فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۱۷ شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٦٣٦-٦٢٧، (۱۳۸۸)

بررسی امکان نگهداري بذر گونه *Eucalyptus microtheca* در شرایط فراسرد (Cryopreservation)

فیروزه حاتمی[۱]، محبت‌علی نادری شهاب[۲*]، مریم جبلی[۳]، عباس قمری زارع[٤]، مسعود طبری[٥] و محمدحسن عصاره[٦]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی نور، دانشگاه تربیت مدرس.

۲*- نویسنده مسئول، استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست الکترونیک: naderishahab@rifr-ac.ir

۳- کارشناس ارشد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

٤- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

٥- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی نور، دانشگاه تربیت مدرس.

٦- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/٥

چکیده

به‌منظور بررسی امکان نگهداری بذر گونه *Eucalyptus microtheca* در شرایط فراسرد، از پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (Plant Vitrification Solution 2 یا PVS2) و کاهش رطوبت بذر (Desiccation) استفاده شد. بذرهای پیش‌تیمار شده به‌مدت یک هفته در ازت مایع با دمای ۱۹٦ ^{o}C- نگهداری شدند و پس از خروج از ازت مایع در معرض شوک حرارتی (٤۲ ^{o}C+) قرار گرفتند. پس از اعمال شوک حرارتی نیمی از بذرها بر روی کاغذ مرطوب کشت و به ژرمیناتور با دمای ۲٤ ^{o}C+ منتقل شدند. نیمی دیگر درون گلدان حاوی خاک معمولی و پیت‌ماس کشت و به گلخانه با دمای ۲۰ ^{o}C+ انتقال یافتند. بذر تیمارهای مختلف که مرحله ماندگاری را در شرایط فراسرد گذرانده بودند، ضمن احیا مجدد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند. بذرهای تیمارهای مختلف فراسرد که در شرایط ژرمیناتور و گلخانه رشد کردند، تفاوت معنی‌داری با بذرهای شاهد نداشتند و رشد گیاهچه‌ها طبیعی و عاری از هر گونه آثار سوء بود. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با توجه به کاهش شدید فعالیت‌های متابولیک و فیزیولوژیک موجود زنده در این دما، امکان نگهداری بلندمدت بذر گونه *E. microtheca* در شرایط فراسرد کاملاً امکان پذیر بوده و می‌توان انتظار داشت که بذرهای این گونه را بتوان با استفاده از تکنولوژی فراسرد برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ نمود.

واژه‌های کلیدی: *Eucalyptus microtheca*، حفاظت فراسرد، گلیسرول ۳۰ درصد، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی، کاهش رطوبت بذر، ازت مایع.

مقدمه

در کنار روشهای مرسوم و کلاسیک حفاظت از گونه‌های گیاهی (ایجاد عرصه‌های حفاظت شده، نگهداری در باغ‌های گیاه‌شناسی و بانک ژن‌های منابع طبیعی)، امروزه حفاظت در شرایط فراسرد (cryopreservation) یکی از دستاوردهای بسیار مهم در حراست از گونه‌های گیاهیست (Rao, 2004). با استفاده از این تکنولوژی می‌توان بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در ازت مایع با دمای ۱۹٦ ^{o}C- نگهداری نمود. در این شرایط فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر یا اندام گیاهی تقریباً متوقف می‌شود. از نظر تئوری، در صورتی‌که بذر در محیط ازت

مایع زنده بماند، تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه‌مدت و میان‌مدت نباید وجود داشته باشد. زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی، مسئله زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌گردد (Ozkavukcu & Purohit, 2004; Erdemli, 2002).

طی سالهای اخیر برای حفاظت از بسیاری از گونه‌ها و واریته‌های گیاهی در شرایط فراسرد، تیمارهای مختلفی نظیر ویتریفیکاسیون (Vitrification) (Wang *et al*., 2005; Fahy *et al*., 1987; Matsumoto *et al*., 2001)، کاهش رطوبت بذر (Desiccation) (Dussert *et al*., 1998)، گلیسرول (Jeyendran *et al*., 1985) و کاهش رطوبت- کپسوله کردن (Encapsulation-Dehydration) بکار گرفته شده است (Phunchindawan *et al*., 1997).

