

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

فیروزه حاتمی^۱، مریم جبلی^۲، محبتعلی نادری شهاب^{۳*}، مسعود طبری^۴ و علی اشرف جعفری^۵

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، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، پست الکترونیک: naderishahab@rifr-ac.ir

۴- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۵- دانشیار، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۰۵

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 196°C یا ازت مایع می‌باشد. در این درجه از سرما، فرایندهای متابولیکی و فعالیت‌های فیزیولوژیک بذر یا اندام گیاهی تقریباً 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 پیش تیمارهای 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 196°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 4°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.

واژه‌های کلیدی: فراسرد، گلیسرول، ویتریفیکاسیون، شوک حرارتی، کیکم.

مقدمه

جنوبی است و در ایران در دامنه‌های البرز و زاگرس انتشار دارد (ثابتی، ۱۳۴۴). طبق طبقه‌بندی ثاقب‌طالبی و همکاران (۱۳۸۳) گونه *Acer monspessulanum* جزو گونه‌های در حال انقراض و در گروه ذخایر طبیعی

کیکم با نام علمی *Acer monspessulanum* L. از خانواده *Aceraceae* و جنس *Acer* درختی است به ارتفاع ۱۰-۱۵ متر. از نظر پراکنش جهانی این گونه بومی اروپای

Jeyendran) گلیسرول (*et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003
 و کپسوله کردن- ویتریفیکاسیون (*et al.*, 1985
 Panis & Lambardi,) (Encapsulation-Vitrification)
 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. محققى 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 ۶۰ 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 موفقیت‌آمیز
 گزارش نمود. بکارگیری تکنیک انجماد یک مرحله‌ای/
 ویتریفیکاسیون (One step freezing-Vtrification) نیز
 برای حفاظت فراسرد جوانه‌های انتهایی گونه‌های
Olea europaea, *Castanea sativa*, *Quercus suber*
Fraxinus angustifolia و *Aesculus hippocastaneum*
 Panis & Lambardi,) موفقیت‌آمیز گزارش شده است (۲۰۰۵).
 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

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 -196°C یا محیط ازت مایع که
 در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام
 گیاهی تقریباً متوقف شده است را برای مدت زمان بسیار
 طولانی حفظ نمود (Ozkavukcu & Erdemli, 2002).
 نتایج حاصل از بررسی‌های Walters و همکاران (۲۰۰۴)
 با استفاده از معادله Avrami نشان داد که نیمه‌عمر
 جوانه‌زنی کاهو در دمای -196°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

قرارگیری نمونه بذرها در ازت مایع (دمای 196°C -)،
پیش تیمارهای زیر اعمال گردید:

پیش تیمار گلیسرول ۳۰ درصد (Glycerol 30%):
محلول گلیسرول ۳۰ درصد با اضافه نمودن ۳۰ میلی لیتر
گلیسرول خالص به ۷۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. نمونه
بذرهای به لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی لیتری درب دار
(فالکون ۱۵ میلی لیتری) منتقل و به آنها محلول گلیسرول
۳۰ درصد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 22°C +
قرار داده شدند. سپس فالکون‌های حاوی بذر بلافاصله
وارد ازت مایع گردیدند.

پیش تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification): از دو
محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و
Loading به عنوان پیش تیمار استفاده شد. محلول PVS2
شامل ساکاروز (Sucrose) $0/4$ مولار، گلیسرول
(Glycerol) ۳۰ درصد، اتیلن گلیکول (Ethylenglycol)
۱۵ درصد و DMSO (Dimethyl sulfoxide) ۱۵ درصد
می باشد (Sakai et al., 1991). محلول Loading شامل
گلیسرول (Glycerol) ۲ مولار و ساکاروز (Sucrose) $0/4$
مولار می باشد (Sakai & Engelman, 2007). بذرهای
داخل فالکون ۱۵ میلی لیتری قرار داده شدند، به فالکون‌ها
محلول Loading اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 0°C
+۲۲ قرار داده شدند. پس از ۲۰ دقیقه محلول Loading
تخلیه و به فالکون‌های حاوی بذر محلول PVS2 سرد
(دمای 4°C +) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 0°C +
قرار داده شدند. سپس فالکون‌ها وارد ازت مایع گردیدند.

