Archive of SID

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۲۳-۱۲ (۱۳۸۹)

نگهداری بذر کیکم (*Acer monspessulanum*) در شرایط فراسرد

فیروزه حاتمی[۱]، مریم جبلی[۲]، محبتعلی نادری‌شهاب[*۳]، مسعود طبری[٤] و علی‌اشرف جعفری[٥]

۱- کارشناس ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۲- کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران
۳*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، پست الکترونیک: naderishahab@rifr-ac.ir
٤- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
٥- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

کیکم با نام علمی *Acer monspessulanum* L. یکی از گونه‌های پهن‌برگ مناطق نیم‌خشک سرد می‌باشد که حفظ آن به‌عنوان یکی از ذخایر توارثی گونه‌های جنگلی، از اهمیت خاصی برخوردار است. فنآوری حفاظت در شرایط فراسرد (cryopreservation) شامل نگهداری بذرها و اندام‌های گیاهی در دمای ۱۹٦ ^{o}C- یا ازت مایع می‌باشد. در این درجه از سرما، فرایندهای متابولیکی و فعالیت‌های فیزیولوژیک بذر یا اندام گیاهی تقریبا" متوقف شده و به دلیل کاهش شدید این فعالیت‌ها نمونه بذر یا اندام گیاهی قادر به زنده‌مانی در مدت زمان بسیار طولانی است. برای نگهداری بذر کیکم در شرایط فراسرد از پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (Plant Vitrification Solution 2 یا PVS2) و کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع، استفاده شد. بذرهای تیمار شده به مدت یک‌هفته و یک‌ماه در دمای ۱۹٦ ^{o}C- نگهداری شدند. بذرهای تیمارهای مختلف پس از خروج از ازت مایع در معرض شوک حرارتی قرار گرفته و پس از اعمال شوک حرارتی همراه با بذرهای شاهد بین کاغذ صافی مرطوب منتقل و بمدت ۱۰۵ روز در سردخانه با دمای ٤ ^{o}C+ نگهداری شدند. جوانه‌زنی بذرهای تیمارهای مختلف فراسرد حدود ۱۹/۱۸ درصد بود و تفاوت معنی‌داری با بذرهای شاهد نداشتند، رشد گیاهچه‌ها نیز طبیعی و عاری از هر گونه آثار منفی بود. مطالعه انجام شده نشان داد که با استفاده از فنآوری فراسرد و بکارگیری پیش‌تیمارهای مناسب، بذر این گونه ارزشمند و در حال خطر را می‌توان برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ و از انقراض این گونه منحصر به فرد جلوگیری نمود.

واژه های کلیدی: فراسرد، گلیسرول، ویتریفیکاسیون، شوک حرارتی، کیکم.

مقدمه

کیکم با نام علمی *Acer monspessulanum* L. از خانواده *Aceraceae* و جنس *Acer* درختی است به ارتفاع ۱۵-۱۰ متر. از نظر پراکنش جهانی این گونه بومی اروپای جنوبی است و در ایران در دامنه‌های البرز و زاگرس انتشار دارد (ثابتی، ۱۳٤٤). طبق طبقه‌بندی ثاقب‌طالبی و همکاران (۱۳۸۳) گونه *Acer monspessulsnum* جزو گونه‌های در حال انقراض و در گروه ذخایر طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID

مدیریت یافته قرار گرفته است. با توجه به اینکه این گونه نماینده طیفی از گونه‌های پهن‌برگ مناطق نیم‌خشک سرد می‌باشد، حفظ و حراست از آن از اهمیت زیادی در میان گونه‌های جنگلی موجود در کشور برخوردار می‌باشد.

در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیک حفاظت از گونه‌های منابع طبیعی مانند ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی ملی و منطقه‌ای، بانک ژن بذرهای گونه‌های جنگلی و مرتعی و عرصه‌های حفاظت شده جنگلی، استفاده از توانمندی‌های بیوتکنولوژی راهکاری منحصر به فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهیست که به سرعت در حال توسعه می‌باشد. یکی از این توانمندی‌ها، نگهداری بذرها و اندام‌های رویشی در شرایط فراسرد یا Cryopreservation است (Lambardi *et al.*, 2005). فنآوری فراسرد روش ذخیره سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی است (Popov *et al.*, 2006). با این فنآوری می‌توان بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در دمای ۱۹۶ ^{o}C- یا محیط ازت مایع که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام گیاهی تقریبا" متوقف شده است را برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ نمود (Ozkavukcu & Erdemli, 2002). نتایج حاصل از بررسی‌های Walters و همکاران (۲۰۰٤) با استفاده از معادله Avrami نشان داد که نیمه‌عمر جوانه‌زنی کاهو در دمای ۱۹۶ ^{o}C- را می‌توان حدود ۳۵۰۰ سال حفظ نمود، که این مدت زمان، توانمندی این فنآوری را در حفاظت از ذخایر توارثی نشان می‌دهد.

