

## بررسی امکان نگهداری بذر *Centaurea lachnopus* Rech. f. در شرایط فراسرد و

### بررسی رشد بذرهای فراسردی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

محبّت علی نادری شهاب، مریم جبلی\*، امر علی شاهمرادی، عباس قمری زارع و علی اشرف جعفری

تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۸

#### چکیده

گونه *Centaurea lachnopus* Rech. f. گیاهیست علفی، دو یا چند ساله که در مراتع بیابانی استان سمنان رویش دارد. به دلیل دامنه محدود اکولوژیک، پراکنش جغرافیایی محدود و تخریب بعضی از عرصه‌های رویشگاهی، در معرض خطر می‌باشد. به‌منظور بررسی امکان نگهداری بلند مدت بذر این گونه در شرایط فراسرد (Cryopreservation) و بررسی رشد بذرهای فراسردی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، بذر این گونه از رویشگاه طبیعی آن جمع‌آوری شد. به منظور تعیین بهترین پیش‌تیمار برای ذخیره‌سازی بذر در فراسرد یا برودت  $-196^{\circ}\text{C}$  سه پیش‌تیمار PVS2 (ویتریفیکاسیون)، Desiccation (آبگیری) و گلیسرول ۳۰ درصد همراه با شاهد مورد آزمایش قرار گرفت. بذرهای تیمار شده به مدت یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال در شرایط فراسرد یا برودت  $-196^{\circ}\text{C}$  (درون ازت مایع) نگهداری شدند. بذرهای پس از خروج از شرایط فراسرد، در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد آزمایش قرار گرفتند و تعدادی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی و استقرار بررسی گردید. نتایج بررسی‌ها نشان داد که بذر *Centaurea lachnopus* قابل نگهداری در شرایط فراسرد یا  $-196^{\circ}\text{C}$  می‌باشد. در بررسی اثر پیش‌تیمارها در حفاظت از بذر در شرایط فراسرد، تیمارهای آبگیری، گلیسرول ۳۰٪ و PVS2 به ترتیب با ۳۷/۶۷ درصد، ۳۷/۶۷ درصد و ۲۲/۶۷ درصد جوانه‌زنی در تیمار یک هفته ماندگاری در فراسرد، تفاوت معنی‌داری داشتند و پیش‌تیمار آبگیری بهترین پیش‌تیمار بود. اثر متقابل مدت زمان نگهداری بذرهای فراسرد و پیش‌تیمارهای مختلف بر میانگین صفات نشان داد که در تعدادی از صفات تفاوت بین زمان‌های ذخیره‌سازی وجود دارد ولی در تعداد دیگری از صفات این تفاوت معنی‌دار نیست. در شرایط گلخانه بذرهای فراسردی بهتر و یکنواخت‌تر از شرایط آزمایشگاه جوانه زده و مستقر شدند. پیش‌تیمار آبگیری با ۳۰ درصد، ۳۱/۶۷ درصد و ۲۸/۳۳ درصد استقرار به ترتیب در یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال ماندگاری در ازت مایع بهترین پیش‌تیمار برای ذخیره‌سازی بلند مدت بذر این گونه در شرایط فراسرد بود.

واژه‌های کلیدی: *Centaurea lachnopus*، نگهداری بذر در فراسرد، گونه مرتعی، گونه در معرض خطر.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۶۷۷۰۸۱۰، پست الکترونیکی: jebelly@rifr-ac.ir

#### مقدمه

گونه *Centaurea lachnopus* Rech. f. گیاهی بیابانی، دو یا چندساله از خانواده Asteraceae است. بر اساس گزارش‌های موجود (۱۴) رویشگاه‌های این گونه در بین سمنان- دامغان و سرخه (سمنان) در ارتفاع ۱۴۰۰ متر از سطح دریا می‌باشد (شکل ۱). همچنین رویشگاه‌های این گونه را بیابان گچی حوالی سرخه ارتفاع ۱۶۰۰ متر، ۷-۲ کیلومتری سرخه ارتفاع ۱۴۰۰-۱۳۰۰ متر، سمنان به طرف فیروزکوه ارتفاع ۱۳۵۰ متر نیز گزارش کرده‌اند (۱۵). در بررسی فلور ناحیه گرمسار و شکل‌های زیستی و کوروتیپ‌های گیاهان این منطقه، به حضور این گونه در منطقه گرمسار (۱) و دامغان (۳) اشاره شده ولی مکان دقیق رویشگاه (های) این گونه مشخص نشده است. با توجه به

اولویت بالایی برخوردار می‌باشد.



اینکه گونه *C. lachnopus* و رویشگاه آن به شدت در معرض تهدید و تخریب است، حفظ و حراست از آن از



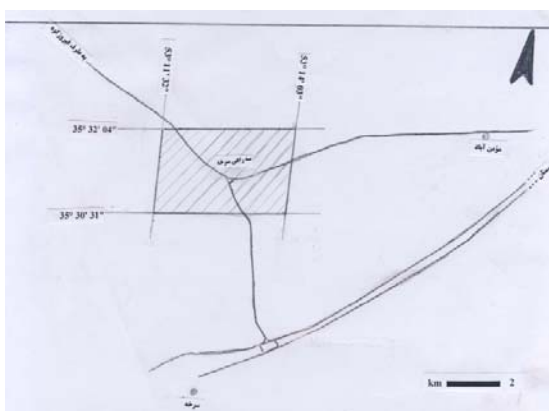
شکل ۱- گیاه چند ساله (راست) و جوان (چپ) *Centaurea lachnopus* در عرصه رویشگاهی سمنان

در بررسی روش‌های فراسردی (۲۰) اثر پیش تیمارهای ویتریفیکاسیون و دهیدراتاسیون-کپسوله‌کردن در زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد مورد مطالعه قرار گرفت. درصد زنده‌مانی نمونه‌ها پس از خروج از ازلت مایع و اعمال شوک حرارتی، برای پیش تیمارهای مختلف به شدت متفاوت بود. به طوری که در پیش تیمار ویتریفیکاسیون، درصد زنده‌مانی ۳۳٪ و در آبگیری ۶۰٪ بود. این اختلاف چشمگیر حاکی از تأثیر پیش تیمار در میزان زنده‌مانی نمونه در شرایط فراسرد می‌باشد.

