Research Article

Iranian Journal of Forest and Poplar Research Vol. 32 No. 3, 2024
Vol. 32, No. 3, Page 203-213 (2023)
DOI: 10.22092/ijfpr.2024.364442.2138

Preservation of the genome of *Acer cappadocicum* Gled. in cryopreservation

L. Mirjani [1*] and A. Ghamarizare [2]

1*- Corresponding author, Researcher, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: mirjani@rifr-ac.ir
2- Associate Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 20.12.2023 Accepted: 03.02.2024

Abstract

Background and objectives: Protecting genetic and ecosystem diversity is essential for breeding programs and the development of new cultivars. The preservation of biodiversity in the Hyrcanian forests, often regarded as a living fossil, is particularly crucial. Cryopreservation, which involves storing biological samples in tanks filled with liquid nitrogen (LN), is the most effective long-term preservation method for plant genetic resources. It serves as an alternative to seed or in vitro banks and can be applied to both vegetatively and generatively propagated crops. Extremely low temperatures stabilize cells in their current state, allowing for long-term storage. This method incurs significantly lower costs compared to classical preservation techniques, while also offering extended sample protection. Various parts of the plant—including seeds, organs, callus, differentiated cells, meristem, and pollen—can be stored using cryopreservation. This technique protects samples from pests and diseases while requiring minimal energy and space for storage. Additionally, it allows for the replication of samples at low cost and with minimal facilities under any environmental conditions. Cryopreservation enables the collection and storage of plant species from diverse climates in one location under uniform conditions. This study aims to evaluate the feasibility of storing *Acer cappadocicum* Gled. seeds under cryopreservation conditions.

Methodology: To store *A. cappadocicum* seeds in LN, they undergo various treatments to prevent the crystallization of free water and rupture of the plasma membrane at cryopreservation temperatures. The seeds were subjected to chemical treatments—30% glycerol and a vitrification solution—along with a physical treatment to reduce seed moisture using a desiccator containing silica gel. These treatments aimed to enhance tolerance to drought and cryogenic processes. After 24 hours in liquid nitrogen, the treated seeds, along with control seeds, were thawed immediately at 42 degrees Celsius. To break dormancy, all seeds—including treated seeds, control seeds that had been cryopreserved, and control seeds that had not been exposed to liquid nitrogen—were planted in moist sand at a temperature of four degrees Celsius. Germination began after three months, followed by assessments of viability and germination rates. Each treatment included three replications with 25 seeds per replication. Data analysis was conducted using one-way ANOVA within a completely randomized design, with means compared using Duncan's multiple range test.

Results: Among the cryopreservation treatments applied to the seeds, physical dehydration yielded the highest germination percentage (26%) and seed vigor index compared to other treatments. Conversely, treatments with 30% glycerol and vitrification reduced germination rates for *A. cappadocicum*, suggesting sensitivity to these cryopreservatives that may harm the seed embryo. A significant difference was observed in root length and root-to-stem ratio among treatments; however, no significant differences were found in seedling length or stem length at the five percent level.

Conclusion: In this research, seeds from three accessions of *A. cappadocicum* collected from different regions (Sari, Dehmian, and Kelich Kola) in Mazandaran province of Iran underwent physical dehydration treatment before being stored in LN tanks at the Research Institute of Forests and Rangelands in Tehran, Iran. This technology provides a viable method for conserving and protecting this species under critical conditions.

Keywords: Cryoprotectant, desiccation, germplasm protection, liquid nitrogen, resuscitation, vitrification.

حفظ ذخایر ژنتیکی گونه شیردار (*Acer cappadocicum* Gled.) در فراسرد

لیلا میرجانی [۱*] و عباس قمری زارع [۲]

۱*- نویسنده مسئول، پژوهشگر، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. پست الکترونیک: mirjani@rifr-ac.ir

