جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۴ (ص ۱۲۲-۱۱۵)

بررسی اثر حفاظت فراسرد به روش شیشه‌ای کردن بر شاخص‌های رشد و نمو جنین‌های زیگوتی برنج

سیده زهرا طباطبایی پور[۱]، احمد معینی[۲*] و محمدصادق ثابت[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشیار و استادیار،
دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲۵)

چکیده

با توجه به اهمیت ژرم‌پلاسم ارقام برنج ایرانی و کاربرد آن در برنامه‌های اصلاحی و تبادل مواد ژنتیکی، اجرای تحقیقاتی در خصوص حفاظت این منابع ژنتیکی ارزشمند، ضروری است. در این زمینه، روش نوین حفاظت فراسرد که نگهداری نمونه‌های زیستی در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد است، کاربرد دارد. ازاین‌رو در پژوهش حاضر، حفاظت فراسرد جنین‌های زیگوتی هفت رقم برنج بومی و اصلاح‌شده به روش شیشه‌ای‌کردن بررسی شده است. در این تحقیق، جنین‌ها به مدت ۱، ۷ و ۳۰ روز در ازت مایع نگهداری شدند. پس از گذراندن دوره انجماد، جنین‌ها از ازت مایع خارج شده و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۰ - ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به محیط کشت MS انتقال یافتند. در بین ارقام مورد مطالعه برای صفت درصد جوانه‌زنی نهایی، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت؛ اما در صفت شاخص بنیه در سطح ۵ درصد و در سایر صفات در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت. در اکثر صفات مورد بررسی، بین مدت زمان‌های نگهداری در ازت مایع تفاوت معنی‌داری وجود نداشت؛ ولی نسبت به زمان شاهد کاهش معنی‌دار بود. بررسی سایر روش‌ها و تیمارهای حفاظت فراسرد ژرم‌پلاسم ارقام برنج بومی ایران توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جنین زیگوتی، حفاظت فراسرد، ژرم‌پلاسم برنج.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.)، مهم‌ترین غلهٔ جهان بعد از گندم و ذرت است (Tajadod *et al*., 2010). گیاه برنج ۲۴ گونه دارد که ۲۲ گونهٔ آن وحشی و دو گونهٔ *O. sativa* و *O. glabrrima* زراعی‌اند (Ravathi & Pillia, 2011). گونهٔ *O. sativa* در ایران دارای سه گروه صدری، چمپا و گرده است که ارقام بومی و محلی ایران هستند. ارقام اصلاح‌شده از تلاقی این ارقام با هم یا با ارقام Japonica و Indica به‌دست می‌آیند (Khodabandeh, 2000). ارقام بومی با شرایط خاص طبیعی پیرامون خود سازگار شده‌اند و در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی مقاوم‌اند (Amiri Ardakani, 2007).

ژرم‌پلاسم از مهم‌ترین منابع و ثروت‌های هر کشور محسوب می‌شود که از اهمیت خاصی برخوردار است و باید نسبت به حفظ و نگهداری آن اقدام کرد. حفاظت فراسرد، به‌معنای ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی (سلول‌های زنده، بافت‌ها یا اندام‌ها) در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد است که از اصلی‌ترین و موفق‌ترین روش‌های نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم به‌شمار می‌رود (Popov *et al*., 2006; Benson, 2008). در این دمای بسیار کم، همهٔ تقسیم‌های سلولی و فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی مواد گیاهی متوقف شده و در نتیجه نگهداری طولانی‌مدت آنها امکان‌پذیر می‌شود (Suzuki *et al*., 2005; Gonzalez-Arnao &

* تلفن: ۰۹۱۲۳۴۸۴۶۴۹
E-mail: moieni_a@modares.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(Engelmann, 2006; Shatnawi, 2011). جنین‌های زیگوتی به‌علت ساختار دوقطبی، می‌توانند به‌طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس به گیاهچه‌های طبیعی تبدیل شوند (Jafari-Mofidabadi, 2007)؛ ازاین‌رو می‌توان امیدوار بود که حداقل تغییرات ژنتیکی را پس از تبدیل به گیاه داشته باشند که این موضوع از لحاظ حفظ منابع ژنتیکی بسیار حائز اهمیت است (Thorp and Yeung, 2011). همچنین جنین‌های زیگوتی به‌دلیل نداشتن آندوسپرم و پوستهٔ بذر، به فضای کمتری نیاز دارند که سبب می‌شود تعداد نمونه‌های بیشتری در شرایط حفاظت فراسرد قابل نگهداری باشد و نیز هزینه‌های نگهداری کاهش یابد (Raghavan, 2003, Thorp & Yeung, 2011). تا کنون جنین‌های زیگوتی یا محورهای جنینی تقریباً ۱۰۰ گونه مختلف و نیز جنین‌های غیرزیگوتی تقریباً ۴۰ گونهٔ مختلف با استفاده از روش‌های متفاوت، حفاظت فراسرد شده‌اند که بذور این گونه‌ها از انواع بذور ارتودکس، ریکالسیترنت و حدواسط بوده‌اند (Thorp & Yeung, 2011).