برای نگهداری بسیاری از گونه‌ها و واریته‌های گیاهی در شرایط فراسرد، تیمارهای مختلفی نظیر ویتریفیکاسیون بذر یا اندام (Vitrification) (Gale *et al.*, 2008; Rall, 1987)، کاهش رطوبت بذر یا اندام (Desiccation) (Bhat *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003)، گلیسرول (Jeyendran *et al.*, 1985) و کپسوله‌کردن- ویتریفیکاسیون (Encapsulation-Vitrification) (Panis & Lambardi, 2005) بکار گرفته شده است. یکی از روش‌هایی که در افزایش کارایی ذخیره‌سازی و زنده‌مانی بذر در شرایط فراسرد تأثیر مثبت دارد، استفاده از تیمار ویتریفیکاسیون با استفاده از محلول PVS2 برای نگهداری بذر و اندام گیاهی می‌باشد. محققی به نام Ishikawa و همکارانش (۱۹۹۷) با استفاده از پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون و سپس ذخیره‌سازی جنین بذرهای گونه *Bletilla striata* در ازت مایع، سرعت جوانه‌زنی جنین‌ها پس از خروج از ازت - مایع را در حدود ٦۰ درصد گزارش نمودند. محقق دیگری به نام Thammasir (۲۰۰۰) از پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون یا PVS2 برای نگهداری بذر گونه *Doritis pulcherrima* در ازت مایع استفاده کرد و پس از ۳ ماه ذخیره‌سازی بذرهای در ازت مایع نتیجه را موفقیت آمیز گزارش نمود. بکارگیری تکنیک انجماد یک مرحله‌ای/ ویتریفیکاسیون (One step freezing-Vtrification) نیز برای حفاظت فراسرد جوانه‌های انتهایی گونه‌های *Quercus suber*، *Castanea sativa*، *Olea europaea*، *Aesculus hippocastaneum* و *Fraxinus angustifolia* موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Panis & Lambardi, 2005). براساس گزارش‌های ارائه شده، استفاده از محلول ویتریفیکاسیون گیاهی یا PVS2 باعث افزایش زنده‌مانی بذر و اندام‌های گیاهی در شرایط فراسرد می‌گردد.

تیمار دیگری که بر ذخیره‌سازی در ازت مایع و زنده‌مانی بذرهای در شرایط فراسرد تأثیر مثبت نشان داده، کاهش درصد رطوبت بذر می‌باشد. پاسخ به کاهش درصد رطوبت بذر با توجه به نوع گونه متفاوت می‌باشد. به طور

www.SID.ir

Archive of SID

کلی زنده‌مانی بذرها در شرایط فراسرد، با کاهش ١٠ – ٥ درصد محتوای رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع، مثبت گزارش شده است (Stanwood, 1985). در جنس بید کاهش ٥ – ٣ درصد از کل رطوبت بذر نتیجه مطلوبی را در زنده‌مانی بذرهای در شرایط فراسرد داشته (Wood *et al.*, 2003)، در حالیکه در گونه *Najas flexiti* کاهش ٩/٥ درصد از کل رطوبت بذر بهترین نتیجه را در زنده‌مانی بذرهای این گونه در بر داشته است (Hay & Muir, 2000). برای حفاظت فراسرد ٩ گونه مختلف از جنس‌های *Pyrus*، *Prunus* و *Malus* و سایر گونه‌های درختی، Lambardi و De Carlo (٢٠٠٣) روش کپسوله‌کردن–کاهش رطوبت بذر (Encapsulation-Dehaydration) را بکار بردند و در ٥٠ درصد از گونه‌ها زنده‌مانی ٨٠ درصد یا بیشتر را گزارش نمودند. برای حفاظت فراسرد بسیاری از گونه‌های گیاهی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری که بذرهای آنها Recalcitrant می‌باشند از روش‌های ویتریفیکاسیون و کاهش رطوبت برای نگهداری بافت یا اندام گیاهی استفاده شده است (Benson, 1999).

براساس آزمایش Beardmore و Whittle (٢٠٠٥) مقاومت به کاهش رطوبت و تحمل به دمای پایین در جوانه‌های جنینی حاصل از بذرهای *Acer saccharinum* L که با ABA و tetcyclacis تیمار شده بودند، رشد - جوانه‌های پیش‌تیمار شده با ABA و tetcyclacis نسبت به نمونه‌های شاهد تا ٥٥٪ افزایش نشان دادند.