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: حفظ تنوع در سطوح ژنتیکی و بوم‌سازگانی در برنامه‌های اصلاحی و ایجاد رقم‌های جدید ضروری است. به همین علت، حفاظت از تنوع زیستی جنگل‌های هیرکانی به‌عنوان فسیل زنده، اهمیت ویژه‌ای دارد. حفاظت فراسرد (Cryopreservation)، ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی در مخازن پر از نیتروژن مایع است که مؤثرترین روش حفظ بلندمدت منابع ژنتیکی گیاهی محسوب می‌شود. این روش، جایگزینی برای بانک‌های بذر یا در شرایط آزمایشگاهی است که می‌تواند هم برای محصولات تکثیرشده به‌صورت رویشی و هم به‌صورت زایشی (از طریق بذر) استفاده شود. دمای بسیار پائین، سلول‌ها را در همان وضعیتی که هستند تثبیت کرده و امکان نگهداری بلند مدت آنها را میسر می‌سازد. روش نگهداری در دمای فراسرد در مقایسه با روش‌های کلاسیک، نیاز به هزینه بسیار کم داشته و از طرفی مدت حفاظت نمونه‌ها بسیار طولانی می‌باشد. در این روش، از قسمت‌های مختلف گیاه (بذر، اندام، کالوس، سلول‌های تمایز یافته، مریستم و دانه گرده) می‌توان برای نگهداری استفاده نمود. در روش فراسرد، نمونه‌ها در مقابل خطرات ناشی از آفات و بیماری‌ها مصون مانده و برای نگهداری و محافظت گونه‌ها، حداقل انرژی و فضا لازم است. علاوه بر اینکه، امکان تکرار نمونه‌ها با حداقل هزینه و امکانات، در هر شرایط محیطی وجود دارد. در روش نگهداری فراسرد، امکان جمع‌آوری و ذخیره‌سازی گونه‌های گیاهی اقلیم‌های مختلف در یک مکان و شرایط واحد میسر می‌باشد. هدف پژوهش پیش‌رو، ارزیابی امکان نگهداری بذر شیردار (*Acer cappadocicum* Gled.) در شرایط فراسرد است.

مواد و روش‌ها: برای نگهداری بذرهای شیردار در فراسرد ابتدا توسط اعمال تیمارهای مختلف، به‌منظور جلوگیری از کریستاله شدن آب آزاد و پاره شدن غشا پلاسمایی در دمای فراسرد، آب‌گیری بذرها صورت گرفت. به‌همین منظور بذرها در معرض تیمارهای شیمیایی و فیزیکی فراسرد پیش از ورود به نیتروژن مایع، قرار گرفتند. تیمارهای شیمیایی شامل، گلیسرول ۳۰ درصد، محلول شیشه‌ای شدن و تیمار فیزیکی کاهش رطوبت بذر بوسیله دسیکاتور حاوی سیلیکاژل می باشد. برای این‌که تحمل به کم‌آبی و فرایندهای کرایوژنیک به اندازه کافی افزایش پیدا کند. بذرهای تیمارشده به همراه بذرهای شاهد، پس از ۲۴ ساعت از نیتروژن مایع خارج شدند و بلافاصله در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. سپس، به‌منظور شکستن خواب، بذرهای تیمارشده، به‌همراه بذرهای شاهدی که در درون نیتروژن مایع قرار گرفته بود و بذر شاهدی که در درون نیتروژن مایع قرار نگرفته بودند، در ماسه مرطوب کاشته شدند و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بذرها پس از سه ماه شروع به جوانه‌زدن کردند. سپس، زنده‌مانی و جوانه‌زنی آن‌ها بررسی شد. در این پژوهش، هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۵ بذر بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، تجزیه واریانس یک‌طرفه در قالب طرح پایه کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به‌روش چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج: در بین تیمارهای فراسرد اعمال‌شده روی بذرهای شیردار، تیمار آب‌گیری فیزیکی، بیشترین درصد جوانه‌زنی (۲۶ درصد) و شاخص بنیه بذر را نسبت به تیمارهای دیگر در سطح اطمینان ۹۹ درصد نشان داد، اما دو تیمار گلیسرول ۳۰ درصد و شیشه‌ای شدن سبب کاهش درصد جوانه‌زنی شیردار شدند. احتمال دارد که این گونه به مواد حفاظت فراسرد حساس باشد و این مواد به جنین بذر آسیب زده باشند. ازنظر ریخت‌شناسی نیز بین تیمارها، تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد در طول ریشه، طول ساقه، طول گیاهچه و نسبت طول ریشه به طول ساقه وجود داشت.

نتیجه‌گیری کلی: در این پژوهش، بذرهای سه اکسشن گونه شیردار جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان مازندران (ساری، دهمیان و کلیج کلا) تحت بهترین تیمار آب‌گیری فیزیکی قرار گرفتند. سپس، آن‌ها در تانک مخصوص ذخیره نیتروژن مایع موجود در بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شدند تا با استفاده از این فناوری، امکان احیا و حفاظت این گونه در شرایط بحرانی فراهم شود.

