فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان ایران
جلد ۲۲، شماره ۳، صفحه ۵۵۷-۵۴۶ (۱۳۹۴)

نگهداری بذر شبدر کوهسری (*Trifolium radicosum* (Boiss. & Hohen.)) در شرایط فراسرد و بررسی جوانه‌زنی، استقرار و تکثیر آن در شرایط گلخانه

محبّت‌علی نادری شهاب[۱]، مریم جبلّی[۲*]، امرعلی شاهمرادی[۳]، عباس قمری‌زارع[۴] و علی اشرف جعفری[۵]

۱- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد پژوهشی، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: rihan2000ir@yahoo.com
۳- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات مرتع، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۴- دانشیار پژوهشی، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۵- استاد پژوهشی، بخش تحقیقات مرتع، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

چکیده

شبدرکوهسری یا شبدر کوهستان (*Trifolium radicosum*) (Boiss. & Hohen) گونه‌ایست علفی و چند ساله که در اقلیم سرد مدیترانه‌ای البرز میانی رشد می‌کند. استقرار این گونه در عرصه‌های کوهستانی سرد و برف‌گیر، مرتفع و شیب‌دار، باعث حفاظت خاک عرصه مستعد فرسایش شده و از اهمیت منحصر بفرد مرتعی و اکولوژیک برخوردار است. شیب تند رویشگاه، تولید علوفهٔ قابل توجه و شدت چرا باعث شده تا این گونه بشدت در معرض خطر انقراض قرار گیرد. به‌طوری‌که حفظ و نگهداری بذر و دستیابی به روش‌های کشت، تکثیر و استقرار گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است. به‌منظور بررسی امکان نگهداری طولانی‌مدت بذر این گونه که جوانه‌زنی پائینی دارد (۳۵/۶۷٪) از روش نگهداری بذر در شرایط فراسرد (Cryopreservation) یا برودت ۱۹۶°C- استفاده شد. برای نگهداری بذرهای *T. radicosum* در شرایط فراسرد از سه پیش‌تیمار شامل Desiccationn, PVS2 و ۳۰٪Glycerol همراه با شاهد استفاده گردید. بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت یکهفته، یکماه و یکسال در شرایط ۱۹۶°C- (درون ازت مایع) نگهداری شدند. بذرهای پیش‌تیمارهای مختلف، پس از خروج از ازت مایع در شرایط آزمایشگاه و گلخانه جوانه زدند و صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که تفات معنی‌داری بین زمان‌های ماندگاری در شرایط فراسرد وجود ندارد. درصد جوانه‌زنی بذر در پیش‌تیمارهای PVS2، ۳۰٪ Desiccation, Glycerol در یک هفته ماندگاری در ازت مایع به‌ترتیب ۲۳/۶۷، ۲۱/۶۷ و ۲۹/۳۳ درصد بود که تفاوت معنی‌داری بین پیش‌تیمارهای فراسردی نشان داد. تکثیر غیرجنسی این گیاه در این شرایط نشان داد که تکثیر غیرجنسی این گونه از طریق ریشه از جایگاه مهمی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: *Trifolium radicosum*, Seed cryopreservation, Endangered species, Range Plant, شبدر کوهسری، فراسرد.

مقدمه

شبدرکوهسری یا شبدر کوهستان (*Trifolium radicosum* (Boiss. & Hohen Synonyms: *Trifolium guestii* Blakelock; *Trifolium tumens* var. rechingeri Zohary & Heller) گونه‌ای است چند ساله که در اقلیم مدیترانه‌ای سرد و در ارتفاعات ۴۰۰۰-۲۰۰۰ متر در البرز

میانی رشد می‌کند. Rechinger (۱۹۷۷) در فلور ایرانیکا پراکنش این گونه را در ایران در کجور، زیرآب، کندوان، آزاد کوه، دیزین، ارتفاعات شمال تهران، سمنان بطرف ساری، شمال گرگان و چند نقطه دیگر اشاره کرده است. محدوده ارتفاعی رویش این گیاه در فلور ایرانیکا بین ۴۰۰۰-۱۹۵۰ متر از سطح دریا گزارش شده است. قلیچ‌نیا رویشگاه‌های این گونه را در البرز مرکزی دامنه غربی آزادکوه در منطقه بلده و در ارتفاع ۳۶۰۰-۳۳۰۰ متر، کوه سوتک در منطقه دونا ارتفاع ۳۸۰۰ – ۳۰۰۰ متر، کوه نمازگاه در منطقه کجور ارتفاع ۳۲۰۰-۳۰۰۰ متر و چند نقطه دیگر گزارش کرده است. نامبرده pH خاک عرصه‌های رویشگاهی را بین ۷/۹۲-۷/۴۰ و اقلیم آنرا مدیترانه‌ای سرد با متوسط درجه حرارت سالانه ^{o}C ۴-۲ گزارش کرده است. اخیراً Salimpour و همکاران (۲۰۰۸) جمع‌آوری بذر این گونه را از توچال در ارتفاع ۳۷۵۰ و ۳۸۵۰ متر گزارش کرده‌اند.

در مورد منشأ و پراکنش این گونه در دنیا، Noroozi و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی فیتوجغرافیایی ناحیه آلپی کوه‌های ایران گزارش کردند که *T. radicosum* گونه Subendemic منطقه البرز و نقطه انتشار آن در دنیا کوهستان البرز می‌باشد که به‌صورت منفصل (Disjunctly) به شمال شرق عراق و کوهستان Alqurd Dag و شرق و مرکز آناتولی ترکیه پراکنش یافته است.

