرایط آزمایشگاهی با تیمارهای مختلف شامل: اسید سولفوریک ۵۰ درصد بـه مـدت ۱۰ دقیقـه، اسـید جیبرلیـک ۵۰۰ ppm بـه‌مـدت ۲٤ ساعت، سرمادهی مرطوب به مدت ۷، ۱٤ و ۲۱ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گـراد و شـاهد مـورد بررسـی قـرار گرفـت. بـرای شـروع آزمـایش بـذرها پـس از ضدعفونی به مدت ٦۰ ثانیـه بـا هیپوکلریـد سـدیم ۱ درصد درون پارچه‌های نخی نازک قـرار گرفتـه و بـا آب مقطر آبیاری شدند. سپس پارچه درون فویل‌هـای ضدعفونی شده با الکل پیچیده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در دمـای محـیط قرارگرفتنـد. بـرای حفـظ رطوبت و متعادل بودن دما، پارچه‌های درون فویل‌هـا مرطوب نگه داشته شـدند. شـمارش بـذور جوانـه‌زده پس از ۲٤ ساعت از شروع آزمایش به صورت روزانه تا زمانی که تعداد تجمعی بـذور جوانـه‌زده بـه مقـدار ثابت برسـد، در زمـان مشـخص انجـام شـد. خـروج ریشه‌چه در حد ۲ میلی‌متر به‌عنوان شاخص جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (ISTA, 2009).

برای تعیین درصد (Sarmadnia,1996) و سرعت (Scott et al., 1984) جوانه‌زنی، تعداد بذرهای جوانه زده در هر فویل روزانه شمارش شـد و بـا اسـتفاده از فرمول‌های زیر به‌ترتیب محاسبه گردید.

$$GP = S/T \times 100 \quad (1)$$

$$R = \sum N \div D \quad (2)$$

برای انجام محاسبات از نرم افزارهای آمـاری Excel، SAS و با تکیه بر آزمون دانکن استفاده شد.

آزمایش دوم: در این آزمـایش خصوصـیات کمـی و کیفی گل دو جمعیت مشهد و جـواهرده در دو فصـل زراعـی در منطقـه مشـهد (شـاندیز) و گرگـان مـورد بررسی قرار گرفت.

کشت بذرها در اواخر آبان صورت گرفـت. ابتـدا بذرها به‌مدت ۱۰ ساعت قبل از کاشت در آب مقطر و در دمای محیط خیسانده شد. سپس بذرها بـه‌صـورت حوله‌پیچ و مرطوب در یخچال با دمای چهـار درجـه سانتیگراد به مدت هفت روز نگـه‌داری شـد (بهتـرین نتایج جوانه‌زنی آزمایش اول در این تیمار بود).

جدول ۱: **ویژگی‌های خاک مزرعه مشهد و گرگان**

ویژگی	مشهد	گرگان
پتاسیم (میلی‌گرم در کیلوگرم) p.p.m	۲۱۹mg/l	۱۲۵
فسفر (میلی‌گرم در کیلوگرم)p.p.m	۱۰mg/l	۱۰ mg/l
نیتروژن (٪)	۰/۰۹۲	٪۳۷
هدایت الکتریکی (dS/m)	٦۲/۱	۲٤/۵
pH	۸	۷/۵۲
بافت خاک	رسی	رسی- شنی

بذرهای تیمار شده در اوایـل آذر ۱۳۹۵ در زمـین کشت شدند. در هر تکرار شش بوتـه در نظـر گرفتـه شد. فاصله بین ردیف‌های کشت ٤۰ تا ۷۰ سانتی‌متـر و فاصله بین بوته‌ها روی ردیف بین ۲۰ تا ٤۰ تعیـین شد. روش کاشت به‌صورت جوی و پشته بود. در این روش آبیاری تا یک ماه (زمانی که بوته‌هـا بـه مرحلـه

٤-٦ برگی رسیدند) به اندازه نیاز هر بوته بود. سپس آبیاری قطع و نیاز گیاه فقط از طریق باران احتمالی تأمین گردید.

عملیات آماده‌سازی زمین و تهیه نمونه: آزمایش در دو شهر مشهد و گرگان به‌صورت همزمان انجام شد. در ابتدا زمین مورد نظر آماده شد. پس از کشت بذرهای جوانه دار شده در آذرماه، در طول دوره به‌صورت دستی (وجین) صورت گرفت. نمونه‌برداری در اواخر خرداد ماه انجام شد. گل گیاهان مورد مطالعه از نقطه نظر میزان آنتوسیانین، توانمندی آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل، فلاونویید و کلروفیل مورد مطالعه قرار گرفت.

