

## نگهداری درازمدت ژرم پلاسما شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.)، یک درختچه‌ی زینتی در حال انقراض، در شرایط فراسرد با کیسوله کردن-آب برداری و باززایی آن توسط هورمون‌های گیاهی

بهزاد کاویانی\*<sup>۱</sup> و ناصر نگهدار<sup>۱ و ۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، موسسه‌ی تحقیقاتی علوم کشاورزی و بیوتکنولوژی هیرکان، آمل، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۹/۱۶)

### چکیده:

شمشاد خزری یا شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana* Pojark. یا *Buxus sempervirens auct non L.*) یک گونه‌ی زینتی درختچه‌ای است که در صنایع مختلف از جمله صنایع دستی و زینتی کاربرد دارد. خطر انقراض، نسل این گیاه را تهدید می‌کند. نگهداری ژرم پلاسما گیاهان به-ویژه گیاهانی که در خطر انقراض نسل قرار دارند، از اهداف محققان و دولت مردان در سراسر جهان است. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، نگهداری درازمدت ژرم پلاسما شمشاد خزری در ازت مایع با پیش تیمار سوکروز و کیسوله کردن-آب برداری بود. ژرم پلاسماها یا ریزنمونه‌های مورد استفاده، بذور و جوانه‌ی راسی بودند که از گیاهان مادری رشد یافته در گلخانه تهیه شدند. این پژوهش یک روش بسیار کارآمد برای ضد عفونی ریزنمونه‌ها به‌ویژه سرشاخه را ارائه می‌کند. در محیط‌های باززایی ژرم پلاسماها، بعد از نگهداری در ازت مایع، از غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر سه تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی BAP، IBA و NAA استفاده شد. بررسی‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (RCD) در ۴ تکرار انجام شدند. نتایج تحقیق نشان داد که کیسوله کردن-آب برداری به‌عنوان یک پیش تیمار، نقش موثری در بقا و قدرت جوانه‌زنی جوانه‌ی راسی داشت. حدود ۵۰ درصد از جوانه‌های راسی کیسوله شده بعد از نگهداری در ازت مایع، قدرت جوانه‌زنی خود را حفظ کردند. بالاترین درصد جوانه‌زنی جوانه‌های راسی کیسوله شده (۶۰ درصد) در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون NAA با تحریک جوانه‌زنی جوانه‌های راسی کیسوله شده به میزان ۴۸ درصد نیز محیط مناسبی بود. هیچ‌یک از بذور کیسوله شده و کیسوله نشده و سرشاخه-های کیسوله نشده بعد از نگهداری در ازت مایع و کشت در محیط باززایی، بقای نداشتند و جوانه نزدند.

واژه‌های کلیدی: ازت مایع، بانک ژن، بذور مصنوعی، خزانه‌ی ژنتیکی، گیاهان زینتی

### مقدمه:

یک جنس از حدود ۷۰ گونه از خانواده‌ی شمشاد یا کیش (*Buxaceae*)، یک گونه‌ی زینتی درختچه‌ای است که در صنایع مختلف از جمله صنایع دستی و زینتی کاربرد دارد

شمشاد خزری یا شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana* Pojark.) یا *Buxus sempervirens auct non L.* با نام انگلیسی box tree

مرحله‌ی کالوس، در نتیجه بدون انجام جهش به گیاه کامل تبدیل می‌شوند، مناسب‌تر هستند. به‌همین دلیل، در این روش معمولاً از محورهای جنینی و جوانه‌ها (راسی و محوری) استفاده می‌شود (Sakai, 2000; Benelli et al., 2013).

در شرایط آزمایشگاهی، ژرم‌پلاسم‌ها در محیط کشت، در یخچال، فریزر و ازت مایع نگهداری می‌شوند. مناسب‌ترین روش برای دستیابی به این هدف، نگهداری در شرایط فراسرد (ازت مایع) ژرم‌پلاسم است. تنش بالای حاصل از نگهداری ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پایین ازت مایع، نیاز به استفاده از پیش‌تیمارها را کاملاً توجیه می‌کند (Engelmann, 2009). بنابراین قبل از قراردادن ژرم‌پلاسم‌ها در ازت مایع، لازم است از پیش تیمارهای مناسب استفاده شود. این پیش‌تیمارها، تنش حاصل از برودت بسیار زیاد ازت مایع روی سلول‌های گیاهی را کاهش می‌دهد (Kulus and Zalewska, 2014). از این پیش‌تیمارها می‌توان به خشک‌کردن در هوا، آب‌برداری با استفاده از انجماد، کاربرد ترکیبات نفوذکننده به درون سلول، کاربرد ترکیبات نفوذناپذیر به درون سلول، متابولیسم سازگارکننده، کپسوله‌کردن آب‌برداری، شیشه‌ای‌کردن، خشک‌کردن بسیار سریع و انجماد آهسته اشاره کرد (Kaviani, 2011). از بین این روش‌ها، بیشترین کاربرد را روش‌های کپسوله‌کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن دارند (Kulus and Zalewska, 2014).

