Archive Of SID

جنگل و فرآورده‌های چوب، مجله منابع طبیعی ایران
دورهٔ ٦٩، شمارهٔ ٤، زمستان ١٣٩٥

تاریخ دریافت: ١٣٩٣/١٠/٠٣
تاریخ پذیرش: ١٣٩٤/٠٣/٠٦

ص ٦٧٩-٦٨٨

نگهداری بذر ملج (*Ulmus glabra* Hudson.) در شرایط فراسرد (Cryopreservation)

❖ **محبتعلی نادری‌شهاب؛** عضو هیأت علمی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران.
❖ **مریم جبلّی*؛** کارشناس ارشد پژوهشی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران.
❖ **علی‌اشرف جعفری؛** استاد پژوهش، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران.

چکیده

ملج ***Ulmus glabra* Hudson** گونهٔ درختی است که در ایران در جنگل‌های شمالی رویش دارد و به‌دلیل دامنهٔ محدود اکولوژیک، استفادهٔ بی‌رویه از چوب آن و ابتلا به بیماری مرگ نارون در معرض خطر است. به‌منظور بررسی امکان نگهداری بلندمدت بذر این گونه در شرایط فراسرد (Cryopreservation) و بررسی رشد بذور فراسردی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، بذر این گونه از رویشگاه طبیعی آن در استان گلستان جمع‌آوری شد. برای تعیین بهترین پیش‌تیمار به‌منظور ذخیره‌سازی بذر در شرایط فراسرد یا برودت ١٩٦- درجهٔ سانتی‌گراد، سه پیش‌تیمار شامل آبگیری، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ٣٠ درصد همراه با شاهد آزمایش شد. بذرهای تیمارشده به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در شرایط فراسرد یا درون نیتروژن مایع نگهداری شدند. بذرها پس از خروج از شرایط فراسرد، در شرایط آزمایشگاه و گلخانه آزمایش شدند و تعدادی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی و استقرار در گلخانه بررسی شد. پیش‌تیمارهای آبگیری، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ٣٠ درصد در حفاظت از بذر ملج (*Ulmus glabra*) در شرایط فراسرد دارای اثرهای متفاوتی بودند و بهترین پیش‌تیمار، Desiccation یا آبگیری بذرها بود. بنابراین بذر این گونهٔ مهم جنگلی را می‌توان از عرصه‌های مختلف جمع‌آوری و نسبت به نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم آن اقدام کرد.

واژگان کلیدی: گونهٔ در معرض خطر، گونهٔ جنگلی، ملج (*Ulmus glabra*)، نگهداری بذر در شرایط فراسرد.

* نویسندهٔ مسئول، تلفن: ٠٢٦-٣٦٧٧٠٨١٠، فاکس: ٠٢٦-٣٦٧٧١٥١٦
Email: Jebelly@rifr-ac.ir

www.SID.ir

Archive Of SID

مقدمه

ملج (*Ulmus glabra*) با نام انگلیسی Wych Elm از خانوادهٔ Ulmaceae است که در ایران، اروپا، آسیای صغیر و قفقاز پراکنش دارد. این گونه در جنگل‌های شمال ایران از آستارا تا مازندران و گرگان رویش دارد. از نظر اکولوژیک، دامنهٔ رویش این گونه تقریباً محدود است و بیشتر در مناطق پرباران معتدل تا به‌نسبت سرد وجود دارد. قطع بی‌رویه و استحصال چوب از یک‌سو و حساسیت این گونه به عامل بیماری پاندمیک مرگ نارون[1] که در کلیهٔ رویشگاه‌های گیاه اعم از اروپا، ایران و دیگر نقاط جهان شیوع دارد، موجودیت این گونهٔ ارزشمند را دچار مخاطره کرده است. به‌منظور حفظ و حراست از این گونه، تمهیدات گسترده‌ای از قبیل دستیابی به پایه‌های مقاوم به بیماری، روش‌های مقابله با بیماری و حفظ کلون‌های این گونه صورت گرفته است [۱].

