دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۶۰-۵۰ (۱۳۸۷)

حفاظت بذرهای *Medicago rigidula* در دمای فراسرد با استفاده از دو روش شیشه‌ای شدن و کپسوله‌کردن-آبگیری

مرضیه کلاهدوزان[1*]، عباس قمری زارع[2]، شکوفه شهرزاد[3] و خدیجه کیارستمی[4]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا تهران، پست الکترونیک: marziehkolahdoozan@yahoo.com
۲- استادیار پژوهشی، گروه زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها ومراتع، ص.پ. ۱۱۶-۱۳۱۸۵ تهران
۳- کارشناس گروه زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- استادیار دانشگاه الزهرا تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸٦/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/٦/۲۳

چکیده

یونجه یکساله (*Medicago rigidula*) یکی از گونه‌های مرتعی و بومی ایران است و حفاظت از منابع ژنتیکی این گیاه مرتعی لازم و ضروری می‌باشد. بنابراین برای اولین بار در ایران بذرهای این گیاه در شرایط فراسرد با استفاده از دو روش شیشه‌ای شدن و کپسوله کردن-آبگیری با موفقیت حفاظت شدند. بذرها به مدت ٤ روز توسط سیلیکاژل در دسیکاتور آبگیری شدند و دو روش حفاظتی اعمال گردید. در روش اول یا روش شیشه‌ای شدن، بذرها به مدت ۲۰ دقیقه با محلول گلیسرول ۲M در سوکروز ۰/٦M بارگیری شدند؛ بذرهای بارگیری شده به کرایوویال‌های ۲ml حاوی ۰/۵cc محلول PVS2 صفر درجه انتقال یافتند. در روش دوم یا روش کپسوله کردن-آبگیری، بذرها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اسید آلژینیک غوطه‌ور گردیدند و پس از آن به همین مدت به محلول $CaCl_2$ منتقل شدند. بذرهای کپسوله شده به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق آبگیری شدند و به کرایوویال‌های ۲ml انتقال یافتند. هر دو گروه از بذرها به‌سرعت وارد نیتروژن مایع گردیدند. پس از ٦ روز بذرهای شیشه‌ای و کپسوله به مدت ۲ دقیقه در حمام آب مقطر سترون با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد ذوب گردیدند و در فاصله‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در محلول سوکروز ۱/۲ مولار با استفاده از شیکر شستشو داده شدند. آنگاه از ۳ روش بازیابی استفاده شد: ۱)آبشویی بذرهای شیشه‌ای و کپسوله و شاهد به مدت الف) ۳۰ دقیقه، ب) ۲٤ ساعت و انتقال بذرهای روش ۱ و ۲ به پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب، ۲) سترون کردن بذرهای شیشه‌ای، کپسوله و شاهد با هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ و انتقال آنها به محیط MS حاوی GA_3 ۰/۵mgl^{-1}. بدین ترتیب درصد زنده‌مانی بذرها در روش غیر سترون پس از ٤ روز و در روش سترون پس از ۱۸ روز اندازه‌گیری شد. درصد جوانه‌زنی بذرها پس از روش شیشه‌ای شدن و کپسوله کردن-آبگیری به‌ترتیب بین ۹۹/۲-۹۸/٦٪ و ۹۹/۷-۹۸/٤٪ بود.

واژه‌های کلیدی: حفاظت در دمای فراسرد، شیشه‌ای شدن، کپسوله‌کردن-آبگیری، *Medicago rigidula*.

مقدمه

منابع ژنتیکی گیاهی در زمینه کشاورزی اساس امنیت غذایی در جهان هستند اما این منابع با سرعت غیر عمولی در حال ناپدید شدن می‌باشند. این امر دلایل بسیاری دارد که از آن جمله می‌توان جنگل‌زدایی، گسترش راه‌ها، شهرسازی و کشاورزی مدرن را نام برد. چرای مفرط و