استفاده از روش انجماد یک‌مرحله‌ای/ویتریفیکاسیون (One step freezing-Vtrification) برای حفاظت فراسرد جوانه‌های انتهایی گونه‌های *Quercus suber*، *Castanea sativa*، *Olea europaea*، *Aesculus hippocastaneum* و *Fraxinus angustifolia* موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Panis & Lambardi, 2005). با استفاده از تکنیک ویتریفیکاسیون جوانه‌های انتهایی *Malus* spp.، *Pyrus* spp.، *Prunus* spp.، *Populus* spp. و *Vitis vinifera* نیز پس از خروج از ازت مایع بیش از ۵۰ درصد زنده‌مانی داشتند (Lambardi & De Carlo, 2003).

استفاده از تیمار کاهش رطوبت بذر با هدف تقلیل رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع، تأثیر مثبتی در حفظ و زنده‌مانی بذرها دارد، به‌طوری که کاهش محتوای رطوبت بذر از ۵ تا ۱۰ درصد تأثیر مثبتی در زنده‌مانی بذر در دمای ۱۹۶- ^{o}C داشته است (Stanwood, 1985). در مورد گونه *Citrus auantifolia* کاهش ۱۲/۹۳ درصدی رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع نتیجه مطلوبی در بر داشت (Normah & Siti Dewi Serimala, 1997). همچنین بذر *Musa balbisiana* در صورت کاهش ۱۳ تا ۱۸ درصد رطوبت بهترین نتیجه را در زنده‌مانی در شرایط فراسرد (۱۹۶- ^{o}C) نشان داده است (Bhat *et al*., 1994).

برای نگهداری جوانه‌های جانبی هیبرید *Eucalyptus camaldulensis*×*E. grandis* در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده از گلیسرول و ساکاروز (در مقایسه با ساکاروز تنها) موفقیت‌آمیزتر گزارش گردید (Blakesley & Kiernan, 2001). از طرف دیگر در مطالعه‌ای بر روی افزایش مقاومت به انجماد سلولهای *E. gunnii*، هر چه محتوای ساکاروز قابل حل در لاین‌های سلولی این گونه بیشتر بود، مقاومت به انجماد این سلول‌ها در مقابل دمای فراسرد نیز افزایش یافت (Leborgne *et al*., 2004).

در ایران هنوز تحقیق گسترده‌ای در ارتباط با نگهداری یا حفاظت بذرهای درختان و درختچه‌های جنگلی با استفاده از تکنیک فراسرد انجام نشده است. مطالعه حاضر در صدد است تا در مورد یکی از گونه‌های درختی وارداتی اکالیپتوس یعنی *E. microtheca* F. Muell. از این روش استفاده نماید. *E. microtheca* درختی است همیشه‌سبز با ارتفاع حدود ۲۰ متر و قطر تا ۱۰۰ سانتی‌متر که نقش سازنده‌ای را در فضای سبز و ایجاد جنگلهای دست‌کاشت دارد. رویشگاه طبیعی این گونه در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شمال‌شرقی استرالیا و نیز در بیشه‌زارهایی با عرض جغرافیایی ۱۴ تا ۳۳ درجه و ارتفاع ۷۰۰ متر از سطح دریاست (Susiluto & Berninger, 2007). *E. microtheca* بردبار به گرما و تا حد زیادی مقاوم به قارچ‌ها، حشرات و باد می‌باشد و در خاک‌های رسی، خشک، سنگین و با اسیدیته زیاد زیست می‌کند (Little, 1983). رویش سالانه ارتفاعی این درخت ۳ متر گزارش شده است. با عنایت به اهمیت این درخت در جلوگیری از فرسایش خاک، تولید هیزم، زغال چوب (Webb *et al*., 1984; Tuomela, 1997) و نقش آن در توسعه فضای سبز، برای بسیاری از مناطق ایران مناسب است (عصاره و سردابی، ۱۳۸۶). بنابراین تحقیق بر روی

نگهداری بلندمدت بذر آن از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

مواد و روشها

بذر گونه *E. microtheca* از منطقه صفی‌آباد دزفول استان خوزستان در شهریورماه ۱۳۸۷ جمع‌آوری گردید و نگهداری آن در شرایط فراسرد در آزمایشگاه زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور مورد بررسی قرار گرفت. قبل از قرارگیری بذرها در ازت مایع (دمای ^{o}C ۱۹٦-)، تحت شرایط زیر و به‌منظور نگهداری در فراسرد پیش‌تیمار شدند.

