دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "حفاظت زیست بوم گیاهان"
دوره ششم، شماره دوازدهم، بهار و تابستان ۹۷
http://pec.gonbad.ac.ir

# حفاظت فراسرد بذرهای بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschyi Boiss.*) با استفاده از روش‌های شیشه‌ای شدن و کپسوله–آبگیری

**حدیثه شهاب‌فر[۱]، وحید پوزش[2] *، سعید زواره[۳]**

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان
[۲] استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان
[۳] دانشیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۵

## چکیده

**امروزه حفظ تنوع گونه‌های گیاهی دارویی-مرتعی و جلوگیری از فرسایش تنوع ژنتیکی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. گیاه بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschyi Boiss.*) از جمله گیاهان مهمی است که بر اثر برداشت‌های بی‌رویه و تغییرهای آب و هوایی در معرض خطر و نابودی قرار گرفته است. از این‌رو در پژوهش حاضر اثر تیمارهای کپسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن با دو محلول انجماد شیشه‌ای گیاه (PVS2 و PVS3) بر بذرهای بادرنجبویه دنایی مورد مطالعه قرار گرفتند. بذرها پس از تیمار با محلول‌های PVS2 و PVS3 با دو روش کپسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن منجمد شده و به‌مدت ۲۰ ساعت در تانک ازت مایع در دمای ۱۹۶- $^{o}C$ نگه‌داری شدند. سپس بذرها در بن ماری ۴۰ $^{\circ}c$ ذوب شدند. بذرها در پتری‌دیش و درون گلدان کشت شدند. درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر و خشک گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیمار کپسوله–آبگیری درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر را**

* نویسنده مسئول: poozesh@du.ac.ir



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

**به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شیشه‌ای شدن کاهش داد. کمترین طول دانه‌رست در تیمار کپسوله-آبگیری و بیشترین در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 به‌دست آمد. وزن خشک ریشه تحت تأثیر تیمارهای مختلف فراسرد قرار نگرفت، اما تیمار کپسوله-آبگیری وزن خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نتایج به‌خوبی نشان داد که تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 می‌تواند به‌خوبی تنش‌های ناشی از انتقال به شرایط فراسرد را کاهش دهد و کیفیت رشد بذرهای گیاه بادرنجبویه دنایی را بهبود ببخشد.**

***واژه‌های کلیدی*: بادرنجبویه دنایی، محلول انجماد شیشه‌ایی، کپسوله-آبگیری**

**مقدمه**

گیاه بادرنجبویه از مهم‌ترین جنس‌های تیره نعناعیان می‌باشد که شامل ۱۸۶ گونه است که از این میان ۸ گونه در ایران می‌روید. یکی از گونه‌های مهم و بومی این گیاه در ایران *Dracocephalum kotschyi* است که در بخش‌هایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود (Rechinger, 1986). این‌گونه انحصاری، با نام زرین گیاه و بادرنجبویه دنایی شناخته می‌شود (مظفریان، ۱۳۷۵). به‌علت برداشت‌های بی‌رویه و غیراصولی به‌ویژه در مرحله گلدهی گیاه که مانع از به بذر نشستن این گیاه و در نتیجه باعث کاهش جمعیت این گیاه شده است؛ بنابراین گیاه بادرنجبویه دنایی در معرض خطر نابودی می‌باشد (Jalali et al., 1999). در حال حاضر تقاضا برای گیاهان دارویی به‌عنوان تولیدات قابل مصرف در صنایع بهداشتی و دارویی روز به روز در حال افزایش است (Koocheki et al., 2008).

رویکرد روز افزون استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهان، اهمیت کشت و تولید این گیاهان را روشن‌تر می‌سازد. پژوهش‌های اخیر نشان داده است که بادرنجبویه دنایی از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و در طب سنتی در کاهش تب، درد مفاصل، روماتیسم و همچنین به‌عنوان ضدالتهاب و التیام دهنده زخم استفاده می‌شود؛ این گیاه در تقویت سیستم ایمنی نیز نقش دارد (آزادبخت ،۱۳۷۸). در برگ‌های گیاه بادرنجبویه ترکیبی به نام Spinal-z وجود دارد که از سال‌ها پیش در درمان سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Jahanian et al., 2005). از دیگر ترکیبات مهم این گیاه می‌توان به اسانس (Yaghmai et al., 1988) فلاونوئید، رزماریک اسید (Amirghofran et al., 2000) و گلیکوزیدهای مونوترپن (Saeidnia et al., 2004) اشاره نمود. گزارش شده است که از هر ۱۰۰ گرم گیاه دارویی بادرنجبویه دنایی، ۹۵۵ میلی‌گرم ترکیب فلاونوئیدی لوتئین به‌دست می‌آید که در بیماری MS اثر درمانی مثبت دارد (کمالی و همکاران، ۱۳۹۳).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

ژرم‌پلاسم گیاهی از مهم‌ترین منابع و ثروت‌های هر کشور محسوب می‌شود و بایستی در حفظ و نگه‌داری آن اقدام‌های لازم انجام گیرد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نگه‌داری و حفظ بذر گونه‌های گیاهی ارزشمند و در حال انقراض در سردخانه برای مدت زمان طولانی میسر نیست. در این میان روش حفاظت فراسرد[۲] که به معنای ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی (یاخته، بافت یا اندام‌ها) در ازت مایع با دمای ۱۹۶c°- است، از جمله اصلی‌ترین و موفق‌ترین روش‌های نگه‌داری درازمدت ژرم‌پلاسم گیاهان ارزشمند در حال انقراض به‌شمار می‌رود (Benson, 2008). در این دما، فعالیت‌های متابولیسمی به حالت تعلیق می‌ماند و ماده گیاهی بدون هیچ تغییری، به مدت نامحدود ذخیره می‌شود و در صورت لزوم فرآیندهای بازیابی صورت می‌گیرد (Sant et al., 2006). بنابراین حفاظت فراسرد، یک فناوری توسعه یافته‌ای برای بقای مواد ژنتیکی است؛ ازاین‌رو خطر فرسایش ژنی و از دست رفتن ذخایر ژنتیکی کاهش می‌یابد.

