

نگهداری بذر پده (*Populus euphratica* Oliv.) در شرایط فراسرد (Cryopreservation) و ارزیابی بذور فراسردی در آزمایشگاه و گلخانه

مریم جبلی^{۱*}، محبت‌علی نادری شهاب^۲، حمیدرضا فیضی^۳ و علی‌اشرف جعفری^۴

۱ و ۲. ۴. کارشناس ارشد پژوهشی، استادیار پژوهش و استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

۳. کارشناس، اداره منابع طبیعی شهرستان املش، استان گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۴/۲۱)

چکیده

پده (*Populus euphratica* Oliv.) گونه بومی مقاوم به گرما، سرما و شوری است و دامنه اکولوژیک گسترده‌ای دارد. ماندگاری بذر پده در شرایط متعارف بسیار کوتاه است و امکان نگهداری آن در شرایط بانک ژن وجود ندارد. برای نگهداری بذر این گونه در شرایط عادی ($+22^{\circ}\text{C}$) و فراسرد یا ازت مایع (-196°C) از سه تیمار PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و آبگیری همراه با بذور شاهد استفاده شد. بذور به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در شرایط فراسرد ذخیره و در $+22^{\circ}\text{C}$ به ژرمیناتور وارد شدند. جوانه‌زنی بذور در $+22^{\circ}\text{C}$ در پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و PVS2، از ۹۰ درصد به ۳۵/۰۰ و ۴۱/۶۷ کاهش یافت. جوانه‌زنی در یک سال ذخیره‌سازی، در شرایط فراسرد (-196°C) از ۹۰ درصد به ۲۶/۶۷ و ۲۸/۳۳ کاهش یافت. تیمار کاهش رطوبت بذر یا آبگیری بهترین نتیجه را در جوانه‌زنی و استقرار بذر در آزمایشگاه و گلخانه داشت. بذور شاهد در شرایط عادی بیش از چند ماه زنده‌مانی نداشتند و بذور فراسردی نیز در طول یک سال ماندگاری در شرایط فراسرد (-196°C) تغییری در زنده‌مانی، جوانه‌زنی و استقرار آن‌ها مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آبگیری، بذر *Populus euphratica*، فراسرد، نیتروژن مایع.

مقدمه

پده (*Populus euphratica* Oliv) از خانواده Salicaceae است و در ایران، افغانستان، پاکستان، عراق، آسیای مرکزی و جنوبی، چین و شمال آفریقا رویش دارد (Sabeti, 2006). رویش این گیاه در ایران در اغلب استان‌های کشور به صورت گسترده، محدود یا لکه‌ای بررسی شده است (Soleimani et al., 2011; Calagari et al., 2007). مقاومت پده به شرایط سخت محیطی مانند گرما، خشکی و شوری بیشتر از سایر گونه‌های جنس *Populus* است. این گیاه با شرایط گرم جنوب کشور مانند خوزستان کاملاً سازگاری دارد و به صورت طبیعی در کنار کارون و رودخانه‌های پرآب مستقر می‌شود و نقش بسیار مهمی در جلوگیری از فرسایش خاک و اراضی حاشیه رودخانه‌ها

دارد. براساس بررسی‌های نگارنده از رویشگاه‌های کشور، گونه *P. euphratica* در تالاب شیمبار به طور خارق‌العاده‌ای داخل آب (Wetland) مستقر می‌شود و شرایط ماندابی را به طور عجیبی تحمل می‌کند. در شرایط گرم، خشک و کویری ریگ‌بلند کاشان، پده به طور طبیعی در خشن‌ترین شرایط مستقر و تکثیر شده است. در مناطق سرد و عرض جغرافیایی بسیار بالا در شمال شرق کشور، در کنار رودخانه ارس توده‌ای از این گونه به طور طبیعی مستقر شده است. این گستره رویشی در اقلیم‌های مختلف، بیانگر سازگاری خارق‌العاده و گسترده‌ی دامنه اکولوژیک این گونه ارزشمند در کشور است.

از پده می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی با هدف انتقال صفت مقاومت به شوری و خشکی به سایر گونه‌های

باید مقدار کاهش رطوبت بهینه‌شده و پس از تعیین رطوبت مناسب به ذخیره‌سازی بذر اقدام کرد. در گونه *Livistana chinensis* بهترین زمان نگهداری جنین بذور اواخر دوره رسیدگی و با محتوای رطوبت حدود ۲۰ درصد است (Wen & Song, 2007). در صورت کاهش بیش از حد رطوبت، زنده‌مانی بذور کاهش می‌یابد. بنابراین، برای نگهداری جنین بذور نارس این گروه از گیاهان در فراسرد، باید درصد رطوبت جنین بهینه شود.