این گونه در ارتفاعات با شیب ۶۰-۵ درصد و اغلب در دامنه‌های رو به شمال و برف‌گیر مشاهده می‌گردد. میزان بارندگی در رویشگاه‌های این گونه در ارتفاعات میانی البرز حدود ۵۰۰-۴۰۰ میلی‌متر و اغلب بصورت برف می‌باشد. Nazarian و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی فیتوسوسیولوژی و اثر فاکتورهای اکولوژیک در پوشش گیاهی حوزه آبخیز دونا و ایلکا در البرز مرکزی اعلام کردند که گونه *T. radicosum* در خاک با بافت لومی-رسی ماسه‌ای و EC بین ۰/۶۵-۰/۶۱ µs/m رویش دارد. Salimpour و همکاران (۲۰۰۷) برای شناسایی *T. rodicosum* و ۶ گونه دیگر از شبدرهای ایران از مورفولوژی بذر برای شناسایی استفاده کردند؛ بر اساس این گزارش بین بذر گونه‌ها تفاوت مرفولوژیک وجود داشت.

ذخیره‌سازی در دمای فراسرد (Cryopreservation) امکان نگهداری طولانی‌مدت بذرها و اندام‌های گیاهی را امکان‌پذیر کرده است. تکنولوژی ذخیره‌سازی ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای فراسرد، اولین بار در دهه ۱۹۷۰ شروع و در دهه ۱۹۸۰ توسعه یافت و مطالعات زیادی در زمینه نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای فرا سرد انجام شده است. این فناوری در اواخر قرن گذشته وارد فاز عملی گردید و در اغلب موارد موفقیت‌های چشمگیری برای حفظ ذخائر توارثی فراهم کرده است. تحقیقات انجام شده بر روی اندام‌های مختلف گیاه نشان داده است که بذر و اندام‌های گیاه مانند قطعات مریستمی، جوانه انتهایی، جوانه‌های جانبی، محور جنینی و دانه گرده در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی به این روش نگهداری، پاسخ مناسبی ارائه می‌دهند.

نگهداری بافت‌ها و اندام‌های رویشی گیاهانی که تکثیر آنها منحصراً از طریق اندام‌های رویشی است، تنها با کاربرد تکنولوژی فراسرد امکان‌پذیر می‌باشد و استفاده از این تکنولوژی افقی پایدار و مطمئن را در حفظ و نگهداری این گیاهان پدید آورده است. بگونه‌ای که این تکنولوژی در حال فراگیر شدن در کشورهای پیشرفته و انتقال دانش فنی آن به آزمایشگاه‌های نگهداری ذخائر ژنتیکی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (Reed *et al.*, 2004).

دامنه گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی از قبیل درختی، درختچه‌ای، علفی، یکساله و چندساله با بکارگیری روش‌ها و پیش تیمارهای مختلف، در شرایط فراسرد نگهداری و دستاوردهای بسیار مهمی برای حفاظت بلندمدت این نوع گیاهان بدست آمده است (Leunufna & Keller, 2005; Sherlock *et al.*, 2005; Clavero– Ramirez *et al.*, 2005; Sanayaima *et al.*, 2006; Towill *et al.*, 2006; Mandal & Dixit – Sharma, 2007).

به دلیل خطراتی که شبدرکوهسری یا شبدر کوهستان (*T. radicosum*) و رویشگاه آنرا تهدید می‌کند، این گونه در

ایران به‌عنوان گونه در معرض خطر (Jalili & Jamzad, 1999) گزارش شده و مراقبت از این گونه ارزشمند از جایگاه بالایی برخوردار است. تاکنون تحقیقی در مورد ذخیره‌سازی بذر این گونه بومی، ارزشمند و در معرض خطر در ایران و سایر کشورها انجام نشده است. همچنین در مورد کشت، تکثیر و استقرار این گونه از طریق بذر یا کلون که مهمترین کار برای حفظ و حراست این گونه است، کمتر توجه شده است. اغلب گزارش‌ها در مورد شناسایی و پراکنش *T. radicosum* بوده و در پاره‌ای از موارد اکولوژی این گونه بررسی شده است. در این تحقیق ضمن بررسی نحوه نگهداری بذر در شرایط فراسرد به نحوه تکثیر آن در شرایط گلخانه و از طریق رویشی نیز پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

محل جمع‌آوری بذر: بذر این گونه از جاده کرج – چالوس، پل زنگوله، جاده بلده، منطقه دونا بالاتر از روستاهای ایلکا و کلاونگاه حوالی معدن سرب رنگه وجان، ارتفاع ۳۲۰۰ متر جمع‌آوری گردید.

زمان جمع‌آوری بذر: باید توجه داشت که بذرهای این گونه به‌طور همزمان نمی‌رسند و از اولین مرحله رسیدگی تا آخرین مرحله رسیدگی و خشک‌شدن گلها حدود یک ماه فاصله زمانی وجود دارد. آغاز خشک‌شدن گلها اوایل شهریور و آخرین مرحله رسیدگی گلها اوایل مهرماه می‌باشد. از این‌رو جمع‌آوری بذر در دو مرحله به‌ترتیب ۸۶/۵/۸ و ۸۶/۵/۲۸ انجام شد. در سال ۸۷ به دلیل شرایط گرم و خشک، جمع‌آوری‌ها چند هفته زودتر انجام شد. قابل توجه اینکه وزن هزار دانه بذر این گونه ۱/۹۰ گرم بود.

بررسی جوانه‌زنی بذرها: قبل از انجام آزمایش‌های فراسرد، آزمایش‌های مقدماتی برای دستیابی به بهترین روش جوانه‌زنی، سبزکردن و استقرار بذر انجام شد. تیمارهای فیزیکی بذر از قبیل خراش‌دهی و تیمارهای دمایی ۲۰+ و ۴+ و ۲۰– درجه سانتی‌گراد بکار گرفته شد. براساس آزمایش‌های مقدماتی بهترین روش جوانه‌زنی و سبزکردن بذر *T. radicosum* بشرح زیر می‌باشد:

۱– حذف بذرهای نارس (که تعداد آنها قابل توجه می‌باشد)، بذرهای فاسد و آلودگی‌های فیزیکی.

۲– انتقال بذرها به داخل لوله‌های آزمایش درب‌دار، اضافه نمودن آب و شستشو همراه با تکان دادن لوله‌ها و بعد تخلیه آب (این مرحله ۲ بار تکرار گردید).

