مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۸ شماره ۴، صفحه ۳۸۱-۳۷۰، (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfpr.2021.352594.1966
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0883.1399.28.370.82.4.1581.1583

حفظ ذخایر ژنتیکی گیلاس وحشی (*Cerasus avium* (L.) Moench.) در شرایط فراسرد

لیلا میرجانی [۱*]، عباس قمری‌زارع [۲]، میترا امام [۳] و کامبیز اسپهبدی [۴]

۱*- نویسنده مسئول، پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
پست الکترونیک: mirjani@rifr-ac.ir
۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۴- دانشیار، بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱

چکیده

گیلاس وحشی یا آلوکک (*Cerasus avium* (L.) Moench.) ازجمله گونه‌های در معرض خطر در ایران است. به همین دلیل، حفظ ذخیره ژنتیکی این گونه اهمیت زیادی دارد. ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد، روشی بسیار کارآمد در نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم گونه‌های گیاهی است. برای نگهداری بذرهای گیلاس وحشی در شرایط فراسرد ابتدا توسط اعمال تیمارهای مختلف و به‌منظور جلوگیری از کریستاله شدن آب آزاد و پاره شدن غشاء پلاسمایی در دمای فراسرد، آب‌گیری بذرها انجام شد. به همین منظور از پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، محلول شیشه‌ای شدن و کاهش رطوبت بذر پیش از ورود به ازت مایع استفاده شد. بذرهای تیمارشده پس از خروج از ازت مایع در معرض شوک حرارتی قرار گرفتند. سپس، این بذرها به‌همراه بذرهای شاهد از نظر زنده‌مانی و جوانه‌زنی بررسی شدند. در بین بذرهایی که در ازت مایع قرار گرفته بودند، بیشترین زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد ازتی مشاهده شد. برخی تیمارهای فراسرد به‌علت اینکه موجب کاهش رطوبت بذر می‌شوند، کاهش درصد جوانه‌زنی را در پی داشتند. بیشترین درصد جوانه‌زنی (۴۰ درصد) متعلق به بذرهایی بود که تحت هیچ‌گونه تیمار کاهش رطوبت قرار نگرفته بودند. این یافته نشان می‌دهد که مواد حفاظت فراسرد به جوانه‌زنی بذر آسیب می‌زنند. درنتیجه، مقدار رطوبت موجود در بذر، کمترین رطوبت مورد نیاز به‌منظور زنده‌مانی و جوانه‌زنی است و کم کردن رطوبت باعث آسیب به جنین بذر می‌شود. به‌این‌ترتیب، با استفاده از فناوری فراسرد و به‌کارگیری پیش‌تیمار بدون کاهش رطوبت، بذرهای گیلاس وحشی از چهار منطقه مختلف جمع‌آوری شدند و در بانک فراسرد مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شدند تا برای مدت طولانی حفظ شوند و از انقراض این گونه ارزشمند و منحصربه‌فرد جلوگیری شود.

واژه‌های کلیدی: آلوکک، احیا، حفاظت‌کننده فراسرد، ذخیره ژنوم.

مقدمه

گیلاس وحشی (*Cerasus avium* (L.) Moench.) متعلق به جنس *Cerasus* از خانواده Rosaceae است. این گونه در ایران به‌صورت خودرو در جنگل‌های مازندران

(کجور، نور و آمل)، گیلان (جنگل‌های گیلان، شیب شرقی گردنه آستارا و بهارستان در غرب آستارا)، آذربایجان (جنگل‌های ارسباران، عاشقلو و وینق) و امروزه به‌صورت کاشته‌شده در بیشتر نقاط معتدله و معتدله سرد کشور دیده می‌شود (Mozaffarian, 2005). گیلاس وحشی از نظر بوم‌شناختی و اقتصادی، ارزشمند است، اما در معرض خطر انقراض قرار دارد. به همین دلیل، حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه، اهمیت زیادی دارد.

براساس استانداردهای IUCN (The International Union for Conservation of Nature) فقط تعداد انگشت‌شماری از گونه‌های درختی و درختچه‌ای (کمتر از پنج درصد) پراکنش عادی دارند. وضعیت بیشتر گونه‌های درختی و نیز درختچه‌ای در حال تغییر از پراکنش عادی و یا خطرپذیری کم به‌سمت آسیب‌پذیری و یا خطر انقراض هستند. ازجمله روش‌هایی که برای حفظ ژرم‌پلاسم گیاهان وجود دارد، می‌توان به حفاظت در رویشگاه و یا حفاظت در خارج از رویشگاه اشاره کرد (Hawksworth & Bull, 2007). حفاظت گیاه در رویشگاه می‌تواند بسیار پرهزینه و در بسیاری از موارد ناممکن باشد. در کنار روش‌های مرسوم و سنتی حفاظت از گونه‌های منابع طبیعی مانند ایجاد باغ های گیاه‌شناسی ملی و منطقه‌ای، بانک ژن بذرهای گونه های جنگلی و مرتعی و عرصه‌های حفاظت‌شده جنگلی می توان به استفاده از توانمندی‌های زیست‌فناوری اشاره کرد. این توانمندی‌ها، راهکاری منحصربه‌فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهی محسوب می‌شوند که به‌سرعت در حال توسعه هستند. یکی از این روش‌ها، نگهداری بذرها و اندام‌های رویشی در شرایط انجماد است (Lambardi *et al*., 2000).

