پژوهش‌های بذر ایران/ سال نهم/ شماره اول/ ۱۴۰۱/ صفحات: ۷۴-۵۹

مقاله پژوهشی

اولین مطالعه‌ی درون شیشه‌ای شکست خواب بذر در جمعیت‌های گل راعی (*Hypericum perforatum*) ایران با منشأ جغرافیایی مختلف

زهرا حیدری[۱]، قاسم کریم‌زاده [۱،*]، سجاد رشیدی منفرد[۲]

چکیده مبسوط

مقدمه: گل راعی یا هوفاریقون یکی از گیاهان دارویی شگفت‌انگیز و مورد توجه در سراسر دنیا است که امروزه به عنوان یک درمان قطعی برای افسردگی شناخته می‌شود. با این حال وجود خواب و جوانه‌زنی اندک بذرها مانع پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی در مورد آن می‌گردد. با وجود غنای ذخیره ژنتیکی گل راعی در کشور تنها چند مورد مطالعه در خصوص تکثیر و نگهداری آن گزارش شده است که در اغلب آنها به منشاء جغرافیایی بذر و یا ریزنمونه‌ها اشاره نشده است. لذا این مطالعه با هدف بررسی تکثیر گیاه از بذرهای هشت جمعیت گل راعی متعلق به مناطق مختلف کشور، تحت شرایط درون شیشه‌ای با توجه به وجود پدیده‌ی خواب در بذر، صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: به دنبال جمع‌آوری بذر جمعیت‌های گل راعی از هشت منطقه مختلف جغرافیایی کشور (چالوس، فریدون‌کنار، رامیان، پرور، زنجان، سقز، مشکین شهر، پرسک)، تلاش شد تا با استفاده از محیط کشت موراشیگ- اسکوگ در سه شکل مختلف (ترکیب رایج به عنوان شاهد، ترکیب رایج غنی شده با هورمون اسید جیبرلیک و یک ترکیب تغییر یافته از آن) تاثیر نوع محیط غذایی و محل جمع‌آوری بذر بر میزان جوانه‌زنی بذر این جمعیت‌ها بررسی گردد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل محل رویش گیاه مادری و نوع محیط کشت، بر جوانه‌زنی بذرها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند. علاوه بر این، اثر تغییر نوع محیط کشت بر جوانه‌زنی بذر همه مناطق به جز مشکین‌شهر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به عبارتی، بذرهای جمع‌آوری شده از مشکین‌شهر به سادگی و به شکل قابل توجهی در محیط درون شیشه‌ای جوانه زدند (به طور متوسط ۹۷/۳ درصد) و تغییر ترکیب محیط کشت یا استفاده از هورمون اسید جیبرلیک، برای شکست خواب آنها ضرورتی نداشت. بذرهای جمع‌آوری شده از چالوس و پرسک در محیط کشت شاهد، کمترین جوانه‌زنی را داشتند (به طور متوسط ۲۲/۳ درصد). بذرهای منطقه چالوس و سقز در محیط دارای اسید جیبرلیک نسبت به شاهد و ترکیب تغییریافته، جوانه‌زنی بهتری داشتند (به ترتیب ۸۸ و ۶۵ درصد). اما کمتر از نیمی از بذرهای منطقه پرور در محیط غنی شده با اسید جیبرلیک نسبت به شاهد، جوانه زدند. کشت بذرهای فریدونکنار در محیط کشت رایج نیز به ترتیب با اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد بهتر از کاربرد اسید جیبرلیک و تغییر ترکیب محیط کشت بود.

نتیجه‌گیری: تفاوت مشاهده شده برای درصد جوانه‌زنی در جمعیت‌های بومی ایرانی گل راعی، تحت شرایط درون شیشه‌ای قابل توجه و تنوع جمعیت‌های کشور از این نظر تفاوت قابل توجهی را نشان داد. به علاوه، واکنش بذر جمعیت مناطق مختلف نسبت به تغییر محیط کشت بسیار متغیر و در موارد مختلف متفاوت بود. این مساله نشان دهنده‌ی تاثیر قابل توجه محل رویش گیاه مادری بر خصوصیات بذرهای نسل بعد و به ویژه نحوه‌ی جوانه‌زنی آنها است. لذا توجه به منشاء جغرافیایی بذرها در مطالعات از اهمیت بالایی برخودار بوده و قابل بررسی است.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی، اسید جیبرلیک، هوفاریقون، گیاه دارویی

جنبه‌های نوآوری:

۱- پژوهش حاضر، اولین گزارش از شکست خواب بذر هشت جمعیت ایرانی از گونه‌ی گل راعی به صورت درون شیشه‌ای است.

۲- برای نخستین بار در سطح کشور، منشاء جغرافیایی بذرها در مطالعات جوانه‌زنی گل راعی مطرح شده است.

۳- استفاده از ترکیب تغییر یافته‌ی محیط غذایی موراشیگ- اسکوگ برای شکست خواب بذر گل راعی یک روش کاملاً جدید است.

[۱] دانشجوی دکتری و استاد گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[*] رایانامه نویسنده مسئول: Karimzadeh_g@modares.ac.ir

http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1401.9.1.3.4

DOI: 10.29252/yujs.9.1.59

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸)

مقدمه

امروزه با ماشینی شدن زندگی بشر، افزایش فناوری و پیشرفت‌های مدرن، انسان بیش از پیش به استفاده از منابع طبیعی در جهت منافع خود روی آورده است. در این میان گیاهان به عنوان یکی از سرمایه‌های اساسی در طول تاریخ و حتی از دوران ماقبل آن، بسیاری از نیازهای جامعه را برطرف نموده (اسدی[۱]، ۲۰۱۹) و در بسیاری از موارد به عنوان دارو در سلامت عمومی ایفای نقش کرده‌اند (قاسمی پیربلوطی[۲]، ۲۰۰۹). فراگیر شدن دیدگاه مثبت جهانیان نسبت به محصولات گیاهی و اعتقاد به ایمن بودن آنها روز به روز بر محبوبیت محصولات سلامتی طبیعی حاوی ترکیبات گیاهی افزوده است (بارنز[۳] و همکاران، ۲۰۱۹). به عنوان مثال تنها در سال ۲۰۱۸، میزان خرید مصرف کنندگان آمریکایی نسبت به سال قبل از آن، با ۹/۴ درصد رشد، رکورد بی‌سابقه‌ای را در ۲۰ سال قبل خود به ثبت رساند (اسمیت[۴] و همکاران، ۲۰۱۷، ۲۰۱۸، ۲۰۱۹). گونه‌ی دارویی مطرح و جذاب گل راعی یا علف چای، با نام علمی *Hypericum perforatum* L. متعلق به خانواده‌ی Hypericaceae است که توسط ابن‌سینا «هوفاریقون» نامیده شد (مظفریان[۵]، ۱۹۹۸) و در جهان با نام انگلیسی St. John's wort شناخته می‌شود. تاکنون وجود ۲۹ گونه از جنس *Hypericum* در کشور ایران به ثبت رسیده (*Hypericum* online , 2018) و سه گونه‌ی *H. dogonbadanicum* Assadi؛ *H. fursei* N. Robson و *H. asperulum* Jaub. and Spach بومی فلور ایران هستند (جایمند[۶] و همکاران، ۲۰۱۳).

گل راعی به طور ویژه در نواحی معتدل شمالی و غرب کشور و در ارتفاعات به صورت وحشی می‌روید (رهنورد[۷]، ۲۰۱۶؛ منتظری[۸] و همکاران، ۲۰۱۸). از زمان‌های دور، این گیاه به عنوان یک عامل درمانی و التیام‌دهنده در بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات عصبی کاربرد داشته است (برولیس[۹] و همکاران، ۱۹۹۸؛ بیرهیوز[۱۰]، ۲۰۱۱؛ اولیویرا[۱۱] و همکاران، ۲۰۱۶؛ سارو[۱۲] و همکاران، ۲۰۱۸). امروزه نیز مهم‌ترین کاربرد گل راعی در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط است (مولر[۱۳]، ۲۰۰۳؛ مدینا[۱۴] و همکاران، ۲۰۰۶؛ کروکت و روبسون[۱۵]، ۲۰۱۱؛ کوشوت[۱۶] و همکاران، ۲۰۱۱؛ گاید[۱۷] و همکاران، ۲۰۱۶).