واژه‌های کلیدی: آب‌گیری، احیا، حفاظت ژرم‌پلاسم، حفاظت‌کننده فراسرد، شیشه‌ای شدن، نیتروژن مایع

مقدمه

حفظ تنوع در سطوح ژنتیکی و بوم‌سازگانی از مهم‌ترین اصول مدیریت جنگل‌ها است (Imani Rastabi *et al.*, 2023). حفاظت فراسرد (Cryopreservation)، تنها روش امکان‌پذیر برای حفظ بلندمدت مواد ژنتیکی از قسمت‌های مختلف گیاهان ازجمله گونه‌های دارای بذر کم‌عمر (Unorthodox seed) که به کم‌آبی حساس هستند، گیاهان تکثیرشده رویشی، گونه‌های کمیاب و در حال انقراض و نیز لاین‌های سلولی ارزشمند گیاهی است (Cruz-Cruz *et al.*, 2013). فراسرد به ذخیره‌سازی بافت‌ها در نیتروژن مایع (LN، ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) یا کمتر، (بخار LN، حدود ۱۶۵- تا ۱۹۰- درجه سانتی‌گراد) اشاره دارد. در LN، فرایندهای متابولیک و زیست‌شیمیایی (ازجمله تنفس و فعالیت آنزیمی که به پیری سلول و مرگ سلولی منجر می‌شوند) و نیز تقسیم سلولی به‌طور مؤثر متوقف می‌شوند. درنتیجه، این تکنیک، ذخیره‌سازی بلندمدت را امکان‌پذیر می‌کند (Li *et al.*, 2019).

ازجمله مهم‌ترین مزیت‌های حفاظت فراسرد می‌توان به حفظ تنوع ژنتیکی با نگهداری گونه‌های وحشی و در معرض انقراض (به‌ویژه برای اصلاح نژاد)، حذف ویروس‌ها از گیاهان آلوده به‌روش سرمادرمانی جوانه رأسی، کمترین نیازهای ذخیره‌سازی، حفظ پایداری فنوتیپ و ژنوتیپ، شرایط ایمن در برابر بیماری‌ها یا آسیب‌های ناشی از محیط‌زیست، بدون نیاز به کشت فرعی مستمر و متوالی و تسهیل تبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسم اشاره کرد (Gonzalez-Arnao *et al.*, 2014). بااین‌حال، توسعه روش‌های مؤثر برای حفاظت فراسرد، آسان نیست. مشکلات ناشی از قرارگیری مواد زیستی در معرض دماهای کم و بسیار کم، شامل تأثیر بر انواع فرایندها، یعنی کاهش یا توقف واکنش‌های زیست‌شیمیایی (و درنتیجه، متابولیسم)، ناپایداری و از دست دادن نیمه نفوذپذیری غشاها، شکستن بافت‌ها و سلول‌ها، پلاسمولیز غیرقابل‌برگشت و درنهایت، مرگ سلولی هستند (Zamecnik *et al.*, 2021). اجتناب از صدمه‌های شیمیایی و فیزیکی در حین حفاظت فراسرد، هدف اصلی حفاظت در برابر سرما است. تشکیل یخ خارج سلولی می‌تواند برای یکپارچگی ساختارهای سلولی مضر باشد، اما یخ درون سلولی کشنده است، بنابراین در همه روش‌های حفاظت فراسرد، حذف آب، نقش کلیدی در جلوگیری از آسیب یخ‌زدگی و ایمن‌سازی زنده‌مانی پس از ذوب نمونه‌های مشتق‌شده از LN دارد. حذف آب را می‌توان با استفاده از به‌اصطلاح محافظت‌کننده‌های فراسرد به‌دست آورد. محافظت‌کننده‌های فراسرد، ترکیبات شیمیایی هستند که توزیع آب را در داخل یا خارج سلول‌ها تعدیل می‌کنند و آن‌ها را کم‌آب می‌کنند. این مواد سبب افزایش پایداری غشای پلاسمایی در کمتر از نقطه یخ‌زدگی آن‌ها و افزایش ویسکوزیته سیتوزول می‌شوند و در عین حال از سلول‌ها در برابر صدمه‌های یخ‌زدگی محافظت می‌کنند (Kaviani & Kulus, 2022).

