نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.)، یک درختچه‌ی زینتی در حال انقراض، در شرایط فراسرد با کپسوله‌کردن-آب‌برداری و باززایی آن توسط هورمون‌های گیاهی

بهزاد کاویانی*[۱] و ناصر نگهدار[۱ و ۲]

[۱]گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، [۲]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 ژرم‌پلاسم گیاهان به‌ویژه گیاهانی که در خطر انقراض نسل قرار دارند، از اهداف محققان و دولت‌مردان در سراسر جهان است. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم شمشاد خزری در ازت مایع با پیش‌تیمار سوکروز و کپسوله‌کردن-آب‌برداری بود. ژرم‌پلاسم‌ها یا ریزنمونه‌های مورد استفاده، بذر و جوانه‌ی راسی بودند که از گیاهان مادری رشدیافته در گلخانه تهیه شدند. این پژوهش یک روش بسیار کارآمد برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها به‌ویژه سرشاخه را ارائه می‌کند. در محیط‌های باززایی ژرم‌پلاسم‌ها، 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 کاملا تصادفی (RCD) در ٤ تکرار انجام شدند. نتایج تحقیق نشان داد که کپسوله‌کردن-آب‌برداری به‌عنوان یک پیش‌تیمار، نقش موثری در بقا و قدرت جوانه‌زنی جوانه‌ی راسی داشت. حدود ۵۰ درصد از جوانه‌های راسی کپسوله‌شده بعد از نگهداری در ازت مایع، قدرت جوانه‌زنی خود را حفظ کردند. بالاترین درصد جوانه‌زنی جوانه‌های راسی کپسوله‌شده (٦۰ 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 کپسوله‌شده به میزان ٤۸ درصد نیز محیط مناسبی بود. هیچ‌یک از بذور کپسوله‌شده و کپسوله‌نشده و سرشاخه‌های کپسوله‌نشده بعد از نگهداری در ازت مایع و کشت در محیط باززایی، بقایی نداشتند و جوانه نزدند.

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

مقدمه:

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

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: kaviani@aurasht.ac.ir , b.kaviani@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

(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 می تواند 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 مرحله‌ی کالوس، در نتیجه بدون انجام جهش به گیاه کامل تبدیل می‌شوند، مناسب‌تر هستند. به‌همین دلیل، در این روش معمولا 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 کاملا 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 پیش تیمارها 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 کپسوله کردن-آب‌برداری دو فن جدید نگهداری در شرایط انجماد ژرم پلاسم‌های گیاهی هستند (Panis and Lambardi, 2005). در فن شیشه‌ای‌کردن، ژرم‌پلاسم به‌مدت کوتاهی در معرض محلول های غلیظ حمایت‌کننده در برابر انجماد قرار می‌گیرد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

(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 ژرم‌پلاسم درون تیله‌های آلژینات و کشت بعدی آن در محلول غلیظ سوکروز (۱/۵-۰/۷ مولار) و سپس آب‌برداری فیزیکی و غوطه‌ورکردن مستقیم در ازت مایع است. راهکارهای ترکیبی فنون فوق، که فن کپسوله-کردن-شیشه‌ای‌شدن نامیده می‌شود، طی چند سال اخیر توسعه یافته است (Matsumoto *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 1998; Sakai, 2000). نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم 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 ژرم‌پلاسم‌های گیاهی؛ دانه، محور جنینی و سرشاخه می‌باشند (Panis and Lambardi, 2005; Kaviani, 2011). استفاده از این ژرم‌پلاسم‌ها باعث می‌شود که بعد از دوره‌ی ذخیره، آنها بدون گذر از فاز کالوس، باززایی شوند. مطالعات زیادی روی نگهداری ژرم‌پلاسم 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، پیداکردن 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 می رسد. این راه را باید در شرایط آزمایشگاهی جستجو کرد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر که برای اولین بار در سطح جهان روی شمشاد خزری (*B. hyrcana*) انجام شده است، نگهداری بذر و سرشاخه‌ی شمشاد خزری به‌عنوان ژرم‌پلاسم یا ریزنمونه در ازت مایع متعاقب پیش‌تیمار با سوکروز و کپسوله‌کردن-آب‌برداری بود. بعد از نگهداری ژرم‌پلاسم‌ها در ازت مایع، آنها در محیط‌های باززایی حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP، IBA و NAA کشت شدند. استفاده از انواع هورمون‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف در محیط کشت باززایی جهت تسریع جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم نگهداری‌شده در ازت مایع نیز تا کنون گزارش نشده است.