مواد و روشها

بذر گونه *Acer monspessulanum* از منطقه قلندر، استان ایلام در پاییز ١٣٨٦جمع‌آوری گردید. قبل از قرارگیری نمونه بذرها در ازت مایع (دمای^{o}C ١٩٦–)، پیش‌تیمارهای زیر اعمال گردید:

پیش‌تیمار گلیسرول٣٠ درصد (Glycerol 30%): محلول گلیسرول ٣٠ درصد با اضافه نمودن ٣٠ میلی‌لیتر گلیسرول خالص به ٧٠ میلی‌لیتر آب‌مقطر تهیه شد. نمونه بذرهای به لوله‌های آزمایش ١٥ میلی‌لیتری درب‌دار (فالکون ١٥ میلی‌لیتری) منتقل و به آنها محلول گلیسرول ٣٠ درصد اضافه و به مدت ٢٠ دقیقه در دمای ^{o}C ٢٢+ قرار داده شدند. سپس فالکون‌های حاوی بذر بلافاصله وارد ازت مایع گردیدند.

پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification): از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و Loading به‌عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 شامل ساکاروز (Sucrose) ٠/٤ مولار، گلیسرول (Glycerol) ٣٠ درصد، اتیلن گلیکول (Ethylenglycol) ١٥درصد و DMSO (Dimethyl soulfoxide) ١٥درصد می‌باشد (Sakai *et al.*, 1991). محلول Loading شامل گلیسرول (Glycerol) ٢ مولار و ساکاروز (Sucrose) ٠/٤ مولار می‌باشد (Sakai & Engelman, 2007). بذرهای داخل فالکون ١٥ میلی‌لیتری قرار داده شدند، به فالکون‌ها محلول Loading اضافه و به مدت ٢٠ دقیقه در دمای ^{o}C ٢٢+ قرار داده شدند. پس از ٢٠ دقیقه محلول Loading تخلیه و به فالکون‌های حاوی بذر محلول PVS2 سرد (دمای ^{o}C ٤+) اضافه و به مدت ٢٠ دقیقه در دمای ^{o}C ٤+ قرار داده شدند. سپس فالکون‌ها وارد ازت مایع گردیدند.

پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر: در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی حساس (٠/٠٠٠١ گرمی) تعیین گردید. سپس بذرها به مدت ٧٢ ساعت در آون و در دمای ^{o}C ٧٢ قرار داده شدند، پس از قرارگرفتن در آون

www.SID.ir

Archive of SID

نیز وزن بذرها محاسبه گردید. درصد رطوبت بذر با محاسبه اختلاف وزن بذرها، قبل و بعد از قرارگیری در آون تعیین گردید (۶/۷ درصد). در تیمار کاهش رطوبت بذر، بذرهای به مدت یک‌هفته در دسیکاتور قرار داده شدند و مقدار کاهش رطوبت تعیین شد. برای این کار در ابتدا وزن بذر با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ گرم تعیین و سپس بذرهای به دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر سیلیکاژل خشک (۱۰ برابر وزن بذر) منتقل گردیدند، در ادامه هوای داخل دسیکاتور تخلیه و دسیکاتور به مدت یک‌هفته در دمای ۴+ ^{o}C قرار داده شد. پس از یک‌هفته، بذرهای از دسیکاتور خارج و مجددا" توزین گردید. مقدار رطوبت کاهش یافته معادل ۴ درصد وزن اولیه بذر بود. مقدار رطوبت کاهش یافته در دسیکاتور نسبت به کل رطوبت بذر (که از طریق قرار دادن در آون بدست آمده بود) محاسبه و درصد آن که همان درصد کاهش رطوبت بذر در تیمار کاهش رطوبت می‌باشد مشخص شد (درصد کاهش رطوبت معادل ۴۰/۳۰٪= ۵۹/۷۰ ٪-۱۰۰٪ می‌شد). بذرهای پس از خروج از دسیکاتور به فالکون‌ها منتقل و بعد وارد ازت مایع گردیدند.

تیمار (شاهد): بذرهای شاهد به فالکون‌ها منتقل و در سردخانه با دمای ۴+ ^{o}C نگهداری شدند.

کلیه تیمارها بجز تیمار شاهد به مدت یک‌هفته و یک‌ماه در ازت مایع با دمای ۱۹۶- ^{o}C نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان نگهداری در ازت مایع، بذرهای از ازت مایع خارج و همراه بذرهای شاهد به مدت ۲ دقیقه در آب ۴۲ ^{o}C (شوک حرارتی) قرار داده شدند (Engelmann, 1990). پس از شوک حرارتی، نمونه بذرهای فراسرد و شاهد برای تعیین درصد جوانه‌زنی در ظروف حاوی کاغذ صافی قرار گرفته و در سردخانه با دمای ۴+ ^{o}C نگهداری شدند. جوانه‌زنی بذرها پس از ۱۰۵ روز تعیین و سایر صفات از قبیل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه پس از سبز شدن بذرها (۱۲۱ روز) اندازه‌گیری گردیدند. با مشخص‌شدن درصد جوانه‌زنی و میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، در شرایط آزمایشگاهی، شاخص بنیه بذر به روش زیر محاسبه شد (Abdul-baki & Anderson, 1973):

