



Optimization of cryopreservation methods for the preservation of seeds of the species *Parrotia persica*.

Leila Mirjani ^{1*}  and Abbas Ghamarizare ²

1* - Corresponding author, Ph.D., 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: 21/12/2024

Revised: 28/01/2024

Accepted: 19/02/2025

Abstract

Background and Objective

Cryopreservation is an effective method for the long-term preservation of plant genetic resources. Its main advantages include the preservation of genetic diversity, elimination of viruses, minimal storage requirements without the need for continuous subculturing, maintenance of phenotypic and genotypic stability, and facilitation of international germplasm exchange. Cryoprotective chemicals in cryopreservation increase plasma membrane stability, lower the freezing point, and increase cytosol viscosity while protecting cells from damage during cooling. Protecting the biodiversity of the Hyrcanian forests, as a living fossil, is of special importance. This study aimed to evaluate the possibility of preserving the seeds of the Persian ironwood (*Parrotia persica*) under cryopreservation conditions, which is classified as a near-threatened species by the International Union for Conservation of Nature (IUCN).

Materials and Methods

The optimization of each cryopreservation protocol depends on the plant's inherent stress tolerance and its capacity to withstand the pretreatment procedures. For cryopreserving *Parrotia persica* seeds, dehydration was first carried out using various pretreatments to prevent free water crystallization and plasma membrane damage during cryogenic temperature exposure. These involved treatments with 30% glycerol, vitrification solution, and seed moisture reduction through desiccation before being immersed in liquid nitrogen, along with a non-pretreated control, were used to enhance desiccation tolerance and cryogenic processes. Each treatment comprised three replicates of 25 seeds. Pretreated and control seeds were retrieved from liquid nitrogen after 24 hours and immediately thawed at 42°C. To break dormancy, cryopreserved seeds and non-cryopreserved controls were sown in moist sand and stratified at 4°C. Germination started after five months. After assessment of viability and germination percentage, data were analyzed using one-way ANOVA based on a completely randomized design, with mean comparison using Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).



Results

There were significant differences in germination percentage and shoot length among the cryopreservation treatments for the *P. persica* seeds ($P < 0.05$). Result of the mean comparison based on Duncan's method indicated that the vitrification treatment had the highest germination percentage (71%) compared to other treatments, suggesting that this method was much more effective in preserving seed viability and germination ability. The vitrification method enhances the extracellular solution concentration, thereby reducing intracellular water, which stabilizes the cell membrane during dehydration and freezing, preventing damage to cellular structures and improving seed viability and germination. The 30% glycerol treatment exhibited the lowest germination percentage with value (24.6%), indicating greater damage to the seeds with this method. There were no significant differences among the treatments for other seed germination traits for cryopreservation. In the *P. persica* species, the desiccation dehydration treatment using a desiccator reduced seed moisture to 1.79%, resulting in a germination percentage even lower than that of the cryopreserved control with value (3.8%). This treatment caused approximately a 2% reduction in seed moisture, which led to damage to the seed embryo.

Conclusion

The results of this study showed that the highest germination percentage belonged to seeds that treated by vitrification method and in this regard, the seeds of the *P. persica* species collected from various regions of Golestan province were subjected to optimal vitrification treatment and stored in the liquid nitrogen tank at the Biotechnology Research division of Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, Iran. This technology aims to provide a means of conserving this species under critical conditions.

Keywords: Dehydration, Revival, Germplasm Preservation, Cryoprotectant, Vitrification, and Liquid Nitrogen.

بهینه‌سازی روش‌های حفاظت فراسرد بذر گونه انجیلی (*Parrotia persica*)

لیلا میرجانی^{*۱} و عباس قمری‌زارع^۲

^۱* نویسنده مسئول، پژوهشگر، بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، تهران، ایران. پست الکترونیک: mirjani@rifr-ac.ir

^۲ دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

تاریخ اصلاحات نهایی: ۱۴۰۳/۱۱/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۱