ارزیابی خصوصیات فیتوشیمی گل‌گاوزبان ایرانی

اندازه‌گیری آنتوسیانین: به این منظور یک گرم از نمونه گل خشک شده در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد را (Amoo aghai et al., 2013) با ١٠ میلی‌لیتر متانول اسیدی ساییده شده و عصاره گیاه برای ٢٤ ساعت در تاریکی در دمای ٤ درجه سانتیگراد (دمای یخچال) قرار داده شد. پس از این به‌مدت ١٠ دقیقه در ٤٠٠٠ دور در دقیقه عصاره سانتریفیوژ شده و جذب محلول رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر، در طول موج ٥٢٠ نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول A=εbc به روش Chen و همکاران (٢٠٠٥) به‌دست آمد. در نهایت میزان آنتوسیانین بر حسب میکرومول در گرم وزن‌تر بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش به دام‌اندازی رادیکال DPPH: برای اندازه‌گیری درصد جذب DPPH عصاره‌های استخراجی یک میلی‌لیتر از محلول متانولی یک میلی‌مولار DPPH با یک میلی‌لیتر محلول عصاره در متانول مخلوط شد. سپس مخلوط به مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شده و در نهایت جذب آن (Chen et al., 2005) در طول موج ٥١٧ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب درصد بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد DPPH} = \frac{\text{درصد جذب نمونه} - \text{درصد جذب شاهد}}{\text{درصد جذب شاهد}} \times ١٠٠$$

اندازه‌گیری فنل کل: به این منظور ابتدا یک گرم کربنات سدیم (Na_2CO_3) بدون آب در ٥٠ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا محلول کربنات سدیم ٢ درصد بدست آید. سپس مقدار یک میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتئورا در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا فولین- سیوکالتئو ٥٠ درصد (*v/v*) حاصل گردد. در ادامه دو میلی‌گرم از اسید گالیک را توزین کرده و در دو میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا محلول اسید گالیک با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آید. سپس برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک ، محلول پایه آماده شده را در لوله‌های آزمایش با مقادیر ٠، ١٠ تا ١٠٠ میکرولیتر به فاصله ١٠ میکرولیتر ریخته شد و با آب مقطر به حجم ١٠٠ میکرولیتر رسانده شد. به این ترتیب، لوله‌ها حاوی ٠، ١٠، ٢٠، ... و ١٠٠ میکروگرم گالیک اسید شدند. سپس، به هر کدام به‌ترتیب مقادیر ٢/٨ میلی‌لیتر آب دیونیزه، ٢ میلی‌لیتر کربنات سدیم ٢ درصد و ١٠٠ میکرولیتر معرف فولین اضافه شد. مخلوط حاصل ورتکس و به‌مدت ٣٠ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. از لوله آزمایش فاقد اسید گالیک به‌عنوان شاهد استفاده شد. مقدار ١٠٠ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی، رقیق شده با آب در لوله‌های آزمایش ریخته شد. پس از انجام مراحل مختلف مطابق با روش استاندارد، مقدار جذب نمونه‌ها نسبت به شاهد در طول موج ٧٢٠ نانومتر قرائت شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به‌منحنی استاندارد، فنل کل موجود در عصاره‌ها محاسبه گردید. در نهایت، داده‌ها بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد(Chen et al., 2005).

انـدازه‌گیـری فلاونوئیـد کـل: بـه ایـن منظـور ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی با ۱/۵ میلـی لیتـر متـانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلـی‌لیتـر اتـانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلـی‌لیتـر پتاسـیم اسـتات ۱ یـک مـولار (۲/٤۱ گرم پتاسیم‌استات در ۱۰ میلی‌لیتـر آب مقطـر) به همراه ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلـوط شـده بـرای تهیه ی شاهد نیز به‌جـای عصـاره متـانولی از متـانول خالص استفاده شد. مخلوط به‌دست آمده پـس از ۳۰ دقیقه نگـه‌داری در دمـای اتـاق و در تـاریکی میـزان جذب نوری در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UNICO 2800) قرائت گردید. و معادله خط کالیبراسیون فلاونوئید براساس غلظت‌های مختلف ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین به‌دست آمد و میزان فلاونوئید کل براساس میلی‌گـرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیـاه بیـان شـد (Chen et al., 2005)

اندازه‌گیری کلروفیل: بـرای قرائـت مقـدار کلروفیـل اعداد دستگاه کلروفیل‌متر (مـدل SPAD ۵۰۲ PLUS کمپانی MINOLTA KONICA ژاپن) پس از روشـن کردن در ابتدا یک‌بار عدد دستگاه را بـدون قـرار دادن برگ در محفظه برگ قرائت کرده تـا دسـتگاه کـالیبره شود. سپس با قرار دادن پهنک برگ در میـان سنسـور انبری شکل عدد مشـاهده شـده ثبـت مـی‌شـود. ایـن فرآیند در سه نقطه برگ انجام شده و میانگین حاصله گزارش می‌شود.

برای انجـام محاسـبات از نـرم افزارهـای آمـاری Excel، SAS و با تکیه بر آزمـون دانکـن در آزمـایش استفاده شد. به دلیل همگن بودن واریانس‌ها از آزمون دانکن برای مقایسه چندگانه استفاده شد. نمودارها بـا برنامه Excel ترسیم شد.

