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

**فریده صالح[1]، مهین مهرپور[2]***

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

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۹)

## چکیده

گیاهان مانند کلیه موجودات زنده با سرعتی هشداردهنده در معرض خطر فرسایش ژنتیکی و انقراضند. آگاهی از فرسایش تنوع گیاهی، حفظ تنوع گونه‌ای و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی را بیشتر ضروری ساخته است. تکنولوژی (Cryopreservation) نگهداری در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد (نیتروژن مایع) یکی از مناسب‌ترین و ایمن‌ترین ابزار برای حفظ ژرم پلاسم گونه‌های گیاهی شامل بذر وبافت‌ها و یاخته‌های گیاهی می‌باشد. در این درجه از سرما فرایندهای متابولیکی و فعالیت‌های فیزیولوژیک بذر یا اندام گیاهی تقریبا متوقف و بذر و اندام گیاهی قادر به زنده‌مانی در دوره‌های نامحدود زمانی است. در این پژوهش به منظور نگهداری 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) وآب گیری (Desiccation) بذور استفاده شد. کلیه تیمارها پس از گذشت یک هفته از ازت مایع خارج و به مدت دو دقیقه در حمام اب گرم ۴۲ 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 ۲۴ درجه سانتیگراد و رژیم نوری ۱۶/۸ ساعت منتقل شدند. در بررسی ازمایشگاهی درصد جوانه‌زنی و طول اندام‌های رویشی اندازه گیری و تحلیل شد. نتایج نشان داد قدرت زنده مانی بذور گیاه *خار مریم* در ازت مایع در سه تیمار حفظ شده و بیشترین درصد زنده مانی (۹۳ درصد)در تیمار آب گیری نسبت به شاهد (۷۰ درصد) مشاهده شد. میانگین طول دانه رست هادر بذرهای تحت تیمار پس از احیا معنی دار بوده و در تیمار ویتریفیکاسیون بیشترین و برابر با ۱۰۱/۱۳ میلی متر و در تیمارهای گلیسرول و آبگیری و شاهد به ترتیب برابر با ۹۶/۸۲ و ۸۵/۶۹ و ۴۷/۳۸ میلی متر مشاهده شد. نتایج ما با نتایج دانشمندان دیگر در زنده مانی بذور در ازت مایع همسو است. مقاومت به سرما پس از آب گیری و باقی ماندن در حالت سکون با حضور پروتئین‌های ویژه ای همچون پروتئین تأخیر جنین زایی، پروتئین‌های شوک حرارتی و پروتئین‌های ذخیره بذر مرتبط می‌باشد و رابطه نزدیکی بین میزان معین این دسته از پروتئین‌ها و طول عمر بذر وجود دارد. نتایج ما با نتایج دانشمندان دیگر در زنده مانی بذور در ازت مایع هم سو است. بنابراین تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation) با بیشترین بازدهی که از نظر سهولت و عدم نیاز به مواد شیمیایی نیز روشی ساده تری است، در مقیاس کاربردی به عنوان نسخه پشتیبان و جایگزین مطمئن برای نگهداری طولانی مدت بذور گیاه خارمریم و سایر بذور ارتودکس (با درصد رطوبت کم) در مراکز نگهداری ذخایر ژرم پلاسم گیاهی پیشنهاد شد.

## کلیدواژگان

ازت مایع، خار مریم، گلیسرول۳۰٪، فراسرد، محلول ویتریفیکاسیون، Cryopreservation، PVS2.

* نویسنده مسئول، رایانامه: sh_mehrpur@qom-iau.ac.ir

**مقدمه**

گیاه خارمریم یا کنگر ابلقی به نام علمی ( .L Silybum marianum) که در گذشته به نام Carduus marianus(L. ) شناخته می‌شد 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 می‌باشد. ساقه آن نیز مستقیم است و انشعابات زیادی دارد. ارتفاع ساقه ۱۵۰تا ۲۵۰ سانتی متر است. برگ آن براق، دانه دار با رگ برگ‌های سفید می‌باشد و حاشیه برگ‌ها دارای خارهای زرد نوک تیز است. برگ‌ها پهن و شکننده هستند و در اوایل رویش به شکل روزت روی زمین قرار می‌گیرند. دمبرگ‌ها بلند، بیضی شکل و خاردار می‌باشند. وجود لکه‌های سبز رنگ کلروفیل دار در بعضی نقاط سطح برگ و عدم وجود کلروفیل در برخی نقاط دیگر به ظاهر برگ حالتی شبیه به سنگ مرمر می‌دهد.