استفاده از روش انجماد برای نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در درجه حرارت بسیار پایین ازت مایع روشی مناسب برای ذخیره‌ی درازمدت منابع ژنتیکی گیاهی است. از آنجایی که تحت این شرایط فعالیت‌های بیوشیمیایی و اکثر مراحل فیزیکی به‌طور کامل متوقف می‌شوند، ماده‌ی گیاهی می‌تواند برای دوره‌های نامحدود نگهداری شود. این روش به محقق اجازه می‌دهد لاین‌های سلولی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد را حفظ کند (Sakai, 2000; Bernard et al., 2002). شیشه‌ای‌کردن و کپسوله‌کردن-آب‌برداری دو فن جدید نگهداری در شرایط انجماد ژرم‌پلاسم‌های گیاهی هستند (Panis and Lambardi, 2005). در فن شیشه‌ای‌کردن، ژرم‌پلاسم به‌مدت کوتاهی در معرض محلول‌های غلیظ حمایت‌کننده در برابر انجماد قرار می‌گیرد

(Orhan et al., 2012). موطن این گونه، جنگل‌های جلگه‌ای شمال ایران است. اغلب رویشگاه‌های شمشاد از بین رفته‌اند و در حال حاضر تنها رویشگاه خالص و انبوه آن پارک جنگلی سی‌سنگان است. رشد و نمو آن بسیار کند است ولی دوام و دیرزیستی آن نسبتاً بالا است.

گیاهان در معرض انواع خطرهای ناشی از شرایط نامساعد طبیعی (زیستی و غیرزیستی) هستند. این شرایط نامساعد می‌تواند منجر به حذف برخی گونه‌های گیاهی، در نتیجه حذف خزانه‌ی ژنتیکی با ارزش شود. بیش از صد هزار گونه‌ی گیاهی یعنی حدود یک‌سوم گونه‌های گیاهی جهان در معرض خطر انقراض قرار دارند (Panis and Lambardi, 2005). تلاش جهانی برای حفظ و حراست خزانه‌ی ژنتیکی در حال انجام است. احساس نیاز برای حفظ ژرم‌پلاسم گیاهی با ارزش به ویژه توسط تولیدکنندگان و اصلاح‌کنندگان گیاهی در حال افزایش است. حفظ و نگهداری تنوع زیستی گیاهی برای برنامه‌های اصلاح گیاهی و مهندسی ژنتیک ضروری است. به علاوه، این تنوع زیستی، منبعی برای استفاده در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی-آرایشی می‌باشد. حفظ تنوع زیستی گیاهی، خطر فرسایش ژنتیکی را کاهش می‌دهد (Sakai, 2000; Kaviani, 2011; Kulus and Zalewska, 2014).

نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در دو شرایط طبیعی و آزمایشگاهی انجام می‌شود. نگهداری در شرایط طبیعی، خطر حذف خزانه‌ی ژنتیکی را به‌دلیل حضور انواع تنش‌ها به‌طور کامل منتفی نمی‌کند. نگهداری در شرایط آزمایشگاهی یا درون‌شیشه‌ای، این خطرها را به حداقل می‌رساند و در نهایت باعث حفظ خزانه‌ی ژنتیکی می‌شود (Kaviani, 2011). نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهانی که از نظر اقتصادی، غذایی، دارویی، زینتی، بهداشتی و آرایشی حائز اهمیت بیشتری هستند، در اولویت قرار دارد (Halmagyi and Pinker, 2006; Engelmann, 2012).

از همه‌ی اندام‌های گیاهی می‌توان به‌عنوان ریزنمونه برای نگهداری درازمدت در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده کرد، اما ریزنمونه‌هایی که بعد از نگهداری، به‌سرعت و بدون گذر از

جهان روی شمشاد خزری (*B. hyrcana*) انجام شده است، نگهداری بذر و سرشاخه‌ی شمشاد خزری به‌عنوان ژرم پلاسم یا ریزنمونه در ازت مایع متعاقب پیش‌تیمار با سوکروز و کپسوله‌کردن-آب‌برداری بود. بعد از نگهداری ژرم پلاسم‌ها در ازت مایع، آنها در محیط‌های باززایی حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA، BAP، و NAA کشت شدند. استفاده از انواع هورمون‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف در محیط کشت باززایی جهت تسریع جوانه‌زنی ژرم پلاسم نگهداری‌شده در ازت مایع نیز تا کنون گزارش نشده است.

#### مواد و روش‌ها:

**شرایط آزمایش:** این طرح طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ در موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان واقع در شهر آمل استان مازندران به مرحله‌ی اجرا در آمد.

**منبع گیاهی:** ابتدا بذر و جوانه‌ی راسی گیاه شمشاد خزری (*Buxus sempervirens* auct non L. یا *Buxus hyrcana* Pojark.) از نهالستانی در شهرستان آمل خریداری و در گلخانه نگهداری شدند. بذر و قسمت انتهایی راس شاخه‌ی گیاهان دو ساله، بریده شده و به‌عنوان منبع ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

**ضدعفونی نمونه‌های گیاهی:** ضدعفونی نمونه‌ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه و اتانول انجام شد. در ابتدا، نمونه‌های گیاهی به‌مدت یک ساعت در زیر جریان روان آب شهری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی به‌خوبی شسته شدند. بعد از این مدت، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد قرار داده شدند، سپس ۳ بار با آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۵ درصد کلرید جیوه قرار دادند و پس از آبکشی کامل به‌مدت ۵ دقیقه در اتانول ۵ درصد ضدعفونی شدند. بعد از ۳ بار شستشوی کامل با آب مقطر استریل در زیر هود، ۵ تا ۱۰ میلی‌متری انتهای سرشاخه‌های ضدعفونی‌شده جدا شده و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۵۰ ظرف ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری انتخاب شده و در آنها تیمارهای هورمونی ریخته شد.

