# ذخیره سازی بذور گیاه دارویی رازیانه .Foeniculum vulgare L در شرایط فراسرد (ازت مایع)

نیره احمدی[1]، شهین مهرپور[2]*

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰)

## چکیده

در کنار روش های مرسوم حفاظت از گونه ها ذخیره سازی در شرایط فرا سرد (Cryopreservation) در دمای 196 oC- روشی منحصر به فردوابزاری قدرتمند برای حفاظت خارج از محل (exstitu) ژرم پلاسم گونه های گیاهی به شمار می رود. در این درجه از سرما فرایندهای متابولیکی و فعالیت های فیزیولوژیکی بذورشدیدا کاهش یافته و بذور قادر به زنده مانی در دوره های بسیار طولانی می شوند. در این پژوهش جهت ذخیره سازی بذور گیاه دارویی رازیانه با نام علمی .Foeniculum vulgare L متعلق به خانواده چتریان در شرایط فراسرد، قبل از نگه داری نمونه ها در ازت مایع از سه پیش تیمار مختلف شامل گلیسرول ۳۰٪، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (PVS2) و کاهش رطوبت بذر (Dessication) استفاده شد. بذرهای تیمار شده به مدت یک هفته در ازت مایع نگهداری شدند. بذرهای تیمار شده پس از خروج از ازت در معرض شوک حرارتی قرار گرفتند. بذرها به همراه نمونه های شاهد در پتری دیش های حاوی کاغذ صافی استریل قرار گرفته و در ژرمیناتور با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و رژیم نوری ۱۶/۸ منتقل شدند. نتایج نشان داد زنده مانی بذور تیمار شده تحت سه روش حفظ شده و دانه رست های حاصل رشد عادی نشان دادند. درصد جوانه زنی در تیمار گلیسرول با ۶۵٪ بیشترین مقدار وسپس تیمار دسیکاتور ۵۳٪و 15% pvs2 در مقایسه باشاهد (۸۳٪)مشاهده گردید. بنابراین نگهداری بذور این گیاه با به کار گیری پیش تیمار گلیسرول ۳۰٪ به عنوان روشی ساده و مطمئن جهت نگهداری طولانی مدت ژرم پلاسم این گیاه در مراکز نگه داری ذخایر ژرم پلاسم گیاهی پیشنهاد می شود.

## کلیدواژگان

رازیانه، شرایط فراسرد، گلیسرول ۳۰ ٪، محلول ویتریفیکاسیون،*Foeniculum vulgare*.

* نویسنده مسئول، رایانامه: Sh.mehrpur12@gmail.com

## مقدمه

با افزایش جمعیت بشر، تقاضا برای غذای بیشتر، پاک سازی بی رویه جنگل ها و تبدیل زمین های کشاورزی، ناشی از توسعه و صنعتی شدن، تاثیرات منفی بر روی اکوسیستم ها گذاشته و در نتیجه ۶۰۰۰۰ -۲۰۰۰ گونه از گیاهان عالی را در معرض خطر، و یا در آستانه انقراض قرار داده است (۱).در سال ۱۹۷۴، بنیاد بین المللی منابع ژنتیک گیاهی با هدف ارائه پشتیبانی لازم برای جمع آوری، حفاظت و بهره برداری از منابع ژنتیک گیاهی، در سراسر جهان، تاسیس شد(۲).علاوه بر روش های مرسوم و کلاسیک در سال ۱۹۹۴ دانشمندان به تشریح نقش بیوتکنولوژی و روش هایی که به حفاظت منابع ژنتیکی گیاهی کمک می کند پرداختند(۳).

ایران با داشتن ۸۰۰۰ گونه گیاهی که متعلق به ۱۵۰ خانواده گیاهی است، یکی از کشورهای غنی از نظر تعداد و تنوع گونه های گیاهی است (۴). حفظ ذخایر توارثی و جلوگیری از فرسایش و انقراض این گونه ها، به ویژه گونه های بومی و در حال خطر از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۵).