تغییر در الگوی استفاده از زمین نیز خسارت سنگینی به گونه‌های گیاهی وحشی کنونی وارد کرده است. چنین روندی در درازمدت تأثیر جدی در امنیت غذایی خواهد داشت. توجه جهانی به نابودی منابع با ارزش ژنتیکی عملکردی بین‌المللی را برمی‌انگیزاند. بنابراین برنامه‌هایی به منظور حفاظت منابع ژنتیکی گیاهی در حال انجام است که هدف اصلی از این عملکردها جمع‌آوری و نگهداری تنوعات ژنتیکی به منظور دسترسی مداوم در مواجهه با نیاز مصرف کنندگان می‌باشد. در این زمینه باید روش‌های جمع‌آوری بکار گرفته شود و حفاظت جدی انجام شود (Rao, 2004). از جمله برنامه‌های حفاظتی، ایجاد بانک‌های ژن در سرتاسر جهان است. در این بانک‌های ژن، معمولاً بذر گیاهان در شرایط مناسب(۵-۱ درجه سانتی‌گراد) برای حفاظت میان‌مدت و یا در دمای زیر صفر (معمولاً ۱۸- درجه سانتی‌گراد) برای حفاظت بلندمدت نگهداری می‌شوند. اما در این شرایط، بذرها پس از مدتی قوه نامیه خود را از دست می‌دهند. بنابراین بازگشت بذرها امری ضروریست. اما ممکن است در طی بازکشت‌های مکرر نمونه‌ها دچار آلودگی گردند (Saloma, 2002). از طرف دیگر گرچه جمع‌آوری دانه در گونه‌هایی که تعداد زیادی دانه تولید می‌کنند آسان است اما گاهی دانه‌ها غیرقابل دسترسند و یا توسط چرای دام و عوامل بیماری‌زا دچار آسیب شده‌اند. گاهی نیز در طی انتقال به محل نگهداری، بذرها قدرت زنده‌مانی خود را از دست می‌دهند (Rao, 2004). از دیگر فعالیت‌های حفاظتی منابع ژنتیکی گیاهی ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی و مناطق حفاظت شده در عرصه‌های طبیعی است که هزینه مراقبت و نگهداری گونه‌های گیاهی در این مکآنها بسیار سنگین و سرسام‌آور است (Saloma, 2002).

تکنولوژی ذخیره ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای فراسرد (Cryopreservation)، اولین بار در دهه ۱۹۷۰ شروع و در دهه ۱۹۸۰ توسعه یافت، در این تکنولوژی ماده گیاهی در دمای بسیار پایین (۱۹۶°C-) نیتروژن مایع به مدت طولانی ذخیره می‌گردد (Barbara, 2001). در این دما تقسیم سلولی و فعالیت‌های متابولیسمی به حالت تعلیق در می‌آیند و ماده گیاهی بدون هیچ تغییری ذخیره می‌شود و در زمان خاص و در صورت لزوم فرایندهای بازیابی صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر، در این دما واکنش‌های معمول شیمیایی اتفاق نمی‌افتد. زیرا دما آنقدر پایین است که تحرک مولکولی کافی برای انجام واکنش‌ها وجود ندارد (Rao, 2004).

حفاظت در دمای فراسرد یک تکنولوژی توسعه یافته است که باعث بقای ماده ژنتیکی با ارزش می‌گردد و تنها روش موجودیست که در درازمدت از ژرم پلاسم گیاهی که به صورت رویشی تکثیر شده است حفاظت می‌کند. مواد نگهداری شده به این روش می‌توانند قدرت زنده‌مانی خود را به مدت طولانی حفظ کنند. از این‌رو خطرفرسایش ژنی و از دست رفتن ذخایر ژنتیکی کاهش می‌یابد. این روش به فضای کمی نیاز دارد و ماده گیاهی را از آلودگی‌ها نیز محافظت می‌کند. علاوه بر این، تقریباً هیچ‌گونه تغییرات فیزیولوژیکی و سوماکلونال در نمونه‌ها پدید نمی‌آید. بنابراین این روش یک انتخاب کارآمد در زمینه حفاظت ماده ژنتیکی گیاهیست (Rao, 2004).

اولین گزارش‌ها در زمینه استفاده از محلول شیشه‌ای شدن در سال ۱۹۸۹ داده شد. ۱۵ سال بعد از اولین گزارش این روش به‌عنوان گسترده‌ترین پروتکل حفاظت فراسرد استفاده گردید. موفقیت این روش، سهولت آن است. همچنین این روش به‌خوبی برای محدوده وسیعی

از گونه‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Wolf & Bryant, 1999).

شیشه‌ای شدن، شامل استفاده از محلول‌هایی با ویسکوزیته و قابلیت آبگیری بالاست (Luo & Reed, 1997). در این روش محتوای آب نمونه‌ها کاهش می‌یابد و به سطحی می‌رسد که کریستال یخی تشکیل نشود و آب باقیمانده، مستقیماً از فاز مایع به فاز بی‌شکل انتقال یابد. در این حالت خطری از جانب فاز بی‌شکل اجزای سلولی را تهدید نخواهد کرد. از طرفی با استفاده از این روش می‌توان از تشکیل کریستال یخی بدون آنکه کاهش قابل توجهی در آب درون سلولی مشاهده شود جلوگیری کرد (Wolf & Bryant, 1999).

روش کپسوله کردن-آبگیری نیز یکی از روش‌های حفاظتی تکنولوژی حفاظت فراسرد است. این تکنیک اولین بار توسط Redebbaugh و همکاران در سال‌های ۱۹۸٦ و ۱۹۸۷ گزارش شد و در سال ۱۹۹۰ توسط Fabre و Dereuddre توسعه یافت و تاکنون برای انواع زیادی از ژرم‌پلاسم‌های گیاهی استفاده شده است. این تکنیک یکی از پروتکل‌های پایه‌ای و مهم حفاظت فراسرد است که تاکنون با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Benson, 1999, Fabre & Dereuddre, 1990). روش کپسوله کردن-آبگیری تاکنون در حفاظت فراسرد هویج (*Davcus carota*) (Dereuddre *et al*., 1991, Dereuddre *et al*., 1991)، جوانه‌های رازک (Martinez & Revilla. 1998) ، کشمش بی‌دانه (*Ribes caliatum*) (Domet, 2000) و چندین گونه تجاری دیگر به کار برده شده است.

