مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۳۰، شماره ۱، صفحه ۱۱۷-۱۰۸ (۱۴۰۱)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2022.357696.1409
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.1.8.2

حفظ ذخایر ژنتیکی گونه زبان‌گنجشک (ون) (*Fraxinus excelsior* L.) در فراسرد

لیلا میرجانی[1*]، عباس قمری‌زارع[2] و کامبیز اسپهبدی[3]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
پست‌الکترونیک: mirjani@rifr-ac.ir

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- دانشیار، بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۴

چکیده

گونه درخت جنگلی زبان‌گنجشک (ون) (*Fraxinus excelsior* L.)، در IUCN، جزو گروه گیاهان در معرض تهدید، به علت گسترش بیماری مرگ ون می‌باشد. به‌همین دلیل، حفظ ذخیره ژنتیکی این گونه اهمیت زیادی دارد. ذخیره‌سازی بذر و اندام گیاهی در شرایط فراسرد، روشی بسیار کارآمد در نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم گونه‌های گیاهیست. بذرهای ون از منطقه سنگده استان مازندران جمع‌آوری شدند. از تیمارهای مختلف آب‌گیری برای نگهداری بذرهای ون در فراسرد استفاده شد. به همین منظور از تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، محلول شیشه‌ای شدن و کاهش رطوبت بذر پیش از ورود به نیتروژن مایع استفاده شد. بذرهای تیمارشده پس از ۲۴ ساعت از نیتروژن مایع خارج و ذوب شدند. سپس به‌همراه بذرهای شاهد از نظر زنده‌مانی و خصوصیات جوانه‌زنی بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد قوه نامیه (۹۲٪) و درصد جوانه‌زنی بذرها (۳۶٪) مربوط به تیمار کاهش رطوبت بود. میزان رطوبت بذر ون در زمان رسیدگی ۵ درصد وزنی بود. در تیمار کاهش رطوبت که بذرها در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل تحت شرایط خلأ قرار گرفتند، رطوبت بذرها ۱/۶۶ درصد نسبت به زمان رسیدگی کاهش یافت. کاهش رطوبت بذر از کریستاله شدن و پارگی غشاءها در نیتروژن مایع جلوگیری می‌کند. تیمارهای گلیسرول ۳۰٪ و شیشه‌ای شدن نیز موفقیت‌آمیز بود، اما احتمالا به جنین بذر آسیب زده و موجب کاهش درصد زنده‌مانی بذرها می‌شود. به‌این‌ترتیب بذرهای ون جمع‌آوری شده، با استفاده از فناوری فراسرد و به‌کارگیری تیمار کاهش رطوبت، به‌دلیل بازدهی بالاتر و عدم نیاز به استفاده از مواد شیمیایی، در بانک فراسرد مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شدند تا برای مدت طولانی حفظ شوند و از انقراض این گونه ارزشمند و منحصر به‌فرد جلوگیری شود.

واژه‌های کلیدی: آبگیری، احیا، حفاظت‌کننده فراسرد، ذخیره‌سازی ژنوم.

مقدمه

درختان جنگلی اساس اکوسیستم جنگلی را تشکیل می‌دهند، زندگی طولانی مدت آنها برای گیاهان و جانوران مختلف بسیار مهم است. مهمترین چالش برای حفظ اکوسیستم جنگلی کاهش جمعیت درختان جنگلی است که در اثر تغییر در بهره‌برداری از مساحت جنگل و جنگل‌کاری،

تغییرات محیطی، آفات و آلودگی روی می‌دهد. تکنیک‌های در شیشه (*in vitro*) مانند ریزازدیادی، تولید و ذخیره بذرهای مصنوعی و حفظ در فراسرد نقش اساسی برای حفظ ذخایر ژنتیکی درختان دارد. به‌همین دلیل تمایل زیادی برای ایجاد بانک‌های ژرم‌پلاسم، بذر، مریستم، گرده و کشت‌های سلولی برای ذخیره طولانی‌مدت ژنوم‌ها و حفاظت ژنتیکی آنها وجود دارد (Panis and Lambardi, 2000). ذخیره بذر به روش نگهداری در فراسرد روشی سازمان‌یافته و کمکی است. حفاظت در فراسرد بر اساس نگهداری مواد گیاهی در نیتروژن مایع ۱۹۶°C- می‌باشد. در دمای فراسرد، تقسیم سلولی و فعالیت‌های متابولیسمی متوقف می‌شود، بدون اینکه هیچ‌گونه تغییر فیزیکی ایجاد شود (Linington and Pritchard, 2001).

