اثر ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی بذور *Medicago polymorpha* L. نگهداری شده در شرایط فراسرد

*مه لقا قربانلی[۱]، رکسانا بنیادی[۲]، عباس قمری زارع[۳] و شکوفه شهرزاد[۳]

۱. عضو هیئت علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد گرگان
۲. کارشناس ارشد دانشگاه پیام نور تهران
۳. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

چکیده

در این پژوهش برای دستیابی به روشی موفق جهت نگهداری طولانی مدت بذور در شرایط دمای فراسرد از روش ویتریفیکاسیون استفاده شد. بدین منظور از بذور یونجه یکساله *Medicago polymorpha* L. که در دمای ٤°C سازگاری سرمایی یافته بودند استفاده گشت. بذور با قرار گرفتن در مجاورت سیلیکاژل در دسیکاتور برای ٤ روز آبگیری شدند. سپس جهت حفاظت اسمزی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵°C با محلول گلیسرول ۲M در ساکاروز ۰/٦ M بارگیری گشتند. بذور بارگیری شده به منظور دهیدراتاسیون و حفاظت به کرایوویال‌های حاوی ۰/۵ ml محلول PVS2 صفر درجه سانتی‌گراد انتقال یافته و بلافاصله در نیتروژن مایع ذخیره شدند. کرایوویال‌های حاوی نمونه پس از یک هفته از نیتروژن مایع خارج گشتند و بلافاصله در حمام آبی ۳۷°C به مدت ۲ دقیقه گرمادهی شدند. در مرحله بعد به منظور آبدهی و شستشوی مواد نگهدارنده به ترتیب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ °C در داخل محلول شستشوی حاوی سوکروز ۱/۲ M در نمک‌های محیط کشت MS قرار گرفتند. بازیابی نمونه‌ها به سه روش صورت گرفت: (الف و ب) قرار دادن بذور به مدت نیم ساعت و ٢٤ ساعت در زیر آب جاری و سپس انتقال آنها بر روی پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب به منظور تولید دانه‌رست، (ج) استریل بذور با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲٪ و سپس انتقال آنها به محیط کشت جامد MS حاوی ۰/۵ mg/lit GA_3. درصد زنده‌مانی بذور نگهداری شده در دمای فراسرد در روش‌های بازیابی الف و ب (به ترتیب ۹٤/۳۷٪ و ۹۸/۲۱٪) در سطح ۵٪ با شاهد (بذوری که تحت تیمار فراسرد قرار نگرفتند) دارای اختلاف بود درحالیکه، این اختلاف در روش ج (زنده‌مانی ۷٦/۱٦٪) فاقد اختلاف معنی‌دار بود.

کلمات کلیدی: آبگیری، بذر، نگهداری بلند مدت بذر، نگهداری در دمای فراسرد، نیتروژن مایع، ویتریفیکاسیون، یونجه یکساله، PVS2

مقدمه

با توجه به اهمیت حفظ ذخائر ژنتیکی و تنوع زیستی، تلاش‌های جدی در سطح جامعه جهانی در جهت جلوگیری از نابودی گونه‌های گیاهی صورت می‌گیرد. از جمله فعالیت‌های حفاظتی، ایجاد باغ‌های گیاهشناسی و مناطق حفاظت شده در عرصه‌های طبیعی می‌باشد.

*e.mail:ghorbanli@yahoo.com

هزینه مراقبت و نگهداری گونه‌های گیاهی در این باغ‌ها بسیار سنگین و سرسام‌آور است. اگر به دلایل اقتصادی یا هر دلیل دیگر امکان نگهداری این عرصه‌ها به خطر افتد، تعداد زیادی از گونه‌های در حال خطر که در این عرصه‌ها نگهداری می‌شوند، به سرعت منقرض خواهند گردید (سایت اینترنتی KEW).

یکی از ساده‌ترین راه‌ها جهت نگهداری از گیاهان به روش ex situ استفاده از بذور است چرا که از این طریق امکان ذخیره تنوع ژنتیکی بیشتری در فضایی کوچک‌تر و باهزینه‌ای کم‌تر وجود دارد (سایت اینترنتی KEW). ایجاد این بانک ژن‌های گیاهی و نگهداری بذر گیاهان درشرایط مناسب برای میان مدت و یا نگهداری در دمای زیر صفر برای مدت‌های طولانی‌تر از جمله عملکردهای حفاظتی انجام شده در زمینه حفظ گونه‌های گیاهی می‌باشد. در شرایط یاد شده، بذرها پس از مدتی قوه نامیه خود را از دست می‌دهند و برای جلوگیری از نابودی آنها نیاز به بازکشت بذور می‌باشد. در برخی از گونه‌ها، بویژه گونه‌های جنگلی، مدت زمان لازم برای تکمیل رشد رویشی و شروع بذر دهی بسیار طولانی است (Saloma, 2002).