۳– در شرایط استریل (داخل هود لامینار ایرفلو) به لوله‌های آزمایش حاوی بذر، محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

۴– محلول هیپوکلریت سدیم تخلیه و بذرها ۳ بار با آب مقطرِ استریل شستشو شدند.

۵– بذرها به میان کاغذ مرطوب استریل که درون پتری‌دیش قرار داشتند، منتقل شدند.

۶– پتری‌ها به ژرمیناتور با دمای ۲۰°C+ با شدت نور ۱۰ وات بر مترمربع و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) منتقل شدند.

آزمایش نگهداری بذر در شرایط فراسرد (Cryopreservation):

پیش‌تیمارهای فراسرد، یا تیمارهای قبل از ورود بذرها به ازت مایع بشرح زیر می‌باشد:

PVS2 (Plant Vitrification Solution 2): به لوله‌های آزمایش درب‌دار ۱۵ میلی لیتری حاوی بذر، محلول Loading شامل: ۰/۴ مول ساکاروز و ۲ مول گلیسرول (Matsumoto *et al.*,1994) اضافه و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول Loading کاملاً تخلیه و به لوله‌های آزمایش حاوی بذر محلول PVS2 (۴°C+) شامل: ۱۵٪ اتیلن گلیکول (w/v)، ۱۵٪ DMSO (w/v)، ۳۰٪ گلیسرول (w/v) و ۰/۴ مول ساکاروز (Sakai *et al.*,1991) اضافه، درب آنها را بسته و بمدت ۲۰ دقیقه در آب ۴°C+ قرار داده شدند. بعد از این مدت لوله‌های آزمایش حاوی بذر بلافاصله وارد ازت مایع گردیدند.

Desiccation یا آبگیری: آزمایش‌های مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوب بذر، بدون وارد آمدن صدمه به جوانه‌زنی آن انجام شد تا حداقل رطوبت بذر بدست آید.

به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌عنوان وزن اولیه بذر (FW) یادداشت گردید. سپس بذرها بمدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵°C قرار داده شدند. بذرها از آون خارج و بلافاصله با ترازوی حساس توزین و وزن خشک بذر بدست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

Total Seed Moisture Content (%)=(FW-DW)/DW*100

با استفاده از روش فوق درصد رطوبت کل بذر ۵/۳۴٪ تعیین گردید. به‌منظور تهیه بذر مورد نیاز تیمار Desiccation، مقدار ۵۰ گرم بذر تازه، توزین و به دسیکاتور حاوی ۵۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و بمدت ۷ روز در سردخانه با دمای ۴°C+ نگهداری شد. بذرها از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین و درصد رطوبت بذر پس از کاهش رطوبت در دسیکاتور با استفاده از فرمول فوق محاسبه گردید. با در دست داشتن رطوبت کل بذر و مقدار رطوبت بذر پس از خروج از دسیکاتور (۴/۰۵٪)، درصد کاهش رطوبت بذر نسبت به رطوبت کل بذر محاسبه گردید که این کاهش برابر ۲۶/۴ درصد رطوبت کل بذر بود. بذرهای رطوبت‌گیری شده به داخل لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری منفذدار منتقل، درب آنها بسته و وارد ازت مایع شدند.

۳۰٪ Glycerol: به لوله‌های آزمایش درب‌دار ۲۵ میلی‌لیتری حاوی بذر، گلیسرول ۳۰٪ اضافه، درب آنها را بسته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲°C+ قرار داده شدند. پس از آن لوله‌های آزمایش حاوی بذر وارد ازت مایع گردیدند.

مدت زمان نگهداری بذرها در ازت مایع: بذرها بمدت یک هفته، یکماه و یکسال در داخل ازت مایع نگهداری شدند.

بذرهای شاهد: سه نمونه بذر به‌عنوان بذرهای شاهد برای استفاده در آزمایشهای یک هفته، یک‌ماه و یکسال در ۴°C+ نگهداری و به‌عنوان شاهد از آنها استفاده شد.

تیمارهای پس از خروج بذرها از ازت مایع: به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، بذرها پس از خروج از ازت مایع بمدت ۲ دقیقه در آب ۴۲°C+ قرار داده شدند. بذرها از آب گرم خارج و بمدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکاروز استریل ۱/۵ مول قرار داده شدند. سپس بذرها ۳ بار با آب مقطر شستشو و بین کاغذ مرطوب استریل قرار داده شدند. پتریهای حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای ۲۰°C+ با شدت نور ۱۰ وات بر مترمربع با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/روشنایی) منتقل گردیدند.

طرح آزمایشی: طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش‌تیمارهای فراسرد (PVS2، Desiccation، ۳۰٪Glycerol و شاهد) و مدت زمان ذخیره‌سازی در ازت مایع با بکارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها هریک با ۵۰ بذر واحدهای آزمایشی در این آزمایش بودند. صفات مورد بررسی و اندازه‌گیری در این آزمایش طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاه‌چه، درصد جوانه‌زنی شاخص بنیه بذر (VI)، سرعت جوانه‌زنی و نسبت طول ریشه‌چه بر طول ساقه‌چه (R/S) بودند. شاخص بنیه بذر با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Abdul – Baki and Anderson (۱۹۷۳) محاسبه گردید. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای: بذرهای تیمارهای مختلف فراسرد پس از خروج از ازت مایع و اعمال شوک حرارتی همراه با بذرهای شاهد در داخل گلدان حاوی ۱/۳ خاک، ۱/۳ پیت‌ماس و ۱/۳ ماسه کشت و درصد استقرار بذرها در گلدان اندازه‌گیری گردید. طرح آزمایشی فاکتوریل با همان تعداد تکرار، پیش‌تیمارها و مدت زمان ذخیره‌سازی در ازت مایع بکار گرفته شد. تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد.

تکثیر رویشی و استقرار گیاه در گلخانه: این آزمایش‌ها بشرح زیر انجام شد:

۱- اوایل آبان‌ماه، گیاه کاملاً رشد کرده و شامل ریشه و ساقه از رویشگاه گیاه از منطقه رنگه‌وجان برداشت شد و بدون تأخیر به آزمایشگاه منتقل گردید.