زبان‌گنجشک یا ون (*Fraxinus excelsior* L.) متعلق به جنس *Fraxinus* از خانواده Oleaceae است. پراکنش این گونه در ایران در مازندران، گیلان، آذربایجان، کرمانشاه، همدان، کردستان، اراک، لرستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، کرمان، خراسان، تهران و سمنان می‌باشد (Mozaffarian, 2005). این گونه به‌علت داشتن چوب‌های سخت، برای جنگل‌کاری مهم و از نظر اقتصادی منبع ارزشمند الوار نهالستان‌ها و مزارع درختان است.

گونه ون در IUCN جزو گروه در معرض تهدید است (Khela and Oldfield, 2018). مرگ ون بر اثر یک بیماری عفونی، باعث از بین رفتن شدید بیشتر گستره ون در اروپا شده است. این تهدید جدی، در ۲۴ کشور ثبت‌شده و خطر بالای سرایت به مناطقی که هنوز مشاهده نشده وجود دارد. از آنجایی‌که بیماری مرگ ون توسط باد گسترش می‌یابد، کاهش یا جلوگیری از شیوع بیماری بسیار دشوار است. قارچ بیماری‌زای *Hymenoscyphus pseudoalbidus (Chalara fraxinea)* باعث پژمردگی تاج و از بین رفتن برگ‌های ون می‌شود و می‌تواند منجر به مرگ درخت گردد. علائم این بیماری در ابتدا روی ساقه و شاخه‌ها ظاهر می‌شود که شامل پژمردگی و تغییر رنگ برگ‌ها و چوب، از بین رفتن ساقه، نکروزه و سیاه شدن آن می‌شود. گزارش‌شده طیف گسترده‌ای از گونه‌های *Fraxinus* به این بیماری آلوده شده‌اند، ولی شدیدترین گونه آسیب‌دیده، گونه *F. excelsior* است (Khela and Oldfield, 2018).

Chmielarz (۲۰۰۹) حساسیت بذرهای ون لهستانی را به حداکثر میزان آبگیری و شرایط فراسرد بررسی کرد. وقتی محتوای بحرانی آب ۴ تا ۶ درصد وزنی بود، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها انجام شد؛ اما زمانی که در نیتروژن مایع ذخیره شدند میزان جوانه‌زنی کاهش پیدا کرد. Ozudogru و همکاران (۲۰۱۰) برای به دست آوردن دستورالعمل ذخیره کالوس جنین‌زای *Fraxinus excelsior* L. در فراسرد سه روش کپسوله‌کردن- شیشه‌ای‌شدن، کپسوله‌کردن-آبگیری و سرمای تدریجی به کمک دستگاه فریزر نایژن (هر دقیقه یک درجه کاهش دما) را به‌کار بردند. بهترین روش بدست آمده برای نگهداری ون در فراسرد، قراردادن کالوس‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در پیش تیمار محلول ساکارز ۰/۶۱ مولار و DMSO (۷/۵٪)، سپس انتقال به سرمای تدریجی بود. بذرهای *F. angustifolia* می‌توانند با ۳٪ رطوبت در فراسرد نگهداری شوند و به‌آسانی ۷۰٪ جوانه‌زنی داشته باشند. زمانی که بذرها با رطوبت ۶٪ در فراسرد قرار گرفتند بذرها دچار خواب فیزیولوژیکی شدند که با اسید جیبرلیک این اثر از بین رفته و جوانه‌زنی تا ۷۶٪ افزایش یافت (Lombardo *et al*., 2013). در حال حاضر در مناطقی از روسیه و جنوب غرب آسیا ون در معرض خطر از بین رفتن قرار دارد (Khela & Oldfield, 2018) و امکان رسیدن این خطر به ایران نیز بعید نیست. ازاین‌رو، لازم است پیش از وقوع خطر پیش‌بینی‌های لازم انجام شده باشد. هدف از اجرای این تحقیق، حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه با ارزش در شرایط فراسرد است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذر

بذرهای رسیده *F. excelsior* از استان مازندران، ساری، سنگده، طول جغرافیایی ″۵′۵۳°۱۳، عرض

جغرافیایی ″۳ ′۳۶ °۱ و ارتفاع ۱۸۲۵ متر، در اوایل فصل تابستان جمع‌آوری شدند. پیش از قرارگیری بذرها در دمای ۱۹۶°C- برای نگهداری در فراسرد، آب‌گیری بذرها به روش‌های زیر انجام شد.

