

ذخیره سازی بذور گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum L.*) در شرایط فراسرد (ازت مایع)

فریده صالح، شهین مهرپور

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه علوم گیاهی

استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

چکیده

گیاهان نیز همانند کلیه موجودات زنده با سرعتی هشدار دهنده در معرض خطر فرسایش ژنتیکی و انقراض هستند. آگاهی از فرسایش تنوع گیاهی، حفظ تنوع گونه‌ای و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی را هرچه بیشتر ضروری ساخته است. تکنولوژی (Cryopreservation) نگه داری در دمای -196°C درجه سانتی گراد (نیترژن مایع) یکی از مناسب‌ترین و ایمن‌ترین ابزار برای حفظ ژرم پلاسما گونه‌های گیاهی شامل بذر وبافت‌ها و یاخته‌های گیاهی می‌باشد. در این درجه از سرما فرایندهای متابولیکی و فعالیت‌های فیزیولوژیک بذر یا اندام گیاهی تقریباً متوقف و بذر و اندام گیاهی قادر به زنده‌مانی در دوره‌های نامحدود زمانی می‌باشد.

طی این پژوهش به منظور نگه داری بذور گیاه دارویی خار مریم *Silybum marianum* از خانواده *Asteraceae* در شرایط فراسرد از پیش تیمارهای گلیسرول ۳۰٪ و محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (Plant Vitrification Solution 2) و آب‌گیری (Desiccation) بذور استفاده شد. کلیه تیمارها پس از گذشت یک هفته از ازت مایع خارج و به مدت دو دقیقه در حمام آب گرم 42°C درجه ذوب و سپس جهت حذف مواد محافظ سرمایی سه مرتبه با آب یک بار تقطیر استریل شسته شدند. بذرها در ظروف پتری دیش استریل بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند و به ژرمیناتور با دمای 24°C درجه سانتی گراد و رژیم نوری $16/8$ ساعت منتقل شدند. در بررسی‌های آزمایشگاهی درصد جوانه زنی و طول اندام‌های رویشی اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج نشان داد که قدرت زنده‌مانی بذور گیاه خار مریم در ازت مایع در هر سه تیمار حفظ شده و بیشترین درصد زنده‌مانی (۹۳ درصد) در تیمار آب‌گیری نسبت به شاهد (۷۰ درصد) مشاهده شد. میانگین طول دانه رست هادر بذرها تحت تیمار پس از احیا معنی‌دار بوده و در تیمار ویتریفیکاسیون بیشترین و برابر با $101/13$ میلی‌متر و در تیمارهای گلیسرول و آب‌گیری و شاهد به ترتیب برابر با $96/82$ و $85/69$ و $47/38$ میلی‌متر مشاهده شد.

نتایج ما با نتایج دانشمندان دیگر در زنده‌مانی بذور در ازت مایع هم‌سو می‌باشد (Zhai et al., 2003; Dixit et al., 2003; Sanchez et al., 2008,...)

مقاومت به سرما پس از آب گیری و باقی ماندن در حالت سکون با حضور پروتئین های ویژه ای همچون پروتئین تأخیر جنین زایی، پروتئین های شوک حرارتی و پروتئین های ذخیره بذر مرتبط می باشد و رابطه نزدیکی بین میزان معین این دسته از پروتئین ها و طول عمر بذر وجود دارد (Rajjou & Debeaujon, 2008). نتایج ما با نتایج دانشمندان دیگر در زنده مانی بذر در ازت مایع هم سو می باشد (Zhai et al., 2003; Dixit et al., 2003; Sanchez et al., 2008,...). بنابراین تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation) با بیشترین بازدهی که از نظر سهولت و عدم نیاز به مواد شیمیایی نیز روشی ساده تری می باشد، در مقیاس کاربردی به عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین مطمئن برای نگه داری طولانی مدت بذر گیاه خارمریم و سایر بذر ارتودکس (با درصد رطوبت کم) در مراکز نگه داری ذخایر ژرم پلاسما گیاهی پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: ازت مایع، فراسرد، محلول ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰٪، خارمریم، PVS2, Cryopreservation.

مقدمه

نقاط دیگر به ظاهر برگ حالتی شبیه به سنگ مرمر می

دهد.

، قرون اولیه دو گیاه شناس باستان Elder , Pliny برای کاهش صفا استفاده از خارمریم را توصیه کردند و سقراط بیان کرد که جوشانده بذرهای خارمریم برای مالخولیا و نیش مار مفید است. گیاه شناس قرن شانزدهم Gerard با سقراط در این زمینه موافق بود و اظهار داشت که ریشه های خارمریم مالخولیا را درمان کرده و تمام بیماری های مرتبط با آن را هم درمان می کند.