۲- قلمه‌های ساقه به طول ۴-۷ سانتی‌متر از یقه بریده

شد. در انتهای ساقه یک دمبرگ با ۳ برگچه نگهداری و بقیه دمبرگ‌ها و برگچه‌ها حذف شدند.

۳- قلمه ریشه شامل ریشه‌ای بطول ۱۰- ۳ سانتی‌متر همراه با ۱-۲ سانتی‌متر ساقه تهیه شد. بر روی ساقه یک دمبرگ با ۳ برگچه نگهداری و بقیه ساقه و برگ‌ها حذف شدند.

۴- گلدان‌ها با نسبت $\frac{1}{3}$ خاک، $\frac{1}{3}$ پیت‌ماس و $\frac{1}{3}$ ماسه پر شدند.

۵- قلمه‌های ریشه تا یقه و قلمه‌های ساقه حدود ۳-۴ سانتی‌متر در خاک فروبرده شدند (در هر گلدان ۴-۳ قلمه).

۶- گلدان‌ها هر ۴-۳ روز یکبار آبیاری گردیدند.

آزمایش‌های بذرهای فراسرد در آزمایشگاه: اثر تیمارهای مدت زمان نگهداری بذرها در ازت مایع شامل یک هفته، یک ماه و یک‌سال ذخیره‌سازی بذر *T. radicosum* در ازت مایع بر میانگین صفات مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین کل جوانه‌زنی بذر برای یک هفته، یک ماه و یکسال ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع به‌ترتیب ۲۷/۵۸٪، ۲۸/۰۸٪ و ۲۷٪ و از نظر آماری تفاوتی بین آنها وجود ندارد. ولی میانگین کل طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و طول گیاهچه و بنیه بذر در تیمار یکسال ذخیره‌سازی از نظر آماری کاهش نشان می‌دهد. با اینکه میانگین صفات یادشده در یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در ازت مایع با یکسال تفاوت دارد اما این تفاوت چشمگیر نیست.

نتایج

جدول ۱- اثر زمان‌های نگهداری بذر *T. radicosum* در ازت مایع بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و طول ریشه‌چه/ساقه‌چه (R/S)

زمان‌های نگهداری بذر	جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (mm)	طول ساقه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر (VI)	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه R/S
یک‌هفته	۲۷/۵۸ a*	۱/۴۶ a	۱/۹۴ a	۳/۴۰ a	۶/۸۸ a	۰/۹۷ a	۰/۷۵ a
یک‌ماه	۲۸/۰۸ a	۱/۳۹ a	۱/۸۵ a	۳/۲۴ a	۷/۱۲ a	۰/۹۴ a	۰/۷۶ a
یکسال	۲۷ a	۱/۲۵ b	۱/۷۰ b	۲/۹۵ b	۶/۸۱ a	۰/۸۲ b	۰/۷۴ a

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

اثر پیش‌تیمارهای قبل از ورود بذر به ازت مایع شامل PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و Desiccation یا کاهش رطوبت بذر بر میانگین کل صفات همراه با بذرهای شاهد در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین میانگین صفات مربوط به تیمار شاهد است و پس از آن تیمار Desiccation بیشترین میانگین را در بین تیمارهای فراسردی نشان می‌دهد. در این تیمار میانگین کل صفات مختلف کمتر دست‌خوش کاهش شده‌اند. پس از آن تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و PVS2 به‌ترتیب کمترین میانگین را در بین صفات مورد بررسی نشان می‌دهند.

جدول ۲- اثر پیش‌تیمارهای قبل از ورود بذر *T. radicosum* به ازت مایع بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و طول ریشه‌چه/ ساقه‌چه (R/S)

تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (mm)	طول ساقه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر (VI)	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه R/S
شاهد	۳۵/۱۱ a*	۱/۷۷ a	۲/۲۸ a	۴/۰۶ a	۸/۴۶ a	۱/۴۳ a	۰/۷۸ a
گلیسرول ۳۰	۲۴ c	۱/۱۸ c	۱/۶۷ c	۲/۸۵ c	۶/۳۴ c	۰/۶۸ c	۰/۷۱ b
Desiccation	۲۸ b	۱/۳۸ b	۱/۹۱ b	۳/۲۸ b	۷/۰۷b	۰/۹۲ b	۰/۷۲ ab

PVS2	۲۳/۱۱ c	۱/۱۴ c	۱/۴۶ d	۲/۶۰ d	۵/۸۷ c	۰/۶۰ c	۰/۷۸ a

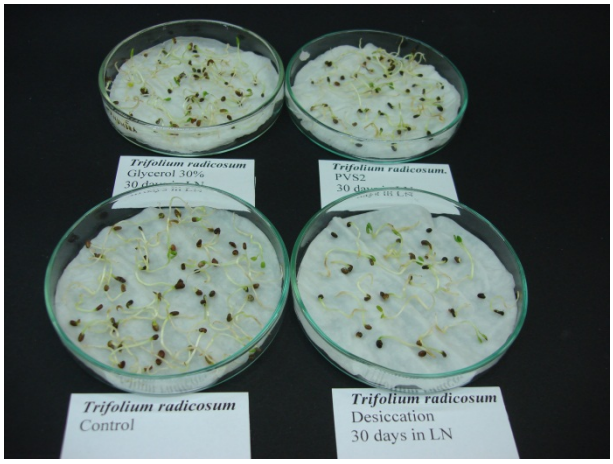
*–در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

