DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6694

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۳۰-۲۱۸ (۱۳۹۰)

ارزیابی اثر شرایط فراسرد بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد برخی بذرهای ارتودکس

الیاس آریاکیا*[۱]، حسین رمضانی[۲]، حسین غفوری[۳]، علیرضا دولتیاری[٤]، محمدرضا نقوی[٥] و سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی[٦]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، علوم باغبانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
پست الکترونیک: elyasaryakia@yahoo.com
۲- کارشناس، علوم باغبانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
۳- کارشناس ارشد، بیوشیمی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
٤- کارشناس ارشد، اکوسیستماتیک گیاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
٥- استاد، زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
٦- استادیار، ژنتیک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲٤

چکیده

با توجه به روند از بین رفتن ژرم‌پلاسم گیاهی کشورمان که ازجمله غنی‌ترین کشورهای جهان از لحاظ ذخایر توارثی گیاهی بشمار می‌رود، لازم است تا در جهت حفاظت و نگهداری تنوع ژنتیکی موجود، اقدامات بنیادین انجام شود. با استفاده از تکنیک نگهداری بذر در دمای فراسرد که یکی از روش‌های نگهداری ژرم‌پلاسم در شرایط خارج از رویشگاه است، می‌توان بذر را به طور طولانی‌مدت، با هزینه بسیار کمتر و بدون از دست دادن قوه نامیه ذخیره‌سازی کرد. در این تحقیق شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد (درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، قدرت بذر، طول گیاهچه، وزن تر گیاهچه) بذرهای ارتودکس هفت گونهٔ درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica*)، هوفاریقون (*Hypericum perforatum*)، مرزنجوش (*Origanum vulgare*)، شنبلیله (*Trigonella monantha*)، سرخاب (*Phytolacca americana*)، گل راعی (*Hypericum androsaemum*)، و تاتوره (*Datura innoxia*) در دو شرایط نگهداری سردخانه (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و شرایط فراسرد (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ ماه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مقایسه دو شرایط بر اساس آزمون t استیودنت نشان داد که بین تیمار دمای فراسرد و سردخانه در درون گونه‌های گیاهی، از لحاظ تمامی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر، بجز درصد و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد که نشانگر کارآمدی این تکنیک به‌عنوان یک روش جایگزین مناسب در حفظ طولانی‌مدت سلامت بذرهای ارتودکس در مراکز نگهداری ذخایر توارثی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فراسرد، بذر ارتودکس، شاخص جوانه‌زنی، ژرم‌پلاسم.

مقدمه

در چند دهه اخیر افزایش فشارهای انسان بر طبیعت، ازجمله چرای بی‌رویه دام‌ها، تخریب پوشش مراتع و جنگل‌ها، مدیریت نادرست کشاورزی و توسعه صنعتی، اثرهای شدیدی بر رشد و نمو، بقاء و پراکنش گونه‌های گیاهی بومی ایران داشته است (Ghahreman & Attar, 1999). کشور ما از لحاظ ذخایر توارثی گیاهی ازجمله غنی‌ترین کشورهای جهان بشمار می‌رود، به طوری که تنوع گیاهی آن با مجموع کشورهای اروپایی برابری می‌کند (Ghahreman & Attar, 1999). با این حال، زوال گونه و به عبارتی فرسایش ژنی گیاهان نیز در آن وجود دارد. در این راستا، حفاظت، دسترسی و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی یکی از فعالیت‌ها و وظایف بانک ژن است که منجر به بهبود و پیشرفت در استفاده از ژرم‌پلاسم‌های جمع‌آوری شده می‌گردد.

در این میان بذر یکی از مهمترین منابع حفظ ذخایر توارثی گیاهی بوده که در تکثیر، انتشار و استقرار گیاه در مناطق مختلف، حفظ و بقای نسل گیاه در شرایط سخت و طولانی‌مدت نقش بسزایی دارد. به علاوه اینکه بذر در صنایع مختلف غذایی و دارویی مورد توجه می‌باشد (Black & Bewley, 2000). 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 پُرهزینه باشد. به‌عنوان مثال، هزینه حفاظت از یک هکتار جنگل‌های گرمسیری سوماترا و مالزی به‌ترتیب ۱ تا ۲۷ دلار به‌ازای هر سال برآورد شده است. در ضمن گفته شده است که هزینه حفاظت گیاهان در خارج از رویشگاه کمتر از ۱ درصد هزینه لازم برای حفاظت گیاهان در رویشگاه می‌باشد (Li & Pritchard, 2009).