چکیده

سابقه و هدف

حفاظت فراسرد (cryopreservation)، مؤثرترین روش حفظ بلندمدت منابع ژنتیکی گیاهیست. مهمترین مزایای آن، حفظ تنوع ژنتیکی، حذف ویروس‌ها، نیاز حداقلی به ذخیره‌سازی بدون نیاز به کشت فرعی مستمر، حفظ پایداری فنوتیپ و ژنوتیپ و تسهیل تبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسما می‌باشد. مواد شیمیایی حفاظت‌کننده در فراسرد باعث افزایش پایداری غشای پلاسمایی، کاهش نقطه فراسرد و افزایش ویسکوزیته سیتوزول می‌شوند و در عین حال از سلول‌ها در برابر آسیب در طول سرد شدن محافظت می‌کنند. حفاظت از تنوع زیستی جنگل‌های هیرکانی به عنوان «فسیل زنده» اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف این مطالعه ارزیابی امکان نگهداری بذر گونه انجیلی (*Parrotia persica*) در شرایط فراسرد است که در اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت جزو گروه NC نزدیک به تهدید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی هر تیمار فراسرد، با توجه به تحمل ذاتی گیاه در برابر تنش و ظرفیت آن در برابر تحمل تیمارها، تعیین‌کننده میزان تأثیر هر روش می‌باشد. برای نگهداری بذرهای انجیلی در فراسرد، ابتدا با اعمال تیمارهای مختلف، به‌منظور جلوگیری از کریستاله شدن آب آزاد و آسیب به غشای پلاسمایی در دمای فراسرد، آب‌گیری بذرها انجام شد. به‌همین منظور، از تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، محلول شیشه‌ای شدن و کاهش رطوبت بذر پیش از ورود به نیتروژن مایع و شاهد بدون پیش تیمار استفاده شد، تا تحمل به کم‌آبی و فرایندهای کرایوژنیک افزایش یابد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۵ بذر بود. بذرهای تیمار شده و شاهد بدون پیش تیمار پس از ۲۴ ساعت از نیتروژن مایع خارج و بلافاصله در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. سپس به‌منظور شکستن خواب، بذرهای خارج شده از نیتروژن مایع به همراه بذرهای شاهدی که در فراسرد قرار نگرفته بودند، در ماسه مرطوب کاشته شده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بذرهای پس از پنج ماه شروع به جوانه‌زدن کردند. سپس پس از اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی، داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش چنددامنه‌ای دانکن بررسی شد.

نتایج

نتایج نشان داد که بین تیمارهای فراسرد بر روی بذرهای انجیلی از نظر درصد جوانه‌زنی و طول ساقچه‌چه، تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۵٪ مشاهده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش دانکن نشان داد که تیمار شیشه‌ای شدن بیشترین درصد جوانه‌زنی (۷۱٪) را نسبت به تیمارهای دیگر داشت، این موضوع نشان می‌دهد که این روش در حفظ زنده‌مانی و توانایی جوانه‌زنی بذرهای بسیار مؤثرتر بوده است. روش شیشه‌ای شدن به دلیل افزایش غلظت محلول خارج سلولی و کاهش آب درون سلولی، باعث ثبات غشاء سلولی در زمان آب‌گیری و سرمازدگی شده و از آسیب به ساختارهای سلولی جلوگیری کرده، در نتیجه زنده‌مانی و توانایی جوانه‌زنی بذرهای را بهبود می‌بخشد. روش گلیسرول ۳۰ درصد کمترین درصد جوانه‌زنی (۲۴/۶ درصد) را داشته است که حکایت از



آسیب بیشتر به بذرها در این روش دارد. از نظر سایر صفات نیز، بین تیمارهای به‌کار رفته برای نگهداری در فراسرد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در گونه انجیلی، تیمار آب‌گیری فیزیکی به کمک دسیکاتور، رطوبت بذر را به ۱/۷۹ درصد رساند که موجب کاهش درصد جوانه‌زنی کمتر از نمونه شاهد (بدون قرارگیری در فراسرد، رطوبت بذر ۳/۸ درصد) شد. در واقع با اعمال این تیمار حدود دو درصد میزان رطوبت بذر کاهش یافت که این موضوع موجب آسیب به جنین بذر گردید.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی متعلق به بذرهایی بود که تحت تیمار شیشه‌ای شدن قرار گرفته بودند و در این راستا بذرهایی گونه انجیلی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گلستان، تحت تیمار بهینه شیشه‌ای شدن قرار گرفتند و در تانک ذخیره نیتروژن مایع موجود در بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ذخیره شدند. به این ترتیب، این فناوری امکان حفاظت این گونه را در شرایط بحرانی فراهم می‌کند.

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

مقدمه

گونه انجیلی (*Parrotia persica*) از خانواده Hamamelidaceae می‌باشد. این گونه از درختانی است که از دوره کواترنری در شمال ایران باقی مانده‌اند ([Ramezani et al., 2008](#)) و بومی جنگل‌های شمال ایران است و در بخش‌هایی از جنگل‌های آذربایجان به‌طور طبیعی انتشار دارد ([Sagheb-Talebi et al., 2013](#)).