سازمانهای جهانی مانند: glova environmental facility (gef), united natons environmental programme(unep) و... تلاش های زیادی برای حفظ ذخائر توارثی و تنوع زیستی به عمل آورده اند. از جمله ایجاد بانک ژن های گیاهی و نگهداری بذور گیاهان در دمای زیر صفر برای مدت های طولانی تر می باشد، که برای گیاهانی با بذور غیر ارتدوکس ( با رطوبت بالا) یا گیاهانی که بذر تولید نمی کنند و یا به طریق کلون تکثیر می گردند، قابل استفاده نمی باشد. تحت شرایط فوق (بانک های ژن گیاهی) هم، بذرها پس از مدتی قوه نامیه خود را از دست می دهند و نیاز به بازکشت بذور حداکثر پس از یک دوره۱۰-۲۰ ساله است که اضافه بر مشکلات فنی، تجدید کشت بذور امری مشکل و پر هزینه است. در بعضی از گونه ها به ویژه گونه های جنگلی، مدت زمان لازم برای تکمیل رشد و رویشی و شروع بذردهی بسیار طولانی می باشد، مضافا این که برخی بذور قوه نامیه کمی دارند و یا اینکه به سرعت قوه جوانه زنی خود را از دست می دهند(۶).

رازیانه Foeniculum vulgare گیاهی علفی، معطر، دوساله یا چند ساله از خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد. در ایران فقط یک گونه دارد که هم به صورت زراعی و هم وحشی یافت می شود .

رازیانه تا ارتفاع ۲ متر رشد می‌کند و ریشه دوکی شکل دوشاخه دارد. برگ ها دارای غلاف گوشتی ضخیم و ساقه آغوش بوده و خوراکی می‌باشند. گل‌ها درون گل آذین چتر مرکب قرار دارند. جام گل دارای ۵ گلبرگ زردرنگ می باشد. میوه شیزوکارپ تخم مرغی ودارای رگه‌های برجسته طولی می‌باشد. در اسانس رازیانه ۲۲ ترکیب شناسایی شده است. قسمت مورداستفاده رازیانه، ریشه، برگ ومیوه آن است ولی معمولا کلیه قسمت ها مورداستفاده قرارمی گیرد (۷).

در کنار روش های مرسوم حفاظت از گونه ها از قبیل ایجاد مناطق حفاظت شده،باغ های گیاه شناسی وبانک ژن بذور گیاهی،ذخیره سازی در شرایط فرا سرد (Cryopreservation) در دمای 196 oC- نیزروشی منحصر به فردوابزاری قدرتمند برای حفاظت خارج از محل (exstitu) ژرم پلاسم گونه های گیاهی به شمار می رود (۸). با توجه به کاهش شدید فعالیت های متابولیک وفیزیولوژیک موجود زنده در این دما ویا حتی توقف تقریبی فعالیت ها، طول مدت نگهداری به طور چشمگیری افزایش پیدا می کندو می توان انتظار داشت که آنها را بتوان با استفاده ازتکنولوژی فرا سرد برای مدت زمان بسیارطولانی حفظ نمود (۹).

با به کارگیری این تکنولوژی می توان نمونه های گیاهی نظیر بذر،اندام های زایشی،رویشی ویاخته های گیاهی رابرای بلند مدت نگهداری نموده وهزینه

نگهداری این بذور به مدت طولانی (هزاران سال) بسیار کمتر خواهد شد،چون نیاز به احیا مرتب این بذور نخواهد بود(۱۰).

ویتریفیکاسیون (Vitrification) یکی ازروش های ذخیره سازی بذور در ازت مایع، فرایندی است که در آن آب از حالت مایع وارد یک فاز شیشه ای بی شکل می شود که فاقد ساختار کریستالی است، در این حالت نگهداری بافت های گیاهی در ازت مایع بدون شکل گیری کریستال های یخی امکان پذیر خواهد بود(۱۱،۱۲).

بذور گیاه Bletilla striata را با روش ویتریفیکاسیون در ازت مایع نگهداری نمودند. توان زنده مانی بالا، بدون کاهش قدرت جوانه زنی در بذور نگهداری شده در ازت مایع مشاهده شد.

