علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۴ (ص ۳۲۲-۳۱۳)

نگهداری بذر پده (*Populus euphratica* Oliv.) در شرایط فراسرد (Cryopreservation) و ارزیابی بذور فراسردی در آزمایشگاه و گلخانه

مریم جبلی[1*]، محبت‌علی نادری شهاب[2]، حمیدرضا فیضی[3] و علی‌اشرف جعفری[4]
۱، ۲ و ۴. کارشناس ارشد پژوهشی، استادیار پژوهش و استاد پژوهش، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۳. کارشناس، ادارهٔ منابع طبیعی شهرستان املش، استان گیلان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۴/۲۱)

چکیده

پده (*Populus euphratica* Oliv.) گونهٔ بومی مقاوم به گرما، سرما و شوری است و دامنهٔ اکولوژیک گسترده‌ای دارد. ماندگاری بذر پده در شرایط متعارف بسیار کوتاه است و امکان نگهداری آن در شرایط بانک ژن وجود ندارد. برای نگهداری بذر این گونه در شرایط عادی (۲۲°C+) و فراسرد یا ازت مایع (۱۹۶°C-) از سه تیمار PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و آبگیری همراه با بذور شاهد استفاده شد. بذور به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در شرایط فراسرد ذخیره و در ۲۲°C+ به ژرمیناتور وارد شدند. جوانه‌زنی بذور در ۲۲°C+ در پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و PVS2، از ۹۰ درصد به ۳۵/۰۰ و ۴۱/۶۷ کاهش یافت. جوانه‌زنی در یک سال ذخیره‌سازی، در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) از ۹۰ درصد به ۲۶/۶۷ و ۲۸/۳۳ کاهش یافت. تیمار کاهش رطوبت بذر یا آبگیری بهترین نتیجه را در جوانه‌زنی و استقرار بذر در آزمایشگاه و گلخانه داشت. بذور شاهد در شرایط عادی بیش از چند ماه زنده‌مانی نداشتند و بذور فراسردی نیز در طول یک سال ماندگاری در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) تغییری در زنده‌مانی، جوانه‌زنی و استقرار آن‌ها مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آبگیری، بذر *Populus euphratica*، فراسرد، نیتروژن مایع.

مقدمه

پده (*Populus euphratica* Oliv) از خانوادهٔ Salicaceae است و در ایران، افغانستان، پاکستان، عراق، آسیای مرکزی و جنوبی، چین و شمال آفریقا رویش دارد (Sabeti, 2006). رویش این گیاه در ایران در اغلب استان‌های کشور به‌صورت گسترده، محدود یا لکه‌ای بررسی شده است (Soleimani *et al.*, 2011; Calagari *et al.*, 2007). مقاومت پده به شرایط سخت محیطی مانند گرما، خشکی و شوری بیشتر از سایر گونه‌های جنس *Populus* است. این گیاه با شرایط گرم جنوب کشور مانند خوزستان کاملاً سازگاری دارد و به‌صورت طبیعی در کنار کارون و رودخانه‌های پرآب مستقر می‌شود و نقش بسیار مهمی در جلوگیری از فرسایش خاک و اراضی حاشیهٔ رودخانه‌ها دارد. براساس بررسی‌های نگارنده از رویشگاه‌های کشور، گونهٔ *P. euphratica* در تالاب شیمبار به‌طور خارق‌العاده‌ای داخل آب (Wetland) مستقر می‌شود و شرایط ماندابی را به‌طور عجیبی تحمل می‌کند. در شرایط گرم، خشک و کویری ریگ‌بلند کاشان، پده به‌طور طبیعی در خشن‌ترین شرایط مستقر و تکثیر شده است. در مناطق سرد و عرض جغرافیایی بسیار بالا در شمال شرق کشور، در کنار رودخانهٔ ارس توده‌ای از این گونه به‌طور طبیعی مستقر شده است. این گسترهٔ رویشی در اقلیم‌های مختلف، بیانگر سازگاری خارق‌العاده و گستردگی دامنهٔ اکولوژیک این گونهٔ ارزشمند در کشور است.

از پده می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی با هدف انتقال صفت مقاومت به شوری و خشکی به سایر گونه‌های

* تلفن: ۰۲۶۳۶۷۷۰۸۱۰
E-mail: rihan2000ir@yahoo.com

جنس *Populus* استفاده کرد. در همین زمینه، Mofidabadi *et al.* (1998) و Jafari & Kalagary (2004) با استفاده از روش کشت تخمک و تخمدان توانستند هیبرید بین گونه‌ای *Populus alba* x *P. euphratica* را تولید کنند. این دستاورد مهم امکان استفاده از این گونهٔ ارزشمند را در تولید هیبریدهای بین گونه‌ای منحصربه‌فرد فراهم آورده است. در آزمایش دیگری Calagari *et al.* (2004)، دورگ‌گیری درون‌گونه‌ای پده را با استفاده از نجات رویان انجام دادند. با انجام اصلاح درون‌شیشه‌ای Mofidabadi *et al.* (2001) با روش تنوع گامتوکلونال اقدام به تهیهٔ ژنوتیپ‌های جدید پده کردند که نتایج آن موفقیت‌آمیز بود. در بررسی تنوع ژنتیکی پده‌های ایران Calagari *et al.*) با استفاده از آنزیم پراکسیداز، تنوع ژنتیکی جوامع پده ایران را بررسی کردند و از وجود تنوع بین جوامع مختلف کشور خبر دادند. در همین زمینه Saito *et al.* (2002)، نیز با استفاده از روش مولکولی تنوع ژنتیکی جوامع پده را در شمال غرب چین بررسی کردند و گزارش دادند که بعضی از جوامع ایزوله از نظر ژنتیکی تفاوت زیادی با سایر جوامع پده در این کشور دارند.

