مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۸

بهینه‌سازی جوانه‌زنی بذر و پرآوری گیاه دارویی ختمی (*Althea rosea*) در شرایط درون شیشه

محمدحسین غزنوی[۱]، مرضیه قنبری جهرمی*[۲]، سید امیر موسوی[۳]

چکیده

ختمی دارویی (*Althea rosea*) از گیاهان یکساله و خودرو بوده که گل، میوه و ریشه آن مصرف دارویی دارد. یکی از مشکلات اساسی در کشت گسترده این گیاه دارویی، عدم جوانه‌زنی مناسب بذر آن و در نتیجه استقرار نامطلوب در شرایط کشت اولیه است. روش‌های مختلفی برای شکستن خواب و تحریک جوانه‌زنی بذر گیاهان وجود دارد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی بر روی سه توده ختمی دارویی از مناطق سپیدان شیراز، کردان کرج و اصفهان در سه تکرار انجام شد. در آزمایش اول جهت بررسی خصوصیات جوانه‌زنی بذر، بذرها تحت تاثیر تیمارهای مختلف شامل دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دوره‌های زمانی مختلف (صفر، ۱۰ ساعت، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز) و دماهای ۳۵ و ۴۶ درجه سانتی‌گراد در حمام بخار (به مدت ۶ ساعت) قرار گرفت. در آزمایش دوم به منظور بهینه‌سازی پرآوری گیاه دارویی ختمی دارویی در شرایط درون شیشه از ترکیب تنظیم کننده‌های مختلف رشد گیاهی شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (M4)، ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (M13)، ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (M6)، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر (M17)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین (M8) و تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر (M20) استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس در آزمایش اول مشخص گردید که تاثیر نوع توده (سپیدان شیراز، کردان کرج و اصفهان) در سطح احتمال ۵ درصد بر صفات مربوط به جوانه‌زنی (درصد و سرعت جوانه‌زنی، حجم ریشه‌چه و ارتفاع گیاهچه) معنی‌دار بود و اثر دما بر درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال ۵ درصد و بر سایر صفات در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. همچنین اثرات متقابل تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار شد. نتایج بر اساس تجزیه واریانس آزمایش دوم (پرآوری) اثر توده بر تمام صفات و اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر طول شاخه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر سایر صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در رابطه با اثرات متقابل مشخص شد که همه صفات در سطح ۵ درصد تحت تاثیر قرار گرفت و فقط درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار گردید. نتایج بررسی تاثیر تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که بیشترین پرآوری، طول نوشاخه، درصد ریشه‌زایی و طول شاخه مربوط به تیمار توده شیراز با مصرف M4 و کمترین میزان آن‌ها مربوط به تیمار توده کرج و با کاربرد M20 بود. بیشترین طول ریشه مربوط به توده اصفهان تحت تیمار M4 و M17 و کمترین طول ریشه مربوط به توده کرج با مصرف M20 بود. بیشترین تعداد برگ در توده شیراز با تیمار M4 و کمترین تعداد برگ در توده کرج با تیمار M8 مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ختمی دارویی، رکود بذر، کشت بافت، اکسین و سایتوکینین.

---

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، علوم باغبانی گرایش گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای

[۲]* نویسنده مسئول. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران. ایمیل: ghanbari460@gmail.com

[۳] عضو هیات علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک

مقدمه

ختمی دارویی (*Althea rosea* L.) گیاهی از تیره پنیرکیان (Malvaceae) است که گل، میوه و ریشه آن مصرف دارویی دارد (Gholami-Tilebandi *et al*., 2012، Abdel-Salam *et al*., 2018). تمام قسمت‌های این گیاه استفاده طبی داشته و دارای مواد نشاسته‌ای، چربی، اسانس، آنتوسیانین، آل‌تئین، دی اکسی بنزوئیک اسید و سیانیدین می‌باشد (Kaya and Gülser, 2018). این گیاه دارای خواص داروئی متعددی از جمله ضد سرفه، خلط‌آور، نرم کننده پوست و کاهش التهاب مجاری تنفسی است (Sutovska *et al*., 2009). نتایج اکثر تحقیقات نشان داد که بذور برخی از گیاهان از جمله گیاهان دارویی، علف‌های هرز و سایر گیاهان وحشی به دلیل سازگاری‌های اکولوژیک دارای مکانیزم‌های مختلف خواب مانند پوسته سخت، فیزیولوژیکی، القایی و غیره می‌باشد (Munira *et al*., 2015، Ehyaee and Khajeh Nezhad, 2012). در جهت کاهش مسائل مرتبط با جوانه‌زنی، راه‌کارهای مختلفی از جمله پیش تیمار بذر وجود دارد. استفاده از تیمارهای پیش از کاشت بذر می‌تواند بذر را به لحاظ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آماده جوانه‌زنی نمایند (Giri and Schilinger, 2003). روش پیش‌تیمار بذر روشی آسان و کم‌هزینه می‌باشد که باعث بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر می‌گردد (Zare *et al*., 2008). از آنجا که بذور تازه ختمی (*Althaea officinalis*)، قدرت رویشی نامناسبی دارند، لذا یا باید با استفاده از روش‌های مختلف پیش‌تیمار، باعث تحریک جوانه‌زنی این گیاه شد و یا این که از بذور ۲ تا ۳ ساله جهت کشت استفاده نمود. مدت زمان لازم جهت جوانه‌زنی در شرایط مناسب ۱۵-۱۰ روز گزارش شده است (Zargari, 1996). در مطالعه‌ای دمای متناوب ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد در حضور نور بیشترین درصد جوانه‌زنی را سبب شد در حالیکه دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تاریکی، کمترین مقدار جوانه‌زنی را در پی داشت (Ilieva and Petrova, 1980). روش‌های مختلفی را برای شکستن خواب و تحریک جوانه‌زنی بذر گیاهان مانند سرمادهی، خراش‌دهی، استفاده از محلول‌های مختلف تحریک کننده جوانه‌زنی (جیبرلین، نیترات پتاسیم، اسید نیتریک، پلی‌اتیلن گلایکول و اتانول) تناوب‌های نوری، دمایی و غیره وجود دارد (Muhetaer *et al*., 2015). پژوهشگران در پژوهشی به ارزیابی ویژگی‌های جوانه‌زنی و خواب در سی توده بذری گیاهان دارویی پرداختند (Bourgaud *et al*., 2001). بر روی بذور ۱۷ گونه دارویی که دارای خواب بودند، تیمارهای مختلف شکست خواب از قبیل نیترات پتاسیم، خراش‌دهی و برداشتن پوست بذور اعمال شد. نتایج نشان داد که در تیمار نیترات پتاسیم بر خاکشیر همدان (*Sisymbrium irio*) با ۹۴ درصد و خاکشیر نیشابور با ۲۷ درصد جوانه‌زنی به ترتیب بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی را دارا بودند. در تیمار خراش‌دهی، بیشترین و کمترین میزان شکست خواب به ترتیب در گل صابونی با ۳۳ درصد و تاتوره (*Datura stramonium*) یک درصد مشاهده شد. در تیمار هیپوکلریت سدیم نیز بیشترین و کمترین میزان جوانه‌زنی در گیاه خارمریم (۹۴ درصد) و ختمی (*Althea officinal*) (۴۲ درصد) مشاهده شد.