افرا (Acer) یکی از جنس‌های خانواده Aceraceae است که ازنظر پراکندگی جغرافیایی جهانی در شمال شرق آناتولی، قفقاز شمال ایران، پاکستان و در ایران در مناطق مختلف استان‌های گرگان، مازندران و گیلان و ناحیه ارسباران در آذربایجان قرار دارد (Mozaffarian, 2005). افرا شیردار (*A. cappadocicum* Gled.) یکی از گونه‌های انفرادی جنگل‌های شمال است که ازنظر بوم‌شناختی و اقتصادی،

اهمیت دارد. از چوب آن برای ساخت ادوات کشاورزی، تیرک، تختخواب و وسایل دیگر استفاده می‌شود. همچنین، این درخت به‌عنوان یک گیاه زینتی در سراسر جهان (ازجمله باغ گیاه‌شناسی میسوری در ایالات متحده آمریکا) کاشته می‌شود (Crowley *et al.,* 2017). چوب شیردار، سفید است و ازنظر مصارف روستایی مانند گونه‌های دیگر افرا است، اما برگ آن بیشتر از گونه‌های دیگر، مورد توجه دامداران است و به تعلیف دام می‌رسد (Sabeti, 1994). شیردار در اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) جزو گروه کمترین نگرانی (Least concern) است، اما توصیه می‌شود که این گونه در جنگل‌های هیرکانی پایش شود و اقدامات حفاظتی در این جنگل‌ها برای آن اجرا شود زیرا به‌نظر می‌رسد که شیردار در معرض خطر از دست دادن زیستگاه در این جنگل‌ها باشد (Crowley *et al.,* 2017). باتوجه‌به این موضوع، هدف از انجام پژوهش پیش‌رو، حفظ ذخیره ژنتیکی این گونه باارزش در شرایط فراسرد است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذر

بذرهای رسیده افرا شیردار از سه منطقه در استان مازندران در اواخر فصل تابستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱- محل جمع آوری بذرهای افرا شیردار

Table 1. Collection location of seeds of *Acer cappadocicum* in northern Iran

No.	Location	Latitude (north)	Longitude (east)	Altitude (m.a.s.l.)
1	Mazandaran province, Sari	36° 8′ 15″	53° 12′ 38″	1061
2	Mazandaran province, Deh mian	36° 0′ 50″	53° 12′ 11″	1920
3	Mazandaran province, Kelich kola	36° 9′ 15″	53° 12′ 44″	1750

پیش از قرارگیری بذرها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد به‌منظور نگهداری در فراسرد، آب‌گیری بذرها به‌روش‌های زیر انجام شد:

تیمار ۱- گلیسرول ۳۰ درصد: بذرها به کرایوویال‌های حاوی گلیسرول ۳۰ درصد منتقل شدند و به‌مدت یک ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس، کرایوویال‌ها وارد نیتروژن مایع شدند.

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

تیمار ۳- کاهش رطوبت بذر یا آب‌گیری (Desiccation): در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی حساس (دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) تعیین شد. ابتدا، محتوای رطوبت بذرها براساس اختلاف وزن‌های تر و خشک نمونه‌ها محاسبه شد. نمونه‌ها با استفاده از آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۷ ساعت خشک شدند (ISTA, 1996). به این ترتیب از طریق رابطه (۱)، کل رطوبت بذر تازه شیردار ۲/۸۶ درصد به‌دست آمد. به‌منظور اعمال تیمار کاهش رطوبت، ابتدا وزن ۷۵ عدد بذر شیردار اندازه‌گیری شد. سپس، آن‌ها بر روی کاغذ صافی در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک منتقل شدند. دسیکاتور به‌مدت چهار ساعت به پمپ خلأ متصل شد تا آب‌گیری صورت گیرد. سپس، بذرها به‌مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد، مقدار کاهش رطوبت آن‌ها اندازه‌گیری شد (رابطه ۱). رطوبت بذرها پس از خروج از دسیکاتور ۰/۳۱ درصد 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) $\text{درصد کل رطوبت بذر} = ((FW - DW)/ FW) \times 100$

که در آن، FW بیانگر وزن تر و DW نشان‌دهنده وزن خشک هستند.

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

تیمارهای تعیین زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای خارج‌شده از فراسرد

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

تعیین درصد جوانه‌زنی بذرهای شیردار خارج‌شده از فراسرد

به‌منظور شکستن خواب بذر، بذرهای شیردار خارج‌شده 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 شدند و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بذرها پس از سه ماه، شروع به جوانه‌زنی کردند. در طی این مدت، رطوبت ماسه کنترل شد. خروج ریشه‌چه به‌طول دو میلی‌متر به‌عنوان معیار بذر جوانه‌زده در نظر گرفته شد (ISTA, 2007). تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر واحد آزمایشی به‌صورت روزانه شمارش شدند. شمارش بذرهای جوانه‌زده برای هر ظرف تا زمانی که تغییری در جوانه‌زنی مشاهده شد، ادامه یافت. مدت 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 معادله‌های زیر محاسبه شد:

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

رابطه (۲) $\text{GP} = \left(\frac{\text{Ni}}{\text{N}}\right) \times 100$

که در آن، Ni بیانگر تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در روز آخر شمارش و N نشان‌دهنده تعداد کل بذرها است. متوسط زمان جوانه‌زنی (AGT) از رابطه (۳) محاسبه شد (Ellis & Roberts, 1981).