اثر متقابل پیش‌تیمارهای فراسردی شامل Desiccation، PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد همراه شاهد و زمان‌های یک هفته، یک ماه و یکسال ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع بر میانگین صفات مختلف در جدول ۳ به تفصیل ارائه شده است. براساس داده‌های این جدول، جوانه‌زنی بذرهای شاهد (جدول ۱ تیمار یک هفته بذرهای شاهد در تیمار) در تیمارهای یک هفته، یک ماه و یکسال (بذرهای شاهد در تیمار یکسال) به‌ترتیب ۳۵/۶۷٪، ۳۵/۳۳٪ و ۳۴/۳۳٪ می‌باشد که از نظر آماری تفاوتی با یکدیگر ندارند. داده‌ها نشان می‌دهند که حداکثر جوانه‌زنی بذر این گونه در شرایط ایده‌آل تنها ۳۵/۶۷٪ بوده و قسمت عمده بذرها به دلایل مختلف قادر به جوانه‌زنی نمی‌باشند. همچنین جوانه‌زنی بذر این گونه در طی یکسال ماندگاری در شرایط معمولی کاهش نشان نمی‌دهد. اما شاخص بنیه بذر تیمار شاهد (VI)، پس از یکسال ماندگاری در شرایط معمولی اندکی کاهش یافته و از ۱/۶ در هفته اول به ۱/۴۷ پس از یک ماه (بدون تفاوت آماری) و ۱/۲۱ پس از یکسال ماندگاری رسیده که نشان می‌دهد شاخص بنیه بذر پس از یکسال از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یک‌هفته و یک ماه نشان می‌دهد. طول ساقه‌چه بر طول ریشه‌چه و سرعت جوانه‌زنی بذر شاهد، طی یکسال کاهشی نشان نمی‌دهند. در سایر صفات ازجمله طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و طول گیاهچه تغییر ناچیزی در تیمار یکسال مشاهده می‌شود که بیانگر حساسیت این صفت به زمان ماندگاری می‌باشد. میانگین سایر صفات نیز پس از خروج از شرایط فراسرد با اینکه در اغلب موارد در مقایسه با شاهد مقدار کمتری را نشان می‌دهند که حکایت از اثر منفی شرایط فراسرد بر این صفات دارد.

جدول ۳– اثر پیش‌تیمارهای مختلف و زمان‌های نگهداری بذر *T. radicosum* در ازت مایع بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و طول ریشه‌چه/ساقه‌چه (R/S)

زمان نگهداری بذر	تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (mm)	طول ساقه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر (VI)	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه (R/S)
یک‌هفته	شاهد	۳۵/۶۷ a*	۱/۹۵ a	۲/۵ a	۴/۴۷a	۸/۳۱ ab	۱/۶۰ a	۰/۷۸ ab
	گلیسرول ۳۰٪	۲۱/۶۷ d	۱/۲۳ def	۱/۷۳ de	۲/۹۷ def	۵/۴۰ e	۰/۶۴ e	۰/۷۱ b
	Desiccation	۲۹/۳۳ b	۱/۴۳ bc	۲/۰۳ b	۳/۴۷ bc	۷/۵۳ abc	۱/۰۱ c	۰/۷۰ b
	PVS2	۲۳/۶۷ cd	۱/۲۲ def	۱/۴۸ fg	۲/۷۰ gf	۶/۲۶ de	۰/۶۴ e	۰/۸۲ a
یک‌ماه	شاهد	۲۵/۳۳ a	۱/۸۳ a	۲/۳۳ a	۴/۱۷ a	۸/۵۰ a	۱/۴۷ a	۰/۷۹ ab
	گلیسرول ۳۰٪	۲۶/۳۳ bcd	۱/۲۰ def	۱/۶۸ def	۲/۸۸ ef	۷/۱۹ bcd	۰/۷۶ de	۰/۷۲ ab
	Desiccation	۲۸/۳۳ bc	۱/۳۸ bcd	۱/۸۸ bcd	۳/۲۷ bcd	۷/۰۷ cd	۰/۹۲ cd	۰/۷۴ ab
	PVS2	۲۲/۳۳ d	۱/۱۵ ef	۱/۴۸ fg	۲/۶۳ gf	۵/۷۱e	۰/۵۹ e	۰/۷۸ ab
یکساله	شاهد	۳۴/۳۳ a	۱/۵۳ b	۲/۰۰ bc	۳/۵۳ b	۸/۵۷ a	۱/۲۱ b	۰/۷۷ ab
	گلیسرول ۳۰٪	۲۴/۰۰ cd	۱/۱۲ f	۱/۵۸efg	۲/۷۰ gf	۶/۴۲ cde	۰/۶۵ e	۰/۷۱ ab
	Desiccation	۲۴/۳۳ bcd	۱/۳۲ cde	۱/۸۰ cde	۳/۱۲ cde	۶/۶۳ cde	۰/۸۲ d	۰/۷۳ ab
	PVS2	۲۳/۳۳ cd	۱/۰۵ f	۱/۴۲ g	۲/۴۷ g	۵/۶۴ e	۰/۵۸ e	۰/۷۴ ab

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



شکل ۱- جوانه‌زنی بذر شبدر کوهسری (*T. radicosum*) در تیمارهای مختلف

آزمایش‌های بذرهای فراسردی در گلخانه: این آزمون‌ها به‌منظور بررسی نتایج آزمایش‌های فراسرد در شرایط خارج از محیط کنترل‌شده آزمایشگاهی و درون خاک که به طبیعت نزدیک‌تر است، انجام شد. اثر پیش‌تیمارهای مختلف و زمان‌های نگهداری بذر در ازت مایع بر استقرار و رشد گیاهچه در گلخانه در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و زمان‌های نگهداری بذر *T. radicosum* در ازت مایع بر استقرار اولیه بذر در شرایط گلخانه

زمان نگهداری	پیش‌تیمارهای فراسرد	ماندگاری
یک‌هفته	شاهد	۲۰ a*
	گلیسرول ۳۰٪	۱۳/۶۷ b
	Desiccation	۱۳/۶۷ b
	PVS2	۱۳ b
یک‌ماه	شاهد	۱۹/۳۳ a
	گلیسرول ۳۰٪	۱۳/۶۷ b
	Desiccation	۱۵/۶۷ ab
	PVS2	۱۴ b
یکسال	شاهد	۱۹/۶۷ a
	گلیسرول ۳۰٪	۱۲/۳۳ b
	Desiccation	۱۵ ab
	PVS2	۱۳/۳۳ b

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

در اینجا نیز بذر شاهد با ۲۰/۰۰٪، ۱۹/۳۳٪ و ۱۹/۶۷٪ بیشترین درصد استقرار را در یک هفته، یک ماه و یکسال داشته است که به‌طور معنی‌داری بیشتر از میانگین بذرهای فراسردی می‌باشد.