تیمار ۱- گلیسرول ۳۰٪: بذرها به کرایوویال‌های حاوی گلیسرول ۳۰٪ منتقل شدند و به‌مدت یک ساعت در دمای ۴°C قرار داده شدند. سپس کرایوویال‌ها وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار ۲- شیشه‌ای‌شدن (Vitrification): از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و بارگیری (Loading) به‌عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 حاوی ۱۵٪ (W/V) اتیلن‌گلیکول، ۱۵٪ (W/V) دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، ۳۰٪ (W/V) گلیسرول در محیط کشت مایع MS، حاوی ساکارز ۰/۴ مولار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد (pH=۵/۸) است. همچنین، محلول بارگیری شامل گلیسرول دو مولار و ساکارز ۰/۴ مولار در محیط کشت مایع MS (Murashige and Skoog, 1962) است. ابتدا بذرها به‌مدت ۲۰ دقیقه در محلول بارگیری قرار گرفتند. در مرحله بعد، این محلول تخلیه شد و محلول PVS2 (در دمای ۲۵°C) جایگزین شد. سپس، کرایوویال‌ها وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار ۳- کاهش رطوبت بذر یا آب‌گیری (Desiccation): در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی دقیق تعیین شد. ابتدا، محتوای رطوبت بذرها بر اساس اختلاف وزن‌های تر و خشک نمونه‌ها محاسبه شد. خشک‌کردن نمونه‌ها با استفاده از آون در دمای ۱۰۳°C و به‌مدت ۱۷ ساعت انجام شد (ISTA, 1996). به این ترتیب از طریق رابطه (۱)، کل رطوبت بذر تازه ۵/۱۵٪ به‌دست آمد. سپس، برای اعمال تیمار کاهش رطوبت، ابتدا وزن ۷۵ عدد بذر ون شمارش شد، سپس به روی کاغذ صافی در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک منتقل گردید. دسیکاتور چهار ساعت به پمپ خلأ متصل شد تا آبگیری انجام شود. سپس به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. در مرحله بعد، میزان کاهش رطوبت آنها اندازه‌گیری شد (رابطه ۱). رطوبت بذرها پس از خروج از دسیکاتور ۱/۶۶٪ کاهش یافته بود. برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذرهای آب‌گیری‌شده، درب ظرف‌ها محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایوویال قرار داده شدند و به‌طور مستقیم وارد نیتروژن مایع شدند.

رابطه (۱)

$$\text{درصد کل رطوبت بذر} = ((FW - DW)/ FW) \times 100$$

در رابطه بالا FW: وزن تر وDW: وزن خشک گیاهچه است.

تیمار ۴- شاهد نیتروژنی: بذرها بدون اعمال تیماری به کرایوویال‌ها منتقل و به‌طور مستقیم وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمارهای تعیین زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای خارج‌شده از فراسرد

برای تعیین بهترین تیمار از نظر زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی، بذرها پس از ۲۴ ساعت از نیتروژن مایع خارج شدند. برای بازیابی بذرها و جلوگیری از یخ‌زدگی به‌فرم کریستالی، نمونه‌ها باید سریع گرم شوند. به‌همین منظور، نمونه‌ها بلافاصله از تانک نیتروژن خارج شدند و در حمام آب گرم با دمای ۴۲°C به‌مدت ۱۲۰ ثانیه ذوب شدند. سپس، بذرها با ساکارز ۱/۲ مولار به‌مدت پنج دقیقه و در مرحله بعدی ساکارز ۰/۷۵ مولار به‌مدت پنج دقیقه و به‌همین ترتیب با محلول رقیق‌تر ساکارز شستشو انجام شد تا از تورژسانس بذرها جلوگیری شود.

آزمون قابلیت زنده‌مانی بذرهای *F. excelsior* با استفاده از تترازولیوم

به‌طور کلی آزمون‌های بیوشیمیایی روش‌های سریعتری برای ارزیابی زنده بودن نمونه‌های بذری از طریق سنجش بافت‌های ضعیف یا مرده است. به‌دلیل اینکه جوانه‌زنی بذرهای *F. excelsior* چندین ماه طول می‌کشد، ابتدا با آزمایش تترازولیوم، قوه نامیه بذرها مشخص شد. به‌این‌صورت که آندوکارپ تعدادی از بذرهای هر تیمار به‌طور جداگانه شکسته

شد و در محلول یک درصد تترازولیوم به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C در تاریکی قرار گرفتند. سپس، درصد زنده‌مانی بذرها در هر تیمار در زیر بینوکولار به‌دست آمد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار حاوی ۳۰ عدد بذر بود (شکل ۲).