از اهداف مهم این تحقیق، دستیابی به یک تکنیک کارآمد جهت حفاظت بذرهای گیاه *M. rigidula* است. این گیاه یکی از گونه‌های مرتعی بومی ایران می‌باشد. بنابراین در طی این پژوهش امکان نگهداری و زنده‌مانی بذرهای این گیاه در شرایط فراسرد با استفاده از روش شیشه‌ای شدن و کپسوله کردن-آبگیری برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

بذرهای این گونه گیاهی، از مراتع واقع در ایستگاه تحقیقاتی البرز کرج جمع‌آوری شدند و بذرهای سالم به مدت ٤ روز توسط سیلیکاژل در دسیکاتور آبگیری گردیدند.

گروهی از بذرهای آبگیری شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محلول بارگیری سترون حاوی گلیسرول ۲M در سوکروز ۰/٦ M قرار گرفتند (Panis *et al*., 2004). به منظور آبگیری از محلول PVS2 استفاده شد. محلول PVS2 حاوی اتیلن گلیکول (EG) ۱۵٪ w/v، DMSO ۱۵٪ w/v، گلیسرول ۸۷٪ w/v ۳۰٪، سوکروز در نمک‌های ۱/۲MS به میزان ۱۳/۷٪ w/v بود. بذرهای بارگیری شده درون کرایوویال‌های سترون حاوی ۰/۵cc محلول PVS2 با دمای صفر درجه قرار داده شدند و بعد بلافاصله در LN ذخیره گشتند.

پس از آبگیری، گروه دیگری از بذرها، به مدت ۱۵ دقیقه به محلول اسید آلژینیک منتقل گردیدند. این محلول حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز، $50 mgl^{-1}$ آسکوربیک اسید، ۳٪ آلژینیک اسید و نمک‌های میکرو محیط MS در حجم کامل و نمک‌های ماکرو این محیط در نصف میزان آن بود. بعد بذرها از این محیط خارج و به مدت ۱۵ دقیقه به محلول $CaCL_2$، ۱۰۰mmol منتقل شدند. پس از تشکیل کپسول در اطراف ریزنمونه‌ها، کپسول‌ها به مدت ۲۰ ساعت در شرایط آزمایشگاهی با دمای اطاق (۲۵ درجه

سانتی‌گراد) خشک شدند تا کپسول‌ها آب خود را از دست دهند.

در روش شیشه‌ای شدن، بذرهای بارگیری شده درون کرایوویال‌های سترون ۲ml حاوی ۰/۵cc محلول PVS2 با دمای صفر درجه قرار داده شدند. بذرهای کپسوله شده نیز به کرایوویال‌های ۲ml منتقل شدند و هر دو گروه از بذرها به‌سرعت در تانک‌های نیتروژن مایع غوطه‌ور گردیدند.

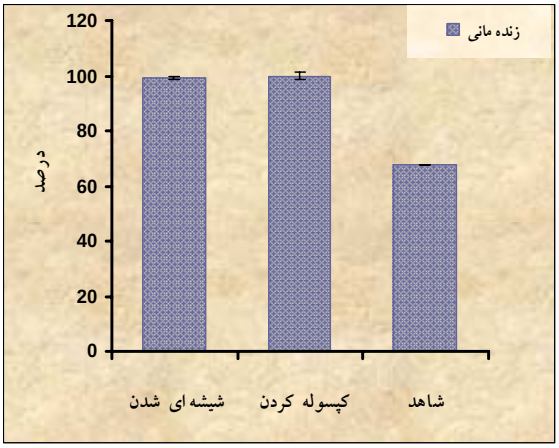
پس از نگهداری بذرهای شیشه‌ای و کپسوله به‌مدت ٦ روز در نیتروژن مایع، کرایوویال‌ها از تانک‌های نیتروژنی خارج شده و به مدت ۲ دقیقه در حمام آب مقطر سترون ٤٠ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند. بعد نمونه‌ها در فاصله‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در محلول سوکروز ۱/۲ مولار و نصف میزان نمک‌های MS بر روی شیکر منتقل گردیدند.

به‌منظور بازیابی بذرها از سه روش استفاده گردید: ۱) بذرهای شیشه‌ای، کپسوله و شاهد به‌مدت ۳۰ دقیقه آبشویی شدند و در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند، ۲) گروه دیگری از بذرهای شیشه‌ای، کپسوله و شاهد به‌مدت ٢٤ ساعت آبشویی شدند و در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند، ۳) گروه سوم بذرهای شیشه‌ای، کپسوله و شاهد با هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ سترون شدند و پس از ۳ بار آبشویی ۲ دقیقه‌ای در ویال‌های حاوی محیط MS و $0/5\ mgl^{-1}$ هورمون جیبرلیک اسید استقرار یافتند. هر تیمار دارای ٤ تکرار و هر تکرار حاوی ۲۵ ریزنمونه بود (بذرهای ۱ و۲ در شرایط غیرسترون و بذرهای ۳ در شرایط سترون بودند).