گونه *H. perforatum* یک گیاه علفی چندساله است که از طریق آپومیکسی[۱۸] اختیاری تولید مثل می‌کند (ماتزک[۱۹] و همکاران، ۲۰۰۱؛ زوباید[۲۰] و همکاران، ۲۰۰۶) و به علت تنوع قابل توجه در مورفولوژی، سطح پلوئیدی و سیستم تولیدمثل، یک گیاه مدل مناسب برای مطالعات آپومیکسی و به‌نژادی است (کوو[۲۱] و همکاران، ۲۰۱۰؛ کخ[۲۲] و همکاران، ۲۰۱۳؛ نورک[۲۳] و همکاران، ۲۰۱۳؛ ریززو[۲۴] و همکاران، ۲۰۱۹). اما روش تولیدمثلی این گیاه برنامه‌های معمول به‌نژادی را در مورد آن غیرعملی می‌سازد (ماتزک و همکاران، ۲۰۰۱؛ زوباید و همکاران، ۲۰۰۶). به علاوه، وجود پدیده‌ی خواب[۲۵] در بذرهای کوچک و استوانه‌ای شکل این گیاه (روبسون[۲۶]، ۲۰۰۶؛ شریای[۲۷]، ۲۰۱۱) مانع بزرگی بر سر راه حفظ ذخایر ژنتیکی آن از طریق تهیه بانک بذر است (پرز- گارسیا[۲۸] و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، کشف، حفظ، تکثیر و تثبیت گیاهان یکسانی که تحت شرایط ایده‌آل درون شیشه‌ای در مقادیر زیاد و به شکل

[1] Asadi
[2] Ghasemi Pirbalouti
[3] Barnes
[4] Smith
[5] Mozaffarian
[6] Jaimand
[7] Rahnavard
[8] Montazeri

[9] Brolis
[10] Beerhues
[11] Oliveira
[12] Sarroua
[13] Muller
[14] Medina
[15] Crockett and Robson
[16] Košuth
[17] Gaid
[18] Apomixis
[19] Matzk
[20] Zobayed
[21] Qu
[22] Koch
[23] Nürk
[24] Rizzo
[25] Seed dormancy
[26] Robson
[27] Scheriau
[28] Pérez-García

یکنواخت قادر به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه باشند؛ در سطح ملی ضروری می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کنترل شده‌ی درون شیشه‌ای، نسبت به بیوسنتز آنها، قابل پیش‌بینی، ساده‌تر، ایمن‌تر وسریع‌تر است (امیدی و عبداللهی[1]، ۲۰۱۵). گیاهان تولید شده به این روش، مورد توجه صنایع داروسازی نیز قرار می‌گیرند (مورچ[2] و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین، کشت بافت و ریزازدیادی به عنوان تحقیقات بنیادی و پایه به منظور سایر مطالعات مانند انتقال ژن و تحقیقات زیست فناوری ضروری است (قاضیان تفریشی[3] و همکاران، ۲۰۰۶).

علی‌رغم ذخیره‌ی ژنتیکی گسترده و پتانسیل دارویی گل راعی، تاکنون هیچ نوع مطالعه‌ی جامع و هدفمندی روی گونه‌های جنس *Hypericum* در ایران گزارش نشده است. تولید ارقام زراعی و حتی در سطح ابتدائی‌تر، تکثیر و نگهداری گونه‌ها به طور کلی و یک گونه به‌طور ویژه به هیچ وجه در سطح ملی مطرح نیست و مغفول مانده است. در چند مورد محققان داخلی، تکثیر گل راعی را با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف و با استفاده از تیمارهای کالوس‌زایی متعدد، تحت شرایط کشت بافت بررسی و بهینه کرده‌اند (پارسامنش[4] و همکاران، ۲۰۱۵؛ ۲۰۱۵؛ زحمتکش[5] و همکاران، ۲۰۱۸). به جز در چند مورد در اغلب این مطالعات منشاء جغرافیایی بذرها و ریزنمونه‌های مورد استفاده گزارش نشده است (قاضیان تفریشی و همکاران، ۲۰۰۶؛ رضایی نظری[6] و همکاران، ۲۰۱۶).

این مطالعه با هدف بررسی تولید گیاه از بذرهای هشت جمعیت گل راعی متعلق به مناطق مختلف کشور، تحت شرایط درون شیشه‌ای با توجه به وجود پدیده‌ی خواب در بذر، صورت گرفت. گیاهانی که به این شکل تکثیر شوند جهت استفاده در سایر مطالعات مانند تعیین اندازه ژنوم، تعیین محتوای متابولیتی و غیره قابلیت کاربرد دارند.

[1] Omidi and Abdollahi
[2] Murch
[3] Ghazian Tafrishi
[4] Parsamanesh
[5] Zahmatkesh
[6] Rezaie Nazari

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آزمایش

با مراجعه به مرکز ذخایر ملی ژنتیکی و زیستی ایران[7]، مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور[8] و مرکز تحقیقات و منابع طبیعی استان لرستان[9]، طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵، هشت نمونه بذر از جمعیت‌های گونه گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) تهیه شد. مشخصات و موقعیت جغرافیایی مناطق مورد نظر در ادامه آورده شده است (جدول ۱، شکل ۱). این آزمایش در سال ۱۳۹۷ (۲۰۱۸) به منظور تعیین اثربخشی شرایط درون شیشه‌ای بر میزان جوانه‌زنی بذر گل راعی طراحی گردید تا اثر محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ[10]، ۱۹۶۲) با ترکیب رایج (t_0)، محیط MS حاوی هورمون اسید جیبرلیک (GA_3) (t_1) و یک ترکیب جدید از MS (t_2) بر جوانه‌زنی بذرها بررسی و مشخص گردد آیا میزان جوانه‌زنی بذر گل راعی را تغییر می‌دهند یا خیر (جدول ۲). در نهایت امکان تکثیر گیاهچه‌های حاصل در محیط کشت MS بدون وجود هیچ گونه تنظیم کننده‌ی رشدی بررسی گردید.

آزمایش جوانه‌زنی

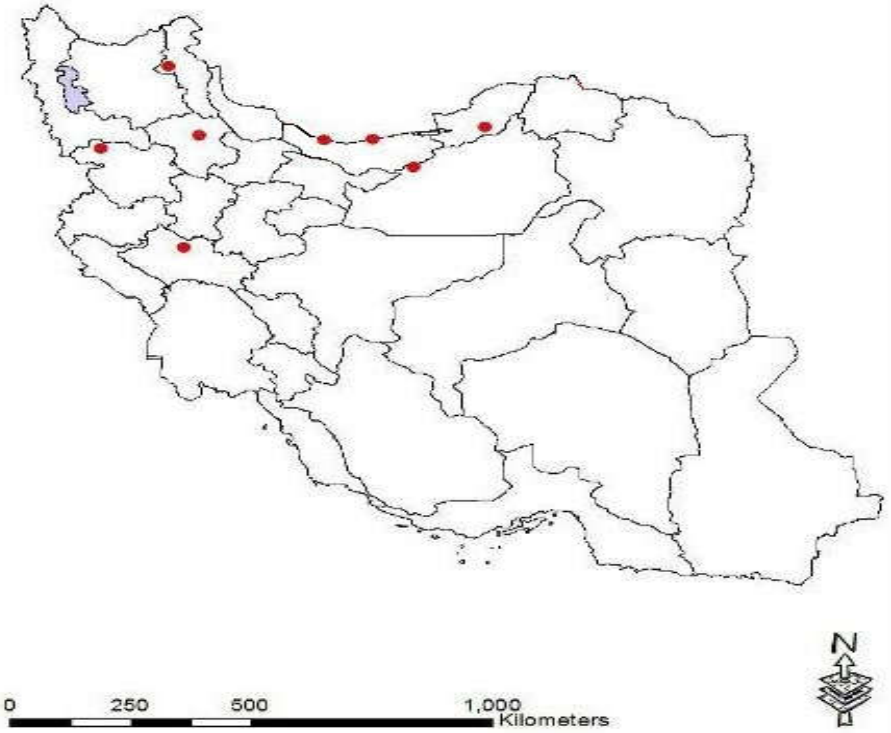
بذرها پس از ضدعفونی با محلول ۱٪ وزنی- حجمی نیترات نقره[11] به مدت ۱۵ دقیقه و سه مرتبه شست‌وشو با آب استریل (کوشوت و همکاران، ۲۰۱۱)، طبق تیمارهای طراحی شده روی محیط کشت MS قرار داده شدند. نکته‌ی قابل ذکر اینکه فقط مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از ترکیب جدید محیط غذایی به هر بذر اختصاص داده شد (جدول ۲). ظرف‌های حاوی محیط کشت و بذرها در یک اتاق رشد با دمای ^{o}C ۲ ± ۲۳، ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی و شدت نور $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ۸۵ منتقل شدند (شکل ۲، الف و ب).