کاهش یا تنظیم محتوای آب بذر یا نمونه گیاهی قبل از ورود به شرایط فراسرد نقش مهمی در زنده‌مانی نمونه گیاهی دارد. در گونه *Bletilla striata* بذور رسیده و خشک به دلیل درصد آب کمتر در مقایسه با بذور آب جذب کرده زنده‌مانی بیشتری پس از گذراندن شرایط فراسرد دارند (Jitsopakul et al., 2008). در پژوهشی نگهداری جوانه‌های جانبی هیبرید بین گونه‌ای جنس اکالیپتوس *E. ×Eucaliptus gradis* گونه‌ای *camadulensis* در دمای فراسرد بررسی شد (Blakesley & Kiernan, 2001). همچنین جوانه‌های انتهایی صنوبر (*Populus alba*) نیز توسط Lambardi et al. (2000) در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) قرار گرفتند که مشاهده شد که پس از خروج از فراسرد نمونه‌ها تا ۹۰ درصد قدرت زیستی خود را حفظ می‌کنند. در آزمایش دیگری در دو وارسته از جنس مرکبات تیمار ویتریفیکاسیون، سبب موفقیت در ذخیره‌سازی جوانه‌های انتهایی این وارسته‌ها در شرایط فراسرد شد (Wang & Deng, 2004). بررسی‌های فوق نشان می‌دهد استفاده از روش پیش تیمار و محلول‌های مناسب برای ذخیره‌سازی بذر یا اندام گیاهی نقش حیاتی در زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی دارد (Cho et al., 2002a & 2002b).

مشکل اساسی در نگهداری این دسته از گونه‌های گیاهی در بانک ژن، تکثیر غیرجنسی آن‌هاست که در این صورت نگهداری کلون‌های آن در بانک ژن امری ناممکن است. از طرفی به دلیل کوتاه‌بودن عمر بذر گونه‌های جنس *Populus* نمی‌توان بذور گونه‌های این جنس را در شرایط متعارف نگهداری کرد. این امر اضافه بر اینکه بقای گونه‌های طبیعی را تهدید کرده است، محدودیت‌هایی را نیز برای نگهداری بذور حاصل از برنامه‌های به‌نژادی ایجاد

جنس *Populus* استفاده کرد. در همین زمینه، Mofidabadi et al. (1998) و Jafari & Kalagary (2004) با استفاده از روش کشت تخمک و تخمدان توانستند هیبرید بین گونه‌ای *Populus alba* x *P. euphratica* را تولید کنند. این دستاورد مهم امکان استفاده از این گونه ارزشمند را در تولید هیبریدهای بین گونه‌ای منحصربه‌فرد فراهم آورده است. در آزمایش دیگری Calagari et al. (2004)، دورگ‌گیری درون‌گونه‌ای پده را با استفاده از نجات رویان انجام دادند. با انجام اصلاح درون‌شیشه‌ای Mofidabadi et al. (2001) با روش تنوع گامتوکلونال اقدام به تهیه ژنوتیپ‌های جدید پده کردند که نتایج آن موفقیت‌آمیز بود. در بررسی تنوع ژنتیکی پده‌های ایران Calagari et al. (2002) با استفاده از آنزیم پراکسیداز، تنوع ژنتیکی جوامع پده ایران را بررسی کردند و از وجود تنوع بین جوامع مختلف کشور خبر دادند. در همین زمینه Saito et al. (2002)، نیز با استفاده از روش مولکولی تنوع ژنتیکی جوامع پده را در شمال غرب چین بررسی کردند و گزارش دادند که بعضی از جوامع ایزوله از نظر ژنتیکی تفاوت زیادی با سایر جوامع پده در این کشور دارند.

نگهداری بلندمدت اغلب بذور ارتدوکس (orthodox) به دلیل کم‌بودن محتوای آب، در شرایط فراسرد به‌خوبی امکان‌پذیر است و یکی از روش‌های کارآمد محسوب می‌شود (Naderi Shahab et al., 2009). ولی بذور intermediate به دلیل محتوای زیاد آب، در مقایسه با بذور ارتدوکس پاسخ متفاوتی به شرایط فراسرد نشان می‌دهند. بنابراین، قبل از ورود بذر به شرایط فراسرد، کاهش رطوبت بذر یا Desiccation ممکن است در تحمل این شرایط تعیین‌کننده باشد. به‌طوری‌که در تعدادی از گونه‌ها کاهش بیش از حد رطوبت بذر (۳-۳/۵ درصد) ممکن است درصد جوانه‌زنی بذر را به ۲۳-۴۰ درصد کاهش دهد. درحالی‌که در *Passiflora karminiana* با رطوبت حدود ۹ درصد، جوانه‌زنی بذر ممکن است به ۸۴ درصد هم برسد (Gonzalez-Benito et al., 2009). از طرفی در بذور intermediate کاهش بیش از حد رطوبت، قبل از ورود بذر به شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) ممکن است جوانه‌زنی بذر را پس از خروج از آن به‌شدت کاهش دهد. بنابراین،

آزمون‌های نگهداری بذر در فراسرد

(Cryopreservation)

پیش‌تیمارهای فراسرد، یا تیمارهای قبل از ورود بذرها به شرایط فراسرد (-196°C) شامل سه مرحله بود.

(Plant Vitrification Solution 2) PVS2

به کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی بذر، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول لودینگ شامل: ساکاروز (۰/۴M) و گلیسرول (۲M) افزوده و ۲۰ دقیقه در دمای $+22^{\circ}\text{C}$ قرار داده شدند (Matsumoto et al., 1994). سپس محلول را کاملاً تخلیه کرده و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول PVS2 شامل: اتیلن گلیکول (۱۵ درصد)، (۱۵ درصد) DMSO، گلیسرول (۳۰ درصد) و ساکاروز (۰/۴M) اضافه کرده و ۲۰ دقیقه در آب $+4^{\circ}\text{C}$ قرار گرفتند (Sakai et al., 1991). کرایوتیوپ‌های حاوی بذر وارد شرایط فراسرد (-196°C) شدند.