نتایج

آزمایش اول: جهـت بررسـی مکـانیزم خـواب بـذور انتخاب شده تحـت تـاثیر تیمارهـای اسـید جیبرلیـک (۵۰۰ پـی‌پـی‌ام)، اسـید سـولفوریک ۵۰ درصـد و سـرمادهی مرطـوب قـرار داده شـده و در نهایـت پارامترهای مرتبط به جوانـه‌زنـی مـورد بررسـی قـرار گرفت.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول۲) به غیـر از طول ریشه‌چه اختلاف معنـی‌داری بـین تـوده‌هـای مطالعه شده مشاهده نشد. این در حالی اسـت کـه بـه غیر از طول ساقه‌چه اغلـب پارامترهـای انـدازه‌گیـری شده تحت تاثیر تیمارهای جوانـه زنـی قـرار داشـتند. بررسـی مقایسـه اثـر متقابـل تـوده بـذری و تیمـار جوانه‌زنی نشان داد که طول ریشه‌چه، وزن‌تر و خشک دانهال تحت تاثیر تیمار تفاوت معنی‌داری داشـت. در مقابل درصد جوانه‌زنی و سـرعت جوانـه‌زنـی تحـت تاثیر اثر متقابل تیمارها قرار نگرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد کـه درصـد جوانـه‌زنـی و سرعت جوانه‌زنی بر خـلاف نتـایج تجزیـه واریـانس تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف تیماری داشـتند. به طوری‌که بالاترین درصـد جوانـه‌زنـی در بـذرهای تیمار شده با سـرمای مرطـوب ۷ روزه مشـاهده شـد (جدول۳). طول ریشه چه در نمونه‌های تیمار شده بـا اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک در کمتـرین مقـدار بود. مدت زمان قرارگیـری بـذور مرطـوب در دمـای پایین نتایج متفاوتی را به دنبال داشت. انتظار بـر ایـن بود که روند تغییرات جوانه زنـی تحـت تـاثیر مـدت زمان افزایشی باشد. با این وجود نمونه‌های تیمار شده با سرمای مرطوب به مدت ۲۱ روز نسبت بـه ١٤ روز روند مناسب‌تری داشت. طول ریشه‌چه گیاهچـه‌هـای حاصله تحت تاثیر سرمای مرطـوب رونـد مشخصـی

نداشت. به طوری‌که نمونه‌های نگه‌داری شده به‌مدت ۱٤ روز طول ریشه‌چه بلندتری داشتند. با وجود عدم معنی‌دار بودن نتایج تجزیه واریانس، نتایج مقایسه میانگین‌ها بیانگر برتری سرمای مرطوب ۷ روزه نسبت به سایر تیمارها است.

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده جوانه زنی بذر گل گاوزبان بر اساس میانگین مربعات.

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصدجوانه‌زنی (درصد)	طول ریشه (میلی‌متر)	طول ساقه (میلی‌متر)	وزن‌ترگیاه‌چه (گرم)	وزن خشک گیاه‌چه (گرم)	سرعت‌جوانه‌زنی (درصد)
جمعیت (a)	۱	۱٥٤/۰۲ ^{ns}	۲۹۰/٤۱**	٤٦/۸٥^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰٦^{ns}	۰/۹۳^{ns}
تیمارجوانه‌زنی (b)	٥	۱۱٦٤/۳ **	۱۳٥/۸۹**	۱۳٥/۳٥ ^{ns}	۰/۰۱*	۰/۰۰٤*	٦/۲٤**
a*b	٥	٦٥/۱٤ ^{ns}	٤٤۱/۲۰**	۸۰/۱۸^{ns}	۰/۰۳*	۰/۰۱**	۰/٥۰^{ns}
خطا	۲۳	٥۲/٤۰	۲۷/٤۸	٦۷/٦۱	۰/۰۰٤	۰/۰۰۱	۰/۷٦
درصد ضریب تغییرات		۲۳/۰۳	۱٥/۳۱	۲۲/۷۳	۲۳/٥۳	۲۳/۲۲	۲۹/۱۹

ns عدم معنی داری. * معنی‌داری در سطح پنج درصد. ** معنی‌داری در سطح یک درصد.

با توجه به نتایج (جدول ۳) در میان جمعیت‌های جواهرده و مشهد تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده به غیر از طول ریشه‌چه فاقد تفاوت معنی داری بود. طول ریشه‌چه تشکیل شده در بذرهای توده مشهد نسبت به جواهرده برتری واضح داشت.

با توجه به مقایسه میانگین از بین تیمارهای اعمال شده بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی نمونه‌های بذری تیمار شده با سرمای مرطوب به مدت ۷ روز مشاهده شد. درصورتی‌که کمترین درصد جوانه‌زنی مربوط به بذرهای تیمار شده با اسید سولفوریک بود. بیشترین طول ریشه‌چه نیز در تیمار ۱٤ روز سرمادهی بذر گاوزبان دیده شد.

وزن تر گیاه‌چه در تیمار ۷ روز سرمادهی بذرها بیشترین مقدار را داشته در صورتی‌که در تیمار ۲۱ روز سرمادهی کمترین وزن تر گیاه‌چه مشاهده گردید. در میان این جمعیت بالاترین مقدار وزن خشک گیاه‌چه متعلق به تیمار ۷ روز سرمادهی به بذور بود. این در حالی است که نمونه‌های نگهداری شده در مای پایین به مدت ۲۱ روز کمترین تجمع ماده خشک را نشان دادند. .