در بررسی تیمارهای جوانه‌زنی گل ختمی (*Althaea officinalis*) گزارش شده است که حذف پوسته بذر ختمی باعث افزایش صفات مرتبط با جوانه‌زنی شد. اثر مدت زمان تیمار با آب داغ نیز بر تمامی صفات معنی‌دار گزارش شد. قرار دادن بذور در آب داغ به مدت ۴ دقیقه باعث افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور نسبت به تیمار شاهد شد (شریف‌آرانی و همکاران، ۱۳۹۳). محققان با اِعمال پیش تیمارهای مختلف (هاردنینگ، آب گرم، آب

مقطر، کلرید پتاسیم، نیترات کلسیم، کلرید سدیم، نیترات پتاسیم و شاهد) و مدت زمان در بذر ختمی (*Althaea officinalis*) مشاهده کردند که با کاربرد تیمارهای ذکر شده، در تمامی صفت‌های جوانه‌زنی بهبود حاصل شد (بیات و همکاران، ۱۳۹۴). ایشان بیان داشتند که استفاده از تکنیک پیش‌تیمار بذر در ختمی دارویی ضمن بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی، می‌تواند باعث صرفه‌جویی در مصرف بذر می‌شود.

به طور کلی کاربرد تیمارهای شکستن خواب، موجب افزایش درصد جوانه‌زنی بذور این گیاهان دارویی شد. گزارشات متعدد نشان داده است که گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی مانند ترکیبات فنولی هستند (Abdel-Salam *et al*., 2018، Bayat *et al*., 2015). با توجه به محدود بودن گونه‌های گیاهی در رویشگاه‌های طبیعی آن‌ها، ارزش اقتصادی متابولیت‌های ثانویه و همچنین پرهزینه و پیچیده بودن سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها، استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی در کشت سلول در شرایط درون شیشه‌ای یک روش جایگزین مناسب جهت بهره‌برداری از ترکیبات گیاهی است. یکی از مشکلات اساسی در کشت گسترده این گیاه دارویی عدم جوانه‌زنی مناسب و در نتیجه استقرار نامناسب در شرایط زراعی است (Bayanati and Mortazavi, 2013). محققان با بررسی تکثیر درون شیشه‌ای گیاه ختمی (*Althea rosea*) غلظت‌های مختلف BAP، NAA و IAA به صورت ترکیبی گزارش کردند که بیشترین پرآوری و تولید شاخساره از ترکیب مختلف BAP (۷ میکرومولار) و NAA (یک میکرومولار) به دست آمد (Omidbeigi, 2007). ترکیبات شیمیایی محیط کشت نقش مهمی را در موفقیت ریزازدیادی دارد؛ به بیان دیگر بهینه کردن محیط کشت سبب پیشرفت در کشت بافت می‌شود (Khalili Aghdam and Jalilian, 2015). القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد به طور مستقیم و یا غیرمستقیم از طریق تنظیم کننده‌های رشد مصنوعی یا پس از حذف سایتوکینین‌ها از محیط کشت، بستگی به گونه و رقم دارد. از طرف دیگر، توانایی تولید ریشه، بستگی به برهمکنش فاکتورهای بیرونی و درونی دارد. اغلب پژوهشگران موفق به ریشه‌دار کردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط‌های حاوی غلظت‌های پائین NAA، IAA و IBA شده‌اند (Bourgaud *et al*., 2001). ترکیبات شیمیایی محیط کشت بر روی تمامی پاسخ‌های مورفوژنیک گیاه که شامل کالوس‌زایی و تکثیر جوانه جانبی و باززایی گیاه و جنین‌زایی می‌باشد؛ تاثیر می‌گذارد (Nas and Read, 2000).

با توجه به اهمیت بهینه‌سازی کشت بافت گیاهان دارویی بومی کشور و همچنین حفظ ژرم‌پلاسم آن‌ها در شرایط درون شیشه، این تحقیق با هدف تسهیل جوانه‌زنی بذر و پرآوری گیاه ختمی دارویی انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذور ختمی دارویی از مناطق سپیدان شیراز، کردان کرج و اصفهان جمع‌آوری شد و در سال ۱۳۹۷ در مجتمع آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بر پایه طرح کاملا تصادفی مورد آزمایش قرار گرفت.

شرایط لازم جهت آزمایش تیمارها مطابق با جدول (۱ و ۲) در ۳ تکرار انجام شد. نمونه‌گیری در هر دو آزمایش به صورت تصادفی صورت گرفت. در هر تکرار ۱۰ مشاهده در نظر گرفته شد.

متغیرهای مورد بررسی در آزمایش اول ـ جوانه‌زنی بذر و بررسی شاخص‌های آن از جمله درصد و سرعت جوانه‌زنی، حجم ریشه‌چه و ارتفاع گیاهچه و در آزمایش دوم ـ آزمایش پرآوری در شرایط درون شیشه و اندازه‌گیری

صفات ضریب پرآوری، طول نوشاخه، تعداد برگ، درصد ریشه‌زایی، طول شاخه‌ها و طول ریشه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

آزمایش اول: آزمون رفع رکود بذر

پس از تهیه سه توده بذری سپیدان شیراز، کردان کرج و اصفهان؛ بذور به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا بذرها توسط مایع ظرفشویی بطور سطحی شستشو شد و جهت انجام عملیات ضدعفونی در پتری‌دیش‌های جداگانه قرار داده و به زیر هود لامینار منتقل شد. در این مرحله بذور ابتدا با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد. به منظور حذف اثرات مواد ضدعفونی کننده، ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس بر روی کاغذ واتمن استریل خشک قرار گرفت. جهت انجام آزمایش جوانه‌زنی بذر از پتری‌دیش‌های ۸ سانتی‌متری استفاده گردید. ۵ عدد بذر در هر پتری‌دیش استریل منتقل شد. در کف پتری‌دیش‌ها کاغذ صافی واتمن استریل (که در اتوکلاو ضدعفونی شده بود) قرار داده شد و پس از قرار دادن بذرها؛ یک کاغذ واتمن استریل دیگر بر روی بذرها قرار گرفت و به همه پتری‌دیش‌ها به مقدار مناسب آب اضافه شد به طوری که کاغذها کاملا خیس شدند. پتری‌دیش‌ها و بذرهای کشت شده در شرایط دمایی مختلف طبق تیمارهای تعریف شده در جدول ۱ قرار داده شد.

پتری‌دیش‌ها روزانه بازبینی و تعداد بذرهایی که جوانه زده و ریشه‌چه آن‌ها قابل رؤیت بود (بیش از ۲ میلی‌متر طول) به عنوان بذرهای جوانه‌زده انتخاب شد.

جدول ۱- تیمار سرمادهی مرطوب در مدت زمان‌های مختلف

تیمار دمایی توده	صفر	۱۰ ساعت	۷ روز	۱۴ روز	۲۱ روز	۲۸ روز	۳۵	۴۶
	روز دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد)					درجه سانتی‌گراد (حمام بخار)		
کرج	۱	۴	۷	۱۰	۱۳	۱۶	۱۹	۲۲
اصفهان	۲	۵	۸	۱۱	۱۴	۱۷	۲۰	۲۳
شیراز	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴

بذرها تحت تیمار سرمادهی مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی صفر، ۱۰ ساعت، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز و دماهای ۳۵ و ۴۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت در حمام بخار قرار گرفت. پس از پایان اعمال دماهای مختلف پتری‌دیش حاوی بذر به دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور منتقل شد (جدول ۱). بعد از جوانه-زدن بذرها و رشد اولیه گیاهچه، ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت.

شکل ۱): بذرهای کشت شده ختمی در پتری‌دیش

رابطه (۱): فرمول درصد جوانه‌زنی $PG=nN\times100$

PG= درصد جوانه‌زنی کل، N= عبارت است از تعداد بذرهایی که در فاصله زمان‌های پی در پی جوانه می‌زند.