(Withers and Englemann, 1997; Sakai, 2000). فن کپسوله‌کردن-آب‌برداری، بر اساس فن‌آوری بذر مصنوعی توسعه یافته است. این فن توسط (Fabre and Dereuddre 1990) ابداع شد و شامل ژرم پلاسم درون تیله‌های آلزینات و کشت بعدی آن در محلول غلیظ سوکروز (۰/۷-۱/۵ مولار) و سپس آب‌برداری فیزیکی و غوطه‌ورکردن مستقیم در ازت مایع است. راهکارهای ترکیبی فنون فوق، که فن کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن نامیده می‌شود، طی چند سال اخیر توسعه یافته است (Matsumoto et al., 1995; Hirai et al., 1998; Sakai, 2000). نگهداری درازمدت ژرم پلاسم گیاهی با استفاده از روش انجماد تنها در صورتی موفقیت‌آمیز خواهد بود که از تشکیل کریستال‌های یخی کوچک درون سلول ممانعت به‌عمل آید (Wesley-Smith et al., 1998). مناسب‌ترین و پرکاربردترین ژرم پلاسم‌های گیاهی؛ دانه، محور جنینی و سرشاخه می‌باشند (Panis and Lambardi, 2005; Kaviani, 2011). استفاده از این ژرم پلاسم‌ها باعث می‌شود که بعد از دوره‌ی ذخیره، آنها بدون گذر از فاز کالوس، باززایی شوند. مطالعات زیادی روی نگهداری ژرم پلاسم گیاهان مختلف از جمله گیاهان زینتی و سایر گیاهان با ارزش اقتصادی و دارویی بالا در شرایط انجماد یا فراسرد انجام شده است (Panis and Lambardi, 2005; Kaviani, 2011; Kulus and Zalewska, 2014). در همه‌ی این مطالعات، هدف اصلی، پیدا کردن راه‌های مناسب برای بقای نمونه‌های گیاهی نگهداری‌شده در ازت مایع و باززایی بیشتر آنها بعد از نگهداری و در هنگام کشت در محیط است.

شمشاد خزری، گیاهی بسیار با ارزش از لحاظ اقتصادی و فضای سبز است. روش‌های نگهداری سنتی شمشاد خزری، روش‌های مناسبی نیستند. این گیاه همچنین از بیماری‌های مختلف رنج می‌برد و هجوم حشرات نیز حیات این گیاه را تهدید می‌کند (Orhan et al., 2012). نسل برخی از ارقام با ارزش شمشاد در خطر انقراض قرار دارد و یافتن راهی برای نگهداری میان‌مدت و درازمدت این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسد. این راه را باید در شرایط آزمایشگاهی جستجو کرد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر که برای اولین بار در سطح



شکل ۱- ژرم پلاسماهای (جوانه‌های راسی) کپسوله‌شده‌ی شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.).

**ذوب‌کردن:** بعد از یک ساعت نگهداری در ازت مایع، نمونه‌های منجمدشده به‌سرعت به درون آب ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه منتقل شدند. ذوب‌کردن به‌منظور حذف سریع بلورهای یخی تشکیل‌شده در سلول‌های بذرها و سرشاخه‌ها و عدم گسترش آن انجام می‌شود. بعد از ذوب کردن، بذرها و سرشاخه‌های کپسوله‌شده و کپسوله‌نشده به محیط کشت باززایی برای بررسی میزان بقا و سرعت جوانه زنی منتقل گردیدند.

**محیط کشت باززایی:** نمونه‌ها بعد از ذوب‌کردن، در محیط باززایی (محیط پایه‌ی MS) همراه با غلظت‌های مختلف از هر سه‌ی NAA، IBA و BAP با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند و در اتاق رشد قرار گرفتند. غلظت‌های مختلف BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA و NAA مورد استفاده قرار گرفتند.

**صفات اندازه‌گیری‌شده:** درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی ژرم پلاسماها (بذر و سرشاخه) بعد از نگهداری در ازت مایع در محیط باززایی همراه با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر سه تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی IBA، BAP و NAA مورد ارزیابی قرار گرفتند. چنانچه علائم جوانه‌زنی (ظهور ریشه یا نوشاخه) در نمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای (بذر و سرشاخه) مشاهده شد، نشان از زنده مانی آنهاست.

**تیمارها:** از غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر سه تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی BAP، IBA و NAA به عنوان تیمارهای هورمونی در محیط کشت (محیط پایه‌ی MS) استفاده شد. تعداد ۲۰ بذر و ۲۰ سرشاخه بعد از ضدعفونی سطحی مستقیماً در ازت مایع قرار داده شدند و در همین شرایط ماندند (شاهد). تعداد ۲۰ بذر و ۲۰ سرشاخه بعد از ضدعفونی سطحی، به محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز و سه درصد آلژینات سدیم منتقل شده و مدت یک ساعت در این محیط ماندند. سپس بذرها و سرشاخه‌ها به‌صورت انفرادی و توسط پنس از این محیط به محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز و صد میلی‌مولار کربنات کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) منتقل شده و مدت یک ساعت در این محیط ماندند. در این شرایط، دور هر بذر و سرشاخه، پوشش (کپسول) تشکیل شد (شکل ۱). کپسول‌های حاوی بذر و سرشاخه سپس به‌درون ظروف پتری بدون درب منتقل شده و مجموعه‌ی ظروف همراه با بذرها و سرشاخه‌های کپسوله‌شده در زیر جریان هوای تمیز هود لامینار فلو به‌مدت یک ساعت آب‌برداری شدند. جریان هوای تمیز هود لامینار فلو باعث تبخیر آب از کپسول و ریزنمونه‌ها (بذر و سرشاخه) می‌شود (آب‌برداری). بعد از این مدت، بذرها و سرشاخه‌ها به درون ازت مایع غوطه‌ور - گردیدند.