آبگیری یا Desiccation

آزمایش‌های مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوبت بذر، بدون وارد آمدن صدمه محسوس به جوانه‌زنی آن انجام شد. ابتدا به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌منزله وزن اولیه (FW) یادداشت شد. بذرها مدت ۷۲ ساعت در خشک‌کن با دمای 75°C قرار داده شدند. سپس از دستگاه خشک‌کن خارج و بلافاصله با ترازوی حساس توزین شدند و وزن خشک بذر به دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر ($17/60$) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

به‌منظور تهیه بذر مورد نیاز تیمار Desiccation، ۱۰ گرم بذر تازه توزین و به دسیکاتور حاوی ۱۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در سردخانه با دمای $+4^{\circ}\text{C}$ نگهداری شد. بذر از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین شد. درصد رطوبت بذرها پس از رطوبت‌گیری در دسیکاتور با استفاده از فرمول فوق محاسبه شدند (۱۳/۹۰ درصد). با در دست داشتن رطوبت کل بذر ($17/60$ درصد) و مقدار رطوبت بذر پس از قرارگرفتن در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر مقایسه با رطوبت کل محاسبه شد که این کاهش

می‌کند. بذر گونه *Populus* با در نظر گرفتن اصل حفظ تنوع ژنتیکی گونه‌ها از عرصه‌ها، رویشگاه‌ها و اقلیم‌های مختلف، جمع‌آوری و با اعمال تیمار مناسب فراسردی در شرایط فراسرد (-196°C) بررسی شدند تا در صورت راه‌اندازی کرایوبانک منابع طبیعی کشور (مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع)، بذر را به‌صورت اصولی نگهداری کنند تا بتوان در صورت بروز هرگونه خطر و تهدید، از بذر ذخیره‌شده برای احیای عرصه‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

محل جمع‌آوری بذر

بذر پده (*Populus euphratica* Oliv.) از پایه‌های موجود در عرصه درختکاری گروه تحقیقات زیست فناوری مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در خردادماه جمع‌آوری شد.

استحصال بذر

ابتدا کیسول‌های رسیده حاوی بذر که در مرحله باز شدن بودند از درختان برداشت شد. بذر بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از دستگاه آسیاب کوچک (مولینکس) کرک‌زدایی و بذر بدون کرک تهیه شد. به‌دلیل وجودنداشتن اختلاف در جوانه‌زنی بذر کرک‌دار و بدون کرک، در کلیه آزمایش‌های از بذر کرک‌زدایی شده استفاده شد. کار با بذره‌های کرک‌زدایی شده آسان‌تر و امکان حذف آلودگی‌های فیزیکی و بذره‌های فاسد و نارس وجود دارد. همچنین درصد آلودگی بذر کرک‌زدایی شده کمتر و ارزیابی‌های آماری دقیق‌تر و بدون اشکال است. وزن هزاردانه بذر $0/072$ گرم بود.

جوانه‌زنی و استقرار بذر

ابتدا بذرها در شرایط استریل (داخل هود لامینار ایرفلو) ۸ بار با آب‌مقطر استریل (همراه با تکان دادن) شست‌وشو شدند. سپس بین کاغذ مرطوب داخل پتری دیش استریل قرار گرفتند و به ژرمیناتور با دمای $+22^{\circ}\text{C}$ با نور مداوم منتقل شدند. بذرها بعد از ۲۴ ساعت شروع به جوانه‌زنی کردند.

۳۰ درصد، آبیگری و شاهد تشکیل دهنده سطح فاکتور اول و چهار بازه زمانی صفر (بدون ورود به ازت مایع)، یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره سازی بذور در شرایط فراسرد (-196°C) تشکیل دهنده سطح فاکتور دوم در این آزمایش بودند. پتری دیش ها هر یک با حدود ۱۰۰ عدد بذر، واحدهای آزمایشی به شمار رفته و صفت اندازه گیری شده در این آزمایش درصد جوانه زنی بذر بود. تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت.

آزمون های گلخانه ای

بذور بر روی سطح گلدان هایی با قطر ۱۵ سانتی متر که به نسبت $\frac{1}{2}$ پیت ماس، $\frac{1}{3}$ خاک و $\frac{1}{3}$ ماسه پر شده بودند پخش شد. گلدان ها داخل تشت آب قرار داده شدند به طوری که ۵ سانتی متر پایین گلدان ها در آب قرار گرفت.

سطح گلدان ها یا روی بذرها یک لایه دستمال کاغذی مرطوب قرار داده شد. درصد استقرار بذر و تولید نهال در هر یک از تیمارها اندازه گیری و طرح آزمایشی فاکتوریل استفاده شد. تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین ها با نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج

در بررسی های مقدماتی که به منظور بهینه کردن روش ها و پیش تیمارهای فراسرد صورت گرفت، مشخص شد که بذور پده بدون اینکه وارد شرایط فراسرد (-196°C) شوند، در دمای $+22^{\circ}\text{C}$ به پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت یا آبیگری و محلول PVS2 عکس العمل متفاوتی نشان می دهند. به بیان دیگر، هنگامی که بذور با گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و محلول PVS2 تیمار شدند، جوانه زنی بذور این پیش تیمارها بدون اینکه وارد شرایط فراسرد (-196°C) شوند کاهش چشمگیری نشان داد. بنابراین، در طراحی آزمایش ها، بذرها شاهد و تیمار شده با گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و محلول PVS2 به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول بدون اینکه وارد ازت مایع شوند ارزیابی آزمایشگاهی و گلخانه ای شدند تا اثر هر یک از پیش تیمارها در جوانه زنی بذر بدون

معادل ۲۱ درصد رطوبت کل بذر بود. بذور بلافاصله وارد کرایوتیوپ های ۲ میلی لیتری شدند و به ازت مایع یا فراسرد (-196°C) منتقل شدند.