ایجاد بانک‌های ژن در سرتاسر جهان ازجمله برنامه‌های حفاظتی ژرم‌پلاسم در خارج از رویشگاه است. در این بانک‌های ژن، معمولاً بذر گیاهان در شرایط مناسب (۱ تا ۵ درجه سانتی‌گراد) برای حفاظت میان‌مدت و یا در دمای زیر صفر (معمولاً ۱۸- درجه سانتی‌گراد) برای حفاظت بلندمدت نگهداری می‌شوند. نگهداری ژرم‌پلاسم به روش انجماد در ازت مایع، برای حفظ طولانی‌مدت ذخایر توارثی می‌باشد. در این روش ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) نیتروژن مایع به مدت‌طولانی ذخیره می‌گردد. از مزایای این تکنیک می‌توان به حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های حفاظت در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلن تکثیر می‌شوند و نیز به‌عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم، اشاره کرد (Reed, 2008).

با استفاده از تکنیک نگهداری در ازت مایع می‌توان یک روش نگهداری بذر را فراهم ساخت که در آن بذر را به طور طولانی‌مدت و بدون از دست‌دادن قوه نامیه ذخیره‌سازی کرد. این تکنیک می‌تواند به طور بالقوه برای نگهداری طولانی‌مدت بذرهای ارتودکس مورد استفاده قرار گیرد (Touchell, Bonner, 1990; Gonzalez-Benito *et al*.,1998 ,1993). از ویژگی‌های بذرهای ارتودکس این است که می‌توانند به کمترین مقدار آبگیری شده و قوه نامیه خود را برای مدت طولانی در دمای پایین حفظ کنند (Buitink & Leprince, 2008). به‌عنوان مثال، کاهش محتوای رطوبت و نگهداری در دمای فراسرد، نیمه عمر انباری بذر ارتودکس کاهو را در فاز بخار و مایع ازت به‌ترتیب ۵۰۰

و ۳٤۰۰ سال افزایش داد (Walters *et al.*, 2004) که نسبت به روش‌های مرسوم نگهداری بذر در دمای سردخانه بسیار بیشتر است.

تحقیقات زیادی بر روی نگهداری بذر ارتودکس در دمای فراسرد انجام شده است. به‌عنوان مثال، حساسیت بذر ارتودکس گیاه *Betula pendula* به آبگیری بسیار زیاد و دمای بسیار پایین ازت مایع (دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) به منظور بررسی حفاظت طولانی‌مدت بذر ارتودکس در دمای فراسرد (Chmielarz, 2010)، توانایی مقاومت به نگهداری در دمای فراسرد در گونه‌های مختلف بذر ارتودکس گیاهان مناطق گرمسیری برزیل (Salomao, 2002)، مقاومت بذرهای گونه‌های مختلف گیاهان بومی غرب استرالیا به نگهداری در دمای فراسرد (Touchell, 1993) و یا عوامل موثر در نگهداری بذر اورتودکس در دمای فراسرد (Pritchard *et al.*, 2007) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

در این تحقیق سعی بر این است که شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر ارتودکس گونه‌های مختلف گیاهی را در پاسخ به دمای فراسرد، جهت بررسی کارآمدی تکنیک نگهداری به روش انجماد در ازت مایع به‌عنوان یک نسخه پشتیبان و نیز یک روش جایگزین و مقرون به صرفه ذخیره‌کردن بلندمدت بذرهای ارتودکس در مراکز نگهداری ذخایر ژرم‌پلاسمی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

بذر ۷ گونه گیاهان دارویی مختلف شامل درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica*)، هوفاریقون (*Hypericum perforatum*)، مرزنجوش (*Origanum vulgare*)، شنبلیله (*Trigonella monantha*)، سرخاب (*Phytolacca americana*)، گل راعی (*Hypericum androsaemum*) و تاتوره (*Datura innoxia*)، از طبیعت جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفت.

نگهداری در دمای فراسرد

بذر گیاهان مورد نظر آبگیری شدند و به سردخانه (٤ درجه سانتی‌گراد) منتقل گردیدند. برای این منظور از دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر استفاده شد. ابتدا محتوای رطوبتی بذرها بر اساس اختلاف وزن تر (وزن نمونه‌ها پس از برداشت) و وزن خشک نمونه‌ها (خشک کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد و برای مدت ۱۷ ساعت) (ISTA 1996) محاسبه شد و بعد به منظور کاهش محتوای رطوبتی به حداقل ممکن، بذرها در اتاق خشک‌کن به مدت ۲ هفته در معرض هوای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۱۵ درصد (FAO/IPGRI, 1994) قرار گرفتند (جدول ۱). به منظور خشک نگهداشتن بذرها قبل از اعمال تیمار، سیلیکاژل را درون یک ظرف ریخته، دو لایه کاغذ صافی واتمن بر روی آن قرار گرفت و بعد بذرها بر روی کاغذصافی قرار داده شدند و به مدت ۸ ساعت در دستگاه آون و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذرهای آبگیری شده، درب ظروف محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایو ویال قرار داده شدند و مستقیماً داخل ازت مایع (دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) فرو برده شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های بذر گونه‌های مختلف مورد مطالعه