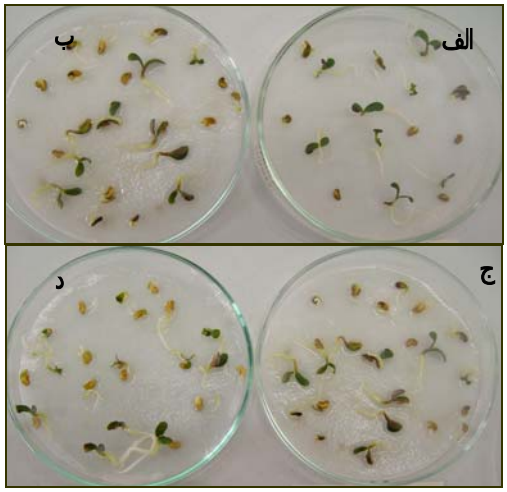
درصد زنده‌مانی بذرها (درصد تولید دانه‌رست یا گیاهچه) در شرایط غیرسترون پس از ٤ روز و در شرایط سترون پس از ۱۸ روز محاسبه گردید. تجزیه واریانس داده‌های تبدیل شده به arcsin، توسط نرم‌افزارSAS در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

اثر انواع پروتکل‌ها با ۳۰ دقیقه آبشویی بر زنده‌مانی بذرها: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده (LN+) و شاهد (LN-) در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. همچنین درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد (LN-) کمتر از بذرهای تیمار شده (LN+) بود. ولی درصد جوانه‌زنی بذرهای شیشه‌ای و کپسوله هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. بالاترین درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب در روش کپسوله کردن و برابر با ۱۰۰٪ بود. درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد نیز ٦٧/٧٪ بود (شکل ۱ و ۲ و جدول ۱).



شکل ۱- مقایسه زنده‌مانی بذرها در شرایط غیر سترون با ۳۰ دقیقه آبشویی پس از تیمار فراسرد.



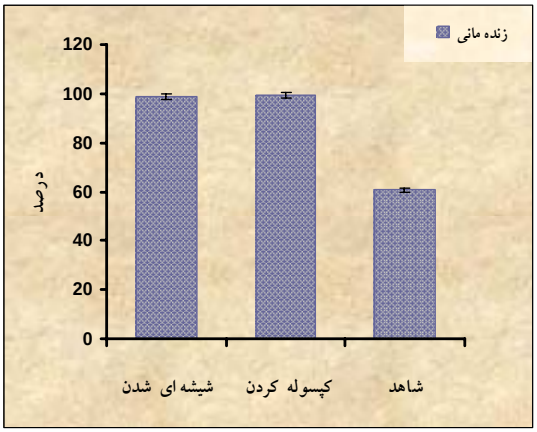
شکل ۲- زنده‌مانی بذرها با ۳۰ دقیقه آبشویی در روش الف: شیشه‌ای شدن، ب: شاهد، ج: کپسوله کردن و د: شاهد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر انواع پروتکل‌ها با ۳۰ دقیقه آبشویی بر زنده‌مانی بذرها پس از تیمار فراسرد

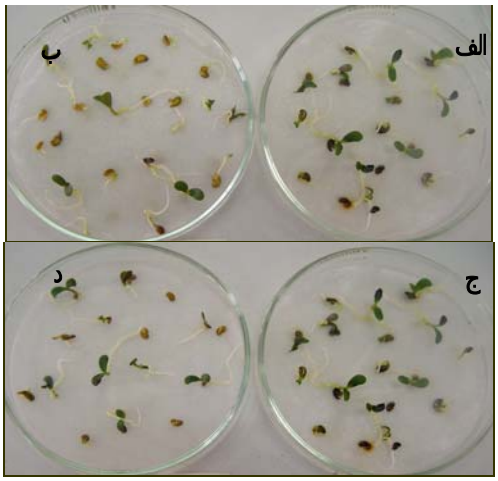
منابع تغییرات	درجه آزادی	ضریب تغییرات	میانگین مربعات	F value
اثر نوع تیمار با ۳۰ دقیقه آبشویی بر زنده‌مانی بذرها	۲	۱۰/۷٤	۱۳٥٥/۸٦	۲۱/۲۳**

**: میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار دارند.

اثر انواع پروتکل‌ها با ۲٤ ساعت آبشویی بر زنده‌مانی بذرها: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده (+LN) و شاهد (-LN) در سطح احتمال ٥ درصد وجود داشت. همچنین درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد (-LN) کمتر از بذرهای تیمار شده (+LN) بود. ولی درصد جوانه‌زنی بذرهای شیشه‌ای و کپسوله هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. بالاترین درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب در روش شیشه‌ای شدن و برابر با ۹۸/٦٪ بود. درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد نیز ٦۰/٦٪ بود (شکل ۳ و ٤ و جدول ۲).