تکنولوژی نگهداری در دمای فراسرد[1]، فرایند انجماد ماده زنده جهت محفوظ نگهداشتن آن است. این امر معمولا در دمای نیتروژن مایع[2] (۱۹۶°C- یا ۳۲۰°F-) یا دمایی نزدیک به آن صورت می‌گیرد (سایت اینترنتی KEW). این فناوری بر پایه کاهش و متعاقبا بازدارندگی فعالیت‌های متابولیکی مواد بیولوژیکی ذخیره‌ای در دمای فراسرد بنا نهاده شده است. در دمای نیتروژن مایع تقریبا کلیه فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها متوقف می‌گردد و سلول‌ها می‌توانند در این حالت معلق و در عین حال زیست‌پذیر، رها از عوامل بیماری‌زا و خطر فرسایش ژنتیکی[3]، برای دوره‌های طولانی باقی بمانند. به طور تئوریکی از این طریق می‌توان بافت گیاهی را برای مدتی نامحدود ذخیره کرد و در زمان مورد نیاز آن را بازیابی و به صورت گیاه کاملی باززایی نمود (Kadkade و همکاران، ۲۰۰۵).

فناوری نگهداری در دمای فراسرد به دلائل اهمیت و کارایی منحصر به فرد خود در حفظ و نگهداری ذخائر توارثی، به سرعت در حال پیشرفت می‌باشد. چراکه، نگهداری طولانی مدت بذور و اندام‌های گیاهی را امکان پذیر نموده و باعث کاهش هزینه‌های گزاف نگهداری، بازکشت و تجدید حیات آنها می‌گردد (Barbara, 2001; Ghamari Zare et al., 2007). این فناوری یکی از بهترین روش‌های ذخیره ژرم‌پلاسم در شرایط in-vitro می‌باشد و با موفقیت بر روی کالوس، پروتوپلاست، گرده، مریستم‌ها، زیگوت، جنین‌های غیرجنسی و کشت‌های تعلیقی گونه‌های گیاهی بسیاری انجام گرفته است. اولین گزارش از نگهداری موفق سوسپانسیون سلولی گیاه در دمای فراسرد (Quatrano, 1968) و باززایی مجدد جنین‌های غیرجنسی از سلول‌های ذخیره شده در شرایط فراسرد (Nag and Street, 1973)، منتهی به مطالعات متعددی در زمینه نگهداری سیستم گیاهی در دمای فراسرد گشت (Paroda and Arora, 1991). گزارشات بسیاری مبنی بر مقاوم بودن بذور گونه‌های کشاورزی و باغبانی رایج در برابر خشک کردن و قرارگیری در نیتروژن مایع در دست است. حدود ۱۵۵ گونه و ٤٥٥ جزء گیاهی توسط Stanwood (۱۹۸۵) معرفی شده است که خود اثباتی بر این موضوع می‌باشد که نگهداری در نیتروژن مایع طرحی عملی بشمار می‌آید. Lipman و Lewis (۱۹۳٤) نشان دادند که بذور نخودفرنگی، کدو، یونجه زراعی و گل آفتابگردان را می‌توان به مدت ٦۰ روز در ۱۹٦°C- نگهداری نمود بدون اینکه هیچ‌گونه کاستی در توانایی زایشی یا زنده‌مانی‌شان رخ دهد؛ ارزیابی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نیز هر دو این موضوع را تایید کردند. بعد از آن Lipman (۱۹۳٦) گزارش داد که بذور گندم، جو، تنباکو، بذرک، گندم سیاه، اسفناج، مایلو، ذرت و