یکی از روش‌های مؤثر در افزایش کارایی نگهداری و زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در شرایط انجماد، روش شیشه‌ای کردن با استفاده از محلول‌های شیشه‌ای کردن گیاهی (Plant Vitrification Solution) است. درحقیقت، شیشه‌ای کردن فرایندی است که آب از حالت مایع وارد یک فاز شیشه‌ای بی‌شکل (Glass State) می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگهداری بافت‌های گیاهی در ازت مایع بدون تشکیل کریستال‌های یخ امکان‌پذیر خواهد بود (Matsumoto *et al*., 2001; Wang *et al*., 2005; Gale *et al*., 2008).

تحقیقات در زمینهٔ حفاظت فراسرد با استفاده از روش‌های مختلف، بر روی جنین‌های زیگوتی جداشده از بذور ارتودکس تعدادی از گیاهان از جمله جو (Withers, 1982)، و *Acer saccharinum* (Beardmore & Whittle, 2005) و نیز روی بذور ارتودکس گیاهانی مانند زبان‌گنجشک (Chmielarz, 2009)، کیکم (Hatami *et al*., 2010)، و چند گونهٔ دیگر (Aryakia *et al*., 2012) با موفقیت انجام گرفته است.

متأسفانه در دهه‌های اخیر، عمدتاً ارقام بومی با ارقام اصلاح‌شده جایگزین شده یا در آینده جایگزین خواهند شد که در نتیجهٔ آن، به‌تدریج ارقام بومی کشور در معرض خطر قرار خواهند گرفت؛ ازاین‌رو باید از روش‌های نوین مختلف برای حفظ این منابع ژنتیکی باارزش استفاده شود (Arzani, 2004). در این راستا و در قالب تحقیق حاضر، برخی از شاخص‌های رشدونموی جنین‌های زیگوتی هفت رقم برنج در زمان‌های مختلف نگهداری در ازت مایع به روش شیشه‌ای کردن، به‌منظور بررسی کارایی روش حفاظت فراسرد ارزیابی شده‌اند. براساس اطلاعات به‌دست‌آمده، تاکنون تحقیقی در خصوص نگهداری ژرم‌پلاسم جنین‌های زیگوتی ارقام برنج از طریق حفاظت فراسرد انجام نگرفته است؛ ازاین‌رو نتایج این تحقیق می‌تواند در نگهداری ژرم‌پلاسم ارقام بومی این گونهٔ ارزشمند حائز اهمیت باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور هفت رقم برنج (*O. sativa* L.) شامل سه رقم محلی (طارم هاشمی، چمپای محلی و طارم محلی) و چهار رقم اصلاح‌شده (کوهرنگ، کشوری، ساحل و شیرودی) از مؤسسهٔ تحقیقات برنج کشور در آمل و مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد تهیه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

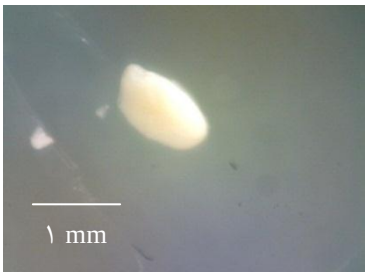
روش حفاظت فراسرد

ضدعفونی بذور و جدا کردن جنین‌ها

ابتدا بذور بالغ هر رقم برنج به‌صورت دستی پوست‌کنی شدند. برای ضدعفونی سطحی بذور، ابتدا آنها با چند قطره مایع ظرفشویی شسته شده و سپس بذور به لامینار ایرفلو منتقل شدند و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد (حجم/حجم) قرار گرفتند و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس بذور در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد (حجم/ وزن)، حاوی یک تا دو قطره توئین ۲۰ و همراه با تکان دادن به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت سه مرتبه (به‌ترتیب ۱، ۳ و ۵ دقیقه) با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از ضدعفونی، بذور به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آب با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند تا آندوسپرم آنها کاملاً آب جذب کند؛ سپس به‌وسیلهٔ کاغذ

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

واتمن خشک شدند. جنین‌های زیگوتی (تقریباً ۲ میلی‌متر) تحت شرایط استریل، به‌کمک پنس، اسکالپل و در زیر استریومیکروسکوپ جدا شدند (شکل ۱).



