Investigation the effect of chilling treatment on the breaking dormancy and forcing culture of the endemic medicinal plant wild celery (*Kelussia odoratissima* Mozaff.)

Abstract

In this research, effect of the number of chilling hours above zero (2 ℃) in five time durations (0, 700, 1400, 2100, and 2800 hours) in three replications on the dormancy and growth of tuberous roots of *Kelussia odoratissima* in the form of a completely randomized design was conducted. Chilling treatment including temperature 2 ℃ was applied on the tuberous roots of *K. odoratissima* in time durations and some morphological and biochemical traits were measured. The highest germination rate (72%) of the tuberous root was observed in the chilling treatment of 2800 h, and in the chilling treatment of 1400 h, 50% of the tuberous roots were germinated. Chilling treatment led to acceleration of germination, increase of seedling length and stem. The highest amount of soluble carbohydrates was recorded in the cold treatment of 2800 h (76 mg/g fresh weight) and the lowest amount was observed in the control treatment (7 mg/g fresh weight). Chilling treatment led to changes in the concentration of abscisic acid and gibberellic acid phytohormones, so that the highest concentration of gibberellic acid and the lowest amount of abscisic acid (75.5 and 20.2 nanomol per gram of fresh weight, respectively) were belonged to 2800 h treatment. In addition, chilling treatment increased the activity of alpha-amylase, beta-amylase and protease enzymes by 1.2, 0.63, and 0.35 (mg/g fresh weight), respectively. These results indicated that the chilling requirement of the *K. odoratissima* plant is approximately 2100 to 2800 h and the forcing culture of *K. odoratissima* in a controlled environment has been successful.

Keywords: *Soluble carbohydrate, Physiological dormancy, Gibberellic acid, Chilling requirement, α-Amylase.*

بررسی اثر تیمار سرمایی بر رفع خفتگی و پیش‌رس کردن گیاه دارویی اندمیک کرفس‌کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.)

چکیده

در این پژوهش تاثیر تیمار تعداد ساعات سرمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) در ۵ سطح زمان (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰، ۲۱۰۰ و ۲۸۰۰ ساعت) بر روی خفتگی و رویش جوانه ریشه غده‌ای کرفس کوهی در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. پس از اعمال تیمار سرمایی طی مدت زمان‌های تعیین شده، برخی شاخص‌های رویشی، بیوشیمیایی و میزان برخی هورمون‌های گیاهی (جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید) ارزیابی گردید. بیشترین میزان رویش (۷۲ درصد) ریشه غده‌ای کرفس کوهی در تیمار سرمایی ۲۸۰۰ ساعت مشاهده شد و همچنین در تیمار سرمایی ۱۴۰۰ ساعت نیز ۵۰ درصد غده‌ها رویش کرده بودند. تیمار سرمایی منجر به تسریع رویش، افزایش طول گیاهچه و بنیه گیاهچه شد. تحت تأثیر تیمار سرمایی بیشترین و کمترین میزان کربوهیدرات محلول (به‌ترتیب ۷۶ و ۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌ترتیب در تیمار سرمایی ۲۸۰۰ و صفر ساعت (شاهد) ثبت گردید. همچنین، بیشترین میزان جیبرلیک اسید و کمترین میزان آبسزیک اسید به‌ترتیب ۷۵/۵ و ۲۰/۲ (نانومول بر گرم وزن تر) در تیمار سرمایی ۲۸۰۰ ساعت مشاهده شد. علاوه براین، سرما باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتئاز به‌ترتیب ۱/۲، ۰/۶۳ و ۰/۳۵ (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که خفتگی ریشه غده‌ای کرفس کوهی از نوع خفتگی فیزیولوژیک بوده و می‌توان آنرا با مشابه‌سازی شرایط محیطی بسته به طول دوره سرمادهی و شرایط اکولوژیک رویشگاه تا حدودی خنثی کرد. در پایان مشخص شد که نیاز سرمایی کرفس کوهی تقریباً ۲۱۰۰ تا ۲۸۰۰ ساعت می‌باشد و پیش‌رس کردن کرفس کوهی در محیطی کنترل شده موفقیت‌آمیز بود.

کلید واژه‌ها: کربوهیدرات محلول، خفتگی فیزیولوژیک، جیبرلیک اسید، نیاز سرمایی، آلفا آمیلاز.

مقدمه

کشور ایران از لحاظ تنوع زیستی و ژنتیکی دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشد. تنوع شرایط جغرافیایی و آب و هوایی در گستره سرزمین پهناور ایران، گوناگونی عظیمی را در شرایط اقلیمی و به تبع آن در جوامع گیاهی پدید آورده است. تاکنون گیاهشناسان داخلی و خارجی تعداد گیاهان موجود در ایران را حدود ۸۰۰۰ گونه برآورد کرده‌اند. ایران با داشتن بیش از یک چهارم سرده‌های چتریان (Apiaceae)، به‌عنوان یکی از مراکز پراکنش مهم این تیره به‌ویژه در منطقه‌ی جنوب غربی آسیا محسوب می‌شود (Mousavi *et al*., 2020). در فلور ایران چتریان به‌عنوان تیره‌ای مهم دارای ۱۲۲ آرایه[1] انحصاری می‌باشد (Mozaffarian, 2007).

سرده *Kelussia* یکی از جدیدترین سرده‌های تیره چتریان بوده که فقط در ایران گزارش شده است. گیاه "کرفس کوهی" یا "کلوس" (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) توسط برنامه توسعه ملل متحد[2] اخیرا به‌عنوان گونه در معرض خطر در ایران معرفی شده است (Ebrahimi *et al*., 2018). از نظر گیاه‌شناسی، ارتفاع این گیاه (ارتفاع ساقه گل‌دهنده) به ۱۲۰ و گاهی تا ۲۰۰ سانتی‌متر هم می‌رسد، بسیار معطر بوده، برگ‌ها قاعده‌ای، بزرگ و دوبار شانه‌ای، گل‌آذین آن بزرگ و بصورت چتر انتهایی می‌باشد. فرم این گیاه در اوایل دوره رویشی به‌دلیل فشردگی برگ‌های قاعده‌ای به‌شکل غنچه می‌باشد. رویشگاه طبیعی این گیاه ارزشمند چند ساله، محدود به ارتفاعات ۲۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا و در مناطق محدودی از رشته کوه‌های زاگرس (استان های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد و خوزستان) دارای خاک رسی سیلتی، با حداقل ۴–۵ ماه دمای زیر صفر و حداکثر دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد است (Razeghi *et al*., 2016).

کرفس کوهی به‌عنوان یک سبزی دارویی مصرف می‌شود که حاوی متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی چون Z–لیگوستیلید[3] و ۳–ای–بوتیل‌فتالید[4] می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2007; Ebrahimi *et al*., 2018). علاوه براین، حاوی ترکیبات فنولی است که به بروز اثراتی مانند پیشگیری از سرطان و فعالیت ضد میکروبی منجر می‌شود. خواص دارویی این گیاه شامل اثرات ضد درد، ضد التهاب، ضد حساسیت و تقویت حافظه می‌باشد. در طب سنتی از این گیاه برای درمان روماتیسم، بیماری‌های قلبی، اسپاسم، تسکین درد قاعدگی، فشار خون و کلسترول استفاده می‌شود (Azizi *et al*., 2017; Ebrahimi *et al*., 2018; Hadian *et al*., 2014; Mirhosseini *et al*., 2015; Sajjadi *et al*., 2013; Torki *et al*., 2018). از نظر تغذیه‌ای نیز نزدیک به ۵۰ درصد ترکیب اسیدهای چرب کرفس کوهی، شامل اسیدهای چرب ضروری ارزشمند می‌باشد. اسیدهای چرب اصلی شناسایی شده عبارتند از اسید لینولئیک (۲۵/۴۶ درصد)، آلفا–لینولئیک (۱۶/۶۶ درصد)، اسید پالمتیک (۱۱/۹۲ درصد)، اسید اولئیک (۹/۳۳ درصد)، اسید استئاریک (۴/۷۲ درصد) و اسید سیس–۱۰–پنتادکنوئیک (۳/۲۹ درصد (Ghasemi Nafchi *et al*., 2015).

افزایش ارزش اقتصادی یک گونه گیاهی می‌تواند منجر به کاهش شدید در جمعیت‌های وحشی به‌دلیل استفاده بی‌رویه شود (Kim *et al*., 2017). برداشت از جمعیت‌های وحشی و روش‌های جمع‌آوری مخرب، مانند حذف اندام‌های زیرزمینی و هوایی که برای بقا گیاهان ضروری است، می‌تواند تهدید جدی تلقی گردد و اغلب منجر به ناپدید شدن این قبیل گونه‌ها شود. کرفس کوهی نیز باوجود پراکنش محدود، در معرض برداشت شدید توسط ساکنین قرار گرفته است. مردم بومی از تمام پیکره گیاه برای مقاصد گوناگون استفاده می‌کنند (Amiri and Joharchi, 2016). علاوه بر این، خفتگی طولانی مدت بذر، سرعت رشد آهسته، تولید ناکافی در رویشگاه‌های محدود و برداشت در مراحل اولیه رشد گیاه، جمعیت کرفس کوهی را در سال‌های اخیر به‌شدت کاهش داده است (Askari-Khorasgani *et al*., 2013). از این رو انجام پژوهش‌هایی با هدف برطرف کردن خفتگی طولانی ریشه غده‌ای و تسریع رشد این گیاه ارزشمند ضروری به‌نظر می‌رسد.