[7] Iranian Biological Resource Center; IBRC
[8] Research Institute of Forests and Rangelands; RIFR
[9] Natural Resources and Agriculture Research Organization; NRAR
[10] Murashige and Skoog
[11] $AgNO_3$

جدول ۱. مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری بذرهای گل راعی مورد استفاده در مطالعه حاضر

Table 1. Geographic characteristics of the St. John's wort's seed collection regions used in the present study

جمعیت Population	منبع بذرها Source of seeds	محل جمع‌آوری Collection Region	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)	تاریخ جمع‌آوری Date of Collection
1	IBRC	Challus, Mazandaran	51° 40′ 70″	36° 64′ 59″	81	2009
2		Feredunkenar, Mazandaran	52° 31′ 17″	36° 41′ 02″	-20	2009
3		Ramyan, Golestan	55° 08′ 25″	37° 00′ 52″	226	2012
4	RIFR	Parvar, Semnan	53° 29′ 04″	35° 53′ 16″	2114	2009
5		Zanjan, Zanjan	48° 44′ 17″	36° 41′ 43″	2350	2009
6		Saqqez, Kurdestan	46° 16′ 02″	36° 14′ 28″	1476	2010
7		Meshkin Shahr, Ardabil	47° 22′ 44″	38° 19′ 56″	1730	2010
8	NRAR	Peresk, Aleshtar, Lorestan	48° 21′ 23″	33° 48′ 57″	1748	2016



شکل ۱. نقشه‌ی موقعیت جغرافیایی مناطق جمع‌آوری بذر جمعیت‌های گل راعی در مطالعه‌ی حاضر، ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار GIS[1].

Fig. 2. The map of Geographic location of the St. John's wort's seed collection regions used in the present study, traced using GIS software.

[1] Geographic Information System; GIS

جدول ۲. جزئیات سه تیمار محیط کشت استفاده شده برای شکست خواب بذر جمعیت‌های گل راعی

Table 2. Three culture media details used for seed dormancy elimination of St. John's wort populations

تیمار Treatment	جزئیات Details
t_0	محیط کشت MS* شامل ۴/۴ گرم در لیتر از نمک‌های رایج، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید آمینه گلایسین MS Medium consisting of 4.4 g l^{-1} common salts, 30 g l^{-1} Sucrose, 2 g l^{-1} glycine
t_1	t_0 غنی شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون اسید جیبرلیک (سنچز-کورونادو[1] و همکاران، ۲۰۱۵) t_0 (Sánchez-Coronado *et al.*, 2015) enriched with 1000 mg l^{-1} Gibberellic acid
t_2	t_0 تغییر یافته شامل یک چهارم از مقدار نمک‌های محیط کشت رایج، فاقد ساکارز و گلایسین Modified t_0 consisting of 25% of common salts, lacking sucrose and glycine

*غنی شده با ویتامین‌های مورد نیاز (گامبورگ[2] و همکاران، ۱۹۸۶)
* Enriched by necessary vitamins (Gamborg *et al.*, 1986)

تعداد بذرهای جوانه‌زده هر روز، به مدت یک ماه شمارش شدند. درصد جوانه‌زنی بذر جمعیت‌های مختلف تحت تاثیر دو عامل محیط کشت در سه سطح (t_0، t_1 و t_2) و محل جغرافیایی منشأ بذر، بصورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab 17.0 تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از روش LSD توسط نرم افزار SPSS 16.0 انجام شد.

شرایط نگهداری از گیاهان

گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذرها در مرحله‌ی رشدی مناسب، به محیط کشت MS غنی شده با گروه ویتامین‌های B5 (گامبورگ[3] و همکاران، ۱۹۶۸)، g l^{-1} ۳۰ ساکارز و mg l^{-1} ۲ گلایسین اما فاقد هر نوع تنظیم کننده رشدی، منتقل و در اتاق رشد با شرایط مذکور، نگهداری شدند. کار تکثیر و ریزازدیادی آنها هر دو هفته یک بار با استفاده از ریزنمونه‌ی ساقه به طول دو سانتی‌متر حاوی یک میانگره و دو تا سه برگ، صورت می‌گرفت (شکل ۲، ج و د).

نتایج

پس از اینکه مشخص شد داده‌های بدست آمده از آزمایش نرمال هستند، اثر تیمارها بر درصد جوانه‌زنی بذرها مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل محل رویش گیاه مادری و نوع محیط کشت، بر جوانه‌زنی بذرها معنی‌دار ($P<0.01$) بود (جدول ۳). نتایج نشان داد که اثر تغییر نوع محیط کشت بر بذر همه مناطق به جز مشکین‌شهر معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه‌ی میانگین‌ها مشخص نمود که بذرهای منطقه مشکین‌شهر بیشتر از سایر بذرها جوانه زده‌اند. به طور متوسط بیش از ۹۷ درصد بذرهای جمع‌آوری شده از این منطقه در محیط کشت MS با ترکیب رایج (t_0) و محیط کشت حاوی هورمون اسید جیبرلیک (t_1)، جوانه زدند. به علاوه بذرهای همین منطقه در محیط کشت MS با ترکیب جدید (t_2) و بذرهای جمع‌آوری شده از منطقه‌ی پرور نیز در محیط کشت رایج، با اندکی اختلاف (با متوسط ۹۶/۷ درصد جوانه‌زنی) در رتبه بعدی قرار گرفتند (جدول ۵). هرچند، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. با توجه به این نتایج مشخص‌گردید که بذرهای گل راعی منطقه‌ی مشکین‌شهر در محیط درون شیشه‌ای به سادگی و به شکل قابل توجهی جوانه می‌زنند و تغییر ترکیب محیط کشت MS یا استفاده از هورمون اسید جیبرلیک ضرورتی ندارد.

استفاده از GA_3 (t_1) موجب شد کمتر از نیمی از بذرهای منطقه پرور نسبت به شاهد جوانه بزنند (۴۲/۳ درصد در مقایسه با ۹۶/۷ درصد). تیمار t_2 نیز سبب گردید که بذرهای این جمعیت نسبت به شاهد کمتر جوانه بزنند که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (کاهش ۱/۶۷ درصدی؛ جدول ۵). کمترین درصد جوانه‌زنی وقتی مشاهده شد که بذرهای جمع‌آوری شده از چالوس و پرسک در محیط MS معمولی (شاهد) کشت شدند

[1] Sánchez-Coronado
[2] Gamborg
[3] Gamborg

(به طور متوسط ۲۲/۳ درصد). در مرتبه‌ی بعد، بذرهای جمع‌آوری شده از سقز و زنجان که به ترتیب در محیط MS تغییر یافته (t_2) و حاوی هورمون GA_3 (t_1) کشت شده بودند؛ کمترین جوانه‌زنی را از خود نشان دادند (به طور متوسط ۲۷/۳ و ۲۸ درصد) (جدول ۵).