نوع گیاه	کد شناسایی	محل جمع‌آوری	درصد محتوای رطوبتی (پس از آبگیری کردن)	درصد محتوای رطوبتی (قبل از آبگیری کردن)	وزن بذر (میلی‌گرم)	طول بذر (میلی متر)	زمان جمع‌آوری
Artemisia khorassanica	IBRC P1000298	شاهرود به آزادشهر، ۸۰ کیلومتر مانده به آزاد شهر	٦/٥٤	٨/٧٤	٠/٤٣	١/٧٩	١٣٨٨/١٠/٠٤
Hypericum perforatum	IBRC P1000423	مازندران- رامسر، کتالم به جنت رودبار	٤/٩٣	٨/١٠	٠/١٠	١/١٩	١٣٨٨/١٠/٠١
Origanum vulgare	IBRC P1000415	مازندران- رامسر، ٥ کیلومتر به جنت رودبار	٥/٧٥	٧/٨٨	٠/٠٨	٠/٨٩	١٣٨٨/٠٩/٣٠
Trigonella monantha	IBRC P1000901	همدان- ١٥ کیلومتر بعد ار آبگرم به سمت آوج	٦/٨٢	٩/٤٦	١/١٣	١/٩٩	١٣٨٨/٠٣/١٤
Phytolacca americana	IBRC P1000489	مازندران- آمل به بابلسر، ٢٥ کیلومتر مانده به بابل	٦/٩٠	١٢/٦٣	٤/٣٥	٢/٨١	١٣٨٨/١٠/٠٣
Hypericum androsaemum	IBRC P1000425	مازندران- رامسر، کتالم به جنت رودبار	٦/٠٢	٧/٢٥	٠/٠٦	١/٠٧	١٣٨٨/١٠/٠١
Datura innoxia	IBRC P1000521	مازندران- ساری به فرح آباد	٦/٩٥	١٠/٦٨	٦/٤٦	٣/٢٢	١٣٨٨/١٠/٠٥

آزمون شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر

بعد از گذشت دو ماه از زمان آغاز تیمار، نمونه‌های سردخانه‌ای (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و نمونه‌های نگهداری شده در شرایط فراسرد (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) کشت شده و از لحاظ شاخص‌های جوانه‌زنی مورد مقایسه قرار گرفتند. در تیمار دمای فراسرد، به منظور گرم کردن سریع، نمونه‌ها بلافاصله از تانک ازت خارج و در بن‌ماری ٤٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه به

شدت تکان داده شدند. عمل ضدعفونی بذرها پس از خروج از شرایط تیمار انجام گرفت تا از مرطوب شدن بذرها قبل از اعمال تیمار و متعاقبا آسیب دیدن در هنگام نگهداری در دمای سردخانه و دمای فراسرد، جلوگیری شود. به منظور جلوگیری از بروز آلودگی‌های قارچی در هنگام آزمون جوانه‌زنی، بذر گیاهان مورد نظر با مایع ظرفشویی و آب شسته شده و به مدت ٦٠ ثانیه در اتانول ٩٦ ٪ (w/v) فرو برده شدند. بذرها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱/۵٪ (w/v) برای مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد از این مرحله چندین بار با آب سترون، شستشو شدند. بعد درون پتری‌دیش سترون شده با قطر ۱۲ سانتی‌متر حاوی یک عدد کاغذ صافی واتمن منتقل شدند و در نهایت به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. تعداد بذر در هر ظرف پتری ۲۵ عدد و از هر ظرف ۳ تکرار در نظر گرفته شد. به هر ظرف پتری ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. شمارش بذرها به صورت روزانه و در ساعت معین انجام شد. پس از طی زمان جوانه‌زنی صفات طول و وزن تر گیاهچه اندازه‌گیری و محاسبه شاخص‌های درصد، سرعت و قدرت به روش زیر انجام شد (Ruan, 2002):

۱- درصد جوانه‌زنی (درصد بذرهای جوانه‌زده) (Germination Percent = Ni/N) که در آن Ni تعداد بذرهای جوانه زده در روز iام و N تعداد کل بذرهای ازمون شده است

۲- سرعت جوانه‌زنی (Germination rate =ΣNi/Ti) که در آن Ni تعداد بذرهای جوانه زده در هر روز و Ti شمار روز پس از کاشت است.

۳- شاخص قدرت (Vigor Index) بذر برابر است با حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی نهایی در طول گیاهچه.

محاسبات آماری

از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت مقایسه تیمارها استفاده شد. به‌طوری‌که ۷ گونه مورد مطالعه به‌عنوان فاکتور اول و دو شرایط نگهداری نمونه‌ها (سردخانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد و فراسرد ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. همچنین به منظور مقایسه دو شرایط نگهداری (سردخانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد و فراسرد ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) برای هر گونه به طور جداگانه از آزمون t. استیودنت استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

درصد جوانه‌زنی

داده‌های مربوط به پارامترهای آماری نشان داد که میانگین درصد جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۵۵/۸۱ و ٦۸/۵۷، واریانس درصد جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۳۱۷/۵٦ و ۲۹۹/٦۵، کمینه درصد جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۲٤ و ۲۰، بیشینه درصد جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۸۰ و ۹۲ و ضریب تغییرات درصد جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۳۱۳/۱۸ و ۳۹٦/۱۲ بود.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از لحاظ صفت درصد جوانه‌زنی نشان داد که بین تیمارها (شرایط فراسرد و سردخانه) و گونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد وجود داشت، ولی اثر متقابل تیمار× گونه معنی‌دار نشد. علت آن ناشی از این امر است که گیاهان از توانمندی ژنتیکی متفاوتی برای جوانه‌زنی برخوردار هستند.