نگهداری بلندمدت اغلب بذور ارتدوکس (orthodox) به‌دلیل کم‌بودن محتوای آب، در شرایط فراسرد به‌خوبی امکان‌پذیر است و یکی از روش‌های کارآمد محسوب می‌شود (Naderi Shahab *et al.*, 2009). ولی بذور intermediate به‌دلیل محتوای زیاد آب، در مقایسه با بذور ارتدوکس پاسخ متفاوتی به شرایط فراسرد نشان می‌دهند. بنابراین، قبل از ورود بذر به شرایط فراسرد، کاهش رطوبت بذر یا Desiccation ممکن است در تحمل این شرایط تعیین‌کننده باشد. به‌طوری‌که در تعدادی از گونه‌ها کاهش بیش از حد رطوبت بذر (۳ـ ۳/۵ درصد) ممکن است درصد جوانه‌زنی بذر را به ۲۳ـ ۴۰ درصد کاهش دهد. درحالی‌که در *Passiflora karminiana* با رطوبت حدود ۹ درصد، جوانه‌زنی بذر ممکن است به ۸۴ درصد هم برسد (Gonzalez-Benito *et al.*, 2009). از طرفی در بذور intermediate کاهش بیش از حد رطوبت، قبل از ورود بذر به شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) ممکن است جوانه‌زنی بذر را پس از خروج از آن به‌شدت کاهش دهد. بنابراین، باید مقدار کاهش رطوبت بهینه‌شده و پس از تعیین رطوبت مناسب به ذخیره‌سازی بذر اقدام کرد. در گونهٔ *Livistana chinensis*، بهترین زمان نگهداری جنین بذور اواخر دورهٔ رسیدگی و با محتوای رطوبت حدود ۲۰ درصد است (Wen & Song, 2007). در صورت کاهش بیش از حد رطوبت، زنده‌مانی بذور کاهش می‌یابد. بنابراین، برای نگهداری جنین بذور نارس این گروه از گیاهان در فراسرد، باید درصد رطوبت جنین بهینه شود.

کاهش یا تنظیم محتوای آب بذر یا نمونهٔ گیاهی قبل از ورود به شرایط فراسرد نقش مهمی در زنده‌مانی نمونهٔ گیاهی دارد. در گونهٔ *Bletilla striata* بذور رسیده و خشک به‌دلیل درصد آب کمتر در مقایسه با بذور آب جذب کرده زنده‌مانی بیشتری پس از گذراندن شرایط فراسرد دارند (Jitsopakul *et al.*, 2008). در پژوهشی نگهداری جوانه‌های جانبی هیبرید بین گونه‌ای جنس اکالیپتوس *E. camadulensis* ×*Eucaliptus gradis* در دمای فراسرد بررسی شد (Blakesley & Kiernan, 2001). همچنین جوانه‌های انتهایی صنوبر (*Populus alba*) نیز توسط Lambardi *et al.* (2000) در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) قرار گرفتند که مشاهده شد که پس از خروج از فراسرد نمونه‌ها تا ۹۰ درصد قدرت زیستی خود را حفظ می‌کنند. در آزمایش دیگری در دو واریته از جنس مرکبات تیمار ویتریفیکاسیون، سبب موفقیت در ذخیره‌سازی جوانه‌های انتهایی این واریته‌ها در شرایط فراسرد شد (Wang & Deng, 2004). بررسی‌های فوق نشان می‌دهد استفاده از روش پیش‌تیمار و محلول‌های مناسب برای ذخیره‌سازی بذر یا اندام گیاهی نقش حیاتی در زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی دارد (Cho *et al.*, 2002a & 2002b).

مشکل اساسی در نگهداری این دسته از گونه‌های گیاهی در بانک ژن، تکثیر غیرجنسی آن‌هاست که در این صورت نگهداری کلون‌های آن در بانک ژن امری ناممکن است. از طرفی به‌دلیل کوتاه‌بودن عمر بذر گونه‌های جنس *Populus* نمی‌توان بذور گونه‌های این جنس را در شرایط متعارف نگهداری کرد. این امر اضافه بر اینکه بقای گونه‌های طبیعی را تهدید کرده است، محدودیت‌هایی را نیز برای نگهداری بذور حاصل از برنامه‌های به‌نژادی ایجاد

می‌کند. بذر گونهٔ *Populus* با در نظر گرفتن اصل حفظ تنوع ژنتیکی گونه‌ها از عرصه‌ها، رویشگاه‌ها و اقلیم‌های مختلف، جمع‌آوری و با اعمال تیمار مناسب فراسردی در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) بررسی شدند تا در صورت راه‌اندازی کرایوبانک منابع طبیعی کشور (مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع)، بذور را به‌صورت اصولی نگهداری کنند تا بتوان در صورت بروز هرگونه خطر و تهدید، از بذور ذخیره‌شده برای احیای عرصه‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

محل جمع‌آوری بذر

بذر پده (*Populus euphratica* Oliv) از پایه‌های موجود در عرصهٔ درختکاری گروه تحقیقات زیست فناوری مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در خردادماه جمع‌آوری شد.