از جمله روش‌های مؤثر و استاندارد در افزایش کارایی نگه‌داری و زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد، روش شیشه‌ای شدن با استفاده از محلول‌های آبگیری PVS2[۳] و PVS3[۴] و روش کپسوله-آبگیری می‌باشد. روش شیشه‌ای شدن فرآیندی است که در آن آب از حالت مایع وارد فاز شیشه‌ای می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است (Gale et al., 2008). شیشه‌ای شدن مستلزم استفاده از محلول‌های تعادلی با ویسکوزیته و قابلیت آبگیری و بالا است (Luo and Read, 1997). به‌منظور انجام فرآیند شیشه‌ای شدن،کاهش میزان آب یاخته به ۲۰-۳۰٪ ضروری است (Wolf and Bryant, 1999). محلول‌های آبگیری PVS2 و PVS3 در فرآیند فراسرد به‌عنوان محلول محافظت-کننده در مقابل انجماد استفاده می‌شوند؛ به‌طوری‌که نقطه انجماد را پایین آورده و از تشکیل بلورهای یخ جلوگیری می‌کند. بنابراین آب مانند شیشه سخت شده و مانع از آسیب جدی به نمونه‌های گیاهی خواهد شد (Turner et al., 2001). طی دو دهه گذشته استفاده از این روش به‌عنوان یکی از گسترده‌ترین پروتکل‌های انجمادی رو به افزایش بوده است. از دلایل موفقیت این روش، سهولت انجام آن است. به نحوی‌که این روش برای محدوده وسیعی از گونه‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Panis and Lambardi, 2005).

[2] Cryopreservetion
[3] Plant vitrification solution
[4] Plant vitrification solution



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

روش کپسوله-آبگیری از جمله روش‌های حفاظتی فراسرد است که در اواخر دهه بیست میلادی توسعه یافت و امروزه برای انواع زیادی از ژرم‌پلاسم‌های گیاهی استفاده می‌شود. این روش یکی از پروتکل‌های پایه‌ای و مهم حفاظت فراسرد است که تاکنون با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (1990 ،. Benson, 1999; Fabre and Dereuddre). در این روش نمونه‌ها در مهره‌های آلژینات کپسوله و در محلول‌های ساکارز با غلظت بالا پیش تیمار می‌گردند و پس از خشک شدن به روش‌های مختلف، در ازت مایع غوطه‌ور می‌گردند. پس از خروج مهره‌ها از ازت مایع و ذوب شدن آن‌ها در حمام آب گرم به محیط بازیابی مناسب منتقل می‌گردند (Blakesley et al., 1995).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر روش‌های شیشه‌ای شدن و کپسوله-آبگیری با استفاده از دو محلول PVS2 و PVS3 بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر بادرنجبویه دنایی بود.

## مواد و روش‌ها

### طرح آزمایشی

این پژوهش در آذر سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی و گلخانه پژوهشی دانشگاه دامغان انجام گرفت. بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. در ابتدا بذرهای یکنواخت با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و سپس سه بار با آب مقطر شستشو و برای اعمال تیمارهای موردنظر آماده شدند. تیمارهای اعمال شده در این پژوهش، شامل تیمار شیشه‌ای شدن با محلول انجماد شیشه‌ای گیاه ۲ [5](PVS2) شیشه‌ای شدن با محلول انجماد شیشه‌ای گیاه ۳ [6](PVS3) و همچنین روش کپسوله کردن-آبگیری می‌باشد. لازم به ذکر است که برای تیمار شاهد، تعدادی از بذرها بدون اعمال تیمار مشخصی برای جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ مرطوب سترون منتقل و وارد دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شدند. در شرایط گلخانه هم کشت بذرها در داخل خاک لوم رسی انجام گرفت. در شرایط آزمایشگاهی، درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه اندازه‌گیری شدند. در آزمایش‌های

[5] Plant Vitrification Solution
[6] Plant Vitrification Solution



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

گلخانه‌ای، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و وزن اندام‌هوایی اندازه‌گ‌ی‌ری شدند. برای اجرای فرآیندهای آزمایشگاهی و گلخانه‌ای که به‌صورت جداگانه برای هر گروه از بذرها انجام گرفت از طرح کامل تصادفی با چهار تکرار استفاده شد؛ بهطوری‌که در فرآیند آزمایشگاهی برای هر تکرار ۳۰ عدد بذر استفاده گردید و در آزمایش گلخانه‌ایی در نهایت ۷ بوته در هر گلدان نگه داشته شد.

**پیش تیمارها و نگه‌داری بذر در شرایط فراسرد**

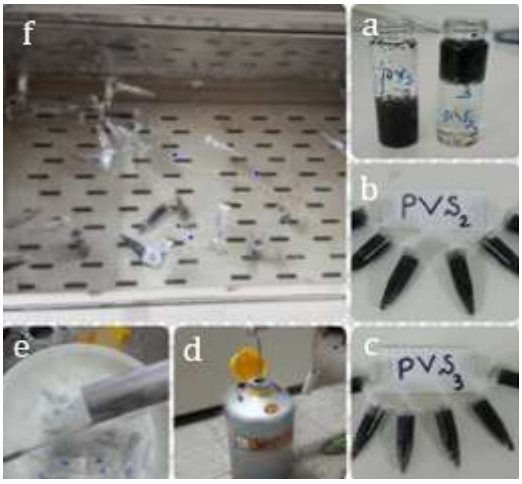
تیمارهای فراسرد، پیش از ورود بذرها به ازت مایع شامل تیمار کپسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن با محلول‌های آبگیری PVS2 در برگیرنده 15% (W/V) اتیلن گلیکول، 15% (W/V) دی متیل سولفوکساید، 30% (W/V) گلیسرول و 0/4 مولار ساکارز (Sakai et al., 1990) و PVS3 در برگیرنده 50% (W/V) ساکارز و 50% (W/V) گلیسرول بودند (Nishizawa et al., 1993).