درخت انجیلی جست‌های ریشه جوش و تنه جوش تولید می‌کند و در جنگل‌های شمال کشور به صورت دانه‌زاد و شاخه‌زاد دیده می‌شود. درخت انجیلی بسیار مقاوم در برابر آتش است. چوب آن سخت است و در شمال کشور در تهیه ذغال و مصارف روستایی استفاده می‌شود. به علت سختی چوب آن، در زبان‌های خارجی به چوب آهن مشهور است ([Sabety, 2008](#)). تنه منشعب، پوست ریزان و تغییر در رنگ برگ‌ها در فصول مختلف، در اروپا و آمریکا به عنوان گونه زینتی در فضای سبز شهری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد ([Nicholson, 1989](#)).

حفاظت فراسرد (cryopreservation) به ذخیره‌سازی بافت‌ها در نیتروژن مایع (LN، -۱۹۶ درجه سانتی‌گراد) یا بخار، (VN، تقریباً بین -۱۶۵ تا -۱۹۰ درجه سانتی‌گراد) اشاره دارد. در نیتروژن مایع، فرایندهای متابولیک و بیوشیمیایی (از جمله تنفس و فعالیت آنزیمی که منجر به پیری سلول و مرگ سلولی می‌شود) و تقسیم سلولی به‌طور مؤثر

متوقف می‌شوند، در نتیجه ذخیره‌سازی طولانی‌مدت را ممکن می‌سازد ([Li et al., 2019](#)). از جمله مهمترین مزایای حفاظت فراسرد، حفظ تنوع ژنتیکی، نگهداری گونه‌های وحشی و در معرض انقراض، حذف ویروس‌ها از گیاهان آلوده به روش سرمادرمانی جوانه رأسی، حداقل نیازهای ذخیره‌سازی، حفظ پایداری فنوتیپ و ژنوتیپ، عدم نیاز به کشت فرعی مستمر و متوالی و تسهیل تبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسما است ([Gonzalez-Arnao et al., 2014](#)). با وجود این، نگهداری در شرایط فراسرد با مشکلاتی ناشی از قرار دادن مواد بیولوژیکی در معرض دماهای پایین و فوق کم، ناپایداری و از دست دادن نیمه‌نفوذپذیری غشاهای، شکستن بافت‌ها و سلول‌ها، پلاسمولیز غیرقابل برگشت و در نهایت مرگ سلولی همراه است ([Zamecnik et al., 2021](#)). به همین منظور، هدف اصلی حفاظت در برابر سرما، اجتناب از صدمات شیمیایی و فیزیکی در زمان حفاظت فراسرد است. تشکیل یخ خارج سلولی می‌تواند برای یکپارچگی ساختارهای سلولی مضر باشد، اما یخ درون سلولی کشنده است. بنابراین، در تمام روش‌های حفاظت فراسرد، حذف آب، نقش کلیدی در جلوگیری از آسیب یخ‌زدگی و ایمن‌سازی زنده‌مانی پس از ذوب نمونه‌های مشتق شده از نیتروژن مایع (LN) دارد که آن را می‌توان با استفاده از اصطلاح محافظت‌کننده‌های فراسرد به‌دست آورد. محافظت‌کننده‌های فراسرد ترکیبات شیمیایی هستند که توزیع آب را در داخل یا خارج سلول‌ها تعدیل و آنها را کم آب

قرار داده شدند. سپس کرایوویال‌ها وارد نیتروژن مایع شدند. تیمار ۲- شیشه‌ای شدن (Vitrification): از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و محلول بارگیری (Loading) به عنوان تیمار استفاده شد. محلول PVS2 حاوی ۱۵٪ (W/V) اتیلن‌گلیکول، ۱۵٪ (W/V) دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) و ۳۰٪ (W/V) گلیسرول در محیط کشت مایع MS، حاوی ساکارز ۰/۴ مولار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد (pH=۵/۸) است. همچنین، محلول بارگیری شامل گلیسرول دو مولار و ساکارز ۰/۴ مولار در محیط کشت مایع MS (Murashige and Skoog, 1962) است. در این تیمار، ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بارگیری قرار گرفتند. در مرحله بعد، این محلول تخلیه شد و محلول PVS2 (در دمای ۲۵°C) 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 گردید. خشک‌کردن نمونه‌ها با استفاده از آون در دمای ۱۰۳°C به مدت ۱۷ ساعت انجام شد (ISTA, 2007). به این ترتیب از طریق رابطه (۱)، کل رطوبت بذر تازه ۵/۲۵٪ به دست آمد. سپس، به منظور اعمال تیمار کاهش رطوبت، ابتدا وزن ۷۵ عدد بذر انجیلی اندازه‌گیری شد، آنگاه بر روی کاغذ صافی در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک منتقل گردید. دسیکاتور چهار ساعت به پمپ خلأ متصل شد تا آبگیری انجام شود. سپس به مدت ۷ روز در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. در مرحله بعد، میزان کاهش رطوبت آنها اندازه‌گیری شد (رابطه ۱). رطوبت بذرها پس از خروج از دسیکاتور به ۱/۷۹٪ کاهش یافته بود. برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذرها، آب‌گیری شده، درب ظرف‌ها محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایوویال قرار داده شده و به‌طور مستقیم وارد نیتروژن مایع شدند.