- **پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد (w/v) (Glycerol 30%):** محلول گلیسرول ۳۰ درصد با اضافه کردن ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به گلیسرول خالص تهیه شد. ۱۲۰۰ عدد بذر به کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و به آنها محلول گلیسرول ۳۰ درصد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۲۲+ قرار داده شد. آنگاه بلافاصله وارد ازت مایع گردید.

- **پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification):** از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و Loading به‌عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 شامل ساکاروز (Sucrose) ۰/٤ مولار، گلیسرول (Glycerol) ۳۰ درصد، اتیلن گلیکول (Ethylenglycol) ۱۵ درصد و DMSO (Dimethyl soulfoxide) ۱۵ درصد (Sakai *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1991) می‌باشد. محلول Loading شامل گلیسرول (Glycerol) ۲ مولار و ساکاروز (Sucrose) ۰/٤ مولار می‌باشد (Nishizawa *et al.*, 1993). تعداد ۱۲۰۰ عدد بذر داخل کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری قرار گرفتند و به آنها محلول Loading اضافه و آنگاه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۲۲+ قرار داده شدند. پس از ۲۰ دقیقه محلول Loading تخلیه و به کرایوتیوپ‌های حاوی بذر محلول PVS2 سرد (دمای ^{o}C ٤+) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ٤+ قرار داده شدند. سپس کرایوتیوپ‌ها وارد ازت مایع گردیدند.

- **پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation):** در این تیمار وزن کل بذر از طریق تعیین وزن اولیه با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ و سپس قرار دادن بذرها به مدت ۷۲ ساعت در آون ^{o}C ۷۲ و محاسبه اختلاف وزن قبل و بعد از آون محاسبه و درصدگیری گردید (٤/۸۱ درصد). رطوبت کل بذر معادل صددرصد درنظر گرفته شد. در تیمار کاهش رطوبت بذر مقدار رطوبت کاهش‌یافته از طریق قراردادن بذرها به مدت یک هفته در دسیکاتور تعیین شد، برای این کار نخست وزن بذرها با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ گرم توزین گردید. بذرها پس از توزین، به دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر سیلیکاژل خشک (۱۰ برابر وزن بذر) منتقل و سپس هوای داخل دسیکاتور تخلیه و دسیکاتور به مدت یک هفته در دمای ^{o}C ٤+ قرار داده شد. پس از یک هفته، بذرها از دسیکاتور خارج و مجدداً توزین گردیدند. مقدار رطوبت کاهش یافته معادل ۲/۰۳ 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، محاسبه گردید (درصد کاهش رطوبت معادل ٪۵۷/۷۱ = ٪٤۲/۲۹ - ٪۱۰۰ می‌باشد). تعداد ۱۲۰۰ عدد بذر پس از خروج از دسیکاتور به کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و سپس تیوپ‌های حاوی بذر وارد ازت مایع گردیدند.

- **بدون پیش‌تیمار (شاهد):** تعداد ۱۲۰۰ بذر به‌عنوان شاهد به کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و در شرایط آزمایشگاه با دمای ^{o}C ۲۲+ نگهداری شدند.

پس از انجام پیش تیمارهای ذکر شده، کلیه نمونه‌ها به‌جز تیمار شاهد پس از یک هفته از ازت مایع خارج و به مدت ۲ دقیقه در آب ^{o}C ٤۲+ (شوک حرارتی) قرار گرفتند (Lambardi & De Carlo, Engelmann, 1990