**روش شیشه‌ای شدن با محلول‌های آبگیری PVS2 و PVS3:**

بذرهای ضدعفونی شده به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بارگیری سترون (حاوی گلیسرول ۲ مولار و ساکاروز ۰/۴ مولار) قرار گرفتند و یک ساعت با دستگاه شیکر، تکان داده شدند (۹۰ دور در دقیقه) و در نهایت محلول بارگیری تخلیه شد. سپس نیمی از بذرهای بارگیری شده با محلول آبگیری PVS2 و نیمی دیگر با محلول آبگیری PVS3 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴C° انکوبه شدند. در نهایت بذرها درون فالکون‌های پلاستیکی بارگیری شدند و به مدت ۲۰ ساعت در تانک ازت مایع نگه‌داری شدند (شکل ۱).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]




**شکل ۱- مراحل شیشه‌ای شدن و ذوب بذرها: قرارگیری بذرها در محلول‌های آبگیری (a)، انتقال بذرها به فالکون پلاستیکی (b و c)، قرار دادن فالکون‌ها در تانک ازت (d)، خروج نمونه‌ها از تانک ازت پس از ۲۰ ساعت (e)، ذوب نمونه‌ها در بن ماری ۴۰c° (f)**

**روش کپسوله-آبگیری:**

تعدادی از بذرهای ضدعفونی شده به مدت پنج دقیقه در بستر حاوی اسیدآلژینیک قرار گرفتند؛ سپس به‌منظور تشکیل کپسول موردنظر به مدت ۱۵ دقیقه درون محلول کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار غوطه‌ور شدند. در ادامه بذرهای کپسوله شده بر روی کاغذ صافی استریل، به مدت ۲۰ ساعت در معرض جریان هود لامینار قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس نمونه‌ها در فالکون‌های پلاستیکی در شرایط استریل بارگیری شدند و در تانک ازت مایع قرار گرفتند. پس از ۲۰ ساعت، بذرهای موجود در تانک نیتروژن مایع خارج شدند و بلافاصله به مدت ۱۰۰ ثانیه در بن ماری ۴۰c° قرار گرفتند تا عمل ذوب صورت گیرد (Engelmann, 1990). به‌منظور حذف مواد محافظ سرما، بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ذوب (۱/۲ مولار ساکارز) قرار گرفتند (شکل ۲).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

**شکل ۲- مراحل کپسوله-آبگیری و ذوب: کپسوله کردن بذرها (a)، آبگیری بذرها در معرض هوای استریل و انتقال به فالکون پلاستیکی (b)، قرار دادن فالکون‌ها در تانک نیتروژن (c)، خروج نمونه‌ها از تانک نیتروژن پس از ۲۰ ساعت (d)، ذوب نمونه‌ها در بن ماری $40^{\circ}C$ (e)**

### اندازه‌گیری شاخص‌های جوانه‌زنی

با استفاده از معادله‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب پارامترهای درصد جوانه‌زنی (Jebeli et al., 2014)، سرعت جوانه‌زنی (Hartman et al., 1990) و شاخص بنیه بذر (Abdul-baki and Anderson, 1973) بذرهای بادرنجبویه دنایی محاسبه شدند.

$$GP = \frac{\sum Ni}{N} \times 100$$ رابطه ۱

Ni = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز iام، N= تعداد کل بذرها، GP[۷]= درصد جوانه‌زنی

[۷] Germination Percent



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

رابطه ۲ $$GR = \Sigma\left(\frac{ni}{di}\right)$$

ni= تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز nام، di= تعداد روز تا شمارش nام، GR[۸]= سرعت جوانه‌زنی

رابطه ۳ $$SVI = (LS \times GP)/100$$

LS= طول گیاهچه (mm)، GP= درصد جوانه‌زنی، SVI[۹]= شاخص بنیه بذر

اندازه‌گیری وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و وزن اندام هوایی به‌وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام شد. به‌منظور تعیین وزن خشک ریشه و اندام هوایی، نمونه‌های موردنظر در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند و سپس با ترازو اندازه‌گیری شدند.

## تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از بررسی توزیع نرمال داده‌های به‌دست آمده، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ( One way analysis of variance) و تست تکمیلی دانکن (Duncan) برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. از لحاظ آماری $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## نتایج

### شاخص‌های جوانه‌زنی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بذرهای بادرنجبویه دنایی پس از خروج از تانک ازت مایع توانایی زنده‌مانی خود را حفظ می‌کنند. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که از لحاظ آماری بین درصد جوانه‌زنی بذرها تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۳، F(۳و۱۱) =۱۱/۴۶۲: جدول ۱).