---

1. Taxon
2. United Nations Development Programme (UNDP)
3. Z-Ligustilide
4. 3-e-Butylphthalide

تکنیک پیش‌رس کردن[1] فرآیندی راهبردی است که با فراهم نمودن شرایطی ویژه به رشد گیاه در خارج از فصل کمک می‌کند (Uragami *et al*., 2017, Uno *et al*., 2021, Jang *et al*., 2022). پیش‌رس کردن یکی از روش‌های تولید محصول در خارج فصل محصولاتی چون مارچوبه، شیکوره، کاهو، ریواس، کرفس، هویج و گیاهان پیازی می‌باشد. به‌عنوان مثال، پیش‌رس کردن شیکوره عموماً با استفاده از کاشت با تراکم بالا در فضای تاریک و تحت دمای کنترل شده و ثابت ۱۴ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. دماهای بالا باعث رشد سریع سرهای شل و کشیده می شود، در حالی که دمای پایین باعث کاهش سرعت رشد و تولید سرهای کوتاه‌تر و سفت‌تر می شود. از آنجایی که سرهای شل، نامنظم یا کوچک قابل فروش نیستند، کنترل دما در محدوده مناسب در پیش‌رس کردن مهم است (Uno *et al*., 2021). پیش‌رس کردن گیاه ریواس اساساً با مارچوبه تفاوتی ندارد. لازم به ذکر است که توصیه‌های مربوط به شیوه‌های مختلف در پیش‌رس کردن ریواس یا به قدری مبهم و نامشخص هستند یا آنقدر با هم متفاوت هستند که شواهد تجربی بیشتری به‌منظور کشف روشی که ریواس تحت تأثیر این عوامل متفاوت قرار می‌گیرد ضروری است (Raymond Hepler, 1922; Hyde Bailey, 1914).

گیاهان دارویی که از عرصه‌های طبیعی برداشت می‌شوند در مقایسه با گونه‌های زراعی و اصلاح شده به‌مدت زمان بیشتری برای جوانه‌زنی احتیاج داشته و اغلب بذرهای گیاهان دارویی دارای سطوح مختلف خفتگی می‌باشند (Malek *et al*., 2022). از آنجایی که دانش کنونی ما درباره نحوه بازسازی رویشگاه‌های طبیعی کرفس کوهی بسیار محدود و ناچیز است، بایستی چگونگی کاهش طول دوره خفتگی و زمینه‌سازی جهت پرورش آن در محیط‌های مصنوعی به‌عنوان راهکاری جایگزین با هدف حفظ رویشگاه‌ها مورد توجه و بررسی قرار گیرد. از طرفی تاکنون مطالعه‌ای بر روی خفتگی ریشه غده‌ای گیاه کرفس کوهی با هدف تسریع دوره رشد صورت نگرفته است. بنابراین هدف این پژوهش علاوه بر کوتاه نمودن دوره خفتگی، بررسی امکان‌سنجی تولید خارج از فصل کرفس کوهی در محیط‌های کنترل شده از طریق پیش‌رس کردن می‌باشد. همچنین مطالعه اثر تعداد ساعات تیمار سرمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) بر شاخص‌های رویش (درصد رویش، شاخص رویش، تعداد روز تا رویش و شاخص بنیه گیاهچه) و همچنین صفات بیوشیمیایی (کربوهیدرات کل، نشاسته و پروتئین کل)، فعالیت‌های آنزیمی (آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتئاز) و میزان برخی هورمون‌های گیاهی (جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید) ریشه غده‌ای کرفس کوهی از اهداف دیگر این پژوهش می‌باشد.

پیشینهٔ پژوهش

در مناطقی که زمستان‌های سخت دارند، خفتگی یک استراتژی پایدار برای گیاهان علفی و چوبی است. با این حال، ظهور خفتگی بین و درون گونه‌ها بسیار متفاوت است و بستگی به نوع تعامل این گونه‌ها با محیط دارد (Muthoni *et al*., 2014). تأثیر عمده خفتگی، ممانعت از جوانه زدن زودرس در هنگام وقوع شرایط نامساعد می‌باشد و به حفظ بقای گیاه در شرایط نامساعد محیطی کمک می‌کند (Chao *et al*., 2007). در نتیجه، تجمع سرمای کافی می‌تواند بر مسیرهای تولید کربوهیدرات‌ها، هورمون‌های گیاهی یا آنتی‌اکسیدان‌ها تأثیر بگذارد و متعاقب آن جوانه‌زنی، رشد و گل‌دهی را افزایش دهد (Hao *et al*., 2017). هورمون‌های گیاهی درون‌زا نیز نقش مهمی در خفتگی بذر یا جوانه گیاه و آزادسازی خفتگی دارند (Nie *et al*., 2016).

تاکنون محققین مختلفی وجود خفتگی فیزیولوژیک بذر کرفس کوهی رو مورد تأیید و بررسی قرار داده‌اند (Ahmadi *et al*., 2019). پژوهشگران در بررسی روش‌های تحریک جوانه‌زنی بذر کرفس کوهی دریافتند که ۴۵ روز سرمادهی مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بهترین تیمار برای شکست خفتگی بذر است (Etemadi *et al*., 2010). در مطالعه دیگر مشخص شد که تیمارهای بـا بیشـترین اثـر در شکسـتن خفتگی بـذر کرفس کوهی عبارتند از جیبرلین، بنزیل آدنین، ترکیبی از ایندول بوتیریک اسید+جیبرلین+بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید در شرایط ۸ هفت سرمادهی (Tabatabaeian and Kadkhodaee, 2019).

در مطالعه‌ای که بر روی جوانه‌های طوقه مارچوبه صورت گرفت، اثر تیمار سرمایی بر شکستن خفتگی بررسی شد. تیمار سرمایی در دو دمای ۲ و ۵ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب به‌مدت ۳۰ و ۴۵ روز اعمال شد. نتایج نشان داد دمای ۲ تا ۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ روز برای

1. Forcing culture

شکستن خفتگی مناسب بود. محتوای جیبرلیک اسید، اسید ایندول استیک و زاتین ریبوزید[1] در جوانه‌ها نسبتاً پایدار باقی ماند، در حالی که میزان آبسزیک اسید در طول خفتگی متفاوت بود (Nie *et al*., 2016). بسیاری از محققان شاهد تغییر محتوای هورمون‌های گیاهی در طول دوره خفتگی بودند. آنها ثابت کردند که داخل جوانه‌های گل صد تومانی، در طول خفتگی زمستانی مقدار آبسزیک اسید و جیبرلیک اسید به‌ترتیب در سطح بالا و پایین تغییر می‌کند (Yu *et al*., 2012). در مطالعه‌ای که توسط کیو و همکاران[2] (۲۰۰۷) صورت گرفت، اثرات طول دوره سرمادهی، دمای سرمادهی و دمای رشد روی خفتگی جوانه‌های طوقه مارچوبه و میزان سرعت رشد ساقه‌های خوراکی مورد بررسی قرار گرفت. آنها اعلام کردند که قرارگرفتن در معرض تیمار سرمادهی از قبل باعث برطرف شدن خفتگی جوانه در دماهای پایین رشد شده و رشد ساقه‌های خوراکی را تحریک می‌کند. بنابراین، سرمادهی می‌بایست از طریق سرعت بخشیدن شکستن خفتگی جوانه و سرعت رشد ساقه‌های خوراکی در دمای پایین، تولید تجاری را تسهیل کند (Ku *et al*., 2007). اثر تیمار سرمایی کوتاه مدت بر روی پیاز ۳ رقم لاله مورد بررسی قرار گرفت نتایج اثر مثبت تیمار سرمادهی کوتاه مدت بر رفع خفتگی و شکوفایی بیشتر ارقام لاله را نشان داد و ارقام پاسخ‌های متفاوتی به تیمار سرمادهی از خود نشان دادند (Wang *et al*., 2019). وضعیت کربوهیدرات در طول تیمار سرمادهی در پیاز و ساقه گل در چندین مطالعه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و گزارش شده است که نشاسته در این اندام‌ها تجزیه می‌شود و گلوکز در آنها تجمع می‌یابد (Khuankaew *et al*., 2010; Wamg *et al*., 2019).