شکل ۱. جنین جداشده از بذر برنج

تیمار شیشه‌ای کردن

جنین‌ها در ۲ میلی‌لیتر محلول بارگیری اسمزی (Osmotic Loading Solution) شامل محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲ مول گلیسرول و ۰/۴ مول ساکارز و pH = ۵/۸ (Matsumoto *et al*., 1994) قرار داده شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای اتاق) نگهداری شدند. در مرحلهٔ بعد، این محلول حذف شد و ۲ میلی‌لیتر محلول شیشه‌ای‌کردن گیاهی (PVS2; Plant Vitrification Solution number 2) (حاوی ۳۰ درصد گلیسرول (حجم/حجم)، ۱۵ درصد اتیلن گلایکول (حجم/حجم)، ۱۵ درصد دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (حجم/وزن) (Sakai *et al*., 1990) و ۴۰ درصد محیط کشت پایهٔ MS حاوی ۰/۴ مول ساکارز (pH=۵/۸) به ویال‌های انجماد اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس ویال‌های انجماد در ازت مایع قرار گرفتند (Reed, 2008) و به مدت ۱، ۷ و ۳۰ روز در ازت مایع نگهداری شدند.

ارزیابی شاخص‌های رشدونمو جنین

به‌منظور بررسی قابلیت رشد مجدد جنین‌های زیگوتی بعد از سپری شدن زمان‌های مورد مطالعه، ویال‌های انجماد از ازت مایع خارج شده و در حمام آب گرم با دمای ۴۰ - ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند تا جنین‌های زیگوتی گرم شوند. سپس بلافاصله محلول PVS2 حذف و به‌جای آن از محلول شست‌وشودهنده (محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۲ مول ساکارز با pH=۵/۸) (Reed, 2008) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. به‌تدریج مقدار ساکارز از طریق حذف ۱ میلی‌لیتر از این محلول و اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع بدون تنظیم‌کننده‌های رشد کاهش یافت. برای باززایی گیاه از جنین‌های حفاظت فراسردشده، جنین‌ها در پتری دیش‌های یک‌بارمصرف (۱۵×۶۰ میلی‌متر) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS جامد (pH=۵/۸) فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد با ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار-آگار قرار داده شده و سپس به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد، با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس به مدت ۱۴ روز منتقل شدند. در هر پتری دیش، پنج جنین قرار داده شد. ظهور ریشه‌چه، ساقه‌چه یا کالوس از جنین‌ها، شاخص زنده بودن جنین‌ها درنظر گرفته شد (شکل ۲). تولید نوساقه و ریشه‌چهٔ طبیعی از جنین‌های زیگوتی حفاظت فراسردشده و مشاهدهٔ رشد آنها تا ۱۰ روز بعد از خروج نمونه‌ها از تیمار حفاظت فراسرد ثبت شد. تعداد جنین‌های جوانه‌زدهٔ هر روز تا پایان روز دهم شمارش شد و درصد جوانه‌زنی نهایی (رابطهٔ ۱) در پایان روز دهم محاسبه شد. براساس تعداد جنین جوانه‌زده در هر روز تا پایان روز دهم، شاخص سرعت جوانه‌زنی (رابطهٔ ۲) برآورد شد. صفت‌های طول ریشه‌چه، نوساقه و گیاهچه نیز در پایان روز دهم اندازه‌گیری شد و با مشخص شدن درصد جوانه‌زنی نهایی و میانگین طول گیاهچه، شاخص بنیه (رابطهٔ ۳) محاسبه شد (تمام صفات در مرحله درون‌شیشه‌ای و در پتری دیش بررسی شدند).

$$\text{درصد جوانه‌زنی نهایی} = \frac{\sum N_i}{N} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

در این رابطه Ni تعداد جنین‌های جوانه‌زده در روز iام و N تعداد کل جنین‌های آزمون شده است (Aryakia *et al*., 2012; Kandil *et al*., 2012).

$$\text{سرعت جوانه‌زنی} = \sum \frac{N_i}{T_i} \qquad (۲)$$

در رابطهٔ بالا Ni تعداد جنین‌های جوانه‌زده در هر روز؛ و Ti تعداد روز پس از کشت است (Aryakia *et al*., 2012).