[۸] Germination Rate
[۹] Seedling Vigor Index



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

**جدول ۱- تجزیه واریانس پارامترهای طولی بخش‌های مختلف گیاهچه‌های بادرنجبویه دنایی تحت تیمارهای مختلف**

| نام متغیرها | | جمع مربع | درجه آزادی | میانگین مربع | F | معنی‌داری (P) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| طول ساقه‌چه | بین گروه‌ها | ۵۳/۱۸۲ | ۳ | ۱۷/۷۲۷ | ۱۰/۷۴۴ | ۰/۰۰۴ |
| | درون گروه‌ها | ۱۳/۲۰۰ | ۸ | ۱/۶۵۰ | | |
| | جمع | ۶۶/۳۸۲ | ۱۱ | | | |
| طول ریشه‌چه | بین گروه‌ها | ۵۱/۵۶۳ | ۳ | ۱۷/۱۸۸ | ۵/۲۷۶ | ۰/۰۲۷ |
| | درون گروه‌ها | ۲۶/۰۶۰ | ۸ | ۳/۲۵۷ | | |
| | جمع | ۷۷/۶۲۳ | ۱۱ | | | |
| طول گیاهچه | بین گروه‌ها | ۲۰۸/۴۲۰ | ۳ | ۶۹/۴۷۳ | ۱۱/۱۰۷ | ۰/۰۰۳ |
| | درون گروه‌ها | ۵۰/۰۴۰ | ۸ | ۶/۲۵۵ | | |
| | جمع | ۲۵۸/۴۶۰ | ۱۱ | | | |



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

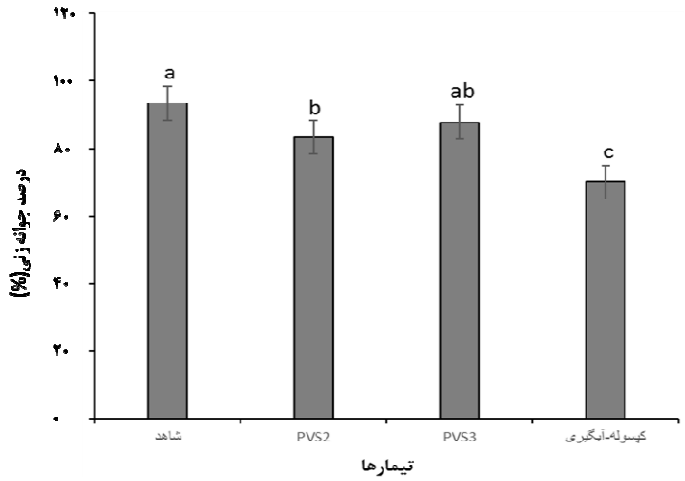
**ادامه جدول (۱)**

| نام متغیرها | | جمع مربع | درجه آزادی | میانگین مربع | F | معنی‌داری (P) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه | بین گروه‌ها | ۰/۱۱ | ۳ | ۰/۰۰۴ | ۰/۱۵۳ | ۰/۹۲۵ |
| | درون گروه‌ها | ۰/۱۹۸ | ۸ | ۰/۰۲۵ | | |
| | جمع | ۰/۲۰۹ | ۱۱ | | | |
| درصد جوانه‌زنی | بین گروه‌ها | ۸۹۱/۶۳۹ | ۳ | ۲۹۷/۲۱۳ | ۱۱/۴۶۲ | ۰/۰۰۳ |
| | درون گروه‌ها | ۲۰۷/۴۳۷ | ۸ | ۲۵/۹۳۰ | | |
| | جمع | ۱۰۹۹/۰۷۶ | ۱۱ | | | |
| سرعت جوانه‌زنی | بین گروه‌ها | ۰/۸۱۴ | ۳ | ۰/۲۷۱ | ۱۶/۰۳۷ | ۰/۰۰۱ |
| | درون گروه‌ها | ۰/۱۳۵ | ۸ | ۰/۰۱۷ | | |
| | جمع | ۰/۹۴۹ | ۱۱ | | | |
| شاخص بنیه بذر | بین گروه‌ها | ۴۵۷/۹۵۱ | ۳ | ۱۵۲/۶۵۰ | ۳۱/۲۹۶ | ۰/۰۰۰ |
| | درون گروه‌ها | ۳۹/۰۲۰ | ۸ | ۴/۸۷۸ | | |
| | جمع | ۴۹۶/۹۷۲ | ۱۱ | | | |

در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمار کپسوله-آبگیری (E-D) و تیمار شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS2 به‌طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (P<۰/۰۵؛ شکل ۳). بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 به میزان ۸۷/۷۷٪ و کمترین مقدار در تیمار کپسوله-آبگیری (E-D) به میزان ۶۹/۹۹٪ مشاهده شد.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]



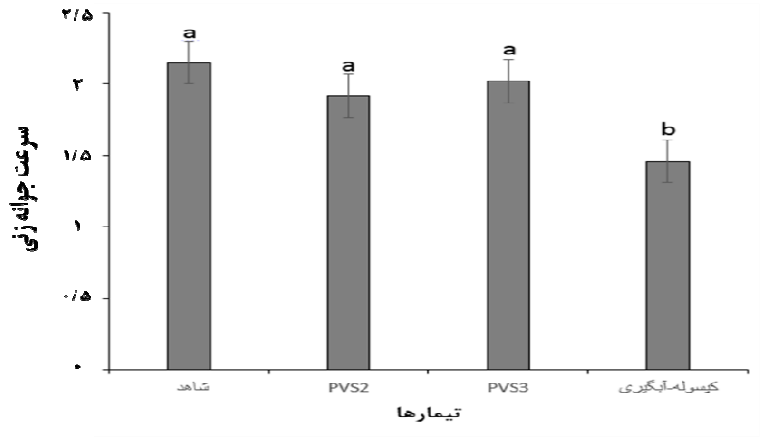

**شکل ۳- درصد جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که از لحاظ آماری بین سرعت جوانه‌زنی بذرها تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=۰/۰۰۱$، $F(۳و۱۱) =۱۶/۰۳۷$ : جدول شماره ۱). در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که سرعت جوانه زنی تیمار کپسوله-آبگیری (E-D) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P<0.05$). درحالی‌که سرعت جوانه‌زنی بذرها در دو محلول آبگیری PVS2 و PVS3 در روش شیشه‌ای شدن به‌ترتیب با مقادیر ۱/۲۹ و ۲/۰۲ واحد در روز بود که نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ( $P<۰/۰۵$؛ شکل ۴).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]