رابطه (۳) $AGT = \frac{\sum d_i n_i}{n}$

که درآن، ni نشان‌دهنده تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و di بیانگر تعداد روزهای شمارش از آغاز جوانه‌زنی و n نشان‌دهنده تعداد کل بذرها است.

سرعت جوانه‌زنی (GR) نیز از معکوس کردن متوسط زمان جوانه‌زنی محاسبه شد (رابطه ۴).

رابطه (٤) $GR = \frac{1}{AGT}$

برای محاسبه شاخص بنیه (VI) از رابطه (۵) استفاده شد

(Ellis & Roberts, 1981).

رابطه (۵) $VI = \frac{\sum(GP \times SL)}{100}$

که در آن، GP بیانگر درصد جوانه‌زنی و SL نشان‌دهنده طول گیاه‌چه است.

مقدار رشد اولیه گیاه‌چه‌ها، طول گیاه‌چه و نیز طول ساقه و ریشه‌چه آن در هرکدام از تیمارها با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

تجزیه وتحلیل 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 کاکس- باکس در نرم‌افزار Minitab 14 نرمال شدند. سپس، تجزیه واریانس یک‌طرفه در قالب طرح پایه کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به‌روش چنددامنه‌ای دانکن در نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت.

نتایج

جوانه‌زنی بذرهای شیردار پس از خروج از فراسرد

بین تیمارهای فراسرد اعمال‌شده بر بذرهای شیردار ازنظر درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر، تفاوت معنی‌داری به‌ترتیب در سطح اطمینان ۹۹ و ۹۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها براساس روش دانکن نیز نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۲۶ درصد) و شاخص بنیه بذر (قدرت رویشی بذر و استقرار آن) متعلق به تیمار آب‌گیری بودند (جدول ۳). گفتنی است که درصد جوانه‌زنی نمونه شاهد ۲۸ درصد به‌دست آمد. ازنظر ریخت‌شناسی نیز بین تیمارها، تفاوت معنی‌داری در طول ریشه، طول ساقه، طول گیاه‌چه و نسبت طول ریشه به ساقه مشاهده شد (جدول ۳). شکل ۱ نشان‌دهنده اثر متفاوت تیمارها بر نگهداری بذر شیردار در فراسرد است.

جدول ۲- خلاصه تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تیمارهای مختلف فراسرد بر خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای شیردار

Table 2. Summary of ANOVA (MS) of different cryo- pretreatments on germination traits in the seeds of *Acer cappadocicum*

Trait	Source of variation	
	Treatment (DF=3)	Error (DF=8)
Germination percentage	187**	7
Rate of germination	0.001ns	0.001
Average germination time	0.001ns	0.001
Vigor Index	1.76*	0.29
Root length	19.35**	1.64
Stem length	5.35 *	0.95
Seedling length	27.16 *	4.14
Root to stem length ratio	0.98**	0.05