منظور از فناوری نگهداری در شرایط فراسرد، روش ذخیره‌سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت بسیار طولانی است. با این فناوری می‌توان بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد یا محیط نیتروژن مایع که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام متوقف شده است، برای مدت بسیار طولانی حفظ کرد (Popov *et al*., 2006). مزیت نگهداری در شرایط فراسرد، ذخیره‌سازی طولانی بدون انجام واکشت است، در حالی‌که با انجام واکشت ممکن است تنوع سوماکلونال به‌وجود آید و ثبات ژنتیکی به‌خطر بیفتد (Jain, 2010). از مزیت‌های دیگر تکنیک فراسرد می‌توان به حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های حفاظت در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به‌صورت کلون تکثیر می‌شوند و نیز به‌عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم اشاره کرد (Sant *et al*., 2006). برای حفاظت موفق ژرم‌پلاسم در شرایط فراسرد، عوامل اثرگذار بسیاری ازجمله مرحله رشد گیاه، نوع ماده گیاهی استفاده‌شده، مهارت تکنسین، شرایط کشت، شرایط پیش‌تیمار، روش انجماد مورد استفاده، نوع تجهیزات به‌کاربرده‌شده برای انجماد، ترکیب‌های استفاده‌شده و روش خارج کردن نمونه از حالت انجماد وجود دارند (Reed *et al*., 2004).

براساس پژوهش Michalak و همکاران (۲۰۱۵) وجود گزارش‌های متعدد درمورد آب‌گیری و ذخیره بذرهای *C. avium* در ازت مایع به این علت است که گیلاس وحشی جزء بذرهای گروه intermediate محسوب می‌شود، به‌طوری‌که بیشینه جوانه‌زنی این بذرها در محتوای رطوبتی بیشتر از ۲۰ درصد رخ می‌دهد. Vujović و همکاران (۲۰۱۵) در نگهداری جوانه انتهایی شاخه دو گونه *Prunus cerasifera* و *Prunus domestica* در شرایط فراسرد موفق بودند و به‌حدود ۴۰ درصد بازیابی دست پیدا کردند. تلاش به‌منظور حفاظت از ذخایر گیاهی با روش نگهداری در شرایط فراسرد و افزایش ضریب اطمینان نگهداری گیلاس وحشی، از اهداف و ضرورت‌های اصلی پژوهش پیش‌رو است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای رسیده گیلاس وحشی از چهار منطقه واقع در

استان مازندران در اوایل فصل تابستان جمع‌آوری شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری بذرهای گیلاس وحشی

ردیف	محل جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	ساری، سنگده و جنگل فریم	″۷ ′۷ °۳۶	″۱۷ ′۱۳ °۵۳	۱۵۰۰
۲	دهمیان و سوادکوه	″۵۰ ′۰ °۳۶	″۱۱ ′۱۲ °۵۳	۱۹۲۰
۳	ساری و اشک دودانگه	″۵۸ ′۳ °۳۶	″۳۱ ′۱۴ °۵۳	۱۰۳۷
۴	سنگده و گزن‌چال	″۵۹ ′۰ °۳۶	″۵۹ ′۱۲ °۵۳	۱۸۴۴

برای پیش‌تیمار بذرها به‌منظور نگهداری در شرایط فراسرد، پیش از قرارگیری بذرها در نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد، ابتدا به‌منظور جلوگیری از کریستاله شدن آب آزاد و پاره شدن غشاء پلاسمایی در دمای فراسرد، آب‌گیری بذرها با اعمال تیمارهای زیر انجام شد:

تیمار ۱ (گلیسرول ۳۰ درصد): بذرها به کرایوویال‌های حاوی گلیسرول ۳۰ درصد منتقل شده 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 حاوی سوکروز ۰/۴ مولار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد (pH=۵/۸) است. همچنین، محلول بارگیری شامل گلیسرول دو مولار و سوکروز ۰/۴ مولار در محیط کشت مایع MS است. 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، کرایوویال ها وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار ۳ (کاهش رطوبت بذر یا آب‌گیری/Desiccation): در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی حساس (دقت ۰/۰۰۰۱ گرمی) تعیین شد. ابتدا، محتوای رطوبتی بذرها براساس اختلاف وزن‌های تر و خشک نمونه‌ها محاسبه شد. خشک کردن نمونه‌ها با استفاده از آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد و به‌مدت ۱۷ ساعت انجام شد (ISTA, 1996). به‌این‌ترتیب، ازطریق رابطه ۱، کل رطوبت بذر گیلاس وحشی ۵/۸ درصد به‌دست آمد. سپس، به‌منظور اعمال تیمار کاهش رطوبت، پس از اندازه‌گیری وزن تر ۷۵ عدد بذر گیلاس وحشی، آن‌ها بر روی کاغذ صافی در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک متصل به پمپ خلأ منتقل شدند و به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در مرحله بعد، وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. درصد رطوبت بذرها پس از خروج از دسیکاتور ۱/۱ درصد 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 وزن تر وDW وزن خشک است.

تیمار ۴ (شاهد ازتی): بذرها بدون اعمال تیماری به کرایوویال‌ها منتقل شدند و به‌طور مستقیم وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار ۵ (شاهد): بذرها بدون اینکه به ازت مایع منتقل شود، به‌منظور تعیین میزان قوه نامیه بررسی شدند.

تیمارهای تعیین زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای خارج‌شده از شرایط فراسرد

برای تعیین بهترین تیمار ازنظر زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی، بذرها پس از ۲۴ ساعت از شرایط فراسرد خارج شدند. به‌منظور بازیابی بذرها و جلوگیری از یخ‌زدگی به‌فرم کریستالی، نمونه‌ها باید سریع گرم شوند. به‌منظور شوک حرارتی، نمونه‌ها بلافاصله از تانک نیتروژن خارج شده و در حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۲۰ ثانیه قرار داده شدند. سپس، بذرها با سوکروز ۱/۲ مولار به‌مدت پنج دقیقه شسته شدند. دوباره شستشوی بذرها با سوکروز ۰/۷۵ مولار به‌مدت پنج دقیقه انجام شد.