گفته شده است که خارمریم به وسیله ی سربازان رومی که به اروپا سفر می کردند به انگلستان برده شده است و بذرها، برگ ها، ساقه ها و ریشه ی آن به عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می گرفته و به همین دلیل به گیاه دارویی مهربان معروف بوده است. در قرن هفدهم گیاه

گیاه خارمریم یا کنگر ابلقی به نام علمی *Silybum (L.)*

marianum که در گذشته به نام *Carduus*

marianus(L.) شناخته می شد متعلق به خانواده

Asteraceae و جنس *Silybum* است. خارمریم گیاهی

مدیترانه ای است یک ساله یا دو ساله، دارای ریشه ضخیم

و ساقه ای منشعب، کرکی و به رنگ قهوه ای کم رنگ می

باشد. ساقه آن نیز مستقیم است و انشعابات زیادی

دارد. ارتفاع ساقه ۱۵۰ تا ۲۵۰ سانتی متر است. برگ آن

براق، دانه دار با رگ برگ های سفید می باشد و حاشیه

برگ ها دارای خارهای زرد نوک تیز است. برگ ها پهن و

شکننده هستند و در اوایل رویش به شکل روزت روی

زمین قرار می گیرند. دمبرگ ها بلند، بیضی شکل و

خاردار می باشند. وجود لکه های سبز رنگ کلروفیل دار

در بعضی نقاط سطح برگ و عدم وجود کلروفیل در برخی

شناس بریتانیایی نیکولاس کلایپر اظهار داشت که کنگر ابلقی برای پیش گیری از تب مالاریا و طاعون موثر است. او معتقد بود که این گیاه محرک ادرار است و سنگ کلیه را خرد کرده و از کلیه خارج می کند او عقیده داشت که خارمریم برای دردهای پهلوی و بیماری های کبد سودمند می باشد و جوشیده ریشه تازه و بذرها نه تنها برای درمان یرقان بلکه برای کمپرس کبد مفید و خوردن گیاه جوان به صورت پخته در بهار به عنوان تصفیه کننده خون سودمند است. (Nice,2000)

گیاه شناسان بعدی بیان کردند که تمامی قسمت های گیاه خارمریم اشتها را زیاد نموده و هضم غذا را بهبود بخشیده و سوء هاضمه را برطرف می کند. مشکلات قاعدگی، سختی و درد در هنگام خروج ادرار، زخم معده و گشادی سیاهرگ ها همگی می توانند با استفاده از پودر بذرها بهبود می یابند. بومیان آمریکایی خارمریم را به عنوان برطرف کننده جوش و محافظ پوست از بیماری ها و بعضی از انواع مسمومیت مورد استفاده قرار می دادند. با تاسیس دانشکده پزشکی پنسیلوانیا در اواخر دهه ی ۱۸۰۰، خارمریم به عنوان یک گیاه دارویی مهم مطرح شد (Nice,2000).

کاربردهای اصلی خارمریم برای درمان بیماری های کبدی مانند ناخوشی های الکلی، انواع هپاتیت (ناشی از عفونت های ویروسی یا تحریکات دارویی) یا مشکلات کبدی مرتبط با بیماری های قند بکار می رود (کارمن تامایو، ۲۰۰۷).

ایران با داشتن حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی گل دار که از این تعداد نزدیک به ۲۰۰۰ گونه آن بومی می باشند از نظر تعداد و تنوع گونه های گیاهی از جمله کشورهای غنی است. حفظ ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از فرسایش و انقراض این گونه ها به ویژه گونه های بومی و در حال خطر از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در شرایط متعارف حفظ و نگهداری این گونه ها به شیوه های مختلفی صورت می گیرد که از مهم ترین آن ها نگهداری بذور گونه ها در بانک ژن و در شرایط نزدیک به صفر و یا حدود ۲۰- درجه سانتی گراد است. مدت زمان نگهداری در این شرایط کوتاه بوده و پس از یک دوره ۱۰-۲۰ ساله نیاز به بازکشت یا تجدید بذور ذخیره شده می باشد که اضافه بر مشکلات فنی هزینه های تجدید کشت بذور امری مشکل و پر هزینه است. بعلاوه در گونه هایی که به صورت کلون تکثیر می گردند امکان نگهداری آن ها در شرایط یاد شده وجود ندارد و حفظ این گونه ها عملاً در شرایط فوق امکان پذیر نمی باشد.