تعیین خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای *F. excelsior* خارج‌شده از فراسرد

برای شکستن خواب بذر، بذرهای ون خارج شده از فراسرد و نمونه‌های شاهد، تحت تیمار سرمادهی قرار گرفتند. بدین ترتیب که بذرها در سه تکرار برای هر تیمار و هر تکرار شامل ۲۵ عدد بذر در ماسه مرطوب کاشته شده و در دمای ۴°C قرار گرفتند. بذرها پس از ۷ ماه شروع به جوانه‌زنی کردند. در طی این مدت رطوبت ماسه کنترل شد. خروج ریشه‌چه به‌مدت دو میلی‌متر به‌عنوان معیار بذر جوانه‌زده در نظر گرفته شد (ISTA, 2007). تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر واحد آزمایشی به‌صورت روزانه شمارش گردید. شمارش بذرهای جوانه‌زده برای هر ظرف تا زمانی که تغییری در جوانه‌زنی مشاهده شد، ادامه یافت. مدت زمان آزمایش پس از شروع جوانه‌زنی بذرها ۴۰ روز بود. در پایان آزمایش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی و بنیه بذر (قدرت رویشی بذر و استقرار آن) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد.

برای محاسبه درصد جوانه‌زنی از رابطه (۲) استفاده شد (Ranai & Santanan, 2006).

رابطه (۲)

$$GP = \left(\frac{Ni}{N}\right) \times 100$$

که در آن GP درصد جوانه‌زنی، تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در روز آخر شمارش و N تعداد کل بذرهاست.

برای محاسبه متوسط زمان جوانه‌زنی (MGT) از رابطه ۳ استفاده شد (Ellis & Roberts, 1981).

رابطه (۳)

$$MGT = \frac{\sum d_i n_i}{n}$$

در رابطه بالا MGT متوسط زمان جوانه‌زنی، n تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و d تعداد روزهای شمارش شده از آغاز جوانه‌زنی می‌باشد.

سرعت جوانه‌زنی از معکوس کردن متوسط زمان جوانه‌زنی بوسیله رابطه (۴) محاسبه گردید.

رابطه (۴)

$$GR = \frac{1}{MGT}$$

در این رابطه GR سرعت جوانه‌زنی، MGT متوسط زمان جوانه‌زنی است.

برای محاسبه شاخص بنیه از رابطه (۵) استفاده شد (Ellis & Roberts, 1981).

رابطه (۵)

$$VI = \frac{\sum(GP \times SL)}{100}$$

در این رابطه VI شاخص بنیه، GP درصد جوانه‌زنی و SL طول گیاهچه است.

برای ارزیابی میزان رشد اولیه گیاهچه‌ها، طول گیاهچه و ریشه‌چه در هر یک از تیمارها با استفاده از خط‌کش مدرج اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

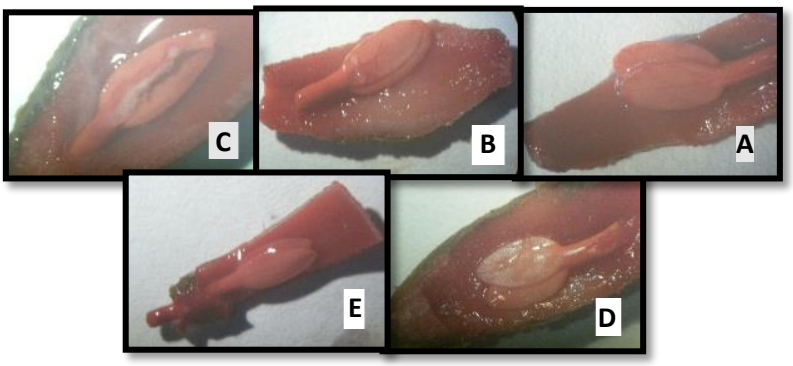
در این پژوهش، هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۵ بذر بود. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون آندرسون دارلینگ بررسی شد. داده‌هایی که نرمال نبودند، به‌روش Normal scores در نرم‌افزار Minitab 14 نرمال شدند. سپس، تجزیه واریانس یک‌طرفه در قالب طرح پایه کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به‌روش چنددامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