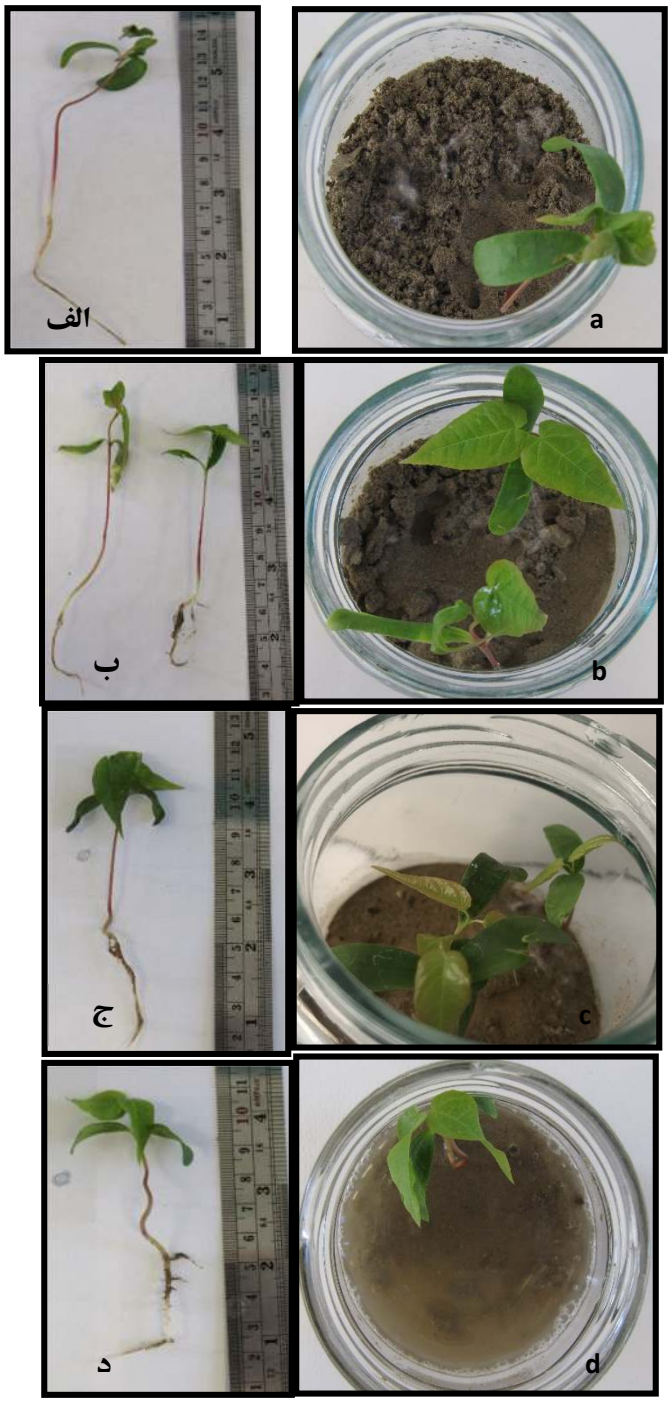
**: Significant at p<0.01; *: Significant at p<0.05; ns: non-significant

جدول ۳- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف فراسرد بر خصوصیات جوانه‌زنی و درصد زنده‌مانی بذرهای شیردار پس از خروج از فراسرد

Table 3. Mean compare of different cryo-treatments on germination traits and survival rate of *Acer cappadocicum* cryopreserved seeds

Trait	Glycerol 30%	Vitrification	Desiccation	Control cryopreserved
Germination percentage	12b	8b	26a	12b
Vigor Index	0.77b	0.96b	2.47a	1.62ab
Root length (cm)	2.5b	5b	5b	8.6a
Stem length (cm)	4b	7a	4.5b	4.8b
Seedling length (cm)	6.5b	12a	9.5b	13.3a
Root to stem length ratio	0.62c	0.72bc	1.09b	1.88a

Different letters in each row indicate a significant difference between means (P<0.05).



شکل ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف فراسرد بر جوانه‌زنی و ریخت‌شناسی بذرهای شیردار. الف) بذر شاهد نگهداری‌شده در فراسرد، ب) شیشه‌ای شدن، ج) آب‌گیری و د) گلیسرول ۳۰ درصد

Figure 1. Comparison of the effects of different cryo-treatments on germination and morphology of *Acer cappadocicum* seeds. A) control cryopreserved, B) vitrification, C) desiccation, and D) 30% glycerol

بحث

تنها راه برای جلوگیری از کریستاله شدن یخ در سلول در دمای بسیار کمِ نیتروژن مایع، بدون کاهش شدید محتوای آب، یخ‌زدگی یک محلول به حالت شیشه‌ای است. شیشه‌ای شدن را می‌توان با افزایش ویسکوزیته، هم در داخل و هم در خارج سلول، در نقطه بحرانی که مانع تشکیل یخ می‌شود، به‌دست آورد. به‌طوری‌که آب باقی‌مانده موجود در اثر قرار گرفتن در معرض نیتروژن مایع شیشه‌ای می‌شود. همه رویکردهای کرایوژنیک مدرن بر این انتقال فاز تکیه دارند. اساس پروتکل‌های حفاظت فراسرد برای جلوگیری از شیشه‌ای شدن، سطحی از دهیدراته کردن بافت‌ها است که با قراردادن نمونه در محلول‌های بسیار غلیظ و یا خشک کردن فیزیکی بسیار قوی، به منظور سرد شدن سریع و فوق‌سریع نمونه می‌باشد. درنتیجه، بیشتر یا همه آب قابل‌یخ‌زدگی حذف می‌شود و املاح داخلی هنگامی که ریزنمونه در LN فرو می‌رود، منجمد می‌شوند (Kaviani & Kulus, 2022).