تکنولوژی استفاده از دمای فراسرد (۱۹۶- درجه سانتیگراد) نخستین بار به دلیل موفقیت در نگه داری میکروارگانیسم ها جنبه کاربردی پیدا کرد و به دنبال آن استفاده از این تکنولوژی در انجماد یاخته های جنسی و بعضی از اندام های موجودات عالی مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این تحقیق بررسی امکان نگه داری بذور در ۱۹۶- درجه سانتی گراد با بهره گیری از نیتروژن مایع است.

طی این پژوهش استفاده از تکنولوژی نگه داری در دمای فراسرد (Cryopreservation) و فاکتورها و تیمارهای موثر در نگه داری طولانی مدت بذور در شرایط فراسرد که شامل مواد مختلف محافظت کننده در برابر سرما مانند گلیسرول و محیط هایی از قبیل محلول ویتریفیکاسیون گیاهی و روش آب گیری می باشد به تفکیک و به طور مجزا بر روی گونه های گیاهی مورد تجربه قرار میگیرد.

هدف از این تحقیق ذخیره سازی بذور گیاه دارویی *Silybum marianum* در شرایط فراسرد به روش بهینه می باشد. انتظار می رود با اجرای موفقیت آمیز این پژوهش بتوان مدت زمان نگه داری ذخایر توارثی این گیاه را صدها سال افزایش داد و ضمن افزایش ضریب اطمینان حفاظت از این ذخایر با تهیه تجهیزات ساده و هزینه نگه داری ناچیز اقدام به نگه داری این گونه گیاهی در حجم انبوه کرد.

مواد و روش ها

منشا بذور *خارمریم* از شرکت پاکان بذور اصفهان می باشد که در سردخانه ی آزمایشگاه با دمای 4°C + نگه داری شدند.

پروتکل نگه داری بذور در شرایط فراسرد: انواع پیش تیمار

۱. نمونه های شاهد (Control):

بذور بدون هیچ پیش تیماری (شاهد) پس از قرارگیری در لوله های درب دار پلاستیکی (فالكون) برای مدت زمان یک هفته، در محیط سردخانه (4°C) نگه داری شدند.

۲. تیمار ویتریفیکاسیون (vitrification):

در این تیمار از دو محلول PVS2 شامل: ساکاروز ۰/۴ Sucrose، گلیسرول 30 Glycerol درصد، اتیلن گلیکول 15 Ethylen glycol درصد، دی متیل سولفوکساید 15 DMSO درصد Loading شامل: گلیسرول (Glycerol) ۲ مول، ساکاروز (Sucrose) ۰/۴ مول به عنوان پیش تیمار استفاده شد. بذور داخل فالكون ها ریخته و به آنها محلول Loading اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 22°C درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ۲۰ دقیقه محلول Loading تخلیه و به فالكون های حاوی بذر محلول PVS2 سرد (دمای 4°C) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C قرار گرفتند، سپس فالكون ها وارد ازت مایع شدند.

۳. تیمار کاهش رطوبت بذور (Desiccation):

در این تیمار وزن تر بذر از طریق تعیین وزن اولیه با ترازوی حساس (۰/۰۰۰۱) و سپس قرار دادن بذور به مدت ۷۲ ساعت در آون 92°C و محاسبه اختلاف وزن قبل و بعد از آون، مشخص گردید رطوبت کل بذر معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

$$\text{درصد کل رطوبت} = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تازه}}{\text{وزن تازه}} \times 100$$

در تیمار کاهش رطوبت بذر مقدار رطوبت کاهش یافته از طریق قرار دادن بذور به مدت یک هفته در دسیکاتور تعیین شد. برای این کار نخست بذور پس از توزین، به دستگاه دسیکاتور حاوی ۳۰۰ گرم سیلیکاژل (۱۰ برابر

وزن بذر) منتقل و سپس هوای داخل دسیکاتور تخلیه و دسیکاتور به مدت یک هفته در دمای 4°C + قرار داده شدند. پس از یک هفته، بذر از دسیکاتور خارج و مجدداً توزین گردید. درصد کاهش رطوبت بذرهای پس از خروج از دسیکاتور، محاسبه شد. بذرهای خارج شده از دسیکاتور داخل یک کرایوتیوپ قرار داده شد و پس از آن درازت مایع غوطه ور شدند.

۴. تیمار گلیسرول ۳۰ درصد :

در این تیمار، بذرهای به درون کرایوتیوپ ها منتقل و در کرایوتیوپ ها توسط گلیسرول ۳۰ درصد پر شده و در دمای 22°C + به مدت ۲۰ دقیقه نگه داری و سپس در ازت مایع غوطه ور گشتند.