آزمون قابلیت زنده‌مانی بذرها با تست تترازولیوم

به‌دلیل اینکه جوانه‌زنی بذرهای گیلاس وحشی چندین ماه طول می‌کشد، ابتدا با تست تترازولیوم، زنده‌مانی بذرها مشخص شد. به‌این‌صورت که اندوکارپ تعدادی از بذرهای هر تیمار به‌طور جداگانه شکسته شد و در محلول یک درصد تترازولیوم به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در تاریکی قرار گرفتند. سپس، درصد زنده‌مانی بذرها در هر تیمار در زیر بینوکولار به‌دست آمد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار حاوی ۳۰ عدد بذر بود.

تعیین جوانه‌زنی بذرهای خارج‌شده از شرایط فراسرد

از دو روش مختلف برای شکستن خواب بذرها استفاده شد:

۱- پس از شکستن اندوکارپ بذرهای هر تیمار، آن‌ها در اواخر مردادماه به‌طور جداگانه در ماسه مرطوب کاشته شدند و به سردخانه با دمای چهار درجه سانتیگراد منتقل شدند. هنگامی‌که بذرهای کاشته‌شده پس از چهار ماه در اوایل دی‌ماه جوانه زدند، درصد جوانه‌زنی، طول ساقه، طول ریشه، طول و عرض برگ اول و طول گیاهچه اندازه‌گیری شد.

۲- بذرهای هر تیمار خارج‌شده از کرایو به‌طور جداگانه در تیرماه در گلدان کاشته شدند و در فضای بیرون قرار گرفتند. بذرها پس از گذشت ۱۰ ماه جوانه زدند. پس از اینکه این بذرها سه ردیف برگ دادند، جوانه‌زنی بذر (تعداد گیاهچه رشدکرده) و طول ساقه آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

در این پژوهش، هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۳۰ بذر بود. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- سمیرنوف بررسی شد. داده‌هایی که نرمال نبودند، به‌روش لگاریتمی در نرم‌افزار Minitab 14 نرمال شدند. سپس، تجزیه واریانس یک‌طرفه در قالب طرح پایه کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به‌روش چنددامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

نتایج

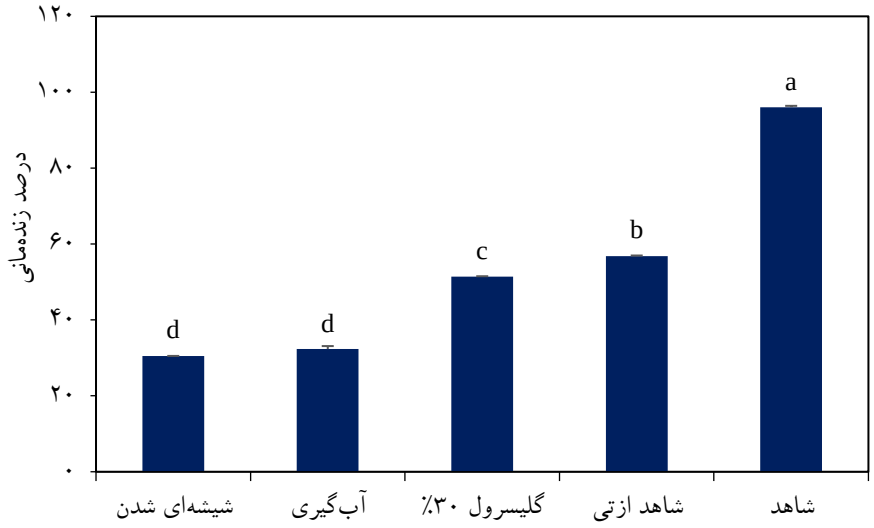
آزمون قابلیت زنده‌مانی (آزمایش تترازولیوم)

تعیین زنده‌مانی بذرهای گیلاس وحشی با تست تترازولیوم حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد بین تیمارهای فراسرد از نظر درصد زنده‌مانی وجود داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین زنده‌مانی مربوط به بذرهایی است که تحت هیچ‌گونه تیمار کاهش رطوبت قرار نگرفته بودند (شکل ۱).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر درصد زنده‌مانی بذرهای گیلاس وحشی پس از خروج از فراسرد