شاخص بنیه بذر = (مجموع طول ساقه‌چه و ریشه‌چه) × میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر × درصد جوانه‌زنی /۱۰۰

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل اجرا شد. تیمارهای قبل از فراسرد شامل کاهش رطوبت (Desiccation)، ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد به‌عنوان سطوح یک فاکتور و زمان‌های ذخیره‌سازی شامل یک‌هفته و یک‌ماه به عنوان سطوح فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. تیمارها در ۳ تکرار و در طرح پایه بلوک‌های کاملا" تصادفی مقایسه شدند. داده‌های بدست آمده از درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، ریشه‌چه، گیاهچه، نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که در بین تیمارهای شاهد، کاهش رطوبت بذر، گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون (PVS2) در صفاتی مانند درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه و شاخص

www.SID.ir

Archive of SID

بنیه بذر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در بررسی اثر زمان‌های یک‌هفته و یک‌ماه نگهداری بذر در دمای ۱۹۶ ^{o}C- در صفاتی مانند درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تنها در نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد. با این حال، روند نزولی درصد جوانه‌زنی و بنیه بذر از یک‌هفته به یک‌ماه دیده شد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمارها، زمان‌ها و اثر متقابل آنها بر نگهداری بذرهای گونه *A. monspessulanum* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای ۱۹۶ ^{o}C-

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	طول گیاهچه	طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه	بنیه بذر
تیمار	۳	۰/۰۱٤ ns	۲/۹۰ ns	۱٤/۸٦ ns	۳۰/٤۰ ns	۰/۰٤ ns	۸/۹۰ ns
زمان	۱	۰/۰۰٤ ns	۱۳/۵۰ ns	۲۸/۱۷ ns	۲/٦۷ns	۰/۸۷ **	۲/۳۲ ns
اثر متقابل تیمار * زمان	۳	۰/۰۰۷ ns	٦/۲۱ ns	۱۲/۱۹ ns	۱۵/۸۷ ns	۰/۲۱ *	٤/۵۰ ns
خطا	۱٦	۰/۰۱	۱۰/۵۱	۱٦/۸۲	٤۸/۲۲	۰/۰٦	۸/۲۳
ضریب تغییرات (CV%)		۲۲/۵۵	۲۷/۸۹	۲۳/۷۸	۲٤/۰۵	۱۵/۵۳	٤۹/۹۵

**،* و ns = به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵٪ ، ۱٪ و عدم معنی‌داری.

اثر متقابل میانگین تیمارهای کاهش رطوبت بذر، ویتریفیکاسیون (PVS2) و گلیسرول ۳۰ درصد در مدت زمان‌های یک‌هفته و یک‌ماه نگهداری در دمای ۱۹۶ ^{o}C- و مقایسه با تیمار شاهد نشان داد که در صفات درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر نیز تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود نداشت (شکل ۱) و تنها در صفت نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد. در این صفت تیمار گلیسرول ۳۰ درصد در یک‌هفته نگهداری در فراسرد با نسبت ۲/۰۷ بیشترین مقدار و گلیسرول ۳۰ درصد یک‌ماه نگهداری در فراسرد با نسبت ۱/۲۲ از کمترین مقدار برخوردار بود (جدول۲). در نمودار ۱ اثر صفات درصد جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول گیاهچه، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذرهای *A. monspessulanum* پس از خروج از شرایط فراسرد نشان داده شده است. شکل ۱ نیز نشان‌دهنده گیاهچه‌های حاصل از رشد گونه *A. monspessulanum* یک‌هفته و یک‌ماه نگهداری شده در ازت مایع می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

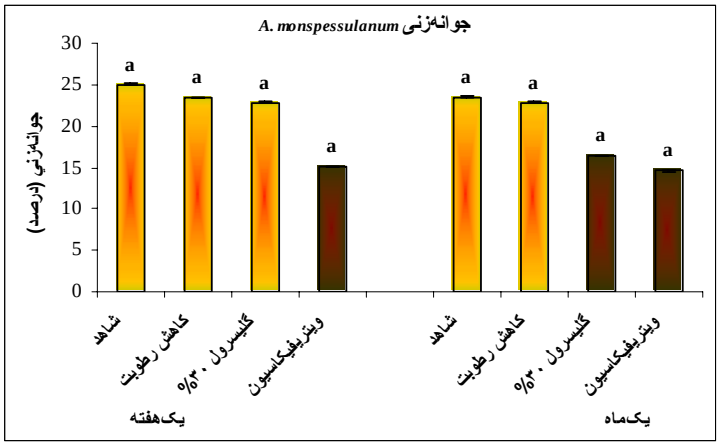
جدول۲- مقایسه میانگین اثر تیمارها در زمان‌های نگهداری بذرهای گونه *A. monspessulanum* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای ۱۹۶ ^{o}C- به روش آزمون دانکن