جدول مقایسه شرایط سردخانه و فراسرد برای گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که در گیاه *Datura innoxia* و گیاه *H. perforatum* از لحاظ درصد جوانه‌زنی بذر، به‌ترتیب اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد وجود داشت، ولی در بقیه گونه‌ها، بین تیمار دمای فراسرد و سردخانه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول۲- تجزیه واریانس به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص قدرت بذر	وزن تر گیاهچه (میلی‌گرم)	طول گیاهچه (میلی‌متر)
تیمار	۱	۰/۳۱۱**	۲۲۵/۸۲۸**	۱۰۱/۷۹۶	۰/۸۷۲	۰/۰۲٤
گونه	٦	۰/۱۱۸**	۲۹۷/۲۱۱**	٦۹٤/۵۸۷**	۱۰٦۲/۷۵۱**	۱۱۷۳/۷۷۷**
گونه × تیمار	٦	۰/۰٤۱	۲۵/۸٦۱	۲۱/۳۸۷	۰/۷۲٤	۰/۹۲۵
خطا	۲۸	۰/۰۳۸	۲۸/۳۲۳	۳٦/٦۳۸	۱۲/۰۲۸	٤۵/۳٦۵

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول۳- مقایسه تیمار سردخانه و فراسرد برای گونه‌های مختلف با استفاده از آزمون t استیودنت

گونه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص قدرت بذر	وزن تر گیاهچه	طول گیاهچه
Artemisia khorassanica	−۱/۲۱	−۰/۷۹	−۱/٤۰	۰/۰۷	−۰/۱٦
Hypericum perforatum	−٤/۷۰**	−۸/۸۰**	−۱/۵۲	−۰/٦۲	−۰/۰۸
Origanum vulgare	۰/۵۵	۰/۰۸	۰/۵۹	۰/۰۳	−۰/۱٤
Trigonella monantha	−۱/٦۲	−۰/۳۷	−۱/۰۳	۰/۵٤	۰/۲۹
Phytolacca americana	−۰/۷۸	−۰/۷۷	−۰/۲۹	−۰/۰۱	۰/۱۱
Hypericum androsaemum	−۱/۱٤	−۱/۹۷	−۰/۸٤	−۰/۱۱	−۰/۲۳
Datura innoxia	−۲/۸۱*	−۳/۹۹*	−۰/۹٤	−۰/٤۲	−۰/۰۳

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

سرعت جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که میانگین سرعت جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۲/۷۸ و ۱۷/٤۲، واریانس سرعت جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ٦۸/۹۵ و ٦۷/٦۱، کمینه سرعت جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۲/۷۸ و ٦/۵٤، بیشینه سرعت جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۳٤/۰٦ و ۳٤/٤۵ و ضریب تغییرات سرعت جوانه‌زنی در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۵۳/۹۸ و ۲۱۱/۸۹ بود.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از لحاظ صفت سرعت جوانه‌زنی نشان داد که بین تیمارها و گونه‌ها اختلاف

معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد وجود داشت ولی اثر متقابل تیمار × گونه معنی‌دار نشد (جدول ۲). گونه‌های مختلف گیاهی از توانمندی ژنتیکی متفاوتی برخوردار هستند، بنابراین سرعت جوانه‌زنی نیز از مقادیر متفاوتی برخوردار بود. جدول مقایسه شرایط سردخانه و فراسرد برای گونه‌های مختلف نشان داد که در گونه *Datura innoxia* و گونه *H. perforatum* از لحاظ درصد جوانه‌زنی بذر، به‌ترتیب اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد وجود داشت ولی در بقیه گونه‌ها، بین تیمار دمای فراسرد و سردخانه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده نشد (جدول ۳).

شاخص قدرت بذر

داده‌های مربوط به پارامترهای آماری نشان داد که میانگین شاخص قدرت بذر در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۵ و ۱۸/۱۲، واریانس شاخص قدرت بذر در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۱٤/۳۸ و ۱۵۱/٦۹، کمینه شاخص قدرت بذر در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۲/۰۸ و ۳/٦۸، بیشینه شاخص قدرت بذر در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۳۸/۹۳ و ٤٤/۵۳ و ضریب تغییرات شاخص قدرت بذر در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱٤۰/۳۲ و ۱٤۷/۱۲ بود.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از لحاظ صفت شاخص قدرت بذر نشان داد که بین گونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد وجود داشت (جدول ۲). البتّه گونه‌های مختلف گیاهی از توانمندی ژنتیکی متفاوتی برخوردار هستند، بنابراین شاخص قدرت بذر نیز از مقادیر متفاوتی برخوردار می‌باشد. جدول مقایسه شرایط سردخانه و فراسرد برای گونه‌های مختلف نشان داد که از لحاظ سرعت جوانه‌زنی بذر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود نداشت (جدول ۳).