از جمله راهکارهای حفاظتی برای حفظ گونه‌های گیاهی، ایجاد بانک ژن‌های گیاهی و نگهداری بذر گیاهان در شرایط متعارف برای میان‌مدت و به‌نسبت طولانی‌مدت است. در این شرایط، بذرها پس از مدتی قوهٔ نامیهٔ خود را از دست می‌دهند که برای جلوگیری از نابودی آنها، بازکشت بذور ضرورت می‌یابد. در برخی از گونه‌ها، به‌ویژه بعضی از گونه‌های جنگلی، مدت زمان لازم برای تکمیل رشد رویشی و شروع بذردهی پایه‌ها، ده‌ها سال است. علاوه‌بر این، برخی از بذرها قوهٔ نامیهٔ کمی دارند و به‌سرعت نیز قوهٔ نامیهٔ خود را از دست می‌دهند [۲]. نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان در دمای فراسرد[2] مزایای بسیاری دارد که حاکی از اهمیت این فناوری است. در دمای بسیار کم یا فراسرد، قبل از اینکه آب درون‌سلولی به فضای بین سلول انتقال یابد و کریستال‌های یخ تشکیل شوند، سلول‌ها در همان وضعیتی که هستند تثبیت می‌شوند. به‌دلیل فعالیت متابولیکی بسیار ناچیز سلول در شرایط فراسرد، زنده‌مانی بسیار طولانی سلول امکان‌پذیر می‌شود. در این روش می‌توان قسمت‌های مختلف گیاه مانند بذر، اندام، سلول‌های تمایزنیافته، مریستم، جوانه و دانهٔ گرده را نگهداری کرد [۳]. در بعضی از گونه‌ها، موفقیت نگهداری بذر در نیتروژن مایع بسیار کم است و اندام‌های رویشی نتیجهٔ بهتری از بذر نشان می‌دهند. برای مثال در گونهٔ *Oncidium bifolium*، بذور تازه‌برداشت‌شده‌ای که وارد نیتروژن مایع شدند، پس از خروج از شرایط فراسرد تنها ٤/٨ درصد قادر به رشد و تولید گیاهچه بودند؛ اما ١١/٣ درصد از غده‌های[3] این گونه پس از خروج از فراسرد، قادر به زنده‌مانی و تولید گیاهچه بودند [٤]. در تحقیقی دیگر [٥]، بذر گونهٔ در حال انقراض *Zizania texana* که از بذور نوع سخت بوده و نگهداری آن در بانک ژن مشکل است، به روش استخراج و نگهداری جنین بررسی شد.

با توجه به اهمیت مرکبات و حفظ ارقام و واریته‌های آنها، تحقیقات گسترده‌ای در زمینهٔ نگهداری اندام‌های رویشی گونه‌ها و واریته‌های مرکبات صورت گرفته است. برای نگهداری گونهٔ *Citrus sinensis* در شرایط فراسرد [٦] از محور جنینی استفاده شد و نتایج بسیار خوبی به‌دست آمد. گونهٔ بلوط *Quercus robur* که از گونه‌های جنگلی بسیار مهم و ارزشمند بوده و بذر آن کم‌عمر[4] است، برای نگهداری در شرایط فراسرد از

1. Dutch Elm Disease
2. Cryopreservation
3. Protocorm
4. Recalcitrant

www.SID.ir

Archive Of SID

جنین بذر کالوس تولید و در شرایط فراسرد نگهداری شد [۷]. پس از خروج از فراسرد، کالوس‌ها زنده‌مانی خود را حفظ و شروع به رشد کردند. در آزمایش دیگری نگهداری ژرم‌پلاسم همان گونهٔ بلوط *Q.robur* از طریق اندام رویشی در شرایط فراسرد گزارش شده است [۸]. کاربرد این روش می‌تواند گونه‌های نادر و ارزشمند را که در معرض خطرند حفظ و نگهداری کند. براساس این توضیحات، روش نگهداری در دمای فراسرد در مقایسه با روش‌های کلاسیک، به هزینهٔ بسیار کمی نیاز دارد و از طرفی حفاظت نمونه‌ها برای مدت زمان بسیار طولانی امکان‌پذیر است. در روش فراسرد، نمونه‌ها در مقابل خطرهای ناشی از آفات و بیماری‌ها مصون می‌مانند و امکان نگهداری نمونه‌های تکراری[1] با حداقل هزینه و امکانات، در هر وضعیت محیطی وجود دارد. در چند دههٔ اخیر، مطالعات زیادی در زمینهٔ نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای فراسرد صورت گرفته و در اغلب موارد موفقیت‌های چشمگیری حاصل شده است. تحقیقات دربارهٔ اندام‌های مختلف گیاه نشان داده که بذر و اندام‌های رویشی مانند قطعات مریستمی، جوانهٔ انتهایی، جوانه‌های جانبی، محور جنینی و دانهٔ گرده را در بیشتر موارد می‌توان در وضعیت فراسرد نگهداری کرد. کاربرد این فناوری در نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم گیاهی، افقی پایدار و مطمئن در نگهداری ذخائر ژنتیکی گیاهان پدید آورده است. این روش به‌سرعت در حال فراگیر شدن در کشورهای پیشرفته بوده و دانش فنی آن در حال انتقال به آزمایشگاه‌های نگهداری ذخایر ژنتیکی در کشورهای در حال توسعه است [۳].