بهینه‌سازی رطوبت بذر قبل از ورود به شرایط فراسرد یا برودت  $196^{\circ}\text{C}$  نیز تأثیر مهمی در زنده‌مانی نمونه گیاهی در شرایط فراسرد دارد. در همین رابطه بذر سه گونه پسته شامل *P. vera*، *P. terebinthus* و *P. lenticus* که جزء بذرهای روغنی و درشت‌اند مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار رطوبت بذر هر یک از گونه‌ها برای نگهداری در شرایط فراسرد متفاوت بود. به طوری که در *P. vera* درصد رطوبت مناسب ۱۱/۷٪ و در دو گونه دیگر، رطوبت ۲۰٪ مناسب‌ترین رطوبت برای حداکثر جوانه‌زنی پس از طی مراحل فراسرد بود (۱۳). بذر گونه *Najas flexilis* از گونه‌های آبی آبهای شیرین است، برای نگهداری در شرایط فراسرد باید رطوبت بذر تا ۱۵٪ کاهش و بعد وارد ازلت مایع گردد (۱۰). از این رو کیفیت و سلامت بذر،

ذخیره‌سازی بذر یا اندام گیاه در ازلت مایع (Cryopreservation) امکان نگهداری طولانی مدت بذرهای و اندام‌های گیاهی را امکان پذیر می‌کند. ذخیره‌سازی ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای فراسرد یا برودت  $196^{\circ}\text{C}$  در اواخر قرن گذشته وارد مرحله عملی شد. اجرایی شدن روش‌های آزمایشی و نگهداری گسترده اندام‌های گیاهی در شرایط فراسرد و دستیابی به روش مناسب، نیاز به تحقیقات و بررسی‌های وسیعی دارد (۱۶). استفاده از پیش تیمارهای مناسب، استفاده از مواد محافظت‌کننده با غلظت‌های بهینه، دمای مناسب، سرمادهی تدریجی و ... در گونه‌های گیاهی مختلف باید مورد بررسی قرار گیرد تا روش بهینه بدست آید. به همین دلیل بهینه‌سازی روش‌ها از ضروریات کار بوده و موفقیت ذخیره‌سازی بذر یا اندام گیاهی در فراسرد بستگی به تحقیقات گسترده در زمینه‌های فوق دارد. زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در فراسرد و میزان رشد مجدد نمونه‌ها پس از خروج از شرایط فراسرد، تولید گیاه کامل و سایر عوامل می‌تواند مورد تجزیه و تحلیل علمی قرار گرفته و کارآیی هر روش مورد ارزیابی قرار گیرد و بعد بر اساس نتایج، روش ذخیره‌سازی بهینه تعیین گردد (۸). از این رو با بهینه‌سازی روش و استفاده از مواد و تیمارهای مناسب می‌توان به نتایج مطلوبی در ذخیره‌سازی نمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد دست یافت (۱۸).

**بررسی‌های آزمایشگاهی:** محل جمع‌آوری بذر: بذر این گونه از استان سمنان، شهرستان سمنان، جاده سمنان-فیروزکوه، سه راهی سرخه جمع‌آوری شد. مختصات و مشخصات مکانی عرصه مورد بررسی این گیاه بین عرض جغرافیایی  $35^{\circ} 32' 04''$  و  $35^{\circ} 30' 31''$  شمالی و طول جغرافیایی  $53^{\circ} 11' 32''$  و  $53^{\circ} 14' 03''$  شرقی به وسعت تقریبی ۱۵ کیلومترمربع و ارتفاع حدود ۱۴۵۰ متر (در قسمت شمالی) و ۱۲۰۰ متر (قسمت جنوبی) رویشگاه می‌باشد (شکل ۲) (قسمت هاشورزده).



شکل ۲- عرصه رویشگاهی عمده *Centaurea lachnopus* در حدود ۲۰ کیلومتری مسیر سمنان-فیروزکوه، در اطراف سه راهی سرخه (قسمت هاشورزده)

وزن هزار دانه بذر این گونه  $42/23$  گرم و اشکال مختلف بذر در شکل ۳ ارائه شده است.

**بررسی جوانه‌زنی بذرها:** قبل از انجام آزمایشهای فراسرد، بررسی‌های مقدماتی متعددی از قبیل خراش بذر با سمباده، شستشوی بذر با آب جاری، تیمار تاریکی و نور، تیمارهای دمایی مختلف و روش‌های ضدعفونی بذر انجام شد. با توجه به اینکه استفاده از هیپوکلریت سدیم در ضدعفونی بذر باعث کاهش شدید جوانه‌زنی بذر گردید، این ماده از ضدعفونی بذر حذف شد. بر اساس نتایج آزمایشهای مقدماتی، بهترین روش جوانه‌زنی بذر *C. lachnopus* به شرح زیر است: ابتدا باید استحصال بذر و حذف کرکهای انتهایی بذر انجام شود (شکل ۳).

رطوبت نسبی محیط رشد گیاهچه و شرایط افزایش دمای بذر پس از خروج از ازت مایع یا برودت  $196^{\circ}\text{C}$ - نقش اساسی در زنده‌مانی و رشد بذرها دارند (۷). استفاده از اندام‌های رویشی مانند محور جنینی و نمونه‌های کشت بافتی گونه‌هایی مانند مرکبات در شرایط فراسرد با هدف ایجاد ژرم‌پلاسم، دستاوردی است که با استفاده از آن می‌توان نسبت به نگهداری اندامهای رویشی مرکبات و سایر ارقام برای بلندمدت استفاده کرد (۶). همچنین نگهداری اندام‌های رویشی مانند محورهای جنینی و سایر اندام‌های رویشی گونه‌هایی که نگهداری بذر آنها در شرایط متعارف امکان‌پذیر نیست، مانند گونه‌های جنس بلوط (*Quercus*) که بذرهای ریکالسیترنت (*Recalcitrant*) دارند، افقی روشن و پایدار در حراست از این گونه‌های مهم و ارزشمند است (۹). بر اساس بررسی منابع علمی، عمده مطالب منابع خارجی، محدود می‌شود به اینکه این گونه از ایران گزارش شده (۱۴) و گزارشهای داخلی نیز اغلب در مورد پراکنش این گونه در زیر حوزه ایران مرکزی (۲)، یا در قالب معرفی فلور، شکل‌های زیستی و پراکنش جغرافیائی گیاهان مرتعی (۳) می‌باشد. در این گزارشها به وضعیت در خطر بودن آن در عرصه‌های طبیعی نیز اشاره‌ای گذرا شده است (۳). اما در مورد نحوه حفظ و حراست از این گونه، روش رویاندن بذر، تولید نهال و نگهداری بلندمدت بذر این گونه در معرض خطر به‌ویژه نگهداری بلندمدت آن در فراسرد تا جایی که بررسی شده هیچگونه گزارشی وجود ندارد. یافته‌های این تحقیق، به اغلب خلأهای مربوط به جمع‌آوری، جوانه‌زنی بذر، رویاندن گیاه و استقرار آن در گلخانه پاسخ خواهد داد. مضافاً اینکه امکان نگهداری بلندمدت بذر در فراسرد با هدف جلوگیری از انقراض و محو شدن آن از عرصه‌های رویشگاهی گیاه و ارائه راهکاری روشن و کاربردی در این زمینه به عنوان هدف اصلی پرداخته شده است.