دهیدراسیون (Dessication) ضمن آنکه از تشکیل یخ درون یاخته جلوگیری می کند، با افزایش فشار اسمزی محلول داخلی یاخته، نقطه انجماد آن را کاهش داده و موجب شروع پدیده شیشه ای شدن می گردد. هر دو مکانیسم باعث جلوگیری از تشکیل یخ درون یاخته می شوند(۱۳).

تلاش ها مبین امکان کاربردی کردن تکنولوژی فراسرد برای نگهداری ذخایرتوارثی گیاهی را تا صدها و حتی هزارها سال با صرف هزینه کمتر وفضای بسیار کوچک تر بدون ازدست دادن قوه نامیه برای تعداد بسیاری ازگونه های گیاهی می باشد.

## مواد و روش ها

این پژوهش در بهار ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شد. بذرها از همدان جمع آوری شد و به منظور تعیین قوه نامیه بذر هابه وسیله اتانول ۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه وهیپو کلرید سدیم ۱٪به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شد وبعد از سه مرتبه شستشو با آب مقطر اماده کشت گردید و سپس در پتری دیش های حاوی کاغذ صافی در ۱۰ تکرار ۱۰ تایی کشت شدند. بذرها تحت سه پیش تیمار جداگانه زیر وارد ازت مایع شدند.

**پیش تیمار گلیسرول ۳۰٪ (**%30 Glycerol**):**

نمونه بذرها به لوله ازمایش ۱۵ میلی لیتری درب دار (فالکون) منتقل وبه آنها محلول گلیسرول ۳۰ درصد اضافه وبه مدت ۲۰ دقیقه دردمای ۲۲درجه قرار داده شدند سپس فالکون های حاوی بذر بلافاصله وارد ازت مایع گردیدند (۱۴).

**پیش تیمار ویتریفیکاسیون (**Vitirfication**):**

از دو محلول PVS2 و Loading به عنوان پیش تیمار استفاده شد. بذرها داخل فالکون ۱۵ میلی لیتری قرار داده شدند به فالکون ها محلول لودینگ (گلیسرول ۲ مول و ساکاروز۰/۴ مول (۱۵)،اضافه وبه مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه قرار داده شدند.پس از ۲۰ دقیقه محلول لودینگ تخلیه و به فالکون های حاوی بذر محلول PVS2 سرد (ساکارز۴٪مولار، گلیسرول ۳۰٪، اتیلن گلیکول ۱۵٪ و DMSO 15%اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه قرار داده شدند سپس فالکون ها وارد ازت مایع گردیدند (۱۶).

**پیش تیمار کاهش رطوبت بذر (**Desiccation**):**

در این تیمار وزن اولیه بذر با ترازوی حساس با دقت (۰/۰۰۰۱) تعیین گردید سپس بذرها به مدت ۷۲ ساعت در آون و در دمای ۷۲ درجه قرار داده شدند پس از قرار گرفتن در آون نیز وزن بذرها محاسبه گردید درصد رطوبت بذر با محاسبه اختلاف وزن بذرها قبل وبعداز قرارگیری در آون تعیین گردید (۶/۷درصد) در تیمار کاهش رطوبت بذر، بذرها به مدت یک هفته در دسیکاتور قرار داده شدند ومقدار کاهش رطوبت تعیین شد. برای این کار در ابتدا وزن

بذربا ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم تعیین وسپس بذرها به دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر وزن بذرها سیلیکاژل خشک منتقل گردید. در ادامه هوای داخل دسیکاتور تخلیه ودسیکاتور به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک هفته بذرها از دسیکاتور خارج ومجددا توزین شد مقدار رطوبت کاهش یافته در دسیکاتور نسبت به کل رطوبت بذر محاسبه ودرصدرطوبت آنها مطابق فرمول زیر محاسبه گردید. بذر ها پس از خروج از دسیکاتور به فالکون ها منتقل و بلافاصله وارد ازت شدند (۱۸،۱۷).