2003;) تا از کریستاله شدن مجدد بافت‌ها جلوگیری شود. پس از اعمال شوک حرارتی و آبگیری با دستمال کاغذی، نیمی از بذرها (۶۰۰ عدد) به پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و در ژرمیناتور با دمای ^{o}C ۲۵+ و رژیم نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در هر پتری ۵۰ عدد بذر قرار داده شد. نیمی دیگر از بذرها (۶۰۰ عدد) به گلخانه (دمای حدود ^{o}C ۲۲+) منتقل و در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس و خاک معمولی به نسبت ۱:۱ کاشته شدند. در هر گلدان ۵۰ عدد بذر کشت گردید. سطح بذر گلدان‌ها با لایه کاغذ مرطوبی پوشانده شد. گلدان‌ها داخل تشت‌های آب قرار گرفته و تا ۱:۳ ارتفاع گلدان‌ها آب اضافه گردید. پس از سبز شدن بذرها و بالا آمدن لایه کاغذ رویی، کاغذها را برداشته و گلدان‌ها از بالا آبیاری شدند. جوانه‌زنی بذرها با سبز شدن حداقل ۵۰ درصد بذرها اندازه‌گیری شد. سایر صفات از قبیل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه پس از سبز شدن بذرها اندازه‌گیری گردید. با مشخص شدن درصد جوانه‌زنی و میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در شرایط آزمایشگاهی، شاخص بنیه بذر از رابطه (۱) محاسبه شد (Abdul Baki & Anderson, 1973):

رابطه (۱)

۱۰۰/درصد جوانه‌زنی×میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر=شاخص بنیه بذر

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ٤ تیمار (شامل شاهد، کاهش رطوبت، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد) انجام شد. واحدهای آزمایشی در گلخانه و ژرمیناتور به‌ترتیب پتری‌دیش و گلدان بودند. داده‌های بدست آمده از درصد جوانه‌زنی (پس از تبدیل به Arcsin)، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر در شرایط آزمایشگاه و داده‌های حاصل از درصد جوانه‌زنی در شرایط گلخانه (پس از تبدیل به Arcsin) با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایشگاهی بذرهای گونه *E. microtheca* نگهداری شده در شرایط فراسرد نشان داد که در صفات جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه بذرها بین تیمار شاهد و تیمارهای مختلف کاهش رطوبت (Desiccation)، گلیسرول ۳۰ درصد (Glycerol 30%) و ویتریفیکاسیون (PVS2) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). تنها در صفت طول ساقه‌چه، تیمار گلیسرول ۳۰ درصد با ۱۲/۹۹ میلی‌متر کمترین و در تیمارهای شاهد و کاهش رطوبت به‌ترتیب با ۱۸ و ۱۷/۸۱ میلی‌متر بیشترین مقادیر را نشان دادند (جدول ۲). در رشد ریشه‌چه، گیاهچه و بنیه بذر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار بین تیمارهای PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت بذر و شاهد در صفات یادشده بود. مقدار رشد ریشه‌چه در تیمار ویتریفیکاسیون (PVS2) با ۱۲/۷۸ میلی‌متر به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها و در کاهش رطوبت بذر (Desiccation) با ۲۰/۱۱ میلی‌متر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بودند در صفت طول گیاهچه (مجموع ریشه‌چه و ساقه‌چه) نیز تیمار گلیسرول ۳۰ درصد با ۲۶/۵۰ میلی‌متر و تیمار کاهش رطوبت بذر با ۳۷/۹۳ میلی‌متر به‌ترتیب از کوچکترین و بزرگترین طول برخوردار بودند (جدول ۲). شاخص بنیه بذر در تیمار ویتریفیکاسیون (PVS2) با ۱۳/۸۳ از کمترین مقدار و در تیمار کاهش رطوبت بذر با ۲۲/۵۶ از بیشترین مقدار برخوردار بود (جدول ۲). براساس نتایج بدست آمده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر زنده‌مانی بذرهای *E. microtheca* پس از خروج از ازت مایع در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه، مشاهده نشد و مقدار این صفت بین ۹۹/۴۳-۹۵/۰۴ درصد در تیمارهای ویتریفیکاسیون و شاهد بود (جدول ۳؛ شکل ۲؛ شکل ۳ الف و ب). در مقایسه درصد جوانه‌زنی بذرها *E. microtheca* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه با استفاده

از آزمون t مشاهده شد که تیمارهای شاهد و کاهش رطوبت بذر با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. این در حالی است که در تیمار ویتریفیکاسیون تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین این دو محیط مشاهده و در تیمار گلیسرول ۳۰ درصد، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد دیده شد (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن پیش‌تیمارها در بذرهای *E. microtheca* آزمایشگاهی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه/ طول ساقه‌چه	بنیه بذر
تیمار	۳	۰/۰۱۱ ns	۲۷/٦٤ ns	٤٦/١٩**	١٣٨/١٢**	۰/۰٤٣ ns	۹۰/۰۵**
خطا	١٢	۰/۰۰٦	۸/٦٧	۵/٤۹	١۵/۰١	۰/۰٧٣	۸/٧٤
ضریب تغییرات		۹/٣٤	١۸/۸٢	١٤/٧٧	١٢/٢۹	٢۵/۸٦	١٦/٢۵