استحصال بذر

ابتدا کپسول‌های رسیده حاوی بذر که در مرحلهٔ بازشدن بودند از درختان برداشت شد. بذور بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از دستگاه آسیاب کوچک (مولینکس) کرک‌زدایی و بذر بدون کرک تهیه شد. به‌دلیل وجودنداشتن اختلاف در جوانه‌زنی بذور کرک‌دار و بدون کرک، در کلیهٔ آزمایش‌های از بذور کرک‌زدایی شده استفاده شد. کار با بذرهای کرک‌زدایی شده آسان‌تر و امکان حذف آلودگی‌های فیزیکی و بذرهای فاسد و نارس وجود دارد. همچنین درصد آلودگی بذور کرک‌زدایی شده کمتر و ارزیابی‌های آماری دقیق‌تر و بدون اشکال است. وزن هزاردانهٔ بذر ۰/۰۷۲ گرم بود.

جوانه‌زنی و استقرار بذر

ابتدا بذرها در شرایط استریل (داخل هود لامینار ایرفلو) ۸ بار با آب‌مقطر استریل (همراه با تکان‌دادن) شست‌وشو شدند. سپس بین کاغذ مرطوب داخل پتری دیش استریل قرار گرفتند و به ژرمیناتور با دمای ۲۲°C+ با نور مداوم منتقل شدند. بذرها بعد از ۲۴ ساعت شروع به جوانه‌زنی کردند.

آزمون‌های نگهداری بذر در فراسرد (Cryopreservation)

پیش‌تیمارهای فراسرد، یا تیمارهای قبل از ورود بذرها به شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) شامل سه مرحله بود.

(Plant Vitrification Solution 2) PVS2

به کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی بذر، ۱/۵میلی‌لیتر محلول لودینگ شامل: ساکاروز (۰/۴M) و گلیسرول (۲M) افزوده و ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲°C+ قرار داده شدند (Matsumoto *et al.*, 1994). سپس محلول را کاملاً تخلیه کرده و ۱/۵میلی‌لیتر محلول PVS2 شامل: اتیلن گلیکول (۱۵ درصد)، (۱۵ درصد) DMSO، گلیسرول (۳۰ درصد) و ساکاروز (۰/۴M) اضافه کرده و ۲۰ دقیقه در آب ۴°C+ قرار گرفتند (Sakai *et al.*, 1991). کرایوتیوپ‌های حاوی بذر وارد شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) شدند.

آبگیری یا Desiccation

آزمایش‌های مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوب بذر، بدون واردآمدن صدمهٔ محسوس به جوانه‌زنی آن انجام شد. ابتدا به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌منزلهٔ وزن اولیه (FW) یادداشت شد. بذرها مدت ۷۲ ساعت در خشک‌کن با دمای ۷۵°C قرار داده شدند. سپس از دستگاه خشک‌کن خارج و بلافاصله با ترازوی حساس توزین شدند و وزن خشک بذر به دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر (۱۷/۶۰) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Total Seed Moisture Content (\%)} = (FW - DW) / DW * 100$$

به‌منظور تهیهٔ بذر مورد نیاز تیمار Desiccation، ۱۰ گرم بذر تازه توزین و به دسیکاتور حاوی ۱۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در سردخانه با دمای ۴°C+ نگهداری شد. بذور از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین شد. درصد رطوبت بذرها پس از رطوبت‌گیری در دسیکاتور با استفاده از فرمول فوق محاسبه شدند (۱۳/۹۰ درصد). با در دست داشتن رطوبت کل بذر (۱۷/۶۰ درصد) و مقدار رطوبت بذر پس از قرارگرفتن در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر مقایسه با رطوبت کل محاسبه شد که این کاهش

معادل ۲۱ درصد رطوبت کل بذر بود. بذور بلافاصله وارد کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری شدند و به ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) منتقل شدند.

گلیسرول ۳۰ درصد

درون کرایوتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی بذر، گلیسرول ۳۰ درصد ریخته و ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲°C+ قرار داده شدند. پس از آن کرایوتیوپ‌های وارد ازت مایع (۱۹۶°C-) شدند.

بذور تحت تیمار در داخل ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) و سه نمونه بذر به‌منزلهٔ شاهد برای استفاده در آزمایش‌های در ۴°C+ به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال نگهداری شدند.

آزمایش اثر پیش‌تیمارها بر جوانه‌زنی بذر

قسمتی از بذور تیمارشده با PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و آبگیری‌شده قبل از ورود به ازت مایع همراه با شاهد، بین کاغذ مرطوب در پتری دیش کشت و وارد ژرمیناتور با دمای ۲۲°C+ شدند تا فقط اثر پیش‌تیمارها بر جوانه‌زنی بذر ارزیابی شود.

تیمارهای پس از خروج بذر از ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-)

به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، بذور پس از خروج از ازت مایع به‌مدت ۲ دقیقه در آب ۴۲°C+ قرار داده شدند. سپس بذرها از آب گرم خارج شدند و ۳۰ دقیقه در محلول ساکاروز ۱/۵ مولار استریل قرار گرفتند. در شرایط استریل، بذور ۸ بار با آب‌مقطر استریل شست‌وشو و سپس بین کاغذ مرطوب استریل قرار داده شدند. پتری‌های حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای ۲۲°C+ با شدت نور ۱۰ وات بر مترمربع (مداوم) منتقل شدند.