تیمارها به مدت یک هفته در ازت مایع 196°C - قرار گرفتند. پس از یک هفته تیمارها از ازت مایع خارج و به مدت ۲ دقیقه در حمام آب با دمای 42°C + (شوگ حرارتی) در بن ماری قرار گرفتند.

پس از انجام مراحل ضد عفونی، تیمارها همراه با بذر شاهد به پتری دیش های حاوی یک لایه کاغذ صافی منتقل شدند. و به هر پتری، 6 ml آب مقطر افزوده شد. نمونه ها به ژرمیناتور با دمای 24°C + منتقل شدند.

این طرح در قالب بلوک کاملاً تصادفی، مشتمل بر ۴ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ۳۰ عدد بذر قرار گرفت.

جوانه زنی بذر و تشکیل دانه رست ها، مجموعاً ۴ هفته به طول انجامید که در این مدت ۴ بار تیمارها بررسی و میزان آلودگی و تعداد بذرهای جوانه زده ثبت گردید.

پس از گذشت ۴ هفته، طول ساقه چه، ریشه چه و دانه رست ها اندازه گیری و ثبت گردیدند. سپس شاخص هایی همچون درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی، بنیه رشد بذر و نسبت ریشه چه به ساقه چه، محاسبه و نتایج به وسیله نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل و میانگین داده ها به وسیله آزمون چند دامنه ای دانکن، با هم مقایسه شدند (جبلی، نادری شهاب ۱۳۹۳).

بنیه رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید

(Abdul-Baki and Anderson, 1973):

(طول دانه رست) × درصد جوانه زنی = بنیه رشد بذر

نتایج

در هر سه تیمار بذر قوه زنده مانی خود را حفظ نموده و درصد جوانه زنی در تیمارهای آب گیری، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰٪ و شاهد به ترتیب برابر ۹۳٪، ۴۷٪، ۴۲٪ و ۷۰٪ درصد مشاهده شد.

میانگین طول ریشه در گیاه خارمریم پس از تیمار فراسرد در تیمار ویتریفیکاسیون بیشترین و برابر با ۶۳/۶۶ میلی متر و در تیمارهای گلیسرول و آب گیری به ترتیب برابر با ۶۰/۸۸ و ۳۷/۹۱ میلی متر می باشد و در نمونه های شاهد میزان آن کم ترین و برابر با ۲۳/۹۲ میلی متر می باشد. میانگین طول دانه رست در بذرهای تحت تیمار

دانه رست در نمونه شاهد کمترین و برابر ۱۵/۱۵ میلی متر می باشد.

دربرسی ها می توان مشاهده کرد که همواره در تمام صفات گروه شاهد کمترین میزان بازده را دارد.

درصد بالای جوانه زنی ۹۳٪ در تیمار آب گیری درمقابل شاهد (۷۰٪) نشان می دهد که ذخیره سازی بذور گیاه خارمریم با تیمار آب گیری در ازت مایع نه تنها بر زنده مانی بذور اثر منفی ندارد بلکه باعث افزایش درصد جوانه زنی بذور و همچنین افزایش رشد دانه رست ها پس از خروج از تیمار فراسرد می شود.

فراسرد پس از احیا معنی دار بوده و در تیمار ویتریفیکاسیون میانگین بیشترین و برابر با ۱۰۱/۱۳ میلی

متر و در تیمارهای گلیسرول و آبگیری به ترتیب برابر با ۹۶/۸۲ و ۸۵/۶۹ میلی متر می باشد. میانگین طول دانه

رست در نمونه شاهد کمترین و برابر ۴۷/۳۸ میلی متر می باشد. بیشترین میانگین طول ساقه دانه رست ها در

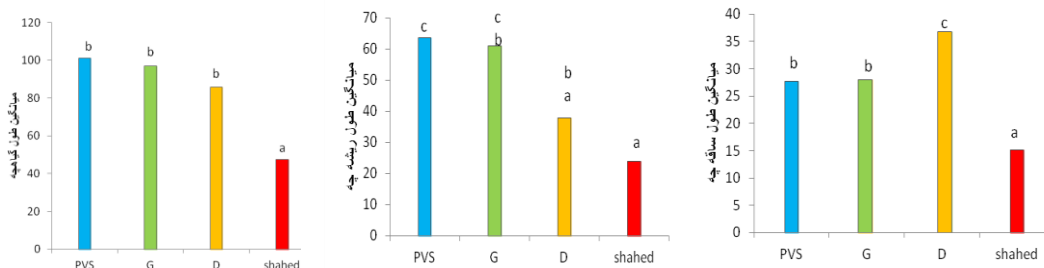
بذرهای تحت تیمار فراسرد پس از احیا معنی دار بوده و در تیمار آبگیری میانگین بیشترین و برابر با ۳۶/۷۱ میلی