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

جدول ۲- مقایسه میانگین پیش‌تیمارها در نگهداری بذرهای *E. microtheca* آزمایشگاهی به روش آزمون دانکن

تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه/ طول ساقه‌چه	بنیه بذر
شاهد	٧٤/۸۹	١۸ a	١٧/۰۸ ab	٣۵/۰۸ a	۰/۹۵	٢٢/۰٢ a
ویتیریفیکاسیون	٦۰/۰٤	١٣/٧۸ ab	١٢/٧۸ c	٢٦/۵٦ b	۰/۹٦	١٣/۸٣ b
گلیسرول ۳۰٪	٦٤/۸۵	١٢/۹۹ b	١٣/٤۹ bc	٢٦/۵۰ b	١/١٤	١٤/٣٤ b
کاهش رطوبت بذر	٧۰/۵٦	١٧/۸١ a	٢۰/١١ a	٣٧/۹٣ a	١/١٣	٢٢/۵٦ a

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست

جدول ۳- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمارهای فراسرد بر بذرهای *E. microtheca* در شرایط گلخانه

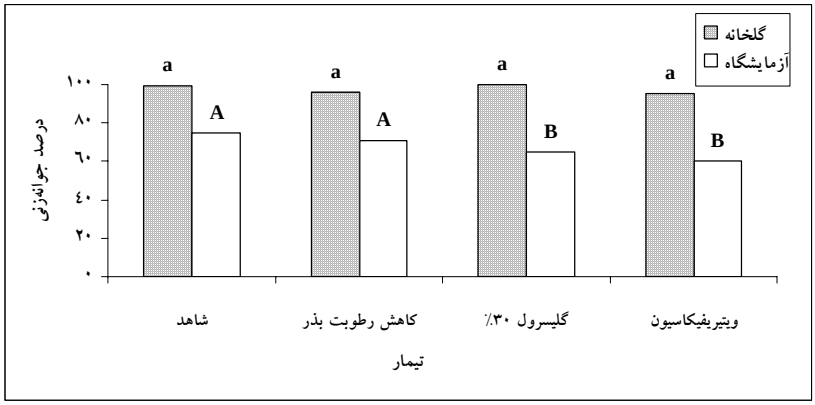
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	خطا	ضریب تغییرات (CV٪)
درصد جوانه‌زنی	۳	۰/۰١٤ ns	۰/۰٢	١٢/٣۵

ns= عدم معنی‌داری

جدول ٤- آزمون t در جوانه‌زنی بین محیط آزمایشگاه و گلخانه برای پیش‌تیمارهای فراسرد

تیمار	شاهد	ویتیریفیکاسیون	گلیسرول ۳۰٪	کاهش رطوبت بذر
آماره t	-١/۹۵	-٤/٦٣	-۹/۹۸	-٣/۰١
معنی‌داری	۰/١۹ ns	۰/۰٤ *	۰/۰١ **	۰/۰۹ ns

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



شکل ۱- مقایسه جوانه‌زنی و زنده‌مانی بذرهای *E. microtheca* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه پس از خروج از تیمار فراسرد

الف ب ج د

شکل ۲- گیاهچه‌های رشد یافته *E. microtheca* در شرایط آزمایشگاهی پس از خروج از ازت مایع؛ الف) تیمار شاهد، ب) تیمار کاهش رطوبت، ج) تیمار ویتریفیکاسیون و د) تیمار گلیسرول ۳۰ درصد

الف

ب ۱ ب ۲ ب ۳ ب ٤

شکل ۳- گیاهچه‌های رشد یافته *E. microtheca* در شرایط گلخانه؛ الف) نمای کلی از گلدانهای تیمارهای مختلف آزمایش فراسرد و شاهد در شرایط گلخانه و ب) استقرار بذرهای تیمارهای مختلف به تفکیک: ۱) تیمار شاهد، ۲) تیمار کاهش رطوبت، ۳) تیمار ویتریفیکاسیون و ٤) تیمار گلیسرول ۳۰ درصد