طرح آزمایشی

طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش‌تیمارهای فراسرد (۱۹۶°C-) و زمان ذخیره‌سازی در آن با به‌کارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. پیش‌تیمارهای فراسرد (۱۹۶°C-) شامل PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و شاهد تشکیل‌دهندهٔ سطح فاکتور اول و چهار بازه زمانی صفر (بدون ورود به ازت مایع)، یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره‌سازی بذور در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) تشکیل‌دهندهٔ سطح فاکتور دوم در این آزمایش بودند. پتری دیش‌ها هر یک با حدود ۱۰۰ عدد بذر، واحدهای آزمایشی به‌شماررفته و صفت اندازه‌گیری شده در این آزمایش درصد جوانه‌زنی بذر بود. تجزیهٔ واریانس داده‌ها و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

آزمون‌های گلخانه‌ای

بذور بر روی سطح گلدان‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر که به نسبت ۱/۳ پیت‌ماس، ۱/۳ خاک و ۱/۳ ماسه پرشده بودند پخش شد. گلدان‌ها داخل تشت آب قرار داده شدند به‌طوری‌که ۵ سانتی‌متر پایین گلدان‌ها در آب قرار گرفت.

سطح گلدان‌ها یا روی بذرها یک لایه دستمال کاغذی مرطوب قرار داده شد. درصد استقرار بذر و تولید نهال در هر یک از تیمارها اندازه‌گیری و طرح آزمایشی فاکتوریل استفاده شد. تجزیهٔ واریانس داده‌ها و مقایسهٔ میانگین‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد.

نتایج

در بررسی‌های مقدماتی که به‌منظور بهینه‌کردن روش‌ها و پیش‌تیمارهای فراسرد صورت گرفت، مشخص شد که بذور پده بدون اینکه وارد شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) شوند، در دمای ۲۲°C+ به پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت یا آبگیری و محلول PVS2 عکس‌العمل متفاوتی نشان می‌دهند. به بیان دیگر، هنگامی که بذور با گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و محلول PVS2 تیمار شدند، جوانه‌زنی بذور این پیش‌تیمارها بدون اینکه وارد شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) شوند کاهش چشمگیری نشان داد. بنابراین، در طراحی آزمایش‌ها، بذرهای شاهد و تیمارشده با گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و محلول PVS2 به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول بدون اینکه وارد ازت مایع شوند ارزیابی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای شدند تا اثر هر یک از پیش‌تیمارها در جوانه‌زنی بذر بدون

تأثیرپذیری از شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) مشخص شود. ۳ گروه دیگر (به استثنای شاهد) به‌ترتیب به‌مدت یک هفته، یک ماه، و یک سال در شرایط فراسرد نگهداری شدند.

جدول۱. اثر پیش‌تیمارهای مختلف همچنین یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره‌سازی و عدم ذخیره‌سازی بذر پده در ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) بر درصد جوانه‌زنی بذر در شرایط آزمایشگاه و استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه

زمان ذخیره‌سازی در ازت مایع	پیش‌تیمار	درصد استقرار گیاهچه (گلخانه)	درصد جوانه‌زنی بذر (آزمایشگاه)
(بدون ذخیره‌سازی در فراسرد)	شاهد	۷۶/۶۷ a*	۹۰ a
	گلیسرول ۳۰٪	۲۵ ef	۳۵ cd
	آبگیری	۶۸/۳۳ abc	۷۵ b
	محلول PVS2	۳۱/۶۷ e	۴۱/۶۷ c
یک هفته	شاهد	۷۳/۳۳ ab	۸۶/۶۷ a
	گلیسرول ۳۰٪	۲۱/۶۷ ef	۲۸/۳۳ d
	آبگیری	۶۳/۳۳ c	۷۳/۳۳ b
	محلول PVS2	۲۵ ef	۳۳/۳۳ cd
یک ماه	شاهد	۵۰ d	۶۸/۳۳ b
	گلیسرول ۳۰٪	۲۳/۳۳ ef	۳۰ d
	آبگیری	۶۵ bc	۷۱/۶۷ b
	محلول PVS2	۲۳/۳۳ ef	۳۱/۶۷ d
یک سال	شاهد	۱ g	۰/۳۳ e
	گلیسرول ۳۰٪	۲۰/۶۷ f	۲۶/۶۷ d
	آبگیری	۶۱/۶۷ c	۷۰ b
	محلول PVS2	۲۱/۶۷ ef	۲۸/۳۳ d

* در هر ستون، میانگین‌هایی که حرف یا حروف مشترک دارند در سطح ۱ درصد معنادار نیستند.

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرها و همچنین استقرار و رشد نهال در شرایط گلخانه، در نمونهٔ شاهد و پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و محلول PVS2 بدون اینکه در دمای (۱۹۶°C-) نگهداری شوند تفاوت معناداری دارند (جدول۱). بذرهای شاهد درصد جوانه‌زنی بسیار بالا و در حد ۹۰ درصد داشتند. لیکن بذوری که با پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و PVS2 تیمار شدند، بدون ورود به ازت مایع درصد جوانه‌زنی آن‌ها به‌ترتیب به ۳۵ ، ۷۵ و ۴۱/۶۷ درصد کاهش یافت. نتیجه اینکه کلیهٔ پیش‌تیمارها اثر منفی در جوانه‌زنی بذرها داشتند. بیشترین کاهش مربوط به گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 بود. این نتایج نشان داد که اثر منفی پیش‌تیمارها در جوانه‌زنی بذر پده بسیار زیاد است و به‌ویژه پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 به‌شدت جوانه‌زنی بذر را کاهش می‌دهند.