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات جوانه زنی در پاسخ به پیش تیمارهای جوانه زنی در گیاه گل گاو زبان.

تیمارها	درصد جوانه‌زنی (٪)	طول ریشه‌چه (mm)	وزن تر گیاه‌چه (g)	وزن خشک گیاه‌چه (g)	سرعت جوانه‌زنی (٪)
۷	٥۱/۳۳^{a}	۳۸/۹۳^{ab}	۰/۳۲٤^{a}	۰/۱٦^{a}	٤/۹٤^{a}
۲۱	٤۰^{b}	۳۱/۷۱^{cb}	۰/۲۱^{b}	۰/۰۹^{b}	۳/۰۲^{b}
۱٤	۳٥/۳۳^{bc}	٤۰/۹٦^{a}	۰/۲٤^{ab}	۰/۱۱^{ab}	۲/٦۲^{b}
GA	۲۸^{cd}	۲۸/۳۹^{c}	۰/۳۲۱^{a}	۰/۱٥^{a}	۲/٥۱^{b}
C	۲۱/۳۳^{d}	۳۲/۰۸^{cab}	۰/۲۸^{ab}	۰/۱٤^{ab}	۲/٥۲^{b}
AS	۱۲^{e}	۲۸/۸^{c}	.	.	۱/۸٥^{b}

۷، ۱٤ و ۲۱ روز سرمادهی مرطوب. GA جیبرلیک اسید. C تیمار شاهد. AS اسیدسولفوریک.

همانطور که مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمارهای اعمال شده نشان می‌دهد (جدول٤)، بلندترین طول ریشه‌چه در جمعیت مشهد تیمار شده با ١٤ روز سرمادهی مشاهده شد. در مقابل در نمونه‌های شاهد جمعیت جواهرده کوتاهترین طول ریشه‌چه را تولید کرد. در بین جمعیت جواهرده کمترین طول ریشه‌چه در شاهد و بیشترین مقدار آن مربوط به تیمار هفت روز سرما تشکیل شد. مقایسه طول ریشه‌چه در جمعیت مشهد نشان داده که بیشترین اندازه ریشه‌چه مربوط به تیمار ١٤روز سرمادهی و کمترین آن مربوط به بذرهای تیمار شده با اسید جیبرلیک بود. حال‌آنکه بیشترین وزن‌تر گیاهچه در بذرهای جمعیت جواهرده تیمار شده با هفت روز سرمادهی مرطوب به ثبت رسید. مقایسه وزن‌تر گیاه‌چه‌های توده بذری مشهد نشان داد که گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تیمار شده بیشترین وزن‌تر را داشتند. این در حالی است که وزن تر گیاهچه های حاصل از بذرهای تیمارشده با ٢١روز سرما مرطوب از نظر وزن تر سنگین‌تر بود .در رابطه متقابل دو جمعیت در وزن خشک گیاه‌چه بیشترین مقدار مربوط به تیمار هفت روز سرما در جمعیت جواهرده بوددیده شد. اگرچه کمترین وزن خشک گیاهچه در بین دو جمعیت در تیمار ١٤ روز سرما بود. در بین جمعیت مشهد بیشترین وزن خشک گیاه-چه درشاهد مشاهده گشت.

جدول ٤: جدول مقایسه میانگین تغییرات صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارها در بذر دو توده جواهرده و مشهد.

جمعیت	تیمار	طول ریشه (mm)	وزن تر (g)	وزن خشک (g)
جواهرده	١٤	٢٧/٢٦^{cd}	٠/٢٠٧^{c}	٠/٠٤^{a}
	٢١	٣٣/٥٣^{c}	٠/٢٢^{cb}	٠/٠٩٠^{de}
	٧	٤٣/٨٦^{b}	٠/٤٢^{a}	٠/٢١^{a}
	AS	٢٨/٨٠^{cd}	.	.
	C	٢١/٠٦^{d}	٠/٢٢^{cb}	٠/١٠١^{cde}
	GA	٣٠/٨٠^{c}	٠/٣٦^{ab}	٠/١٧^{ab}
مشهد	١٤	٥٤/٦٦^{a}	٠/٢٥^{cb}	٠/١٦^{cab}
	٢١	٢٩/٨٨^{c}	٠/٢١^{c}	٠/١٠٢^{cde}
	٧	٣٣/٩٩^{c}	٠/٢٥^{cb}	٠/١١٩^{cdb}
	C	٤٣/١٠٧^{b}	٠/٣٢^{cab}	٠/١٨^{ab}
	GA	٢٥/٩٩^{cd}	٠/٢٩^{cab}	٠/١١٢^{cde}

٧، ١٤ و ٢ روز سرمادهی مرطوب. *GA* جیبرلیک اسید. *C* شاهد. *AS* اسیدسولفوریک.