می‌کنند. این مواد باعث افزایش پایداری غشای پلاسمایی، در پایین‌تر از نقطه یخ‌زدگی آنها و افزایش ویسکوزیته سیتوزول می‌شوند و در عین حال از سلول‌ها در برابر صدمات یخ‌زدگی محافظت می‌کنند (Kaviani and Kulus, 2022). به‌طورکلی، باید پنج عامل حیاتی در هنگام ایجاد یک شیوه‌نامه فراسرد در نظر گرفته شود.

پیش تیمار، دستکاری شرایط کشت در شرایط آزمایشگاهی برای افزایش تحمل ریزنمونه به دماهای پایین تیمار با ترکیبات تنظیم‌کننده اسمز برای فعال کردن سلول‌ها در جهت مقاومت در برابر فراسرد

ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع

گرم کردن دوباره مواد ذخیره شده

بازیابی، که زنده بودن مواد بیولوژیکی را ارزیابی می‌کند. یک مجموعه فراسرد شده ممکن است برای ایجاد یک پشتیبان ایمن استفاده شود. مزیت دیگر چنین پشتیبانی، در مقایسه با بانک بذر سنتی، این است که می‌تواند صدها یا حتی هزاران سال خدمت کند و پس از چند سال ذخیره‌سازی نیازی به بازسازی ندارد (Jiroutova and Sedlak, 2020).

با توجه به اینکه گونه انجیلی (*Parrotia persica*) در IUCN جزو گروه NC (Near Threatened) نزدیک به تهدید می‌باشد (Oldfield and Rivers, 2024). هدف از اجرای این تحقیق نیز حفظ ذخیره ژنتیکی این گونه با ارزش در شرایط فراسرد است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذر

بذرهای رسیده انجیلی از استان گلستان و گرگان در فصل تابستان جمع‌آوری شدند. پیش از قرارگیری بذرها در دمای ۱۹۶°C به‌منظور نگهداری در فراسرد، آب‌گیری بذرها به روش‌های زیر انجام شد.

تیمار ۱- گلیسرول ۳۰٪: بذرها به کرایوویال‌های حاوی گلیسرول ۳۰٪ منتقل و به مدت یک ساعت در دمای ۴°C

$$MC\% = (FW - DW) / FW \times 100$$

رابطه (۱)

رویشی بذر و استقرار آن با استفاده از معادلات زیر محاسبه گردید.

درصد جوانه‌زنی براساس معادله ۲ محاسبه شد (Ranai and Santanan, 2006).

$$GP = \left(\frac{N_i}{N} \right) \times 100$$

رابطه (۲):

که در آن GP: درصد جوانه‌زنی، N_i : تعداد کل بذرها، جوانه‌زده در روز آخر شمارش و N: تعداد کل بذرهاست. متوسط زمان جوانه‌زنی براساس معادله ۳ محاسبه شد (Ellis and Roberts, 1981) (MGT).

$$MGT = \frac{\sum d_i n_i}{n}$$

رابطه (۳):

در رابطه ذکر شده MGT: متوسط زمان جوانه‌زنی، n: تعداد بذرها، جوانه‌زده در هر روز و d: تعداد روزهای شمارش از آغاز تا پایان جوانه‌زنی می‌باشد.

سرعت جوانه‌زنی براساس معادله ۴ محاسبه شد.

$$GR = \frac{1}{MGT}$$

رابطه (۴):

در این معادله GR: سرعت جوانه‌زنی، MGT: متوسط زمان جوانه‌زنی است.

رابطه (۵): شاخص بنیه براساس معادله ۵ محاسبه شد (Ellis and Roberts, 1981).

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

رابطه (۵):

در این معادله VI: شاخص بنیه، GP: درصد جوانه‌زنی و SL: طول گیاهچه است.

برای ارزیابی میزان رشد اولیه گیاهچه‌ها، طول گیاهچه و ریشه‌چه در هریک از تیمارها با استفاده از خط‌کش مدرج اندازه‌گیری شد. یادآوری می‌شود که درصد جوانه‌زنی بذرها شاهد که در نیتروژن مایع قرار نگرفته بودند برابر ۹۰ درصد بود.

در رابطه ذکر شده MC%: درصد کل رطوبت بذر: FW: وزن تر و DW: وزن خشک است.