شکل ۳- مقایسه زنده‌مانی بذرها در شرایط غیر سترون با ۲٤ ساعت آبشویی پس از تیمار فراسرد.



شکل ٤: زنده‌مانی بذرها با ۲٤ ساعت آبشویی در روش الف: شیشه‌ای شدن،ب: شاهد ج: کپسوله کردن و د: شاهد.

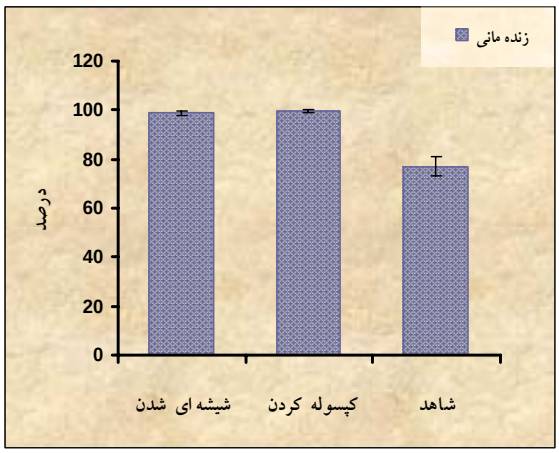
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر انواع پروتکل‌ها با ۲٤ ساعت آبشویی بر زنده‌مانی بذرها پس از تیمار فراسرد

منابع تغییرات	درجه آزادی	ضریب تغییرات	میانگین مربعات	F value
اثر نوع تیمار با۲٤ ساعت آبشویی بر زنده‌مانی بذرها	۲	۱٤/۱۵	۱۸٦۸/۰۲	**۱۷/۳۳

**: میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار دارند.

اثر انواع پروتکل‌ها در شرایط سترون بر زنده‌مانی و تولید گیاهچه بذرها: در شرایط سترون اختلاف معنی‌داری بین درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده (+LN) و شاهد (-LN) در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. همچنین درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد (-LN) کمتر از بذرهای تیمار شده (+LN) بود. ولی درصد جوانه‌زنی بذرهای شیشه‌ای و کپسوله هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. بالاترین درصد جوانه‌زنی

به‌ترتیب در روش کپسوله کـردن و برابـر بـا ۹۹/۷٪ بـود. و جدول ۳).
درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد نیز ۷۷/۰۵٪ بود (شـکل ۵



شکل ۵- مقایسه درصد زنده‌مانی بذرها در شرایط سترون پس از تیمار فراسرد.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر انواع پروتکل‌ها در شرایط سترون بر زنده‌مانی بذرها پس از تیمار فراسرد

منابع تغییرات	درجه آزادی	ضریب تغییرات	میانگین مربعات	F value
اثر نوع تیمار در شرایط سترون بر زنده‌مانی بذرها	۲	۱۱/۷۰	۹۸۲/۰۳	**۱۱/۹۵

**: میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار دارند.

بحث

حفاظت فراسرد بافت‌های زیستی تنها زمانی می‌تواند با موفقیت انجام شود که از تشکیل کریستال‌هـای یخـی درون سـلولی در زمـان غوطـه‌وری در نیتـروژن مـایع اجتناب گردد. زیرا این کریستال‌ها می‌توانند آسـیب‌هـای جـدی بـه غـشاء سـلولی وارد کننـد و قابلیـت غـشاء پلاسمایی را مختل کنند و از آنجایی که آسیب سلولی در تکنیک حفاظت فراسرد قابل جبران نیست بنابراین تکنیک‌های آبگیری به منظور کاهش آب درون سلولی صـورت مـی‌گیـرد (Wang *et al*, 2005; Roland *et al*, 2006). استفاده از ماده سیلیکاژل به‌منظور آبگیـری یکـی از روش‌هـای مرسـوم خشک کردن نمونه‌ها می‌باشد. نمونه‌هـای کپـسوله‌شـده را می‌توان به همراه مقداری سـیلیکاژل درون دسـیکاتور قـرار داد و به پمپ خلأ وصـل نمـود (Wolf & Bryant, 1999; Finkle & Ulrich, 1982). بـه ایـن منظـور بـذرها توسـط سیلیکاژل در دسیکاتور آبگیری شـدند تـا در اثـر کریـستاله شدن این میزان آب در زمان ورود به نیتروژن مـایع آسـیبی به ریزنمونه‌ها وارد نگردد.