گلیسرول ۳۰ درصد

درون کرایوتیوپ های ۲ میلی لیتری حاوی بذر، گلیسرول ۳۰ درصد ریخته و ۲۰ دقیقه در دمای $+22^{\circ}\text{C}$ قرار داده شدند. پس از آن کرایوتیوپ های وارد ازت مایع (-196°C) شدند.

بذور تحت تیمار در داخل ازت مایع یا فراسرد (-196°C) و سه نمونه بذر به منزله شاهد برای استفاده در آزمایش های در $+4^{\circ}\text{C}$ به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال نگهداری شدند.

آزمایش اثر پیش تیمارها بر جوانه زنی بذر

قسمتی از بذور تیمار شده با PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و آبیگری شده قبل از ورود به ازت مایع همراه با شاهد، بین کاغذ مرطوب در پتری دیش کشت و وارد ژرمیناتور با دمای $+22^{\circ}\text{C}$ شدند تا فقط اثر پیش تیمارها بر جوانه زنی بذر ارزیابی شود.

تیمارهای پس از خروج بذر از ازت مایع یا فراسرد (-196°C)

به منظور ایجاد شوک حرارتی، بذور پس از خروج از ازت مایع به مدت ۲ دقیقه در آب $+42^{\circ}\text{C}$ قرار داده شدند. سپس بذرها از آب گرم خارج شدند و ۳۰ دقیقه در محلول ساکاروز $\frac{1}{5}$ مولار استریل قرار گرفتند. در شرایط استریل، بذور ۸ بار با آب مقطر استریل شست و شو و سپس بین کاغذ مرطوب استریل قرار داده شدند. پتری های حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای $+22^{\circ}\text{C}$ با شدت نور ۱۰ وات بر متر مربع (مداوم) منتقل شدند.

طرح آزمایشی

طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش تیمارهای فراسرد (-196°C) و زمان ذخیره سازی در آن با به کارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. پیش تیمارهای فراسرد (-196°C) شامل PVS2، گلیسرول

تأثیرپذیری از شرایط فراسرد (-196°C) مشخص شود. هفته، یک ماه، و یک سال در شرایط فراسرد نگهداری ۳ گروه دیگر (به استثنای شاهد) به ترتیب به مدت یک شدند.

جدول ۱. اثر پیش تیمارهای مختلف همچنین یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره سازی و عدم ذخیره سازی بذر پده در ازت مایع یا فراسرد (-196°C) بر درصد جوانه زنی بذر در شرایط آزمایشگاه و استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه

درصد جوانه زنی بذر (آزمایشگاه)	درصد استقرار گیاهچه (گلخانه)	پیش تیمار	زمان ذخیره سازی در ازت مایع (بدون ذخیره سازی در فراسرد)
۹۰ a	۷۶/۶۷ a*	شاهد	یک هفته
۳۵ cd	۲۵ ef	گلیسرول ۳۰٪	گلیسرول ۳۰٪
۷۵ b	۶۸/۳۳ abc	آبگیری	آبگیری
۴۱/۶۷ c	۳۱/۶۷ e	محلول PVS2	محلول PVS2
۸۶/۶۷ a	۷۳/۳۳ ab	شاهد	یک ماه
۲۸/۳۳ d	۲۱/۶۷ ef	گلیسرول ۳۰٪	گلیسرول ۳۰٪
۷۳/۳۳ b	۶۳/۳۳ c	آبگیری	آبگیری
۳۳/۳۳ cd	۲۵ ef	محلول PVS2	محلول PVS2
۶۸/۳۳ b	۵۰ d	شاهد	یک سال
۳۰ d	۲۳/۳۳ ef	گلیسرول ۳۰٪	گلیسرول ۳۰٪
۷۱/۶۷ b	۶۵ bc	آبگیری	آبگیری
۳۱/۶۷ d	۲۳/۳۳ ef	محلول PVS2	محلول PVS2
۰/۳۳ e	۱ g	شاهد	یک سال
۲۶/۶۷ d	۲۰/۶۷ f	گلیسرول ۳۰٪	گلیسرول ۳۰٪
۷۰ b	۶۱/۶۷ c	آبگیری	آبگیری
۲۸/۳۳ d	۲۱/۶۷ ef	محلول PVS2	محلول PVS2

* در هر ستون، میانگین‌هایی که حرف یا حروف مشترک دارند در سطح ۱ درصد معنادار نیستند.

بذر پده بسیار زیاد است و به‌ویژه پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 به شدت جوانه زنی بذر را کاهش می‌دهند.

بذوری که با پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و محلول PVS2 تیمار و به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در ازت مایع ذخیره شدند، کاهش جوانه زنی بذر بیشتر از بذوری بود که وارد ازت مایع یا فراسرد نشده بودند. این کاهش مضاعف، به دلیل تأثیر منفی شرایط فراسرد (-196°C) بر جوانه زنی بذر است. نکته بسیار مهم اینکه اثر شرایط فراسرد (-196°C) در کاهش جوانه زنی بسیار ناچیز و یا از نظر آماری تفاوتی بین مدت زمان‌های ذخیره سازی با تیمار بدون ذخیره سازی مشاهده نشد (جدول ۱).