بذوری که با پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، آبگیری و محلول PVS2 تیمار و به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در ازت مایع ذخیره شدند، کاهش جوانه‌زنی بذر بیشتر از بذوری بود که وارد ازت مایع یا فراسرد نشده بودند. این کاهش مضاعف، به‌دلیل تأثیر منفی شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) بر جوانه‌زنی بذر است. نکتهٔ بسیار مهم اینکه اثر شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) در کاهش جوانه‌زنی بسیار ناچیز و یا از نظر آماری تفاوتی بین مدت زمان‌های ذخیره‌سازی با تیمار بدون ذخیره‌سازی مشاهده نشد (جدول۱).

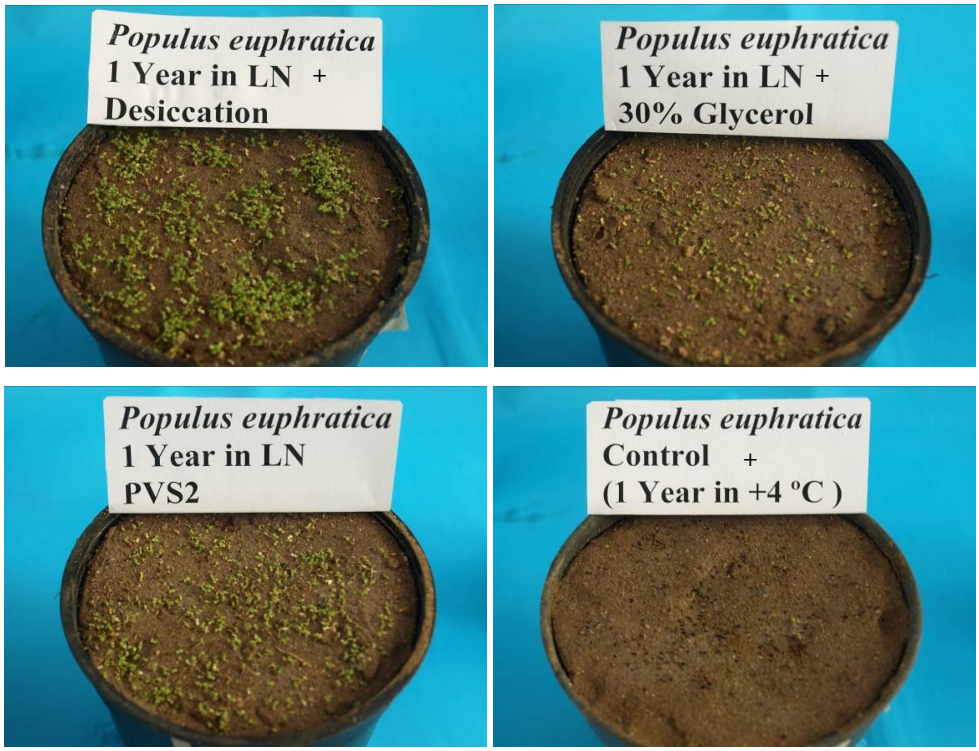
جوانه‌زنی پیش‌تیمارهای ۳۰ درصد، آبگیری و

محلول PVS2 در یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) روند به‌نسبت ثابتی داشت و زمان ماندگاری بذر در این شرایط سبب کاهش چشمگیر جوانه‌زنی بذور نشد. به عنوان نمونه جوانه‌زنی بذور در پیش‌تیمار آبگیری برای یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در (۱۹۶°C-) به‌ترتیب ۷۳/۳۳ درصد، ۷۱/۶۷ درصد و ۷۰ درصد بدون اختلاف معنادار بود (جدول۱). این نتایج نشان‌دهندهٔ حفظ و ثابت‌ماندن جوانه‌زنی بذر طی مدت یک سال ماندگاری در ازت مایع بود.

جوانه‌زنی بذور فراسردی در پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد در یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در (۱۹۶°C-) به‌ترتیب ۲۸/۳۳ درصد، ۳۰ درصد و ۲۶/۶۷ درصد و در محلول PVS2 به میزان ۳۳/۳۳ درصد (یک هفته)، ۳۱/۶۷ درصد (یک ماه) و ۲۸/۳۳ درصد (یک سال) بود (جدول۱). به‌رغم جوانه‌زنی کم در این پیش‌تیمارها، طی ماندگاری در فراسرد (۱۹۶°C-)، درصد جوانه‌زنی حالت ثابت داشته و از نظر آماری تقریباً زمان نگهداری تغییری در جوانه‌زنی بذر ایجاد نکرده است. لیکن بذور شاهد که در شرایط عادی نگهداری شدند، بلافاصله پس از برداشت ۹۰ درصد جوانه‌زنی داشتند و پس از یک هفته، یک ماه و یک سال به‌ترتیب به ۸۶/۶۷ درصد، ۶۸/۳۳ درصد و ۰/۳۳ درصد (در حد صفر) کاهش یافت (جدول۱). نتایج تیمار شاهد نشان داد که بذور گونهٔ *P. euphratica* در صورت نگهداری در شرایط عادی به‌سرعت جوانه‌زنی خود را از دست دادند و پس از یک ماه از ۹۰ درصد به ۶۸/۳۳ درصد و پس از یک سال ماندگاری، جوانه‌زنی به حدود صفر رسید. به‌منظور بررسی مدت ماندگاری بذر شاهد در شرایط معمولی، آزمون‌های تکمیلی انجام شد که نتایج آن بیانگر ماندگاری بذر به‌مدت ۴ ماه در شرایط عادی بوده است و پس از این مدت بذرها کاملاً از بین می‌روند.