نتایج

آزمون قابلیت قوه نامیه (آزمایش تترازولیوم)

تعیین زنده‌مانی بذرهای ***F. excelsior*** با آزمایش تترازولیوم حکایت از آن داشت که تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد بین تیمارهای فراسرد از نظر درصد زنده‌مانی وجود دارد (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نیز

نشان داد که بیشترین زنده‌مانی (۹۲٪) مربوط به بذرهایی است که تحت تیمار کاهش رطوبت از طریق فیزیکی (به‌وسیله سیلیکاژل تحت شرایط خلأ) قرار گرفته بودند و تیمار گلیسرول ۳۰٪ باعث کاهش زنده‌مانی (۶۹٪) بذرها به نسبت بقیه تیمارها گردید (شکل ۱ و جدول ۲).



شکل ۱- جنین‌های زنده بذرهای *F. excelsior* آزمایش شده با تترازولیوم، پس از خروج از فراسرد. A- شاهد، B- شاهد خارج‌شده از نیتروژن مایع، C- آب‌گیری، D- گلیسرول ۳۰٪ و E- شیشه‌ای شدن

Figure 1. Live embryos of *F. excelsior* cryopreserved seeds tested with tetrazolium. A- control, B- control cryopreserved, C- desiccation, D- glycerol 30% and H- vitrification

نتایج خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای *F. excelsior* پس از خروج از فراسرد

بین تیمارهای فراسرد از نظر سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵٪ مشاهده شد. در حالی که تیمارهای فراسرد تأثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر نداشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها براساس روش دانکن نیز نشان داد که تیمار آبگیری بیشترین درصد جوانه‌زنی (۳۶٪)، شاخص بنیه بذر (قدرت رویشی بذر و استقرار آن) و سرعت جوانه‌زنی را نسبت به تیمارهای دیگر نشان داد (جدول ۲).

جدول ۱- خلاصه تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تیمارهای مختلف فراسرد بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر زبان‌گنجشک

Table 2 – Summary of ANOVA (MS) of different cryo- pretreatments on viability and seed germination traits of *F. excelsior* seeds

نام صفات	Traits	MS تیمار Treatment (DF=4)	MS خطا Error (DF=8)
درصد قوه نامیه	Viability percentage	275**	9.4
درصد جوانه‌زنی	Germination percentage	302ns	82
سرعت جوانه‌زنی	Rate of Germination	2.28*	0.37
متوسط زمان جوانه‌زنی	Average germination time	0.96ns	0.87
شاخص بنیه	Vigor Index	0.25ns	0.08
طول ریشه	Root length	0.12ns	0.89
طول ساقه	Stem length	0.25 ns	0.27
طول گیاهچه	Seedling length	0.25 ns	0.83
نسبت طول ریشه به ساقه	Root to stem length ratio	0.052 ns	0.058

**، * و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

**, * and ns= Significance at 1% and 5% probability levels and non-significant, respectively

از نظر ریخت‌شناسی نیز، بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در طول گیاهچه، طول ساقه و نسبت ریشه به ساقه وجود نداشت (جدول ۲). شکل ۲ نیز بیانگر اثر متفاوت تیمارها بر روی نگهداری بذر ون در فراسرد است. تیمار گلیسرول ۳۰٪ و شیشه‌ای شدن، کمتر از تیمارهای دیگر جوانه‌زنی داشته‌اند.

جدول ۲- میانگین تیمارهای مختلف فراسرد بر درصد قوه نامیه و خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای زبان‌گنجشک پس از خروج از فراسرد

Table 3. Mean of different cryo-treatments on viability and seed germination traits and of *F. excelsior* cryopreserved seeds.

نام صفات	Name of traits	گلیسرول ۳۰ درصد 30% glycerol	شیشه‌ای‌شدن Vitrification	آب‌گیری Desiccation	شاهد نیتروژن مایع Control Cryopreserved
درصد قوه نامیه	Viability percentage	80b	75c	92a	69d
درصد جوانه‌زنی	Germination percentage	26	12	36	21
سرعت جوانه‌زنی	Rate of germination	0.01	0.012	0.01	0.02
متوسط زمان جوانه‌زنی	Average germination time	0.01	0.012	0.01	0.01
شاخص بنیه	Vigor Index	0.84	0.41	1.1	0.68
طول ریشه (سانتی‌متر)	Root length (cm)	6.7a	6.6a	6.3a	6.3 a
طول ساقه (سانتی‌متر)	Stem length (cm)	4.5a	4.03a	4.26a	4.7 a
طول گیاهچه (سانتی‌متر)	Seedling length (cm)	11.03 a	10.66 a	10.6 a	11.21 a
نسبت طول ریشه به ساقه	Root to stem length ratio	1.51 a	1.67 a	1.48 a	1.35 a

میانگین‌های هر ردیف با حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ۵ درصد است.