(۳) = شاخص بنیه

درصد جوانه‌زنی نهایی × میانگین طول گیاهچه

(Aryakia *et al*., 2012; Kandil *et al*., 2012).

همزمان با انتقال جنین‌ها به ازت مایع، جنین‌های زیگوتی که به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شده بودند، به‌طور مستقیم به پتری‌دیش (۱۵×۶۰ میلی‌متر) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS منتقل شدند. تمام صفت‌ها برای گیاهچه‌های شاهد در شرایط درون‌شیشه‌ای در پتری‌دیش) نیز اندازه‌گیری شدند. اثر مدت زمان نگهداری در ازت مایع و رقم از طریق بررسی زنده ماندن جنین‌های حفاظت فراسردشده و مقایسهٔ آنها با شاهد ارزیابی شد.

آنالیز آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل دوعاملی، شامل رقم در هفت سطح به‌عنوان عامل اول، و مدت زمان نگهداری در ازت مایع در چهار سطح (شاهد (جنین‌های زیگوتی حفاظت فراسردنشده)، ۱، ۷ و ۳۰ روز) به‌عنوان عامل دوم، در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. برای بررسی نرمال بودن و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 19 و SAS 9.2 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد. مقایسهٔ میانگین‌ها نیز با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی اثر متقابل رقم در مدت زمان نگهداری در ازت مایع نشان داد که این اثر در صفات درصد جوانه‌زنی نهایی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه‌چه به طول نوساقه و شاخص بنیهٔ جنین معنی‌دار نبود (جدول ۱) و فقط در صفت طول نوساقه معنی‌دار بود و در این صفت، رقم چمپای محلی تحت تیمار شاهد و رقم ساحل تحت تیمار ۱ روز نگهداری در ازت مایع به‌ترتیب بیشترین و کمترین طول نوساقه را داشتند (شکل ۳). نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که بین ارقام مورد مطالعه برای صفت درصد جوانه‌زنی نهایی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، درحالی که در صفات سرعت جوانه‌زنی نهایی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه‌چه به طول نوساقه در سطح ۱ درصد و در مورد صفت شاخص بنیهٔ جنین در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری بین ارقام بررسی‌شده وجود داشت. نتایج نشان داد که اثر سادهٔ مدت زمان نگهداری در ازت مایع (۱، ۷ و ۳۰ روز و شاهد) برای صفت نسبت طول ریشه‌چه به طول نوساقه تفاوت معنی‌دار نداشت، اما در مورد صفات درصد جوانه‌زنی نهایی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیهٔ جنین در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار بود. جدول‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب نتایج مقایسهٔ میانگین ارقام مورد مطالعه و مدت زمان‌های نگهداری جنین‌های زیگوتی در ازت مایع را نشان می‌دهند.

شکل ۲. باززایی نوساقه از جنین زیگوتی برنج روی محیط کشت MS

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس تأثیرات رقم برنج و مدت زمان نگهداری جنین‌های زیگوتی برنج در ازت مایع بر صفات بررسی‌شده

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	درصد جوانه‌زنی نهایی	سرعت جوانه‌زنی (تعداد جنین جوانه‌زده در روز)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول نوساقه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه/ طول نوساقه	شاخص بنیه جنین
رقم	۶	۳۲۶/ ۹۸^{ns}	۰/۵۷**	۱۳۳/۰۳**	۲۱۶/۰۶ **	۳۸۶/۲۹**	۱/۶۶**	۳۲۵۵۶۹۱/۵۵*
مدت زمان نگهداری	۳	۲۶۰۹/۵۲**	۴/۸۵**	۲۳۷۳/۶۵**	۳۱۶۸/۴۴ **	۱۱۰۱۰/۰۶**	۰/۱۵ ^{ns}	۱/۲۲**
رقم× مدت زمان نگهداری	۱۸	۳۰۵/۸۲^{ns}	۰/۲۰ ^{ns}	۳۶/۷۸ ^{ns}	۷۴/۴۳ **	۱۳۲/۹۰ ^{ns}	۰/۱۹ ^{ns}	۱۵۳۶۵۷۱/۷۲ ^{ns}
خطا	۸۴	۲۹۵/۲۳	۰/۱۶	۲۶/۸۴	۲۷/۷۲	۸۹/۴۳	۰/۱۲	۱۱۲۳۵۳۸/۰۹
ضریب تغییرات		۲۱/۱۰	۰/۴۹	۶/۳۶	۶/۴۶	۱۱/۶۱	۰/۴۲	۱۳/۰۱