**طرح آماری و تجزیه‌ی داده‌ها:** بررسی داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی (RCD) در ۳ تکرار بود. هر ظرف پتری یک تکرار در نظر گرفته شد و در هر یک ۶ ریزنمونه به عنوان مشاهده کشت گردیدند. کرت‌ها، ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌ها می‌باشند. مشاهده و ثبت نتایج، هر ۲ هفته یکبار انجام شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS<sup>9.2</sup> و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

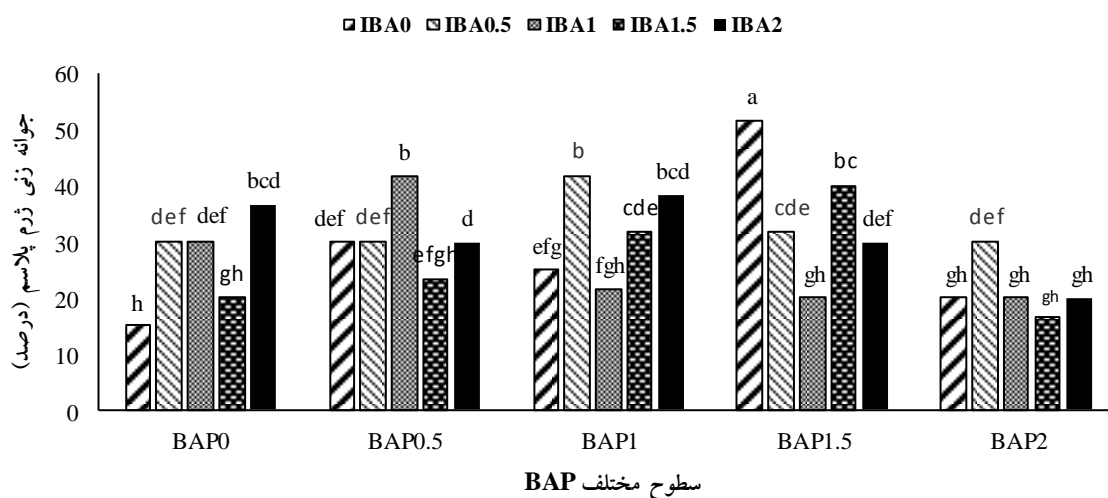
### نتایج

**درصد بقای ژرم پلاسماها:** ژرم پلاسماهای شمشاد خزری (بذر و سرشاخه) در محیط‌های کشت MS حاوی آلژینات سدیم و کربنات کلسیم، کیسوله (پوشش‌دار) شدند. کیسوله‌کردن یکی از پیش‌تیمارهای مهم محافظ در برابر دمای بسیار پایین ازت مایع در فن نگهداری ژرم پلاسما در شرایط فراسرد است. ژرم-پلاسماهای کیسوله‌شده و کیسوله‌نشده به‌درون ازت مایع غوطه‌ور گردیدند. نتایج نشان داد که تمام جوانه‌های راسی نگهداری‌شده در ازت مایع که کیسوله نشده بودند، همچنین تمام بذرهای کیسوله‌شده و کیسوله‌نشده بعد از مدت زمان نگهداری، قدرت جوانه‌زنی خود را به‌طور کامل از دست دادند. برعکس، ۶۰-۲۰ درصد از جوانه‌های راسی کیسوله‌شده (بر اساس نوع محیط حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌ها)، قدرت جوانه‌زنی و باززایی خود را بعد از مدت زمان نگهداری در ازت مایع، حفظ کردند (شکل‌های ۲ و ۳)، که بسیار حائز اهمیت است، به‌ویژه اینکه این گیاه در معرض خطر انقراض قرار دارد.

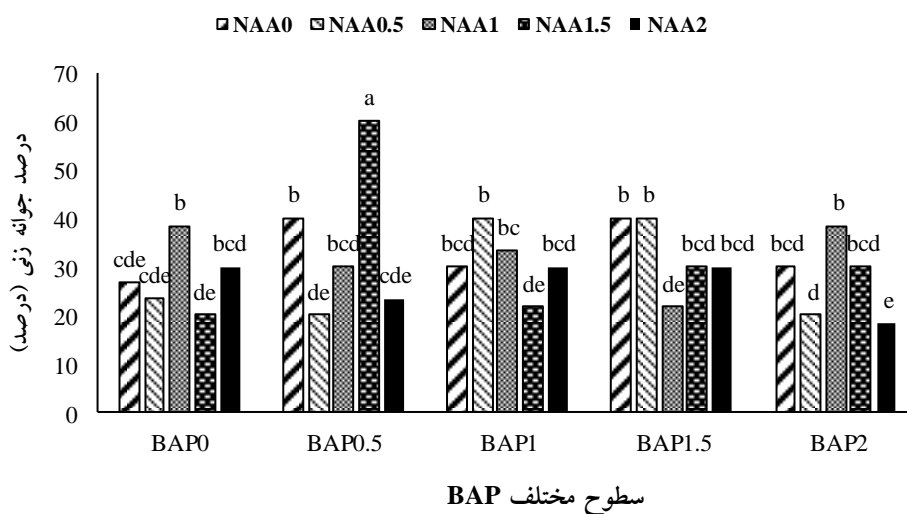
**اثر IBA و BAP روی قدرت بقا و جوانه‌زنی ژرم پلاسماها:** نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی ژرم پلاسماها در سطح احتمال ۱ درصد ( $p \leq 0.01$ ) معنی‌دار بود. بالاترین درصد بقای ژرم پلاسماها بعد از نگهداری در ازت مایع (۵۱/۶۶ درصد)، در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۴). این