## مواد و روشها



شکل ۳- گل رسیده خشک شده *C. lachnopus* (راست)، بذر کرکدار (وسط) و بذر کرک‌زدایی شده (چپ)

درصد DMSO (w/v)، ۳۰ درصد گلیسرول (w/v) و ۰/۴ مول ساکارز (۱۷) اضافه کرده و ۲۰ دقیقه در آب  $4^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. سپس لوله‌های آزمایش دردار حاوی بذر بلافاصله وارد ازت مایع گردیدند.

**Desiccation** یا **آبگیری**: آزمایش‌های مقدماتی به منظور یافتن حداقل رطوبت بذر، بدون وارد آمدن صدمه به جوانه‌زنی آن انجام شد. به منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۱۰ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌عنوان وزن اولیه بذر (FW) یادداشت شد. سپس بذرها بمدت ۷۲ ساعت در آون با دمای  $75^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. بذرها از آون خارج و بلافاصله با ترازوی حساس توزین و وزن خشک بذر (DW) بدست آمد. درصد رطوبت کل بذر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Total Seed Moisture Content (\%)} = (\text{FW} - \text{DW})/\text{DW} * 100$$

به منظور تهیه بذر مورد نیاز این تیمار، مقدار ۵ گرم بذر تازه توزین و به دسیکاتور حاوی ۱۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و بمدت ۹ روز در سردخانه با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. بذرها از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین و درصد رطوبت بذر پس از خشک شدن در دسیکاتور با استفاده از فرمول فوق محاسبه شد. با در دست داشتن رطوبت کل بذر (۳/۸۷ در صد) و مقدار رطوبت بذر پس از خروج از دسیکاتور (۲/۵۵ درصد)، درصد کاهش رطوبت بذر در دسیکاتور نسبت به کل رطوبت بذر محاسبه گردید که این کاهش برابر ۳۴/۱۲ درصد رطوبت

سپس بذرها با سمباده شماره ۱۰۰ خراش ملایم داده شده و به شیشه‌های دردار منتقل و با تکان شدید شستشو شوند. بعد از این مرحله آب را تخلیه کرده و به شیشه‌ها آب استریل اضافه کرده و این مرحله را تا ۶ بار در شرایط استریل تکرار می‌نماییم. سپس بذرها را بین کاغذ استریل مرطوب در درون پتری‌دیش قرار داده و به ژرمیناتور با دمای  $24^{\circ}\text{C}$  در شرایط تاریکی منتقل می‌کنیم (شکل ۴).



شکل ۴- جوانه‌زنی بذرها شاهد *Centaurea lachnopus* در شرایط آزمایشگاه

**آزمایش نگهداری بذر در فراسرد (Cryopreservation):** پیش‌تیمارهای فراسرد یا تیمارهای قبل از ورود بذرها به ازت مایع به شرح زیر می‌باشد:

**PVS2 (Plant Vitrification Solution 2):** به لوله‌های آزمایش درب‌دار ۱۵ میلی‌لیتری حاوی بذر محلول لودینگ شامل: ۰/۴ مول ساکارز و ۲ مول گلیسرول (۱۱) اضافه و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. محلول را کاملاً تخلیه و به لوله‌های آزمایش حاوی بذر محلول PVS2 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) شامل: ۱۵ درصد اتیلن‌گلیکول (w/v)، ۱۵

یکسال ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع تشکیل دهنده ۳ سطح فاکتور B در این آزمایش بودند. پتری‌دیش‌ها هر یک با ۲۵ بذر واحدهای آزمایشی محسوب شدند. صفات مورد بررسی و اندازه‌گیری در این آزمایش عبارت بودند از: درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، شاخص بنیه بذر (VI)، سرعت جوانه‌زنی و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (R/S). شاخص بنیه بذر با استفاده از روش زیر (۴) محاسبه شد:

$$100 / \text{درصد جوانه‌زنی} \times \text{میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر (مجموع طول ساقه‌چه و ریشه‌چه)} = \text{شاخص بنیه بذر}$$

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

**بررسی‌های گلخانه‌ای:** بذرهای پس از خروج از ازت مایع و اعمال تیمارهای پس از خروج از ازت مایع همراه با نمونه شاهد در گلخانه در گلدان‌های با قطر ۱۵ سانتیمتر و طشت‌های بزرگ با ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و قطر ۶۰ سانتی‌متر حاوی ماسه‌بادی کشت شدند. عمق کشت ۲/۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بذرهای هر هفته یکبار آبیاری گردیدند. درصد استقرار و سبز شدن بذرهای اندازه‌گیری گردید. طرح آزمایشی مورد استفاده فاکتوریل و پیش تیمارها، تکرارها و تیمارهای زمان ذخیره‌سازی در ازت مایع بکار رفت. داده‌های حاصل از آزمایش و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار SAS انجام شد.

### نتایج

بررسی‌های آزمایشگاهی: بذرهای پس از گذراندن یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال از ازت مایع خارج و پس از اندازه‌گیری صفات، داده‌های آزمایشی به همراه بذر شاهد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تأثیر پیش تیمارهای مختلف فراسردی بر میانگین کل صفات مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است.

کل بذر بود. بذرهای لوله‌های آزمایش دردار ۱۵ میلی‌لیتری منفذدار منتقل و بلافاصله وارد ازت مایع شدند. **گلیسرول ۳۰ درصد (Glycerol):** لوله‌های آزمایش دردار ۱۵ میلی‌لیتری حاوی بذر، با گلیسرول ۳۰ درصد پر، درب آنها را بسته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. پس از آن لوله‌های آزمایش حاوی بذر وارد ازت مایع گردیدند.