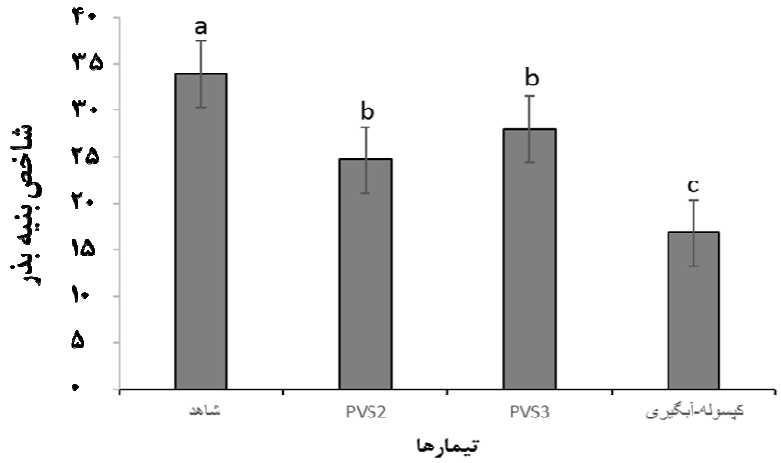

**شکل ۴- سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (P<0/05)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین شاخص بنیه بذر بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف بود (P=۰/۰۰۰، F(۳و۱۱) =۳۱/۲۹۶ : جدول شماره ۱). در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که شاخص بنیه بذر در تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود. کمینه شاخص بنیه بذر مربوط به روش کپسوله-آبگیری (E-D) و بیشینه شاخص مربوط به روش شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 بود (P<۰/۰۵: شکل ۵). تفاوت معنی‌داری بین شاخص بنیه بذر بین دو تیمار PVS2 و PVS3 مشاهده نشد (*P*>0/05).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]




**شکل ۵- شاخص بنیه بذر در تیمارهای مختلف**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0/05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه بیان‌کننده عدم تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف بود (P=۰/۹۲۵، F(۳و۱۱)= ۰/۱۵۳: جدول ۱). درحالی‌که میانگین طول ریشه‌چه (P=۰/۰۲۷، F(۳و۱۱) =۵/۲۷۶: جدول ۱)، گیاهچه (P=۰/۰۰۳، F(۳و۱۱)= ۱۱/۱۰۷: جدول ۱) و ساقه‌چه (P=۰/۰۰۴، F(۳و۱۱)= ۱۰/۷۴۴: جدول شماره ۱) بین گروه‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که طول ساقه چه در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شیشه‌ای با PVS2 و کپسوله آبگیری بود ($P<0/05$) درحالی‌که تفاوت معنی‌داری با تیمار شیشه‌ای با PVS3 نداشت ($P>0/05$). طول ریشه‌چه در گروه کپسوله آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دیگر گروه‌ها کمتر بود ($P<0/05$). همچنین نتایج نشان داد که طول گیاهچه نیز در گروه کپسوله آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دیگر گروه‌ها کمتر بود ($P<0/05$؛ جدول ۲).



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

**جدول ۲- پارامترهای طولی بخش‌های مختلف گیاهچه‌های بادرنجبویه دنایی تحت تیمارهای مختلف**

| تیمار | طول ساقه‌چه | طول ریشه‌چه | طول گیاهچه | طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۱۷.۱۳ ± ۱/۵$^{a}$ | ۱۸.۵ ± ۱$^{a}$ | ۳۵.۶۳ ± ۲/۵$^{a}$ | ۱/۰۸ ± ۰/۰۳$^{a}$ |
| شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS2 | ۱۴ ± ۱$^{b}$ | ۱۵ ± ۲$^{ab}$ | ۲۷ ± ۱/۹$^{bc}$ | ۱/۰۸ ± ۰/۰۱$^{a}$ |
| شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 | ± ۰/۹$^{ab}$ ۱۵.۲۳ | ۱۷ ± ۱$^{a}$ | ± ۱/۷$^{ab}$ ۳۲/۲۳ | ۱/۱۲ ± ۰/۰۵$^{a}$ |
| کپسوله–آبگیری | ۱۱/۳۳ ± ۱/۵$^{c}$ | ۱۳ ± ۲/۶$^{b}$ | ۲۴/۳۳ ± ۳/۵$^{c}$ | ۱/۱۵ ± ۰/۲$^{a}$ |

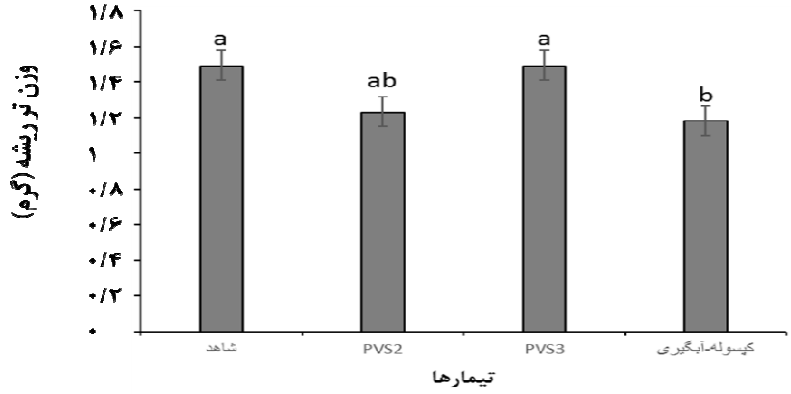
×حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P<0/05$)

**شاخص‌های وزنی**

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن تر ریشه در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که وزن تر ریشه گیاه بادرنجبویه دنایی در گروه کپسوله-آبگیری در مقایسه با دیگر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$). درحالی‌که وزن تر ریشه بین گروه‌های شاهد، انجماد شیشه‌ای PVS2 و انجماد شیشه‌ای PVS3 تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$): شکل ۶). آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن خشک ریشه بیان‌کننده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف فراسرد و شاهد بود.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]