نتیجه نشان‌دهنده‌ی نقش مهم‌تر BAP نسبت به IBA در ارتقای درصد بقا و جوانه‌زنی ژرم پلاسماها بعد از نگهداری در ازت مایع و طی کشت در محیط است. پایین‌ترین درصد بقای ژرم پلاسماها بعد از نگهداری در ازت مایع (۱۵/۰۰ درصد)، در محیط کشت شاهد به‌دست آمد (شکل ۳). در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ۵۱/۶۶ و ۱۵/۰۰ درصد) در ژرم-پلاسماهای کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر، در میان تمام غلظت‌های IBA استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی جوانه‌های راسی (به‌ترتیب با ۳۶/۶۶ و ۱۵/۰۰ درصد) در ژرم پلاسماهای کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر و شاهد دیده شد (شکل ۲).

**اثر NAA و BAP روی قدرت بقا و جوانه‌زنی ژرم پلاسماها:** نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل NAA و BAP بر درصد بقای ژرم پلاسماها در سطح احتمال ۱ درصد ( $p \leq 0.01$ ) معنی‌دار بود. بالاترین درصد بقای ژرم پلاسماها (۶۰ درصد)، بعد از نگهداری در ازت مایع، در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۵). پایین‌ترین درصد بقا (۱۸/۳۳ درصد) بعد از نگهداری در ازت مایع، مربوط به جوانه‌های راسی کیسوله‌شده‌ی کشت‌شده در محیط حاوی بیشترین غلظت NAA و BAP یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۴). این جدول نشان می‌دهد که نقش BAP در افزایش درصد جوانه‌زنی ژرم پلاسماها برجسته‌تر از NAA است. در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ۴۸/۰۰ و ۲۶/۶۶ درصد) در ژرم پلاسماهای کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر، در میان تمام غلظت‌های NAA استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ۳۸/۳۳ و ۲۰/۰۰ درصد) در ژرم پلاسماهای کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی درصد جوانه‌زنی ژرم پلاسما کپسوله‌شده‌ی شمشاد خزری. در ستون‌ها، میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای ال.اس.دی تفاوت معنی‌داری ندارند.



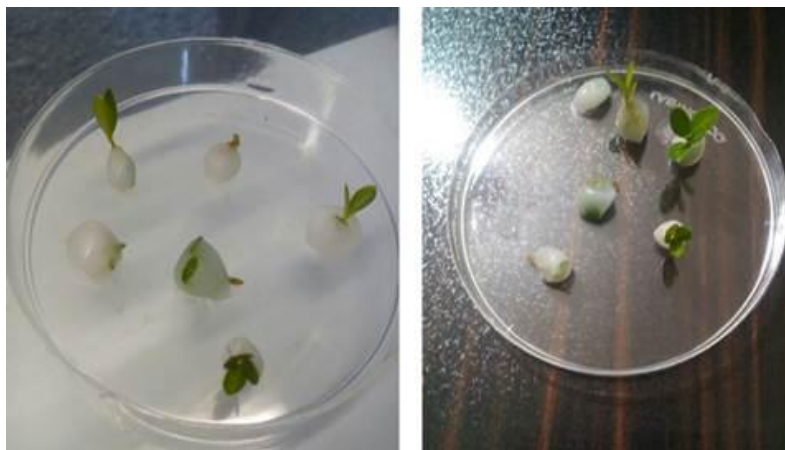
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA روی درصد جوانه‌زنی ژرم پلاسما کپسوله‌شده‌ی شمشاد خزری. در ستون‌ها، میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای ال.اس.دی تفاوت معنی‌داری ندارند.

لیتر دیده شد (شکل ۳).

ذخیره‌ی این منابع ژنتیکی با ارزش برای کارایی اصلاح‌شده در اصلاح گیاهان، حفظ تنوع ژنتیکی، تغییر ژنتیکی، مبادله‌ی ژرم پلاسما و تقاضای بازار بسیار مهم است (Engelmann and Engels, 2002; Kaviani, 2011; Wang *et al.*, 2012; Benelli *et al.*, 2013; Kulus and Zalewska, 2014). تلاش‌ها برای حفظ گیاهان در حال انجام است. نگهداری سنتی گیاهان در

بحث:

هر گیاه زینتی یک خزانه‌ی ژنتیکی با ارزش برای اصلاح است. بسیاری از گیاهان از جمله برخی گیاهان زینتی در خطر انقراض قرار دارند (Panis and Lambardi, 2005). حمایت و

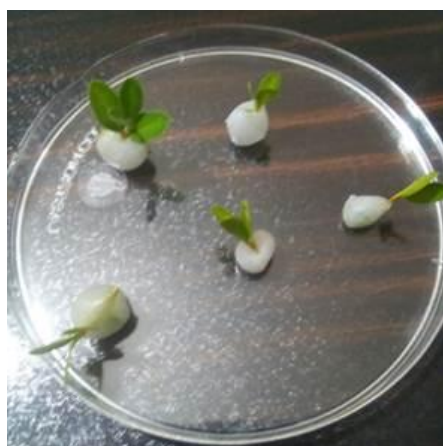


شکل ۴- اثر کپسوله کردن-آب برداری و غلظت های مختلف BAP و IBA روی درصد بقا و جوانه زنی ژرم پلاسم (جوانه ی راسی) شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.). ژرم پلاسم های کپسوله شده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP بدون NAA بیشترین درصد جوانه زنی را داشتند.