رابطه (۲): فرمول سرعت جوانه‌زنی $Vg = \Sigma \frac{Ni}{Di}$

Vg= سرعت جوانه‌زنی بر حسب تعداد بذر در روز، Ni= تعداد بذر جوانه زده در هر روز؛ Di= شماره روز

آزمایش دوم: پرآوری در شرایط درون شیشه

پس از جوانه‌زنی بذرها در شرایط درون شیشه، قطعات ساقه دو الی سه گرهی به منظور پرآوری به محیط کشت‌های مختلف منتقل گردید. تیمارهای مختلف پرآوری ریزنمونه در شرایط درون شیشه به شرح زیر می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲) تیمارهای مختلف پرآوری ریزنمونه گیاه ختمی در شرایط درون شیشه

ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی	تیمار
۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین	M4
۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون	M6
۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین	M8
۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید	M13
۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر	M17
۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر	M20

پس از گذشت ۴ هفته، باززایی و پرآوری هر سه توده (سپیدان شیراز، کردان کرج و اصفهان) گیاهچه‌های ختمی دارویی (*Althea rosea*) در شرایط درون شیشه (طبق شکل ۲) با موفقیت انجام شد. میزان شاخه‌زایی و دیگر صفات مرتبط با پرآوری در توده‌های مختلف مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت.

پس از مرحله شاخه‌زایی و پرآوری گیاهچه‌ها به محیط کشت MS بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، منتقل شدند.

شکل ۲) مراحل مختلف رشد گیاهچه، کشت ریزنمونه و پرآوری گیاه ختمی

گیاهچه‌ها در محیط بدون تنظیم کننده رشد قابلیت ریشه‌زایی خوبی داشتند. بنابراین از هیچ تنظیم کننده رشدی جهت ریشه‌زایی استفاده نشد. در نهایت کلیه صفات مرتبط با تکثیر و پرآوری ثبت و با استفاده از نرم-افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج مرحله اول: آزمون رفع رکود بذر

نتایج جوانه‌زنی بذور و رشد اولیه گیاهچه‌ها تحت تاثیر تیمارهای دمایی اعمال شده طی مدت زمان صفر، ۱۰ ساعت، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دمای ۳۵ و ۴۶ درجه سانتی‌گراد در حمام بخار و انتقال بذور به انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی-گراد، بررسی و نتایج زیر حاصل شد.

جدول ۳) نتایج تجزیه واریانس اثرات پیش تیمارهای مختلف بر صفات جوانه‌زنی سه توده بذر ختمی دارویی

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	حجم ریشه	ارتفاع گیاهچه
توده بذری	۲	۴۸۳/۶۸**	۰/۰۵**	۰/۵۶**	۲/۶۳**
پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر	۷	۴۱۷۵/۴۰**	۰/۲۲**	۰/۰۹**	۵/۰۴**
توده بذری× پیش‌تیمارهای جوانه‌زنی بذر	۱۴	۶۳۶/۸۶**	۰/۰۵**	۰/۹۶**	۲/۴۹**
اشتباه	۴۸	۲۶/۷۴	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۶
ضریب تغییرات	-	۸/۲۴	۷/۵۸	۵/۹۷	۸/۶۸

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

درصد جوانه‌زنی بذر ختمی دارویی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از اثر معنی‌دار تیمار توده بذری، پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر و اثر متقابل تیمارها بر میزان درصد جوانه‌زنی بذر در سطح احتمال یک درصد بوده است (جدول ۳). درصد جوانه‌زنی در توده کرج بیش از سایر توده‌ها گزارش شده است، پس از آن در توده اصفهان بیشترین درصد جوانه‌زنی را دارا بود (جدول ۴). کمترین درصد جوانه‌زنی در بذور ختمی دارویی تحت تیمار ۱۰ ساعت نگهداری در یخچال (۱۸/۳۳ درصد) و بیشترین مقدار آن تحت تیمار ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور (۸۸/۸۹ درصد) مشاهده گردید (جدول ۴). با توجه به نتایج اثرات متقابل تیمارها، بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمار توده شیراز تحت دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور مشاهده گردید، این در حالی است که کمترین درصد جوانه‌زنی نیز در توده شیراز اما تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دمای یخچال به مدت ۱۰ ساعت محاسبه شده است (جدول ۵).

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده تیمارها بر برخی صفات مربوط به جوانه‌زنی بذور تیمار شده گیاه ختمی دارویی

تیمارها	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	حجم ریشه (میکرولیتر)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر)
توده بذری				
کرج	۶۷/۰۸a	۰/۵۲b	۱/۸۳b	۲/۹۷a
اصفهان	۶۳/۱۲b	۰/۵۵a	۱/۹۲a	۲/۹۱a
شیراز	۵۸/۱۲c	۰/۴۶c	۱/۶۲c	۲/۳۷b
پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر				
شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور ـ عدم اعمال سرمادهی مرطوب)	۸۸/۸۹a	۰/۶۳b	۲/۶۰a	۳/۵۹a
۱۰ ساعت یخچال	۱۸/۳۳f	۰/۲۲g	۰/۸۶f	۱/۴۸f
۷ روز یخچال	۸۰/۰۰b	۰/۵۷c	۲/۲۴b	۳/۴۴ab
۱۴ روز یخچال	۶۷/۷۸c	۰/۴۸e	۲/۰۰c	۲/۹۱c
۲۱ روز یخچال	۶۷/۷۸c	۰/۴۸e	۱/۹۹c	۲/۸۷c
۲۸ روز یخچال	۵۷/۷۸d	۰/۴۱f	۱/۶۸d	۲/۶۳d
۳۵ درجه حمام بخار	۵۰/۵۶e	۰/۵۲d	۱/۰۴e	۱/۸۴e
۴۶ درجه حمام بخار	۷۱/۱۱b	۰/۷۴a	۱/۹۰c	۳/۲۴b

حروف مشترک در هر ستون حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

سرعت جوانه‌زنی بذر ختمی دارویی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر توده بذری و اثر پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر و اثر متقابل این دو بر میزان سرعت جوانه‌زنی بذر در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان داده است (جدول ۳). نتایج اثرات ساده تیمار توده نشان می‌دهد سرعت جوانه‌زنی در بذور توده اصفهان بیش از دو توده دیگر بوده است، این در حالی است که توده شیراز کمترین سرعت جوانه‌زنی را داشته است (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصله تیمار دمایی ۴۶ درجه سانتی‌گراد حمام بخار موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذور ختمی دارویی شد، این در حالی است که تیمار ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور در رده بعدی قرار گرفته است (جدول ۴). بر اساس نتایج اثرات متقابل تیمارها، در توده شیراز تحت تیمار نگهداری بذور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال به مدت ۱۰ ساعت کمترین سرعت جوانه‌زنی مشاهده شد، در حالی که بیشترین سرعت جوانه‌زنی در توده اصفهان تحت دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد حمام بخار محاسبه گردید (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج اثرات متقابل تیمارها بر برخی صفات مربوط به جوانه‌زنی بذور تیمار شده گیاه ختمی دارویی