جوانه زنی پیش تیمارهای ۳۰ درصد، آبگیری و

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که درصد جوانه زنی بذرها و همچنین استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه، در نمونه شاهد و پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و محلول PVS2 بدون اینکه در دمای (-196°C) نگهداری شوند تفاوت معناداری دارند (جدول ۱). بذرها شاهد درصد جوانه زنی بسیار بالا و در حد ۹۰ درصد داشتند. لیکن بذوری که با پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و PVS2 تیمار شدند، بدون ورود به ازت مایع درصد جوانه زنی آن‌ها به ترتیب به ۳۵، ۷۵ و ۴۱/۶۷ درصد کاهش یافت. نتیجه اینکه کلیه پیش تیمارها اثر منفی در جوانه زنی بذرها داشتند. بیشترین کاهش مربوط به گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 بود. این نتایج نشان داد که اثر منفی پیش تیمارها در جوانه زنی

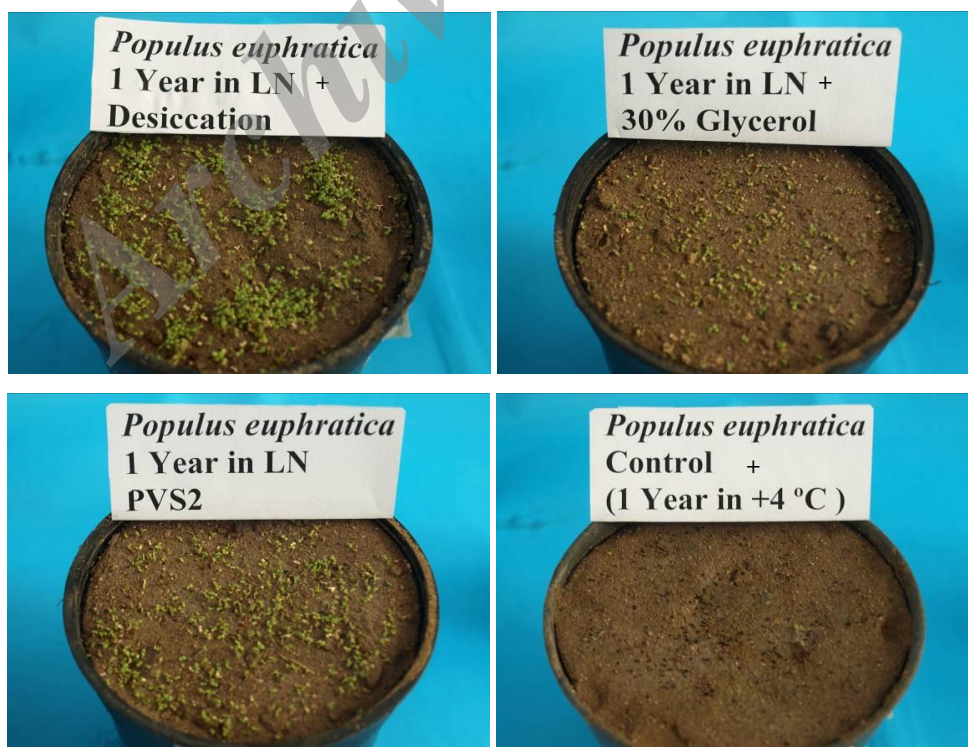
پس از برداشت ۹۰ درصد جوانه‌زنی داشتند و پس از یک هفته، یک ماه و یک سال به ترتیب به ۸۶/۶۷ درصد، ۶۸/۳۳ درصد و ۰/۳۳ درصد (در حد صفر) کاهش یافت (جدول ۱). نتایج تیمار شاهد نشان داد که بذور گونه *P. euphratica* در صورت نگهداری در شرایط عادی به سرعت جوانه‌زنی خود را از دست دادند و پس از یک ماه از ۹۰ درصد به ۶۸/۳۳ درصد و پس از یک سال ماندگاری، جوانه‌زنی به حدود صفر رسید. به منظور بررسی مدت ماندگاری بذر شاهد در شرایط معمولی، آزمون‌های تکمیلی انجام شد که نتایج آن بیانگر ماندگاری بذر به مدت ۴ ماه در شرایط عادی بوده است و پس از این مدت بذرها کاملاً از بین می‌روند.

آزمون‌های گلخانه‌ای

اثر پیش‌تیمارهای مختلف و همچنین یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری بذر پده در ازت مایع یا فراسرد (-196°C) و بذور پیش‌تیمارهایی که وارد ازت مایع یا فراسرد (-196°C) نشده بودند به همراه بذرها در شاهد بر درصد استقرار و رشد نهال‌ها در گلخانه در جدول ۱ و شکل ۱ (سمت چپ) ارائه شده است.

محلول PVS2 در یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در ازت مایع یا فراسرد (-196°C) روند به نسبت ثابتی داشت و زمان ماندگاری بذر در این شرایط سبب کاهش چشمگیر جوانه‌زنی بذور نشد. به عنوان نمونه جوانه‌زنی بذور در پیش‌تیمار آبیگری برای یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در (-196°C) به ترتیب ۷۳/۳۳ درصد، ۷۱/۶۷ درصد و ۷۰ درصد بدون اختلاف معنادار بود (جدول ۱). این نتایج نشان‌دهنده حفظ و ثابت ماندن جوانه‌زنی بذر طی مدت یک سال ماندگاری در ازت مایع بود.