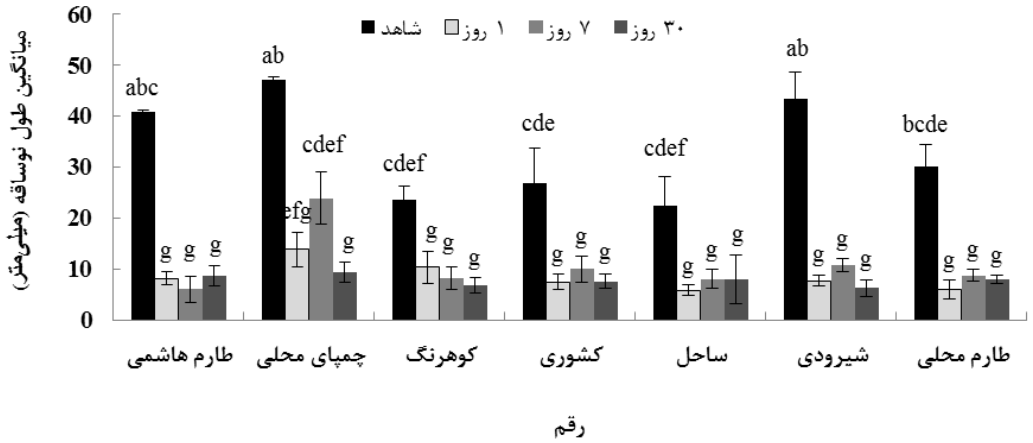
**، *و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد؛ و عدم معنی‌داری.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین ارقام برای صفات سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، نسبت طول ریشه‌چه به طول نوساقه و شاخص بنیهٔ جنین برنج با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال معنی‌داری ۵ و ۱ درصد.

رقم	سرعت جوانه‌زنی (تعداد جنین جوانه‌زده در روز)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	نسبت طول ریشه‌چه به طول نوساقه	شاخص بنیهٔ جنین
	خطای استاندارد ± میانگین صفات				
طارم هاشمی	۰/۸۷ ± ۰/۱۰	۱۲/۴۸ ± ۴/۱۲	۲۸/۴۰ ± ۸/۴۹	۰/۶۳ ± ۰/۰۸	۲۶۱۱/۶۶ ± ۸۸۶/۶۲
چمپای محلی	۱/۴۳ ± ۰/۲۲	۱۵/۸۳ ± ۳/۴۷	۳۹/۳۶ ± ۷/۸۴	۰/۷۲ ± ۰/۱۰	۳۵۹۳/۳۳ ± ۸۵۵/۳۶
کوهرنگ	۰/۸۰ ± ۰/۱۰	۱۴/۵۱ ± ۳/۳۱	۲۶/۷۸ ± ۵/۵۳	۱/۰۹ ± ۰/۰۸	۲۳۲۶/۰۰ ± ۶۲۴/۴۵
کشوری	۱/۱۲ ± ۰/۱۴	۱۰/۲۸ ± ۲/۳۳	۲۳/۲۵ ± ۵/۰۸	۰/۸۴ ± ۰/۰۸	۲۰۹۷/۶۶ ± ۵۳۴/۸۳
ساحل	۱/۲۵ ± ۰/۱۷	۱۷/۷۵ ± ۳/۸۰	۲۸/۸۰ ± ۶/۳۱	۱/۶۴ ± ۰/۱۸	۲۶۷۳/۰۰ ± ۶۶۲/۹۴
شیرودی	۱/۲۰ ± ۰/۲۳	۱۰/۴۵ ± ۱/۹۰	۲۷/۵۰ ± ۶/۵۸	۰/۷۸ ± ۰/۰۸	۲۵۳۹/۳۳ ± ۶۹۱/۸۸
طارم محلی	۱/۰۳ ± ۰/۱۶	۸/۵۶ ± ۲/۵۹	۲۱/۷۶ ± ۵/۷۲	۰/۵۵ ± ۰/۰۷	۲۰۳۴/۶۶ ± ۵۵۹/۳۱
LSD ٪۵	۰/۳۲	۴/۲۳	۷/۷۲	۰/۲۸	۸۶۵/۴۶
LSD ٪۱	۰/۴۳	۵/۶۴	۱۰/۳۰	۰/۳۷	۱۱۵۵/۳۹

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین مدت زمان نگهداری برای صفات درصد جوانه‌زنی نهایی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیهٔ جنین برنج با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال معنی‌داری ۵ و ۱ درصد