	تیمارها	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	حجم ریشه (میکرولیتر)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر)
کرج	شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور ـ عدم اعمال سرمادهی مرطوب)	۸۳/۳۳c	۰/۵۹de	۲/۲۷c	۳/۲۳def
	۱۰ ساعت یخچال	۲۸/۳۳k	۰/۲۹k	۱/۱۳j	۲/۰۷i
	۷ روز یخچال	۷۳/۳۳de	۰/۵۲fg	۲/۰۳de	۳/۶۷bc
	۱۴ روز یخچال	۶۶/۶۷efg	۰/۴۷gh	۱/۹۰ef	۲/۹۰fg
	۲۱ روز یخچال	۶۳/۳۳fgh	۰/۴۵hi	۱/۸۳f	۲/۶۰gh
	۲۸ روز یخچال	۵۷/۶۷hi	۰/۴۰ij	۱/۵۷g	۲/۴۳hi
	۳۵ درجه هوای آزاد	۷۱/۶۷def	۰/۶۵cd	۱/۳۷hi	۲/۶۰gh
	۴۶ درجه هوای آزاد	۹۳/۳۳ab	۰/۷۵b	۲/۵۰b	۴/۳۰a
اصفهان	شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور ـ عدم اعمال سرمادهی مرطوب)	۸۶/۶۷bc	۰/۶۲de	۲/۵۷b	۳/۶۳bcd
	۱۰ ساعت یخچال	۱۸/۳۳l	۰/۲۶k	۱/۲۷ij	۲/۱۰i
	۷ روز یخچال	۸۰/۰۰cd	۰/۵۷ef	۲/۲۰cd	۳/۰۳efg
	۱۴ روز یخچال	۶۳/۳۳fgh	۰/۴۵hi	۱/۹۰ef	۲/۶۳gh
	۲۱ روز یخچال	۶۶/۶۷efg	۰/۴۷gh	۱/۸۳f	۲/۶۳gh
	۲۸ روز یخچال	۵۳/۳۳i	۰/۳۷j	۱/۵۰gh	۲/۴۳hi
	۳۵ درجه حمام بخار	۵۸/۳۳ghi	۰/۶۶cd	۱/۵۰gh	۲/۴۰hi
	۴۶ درجه حمام بخار	۷۸/۳۳cd	۰/۹۷a	۲/۶۰b	۴/۴۰a
شیراز	شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور ـ عدم اعمال سرمادهی مرطوب)	۹۶/۶۷a	۰/۶۹c	۲/۹۷a	۳/۹۰b
	۱۰ ساعت یخچال	۸/۳۳m	۰/۱۰l	۰/۱۷l	۰/۲۷k
	۷ روز یخچال	۸۶/۶۷bc	۰/۶۲de	۲/۵۰b	۳/۶۳bcd
	۱۴ روز یخچال	۷۳/۳۳de	۰/۵۲fg	۲/۲۰cd	۳/۲۰ef
	۲۱ روز یخچال	۷۳/۳۳de	۰/۵۲fg	۲/۳۰c	۳/۳۷cde
	۲۸ روز یخچال	۶۳/۳۳fgh	۰/۴۵hi	۱/۹۷ef	۳/۰۳efg
	۳۵ درجه حمام بخار	۲۱/۶۷kl	۰/۲۵k	۰/۲۷l	۰/۵۳k
	۴۶ درجه حمام بخار	۴۱/۶۷j	۰/۵۱fgh	۰/۶۰k	۱/۰۳j

حروف مشترک در هر ستون حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

حجم ریشه‌چه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر اثر معنی‌دار تیمار توده بذری، پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر و اثر متقابل تیمارها بر میزان حجم ریشه در سطح احتمال یک درصد اختلاف می‌باشد (جدول ۳). بر اساس نتایج اثرات ساده میزان حجم ریشه در توده اصفهان ۴/۹۲ و ۱۸/۵۲ درصد به ترتیب نسبت به توده کرج و شیراز بیشتر بوده است (جدول ۴). بیشترین میزان حجم ریشه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور مشاهده شد که نسبت به تیمار ۷ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال ۱۶/۰۷ درصد افزایش نشان داده است (جدول ۴). بیشترین حجم ریشه در تیمار توده شیراز تحت دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور اندازه‌گیری شد، اگرچه کمترین حجم ریشه مربوط به بذور تحت تیمار توده شیراز و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت بوده است (جدول ۵).

ارتفاع گیاهچه

ارتفاع گیاهچه تحت اثر تیمار توده بذری، پیش تیمارهای جوانه‌زنی بذر و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفته و در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار حاصل شده است (جدول ۳). در توده کرج و اصفهان بترتیب بیشترین میزان ارتفاع گیاهچه حاصل شد که با یکدیگر در یک رده بوده‌اند (جدول ۴). بر اساس نتایج اثرات مستقل تیمارهای جوانه‌زنی بذر؛ بیشترین میزان ارتفاع گیاهچه تحت تیمار ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور حاصل شد، در حالی که با تیمار ۷ روز نگهداری در یخچال اختلاف اندکی داشته است (جدول ۴). نتایج اثرات متقابل تیمارها بیانگر تولید بیشترین ارتفاع گیاهچه در تیمار توده اصفهان تحت دما ۴۶ درجه سانتی‌گراد حمام بخار بوده است، در صورتی که در توده شیراز و تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت کمترین ارتفاع گیاهچه حاصل شده است (جدول ۵).

نتایج مرحله دوم: پرآوری در شرایط درون شیشه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر توده در سطح احتمال ۵ درصد بر تمام صفات مورد مطالعه (ضریب پرآوری، طول نوشاخه، تعداد برگ، درصد ریشه‌زایی، طول شاخه و ریشه‌ها) و اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر طول شاخه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار و بر سایر صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. اثرات متقابل تیمارها بر تمامی صفات بجز درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ایجاد نمود، درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد تحت اثر متقابل تیمارها معنی‌دار گردید (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین مربعات صفات مورد بررسی تیمار تنظیم کننده‌های رشد

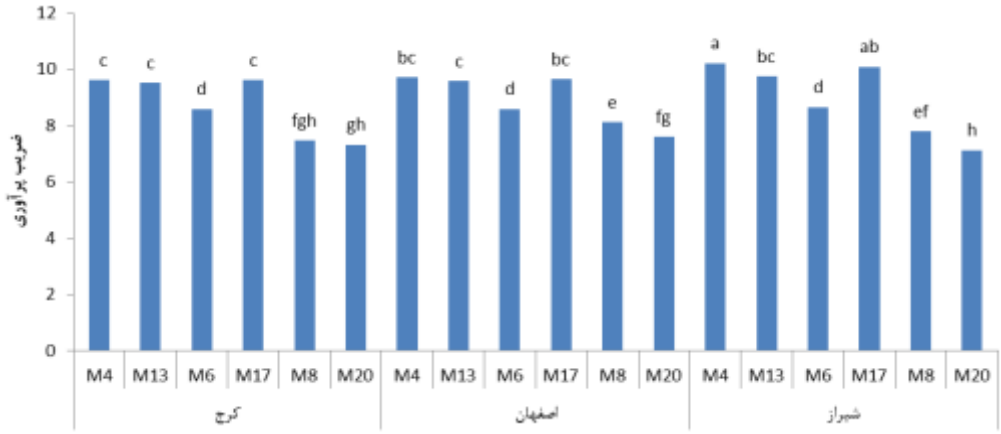
منابع تغییر	درجه آزادی	ضریب پرآوری	طول شاخه	تعداد برگ	درصد ریشه‌زایی	طول نوشاخه	طول ریشه
توده بذری (اصفهان، شیراز و کرج)	۲	۴/۴۱*	۱۰/۰۵*	۷/۲۱*	۰/۰۴*	۲۱/۳۷*	۶/۲۲*
ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی	۵	۶/۴۲**	۲۰/۷۱**	۱۲/۸۹**	۰/۰۹**	۱۴/۹۳*	۱۲/۶۵**
توده*تیمار تنظیم کننده رشد	۱۰	۲/۶۰*	۶/۰۱*	۴/۲۵*	۰/۱۳*	۱۲/۳۱*	۳/۶۷*
خطا	۳۶	۱/۰۹	۲/۵۱	۱/۷۸	۰/۰۱	۵/۱۵	۱/۵۴
ضریب تغییرات	-	۹/۱	۱۰/۳۲	۶/۹	۸/۴۲	۷/۵۶	۶/۲۱

علامت * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد می‌باشد.