بحث

بذرهای *E. microtheca* پس از خروج از ازت مایع و انتقال به پتری‌دیش در ژرمیناتور و نیز انتقال به گلدان در شرایط گلخانه بدون این که دچار اثرات سوئی شوند، سرمای ۱۹٦ ^{o}C- را به‌خوبی تحمل کرده و قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه شدند. درصد جوانه‌زنی بذرها پس از خروج از ازت مایع نیز در هر دو محیط ژرمیناتور و گلخانه تفاوت معنی‌داری را با بذرهای شاهد نشان ندادند. با توجه به امکان زنده‌مانی بذرهای *E. microtheca* در ازت مایع می‌توان این گونه را جزء بذرهای Orthodox (Roberts & Engelmann, 1990; Elis, 1989) به‌حساب آورد.

در زنده‌مانی بذرهای *E. microtheca* در شرایط گلخانه و آزمایشگاه تفاوتی میان تیمارهای ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت بذر (Desiccation) و گلیسرول ۳۰ درصد (Glycerol 30%) با تیمار شاهد مشاهده نشد. تیمار ویتریفیکاسیون (PVS2) به‌دلیل ایجاد حالت ورقه‌ای در زمان انجماد آب و جلوگیری از شکل‌گیری کریستال‌های یخ درون سلولی که برای سلول کشنده است، شرایط امنی را برای سلول فراهم می‌کند (Volk *et al.*, 2006). با این که در اغلب منابع به اثر مثبت تیمار PVS2 بر روی درصد جوانه‌زنی بسیاری از گونه‌ها (Liu *et al.*, 2003; Sakai & Engelman, 2007) به‌ویژه زبان‌گنجشک (Schoenweiss *et al.*, 2005) و ارکیده ژاپنی (*Bletilla striata*) (Ishikawa *et al.*, 1997) اشاره شده، در مورد بذرهای *E. microtheca* واکنش قابل‌توجهی مشاهده نشد و پس از خروج از شرایط فراسرد تنها در صفات طول ریشه‌چه و شاخص بنیه بذر اثر ناچیز این تیمار قابل مشاهده بود.

بکارگیری پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation) نسبت به سایر پیش‌تیمارها در طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر مؤثر بود، اما این تیمار جوانه‌زنی را تحت تأثیر قرار نداده است. با این که در درصد جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای فراسرد و شاهد وجود نداشت، در مقایسه بین میانگین تیمارها پس از تیمار شاهد، تیمار کاهش رطوبت در درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر از مقدار به نسبت بیشتری برخوردار بود. تحقیقات نشان داده که گونه بید با کاهش ۳ تا ۵ درصدی رطوبت نتیجه مطلوبی را در زنده‌مانی پس از خروج از ازت مایع در بر داشته است (Wood *et al.*, 2003). برای حفاظت فراسرد جنین‌های سوماتیکی درخت زیتون تلخ (*Melia azedarach*) روش کپسوله کردن- کاهش رطوبت (Encapsulation-Dehydration) و پیش‌تیمار کاهش رطوبت (Pre-treatment-Dehydration) به‌ترتیب با درصدهای زنده‌مانی ۳٦ و ۳۰ درصد به‌عنوان روش‌هایی موفق معرفی شده‌اند (Scocchi *et al.*, 2007). با توجه به این که مشکل عمده سلول‌های گیاهی میزان آب قابل انجماد می‌باشد، در تیمار کاهش رطوبت و با قرارگیری بذرها در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل می‌توان محتوای آب بین‌سلولی را کاهش و در نتیجه اثرهای مخرب تشکیل کریستال‌های یخی و افزایش حجم آب در مرحله انجماد بذرها و اندام‌های گیاهی را به حداقل رساند (Bhat *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2003). بنابراین می‌توان استفاده از این تکنیک را برای حفاظت بذرها پس از فراسرد به‌عنوان روشی موفق معرفی نمود.