جوانه‌زنی بذور فراسردی در پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد در یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در (-196°C) به ترتیب ۲۸/۳۳ درصد، ۳۰ درصد و ۲۶/۶۷ درصد و در محلول PVS2 به میزان ۳۳/۳۳ درصد (یک هفته)، ۳۱/۶۷ درصد (یک ماه) و ۲۸/۳۳ درصد (یک سال) بود (جدول ۱). به رغم جوانه‌زنی کم در این پیش‌تیمارها، طی ماندگاری در فراسرد (-196°C)، درصد جوانه‌زنی حالت ثابت داشته و از نظر آماری تقریباً زمان نگهداری تغییری در جوانه‌زنی بذر ایجاد نکرده است. لیکن بذور شاهد که در شرایط عادی نگهداری شدند، بلافاصله



شکل ۱. استقرار بذور *P. euphratica* در پیش‌تیمارهای مختلف فراسردی (196°C) پس از یک سال و شاهد

این گونه در شرایط متعارف کمتر از ۴ ماه است و حفظ بذر این گونه در بانک ژن‌های متعارف امکان‌پذیر نیست.

بذر *P. euphratica* از دو منظر به بذر ریکالسیترنت (Recalcitrant) شباهت دارد. نخست محتوای بالای آب بذر که در حد ۱۷/۶۰ درصد است و دوم ماندگاری کوتاه‌مدت بذر که کمتر از چهار ماه بود. لیکن بذر پده به‌عکس بذر ریکالسیترنت، شرایط فراسردی را بسیار خوب تحمل می‌کنند زیرا بذر ریکالسیترنت (مانند بلوط و شاه‌بلوط) به هیچ‌وجه تحمل فراسرد را ندارند و به محض ورود به ازت مایع و همسان‌شدن برودت آن با برودت محیط به‌سرعت از بین می‌روند. بنابراین، در دسته‌بندی بذر، بذر پده از نظر ماندگاری در شرایط متعارف رفتار بذر ریکالسیترنت و از نظر تحمل شرایط فراسردی رفتار بذر ارتدوکس را دارد. در رابطه با نگهداری بذر در فراسرد (-196°C)، نتایج نشان داد که پیش‌تیمارهای فراسردی شامل کاهش رطوبت، محلول PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد تأثیر متفاوتی در ذخیره‌سازی بذر در فراسرد (-196°C) دارند. تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 به‌ترتیب بیشترین تأثیر منفی را در زنده‌مانی، جوانه‌زنی و استقرار بذر در فراسرد و خارج از فراسرد دارند. ریزبودن بذر و نداشتن پوسته محافظ و درصد آب بالا، بذر را به‌شدت در مقابل مواد شیمیایی آسیب‌پذیر کرده است. در تیمار محلول PVS2، موادی مانند DMSO، گلیسرول، ساکاروز و اتیلن گلیکول احتمالاً سبب بروز آثار سوء در بذر شده است. در پاره‌ای موارد به‌دلیل سمیت بعضی از مواد موجود در محلول این پیش‌تیمار تأثیر منفی در زنده‌مانی نمونه‌های فراسردی دارد (Kuleshova et al., 1999) که نتایج این پژوهش نیز با یافته‌های این پژوهشگران همسو است. در تیمار گلیسرول ۳۰ درصد که بیشترین تأثیر سوء را در جوانه‌زنی بذر داشته است، احتمالاً به‌دلیل نفوذ گلیسرول (به‌دلیل هیدروفوبیک بودن آن) به داخل بذر و ایجاد اختلال در تبادل اکسیژن، گازها و ملکول‌های آب بین فضای درونی و بیرونی بذر قرار گرفته و موجب آثار سوء در جوانه‌زنی بذر پده شده است. این در حالی است که Volk et al. (2006) بیان داشتند گلیسرول

درصد سبزکردن و استقرار نهال در گلخانه به‌رغم تفاوت در میانگین‌ها، روندی مشابه بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد. بیشترین درصد استقرار در تیمار غیرفراسرد یا بدون ورود به فراسرد به‌ترتیب مربوط به شاهد (۷۶/۶۷ درصد) آبیگری (۶۸/۳۳ درصد)، محلول PVS2 (۳۱/۶۷ درصد) و گلیسرول ۳۰ درصد (۲۵ درصد) بود که نشان‌دهنده تأثیر سوء پیش‌تیمارها در استقرار بذر در شرایط گلخانه است. در تیمارها و زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع یا فراسرد (-196°C)، درصد استقرار بذر در پیش‌تیمارهای فراسردی و زمان‌های ذخیره‌سازی در شرایط فراسردی روندی تقریباً مشابه شرایط آزمایشگاهی داشت. به‌ترتیب تیمارهای آبیگری، محلول PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد بیشترین استقرار بذر و تولید گیاهچه را دارند و تفاوت چشمگیری در استقرار گیاه در تیمار یک هفته، یک ماه و یک سال مشاهده نشد. این در حالی است که استقرار بذر شاهد (بذر تازه و بدون ورود به فراسرد) با گذشت زمان کاهش نشان می‌دهد به‌گونه‌ای که درصد گیاهچه استقرار یافته در تیمار شاهد، یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در شرایط معمولی به‌ترتیب ۷۶/۶۷ درصد، ۷۳/۳۳ درصد، ۵۰ درصد و ۱ درصد بود (جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲).