جدول ۱- تجزیه ی واریانس اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی BAP، NAA و IBA روی درصد بقا (قدرت جوانه زنی) ژرم پلاسم شمشاد خزری.

جوانه زنی ژرم پلاسم (در حضور NAA)	منبع تغییرات	جوانه زنی ژرم پلاسم (در حضور IBA)	درجه ی آزادی	منبع تغییرات
۳۴۲/۳**	NAA	۵۱۱/۳**	۴	IBA
۴۸۸/۴**	BAP	۱۷۹/۳**	۴	BAP
۲۵۱/۲**	NAA × BAP	۲۱۸/۷**	۱۶	IBA × BAP
۱۸/۶۶	خطا	۱۵/۲۸	۵۰	خطا
۱۴/۱۱	ضریب تغییرات	۱۲/۷۷		ضریب تغییرات

\*\* : معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۵- اثر کپسوله کردن-آب برداری و غلظت های مختلف BAP و NAA روی درصد بقا و جوانه زنی ژرم پلاسم (جوانه ی راسی) شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.). ژرم پلاسم های کپسوله شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین درصد جوانه زنی را داشتند.

شرایط استریل جریان هوای هود لامینار فلو و آب‌برداری فیزیکی توسط سوکروز، پر استفاده‌ترین پیش‌تیمار کاهنده‌ی تنش انجمادی هستند (Sakai *et al.*, 2000). روش کپسوله‌کردن-آب‌برداری برای سرشاخه‌های تعداد زیادی از گونه‌های مناطق گرمسیری مانند کاساوا و نیسکر و گونه‌های مناطق معتدله مانند گلابی، سیب، انگور و اکالیپتوس توسعه یافته است (Kaviani, 2011). حضور یک پوشش مغزی (تیله) اطراف ریزنمونه‌ها می‌تواند رشد آنها را بعد از ذوب‌کردن تحریک کند. سوسن چلچراغ، زیتون تلخ و چای برای نگهداری در ازت مایع، کپسوله شدند. مفیدبودن کپسوله‌کردن درون تیله‌های آلزینات برای این گونه‌ها نشان داده شده است (Kaviani, 2011). مطالعه‌ای روی نگهداری ژرم‌پلاسم شمشاد خزری در دمای بسیار پایین و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای تسریع جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم منجمدشده بعد از نگهداری در ازت مایع انجام نشده است. در مجموع، موفقیت در باززایی ژرم‌پلاسم‌های نگهداری‌شده در دمای بسیار پایین ازت مایع در سطح جهانی کمتر از ۳۰ درصد بوده است (Kaviani, 2011). در مطالعه‌ی حاضر حدود ۵۰ درصد از سرشاخه‌های منجمدشده قدرت بقا و جوانه‌زنی خود را حفظ کردند. باززایی در سرشاخه‌های منجمدشده‌ی داودی که با روش کپسوله‌کردن-آب‌برداری پیش‌تیمار شده بودند، ۲۰ درصد بود (Sakai *et al.*, 2000).

در گونه‌های زینتی، فنون انجماد یک‌مرحله‌ای (مانند شیشه‌ای‌کردن، کپسوله‌کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن) به‌طور گسترده‌ای نسبت به سردکردن آهسته ارجح است. از جمله گیاهان زینتی که با این روش نگهداری شده‌اند عبارتند از: داودی، افرا، گل سپاس، میخک، قره‌قاپ و رازک (Kaviani, 2011). چند نوع ارکید با استفاده از کپسوله‌کردن-آب‌برداری و شیشه‌ای‌کردن در شرایط انجماد نگهداری شدند. نگهداری ژرم‌پلاسم سوسن چلچراغ در شرایط دمای بسیار پایین با روش‌های کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن و کپسوله‌کردن-آب‌برداری همچنین با استفاده از سوکروز و آب‌برداری انجام شد (Kaviani, 2010). این مطالعه نشان داد که بقا در

مزرعه و یا گلخانه هزینه و دقت زیادی لازم دارد (Reed, 2006). امروزه، رویکردهای مکمل مهم برای بانک‌های بذر و باغ‌های کلون که توسط بیوتکنولوژی ارائه می‌شود، نگهداری در شرایط درون‌شیشه‌ای (ذخیره با رشد آهسته) یا در دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد (نگهداری در ازت مایع) مواد گیاهی است. نگهداری ژرم‌پلاسم در شرایط انجماد به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بیش از ۲۰۰ گونه‌ی زراعی و باغی به‌کار رفته است (Zhao *et al.*, 2005; Kulus and Zalewska, 2014). درک اهمیت حفظ خزانه‌ی ژنتیکی گیاهان زینتی پایین بوده است، اگرچه در سال‌های اخیر رو به افزایش بوده است. بر خلاف ریزازدیادی، مطالعه‌ی زیادی روی نگهداری ژرم-پلاسم گیاهان زینتی در شرایط فراسرد انجام نشده است (Kulus and Zalewska, 2014).