در مورد تیمار گلیسرول ۳۰ درصد مشاهده شد که تنها طول گیاهچه بذرهای *E. microtheca* پس از خروج از ازت مایع در شرایط آزمایشگاهی کاهش یافت. در واقع گلیسرول به‌عنوان ماده محافظت‌کننده، خطرات ناشی از کریستال‌های یخی را کاهش می‌دهد (Turner *et al.*, 2001). تا جایی که بررسی‌ها نشان داده، استفاده از گلیسرول به‌عنوان یک پیش‌تیمار به تنهایی در مورد گونه‌های گیاهی بکار گرفته نشده است. اما نتایج این پژوهش گویای بکارگیری آن به‌عنوان یک ماده محافظت کننده برای حفاظت فراسرد گونه *E. microtheca* بود (با

توجه به نبود تفاوت معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی بذرها پس از خروج از ازت مایع). از گلیسرول عمدتاً در نگهداری باکتری‌ها در شرایط فراسرد استفاده می‌شود و همان‌گونه که اشاره شد، نتایج نشان داد که بکارگیری این تیمار در نگهداری از بذرهای گیاهی در شرایط فراسرد نیز می‌تواند مؤثر باشد.

در مورد نمونه بذرهایی که پس از خروج از ازت مایع به گلخانه منتقل و در گلدان کاشته شدند باید گفت که زنده‌مانی بذرهای *E. microtheca* در شرایط گلخانه بهتر از شرایط آزمایشگاهی بود. به‌طوری که تیمار شاهد با ٩٩/٤٣ و تیمار ویتریفیکاسیون با ٩٥/٠٤ درصد به‌ترتیب از بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی برخوردار بودند. در حالی‌که در شرایط آزمایشگاهی درصد جوانه‌زنی بذرها در تیمار شاهد با ٧٤/٨٩ درصد از بیشترین و در تیمار ویتریفیکاسیون با ٦٠/٠٤ درصد از کمترین درصد جوانه‌زنی برخوردار بود (شکل ١ و جدول ٤)؛ در واقع جوانه‌زنی در بستر پیت‌ماس و با لایه کاغذ مرطوب رویی آنها در گلخانه بهتر از کاغذ مرطوب درون پتری‌دیش و در ژرمیناتور بود.

بذر این گونه به‌راحتی شرایط فراسرد را تحمل می‌نماید و درصد احیاء بذر (Recovery) در کلیه تیمارها زیاد و بسیار امیدوارکننده بود و تفاوت کمی بین پیش‌تیمارها وجود داشت، ولی در حالت کلی تیمار کاهش رطوبت بذر با توجه به اختلافات کم آن با شاهد مناسب‌تر از بقیه تیمارها بود. با توجه به موفقیت نگهداری بذر *E. microtheca* در شرایط فراسرد امکان تعمیم نتایج حاصل به سایر گونه‌های اکالیپتوس نیز وجود دارد، اما بررسی‌های تکمیلی لازم است.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی در موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شده است. از سرکار خانم مهندس زهرا آبروش برای تهیه بذر تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- عصاره، م.ح. و سردابی، ح، ١٣٨٦. اکالیپتوس. شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوریهای نوین (جلد اول). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ٦٧٢ صفحه.
- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D., 1973. Vigor determination in soybean seed by multiplication. Crop Science, 3: 630-633.
- Bhat, S.R., Bhat, K.H. and Chandel, K.P.S., 1994. Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. Seed Science and Technology, 22(3): 637-640.
- Bhat, S.N., Sharma, A. and Bhat, S.V., 2005. Vitrification and glass transition of water: insights from spin probe ESR. Phys, Rev. Lett., 95 (23): 4 p.
- Blakesley, D. and Kiernan, R.J., 2001. Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis×Eucalyptus camaldulensis* hybrid. CryoLetters, 22(1): 13-8.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Engelmann, F., Anthony, F., Louarn, J. and Hamon, S., 1998. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. Seed Science Research, 8: 9-15.
- Engelmann, F., 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation casehistory: *Oil Palm* somatic embryos. International Journal of Refrigeration, 13 (1): 26-30.
- Fahy, G.M., Levy, D.I. and Ali, S.E., 1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. Cryobiology, 24: 196–213.
- 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(3): 241-8.
- Lambardi, M. and De Carlo, A., 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain, S.M. and Ishii, K., (Eds.), Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Ac. Pub., Dordrecht: 815-840.
- Leborgne, N., Teulieres, C., Travert, S., Rols, M-P., Teissie, J. and Boudet, A.M., 2004. Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. European Journal of Biochemistry, 229 (3): 710-717.