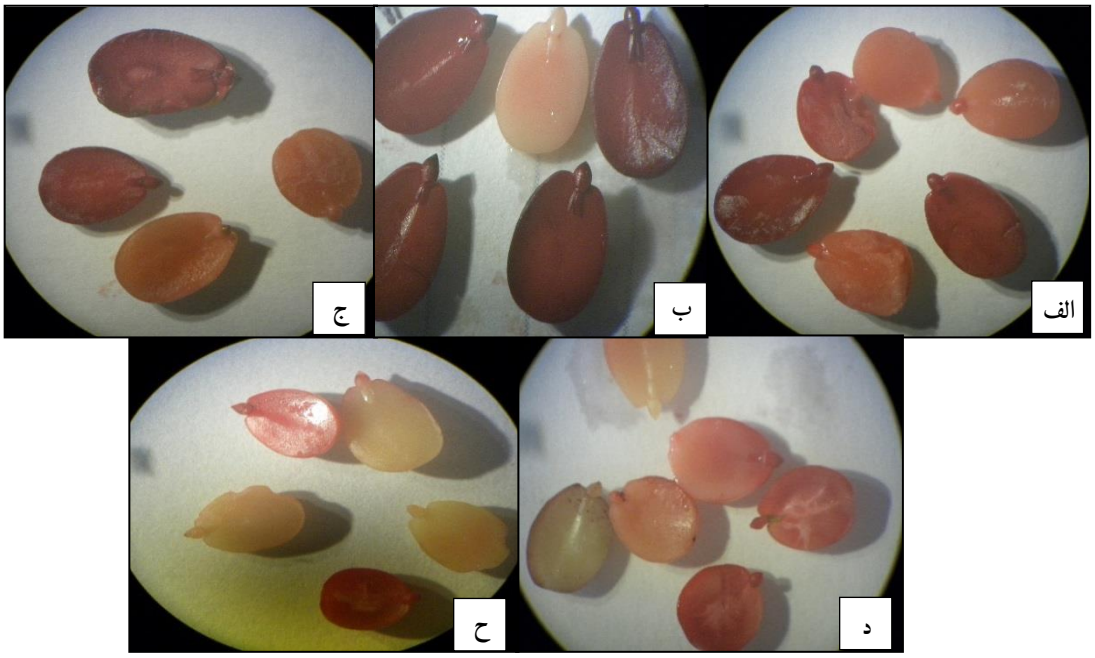
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۴	۰/۱۲**
خطا	۱۰	۰/۰۰۱

** معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد ازنظر قابلیت زنده‌مانی بذرهای گیلاس وحشی پس از خروج از فراسرد

(براساس نتایج آزمون دانکن، حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.)



شکل ۲- اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر قابلیت زنده‌مانی بذرهای گیلاس وحشی پس از خروج از فراسرد (الف: شاهد، ب: شاهد خارج‌شده از ازت مایع، ج: آب‌گیری، د: گلیسرول ۳۰ درصد و ح: شیشه‌ای شدن)

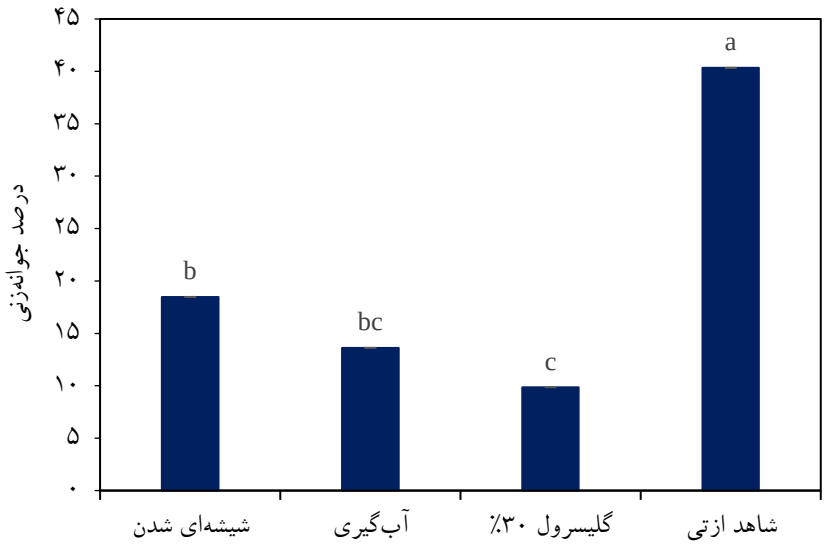
درصد جوانه‌زنی بذرها پس از خروج از شرایط فراسرد و کاشته شدن در ماسه مرطوب

بین تیمارهای فراسرد از نظر درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول گیاهچه و عرض برگ، تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد مشاهده شد، در حالی‌که تیمارهای فراسرد تأثیر معنی‌داری بر طول ساقه نداشتند (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها براساس روش دانکن نیز نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد ازتی بود (شکل‌های ۳ و ۵). طول ریشه و درنتیجه طول گیاهچه در تیمار شیشه‌ای شدن به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر بود (شکل ۴). در این تیمار، طول و عرض برگ نیز کاهش یافت.

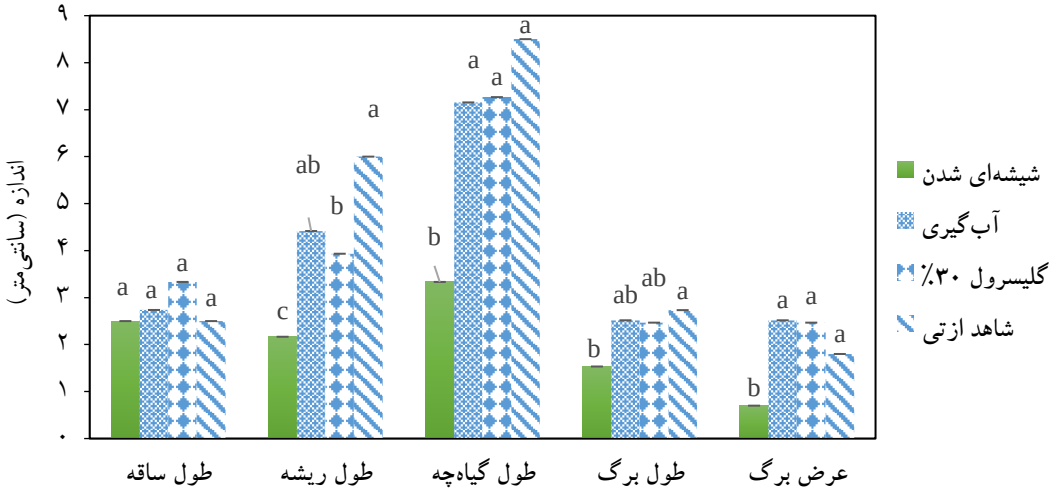
جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر استقرار بذرهای گیلاس وحشی فاقد آندوسپرم کاشته‌شده در ماسه مرطوب