هم‌چنین، معلوم شد که استفاده از $1000\ mg\ l^{-1}$ اسید جیبرلیک در محیط غذایی (t_1)، تنها در مورد بذرهای مناطق چالوس و سقز موجب شد تا هم نسبت به شاهد و هم نسبت به ترکیب تغییریافته، جوانه‌زنی بهبود یابد (به ترتیب با میانگین جوانه‌زنی ۸۸ و ۶۵ درصد).

بذرهای منطقه‌ی چالوس در اثر تیمار با اسید جیبرلیک به ترتیب در مقایسه با شاهد و t_2، ۶۵/۷ و ۲۶/۳ درصد بیشتر جوانه زدند. اما بذرهای منطقه‌ی سقز به طور متوسط در محیط دارای اسید جیبرلیک ۲۴/۳ درصد بیشتر از بذرهای تیمار شاهد و ۱۷/۷ درصد بیشتر از تیمار t_2 جوانه زدند. جوانه‌زنی بذرهای منطقه پرسک در اثر استفاده از GA_3 در محیط غذایی نسبت به شاهد بهبود یافت، اما استفاده از ترکیب تغییریافته‌ی محیط کشت، نسبت به GA_3 کارایی بیشتری در مقایسه با شاهد داشت (بیشتر از ۵۰ درصد؛ جدول ۵).

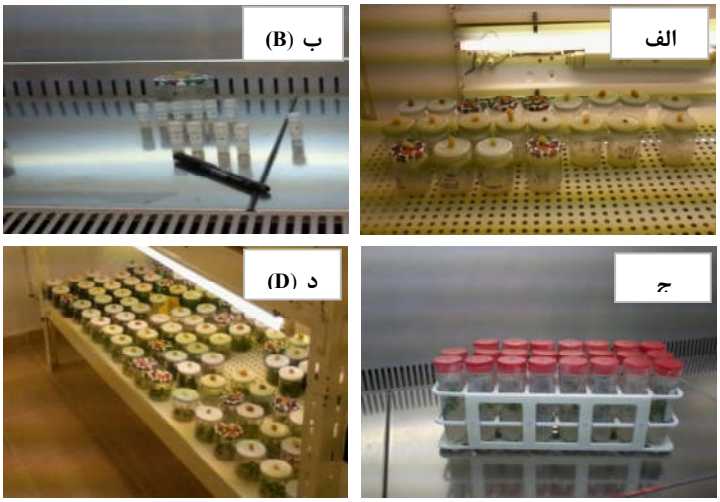
واکنش بذرهای منطقه فریدونکنار نسبت به انواع محیط کشت، همانند بذرهای مشکین‌شهر بود (جدول ۵). اما برخلاف بذرهای منطقه‌ی مشکین‌شهر، اختلاف جوانه‌زنی بذرهای فریدونکنار در محیط‌های غذایی متفاوت، معنی‌دار شد. ترکیب رایج محیط MS برای بذرهای این منطقه بهتر از کاربرد GA_3 و تغییر ترکیب محیط غذایی (t_2) بود (به ترتیب $P<0.05$ و $P<0.01$؛ جدول ۴ و ۵). به علاوه مشخص گردید که همبستگی درصد جوانه‌زنی بذرها با ارتفاع از سطح دریا و طول جغرافیایی محل جمع‌آوری بذرها معنی‌دار نیست (به ترتیب با ضرایب همبستگی r =۰/۱۰۱ و r = ۰/۰۰۹). اما عرض جغرافیایی محل رویش گیاه مادری بذرها در سطح احتمال پنج درصد با درصد جوانه‌زنی آنها همبستگی داشت (r = ۰/۲۹۸) (جدول ۶).

بحث

به طور کلی، کیفیت نامناسب بذر گیاه دارویی گل راعی باعث حصول درصد جوانه‌زنی پایین، عدم یکنواختی در جوانه‌زنی و عدم توانایی کافی برای تولید گیاهچه قوی می‌گردد (نعمتی[1] و همکاران، ۲۰۱۶)؛ در حالی‌که جوانه‌زنی یک مرحله حساس در چرخه زندگی گیاهان محسوب می‌شود (کلر و کولمن[2]، ۱۹۹۹) و تعیین کننده میزان پویایی درون یک جمعیت گیاهی و بر آن تاثیرگذار است (زوبل[3] و همکاران، ۲۰۰۰).

با توجه به پتانسیل دارویی زیاد گونه‌های *Hypericum* تاکنون مطالعات زیادی در سطح بین‌المللی روی جوانه‌زنی و شکست خواب بذر آنها انجام شده است، ولی نتیجه‌ای جز درصد جوانه‌زنی اندک، در پی نداشته است. از سوی دیگر، بیوسنتز و مقدار متابولیت‌های مهم این گیاه توسط عوامل مختلف از جمله عوامل محیطی (چیراک [4] و همکاران، ۲۰۰۶؛ چیراک و همکاران، ۲۰۰۷؛ گادزوسکا- سیمیک[5] و همکاران، ۲۰۱۲) و همین‌طور شرایط ژنتیکی، فیزیولوژیکی و متابولیکی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (کوشوت و همکاران، ۲۰۰۳). امروزه در سطح دنیا و کشور گزارش‌های متعددی در زمینه‌ی تکثیر درون شیشه‌ای گل راعی با اهداف مختلف وجود دارد. اما در سطح ملی تاکنون گزارشی مشاهده نشده است که بدون استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی به تولید گل راعی بپردازند و استفاده از ترکیبات مختلف هورمونی برای کالوس‌زایی، ریشه‌زایی و شاخه‌زایی رایج است. به عنوان مثال، قاضیان تفریشی و همکاران (۲۰۰۶) به مطالعه‌ی کشت درون شیشه، نحوه کال‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی توده بذر گونه‌ی *H. perforatum* بومی منطقه اردبیل پرداخته‌اند.

[1] Nemati
[2] Keller and Kollmann
[3] Zobel
[4] Çirak
[5] Gadzovska-Simic



شکل ۲. مراحل مختلف آزمایش جوانه‌زنی و تولید درون شیشه‌ای گل راعی. (الف) ظرف‌های حاوی محیط غذایی MS و بذرها، t_0؛ (ب) میکروتیوب‌های حاوی تک بذرها روی ۰/۵ میلی‌لیتر محیط MS تغییر یافته، t_2؛ (ج) گیاهان آماده برای انتقال به محیط MS معمولی جهت تکثیر؛ (د) گیاهان یکسان حاصل از ریزازدیادی.

Fig. 2. Different stages of *in vitro* germination test and the propagation of St. John's wort. (A) Vessels, containing MS media as well as seeds, t_0; (B) Microtubes containing 0.5 ml modified MS medium carrying single seeds, t_2; (C) Plants ready for transplanting into common MS medium for propagation; (D) Identical plants from micro propagation.

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر محل جمع‌آوری بذر و محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی گل راعی

Table 3. Analysis of variance for the effect of seed collection's location and culture medium on the germination percentage of St. John's wort

منبع تغییرات Source of variations		درجه آزادی Df	میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی Mean squares of germination percentage
محل جمع‌آوری بذر	Seed collection's location (A)	7	2790.5**
محیط کشت	Culture medium (B)	2	708.5**
(A) × (B)	(A) × (B)	14	1821.5**
خطا	Error	48	7.7
ضریب تغییرات (درصد)	Coefficient of variation (%)	-	4.4

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

** Significant difference at 1% probability level

آنها از هورمون‌های مختلف برای کالوس‌زایی در بذر، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی استفاده نمودند. در این آزمایش بیشترین مقدار وزن کالوس در تیمار $1\ mg\ l^{-1}$ کینتین[1] به همراه $0/25\ mg\ l^{-1}$ تنظیم کننده‌ی رشد دی‌کلروفنوکسی استیک‌اسید[2] (2-4, D) به دست آمد.