[1]. Cryopreservation
[2]. Liquid nitrogen
[3]. Genetic drift

گونه‌های اکلیل کوهی که برای چندین ساعت در معرض دمای ۲۷۲°C- قرار گرفته بودند در مقایسه با نمونه‌های شاهد هیچ تفاوتی در توانایی زایشی نشان ندادند. بر اساس گزارش Sakai و Noshiro (۱۹۷۵)، بذور برنج، گندم زمستانه، سویا، یونجه زراعی و چچم چمنی ایتالیایی که محتوای رطوبتی‌شان کمتر از ۸٪ بود با نیتروژن مایع آسیب ندیدند. Towill (۱۹۸۲) برای گونه‌های متعددی از سیب‌زمینی گزارش داد که بذور قرار گرفته در معرض نیتروژن مایع در مقایسه با نمونه‌های شاهد هیچ تفاوتی در درصد و سرعت جوانه‌زنی نشان ندادند.

اکثر موجودات زنده، از جمله گیاهان، توان مقاومت و زنده ماندن در برابر انجماد و سپس گرم شدن پس از خروج از دماهای برودتی را ندارند. به این دلیل است که باید طی یک سری مراحل ویژه و با استفاده از مواد محافظت کننده، از نمونه‌ها در برابر دمای فراسرد حفاظت نمود. شماری از این مواد نگهدارنده در برابر سرما[1] دارای ویژگی‌هایی می‌باشند که از سلول‌ها در برابر اثرات تخریبی انجماد در دمای فراسرد حفاظت می‌کنند. در اصل ماهیت نگهداری در دمای فراسرد این است که بر آبگیری و غلظت سیتوزول به طریقی کنترل شده و با حداقل آسیب اثر گذارد و در نتیجه از تشکیل کریستال‌های یخ در سیتوزول حین فرو رفتن در نیتروژن مایع (یا دمای خیلی پایین) جلوگیری نماید و یا آن را به حداقل برساند (Kadkade et al., 2005).

ویتریفیکاسیون یا نگهداری در شرایط فراسردی که عاری از یخ باشد، بر اثر درگیری و محصور شدن آب قابل انجماد با استفاده از غلظت‌های چندمولاری مخلوطی از عوامل حفاظت کننده در برابر انجماد نفوذ کننده و غیر نفوذ کننده امکان‌پذیر می‌گردد (Baust, 2007). یک عامل محافظت کننده در برابر انجماد می‌تواند آب را مانند شیشه سخت نماید، بدون اینکه بلوری تشکیل شود. این فرایند ویتریفیکاسیون یا شیشه‌ای شدن نامیده می‌شود (Best, 2006). از جمله رایج‌ترین محلول‌های ویتریفیکاسیون (PVS2)[2] است.

اولین گزارش‌ها در رابطه با استفاده از محلول ویتریفیکاسیون برای بافت‌های گیاهی در سال ۱۹۸۹ (Langis et al., 1989; Uragami et al., 1989) بدست آمد. این روش بر پایه تیمار دادن نمونه‌ها با یک محلول ویتریفیکاسیون غلیظ برای دوره‌های زمانی متغیر (از ۱۵ دقیقه تا ۲ ساعت) و به دنبال آن انتقال مستقیم به درون نیتروژن مایع بنا شده است. این کار باعث ویتریفیکاسیون (شیشه‌ای شدن) آبهای میان و برون‌سلولی می‌گردد. محلول ویتریفیکاسیون از ترکیب غلیظی از مواد محافظت کننده در برابر انجماد نفوذ کننده و غیر نفوذ کننده تشکیل شده است. امروزه ویتریفیکاسیون رایج‌ترین روش مورد استفاده در فناوری نگهداری در دمای فراسرد می‌باشد. دلیل موفقیت این روش آسانی، قابلیت تکثیر بالا و کاربرد موفقیت آمیز آن بر روی بسیاری از بافت‌ها و گونه‌های گیاهی می‌باشد (Panis and Lambardi, 2005).

در طی این پژوهش امکان نگهداری بذور گیاه یونجه یکساله[3]، از گیاهان مهم مرتعی ایران، در شرایط فراسرد با استفاده از روش ویتریفیکاسیون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی: جهت اعمال روش‌های نگهداری در دمای فراسرد از بذور *Medicago polymorpha* جمع‌آوری شده از مراتع منطقه چاد واقع در استان گلستان از ارتفاع ۸۰ متری از سطح دریا در خردادماه ۱۳۸٤ استفاده شد.