ضریب پرآوری

بر اساس نتایج حاصله؛ بیشترین ضریب پرآوری مربوط به تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) در توده ختمی دارویی شیراز و کمترین میزان پرآوری در M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در توده کرج مشاهده شد (جدول ۷).

بر اساس نتایج تیمارهای M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون) و تیمار M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) تاثیر معنی‌داری بر روی ضریب پرآوری نداشتند (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج میزان ضریب پرآوری تیمار تنظیم کننده رشد نمونه‌ها: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

جدول ۷- نتایج بررسی اثر ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر صفات مورد بررسی

تیمارها		ضریب پرآوری (درصد)	طول شاخه (میلی‌متر)	تعداد برگ	درصد ریشه‌زایی	طول نوشاخه (میلی‌متر)	طول ریشه (میلی‌متر)
شیراز	M4	۱۰/۲۳a	۵۳/۷۳a	۱۰/۳۳a	۹۳a	۳۱/۲۷b	۲۹/۳۳ab
	M13	۹/۷۷bc	۵۲/۳bc	۹bcd	۸۶ab	۲۹/۲۳c	۲۷/۶۷def
	M6	۸/۶۷d	۵۱/۰۳c…g	۸/۳۳def	۷۶bcd	۲۷/۸d	۲۷/۴۷d..g
	M17	۱۰/۱ab	۵۲/۶b	۱۰ab	۹۰a	۳۰/۹۳b	۲۹/۰۷abc
	M8	۷/۸ef	۴۹/۳hi	۷/۳۳fg	۷۳cde	۲۶/۸۷de	۲۶/۵gh
	M20	۷/۱۳h	۴۷/۵۷j	۷gh	۷۰de	۲۶/۱۷e	۲۶/۴۷gh
اصفهان	M4	۹/۷۳bc	۵۲/۵b	۱۰ab	۹۳a	۳۲/۷a	۲۹/۶a
	M13	۹/۶c	۵۱/۴۷b…g	۸/۳۳def	۸۳abc	۲۹/۰۳c	۲۷efg
	M6	۸/۶d	۵۰/۹۳d…g	۷/۶۷efg	۷۳cde	۲۷/۶۷d	۲۶/۷۳fg
	M17	۹/۶۷bc	۵۲/۱۳b…e	۸/۶۷cde	۹۰a	۳۱/۸۷ab	۲۹/۶a
	M8	۸/۱۳e	۵۰/۸fg	۷/۳۳fg	۷۰de	۲۶/۴۷e	۲۶/۷۷fg
	M20	۷/۶fg	۵۰/۳۳gh	۷gh	۶۳e	۲۵/۲f	۲۷/۱efg
کرج	M4	۹/۶۳a	۵۲/۲bcd	۹/۶۷abc	۹۳a	۳۰/۹b	۲۸/۴bcd
	M13	۹/۵۳bc	۵۰/۸۷efg	۸/۳۳def	۸۳abc	۲۹/۱۳c	۲۸/۰۷cde
	M6	۸/۶d	۴۹/۵۷hi	۷/۶۷efg	۷۶bcd	۲۷/۵۷d	۲۸/۳۳bcd
	M17	۹/۶۳ab	۵۱/۸۷b…f	۸/۳۳def	۹۰a	۲۸/۸c	۲۹/۰۷abc
	M8	۷/۴۷ef	۴۹/۱۳hi	۵/۶۷i	۷۳cde	۲۷/۴۷d	۲۶/۵۷fgh
	M20	۷/۳۳h	۴۸/۹i	۶hi	۶۳E	۲۵/۰۷F	۲۵/۵۷H

داده‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند.

طول شاخه

بر اساس نتایج اثرات تیمارها، بیشترین طول شاخه در توده شیراز تحت تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) کمترین طول آن در توده کرج و با اِعمال تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد (جدول ۷).

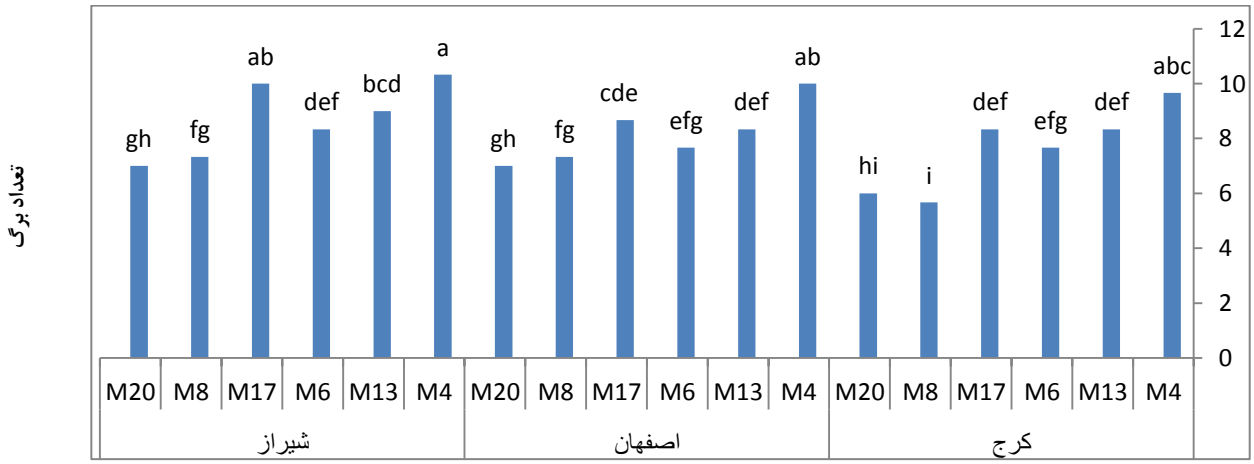
بر اساس نتایج تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) تاثیر کمتری نسبت به بقیه تیمارها بر روی طول شاخه داشت؛ سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۲).

شکل ۲- نتایج طول شاخه بدست آمده از تیمار تنظیم کننده‌های رشد نمونه‌ها: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

تعداد برگ

بر اساس نتایج حاصله، بیشترین تعداد برگ در تیمار M4 توده شیراز (۱۰/۳۳ عدد) و پس از آن M17 توده شیراز (۱۰ عدد) و کمترین تعداد آن در تیمار M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) توده کرج (۵/۶۷ عدد) مشاهده شد (جدول ۷).

نتایج نشان داد تیمارهای M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین) تاثیر کمتری بر تعداد برگ داشتند (نمودار ۳).