آزمون‌های گلخانه‌ای

اثر پیش‌تیمارهای مختلف و همچنین یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری بذر پده در ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) و بذور پیش‌تیمارهایی که وارد ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) نشده بودند به‌همراه بذرهای شاهد بر درصد استقرار و رشد نهال‌ها در گلخانه در جدول۱ و شکل۱ (سمت چپ) ارائه شده است.



شکل۱. استقرار بذور *P. euphratica* در پیش‌تیمارهای مختلف فراسردی (196°C) پس از یک سال و شاهد

درصد سبزکردن و استقرار نهال در گلخانه به‌رغم تفاوت در میانگین‌ها، روندی مشابه بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد. بیشترین درصد استقرار در تیمار غیرفراسرد یا بدون ورود به فراسرد به‌ترتیب مربوط به شاهد (۷۶/۶۷ درصد) آبگیری (۶۸/۳۳ درصد)، محلول PVS2 (۳۱/۶۷ درصد) و گلیسرول ۳۰ درصد (۲۵ درصد) بود که نشان‌دهندهٔ تأثیر سوء پیش‌تیمارها در استقرار بذر در شرایط گلخانه است.

در تیمارها و زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع یا فراسرد (°C ۱۹۶-)، درصد استقرار بذر در پیش‌تیمارهای فراسردی و زمان‌های ذخیره‌سازی در شرایط فراسردی روندی تقریباً مشابه شرایط آزمایشگاهی داشت. به‌ترتیب تیمارهای آبگیری، محلول PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد بیشترین استقرار بذر و تولید گیاهچه را دارند و تفاوت چشمگیری در استقرار گیاه در تیمار یک هفته، یک ماه و یک سال مشاهده نشد. این در حالی است که استقرار بذور شاهد (بذر تازه و بدون ورود به فراسرد) با گذشت زمان کاهش نشان می‌دهد به گونه‌ای که درصد گیاهچهٔ استقراریافته در تیمار شاهد، یک هفته، یک ماه و یک سال ماندگاری در شرایط معمولی به‌ترتیب ۷۶/۶۷ درصد، ۷۳/۳۳ درصد، ۵۰ درصد و ۱ درصد بود (جدول۱ و شکل‌های ۱ و ۲).

بحث

بذر تازه برداشت‌شدهٔ پده جوانه‌زنی بالا و در حد ۹۰ درصد داشته است و در این رابطه بررسی‌های انجام‌شده توسط دیگران نیز بیانگر جوانه‌زنی بالای بذر این گونه است (Soleimani *et al.*, 2011). ولی در شرایط متعارف بذر این گونه عمر کوتاهی داشته است و به‌سرعت جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهد. براساس آزمایش‌های انجام‌شده، عمر بذر پده در یک سال ماندگاری در شرایط متعارف به حدود صفر رسید. با توجه به اینکه فاصلهٔ بین تیمار یک ماه و یک سال بسیار طولانی بود به‌منظور بررسی دقیق زمان ماندگاری این بذر در شرایط متعارف، آزمایش‌های متعددی انجام شد و مشخص شد پس از ۴ ماه جوانه‌زنی بذر این گونه به حدود صفر می‌رسد. بنابراین، بیشترین ماندگاری بذر این گونه در شرایط متعارف کمتر از ۴ ماه است و حفظ بذر این گونه در بانک ژن‌های متعارف امکان‌پذیر نیست.

بذر *P. euphratica* از دو منظر به بذور ریکالسیترنت (Recalcitrant) شباهت دارد. نخست محتوای بالای آب بذر که در حد ۱۷/۶۰درصد است و دوم ماندگاری کوتاه‌مدت بذر که کمتر از چهار ماه بود. لیکن بذر پده به‌عکس بذور ریکالسیترنت، شرایط فراسردی را بسیار خوب تحمل می‌کنند زیرا بذور ریکالسیترنت (مانند بلوط و شاه‌بلوط) به هیچ‌وجه تحمل فراسرد را ندارند و به محض ورود به ازت مایع و همسان‌شدن برودت آن با برودت محیط به‌سرعت از بین می‌روند. بنابراین، در دسته‌بندی بذور، بذر پده از نظر ماندگاری در شرایط متعارف رفتار بذور ریکالسیترنت و از نظر تحمل شرایط فراسردی رفتار بذور ارتدوکس را دارد. در رابطه با نگهداری بذر در فراسرد (°C۱۹۶-)، نتایج نشان داد که پیش‌تیمارهای فراسردی شامل کاهش رطوبت، محلول PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد تأثیر متفاوتی در ذخیره‌سازی بذور در فراسرد (°C۱۹۶-) دارند. تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و محلول PVS2 به‌ترتیب بیشترین تأثیر منفی را در زنده‌مانی، جوانه‌زنی و استقرار بذر در فراسرد و خارج از فراسرد دارند. ریزبودن بذر و نداشتن پوستهٔ محافظ و درصد آب بالا، بذر را به‌شدت در مقابل مواد شیمیایی آسیب‌پذیر کرده است. در تیمار محلول PVS2، موادی مانند DMSO، گلیسرول، ساکاروز و اتیلن گلایکول احتمالاً سبب بروز آثار سوء در بذر شده است. در پاره‌ای موارد به‌دلیل سمّیت بعضی از مواد موجود در محلول این پیش‌تیمار تأثیر منفی در زنده‌مانی نمونه‌های فراسردی دارد (Kuleshova *et al.*, 1999) که نتایج این پژوهش نیز با یافته‌های این پژوهشگران همسو است. در تیمار گلیسرول ۳۰ درصد که بیشترین تأثیر سوء را در جوانه‌زنی بذر داشته است، احتمالاً به‌دلیل نفوذ گلیسرول (به‌دلیل هیدروفوبیک بودن آن) به داخل بذر و ایجاد اختلال در تبادل اکسیژن، گازها و ملکول‌های آب بین فضای درونی و بیرونی بذر قرار گرفته و موجب آثار سوء در جوانه‌زنی بذر پده شده است. این در حالی است که Volk *et al.* (2006) بیان داشتند گلیسرول