از آنجایی‌که کلید موفقیت در روش شیشه‌ای شدن، القاء مقاومت اسمزی در نمونه‌ها به منظور رویارویی بـا محلـول شیشه‌ای شدن است، در طی اعمال پروتکل شیشه‌ای شـدن و پس از آبگیری و قبل از تماس با محلول PVS2، نمونه‌ها

در محلـول بـارگیری غوطـه‌ور شـدند (Hirai & Sakai, 2005). این محلول حاوی سوکروز ۰/٦ مولار و گلیـسرول ۲ مولار بود.

Wang و همکـاران (۲۰۰٤)، نـشان دادنـد کـه تمـاس مستقیم با محلول شیشه‌ای شـدن بـدون حفاظـت اسـمزی باعث ایجاد اثرهای مخرب بر روی بافت‌ها می‌شود کـه بـه دلیل استرس اسـمزی یـا سـمیت شـیمیایی اسـت. در ایـن صورت استفاده از محلول بـارگیری لازم و ضروریـست. از این‌رو پیش‌تیمار با محلول بارگیری باعث می‌شود محتـوای آب درونی نمونه‌ها را کاهش و مقامت اسمزی نمونه‌هـا در مقابل محلول شیشه‌ای شدن افزایش یابد. همچنین اسـتفاده از این محلول اثرهای سـمی مـواد محافظـت کننـده کـه در مرحله بعدی استفاده می‌شود را به حداقل می‌رساند. Wang و همکاران (۲۰۰۵)، طی آزمایشهایی بر روی سر شاخه‌های گیاه Papaya بیان داشتند که استفاده از ایـن محلـول باعـث بقای سرشاخه‌ها و طول عمر آنها می‌گردد. البته بقا نمونه‌هـا به ژنوتیپ آنها نیز بستگی دارد. استفاده از محلول بـارگیری دمای ذوب را نیز تا حد زیادی پایین می‌آورد و میزان بقـای نمونه‌ها را بعد از خروج از نیتروژن مایع افـزایش مـی‌دهـد (Wang *et al*., 2004، Wang *et al*., 2005 و Sarkar & Naik, 1998). Volk و Walters (۲۰۰٦)، نشان دادنـد کـه تیمار سرشاخه‌های نعنا و سیر با گلیسرول و سوکروز دمای ذوب را کـاهش داد و پـس از آن بـا اسـتفاده از محلـول شیشه‌ای این دما باز هم کاهش پیدا کرد. باید توجه داشـت بدون وجود گلیـسرول هـیچ غلظتـی از سـوکروز مقاومـت اسمزی را افزایش نخواهد داد (Hirai & Sakai, 2005).

گزارشها بسیاری مبنی بـر اثـرات بـسیار مفیـد محلـول بارگیری بر افزایش تحمل استرس اسمزی ناشی از محلـول شیشه‌ای شـدن وجـود دارد کـه در Taro (Takagi *et al*., 1997)، مـوز، ارکیـده و آنانـاس، (Thinh, 1997) و تـوت فرنگی، (Hirai *et al*., 1998) به اثبات رسیده است.

در این تکنیک پس از بارگیری، ریزنمونه‌هـا بـا یـک محلول غلیظ شیشه‌ای تیمار می‌شوند و شیـشه‌ای شـدن درون سلولی و خارج سـلولی رخ مـی‌دهـد. معمـولترین حفاظت کنندگان سرمایی کـه در ایـن مرحلـه و در ایـن محلول استفاده می‌شود شامل موادی مثل گلیـسرول، دی متیـل سولفوکـسید و اتـیلن‌گلیکـول هـستند. رایجتـرین محلولی که مورد استفاده قرار می گیرد PVS2 است. این محلول حاوی گلیـسرول ۳۰w/v٪، پلـی اتـیلن گلیکـول ۱۵w/v٪، دی متیل سولفوکسید w/v ۱۵٪ اسـت و دارای غلظت نسبتاً بالایی از قند سوکروز در محیط MS اسـت (۰/٤ مـولار). البتـه درصـد مـواد ذکـر شـده در مـورد گونه‌های گیاهی می‌تواند متفاوت باشـد (Wang *et al*., 2005 و Sarkar & Naik, 1998). برخی اجزای محلـول PVS2 در عین آبگیری از نمونه‌ها، جایگزین آب سلولی می‌شـوند، زیـرا بـه‌رغـم از دسـت رفـتن آب ، وزن تـر نمونه‌ها تغییر زیادی نمی‌کند، که این امر بـه دلیـل نفـوذ مواد سرمایی به درون سلول‌ها است. جرم مواد وارد شده به‌درون سلول‌ها را می‌توان با اندازه‌گیـری آب از دسـت رفته از سلول‌ها تخمـین زد (Volk & Walters, 2006 و Wang *et al*., 2005).