بهترین ترکیب هورمونی برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی نیز به ترتیب، $1\ mg\ l^{-1}$ نفتالین استیک‌اسید[3] (NAA) به همراه $1\ mg\ l^{-1}$ کینتین معرفی شد. در یک گزارش دیگر از پارسامنش و همکاران (۲۰۱۵) ریزنمونه‌ی یک گره و برگ، در ترکیب $2\ mg\ l^{-1}$ بنزیل آدنین[4] (BA) به همراه $0/2\ mg\ l^{-1}$ تنظیم کننده‌ی رشد 2-4 D بیشترین تعداد کالوس را تولید کرد. هم‌چنین، تیمار $1\ mg\ l^{-1}$ BA به همراه $0/5\ mg\ l^{-1}$ کینتین باعث تولید بیشترین تعداد شاخه شد.

[1] Kinetin
[2] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
[3] 1-Naphthaleneacetic acid
[4] Benzyl Adenin

جدول ۴. میانگین مربعات اثر متقابل بین محل جمع‌آوری بذر و محیط کشت برش داده شده بر اساس محیط کشت برای درصد جوانه‌زنی
Table 4. Mean squares of interaction between seed collection's location and culture medium sliced on the basis of culture medium for germination percentage

منبع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean Squares
محل جمع‌آوری بذر Seed collection's location		
1•	2	3276.33**
2	2	515.11**
3	2	724.11**
4	2	2864.33**
5	2	3123.11**
6	2	1094.33**
7	2	0.44ns
8	2	2852.11**

ns ، ** به ترتیب، اختلاف غیر معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪
• اعداد نماینده‌ی هشت محل جمع آوری بذر براساس جدول ۱ هستند.
ns, ** Non-significant and significant difference at 1% probability level, respectively
• Numbers represents eight seed collection's location according to Table 1.

تفاوت بسیار معنی‌دار درصد جوانه‌زنی بذر جمعیت‌های مختلف پژوهش حاضر، با نتایج محققان دیگر انطباق دارد و با توجه به تنوع آب و هوایی و جغرافیایی کشور قابل پیش بینی بوده و دور از ذهن نمی‌باشد. به عنوان نمونه، طی یک مطالعه، پرز- گارسیا و همکاران (۲۰۰۶)، تعداد ۶۸ جمعیت مختلف *H. perforatum* را از مناطق مختلف جغرافیایی اسپانیا جمع‌آوری و از لحاظ درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت شرایط مختلف نوری و دمایی بررسی نمودند. درصد و سرعت جوانه‌زنی بسیار متغیر جمعیت‌ها، این نتیجه را در پی داشت که دما بر درصد جوانه‌زنی اثری معنی‌داری ندارد، ولی نور در اغلب جمعیت‌ها موجب افزایش درصد جوانه‌زنی گردید. با این حال، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی در مقابل ۸ ساعت تاریکی تفاوتی در سرعت جوانه‌زنی بذر اغلب جمعیت‌ها ایجاد نکرد. کارتا[1] و همکاران (۲۰۱۶) اما بر نیاز نوری و رژیم دمایی بذر جمعیت‌های *H. elodes* L. برای جوانه‌زنی تاکید کرده‌اند. این محققین سپس بذر جمعیت‌های با درصد جوانه‌زنی پایین را در معرض پیش‌تیمارهای مختلف قرار دادند و مشخص شد که جوانه‌زنی در نیمی از جمعیت‌های تحت مطالعه در صورت پیش‌تیمار با اسید جیبرلیک، به شکل معنی‌داری، رخ داد. این مطلب در توافق با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر است: استفاده از mg l^{-1} ۱۰۰۰ از GA_3 در محیط کشت (t_1) برای بذرهای مناطق چالوس (۱)، سقز (۶) و پرسک (۸) موجب افزایش جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد گردید. این افزایش برای بذرهای چالوس چشمگیرتر بود (به ترتیب ۶۵/۷، ۲۴/۳ و ۱۷/۷ درصد؛ جدول ۵). این مساله نشان می‌دهد که اثر کاربرد خارجی GA_3 بر بذر در جمعیت‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد (پرز- گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، بذرهایی که در این مناطق تشکیل می‌شوند احتمالا دارای خواب فیزیولوژیکی بوده و جنین نابالغ دارند. این امر می‌تواند در اثر یک یا چند عامل آب و هوایی مثل رطوبت نسبی، ارتفاع از سطح دریا یا شرایط خاک باشد. تفاوت پاسخ بذرها به اسید جیبرلیک می‌تواند به میزان بارندگی‌ها در سال جمع‌آوری آنها مربوط باشد (سیلر[2] و همکاران، ۲۰۱۱). با کاهش بارندگی و بروز خشکی در منطقه، میزان بیوسنتز اسید آبسزیک (ABA) در بذر افزایش و در

[1] Cárta
[2] Seiler

جدول ۵. اثرات محل جمع‌آوری بذر و محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی

Table 5. Effects of seed collection's location and culture medium on germination percentage

محل جمع‌آوری بذر Seed collection's location	محیط کشت Culture medium	میانگین درصد جوانه‌زنی ± خطای استاندارد Mean of germination percentage ± SE
1•	t_0	$22.33^{i} \pm 1.45$
1	t_1	$88.00^{b} \pm 1.53$
1	t_2	$61.67^{de} \pm 1.67$
2	t_0	$83.00^{bc} \pm 2.08$
2	t_1	$78.33^{c} \pm 1.67$
2	t_2	$58.33^{ef} \pm 1.67$
3	t_0	$63.33^{de} \pm 2.40$
3	t_1	$32.67^{h} \pm 1.45$
3	t_2	$52.33^{f} \pm 1.45$
4	t_0	$96.67^{a} \pm 0.88$
4	t_1	$42.33^{g} \pm 1.45$
4	t_2	$95.00^{a} \pm 1.45$
5	t_0	$63.00^{de} \pm 2.08$
5	t_1	$28.00^{hi} \pm 1.53$
5	t_2	$80.33^{c} \pm 0.88$
6	t_0	$40.67^{g} \pm 0.67$
6	t_1	$65.00^{d} \pm 1.15$
6	t_2	$27.33^{hi} \pm 1.45$
7	t_0	$97.33^{a} \pm 1.20$
7	t_1	$97.33^{a} \pm 1.45$
7	t_2	$96.67^{a} \pm 1.76$
8	t_0	$22.33^{i} \pm 0.45$
8	t_1	$40.00^{g} \pm 1.15$
8	t_2	$82.33^{bc} \pm 1.45$
		$LSD_{1\%} = 6.077$

میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند.

• اعداد نماینده‌ی هشت محل جمع آوری بذر براساس جدول ۱ هستند.

Means with at least a common letter have no significant different at 1% probability level.

• Numbers represents eight seed collection's location according to Table 1.

جدول ۶. ضرایب همبستگی پیرسون برای درصد جوانه‌زنی بذور جمعیت‌های مختلف گل راعی و مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری بذرها

Table 6. Pearson correlation coefficients for seeds germination percentage of St. John's wort's populations vs. geographical characteristics of seed collection's locations

	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)
طول جغرافیایی Longitude	0.059^{ns}	1	
ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude	-0.250^{*}	-0.545^{**}	1
درصد جوانه‌زنی Germination Percentage	0.298^{*}	0.009^{ns}	0.101^{ns}

^{ns} ، * ، ** به ترتیب اختلاف غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪

^{ns}, *, ** Non-significant, significant differences at 5% and 1% probability levels, respectively

نتیجه مقدار GA_3 کاهش می‌یابد. بنابراین، جنین برای بلوغ و جوانه زدن به اسید جیبرلیک احتیاج پیدا می‌کند. سنچز و همکاران که در سال ۲۰۱۵ انواع خواب بذر در گونه‌ی *Hypericum philonotis* را بررسی کردند نیز گزارش نمودند که نور، جیبرلین‌ها، ترکیبی از درجه حرارت و جیبرلین و غوطه‌ورسازی در استون[1] درصد جوانه‌زنی بذرها را افزایش می‌دهد. در گزارش موردنظر، بهترین غلظت GA_3 برای شکست خواب بذرهای گونه‌ی *H. philonotis* $1000\,mg\,l^{-1}$ ذکر شده است.