وزن تر گیاهچه

داده‌های مربوط به پارامترهای آماری نشان داد که میانگین وزن تر گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۲/۳۹ و ۱۲/٦۷، واریانس وزن تر گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱٦۲/۳٤ و ۱۷۳/۵۳، کمینه وزن تر گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱/۱ و ۱/۲، بیشینه وزن تر گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۳۸/۷ و ۳۸/۷ و ضریب تغییرات وزن تر گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۹۷/۳۰ و ۹٦/۱۸ بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از لحاظ صفت وزن تر گیاهچه نشان داد که بین گونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد وجود داشت (جدول ۲). در این خصوص نیز گونه‌های مختلف گیاهی از توانمندی ژنتیکی متفاوتی برخوردار هستند. از این رو، وزن تر گیاهچه نیز از مقادیر متفاوتی برخوردار بود. در ضمن جدول مقایسه شرایط نرمال و فراسرد برای گونه‌های مختلف نشان داد که از لحاظ سرعت جوانه‌زنی بذر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود نداشت (جدول ۳).

طول گیاهچه

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میانگین طول گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۲۵/۸۸ و ۲۵/۸٤، واریانس طول گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۲۰۹ و ۲۰٦/۹۱، کمینه طول گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۸/٦٦

و ۷/٦٦، بیشینه طول گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ٥٦ و ٥٥/٦٦ و ضریب تغییرات طول گیاهچه در شرایط فراسرد و سردخانه به‌ترتیب ۱۷۹/۰۷ و ۱۷۹/٦٤ بود.

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها از لحاظ صفت طول گیاهچه نشان داد که بین گونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد وجود داشت (جدول ۲). با توجه به این نتایج می‌توان استنباط نمود که طول گیاهچه نیز از مقادیر متفاوتی برخوردار می‌باشد. جدول مقایسه شرایط سردخانه و فراسرد برای گونه‌های مختلف نشان داد که از لحاظ طول گیاهچه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود نداشت (جدول ۳).

بحث

درصد جوانه‌زنی

در خصوص درصد جوانه‌زنی، بجز دو گونه، در دیگر موارد تفاوت معنی‌داری بین تیمار سردخانه و دمای فراسرد مشاهده نشد. گزارش شده است بذرهایی که به اندازه ۳/۷ تا ۵/۵ درصد آبگیری شده و در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، کمترین کاهش جوانه‌زنی را از خود نشان دادند (Spech & Börner 1998)، همچنین نگهداری بذر سیزده گونه گیاهی در دمای فراسرد (ازت مایع و دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد)، درصد جوانه‌زنی بذر را کاهش نداد (Gonzalez-Benito *et al*., 1998). گزارشی دیگر نشان داد که بذرهای پیازی که برای مدت سه سال در دو دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد و ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، جوانه‌زنی خود را به خوبی حفظ کردند (Harrison & Carpenter, 1977) که با این نتایج مبنی بر اینکه با کاهش محتوای رطوبت بذر و نگهداری در شرایط فراسرد، درصد جوانه‌زنی بذر به خوبی حفظ می‌شود، مطابقت دارد (شکل ۱).

شکل ۱ - مقایسه جوانه‌زنی بذر گیاه سرخاب (*Phytolacca americana*) پس از خروج از دمای فراسرد. ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد (a) و سردخانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد (b)

سرعت جوانه‌زنی

در این آزمایش بجز دو گونه، در دیگر موارد تفاوت معنی‌داری از لحاظ سرعت جوانه‌زنی بین تیمار دمای سردخانه و دمای فراسرد مشاهده نشد. سرعت جوانه‌زنی بالاتر سبب خروج سریع‌تر گیاهچه از خاک، استقرار و رشد سریع‌تر بوته‌ها می‌شود (Finch-Savage & McQuistan, 1988). گزارش شده است که اگر بذرها برای مدت زمان طولانی (۳ تا ٢٤ سال) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انبار شوند، با کاهش سرعت جوانه‌زنی مواجه می‌شوند به طوری که یک رابطه منفی بین سال‌های انبارداری و سرعت جوانه‌زنی وجود دارد (David, 2002). حال اگر بذرها به اندازه کافی آبگیری شوند (۲ تا ۸ درصد)، می‌توانند برای مدت زمان طولانی قوه نامیه خود را در دمای خیلی پایین (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نسبت به دمای بالای صفر درجه سانتی‌گراد حفظ کنند (Ellis *et al*., 1996)، به طوریکه با کاهش محتوای رطوبت بین ۰/۳ تا ۳ درصد و نگهداری بذرها در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد، بعد از گذشت ٣٤ تا ٣٩ سال، اغلب گیاهان تیره شب بو، سرعت جوانه‌زنی خود را همچون روز اول (قبل از انبارداری) حفظ کردند (Pérez-García *et al*., 2007). همچنین نگهداری بذرهای گیاه *Bratonia* در دمای فراسرد اثر منفی بر روی سرعت جوانه‌زنی آنها نداشته است (Popov *et al*., 2004) زیرا با این نتایج که با کاهش محتوای رطوبت بذر و نگهداری در شرایط فراسرد، سرعت جوانه‌زنی بذر تغییری نمی‌کند، مطابقت دارد.