در صورت ممکن شدن نگهداری بلندمدت بذر گونهٔ ارزشمند ملج در شرایط فراسرد، نگهداری بلندمدت ذخایر توارثی این گونه در کشور امکان‌پذیر شده و از خطر انقراض این ذخائر ژنتیکی ارزشمند جلوگیری خواهد شد.

مواد و روش‌ها

محل جمع‌آوری بذر: بذر این گونه در ۱۳۸۷/۱/۲۰ از رامیان استان گلستان جمع‌آوری شد.

بررسی جوانه‌زنی بذور: به‌منظور دستیابی به‌بهترین روش جوانه‌زنی و رویاندن بذر با آزمایش‌های متعدد مناسب‌ترین روش به‌دست آمد. در این زمینه، پس از استحصال بذر، شیشه‌های حاوی بذر سه بار با آب معمولی در شرایط سترون (درون هود لامینارایرفلو) با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد و مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه شست‌وشو و نگهداری شدند. سپس بذرها سه بار با آب مقطر سترون شسته شده و پس از ضدعفونی بین کاغذ مرطوب سترون در داخل پتری‌دیش قرار داده شدند. پتری‌های حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، منتقل شدند.

آزمایش نگهداری بذر در شرایط فراسرد

پیش‌تیمارهای فراسرد، یا تیمارهای قبل از ورود بذر به نیتروژن مایع به‌شرح زیر است:

محلول ویتریفیکاسیون یا PVS2[2]: به تیوب‌های دردار ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، محلول لودینگ شامل ۰/٤ مول ساکارز و ۲ مول گلیسرول [۹] اضافه شد؛ تیوب‌ها ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محلول کاملاً تخلیه شد و به تیوب‌های حاوی بذر، محلول PVS2 (٤ درجهٔ

1. Duplicate

2. Plant Vitrification Solution 2

www.SID.ir

Archive Of SID

سانتی‌گراد) شامل ۱۵ درصد اتیلن گلیکول (w/v)، ۱۵ درصد DMSO (w/v)، ۳۰ درصد گلیسرول (w/v) و ۰/٤ مول ساکارز اضافه شد. در تیوب‌ها بسته شد و تیوب‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب ٤ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس وارد نیتروژن مایع شدند.

آبگیری[1]: آزمایش مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوبت بذر، بدون وارد آمدن صدمه به جوانه‌زنی آن انجام گرفت. به‌منظور تعیین رطوبت کل بذرها، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس (۱/۱۰۰۰۰) توزین و به‌عنوان وزن اولیهٔ بذر (FW) یادداشت شد. بذرها ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و بلافاصله با ترازوی حساس توزین شدند و وزن خشک آنها به‌دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر با استفاده از رابطهٔ ۱ محاسبه شد:

$$\text{درصد رطوبت بذر} = (FW-DW)/DW*100 \qquad (1)$$

به‌منظور کاهش رطوبت بذرها، حدود ۲۰ گرم بذر تازه توزین شد و به دسیکاتور حاوی ۲۰۰ گرم سیلیکاژل انتقال یافت و ۷ روز در سردخانه با دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. بذر از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین و درصد رطوبت بذر پس از خشک شدن در دسیکاتور با استفاده از رابطهٔ بالا محاسبه شد. با استفاده از رطوبت کل بذر و مقدار رطوبت بذر پس از قرار گرفتن در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر در دسیکاتور محاسبه شد که این کاهش معادل ۳۰/٦۷ درصد رطوبت کل بذرها بود. سپس بذرهای خارج‌شده از دسیکاتور وارد تیوب‌های دردار ۵۰ میلی‌لیتری منفذدار شده و بلافاصله وارد نیتروژن مایع شدند.

گلیسرول ۳۰ درصد: تیوب‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، با گلیسرول ۳۰ درصد پر شده و ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس وارد نیتروژن مایع شدند.

بذر شاهد: سه نمونه بذر به‌عنوان بذر شاهد برای استفاده در آزمایش‌های یک هفته یک ماه و یک سال در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و به‌عنوان شاهد آزمایش از آنها استفاده شد.

تیمار اصلی فراسرد (مدت زمان نگهداری بذور در نیتروژن مایع): بذرها به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در داخل نیتروژن مایع نگهداری شدند.

پس‌تیمارها (تیمارهای پس از خروج بذر از نیتروژن مایع)

۱. پس‌تیمار آب‌گرم: بذرها پس از خروج از نیتروژن مایع به‌مدت ۲ دقیقه در حمام آب‌گرم ٤۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۲. پس‌تیمار محلول غلیظ ساکارز: بذرها پس از بیرون آوردن از آب گرم و متعادل شدن با دمای محیط، به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکارز ۱/۵ مول سترون قرار داده شدند. سپس سه بار با آب مقطر سترون شست‌وشو شدند. آن‌گاه بخشی از بذرها بین کاغذ مرطوب سترون داخل پتری قرار داده شدند. پتری‌های حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. بخش دیگر بذرها برای کشت در گلخانه استفاده شد.