زمان بهینه تماس جداکشت با PVS2 در مورد گونه‌های مختلف متفاوت است و بستگی به دمای ایـن محلـول دارد، بنابراین می‌توان با کاهش دما از اثرات مخرب ایـن محلـول کاست. با کاهش دما، بـه‌دلیـل فعالیـت کمتـر واکـنش‌هـای جذبی در نمونه‌ها و در اثر تغییرات خاص در جذب اجزای PVS2، آسیب‌هـای احتمـالی محـدود مـی‌گردنـد. معمـولاً بهترین زنده‌مانی توسط تیمار نمونه‌هـا بـا ایـن محلـول، در

دمای صفر درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود. Wang و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که سلول‌های تیمار شده با محلول PVS2 در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت کمی زنده‌مانی خود را از دست دادند. Corredoira و همکاران نیز (۲۰۰٤) از محلول شیشه‌ای در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بر روی جنین‌های سوماتیکی و تخمی Chestnut استفاده نمودند. Panis و همکاران نیز (۲۰۰٤) با به‌کاربردن محلول PVS2 در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بر روی سرشاخه‌های برخی گونه‌های تیره Musaceae توانستند بازیابی حاصل کنند.

در روش کپسوله کردن-آبگیری، بذرها در کپسول‌هایی از جنس آلژینات کلسیم محصور می‌شوند. Flashsland و همکاران (۲۰۰٦) پیشنهاد کردند که یک تفسیر قابل قبول در رابطه با تأثیر زیاد این روش در افزایش درصد زنده‌مانی بذرها اینست که در این روش مواد غذایی معدنی و هورمونی کاملاً در دسترس ریزنمونه‌ها هستند، بنابراین علاوه بر ذخیره غذایی بذر، این کپسول‌ها می‌توانند به‌عنوان یک فاکتور تکمیلی به افزایش زنده‌مانی بذرها کمک کنند. همین‌طور ممکن است بدلیل وجود این کپسول‌ها و حضور طولانی مدت آنها در اطراف ریزنمونه‌ها یک‌سری مواد اندوژنی بتدریج به محیط آزاد شوند و تأثیر بسزایی در بروز پاسخ داشته باشند (Flashsland *et al*., 2006). همین‌طور مشاهده شده است که وجود ماتریکس غذایی در اطراف ریز نمونه‌ها رشد دوباره آنها را پس از ذوب شدن تقویت می‌کند (Fabre & Dereuddre, 1990).

پس از مدت زمان لازم، نمونه‌ها از نیتروژن مایع خارج می‌شوند و به‌سرعت به مدت ۱۰-۲ دقیقه وارد حمام آبی با دمای ٤٥-٤۰ درجه سانتی‌گراد می‌گردند. اگر گرم کردن بصورت تدریجی انجام شود ممکن است فرصت کافی برای تشکیل کریستال‌های یخی در زمان بازیابی فراهم شود (Sarkar,.& Naik, 1998; Finkle & Ulric, 1982). بنابراین ریزنمونه‌ها پس از خروج از نیتروژن مایع به‌سرعت وارد حمام آبی ٤۰ درجه سانتی‌گراد شده تا برای ورود به مراحل بعدی، ذوب گردند.

مشاهدات نشان داد که در هر سه روش بازیابی بذرها کپسوله و شیشه‌ای شده، (شرایط غیر سترون با آبشویی ۲٤ ساعت و ۳۰ دقیقه و نیز در شرایط سترون) درصد زنده مانی بسیار بالایی بدست آمد که حاکی از کارآمد بودن این روش‌ها در حفاظت بذرهای گونه مرتعی *M. rigidula* است. از طرف دیگر، از آنجایی‌که تفاوت معنی‌داری بین درصد زنده‌مانی بذرهای تیمار شده در شرایط فراسرد با آبشویی ۲٤ ساعت و ۳۰ دقیقه وجود نداشت بنابراین تفاوت در مدت زمان آبشویی نمی‌تواند تأثیر زیادی در افزایش درصد زنده‌مانی داشته باشد.

در هر دو شرایط سترون و غیر سترون تفاوت چشمگیری بین درصد زنده‌مانی بذرهای حفاظت شده در نیتروژن مایع (+LN) و بذرهای شاهد (-LN) وجود داشت. بنابراین می‌توان این‌طور استنباط کرد که وجود دمای بسیار پایین می‌تواند باعث افزایش دوره زنده‌مانی بذرهای این گونه مرتعی گردد.

به‌طور کلی با توجه به درصد بسیار بالای زنده‌مانی بذرها، هر دو روش حفاظتی (شیشه‌ای شدن و کپسوله کردن-آبگیری)، به‌عنوان روش‌های کارآمد برای حفاظت بذرهای این گونه مرتعی شناخته شدند ولی از آنجایی‌که در روش شیشه‌ای شدن در وقت صرفه‌جویی بیشتری می‌شود و سهولت بیشتری هم دارد بنابراین این روش به منظور حفاظت فراسرد بذرهای این گونه مرتعی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شده است. بدین وسیله از مساعدت‌های صمیمانه استادان محترم و همکاران گرامی در گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی و نیز دانشگاه الزهراء تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

–Benson, E.E., 1999. Cryopreservation in: E.E. Benson (Ed.), Plant Conservation Biotechnology, Talor Frances, London, 83-95.