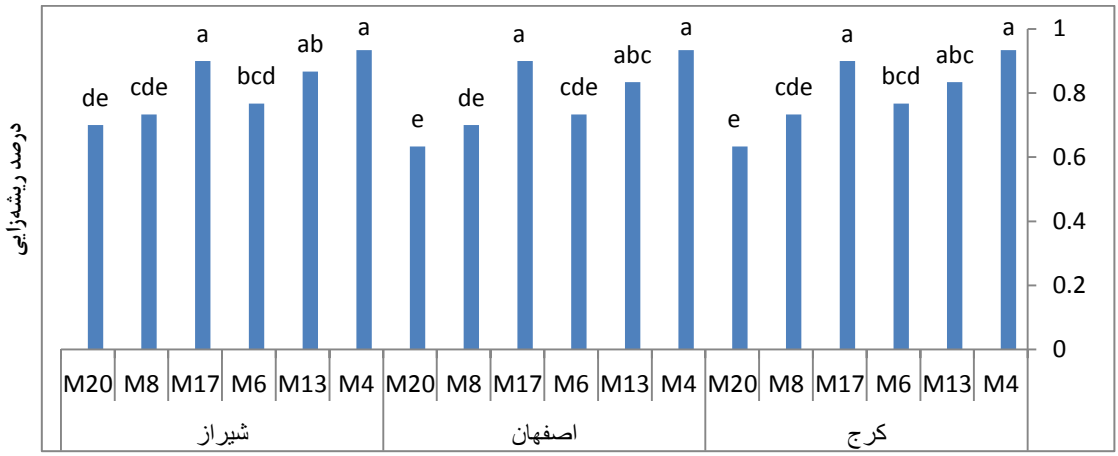


شکل ۳- نتایج بررسی تعداد برگ بدست آمده از تیمار تنظیم کننده‌های رشد نمونه‌ها: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

درصد ریشه‌زایی

با توجه به نتایج حاصله، بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) و M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در توده شیراز و اصفهان و کمترین درصد ریشه‌زایی در تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین و نفتالین استیک‌اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در نمونه‌های کرج و اصفهان مشاهده شد (جدول ۷).

تیمارهای M4 (۹۳ درصد) و M17 (۹۰ درصد) در هر سه توده، بیشترین درصد ریشه‌زایی داشتند. بر اساس نتایج؛ تیمارهای M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون) و M13 (-۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید) به همراه تیمار M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین)، در یک رده قرار گرفته‌اند (شکل ۴).

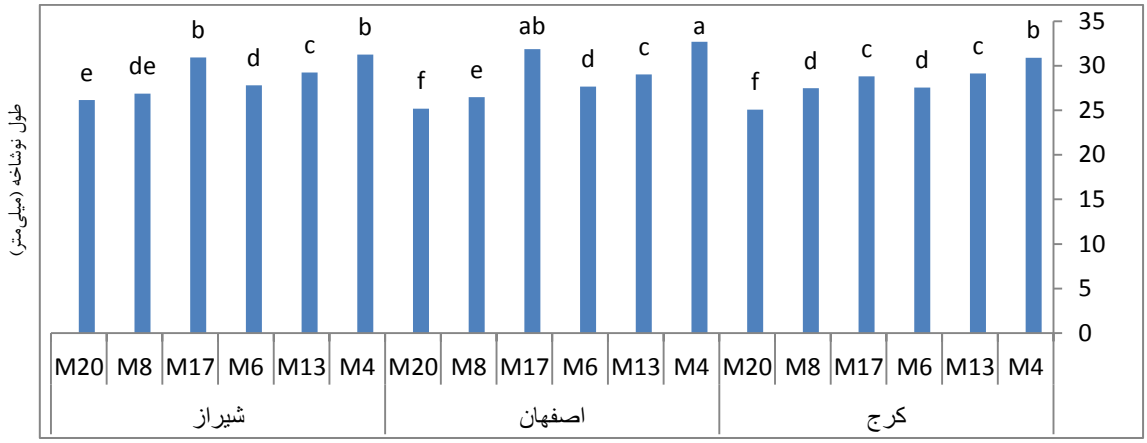


شکل ۴) بررسی تاثیر محیط‌های مختلف بر درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های پرآوری شده: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

طول نوشاخه

نتایج حاکی از این است که بیشترین طول نوشاخه (۳۲/۷ میلی‌متر) در تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) در توده اصفهان و کمترین طول نوشاخه (۲۵/۰۷ میلی-متر) در تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی M8 در توده کرج مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (جدول ۷).

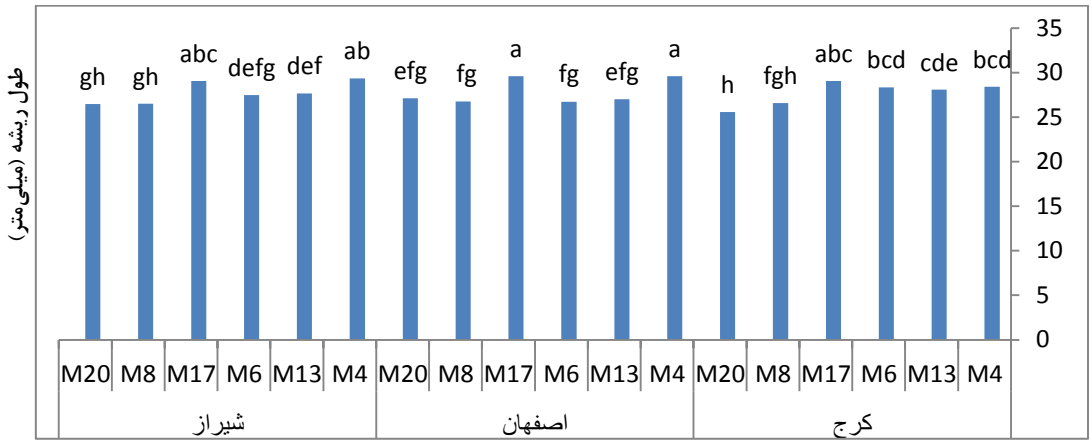
بر اساس نتایج تیمارهای M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) تاثیر کمتری در طول نوشاخه‌ها داشتند. تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) و M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در توده سپیدان شیراز تاثیر مشابهی بر طول نوشاخه‌ها داشتند (نمودار ۵).



شکل ۵- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی برروی طول نوشاخه: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

طول ریشه‌ها

بیشترین طول ریشه (۲۹/۶ میلی‌متر) مربوط به تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) و M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) توده اصفهان و کمترین طول ریشه (۲۵/۵۷ میلی‌متر) مربوط به تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) توده کرج بود (جدول ۷ و نمودار ۶).



شکل ۶) بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی بر روی طول ریشه: تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین)، M13 (۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید)، M6 (۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون)، M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، M8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) و تیمار M20 (۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر).

بحث

بذرهای ختمی همچون اکثر گیاهان این تیره دارای خواب نسبتاً طولانی بوده و کوتاه کردن دوره خواب و افزایش میزان جوانه‌زنی به روش‌های آزمایشگاهی می‌تواند در تکثیر و احیای این گیاه موثر واقع شود (Khare, 2007). در این بررسی جهت کوتاه کردن خواب بذر ختمی دارویی از تیمارهای مختلف استفاده شد. بر اساس نتایج حاصله اثر تیمار دمای بالا بیش از دمای پایین بر رفع رکود بذر موثر بود و اغلب صفات مورد مطالعه در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور و دمای حمام بخار مقادیر عددی بهتری را نشان داد.

دما تأثیر معنی‌داری بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بر جای می‌گذارد. کاهش سرعت جوانه‌زنی در دماهای پایین به غیرفعال شدن برخی آنزیم‌ها نسبت داده شده است (Jalilian *et al*., 2004). گزارشات متعددی حاکی از اثر مثبت افزایش درجه حرارت تا نقطه‌ای خاص بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور می‌باشد (Gholami-Tilebandi *et al*., 2012؛ Biabani *et al*., 2017). مطالعه‌ی تاثیر دما در ماشک (Khalili Aghdam and Jalilian, 2015) و ترشک وحشی (Alirezaei Noghondarand Azizi, 2016) نیز نشان می‌دهد که دما تاثیر معنی‌داری بر درصد و سرعت جوانه‌زنی دارد. موارد فوق در تایید نتایج حاصل از مطالعه پیش رو می‌باشد. از آنجا که نقل و انتقالات مواد غذایی در بذور پیش تیمار شده به خاطر بالاتر بودن فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم ساکارز، افزایش می‌یابد (Kaur *et al*., 2005) بنابراین بذرهای تیمار شده دارای قدرت زیستی بالاتری هستند و جوانه‌زنی سریع‌تر نیز دارند.