مواد و روش‌ها:

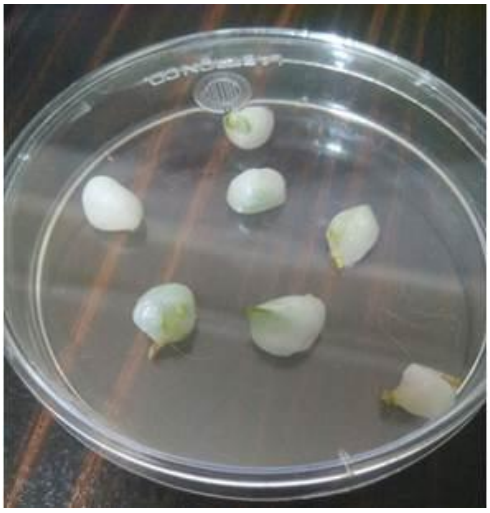
شرایط آزمایش: این طرح طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ در موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان واقع در شهر آمل استان مازندران به مرحله‌ی اجرا در آمد.

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 داده شدند 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]



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

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 مستقیما 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 ($CaCl_2$) 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.

ذوب‌کردن: بعد از یک ساعت نگهداری در ازت مایع، نمونه‌های منجمدشده به‌سرعت به درون آب ٤۰ 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 پلاسم‌ها (بذر و سرشاخه) بعد از نگهداری در ازت مایع در محیط باززایی همراه با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر از هر سه تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی BAP، IBA و NAA مورد ارزیابی قرار گرفتند. چنانچه علائم جوانه‌زنی (ظهور ریشه یا نوشاخه) در نمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه ای (بذر و سرشاخه) مشاهده شد، نشان از زنده مانی آنهاست.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

طرح آماری و تجزیه‌ی داده‌ها: بررسی داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی (RCD) در ۳ تکرار بود. هر ظرف پتری یک تکرار در نظر گرفته شد و در هر یک ٦ 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 $SAS_{9.2}$ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