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 (3): 141-172.
- Scocchi, F.D., Vila, S., Mroginski, L. and Engelmann, F., 2007. Cryopreservation of somatic embryos of Paradise tree (*Melia azedarach* L.). CryoLetters, 28 (4): 281-290.
- Schoenweiss, K., Meier-Dinkel, A. and Grotha, F., 2005. Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of Ash (*Fraxinus excelsior* L.). CryoLetters, 26 (3): 201-212.
- 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.
- Susiluoto, S. and Berninger, F., 2007. Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. Silva Fennica, 41(2): 221-233.
- Tuomela, K., 1997. Physiological and morphological responses of *Eucalyptus microtheca* provenances to water availability in tropical drylands. Ph.D. Thesis, Univ. Helsinki, Tropic. For. Rep. 13, 60 p.
- 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: 489-497.
- Volk, G.M., Harris, J.L. and Rotindo, K.E., 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. Cryobiology, 52: 305-308.
- 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. Bot. Bull. Acad. Sin., 46: 29-34.
- Webb, D.E., Wood, P.J., Smith, J. and Heman, G.S., 1984. Guide to species selection for tropical and sub-tropical plantations. Unit of Tropical Silviculture, Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford, Oxford, GB. Tropical forestry papers; No. 15, Second Edition, 256 p.
- Wood, C.B., Pritchard, H.W. and Lindegard, K., 2003. Seed cryopreservation and longevity of two *Salix* hybrids. CryoLetters, 24 (1): 17-26.
- Little, E.L., 1983. Common fuelwood crops: a handbook for their identification. Communi-Tech Associates. 354 p.
- 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 (1): 97-102.
- Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H. and Sakai, A., 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by vitrifiation of dormant shoot tips. Plant Cell Report, 20: 398-402.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y. and Matuzawa, T., 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science, 88: 67–73.
- Normah, M.N. and Siti Dewi Serimala, M.N., 1997. Cryopreservation of seeds and embryonic axes of several citrus species. In: Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J. and Hong, T.D., (Eds.). Basic and Applied Aspects of Seed Bioligy. Dordrecht: Kluwer Academic Published, 817-823.
- Ozkavukcu, S. and Erdemli, E., 2002. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara Medical School, 24(4): 187-196.
- 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.
- Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A., 1997. Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. Plant Cell Reports, 16: 469–473.
- Purohit, S.S., 2004. Plant Tissue Culture. Student Edition, 366 p.
- Rao, N.K., 2004. Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3: 136-145.
- Roberts, E.H. and Ellis, R.H., 1989. Water and seed survival. Annals of Botany, 63: 39-52.
- Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I., 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Report, 9: 30–33.
- Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I., 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel

Investigation on possibility of cryopreservation of *Eucalyptus microtheca* seeds

F. Hatami[1], M. Naderi Shahab[2*], M. Jebelli[3], A. Ghamari-Zare[3], M. Tabari[4] and M. H. Assareh[5]

1- M.Sc. Student, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University.
2*-Corresponding author, Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands. E-mail: naderishahab@rifr-ac.ir
3- Senior research expert, Research Institute of Forests and Rangelands.
4- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands.
5- Associate Prof., Tarbiat Modares University.
6- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands.

Abstract

The aim of this study was to investigate the possibility of cryopreservation of *Eucalyptus microtheca* seeds at -196 ºC, using Liquid Nitrogen (LN). Before transferring the seeds into LN, three pre-treatments including Plant Vitrification Solution 2 (PVS2), Desiccation and Glycerol 30% was applied. The treated seeds transferred into LN for period of one week. The seeds removed from the LN, subjected to heat shock (+42 ºC) for 2 minutes, blotted and transferred both onto moist paper in petri dishes and pots, filled with soil and pit moss. The petri dishes and pots, transferred into germinator (+24 ºC) or greenhouse (+20ºC), respectively. Subsequent of cryopreservation period, seed germination and recovery was high, there were no significant differences between cryopreserved and control seeds in germinator and greenhouse conditions. Further more, there were no adverse effect or abnormality observed in seedlings developed from cryopreserved seeds. Results showed that, long-term preservation of *E. microtheca* seeds under LN (cryopreservation) is promising.

Key words: *Eucalyptus microtheca*, cryopreservation, Glycerol 30%, Plant Vitrification Solution 2 (PVS2), Desiccation, Liquid Nitrogen.