مدت زمان نگهداری	درصد جوانه‌زنی نهایی	سرعت جوانه‌زنی (تعداد جنین جوانه‌زده در روز)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	شاخص بنیهٔ جنین
	خطای استاندارد ± میانگین صفات				
شاهد	۹۸/۰۹ ± ۱/۳۱	۱/۸۲ ± ۰/۱۴	۲۸/۷۷ ± ۱/۸۹	۶۲/۲۳ ± ۳/۵۵	۶۱۷۰/۲۸ ± ۳۸۲/۲۹
۱ روز	۷۵/۲۳ ± ۳/۶۲	۰/۹۳ ± ۰/۰۸	۷/۸۸ ± ۰/۹۸	۱۶/۳۷ ± ۱/۶۴	۱۲۸۷/۰۴ ± ۱۶۱/۵۸
۷ روز	۷۵/۲۳ ± ۴/۹۵	۰/۸۴ ± ۰/۰۷	۷/۸۵ ± ۱/۲۶	۱۸/۶۶ ± ۲/۲۶	۱۵۵۱/۸۰ ± ۲۴۲/۰۰
۳۰ روز	۷۷/۱۴ ± ۴/۲۰	۰/۸۱ ± ۰/۰۶	۶/۸۴ ± ۰/۹۴	۱۴/۶۴ ± ۱/۶۲	۱۲۰۵/۵۲ ± ۱۷۷/۰۲
LSD ٪۵	۱۰/۶۰	۰/۲۴	۳/۱۹	۵/۸۳	۶۵۴/۲۲
LSD ٪۱	۱۴/۱۵	۰/۳۲	۴/۲۶	۷/۷۹	۸۷۳/۳۹



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین ترکیبات تیماری رقم × مدت زمان نگهداری جنین‌های زیگوتی در ازت مایع برای صفت میانگین طول نوساقه (میلی‌متر) در برنج

در اکثر صفات بررسی‌شده، تفاوت معنی‌داری بین مدت زمان‌های مختلف نگهداری در ازت مایع (۱، ۷ و ۳۰ روز) وجود نداشت، ولی نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار بود، که بیشترین و کمترین کاهش به‌ترتیب مربوط به صفات شاخص بنیهٔ جنین و درصد جوانه‌زنی نهایی بود. در پژوهش Kaviani *et al.* (2010) دربارهٔ حفاظت فراسرد