پیش تیمار کاهش رطوبت بذر: در این تیمار، وزن
اولیه بذر با ترازوی حساس ($0/0001$ گرمی) تعیین
گردید. سپس بذرها به مدت ۷۲ ساعت در آن و در
دمای 0°C ۷۲ قرار داده شدند، پس از قرارگرفتن در آن

کلی زنده‌مانی بذرها در شرایط فراسرد، با کاهش ۱۰ - ۵
درصد محتوای رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع،
مثبت گزارش شده است (Stanwood, 1985). در جنس
بید کاهش ۵ - ۳ 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
۹/۵ درصد از کل رطوبت بذر بهترین نتیجه را در
زنده‌مانی بذرهای این گونه در بر داشته است (Hay &
Muir, 2000). برای حفاظت فراسرد ۹ گونه مختلف از
جنس‌های *Malus*، *Prunus*، *Pyrus* و سایر گونه‌های
درختی، Lambardi و Carlo (۲۰۰۳) روش
کیسوله کردن-کاهش رطوبت بذر (-Encapsulation
Dehydration) را بکار بردند و در ۵۰ درصد از گونه‌ها
زنده‌مانی ۸۰ درصد یا بیشتر را گزارش نمودند. برای
حفاظت فراسرد بسیاری از گونه‌های گیاهی نواحی
گرمسیری و نیمه گرمسیری که بذرهای آنها Recalcitrant
می باشند از روش‌های ویتریفیکاسیون و کاهش رطوبت
برای نگهداری بافت یا اندام گیاهی استفاده شده است
(Benson, 1999).

براساس آزمایش Beardmore و Whittle (۲۰۰۵)
مقاومت به کاهش رطوبت و تحمل به دمای پایین در
جوانه‌های جنینی حاصل از بذرهای *Acer saccharinum*
L که با ABA و tetracyclacis تیمار شده بودند، رشد -
جوانه‌های پیش تیمار شده با ABA و tetracyclacis نسبت
به نمونه‌های شاهد تا ۵۵٪ افزایش نشان دادند.

مواد و روشها

بذر گونه *Acer monspessulanum* از منطقه قلندر،
استان ایلام در پاییز ۱۳۸۶ جمع‌آوری گردید. قبل از

نیز وزن بذرها محاسبه گردید. درصد رطوبت بذر با محاسبه اختلاف وزن بذرها، قبل و بعد از قرارگیری در آن تعیین گردید (۶/۷ درصد). در تیمار کاهش رطوبت بذر، بذرها به مدت یک هفته 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 بذرها به دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر سیلیکاژل خشک (۱۰ برابر وزن بذر) منتقل گردیدند، در ادامه هوای داخل دسیکاتور تخلیه و دسیکاتور به مدت یک هفته در دمای 4°C قرار داده شد. پس از یک هفته، بذرها از دسیکاتور خارج و مجدداً 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 آن بدست آمده بود) محاسبه و درصد آن که همان درصد کاهش رطوبت بذر در تیمار کاهش رطوبت می باشد مشخص شد (درصد کاهش رطوبت معادل $40/30 = 59/70 - 100$ می شد). بذرها پس از خروج از دسیکاتور به فالكونها

منتقل و بعد از ازت مایع گردیدند. تیمار (شاهد): بذرها شاهد به فالكونها منتقل و در سردخانه با دمای 4°C نگهداری شدند. کلیه تیمارها بجز تیمار شاهد به مدت یک هفته و یک ماه در ازت مایع با دمای 196°C - نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان نگهداری در ازت مایع، بذرها از ازت مایع خارج و همراه بذرها شاهد به مدت ۲ دقیقه در آب 42°C (شوک حرارتی) قرار داده شدند (Engelmann, 1990). پس از شوک حرارتی، نمونه بذرها فراسرد و شاهد برای تعیین درصد جوانه زنی در ظروف حاوی کاغذ صافی قرار گرفته و در سردخانه با دمای 4°C نگهداری شدند. جوانه زنی بذرها پس از ۱۰۵ روز تعیین و سایر صفات از قبیل طول ریشه چه، طول ساقه چه و طول گیاهچه پس از سبز شدن بذرها (۱۲۱ روز) اندازه گیری گردیدند. با مشخص شدن درصد جوانه زنی و میانگین طول ریشه چه و ساقه چه، در شرایط آزمایشگاهی، شاخص بنیه بذر به روش زیر محاسبه شد (Abdul-baki & Anderson, 1973):

$$100 / \text{درصد جوانه زنی} \times \text{میانگین طول گیاهچه به میلی متر (مجموع طول ساقه چه و ریشه چه)} = \text{شاخص بنیه بذر}$$