تکنیک کشت پیش‌رس کردن محصول روشی است برای تولید دائم و سالانه استفاده می‌شود. درخت گل صد تومانی دارای خفتگی درون خفتگی[3] است و خفتگی غنچه گل مانع اصلی برای پیش‌رس کردن گل صد تومانی در زمستان است. نور و دما نقش مهمی در القاء و شکستن درون خفتگی دارند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سرما جهت پیش‌رس کردن درخت گل صد تومانی ضروری می‌باشد (Wang *et al*., 2015). در کشور ژاپن این روش تولید برای محصول مارچوبه در حال پیشرفت می‌باشد. در پژوهشی تعداد مشخصی دانهال نر و ماده مارچوبه را در گلدان‌هایی حاوی خاک اره و بدون کود در تونل‌هایی با ارتفاع ۵ متر، عرض ۶/۹ متر و طول ۷۳۰ متر کاشته شدند. دما و رطوبت تونل در طول سال به‌ترتیب تقریباً ۱۶ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ درصد حفظ شد و داخل آن کاملاً تاریک بود. گلدان‌ها گهگاه آبیاری شدند، و ساقه‌های خوراکی دارای ارتفاع بلندتر از ۲۵ سانتی‌متر یک بار در هفته به‌مدت ۱۰ تا ۱۶ هفته برداشت شدند (Uragami *et al*., 2017).

روش‌شناسی پژوهش

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و در ۳۰ تکرار انجام شد. اثر تیمار تعداد ساعات سرمایی (دمای ثابت ۲ درجه سانتی‌گراد در یخچال) در ۵ سطح (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰، ۲۱۰۰ و ۲۸۰۰ ساعت) با ۳ تکرار بر خفتگی ریشه غده‌ای کرفس کوهی مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور اجرای پژوهش ریشه‌های غده‌ای کرفس کوهی یکساله، یکنواخت و عاری از هرگونه بیماری و آفت از شرکت مهندس رئیسی (واقع در استان چهارمحال و بختیاری) تهیه شد و به گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد. آزمایش در اواسط مهر سال ۱۳۹۸ آغاز گردید و تا پایان سال بطول انجامید. ابتدا ریشه‌های غده‌ای با قارچ‌کش کاپتان با غلظت ۲ در هزار تیمار شدند. سپس ریشه‌های غده‌ای در دسته‌های ۱۰ تایی درون کیسه پارچه‌ای قرار داده شدند و جهت تامین رطوبت با آب محلول پاشی و درون یخچال با دمای ۲درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هر سه روز یکبار نمونه‌ها بررسی و مرطوب می‌شدند. پس از سپری شدن زمان مربوط به هر تیمار (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰، ۲۱۰۰ و ۲۸۰۰ ساعت) نمونه‌ها در بستر مناسب (خاک، ماسه، خاکبرگ) با نسبت برابر کشت شده و به گلخانه با میانگین دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی (۷۰۰۰–۱۰۰۰۰ لوکس) منتقل شدند. به‌طور کلی، در شکل ۱ مراحل اعمال تیمار سرمایی تا کاشت و پیش‌رس کردن ریشه غده‌ای گیاه کرفس کوهی نشان داده شده است (شکل ۱). رویش ریشه‌های غده‌ای از تاریخ ۲۵ ام مهرماه ۱۳۹۸ شروع و ثبت گردید. معیار رویش جوانه با طول حداقل ۳ میلی‌متر و قابل رویت بودن آن در نظر گرفته شد. در پایان صفات

1. Zeatin Riboside
2. Ku *et al*
3. Endo-dormancy

مربوط به رویش (درصد رویش، شاخص رویش، تعداد روز تا رویش و شاخص بنیه گیاهچه) و همچنین صفات بیوشیمیایی (کربوهیدرات کل، نشاسته و پروتئین کل)، فعالیت‌های آنزیمی (آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتئاز) و میزان برخی هورمون‌های گیاهی (جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید) مورد بررسی قرار گرفت.

درصد رویش با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (Scat *et al*., 1984).

رابطه ۱)
$$\text{درصد رویش} = \frac{\text{تعداد غده روئیده}}{\text{تعداد کل غده}} \times ۱۰۰$$

شاخص تعداد روز تا ظهور جوانه با توجه به تعداد ساعات سرمایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

شاخص رویش با استفاده از روش رانال و همکاران[۱] (۲۰۰۹) طبق رابطه ۲ زیر محاسبه شد.

رابطه ۲)
$$\text{شاخص رویش} = \frac{\sum \text{تعداد گیاهان سبز شده در هر شمارش} \times \text{زمان شمارش از پس کاشت}}{\text{کل گیاهان}}$$

شاخص بنیه گیاهچه با استفاده از رابطه ۳ زیر محاسبه گردید.

رابطه ۳)
$$\text{شاخص بنیه گیاهچه} = \frac{\text{میانگین طول گیاهچه (میلی متر)} \times \text{درصد رویش}}{100}$$

طول گیاهچه با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد.

مقدار کربوهیدرات کل طبق روش دبوا و همکاران[۲] (۱۹۵۶) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. میزان تغییرات هورمون‌های گیاهی داخلی شامل آبسزیک اسید و جیبرلیک اسید بر اساس روش شیائو و همکاران[۳] (۲۰۱۰) اندازه‌گیری شد. به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز، از روش شیائو و همکاران استفاده گردید (Xiao *et al*., 2006). همچنین، سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز براساس روش مارامبی و همکاران[۴] (۱۹۹۲) انجام شد (Marambe *et al*., 1992).

طرح آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی Completely Randomized Design (CRD) و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS.9 و جهت مقایسه میانگین صفات مورد نظر نیز از آزمون LSD استفاده شد.

۱. Ranal *et al*

2. Dubois *et al*
3. Xiao-Juan *et al*
4. Marambe *et al*

شکل ۱- مراحل اعمال تیمار سرمایی تا کاشت و پیش‌رس کردن ریشه غده‌ای گیاه کرفس کوهی

یافته‌های پژوهش

میزان رویش ریشه‌های غده‌ای کرفس کوهی تحت تاثیر تیمار ساعات سرمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. جدول تجزیه واریانس صفات مورد آزمایش نشان داد که صفات مورد بررسی در سطح آماری یک درصد و پنج درصد به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای مختلف سرمایی قرار گرفتند (جدول ۱). مقایسه میانگین تاثیر تعداد ساعات سرمایی بر درصد رویش در شکل ۲ نشان داده شده است. درصد رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی تحت تاثیر تیمارهای مختلف دمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) بین ۳ تا ۷۲ درصد محاسبه شد. روند تغییرات درصد رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی در تیمارهای مختلف ساعات سرمایی نشان داد که بیشترین و کمترین درصد رویش به‌ترتیب در تیمارهای سرمایی ۲۸۰۰ و ۰ ساعت (شاهد) مشاهده شد. همچنین در تیمار ۱۴۰۰ ساعت سرمایی، ۵۰ درصد ریشه‌های غده‌ای کرفس کوهی رویش یافتند (شکل ۲). با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای ساعات سرمایی بر صفت تعداد روز تا رویش ریشه غده‌ای تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۱). طبق نتایج کمترین تعداد روز تا رویش (۹ روز) متعلق به تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی و بیشترین تعداد روز تا رویش (۶۳ روز) در تیمار شاهد ثبت گردید (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس نشان داد شاخص رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی در سطح احتمال ۱ درصد تحت تاثیر تیمار سرمایی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین شاخص رویش نشان داد که تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی بیشترین مقدار (۲/۸ روز) و تیمار صفر ساعت (شاهد) کمترین مقدار (۰/۱) ارزیابی شد (شکل ۲). یکی دیگر از شاخص‌های تعیین کننده کیفیت ریشه غده‌ای، شاخص بنیه ریشه غده‌ای می‌باشد که از طریق درصد رویش نهایی و طول گیاهچه محاسبه می‌گردد. ریشه‌های غده‌ای که دارای بنیه قویتری باشند، توانایی بالاتری در تحمل تنش‌های محیطی دارند و ضمن داشتن

درصد بالایی از رویش، قادرند گیاهچه‌های قوی تولید نمایند. نتایج نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد تحت تاثیر تیمار سرمایی قرار گرفت (جدول ۱). بیشترین شاخص بینه گیاهچه در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی بدست آمد و کمترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین بین سطوح تیمار سرمایی ۱۴۰۰ تا ۲۸۰۰ ساعت اختلاف معنی‌داری در میزان شاخص بنیه گیاهچه ثبت شد (شکل ۲). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که شاخص طول گیاهچه کرفس کوهی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین بین تیمارهای سرمایی اختلاف معنی‌داری را نشان داد به‌طوری که بیشترین میزان طول گیاهچه در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی ۱۴/۳سانتی‌متر و کمترین میزان در تیمار شاهد ۲/۵ سانتی‌متر ثبت گردید (شکل۲).

نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تغییرات میزان کربوهیدرات محلول ریشه غده‌ای تحت تاثیر تیمار تعداد ساعات سرمایی قرار گرفت و در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش تعداد ساعات سرمایی میزان کربوهیدرات محلول به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین میزان کربوهیدرات محلول در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی (۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان در تیمار شاهد (۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده گردید (شکل ۲). همچنین آنالیز داده‌های مربوط به شاخص نشاسته نشان داد که با افزایش دوره تیمار سرمایی میزان نشاسته به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری که بیشترین میزان نشاسته در تیمار شاهد (۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و کمترین میزان در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی (۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) ثبت شد. نتایج جدول تجزیه واریانس بدست آمده حاکی از معنی‌دار بودن اثر تیمار تعداد ساعات سرمایی (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰، ۲۱۰۰ و ۲۸۰۰ ساعت) بر هورمون‌های گیاهی جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان جیبرلیک اسید ریشه غده‌ای کرفس کوهی در تیمار شاهد (۳۳/۵ نانومول بر گرم وزن تازه) و بیشترین میزان در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی (۷۵/۵ نانو مول بر گرم وزن تازه) ثبت گردید. همچنین تیمار سرمادهی سبب کاهش معنی‌داری میزان آبسزیک اسید موجود در بافت ریشه غده‌ای کرفس کوهی شد به‌طوری که کمترین میزان آن در تیمار ۲۸۰۰ ساعت سرمایی (۲۰/۲ نانو مول بر گرم وزن تر) و بیشترین میزان در تیمار شاهد (۶۲/۶ نانو مول بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل۳). بررسی اثر تیمارهای سرمایی بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در رویش نشان داد که فعالیت هر سه آنزیم آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتئاز با افزایش تعداد ساعت سرمایی از صفر تا ۲۸۰۰ ساعت سرمایی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. کمترین میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمار شاهد (۰/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و بیشترین فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمار ۲۱۰۰ ساعت سرمایی با میانگین (۱/۲میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم بتا آمیلاز نشان داد که با افزایش تعداد ساعات سرمایی فعالیت این آنزیم به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری که کمترین میزان فعالیت در تیمار شاهد (۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و بیشترین میزان فعالیت در تیمار۰۰ ۲۸ ساعت سرمایی (۰/۶۳میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) ارزیابی شد. فعالیت آنزیم پروتئاز تحت تاثیر تیمار سرمایی قرار گرفت. نتایج جدول مقایسه میانگین اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای شاهد و با سایر تیمارهای سرمایی نشان داد. کمترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمار شاهد (۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و بیشترین در تیمار ۲۱۰۰ ساعت سرمایی (۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) اندازه‌گیری شد (شکل۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تعداد ساعت تیمار سرمایی مختلف بر روی شاخص‌های رویش کرفس کوهی

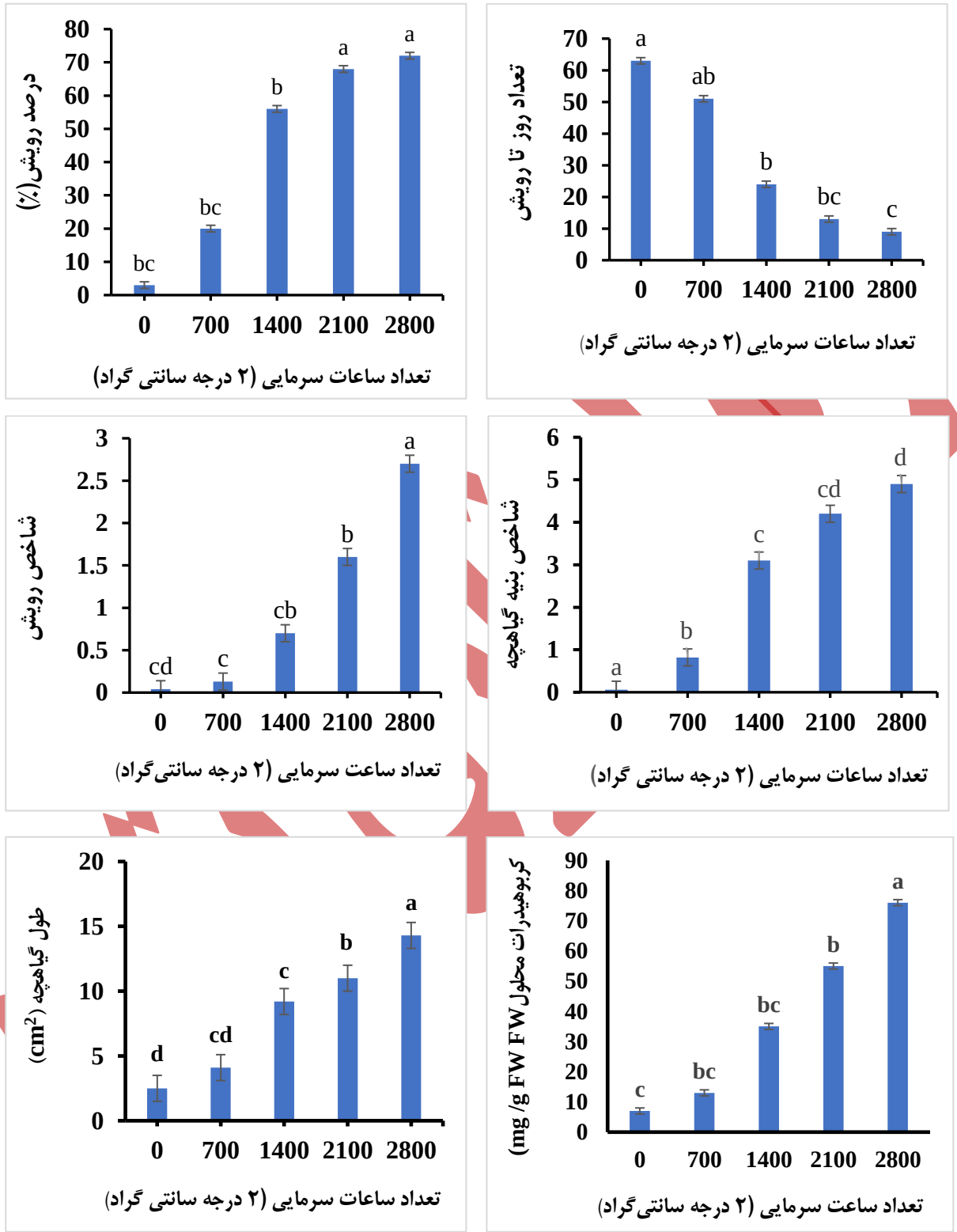
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد رویش	تعداد روز تا رویش	شاخص رویش	شاخص بنیه	طول گیاهچه	کربوهیدرات محلول
تیمار (تعداد ساعات سرمایی)	۴	۸۷/۲**	۴۵/۶**	۲/۲**	۱۵/۵*	۱۱**	۵۴**
خطا	۹/۲۱	۵/۶	۳/۳	۰/۸	۱/۲	۲/۶	۸/۳
ضریب تغییرات (CV%)		۸/۶	۱۲/۴	۹/۸	۱۵/۵	۷/۵	۱۱

* و **: به ترتیب دارای تفاوت معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

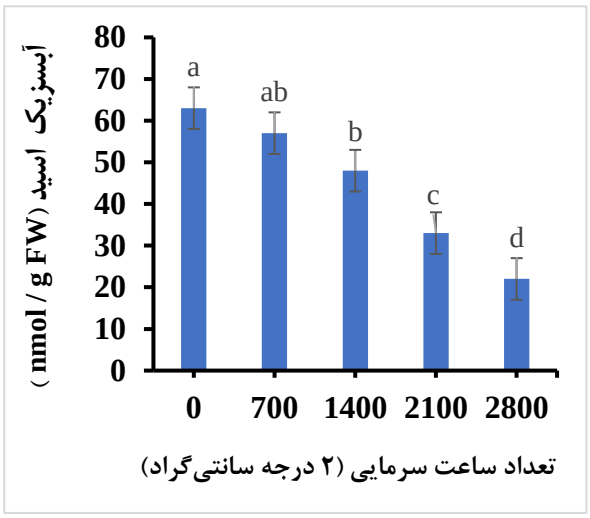
جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تعداد ساعت تیمار سرمایی مختلف بر روی شاخص‌های رویش کرفس کوهی