زمان	تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه (mm)	طول ریشه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه	بنیه بذر (vigor)
یک‌هفته	شاهد	۲۵/۰۶	۱۱/۱۷	۱۷/۶۷	۲۸/۸۳	۱/۶۰ b	۶/۶۴
	ویتریفیکاسیون	۱۵/۱۵	۱۰/۸۳	۱۷/۶۷	۲۸/۵۰	۱/۶۵ b	۴/۱۷
	گلیسرول ۳۰٪	۲۲/۸۴	۱۰/۱۷	۲۱/۳۳	۳۱/۵۰	۲/۰۷ a	۷/۲۹
	کاهش رطوبت	۲۳/۴۷	۱۱/۳۳	۱۷/۶۷	۲۸/۰۰	۱/۵۲ b	۶/۱۳
یک‌ماه	شاهد	۲۳/۴۷	۱۲/۳۳	۱۶/۵۰	۲۸/۸۳	۱/۳۶ b	۶/۶۲
	ویتریفیکاسیون	۱۴/۶۲	۱۰/۸۳	۱۴/۱۷	۲۵/۰۰	۱/۳۱ b	۳/۷۶
	گلیسرول ۳۰٪	۱۶/۴۹	۱۴/۸۳	۱۷/۶۷	۳۲/۵۰	۱/۲۲ b	۵/۵۸
	کاهش رطوبت	۱۴/۶۲	۱۱/۵۰	۱۶/۳۳	۲۷/۸۳	۱/۴۲ b	۵/۷۸

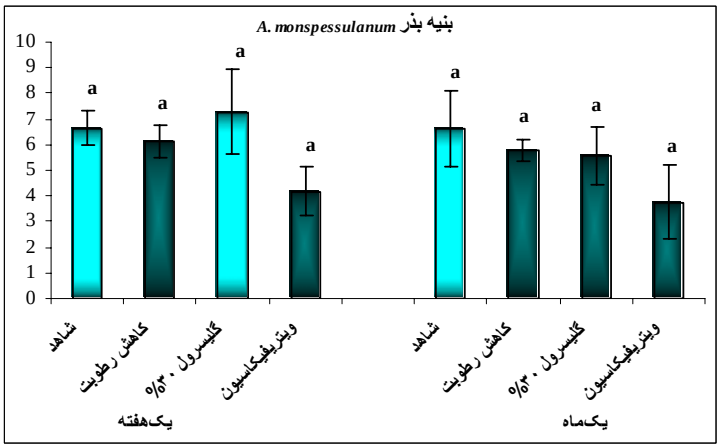
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح تیمارهاست.