تجزیه و تحلیل آماری شدند و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها (جدول ۱) نشان داد که در بین تیمارهای شاهد، کاهش رطوبت بذر، گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون (PVS2) در صفاتی مانند درصد جوانه زنی، طول ساقه چه، طول ریشه چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه چه به طول ساقه چه و شاخص

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل اجرا شد. تیمارهای قبل از فراسرد شامل کاهش رطوبت (Desiccation)، ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد به عنوان سطوح یک فاکتور و زمان های ذخیره سازی شامل یک هفته و یک ماه به عنوان سطوح فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. تیمارها در ۳ تکرار و در طرح پایه بلوک های کاملاً تصادفی مقایسه شدند. داده های بدست آمده از درصد جوانه زنی، طول ساقه چه، ریشه چه، گیاهچه، نسبت ریشه چه به ساقه چه و شاخص بنیه بذر با نرم افزار SAS

معنی داری وجود نداشت. تنها در نسبت طول ریشه چه به طول ساقه چه تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد. با این حال، روند نزولی درصد جوانه زنی و بنیه بذر از یک هفته به یک ماه دیده شد (جدول ۱).

بنیه بذر تفاوت معنی داری وجود نداشت. در بررسی اثر زمان های یک هفته و یک ماه نگهداری بذر در دمای 196°C در صفاتی مانند درصد جوانه زنی، طول ساقه چه، طول ریشه چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر نیز تفاوت

جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنی دار بودن اثر پیش تیمارها، زمان ها و اثر متقابل آنها بر نگهداری بذرهای گونه *A. monspessulanum* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای 196°C

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه زنی	طول ساقه چه	طول ریشه چه	طول گیاهچه	طول ریشه چه به طول ساقه چه	بنیه بذر
تیمار	۳	۰/۰۱۴ ^{ns}	۲/۹۰ ^{ns}	۱۴/۸۶ ^{ns}	۳۰/۴۰ ^{ns}	۰/۰۴ ^{ns}	۸/۹۰ ^{ns}
زمان	۱	۰/۰۰۴ ^{ns}	۱۳/۵۰ ^{ns}	۲۸/۱۷ ^{ns}	۲/۶۷ ^{ns}	۰/۸۷ ^{**}	۲/۳۲ ^{ns}
اثر متقابل تیمار * زمان	۳	۰/۰۰۷ ^{ns}	۶/۲۱ ^{ns}	۱۲/۱۹ ^{ns}	۱۵/۸۷ ^{ns}	۰/۲۱ [*]	۴/۵۰ ^{ns}
خطا	۱۶	۰/۰۱	۱۰/۵۱	۱۶/۸۲	۴۸/۲۲	۰/۰۶	۸/۲۳
ضریب تغییرات (CV%)		۲۲/۵۵	۲۷/۸۹	۲۳/۷۸	۲۴/۰۵	۱۵/۵۳	۴۹/۹۵

ns و **،* = به ترتیب معنی دار در سطح ۵٪، ۱٪ و عدم معنی داری.