درصد رطوبت بذر= [وزن اولیه –وزن انتهایی /وزن اولیه]

**نمونه های شاهد:**

بذرها ی شاهد به فالکون ها منتقل ودر سرد خانه با دمای ۴ + درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلیه تیمار ها به جز شاهد به مدت یک هفته در ازت مایع با دمای 196 oC- نگهداری شدند. سپس بذرها از ازت مایع خارج وهمراه بذرهای شاهد ۲ دقیقه در اب ۴۲ درجه سانتی گراد (شوک حرارتی) قرار داده شدند پس از شوک حرارتی نمونه بذرهای فراسرد وشاهد برای تعیین درصد جوانه زنی در ظروف حاوی کاغذ صافی کشت شدند وجوانه زنی آنها اندازه گیری شد.

وزن هزار دانه از بذرها نیز محاسبه گردید(۱۹). بررسی های آماری با استفاده از نرم افزارSpss به روش ANOVA و آزمون توکی صورت گرفت.

## نتایج

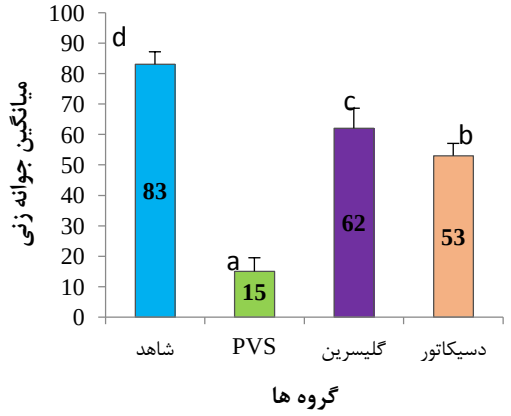
وزن هزار دانه بذرها g ۱۱/۳۲ اندازه گیری شد. درصد جوانه زنی بذور گیاه رازیانه در شاهد و تیمارها پس از خروج از ازت در جدول ۱ مقایسه شده است.

با توجه به نتایج جوانه زنی مشاهده شد در هر سه تیمار بذر ها پس از خروج از ازت زنده مانی خود را حفظ نموده درصد جوانه زنی در تیمار گلیسرول با ٪۶۵ بیشترین مقدار وسپس تیمار دسیکاتور ٪۵۳ و 15% pvs2در مقایسه با شاهد (٪۸۳) مقایسه گردید.

**جدول ۱- مقایسه درصد جوانه زنی بذور گیاه رازیانه در شاهد و تیمارها پس ازخروج از ازت**

| تیمار | درصد جوانه زنی |
|---|---|
| شاهد | ٪۸۳ |
| ویتریفیکاسیون | ٪۱۵ |
| گلیسرول | ٪۶۵ |
| دسیکاتور | ٪۵۳ |

به منظور بررسی های آماری از لحاظ جوانه زنی، ابتدا با استفاده از تست لوان مشخص شد که واریانس ها برابر هستند (sig > 0.05). جهت تشخیص اختلاف در میانگین بین گروه ها از ANOVA استفاده شد. چون سطح معناداری از ۰،۰۵ کوچکتر می باشد پس حداقل بین دو گروه می تواند اختلاف معناداری از لحاظ میانگین وجود داشته باشد. مطابق نمودار آزمون آماری توکی مشخص شد که بین تمامی گروه ها با گروه شاهد و همچنین خود گروه ها با هم از لحاظ میانگین جوانه زنی اختلاف معناداری وجود دارد.




**شکل ۱- مقایسه جوانه زنی در نمونه های ۱- شاهد، ۲- گلیسرین، ۳- دسیکاتور، ٤ - PVS2**

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس ANOVA

| ANOVA | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاخص ها | | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین مربعات | F | سطح معنی‌داری |
| | بین تیمارها | ۲۳۶۶۰ | ۳ | ۷۸۸۶,۶۶۷ | ۳۲۷,۰۹۷ | ۰,۰۰۰ |
| تعداد leafe | درون تیمارها | ۸۶۸ | ۳۶ | ۲۴,۱۱۱ | | |
| | کل | ۲۴۵۲۸ | ۳۹ | | | |

## بحث و نتیجه گیری

در تحقیقات ما از سه پیش تیمار به کار رفته در شرایط فراسرد در هر سه، زنده مانی بذورحفظ شد و در تیمار گلیسرول ۳۰٪ بیشترین میزان جوانه زنی مشاهده شد، در نتیجه امکان زنده مانی بذور رازیانه در دمای 196 oC - وجود دارد.