روش نگهداری در شرایط دمای فراسرد: بذور پس از سازگاری سرمایی به منظور آبگیری به مدت ٤ روز در درون دسیکاتور و در مجاورت سیلیکا ژل قرار گرفتند. بذور آبگیری شده جهت حفاظت اسمزی به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵°C در محلول بارگیری (LS)[4] استریل حاوی

[1]. Cryoprotectant

[2]. Plant Vitrification Solution 2

[3]. Medicago polymorpha

[4] Loading solution

گلیسرول M ۲ در ساکاروز M ۰/٦ قرار گرفتند (Sant et al., 2006). به منظور دهیدراتاسیون از محلول PVS2 استفاده شد. محلول PVS2 حاوی ۱۵w/v٪[1] اتیلن گلیکول، w/v ۱۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)[2]، w/v ۳۰٪ گلیسرول ۸۷٪، w/v ۱۳/۷٪ ساکاروز در نمک‌های محیط کشت MS ۱/۲ بود (Volk and Walters, 2006). بذور بارگیری شده درون کرایوویال‌های استریل حاوی ml ۰/۵ محلول PVS2 صفر درجه قرار داده شدند و بلافاصله به نیتروژن مایع (LN) انتقال یافته برای مدت یک هفته در آن ذخیره گشتند.

ذوب کردن و شستشو: کرایوویال‌های حاوی نمونه‌های بذر پس از خروج از LN به منظور ذوب شدن بلافاصله در حمام آبی ۳۷°C به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند (Schmale et al., 2006). به منظور حذف و شستشوی مواد حفاظت کننده در برابر سرما (Finkle and Ulrich, 1982) و نیز جذب مجدد آب (Sant و همکاران، ۲۰۰٦)، بذور در دمای ۲۲°C (Finkle and Ulrich, 1982) به ترتیب به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه در داخل محلول شستشو قرار گرفتند. محلول شستشو حاوی سوکروز M ۱/۲ در نمک‌های محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) بود (Panis et al., 2004).

بازیابی و باززایی نمونه‌ها: بازیابی نمونه‌ها با استفاده از سه پس‌تیمار متفاوت زیر صورت گرفت:

۱) قرار دادن بذور در زیر آب جاری به مدت ۲٤ ساعت و سپس انتقال آنها بر روی ظروف حاوی کاغذ صافی مرطوب به منظور تولید گیاهچه.

۲) قرار دادن نمونه‌ها در زیر آب جاری به مدت نیم ساعت و سپس انتقال بر روی ظروف حاوی کاغذ صافی مرطوب به منظور تولید گیاهچه.

۳) استریل نمودن بذور (هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱ دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر استریل) و متعاقبا انتقال آنها به محیط کشت جامد MS حاوی GA3 ۰/۵ mg/lit (اسید جیبرلیک).

طرح آزمایشی: در این پژوهش، اطلاعات حاصل از هر یک از پس‌تیمارهای فوق به صورت سه آزمایش جداگانه در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی با ۵ تکرار و در هر تکرار ۲۰ نمونه، با نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به زنده‌مانی بذور (تولید دانه‌رست و یا گیاهچه) پس از یک هفته برای پس‌تیمارهای غیر استریل و یک ماه برای پس تیمار استریل، به صورت درصد بیان گردید و پس از تبدیل به arcsine، آنالیز واریانس (ANOVA) آن محاسبه گشت.

نتایج

اثر ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی بذور قرار گرفته تحت پس‌تیمارهای غیر استریل:

در این مرحله اثر ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی و رشد بذوری بررسی شد که پس از خروج از LN تحت دو نوع پس‌تیمار متفاوت (نیم/ ٢٤ ساعت آب‌شویی و سپس انتقال بر روی ظروف حاوی کاغذ صافی مرطوب) قرار گرفتند.

در هر دو نوع پس‌تیمار (نیم ساعت و ٢٤ ساعت آبشویی)، بین بذور نگهداری شده در شرایط فراسرد (LN+) و بذور شاهد (LN-) از لحاظ زنده‌مانی در سطح ۵٪ ($\alpha \leq 5\%$) اختلاف وجود داشت (جدول ۱). بذور تیمار شده در نیتروژن مایع (LN+) در هر دو نوع پس‌تیمار، نسبت به شاهد (LN–) از درصد زنده‌مانی بالاتری برخوردار بودند ($\alpha \leq 5\%$) (شکل ۱). بالاترین درصد زنده‌مانی به ترتیب در بذور فراسرد شده‌ای مشاهده شد که تحت پس‌تیمار ٢٤ ساعت (۹۸/۲۱٪) و نیم ساعت (۹٤/۳۷٪) آبشویی قرار گرفتند.