طرح آزمایشی: طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش‌تیمارهای فراسرد و مدت زمان ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع و با به‌کارگیری طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. پیش‌تیمارهای

1. Desiccation

www.SID.ir

Archive Of SID

فراسرد شامل محلول ویتریفیکاسیون، آبگیری، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد تشکیل‌دهندهٔ سطح فاکتور A بودند. سه دورهٔ زمانی یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع، تشکیل‌دهندهٔ سه سطح فاکتور B در این آزمایش بودند. هر پتری‌دیش دارای ۵۰ بذر واحدهای آزمایشی در این آزمایش بود. صفات اندازه‌گیری‌شده در این آزمایش عبارت بودند از طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، درصد جوانه‌زنی شاخص بنیهٔ بذر (VI)، سرعت جوانه‌زنی و نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه (R/S). شاخص بنیهٔ بذر با استفاده از فرمول ارائه‌شده [۱۰] محاسبه شد و تجزیهٔ واریانس داده‌ها و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

آزمون گلخانه: بذر تیمارهای مختلف فراسرد و شاهد مربوط به‌مدت زمان‌های ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع در شرایط گلخانه و داخل گلدان‌های پلاستیکی با نسبت یک‌سوم خاک، یک‌سوم پیت‌ماس و یک‌سوم ماسه کشت شد. آبیاری گلدان‌ها هفت روز یک‌بار در نظر گرفته شد. درصد استقرار و تولید نهال‌های جوان یادداشت شد. در این آزمایش از طرح فاکتوریل با تکرارها و تیمارهای مشابه برای صفت استقرار بذر استفاده شد. تجزیهٔ واریانس داده‌های آزمایش و مقایسهٔ میانگین‌ها با نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌های مقدماتی نشان داد که عوامل پنهان و مؤثری در روند کار وجود دارد. یکی از این عامل‌ها، تأثیر به‌شدت منفی پیش‌تیمارهای شیمیایی در صفات مختلف بذر بدون وارد شدن به نیتروژن مایع یا شرایط فراسرد بود. بر این اساس و به‌منظور مشخص کردن نقش انحصاری پیش‌تیمارها در جوانه‌زنی و سایر صفات بذر، تیماری با عنوان "تیمار صفر" در نظر گرفته شد که در آن کلیهٔ پیش‌تیمارها شامل ویتریفیکاسیون، آبگیری و گلیسرول ۳۰ درصد در بذرها اعمال شد، بدون اینکه بذرهای تیمارشده وارد نیتروژن مایع شوند. این بذرها نیز همراه بذر شاهد کشت شد. در جدول ۱ اثرهای متقابل پیش‌تیمارهای مختلف و نیز زمان‌های ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع به‌همراه تیمارهای شاهد بر میانگین صفات مختلف ارائه شده است.

بر اساس داده‌های جدول ۱ در تیمار صفر (بدون ورود بذور تیمارشده به شرایط فراسرد یا نیتروژن مایع) حداکثر جوانه‌زنی مربوط به بذور شاهد با ۷۷/۳۳ درصد و سپس بدون وجود اختلاف معنی‌دار پیش‌تیمار آبگیری با ۷٤/۳۳ درصد بود. ولی میانگین درصد جوانه‌زنی در پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب ۱۳/۳۳ و ۸/۳۳ درصد بود که کاهش شدیدی در مقایسه با تیمارهای شاهد و آبگیری نشان داد. کاهش شدید درصد جوانه‌زنی بذر در تیمارهای یادشده نشان‌دهندهٔ تأثیر سوء گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون بر جوانه‌زنی بذر ملج بود، بدون اینکه بذور وارد نیتروژن مایع شده باشند (شکل ۱). سرعت جوانه‌زنی و سایر صفات بررسی‌شده نیز تقریباً روندی مشابه با جوانه‌زنی بذر نشان دادند. برای نمونه، سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد و آبگیری به‌ترتیب ۲۲/۷٤ و ۲۱/٦۳ درصد (بدون تفاوت آماری) و در تیمارهای گلیسرول و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب ۱/٦۰ و ۱/۰۸ درصد بود که تفاوت معنی‌داری داشتند. نتایج فوق یادشده نشان داد که بذر ملج به‌شدت تحت تأثیر منفی مواد شیمیایی و گلیسرول موجود در تیمارهای مذکور واقع شده است.