نعمتی و همکاران (۲۰۱۶) معتقدند که استفاده از هورمون اسید جیبرلیک و مواد ایجاد کننده‌ی پتانسیل اسمزی برای پرایمینگ[2] بذرها با تسهیل و تسریع آبنوشی، فراهم کردن عناصر غذایی مورد نیاز جنین و تاثیر بر فعالیت آنزیم‌هایی مانند آلفاآمیلازها، میزان و سرعت جوانه‌زنی را بهبود می‌بخشد. آنها گزارش نمودند که از بین تیمارهای به کار رفته برای پرایمینگ هورمونی و اسمزی بذر *H. perforatum* تیمار ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون جیبرلین با میانگین ۸۷/۵ درصد موجب بالاترین درصد جوانه‌زنی و سایر صفات مربوط به جوانه‌زنی گردید؛ درحالی‌که شاهد در تمامی صفات مورد بررسی در پایین‌ترین گروه آماری قرار گرفت. این محققین، استفاده از پرایمینگ هورمون جیبرلین در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را برای افزایش کارایی بذر گل راعی توصیه کرده‌اند. در واقع نسبت اسید جیبرلیک به اسید آبسزیک آغاز یا عدم آغاز جوانه‌زنی را مشخص می‌نماید. به نحوی که افزایش این نسبت موجب می‌شود تا سنتز آنزیم آلفا آمیلاز در بذر شروع شود. این آنزیم منابع غذایی در دسترس را به شکلی که برای جنین قابل استفاده باشند، تجزیه می‌کند و بنابراین جوانه‌زنی اتفاق می‌افتد (تایز و زایگر[3]، ۲۰۰۶ به نقل از نعمتی خویی و همکاران، ۲۰۱۶). بنابراین، استفاده از این روش منجر به جوانه‌زنی مطلوب‌تر بذرهای تیمار شده نسبت به شاهد می‌گردد و در نهایت گیاهچه‌های قوی‌تر و سالم‌تری تولید می‌شود که منجر به استقرار بهتر و سریع‌تر گیاه می‌گردد (نعمتی و همکاران، ۲۰۱۶).

در مطالعه‌ی پیش‌رو مشخص شد که تنها عرض جغرافیایی محل جمع‌آوری بذر، با درصد جوانه‌زنی بذرها همبستگی دارد (۲۹/۸ درصد). هرچند این همبستگی چندان قوی به نظر نمی‌رسد. به عبارت دیگر، به طور کلی انتظار می‌رود که بذرهای مناطق شمالی‌تر جوانه‌زنی بهتری نسبت به بذرهای جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی‌تر داشته باشند، به طوری که بذرهای جمع‌آوری شده از منطقه‌ی مشکین‌شهر در همه تیمارها نسبت به بذر مناطق دیگر (به استثناء بذرهای پرور در تیمار شاهد) بیشتر جوانه زدند. این نکته می‌تواند تحت تاثیر بلوغ جنین بذرها و تاریخ جمع‌آوری آنها از منطقه، امری پیچیده باشد. با در نظر گرفتن آزمایشات شاهد، مشخص می‌گردد که درصد جوانه‌زنی بذرهای مشکین‌شهر (۷) بیش از سایر مناطق بوده و در مرتبه‌ی بعدی بذرهای منطقه فریدونکنار (۲) علیرغم عرض جغرافیایی کمتر، نسبت به منطقه رامیان (۳)، بیشتر جوانه زدند. علت این مساله می‌تواند مربوط به سن بذرها باشد. احتمالا افزایش سن بذر، بر بلوغ جنین تاثیر مثبت داشته و موجب می‌گردد پس از طی یک دوره، میزان خواب آن کاهش یابد. اگرچه، لازمه‌ی اظهار نظر قطعی در این خصوص، بررسی سایر پارامترها نظیر میزان متوسط بارندگی‌های زمستان، درجه حرارت‌های مناطق در فصل‌های مختلف و حتی شرایط ذخیره‌ی بذر غیره است.

پرز- گارسیا و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع مناطقی که بذرها از آنجا جمع‌آوری شده‌اند با درصد جوانه‌زنی نهایی بذرها همبستگی ندارد. از سوی دیگر، اگرچه تفاوت قابل توجه ارتفاع مناطق جغرافیایی جمع‌آوری (۲۰- تا ۲۳۵۰ متر) با درصد جوانه‌زنی بذرها همبستگی معنی‌داری نداشت، اما می‌تواند از طریق تأثیر بر عوامل محیطی دیگر مانند میزان تابش فرابنفش منطقه، درجه حرارت و غیره بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذرها تاثیرگذار باشد. چنانچه دو یا چند جمعیت، زیستگاه‌های مشابهی داشته باشند، هم‌چنان می‌توانند در درصد جوانه‌زنی از یکدیگر متفاوت باشند (پرز- گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶). این مطلب در

[1] Aceton
[2] Priming
[3] Taiz and Zieger

خصوص جمعیت‌های مناطق چالوس، فریدونکنار و رامیان به خوبی مشخص شد. بذرهای بدست آمده از منطقه چالوس و فریدونکنار نزدیک به ۱۶ درصد در جوانه‌زنی با یکدیگر متفاوت هستند و بذرهای منطقه‌ی رامیان ۲۴ درصد کمتر از بذرهای فریدونکنار جوانه زدند. درحالی‌که طول و عرض جغرافیایی تقریباً مشابهی دارند. اما ارتفاع این سه منطقه از سطح دریا به شکل قابل توجهی متفاوت است. تنوع بالای جمعیت‌های مناطق مختلف از نظر جوانه‌زنی بذرها بواسطه‌ی تنوع فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آن‌ها توجیه می‌شود و می‌تواند نوعی سازگاری منطقه‌ای به شرایط محیطی ویژه باشد (پرز- گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶).

تاثیر عوامل مختلف محیطی از جمله نور، رطوبت، درجه حرارت و مواد مغذی خاک بر نحوه جوانه‌زنی بذر گونه‌های مختلف گیاهی (فننر[1]، ۱۹۹۱؛ گاترمن[2]، ۱۹۹۲) در سال ۲۰۱۶ نیز توسط محققان تائید شد. کارتا و همکاران (۲۰۱۶) با جمع‌آوری پنج توده بذر از پنج منطقه در فرانسه، ایتالیا، آلمان و انگلستان به دنبال یافتن رابطه همبستگی شرایط آب و هوایی با تفرق ژنتیکی جمعیت‌ها بودند. میزان خواب اولیه‌ی بذرها پس از دوره‌های مختلف سرمادهی مرطوب بررسی و مشخص شد که موثرترین عامل در شکست خواب، سرمادهی مرطوب بذرها درست قبل از قرار دادن آنها در دمای مطلوب جوانه‌زنی است. در این میان بذرهای مناطق جنوبی طی این شرایط راحت‌تر جوانه زدند. به علاوه بذرهای همه مناطق برای جوانه زدن احتیاج به یک دوره نوری تقریباً مشابه و رژیم دمایی متناوب داشتند. با این حال میزان خواب اولیه جمعیت‌های مختلف به شکل قابل توجهی متفاوت بود و ارتباطی به تفاوت ژنتیکی آنها نداشت. مدل‌های بدست آمده در این مطالعه با استفاده از پارامترهای آب و هوایی مختلف میزان خواب جمعیت‌ها را پیش‌بینی نموده و نتایج حاصل نشان داد که درجه حرارت‌های بالاتر در تابستان و بارندگی بیشتر در زمستان، موجب خواب کمتر و جوانه‌زنی سریع‌تر بذر می‌گردد. بنابراین محیطی که بذر در آن تشکیل می‌شود و بلوغ بذر اتفاق می‌افتد نقش اساسی در تعیین میزان خواب اولیه بذر *H. elodes* دارد. در نهایت این محققان به این نتیجه رسیدند که میزان خواب اولیه در بذر جمعیت‌های گونه‌ی *H. elodes* با منشأ آتلانتیک- اروپا به جای تفرق ژنتیکی جمعیت‌ها به شرایط اقلیمی محل مرتبط است.