[1] weight/volume
[2] Dimethyl Sulphoxide

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس درصد زنده‌مانی بذور

(+LN و -LN)

منابع تغییرات		C.V	میانگین مربعات	Pr > F
غیر استریل	نیم ساعت	٤/٩٠٩٠٣٨	١٨٥/٩٥	٠/٠١٧١
	٢٤ ساعت	٦/٩٥٢٢٦٦	٣٧٥/٩٠	٠/٠٢٠٠
استریل		١٥/٠٣١٩٥	١٦٨/٩٧	٠/١٩١٤

شکل ۱: اثر ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی بذور نگهداری شده در شرایط فراسرد (+LN) در مقایسه با شاهد (-LN). میانگین‌هایی که با حروف غیر یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

اثر ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی بذور قرار گرفته تحت پس‌تیمارهای استریل:

گرچه درصد زنده‌مانی بذور +LN (٧٦/١٦٪) بالاتر از بذور شاهد (٥٨/٢٧٪) بود، ولی این اختلاف در سطح ٥٪ معنی‌دار نبود (شکل ۱).

بحث

بسیاری از پروتکل‌های بکار رفته جهت نگهداری نمونه در شرایط فراسرد محتوای آب را از طریق خشک کردن بافت‌های بردبار و یا با تیمار آنها با محلول‌های غلیظی که آب را به طریقه اسمزی از سلول‌ها خارج می‌کنند کاهش می‌دهند. پروتکل‌های موفق محتوای آب سلول را تنظیم می‌کنند تا آسیب انجمادی و صدمه حاصل از خشک کردن به حداقل برسد. برای بسیاری از انواع سلول‌های غیرمقاوم، خشک نمودن (از طریق قرارگیری در معرض هوا، استفاده از محلول‌های غلیظ یا آبگیری انجمادی) آنها را به میزان کافی در برابر دماهای بسیار پایین کرایوژنیک حفاظت نمی‌کند. در این میان، غوطه‌وری سلول‌ها در محلول‌های حاوی ترکیبات ویژه، باعث پیشرفت عمده‌ای در زمینه کرایوبیولوژی مدرن گشته است (Volk and Walters, 2006). بذر گیاه یونجه از جمله بذور ارتدکس می‌باشد. تاکنون بذور یونجه زراعی (*Medicago sativa*) با محتوای رطوبتی ۸درصد بدون اینکه آسیبی ببیند با موفقیت در LN نگهداری شده است (Paroda and Arora, 1991) ولی در مورد بذور یونجه یکساله گزارشی مشاهده نگردید. جلوگیری از تشکیل و رشد یخ درون‌سلولی در طی انجماد، ذخیره و ذوب، عاملی مهم و بحرانی جهت نگهداری موفق نمونه‌ها در شرایط دمایی فراسرد می‌باشد. این امر با خارج کردن آب درون نمونه صورت می‌گیرد، چرا که در غیر این صورت آب در طی انجماد در دمای نیتروژن مایع بلورهای کشنده یخ را تشکیل می‌دهد (Volk and Walters, 2006). در طی این پژوهش آبگیری بذور با استفاده از سیلیکاژل صورت گرفت که باعث کاهش وزن بذور از ۱/۹۰ g به ۱/۸٦ g گشت. خشک کردن نمونه با جریان هوا در ویال درب بسته حاوی سیلیکاژل یکی از روش‌های مرسوم برای آبگیری می‌باشد (Panis and Lambardi, 2005) که ما در این پژوهش به جای ویال درب بسته از دسیکاتور استفاده نمودیم.