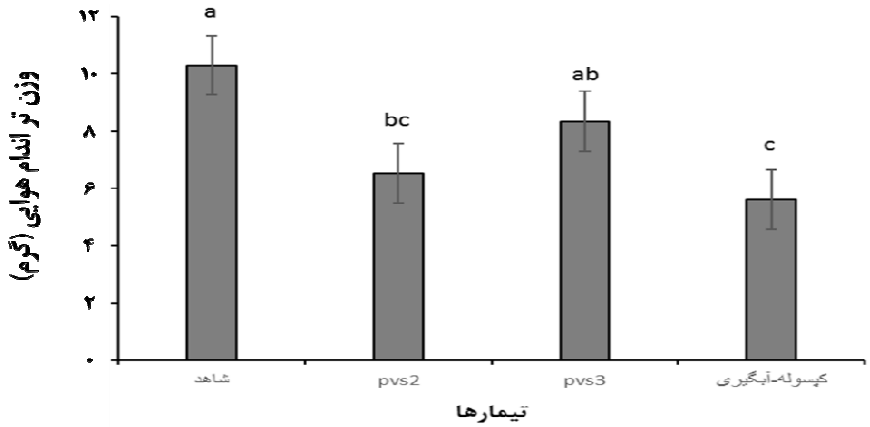

**شکل ۶- وزن تر ریشه در تیمارهای مختلف (گرم)**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0/05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن تر اندام هوایی در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی-دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که کمترین وزن تر اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی تحت تیمار کپسوله-آبگیری به‌دست آمد ($P<0/05$). درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در وزن تر اندام هوایی بین تیمار روش شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 و گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۷). همچنین آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن خشک اندام هوایی در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که بین وزن خشک اندام هوایی گروه تیمار با PVS3 و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. درحالی‌که وزن خشک اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی تحت تیمار کپسوله-آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ($P<0/05$؛ شکل ۸).

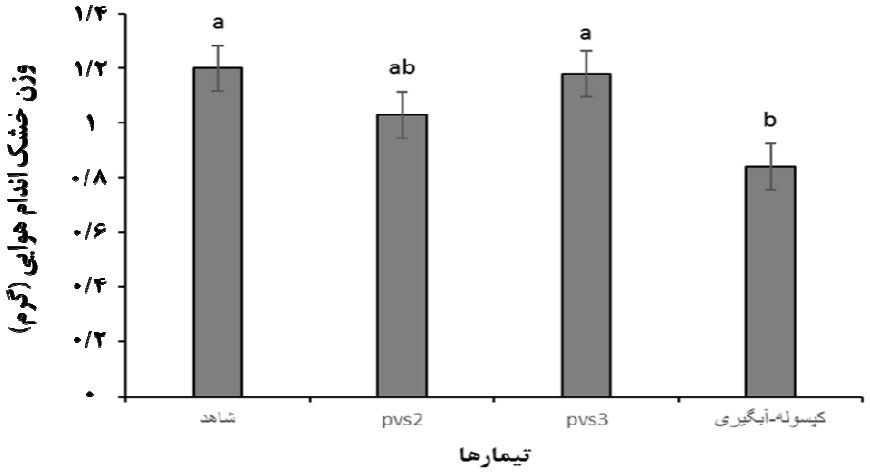


[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]




**شکل ۷- وزن تر اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی در تیمارهای مختلف (گرم)**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0/05$)




**شکل ۸- وزن خشک اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی در تیمارهای مختلف (گرم)**

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0/05$)



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

**بحث و نتیجه‌گیری**

در این پژوهش قابلیت بقاء و رشد بذرهای حفاظت‌شده گیاه مرتعی-دارویی بادرنجبویه دنایی با استفاده از روش‌های مختلف تکنیک فراسرد ارزیابی شد. این بذرها پس از خروج از ازت مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند. بنابراین با توجه به امکان بقاء و رشد بذرها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد می‌توان بذرهای این گونه را جزء بذرهای ارتودکس[۱۰] (orthodox) قرار داد (Engelmann, 1990).

حفاظت فراسرد بافت‌های زیستی تنها زمانی می‌تواند با موفقیت انجام شود که از تشکیل کریستال‌های یخی درون یاخته‌ایی در زمان غوطه‌وری در ازت مایع اجتناب گردد. زیرا این کریستال‌ها می‌توانند آسیب‌های جدی به غشای یاخته وارد کنند و قابلیت غشای پلاسمایی را مختل کنند و از آن-جایی‌که آسیب یاخته‌ایی در تکنیک حفاظت فراسرد قابل جبران نیست، بنابراین پیش تیمارها و تکنیک‌های آبگیری به‌منظور کاهش آب درون یاخته‌ایی صورت می‌گیرد (Wang et al., 2005; 2006 ,Roland et al.).

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر مربوط به تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 است؛ به‌نظر می‌رسد، محلول آبگیری در این تیمار به‌دلیل وجود مقدار بالای غلظت ساکارز (۵۰٪ (W/V)) در محافظت از سرما مؤثرتر از سایر تیمارها می‌باشد درحالی‌که به‌نظر می‌رسد که قدرت آبگیری در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS2 که حاوی ۰/۴ مولار ساکارز و تیمار کپسوله-آبگیری در ارتباط با گیاه بادرنجبوبه کارآمد نمی‌باشد که همین امر سبب کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر در این دو تیمار اخیر نسبت به تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 شده است. ساکارز طبیعی به‌دلیل کارایی بالا و فقدان سمیت، یک ماده شیمیایی مهم در آبگیری و مقاومت سرمایی است که در محلول‌های بارگیری و آبگیری، پیش از انجماد استفاده می‌گردد (Chang, 2001). نشان داده شده است که روش و نوع محلول آبگیری به‌کار گرفته شده در فرآیند فراسرد بر پارامترهای جوانه‌زنی و رشد بذرها مؤثر می‌باشد (Pennycooke and Towill, 2000). بنابراین، غلظت بالای قند، مقدار آب آزاد