[1] Fenner
[2] Gutterman

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تفاوت صفت درصد جوانه‌زنی در جمعیت‌های ایرانی گل راعی (*H. perforatum*) در شرایط درون شیشه‌ای قابل توجه و تنوع جمعیت‌های کشور از این نظر بسیار معنی‌دار است. به علاوه، واکنش بذر جمعیت مناطق مختلف نسبت به تغییر محیط غذایی بسیار متغیر و در موارد مختلف متفاوت است. این مساله نشان دهنده‌ی تاثیر قابل توجه محل رویش گیاه مادری بر خصوصیات بذرها و به ویژه نحوه‌ی جوانه‌زنی آن‌ها است. لذا استفاده از شرایط کنترل شده‌ی درون شیشه‌ای به خوبی تاثیر منشاء جغرافیایی بذرها را بر جوانه‌زنی آنها نمایان و تائید می‌کند. اگرچه این امر می تواند ناشی از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها نیز باشد که خود تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. بنابراین، توجه به منشأ بذرها در مطالعات و پژوهش‌ها از اهمیت بالایی برخودار بوده و قابل بررسی و مطالعه است.

سپاسگزاری

از دانشگاه تربیت مدرس و پروفسور ایوا چلاروا[3] مدیر گروه ژنتیک موسسه زیست‌شناسی و اکولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه پاول جوزف شافاریک[4]، جهت تهیه امکانات و حمایت مالی و از جناب آقای دکتر علی مختصی بیدگلی هیأت علمی گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس جهت مشاوره آماری در تالیف مقاله تقدیر می‌شود.

[3] Eva Čellárová
[4] Department of Genetics, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, P. J. Šafárik University in Košice, Mánesova 23, 041 54 Košice, Slovakia

منابع

Assadi, M. 2019. Flora of Iran. Journal of Iran Nature, 4(2): 21-49. [In Persian].

Barnes, J., Arnason, J.T. and Roufogalis, B.D. 2019. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): botanical, chemical, pharmacological and clinical advances. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71: 1-3. https://doi.org/10.1111/jphp.13053

Beerhues, L. 2011. Biosynthesis of the active *Hypericum perforatum* constituents. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5(1): 70-77.

Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R. and Peterlongo, F. 1998. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. Journal of Chromatography A, 825: 9-16. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00697-9

Cárta, A., Probert, R., Peruzzi, L. and Bedini, G. 2016. Local climate explains degree of seed dormancy in *Hypericum elodes* L. (Hypericaceae). Plant Biology, 18(1): 76-82. https://doi.org/10.1111/plb.12310

Crockett, S.L. and Robson, N.K.B. 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5: 1-13.

Çirak, C., Ayan, A.K., Scholl, T., Kevseroðlu, K. and Özen, T. 2006. Variation of hypericin in St. John's wort (*Hypericum perforatum*) from wild populations of northern Turkey. Acta Botanica Hungarica, 48(1-2): 47-56. https://doi.org/10.1556/ABot.48.2006.1-2.8

Çirak, C., Radušienė, J., Karabük, B. and Janulis, V. 2007. Variation of bioactive substances and morphological traits in *Hypericum perforatum* populations from Northern Turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 35(7): 403- 409. https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.01.009

Fenner, M. 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. Seed Science Research, 1: 75-84. https://doi.org/10.1017/S0960258500000696

Gaid, M., Haas, P., Beuerle, S. and Beerhues, L. 2016. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. Journal of Biotechnology, 222: 47-55. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.016

Gadzovska- Simic, S., Tusevski, O., Antevski, S., Atanasova-Pancevska, N., Petreska, J., Stefova, M., Kungulovski, D. and Spasenoski, M. 2012. Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. Archives of Biological Sciences, 64(1): 113-121. https://doi.org/10.2298/ABS1201113G

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158. https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5

Ghasemi Pirbalouti, A. 2009. Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts of Iran. Herba Polonica, 55(2): 69-77.

Ghazian Tafrishi, G., Azizi, M., and Farsi, M. 2006. Investigation of in vitro culture of Iranian St. Johns wort (*Hypericum perforatum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 22(3): 172-179. [In Persian with English Summary].

Gutterman, Y. 1992. Maternal effects on seeds during development. In: Fenner, M., 2nd (ed.). Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities. CAB International, Wallingford, pp. 27-59. https://doi.org/10.1079/9780851994321.0059

Hypericum Online 2018. A site dedicated to Hypericum- The St. John's Wort. Available online in: http://hypericum.myspecies.info/. (Accessed November 2018).

Jaimand, K., Rezaee, M.B., Naderi, M., Mazaffarian, V., Azadi, R., Golipoo, M. and Karimi, Sh. 2013. Essential oil composition of eight *Hypericum species* (Hypericaceae) from Iran: Part II. Journal of Medicinal Plants and By-products, 8: 61-68. [In Persian with English Summary].

Keller, M. and Kollmann, J. 1999. Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. Agriculture, Ecosystema & Environment, 72: 87-99. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(98)00167-4

Koch, M.A., Scheriau, Ch., Betzin, A., Hohmann, N. and Sharbel, T. 2013. Evolution of cryptic gene pools in *Hypericum perforatum*: the influence of reproductive system and gene flow. Annals of Botany, 111: 1083-1094. https://doi.org/10.1093/aob/mct065

Košuth, J., Smelcerovic, A., Borsch. Th., Zuehlke, S., Karppinen, K., Spiteller, M., Hohtola, A. and Čellárová, E. 2011. The hyp-1 gene is not a limiting factor for hypericin biosynthesis in the genus Hypericum. Functional Plant Biology, 38: 35-43. https://doi.org/10.1071/FP10144

Matzk, F., Meister, A., Brutovská, R. and Schubert, I. 2001. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixes. The Plant Journal, 26(3): 275-282. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01026.x

Medina, M.A., Martínez- Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I. and Quesada, A.R. 2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound. Life Science, 79(2): 105-111. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.027

Montazeri, M., Azadbakht, M., Najafi Zarrini, H., Nematzadeh G.A., Pakdin Parizi, A. and Davoodi, A. 2018. Hairy root cultures of *Hypericum perforatum* L.; A promising method for the high scale production of hypericin. Journal of Medicinal Plants, 17(67): 55-67.

Mozaffarian, V.A. 1998. Dictionary of Iranian plant names, Latin-English-Persian. Farhang Mo'aser. Tehran, Iran, 596p.

Murch, S.J. and Saxena, P.K. 2006. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Challenges and strategies for production of chemically- consistent plants. Canadian Journal of Plant Science, 86(3): 765-771. https://doi.org/10.4141/P05-179

Müller, W.E. 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacological Research, 47(2): 101-109. https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00266-9

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nemati, M.R., Abbasi Surki, A. and Falah, S. 2016. Effect of seed priming on germination parameters of medicinal plant St. John's wort. Proceedings of the 4th International Conference on Applied Research in Agriculture, Natural Resources and Environment, Tehran, Iran, October. [In Persian with English Summary].

Nürk, N.M., Madriñán, S., Carine M.A., Chase, M.W. and Blattner, F.R. 2013. Molecular phylogenetics and morphological evolution of St. John's wort (*Hypericum*: Hypericaseae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 66: 1-16. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.022

Oliveira, A.I., Pinho, C., Sarmento, B. and Dias, A.C. 2016. Neuroprotective activity of *Hypericum perforatum* and its major components. Frontiers in Plant Science, 7: 1004-1004. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01004

Omidi, M. and Abdollahi, P. 2015. Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. Modern Genetics Journal, 9(4): 391-402. [In Persian with English Summary].