در قرون اولیه دو گیاه شناس باستان Elder, Pliny برای کاهش صفرا استفاده از خارمریم را توصیه کردند و سقراط بیان کرد که جوشانده بذرهای خارمریم برای مالیخولیا و نیش مار مفید است. گیاه شناس قرن شانزدهم Gerardبا سقراط در این زمینه موافق بود و اظهار داشت که ریشه‌های خارمریم مالیخولیا را درمان کرده و تمام بیماری‌های مرتبط با آن را هم درمان می‌کند.

گفته شده است که خارمریم به وسیله ی سربازان رومی که به اروپا سفر می‌کردند به انگلستان برده شده است و بذرها، برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه ی آن به عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گرفته و به همین دلیل به گیاه دارویی مهربان معروف بوده است. در قرن هفدهم گیاه شناس بریتانیایی نیکولاس کلاپر 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 می‌کند او عقیده داشت که خارمریم برای دردهای پهلو و بیماری‌های کبد سودمند می‌باشد و جوشیده ریشه تازه وبذرها 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 قسمت‌های گیاه خارمریم اشتها را زیاد نموده و هضم غذا را بهبود بخشیده و سوء هاضمه را برطرف می‌کند. مشکلات قاعدگی، سختی و درد در هنگام خروج ادرار، زخم معده و گشادی سیاهرگ‌ها همگی می‌توانند با استفاده از پودر بذرها بهبود می‌یابند. بومیان آمریکایی خارمریم را به عنوان برطرف کننده جوش و محافظ پوست از بیماری‌ها و بعضی از انواع مسمومیت مورد استفاده قرار می‌دادند. با تاسیس دانشکده پزشکی پنسیلوانیا در اواخر دهه ی ۱۸۰۰، خارمریم به عنوان یک گیاه دارویی مهم مطرح شد (Nice,2000).

کاربردهای اصلی خارمریم در درمان بیماری‌های کبدی مثل ناخوشی‌های الکلی، انواع هپاتیت (ناشی از عفونت‌های ویروسی یا تحریکات دارویی) یا مشکلات کبدی مرتبط با بیماری قند است (تامایو، ۲۰۰۷).

ایران با داشتن حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی گل دار که از این تعداد نزدیک به ۲۰۰۰ گونه آن بومی می‌باشند از نظر تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی از جمله کشورهای غنی است. حفظ ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از فرسایش و انقراض این گونه‌ها به ویژه گونه‌های بومی و در حال خطر از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد. در شرایط متعارف حفظ و نگهداری این گونه‌ها به شیوه‌های مختلفی صورت

می‌گیرد که از مهم‌ترین آن‌ها نگهداری بذور گونه‌ها در بانک ژن و در شرایط نزدیک به صفر و یا حدود ۲۰- درجه سانتیگراد 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 می‌باشد که اضافه بر مشکلات فنی هزینه‌های تجدید کشت بذور امری مشکل و پر هزینه است. بعلاوه در گونه‌هایی که به صورت کلون تکثیر می‌گردند امکان نگهداری آن‌ها در شرایط یاد شده وجود ندارد و حفظ این گونه‌ها عملا در شرایط فوق امکان پذیر نمی‌باشد.

تکنولوژی استفاده از دمای فراسرد (۱۹۶- درجه سانتیگراد ) نخستین بار به دلیل موفقیت در نگه داری میکروارگانیسم‌ها جنبه کاربردی پیدا کرد و به دنبال آن استفاده از این تکنولوژی در انجماد یاخته‌های جنسی و بعضی از اندام‌های 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 نگهداری 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 محیط‌هایی از قبیل محلول ویتریفیکاسیون گیاهی و روش آب گیری می‌باشد به تفکیک وبه طور مجزا بر روی گونه‌های گیاهی مورد تجربه قرار میگیرد.

هدف از این تحقیق ذخیره سازی بذور گیاه دارویی خارمریم Silybum marianum در شرایط فراسرد به روش بهینه می‌باشد. انتظار می‌رود 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 نگهداری ناچیز اقدام به نگهداری این گونه گیاهی در حجم انبوه کرد.