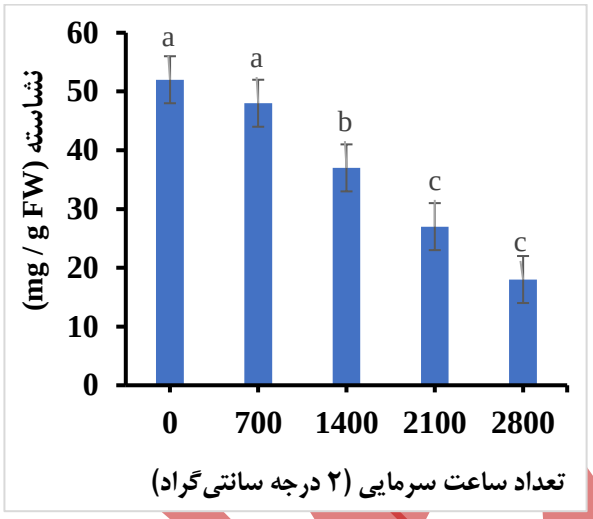
منابع تغییرات	درجه آزادی	نشاسته	جیبرلیک اسید	آبسزیک اسید	آنزیم آلفا آمیلار	آنزیم بتا آمیلاز	آنزیم پروتئاز
تیمار (تعداد ساعات سرمایی)	۴	۸۷/۲**	۴۵/۶**	۲/۲**	۱۵/۵*	۱۱**	۵۴**
خطا	۲۱/۹	۵/۶	۳/۳	۰/۸	۱/۲	۲/۶	۸/۳
ضریب تغییرات (CV%)		۸/۶	۱۲/۴	۹/۸	۱۵/۵	۷/۵	۱۱

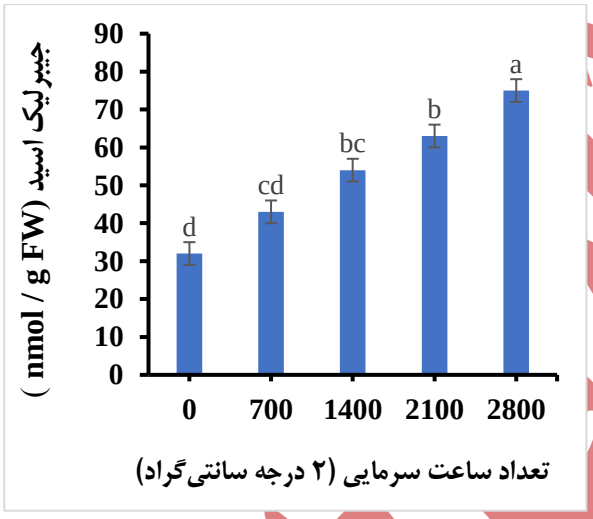
* و **: به ترتیب دارای تفاوت معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد



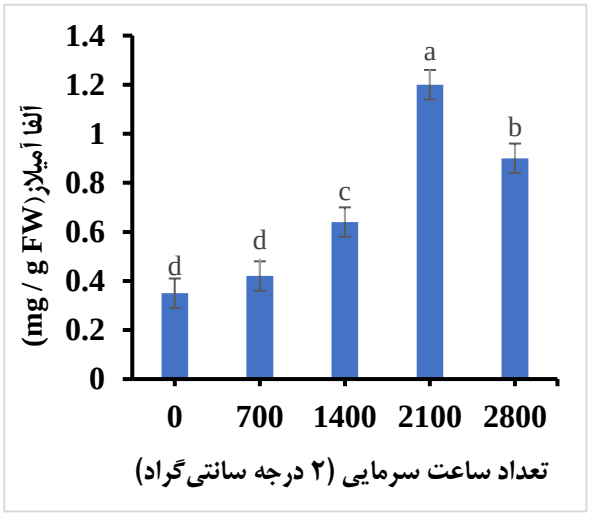
شکل ۲– مقایسه میانگین تاثیر تیمار تعداد ساعت سرمایی مختلف بر شاخص‌های رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی. میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

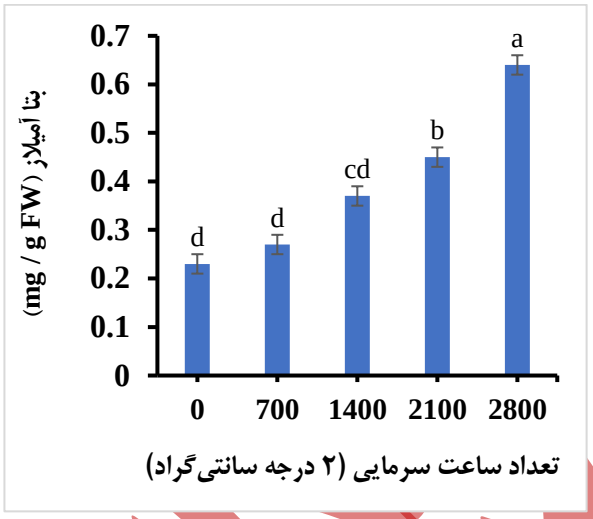


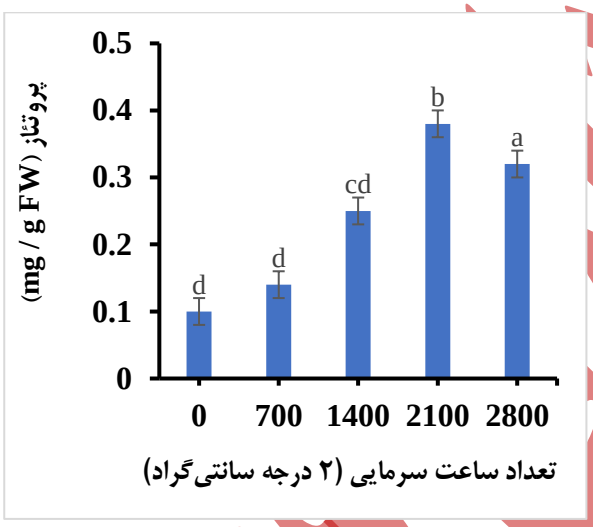




شکل۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمار تعداد ساعت سرمایی مختلف بر شاخص‌های نشاسته، آبسزیک اسید و جیبرلیک اسید در کرفس کوهی. میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.







شکل ٤- مقایسه میانگین تاثیر تیمار تعداد ساعت سرمایی مختلف بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و آنزیم پروتئاز در کرفس کوهی. میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

بحث

نتایج نشان داد که شکستن خفتگی ریشه غده‌ای کرفس کوهی تحت تاثیر تیمار سرمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت به‌طوری که منجر به افزایش رویش، یکنواختی رویش، سرعت رویش و توسعه بهتر ساقه رویشی گردید. خفتگی گیاهان با اندام زیرزمینی ذخیره‌ای عمدتاً به سه دسته فرا[1]، بوم[2] و درون- خفتگی طبقه‌بندی شده است. هر سه نوع خفتگی در بافت‌های رویشی زیرزمینی وجود دارد که فراخفتگی و بوم‌خفتگی برجسته‌تر هستند. فراخفتگی بافت گیاه در درجه اول توسط عوامل فیزیولوژیکی سنتز شده و از قسمت دیگری از گیاه منتقل می‌شود (Sheikh *et al*, 2022). تیمار با دمای پایین عامل اصلی محیطی مورد نیاز برای شکستن خفتگی جوانه در بسیاری از گیاهان منطقه معتدل می‌باشد. حداقل دمایی که در آن شکستن جوانه رخ می‌دهد، با تکامل گیاهان در مرحله خفتگی متفاوت است و در

1. Para
2. Eco

صورت عدم سرمایش کافی، رشد اندام هوایی به تأخیر می‌افتد و کاهش می‌یابد (Arora *et al*, 2003). تأخیر در شکستن جوانه و کاهش سرعت رشد اندام هوایی برای گیاهانی است که خفتگی آنها به‌طور کامل شکسته نشده است (Guo *et al*., 1995).

به‌طور مشابه، در گیاهان چوبی با نیاز سرمایی بالا، موثرترین دما برای سرمایش حدود ۵/۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. چندین مدل برای ارزیابی نیاز سرمایی گیاهان چوبی تعیین شده است که مهمترین این مدل‌ها، مدل یوتا است که توسط ریچاردسون و همکاران در سال ۱۹۸۶ معرفی شده است (Richardson *et al*., 1986)). به‌طور مثال تیمار سرمایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۴ هفته، میانگین روزهای شکستن جوانه زنجبیل ژاپنی (میوگا)[1] را کاهش داد و رویش یکنواخت را افزایش داد (Gracie *et al*., 2000). همچنین گزارش شده است، ریشه‌های غده‌ای که تیمار سرمایی دریافت نکرده بودند نتوانستند ساقه‌های رویشی را برای مدت زمان نامشخصی تولید کنند. به‌طور مشابه در لیلیوم[2] تیمار سرمایی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ هفته تعداد روزهای ظهور ساقه را کاهش داد (Choi *et al*., 1998). لانگنز و همکاران[3] گزارش کردند که اکثر پیازهای سوسن معمولاً برای زنده ماندن در محیط نامساعد از اواخر پاییز تا زمستان به خفتگی می‌روند. خفتگی را می‌توان با دمای پایین شکست. تیمار سرمایی در پیاز زنبق منجر به تحریک متابولیت درون آن و باعث شکستن خفتگی شد (Shin *et al*., 2002). در بذرهای دارای سطوحی از خفتگی مورفولوژیک ازجمله بذر گیاهان خانواده چتریان، جنین توسعه نیافته یکی از دلایل مهم عدم جوانه‌زنی بذرها می‌باشد. رخ دادن شرایط سرمادهی مرطوب در طبیعت نیز یکی از نیازهای جوانه‌زنی بذرهای این گونه‌های گیاهی می‌باشد که نشان دهنده‌ی نیاز فیزیولوژیک بذرها به سرمای دوره‌ای به‌منظور القای توانایی جوانه‌زدن می‌باشد (Malek *et al*., 2022). مطالعات متعدد صورت گرفته نشان داد که رفع خفتگی بذرهای تیره چتریان (کرفس کوهی، باریجه، زیره سیاه و آنغوزه) از طریق سرمادهی مرطوب (قرارگیری بذرها در شرایط سرد و مرطوب) می‌تواند با تغییر توازن هورمون‌های تنظیم کننده جوانه‌زنی و رشد، تغییر در ساختار و میزان ذخایر بذر از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها، قندها و همچنین تغییر زیرساخت‌های سلولی همراه باشد (Malek *et al*., 2022; Pouresmail and Sharifi 2003; Malek *et al*., 2023; Tabatabaeian and Kadkhodaee, 2019).