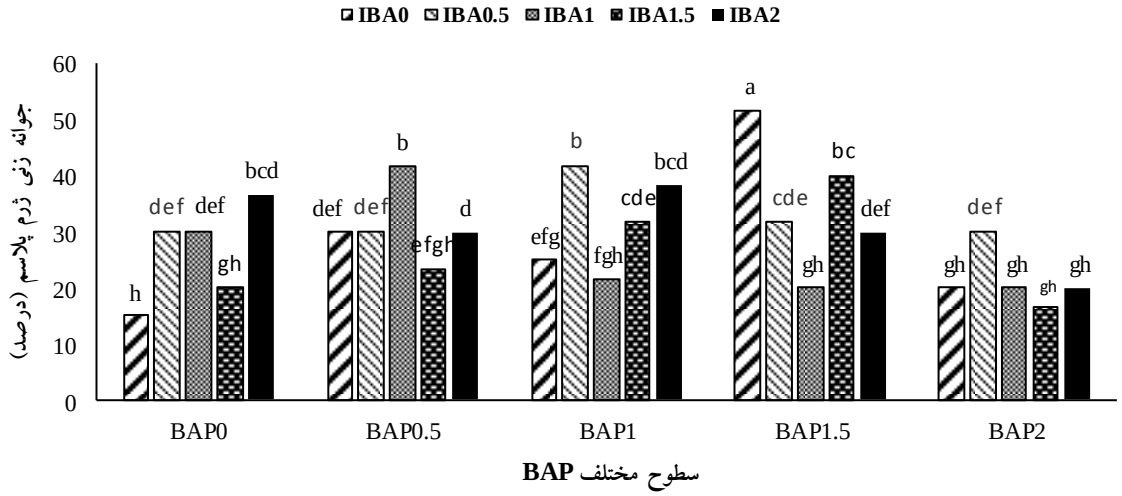
درصد بقای ژرم‌پلاسم‌ها: ژرم‌پلاسم‌های شمشاد خزری (بذر و سرشاخه) در محیط‌های کشت MS حاوی آلژینات سدیم و کربنات کلسیم، کپسوله (پوشش‌دار) شدند. کپسوله‌کردن یکی از پیش‌تیمارهای مهم محافظ در برابر دمای بسیار پایین ازت مایع در فن نگهداری ژرم‌پلاسم در شرایط فراسرد است. ژرم-پلاسم‌های کپسوله‌شده و کپسوله‌نشده به‌درون ازت مایع غوطه‌ور گردیدند. نتایج نشان داد که تمام جوانه‌های راسی نگهداری‌شده در ازت مایع که کپسوله نشده بودند، همچنین تمام بذرهای کپسوله‌شده و کپسوله‌نشده بعد از مدت زمان نگهداری، قدرت جوانه‌زنی خود را به‌طور کامل از دست دادند. برعکس، ٦۰-۲۰ درصد از جوانه‌های راسی کپسوله‌شده (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 ژرم‌پلاسم‌ها: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی ژرم پلاسم‌ها در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq$۰/۰۱) معنی‌دار بود. بالاترین درصد بقای ژرم‌پلاسم‌ها بعد از نگهداری در ازت مایع (۵۱/٦٦ درصد)، در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (شکل ٤). این جدول نشان می‌دهد که نقش BAP در افزایش درصد جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم‌ها برجسته‌تر از IBA است. در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ۵۱/٦٦ و ۱۵/۰۰ درصد) در ژرم-پلاسم‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر، در میان تمام غلظت های IBA استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی جوانه‌های راسی (به‌ترتیب با ۳٦/٦٦ و ۱۵/۰۰ درصد) در ژرم‌پلاسم‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر و شاهد دیده شد (شکل ۲).

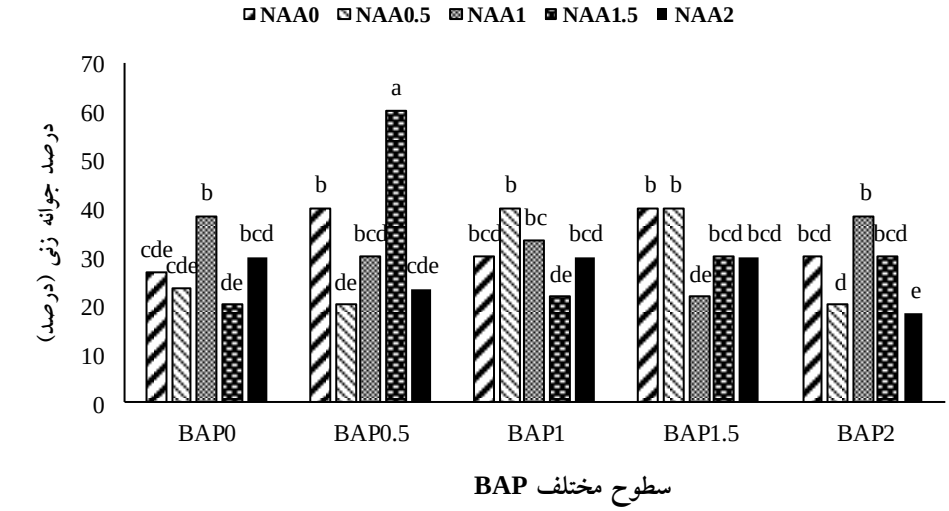
اثر NAA و BAP روی قدرت بقا و جوانه‌زنی ژرم پلاسم‌ها: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل NAA و BAP بر درصد بقای ژرم‌پلاسم‌ها در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq$۰/۰۱) معنی‌دار بود. بالاترین درصد بقای ژرم‌پلاسم‌ها (٦۰ درصد)، بعد از نگهداری در ازت مایع، در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۵). پایین ترین درصد بقا (۱۸/۳۳ درصد) بعد از نگهداری در ازت مایع، مربوط به جوانه‌های راسی کپسوله‌شده‌ی 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 ٤). این جدول نشان می‌دهد که نقش BAP در افزایش درصد جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم‌ها برجسته‌تر از NAA است. در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ٤۸/۰۰ و ۲٦/٦٦ درصد) در ژرم پلاسم‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر، در میان تمام غلظت های NAA استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی درصد بقا و قدرت جوانه‌زنی (به‌ترتیب با ۳۸/۳۳ و ۲۰/۰۰ درصد) در ژرم‌پلاسم های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی درصد جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم 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 ژرم‌پلاسم 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.