## مواد و روش کار

منشا بذور خارمریم از شرکت پاکان بذر اصفهان می‌باشد که در سردخانه ی آزمایشگاه با دمای oC ۴+ نگه داری شدند.

پروتکل نگهداری بذر درشرایط فرا سرد: انواع پیش تیمار

**۱. نمونه‌های شاهد (Control):** بذور بدون هیچ پیش تیماری (شاهد) پس از قرارگیری در لوله‌های درب دار پلاستیکی (فالکون) برای مدت زمان یک هفته، در محیط سردخانه (C° ۴ ) نگه داری شدند.

**۲. تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification):** در این تیمار از دو محلول PVS2 شامل: ساکاروز Sucrose۰/۴مول، گلیسرولGlycerol 30درصد، اتیلن گلیکول15 Ethylen glycol درصد، دی متیل سولفوکساید DMSO 15 درصد

Loading شامل گلیسرول (Glycerol) ۲مول، ساکاروز(Sucrose) ۰/۴ مول به عنوان پیش تیمار استفاده شد. بذور داخل فالکون‌ها ریخته و به آنها محلول Loading اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ۲۰ دقیقه محلول Loading تخلیه و به فالکون‌های حاوی بذر محلول PVS2 سرد (دمای4 Co ) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای C° 4 قرار گرفتند، سپس فالکون‌ها 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 C° ۹۲ و محاسبه اختلاف وزن قبل و بعد از آون، مشخص گردید رطوبت کل بذر معادل ۱۰۰ درصد درنظر 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 یه 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، بذور از دسیکاتور خارج و مجددا توزین گردید. درصد کاهش رطوبت بذرها 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، بذرها به درون کرایوتیوپ‌ها منتقل و کرایوتیوپ‌ها توسط گلیسرول ۳۰ درصد پر شده و در دمای C° 22+ به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس در ازت مایع غوطه ور گشتند.

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

پس از انجام مراحل ضد عفونی، تیمارها همراه با بذور شاهد به پتری دیش‌های حاوی یک لایه کاغذ صافی منتقل شدند. و به هر پتری، 6 ml آب مقطر افزوده شد. نمونه‌ها به ژرمیناتور با دمای Co+24+ منتقل شدند.

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

جوانه‌زنی بذور و تشکیل دانه رست‌ها، مجموعا ۴ هفته به طول انجامید که در این مدت ۴ بار تیمارها بررسی و میزان آلودگی و تعداد بذرهای جوانه‌زده ثبت گردید.

پس از گذشت ۴ هفته، طول ساقه چه، ریشه چه و دانه رست‌ها اندازه گیری و ثبت گردیدند. سپس شاخص‌هایی 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 داده‌ها 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 بذور 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 می‌باشد و در نمونه‌های شاهد میزان آن کم ترین و برابر با ۲۳/۹۲ میلی متر می‌باشد. میانگین طول دانه رست در بذرهای تحت تیمار 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 می‌باشد. میانگین طول دانه رست در نمونه شاهد کمترین و برابر ۴۷/۳۸ میلی متر می‌باشد. بیشترین میانگین طول ساقه دانه رست‌ها 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 می‌باشد. میانگین طول دانه رست در نمونه شاهد کمترین و برابر ۱۵/۱۵ میلی متر می‌باشد.

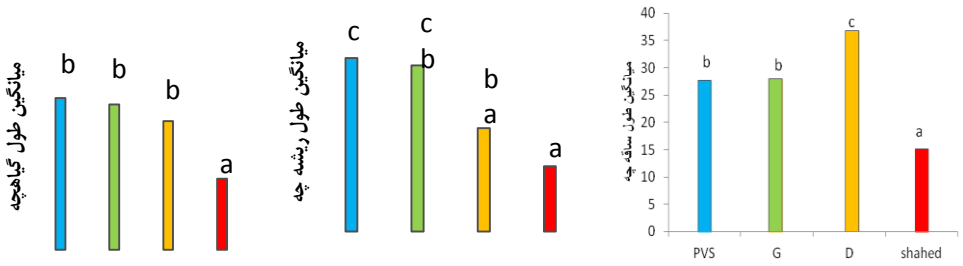
دربررسی‌ها می‌توان مشاهده کرد که همواره در تمام صفات گروه شاهد کمترین میزان بازده را دارد.