www.SID.ir

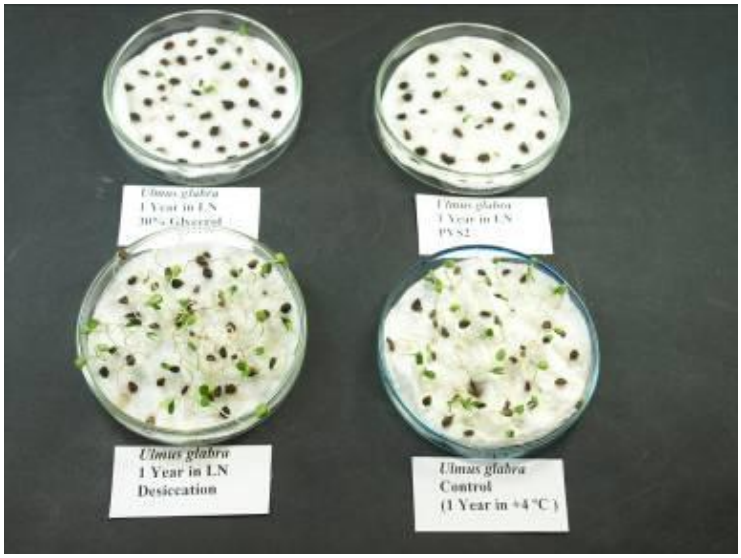
Archive Of SID

در تیمارهای فراسردی یا نگهداری بذر در نیتروژن مایع یا برودت ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال، میانگین جوانه‌زنی و میانگین سایر صفات، اختلاف ناچیزی با پیش‌تیمارهای غیرفراسردی (تیمار صفر) داشتند که این اختلاف ناچیز دلیلی بر تأثیر منفی برودت نیتروژن مایع نیست.

جدول ۱. اثر پیش‌تیمارهای مختلف بر ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع در مقایسه با شاهد (نگهداری در شرایط عادی) به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال بر صفات مختلف جوانه‌زنی بذر

زمان نگهداری	تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیهٔ بذر (VI)	نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه
تیمار صفر	شاهد	۷۷/۳۳ a	۲۹/۵۲ a	۴۷/۳۵ a	۷۶/۸۷ a	۲۲/۷۴ a	۵۹/۸۲ a	۰/۶۲cde
	گلیسرول ۳۰درصد	۱۳/۳۳ c	۹/۴۷ d	۱۳/۳۳ d	۲۲/۸۰ d	۱/۶۰ d	۳/۰۳ d	۰/۷۲ bc
	آبگیری	۷۴/۳۳ a	۲۷/۲۰ ab	۴۲/۶۰ ab	۶۹/۸۰ab	۲۱/۶۳ a	۵۱/۸۵ab	۰/۶۴ bcd
	ویتریفیکاسیون	۸/۳۳ c	۹/۷۳ d	۱۳/۰۷ d	۲۲/۸۰ d	۱/۰۸ d	۱/۹۱ d	۰/۷۵ ab
یک‌هفته	شاهد	۷۸/۳۳ a	۳۰/۶۷ a	۵۰/۶۷ a	۸۱/۳۳ a	۲۳/۰۴ a	۶۴/۹۳ a	۰/۶۱ de
	گلیسرول ۳۰درصد	۹/۶۷ c	۸/۰۰ d	۱۰/۶۰ d	۱۸/۶۰ d	۱/۲۷ d	۱/۷۹ d	۰/۷۵ a
	آبگیری	۶۶/۳۳ ab	۲۲/۳۰ bc	۳۵/۶۷ bc	۵۷/۹۷ bc	۱۹/۷۴ ab	۳۸/۸۸ bc	۰/۶۲ cde
	ویتریفیکاسیون	۷/۶۷ c	۷/۸۷ d	۱۰/۶۷ d	۱۸/۵۳ d	۰/۷۶ d	۱/۴۲ d	۰/۷۴ ab
یک ماه	شاهد	۷۷/۳۳ a	۲۸/۶۰ a	۴۷/۳۳ a	۷۵/۹۳ a	۲۲/۶۰ a	۵۹/۱۸ a	۰/۶۱ de
	گلیسرول ۳۰درصد	۹/۰۰ c	۸/۰۷ d	۱۰/۲۷ d	۱۸/۳۳ d	۱/۰۹ d	۱/۶۴ d	۰/۷۹ a
	آبگیری	۵۳/۳۳ b	۱۹/۰۷ c	۳۰/۰۰ c	۴۹/۰۷ c	۱۶/۳۱ bc	۲۸/۰۹ c	۰/۶۴ cde
	ویتریفیکاسیون	۷/۳۳ c	۸/۰۷ d	۱۰/۸۷ d	۱۸/۹۳ d	۰/۹۶ d	۱/۳۸ d	۰/۷۴ ab
یک‌سال	شاهد	۵۵/۶۷ b	۲۸/۳۳ a	۴۸/۰۰ a	۷۶/۳۳ a	۱۵/۰۷ c	۴۲/۴۰ bc	۰/۶۰ e
	گلیسرول ۳۰درصد	۸/۰۰ c	۶/۷۳ d	۹/۵۳ d	۱۶/۲۷ d	۱/۰۸ d	۱/۲۸ d	۰/۷۳ ab
	آبگیری	۵۸/۳۳ b	۱۸/۶۷ c	۳۰/۰۰ c	۴۸/۶۷ c	۱۵/۹۱ bc	۲۸/۵۲ c	۰/۶۲ cde
	ویتریفیکاسیون	۸/۳۳ c	۸/۸۰ d	۱۱/۶۰ d	۲۰/۴۰ d	۱/۵۶ d	۱/۷۰ d	۰/۷۶ a