**بذرهای شاهد:** سه نمونه بذر به‌عنوان بذرهای شاهد برای استفاده در آزمایشهای یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال به‌عنوان کوتاه مدت، میان مدت و نسبتاً بلند مدت در  $19^{\circ}\text{C} \pm 23^{\circ}\text{C}$  نگهداری و به‌عنوان شاهد آزمایشها از آنها استفاده شد.

**مدت زمان نگهداری بذر در ازت مایع:** بذرهای به مدت یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال در داخل ازت مایع یا  $196^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند.

**تیمارهای پس از خروج بذر از ازت مایع:** بر اساس آزمایشهای مقدماتی بهترین تیمار پس از خروج بذرهای ازت مایع به شرح زیر به دست آمد. ابتدا بذرهای پس از خروج از ازت مایع به مدت ۲ دقیقه در آب  $42^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. آنگاه بذرهای از آب گرم خارج و بمدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکارز استریل ۱/۵ مول قرار گرفتند. در شرایط استریل بذرهای ۶ بار با آب مقطر استریل شستشو و بعد بین کاغذ مرطوب استریل در داخل پتری‌دیش قرار داده شدند. پتریهای حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای  $24^{\circ}\text{C}$  با شرایط تاریکی منتقل گردیدند.

**طرح آزمایشی:** طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش تیمارهای فراسرد و زمان ذخیره‌سازی در ازت مایع با بکارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. پیش تیمارهای فراسرد شامل PVS2، Desiccation، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد تشکیل دهنده سطح فاکتور A و سه دوره زمانی یک‌هفته، یک‌ماه و

جدول ۱- اثر پیش تیمارهای فراسردی بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاه‌چه، سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (R/S) بذرهای *Centaurea lachnopus* ذخیره‌شده در ازت مایع

پیش تیمار	جوانه‌زنی (درصد)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاه‌چه (میلی‌متر)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه (VI)	طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه
شاهد	۳۵/۱۱ *a±۰/۵	۲۶/۵۸ a±۰/۵	۳۷/۰۸ a±۰/۷	۶۳/۶۷ a±۱	۷/۶۴ a±۰/۱	۲۲/۷۲ a±۰/۵	۰/۷۲ ab±۰/۰۷
گلیسرول ۳۰٪	۲۸ b±۱	۲۰ c±۰/۸	۲۵/۸۳ c±۰/۸	۴۵/۸۳ c±۱/۵	۴/۴۳ c±۰/۲	۱۲/۸۶ c±۰/۵	۰/۷۸a±۰/۰۷
Desiccation	۳۲/۶۷ a±۰/۸	۲۳/۴۷ b±۰/۵	۳۲/۷۸ b±۱	۵۶/۲۵ b±۱	۵/۲۶ b±۰/۱	۱۸/۴۷ b±۰/۷	۰/۷۲ ab±۰/۰۷
PVS2	۲۰/۶۷ c±۰/۱	۱۶/۵۳ d±۰/۴	۲۳/۶۱ c±۰/۶	۴۰/۱۴ d±۱	۲/۹۹ d±۰/۱	۸/۲۹ d±۰/۴	۰/۷ b±۰/۰۷±

\*: در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک هستند در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

میانگین درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد از نظر آماری تفاوتی با بذرهای فراسردی در تیمار Desiccation نشان نمی‌دهند (به ترتیب ۳۵/۱۱ درصد و ۳۲/۶۷ درصد)، اما پیش تیمارهای PVS2 و گلیسرول ۳۰٪ به ترتیب کمترین میانگین‌ها را در بین پیش تیمارهای فراسردی دارند. این نتایج حاکی از تأثیر کم پیش تیمارهای اخیر در جوانه‌زنی

و سایر صفات اندازه‌گیری شده مربوط به بذرهای ذخیره شده در ازت مایع است.

اثر متقابل پیش تیمارهای مختلف فراسردی شامل گلیسرول ۳۰ درصد، Desiccation و PVS2 همراه با بذرهای شاهد و زمانهای نگهداری بذرها در ازت مایع بر میانگین صفات مختلف، در جدول ۲ به تفصیل ارائه شده است.

جدول ۲- اثر پیش تیمارهای مختلف و زمان‌های نگهداری بذر *Centaurea lachnopus* در ازت مایع بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاه‌چه، سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر و نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه (R/S)

زمان نگهداری	پیش تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاه‌چه (میلی‌متر)	سرعت جوانه‌زنی (میلی‌متر)	شاخص بنیه (VI)	طول ریشه‌چه به ساقه‌چه
یک‌هفته	شاهد	۴۴/۳۳* a±۰/۵	۲۶/۶۷ ab±۰/۷	۳۸/۳۳ ab±۰/۹	۶۵ ab±۱	۱۰/۵۳ a±۱	۲۸/۸۳ a±۰/۷	۰/۷۰ b±۰/۰۷
	گلیسرول ۳۰٪	۳۲/۶۷ cd±۲	۲۰/۴۲ de±۱	۲۵ e±۱	۲۵ e±۱	۵/۰۵ bc±۱	۱۴/۷۰ c±۰/۴	۰/۸۲ a±۰/۰۸
	Desiccation	۳۷/۶۷ bc±۱	۲۳/۷۵ bcd±۱	۳۴/۱۷ bc±۲	۵۷/۹۲ bc±۲	۵/۹۸ b	۲۱/۸۷ b±۱/۵	۰/۷ b±۰/۰۷
	PVS2	۲۲/۶۷ ef±۲	۱۶/۶۷ f±۰/۷	۲۳/۷۵ e±۱	۴۰/۴۲ ef±۱	۳/۴۲ de	۹/۰۵ de±۰/۴	۰/۷ b±۰/۰۷
یک‌ماه	شاهد	۴۱ ab±۱	۲۷/۶۷ a±۰/۵	۳۹/۵۸ a±۲	۶۷/۲۵ a±۲	۹/۴۶ a±۰/۵	۲۷/۵۹ a±۱/۶	۰/۷۱ b±۰/۰۷
	گلیسرول ۳۰٪	۳۱ d±۱	۲۰/۴۲ de±۱	۲۷/۰۸ de±۱	۴۷/۵۰ de±۲	۵/۳۶ b±۰/۵	۱۴/۸۵ c±۱/۷	۰/۷۵ ab±۰/۰۷
	Desiccation	۳۴/۳۳ cd±۰/۵	۲۳/۷۵ bcd±۰/۶	۳۳/۳۳ c±۱	۵۷/۰۸ c±۱	۵/۷۸ b±۱	۱۹/۶۱ b±۰/۸	۰/۷۱ b±۰/۰۷
	PVS2	۲۱ ef±۰/۸	۱۷/۰۸ ef±۰/۷	۲۴/۱۷ e±۱	۴۱/۲۵ ef±۲	۳/۱۶ de±۱	۸/۷۱ de±۰/۸	۰/۷۱ b±۰/۰۷
یک‌سال	شاهد	۲۰ f±۰	۲۵/۴۲ abc±۱	۳۳/۳۳ c±۰/۳	۵۸/۷۵ bc±۱	۲/۹۲ de±۱	۱۱/۷۵ cd±۰/۳	۰/۷۶ ab±۰/۰۷
	گلیسرول ۳۰٪	۲۰/۳۳ f±۱	۱۹/۱۷ ef±۰/۷	۲۵/۴۲ e±۰/۹	۴۴/۵۸ ef±۱	۲/۸۸ de±۱	۹/۰۱ de±۰/۲	۰/۷۶ ab±۰/۰۷
	Desiccation	۲۶ e±۱	۲۲/۹۲ cd±۰/۹	۳۰/۸۳ cd±۱	۵۳/۷۵ cd±۲	۴/۰۲ dc±۱	۱۳/۹۲ c±۰/۸	۰/۷۴ ab±۰/۰۷
	PVS2	۱۸/۳۳ f±۱	۱۵/۸۳ f±۰/۳	۲۲/۹۲ e±۰/۳	۳۸/۷۵ f±۰/۶	۲/۴۰ e±۱	۷/۱۰ e±۰/۵	۰/۶۹ b±۰/۰۷