خفتگی در ریشه غده‌ای کرفس کوهی به دمای رشد بستگی دارد. درک مکانیسم القا و شکست خفتگی مربوط به رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی بسیار مهم است. وضعیت متابولیک فعال یک اندام رویشی زیرزمینی سرنوشت رشد آن را تعیین می‌کند. قندها اجزای اصلی اندام‌های ذخیره سازی محسوب می‌شوند. بنابراین، دینامیک آنها نقش مهمی در کنترل چرخه خفتگی–رشد گیاهان ریزوم‌دار ایفا می‌کند. جوانه‌های خفته برای تقویت رشد به منابع کربن (قند) نیاز دارند و گیاه متابولیسم قند را بین قندهای ذخیره شده و محلول تنظیم می‌کند تا خفتگی و جوانه زدن را حفظ کند (Sheikh *et al*, 2022). خورنگ[4] و همکاران (۲۰۰۶) اعلام کردند اعمال تیمار سرمایی به‌مدت ۱۴ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی پیاز لیلوم منجر به افزایش گلوکز و فروکتوز شد. در طی دوره رکود، کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای (مانند نشاسته) در جوانه گل تجمع می‌یابند و پس از تأمین نیاز سرمایی، برای شروع رشد جوانه مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین به نظر می‌رسد که متابولیسم کربوهیدرات در کنترل رشد و نمو جوانه طی مراحل رکود و شکست آن دخالت دارند. در واقع، بیشترین مقدار نشاسته در ابتدای دوره رکود مشاهده می‌شود و سپس مقدار آن تا مرحله شکست رکود، به تدریج کاهش می‌یابد. کاهش مقدار نشاسته، با افزایش قندهای محلول مانند سوربیتول و ساکارز همراه می‌باشد که به‌عنوان منابع کربن و انرژی، رشد و نمو جوانه را پس از تامین نیاز سرمایی، کنترل می‌کند (Hernandez *et al*, 2021).

هورمون آبسزیک اسید عامل اصلی القا و حفظ خفتگی در جوانه‌ها و بذور گیاهان چندساله علفی می‌باشد. بدنبال القای خفتگی، سنتز و عملکرد پایدار آبسزیک اسید درون‌زا برای حفظ خفتگی زمستانی ضروری است، اگرچه با پیشرفت خفتگی غلظت آبسزیک اسید کاهش می‌یابد (Muthoni *et al*., 2014). محققان گزارش کرده اند سرمادهی مرطوب موجب افزایش مقدار جیبرلین‌های درونی (GA_3 و GA_7) و از طرفی کاهش اسید آبسیزیک درونی، کاهش پروتئین‌ها و لیپیدها و در مقابل، افزایش قندهای محلول و اسیدهای آمینه می‌گردد (Malek *et al*., 2022). علاوه براین، جیبرلیک اسید به‌عنوان جایگزینی برای سرما برای تحریک موثر بر شکستن خفتگی استفاده شده است. اعمال

1. *Zingiber mioga* Roscoe
2. *Lilium longiflorum* Gerlia
3. Langens-Gerrits
4. Xu-Rong *et al*

خارجی جیبرلیک اسید بر روی جوانه‌های درخت صد تومانی خفتگی درون‌خفتگی این جوانه‌ها را برطرف نموده است (Guan *et al*., 2019). علاوه بر این، کاربرد خارجی جیبرلیک اسید باعث رفع خفتگی غده‌های سیب زمینی و پیاز سوسن شد (Kim *et al*., 1994). مطالعات در مورد نقش جیبرلیک اسید بر خفتگی نتایج متناقضی را نشان می‌دهد.کاربرد جیبرلیک اسید خارجی مدت‌هاست که برای شکستن خفتگی و رشد جوانه‌زنی هم به‌صرت تجربی و هم به‌عنوان یک تیمار تجاری گونه‌های علفی و چوبی تأیید شده و به‌عنوان یک القاکننده قوی رفع خفتگی جوانه‌های کاملاً خفته در صنوبر استفاده می‌شود. کاربرد جیبرلیک اسید برون‌زا باعث شکستن خفتگی و القای رویش در سیب زمینی شد (Rentzsch *et al*., 2012). سطوح جیبرلیک اسید درون‌زا با چرخه خفتگی تغییر می‌کند و با القای خفتگی به سرعت کاهش می‌یابد، در طول خفتگی میزان آن کاهش می‌یابد و نزدیک به پایان خفتگی و آغاز رویش افزایش می‌یابد. نتایج این پژوهش مشابه با نتایج فوق می‌باشد.

آنزیم آلفا آمیلاز مهمترین آنزیم در مراحل اولیه جوانه‌زنی است و با تأمین سوبسترای رشد برای جنین بذر، جوانه‌زنی را تسریع می‌نماید. آنزیم‌های آلفا و بتا آمیلاز از آنزیم‌های حیاتی در فرایند جوانه‌زنی محسوب می‌شوند که کاهش فعالیت آنها می‌تواند باعث کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر شود (Gimbi and Kitabtake, 2002). با افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و بتاآمیلاز، طی پرایمینگ مواد ذخیره‌ای به ساکارز و گلوکز تبدیل شده و به جنین انتقال می‌یابند و موجب رشد جنین شده و در نتیجه جوانه‌زنی و رشد گیاهچه افزایش می‌یابد (Parera and Cantliffe,1994). پروتئاز باعث کاهش پروتئین‌ها در بذرهای در حال جوانه‌زنی می‌شود که این کاهش با فعالیت آندو پروتئازها شروع شده، این آنزیم‌ها پروتئین‌های ذخیره‌ای نامحلول را به پپتیدهای محلول تبدیل می‌کند. به هنگام شرایط مطلوب جوانه‌زنی این پروتئین‌ها توسط پروتئازها تحت فرآیندهای تجزیه قرار گرفته و می‌شکنند. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان دهنده از بین رفتن مکانیسم بازدارنده در مقابل تجزیه می‌باشد (Foti *et al*., 2002). به‌طور کلی اعتقاد براین است که دریافت سرما توسط ریزوم و پیاز سبب تغییرات فیزیولوژیک مانند تغییر وضعیت آبی، تعادل هورمون گیاهی، تنفس و تحرک پذیری کربوهیدارت‌ها در آن خواهد شد و یا اینکه با دریافت سرما، میزان حساسیت پیاز و ریزوم به هورمون اکسین بیشتر شده و در نتیجه سبب افزایش رشد ریشه‌ها می‌شود (Khodorova and Boitel-Conti, 2013).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که خفتگی ریشه غده‌ای کرفس کوهی از نوع خفتگی فیزیولوژیک بوده و می‌توان آنرا با مشابه‌سازی شرایط محیطی بسته به طول دوره سرمادهی و شرایط اکولوژیک رویشگاه تا حدودی خنثی کرد. طول دوره سرمادهی بر درصد و سرعت رویش ریشه غده‌ای گیاه کرفس کوهی موثر بود و با افزایش دوره سرمادهی درصد و سرعت رویش نیز افزایش یافت. با توجه به درصد رویش ریشه‌های غده‌ای کرفس کوهی در شرایط گلخانه مشخص شد که افزایش مدت تیمار سرمایی (۲ درجه سانتی‌گراد) باعث تسریع در رویش ریشه‌های غده‌ای کرفس کوهی شد. با توجه به اینکه بیشترین درصد رویش ریشه‌ها در تیمار سرمایی ۲۱۰۰ تا ۲۸۰۰ ساعت رخ داد، به نظر می‌رسد که نیاز سرمایی کرفس کوهی بین ۹۰ تا ۱۲۰ روز باشد. هر چند که در تیمار سرمایی ۱۴۰۰ ساعت، ۵۰ درصد رویش ریشه‌ها غده‌ای صورت گرفت و این تعداد ساعت تیمار سرمایی نیز می‌تواند در تولید تجاری مورد توجه قرار گیرد. عدم تأمین نیاز سرمایی باعث رویش ضعیف ریشه غده‌ای در گیاه کرفس کوهی شد به‌طوری که تیمار شاهد و ۷۰۰ ساعت سرما سبب کمترین رویش ریشه غده‌ای کرفس کوهی گردید. همچنین تیمار سرمایی باعث افزایش معنی‌دار هورمون جیبرلیک اسید و کربوهیدرات کل شد و از طرفی منجر به کاهش هورمون آبسزیک اسید و نشاسته گردید. فعالیت آنزیم‌های مربوط به رویش آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتئاز به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمار سرمایی قرار گرفت و مجموع تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی باعث رفع خفتگی و تسریع رشد گیاهچه کرفس کوهی شد. با توجه به نتایج این پژوهش کاربرد تیمار سرمادهی (۲ درجه سانتی‌گراد) منجر به افزایش سرعت رویش گردید. همچنین نتایج نشان داد که تیمار سرمادهی به‌طور چشمگیری باعث پیش‌رس کردن محصول و تولید خارج از فصل کرفس کوهی می‌شود. در پایان، با توجه به اینکه گیاه کرفس کوهی به‌صورت خودرو و در حال انقراض می‌باشد به‌منظور اهلی کردن این گیاه نیاز است که تحقیقاتی با هدف کاهش دوره رشد، برطرف کردن نیاز سرمایی و تولید خارج از فصل این محصول انجام گیرد. نتایج حاصل از این پژوهش را بهمراه مطالعات آتی می‌توان