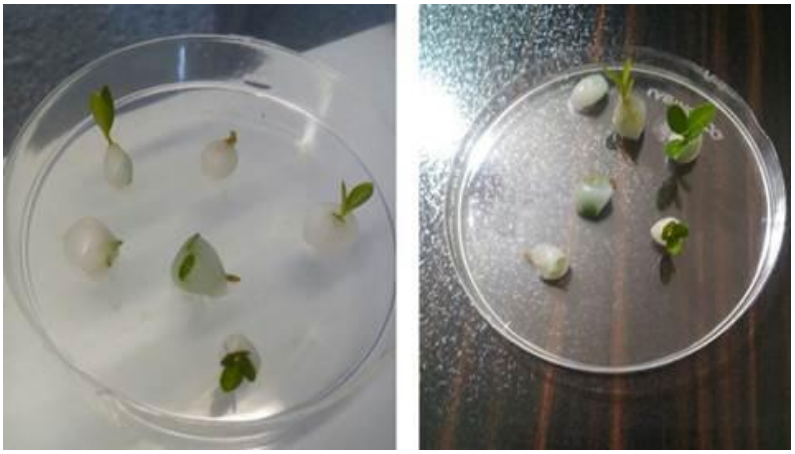
لیتر دیده شد (شکل ۳).

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 ذخیره‌ی این منابع ژنتیکی با ارزش برای کارایی اصلاح‌شده در اصلاح گیاهان، حفظ تنوع ژنتیکی، تغییر ژنتیکی، مبادله‌ی ژرم پلاسم 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

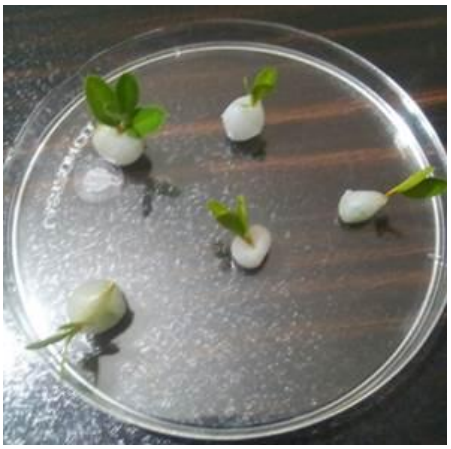


شکل ٤- اثر کپسوله‌کردن-آب‌برداری و غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی درصد بقا و جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم (جوانه‌ی راسی) شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.). ژرم‌پلاسم‌های کپسوله‌شده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون NAA بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشتند.

جدول ۱- تجزیه‌ی واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP، NAA و IBA روی درصد بقا (قدرت جوانه‌زنی) ژرم‌پلاسم شمشاد خزری.

منبع تغییرات	درجه‌ی آزادی	جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم (در حضور IBA)	منبع تغییرات	جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم (در حضور NAA)
IBA	٤	٥١١/٣**	NAA	٣٤٢/٣**
BAP	٤	١٧٩/٣**	BAP	٤٨٨/٤**
IBA × BAP	١٦	٢١٨/٧**	NAA × BAP	٢٥١/٢**
خطا	٥٠	١٥/٢٨	خطا	١٨/٦٦
ضریب تغییرات		١٢/٧٧	ضریب تغییرات	١٤/١١

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ٥- اثر کپسوله‌کردن-آب‌برداری و غلظت‌های مختلف BAP و NAA روی درصد بقا و جوانه‌زنی ژرم‌پلاسم (جوانه‌ی راسی) شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.). ژرم‌پلاسم‌های کپسوله‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشتند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