\*: در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک هستند در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

درصد جوانه‌زنی بذر شاهد در شرایط ایده‌آل (یک‌هفته ذخیره‌سازی در شرایط عادی) ۴۴/۳۳ درصد بوده و بیش از ۵۵ درصد از بذرها قادر به جوانه‌زنی نبودند. از طرفی جوانه‌زنی بذرهای شاهد با گذشت زمان به سرعت کاهش

می‌دهد. پس از آن تیمار گلیسرول ۳۰ درصد و متعاقب آن PVS2 قرار دارد. داده‌های جوانه‌زنی و سایر صفات مورد بررسی نشان می‌دهد که تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و PVS2 در مقایسه با Desiccation تأثیر کمتری در حفاظت از بذرها در شرایط فراسرد دارند. در بین صفات مورد بررسی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنيه بذر در تیمارهای فراسردی روندی همانند درصد جوانه‌زنی نشان می‌دهند. اما صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه و نسبت طول ریشه‌چه بر طول ساقه‌چه (R/S) روند تغییرات کمی را در مدت زمان‌های ذخیره‌سازی در بین پیش تیمارهای مختلف نشان می‌دهند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که پیش تیمار Desiccation بهترین تیمار برای نگهداری بذر این گونه در شرایط فراسرد می‌باشد.

بررسی‌های گلخانه‌ای: شرایط گلخانه بدلیل حضور عوامل طبیعی مانند خاک، نور، عوامل بیولوژیک، میکروارگانیسم‌ها و سایر عوامل، به عرصه طبیعی نزدیک‌تر می‌باشد. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، استقرار گیاه در گلدان مورد بررسی قرار گرفت. اثر پیش تیمارهای مختلف و مدت زمان ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع بر استقرار و رشد گیاهان در شرایط گلخانه در جدول ۳ و شکل ۵ ارائه شده است.

یافته و پس از یک‌ماه و یکسال به ترتیب به ۴۱ و ۲۰ درصد کاهش یافت. شاخص بنيه بذر نیز با همین روند کاهش پیدا کرده و پس از یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال ماندگاری (در شرایط عادی) به ترتیب به ۲۸/۸۳، ۲۷/۵۹ و ۱۱/۷۵ درصد رسید. اما طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه تغییر ناچیزی را نشان دادند که این تغییرات نامحسوس نشان می‌دهد بذرهای شاهد در صورت جوانه‌زنی به طور عادی شروع به رشد و نمو می‌کنند.

بذرهای فراسردی که پس از پیش‌تیمار با گلیسرول ۳۰ درصد، Desiccation و PVS2 وارد ازت مایع شده‌اند، نشان دادند که بذر این گونه به خوبی شرایط فراسرد را تحمل کرده و قابل نگهداری در شرایط فراسرد هستند. در عین حال تفاوت معنی‌داری بین پیش تیمارهای مختلف برای اغلب صفات مشاهده شد.

اثر متقابل مدت زمان نگهداری بذرها در شرایط فراسرد و پیش تیمارهای مختلف بر میانگین صفات نشان می‌دهند که درصد جوانه‌زنی بذر در تیمار یکسال ذخیره سازی در ازت مایع در کلیه پیش تیمارها کاهش نشان می‌دهند.

در بین پیش تیمارها، Desiccation بیشترین درصد جوانه‌زنی را به ترتیب ۳۷/۶۷، ۳۴/۳۳ و ۲۶ درصد، برای یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال ذخیره سازی در فراسرد نشان

جدول ۳- اثر پیش تیمارهای مختلف و زمانهای نگهداری بذر *Centaurea lachnopus* در فراسرد بر استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه

درصد استقرار گیاهچه	پیش تیمار	زمان ذخیره سازی
۴۵* a±۲/۵	شاهد	یک هفته
۱۷/۶۷ d±۱/۲	گلیسرول ۳۰ درصد	
۳۰ b±۴/۳	Desiccation	
۲۰ d±۲/۵	PVS2	
۴۳/۳۳ a±۱/۴	شاهد	یک ماه
۲۱/۶۷ cd±۱/۴	گلیسرول ۳۰ درصد	
۳۱/۶۷ b±۱/۴	Desiccation	
۱۸/۳۳ d±۱/۴	PVS2	
۲۰ d±۲/۵	شاهد	یک سال
۱۴/۶۷ d±۰/۲	گلیسرول ۳۰ درصد	
۲۸/۳۳ bc±۳/۸	Desiccation	
۱۹/۳۳ d±۰/۵	PVS2	

\*: در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک هستند در سطح ۱٪ معنی دار نمی‌باشند.