متر و در تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول به ترتیب برابر با ۲۷/۶۳ و ۲۷/۹۱ میلی متر می باشد. میانگین طول

جدول-۱: مقایسه میانگین اثر پیش تیمار ها بر نگه داری بذور خارمریم در فراسرد پس از خروج از ازت مایع

بذریه بذریه	طول ریشه چه به ساقه چه	طول دانه رست	طول ریشه چه	طول ساقه چه	درصد جوانه زنی	
۳۳/۱۶	۱/۵۷	a ۴۷/۳۸	a ۲۳/۹۲	a ۱۵/۱۵	٪۷۰	شاهد
۴۷/۵۳	۲/۳۰	b ۱۰۱/۱۳	c ۶۳/۶۶	b ۲۷/۶۳	٪۴۷	PVS2
۴۰/۶۶	۲/۱۸	b ۹۶/۸۲	bc ۶۰/۸۸	b ۲۷/۹۱	٪۴۲	گلیسرول ۳۰٪
۷۹/۶۹	۱/۰۳	b ۸۵/۶۹	ab ۳۷/۹۱	c ۳۶/۷۱	٪۹۳	آب گیری

تیمارهایی که دارای حروف مشابه می باشند براساس آزمون چند دامنه ای دانکن، اختلاف معنی داری ندارند.



نمودار-۱: نمودارهای میانگین طول ساقه چه (mm)، طول ریشه چه (mm)، طول دانه رست (mm)

بحث

درزمینه سمیت مواد موجود در PVS2 بعضی از گزارش ها نشان می دهند که مواد محلول موجود در آن مانند اتیلن گلیکول تاثیر منفی در نگه داری نمونه درفراسرد دارد (Kuleshova et al., 1999).

این در حالی است که بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر روی گونه هایی مانند موز، ارکیده، آناناس (Thin, 1997)، توت فرنگی (Hirai et al., 1998) و سپیدار (Lambardi et al., 2000) اثر مثبت این تیمار گزارش شده است.

از گلیسرول با غلظت های مختلف به عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده میشود (Jeyendran et al., 1985).

این ماده تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را به آرامی پایین می آورد. به همین علت به عنوان ماده محافظ یا Cryoprotectant استفاده می شود، پیش تیمار گلیسرول 30 درصد در حفاظت تفاوتی با سایر تیمارها نداشته است بررسی های محققان دیگر نیز نشان می دهد که قرار گرفتن بذور یانمونه های گیاهی در

بذرهای گونه *S. marianum* پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه های شاهد قادر به جوانه زنی بودند. با توجه به امکان زنده مانی بذرها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد می توان بذرهای این گونه را جزو بذرهای ارتودکس (Orthodox) قرارداد.

(Roberts and Ellis, 1989; Engelman, 1990)

همچنین تفاوت معنی داری از نظر طول ریشه چه، طول ساقه چه، طول دانه رست، شاخص بنیه بذر (VI) و نسبت طول ریشه چه به ساقه چه بین بذور شاهد و تیمارهای ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول و کاهش رطوبت بذر مشاهده نشد.

در تیمار ویتریفیکاسیون آب موجود در نمونه ها از حالت مایع وارد یک فاز شیشه ای بی شکل می شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگه داری بافت های گیاهی در نیتروژن مایع بدون شکل گیری کریستال های یخی امکان پذیر خواهد بود.

(Wang et al., 2005; Gale et al., 2008)

شرایط فراسرد، در گیاهان تغییرات ژنتیکی ایجاد نمی کند

(Zhai et al., 2003; Dixit et al., 2003; Sanchez et al., 2008) قرارگیری بذر کاهو (Walters et al., 2004) و جوانه انتهایی سیب زمینی (Mix-Wagner et al., 2003) در نیتروژن مایع، به دلیل کاهش فعالیت های متابولیکی و حیاتی نمونه گیاهی مدت زمان زنده مانی به شدت افزایش می یابد. با محاسبات ترمودینامیکی انجام شده بر روی بذر کاهو که در شرایط دمایی پایین نگه داری گردیدند، نیمه عمر جوانه زنی این گونه 3500 سال برآورد گردید.

بر اساس تئوری، در صورتی که بذر در محیط ازت مایع زنده بماند، نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگه داری در کوتاه مدت و میان مدت وجود داشته باشد. زیرا با کاهش شدید فعالیت های متابولیکی و حیاتی، مسئله زمان منتفی می گردد.

Popov و همکاران (2006) نیز نشان دادند که یاخته های های هویج پس از 25 سال ذخیره در ازت مایع قابلیت تجدید حیات خود را حفظ می نمایند.