در پژوهش پیش‌رو، نتایج آزمون قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای شیردار خارج‌شده از فراسرد نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی متعلق به بذرهایی است که تحت تیمار آب‌گیری فیزیکی قرار گرفته بودند (۲۶ درصد). باتوجه‌به اینکه درصد جوانه‌زنی نمونه شاهد، ۲۸ درصد به‌دست آمد، می‌توان گفت که تیمار آب‌گیری سبب کاهش قوه نامیه بذر شیردار نشده است. مقدار آب قابل‌انجماد 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 حد 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 تاجای‌ممکن جلوگیری می‌شود.

مقدار رطوبت بذر شیردار در زمان رسیدگی ۲/۸۶ درصد وزنی به‌دست آمد. در تیمار کاهش رطوبت، قرار دادن بذرها در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل تحت شرایط خلأ باعث شد که رطوبت بذر به ۰/۳۱ درصد کاهش یابد. درنتیجه، بذرهای شیردار نیز وقتی رطوبت خود را از دست می‌دهند، با جلوگیری از کریستاله شدن و پارگی غشا پلاسمایی جنین آن‌ها، بیشترین درصد جوانه‌زنی را دارند. در جنس Acer، دانه‌ها حساسیت متفاوتی را به خشک شدن نشان می‌دهند. چنانچه بذرهای ماندگار (Orthodox seeds) متعلق به *A. platanoides* L. تحمل خشک شدن تا محتوای آب شش تا ۱۰ درصد را دارند، اما بذرهای کم‌عمر (Recalcitrant seeds) از *A. pseudoplatanus* L. به خشک شدن حساس هستند (Pukacki & Juszczyk, 2015). به‌طور مثال، Beardmore و Whittle (۲۰۰۵) بررسی کردند که آیا محور جنینی بذرهای کم‌عمر متعلق به A. saccharinum L. می‌تواند آب‌گیری (۱۰ درصد محتوای آب) و دمای فراسرد را توسط پیش‌تیمار با ABA یا tetcyclacis تحمل کند؟ پیش‌تیمار محور جنینی با هر دو ماده سبب افزایش غلظت ABA درونی شد و جوانه‌زنی را پس از آب‌گیری و فریز، ۵۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. براساس نتایج پژوهش مذکور، تحریک سنتز پروتئین دهیدرین در تحمل به خشکی در بذرهای کم‌عمر نیز نقش دارد. چنانچه کاهش ۱۰ درصدی رطوبت توسط تیمار آب‌گیری فیزیکی باعث شد که جوانه‌زنی بذرهای تحت این تیمار نسبت به نمونه‌های شاهد ۴۸ درصد افزایش یابد. Hatami و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که بذرهای کیکم (*A. monspessulanum* L.) تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف فراسرد و نیز با شاهد نداشتند. هم‌راستا با نتایج پژوهش پیش‌رو، بهترین تیمار نگهداری در فراسرد درمورد کنار (*Ziziphus spina-christi* (L.) Willd.) و ملج (*Ulmus glabra* Huds.) نیز آب‌گیری گزارش شد (Naderi-Shahab *et al.*, 2016, 2017). برخلاف شیردار، گیاه گیلاس وحشی (*Prunus avium* (L.) L. با نام مترادف *Cerasus avium* (L.) Moench) در این روش، ۴/۷ درصد آب خود را از دست داد که باعث کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها شد

(Mirjani *et al.,* 2021). به‌طوری‌که تیمارهای فراسرد که موجب کاهش رطوبت بذر گیلاس وحشی شدند، کاهش درصد زنده‌مانی را نیز در پی داشتند، اما تفاوت جوانه‌زنی گونه‌های گبر (*Vachellia tortilis* (Forssk.) Galasso & Banfi با نام مترادف *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne)، چش (*Vachellia nilotica* (L.) P.J.H.Hurter & Mabb. با نام مترادف *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile) و نیز کیکم بین تیمارهای مختلف، غیرمعنی‌دار گزارش شد (Hatami *et al.,* 2010; Jebelli *et al.,* 2015). درنتیجه، می‌توان گفت که حساسیت جنین نسبت به رطوبت به نوع گونه بستگی دارد.

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 کم می‌کند. به‌همین علت، گلیسرول به‌عنوان ماده محافظ فراسرد استفاده می‌شود (Turner *et al.,* 2001). شیشه‌ای شدن نیز 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 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 سبب کاهش رطوبت بذر شدند، درصد زنده‌مانی شیردار را کاهش دادند. پس مواد حفاظت فراسرد به‌کاررفته ممکن است که به جنین بذر این گونه آسیب زده باشند. بررسی حفظ ذخایر ژنتیکی گیلاس وحشی در شرایط فراسرد نشان داد که تیمار PVS2 با اثر منفی بر درصد جوانه‌زنی بذرهای این گونه سبب کاهش ۵۰ درصدی جوانه‌زنی نسبت به بذرهای شاهد نیتروژنی شد (Mirjani *et al.,* 2021). اثر مثبت این پیش‌تیمار بر سپیدار (*Populus alba* L.) نیز گزارش شده است (Lambardi *et al.,* 2000).