–Corredoira, E., San-Jose, C.M., Ballester, A. and Vieitez, M., 2004. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. Cryoletters, 25: 33-42.

–Dereuddre, J., Blandin, S. and Hassen N., 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Dacus carrota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effect of preculture. Cryoletters, 12: 125-134.

–Dereuddre, J., Blandin, S., Hassen N. and Kaminski, K. 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Dacus carrota* L.) to dessication and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. Cryoletters, 12: 135-148.

–Domet, D., Block, W., Worland, R., Reed, B.M. and Benson E.E., 2000. Profiling cryopreservation protocols for *Ribes ciliatum* using differential scaning calorimetry. Cryoletters, 21: 367-378.

–Fabre, A., and Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. CryoLetters, 11: 413-426.

–Finkle B.J., and Ulrich J.M., 1982. Cryopreservation removal temperature as a factor in the survival of frozen rice and sugarcane cells. Cryobiology, 19: 329-335.

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

–Hirai, D., and Sakai, A., 2005 Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. Bolletin of Pope, 4.

–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.

–Luo, J., and Reed, B.M., 1997. Abscisic acid-responsive protein, Bovin Serum Albumin, and praline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. Cryobiology, 34: 240-250.

–Martinez, D., and Revilla, M.A., 1998. Cold acclimation and thermal transition in the cryopreservation of hop shoot tips. Cryoletters, 19: 333-342.

–Panis, B., Piette, B., Swennen, R., 2004. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae Plant Science, 168: 45-55.

–Rao, N.K., 2004. Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3: 136-145.

–Reed, B.M., 2001. Implementation cryogenic storage of clonally propagated plants. Cryoletters, 22: 97-104.

–Roland, A., Fleck, R.W., Pickup, J., Day, G. and Benson, E., 2006. Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy. Cryobiology, 52: 261-268.

–Saloma, A.N., 2002 Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. Braz. J. Plant Phisiol., 14: 133-138.

–Sarkar, D., and Naik, P.S., 1998 Cryopreservation of shoot tips pf tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. Annals of Botany, 82 455-461.

–Takagi, H., Thinh, N.T., Tsulam, O.M., Senboku, T. and Sakai, A., 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Reports, 16: 594-599.

–Thinh, N.T., 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral papers of Cobe University-Department of Agronomy, Japan.

–Volk, G.M. and Walters, C., 2006 Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryopreservation. Cryobiology, 52: 48-61.

–Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C.T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. and Perl, A., 2004. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 77: 267-275.

–Wang, Y.L., Fan, M.J. and Liaw, S.I., 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) But. Bull. Acad. Sin., 46: 29-34.

–Wolf, J. and Bryant, G., 1999 Freezing Drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology, 39: 103-129.

Cryopreservation of *Medicago rigidula* seeds by two methods of vitrification and encapsulation-dehydration

M. Kolahdoozan, [1] A. Ghamari-Zare *[2], Sh. Shahrzad [3] and Kh. Kiarostami[4]

1*-Corresponding author, MSc. Biology Dept., Al-Zahra University, Tehran, Iran. Email: marziehkolahdoozan@yahoo.com
2. Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran.
3. Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, Iran.
4. Assa. Prof., Biology Dept., Al-Zahra University, Tehran, Iran.

Received:28.02.2008 Accepted:13.09.2008

Abstract

Preservation of genetic resources of *Medicago rigidula* which is one of the forage and endemic species in Iran is essential. For the first time seeds of the species were successfully cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration methods. The seeds were dehydrated by silicagel in desiccator, then two conservation methods were applied: 1) by vitrification method, seeds were loaded with 2M glycerol solution in 0.6M sucrose for 20 min., then loaded seeds were transferred into 2ml cryovials containing 0.5ml PVS2 at 0°C. 2). By encapsulation-dehydration method, dried seeds plunged into alginic acid solution for 15 min, then transferred into $CaCl_2$ solution for the same duration. Encapsulated seeds were dehydrated in room temperature for 20h and transferred into 2ml cryovials. Both of the seed groups plunged instantly in liquid nitrogen (-196°C). After a week vitrified and encapsulated seeds were thawed in distilled water bath at 40°C for 2 min and washed in 1.2M sucrose solution for 5, 10 and 15 min intervals with gentle shake. Three recovery procedures were used: 1) washing of vitrified, encapsulated and control seeds under running water for I) 30 min, II) 24 h and transferring the seeds onto petri-dishes containing moist filter papers and 2) sterilization of vitrified, encapsulated and control seeds by 1.5% sodium hypochlorite and transferring into MS medium supplemented with 5 mgl^{-1} GA_3. Survival percentage of seeds was estimated after 4 and 18 days respectively for unsterile and sterile conditions. The germination percentage of seeds after vitrification and encapsulation-dehydration method ranged respectively between 98.6%-99.2% and 98.4%-99.7%.

Key words: Cryopreservation, Vitrification, Encapsulation, Dehydration and *Medicago rigidula*.