درصد بالای جوانه زنی ۹۳ ٪ در تیمار آب گیری درمقابل شاهد (۷۰٪) نشان می‌دهد که ذخیره سازی بذور گیاه خارمریم با تیمار اب 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 رست‌ها پس ازخروج از تیمار فراسرد می‌شود.

**جدول ۱- مقایسه میانگین اثر پیش تیمارها بر نگهداری بذور خارمریم در فراسرد پس از خروج از ازت مایع**

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

نکته: تیمارهایی که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه ای دانکن، اختلاف معنی داری ندارند.




**شکل ۱- نمودارهای میانگین طول ساقه‌چه (mm )، طول ریشه چه(mm)، طول دانه رست (mm)**

## بحث

بذرهای گونهٔ S. marianum پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه زنی بودند. با توجه به امکان زنده مانی بذرها در دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی گراد می‌توان بذرهای این گونه را جزو بذرهای ارتودکس (Orthodox) قرارداد (Roberts and Ellis, 1989; Engelman,1990). همچنین تفاوت معناداری از نظر طول ریشه چه، طول ساقه چه، طول دانه رست، شاخص بنیهٔ بذر (VI) و نسبت طول ریشه چه به ساقه چه بین بذور شاهد و تیمارهای ویتریفیکاسیون(PVS2) ، گلیسرول وکاهش رطوبت بذر مشاهده نشد.

در تیمار ویتریفیکاسیون آب موجود در نمونه‌ها از حالت مایع وارد یک فاز شیشه ای بی شکل می‌شود که فاقد ساختارکریستالی است. در این حالت نگه داری بافت‌های گیاهی در نیتروژن مایع بدون شکل گیری کریستال‌های یخی امکان پذیر خواهد بود (Wang et al. , 2005; Gale et al. , 2008).

در زمینهٔ سمیت مواد موجود در PVS2 بعضی ازگزارش‌ها نشان می‌دهند که مواد محلول موجود در آن مانند اتیلن گلایکول تاثیر منفی در نگه داری نمونه درفراسرد دارد. (Kuleshova et al. , 1999)

این در حالی است که بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌هایی مانند موز، ارکیده، آناناس(Thinh, 1997)، توت فرنگی ( Hirai et al. ,

1998 ) و سپیدار(Lambardi et al. , 2000) اثر مثبت این تیمار گزارش شده است.

از گلیسرول با غلظت‌های مختلف به عنوان نوعی ماده محافظ در فرایندهای سرمایی استفاده میشود. (Jeyendran etal. , 1985)

این ماده تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را به آرامی پایین می‌آورد. به همین علت به عنوان ماده محافظ یا Cryoprotectant استفاده می‌شود، پیش تیمار گلیسرول ٪۳۰در حفاظت تفاوتی با سایر تیمارها نداشته است بررسی‌های محققان دیگر نیز نشان می‌دهد قرارگرفتن بذور یانمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد، در گیاهان تغییرات ژنتیکی ایجاد نمی‌کند (Zhai et al. , 2003:Dixit et al. , 2003; Sanchez et al. , 2008) قرارگیری بذر کاهو (Walters et al. , 2004) و جوانۀ انتهایی سیب زمینی-(Mix-Wagner et al. , 2003) در نیتروژن مایع، به دلیل کاهش فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی نمونۀ گیاهی مدت زمان زنده مانی به شدت افزایش می‌یابد. 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 فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی مسئله زمان منتفی می‌گردد.

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

شاخص قدرت بذر نشان دهنده هم زمان قدرت جوانه زنی و قدرت رویش بذر است که منجر به عمل کرد بالاتر می‌شود. این شاخص در واقع بیانگر توانایی بالقوه بذر در ایجاد بیشینه گیاه در کوتاه ترین زمان ممکن در شرایط محیطی متغیر می‌باشد(۱۹۷۸ ,Gelmond et al)، 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 می‌باشد (۱۹۷۲,Roberts) گزارش شده است که شاخص قدرت بذرهایی 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 ،۱۹۹۹) 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.,۱۹۹۵) که با این نتایج مبنی بر اینکه با کاهش محتوای رطوبت بذر و نگه داری در شرایط فر اسرد، قدرت بذر حفظ می‌شود، مطابقت دارد (Hampton and Tekrony, 1995).