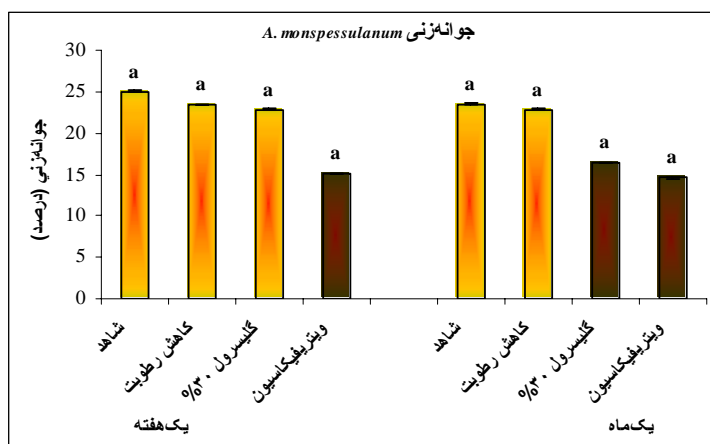
۳۰ درصد در یک هفته نگهداری در فراسرد با نسبت ۲/۰۷ بیشترین مقدار و گلیسرول ۳۰ درصد یک ماه نگهداری در فراسرد با نسبت ۱/۲۲ از کمترین مقدار برخوردار بود (جدول ۲). در نمودار ۱ اثر صفات درصد جوانه زنی، بنیه بذر، طول گیاهچه، طول ریشه چه و طول ساقه چه بذرهای *A. monspessulanum* پس از خروج از شرایط فراسرد نشان داده شده است. شکل ۱ نیز نشان دهنده گیاهچه های حاصل از رشد گونه *A. monspessulanum* یک هفته و یک ماه نگهداری شده در ازت مایع می باشد.

اثر متقابل میانگین تیمارهای کاهش رطوبت بذر، ویتریفیکاسیون (PVS2) و گلیسرول ۳۰ درصد در مدت زمان های یک هفته و یک ماه نگهداری در دمای 196°C و مقایسه با تیمار شاهد نشان داد که در صفات درصد جوانه زنی، طول ساقه چه، طول ریشه چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر نیز تفاوت معنی داری در بین تیمارها وجود نداشت (شکل ۱) و تنها در صفت نسبت طول ریشه چه به طول ساقه چه تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد. در این صفت تیمار گلیسرول

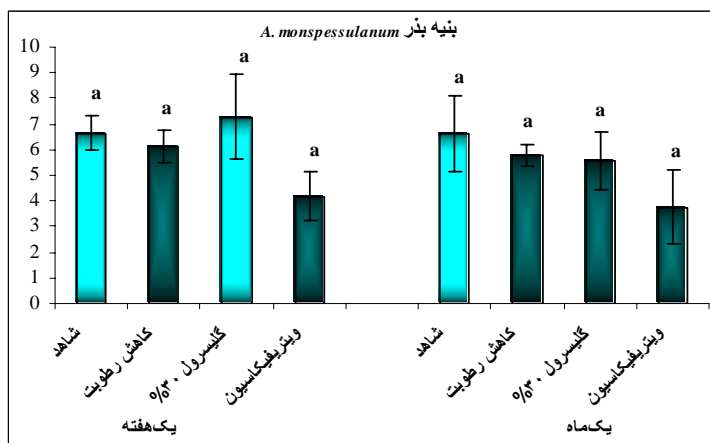
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تیمارها در زمان‌های نگهداری بذرهای گونه *A. monspessulanum* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای ۱۹۶ °C- به روش آزمون دانکن

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

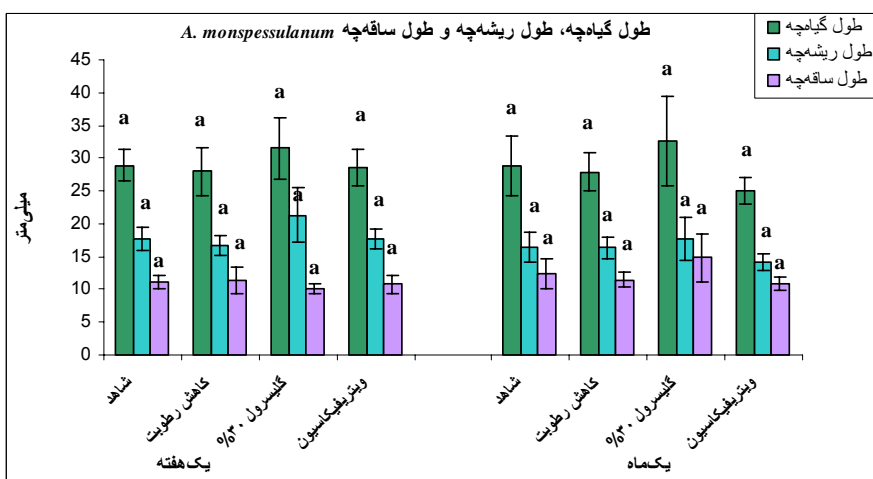
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح تیمارهاست.