منبع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه	طول ریشه	طول گیاهچه	طول برگ	عرض برگ
تیمار	۳	۰/۲۰**	۰/۶۷ ^{ns}	۴۷/۷**	۱۵/۰۲**	۰/۸۵ ^{ns}	۰/۷۴*
خطا	۸	۰/۰۱	۵/۸	۰/۸۶	۷/۳۴	۰/۲۹	۰/۱۰

** معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛* معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد؛ ^{ns} غیرمعنی‌دار

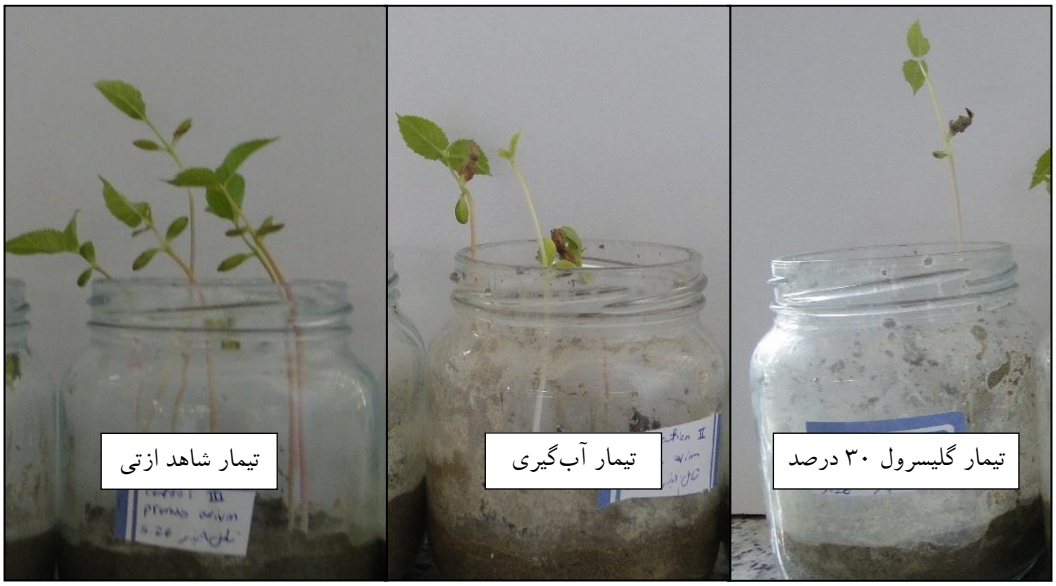


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر درصد جوانه‌زنی بذرهای گیلاس وحشی فاقد آندوسپرم کاشته‌شده در ماسه مرطوب (براساس نتایج آزمون دانکن، حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.)



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر رشد گیاهچه‌های گیلاس وحشی فاقد آندوسپرم کاشته‌شده در ماسه مرطوب

(براساس نتایج آزمون دانکن، حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.)



شکل ۵- مقایسه نتایج اثر برخی پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر درصد جوانه‌زنی بذرهای گیلاس وحشی فاقد آندوسپرم کاشته‌شده در ماسه مرطوب

استقرار بذرها در گلدان پس از خروج از شرایط فراسرد

بین تیمارهای فراسرد از نظر درصد جوانه‌زنی و تعداد ردیف برگی، تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد به‌دست آمد (جدول ۴)، اما از نظر طول ساقه، تفاوت معنی دار مشاهده نشد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد ازتی است، در حالی‌که تیمارهای فراسرد، تأثیر معنی‌داری بر طول ساقه نداشتند. همچنین، فقط تیمار گلیسرول ۳۰ درصد باعث کاهش معنی‌دار تعداد ردیف برگ‌ها شد (جدول ۵).

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر استقرار بذرهای گیلاس وحشی کاشته‌شده در گلدان

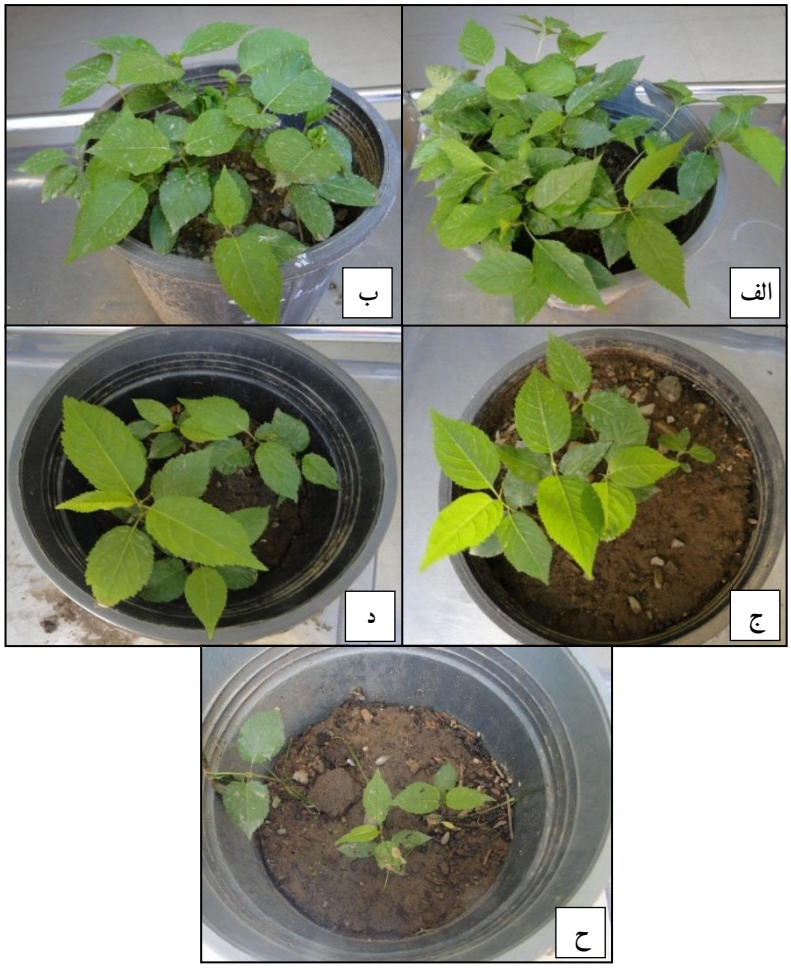
منبع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه	تعداد ردیف برگی
تیمار	۳	۰/۲۲**	۱/۲۴ ns	۰/۶۶**
خطا	۸	۰/۰۱	۰/۵۱	۰/۰۸

** معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر استقرار بذرهای گیلاس وحشی

تیمار	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه	تعداد ردیف برگی
شیشه‌ای شدن	۲۰/۵۸ b ± ۰/۰۵	۷/۵۹ a ± ۰/۱۱	۳ a ± ۰
آب‌گیری	۱۱/۷۶ c ± ۰/۰۶	۶/۸ a ± ۰/۶	۳ a ± ۰
گلیسرول ۳۰ درصد	۱۴/۲۸ c ± ۰	۶/۱ a ± ۰/۳	۲ b ± ۰
شاهد ازتی	۴۸/۳ a ± ۰/۰۰۸	۷/۴۱ a ± ۰/۴۵	۲/۶ a ± ۰/۳

براساس نتایج آزمون دانکن، حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.



شکل ۶- مقایسه نتایج اثر پیش‌تیمارهای مختلف فراسرد بر استقرار بذرهای گیلاس وحشی (الف: شاهد، ب: شاهد خارج‌شده از شرایط فراسرد، ج: آب‌گیری، د: شیشه‌ای شدن و ح: گلیسرول ۳۰ درصد)

بحث

گسترش پروتکل‌های ساده برای نگهداری بذرهای با عمر کوتاه سبب شد تا از این روش برای گونه‌های زیادی با هزینه اندک استفاده شود، بنابراین از بین رفتن بذرها در طی این فرایند به‌میزان چشمگیری کاهش یافت (Stanwood, 1987)، اما درمورد استفاده از این روش برای نگهداری بذر گونه‌های درختی در معرض خطر انقراض، پژوهش‌های اندکی انجام شده است (Rajasekharan & Ganeshan, 2019). از آنجایی‌که گیلاس وحشی از گونه‌های در معرض خطر و مهم جنگل‌های هیرکانی به‌شمار می‌آید، دستیابی به اطلاعات درمورد نگهداری بلندمدت بذرهای آن، اهمیت زیادی دارد. طبق نتایج پژوهش پیش‌رو در بررسی اثر فراسرد بر بذرهای گیلاس وحشی مشاهده شد که بذرها پس از خروج از ازت مایع همانند نمونه‌های شاهد، قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه هستند. همچنین، نتایج آزمون قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای خارج‌شده از شرایط فراسرد نشان داد که بیشترین زنده‌مانی متعلق به بذرهایی است که تحت هیچ‌گونه تیمار کاهش رطوبت قرار نگرفته بودند. پس از لقاح و تشکیل جنین بذر با گذر زمان، رطوبت جنین کاهش یافته و در زمان رسیدگی کامل به کمترین مقدار خود می‌رسد. برای نگهداری جنین بذر در شرایط 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 مورد توجه قرار گیرد (Wen & Song, 2007). درصد رطوبت در زمان رسیدگی بذرهای گیلاس وحشی در پژوهش پیش‌رو ۵/۸ درصد به‌دست آمد. در کمتر از این مقدار رطوبت، درصد جوانه‌زنی آن کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که تیمارهای فراسرد که موجب کاهش رطوبت بذر می‌شوند، کاهش درصد زنده‌مانی را در پی داشتند. پس مواد حفاظت فراسرد به جوانه‌زنی بذر آسیب می‌زنند. درنتیجه، رطوبت موجود در بذر، کمترین مقدار رطوبت مورد نیاز به‌منظور زنده‌مانی و جوانه‌زنی است و کم کردن رطوبت باعث آسیب به جنین بذر می‌شود. Michalak و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که کاهش محتوای رطوبت بذرهای گیلاس وحشی باعث کاهش درصد جوانه‌زنی آن می‌شود. پژوهشگران مذکور، بذرهای گیلاس وحشی را در گروه بذرهای Intermediate طبقه‌بندی کردند. به همین علت، کاهش رطوبت اثر منفی بر جوانه‌زنی آن‌ها دارد.

در تیمار گلیسرول، از این ماده با غلظت‌های مختلف به‌عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده می‌شود. گلیسرول، احتمال تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را به‌آرامی پایین می‌آورد. به همین دلیل، به‌عنوان ماده محافظ فراسرد استفاده می‌شود (Turner *et al*., 2001). تیمار گلیسرول برای گیلاس وحشی منجر به کاهش در زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی شد. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، علت این نتیجه به مقدار رطوبت مورد نیاز جنین برای جوانه‌زنی برمی‌گردد.