به‌عنوان یک دستورالعمل برای تولید خارج از فصل این محصول در نظر گرفت، که بهره برداران می‌توانند با تهیه نشا این محصول و اعمال تیمارهای رفع خفتگی، موانع رویش این گیاه ارزشمند را مرتفع نموده و در یک محیط کنترل شده به تولید خارج از فصل این محصول بپردازند.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند که از حمایت های بنیاد ملی علم ایران (طرح پژوهشی شماره ۹۸۰۰۲۸۲۴) تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

احمدی، خدیجه؛ امیدی، حشمت؛ امینی دهقی، مجید و نقدی آبادی، حسنعلی (۱۳۹۸). مروری بر خصوصیات گیاهشناسی، فیتوشیمیایی و فارماکولوژیکی گیاه دارویی کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.). *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۱۸ (۷۲)، ۳۰-۴۵.

پوراسماعیل، معصومه و شریفی، مظفر (۱۳۸۲). بررسی اثر تیمار سرما و برخی سیتوکینین‌ها در رفع خواب بذرهای زیره سیاه. *فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۱۹(۲)، ۱۸۳-۱۹۳.

طباطبائیان، جواد و کدخدایی، اعظم (۱۳۹۸). تأثیر تیمارهای شکست خفتگی بذر بر جوانه‌زنی کرفس کوهی توده کوهرنگ (*Kelussia odoratissima* Mozaff.). *نشریه علوم و فناوری بذر ایران*، ۸(۱)، ۲۰۱-۲۱۲.

مظفریان، ولی‌الله (۱۳۸۶). *فلور ایران، شماره ۵۴: تیره چتریان*. چاپ اول. تهران: *موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور*. ۱-۵۹۶.

ملک، محسن؛ حسنی، فرشید؛ رضوانی خور شیدی، عنایت؛ شایانفر، علی؛ اسکویی، بیتا و دهشیری، عباس (۱۴۰۱). پاسخ خفتگی و جوانه‌زنی بذر باریجه (*Ferula gummosa*) تحت پیش‌تیمارهای مختلف هورمونی و سرمادهی مرطوب. *پژوهش‌های بذر ایران*، ۹(۱)، ۱۲۷-۱۴۶.

ملک، محسن؛ حسنی، فرشید؛ رضوانی خور شیدی، عنایت؛ محمودی، وحیدرضا و خسروی، مسعود (۱۴۰۲). تعیین شرایط بهینه آزمون جوانه‌زنی استاندارد بذر آنغوزه (*Ferula assa-foetida*). *نشریه علوم و فناوری بذر ایران*، ۱۲(۱)، ۶۱-۷۷.

References

- Ahmadi, K., Omidi, H., Amini Dehaghi, M., & Naghdi Badi, H. (2019). A review on the botanical, phytochemical and pharmacological characteristics of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Journal of Medicinal Plants*, 18(72), 30-45. (In Persian).
- Amiri, M. S., & Joharchi, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(6), 621-635.
- Arora, R. Rowland, L. J., & Tanino, K. (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age. *Horticultural Science*, 38**,** 911–921.
- Askari-Khorasgani, O., Mortazaeinezhad, F., Otroshy, M., & Golparvar, A. R. (2013). Breaking seed dormancy of endangered medicinal plant *Kelussia odoratissima* using zygotic embryo culture technique. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(15), 1712-1718.
- Bhowmik, P. K., & Matsui, T. (2003). Carbohydrate status and sucrose metabolism in asparagus roots over an extended harvest season. *Asian Journal of Plant Science*, 2 (12), 891-893.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chao, W. S., Foley, M. E., Horvath, D. P., & Anderson, J. V. (2007). Signals regulating dormancy in vegetative buds. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1: 49–56.
- Choi, S. T., Jung, W. Y., Ahn, H. G., & Chang, Y. D. (1998). Effects of duration of cold treatment and planting depth on growth and flowering of *Lilium* spp. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 39**,** 765–770.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 167-167.
- Etemadi, N., Haghighi, M., Nikbakht, A., & Zamani, Z. (2010). Methods to promote germination of *Kelussia odoratissima* Mozaff. an Iranian endemic medicinal plants. *Herba polonica*, 56(2), 21-28.

- Foti, S., Cosentino, S. L., Patane, C., & Agosta, G. M. D. (2002). Effects of osmoconditioning upon seed germination of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) under low temperatures. *Seed Science and Technology*, 30(3), 521-533.
- Ghasemi Nafchi, M., Mirlohi, A., Ayyari, M. & Shojaeiyan, A. (2015). *Kelussia odoratissima* Mozaff. a rich source of essential fatty acids and phthalides. *Journal of HerbMed Pharmacology*. 4(4): 115-120.
- Gimbi, D. M., & Kitabatake, N. (2002). Changes in alpha-and beta-amylase activities during seed germination of African finger millet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(6), 481-488.
- Gracie, A. J., Brown, P. H., Burgess, S. W. & Clark, R. J. (2000). Rhizome dormancy and shoot growth in myoga (*Zingiber mioga* Roscoe). *Scientia Horticulturae*, 84, 27–36. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00102-8.
- Guan, Y. R., Xue, J. Q., Xue, Y. Q., Yang, R. W., Wang, S. L., & Zhang, X. X. (2019). Effect of exogenous GA3 on flowering quality, endogenous hormones, and hormone-and flowering-associated gene expression in forcing-cultured tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1295-1311.
- Guo, Z., Goi, M., Fukai, S., & Tanaka, M. (1995). Effects of temperature and photoperiod on the bud formation of *Rhododendron obtusum* 'Wakakaede'. *Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University*, 47**,** 33–40.
- Hao, X., Yang, Y., Yue, C., Wang, L., Horvath, D. P., & Wang, X. (2017). Comprehensive transcriptome analyses reveal differential gene expression profiles of *Camellia sinensis* axillary buds at para-, endo-, ecodormancy, and bud flush stages. *Frontiers in plant science*, 8, 1-19. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00553.
- Hernandez, J. A., Díaz-Vivancos, P., Martínez-Sánchez, G., Alburquerque, N., Martínez, D., BarbaEspín, G., Acosta-Montos, J. R., Carrera, E., & García-Bruntón, J. (2021). Physiological and biochemical characterization of bud dormancy: Evolution of carbohydrate and antioxidant metabolisms and hormonal profile in a low chill peach variety. *Scientia Horticulturae*, 281, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109957.
- Hyde Bailey, L. (1914). *The Forcing Book: A Manual of the Cultivation of Vegetables in Glass Houses*. Macmillan, 1-266.
- Jang, Y., Moon, J. H., Kim, S. G., Kim, T., Lee, O. J., Lee, H. J., & Wi, S. H. (2022). Effect of low-temperature tolerant rootstocks on the growth and fruit quality of watermelon in semi-forcing and retarding culture. *Agronomy*, 13(1), 1-16.
- Khuankaew, T., Ruamrungsri, S., Ito, S., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. (2010). Assimilation and translocation of nitrogen and carbon in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *Plant Biology*, 12(3), 414–423. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00229.
- Kim, Y. M., Jo, A., Jeong, J. H., Kwon, Y. R., & Kim, H. B. (2017). Development and characterization of microsatellite primers for *Zanthoxylum schinifolium* (Rutaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(7), 1-4.
- Khodorova, N. V., & Boitel-Conti, M. (2013). The role of temperature in the growth and flowering of geophytes. *Plants*, 2, 699-711.
- Ku, Y. G., Woolley, D. J., Hughes, A. R., & Nichols, M. A. (2007). Temperature effects on dormancy, bud break and spear growth in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3), 446-450.
- Marambe, B., Ando, T., & Kouno, K. (1992). Alpha-amylase and protease activities and water relations in germinating sorghum (*Sorghum bicolor* Moench) seeds as affected by animal-waste composts. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38 (1), 123-131.
- Langens-Gerrits, M. M., Nashimoto, S., Croes, A. F., & De Klerk, G. J. (2001). Development of dormancy in different lily genotypes regenerated in vitro. *Plant growth regulation*, 34, 215-222.
- Mousavi, S., Mozaffarian, V., Mummenhoff, K., Downie, S. R., & Zarre, S. (2020). An updated lineage-based tribal classification of Apiaceae subfamily Apioideae with special focus on Iranian genera. *Systematics and Biodiversity*, 1-21. https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1834002.