[۱۰] بذری که می‌توان خشک کرد و در دمای پایین بدون از دست دادن قوه نامیه نگه‌داری کرد.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

(free water) بذرها را کاهش داده و آن‌ها را برای ورود به ازت مایع با حداقل آسیب بافتی آماده‌تر می‌کند. گزارش شده است که اتیلن گلیکول موجود در PVS2 می‌توانند تأثیر منفی در محافظت از نمونه‌ها حین انجماد داشته باشند (Kuleshova et al., 1999). اتیلن گلیکول، پلیمری محلول در آب و انعطاف‌پذیر است که به‌منظور تأمین فشار اسمزی بالا در فرآیند انجماد به جای ساکارز استفاده می‌شود، درحالی‌که اتیلن گلیکول سمی می‌باشد و استفاده از غلظت‌های بالای آن می‌تواند منجر به مرگ سلولی گردد (Chang, 2001).

در مطالعه‌ای مشخص شد که شاخص بنیه بذرهایی که به مدت طولانی در سردخانه با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده‌اند، تغییری نکرده است. همچنین بررسی بر روی شاخص بنیه بذر چهار گونه گیاه از خانواده چلیپاییان نشان داده است بذرهایی که به مدت ۲۴ تا ۳۰ سال در دمای ۱۳- درجه سانتی‌گراد و محتوای رطوبتی ۳ درصد نگه‌داری شده بودند، در مقایسه با نگه‌داری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸ درصد، بنیه بذر آن‌ها بیشتر حفظ شده بود که بیان‌کننده تأثیر دماهای پائین‌تر بر حفظ گونه‌های گیاهی می‌باشد (Maselli et al., 1999). شاخص بنیه بذر ارتباط مستقیم با درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه دارد که نشان‌دهنده هماهنگی قدرت جوانه‌زنی و قدرت رویش گیاه است و می‌تواند به عملکرد بیشتر گیاهان منجر شود (Aryakia et al., 2012). کاهش ارتفاع گیاه در گیاهان باززایی شده از ژرم‌پلاسم تحت تکنیک‌های انجمادی در بسیاری از پژوهش‌ها گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Harding and Benson, 2000). گزارش‌های متفاوتی از پاسخ‌های رشدی و مورفولوژیکی از گیاهچه‌های باززایی شده پس از حفاظت انجمادی وجود دارد (Sershen et al., 2012). با این حال، به‌خوبی نشان داده شده است که با افزایش دمای نگه‌داری بذر، طول گیاهچه کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از زوال تدریجی و تجزیه شیمیایی ترکیبات بذر باشد که در طی فرآیند خسارت اکسیداتیو رخ می‌دهد که سرعت این فرآیندها به‌طور عمده به دو عامل رطوبت و دما بستگی دارد (Walters et al., 2009).

تغییرات وزن خشک و وزن تر در هر دو اندام ریشه و بخش هوایی بادرنجبویه دنایی تحت تأثیر تیمارهای مختلف فراسرد نشان‌دهنده وضعیت مناسب سبز شدن و استقرار بذر و تولید گیاه در گلخانه می‌باشد. وزن گیاه جوان همبستگی زیادی با اندازه و کیفیت بذر دارد، به‌طوری‌که بذرهای سالم‌تر، گیاهانی با وزن تر و وزن خشک بیش‌تری دارند و می‌توانند عملکرد مزرعه را تحت تأثیر قرار دهند



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

(Sawan et al., 2009). در آزمایش حاضر شرایط فراسرد و به‌ویژه تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 توانست کیفیت بذر و به‌دنبال آن وزن تر و خشک گیاه بادرنجبویه دنایی را به‌خوبی حفظ نماید. گزارش شده است که افزایش دمای نگه‌داری بذر منجر به کاهش وزن تر و وزن خشک گیاه می‌گردد (Setyowati, 2009) که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر این‌که با آبگیری بذر و نگه‌داری در شرایط فراسرد، کیفیت بذر و لذا شاخص‌های وزنی به‌خوبی حفظ می‌شوند، مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر به‌خوبی نشان داده شد که در میان همه روش‌های مورد استفاده در فرآیند فراسرد، روش شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 در نگه‌داری بذرهای بادرنجبویه دنایی در شرایط فراسرد مؤثرتر می‌باشد. زیرا محلول آبگیری PVS3 در ارتباط با شاخص‌های جوانه‌زنی و وزن خشک و وزن تر اندام‌های گیاه نسبت به محلول آبگیری PVS2 و روش کپسوله-آبگیری بهتر عمل کرده است. به‌نظر می‌رسد که استفاده از غلظت بالاتر ساکارز در محلول آبگیری PVS3 عامل موفقیت بیشتر آن نسبت به محلول آبگیری PVS2 باشد. همچنین به‌نظر می‌رسد که مهره‌های آلژینات در روش کپسوله-آبگیری مانع از تنفس بذر و رشد طبیعی آن شده و در نتیجه رشد گیاهان حاصل از بذرهایی که تیمار کپسوله-آبگیری بر آن‌ها اعمال شده ضعیف می‌باشند؛ بنابراین می‌توان با استفاده از این روش در مقیاس کاربردی به‌عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین مناسب و مطمئن برای نگه‌داری طولانی مدت بذرهای گیاه بادرنجبویه دنایی در مراکز نگه‌داری ذخایر ژرم‌پلاسمی استفاده نمود.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه دامغان بابت حمایت مالی و معنوی پروژه کمال سپاسگزاری را داریم.