شاخص قدرت بذر نشان دهنده هم زمان قدرت جوانه زنی و قدرت رویش بذر است که منجر به عمل کرد بالاتر می شود. این شاخص در واقع بیانگر توانایی بالقوه بذر در ایجاد بیشینه گیاه در کوتاه ترین زمان ممکن در شرایط محیطی متغیر می باشد (Gelmond et al., 1978)، مقیاس دقیق و مناسبی برای آزمون کیفیت بذر و تحت تاثیر عوامل محیطی (Fu et al., 1994) مختلفی

همچون دما، رطوبت و غلظت اکسیژن و دی اکسید کربن می باشد. (Roberts, 1972) گزارش شده است که شاخص قدرت بذری که به مدت طولانی در سردخانه ۲۰ - درجه سانتی گراد نگه داری شده اند، تغییری نکرده است و شاخص قدرت بذر چهار گونه گیاه از خانواده چلیپاییان (Meng et al., 2003) که به مدت ۲۴ تا ۳۰ سال در دمای ۱۰ - درجه سانتی گراد و محتوای رطوبتی ۳ درصد نگه داری شده بودند، در مقایسه با نگه داری در دمای ۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۸ درصد، بیشتر حفظ. (Maselli et al., 1999) شده است. همچنین شاخص قدرت بذر پیاز نگه داری شده در دمای فراسرد نسبت به بذرها نگه داری 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 نگه داری در شرایط فراسرد، قدرت بذر حفظ می شود، مطابقت دارد.

(Hampton and Tekrony, 1995).

با افزایش دمای نگه داری بذر، طول دانه رست کاهش میابد علت آن می تواند ناشی از زوال تدریجی و تجزیه شیمیایی ترکیبات بذر باشد که در طی فرایند خسارت اکسیداتیو رخ می دهد 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 نگه داری در دمای فراسرد، می تواند باعث افزایش ویسکوزیته یاخته ای و تغییر شکل سیتوپلاسم به حالت شیشه ای شده

بود. . لذا از این روش که از نظر سادگی و سهولت و عدم نیاز به مواد شیمیایی روشی ساده تری می باشد، می توان در مقیاس کاربردی به عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین مناسب و مطمئن برای نگه داری طولانی مدت بذور گیاه خارمریم در مراکز نگه داری ذخیره ژرم پلاسمی استفاده نمود.

منابع

۱. ابراهیمی رستاقی، م، اسدی اتویی، ع، هدایتی، م.، تهرانی، م.، جهاندار، ج.، ترابی ورکی، ب. ۱۳۸۲. کیمیای سبز. انتشارات سازمان جنگل ها مراتع و اخیزداری کشور، معاونت امور جنگل. ص ۳۶۸.
۲. احمدی، ر. ۱۳۸۶. بررسی امکان نگهداری جوانه های انتهایی، بذر و سلول های *scale motanum* در شرایط فراسرد. پایایانامه کارشناسی ارشد. دانشگاه پیام نور تهران.
۳. بیگم فقیر، محمد ۱۳۸۰. تیره های گیاهان گلدار. انتشارات دانشگاه گیلان.
۴. جلی م.، م.، ع.، نادری شهاب، ع.، ا.، جعفری ف.، حاتمی، نگهداری بذر اقا قیا *Robinia pseudoacacia L* در شرایط فراسرد، مجله جنگل ایران، جنگلبنای ایران، سال ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۲۴۵ تا ۲۵۴

(Buitink & Leprince, 2008) در نتیجه از زوال تدریجی بذر جلوگیری می کند. (Sun & Leopold, 1994)

استفاده از تیمار کاهش رطوبت با هدف تقلیل رطوبت بذر تأثیر مثبتی در حفظ و زنده مانی بذرها قبل از ورود به دمای °C ۱۹۶- داشت. در این بررسی مشاهده شد که این تیمار همانند تیمارهای دیگر باعث حفاظت از بذر در شرایط فراسرد می شود. مقاومت به سرما پس از آب گیری و باقی ماندن در حالت سکون با حضور پروتئین های ویژه ای همچون پروتئین تأخیر جنین زایی، پروتئین های شوک حرارتی و پروتئین های ذخیره بذر مرتبط می باشد. بنابراین به نظر می رسد رابطه نزدیکی بین میزان معین این دسته از پروتئین ها و طول عمر بذر وجود دارد (Rajjou & Debeaujon, 2008)

(Whittle و Beardmore (۲۰۰۵) نیز در همین رابطه بکارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذر موفقیت آمیز گزارش نمودند.