برای سلول‌های گیاهی سمی است و اگر مدت طولانی در معرض آن قرار گیرد مشکل‌آفرین می‌شود.

از طرفی نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای (جدول۱ و شکل۱) نشان می‌دهد که تیمار کاهش رطوبت یا Desiccation بهترین پیش‌تیمار برای حفاظت بذر *P. euphratica* در شرایط فراسردی است و با این روش می‌توان بذر این گونه را جمع‌آوری و برای بلندمدت نگهداری کرد. نتایج مثبت و مؤثر این پیش‌تیمار در مقایسه با سایر پیش‌تیمارها، در حفاظت بذر گونه‌های دیگر نیز گزارش شده است (Naderi Shahab *et al.*, 2009).

زنده‌مانی و رشد بذوری که از ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) خارج می‌شوند تحت‌تأثیر درصد رطوبت بذر است. بنابراین، خشک‌کردن بیش از حد بذرها سبب کاهش جوانه‌زنی می‌شود (Walters *et al.*, 2002). در همین رابطه، بهینه‌کردن رطوبت بذر قبل از ورود به شرایط فراسرد اهمیت زیادی دارد (Jitsopakul *et al.*, 2008). در جنس صنوبر (*Populus*) درصورتی‌که نگهداری کلون مورد نظر باشد می‌توان جوانهٔ گونه را با پیش‌تیمار مناسب تیمار و در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-) ذخیره کرد. زنده‌مانی جوانه‌ها پس از خروج از ازت مایع یا شرایط فراسردی در بعضی از گونه‌ها مانند *P. alba* تا ۹۰ درصد گزارش شده است (Lambardi *et al.*, 2000). امکان نگهداری بذر جنس بید (*Salix*) از خانوادهٔ Salicaceae در شرایط فراسرد نیز گزارش شده است (Wood *et al.*, 2003). در رابطه با نگهداری بذر *P. euphratica* در شرایط فراسرد (۱۹۶°C-)، براساس منابع در دسترس، پژوهشی انجام نشده است و این اولین بررسی در زمینهٔ نگهداری بذر این گونهٔ ارزشمند در این شرایط است. در نگهداری بذر این گونه، پیش‌تیمار فراسرد (۱۹۶°C-) نقش اساسی و تعیین‌کننده‌ای در موفقیت کار دارد. بنابراین، کاربرد پیش‌تیماری که مبتنی بر آزمایش‌های هدفمند نباشد، نتیجهٔ مطلوبی نخواهد داشت. از نظر اقتصادی *P. euphratica* توان رقابت با گونه‌های تجاری جنس *Populus* را در زراعت چوب ندارد، لیکن از نظر اکولوژیک، زیست‌محیطی و تحمل شرایط بسیار سختِ عرصه‌های منابع طبیعی مزیت منحصر به‌فردی دارد که گونه‌های تجاری از آن بی‌بهره هستند. بنابراین، به‌دلیل نداشتن مزیت اقتصادی برای تولیدکنندگان چوب و مواد سلولزی، کشت و تکثیر آن در عرصه‌های زراعی کمتر مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه این گونه به‌صورت خودرو در عرصه‌های منابع طبیعی رشد می‌کند و ملکیّت شخصی و محافظ ندارد، در صورت عدم حفاظت به عنوان هیزم و چوب غیرصنعتی توسط افراد برداشت و امکان از بین رفتن گونه و رویشگاه آن وجود دارد. به عنوان مثال طی ۳ سال اخیر به‌دلیل تعرّض افراد به رویشگاه گیاه در ریگ‌بلند کاشان بخشی از رویشگاه این گونه تخریب و امحا شده و باقی‌ماندهٔ آن نیز به‌شدت در معرض تجاوز و تخریب است. علاوه بر این تغییر کاربری عرصه‌های رویشگاهی گیاه، کاهش جریان آب رودخانه‌های بزرگ به‌دلیل اجرای طرح‌های مهار و انتقال آب، افت سطح آب‌های زیرزمینی، آتش‌سوزی و غیره، این گونه را در معرض خطر جدی قرار داده است.