درصد استقرار بذرهای ذخیره شده در ازت مایع که با پیش‌تیمارهای مختلف تیمار شده‌اند و طی زمان‌های مختلف در ازت مایع نگهداری گردیده‌اند تفاوت قابل توجهی نشان نمی‌دهند. به‌طوری‌که بیشترین درصد استقرار مربوط به تیمار Desiccation یا آبگیری در یکماه ذخیره سازی در ازت مایع با ۱۵/۶۷٪ می‌باشد.

شکل ۲- استقرار بذر و گیاهچه‌های ***Trifolium radicosum*** بعد از یکسال ماندگاری در ازت مایع، در شرایط گلخانه

تکثیر غیرجنسی گیاه در شرایط گلخانه

به‌منظور حفظ و حراست از این گیاه (صرف‌نظر از مباحث فراسرد)، یافتن روش مناسب برای تکثیر و تولید گیاه کامل بسیار مهم می‌باشد. با توجه به مشکلات فراروی تولید گیاه کامل از طریق بذر، با انجام آزمایش‌های گسترده، بهترین روش تکثیر گیاه از طریق غیرجنسی یا کلون بدست آمد که روش کار در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد. قلمه‌های ساقه تا حدود ۳-۴ هفته بعد از کشت شروع به رشد کردند، اما پس از سپری شدن این مدت شروع به پژمردگی نموده و خشک شدند.

شکل ۳- تکثیر گیاه ***T. radicosum*** از طریق کلون ریشه در شرایط گلخانه

تکثیر گیاه از طریق قلمه ریشه بسیار موفقیت‌آمیز بود و بیشتر قلمه‌ها بخوبی رشد کرده و ریشه و ساقه سالم، طبیعی و فراوانی تولید کردند (شکل ۳).

بحث

بررسی بذرهای فراسرد در محیط آزمایشگاه: در رابطه با اثر پیش‌تیمارهای ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع بر میانگین صفات مختلف که در جدول ۳ ارائه شده، بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به پیش‌تیمار Desiccation در یک هفته، یک ماه و یک‌سال ذخیره سازی بذر در ازت مایع بود که به‌ترتیب ۲۹/۳۳٪، ۲۸/۳۳٪ و ۲۶/۳۳٪ می‌باشد، و تفاوت جزئی بین یک هفته، یک ماه و یکسال مشاهده می‌شود (شکل ۱). اما از نظر آماری میانگین‌ها در دامنه مشترک قرار دارند. پس از پیش‌تیمار Desiccation، پیش‌تیمارهای Glycerol ۳۰ درصد و PVS2 قرار دارند. بقیه صفات هم تقریباً روندی مشابه با درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذر دارند.

نتایج مربوط به نگهداری بذرها در فراسرد که با پیش‌تیمارهای مختلف تیمار شده‌اند، نشان می‌دهد که بذر گونه *T. radicosum* قابل نگهداری بلندمدت در ازت مایع می‌باشد. از طرفی پیش‌تیمار Desiccation یا کاهش رطوبت بذر نتیجه بهتری نسبت به پیش‌تیمارهای PVS2 و Glycerol ۳۰ درصد نشان می‌دهد، از این‌رو مناسب‌ترین پیش‌تیمار برای نگهداری بذر این گونه در شرایط فراسرد، پیش‌تیمار Desiccation یا کاهش رطوبت بذر قبل از ذخیره‌سازی در فراسرد است. البته تأثیر مثبت کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع، در احیاء و زنده‌مانی آنها پس از خروج از ازت مایع توسط دیگران نیز گزارش شده است (Cho *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2001). تأثیر مثبت این پیش‌تیمار بدلیل کاهش محتوای آب بذر و در نتیجه کاهش تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی می‌باشد. ذخیره‌سازی بذر در فراسرد، تنها گزینه برای نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم ذخایر توارثی در حال خطر می‌باشد. زیرا در شرایط فراسرد یا C °۱۹۶-، بدلیل کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی، مدت زمان زنده‌مانی بذر تا چند هزار سال افزایش می‌یابد. در رابطه با مدت زمان زنده‌مانی بذر در شرایط C°۱۹۶-، Walters و همکاران (۲۰۰۴) مدت زمان زنده‌مانی بذر کاهو را ۳۴۰۰ سال محاسبه کردند. از طرفی شرایط فراسرد هیچ‌گونه اثر سوئی در بذر و گیاهان رشد کرده از بذرهای فراسردی ندارد (Naderi Shahab *et al.*, 2009).

بررسی بذرهای فراسرد در گلخانه: میانگین‌های مربوط به تیمارهای شاهد و پیش‌تیمارهای ذخیره سازی در ازت مایع نشان می‌دهند که درصد استقرار بذر این گونه در بهترین شرایط برای بذر شاهد ۲۰/۰۰٪ و در حالت ذخیره‌سازی در ازت مایع ۱۵/۶۷٪ در پیش‌تیمار Desiccation می‌باشد. این داده‌ها حکایت از استقرار کم این گونه در شرایط گلخانه دارد (شکل ۲). بدیهی است در عرصه‌های طبیعی بدلیل شرایط سخت و استرس‌های زنده و غیر زنده، درصد استقرار بسیار کمتر خواهد بود.