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

تیمار بذرها، خارج شده از فراسرد

برای تعیین بهترین تیمار از نظر 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 بلافاصله از تانک نیتروژن خارج شده و در حمام آب گرم با دمای 42°C به‌مدت ۱۲۰ ثانیه ذوب شدند. سپس بذرها، با ساکارز ۱/۲ مولار به‌مدت پنج دقیقه و در مرحله بعدی ساکارز ۰/۷۵ مولار به‌مدت پنج دقیقه و به‌همین ترتیب با محلول رقیق‌تر ساکارز شستشو انجام شد تا از تورژسانس بذرها جلوگیری شود.

تعیین جوانه‌زنی بذرها، انجیلی خارج شده از فراسرد و شاهد به‌منظور شکستن خواب بذر، بذرها، انجیلی خارج شده از فراسرد و بذرها، شاهد بدون قرار گرفتن در فراسرد، 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 شده و در دمای 4°C قرار گرفتند. بذرها پس از ۵ ماه شروع به جوانه‌زنی کردند. در طی این مدت رطوبت ماسه کنترل گردید. خروج ریشه‌چه به‌مدت دو میلی‌متر به‌عنوان معیار بذر جوانه‌زده در نظر گرفته شد (ISTA, 2007). تعداد بذرها، جوانه‌زده در هر واحد آزمایشی به‌صورت روزانه شمارش گردید. شمارش بذرها، جوانه‌زده برای هر ظرف تا زمانی که تغییری در جوانه‌زنی مشاهده شود، ادامه یافت. مدت زمان آزمایش پس از شروع جوانه‌زنی بذرها ۵۰ روز بود. در پایان آزمایش، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی و بنیه بذر (قدرت

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج

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، به روش Normal scores در نرم‌افزار Minitab 14 نرمال شدند. سپس، تجزیه واریانس یک طرفه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش چنددامنه‌ای دانکن بوسیله نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بین تیمارهای فراسرد بر روی بذرهای انجیلی بجز درصد جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه برای هیچیک از صفات معنی‌دار نبود ($P < 0.05$). از لحاظ شاخص بنیه بذر که نشان‌دهنده سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی بذرهای است، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، در نتیجه روش‌های مختلف حفاظت فراسرد تأثیر یکسانی بر صفات سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و نسبت ریشه به ساقه داشته‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- خلاصه تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تیمارهای مختلف فراسرد بر خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای انجیلی

Table 1. Summary of ANOVA (MS) of different Cryo-pretreatments on germination traits in the seeds of *Parrotia persica*

Trait	Source of variation	
	Treatment (DF=3)	Error (DF=8)
Germination percentage	39.65 **	2.30
Average germination time	1.76 ns	6.08
Vigor Index	0.13 ns	1.68
Root length	2.02 ns	3.59
Stem length	5.33 **	1.81
Seedling length	0.99 ns	1.12
Root to stem length ratio	0.20 ns	0.34

ns، * و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

ns, * and **= Significance at 1% and 5% probability levels and non-significant, respectively

مقایسه میانگین داده‌ها براساس روش دانکن نشان داد که تیمار شیشه‌ای شدن بیشترین درصد جوانه‌زنی (۷۱٪) را نسبت به تیمارهای دیگر نشان داد، این موضوع نشان می‌دهد که این روش در حفظ زنده‌مانی و توانایی جوانه‌زنی بذرهای بسیار مؤثرتر بوده است. در مقابل، روش گلیسرول ۳۰ درصد کمترین درصد جوانه‌زنی (۲۴٪/۶) را داشته است که حکایت از آسیب بیشتر به بذرهای در این روش دارد (جدول ۲). از نظر مورفولوژی نیز، بین تیمارهای به‌کار برده شده برای نگهداری در فراسرد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). به‌طورکلی نتایج نشان داد که

گیاهچه‌های حاصل از روش شیشه‌ای شدن طول بیشتری داشتند که نشان‌دهنده رشد بهتر و سریع‌تر گیاهچه‌ها در این تیمار است. از سویی نسبت طول ریشه به ساقه در روش شیشه‌ای شدن به‌طور قابل توجهی کمتر از سایر روش‌ها بود که می‌تواند نشان‌دهنده تخصیص انرژی بیشتر به رشد ساقه در گیاهچه‌های حاصل از این روش باشد. شکل ۱ نیز بیانگر اثر متفاوت تیمارها بر روی نگهداری بذر در شرایط فراسرد است، در نتیجه تیمار شیشه‌ای شدن نسبت به دو تیمار آبگیری و گلیسرول برای نگهداری بذرهای انجیلی در فراسرد برتری دارد.