شاخص قدرت بذر

بین تیمار دمای سردخانه و دمای فراسرد از لحاظ شاخص قدرت بذر گونه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. شاخص قدرت بذر نشان‌دهنده همزمان قدرت جوانه‌زنی و قدرت رویش بذر است که منجر به عملکرد بالاتر می‌شود. این شاخص در واقع بیانگر توانایی بالقوه بذر در ایجاد بیشینه گیاه در کوتاهترین زمان ممکن در شرایط محیطی متغیر می‌باشد (Gelmond *et a.l*, 1978)، مقیاس دقیق و مناسبی برای آزمون کیفیت بذر بوده (Fu *et al*., 1994) و تحت تاثیر عوامل محیطی مختلفی همچون دما، رطوبت و غلظت اکسیژن و دی اکسید کربن می‌باشد (Roberts, 1972). گزارش شده است که شاخص قدرت بذرهایی که به مدت طولانی در سردخانه ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند، تغییری نکرده است (Meng *et al*., 2003) و شاخص قدرت بذر چهار گونه گیاه از خانواده چلیپاییان که به مدت ٢٤ تا ۳۰ سال در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد و محتوای رطوبتی ۳ درصد نگهداری شده بودند، در مقایسه با نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸ درصد، بیشتر حفظ شده است (Maselli *et al*., 1999). همچنین شاخص قدرت بذر پیاز نگهداری شده در دمای فراسرد نسبت به بذرها نگهداری شده در دمای اتاق، به خوبی حفظ شد (Lakhanpaul *et al*.,1995) که با این نتایج مبنی بر اینکه با کاهش محتوای رطوبت بذر و نگهداری در شرایط فراسرد، قدرت بذر حفظ می‌شود، مطابقت دارد.

وزن تر گیاهچه

بین تیمار دمای سردخانه و دمای فراسرد از لحاظ وزن تر گیاهچه، گونه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. وزن تر گیاهچه همبستگی زیادی با اندازه و کیفیت بذر دارد به طوری‌که بذرهای بزرگ‌تر و سالم‌تر، گیاهچه‌هایی با وزن تر، وزن خشک و کیفیت بهتری را

بروز می‌دهد (Sawan *et al.*, 2009) و می‌تواند عملکرد گیاهچه را در مزرعه متأثر سازد (Baalbaki & Copeland, 1997). گزارش شده است با افزایش دمای نگهداری بذر در انبار، وزن تر گیاهچه کاهش می‌یابد به طوری‌که در تیمارهای دمای انباری ۵، ۲۰ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد، بیشترین وزن تر گیاهچه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین وزن تر گیاهچه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حاصل شده است (Setyowati, 2009)، که با نتایج ما مبنی بر اینکه با کاهش محتوای رطوبت بذر و نگهداری در شرایط فراسرد، کیفیت بذر و متعاقباً وزن تر گیاهچه به خوبی حفظ می‌شود، مطابقت دارد.

طول گیاهچه

بین تیمار دمای سردخانه و دمای فراسرد از لحاظ طول گیاهچه گونه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. طول گیاهچه معیاری از بُنیه گیاهچه محسوب می‌شود و در بسیاری از گونه‌های گیاهی همبستگی بین طول گیاهچه و بنیه آن به اثبات رسیده است (Hampton and Tekrony, 1995). گزارش شده است با افزایش دمای نگهداری بذر در انبار، طول گیاهچه کاهش می‌یابد، به طوری‌که در تیمارهای دمای انباری ۵، ۲۰ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد، بیشترین طول گیاهچه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین طول گیاهچه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است (Setyowati, 2009). همچنین در مدت زمان ۹ ماه پس از نگهداری بذر گیاه چاودار رقم Calibra در تیمارهای دمای انباری ۱۰، ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد، بیشترین کاهش طول گیاهچه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و کمترین کاهش طول گیاهچه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نسبت به طول گیاهچه قبل از انبارداری مشاهده شد (Rozman *et al.*, 2010). در مجموع، با افزایش دمای نگهداری بذر، طول گیاهچه کاهش یافت. علت آن می‌تواند ناشی از زوال تدریجی و تجزیه شیمیایی ترکیبات بذر باشد که در طی فرایند خسارت اکسیداتیو رخ می‌دهد و سرعت این فرایندها به طور عمده به دو عامل رطوبت و دما بستگی دارد (Walters *et al.*, 2010). بنابراین کاهش محتوای رطوبتی بذر و نگهداری در دمای فراسرد، می‌تواند باعث افزایش ویسکوزیته سلولی و تغییر شکل سیتوپلاسم به حالت شیشه‌ای شده (Buitink & Leprince, 2008) و در نتیجه از زوال تدریجی بذر جلوگیری می‌کند (Sun & Leopold. 1994).