در فرایند ویتریفیکاسیون آب در دمای 196 oC - از حالت مایع به فرم شیشه ای بی شکل (رسوب) و فاقد ساختار کریستالی تبدیل می شود، به همین دلیل نگه داری بافت ها بدلیل عدم تشکیل کریستال یخ امکان پذیر می باشد(۲۰).

هم چنین، کاهش محتوای رطوبتی بذر و نگه داری در دمای فراسرد، می تواند باعث افزایش ویسکوزیته یاخته ای وتغییر شکل سیتوپلاسم به حالت شیشه ای شده در نتیجه از زوال تدریجی بذر جلوگیری می کند (۲۱).

وایت و برمور (۲۰۰۵)، نیز در همین رابطه بکارگیری روش کاهش رطوبت برای حفاظت از بذر گیاه Acer saccharinum را موفقیت آمیز گزارش نمودند(۲۲). در بذور گیاه رازیانه نیز تیمار کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به ازت تاثیر مثبتی (۵۳٪ جوانه زنی) بر زنده مانی بذرها داشت. این روش نیز به دلیل سادگی و عدم استفاده از مواد شیمیایی روش مناسبی در استفاده در مقیاس های کاربردی می باشد.

تیمار گلیسرین 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 (۲۳). در آزمایشات ما میزان جوانه زنی بذور رازیانه در پیش تیمار گلیسیرین بیشتر از سایر تیمارها بوده است.

فیروزه حاتمی وهمکاران (۱۳۸۸)، طی ذخیره سازی بذرهای گیاه کیکم (A.monspessuamum) نشان دادند رشد گیاهچه ها در بذرهای تحت شرایط فراسرد طبیعی وعاری از هر گونه آثار منفی بود. در زمینه زمان نگهداری بذرها در ازت مایع نیز بین زمان نگهداری بذر های ذکر شده در ازت مایع تفاوت معنی داری دیده نشد. با استفاده از فناوری فراسرد می توان این گونه ارزشمند را برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ واز انقراض آن جلوگیری کرد(۱۴).

(براساس تئوری فراسرد، در صورتی که بذر در محیط ازت مایع زنده بماند نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه مدت ومیان مدت وجود داشته باشد، زیرا با کاهش فعالیت های متابولیکی وحیاتی مسئله زمان نگهداری منتفی است(۱۰).

مطابق گزارشات ذکر شده وسایر گزارشات ذخیره سازی بذور ارتودوکس واینترمدیت با موفقیت انجام می شود(۲۴).

براساس مطالعات ترمودینامیکی انجام شده بر روی بذر کاهو، نیمه عمر جوانه زنی این گونه پس از ذخیره

سازی در ازت مایع ۳۵۰۰ سال برآورد شده است (۲۵).

براین اساس با توجه به مقاومت بذور رازیانه به شرایط فراسرد برآورد ماندگاری بذور این گیاه در ازت مایع را می توان بیش از هزار سال دانست.

پس می توان از این روش ساده، مقرون به صرفه و بی خطر به سهولت برای نگهداری ذخایر ژنتیکی این گیاه در مقیاس کاربردی استفاده نمود.

با استفاده از فناوری فرا سرد می توان علاوه بر بذر سایر اندام های مانند جوانه های جانبی وانتهایی،یاخته،دانه گرده وجنین را برای مدت زمان طولانی نگهداری کرد، بنابراین حفظ و بقای گونه هایی که نگهداری آنها از طریق بذر امکان پذیر نیست (مانند بذور Recalcitrant که درصد آب آنها زیاد است) با این فناوری قابل اجرا خواهد بود(۲۶).