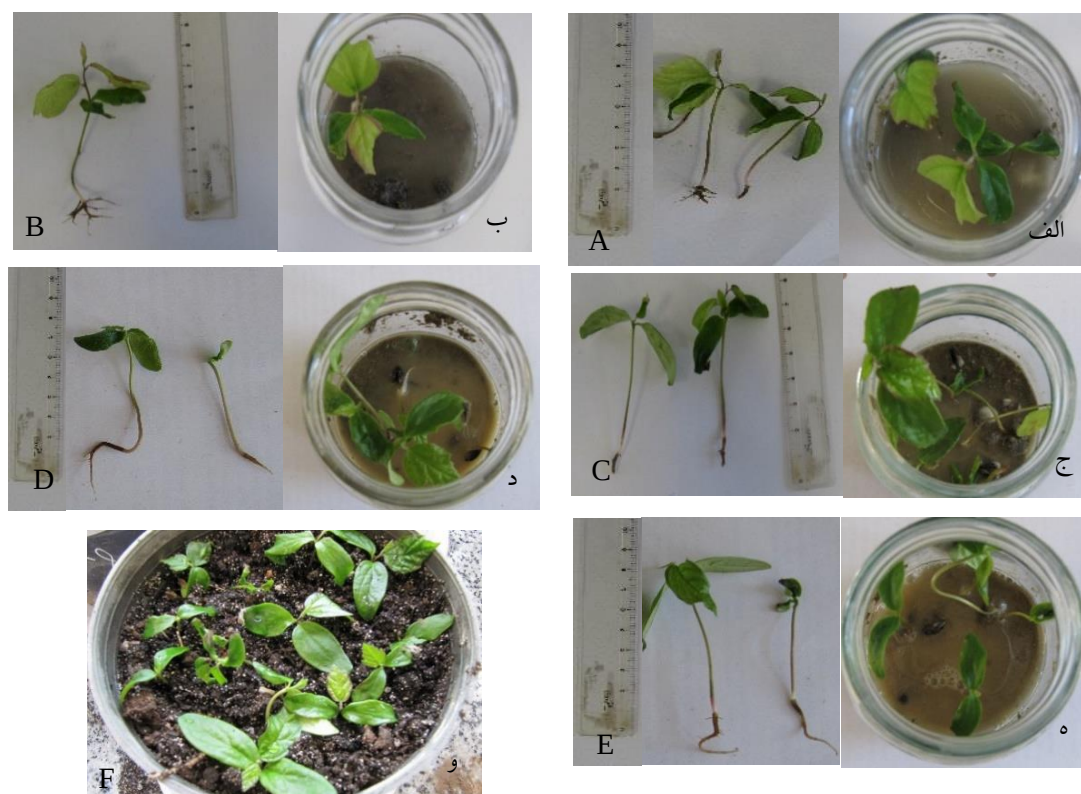
جدول ۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف فراسرد بر خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای انجیلی پس از خروج از فراسرد

Table 2. Mean comparison of different Cryo-treatments on seed germination traits of *Parrotia persica* cryopreserved seeds

Trait	Germination percentage	Vigor Index	Root length (cm)	Stem length (cm)	Seedling Length (cm)	Root to stem length ratio
Desiccation	35.0 ^b	0.44 ^a	2.00 ^a	4.5 ^b	6.5 ^a	0.47 ^a
Glycerol 30%	24.6 ^c	0.65 ^a	1.50 ^a	4.7 ^b	6.3 ^a	0.33 ^a
Vitrification	71.0 ^a	0.37 ^a	1.00 ^a	6.0 ^a	7.0 ^a	0.17 ^a
Control in LN	31.0 ^{bc}	0.49 ^a	2.00 ^a	4.3 ^b	6.3 ^a	0.49 ^a

میانگین‌های هر ردیف با حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ۵ درصد است.

Means of rows with the same letter are not significantly different according to Duncan 5% method.



الف- شیشه‌ای شدن، ب- آب‌گیری فیزیکی، ج- گلیسرول ۳۰٪، د- *Parrotia persica* شکل ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف فراسرد بر جوانه‌زنی و مورفولوژی بذرهای انجیلی بذرهای شاهد نگهداری شده در فراسرد، ه- بذرهای شاهد، و- گیاهچه‌های حاصل از تیمار شیشه‌ای شدن

Figure 1- Comparison of the effects of different cryo-treatments on germination and morphology of *Parrotia persica* seeds. A- vitrification, B- desiccation, C- 30% glycerol, D- control cryopreserved seed, E- control seed, F- Seedlings resulting from vitrification treatment

بحث

بهینه‌سازی هر تیمار فراسرد، با توجه به تحمل ذاتی گیاه در برابر تنش به همراه ظرفیت آن در برابر تحمل تیمارها، تعیین‌کننده در میزان تأثیر هر روش می‌باشد (Benson, 2008).