شیشه‌ای شدن، 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). Wu و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که بذرهای *Bletilla formosana* را می‌توان در طولانی‌مدت با استفاده از تیمار شیشه‌ای شدن نگهداری کرد. زمانی‌که بذرها با محلول بارگیری و PVS2 تیمار شدند، درصد جوانه‌زنی بذرهای گونه مذکور در طول دوره حفاظت فراسرد افزایش یافت. اثر مثبت این پیش‌تیمار بر سپیدار (*Populus alba*) (Lambardi *et al*., 2000) و پسته (*Pistacia vera*) (Jebelli *et al*., 2015) نیز گزارش شده است، در حالی‌که براساس نتایج پژوهش پیش‌رو، PVS2 اثر منفی بر درصد جوانه‌زنی بذرهای گیلاس وحشی داشت که ممکن است ناشی از تأثیر DMSO یا اتیلن‌گلیکول در محلول PVS2 باشد. سمیت DMSO به‌رغم اثر مثبت آن در شیشه‌ای شدن

در تعدادی از پژوهش‌ها گزارش شده است (Kuleshova *et al*., 1999, Volk *et al*., 2006).

مقدار آب قابل انجماد در سلول‌های گیاهی عمده‌ترین مشکل است. در تیمار کاهش رطوبت، محتوای آب بین سلولی کاهش داده شده و از تشکیل کریستال‌های یخی تاحدامکان جلوگیری می‌شود. در همین رابطه، Beardmore و Whittle (۲۰۰۵) نیز به‌کارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذرهای *Acer saccharinum* موفقیت‌آمیز عنوان کردند. اولین گزارش درمورد کاهش رطوبت و حفاظت فراسرد بذرهای ۱۰ گونه از *Passiflora* توسط Veiga-Barbosa و همکاران (۲۰۱۳) ارائه شد. این پژوهشگران گزارش کردند که با تقلیل رطوبت بذرهای *P. morifolia*، *P. giberti*، *P. coriacea*، *P. cincinnata*، *P. alata* و *P. edulis* می‌توان باعث حفاظت از بذرهای این گونه‌ها در شرایط فراسرد شد. با اینکه تأثیر مثبت تیمار کاهش رطوبت بر نگهداری بعضی از بذرها در فراسرد به‌دلیل کاهش محتوای آب بذر گزارش شده است (Cho *et al*., 2002)، اما این کاهش رطوبت باید در حدی باشد که اثر منفی بر جوانه‌زنی بذر نداشته باشد. Shahbazi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که هیچیک از بذرهای *Satureja rechingeri* با به‌کارگیری روش کاهش رطوبت پس از خروج از نیتروژن مایع جوانه نزد. براساس نتایج پژوهش پیش‌رو، گیلاس وحشی نیز در این روش ۴/۷ درصد آب خود را از دست داد که باعث کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها شد. در همین رابطه، Wen و Song (۲۰۰۷) گزارش کردند که جنین بذرهای در حال رشد *Livistona chinensis* در طول رسیدگی بذر، رطوبت خود را کاهش داده و به کمترین مقدار خود در زمان رسیدگی و با محتوای رطوبت حدود ۲۰ درصد می‌رساند، اما با کاهش بیش‌ازحد رطوبت، زنده‌مانی این بذرها کاهش یافت.

در بین بذرهایی که در تمامی تیمارهای دو نوع کاشت جوانه‌زده بودند، تیمارهای فراسرد تأثیری بر طول ساقه نداشتند. فقط طول ریشه و درنتیجه، طول گیاهچه در تیمار شیشه‌ای شدن کاهش یافت، بنابراین تیمارهای فراسرد اثری بر رشد گیاهچه و ریخت‌شناسی آن نگذاشتند. نتایج پژوهش‌های گسترده‌ای که درمورد تأثیر شرایط فراسرد بر ساختار ژنومی گیاه انجام شده است، نشان می‌دهند که شرایط فراسرد، تغییری در ساختار ژنومی نمونه ذخیره‌شده ایجاد نمی‌کند (Reed *et al*., 2004). این موضوع درمورد بیشتر بذرها، نمونه‌های رویشی و یا نمونه کشت بافتی صدق می‌کند (Dixit *et al*., 2003; Zhai *et al*., 2003).

به‌طور کلی، نتایج پژوهش پیش‌رو نشان می‌دهد که بذر گیلاس وحشی، قابلیت نگهداری در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد را دارد. به‌دلیل اینکه بذر آن از نوع ارتدوکس است و محتوای رطوبت آن، بسیار کم است، بنابراین رطوبت موجود در بذر، اثر منفی در ماندگاری آن در محیط فراسرد ندارد. از نظر مدت نگهداری بذر در شرایط فراسرد، امکان نگهداری چند هزار سال وجود دارد. به‌عنوان نمونه، براساس محاسبات دینامیکی انجام‌شده درمورد بذر کاهو که در شرایط دمایی پایین نگهداری می‌شد، نیمه‌عمر جوانه‌زنی این گونه ۳۵۰۰ سال برآورد شد (Walters *et al*., 2002). به‌این‌ترتیب، بذرهای چهار اکسشن گیلاس وحشی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف با تیمار بهینه در تانک ذخیره ازت مایع موجود در گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شد تا با استفاده از این فناوری، امکان احیا و حفاظت این گونه در معرض خطر در بوم‌سازگان‌های طبیعی در شرایط بحرانی فراهم شود.