Means of rows with the same letter are not significantly different according to Duncan 5% method.

شکل ۲- مقایسه اثر تیمارهای مختلف فراسرد بر مورفولوژی گیاهچه‌های زبان‌گنجشک *F. excelsior*.

A- شیشه‌ای شدن، B- آب‌گیری، C- گلیسرول ۳۰٪، D- بذر شاهد نگهداری شده در فراسرد

Figure 2- Comparison of the effects of different cryo-treatments on seedling morphology of *F. excelsior* seeds. A- vitrification, B- desiccation, C- 30% glycerol, D- control cryopreserved

بحث

ازآنجایی‌که ون (*F. excelsior*) از گونه‌های در معرض تهدید و مهم جنگل‌های هیرکانی به‌شمار می‌آید، دستیابی به اطلاعات در مورد نگهداری بلندمدت بذرهای آن، اهمیت زیادی دارد. طبق نتایج این تحقیق مشاهده شد که بذرها پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه‌های شاهد، قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه هستند. همچنین، نتایج آزمون قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای خارج شده از فراسرد نشان داد که بیشترین درصد قوه نامیه متعلق به بذرهایی است که تحت تیمار آبگیری فیزیکی قرار گرفته بودند. میزان آب قابل انجماد در سلول‌های گیاهی، عمده‌ترین مشکل در نگهداری آنها در فراسرد است. پس از لقاح و تشکیل جنین بذر با گذر زمان، رطوبت جنین کاهش می‌یابد و در زمان رسیدگی کامل به کمترین میزان خود می‌رسد. برای نگهداری جنین بذر در فراسرد، درصد رطوبت نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. به‌طوری‌که درصد زیاد رطوبت جنین، احتمال از بین رفتن آن را در فراسرد افزایش می‌دهد، بنابراین برای نگهداری جنین بذرهای گیاهان در فراسرد باید درصد رطوبت جنین مدنظر قرار گیرد (Wen & Song, 2007). در تیمار کاهش رطوبت یا آبگیری، محتوای آب بین سلولی کاهش داده می‌شود و از تشکیل کریستال‌های یخی تا حدامکان جلوگیری می‌شود. میزان رطوبت بذر ون مورد آزمایش در زمان رسیدگی ۵ درصد وزنی بود. در تیمار کاهش رطوبت، قرار دادن بذرها در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل تحت شرایط خلأ باعث شد رطوبت بذر ۱/۶ درصد دیگر نیز کاهش یابد، در نتیجه بذرهای ون وقتی رطوبت خود را از دست می‌دهند، از کریستاله شدن و پارگی غشا پلاسمایی جنین آنها جلوگیری شده و بیشترین درصد جوانه‌زنی را دارند. Chmielarz (۲۰۰۹) حساسیت بذرهای ون لهستانی *F. excelsior* را با حداکثر میزان آبگیری و شرایط فراسرد بررسی کرد. وقتی محتوای بحرانی آب بذر ۴ تا ۶ درصد بود، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها انجام شد؛ اما زمانی که در نیتروژن مایع ذخیره شدند چون آبگیری بیشتر از حد بحرانی آب برای جوانه‌زنی انجام شده بود، میزان جوانه‌زنی کاهش پیدا کرد. در واقع آبگیری باعث ایجاد خواب ثانویه در بذرها شده بود. اما در این پژوهش بذرهایی که آبگیری شده بودند، حدود ۱۰ درصد جوانه‌زنی بیشتر از بذرهای شاهدی که بدون تیمار در نیتروژن مایع قرار گرفته بودند، داشتند، چون میزان آبگیری کمتر از حد بحرانی آب برای جوانه‌زنی انجام شده بود. بذرهای *Fraxinus angustifolia* نیز توانستند با ۳٪ رطوبت در فراسرد نگهداری شوند و به‌آسانی جوانه‌زنی کردند؛ اما زمانی که بذرها با رطوبت ۶٪ در فراسرد قرار گرفتند بذرها دچار خواب فیزیولوژیکی شدند که با کمک اسید جیبرلیک، این اثر از بین برده شد و جوانه‌زنی به ۷۶٪ رسید (Lombardo *et al*., 2013). مطابق با نتایج تحقیق منتشر شده، بهترین تیمار نگهداری در فراسرد در مورد گونه کنار *Ziziphus spina-christi* (Naderi-Shahab *et al*., 2015) و ملج *Ulmus glabra* (Naderi-Shahab *et al*., 2017) نیز آبگیری بود و برخلاف گونه ون، گیاه گیلاس وحشی (*Cerasus avium*) در این روش ۴/۷٪ آب خود را از دست داد که باعث کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها شد و به‌طورکلی تیمارهای فراسرد که موجب کاهش رطوبت بذر گیلاس وحشی شدند، کاهش درصد زنده‌مانی را نیز درپی داشتند (Mirjani *et al*., 2021). ولی گونه‌های گبر (*Acacia tortilis*) و چش (*Acacia nilotica*)، همچنین کیکم (*Acer monspessulanum*) (Hatami *et al*., 2010) تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از لحاظ جوانه‌زنی نداشتند، در نتیجه حساسیت جنین نسبت به رطوبت به نوع گونه بستگی داشت.