www.SID.ir

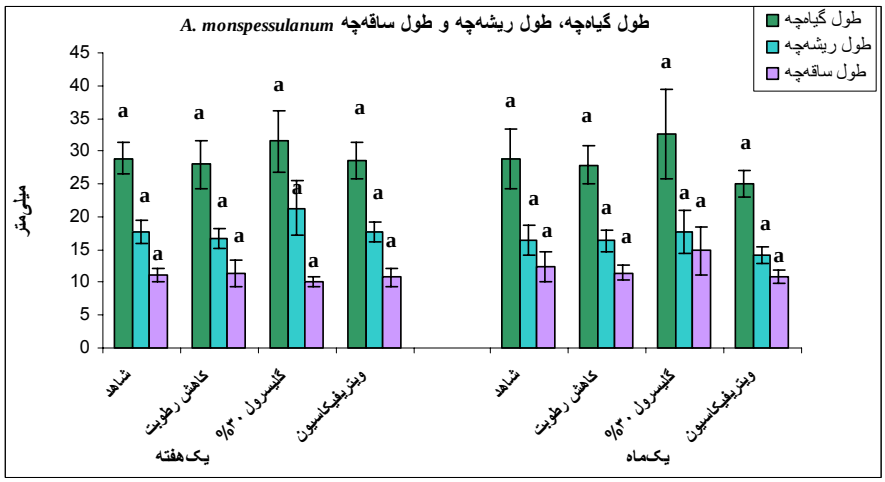
Archive of SID



الف



ب



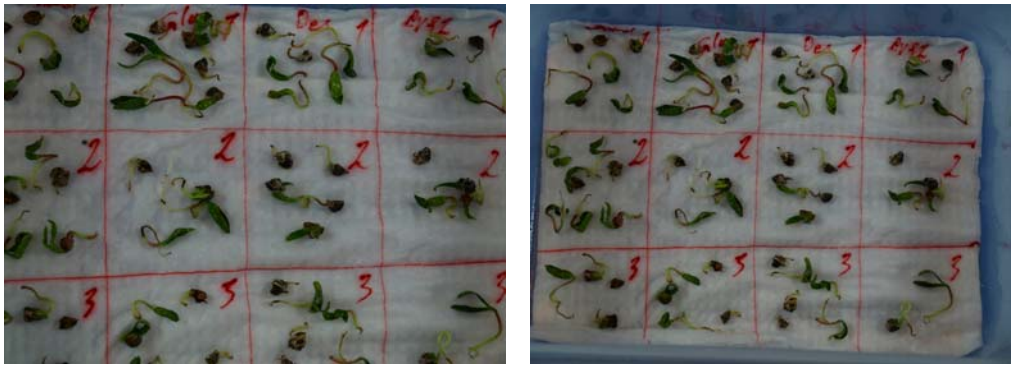
ج

نمودار ۱- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول ۳۰٪ و کاهش رطوبت بذر بر

الف: درصد جوانه‌زنی، ب: بنیه بذر و ج: طول گیاهچه، ریشه‌چه و ساقه‌چه بذرهای جوانه‌زده گونه *A. monspessulanum* پس از یک‌هفته و یک‌ماه نگهداری در ازت مایع

www.SID.ir

Archive of SID



الف ب

شکل ۱- الف: گیاهچه‌های حاصل از رشد بذرهای گونه *A. monspessulanum* یک‌هفته نگهداری شده در دمای ۱۹۶ ^{o}C-
ب: گیاهچه‌های حاصل از رشد بذرهای گونه *A. monspessulanum* یک‌ماه نگهداری شده در دمای ۱۹۶ ^{o}C-

بحث

در مطالعه اثر فراسرد بر روی بذرهای *A. monspessulanum* مشاهده گردید که بذرها پس از خروج از ازت مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه می‌باشند. با توجه به امکان زنده‌مانی بذرهای *A. monspessulanum* در دمای ۱۹۶ ^{o}C- می‌توان بذرهای این گونه را جزو بذرهای Orthodox (Engelman, 1990; Roberts & Ellis, 1989) قلمداد نمود. در بررسی زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی گونه *A. monspessulanum* تفاوت آماری میان تیمارهای ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت بذر و گلیسرول ۳۰ درصد با تیمار شاهد مشاهده نشد. در زمینه زمان نگهداری بذرها در ازت مایع نیز بین زمان‌های نگهداری بذرهای یاد شده در ازت مایع تفاوت معنی‌داری دیده نشد. براساس تئوری، در صورتی که بذر در محیط ازت مایع زنده بماند، نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه‌مدت و میان‌مدت وجود داشته باشد. زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی، مسئله زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌گردد. Popov و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که سلول‌های هویج (*Carrot*) پس از ۲۵ سال ذخیره در ازت مایع قابلیت تجدید حیات خود را حفظ می‌نمایند.

ویتریفیکاسیون فرایندی است که آب از حالت مایع وارد یک فاز شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگهداری بافت‌های گیاهی در ازت مایع بدون شکل‌گیری کریستال‌های یخی امکان‌پذیر خواهد بود (Gale *et al*., 2008; Matsumoto *et al*., 2001; Wang *et al*., 2005). در این مطالعه تفاوتی بین پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون و سایر پیش‌تیمارها مشاهده نشد. زیرا در هیچ یک از صفات (درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر) اثر محسوسی دیده نشد و این در حالیست که در بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی گونه‌هایی مانند موز، ارکیده، آناناس (Thinh, 1997)، توت فرنگی (Hirai *et al*., 1998) و سپیدار (Lambardi *et al*., 2000) اثر مثبت این تیمار گزارش گردیده است.

استفاده از تیمار کاهش رطوبت با هدف تقلیل رطوبت بذر قبل از ورود به دمای ۱۹۶ ^{o}C- تأثیر مثبتی در حفظ و

www.SID.ir

Archive of SID

زنده‌مانی بذرها داشت. در این بررسی مشاهده شد که این تیمار همانند تیمارهای دیگر باعث حفاظت از بذر در شرایط فراسرد می‌شود و کاربرد این روش با موفقیت همراه می‌باشد. لذا از این روش که از نظر سادگی و سهولت و عدم نیاز به مواد شیمیایی روشی ساده‌تر می‌باشد، می‌توان در مقیاس کاربردی استفاده نمود. در همین رابطه Beardmore و Whittle (۲۰۰۵) نیز بکارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذر گونه *Acer saccharinum* موفقیت‌آمیز گزارش نمودند.

از گلیسرول با غلظت‌های مختلف به‌عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده می‌شود (Jeyendran *et al.*, 1985). این ماده تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را به آرامی پایین می‌آورد. به همین علت به‌عنوان ماده محافظ یا Cryoprotectant استفاده می‌شود، پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد در حفاظت بذرهای گونه *A. monspessulanum* تفاوتی با سایر تیمارها نداشته است.