به‌طورکلی، نتایج پژوهش پیش‌رو نشان می‌دهد که بذرهای شیردار، قابلیت نگهداری در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد را دارند. ازنظر مدت نگهداری بذر در شرایط فراسرد، امکان نگهداری چند هزار سال وجود دارد. به‌عنوان مثال، براساس محاسبه‌های دینامیکی انجام‌شده بر بذرهای کاهو که در شرایط دمایی کم نگهداری می‌شدند، نیمه‌عمر جوانه‌زنی این گونه ۳۵۰۰ سال برآورد شد (Walters *et al.,* 2004).

بدین ترتیب بذرهای سه اکسشن گونه شیردار جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف، تحت تیمار آب‌گیری فیزیکی قرار گرفتند و در تانک ذخیره نیتروژن مایع موجود در بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شدند. با استفاده از این فناوری، امکان احیا و حفاظت این گونه در معرض خطر در بوم‌سازگان‌های منابع طبیعی در شرایط بحرانی فراهم شد.

References

- 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.
- Crowley, D., Barstow, M. and Rivers, M.C., 2017. *Acer cappadocicum*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T193525A2241869. Available at: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T193525A2241869.en
- Cruz-Cruz, C.A., Gonzlez-Arnao, M.T. and Engelmann, F., 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Resources, 2: 73-95.
- Ellis, R.A. and Roberts, E.H., 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and 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.
- Gonzalez-Arnao, M.T., Martinez-Montero, M.E., Cruz-Cruz, C.A. and Engelmann, F., 2014. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity: 129-170. In: Ahuja, M.R. and Ramawat, K.G. (Eds.). Biotechnology and

Biodiversity. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 340p.
- Hatami, F., Jebelli, M., Naderi Shahab, M., Tabari, M. and Jafari, A.A., 2010. Cryopreservation of Acer monspessulanum seeds. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18(1): 12-23 (In Persian with English summery).
- Imani Rastabi, M., Jalilvand, H., Fallah, A. and Shahin Kaleybar, B., 2023. Genetic diversity of Parrotia persica (DC) CA Meyer in Hyrcanian forests. Iranian Journal of Forest, 15(3): 313-327 (In Persian with English summery).
- ISTA [International Seed Testing Association]. 1996. International Rules for Seed Testing, 1996. Seed Science and Technology 21(Supplement): 1B288.
- Jebelli, M., Naderishahab, M.A. and Jafari, A.A., 2015. 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 with English summery).
- Kaviani, B. and Kulus, D., 2022. Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions. Biology, 11: 847.
- Lambardi, M., Fabbari, 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.
- Li, J.W., Zhang, X.C., Wang, M.R., Bi, W.L., Faisal, M., Teixeira da Silva, and Wang, Q.C., 2019. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of Lilium spp. Plant Methods, 15: 125.
- Mirjani, L., Ghamarizare, A., Emam, M. and Espahbodi, K., 2021. Preservation of the genome of sweet cherry (*Cerasus avium* (L.) Moench.) in cryopreservation conditions. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 28(4): 370-381 (In Persian with English summery).
- Mozaffarian, V., 2005. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser, Tehran, Iran, 1082p (In Persian).
- Murashige, T. and F. Skooge., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
- Naderi-Shahab, M., Jebelli, M. and Jafari, A.A., 2016. Assesment of maintenance of *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. seed under cryogenic conditions. Iranian Journal of Seed Science and Research, 3(1): 111-120 (In Persian with English summery).
- Naderi-Shahab, 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 with English summery).
- Pukacki, P.M. and Juszczyk, K., 2015. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two Acer species. Trees, 29: 385-396.
- Ranai, M.A. and De Santana, D.G., 2006. How and why to measure the germination process. Revista Brasileira de Botanica, 29: 1-11.
- Sabeti, H., 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Published by University of Yazd, Yazd, Iran, 884p (In Persian).
- 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
- Walters, C., Wheeler, L. and Stanwood, P.C., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48: 229-244
- Wen, B. and Song, S., 2007. Acquisition and loss of cryotolerance in Livistona chinensis embryos during seed development. Cryoletters, 28(4): 291-302.
- Zamecnik, J., Faltus, M. and Bilavcik, A., 2021. Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. Plants, 10(12): 2623.