از ماده گلیسرول با غلظت‌های مختلف به‌عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده می‌شود. گلیسرول، احتمال تشکیل یخ را کاهش می‌دهد و نقطه انجماد را به‌آرامی پایین می‌آورد. به‌همین علت به‌عنوان ماده محافظ فراسرد استفاده می‌شود (Turner *et al*., 2001). شیشه‌ای شدن نیز فرایندی است که آب از حالت مایع، وارد یک مرحله شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار

کریستالی است. در این حالت، نگهداری بافت‌های گیاهی در نیتروژن مایع بدون شکل‌گیری کریستال‌های یخی امکان‌پذیر خواهد بود (Gale *et al*., 2008). در بیشتر پژوهش‌ها به اثر مثبت PVS2 به‌ویژه در نگهداری اندام‌های رویشی در شرایط فراسرد اشاره شده است (Turner *et al*., 2001). اما این دو تیمار فراسرد که با استفاده از مواد شیمیایی، موجب کاهش رطوبت بذر شدند، موجب کاهش درصد زنده‌مانی گیاه ون گردیدند. پس احتمالا مواد حفاظت فراسرد به‌کاررفته به جنین بذر آسیب می‌رساند.

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بذر ون *F. excelsior*، قابلیت نگهداری در دمای ۱۹۶°C- را دارد. از نظر مدت نگهداری بذر در شرایط فراسرد، امکان نگهداری به مدت بسیار طولانی وجود دارد. به‌عنوان نمونه، بر اساس محاسبات دینامیکی انجام‌شده بر روی بذر کاهو که در شرایط دمایی پایین نگهداری می‌شد، نیمه‌عمر جوانه‌زنی این گونه ۳۵۰۰ سال برآورد شد (Walters *et al*., 2002). به این ترتیب، بذرهای گونه *F. excelsior* جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف با تیمار بهینه کاهش رطوبت در تانک ذخیره نیتروژن مایع موجود در گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شد تا با استفاده از این فناوری، امکان احیا و حفاظت این گونه در معرض خطر در بوم‌سازگان‌های طبیعی در شرایط بحرانی فراهم شود.