امروزه فن کپسوله‌کردن-آب‌برداری ژرم‌پلاسم گیاهی، پر استفاده‌ترین روش برای نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان زینتی در جهان است (Kulus and Zalewska, 2014). به احتمال زیاد در آینده‌ی نزدیک فنون ترکیبی، جایگزین این فن خواهند شد (Kulus and Zalewska, 2014). پژوهش حاضر نقش انکارناپذیر کپسوله‌کردن در حفظ ژرم‌پلاسم گیاه شمشاد خزری قراردادده‌شده در ازت مایع را نشان داد، به‌طوری‌که تمام ژرم‌پلاسم‌های کپسوله‌نشده بعد از قرارگیری در ازت مایع، قدرت جوانه‌زنی خود را به‌طور کامل از دست دادند. این نتیجه توسط بسیاری از محققان نشان داده شد (Panis *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2010; Kaviani, 2011).

در مطالعه‌ی حاضر از بذر و سرشاخه به‌عنوان ژرم‌پلاسم استفاده شد. این ژرم‌پلاسم‌ها استفاده‌ی گسترده‌ای در تحقیقات جهانی نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در دمای بسیار پایین دارند (Panis *et al.*, 2005; Kaviani, 2011; Kulus and Zalewska, 2014). سایر ریزنمونه‌ها مانند قطعات گره‌ای، پیازچه‌ها و حتی نمونه‌های کالوس برای تولید بذرهای مصنوعی (ساختگی) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Benelli *et al.*, 2013; Kulus and Zalewska, 2014). کپسوله‌کردن، هنوز پر استفاده‌ترین روش برای تولید بذرهای مصنوعی است. آب‌برداری فیزیکی تحت



قابل دسترس، لازم است که ابزارهای بیوتکنولوژی مدرن به کار برده شوند. ریزنمونه‌ای که به خوبی مورد حمایت قرار گرفته باشد را می‌توان به مدت نامحدود در ازت مایع نگهداری کرد. با ترکیب فنون کشت بافت گیاهی و نگهداری در شرایط فراسرد، می‌توان یک بانک ژن گیاهی گسترده در یک فضای محدود ایجاد نمود. موفقیت رویکرد نگهداری ژرم پلاسما در شرایط فراسرد به عوامل متعددی از جمله تحمل مواد گیاهی به تنش اسمزی، تنش تغییر مواد شیمیایی، تنش خشکی و تنش انجماد بستگی دارد. هدف اصلی ذخیره در شرایط انجماد، نگهداری درازمدت ژرم پلاسما و اصلاح و حمایت بسیاری از گیاهان زینتی است. حمایت از ژرم پلاسماها قبل از نگهداری در ازت مایع، نقش مهمی در باززایی این ژرم پلاسماها بعد از نگهداری در ازت مایع دارند. در تحقیق حاضر مشخص شد که کپسوله کردن به عنوان یک پیش تیمار، نقش موثری در بقا و قدرت جوانه زنی ریزنمونه‌های شمشاد خزری داشت. هیچ یک از بذور و سرشاخه‌های کپسوله نشده، بعد از نگهداری در ازت مایع و کشت در محیط باززایی، بقایی نداشتند و جوانه نزدند. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در جوانه زنی جوانه‌های راسی کپسوله شده موثر بودند، به طوری که بالاترین درصد جوانه زنی این جوانه‌های کپسوله شده، در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد.

#### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از مساعدت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به ویژه جناب آقای دکتر حسین فلاح باقرشیدایی بسیار سپاسگزاریم.

ریزنمونه‌های شاهد برابر با صفر و ریزنمونه‌های پیش تیمار شده با ۰/۷۵ مولار سوکروز و یک ساعت آب برداری در زیر هود لامینارفلو برابر با ۷۵ درصد بود. همچنین در مورد بذره‌های سوسن چلچراغ نشان داده شد که بعد از نگهداری در ازت مایع، بقا در بذره‌های شاهد برابر صفر، در بذره‌های تیمار شده با ۰/۶ مولار سوکروز و آب برداری به مدت یک ساعت در لامینارفلو برابر با ۲۲ درصد و در بذره‌های کپسوله شده تیمار شده با ۰/۶ مولار سوکروز و آب برداری به مدت یک ساعت در لامینارفلو برابر با ۵۱ درصد بود (Kaviani, 2010). در ادامه‌ی این مطالعات مشخص شد که نگهداری ژرم پلاسما سوسن چلچراغ (بذر، محور جنینی، جوانه‌ی جانبی و پیازچه) در دمای بسیار پایین ازت مایع باعث جوانه زنی حدود ۱۰ درصد از بذرها و محورهای جنینی پیش تیمار شده با  $PVS_2$ ، ۰/۷۵ مولار سوکروز و کپسوله کردن شد، در حالی که بذرها و محورهای جنینی پیش تیمار شده با  $PVS_2$  و ۰/۷۵ مولار سوکروز بدون کپسوله کردن جوانه نزدند. هیچ یک از جوانه‌های جانبی و پیازچه‌های پیش تیمار شده با ۰/۷۵ مولار سوکروز و کپسوله کردن-شیشه‌ای کردن، بعد از نگهداری در ازت مایع بقایی نداشتند (Kaviani, 2010). مطالعه روی سوسن چلچراغ نشان داد که بهترین ژرم پلاسما، بذر و بهترین پیش تیمار ۰/۷۵ مولار سوکروز و آب برداری به مدت یک ساعت است (Kaviani, 2010). در مطالعه‌ی حاضر نیز از این پیش تیمارها استفاده گردید.