(Cho et al., 2002; Stewart et al., 2001) این یافته های محققان در اغلب صفات همسو با نتایج تحقیقات حاضر بودند.

جمع بندی نتایج آزمایشگاهی تیمارها نشان داد که با قرار گرفتن بذور در نیتروژن مایع بعضی از صفات تغییر معنی داری نشان ندادند. بنابراین این از بین تیمارهای مختلف، تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation) مناسب ترین تیمار برای نگه داری بذور در شرایط فراسرد

۵. حاتمی ، ف.، م.، ع.، نادری شهاب، م.، جبلی، ع.، قمری زارع، م.، طبری، م.، ح.، عصاره، بررسی امکان نگهداری بذر گونه *Eucalyptus microtheca* در شرایط فراسرد، فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، (۱۳۸۸) سال هفدهم، شماره ۴ (پیاپی ۳۸)
۶. رضایی نژاد، ع.، ۱۳۸۰. فرهنگ کامل گیاه شناسی، حشره شناسی و زیست شناسی. انتشارات کارنگ. ص ۶۷۸.
۷. شاهمادی، امرعلی ۱۳۸۳. طرح تحقیقاتی آت اکولوژی *Secale montanum* و *Alopecurus textiles* در استان زنجان. گزارش نهایی، انتشارات مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان.
۸. عبادی، ع.، س.، م.، سیدی م.، سلطانی نژاد، (۱۳۹۳) ، استفاده از فناوری فراسرد برای نگهداری بذور پسته *Pistacia vera L*، اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران
۹. قمری زارع، ع.، نادری شهاب، م.، نبی، ع.، شهرزاد، ش.، عصاره، م.، ح ۱۳۸۶. نگهداری بذر، جوانه های انتهایی و جانبی و سلول های گیاهی حاصل از کشت بافت، روشی برای حفاظ بلند مدت ذخایر ژنتیکی گیاهی. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلام ایران. ص ۶۸-۷۱
۱۰. قمری زارع ، ع.، ش.، شهرزاد، م.، ع.، نادری شهاب، (۱۳۹۰) ، حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهان منابع طبیعی ایران در شرایط دمایی فراسرد، کنگره ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی
۱۱. قهرمان، ا. ۱۳۶۵. فلور ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.
۱۲. قهرمان، احمد ۱۳۷۶. فلور رنگی ایران. جلد شانزدهم، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.
۱۳. کریمی، ه. ۱۳۸۱. فرهنگ رستنی های ایران. انتشارات پرچم. ص ۹۸۸.
۱۴. کریمی، هادی ۱۳۷۵. گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۷۱۴.
۱۵. کریمی، هادی ۱۳۷۸. مرتعداری. انتشارات دانشگاه تهران.
۱۶. کریمی، هادی ۱۳۸۶. فرهنگ رستنی های ایران. جلد چهارم، انتشارات نشر علوم کشاورزی، صفحه ۴۱۷.
۱۷. کریمی، هادی، ۱۳۷۵. زراعت و اصلاح گیاهان علوفه ای. انتشارات دانشگاه تهران.
۱۸. کلاهدوزان ، م.، ع.، قمری زارع ، ش.، شهرزاد ، خ.، کیارستمی ، حفاظت بذرهاي *Medicago rigidula* در فراسرد با استفاده از دو

with incipient freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion bulb scale tissue. *Plant Physiology* 95: 846-852.

Arora R. and Wisniewski M.E., ۲۶ 1995. Ultrastructural and protein changes in cell suspension cultures of peach associated with low temperature-induced cold acclimation and abscisic acid treatment. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 40: 17-24.

Chen T.H.H., Kartha, K.K., and ۲۷ Gusta, L.V., 1985. Cryopreservation of wheat suspension. Culture and regenerate callus. *Plant Cell, Tissue and organ cult* 4: 101-109.

Cho E., Hor Y.L., Kim H.H, and ۲۸ Rao V.R. 2001. Cryopreservation of *Citrus madurensis* zygotic axes by vitrification: Importance of pergrowth and preculture conditions. *CryoLetters* 22(6): 391-396.

Close, T.J., 1997. Dehydrins: a ۲۹ commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol plant* 1997, 100: 291-296.

Crowe, J.H., Carpenter, J.F. and ۳۰ Crow, L.M., 1998. The role of

روش شیشه ای شدن و کپسوله کردن -
آبگیری ، تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان
مرتعی و جنگلی

ایران : ، 1388 دوره ، 17 شماره) 1 پی‌اپی
۳۳ (؛ از صفحه 50 تا صفحه 60)

۱۹. مبین، صادق ۱۳۷۸. رستنی های ایران. فلور
گیاهان آوندی، جلد اول، موسسه انتشارات و
چاپ دانشگاه تهران، صفحه ۵۰۰.