قابل توجه اینکه با بکارگیری روش‌های مختلف مراقبتی و اعمال روش‌های کشت و نگهداری متعدد، که با صرف وقت و زمان زیادی همراه بود، استقرار و تولید گیاه کامل از بذر بسیار مشکل و با دستاورد بسیار ناچیز و یا عدم موفقیت همراه بود. با توجه به اینکه امکان تولید گیاه از بذر مشکل می‌باشد می‌توان از روش‌های دیگری برای حفظ بلندمدت این گونه در شرایط فراسرد نیز استفاده کرد. زیرا در صورتی‌که امکان رویش گیاه از بذر مشکل باشد و یا نگهداری بذر در شرایط متعارف امکان‌پذیر نباشد (بذرهای ریکالسیترنت) می‌توان با استفاده از اندام‌های رویشی مانند مریستم انتهایی، جنین‌های زایگوتی، محورهای جنینی، جوانه‌های جانبی و انتهایی برای نگهداری بلندمدت استفاده کرد (Caswell & Kartha, 2009; Walters *et al.*, 2002; Sanayaima *et al.*, 2006; Clavero-Ramirez *et al.*,2005; González-Arnao & Engelmann, 2006). از این‌رو پیشنهاد می‌گردد با استفاده توأمان از دانش کشت بافت و روش‌های فراسرد، نسبت به بررسی امکان نگهداری اندام یا اندام‌های رویشی این گونه در شرایط فراسرد بررسی تا علاوه بر بذر امکان نگهداری اندام رویشی در فراسرد نیز فراهم گردد.

تکثیر غیرجنسی گیاه در گلخانه: همان‌گونه که در بخش نتایج توضیح داده شد قلمه‌های ساقه حدود ۳-۴ هفته پس

از کشت پژمرده و خشک شدند. در بررسی که از قلمه‌های خشک شده بدست آمد مشخص گردید که در هیچ‌یک از این قلمه‌ها ریشه تشکیل نشده است. به‌طوری‌که عدم تشکیل ریشه باعث عدم توان جذب مواد غذایی از محیط خاک و مرگ گیاه شده است. درنتیجه اینکه استفاده از قلمه ساقه برای تکثیر گیاه موفقیت‌آمیز نمی‌باشد.

بر اساس نتایج این آزمایش، بهترین روش تکثیر این گیاه بسیار ارزشمند و در حال خطر که بشدت نیاز به حفظ و حراست دارد، تکثیر از طریق قلمه ریشه می‌باشد. بر اساس نتایج بدست آمده از تکثیر غیرجنسی، تکثیر انبوه گیاه از طریق قلمه ریشه راهکار اجرایی بسیار مطمئن و سریع برای تکثیر این گیاه در خارج از عرصه رویشگاهی می‌باشد. از این‌رو برای احیاء عرصه‌های در معرض تهدید و یا عرصه‌هایی که در اثر فشار چرا باعث حذف گونه و جایگزینی آن با گونه‌های دیگر شده می‌توان گونه را با بکارگیری روش فوق در خاج از عرصه تکثیر و در عرصه رویشگاهی آن کشت و مراقبت کرد.

شرایط شکننده رویشگاه و لزوم حفاظت از گیاه و عرصه رویشگاهی

در رابطه با رویشگاه طبیعی گیاه، بدلیل بارش برف سنگین و وجود سرما، آغاز رشد رویشی گیاه در منطقه دونا، از حدود اردیبهشت‌ماه شروع و زمان ظهور گل‌ها اواسط تیرماه می‌باشد. رسیدگی گلها به‌طور غیرهمزمان بوده و مدت زمان گلدهی نسبتاً طولانی است. به‌طوری‌که در اواسط مرحله گلدهی غنچه‌های در حال باز شدن و گل‌های رسیده و خشک‌شده قابل مشاهده می‌باشند. در بررسی گل‌های خشک جمع‌آوری شده مشخص گردید که بیشتر گل‌ها عقیم و فاقد بذر هستند. ساقه اغلب بصورت خوابیده (prostrate) و ارتفاع آن تا ۴۰ سانتی‌متر هم می‌رسد. تکثیر گیاه در شرایط طبیعی اغلب تکثیر از طریق استولون بوده و ریشه‌ها بسیار متراکم، بهم تنیده و فشرده می‌باشند. البته تراکم پوشش این گیاه در بعضی از عرصه‌های رویشگاهی تخریب‌نیافته مانند رنگه وجان تا ۱۰۰ درصد هم مشاهده شد.

استقرار این گونه در عرصه‌های شیب‌دار، مرتفع و برف‌گیر، باعث حفاظت خاک این نوع اراضی ناپایدار شده، و این گیاه از اهمیت منحصر به‌فرد اکولوژیک برخوردار می‌باشد. شرایط خاص اکولوژیک و محدود بودن دامنه اکولوژیک این گیاه، محدودیت در پراکنش این گونه را موجب شده است.

شیب زیاد عرصه‌های رویشگاهی، ماندگاری طولانی‌مدت برف در بهار، خوشخوراکی گونه و تولید علوفه در طول فصل رویش باعث شده که گیاه بشدت مورد چرای دام قرار گیرد. چرای مفرط زمینه را برای تخریب پوشش گیاهی و متعاقب آن فرسایش شدید و ناگهانی خاک و رانش عرصه‌های رویشگاهی پرشیب گیاه فراهم کرده است. علاوه‌برآن، احداث جاده، استخراج معدن و تأسیسات موجب اعمال برنامه‌های حفاظتی و جلوگیری از تخریب عرصه و پوشش گیاهی آن، استقرار مجدد گیاه و احیاء عرصه‌های فراوری سرب در قلب رویشگاه این گونه در رنگه‌وجان و باعث تخریب قابل توجه رویشگاه شده است.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که اعتبارات مورد نیاز این تحقیق را که در قالب طرح مصوب "بررسی امکان نگهداری بذر تعدادی از گونه‌های مرتعی و بیابانی در شرایط فراسرد" تأمین کردند، تشکر می‌گردد. از جناب آقای دکتر قلیج‌نیا (مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام مازندران) که نسبت به شناسایی و عزیمت به رویشگاه در رنگه‌وجان مساعدت کردند، تشکّر بعمل می‌آید. از جناب آقای حسین نیکچهره (مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور) به دلیل راهنمایی در تنظیم متن تشکّر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abdul-Baki, A., A. and Anderson, J. D., 1973.Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. Crop Science,13**:** 630-633.
- Caswell, K. L. and Kartha, K. K., 2009. Recovery of