با افزایش دمای نگهداری بذر، طول دانه رست کاهش میابد 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 یاخته‌ای و تغییر شکل سیتوپلاسم به حالت شیشه ای شده (Buitink & Leprince,2008) در نتیجه از زوال تدریجی بذر جلوگیری می‌کند ( 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 ۱۹۶ºC- داشت. در این بررسی

مشاهده شد که این تیمار همانند تیمارهای دیگر باعث حفاظت از بذر در شرایط فراسرد می‌شود. مقاومت به سرما پس از آب گیری و باقی ماندن در حالت سکون با حضور پروتئین‌های ویژه ای همچون پروتئین تأخیر جنین زایی، 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)

Whittle (۲۰۰۵) و Beardmore 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 یافته‌های محققان در اغلب صفات همسو با نتایج تحقیقات حاضر بودند.

جمع‌بندی نتایج آزمایشگاهی تیمارها نشان داد که با قرار گرفتن بذور درنیتروژن مایع بعضی از صفات تغییر معنی داری نشان ندادند. بنابر این از بین تیمارهای مختلف، تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation) مناسب ترین تیمار برای نگه داری بذور در شرایط فراسرد بود.. لذا از این روش که از نظر سادگی وسهولت و عدم نیاز به مواد شیمیایی روشی ساده تری می‌باشد، می‌توان در مقیاس کاربردی به عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین مناسب و مطمئن برای نگهداری طولانی مدت بذور گیاه خارمریم در مراکز نگهداری ذخایر ژرم پلاسمی استفاده نمود.

## منابع و مآخذ


۱. ابراهیمی رستاقی، م، اسدی اتویی، ع، هدایتی، م. تهرانی، م. جهاندار، ج. ترابی ورکی، ب. ۱۳۸۲. کیمیای سبز. انتشارات سازمان جنگل‌ها مراتع و اخیزداری کشور، معاونت امور جنگل. ص ۳۶۸.

۲. احمدی، ر. ۱۳۸۶. بررسی امکان نگهداری جوانه‌های انتهایی، بذر و سلول‌های scale motanum در شرایط فراسرد. پایانامه کارشناسی ارشد. دانشگاه پیام نور تهران.

۳. بیگم فقیر، محمد ۱۳۸۰. تیره‌های گیاهان گلدار. انتشارات دانشگاه گیلان.

۴. جبلی م.، م.، ع.، نادری شهاب، ع.، ا.، جعفری، ف.، حاتمی، نگهداری بذر اقاقیا Robinia pseudoacacia L. در شرایط فراسرد، مجله جنگل ایران، جنگلبانی ایران، سال ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۲۴۵ تا ۲۵۴.

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، تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۳۸۸، سال ۱۷، شماره ۴ (پیاپی ۳۸)

۶. رضایی نژاد، ع، ۱۳۸۰. فرهنگ کامل گیاه شناسی، حشره شناسی و زیست شناسی. انتشارات کارنگ. ص ۶۷۸.

۷. شاهمرادی، امرعلی ۱۳۸۳. طرح تحقیقاتی آت اکولوژی Secale montanumو 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، جوانه‌های انتهایی و جانبی و سلول‌های گیاهی حاصل از کشت بافت، روشی برای حفاظ بلند مدت ذخایر ژنتیکی گیاهی. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلام ایران. ص ۷۱-۶۸.

۱۰. قمری زارع، ع.، ش.، شهرزاد، م.، ع.، نادری شهاب، (۱۳۹۰)، حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهان منابع طبیعی ایران در شرایط دمای فراسرد، کنگره ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی

۱۱.قهرمان، ا. ۱۳۶۵. فلور ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

۱۲.قهرمان، احمد ۱۳۷۶. فلور رنگی ایران. جلد شانزدهم، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

۱۳.کریمی، ه. ۱۳۸۱. فرهنگ رستنی‌های ایران. انتشارات پرچم. ص۹۸۸.

۱۴.کریمی، هادی ۱۳۷۵. گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۷۱۴.

۱۵.کریمی، هادی ۱۳۷۸. مرتعداری. انتشارات دانشگاه تهران.

۱۶.کریمی، هادی ۱۳۸۶. فرهنگ رستنی‌های ایران. جلد چهارم، انتشارات نشر علوم کشاورزی، صفحه۴۱۷.