#### نتیجه گیری کلی:

امروزه به دلیل حمایت از تعداد زیادی گونه‌های زینتی به ویژه گونه‌های با ارزش در حال انقراض و افزایش خزانه‌ی ژنتیکی

#### منابع

- Benelli, C., De Carlo, A. and Engelmann, F. (2013) Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. *Biotechnology Advances* 31: 175-185.
- Bernard, F., Shaker-Bazarnov, H. and Kaviani, B. (2002) Effect of salicylic acid on cold preservation and cryopreservation of encapsulated embryonic axes of Persian Lilac (*Melia azedarach* L). *Euphytica* 123: 85-88.
- Engelmann, F. (2009) Encapsulation-dehydration: past, present and future. *Acta Horticulture* 908: 165-171.
- Fabre, J. and Dereudde, J. (1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoots tips. *Cryo-Letter* 11: 413-426.

- Engelmann, F. (2012) Germplasm collection, storage and preservation. In: Plant Biotechnology and Agriculture — Prospects for the 21<sup>st</sup> Century. (eds. Altman, A., Hazegawa, P. MOxford.) Pp. 255–68. Academic Press.
- Halmagyi, A. and Pinker, I. (2006) Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 100129–100137.
- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S. and Sakai, A. (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by encapsulation vitrification. *Euphytica* 101: 109-115.
- Kaviani, B. (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science* 5: 778-800.
- Kaviani, B. (2010) Cryopreservation by encapsulation–dehydration for long–term storage of some important germplasm: Seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.) and tea (*Camellia sinensis*). *Plant Omics Journal* 3 (6): 177-182.
- Kulus, D. and Zalewska, M. (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. *Scientia Horticulturae* 168: 88–107.
- Matsumoto, T., Sakai, A. and Yamada, K. (1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 237-241.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-479.
- Orhan, I.E., Sinem, A.E., Fatma, S.S. and Murat, K.B.S. (2012) Exploration of cholinesterase and tyrosinase inhibitory, antiprotozoal and antioxidant effects of *Buxus sempervirens* L. (boxwood). *Industrial Crops Production* 40: 116–121.
- Panis, B. and Lambardi, M. (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: The role of biotechnology. Villa Gualino, 5-7 March. 2005, Turin, Italy, 43-54.
- Panis, B., Piette, B. and Swennen, R. (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168: 45–55.
- Reed, B.M. (2006) Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation-dehydration. *Crop Science* 46 (1): 6–11.
- Sakai, A. (2000) Development of cryopreservation techniques. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds.), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Intl. Plant Gen. Res. Ins. Rome, pp. 1-7.
- Wang, B., Zhang, Z., Yin, Z., Feng, C. and Wang, Q. (2012) Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnology Advance* 30: 604–612.
- Wen, B., Wang, R., Cheng, H. and Song, S. (2010) Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. *Protoplasma* 239: 57-67.
- Wesley-Smith, J., Walters, C., Berjak, P. and Pammenter, N. W. (1998) A method for the cryopreservation of embryonic axes at ultra-rapid cooling rates. pp. 132-139. In: *Recalcitrant seeds*. (eds. M. Marzalina, K. Khoo, N. Jayanthi, F. Tsan and B. Krishnapillary). Proceedings of the IUFRO Seed Symposium, 12-15 October 1998. Kuala Lumpur, Malaysia, International Plant Germplasm Institute.
- Withers, L. A. and Engelmann, F. (1997) *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: *Biotechnology in Agriculture*. (ed. Altman, A. and Marcel Dekker, N. Y.), pp. 57-88.
- Zhao, M. A., Xhu, Y. Z., Dhital, S. P., Khu, D. M., Song, Y. S., Wang, M. Y. and Lim, H. T. (2005) An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, Supercool X1000. *Plant Cell Report* 24: 477–481.

## Long-term storage of *Buxus hyrcana* Pojark. gerplasm, an ornamental shrub in danger of extinction, under cryopreservation conditions with encapsulation-dehydration and its regeneration by phytohormones

Behzad Kaviani<sup>1\*</sup> and Naser Negahdar<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>2</sup> Hyrcan Agricultural Sciences and Biotechnology Research Institute, Amol, Iran

(Received: 09/09/2016, Accepted: 06/12/2016)

### Abstract

Box tree (*Buxus sempervirens* L. or *Buxus hyrcana* Pojark.), is an ornamental shrub species that has applications in various industries such as handmade and ornamental industries. This species is in danger of extinction. Conservation of plants germplasm especially the plants in danger of extinction is one of the purposes of researchers and parlements members all of the worlds. Thus, the aim of this research was long-term conservation of germplasm in liquid nitrogen with sucrose and encapsulation-dehydration pre-treatments. Used germplasms or explants were seed and apical buds which were prepared from mother plants grown in greenhouse. This research presents a suitable method for sterilization of explants especially apical buds. Concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg l<sup>-1</sup> of three plant growth regulators BAP, IBA and NAA were used in germplasm regeneration medium after conservation in liquid nitrogen. The experiment was carried out as factorial based on a randomized complete block design in four replications. The results of the research showed that encapsulation as a pre-treatment had effective role on the survival and germination of apical buds. Around 50% of encapsulated apical buds were attained their germination capacity. The highest germination percentage of encapsulated apical buds (60%) was obtained in culture medium containing 0.5 mg l<sup>-1</sup> BAP along with 1.5 mg l<sup>-1</sup> NAA. Medium containing 0.5 mg l<sup>-1</sup> BAP without NAA with the content of 48% germination induction of apical buds was a suitable medium, too. None of non-encapsulated apical buds and encapsulated and non-encapsulated seeds had survival after conservation in liquid nitrogen and cultivation in regeneration medium.

**Keywords:** Liquid nitrogen, Gene bank, Synthetic seed, Genetic pool, Ornamental plants

\*Corresponding author, E-mail: b.kaviani@yahoo.com, kaviani@iaurasht.ac.ir