منابع مورد استفاده

- Chmielarz, P. L., 2009. Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds, Tree Physiology 29, 1279–1285.https://doi.org/10.1093/treephys/tpp064
- Ellis, R.A., and Roberts, E.H., 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science Technology, 9: 373-409.
- Gale, S., John A., Harding, K. and Benson, E., 2008. Developing cryopreservation for Picea stichensis (*sitca spruce*) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. CryoLetters 29(2):135-144.
- Hatami, F., Jebelli, M., Naderishahab, M., Tabari, M. and Jafari, A.A., 2013. Cryopreservation of *Acer monspessulanum* seeds. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18 (1): 12-23. (In Persian).
- ISTA. 2007. International Rules for Seed Testing. Seed Science Technology, 13: 299-520.
- Jebelli, M., Naderishahab, M.A. and Jafari, A.A., 2013. Cryopreservation of seeds of *Acacia tortilis* and *Acacia nilotica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23 (1): 103-111. (In Persian).
- Khela, S. & Oldfield, S., 2018. *Fraxinus excelsior*. The IUCN Red List of Threatened Species http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20181.RLTS.T203367A67807718.en
- 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(3): 213-218.
- Linington SH, Pritchard HW. 2001. Gene banks. In: Encyclopedia of biodiversity (Levin SA, ed). 3rd ed. Academic Press, New York, USA, pp 165-181.
- Lombardo, G., Scialabba, A., & Schicchi, R., 2013. Seed cryopreservation of *Fraxinus angustifolia* Vahl, African Journal of Biotechnology, 12(16), 1930–1936. https://doi.org/10.5897/AJB12.2866
- Mirjani, L., Ghamarizare, A., and Espahbodi, K. 2021. Preservation of the genome of *Cerasus avium* (L.) Moench. in cryopreservation conditions. Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 28 (4). 370-381. (In Persian).
- Mozaffarian, V. 2005. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser, Tehran, Iran, 1082p (In Persian).
- Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
- Naderishahab, M.A. Jebelli, M., and Jafari, A.A., 2015. Assessment of maintenance of *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. Seed under cryogenic conditions. Iranian Journal of Seed Science and Research, 3 (1): 111-120.
- Naderishahab, M.A. Jebelli, M., and Jafari, A.A., 2017.Cryopreservation of *Ulmus glabra* Hudson seeds. Journal of Forest and Wood Products. 69(4):681-691. (In Persian)
- Ozudogru, A., Capuana, M., Kaya, E., Panis, B. and Lambardi, M., 2010. Cryopreservation of Fraxinus Excelsior L. Embryogenic Callus by One-Step Freezing and Slow Cooling Techniques. CryoLetters 31 (1), 63-75
- Panis B, Lambardi M., 2005. Status of Cryopreservation Technologies in Plant (Crops and Forest Trees). Proc. Int. Workshop "The Role of Biotechnology for the Characterization and conservation of Crop, Forestry, Animal, and Fishery

Genetic Resources, Turin, pp 43-54.
– Ranai, M.A., and De Santana, D.G., 2006. How and why it measure the germination process. Revista Brasileira de Botanica, 29: 1-11. https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002
– Turner, S., Seranatna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K. and Tan, B., 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. Plant Science, 160(3): 489-497.
– Walters, C., Touchell, H.D., Power, P., Wesley-Smith, J. and Antolin, M.F. 2002. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. Cryo Letters, 23(5): 291-298.
– Wen, B. and Song, S., 2007. Acquisition and loss of cryotolerance in *Livistona chinensis* embryos during seed development. Cryo Letters, 28(4): 291-302.

Preservation of the genetic resources of *Fraxinus excelsior* L. in cryopreservation

L. Mirjani [1*], A. Ghamarizare [2] and K. Spahbodi [3]

1*- Corresponding author, Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran. E-mail: mirjani@rifr-ac.ir
2- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R.Iran
3- Assoc. Prof., Forests and Rangelands Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, I.R. Iran

Received: 02.02.2022 Accepted: 15.08.2022

Abstract

According to the IUCN, *Fraxinus excelsior* L. is a near-threatened species due to the spread of Ash dieback disease. Thus, it is important to preserve the genetic resourse of this species. Seeds and plant organs storage under cryopreservation conditions is a very efficient method to maintain the germplasm of plant species for a long time. Ash seeds were collected from Sangdeh region of Mazandaran province, Iran. Three dehydration treatments were applied to store ash seeds in the cryopreservation. The treatments were 30% glycerol pretreatments, vitrification, and desiccation which were used before entering to liquid nitrogen. After 24 hours, the treated seeds were removed from liquid nitrogen and thawed. Then, they were evaluated for viability and seed germination traits in coimparison to the control. The highest seed viability (92%) and germination (36%) were related to desiccation treatment. The moisture content of *F. excelsior* seeds at maturity was 5%(w/w). For desiccation treatment, the seeds were placed in a desiccator containing silica gel under vacuum conditions. The moisture content of the seeds decreased by 1.66% compared to the ripening time. Reducing the amount of seed moisture prevents crystallization and rupture of plasma membranes in liquid nitrogen. Glycerol 30% and vitrification treatments were also successful, but probably damaged the seed embryo and reduced the seed survival rate. Due to higher efficiency and no need to use chemicals, the collected ash seeds successfully cryopreserved in the Cryo-Bank of the Research Institute of Forests and Rangelands, Iran, to preserve for a long term and to prevent the extinction of this valuable and unique species.

Keywords: Desiccation, regeneration, cryoprotectant, genome storage