منابع مورد استفاده

- Beardmore, T. and Whittle, C.A., 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. Tree Physiology, 25(8): 965-972.
- Dixit, S., Mandal, B.B., Ahuja, S. and Srivastava, P.S., 2003. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. National Bureau plant genetic resources.Cryoletters, 24(2): 77-84.
- Gale, S., John A., Harding, K. and Benson, E., 2008 Developing cryopreservation for Picea stichensis (*sitca spruce*) somatic embyos: a compareson of

vitrification protocols. CryoLetters 29(2):135-144.
- Hawksworth, D.L. and Bull, A.T., 2007. Plant Conservation and Biodiversity. Springer, Volume 6, 420 p.
- ISTA (International Seed Testing Association), 1996. International rules for seed testing, 1996. Seed Science and Technology, 21(Supplement): 1B288.
- Jain, M., 2010. Date palm genetic diversity conservation for sustainable production. Acta Horticulturae, 882: 785-791.
- Jebelli, M., Tabari Koochaksoraei, M., Hatami, F. and Mehrparvar, Sh., 2015. Possibility evaluation of *Pistacia vera* L. seed conservation under cryogenic condition. Journal of Conservation and Utilization of Natural Resources, 4(1): 101-116 (In Persian).
- Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. and Shaw, J.M., 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol–based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology, 38 (2): 119 – 130.
- Lambardi, M., Fabbri, A. and Caccavale, A., 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports, 19(3): 213-218.
- Michalak, M., Plitta-Michalak, B.P. and Chmielarz, P., 2015. A new insight in desiccation tolerance and cryopreservation of mazzard cherry (*Prunus avium* L.) seeds. Open Life Sciences, 10(1): 354-364.
- Mozaffarian, V., 2005. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser, Tehran, Iran, 1082p (In Persian).
- Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. and Vysotskaya, O.N., 2006. Cryobank of plant genetic resoureces in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration, 29(3): 403-410.
- Rajasekharan, P.E. and Ganeshan, S., 2019. Current perspectives on pollen cryopreservation in horticultural species. Acta Horticulturae, 1234: 47-56.
- Reed, B.M., Kovalchuk, I., Kushnarenko, S., Merier-Dinkel, A., Schoenweiss, K., Pluta, S. and Benson, E.E., 2004. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. CryoLetters, 25(5): 341-352.
- Sant, R., Taylor, M. and Taygi, A. 2006. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification. CryoLetters, 27(3): 133-142.
- Shahbazi, S. Ghamari-Zare, A., Sefidkon, F., Jafari, A.A. and Abdossi, V., 2014. Investigation on possibility of cryopreservation of *Satureja rechingeri* seeds. International Journal of Biosciences (IJB), 5(1):113-119.
- Stanwood, P.C., 1987. Survival of sesame seeds at the temperature (−196°C) of liquid nitrogen. Crop Science, 27(2): 327-331.
- Turner, S., Seranatna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K. and Tan, B., 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. Plant Science, 160(3): 489-497.
- Veiga-Barbosa, L., Mira, S., González-Benito, M.E., Souza, M.M., Meletti, L.M.M. and Pérez-García, F., 2013. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of Passiflora species. Seed Science and Technology, 41(1): 89-97.
- Volk, G.M., Harris, J.L. and Rotindo, K., 2006. Sruvival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. Cryobiology, 52: 305 – 308.
- Vujović, T., Chatelet, P., Ružić, Đ. and Engelmann, F., 2015. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. Scientia Horticulturae, 195: 173-182.
- Walters, C., Touchell, H.D., Power, P., Wesley-Smith, J. and Antolin, M.F., 2002. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. CryoLetters, 23(5): 291-298.
- Wen, B. and Song, S., 2007. Acquisition and loss of cryotolerance in *Livistona chinensis* embryos during seed development. CryoLetters, 28(4): 291-302.
- Wu, R.Y., Chang, S.Y., Hsieh, T.F. and Chang, Y.S., 2013. Cryopreservation *of Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. Scientia Horticulturae, 157, 108-112.
- Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann, F., Chen, R. and Zhao, Y., 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultures grape and kiwi shoot tips using RAPD. Cryoletters, 24(5): 315- 322.

Preservation of the genome of sweet cherry (*Cerasus avium* (L.) Moench.) in cryopreservation conditions

L. Mirjani [1*], A. Ghamarizare [2], M. Emam [3] and K. Espahbodi [4]

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
3- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
4- Associate Prof., Forests and Rangelands Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran

Received: 18.11.2020 Accepted: 21.12.2020

Abstract

Sweet cherry (*Cerasus avium* (L.) Moench.) is an endangered species in Iran, which necessitates the preservation of its genome. Cryopreservation condition storage is an efficient way for long-term maintenance of the germplasm. To store sweet cherry seeds in cryopreservation conditions in this study, the first treatment was to dehydrate seeds to prevent free water crystallization and rupture of the plasma membrane at cryo temperatures. Therefore, 30% glycerol pretreatments, vitrification solution, and reduction of seed moisture were used before entering liquid nitrogen. The treated seeds were exposed to heat shock after taking out from liquid nitrogen, followed by examination of their seed survival and germination. The nitrogen control treatment showed the highest survival and germination percentage. Some cryopreservation treatments reduced germination percentage, since they reduced seed moisture. Furthermore, the highest germination percentage (40%) was found in seeds that were not treated with any moisture reduction. Therefore, cryopreservation preservatives impair seed germination. As a result, the amount of moisture in the seed is the minimum amount of moisture needed for survival and germination, and reducing the moisture will damage the seed embryo. Thus, by using cryopreservation technology and applying pretreatment without reducing moisture, the seeds were collected from four different regions and stored in the cryopreservation bank of the Research Institute of Forests and Rangelands in Iran, in order to preserve this species for long term.

Keywords: Cryoprotectant, genome storage, resuscitation, sweet cherry.