**b**

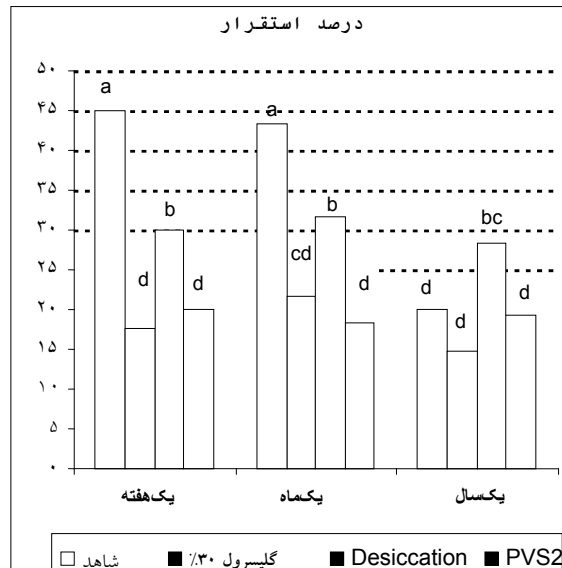


**a**

شکل ۵- استقرار بذر گیاهان فراسردی *Centaurea lachnopus* پس از یک‌ماه ماندگاری در ازت مایع (a) در گلدان و طشت (b) در شرایط گلخانه

براساس داده‌های جدول ۳ حداکثر استقرار بذرهای شاهد در یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال ماندگاری در شرایط عادی، به ترتیب ۴۵ درصد، ۴۳/۳۳ درصد و ۲۰ درصد می‌باشد که تقریباً مشابه شرایط آزمایشگاهی است. از بین پیش‌تیمارهای فراسردی، Desiccation با میانگین ۳۰ درصد (۳۱/۶۷ درصد و ۲۸/۳۳ درصد) بیشترین میانگین استقرار را داشته و بعد PVS2 با میانگین ۲۰ درصد (شکل ۶).

براساس داده‌های جدول ۳ حداکثر استقرار بذرهای شاهد در یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال ماندگاری در شرایط عادی، به ترتیب ۴۵ درصد، ۴۳/۳۳ درصد و ۲۰ درصد می‌باشد که تقریباً مشابه شرایط آزمایشگاهی است. از بین پیش‌تیمارهای فراسردی، Desiccation با میانگین ۳۰ درصد (۳۱/۶۷ درصد و ۲۸/۳۳ درصد) بیشترین میانگین استقرار را داشته و بعد PVS2 با میانگین ۲۰ درصد (شکل ۶).



شکل ۶- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و زمانهای نگهداری بذر *Centaurea lachnopus* در ازت مایع بر استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه

بوده و بخوبی شرایط فراسرد را تحمل می‌کند و قابل ذخیره‌سازی طولانی مدت است. میزان رطوبت بذر *C lachnopus* بسیار کم و در حد ۳/۸۷ درصد و بذر این

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که بذر *C lachnopus* قابل نگهداری در شرایط فراسرد یا  $-196^{\circ}\text{C}$

## بحث



گونه جزء بذره‌های اُرتدوکس محسوب می‌شود. بذر این گونه پس از رسیدن به سرعت توسط آفات بذرخوار در روی بوته پارازیت می‌شود. بر اساس آزمایش‌های این پژوهش، درصد جوانه‌زنی بذر این گونه در بهترین حالت ۴۴/۳۳ درصد بود که این درصد برای گونه بیابانی طبیعی می‌باشد. در عین حال شرایط فراسرد باعث کاهش درصد جوانه‌زنی، بنیه بذر و سرعت جوانه‌زنی می‌گردد. در این رابطه باید گفت که بذرها پس از قرار گرفتن در شرایط فراسرد تا حدی بنیه خود را از دست داده و درصدی از بذرها نیز که تحمل شرایط فراسرد را ندارند، پس از خروج از فراسرد توان جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهند (۱۲)، این کاهش بنیه و جوانه‌زنی در یک مقطع و در زمان ورود بذر یا اندام گیاهی به فراسرد رخ می‌دهد و پس از آن در طی زمان تقریباً ثابت مانده و تغییر نمی‌کند. در این تحقیق بعضی از صفات مانند درصد جوانه‌زنی، بنیه بذر و سرعت جوانه‌زنی در یکسال ذخیره‌سازی در فراسرد در مقایسه با یک‌هفته ذخیره‌سازی، کاهش معنی‌داری را نشان داد. به لحاظ تئوریک و محاسبات انجام شده، این کاهش منطقی به نظر نمی‌رسد. زیرا در محیط فراسرد فعالیت‌های متابولیکی و زیستی سلول به شدت و تا نزدیک به صفر کاهش یافته و به همین نسبت مدت زمان زنده‌مانی افزایش می‌یابد. در رابطه با مدت زمان ماندگاری بذر یا اندام گیاهی در شرایط فراسرد، به طور کلی بذر یا اندام‌های رویشی مانند بذر گونه‌های جنس بلوط (*Quercus*) و بذر شاه بلوط (*Castanea.sativa*) که توان زنده‌مانی در فراسرد را نداشته باشند به محض ورود به ازت مایع و یکنواخت شدن با دمای پیرامونی خود ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) بلافاصله از بین می‌روند. در صورتیکه بذر یا اندام گیاهی فضای فراسرد را تحمل کند، بر اساس اصول تئوریک و محاسبات ترمودینامیک (۵) که بر روی بذر کاهو انجام شده نیمه عمر جوانه‌زنی بذر تا سه هزار و چهار صد سال حفظ می‌گردد (۱۹).