آزمایش دوم: مطالعه خصوصیات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف گل‌گاوزبان ایرانی در منطقه مشهد و گرگان

تغییرات آنتوسیانین کل تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثر عوامل ساده مکان، فصل زراعی و جمعیت در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل مکان در فصل زراعی در سطح پنج درصدمعنی‌دار شد. در صورتی‌که اثرات متقابل عوامل بلوک (مکان ×فصل زراعی)، جمعیت در مکان، جمعیت در فصل زراعی و جمعیت × مکان × فصل زراعی در مقدار آنتوسیانین از نظر

آماری بی‌معنی بودند (جدول۵). بررسی مقایسه میانگین‌ها تحت تأثیر فصل زراعی نشان داد میزان آنتوسیانین در فصل زراعی دوم، در مشهد و در جمعیت جواهر ده دارای بیشترین میزان آنتوسیانین بود (جدول ٦).

جدول ۵: نتایج تجزیه واریانس تأثیر فاکتورهای مورد مطالعه بر صفات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف گل‌گاوزبان ایرانی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	آنتوسیانین	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فنل کل	فلاونوئید کل	کلروفیل
مکان	۱	۲۵۱۸/۹۰**	۹۸۲/۰۲**	٤۱/۹٥^{ns}	۱۹۰/٦۱**	۱۹۹/۱٥**
فصل زراعی	۱	۲٦٥/۰۱**	٥۰۳/۳۱**	۳۲/۸۸^{ns}	۹/٦۳^{ns}	۰/۳۱^{ns}
مکان× فصل زراعی	۱	٥۸/۸۸*	٥۷/۲۷*	۲/۲۲^{ns}	۲/۲۸^{ns}	٥٥/۱٥**
بلوک (مکان × فصل زراعی)	۱۲	۱۰/٥۹^{ns}	۸/٥٦^{ns}	۱۷/۳۹^{ns}	٤/۹۱^{ns}	٥/۰٥^{ns}
جمعیت	۱	۸۰۳/۱۰**	۲/۳۱^{ns}	۱۰٥/۱۲*	۳٦/٤۲**	۱۳٥/٦۷**
جمعیت×مکان	۱	۱/۳۰^{ns}	۱۱۷/۳۱**	۹/٤٦^{ns}	۱/۹٥^{ns}	۸۳/۸۱**
جمعیت×فصل زراعی	۱	۳۲/۲۲^{ns}	۱٤/٦۲^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۸^{ns}	۰/۰٤^{ns}
جمعیت×مکان×فصل زراعی	۱	٦/۰۲^{ns}	٥/٦۸^{ns}	۳٦/۲۹^{ns}	۰/٦۷^{ns}	۹٥/۹۷^{ns}
خطا	۱۲	۸/۷۳	۱۰/۹۸	۱۳/۳٦	۳/۱۸	٥/۲۲
ضریب تغییرات		٥/٦۳	۹/۸۹	۱۸/٦۲	۱۰/۲۳	۱۱/٦۲

**معنی‌داری در سطح یک درصد، *معنی‌داری در سطح پنج درصدو *ns* عدم معنی‌داری می‌باشد.

جدول ٦: مقایسه میانگین اثرات اصلی زمان-مکان برخصوصیات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف گل‌گاوزبان ایرانی(منطقه کشت مشهد-گرگان).

	متغیر	آنتوسیانین (mg/g)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪)	فنل (mg/g)	فلاونوئید (mg/g)	کلروفیل
فصل زراعی	۹٥-۹٦	٤۹/٥٤^{b}	۲۹/٥٤^{b}	۱۸/٦۱^{a}	۱٦/۸۸^{a}	۱۹/٥٦^{a}
	۹٦-۹۷	٥٥/۲۹^{a}	۳۷/٤۷^{a}	۲۰/٦٤^{a}	۱۷/۹۷^{a}	۱۹/۷٦^{a}
مکان	مشهد	٦۱/۲۹^{a}	۳۹/۰٤^{a}	۲۰/۷۷^{a}	۱۹/۸۷^{a}	۲۲/۱٥^{a}
	گرگان	٤۳/٥٤^{b}	۲۷/۹٦^{b}	۱۸/٤۸^{a}	۱٤/۹۹^{b}	۱۷/۱٦^{b}
جمعیت	جواهرده	٥۷/٤۳^{a}	۳۳/۷۷^{a}	۲۱/٤٤^{a}	۱۸/٤۹^{a}	۲۱/۷۲^{a}
	مشهد	٤۷/٤۱^{b}	۳۳/۲۳^{a}	۱۷/۸۱^{b}	۱٦/۳٦^{b}	۱۷/٦۰^{b}

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی: اثر مستقل مکان، فصل زراعی و اثر متقابل جمعیت×مکان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نتایج تجزیه واریانس در سطح خطای آزمایش یک درصد معنی‌دار شدند. حال آنکه اثر متقابل مکان در فصل زراعی در سطح آماری پنج درصد در میزان آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار شد. اما اثر عوامل ساده و متقابل بلوک (مکان × فصل زراعی)، جمعیت، جمعیت × فصل زراعی و جمعیت × مکان × فصل زراعی در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی معنی‌دار نبود (جدول ۵). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد در فصل زراعی دوم کشت در منطقه مشهد میزان

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بیشتر از فصل زراعی اول بود. این در حالی‌ست که در نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های جمعیت‌های کشت شده اختلاف معنی‌داری بین این مقادیر وجود نداشت و هر دو جمعیت مشهد و جواهرده از نظر آماری در یک گروه مشترک قرار گرفتند (جدول ٦).