با توجه به نتایج ارزشمندی که برای جوانه‌زنی، استقرار و رشد بذر این گونه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به دست آمده است می‌توان نسبت به تهیهٔ نهال بذری از بذور فراسردی به‌آسانی اقدام کرد. برای حفظ تنوع ژنتیکی این گونه، می‌توان بذر این گونه را از رویشگاه‌های مختلف کشور جمع‌آوری و با روش کاهش رطوبت یا Desiccation تیمار و در شرایط ازت مایع یا فراسرد (۱۹۶°C-) برای مدت زمان بسیار طولانی و در مقیاس هزاران سال (Walters *et al.*, 2004) نگهداری کرد (شکل۲). علاوه بر اینکه با استفاده از روش‌های فراسردی می‌توان بذور هیبرید و بذور حاصل از طرح‌های به‌نژادی ارقام و گونه‌ها را برای استفاده در طرح‌های آتی به‌صورت بلندمدت نگهداری کرد.

سپاسگزاری

از مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور که اعتبار مورد نیاز این پژوهش را که در قالب طرح مصوب «بررسی امکان نگهداری بذر تعدادی از گونه‌های جنگلی در شرایط فراسرد» تأمین کردند، تشکر می‌شود. همچنین از جناب آقای دکتر قمری‌زارع، رئیس وقت محترم بخش زیست‌فناوری مؤسسه، به‌دلیل همکاری در جمع‌آوری بذور و از جناب آقای حسین نیک‌چهره به‌دلیل راهنمایی در تنظیم متن، تشکر و قدردانی می‌گردد.

شکل ۲. استقرار بذور فراسردی *P. euphratica* در شرایط گلخانه

REFERENCES

1. Blakesley, D. & Kiernan, R.J. (2001). Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis X Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *CryoLetters*, 22 (1), 13-18.
2. Calagari, M., Jafari Mofidabadi, A., Tabari, M. & Hoseini, S.M. (2007). Genetic variation on natural population of *Populus euphratica* Oliv. by peroxidase isoenzyme. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 15(2), 115-122.
3. Calagari, M., Jafari Mofidabadi, A., Tabari, M. & Hosseini, S.M. (2004). Intraspecific hybridization of *Populus euphratica* Oliv. using *in vitro* technique. *Journal of Science*, 15(2), 109-112.
4. Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H. H., Rao, V.R. & Engelmann, F. (2002a). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation- dehydration. *CryoLetters*, 23(5), 325-332.
5. Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H.H., Rao, V.R. & Engelmann, F. (2002b). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification soulution. *CryoLetters*, 23(5), 317-324.
6. González-Benito, M.E., Aguilar, N. & Avila, T. (2009). Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. *CryoLetters*, 30(2), 142-147.
7. Jafari, M.A. & Klagary, M. (2004). Inter and intra specific hybridization in *Populus euphratica* Oliv. Through ovary and ovule culture. Proceeding of *the Fourth International Iran & Russia Conference*, pp. 159-163.
8. Jitsopakul, N., Tammasiri, K. & Ishikawa, K. (2008). Cryopreservation of *Bletilla striata* seeds, 3-day germinating seeds and protocorms by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29(6), 517-526.
9. Lambardi, M., Fabbri, A. & 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.
10. Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. (1994). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant. *Plant Cell Report*, 13, 442-446.
11. Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. & 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.
12. Mofidabadi, A.J., Jourabchi, A., Shahrzad, S. & Mahmodi, F. (2001). New genotypes development of *Populus euphratica* Oliv. Using gametoclonal variation. *Silvae Genetica*, 50(5-6), 257-279.
13. Mofidabadi, A.J., Modir-Rahmati, A.R. & Tavesoli, A. (1998). Application of ovary and ovule culture in *Populus alba* L. x *P. euphratica* Oliv. hybridization. *Silvae Genetica*, 47(5-6), 332-334.
14. Naderi Shahab, M., Hatami, F., Tabari, M. & Jafari, A.A. (2009). Cryopreservation and evaluation of chinese arbor-vitae (*Biota orientalis*) Seeds. *Journal of New Seeds*, 10(4), 264-276.
15. Sabeti, H. (2006). *Forests trees and shrubs of Iran*. (4th ed.) Publication of Yazd University. pp: 536.
16. Saito, Y., Shiraishi, S., Tanimoto, T., Yin, L., Watanabe, S. & Ide, Y. (2002). Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis. *New Forests*, 23(2), 97-103.
17. Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. (1991). Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to –196°C. *Journal of Plant Physiology*, 137, 465-470.

18. Soleimani, A., Etemad, V., Kalagari, M., Namiranian, M. & Shirvani, A. (2011). Germination percentage of *Populus euphratica* Oliv. originated from different provenances and comparing seedling production in greenhouse and *in vitro* cultures. *Journal of Forest and Wood Products* (JFWP), *Iranian Journal of Natural Resources*, 63(4), 387-397.
19. Walters, C., Touchell, D.H., Power, P., Wesley-Smith, J. & Antolin, M.F. (2002). A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. *CryoLetters*, 23, 291-298.
20. Walters, C., Wheeler, L.J. & Stanwood, P.C. (2004). Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48, 229-244.
21. Wang, Z.H. & Deng, X.X. (2004). Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *CryoLetters*, 25, 43-50.
22. Wen, B. & Song, S. (2007). Acquisition and loss of cryotolerance in *livistona chinensis* embryos during seed development. *CryoLetters*, 28(4), 291-302.
23. Wood, C.B., Pritchard, H.W. & Lindegaard, K. (2003). Seed cryopreservation and longevity of tow *Salix* hybrids. *CryoLetters*, 24, 17-26.
24. Volk, G.M., Harris, J.L. & Rotindo, K.E. (2006). Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52, 305-308.