آزمون t- استیودنت نتایج نشان داد که بین تیمار دمای فراسرد و شاهد در درون گونه‌های گیاهی، از لحاظ تمامی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر، بجز درصد و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که علت آن می‌تواند ناشی از این امر باشد که در بذر ارتودکس، طی فرایند آبگیری ویسکوزیته سلولی به‌شدت افزایش یافته و سیتوپلاسم به حالت شیشه‌ای تغییر شکل می‌دهد (Buitink & Leprince, 2008). در این دسته از بذرها، مقاومت به آبگیری و باقی ماندن در حالت سکون با حضور پروتئین‌های ویژه‌ای همچون پروتئین تأخیر جنین‌زایی، پروتئین‌های شوک حرارتی و پروتئین‌های ذخیره بذر مرتبط می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد رابطه نزدیکی بین میزان معین این دسته از پروتئین‌ها و طول عمر بذر وجود دارد (Rajjou & Debeaujon, 2008). به طور کلی نتایج نشان داد که می‌توان از روش‌های نگهداری در دمای فراسرد (ازت مایع و دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) به‌عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین

مناسب و مطمئن برای نگهداری طولانی مدت بذر ارتودکس در مراکز نگهداری ذخایر ژرم پلاسمی استفاده نمود.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران که امکانات مالی و اجرایی را برای انجام این تحقیق فراهم آورده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

– Baalbaki, R.Z. and Copeland O., 1997. Seed size, density and protein content effects on field performance of wheat. Seed Science and Technology, 25: 511-521.
– Black. M. and Bewley D., 2000. Seed Technology and Its Biological Basis. Sheffield, UK: CRC Sheffield Academic Press, 516p.
– Bonner, F.T.,1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. Forest Ecology and Management, 35: 35-43.
– Buitink, J. and Leprince O., 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. Comptes Rendus Biologies, 331: 788–795.
– Chmielarz, P., 2010. Cryopreservation of conditionally dormant orthodox seeds of *Betula pendula*. Acta Physiologiae Plantarum, 32: 591–596.
– David, A. 2002. Germination percentage and germination speed of European Larch (*Larix decidua* Mill.) seed after prolonged storage. Northern Journal of Applied Forestry, 19: 168-170.
– Ellis, R.H., Hong, T.D., Astley, D., Pinnegar, A.E. and Kraak, H.L., 1996. Survival of dry and ultra-dry seeds of carrot, groundnut, lettuce, oilseed rape, and onion during five years' hermetic storage at two temperatures. Seed Science and Technology, 24: 347-358.
– Finch-Savage, W. E. and McQuistan, C., I., 1988. Performance of carrot seeds possessing different germination rates within a seed lot. The Journal of Agricultural Science, 110: 93-99.
– Fu, J.R., Jin, J.R., Peng, Y.F. and Xia, Q.H., 1994. Desiccation tolerance in two species with recalcitrant seeds: *Clausena lansium* (Lour.) and *Litchi chinensis* (Sonn.). Seed Science Research, 4: 257-261.
– Gelmond, H., Luria, I., Woodstock, L.W. and Perl, M., 1978. The effect of accelerated ageing of *Sorghum* seeds on seedling vigor. J. Exp. Bot., 29: 489-495.
– Genebank Standards. 1994. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
– Ghahreman. A. and Attar, F., 1999. Biodiversity of plant species in Iran. Tehran University Press, 1176p.
– Gonzalez-Benito, M. E., Iriondo, J. M. and Perez-Garcia, F., 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. Seed Science and Technology, 26: 257-262.
– Hampton, J.G., and Tekrony, D.M., 1995. Handbook of Vigor Test Methods (3rd. Ed.) ISTA, Zurich, Swirztland, 125p.
– Harrison, B.J. and Carpenter, R. 1977. Storage of *Allium cepa* at low temperatures. Seed Science and Technology, 5: 699–702.
– 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(Suppl.): 1B288.
– Lakhanpaul, S., Babrekar, P.P. and Chandel, K.P.S., 1995. Seed evaluation after cryopreservation in onion (*Allium cepa* L.) cultivars. Indian Journal of Plant Genetic Resources, 8: 99-105.
– Li, D.Z. and Pritchard, H.W., 2009. The science and economics of ex situ plant conservation. Trends in Plant Science, 14: 614-621.
– Maselli, S., Pérez-García, F. and Aguinagalde, I., 1999. Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain. Annals of Botany, 84: 207-212.
– Meng, S.C., Zhang, H.Y., Liu, P.Y. and Kong, X.H., 2003. Studies on the physiological characteristics and genetic integrities of long-stored vegetable seeds at 20°C. Acta Agric. Sin, 18: 26-23.
– Perez-Garcia, F., González-Benito, M.E. and Gómez-Campo, C., 2007. High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. Seed Science and Technology, 35: 143-153.
– Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. and Kolomeytseva, G.L., 2004. The development of juvenile plants of the hybrid *Orchid Bratonia* after seed cryopreservation. Cryoletters, 25: 205-212.
– Pritchard, HW., 2007. Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds. Methods in Molecular Biology. 368: 185-201.