تغییرات فنل کل گلبرگ گل‌گاوزبان تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی: در مطالعه نتایج تجزیه واریانس اثر ساده جمعیت در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. درحالی‌که تأثیر بقیه عوامل بر میزان فنل کل فاقد معنی بودند (جدول۵). همچنین در بررسی مقایسه میانگین‌ها جمعیت جواهرده دارای بیشترین میزان فنل کل بود. درصورتی‌که در فصل‌های زراعی و مکان کشت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ٦).

تغییرات فلاونوئید کل تحت تاثیر تیمارهای استفاده شده: اثرات ساده مکان و جمعیت در سطح احتمال یک درصد بر میزان محتوای فلاونوئید بر اساس نتایج تجزیه واریانس معنی‌دار بود (جدول ۵). این در حالی است که تأثیر بقیه عوامل بر میزان محتوای فلاونوئیدی فاقد معنی بود. مقایسه میانگین‌های فصل‌های زراعی کشت بر مقدار فلاونوئید نشان داد که بین مقادیر فلاونوئید در فصل‌های زراعی اول و دوم کشت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. حال آن‌که مقایسه میانگین‌ها در مشهد و در جمعیت جواهرده بیشترین میزان فلاونوئید را دارا بود (جدول ٦).

محتوای کلروفیل: نتایج تجزیه واریانس اثر ساده مکان، رقم و اثرات متقابل مکان×فصل زراعی و جمعیت×مکان در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شدند(جدول۵). حال آن‌که تأثیر بقیه عوامل بر محتوای کلروفیل معنی‌دار نبودند. همچنین نتایج مقایسه میانگین مقدار کلروفیل تحت تأثیر فصل زراعی، نشان داد بین فصل‌های زراعی اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد. اما در مکان مشهد و جمعیت جواهرده بیشترین مقدار کلروفیل رؤیت گردید (جدول ٦).

بحث

همان‌طور که مشاهده می‌گردد در هر دو جمعیت گل‌گاوزبان ایرانی بیشترین مقدار متابولیت‌های ثانویه مربوط به منطقه مشهد بود. عمده‌ترین عامل اختلاف اکولوژیکی دومنطقه در کنار شدت نور آفتاب و رطوبت نسبی محیط، ارتفاع از سطح دریا است. آنتوسیانین‌ها در ردیف ترکیبات فلاونوئیدی مسئول حفاظت اندام‌های حساس گیاهی در مقابل تشعشعات نوری به ویژه طول موج‌های پایین‌تر از ٤٠٠ نانومتر هستند. لذا به نظر می‌رسد که ارتفاع از سطح دریا عامل مهم ایجاد تفاوت بیوشیمیایی در این توده‌ها است. به طوری‌که در منطقه مشهد با ارتفاع بیشتری نسبت به گرگان تجمع ترکیبات بیوشیمیایی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. مطالعات متعدد انجام شده نشان می‌دهد که ویژگی‌های مورفولوژی و فیتوشیمیایی گیاه تحت تأثیر شرایط اقلیمی محل رویش قرار می‌گیرد (Omidbaigi, 2000).

بررسی خصوصیات اقلیمی نشان داد که روند تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه در دو رویشگاه از روند مشابهی تبعیت نمی‌کند. به گونه‌ای که در مناطقی با اقلیم کوهستانی که اختلاف دمای روز و شب بیشتر از مناطق شمالی ایران است، عوامل استرس‌زای محیطی بیشتر بوده و گیاه برای مقابله با آنها ملزم به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های محافظتی با تمام ظرفیت است. نتایج حاضر با یافته‌های Habibi و همکاران (۲۰۰۷) که به‌طور ویژه اثر ارتفاع از سطح دریا را بر روی ترکیبات اسانس گیاه آویشن وحشی در منطقه طالقان بررسی کرده بود، همخوانی دارد نتایج پژوهش حاضر از نظر نقش عوامل‌های محیطی بررسی شده برروی تولید مواد مؤثره گل گاوزبان با