بحث

بذر تازه برداشت‌شده پده جوانه‌زنی بالا و در حد ۹۰ درصد داشته است و در این رابطه بررسی‌های انجام‌شده توسط دیگران نیز بیانگر جوانه‌زنی بالای بذر این گونه است (Soleimani et al., 2011). ولی در شرایط متعارف بذر این گونه عمر کوتاهی داشته است و به‌سرعت جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهد. براساس آزمایش‌های انجام‌شده، عمر بذر پده در یک سال ماندگاری در شرایط متعارف به حدود صفر رسید. با توجه به اینکه فاصله بین تیمار یک ماه و یک سال بسیار طولانی بود به‌منظور بررسی دقیق زمان ماندگاری این بذر در شرایط متعارف، آزمایش‌های متعددی انجام شد و مشخص شد پس از ۴ ماه جوانه‌زنی بذر این گونه به حدود صفر می‌رسد. بنابراین، بیشترین ماندگاری بذر

مزیت اقتصادی برای تولیدکنندگان چوب و مواد سلولزی، کشت و تکثیر آن در عرصه‌های زراعی کمتر مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه این گونه به صورت خودرو در عرصه‌های منابع طبیعی رشد می‌کند و ملکیت شخصی و محافظ ندارد، در صورت عدم حفاظت به عنوان هیزم و چوب غیرصنعتی توسط افراد برداشت و امکان از بین رفتن گونه و رویشگاه آن وجود دارد. به عنوان مثال طی ۳ سال اخیر به دلیل تعرض افراد به رویشگاه گیاه در ریگ‌بلند کاشان بخشی از رویشگاه این گونه تخریب و امحا شده و باقی‌مانده آن نیز به شدت در معرض تجاوز و تخریب است. علاوه بر این تغییر کاربری عرصه‌های رویشگاهی گیاه، کاهش جریان آب رودخانه‌های بزرگ به دلیل اجرای طرح‌های مهار و انتقال آب، افت سطح آب‌های زیرزمینی، آتش‌سوزی و غیره، این گونه را در معرض خطر جدی قرار داده است.

با توجه به نتایج ارزشمندی که برای جوانه‌زنی، استقرار و رشد بذر این گونه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به دست آمده است می‌توان نسبت به تهیه نهال بذری از بذور فراسردی به‌آسانی اقدام کرد. برای حفظ تنوع ژنتیکی این گونه، می‌توان بذر این گونه را از رویشگاه‌های مختلف کشور جمع‌آوری و با روش کاهش رطوبت یا Desiccation تیمار و در شرایط ازت مایع یا فراسرد (-196°C) برای مدت زمان بسیار طولانی و در مقیاس هزاران سال (Walters et al., 2004) نگهداری کرد (شکل ۲). علاوه بر اینکه با استفاده از روش‌های فراسردی می‌توان بذور هیبرید و بذور حاصل از طرح‌های به‌نژادی ارقام و گونه‌ها را برای استفاده در طرح‌های آتی به صورت بلندمدت نگهداری کرد.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور که اعتبار مورد نیاز این پژوهش را که در قالب طرح مصوب «بررسی امکان نگهداری بذر تعدادی از گونه‌های جنگلی در شرایط فراسرد» تأمین کردند، تشکر می‌شود. همچنین از جناب آقای دکتر قمری‌زارع، رئیس وقت محترم بخش زیست‌فناوری مؤسسه، به دلیل همکاری در جمع‌آوری بذور و از جناب آقای حسین نیک‌چهره به دلیل راهنمایی در تنظیم متن، تشکر و قدردانی می‌گردد.

برای سلول‌های گیاهی سمی است و اگر مدت طولانی در معرض آن قرار گیرد مشکل‌آفرین می‌شود. از طرفی نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای (جدول ۱ و شکل ۱) نشان می‌دهد که تیمار کاهش رطوبت یا Desiccation بهترین پیش‌تیمار برای حفاظت بذر *P. euphratica* در شرایط فراسردی است و با این روش می‌توان بذر این گونه را جمع‌آوری و برای بلندمدت نگهداری کرد. نتایج مثبت و مؤثر این پیش‌تیمار در مقایسه با سایر پیش‌تیمارها، در حفاظت بذر گونه‌های دیگر نیز گزارش شده است (Naderi, Shahab et al., 2009).