بذر گونه *A. monspessulanum* دارای خواب می‌باشد و مدت زمان لازم برای جوانه‌زنی بذرهای شاهد و فراسرد در ٤+ ^{o}C، حدود ۱۰۵ روز به طول می‌انجامد. در همین رابطه نصیری (۱۳۸۷) جوانه‌زنی بذر گونه *A. monspessulanum* در بستر ماسه را حدود ٦ ماه گزارش نمود که موید وجود خواب در بذر این گونه می‌اشد. درصد احیاء بذرها در کلیه تیمارها پایین ولی امیدوارکننده بود و با توجه به اختلافات کم موجود بین سه پیش‌تیمار فراسرد با تیمار شاهد می‌توان به این نتیجه رسید که بذر این گونه را با هریک از تیمارهای فوق می‌توان در دمای ۱۹٦ ^{o}C- در دوره بلندمدت نگهداری نمود. در بین پیش‌تیمارهایی که در این بررسی بکار گرفته شد، تیمار کاهش رطوبت قابل توصیه می‌باشد، زیرا این تیمار از نظر مواد مصرفی و سهولت کار نسبت به بقیه تیمارها ارجحیت دارد.

به طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که بذر این گونه قابل نگهداری در دمای ۱۹٦ ^{o}C- بوده و به دلیل اینکه بذر از نوع Orthodox بوده و محتوای رطوبت آن بسیار پایین می‌باشد. بنابراین، رطوبت موجود در بذر، اثر منفی در ماندگاری آن در محیط فراسرد ندارد. از نظر مدت زمان نگهداری بذر در شرایط فراسرد، امکان نگهداری چند هزار سال وجود دارد. زیرا براساس محاسبات ترمودینامیکی انجام شده بر روی بذر کاهو که در شرایط دمایی پایین نگهداری گردیدند، نیمه عمر جوانه‌زنی این گونه ۳۵۰۰ سال برآورد گردید (Walters *et al.*, 2004). بنابراین با توجه به مقاومت بذر گونه *A. monspessulanum* به شرایط فراسرد و عدم تفاوت بین شاهد و تیمارهای ماندگاری در دمای ۱۹٦ ^{o}C- برآورد ماندگاری بذر در مقیاس بیش از هزار سال وجود دارد.

با استفاده از فنآوری فراسرد می‌توان علاوه بر بذر، سایر اندام‌های گیاهی مانند جوانه‌های جانبی یا انتهایی، سلول، دانه گرده و جنین را برای مدت زمان بسیار طولانی نگهداری نمود. در این صورت حفظ و بقای گونه‌هایی که نگهداری بذر آنها امکان‌پذیر نیست (مانند بذرهای Recalcitrant) یا فقط از طریق کلن تکثیر می‌شوند، قابل اجرا خواهد بود (Berjak & Pammenter, 2002; Pâques *et al.*, 2000). استفاده از فنآوری حفاظت در شرایط فراسرد امکان نگهداری طولانی‌مدت بذر تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در معرض خطر را فراهم کرده و حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

ارزشمند جنگلی و مرتعی را موجب می‌شود. بنابراین با استفاده از این فنآوری امکان احیاء و حفاظت گونه‌های مختلف در معرض خطر در اکوسیستم‌های منابع طبیعی فراهم می‌شود. شایان ذکر است که نگهداری طولانی‌مدت بذر یا سایر اندام‌ها در شرایط فراسرد و دور شدن نمونه از شرایط متغیر محیطی، از جمله ملاحظاتی است که نباید از نظر پنهان بماند.

منابع مورد استفاده

– ثابتی، ح. ۱۳٤٤. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی. ۸۸٦ص

– ثاقب‌طالبی، خ.، ساجدی، ت.، یزدیان، ف.، ۱۳۸۳. نگاهی به جنگلهای ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ۲۷صفحه.

– نصیری، م.، ۱۳۸۷. تعیین تیمار مطلوب برای شکستن خواب و افزایش جوانه‌زنی بذر کیکم (*Acer monspessulanum* L.). فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱٦: ۱۰–۹

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

– Beardmore, T. and Whittle, C.A., 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. Tree Phisiology, 25: 965-972.

– Benson, E.E., 1999. Cryopreservation, *In* E.E., Benson, (Ed). Plant Conservation Biotechnology. Talor Francis, London, 6: 83-95.

– Berjak, P. and Pammenter N.W., 2002 . Orthodox and Recalcitrant Seeds. Plant Cell Biology Research Unit, School of Life Sciences University of Natal, Durban, 4041 South Africa.

– Bhat, S.N., Sharma, A., and Bhat, S.V., 2005. Vitrification and glass transition of water insights from spin probe ESR. Physical Review Letters, 95 (23):4.

– Engelmann, F., 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation. Case history: *Oil Palm* somatic embryos. International Journal of Refrigeration, 13: 26-30.