## منابع و مآخذ


1. Bajaj, Y. P. S., Cryopreservation of Plant Germplasm I, Life Sciences Agriculture Biotechnology in Agriculture and Forestry,vol 32, 1995.
2. Razan, F., Guillouzo, C. G., Legallais, C., cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure.. pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/acs.chemrestox.. May 3, 2016 – 2003.
3. Rao,M. R. Ahuja, K.G. Ramawat...called in vitro techniques and includes the use of cryopreservation and other... cryopreservation where plant material is stored in liquid nitrogen. https://books.google.com/books.
4. Jalili, A. & Jamzad, Z. 1999: Biodiversity of Plant Species in Iran. -Tehran University.,1999. journals.areo.ir/article
5. Jamzad,Z., RJ Grayer, GC Kite, MSJ Simmonds, M Ingrouille, A Jalili. Leaf surface flavonoids in Iranian species of Nepeta (Lamiaceae) and some related genera. Prof. in Ecology in Research Institute of Forests and Rangelands - rifr-ac.ir.
6. Salomao, Seeds: Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germinatio. 2002, https://books.google.com/books.
7. Emad,M., Dr Fariborz Ghibi, Seyyed Mohsen Rasooli, Rasoul Khanjanzadeh, Medicinal Plants. -. Industrial Fennel. [in Persian]
8. Lambardi & Panis Cryopreservation is a perfect method for long-term conservation of plant, www.cropj.com/kaviani_5_6_2011_778_800.pdf.2005.Australian Journal of crop science5(6).778-800.
9. Ozkavukcu S, Erdemli E. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells., REVIEW. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. Cynecological Endocrinology., August 2010; 26(8): 563–567.
10. Popov,A.S., Popova, E.V., Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. 2006.,International Journal of Refrigeration,29: 403-410.
11. Gale, S., John, A., Harding, K., and Benson, E., 2008. Developing cryopreservation for Picea stichensis (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. CryoLetters, 29: 135-144.
12. Thammasiri K., 2000. Cryoperservation of seeds of a Thai Orchid (Doritis pulcherrima lindl).CryoLetters 21(4): 237-244.
13. Wolf and Bryant, Norman, Cryopreservation of seeds of Amaranth., 1992.gjstd.org/index.php/GJSTD/article/viewFile/10/6.
14. Hatami F., Jebeli M., SHAHAB M.A., Cryopreservation OF Acer monspessulanum seeds. 2010., Iranian Journal of Rengeland and Forests. Plant Breeding and Genetic Research. 2010, Volume 18, Number 1 (35); Page(s) 12 To 23. [in Persian]
15. Sakai, A., and Engelmann, F., 2007. Vitrification,Encapsulation and Droplet-Vitrification: A review.CryoLetters, 28: 141-172.
16. Sakai, A., Kobayashi, S., and Oiyama, I., 1991.Survival by vitrification of nucellar cells of navelorange (Citrus sinensis var. brasiliensis Tanaka)cooled to –196 °C. Plant Physiology, 137: 465–470.
17. Saleh,F., Mehrpoor,Sh., jamaloo,F., Cryopreservation of Silybum marianum L. seeds.2015. Applies Biology. period 4, n.2,p 41-54. [in Persian]
18. Roberts, E.H. and Ellis, R.H., 1989. Water and seed survival. Annals of Botany, 63: 39
19. JEBELI M., Naderi Shahab MA, Feizi H., Jafari A., Cryopreservation of Pupulus euphratica oliv. Seeds and evaluation of the cryopreservation seeds under laboratory and greenhouse conditions. 2015., Iranian Journal of Horticultural Science. Volume 46, N 2; Page(s) 313 To 322. [in Persian]

20. Gale, S., John, A., Harding, K., and Benson, E., 2008. Developing cryopreservation for Picea stichensis (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. CryoLetters, 29: 135-144.

21. Sun WQ, Irving TC, Leopold AC., Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems.1994. Ann Bot 79:291–297.

22. Beardmore T(1), Whittle CA., Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (Acer saccharinum) embryonic axes.2005., Tree Physiol. Aug;25(8):965-72.

23. Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., and Zaneveld, L.J., 1985. Effect of glycerol and cryopreservation on oocyte penetration by human spermatozoa. Andrologia. 1985 May-Jun;17(3):241-8.

24. WH Hu - 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, Bletilla formosana (Hayata) Schltr. by vitrification. Botanical studies,December 2013, 54:33

25. Walters C., Wheeler L., and Stanwood Ph., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48: 229-244.

26. Berjak, P. and Pammenter N.W.2014.Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. Front Plant Sci. 2014; 5: 123.