در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشترک، در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.



شکل ۱. اثر پیش‌تیمارهای مختلف در جوانه‌زنی بذر ملج پس از یک سال ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع همراه با بذرشاهد

www.SID.ir

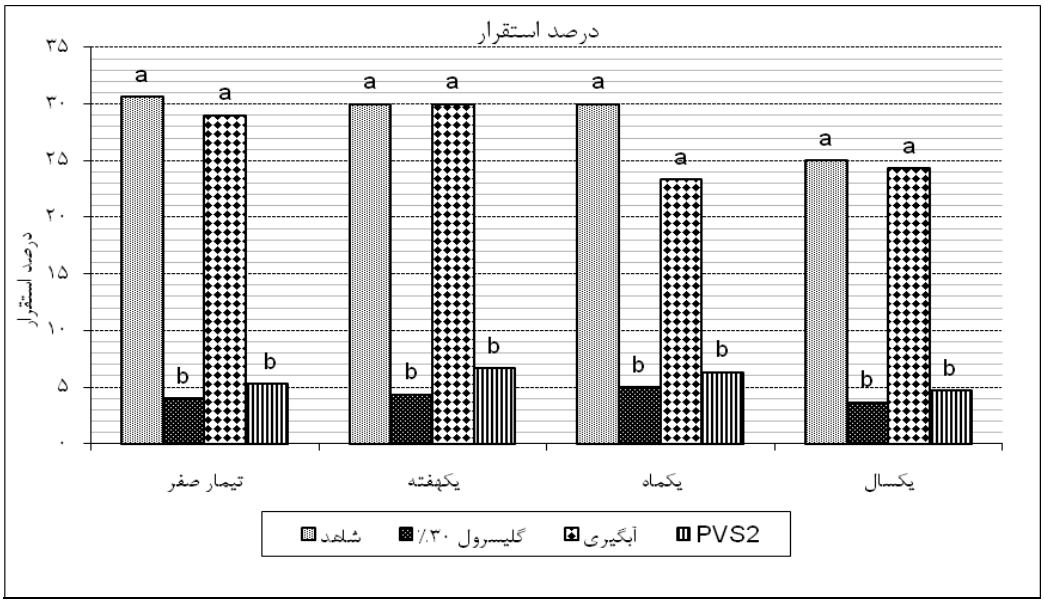
Archive Of SID

همچنین در شرایط گلخانه، درصد استقرار بـذر و رشد نهال‌های جوان مربوط به پیش‌تیمارهای مختلـف و زمان‌های ذخیره‌سازی بـذرها در نیتـروژن مـایع، در جدول ۲ و شکل ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. اثر پیش‌تیمارهای مختلف، ذخیره‌سازی و عدم ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع بر استقرار و رشد نهال در گلخانه

دورهٔ نگهداری	پیش‌تیمار فراسردی	درصد استقرار
تیمار صفر	شاهد	۳۰/ ۶۷ a
	گلیسرول ۳۰ درصد	۴/۰۰ b
	آبگیری	۲۹/۰۰ a
	ویتریفیکاسیون	۵/۳۳ b
یک هفته	شاهد	۳۰ a
	گلیسرول ۳۰ درصد	۴/۳۳ b
	آبگیری	۳۰/۰۰ a
	ویتریفیکاسیون	۶/۶۷ b
یک ماه	شاهد	۳۰/۰۰ a
	گلیسرول ۳۰ درصد	۵/۰۰ b
	آبگیری	۲۳/۳۳ a
	ویتریفیکاسیون	۶/۳۳ b
یک سال	شاهد	۲۵/۰۰ a
	گلیسرول ۳۰ درصد	۳/۶۷ b
	آبگیری	۲۴/۳۳ a
	ویتریفیکاسیون	۴/۶۷ b

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک‌اند، در سطح درصد ۱ معنی‌دار نیستند.