پس از آبگیری، بذور به روش ویتریفیکاسیون تیمار یافتند. روش ویتریفیکاسیون بر پایه تیمار دادن نمونه‌ها با یک محلول ویتریفیکاسیون غلیظ برای دوره‌های زمانی متغیر و به دنبال آن انتقال مستقیم به درون نیتروژن مایع بنا نهاده شده است. این کار باعث ویتریفیکاسیون (یا شیشه‌ای شدن) آب‌های میان و برون‌سلولی می‌گردد. رایج‌ترین محلولی که برای این امر به کار برده می‌شود PVS2 است که ترکیب غلیظی از مواد محافظت کننده در برابر انجماد نفوذ کننده و غیر نفوذ کننده می‌باشد. دلیل موفقیت این روش آسانی، قابلیت تکثیر بالای نمونه‌های ذخیره شده و کاربرد موفقیت آمیز آن بر روی بسیاری از بافت‌ها و گونه‌های گیاهی می‌باشد (Panis and Lambardi, 2005). محلول PVS2 در دمای حدود

۱۱۵°C- به صورت شیشه تغییر حالت می‌یابد یا ویتریفیه[1] می‌شود. این ماده احتمالاً به عنوان یک خشک کننده عمل می‌نماید و از میزان آبی که باعث تشکیل بلورهای کشنده می‌گردد، می‌کاهد. این محلول ساختار سلول را در حین خشک شدن و سرد شدن تثبیت می‌نماید. عوامل ویتریفیکاسیون ممکن است ساختار آب باقی‌مانده در درون سلول را به طریقی آرایش دهند که احتمال انجماد آن کم‌تر باشد (Volk and Walters, 2006).

کلید یک ویتریفیکاسیون موفق آبگیری اسمزی نمونه‌ها با قرارگیری در مجاورت محلول PVS2 است. ولی پیش از آن لازم که نمونه‌ها از لحاظ اسمزی حفاظت شوند؛ چرا که در غیر این صورت تنش اسمزی در نمونه گیاهی به مرحله آسیب رساننده خواهد رسید (Hirai and Sakai, 1998). بدین منظور بذور به مدت ۲۰ دقیقه در LS (محلول گلیسرول ۲ M در سوکروز ۰/٦ M) بارگیری شدند (Sant et al., 2006). پس از آن به کرایوویال‌های ۲ ml حاوی ۰/۵ ml محلول PVS2 صفر درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند و بلافاصله در LN ذخیره شدند. مدت زمان قرارگیری نمونه در معرض PVS2 از جمله عوامل موثر در زنده‌مانی پس از خروج از LN است. اگر این مدت طولانی شود این محلول می‌تواند کشنده باشد (Volk and Walters, 2006). در بررسی زنده‌مانی جوانه‌های انتهایی نعنا، Volk و همکاران (۲۰۰٦) مشاهده نمودند که قرارگیری آنها در PVS2 با دمای ۲۲ °C نسبت به °C صفر آسیب رساننده‌تر بود. به نظر می‌رسد که در پژوهش حاضر، دمای محلول ویتریفیه کننده و مدت زمان کوتاه نگهداری بذور در این محلول پیش از انتقال به LN در دستیابی به درصد بالای زنده‌مانی بذور موثر بوده است.

ذوب سریع نمونه‌های درون کرایوویال‌ها پس از خروج از LN روشی مناسب برای افزایش زنده‌مانی نمونه‌های بذور تشخیص داده شد. همچنان‌که Paroda و Arora (۱۹۹۱) نیز قراردادن نمونه‌ها درون حمام آبی دارای دمای °C ٤٠-۳۵ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه، بلافاصله پس از خروج از نیتروژن مایع، را یکی از طرق موثر ذوب گزارش داده‌اند. از اثر سمی حفاظت کننده‌های در برابر انجماد پس از انتقال به دماهای بالاتر می‌توان از طریق گرم کردن نمونه‌ها تا حدی که قرص کوچکی از یخ باقی بماند جلوگیری نمود. با این کار می‌توان اطمینان حاصل نمود که دمای تقریبی نمونه حدود ٤°C است (Schmale et al., 2006).

بذور گونه مورد مطالعه، پس از ذوب یا گرمادهی به محلول شستشوی ۲۲°C حاوی سوکروز M ۱/۲ در نمک‌های محیط کشت MS انتقال یافتند و سه بار به ترتیب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند. بدین دلیل که این محلول یک محلول بی‌بار کننده است که برای شستشو و از بین بردن اثرات سمی محلول PVS2 بکار برده می‌شود (Panis و همکاران، ۲۰۰٤). به علاوه پس از آبگیری انجام شده در مراحل پیش‌تیمار برای اجتناب از بروز شوک اسمزی در نمونه‌ها لازم است که آنها را پس از خروج از LN ابتدا در یک محلول غلیظ قرار داد و سپس به تدریج به محیط باززایی منتقل نمود. با توجه به تجربیاتی که قبلا صورت گرفت، دمای محلول شستشو را نیز می‌توان از عوامل موثر در بازیابی نمونه‌های بذر دانست. همانگونه که Finkle و همکاران (۱۹۸۲) نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند و اثر دما را پس از خروج از شرایط فراسرد بعنوان فاکتوری موثر بر زنده‌مانی سلول‌های منجمد شده برنج و نیشکر معرفی نمودند. آنها مشاهده کردند که شستشوی مواد محافظت کننده در برابر سرما در دمای اتاق (۲۲°C) (به جای دمای °C صفر) باعث بهبود بازیافت سوسپانسیون سلولی نیشکر و بافت‌های کالوس برنج شد.