## فهرست منابع

کمالی، م.، خسرویان، س.، جلیلوند، م.ر. ۱۳۹۳. جداسازی فلاونوئید لوتئولین (داروی کمکی درمان بیماری MS) از گیاه دارویی بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschyi Boiss*) با روش‌های کروماتوگرافی. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، ۹ صفحه.

آزادبخت، م. ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. نشر طبیب، ۴۰۰ صفحه.

مظفریان، و. ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران: لاتینی، انگلیسی، فارسی. انتشارات فرهنگ معاصر، ۷۴۰ صفحه.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

Abdul-baki, A. A., Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiplication. Crop Sci, 3: 630-633.

Amirghofran, Z., Azadbakht, M., Karimi, M.H. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. Journal of Ethnopharmacology, 72: 167-172.

Aryakia, E., Ramazani, H., Ghafoori, H., Dolatyari, A., Naghavi M. R., Shahzadeh fazeli S.A. 2012. The effect of cryopreservation on germination and growth indices of some orthodox seeds. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 19, 218-230. (In Persian)

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. Critical Reviews in Plant Sciences, 27: 141-219.

Benson, E.E. 1999. Cryopreservation in: Plant Conservation Biotechnology, Talor Frances, London, 83-95.

Blakesley, D., Al-Mazrooei, S., Henshaw, G.G. 1995. Cryopreservation of ebryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*): use of sucrose and dehydration for cryopreservation. Plant Cell Reports, 15: 259-263.

Chang, Y. 2001.Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. HortiScience, 36: 1329-1333

Engelmann, F. 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation casehistory: Oil Palm somatic embryos. International Jornal of Refrigation, 13(1): 26-30.

Fabre, J., Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration; A new approaches to cryopreservation of Solanum shoot tips, Cryo- Letters, 11: 413-426.

Gale, S., John, A., Harding, K., Benson, E. 2008. Developing cryopreservation for Picea sitchensis (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. CryoLetters, 29: 135-144.

Harding, K., Benson, E.E. 2000. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from Cryopreserved Shoot-Tips of Potato. CryoLetters, 21(5): 279-288.

Hartman, H., Kester, D., Davis, F. 1990. Plant Propagation, Principle and Practices. Prentice Hall International Editions, 647p.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

Jahanian, F., Ebrahimi S.A., Rahbar Roshandel, N., Mahmoudian, M. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum* and a potential anti-cancer agent. Phytochemistry, 66(13): 1581-1592.

Jalali, A., Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Iran, Tehran, 748p.

Jebeli, M.M., Nadery, A.A., Gafary, F., Hatamy, M. 2014. Robinia pseudoacacia L seed storage in cryopreservation. Iranian journal of forest, 6: 245-254.

Kuleshova, L.L., Macfarlane, D.R., Trounson, A.O. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. cryobiology, 38: 119-130.

Koocheki, A., Tabrizi, L., Ghorbani, R. 2008. Effect of biofertilizers on agronomic and quality criteria of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Iranian Journal of Field Crops Research, 6(1): 127–37.

Luo, J., Reed, B.M. 1997. Abscisic acid-responsive protein, Bovin Serum Albumin, and praline pretrements improve recovery of in vitro currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. Cryobiology, 34: 240-250.

Maselli, S., Pérez-García, F., Aguinagalde, I. 1999. Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain. Annals of Botany, 84: 207-212.

Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science, 91 (1): 67-73.

Panis, B., Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (Crops and Forest Trees). The Rol of Biotechnology, 43-50.

Pennycooke, J.C., Towill, L.E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. Plant Cell Rep, 19: 733–739.

Rechinger, K.H. 1986. *Labiatae* in Flora Iranica. Akademische Druck Verlagsantalt, Graz, Austria, vol. 150: 495-504.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

Roland, A., Fleck, R.W., Pickup, J., Day, G., Benson, E. 2006. Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy. Cryobiology, 52: 261-268.

Saeidnia, S., Gohari, A.R., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G., Kiuchi, F. 2004. Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52(10): 1249-1250.

Sakai, A. S., Kobayashi, I., Oiyama, R. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 9(1): 30-33.

Sant, S., Taylor, M., Tyagi, A. 2006. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of tropical taro (Colocasia esculenta) by vitrification. CryoLetters, 27 (3): 133-142.

Sawan, Z.M., Fahmy, A.H., Yousef, S.E. 2009. Direct and residual effects of nitrogen fertilization, foliar application of potassium and plant growth retardant on Egyptian cotton growth, seed yield, seed viability and seedling vigor. Acta Ecologica Sinica, 29: 116-123.

Setyowati, N. 2009. The effect of seed maturity, temperature, and storage period on vigor of Picrasma javanica Bl. seedling. Biodiversitas, 10: 49-53.

Sershen, A., Berjak, P., Pammenter, N.W., Wesley-Smith, J. 2012. The effects of various parameters during. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52(10):1249-1250. Setyowati, N. 2009. The effect of seed maturity, temperature and storage period on vigor of Picrasma javanica Bl. seedling. Biodiversitas, 10: 49-53.

Turner, S., Seranatna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., Tan, B. 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. Plant Science, 160: 489-497.

Walters, C., Volk, G.M., Towill, L.E., Forsline, P. 2009. Survival of cryogenically-stored dormant apple buds: a 20-year assessment. Paper presented at the 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, Leuven, Belgium, 5-9 April.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

Wang, Y.L., Fan, M.J., Liaw, S.I. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) But. Bull. Acad. Sin, 46: 29-34.

Wolf, J., Bryant, G. 1999. Freezing Drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology, 39: 103-129.

Yaghmai, M.S., Taffazoli, R. 1988. The essential oil of Dracocephalum *kotschyi* Boiss. Flavour and Fragrance Journal, 3(1): 33-36.



[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]

[ Downloaded from pec.gonbad.ac.ir on 2025-07-25 ]