مطالعه Soleimani و همکاران (۲۰۱۱) که رابطه تغییرات فیتوشیمیایی گیاه چای کوهی با عوامل محیطی در غرب اصفهان را مورد بررسی قرار دادند، همسو است. اثر بسیاری از عوامل محیطی بر تولید مواد مؤثره در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. نشان داده شد که میزان متابولیت‌های ثانویه همچون میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه *Cerateagus microphylla* در ارتفاعات بالا دارای بیشترین سطح و در ارتفاعات پایین دارای کمترین مقدار بود (Tajali and Khazaeipoor, 2012) که مؤید نتایج پژوهش حاضر است. دراغلب مطالعات بر نقش رویشگاه به‌عنوان عامل مؤثر در میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه تأکید شده است. مکان رشد گیاه می‌تواند از طریق تغییرات دمایی و رطوبتی بر فرآیند تشکیل مواد مؤثره تأثیر گذار باشد. مکانیسم تأثیرات محیط بر تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌درستی روشن نیست، ولی این مطلب تأیید شده است که محیط از طریق تأثیری که در فرآیند تولید متابولیت‌ها و نیز آنزیم‌های مرتبط به آن دارد، در نوع و شدت واکنش‌های شیمیایی مؤثر است (Hemati et al., 2002). محققین بیان داشتند که در ارتفاعات بالاتر از ۱۵۰۰ متر، مقادیر بالاتری از ترکیبات فنلی وجود دارد (Jaakola et al., 2004). شدت نور، دوره‌های نوری و دما بر روی سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارند (Hohtola, 2007). در مطالعات Nikkhah و همکاران (۲۰۱۷) بر روی گیاه *Ferulago angulate* مشخص شد فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت تأثیر مراحل مختلف فنولوژیکی و ارتفاع از سطح دریا قرار داشت. به طوری‌که افزایش ارتفاع، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در پی داشت. نتیجه‌ای که با با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همانگونه که قبلا نیز اشاره شده است، فلاونوئیدها، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌دلیل ایجاد مکانیسم دفاعی گیاهان را در برابراشعه ماوراءبنفش، عوامل بیماری‌زا و گیاه‌خواران محافظت می‌کند. فلاونوئیدها به طور کلی ترکیبات فنیل پروپانئیدی به علت توانمندی آنتی‌اکسیدانی در تنظیم فعالیت‌های آنزیمی و تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه نقش دارند. میزان آن‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی با مرحله رشد، بافت گیاهی، واریته، تنش‌های محیطی مانند اشعه ماوراءبنفش، شرایط اقلیمی، شرایط خاک، شخم، آفات و بیماری‌ها متغیر است (Kalinova and Vrchotiva, 2011). در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که افزایش متابولیت‌های ثانویه در منطقه مشهد و در جمعیت جواهرده به‌دلیل افزایش ارتفاع از سطح دریا و بالا بودن اشعه ماوراءبنفش می‌باشد. بررسی نتایج این تحقیق و پژوهش‌های دیگران مؤید این مطلب است که صفات کمی و کیفی گیاهان در اکوسیستم‌ها، تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر اقلیم منطقه، ارتفاع از سطح دریا و موقعیت جغرافیایی قرار دارند. اما ذکر این نکته ضروری است که علاوه بر عوامل محیطی، عوامل ژنتیکی به‌عنوان یک فاکتور مهم و تأثیرگذار بر صفات کمی و کیفی گیاهان نقش مهمی دارند (Wichti, 1989). همچنین در تحقیقی ثابت شد که تغییرات میزان ترکیبات ثانویه گل گاوزبان ایرانی در ارتفاعات بالاتر از سطح دریا بیشتر است (Babakhanzade Sajirani, 2015). حال آنکه نتایج به‌دست آمده در تحقیق ما نیز با نتایج این تحقیقات مطابقت داشت. لذا مشهد با ۱٤۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا نسبت به گرگان (۱٦٥ متر ارتفاع از سطح دریا) دارای شب‌های خنک بوده، در روز شدت نور بالایی را دریافت می‌کند و در نتیجه میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه در مشهد نسبت به گرگان افزایش بیشتری داشت. بررسی‌های تحقیق حاضر نشان داد که جوانه‌زنی بذر گل گاوزبان تحت تأثیر شرایط اقلیمی و تفاوت ژنتیکی رشد گیاه قرار دارد. در این خصوص عنوان

شده است مدت زمان سرمادهی لازم برای افزایش قوه نامیه در بذرهای گیاهان مختلف به ویژگی‌های ژنتیکی بذر، شرایط محیطی و اقلیمی نمو بذر بستگی دارد (Esmaili et al., 2017; Benech-Arnold et al., 2000). نکته‌ای که در تحقیق حاضر در خصوص گل گاوزبان به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری نهایی

تکامل گیاهان در طبیعت وابسته به عوامل متفاوتی همچون اقلیم، گونه، نوع خاک، ژنتیک گیاه، ارتفاع از سطح دریا وموقعیت جغرافیایی است. هر کدام از این عوامل به تنهایی نقش مؤثری در خصوصیات مورفولوژی و فیتوشیمیایی گیاهان دارند. اگرچه پتانسیل تولید متابولیت های ثانویه ژنتیکی است، اما میزان تولید آن‌ها به‌صورت قابل توجهی تحت تاثیرشرایط محیطی قرار می‌گیرد نکته‌ای که به وضوح در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد.در این پژوهش صفات اندازه‌گیری شده از جمله آنتوسیانین ها، فلاونوئید ها، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان حاصل از بذور جمعیت جواهرده کشت شده در مشهد شرایط بهتری نسبت به توده بذری مشهد داشت. با توجه به نتایج مورفولوژی بذر و فیتوشیمی گل برای کشت گل گاوزبان، پیشنهاد می‌شود که به منظور افزایش جوانه‌زنی بذر در مزرعه، و افزایش کیفی گل جمع‌آوری بذر برای کشت و کار از مناطق مرتفع و کوهستانی با شب‌های خنک صورت گیرد.