محورهای جنینی *Lilium*، شرایط انجماد، درصد جوانه‌زنی محورهای جنینی را کاهش نداد و حتی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شد. همچنین در گزارش Wen *et al.* (2010)، درصد جوانه‌زنی جنین‌های زیگوتی ذرت پس از سه روز نگهداری در ازت مایع بین ۸۰ تا ۸۵ درصد بود که نسبت به شاهد (عدم نگهداری در ازت مایع) تفاوت معنی‌داری نداشت. گزارش شده است که به‌طور معمول، مدت زمان انجماد تأثیری بر حفاظت فراسرد از راه شیشه‌ای کردن ندارد (Rong & Hua, 2009) و به‌نظر می‌رسد در صورتی که ریزنمونه بتواند در ازت مایع زنده بماند، تفاوت محسوسی در مدت زمان‌های مختلف نگهداری در ازت مایع وجود ندارد؛ زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی، مسئلهٔ مدت زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌شود (Shatnawi, 2011). در این دمای بسیار کم، همهٔ تقسیم‌های سلولی و فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی ریزنمونه‌های گیاهی متوقف می‌شوند (Suzuki *et al.*, 2005; Gonzalez-Arnao & Engelmann, 2006). تنها ارزیابی معتبر حفاظت فراسرد، رشد مجدد جنین‌های زیگوتی و ایجاد گیاهچه‌های طبیعی پس از مرحلهٔ ذوب شدن است و سایر موارد مثل رشد کالوس نمی‌تواند دلیل بر حفاظت ژرم‌پلاسم باشد (Panis *et al.*, 2005). در این پژوهش، ارقام مورد مطالعه در اکثر صفت‌های بررسی‌شده تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. در بین ارقام بررسی‌شده، رقم چمپای محلی و رقم طارم محلی در اکثر شاخص‌های رشدونمو مورد مطالعه به‌ترتیب پاسخ بهتر و ضعیف‌تری به شرایط حفاظت فراسرد نشان دادند. همچنین رقم چمپای محلی از بین ارقام محلی، و رقم شیرودی از بین ارقام اصلاح‌شده بهترین پاسخ را به شرایط حفاظت فراسرد نشان دادند (جدول ۲). این نتیجه نشان می‌دهد که فرایند حفاظت فراسرد و رشد جنین‌های زیگوتی پس از خروج از شرایط انجماد به رقم و ژنوتیپ نیز بستگی دارد و پاسخ ارقام مختلف به شرایط حفاظت فراسرد و رشد مجدد مواد گیاهی بعد از حفاظت فراسرد متفاوت است (Kami *et al.*, 2009; Brunakova *et al.*, 2011). در حقیقت، پتانسل باززایی گیاهان پس از دورهٔ حفاظت فراسرد، عامل مهمی محسوب می‌شود (Reed, 2008). در بین ارقام بررسی‌شده، رقم چمپای محلی بیشترین سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه و شاخص بنیهٔ جنین را داشت. سرعت جوانه‌زنی بیشتر سبب خروج سریع‌تر گیاهچه از بستر کشت (خاک، محیط کشت و ...)، استقرار بهتر و رشد سریع‌تر گیاهچه‌ها می‌شود (Aryakia *et al.*, 2012). شاخص بنیه با درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه ارتباط مستقیم دارد که نشان‌دهندهٔ هماهنگی قدرت جوانه‌زنی و قدرت رویش گیاه است که به عملکرد بیشتر منجر می‌شود (Aryakia *et al.*, 2012). کاهش ارتفاع گیاه در گیاهان باززایی‌شده از ژرم‌پلاسم حفاظت فراسردشده در پژوهش‌های قبل نیز گزارش شده است (Harding & Benson 1994; Harding, 1996). در گونه‌ها و ریزنمونه‌های مختلف، پاسخ‌های رشدی و مورفولوژیکی گیاهچه‌های باززایی‌شده پس از حفاظت انجمادی متفاوت است (Sershen *et al.*, 2012). از روش شیشه‌ای کردن برای حفاظت فراسرد جنین‌های زیگوتی ارکیدهٔ ژاپنی (*Bletilla striata*) (Ishikawa *et al.*, 1997) و محورهای جنینی ذرت (*Zea mays* L.) (Usman & Abdumalik, 2010) نیز استفاده شده که تأثیر مثبت این روش گزارش شده است. همچنین حفاظت فراسرد موفق جنین‌های زیگوتی بذور ارتودکس غلاتی مانند گندم و ذرت نیز گزارش شده است (Thorpe & Yeung, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت در شاخص‌های رشدونموی جنین‌های زیگوتی حفاظت فراسردشده به‌دلیل تفاوت ژنتیکی ارقام و پاسخ متفاوت آنها به شرایط انجماد است. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که نگهداری جنین‌های زیگوتی ارقام محلی و اصلاح‌شدهٔ برنج ایرانی در ازت مایع امکان‌پذیر است. درصد جوانه‌زنی جنین‌های زیگوتی پس از دورهٔ حفاظت انجمادی، در همهٔ تیمارها زیاد و بسیار امیدوارکننده بود و تفاوت معنی‌داری بین ارقام وجود نداشت. بررسی دیگر روش‌ها و تیمارهای حفاظت فراسردی ژرم‌پلاسم ارقام برنج بومی ایران توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از مؤسسهٔ تحقیقات برنج کشور در آمل و مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد، برای تأمین بذور مورد نیاز این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Amiri Ardakani, M. (2007). *Indigenous Knowledge in Rice Farming*. Esfahan: Sabouh Publication. (In Farsi)
2. Aryakia, E., Ramazani, H., Ghafoori, H., Dolatyari, A., Naghavi M. R. & Shahzadeh fazeli S. A. (2012). The effect of cryopreservation on germination and growth indices of some orthodox seeds. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 19, 218-230. (In Farsi)
3. Arzani, A. (2004). *Breeding Field Crops* (Authored by: Sleper & Poehlman). 3th edition. Isfahan University of Technology Publication. (In Farsi)
4. Benson, E. E. (2008). Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27, 141-219.
5. Beardmore, T. & Whittle, C. A. (2005). Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree Physiology*, 25, 965-972.
6. Brunakova, K., Zamecnik, J., Urbanova, M. & Cellarova, E. (2011). Dehydration status of ABA-treated and cold-acclimated *Hypericum perforatum* L. shoot tips subjected to cryopreservation. *Thermochimica Acta*, 525, 62-70.
7. Chmielarz, P. (2009). Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds. *Tree Physiology*, 29, 1279-1285.
8. Gale, S., John, A., Harding, K. & Benson, E. (2008). Developing cryopreservation for *Picea sitchensis* (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. *CryoLetters*, 29, 135-144.
9. Gonzalez-Arnao, M. T. & Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of plant germplasm using encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27, 155-168.
10. Harding, K. (1996). Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from *in vitro* culture. In: Normah, M. N., Narimah, M. K. & Clyde, M. M. (eds). *In-vitro conservation of plant genetic resources*. University Kebangsaan, Malaysia, pp 135-168.
11. Harding, K. & Benson, E. E. (1994). A study of growth, flowering and tuberisation in plants derived from cryopreserved potato shoot-tips: implications for *in vitro* germplasm collections. *CryoLetters*, 15, 59-66.
12. Hatami1, F., Jebelli, M., Naderi Shahab, M., Tabari, M. & Jafari, A. A. (2010). Cryopreservation of *Acer monspessulanum* seeds. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 18(1), 12-23.
13. Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K. & Shimomura, K. (1997). Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 16, 754-757.
14. Jafari-Mofidabadi, A. (2007). *Tissue Culture Methods in Breeding and Reproduction of Plants*. Anemone Village, Publication. (In Farsi)
15. Kami, D., Shi, L., Sato, T., Suzuki, T. & Oosawa, K. (2009). Cryopreservation of shoot apices of hawthorn *in vitro* cultures originating from East Asia. *Scientia Horticulturae*, 120, 84-88.
16. Kandil, A. A., Sharief A. E. & Nassar, E. S. E. (2012). Response of some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to germination under salinity stress. *International Journal of Agriculture Sciences*, 4, 272-277.
17. Kaviani, B., Padasht Dehkaei, M. N., Hashemabadai, D. & Darabi, A. H. (2010). Cryopreservation of *Lilium Ledebourii* (Baker) Bioss. By encapsulation-vitrification and *in vivo* media for planting of germplasm. *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 8(5), 556-560.
18. Khodabandeh, N. (2000). *Cereals* (6th ed). Tehran University Publications. (In Farsi)
19. Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H. & Sakai, A. (2001). Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrifiation of dormant shoot tips. *Plant Cell Report*, 20, 398-402.
20. Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. (1994). Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 13, 442-446.
21. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
22. Panis, B., Piette, B. & Swennen, R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, 168, 45-55.
23. Popov, A. S., Popova, E. V., Nikishina, T. V. & Vysotskaya, O. N. (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29, 403-410.
24. Raghavan, V. (2003). One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39, 437-442.
25. Ravathi, S. & Pillia, M. A. (2011). *In vitro* callus induction in rice (*Oryza sativa* L.). *Research in Plant Biology*, 1(5), 13-15.
26. Reed, B. M. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York: Springer.