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

– Hay, F.R., and Muir, J.S.K., 2000. Low temperature survival of slender Naiad (*Najas flexilis*) seeds. CryoLetters, 21: 271-278.

– Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S., and Sakai, A., 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) by encapsulation- vitrification. Euphytica, 101: 109-115.

– Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., and Sakai, A., 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Reports, 16: 754–757.

– Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., and Zaneveld, L.J., 1985. Effect of glycerol and cryopreservation on oocyte penetration by human spermatozoa. Andrologia, 17 : 241-8.

– Lambardi, M., Fabbri, A., and Caccavale, A., 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports, 19: 213-218.

– Lambardi, M., Benelli, C., and Decarlo, A., 2005. Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: development of the technology at the CNR/INVALSA Institute of Florence. The Role of Biotechnology: 181-182.

– Lambardi, M., and De Carlo, A., 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. *In*: S.M., Jain, and K., Ishii, (ed), Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 815-840.

– Liu, H., Yu, H., Dai J., Gong, Q., Yang, K., and Lu, X., 2003. Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification. Plant Science, 166 :97-102.

– Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H., and Sakai A., 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Report, 20: 398-402.

– Ozkavukcu, S., and Erdemli, E., 2002. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara Medical School, 24 :187-196

– Pâques, M., Poissonnier, M., Dumas, E., and Monod, V., 2000. Cryopreservation of dormant and non dormant broad-leaved trees. ISHS Acta Horticulturae 447.

– Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V., and Vysotskaya, O. N., 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration, 29: 403–410.

www.SID.ir

Archive of SID

Thai orchid (*Doritis pulcherrima* lindl.) by vitrification. CryoLetters, 21: 237-244.
– Thinh, N.T., 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral papers of Cobe University-Department of Agronomy, Japan.
– Walters C., Wheeler L., and Stanwood Ph., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48: 229-244.
– Wang, Y.L., Fan, M.J., and Liaw, S.I., 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 46: 29-34.
– Wood, C.B., Pritchard, H.W., and Lindegard, K., 2003. Seed cryopreservation and longevity of two *Salix* hybrids. CryoLetters, 24: 17-26.
– Rall, W.F., 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology, 24: 387–402.
– Roberts, E.H. and Ellis, R.H., 1989. Water and seed survival. Annals of Botany, 63: 39.
– Panis, B., and Lambardi, M., 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy, 5-7.
– Sakai, A., Kobayashi, S., and Oiyama, I., 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to –196 °C. Plant Physiology, 137: 465–470.
– Sakai, A., and Engelmann, F., 2007. Vitrification, Encapsulation and Droplet-Vitrification: A review. CryoLetters, 28: 141-172.
– Stanwood, P.C., 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. *In*: Kartha, K. K., (ed) Cryopreservation of Plant Cells and Tissues. Boca Raton, FL: CRC, 199-226.
– Thammasir, K., 2000. Cryopreservation of seeds of a

www.SID.ir

Archive of SID

Cryopreservation of *Acer monspessulanum* seeds

F. Hatami[1], M. Jebelli[2], M. Naderi Shahab[3]*, M. Tabari[4] and A.A. Jafari[5]

1- M.Sc, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modarres University, Noor, I.R.Iran
2- M.Sc, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran
3*- Corresponding author, Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
E-mail: naderishahab@rifr-ac.ir
4- Assoc. Prof., Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modarres University, Noor, I.R.Iran
5- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran

Received: 23.02.2009 Accepted: 22.11.2009

Abstract

Montpellier Maple (Acer monspessulanum) is one of the broad leaf species grows in semi-arid and cold climate of I.R. Iran. Preservation of this wild woody species has a great importance in natural resource point of view. Cryopreservation technique is used to preserve seed and vegetative organs under -196 ºC conditions. In the mentioned temperature, all of the metabolic and physiological activities of the seed or organ almost is stopped. As the result, seed and organ can survive for a long period of time. In order to preserve A. monspessulanum seed under -196 ºC condition, three pre-cryopreservation treatments, PVS2 solution, Desiccation and 30% Glycerol were applied. The treated seeds were transferred into Liquid Nitrogen (LN) and stored for 7 and 30 days respectively. After finishing storage period, the seeds were removed from the LN, imposed to heat shock and transferred between wet-papers in germination boxes. The cryogenic seeds together with control seeds were incubated at +4 ºC for 105 days to germinate. Mean germination percentage of the cryopreserved seeds was 19.18% and, there were no significant differences between the control and cryopreserved seeds. No adverse effects or abnormalities were observed on seedlings developed from cryopreserved seeds. The results showed that, the long-term preservation of the species, seed in -196 ºC using suitable pre-cryopreservation treatment is possible.

Key words: Cryopreservation, Glycerol, Vitrification, Desiccation, and Acer monspessulanum.

www.SID.ir