References

Abed, A., Minaiyan, M., Ghannadi, A., Mahzouni, P. and Babavalian, MR. (2012). Effect of *Echium amoenum Fisch*. et Mey a traditional Iranian herbal remedy in an experimental model of acute pancreatitis. International Scholarly Research Notice Gastroenterology. 14(1): 48- 54.

Amoo Aghai, R. and Vali Vand, M.(2014). Effect of cold time, concentration, type and time of nitrogen treatments on germination and growth of Rosus celery (*Kelussia odoratissima Mozaff)*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology).27 (3): 462-468.

Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimarães, E.F., Carreira, L.M.M. and Maia, J.G.S. (2011). Variability in essential oil composition of Piper dilatatum LC Rich. Biochemical Systematics and Ecology, 39(4):669-75.

Asadi, E.M. and Heshmati, Gh.E.(2015). The effect of different treatments on breaking the sleep and stimulating germination of (*Thymus transcaucasicus Ronn*) and (*Zataria moltiflora Boiss)* seedlings. Journal of Plant Research (Iranian Biology Journal), 28 (1): 12-24.(In persian)

Babakhanzade Sajirani, E. (2015). Persian blooming flower. Negin Eshvakat Gilan. First Printing, Exquisite Exhibitions .93 p.

Baskin, C.C., Meyer., S.E. and J.M. Baskin. (2004). Two type morphophysiological dormancy in seeds of two genera Osmorhiza and Erythronium with an Arcto- Tertiary distribution pattern. American Journal of Botany. 82: 293-298

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.

Chen, X-Q. and Xiao, J. (2005). HPLC-DAD determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and apigenin in *Marchantia Convoluta*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3:175-181.

Esmaili, A., Hosseini Moghadam, H. and Mostafa Loo, H. (2017). Investigating the effect of different treatments on breaking of sleep and stimulating seed germination(*Astragalus podolobus).* New Findings in Biotechnology, 4(2): 147-154.(In persion)

Habibi, H., Mazaheri., D., Majnoun Hosseini., N., Chaeichi., M.R., Fakhr Tabatabaei, M. and Bigdeli, M. (2007). Effect of altitude on essential oil and components in wild thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss) Taleghan region. Pajouhesh Va Sazandegi, 19(4):2–10.(In Persian)

Hall, R.D. and Wiesner, L.E.(1990). Relationship between seed vigor tests and field performance of Regar meadow bromegrass. Crop Scientific. 30: 967-970.

Hasanvand, H., Siadat, S.E., Bakhshande, E., Moradi Talavat, M.R. and Posht Dar, E. (2018). Performance evaluation and some

physiological characteristics of *Borago officinalis* L. under plant density and different planting dates in Ahvaz region. Iranian Journal of Medicinal Plants and Herbs Research. 34 (1): 1-16.

Hooshidari, F., Sefid Can, F, Tabai Aghdai, S.R. and Yosefi, B. (2018). Investigation of quantitative and qualitative changes of (*Satureja mutica Fisch. & C. A. Mey*) in Cultural Conditions of Kurdistan. Journal of Horticultural Science, 10: 2-49.

Kazemizadeh, Z., Habibi, Z. and Moradi A. (2010). Investigation of the essential oil composition of CaspianTeucrium species (*Teucrium hyrcanicum L.*) in two different localities. Iranian Journal of Medicinal and Arom Plant, 9:73-67.

Khalasi Ahvazi, L., Heshmati, Gh. E. and Zofen, P., M. (2015). Effect of environmental factors on the antioxidant activity of (*Gundelia tournefortii L.*) in different vegetative stages. Scientific Journal of Rangeland, 10(2):237-246.

Koornneff, M., Bentsink, L. and Hilhors, H.(2002). Seed dormancy and germination. Plant Growth and Development, 5:33-36.

Maki Zade Tafty, M., Tavakol Afshari, R., Majnoon Hosseini, N., Naghdi Badi, H.E. and Mehdi Zade, E. (2006). The effect of osmotic preparation on seedling germination of *Borogolicinalis L.* in order to optimize production. Journal of Research in Iranian Herbs and Medicinal Herbs, 22(3): 216-222.

Mir Jalili, M.H., Fakhr atabai, M. and Omidbeigi, R. (2005). Study of the adaptation and evaluation of lemon grass essential oil. Iranian Journal of Agricultural Science, 36: 33-41.

Omidbeigi, R. (2005). Production and processing of medicinal plants. BehNashr. Mashhad. 1:1- 347.

Sarmadnia, GH. (1996). Seed technology. Pubications University of Mashhad.288 p. (In Persian)

Scott, S.J., Jones, R.A. and Williams, W.A. (1984). Review of data analysis methods for seed germination. Crop Science, 24: 1192-1199.

Soleimani maymand, F. (2011). The investigation of phytochemical of *Stachys lavandulifolia* Vahl and its relation with ecological condition in the west area of Isfahan province. MSc thesis in Isfahan University of Technology, 95p. (In Persian)

Soltani, A. (2007). Application of SAS in statistical analysis. Jihad Daneshgahi Mashhad Press, 20. Mashhad, Iran. 180-188.

Tekroni, D.M. and Egli, D.B. (1991). Relationship of seed vigor to crop yield. A Review Crop Science. 31: 816-822.