محققان در پژوهش‌های انجام شده با هدف دستیابی به ماده گیاهی کافی برای کشت درون شیشه‌ای و بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه ختمی دارویی تأثیر تیمارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی شامل سرما، آبشویی، GA_3، غلظت نمک‌های معدنی محیط کشت و همچنین اثر سال بر شکستن خواب بذر و پرآوری (ریزازدیادی و ریشه‌زایی) این گیاه مورد بررسی قرار دادند، آنان دریافتند که افزایش دما از ۳۰ درجه سانتی‌گراد به بالا و همچنین افزایش مدت زمان قرار گرفتن بذور در دماهای مختلف از ۲۴ ساعت به بالا باعث کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی شد که حاکی از اثر تنش‌های محیطی (دما) در کاهش سرعت جوانه‌زنی بذور جو بود (Biabani *et al*., 2017). ضمن این که تاثیر تیمار گرمادهی می‌تواند به پوسته سفت بذر ارتباط داشته باشد. در مطالعه‌ای در بررسی تیمارهای مختلف بهبود جوانه‌زنی بذر ختمی (*Althaea officinalis*) اِعمال تیمار آب داغ به مدت ۴ ساعت باعث افزایش صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر شد (شریف‌آرانی و همکاران، ۱۳۹۳). گزارش شده است که با افزایش مدت زمان اعمال تیمارها، اثر پیش‌تیمار بر مولفه‌های جوانه‌زنی افزایش می‌یابد (بیات و همکاران، ۱۳۹۴) که در مغایرت با نتایج حاصل از افزایش تعداد روز اعمال تیمار سرمادهی در مطالعه حاضر می‌باشد، این اختلاف، به تفاوت در ماهیت تیمارهای بکار برده شده ارتباط دارد. اگرچه افزایش دما در حمام بخار موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شد. دمای خیساندن تأثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی و پتانسیل جوانه‌زنی ختمی دارویی (*Althanes rosea*) دارد؛ زمان خیساندن به طور قابل توجهی پتانسیل جوانه‌زنی را تحت تأثیر قرار داد (Shao-ping and Shu-yun, 2007).

در آزمایش مربوط به پرآوری در تمامی صفات مورد مطالعه، ترکیب تنظیم کننده رشد ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (M4) بیشترین مقدار عددی را حاصل نمود. تنظیم کننده‌های رشد و ترکیبات محیط کشت، عوامل کلیدی برای تکثیر در شیشه و باززایی هستند

(Muhetaer *et al*., 2015). بطوری که تغییر در ترکیب و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بکار برده شده در محیط کشت می‌تواند رشد و مراحل توسعه گیاه را به شدت تحت تاثیر قرار دهد (Rao and Ravishankar, 2002). یکی از مهمترین مراحل ریزازدیادی مرحله پرآوری شاخه است، زیرا تهیه شاخساره‌ای مناسب برای ریشه‌زایی از ریزنمونه‌ها برای تکثیر انبوه از این مرحله آغاز می‌شود. سرعت پرآوری متأثر از تنظیم کننده‌های گیاهی به‌خصوص سایتوکینین‌ها می‌باشد حضور سایتوکینین به پرآوری نمونه‌ها در محیط کشت کمک می‌کند (Christensen *et al*., 2008). نتایج تحقیقات بر روی ختمی چینی نشان داد که بالاترین میانگین طول شاخه، تعداد برگ، وزن تر و خشک شاخه، میزان کلروفیل و تعداد شاخساره در محیط کشت *MS* به همراه FeEDDHA در مقایسه با *MS* همراه با FeEDDHA به دست آمد (Biabani *et al*., 2017). سرعت پرآوری متأثر از تنظیم‌کننده‌های گیاهی به خصوص سایتوکینین‌ها بوده است. حضور سایتوکینین به پرآوری نمونه‌ها در محیط کشت کمک می‌کند (Munir *et al*., 2012). محققان در بررسی کالوس‌زایی بر روی گونه ختمی مورد نظر به این نتیجه رسیدند که BA سبب کالوس‌دهی در ریزنمونه‌های کوتیلدون ختمی می‌گردد اما مدت زمان القای کالوس طولانی‌تر می‌باشد (Kaya and Gülser, 2018). در گونه‌ای از گیاه ترشک (*Rheum coreanum* Nakai) نیز محیط کشت حاوی BAP، بیشترین مقدار ریشه، شاخساره و گیاهچه حاصل شد (Num and Num, 2016) که نتایج حاصل از کاربرد این هورمون در افزایش پرآوری گیاهچه و تولید ریشه در گیاه ختمی را تایید می‌کند. با کاربرد BAP با غلظت ۳ میلی-گرم در لیتر در گیاه آلوئه‌ورا نیز بالاترین مقدار تولید شاخساره به دست آمد (Lavakumaran and Seran, 2014). گزارش شده است که کاربرد BAP در محیط کشت درون شیشه‌ای تاثیر قابل ملاحظه‌ای در فرایند باززایی گیاهان دارد (Xu *et al*., 2008). در تحقیقی که به منظور پرآوری گیاه ختمی (*Althaea officinalis*) با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد صورت گرفت، بیشترین تعداد برگ و حجم ریشه تحت کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد، این در حالی بود که بیشترین شاخه‌زایی تحت تاثیر ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین ریشه‌زایی تحت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد (Mujib *et al*., 2017). همانطور که مشخص است همه گیاهان بطور طبیعی هورمون‌های طبیعی و درونی تولید می‌کنند، بنابراین در شرایط آزمایش تحت تیمار هورمون‌های خارجی (تنظیم‌کننده‌های رشد) عکس‌العمل‌های متفاوتی می‌توانند نشان دهند. بر اساس نتایج این آزمایش بطور کلی قدرت ریشه‌زایی در این گیاه بالا بود و حتی در محیط‌های بدون اکسین نیز ریشه‌زایی خوبی در گیاهچه‌های پرآوری شده مشاهده شد. از آنجایی که گیاهچه‌ها قابلیت ریشه‌زایی خوبی داشتند از این رو آزمایش ریشه‌زایی حذف شد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، بیشترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار ۴۶ درجه سانتی‌گراد حمام بخار نمونه بذر توده اصفهان و کمترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار نگهداری به مدت ۱۰ ساعت در یخچال در توده شیراز بود. همچنین بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوباتور (بدون سرمادهی) در توده شیراز و کمترین درصد جوانه-زنی مربوط به تیمار ۱۰ ساعت نگهداری در یخچال در توده شیراز مشاهده شد. بیشترین ارتفاع گیاهچه مربوط به تیمار ۴۶ درجه سانتی‌گراد حمام بخار در بذر نمونه توده اصفهان با ۴/۴۰ سانتی‌متر و کمترین ارتفاع گیاهچه (۰/۳

سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۱۰ ساعت سرمادهی توده شیراز بود. بنظر می‌رسد با توجه به سفت بودن پوسته بذر گیاه ختمی، تیمار گرمادهی تاثیر بیشتری در جوانه‌زنی بذر دارد.