– Setyowati, N., 2009. The effect of seed maturity, temperature, and storage period on vigor of *Picrasma javanica* Bl. seedling. Biodiversitas, 10: 49-53.
– Spech, C.E. and Börner, A., 1998. An interim report on a long term storage experiment on rye (*Secale cereale* L.) under a range of temperatures and atmospheres. Genetic Resources and Crop Evolution, 45: 483-488.
– Sun, W.Q. and A.C. Leopold, 1994. Glassy state and seed storage stability: A viability equation analysis. Annals of Botany, 74: 601-604.
– Touchell, D.H. and Dixon, K.W., 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. Biodiversity and Conservation, 2: 594-602.
– Walters, C., Ballesteros, D. and Vertucci V.A., 2010. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. Plant Science, 179: 565–573.
– Walters, C., Wheeler, L.J. and. Stanwood, P.C., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48: 229–244.
– Rajjou, L. and Debeaujon, I., 2008. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. Comptes Rendus Biologies, 331: 796–805.
– Reed, B.M., 2008. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, Chap 19. 515pp.
– Roberts EH., 1972. Storage Environment And The Control Of Viability. Pages 14–58 in Viability of Seeds. London, UK: Chapman and Hall. 448p.
– Rozman, V., Gukvic, G., Liska, A., Balicevice, R., Eden, A. and Petrovic, S., 2010. Differences in Traits of Seeds and Seedlings of Perennial Ryegrass Cultivars after Nine Months Storage at Different Temperatures. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(1): 155-158.
– Ruan, S., Xue, Q. and Tylkowska, K., 2002. The influence of priming on germination of rice seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. Seed Science and Technology. 30: 61-67.
– Salomao, A.N., 2002. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. Brazilian Journal of Plant Physiology. 14: 133-138.
– Sawan, Z.M., Fahmy, A.H. and Yousef, S.E., 2009. Direct and residual effects of nitrogen fertilization, foliar application of potassium and plant growth retardant on Egyptian cotton growth, seed yield, seed viability and seedling vigor. Acta Ecologica Sinica, 29: 116–123.

The effect of cryopreservation on germination and growth indices of some orthodox seeds

E. Aryakia[*1], H. Ramazani[2], H. ghafoori[3], A. Dolatyari[4], M.R. Naghavi[5] and S.A. Shahzadeh fazeli[6]

1*- Corresponding author, M.Sc., Horticultural Sciences, Iranian Biological Resource Center, Karaj, I.R. Iran
E-mail: elyasaryakia@yahoo.com
2- B.Sc., Horticultural Sciences, Iranian Biological Resource Center, Karaj, I.R. Iran
3- M.Sc., Biochemistry, Iranian Biological Resource Center, Karaj, I.R. Iran
4- M.Sc., Plant Eco-systematics, Iranian Biological Resource Center, Karaj, I.R. Iran
5- Prof., Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran
6- Assis. Prof., Molecular Genetics, Iranian Biological Resource Center, Karaj, I.R. Iran

Received: 29.01.2011 Accepted: 16.10.2011

Abstract

With regard to the trend of plant germplasm degradation in our country, as one of the richest countries on plant genetic resources, it is necessary to act fundamentally on conservation and maintenance of available genetic diversity. Using seed cryopreservation, as one of the *Ex situ* plant germplasm conservation method we can store seed for long-term, with much lower costs and without losing seed viability. In this study the effect of cryopreservation on germination and growth indices (germination percent, germination rate, seed vigour index, plantlet length, plantlet fresh weight) on orthodox seeds of seven plant species (*Artemisia khorassanica, Hypericum perforatum, Origanum spp, Trigonella monantha, Phytolacca americana, Hypericum androsaemum, Datura innoxia*) in two storage conditions of freezer (-20ºC) and cryopreservation (-196ºC) were evaluated for two months. Comparing cryopreservation and freezer treatments on each species based on t- student method, no significant differences were observed on germination and growth indices except for germination percent and germination rate. Cryopreservation may be recommended as a suitable and alternative method for healthy long term storage of orthodox seeds in germplasm resources conservation centers.

Key words: Cryopreservation, Orthodox seed, Seed germination and growth indices, Germplasm.