- Muthoni, J., Kabira, J., Shimelis, H., & Melis, R. (2014). Regulation of potato tuber dormancy: A review. *Australian Journal of Crop Science*, 8, 754–759.
- Nie, L. C., Chen, Y. H., & Liu, M. (2016). Effects of low temperature and chilling duration on bud break and changes of endogenous hormones of asparagus. *European Journal of Horticultural Science*, 81(1), 22-26.
- Parera, C., & Cantliffe, D. (1994). Dehydration rate after solid matrix alters seed performance of shrunken-2 corn. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(3), 629-635.
- Ranal, M. A., Santana, D. G., Ferreira, W. R., & Mendes-Rodrigues, C. (2009). Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Brazilian Journal of Botany*, 32, 849-855.
- Raymond Hepler, J. (1922). *Experiments in Forcing Rhubarb*. University of Wisconsin--Madison, 1-76.
- Razeghi, L., Azizi, M., Ziaratnia, S. M., Bagheri, A. R., & Nemati, S. H. (2016). Evaluation in vitro culture of *Kelussia odoratissima* Mozaff and secondary metabolites production through suspension cultures. *The Pharma Innovation*, 5(1, Part B), 74-80.
- Rentzsch, S., Podzimska, D., & Voegele, A. (2012). Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellin-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of α-amylases and β-amylases. *Planta*, 235, 137–151. DOI 10.1007/s00425-011-1501-1.
- Richardson, E. A., Anderson, J. L., & Campbell, R. H. (1986). The omnidata biophenometer (TA45-P): A chill unit and growing degree hour accumulator. *Acta Horticulturae*, 184, 95–100.
- Scott, S., Jones, R., & Williams, W. (1984). Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science*, 24, 1192-1199. https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400060043x.
- Sheikh, F. R., Jose-Santhi, J., Kalia, D., Singh, K., & Singh, R. K. (2022). Sugars as the regulators of dormancy and sprouting in geophytes. *Industrial Crops and Products*, 189, 115817. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115817.
- Shin, K. S., Chakrabarty, D., & Paek, K. Y. (2002). Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated in vitro. *Scientia Horticulturae*, 96(1-4), 195-204. https://doi.org/10.1016/S0304-4238 (02)00087-0.
- Tabatabaeian, J., & Kadkhodaee, A. (2019). The effect of dormancy breaking treatments on seed germination of *Kelussia odoratissima* Mozaff (kohrang). *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 8 (1), 201 – 212. (In Persian).
- Uno, T., Kumano, T., & Araki, H. (2021). Utilization of snow and geothermal cold heat for temperature control and head production in witloof chicory hydroponic forcing culture in summer. *Environmental Control in Biology*, 59(3), 125-133.
- Uragami, A., Yamasaki, A., Matsuo, K., Yamaguchi, T., Tokiwa, H., Takizawa, T., & Shinzato, Y. (2017). Yield estimation of 1-year-old asparagus grown using rootstock-planting forcing culture. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(5), 530-538. https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1301787 .
- Wang, Y., Zhao, H., Wang, Y., Yu, S., Zheng, Y., Wang, W. E., & Chan, Z. (2019). Comparative physiological and metabolomic analyses reveal natural variations of tulip in response to storage temperatures. *Planta*, 249, 1379-1390. https://doi.org/10.1007/s00425-018-03072-4.
- Wang, S. L., Beruto, M., Xue, J, Q., Zhu F, Y., Liu, C. J., Yan, Y. M., & Zhang, X. (2015). Molecular cloning and potential function prediction of homologous SOC1 genes in tree peony. *Plant cell Reports, 34, 1459-1471*.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351(1), 146-148.
- Xu, R. Y., Niimi, Y., & Han, D. S. (2006). Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy-release in bulbs of *Lilium rubellum*. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 68-72. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.08.004.
- Yu, X., Wang, L., & da Silva, J. A. T. Change of endogenous hormones inside *Paeonia lactiflora* buds during winter dormancy. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 6(1), 61-63.

Extended Abstract

Introduction

Mountain celery (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) already described as "*Amirkabiria odoratissima* Mozaff., *Apium graveolens* L., and *Opopanax* sp." is the only species reported for *Kelussia* genus, the most recent genera introduced to Apiaceae. The plant is perennial herb and tall which is predominately outcrossing pollinated mainly by bees. It inhabits alpine regions (found in over 2,500 m. a.s.l.) of central Zagros mountains (Iran) distributed in a restricted geographic range, experiencing subfreezing temperature for several months and thus short growing season. *K. odoratissima* called locally as “Kelous”, is consumed as a medicinal wild plant with a pleasant taste and aroma that contains valuable secondary metabolites including Z-Ligustilide and Z-Butylidene phthalide. In addition, it contains total phenolic, flavonoid, and flavonol compunds, which are attributed to the cancer prevention and liver protection, and antibacterial and antimicrobial activity. Other pharmacological properties of this plant include analgesic, anti-diabetic, anti-inflammatory, anti-allergic, fibrinolytic, acid and pepsin reducing, and memory enhancing effects. In traditional medicine, the plant is used to treat disorders such as rheumatism, heart diseases, antispasmodics, menstrual pain relief, blood pressure, and cholesterol. Recently, the conservation of indigenous and threatened species has attracted considerable attention globally. Long-term seed dormancy, slow growth rate, insufficient production in limited local habitats, and harvesting in the early stages of growth (buds) have endangered the survival of this plant. Consecutive harvesting of buds causes the permanent destruction of this plant and therefore the possibility of production in controlled environments and off-season can help to preserve it.

Materials and Methods

In order to carry out the research, tuberous roots of one-year-old plants, uniform and free from any diseases and pests, were obtained from Mr. Raisi Company (located in Chaharmahal and Bakhtiari province) and transferred to the Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. The experiment started in the middle of October 2018 and lasted until the end of March 2019. First, the tuberous roots were treated with captan fungicide with a concentration of 2 parts per thousand. Then the tuberous roots were placed in groups of 10 in a bag and sprinkled with water to provide moisture and placed in a refrigerator at a temperature of 2-7℃. The samples were checked and moistened every three days. In this research, effect of the number of chilling hours above zero (2 to 7℃) in five time durations (0, 700, 1400, 2100, and 2800 hours) in three replications on the dormancy and growth of tuberous roots of *K. odoratissima* in the form of a completely randomized design was conducted. Chilling treatment including temperature 2-7° was applied on the tuberous roots of *K. odoratissima* during time durations and some morphological and biochemical traits were measured such as germination parameters (percentage of germination, germination index, number of days until germination and seedling stem index) as well as biochemical traits (total carbohydrates, starch and total protein), enzyme activities (α-amylase), β-amylase and protease) and some phyto-hormones (gibberellic acid and abscisic acid).

Results and Discussion

The highest germination rate (72%) of the tuberous root was observed in the chilling treatment of 2800 h, ad in the chilling treatment of 1400 h, 50% of the tuberous roots had germinated. Chilling treatment led to acceleration of germination, increase of seedling length and stem. The highest amount of soluble carbohydrates was recorded in the cold treatment of 2800 h (76 mg/g fresh weight) and the lowest amount was observed in the control treatment (7 mg/g fresh weight). Chilling treatment led to changes in the concentration of abscisic acid and gibberellic acid phytohormones, so that the highest concentration of gibberellic acid and the lowest amount of abscisic acid (75.5 and 20.2 nanomol per gram of fresh weight, respectively) were belonged to 2800 h treatment. In addition, chilling treatment increased the activity of alpha-amylase, beta-amylase and protease enzymes by 1.2, 0.63, and 0.35 (mg/g fresh weight), respectively. These results indicated that the chilling requirement of the *K. odoratissima* plant is approximately 2100 to 2800 h and the forcing culture of *K. odoratissima* in a controlled environment has been successful.

Conclusion

It is recommended to reduce the length of the dormant period and create grounds for its cultivation in controlled environments using the forcing culture technique as an alternative solution to preserve, expand, and develop the habitats of this valuable medicinal plant at risk of extinction.

ویراستاری نشده