زنده‌مانی و رشد بذوری که از ازت مایع یا فراسرد (-196°C) خارج می‌شوند تحت تأثیر درصد رطوبت بذر است. بنابراین، خشک‌کردن بیش از حد بذرها سبب کاهش جوانه‌زنی می‌شود (Walters et al., 2002). در همین رابطه، بهینه‌کردن رطوبت بذر قبل از ورود به شرایط فراسرد اهمیت زیادی دارد (Jitsopakul et al., 2008). در جنس صنوبر (*Populus*) در صورتی که نگهداری کلون مورد نظر باشد می‌توان جوانه‌گونه را با پیش‌تیمار مناسب تیمار و در شرایط فراسرد (-196°C) ذخیره کرد. زنده‌مانی جوانه‌ها پس از خروج از ازت مایع یا شرایط فراسردی در بعضی از گونه‌ها مانند *P. alba* تا ۹۰ درصد گزارش شده است (Lambardi et al., 2000). امکان نگهداری بذر جنس بید (*Salix*) از خانواده Salicaceae در شرایط فراسرد نیز گزارش شده است (Wood et al., 2003). در رابطه با نگهداری بذر *P. euphratica* در شرایط فراسرد (-196°C)، براساس منابع در دسترس، پژوهشی انجام نشده است و این اولین بررسی در زمینه نگهداری بذر این گونه ارزشمند در این شرایط است. در نگهداری بذر این گونه، پیش‌تیمار فراسرد (-196°C) نقش اساسی و تعیین‌کننده‌ای در موفقیت کار دارد. بنابراین، کاربرد پیش‌تیماری که مبتنی بر آزمایش‌های هدفمند نباشد، نتیجه مطلوبی نخواهد داشت. از نظر اقتصادی *P. euphratica* توان رقابت با گونه‌های تجاری جنس *Populus* را در زراعت چوب ندارد، لیکن از نظر اکولوژیک، زیست‌محیطی و تحمل شرایط سخت عرصه‌های منابع طبیعی مزیت منحصر به فردی دارد که گونه‌های تجاری از آن بی‌بهره هستند. بنابراین، به دلیل نداشتن



شکل ۲. استقرار بذور فراسردی *P. euphratica* در شرایط گلخانه

REFERENCES

1. Blakesley, D. & Kiernan, R.J. (2001). Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *CryoLetters*, 22 (1), 13-18.
2. Calagari, M., Jafari Mofidabadi, A., Tabari, M. & Hoseini, S.M. (2007). Genetic variation on natural population of *Populus euphratica* Oliv. by peroxidase isoenzyme. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 15(2), 115-122.
3. Calagari, M., Jafari Mofidabadi, A., Tabari, M. & Hosseini, S.M. (2004). Intraspecific hybridization of *Populus euphratica* Oliv. using *in vitro* technique. *Journal of Science*, 15(2), 109-112.
4. Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H. H., Rao, V.R. & Engelmann, F. (2002a). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 23(5), 325-332.
5. Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H.H., Rao, V.R. & Engelmann, F. (2002b). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification solution. *CryoLetters*, 23(5), 317-324.
6. González-Benito, M.E., Aguilar, N. & Avila, T. (2009). Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. *CryoLetters*, 30(2), 142-147.
7. Jafari, M.A. & Klagary, M. (2004). Inter and intra specific hybridization in *Populus euphratica* Oliv. Through ovary and ovule culture. Proceeding of the *Fourth International Iran & Russia Conference*, pp. 159-163.
8. Jitsopakul, N., Tammasiri, K. & Ishikawa, K. (2008). Cryopreservation of *Bletilla striata* seeds, 3-day germinating seeds and protocorms by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29(6), 517-526.
9. Lambardi, M., Fabbri, A. & Caccavale, A. (2000). Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* – grown shoot tips. *Plant Cell Reports*, 19(3), 213-218.
10. Matsumoto, T., Sakai, A. & 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.
11. Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. & 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.
12. Mofidabadi, A.J., Jourabchi, A., Shahrzad, S. & Mahmodi, F. (2001). New genotypes development of *Populus euphratica* Oliv. Using gametoclonal variation. *Silvae Genetica*, 50(5-6), 257-279.
13. Mofidabadi, A.J., Modir-Rahmati, A.R. & Tavesoli, A. (1998). Application of ovary and ovule culture in *Populus alba* L. x *P. euphratica* Oliv. hybridization. *Silvae Genetica*, 47(5-6), 332-334.
14. Naderi Shahab, M., Hatami, F., Tabari, M. & Jafari, A.A. (2009). Cryopreservation and evaluation of chinese arbor-vitae (*Biota orientalis*) Seeds. *Journal of New Seeds*, 10(4), 264-276.
15. Sabeti, H. (2006). *Forests trees and shrubs of Iran*. (4th ed.) Publication of Yazd University. pp: 536.
16. Saito, Y., Shiraishi, S., Tanimoto, T., Yin, L., Watanabe, S. & Ide, Y. (2002). Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis. *New Forests*, 23(2), 97-103.
17. Sakai, A., Kobayashi, S. & 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. Soleimani, A., Etemad, V., Kalagari, M., Namiranian, M. & Shirvani, A. (2011). Germination percentage of *Populus euphratica* Oliv. originated from different provenances and comparing seedling production in greenhouse and *in vitro* cultures. *Journal of Forest and Wood Products (JFWP), Iranian Journal of Natural Resources*, 63(4), 387-397.
19. Walters, C., Touchell, D.H., Power, P., Wesley-Smith, J. & Antolin, M.F. (2002). A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. *CryoLetters*, 23, 291-298.
20. Walters, C., Wheeler, L.J. & Stanwood, P.C. (2004). Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48, 229-244.
21. Wang, Z.H. & Deng, X.X. (2004). Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *CryoLetters*, 25, 43-50.
22. Wen, B. & Song, S. (2007). Acquisition and loss of cryotolerance in *livistona chinensis* embryos during seed development. *CryoLetters*, 28(4), 291-302.
23. Wood, C.B., Pritchard, H.W. & Lindegaard, K. (2003). Seed cryopreservation and longevity of tow *Salix* hybrids. *CryoLetters*, 24, 17-26.
24. Volk, G.M., Harris, J.L. & Rotindo, K.E. (2006). Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52, 305-308.

Archive of SID