27. Rong, H. S. & Hua, Y. M. (2009). High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99, 217-226.
28. Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 9, 30-33.
29. Sershen, Varghese, B., Pammenter, N. W. and Berjak, P. (2012). Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress-A case study on two amaryllid species. *Journal of Plant Physiology*, 169, 999-1011. Available on the www.SciVerseScienceDirect.com.
30. Shatnawi, M. A. (2011). Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification**.** *World Applied Sciences Journal*, 15, 318-325.
31. Suzuki, M., Ishikawa, M. & Akihama, T. (2005). Cryopreservation of encapsulated gentian axillary needed to increase recovery of tips after cryopreservation buds following 2 step preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 115-121.
32. Tajadod, G., Farzami sepehr, M. & Kalami, Z. (2010). The effect of two plant growth regulators on callus generation of *Oryza Sativa* L. var Hashemi. *Journal of Biology iau-garmsar*, 5(3), 13-20. (In Farsi)
33. Thorpe, T. A. and Yeung, E. C. (2011). *Plant Embryo Culture**:** Methods and Protocols*, Humana Press, Springer Science, Business Media, Spring Street, New York, USA.
34. Usman, I. S. & Abdulmalik, M. M. (2010). Cryopreservation of embryonic axes of maize (*Zea mays* L.) by vitrification protocol. *African Journal of Biotechnology*, 9, 8955-8957.
35. Wang, Y. L., Fan, M. J. & Liaw, S. I. (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46, 29-34.
36. Wen, B., Wang, R., Cheng, H. & Song, S. (2010). Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. *Protoplasma*, 239, 57-67.
37. Withers, L. A. (1982). The development of cryopreservation techniques for plant cell, tissue and organ culture. In: Fujiwara A (ed), In: Proceedings of *5th International Congress Plant Cell Tissue Culture*, Tokyo, Japan, pp 793-794.