شکل ۲. اثر پیش‌تیمارهای مختلف و ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع و عدم ذخیره‌سازی (تیمار صفر) بر استقرار و تولید نهال در شرایط گلخانه

www.SID.ir

Archive Of SID

بر اساس داده‌های جدول مذکور، تیمار شاهد و پیش‌تیمار آبگیری در تیمار صفر، یک هفته، یک ماه و یک سال نگهداری در نیتروژن مایع تفاوت آماری چندانی نداشتند. پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد نیز با حداقل درصد استقرار روندی مشابه نتایج آزمایشگاهی داشتند. با توجه به موارد یادشده، پیش‌تیمار آبگیری در کلیهٔ صفات، اختلاف ناچیزی با تیمار شاهد نشان داد؛ ولی پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون در کلیهٔ صفات مورد بررسی با اختلاف بسیار زیاد، میانگین بسیار کمتری نسبت به شاهد و آبگیری داشتند. درصد جوانه‌زنی تیمار شاهد پس از یک سال ماندگاری در شرایط عادی به‌طور معنی‌داری از ۷۸/۳۳ درصد در هفتهٔ اول به ۵۵/٦۷ درصد در پایان یک سال کاهش یافت؛ ولی جوانه‌زنی بذرهایی که یک هفته و یک سال در نیتروژن مایع با پیش‌تیمار آبگیری نگهداری شده بودند، بدون اختلاف معنی‌دار، از ٦٦/۳۳ درصد به ۵۸/۳۳ درصد کاهش یافت. سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیهٔ بذر شاهد نیز همانند دو صفت قبلی کاهش نشان داد، درحالی که نتایج آماری نگهداری بذر در نیتروژن مایع، با پیش‌تیمار آبگیری تفاوتی بین یک ماه و یک سال در صفات مورد مطالعه نشان ندادند. این نبود اختلاف نشان‌دهندهٔ ثبات شاخص بنیهٔ بذر در شرایط نگهداری در نیتروژن مایع یا فراسرد نشان‌دهندهٔ امکان نگهداری ژرم‌پلاسم گونهٔ ملج در شرایط فراسرد برای قرن‌هاست. در مورد اثرهای مثبت کاهش رطوبت بررسی‌های متعددی صورت گرفته است. در جنین سوماتیکی گیاه *Cassava* کاهش رطوبت نمونه با پیش‌تیمار آبگیری سبب افزایش چشمگیر زنده‌مانی نمونه‌های فراسردی شد [۱۱] که دلیل آن کاهش اثرهای سوء تجمع مولکول‌های آب و شکل‌گیری کریستال یخ بود. در بذر مرکبات گونهٔ *Citrus aurantifolia* نیز کاهش رطوبت بذر، زنده‌مانی بذر را در شرایط فراسرد تا حد زیادی افزایش داد [۱۲] که این نتایج با یافته‌های این تحقیق دربارهٔ بذر *Ulmus glabra* مطابقت دارد.

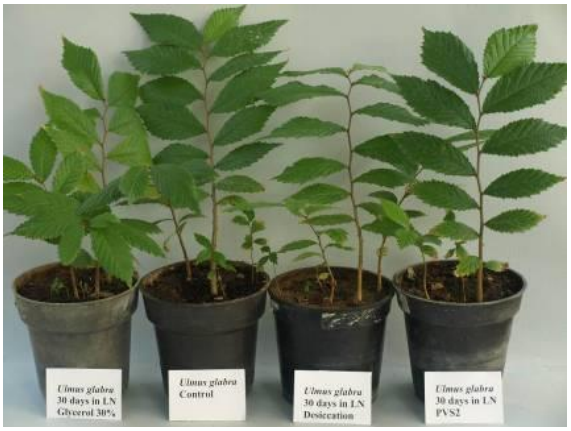
نکتهٔ بسیار مهم و شایان تأمل اینکه در اغلب بررسی‌ها، به اثر مثبت محلول‌های ویتریفیکاسیون در زنده‌مانی بذر و اندام گیاهی در نیتروژن مایع اشاره شده است [۱۳–۱٤– ۱۵] اما در این پژوهش گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون تأثیر سوء شدیدی بر جوانه‌زنی و دیگر صفات بذر داشتند. البته در گزارش‌های اندکی، به اثر سوء مواد موجود در این تیمارها اشاره شده است [16]. این آثار سوء احتمالاً به‌دلیل نفوذ موادی مانند DMSO[1]، اتیلن‌گلایکول و گلیسرول به درون بذر و اثر مهارکنندگی فرایند جوانه‌زنی و رشد بذر یا جلوگیری از تبادل اکسیژن و گازها بین بذر و فضای بیرونی است. در مورد گلیسرول به‌ندرت به آثار سوء این ماده در جوانه‌زنی بذر یا زنده‌مانی اندام گیاهی اشاره شده است. با این‌حال نتایج این آزمون‌ها نشان‌دهندهٔ آثار سوء این ماده در جوانه‌زنی و سایر صفات مورد بررسی است که البته پژوهش‌های بیشتر در این زمینه ضرورت دارد. از طرفی استقرار بذرهای شاهد و فراسردی پس از آبگیری در شرایط گلخانه، از درصد خوبی برخوردار بود. درصد استقرار بذور فراسردی در طی یک سال نیز از نظر آماری تغییری نداشت. استقرار خوب بذور فراسردی گونهٔ ملج در شرایط گلخانه (شکل ۳) و بروز نیافتن صفات سوء و غیرنرمال در نهال‌های جوان نشان داد که بذر این گونهٔ مهم جنگلی را می‌توان با در نظر گرفتن پراکنش و تنوع رویشگاهی آن از عرصه‌های