Parsamanesh, Z., Bayat, F. and Hedayat, M. 2015. Investigation of In vitro culture and indirect organogenesis of *Hypericum perforatum* L. Proceedings of 1st International and 4th national conference on medicinal plants and sustainable agriculture. Iran, Hamedan. 16th December. [In Persian with English Summary].

Pérez-García, F., Huertas, M., Mora, E., Peña, B., Varela, F. and González Benito, M.E. 2006. *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, pre-sowing treatments and seed desiccation. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1187-1198. https://doi.org/10.1007/s10722-005-2012-3

Qu, L., Widrlechner, M.P. and Rigby, A.M. 2010. Analysis of breeding system, ploidy and the role of hexaploids in three *Hypericum perforatum* L. populations. Industrial Crops and Products, 32: 1-6. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.01.005

Rahnavard, A. 2016. Genetic and biochemical diversity of *Hypericum perforatum* L. grown in the Caspian climate of Iran. Applied Ecology and Environmental Research, 15(1): 665-675. https://doi.org/10.15666/aeer/1501_665675

Rezaie Nazari, M., Miri, S.M., and Ghazi Jahani, N. 2016. Production of somatic embryos using stem explants in the St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Proceedings of 5th National Conference on Agriculture and Natural Resoureces Iran, Tehran.14 July, Iran. [In Persian with English Summary].

Rizzo, P., Altschmied, L., Stark, P., Rutten, T., Gündel, A., Scharfenberg, S., Franke, K., Bäumlein, H., Wessjohann, L., Koch, M., Borisjuk, L. and Sharbe, T.F. 2019. Discovery of key regulators of dark gland development and hypericin biosynthesis in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Plant Biotechnology Journal, 17(12): 2299-2312. https://doi.org/10.1111/pbi.13141

Robson, N.K.B. 2006. Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 3): Subsection 1. Hypericum series 2. Senanensia, subsection 2. Erecta and section 9b. Graveolentia. Systematics and Biodiversity, 4(1): 19-98. https://doi.org/10.1017/S1477200005001842

Sánchez-Coronadoa, M.E., Olverab, C., Márquez- Guzmánb, J., Macías-Rubalcavac, M.L., Orozcod, S., Anayaa, A.L. and Orozco-Segoviaa, A. 2015. Complex dormancy in the seeds of *Hypericum philonotis*. Flora, 213: 32-39. https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.04.001

Sarroua, E., Giassafaki, L.P., Masuero, D., Perenzoni, D., Vizirianakis, I.S., Irakli, M., Chatzopouloua, P., and Martens, S. 2018. Metabolomics assisted fingerprint of *Hypericum perforatum* chemotypes and assessment of their cytotoxic activity. Food and Chemical Technology, 11: 325-333. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.057

Scheriau, C.L. 2011. Evolutionary History of *Hypericum perforatum* L. Ph.D. Thesis, Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics, Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany.

Seiler, C., Harshavardhan, V.T., Rajesh, K., Reddy, P.S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. and Sreenivasulu, N. 2011. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. Journal of Experimental Botany, 62: 2615-2632. https://doi.org/10.1093/jxb/erq446

Smith, T., Kawa, K., Eckl, V., Morton, C. and Stredney, R. 2017. Herbal supplement sales in US increase 7.7% in 2016. Market Report, 115: 56-65.

Smith, T., Kawa, K., Eckl, V., Morton, C. and Stredney, R. 2018. Herbal supplement sales in US increase 8.5% in 2017, Topping $8 Billion. Market Report, 119: 62-71.

Smith, T., Gillespie, M., Eckl, V., Knepper, J. and Morton Reynolds, C. 2019. Herbal supplement sales in US increase by 9.4% in 2018. Market Report, 123: 62-73.

Taiz, L. and Zieger, E. 2006. Plant Physiology. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 764p.

Zahmatkesh, H., Azizi, E., Kermani, M., and Rahbarian, R. 2018. Investigating of using tissue culture in improving the propagation of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Proceedings

of 2nd National Conference on Knowledge and Technology of Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment of Iran. Tehran, Iran. 2nd-4th April. [In Persian with English Summary].

Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Goto, F.E. and Kozai, T. 2006. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. Annals of Botany, 98: 793-804. https://doi.org/10.1093/aob/mcl169

Zobel, M., Otsus, M., Liira, L., Moora, M. and Möls, T., 2000. Is small scale species richness limited by seed availability or microsite availability? Ecology, 81: 3274-3282. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[3274:ISSSRL]2.0.CO;2

Iranian Journal of Seed Research, 2022, 9(1): 59-74

Research Article

The first *in vitro* study of seed dormancy breakage in Iranian populations of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) with different geographical origins

Zahra Heidari[1], Ghasem Karimzadeh[1, *], Sajad Rashidi Monfared[2]

Extended Abstract

Introduction: St. John's wort is one of the most amazing and medicinal plants of interest worldwide which is nowadays known as a certain cure for depression. However, the presence of dormancy and low seed germination is a barrier to the progress of its breeding programs. Despite the richness of the plant's genetic resources, there are only a few studies reported on its propagation and maintenance in Iran, most of which do not mention the geographical origin of the used seeds or explants. The current study was carried out aiming to evaluate *in vitro* plant propagation of eight Iranian endemic populations of St. John's wort seeds which belonged to different geographical origins, emphasizing seed dormancy phenomena.

Materials and Methods: Following the collection of eight populations of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) seeds from different geographical regions of Iran, the Murashige and Skoog culture media (common salt mixture as a control, MS improved with gibberellic acid and a modified combination of MS) was used in an effort to investigate the effect of culture medium as well as seed collection locations on the germination percentage of these populations.

Results: The results showed that the interaction between the seed collection locations and the culture medium on seed germination was significant at $P<0.01$. Besides, the effect of changing culture media on seed germination was significant in all populations at $P<0.01$, except for Meshkin-Shahr. In other words, the seeds collected from Meshkin-Shahr germinated easily as well as notably under *in vitro* conditions (97.3% on average), and there was no need either to modify the combination of MS medium or to use gibberellic acid for seed dormancy elimination. The seeds originated from Challus and Peresk had the lowest germination in the control medium (22.3%, on average). Seeds from Challus and Saqqez had better germination in the media enriched with gibberellic acid compared to the control and the modified MS media (88% and 65%, respectively). However, less than half of the Parvar seeds germinated in the MS medium improved with GA_3, compared to the control. Cultivation of seeds obtained from Fereydunkenar in common MS medium also led to better germination than using GA_3 and modifying the combination of medium with 95% and 99% confidence levels, respectively.

Conclusion: The results of the current study demonstrated that the observed difference in seed germination percentage is remarkable in the Iranian endemic St. John's wort populations under *in vitro* conditions. Moreover, the variation among national populations was significant. Besides, the response of the seed populations originating from different locations varied with respect to the changes in the culture medium and in the different cases. This shows the considerable effect of the growth location of the maternal plant on the characteristics of the next generation seeds, especially the way they germinate. Hence, it is very important to pay attention to the seed's origins in the studies and it is investigable.

Keywords: Germination, Gibberellic acid, Medicinal plant

***Highlights*:**

1- This is the first report on the *in vitro* seed dormancy elimination in the eight Iranian St. John's wort populations.
2- It was for the first time bringing up the geographical origins of seeds in the national germination studies on the St. John's wort.
3- It is a quite new method to use a modified combination of MS medium for seed dormancy elimination in the St. John's wort.

[1] Ph.D. Student and Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[2] Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author, E-mail: karimzadeh_g@modares.ac.ir

http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1401.9.1.3.4

DOI: 10.29252/yujs.9.1.59

(Received: 05.01.2021; Accepted: 08.09.2021)