یکی از مهمترین عوامل در افزایش درصد زنده‌مانی پس از خروج از LN استفاده از پس‌تیمارهای مناسب است

(Na and Kondo, 1996; Gagliardi et al., 2003).

بدین منظور بذور خارج شده تحت ۳ نوع پس‌تیمار

[1] Vitrified

متفاوت قرار گرفتند و اثرات ویتریفیکاسیون و این سه نوع پس‌تیمار بر درصد زنده‌مانی بذور *M. polymorpha* بررسی شد. در کلیه تیمارهای LN+ میزان زنده‌مانی بالاتری نسبت به شاهد بدست آمد. یکی از دلایل احتمالی برای این امر می‌تواند استفاده از پیش‌تیمارهای حفاظتی و آبگیری در بذور LN+ باشد. به نظر می‌رسد که تفاوت میزان جوانه‌زنی بین بذور شاهد و تیمارهای LN+ می‌توانند به دلیل محتوای رطوبتی بذور باشد (Martinkova and Honek, 2007). این احتمال نیز وجود دارد که دمای فراسرد با تاثیر بر عوامل رویش و جوانه‌زنی باعث بهبود زنده‌مانی و خروج بذور از حالت کمون شده باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در طی این پژوهش، ویتریفیکاسیون بعنوان روشی کارآمد برای حفاظت از بذور در برابر دمای فراسرد شناخته شد. بذور تیمار یافته به روش ویتریفیکاسیون پس از نگهداری در شرایط فراسرد از نظر توانایی زایشی یا زنده‌مانی آسیب ندیدند و ارزیابی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نیز هر دو این موضوع را تایید کردند. نگهداری بذور در دمای فراسرد نه تنها مانع از جوانه‌زنی آنها نشد بلکه در مورد تیمارهایی که به مدت ۲٤ ساعت و نیم ساعت زیر آب جاری قرار گرفته بودند درصد تولید دانه‌رست و گیاهچه (زنده‌مانی) نسبت به نمونه‌های شاهد بالاتر نیز بودند (به ترتیب ۹۸/۲۱درصد و ۹٤/۳۷ درصد). در رابطه با بذوری که تحت پس‌تیمار استریل قرارگرفته بودند نیز، گرچه درصد زنده‌مانی بذور قرار گرفته در شرایط فراسرد (۷٦/۱٦ درصد) از بذور شاهد (۵۸/۲۷ درصد) برتر بود، ولی از لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار نبود.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع انجام گرفت که از همکاران و مؤسسه مذکور تشکر می‌گردد.

References

Barbara M.R., 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo Letters* 22 (1): 97-104.

Baust J.G., 2007. Progression of cell and tissue vitrification. *Cell preservation technology* 5(1): 1-1.

Best B., 2006. *Vitrification of cryonics*. http://www.benbest.com/cryonics

Finkle B.J., Ulrich J.M., 1982. Cryopreservation removal temperature as a factor in the survival of frozen rice and sugarcane cells. *Cryobiology* 19(3): 329-335.

Gagliardi R.F., Pacheco G.P., Carneiro L.A, Valls J.F.M., Vieira M.L.C. and Mansur E., 2003. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetics stability of recovered plants. *CryoLetters* 24 (2): 103-110.

Ghamari Zare A., Naderi Shahab M., Shahrzad S. and Asare M., 2007. Conservation of seeds, apical and auxiliary buds and plant cells produced by tissue culture, a method for long term conservation of plant genetic resources. The 5th Iranian National Biotechnology Congress.

Hirai D., Sakai A., 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato *(Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Bulletin of Pope* Vol. 4, Not 21 November 15, 2002.