در این پژوهش، نتایج آزمون قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی بذرهای انجیلی فراسرد شده، نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی متعلق به بذرهایی است که تحت تیمار شیشه‌ای شدن قرار گرفته بودند (۷۱ درصد). روش فراسرد شیشه‌ای شدن در حال حاضر پرکاربردترین شیوه‌نامه فراسرد گیاهی است، اغلب از آن به عنوان «حفاظت فراسرد کامل» یاد می‌شود، زیرا حفاظت در محلول‌های داخل و خارج سلولی انجام می‌شود (Panis, 2019). این تکنیک شامل دو مرحله می‌باشد، مرحله اول استفاده از ترکیب رقیق‌شده‌ای از محافظ‌های سرمایی با نمونه‌ها، برای افزایش مقاومت ریزنمونه در برابر

مواد شیمیایی حفاظت‌کننده در فراسرد باعث افزایش پایداری غشای پلاسمایی، کاهش نقطه فراسرد و افزایش ویسکوزیته سیتوزول می‌شوند و در عین حال از سلول‌ها در برابر آسیب در طول سرد شدن محافظت می‌کنند. دو نوع اصلی از این مواد وجود دارد: مواد نفوذی به سلول مانند DMSO، گلیسرول و پروپیلن گلیکول و مواد غیرقابل نفوذ با فعالیت اسمزی مانند ساکارز، دکستران و پرولین که به‌طور کلی به صورت ترکیبی به‌کار می‌روند (Ciani et al., 2012). در برخی از انواع ژرم‌پلاسم‌های گیاهان گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، مخلوطی از مواد نافذ و غیرنافذ سلولی را می‌توان استفاده کرد (Panis and Lambardi, 2005; Barh et al., 2015; Panis et al., 2005). اگرچه اثر محافظ‌های فراسرد، از جمله نفوذپذیری و سمیت آنها، مختص گونه است.

با اعمال این تیمار حدود دو درصد میزان رطوبت بذر کاهش پیدا کرد که این موضوع موجب آسیب به جنین بذر گردید. در حالی که تیمار آب‌گیری فیزیکی به کمک دسیکاتور اثر مثبت بر روی نگهداری بذر گونه‌های زیادی مانند گونه شیردار (*Acer cappadocicum*) (Mirjani and Ghamarizare, 2024)، گونه زبان‌گنجشک یا ون (*Fraxinus excelsior*) (Mirjani et al., 2022) و گیلان وحشی (*Prunus avium*) (Mirjani et al., 2021) داشته است.

از ماده گلیسرول با غلظت‌های مختلف به‌عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده می‌شود. گلیسرول، احتمال تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را به‌آرامی کم می‌کند. به‌همین علت، گلیسرول به‌عنوان ماده محافظ فراسرد استفاده می‌شود (Turner et al., 2001). تیمار گلیسرول ۳۰ درصد، کمترین درصد جوانه‌زنی (۶٪/۲۴) در گونه انجیلی داشت که حکایت از آسیب بیشتر به بذر در این روش دارد. زیرا اثر سمیت مواد محافظ فراسرد بستگی زیادی به نوع گونه دارد.

به‌طورکلی، نتایج نشان داد که بذرهای انجیلی، قابلیت نگهداری در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد را دارند. براساس نتایج این تحقیق، بذرهای چهار اکسشن گونه انجیلی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان گلستان، تحت تیمار شیشه‌ای شدن 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 احیاء و حفاظت این گونه در معرض خطر در بوم‌سازگان‌های منابع طبیعی در شرایط بحرانی فراهم شد.

مواد شیمیایی سمی و غلیظ‌تر مرحله دوم می‌باشد و مرحله دوم آب‌گیری با استفاده از محافظ‌های سرمایی غلیظ انجام می‌شود. نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعات قبلی در زمینه حفاظت فراسرد بذرها هم‌خوانی دارد. روش شیشه‌ای شدن به دلیل افزایش غلظت محلول خارج سلولی و کاهش آب درون سلولی، باعث ثبات غشاء سلولی در هنگام آب‌گیری و سرمزدگی شده، از آسیب به ساختارهای سلولی جلوگیری کرده و زنده‌مانی و توانایی جوانه‌زنی بذر را بهبود می‌بخشد. اثر مثبت این تیمار بر حفظ ذخایر ژنتیکی بذر سپیدار (*Populus alba* L.) (Lambardi et al., 2000)، بذرهای شب‌خسب (*Albizia julibrissin* و بذر لیلکی (*Gleditsia caspica*) (Mirjani et al., 2021) در فراسرد نیز گزارش شده است. با این حال، تیمار شیشه‌ای شدن اثر منفی بر درصد جوانه‌زنی بذرهای گیلان وحشی داشت و سبب کاهش ۵۰ درصدی جوانه‌زنی نسبت به بذرهای شاهد نیتروژنی شد (Mirjani et al., 2021).