بیشترین تعداد برگ در توده شیراز تحت تیمار M17 و M4 و همچنین توده کرج تیمار M4 و کمترین میزان تعداد برگ در توده کرج تیمار M20 و M18 شمارش شد. بیشترین طول شاخه مربوط به توده شیراز و با کاربرد تیمار M4 و کمترین طول شاخه مربوط به توده کرج و اعمال تیمار M20 توده کرج بود. بیشترین درصد ریشه-زایی در تیمار M4 (۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین) و M17 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و نفتالین استیک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در توده شیراز و اصفهان بدست آمد. از آنجایی که اغلب گیاهچه‌ها در همه تیمارها قابلیت ریشه‌زایی خوبی داشتند، بین تیمارهای دارای اکسین و بدون اکسین تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

References

Abdel-Salam, N.A., Ghazy, N.M., Sallam, S.M., Radwan, M.M., Wanas, A.S., ElSohly, M.A. and Shenouda, M.L. (2018). Flavonoids of *Althea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. - Nat Prod Res 32 (6), 702-706.

Bayanati, M. and Mortazavi, S.N. (2013). Mass propagation of Rosa hybrid cv. Black baccara by periodical bioreactor. International Journal of Agriculture: Research and Review. 3 (2): 241-245.

Bayat, M., Rahmati, A., Amirnia, R. and Ramezani, M. (2015). Effect of pre-treatment and pre-treatment duration on seedling characteristics and germination indices of *Althaea officinalis* L. Iranian Journal of Science and Technology. 4 (1): 82-78.

Biabani, A., Zare, M., Sancholi, S. and Romani, A. (2017). Effect of temperature and duration of seed placement at different temperatures on seed germination characteristics of barley. Journal of Plant Ecosystem Conservation. 4 (1): 173-186.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161:839-851.

Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M. and Muller, R. (2008). *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 93 (2): 151-161.

Ehyaee, H. and Khajeh Nezhad, M. (2012). Evaluation of germination and sleep characteristics in 30 seedlings of medicinal plants; 2012. Iranian Journal of Field Crops Research.Vol. 9, No.4, p. 651-658.

Gholami-Tilebandi, H., Salehi-Balashahri, M. and Farhadi, R. (2012). Effects of priming and seed aging on germination and seedling growth of *Oryza sativa* L. Seed Science and Technology. 1:1-13.

Kaya, I. and Gülser, F. (2018). Determining Heavy Metal Contents of Hollyhock (*Althea rosea* L.) in Roadside Soils of a Turkish Lake Basin. Polish Journal of Environmental Studies 27:2081-2087.

Khalili Aghdam, N. and Jalilian, J. (2015). Estimation of germination cardinal temperature in cold and tropical Vetch. Iranian Journal of Seed Science and Research. 2 (1): 37-43.

Khare, C.P. (2007). Indian medicinal plants an illustrated dictionary. Delhi: Heidelberg Publication. pp. 40.

Muhetaer, T., Resalat, Y., Chu, G., Yin, X. and Munira, A. (2015). Determination of rutin,

affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality. In: Proceedings of the Fifth InternationalCongress on Hazelnut. Acta Hort. 556, 251–258.

Omidbeigi, R. (2007). Production and processing of medicinal plants. (2th ed). Astanghods publication. Vol. 1, 283p, (In Farsi).

Shao-ping, W. and Shu-yun, M.A. (2007). Effects of Soaking Seeds on the Germination Characteristics of *Mirabilis Jalapa* and *Althanes Rosea*. School of Landscape and Architecture, Henan Institute of Science and technology, Xinxiang, He'nan 453003, China.

Sharif Arani, S.A., Sadr Abadi Haghighi, R. And Abbaspour, M. (2014). The effect of different hot water usage on the failure of *Althaea officinalis* seed dormancy. Third Conference on Seed Science and Technology of Iran. 6-4 Shahrivar, Tehran.

Zargari, A. (1996). Medicinal Plant. University of Tehran Press. Fifth Edition. pP: 500-501.

quercetin and kaempferol in *Althaea rosea* (L) Gavan for Uyghur medicine by high performance liquid chromatography. Se Pu. 33 (12):1269-73.

Mujib, A., Tanu, P., Muzamil, A., Dipti, T., Nadia, Z., Basit, G. (2017). In vitro propagation of *Althaea officinalis*: the role of plant growth regulators in morphogenesis. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. Vol. 98(3) C pp. 167-173.

Munir, M., Hussain, A., Ul-Haq, I., Qureshi, R., Munazir, M., Rshad, M. and Khan, M. (2012). Callogenesis potential of cotyledonary explants of Althaea rosea. from Pakistan. Pak J Bot 44:271-75.

Munira, A., Muheta'er, T., Resalat, Y. and Xia, N. (2015). Study on composition, antibiotic activity and antioxidant activity of volatile oils from uyghur medicine *Althaea rosea*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi; 40 (8):1614-9.

Nas, M.N. and Read, P.E. (2000). Micropropagation of hybrid hazelnut: medium composition, physical state and ironsource

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 5, No 2, Autumn & Winter 2020

Optimization of seed germination and micropropagation of *Althea rosea* L. *in vitro* condition

Mohammad Hosein Ghaznavi[1], Marzieh Ghanbari Jahromi*[2], Seyed Amir Mousavi[3]

Abstract

The common hollyhock (*Althea rosea*) is a wild, annual plant. Its flowers, fruits and roots have medicinal properties. The cultivation of this medicinal plant is mostly challenged by a lack of proper seed germination and, as a result, an unfavorable establishment of seedlings in primary conditions of cultivation. Breaking the seed dormancy and stimulating seed germination in this species are known to have several ways. In three replications, this experiment was performed in a completely randomized design on three hollyhock ecotypes from Sepidan Shiraz, Kordan Karaj and Isfahan. In the first experiment, germination was evaluated after the seeds were exposed to 4 °C in different time periods (0, 10 hours, 7, 14, 21 and 28 days), while another treatment group involved the exposure of seeds to 35 and 46 °C in a steam bath for 6 hours. In the second experiment, the proliferation of hollyhock was optimized in vitro using a combination of different plant growth regulators, including 2 mg/L benzyl adenine (M4), 1 mg/L benzyl adenine in combination with 0.10 mg/L naphthalene acetic acid (M13), 1 mg/L thidiazuron (M6), 1.5 mg/L thidiazuron in combination with 0.10 mg/L naphthalene acetic acid (M17), 0.5 mg/L kinetin (M8), and 2 mg/L kinetin in combination with 0.10 mg/L naphthalene acetic acid (M20). The analysis of variance for the first experiment showed that the effect of ecotype (Sepidan Shiraz, Kordan Karaj and Isfahan) was significant ($P \leq 0.05$) on germination. This included the percentage and rate of germination, root volume and height of seedlings. The effect of temperature on seed germination was significant ($P \leq 0.05$), while also affecting other traits ($P \leq 0.01$). The highest values of proliferation, shoot length and rooting percentage were observed in the Shiraz ecotype when treated with M4 in vitro. The lowest values of these parameters were observed in the Karaj ecotype when treated with M20. Root length grew significantly in the Isfahan ecotype under M4 and M17 treatments, whereas the shortest roots were observed in the Karaj ecotype under the M20 treatment. The highest number of leaves was observed in the Shiraz ecotype by the M4 treatment, whereas the lowest number of leaves was recorded in the Karaj ecotype as a result of the M8 treatment.

Keywords: medicinal hollyhock, seed dormancy, tissue culture, auxin, cytokinin.

[1] Ms Graguated student of Horticulture Science, Vegetable Plants. Islamic University of Azad. Science and Research Branch of Tehran.

[2] *- Corresponding Author, Professor Assistant of Horticulture Science. Islamic University of Azad. Science and Research Branch of Tehran

[3] Professor Assistant of the National Institute of Genetics Research