۲۰. مظفریان، ولی الله ۱۳۷۵. فرهنگ نام های ایران.
نشر فرهنگ معاصر، صفحه ۶۷۰.

Alcor Life Extension Foundation, ۲۱
2007. [Http://www.alcor.org](http://www.alcor.org)

Answer.com web site, 2007. ۲۲
<http://www.answer.com>

Antikainen M., Griffith M., Zhang ۲۳
j., Hon W.C., yang D.S.C. and
Pihakaskimaunsbach K., 1996.
Immunolocalization of antifreeze
proteins in winter rye leaves,
crowns, and roots by tissue
printing. *Plant Physiology* 110:
845-857.

Arny D.C., Lindow S.E., and ۲۴
Upper C.D., 1976. Frost sensitivity
in *zea mays* increased by
application of *Pseudomonas*
syringae. *Nature* 262:282-284.

Arora R. and Palt J.P., 1991. A loss ۲۵
in the plasma membrane ATPase
activity and its recovery coincides

- encapsulation-dehydration.
CryoLetters 27: 235-242.
- Gonzalez-Benito M.E., and Perez- ٣٥
Garoya F., 2002, Cryopreservation
of lipid-rich seed: effect of
moisture content and cooling rate
on germination. CryoLetters 22 (2):
135-140.
- Ishokawa, K., Harata, K., Mii, M. ٣٦
and Sakai, A. 1997.
Cryopreservation of zygotic
embryos of a Japanese terrestrial
orchid (*Bletilla striata*) by
vitrification. Plant Cell Reports,
16: 754-757.
- Panis B., Lambardi m., 2005. ٣٧
Status of cryopreservation
technologies in plants (crops and
forest trees), the role of
biotechnology. Villa Gualino,
Turin, Italy, 5-7 March, 2005.
- Popov A.S., Popova E.v., nikishina ٣٨
T.V. and Klomeyrseva G.L., 2004.
The development of juvenile plants
of the hybrid Orchid *bratonia* after
seed cryopreservation. CryoLetters
23(6): 205-212.
- Thammasiri K., 2000. ٣٩
Cryopreservation of seeds of a Thai
Orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl).
CryoLetters 21(4): 237-244.
- Touchell, D.H., Chiang, V.L. and ٤٠
Tsai, C.J., 2002. Cryopreservation
vitrification in anhydrobiosis. Ann.
Rev. physiol. Vol. 60. P. 73-103.
- Cyr, D.R., 2000. Cryopreservation: ٣١
roles in coal propagation and
germplasm conservation of
conifers In: F. Engelmann and H.
Takagi (eds), Cryopreservation of
Tropical Plant Germplasm.
International Plant Genetic
Resources Institute Rome, pp: 261-
268.
- El-Itriby, H. 2004. Inviation to the ٣٢
5th ISTA/FAO Workshop on
Electrophoretic Methods and PCR-
Techniques for Variety
Verification and GMO Detection.
Agriculture Genetic Engineering
Research Institute (AGERI), Giza,
Egypt.
- Engelmann, F. 1990. Use of ٣٣
cryopreservation for plant
germplasm long-term conservation
case history: Oil Palm somatic
embryos. International Journal of
Refrigeration, 13(1): 26-30.
- Flashland, E., Terada, G., Soccho, ٣٤
Ray, H., Morginski, I. and
Engelmann, F. 2006.
Cryopreservation of seeds and in
vitro-cultured protocorm of
Oncidium bifolium Sims.
(ORCHIDACEAE) by

- D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds). Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 133-137). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.
- Wood C.B., Pritchard H,W. and Miller A.P., 2000. Simultaneous preservation of Orchid seed and its Fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *CryoLetters* 21(2): 125-136.
- of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Reports* 21: 118-124.
- Towill L.E., 1982. Low temperature (-196 C) storage of the seed from the tuberbearing *Solanums* species. *Amer. Potato Journal*. 59: 141-147.
- Tsuruta T., Ishimoto Y., Masuoka T., 1998. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 858:217-226.
- Turner S., Senaratna T., Touchell D., Bunn E., Dixon K., Tan B., 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. *Plant Science* 160: 489-497.
- Uemura M., Joseph R.A. and Steponkus P.L, 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* – Effect on plasma membrane lipid composition and freezing-induced lesions. *Plant Physiology* 109: 15-30.
- Van Bragt, J., and Pierik, R.L.M., 1971. The effect of autoclaving on the gibberellin A₁. In J. Van Bragt,