Tehran, Iran.
- Rechinger, K. H., 1977. Flora Iranica. Academiche Druck-und Verlagsanstalt, Graz, Austria.
- Reed, B. M., Kovalchuk, I., Kushnarenko, S., Meier-Dinkel, A., Schoenweiss, K., Pluta, S., Straczynska, K. and Benson, E. E., 2004. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. CryoLetters, 25: 341-352.
Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I., 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (Citrussinensisosb.Var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to –196C. Journal of Plant Physiology, 137: 465-470.
-Salimpour, F., Sharifnia, F., Mostafavi, G., Hajrasoliha, S. and Ukhneh, E., 2008. Chromosome counts and determination of ploid levels in Iranian species of *Trifolium*. Chromosome Botany, 3: 53-63.
-Salimpour, F., Mostafavi, G. and Sharifnia, F., 2007. Micromorphologic study of the seed of the genus *Trifolium*, section *Lotoidea*, in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (3): 378-382.
-Sanayaima, R. K., Kaur, A., Agrawal, A. and Babbar, S. B., 2006. Cryopreservation of *in vitro*–grown shoot tips of *Cratevanurvala*Buch. Ham, an important medicinal tree. CryoLetters, 27(6): 375 – 386.
- Sherlock, G., Block, W. and Benson, E. E., 2005. Thermal analysis of the plant encapsulation–dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant.CryoLetters 26 (1): 45 – 54.
- Stewart, P., Taylor, M. and Mycock, D., 2001. The sequence of the preparative procedures affects the success of cryostorage of cassava somatic embryos. CryoLetters, 22(1): 35-42.
- Thammasiri, K., 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritispulcherrima*Lindl.) by vitrification.CryoLetters, 21: 237-244.
- Towill, L. E., Bonnart, R. and Volk G. M., 2006. Cryopreservation of *Arabidopsisthaliana* shoot tips. CryoLetters, 27(6): 352 – 360.
- Walters, C., Wheeler, L. J. and Stanwood, P. C., 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. Cryobiology, 48**:** 229-244.
- Walters, C., Touchell, D. H., Power, P., Wesley-Smith, J. and Antolin, M. F., 2002. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizaniatexana*.CryoLetters, 23: 291-298.
plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. CryoLetters, 30(1): 41-46.
- Cho, E.G., Noor, N. M., Kim, H. H., Rao V. R. and Engelmann F., 2002. Cryopreservation of *citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a desiccation protocol.CryoLetters, 23(5): 309-316.
- Clavero-Ramirez, I., Gálvez–Farfán, J., López–Aranda, J. M. and González–Benito, M. E., 2005. Apex cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation – dehydration methods. CryoLetters, 26 (1): 17 – 24.
- González-Arnao, M. T. and Engelmann, F., 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. CryoLetters, 27 (3): 155-168.
- Jalili, A. and Jamzad Z., 1999.Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
- Leunufna, S. and Keller, E. R. J., 2005. Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. CryoLetters, 26 (2): 93 – 102.
- Mandal, B. B. and Dixit-Sharma S., 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of *dioscoreadeltoidea*Wall., an endangered medicinal plant: effect of cryogenic procedure and storage duration. CryoLetters, 28(6): 461 – 470.
- 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.
- 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
-Nazarain, H., Ghahreman, A., Atri, M. and Assadi, M., 2004. Ecological factors affecting parts of vegetation in north Iran (Elika and Duna watersheds) by employing eco-phytosociological methods. Pakistan Journal of Botany, 36 (1): 41-64.
- Noroozi, J., Akhani, H. and Breckle, S., 2008. Biodiversity and phytogeography of the alpine flora of Iran. Biodiversity and Conservation, 17(3):493-521.
- Parsa, A., 1949. Flore de l'Iran. du ministére de l'education meuseum de l'histoire naturalle de

Cryopreservation of *Trifolium radicosum* seeds and establishment of the Cryopreserved seeds under laboratory and greenhouse conditions

M. Naderi Shahab[1], M. Jebelli[2*], A. A. Shahmoradi[3], A. Ghamari Zare[4] and A. A. Jafari[5]

1-Assistant Professor, Biotechnology Research Group, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Senior Research Expert, Biotechnology Research Group, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran,
Email: rihan2000ir@yahoo.com

3- Assistant Professor, Rangeland Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4-Associate Professor, Biotechnology Research Group, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

5-Professor, Rangeland Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received:10/4/2013 Accepted:9/6/2014

Abstract

Trifolium radicosum (Boiss. & Hohen.) is a perennial range legume growing on steep or moderately steep slopes in high altitudes areas of the central Alborz Mountain with a cold Mediterranean climate. Establishment of this species in cold, high-altitudes, and steep slopes with heavy snow falls prevents soil degradation and erosion. In this regard, the species has a great importance in ecological and range conservation point of view. Overgrazing, high nutrient values, palatability, as well as habitat susceptibility may cause the species to face the risk of extinction. In order to evaluate the possibility of long-term conservation of the *Trifolium radicosum* seeds, with low degree of germination (35.67%), cryopreservation approach was evaluated. Subsequent to cryopreservation, three pre-cryopreservation methods including PVS2, desiccation, and 30% glycerol were applied. The treated seeds were transferred into liquid nitrogen (-196°C) for one week, one month and one year, respectively. The cryopreserved seeds were removed from liquid nitrogen and imposed to heat shock, surface sterilized and were transferred between sterile moist papers in petri dishes or sown in pots under greenhouse conditions. The cryopreserved seeds of different storage times and pre-cryopreservation treatments were survived under liquid nitrogen conditions, germinated normally, and grown to seedlings. Differences between cryopreservation times for most of the attributes were not significant. However there were significant differences between pre-cryopreservation treatments for some of the attributes, such as germination (29.33, 26.33 and 21.67% for desiccation, PVS2 and 30% glycerol in one weak cryopreservation period). In clonal propagation experiments under greenhouse conditions, the root cuttings showed excellent results compared to that of the stem cuttings.

Keywords: *Trifolium radicosum*, seed cryopreservation, endangered species, range plant.