با توجه به مباحث فوق، دلیل کاهش درصد جوانه‌زنی، بنیه بذر و سرعت جوانه‌زنی در تیمار یکسال ذخیره‌سازی در ازت مایع در مقایسه با یک‌هفته، به احتمال زیاد به دلیل وجود عوامل اثرگذار و غیرقابل پیشگیری مانند زمان اجرای آزمایشها و غیره بوده است. به عنوان نمونه، آزمایش یکسال ماندگاری در ازت مایع حدود یکسال بعد از تیمار یک‌هفته انجام شده است. ولی مشاهده شد که سایر صفات مانند طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه یا از نظر آماری تفاوت معنی‌دار برای زمان‌های ذخیره‌سازی نشان نمی‌دهند و یا میزان تفاوت بسیار ناچیز می‌باشد. عدم وجود تغییرات نشان می‌دهد که بذرها زنده مانده بخوبی رشد کرده و تفاوتی بین زمان‌های ذخیره‌سازی وجود ندارد. تأثیر پیش تیمارهای فراسردی (گلیسرول ۳۰٪، PVS2 و Desiccation) بر صفات مورد بررسی در بذره‌های فراسردی نشان داد که بیشترین میانگین صفات مربوط به پیش تیمار Desiccation بود. بنابراین در مقایسه با پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰٪ و PVS2 این پیش تیمار بهترین تأثیر را در حفاظت از بذر در شرایط فراسرد داشته است. تأثیر مثبت Desiccation احتمالاً به دلیل کاهش محتوای آب درون سلولی و کاهش شکل‌گیری کریستال‌های یخ درون سلولی در شرایط فراسرد می‌باشد. از طرفی محافظت کم پیش تیمار گلیسرول ۳۰٪ و به‌ویژه PVS2 از بذر در شرایط فراسرد می‌تواند به دلیل محتوای بیشتر آب درون سلولی (در مقایسه با Desiccation) و یا تأثیر منفی گلیسرول در پیش تیمار گلیسرول ۳۰٪ و یا گلیسرول و سایر مواد شیمیایی موجود در PVS2 باشد. از این‌رو بهترین پیش تیمار برای نگهداری بذر گونه *C lachnopus* در شرایط فراسرد پیش تیمار Desiccation است. بررسی‌های گلخانه‌ای نشان می‌دهد که بذره‌های فراسردی به‌ویژه در تیمار Desiccation یا آبیگری زنده‌مانی خود را به طور ثابت حفظ کرده و زمان ذخیره‌سازی تغییری در درصد استقرار نداشته است. نتایج نشان داد که بذر این

اینکه کریمی (۳) این گونه را با خطر کمتر معرفی کرده است، اما بر اساس بررسی‌های میدانی و پیمایش منطقه، به دلیل گسترش فعالیت‌های معدنی-صنعتی، باید گفت رویشگاه این گونه در معرض نابودی، و موجودیت این گونه به شدت در معرض انقراض می‌باشد. طی بررسی‌های سالانه از عرصه رویشگاهی تا سال ۱۳۸۹ علاوه بر گسترش کارخانه‌های گچ، تپه واقع در شمال شرق سه راهی سرخه به دلیل استخراج سنگ گچ تقریباً این رویشگاه تخریب و از بین رفته بود.

با توجه به مباحث فوق، این گونه یکی از گونه‌های نادر با دامنه اکولوژیک بسیار محدود و رویشگاه آن به دلیل گسترش فعالیت‌های صنعتی-معدنی در حال نابودی می‌باشد. از طرفی به دلیل چرای مفرط عرصه رویشگاهی، بقای گیاه به شدت در معرض خطر انقراض است. با در نظر گرفتن اینکه بذر این گونه قابل نگهداری بلند مدت در شرایط فراسرد می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد در اولین اقدام، بذر این گونه از عرصه رویشگاهی جمع‌آوری و با اعمال پیش‌تیمار مناسب در شرایط فراسرد نگهداری تا در صورت بروز خطر و حذف گونه از طبیعت، بذری برای کشت و استقرار مجدد در گلخانه و عرصه وجود داشته باشد. همچنین توصیه می‌شود در اولین فرصت طرحی در زمینه کشت این گونه در عرصه رویشگاهی و خارج از رویشگاه با هدف تکثیر گیاه و تولید بذر ارائه گردد. از طرفی از هر گونه بهره‌برداری و تصویب طرح‌هایی که منجر به بهره‌برداری از گیاه یا بذر آن از طبیعت باشد باید جداً جلوگیری شود. بعلاوه توصیه می‌شود بخش اجرا به هر نوع ممکن از تخریب عرصه جلوگیری و نسبت به حفاظت این گونه و عرصه‌های رویشگاهی آن اقدام کند.

### سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که اعتبارات مورد نیاز این تحقیق را در قالب طرح مصوب "بررسی امکان نگهداری بذر تعدادی از گونه‌های مرتعی و بیابانی

گونه در شرایط خاک بهتر از شرایط آزمایشگاه جوانه زده و مستقر می‌شود. میزان بالای بذرهای مستقر شده در شرایط گلخانه در مقایسه با شرایط آزمایشگاه می‌تواند به دلیل شرایط ناشناخته اثرگذار بوده باشد و یا شرایط گلخانه برای جوانه‌زنی و استقرار گیاه مناسب‌تر از شرایط آزمایشگاه است. نکته حائز اهمیت اینکه بذرهای فراسردی و شاهد *C.lachnopus* به خوبی توان رشد و استقرار در محیط گلخانه را دارند.

مباحث کلی در رابطه با اهمیت حفظ و حراست از این گونه اندمیک، کمیاب و در حال خطر بصورت زیر قابل ارائه است. گستره پراکنش و دامنه اکولوژیک این گونه بسیار محدود می‌باشد. این گونه منحصراً در خاکهای عمدتاً کم عمقی که بر روی سازندهای گچی قرار دارند رشد می‌کند. استقرار آن در بستر یا مسیر رودهای خشک فصلی یا نقاطی که در آنها تا حدودی آب باران جمع می‌شود و یا در دامنه‌های رو به شمال تپه‌های کوچک این عرصه است. از منظر پراکنش جغرافیایی، در شعاع محدود در بعضی از نقاط استان سمنان رویش دارد. به لحاظ حفاظتی، بر اساس گزارش کریمی (۳) این گونه در طبقه با خطر کمتر (Low Risk= LR) دسته بندی شده است. با توجه به اهمیت گیاه به دلیل در معرض خطر بودن، بررسی‌های مستمر و چند ساله‌ای از روند رویشگاه و حضور این گونه در رویشگاه اصلی آن در شهرستان سمنان، جاده فیروزکوه، سه راه سرخه (حدود ۲۰ کیلومتری سمنان) طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۶ بعمل آمده که شعاع انتشار گیاه در این رویشگاه حدود ۱۵ کیلومتر مربع می‌باشد (شکل ۲). با پیمایش عرصه و بررسی دقیق رویشگاه، ارتفاع رویشگاه از ۱۳۰۰ متر (کمی پائین‌تر از سه راه سرخه) تا ارتفاع ۱۴۵۰ متر (حدود ۳ کیلومتر بالاتر از سه راه سرخه به طرف فیروزکوه) و ۲ کیلومتری شمال شرقی سه راه سرخه (در دامنه رو به شمال تپه ارتفاع حدود ۱۳۷۸ متر) مشخص شد. با بررسی‌های کامل این عرصه، تعداد پایه‌های این گونه در این رویشگاه حدوداً صد پایه تخمین زده شد. با

دکتر مصطفی اسدی به‌دلیل پیشنهاد گیاه برای بررسی تشکر می‌گردد. از آقای حسین نیکچهره به‌علت راهنمایی در تنظیم متن قدردانی می‌شود.