Kadkade and Prakash G., 2005. Cryopreservation of plant cells. United States Patent Application 20050158699.

KEW Royal Botanical Gardens web site, 2007. http://www.kew.org

Langis R., Schnabel B., Earle E.D., Steponkus P.L., 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *CryoLetters* 10:421-428.

Lipman C.B. and Lewis G.N., 1934. Tolerance of liquid air temperatures by seeds of higher plants for sixty days. *Plant Physiology* 9: 392-394.

Lipman C.B., 1936. Normal viability of seeds and bacterial spores after exposure to temperatures near the absolute zero. *Plant Physiology* 11: 201-205.

Martinkova Z., Honek A., 2007. The effect of cryopreservation on germination of Dandelion seeds. *Plant Protection Science* 43: 63-67.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with

tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-597.

Na H., Kondo K., 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordial from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. *Plant Science* 118(2): 195-201.

Nag K.K. and Street H.E., 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature* 245: 270-272.

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.

Panis B., Piette B., Swennen R., 2004. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168(1): 45-55.

Paroda R.S., Arora R.K., 1991. Plant genetic resources conservation and management concepts and approaches. International Board for Plant Genetic Resources, Regional office for South and Southeast Asia, c/o NBPGR, Pusa Campus, New Delhi 110 012, India.

Quatrano R.S., 1968. Freeze preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiol*ogy 43: 2057-2061.

Sakai A. and Noshiro M., 1975. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. pp. 317-326. In Crop genetic resources for today and tomorrow (Eds., O.H. Frankel and J.G. Hawkes). Cambridge University Press, Cambridge.

Saloma A.N., 2002. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14(2): 133-138.

Sant R., Taylor M., Tyagi A., 2006. Cryopreservation of *in-vitro* grown shoot tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. esculenta) by vitrification. *Cryo Letters* 27(3): 133-42.

Schmale K., Rademacher T., Fischer R., Hellwig S., 2006. Towards industrial usefulness- cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *Journal of Biotechnology* 124(1): 302-311.

Stanwood P.C., 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation, pp. 199-226. In Cryoperservation of plant cells and organs (Ed., K.K. Kartha). CRC Press, Boca Raton, Florida.

Towill L.E., 1982. Low temperature (-196° C) storage of the seed from the tuber-bearing Solanums species. *American Potato Journal* 59: 141-147.

Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T., 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8: 418-421.

Volk GM., Walters C., 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryopreservation. *Cryobiology* 52: 48-61.

Effect of Vitrification on Survival of *Medicago polymorpha* L. Cryopreserved Seeds

Ghorbanli, M[1]., Bonyadi, R[2]., Ghamari Zare, A[3]., and Shahrzad, S[3].

1. Islamic azad university Gorgan Branch, Iran
2. University of payame noor of Tehran, Iran
3. Recearch institute of Forest and Rangelands, Tehran, Iran

Abstract

In this research a new method for long term conservation of *Medicago polymorpha* seeds was developed by using cryopreservation. Two year cold acclimated seeds, collected from Iran rangelands, were desiccated using silica gel for four days and then cryopreserved by vitrification method. Seeds were loaded by loading solution containing 2 M glycerol and 0.6 M sucrose for 20 min and then inserted into cryo-vials containing 0.5 ml PVS2 in 0 °C prior to direct immersed into liquid nitrogen. Seeds were kept in liquid nitrogen for a week then thawed in 37 °C water bath for 2 min. The seeds were rehydrated and detoxified in a solution of MS medium salts containing 1.2 M sucrose respectively for 5, 10 and 15 min in 22 °C. At the final stage of post-treatment, three different procedures were used: (a,b) placing seeds under running water for 30 min and 24 h before being transferred to petri-dishes containing moist filter paper, (c) sterilization of seeds with 2% hypochloride then placed on MS medium containing 0.5 mg/lit GA_3. Germination percentage of cryopreserved seeds in all three post-treatments was higher than control (not cryopreserved seeds). This figure was respectively 94.37% and 98.21% for cryopreserved seeds of post-treatments a and b which was different at 0.05 levels with controls. However, germination percentage (76.16%) of cryopreserved seeds in post-treatment c showed no significant difference with control.

Keywords*:* Cryopreservation, Dehydration, Liquid nitrogen, Long term conservation, *Medicago polymorpha*, PVS2, Seeds conservation, Vitrification