الف

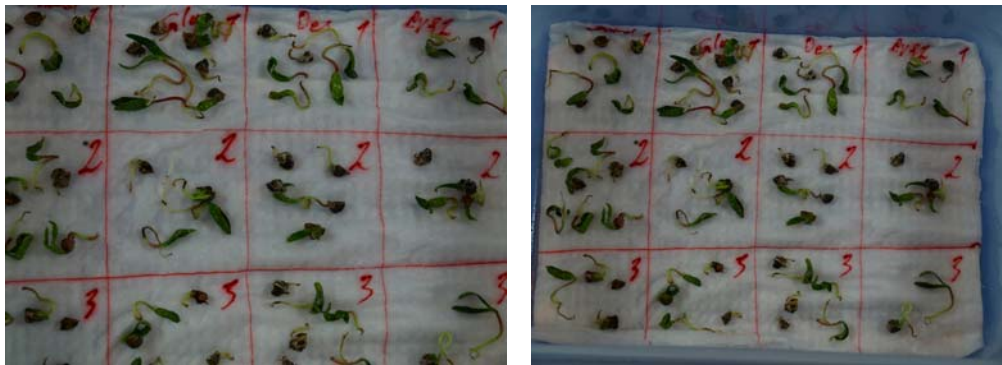


ب



ج

نمودار ۱- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول ۳۰٪ و کاهش رطوبت بذر بر الف: درصد جوانه زنی، ب: بنیه بذر و ج: طول گیاهچه، ریشه چه و ساقه چه بذرهای جوانه زده گونه *A. monspessulanum* پس از یک هفته و یک ماه نگهداری در ازت مایع



ب

الف

شکل ۱- الف: گیاهچه‌های حاصل از رشد بذرهای گونه *A. monspessulanum* یک‌هفته نگهداری شده در دمای -196°C -
 ب: گیاهچه‌های حاصل از رشد بذرهای گونه *A. monspessulanum* یک‌ماه نگهداری شده در دمای -196°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 -196°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 ثوری، 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, 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 (Thin, 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 -196°C تأثیر مثبتی در حفظ و

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 196°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 196°C - برآورد ماندگاری بذر در مقیاس بیش از هزار سال وجود دارد.

با استفاده از فناوری 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 فناوری حفاظت در شرایط فراسرد امکان نگهداری طولانی مدت بذر تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در معرض خطر را فراهم کرده و حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های

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، پیش تیمار 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 4°C +، حدود ۱۰۵ روز به طول می‌انجامد. در همین رابطه نصیری (۱۳۸۷) جوانه‌زنی بذر گونه *A. monspessulanum* در بستر ماسه را حدود ۶ ماه گزارش نمود که موید وجود خواب در بذر این گونه می‌باشد. درصد احیاء بذرها در کلیه تیمارها پایین ولی امیدوارکننده بود و با توجه به اختلافات کم موجود بین سه پیش تیمار فراسرد با تیمار شاهد می‌توان به این نتیجه رسید که بذر این گونه را با هریک از تیمارهای فوق می‌توان در دمای 196°C - در دوره بلندمدت نگهداری نمود. در بین پیش تیمارهایی که در این بررسی بکار گرفته

- 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/IVALSA 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 Horticulturæ* 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.
- ارزشمند جنگلی و مرتعی را موجب می‌شود. بنابراین با استفاده از این فناوری امکان احیاء و حفاظت گونه‌های مختلف در معرض خطر در اکوسیستم‌های منابع طبیعی فراهم می‌شود. شایان ذکر است که نگهداری طولانی مدت بذر یا سایر اندام‌ها در شرایط فراسرد و دور شدن نمونه از شرایط متغیر محیطی، از جمله ملاحظات است که نباید از نظر پنهان بماند.
- ### منابع مورد استفاده
- ثابتی، ح. ۱۳۴۴. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی. ۸۸۶ص
 - 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. ۱۶: ۹-۱۰
 - 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 Physiology*, 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.

- 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

Cryopreservation of *Acer monspessulanum* seeds

F. Hatami¹, M. Jebelli², M. Naderi Shahab^{3*}, M. Tabari⁴ and A.A. Jafari⁵

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 °C 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 °C 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 °C 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 °C using suitable pre-cryopreservation treatment is possible.

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