در شرایط فراسرد "تأمین کرد، تشکر می‌گردد. از جناب آقای مهندس طاهری (هرباریوم مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام سمنان) که نسبت به عزیمت و شناسایی رویشگاه گیاه مساعدت کردند و از راهنمایی جناب آقای

## منابع

- ۱- ایرانخشن، ع.، حمدی، م.، اسدی، م.، ۱۳۸۷، معرفی فلور، شکل‌های زیستی و کوروتیپ‌های گیاهان منطقه گرمسار در استان سمنان، پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، شماره ۷۹، ص: ۱۹۹-۱۷۹.
- ۲- بخشی‌خانیک‌ی، غ.، ۱۳۸۶، درختان و درختچه‌های ایران رشته علوم کشاورزی، انتشارات دانشگاه پیام نور.
- ۳- کریمی، ز.، ۱۳۸۸، معرفی فلور شکل‌های زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان مرتع شهرستان دامغان، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم، شماره ۱ پیاپی ۷۱. ویژه‌نامه ۱-الف، ص: ۱۸۶-۲۰۰.
- 4- Abdul-Baki, A.A., and Anderson, J.D. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13: 630-633.
- 5- Avrami, M. 1941. Granulation phase change and microstructure, III. Kinetics of phase change. *Journal of Chemical Physics*, 9: 177-184.
- 6- Bachiri, Y., Song, G.Q., Plessis, P., Shoar-Ghaffari, A., Rekab, T., and Morisset, C. 2001. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp.) germplasm by encapsulation-dehydration: importance of plant growth regulators. *CryoLetters*, 22(1): 61-74.
- 7- Dussert, S., and Engelmann, F. 2006. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. *CryoLetters*, 27(3): 169-178.
- 8- Dussert, S., Englemann, F., and Noirot, M. 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters*, 24: 149-160.
- 9- González-Benito, M.E., Prieto, R.M., Heradón, E., and Martin, C. 2002. Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: *in vitro* culture, desiccation and cooling factors. *CryoLetters*, 23(5): 283-290.
- 10- Hay, F.R., and Muir, J.S.K. 2000. Low temperature survival of Slender Naiad (*Najas flexillis*) seeds. *CryoLetters*, 21: 271-278.
- 11- Matsumoto, T., Sakai, A., and Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant. *Plant Cell Report*, 13:442-446.
- 12- Naderi Shahab M., Hatami, F., Tabari, M., and Jafari, A.A. 2009. Cryopreservation and evaluation of chinese arbor-vitae (*Biota orientalis*) Seeds. *Journal of New Seeds*, 10(4): 264-276.
- 13- Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E.A., Gumusel, F., and Lambardi, M. 2007. Cryopreservation of *Pistacia* spp. seeds by dehydration and one-step freezing. *CryoLetters*, 28(2): 83-94.
- 14- Parsa, A. 1943. Flore l'Iran. vol. III, Carpifoliaceae-vacciniaceae. Publication du Ministere de l'Education: Museum d'Histoire Naturelle de Tehran. Impremerele Mazaheri, Tehran.
- 15- Rechinger, K. H. 1977. Flora Iranica. Akademische Druck-und Verlagsanstalt, Graz, Austria.
- 16- Reed, B.M. 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*, 22(1): 97-104.
- 17- Sakai, A., Kobayashi, S., and Oiyama, I. 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Journal of Plant Physiology*, 137: 465-470.
- 18- Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C., and Vieitez, A.M. 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLetters*, 25: 177-186.
- 19- Walters, C., Wheeler, L.J., and Stanwood, P.C., 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244.
- 20- Wu, Y., Zhao, Y., Engelman, F., Zhou, M., Zhang, D., and Chen, S. 2001. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips. *CryoLetters*, 22(6): 375-380.

## **Cryopreservation of *Centaurea lachnopus* Rech. f. Seeds and Establishment of the Cryopreserved Seeds under Laboratory and Greenhouse Conditions**

**Naderi Shahab M., Jebelli M., Shahmoradi A.A., Ghamari Zare A. and Jafari A. A.**

**Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization ( AREEO), Tehran, I.R. of Iran**

### **Abstract**

*Centaurea lachnopus* Rech. f. is a biennial or perennial range specie which grows in Semnan province located in center of Iran. Narrow geographic range and ecological zone, small population size, and habitat degradation in one of its growing sites put this species under threat. To evaluate the possibility of long-term preservation of *Centaurea lachnopus* seeds, three pre-cryopreservation methods including PVS2, Desiccation, and 30% Glycerol were applied before incubation of the seeds under cryopreservation conditions (-196°C). The treated seeds were incubated in LN for period of 1 week, 1 month, and 1 year. The cryopreserved seeds were removed from liquid nitrogen and evaluated under laboratory and greenhouse conditions. The results showed that seeds of *Centaurea lachnopus* are able to tolerate cryogenic conditions. Effects of the cryopreservation pre-treatments on seed germination at 1 week cryogenic incubation, revealed that 30%Glycerol, Desiccation and PVS2 with 36.67%, 37.67% and 22.67% germination (respectively) were significantly different. Desiccation showed the best effects on survival rate and other attributes of the cryopreserved seeds. The interaction effects between LN incubation periods and pretreatments were significant for some of the attributes. However some of the attributes did not show different means in different incubation periods. In greenhouse conditions, the cryopreserved seeds were germinated better and established more consistently than that of the laboratory conditions. Desiccation pretreatment with 30.00%, 31.67% and 28.33% plantlet establishment in greenhouse conditions for 1 week, 1 month and 1 year cryopreservation periods, showed the best results, compared with the other pretreatments.

**Key words:** *Centaurea lachnopus*, Seed cryopreservation, Range species, Endangered species.