1. Dimethyl sulfoxide

www.SID.ir

Archive Of SID

مختلف جمع‌آوری و نسبت به نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم آن اقدام کرد. کاهش جوانه‌زنی به‌نسبت سریع بذور این گونه در شرایط عادی، استفاده از فناوری فراسرد برای نگهداری بلندمدت بذر این گونه را الزام‌آور کرده است [۱۷–۱۸–۱۹].



شکل ۳. نهال‌های حاصل از بذور با پیش‌تیمارهای مختلف در کنار گیاهان حاصل از بذور شاهد

نتیجه‌گیری

سخن آخر اینکه برای نگهداری بذر ملج در شرایط فراسرد، پیش‌تیمار آبگیری مناسب‌ترین پیش‌تیمار است و از کاربرد پیش‌تیمارهایی مانند گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون باید خودداری کرد. با توجه به خطرهای تهدیدکنندهٔ این گونهٔ گیاهی و عرصه‌های رویشگاهی آن و همچنین تهدید جدی بیماری پاندمیک مرگ نارون در دنیا و از جمله ایران، توصیه می‌شود در اولین فرصت نسبت به جمع‌آوری و نگهداری بذر این گونه در شرایط فراسرد اقدام شود تا در صورت به مخاطره افتادن این گونه در کشور یا تهدید خطر انقراض آن، بتوان با کشت بذور ذخیره‌شده در کرایو بانک نسبت به احیای مجدد آن با روش‌های معرفی‌شده در این مقاله اقدام کرد.

References

[1]. Harvengt, L. (2004). Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 43-55.

[2]. Salomão, A.N. (2002). Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14 (2):133-138

[3]. Caswell, K.L., and Kartha, K.K. (2009). Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. *CryoLetters*, 30(1): 41-46.

[4]. Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Rey, H., Mroginski, L., and Engelmann F. (2006). Cryopreservation of seeds and *in vitro*–cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 27(4): 235-242.

[5]. Walters, C., Touchell, D.H., Power, P., Wesley-Smith, J., and Antolin, M.F. (2002). A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. *CryoLetters*, 23: 291-298.

[6]. Santos, I.R.I., and Stushnoff, C. (2003). Desiccation and freezing tolerance of embryonic axes from *Citrus sinensis* (L.) OSB. pretreated with sucrose. *CryoLetters*, 24(5): 281-292.

[7]. Chmielarz, P., March, G.G., and Boucaud, M.T. (2005). Cryopreservation of *Quercus robur* L. embryogenic calli. *CryoLetters*, 26(6): 349-356.

[8]. Sánchez, C., Martinez, M.T., Vidal, N., San–José, M.C., Valladares, S., and Vieitez, A.M. (2008). Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters*, 29(6): 493-504.

www.SID.ir

Archive Of SID

[9]. 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.

[10]. Abdul-Baki, A.A., and Anderson, J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13**:** 630-633.

[11]. 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.

[12]. 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.

[13]. 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.

[14]. González-Arnao, M.T., Juárez, J., Ortega, C., Navarro, L., and Duran-Vila, N. (2003). Cryopreservation of ovules and somatic embryos of *Citrus* using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 24: 85-94.

[15]. Ellis, D., Skogerboe, D., Andre, C., Hellier, B., and Volk, G. (2006). Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *CryoLetters*, 27(2): 99-106.

[16]. Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O. and Shaw J.M. (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 (2): 119-130.

[17]. Walters, C., Wheeler, L. J., and Stanwood, P.C. (2004). Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244.

[18]. Naderi Shahab, M.A., 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.

[19]. Mix-Wagner, G., Schumacher, H.M., and Cross, R.J. (2003). Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetters*, 24 (1): 33-42.

www.SID.ir