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 and Song, 2007). در تیمار کاهش رطوبت یا آب‌گیری، محتوای آب بین سلولی کاهش داده می‌شود و از تشکیل کریستال‌های یخی تا حد امکان جلوگیری می‌شود. در گونه انجیلی تیمار آب‌گیری فیزیکی به کمک دسیکاتور رطوبت بذر را به ۱/۷۹ درصد رسانده که موجب کاهش درصد جوانه‌زنی حتی کمتر از نمونه شاهد (۳/۸ درصد) شد. در واقع

References

- Barh, D., Sarwar Khan, M., Davies, E. 2015. Plant Omics: The Omics of Plant Science; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Benson, E. E. 2008. Cryopreservation of

- phytoidiversity: A critical appraisal of theory & practice. Crit. Rev. Plant Sci. 27, 141–219.
- Ciani, F., Cocchia, N., Esposito, L., Avallone, L. 2012. Fertility cryopreservation. In book: Advances in Embryo Transfer; Ed. Wu, B., pages. In Tech: Rijeka,

- Croatia. 223-235. DOI:10.13140/2.1.3538.0161.
- Ellis, R.A. and Roberts, E.H., 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science Technology*, 9: 373-409.
 - Gonzalez-Arno, 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. Maria Teresa. In *Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity*; Eds. Ahuja, M. R., Ramawat, K.G. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; pp. 129-170.
 - ISTA [International Seed Testing Association]. 2007. International Rules for Seed Testing. *Seed Science Technology*, 13: 299-520.
 - Jiroutova, P.; Sedlak, J. 2020. Cryobiotechnology of plants: A hot topic not only for gene banks. *Appl. Sci.*, 10, 4677.
 - Kaviani, B. and Kulus, D., 2022. Cryopreservation of Endangered Ornamental Plants and Fruit Crops from Tropical and Subtropical Regions. *Biology*, 11, 847. doi.org/10.3390/biology11060847.
 - Lambardi, M., Fabbari, A. and Caccavale, A., 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification 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., da Teixeira Silva, J.A., Volk, J. M. and Wang, Q. C. 2019. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp. *Plant Methods*, 15: (125) 2-12.
 - Mirjani, L., Ghamarizare, A. 2024. Preservation of the genome of *Acer cappadocicum* Gled. in cryopreservation. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*. 32(3): 203-213. doi: 10.22092/ijfpr.2024.364442.2138. (In Persian).
 - Mirjani, L., Ghamarizare, A., and Espahbodi, K., 2021. Preservation of the genome of *Cerasus avium* (L.) Moench, in cryopreservation conditions. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*. 28 (4). 370-381 (In Persian).
 - Mirjani, L., Ghamarizare, A., and Espahbodi, K., 2022. Preservation of the genetic resources of *Fraxinus excelsior* L. in cryopreservation. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*. 30(1), 108-117. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2022.357696.1409. (In Persian).
 - Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-597.
 - Nicholson, R.G., 1989. *Parrotia persica*: an ancient tree for modern landscapes. *Arnoldia*, 49, 34-39
 - Oldfield, S. & Rivers, M.C. 2024. *Parrotia persica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2024: e. T199803456A19980360
 - Panis, B., 2019. Sixty years of plant cryopreservation: From freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. *Acta Hort.* 1234, 1-7.
 - Panis, B.; Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In *The Role of Biotechnology*; Villa Gualino: Turin, Italy, pp. 43-54.
 - Panis, B.; Piette, B.; Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.*, 168, 45-55.
 - Ramezani, R., Marvie Mohadjer. M., Knapp, H., Ahmadi, H., and Joosten, H. 2008. The late Holocene vegetation history of the Central Caspian (Hyrcanian) forests of northern Iran. *The Holocene* 18(2): 307-321.
 - Ranai, M.A. and De Santana, D.G. 2006. How and why it measure the germination process. *Revista Brasileira de Botanica*, 29: 1-11.
 - Sabety, H., 2008. Forests, trees, and shrubs of Iran. Yazd University publication, Yazd, Iran. (In Persian).
 - Sagheb-Talebi, Kh., Sajedi, T., Pourhashemi, M. 2013. *Forest of Iran, A Treasure from the Past, a Hope for the Future*, Springer Verlage. 145 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 is an important factor in effective cryopreservation. *Plant Science*. 160: 489-497.
 - Wen, B. and Song, S., 2007. Acquisition and loss of cry tolerance in *Livistona chinensis* embryos during seed development. *Cryo Letters*, 28(4): 291-302.
 - Zamecnik, J., Faltus, M. and Bilavcik, A., 2021. Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10 (12), 2623.