۱۷.کریمی، هادی، ۱۳۷۵. زراعت و اصلاح گیاهان علوفه ای. انتشارات دانشگاه تهران.

۱۸.کلاهدوزان، م.، ع.، قمری زارع، ش.، شهرزاد، خ.، کیارستمی، حفاظت بذرهای Medicago rigidula در دمای فراسرد با استفاده از دو روش شیشه ای شدن و کپسوله کردن – آبگیری، تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران : ۱۳۸۸ , دوره ۱۷ , شماره ۱پیاپی ۳۳; از صفحه ۵۰ تا صفحه ۶۰. )

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

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

21. Alcor Life Extension Foundation, 2007. Http://www. alcor. org
22. Answer. 2007. http://www. answer. com
23. Antikainen M. , Griffith M. , Zhang 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.
24. Arny D. C. , Lindow S. E. , and Upper C. D. , 1976. Frost sensitivity in zea mays increased by application of Pseudomonas syringae. Nature 262:282-284.
25. Arora R. and Palt J. P. , 1991. A loss in the plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion bulb scale tissue. Plant Physiology 95: 846-852.
26. Arora R. and Wisniewski M. E. , 1995. Ultrastrucural 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.
27. Chen T. H. H. , Kartha, K. K. , and Gusta, L. V. , 1985. Cryopreservation of wheat suspension. Culture and regenerate callus. Plant Cell, Tissue and organ cult 4: 101-109.
28. Cho E. , Hor Y. L. , Kim H. H, and Rao V. R. 2001. Cryopreservation of Citrus madurenis zygonic axes by vitrificatin: Importance of pergrowth and preculture conditions. CryoLetters 22(6): 391-396.
29. Close, T. J. , 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiol plant 1997, 100: 291-296.
30. Crowe, J. H. , Carpenter, J. F. and Crow, L. M. , 1998. The role of vitrification inanhydrobiosis. Ann. Rev. physiol. Vol. 60. P. 73-103.
31. Cyr, D. R. , 2000. Cryopreservation: roles in coal propagation and germplasm conservation of conifers In: F. Engelmann and H. Takagi (eds), Cryopreservationof Tropical Plant Germpalsm. International Plant Genetic Resouces Intitute Rome, pp: 261-268.
32. El-Itriby, H. 2004. Inviation to the 5th ISTA/FAO Workshop on Electrophorctic Methods and PCR-Techniques for Variety Verification and GMO Detection. Agriculture Genetic Engineering Research Institute (AGERI),Giza, Egypt.
33. Engelmann, F. 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation casehistory: Oil Palm somatic embryos. International Jornal of Refrigation, 13(1): 26-30.
34. Flashland, E. , Terada, G. , Soccho, Ray, H. , Morginski, l. and Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorm of O|ncidium bifolium Sims. (ORCHIDACEAE) by encapsulation-dehydration. CryoLetters 27: 235-242.
35. Gonzalez-Benito M. E,. and Perez-Garoya F. , 2002, Cryopreservation of lipid-rich seed: effect of moisture content and cooling rate on germination. CryoLetters 22 (2): 135-140.
36. Ishokawa, K. , Harata, K. , Mii, M. and Sakai, A. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (Bletilla striata) by vitrification. Plant Cell Reports, 16: 754-757.
37. Panis B. , LAmbardi m. , 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees), the role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy, 5-7 March, 2005.
38. Popov A. S. , Popova E,v. , nikishina T. V. and Klomeyrseva G. L. , 2004. The development of juvenile plants of the hydrid Orchid bratonia after seed cryopreservation. CryoLetters 23(6): 205-212.
39. Thammasiri K. , 2000. Cryoperservation of seeds of a Thai Orchid (Doritis pulcherrima lindl). CryoLetters 21(4): 237-244.

40. Touchell, D. H. , Chiang, V. L. and Tsai, C. J. , 2002. Cryopreservation of embaryogenic cultures of Picea mariana ( black spruce ) using vitrification. Plant Cell Reports 21: 118-124.

41. Towill L. E. , 1982. Low temperature (-196 C) storage of the seed from the tuberbearing Solanums species. Amer. Potato Journal. 59: 141-147.

42. 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.

43. 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.

44. 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.

45. Van Bragt, J. , and Pierik, R. L. M. , 1971. The effect of autoclaving on the gibberellin A,. In J. Van Bargt, 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.

46. 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.