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 ۱۹٦- 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، پراستفاده‌ترین 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 قراردادهشده 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 پراستفاده‌ترین روش برای تولید بذرهای مصنوعی است. آب‌برداری فیزیکی تحت شرایط استریل جریان هوای هود لامینار فلو و آب‌برداری فیزیکی توسط سوکروز، پراستفاده‌ترین پیش‌تیمار کاهنده‌ی تنش انجمادی هستند (Sakai *et al.*, 2000). روش کپسوله-کردن-آب‌برداری برای سرشاخه‌های تعداد زیادی از گونه‌های مناطق گرمسیری مانند کاساوا و نیشکر و گونه‌های مناطق معتدله مانند گلابی، سیب، انگور و اکالیپتوس توسعه یافته است (Kaviani, 2011). حضور یک پوشش مغذی (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 آلژینات 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-شیشه-ای‌کردن) 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، قره‌قاط 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

ریزنمونه‌های شاهد برابر با صفر و ریزنمونه‌های پیش‌تیمارشده با ۰/۷۵ مولار سوکروز و یک ساعت آب‌برداری در زیر هود لامینارفلو برابر با ۷۵ درصد بود. همچنین در مورد بذرهای سوسن چلچراغ نشان داده شد که بعد از نگهداری در ازت مایع، بقا در بذرهای شاهد برابر صفر، در بذرهای تیمارشده با ۰/٦ مولار سوکروز و آب‌برداری به‌مدت یک ساعت در لامینارفلو برابر با ۲۲ درصد و در بذرهای کپسوله‌شده‌ی تیمارشده با ۰/٦ مولار سوکروز و آب‌برداری به‌مدت یک ساعت در لامینارفلو برابر با ۵۱ درصد بود (Kaviani, 2010). در ادامه‌ی این مطالعات مشخص شد که نگهداری ژرم‌پلاسم سوسن چلچراغ (بذر، محور جنینی، جوانه‌ی جانبی و پیازچه) در دمای بسیار پایین ازت مایع باعث جوانه‌زنی حدود ۱۰ درصد از بذرها و محورهای جنینی پیش‌تیمارشده با PVS_2، ۰/۷۵ مولار سوکروز و کپسوله‌کردن شد، درحالی‌که بذرها و محورهای جنینی پیش‌تیمارشده با PVS_2 و ۰/۷۵ مولار سوکروز بدون کپسوله‌کردن جوانه نزدند. هیچ‌یک از جوانه‌های جانبی و پیازچه‌های پیش‌تیمارشده با ۰/۷۵ مولار سوکروز و کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌کردن، بعد از نگهداری در ازت مایع بقایی نداشتند (Kaviani, 2010). مطالعه روی سوسن چلچراغ نشان داد که بهترین ژرم‌پلاسم، بذر و بهترین پیش‌تیمار ۰/۷۵ مولار سوکروز و آب‌برداری به‌مدت یک ساعت است (Kaviani, 2010). در مطالعه‌ی حاضر نیز از این پیش‌تیمارها استفاده گردید.

نتیجه‌گیری کلی:

امروزه به‌دلیل حمایت از تعداد زیادی گونه‌های زینتی به‌ویژه گونه‌های با ارزش در حال انقراض و افزایش خزانه‌ی ژنتیکی قابل‌دسترس، لازم است که ابزارهای بیوتکنولوژی مدرن به‌کار برده شوند. ریزنمونه‌ای که به‌خوبی مورد حمایت قرار گرفته باشد را می‌توان به‌مدت 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 ژرم‌پلاسم 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 ژرم‌پلاسم و اصلاح و حمایت بسیاری از گیاهان زینتی است. حمایت از ژرم‌پلاسم‌ها قبل از نگهداری در ازت مایع، نقش مهمی در باززایی این ژرم‌پلاسم‌ها بعد از نگهداری در ازت مایع دارند. در تحقیق حاضر مشخص شد که کپسوله-کردن به‌عنوان یک پیش‌تیمار، نقش موثری در بقا و قدرت جوانه‌زنی ریزنمونه‌های شمشاد خزری داشت. هیچ‌یک از بذور و سرشاخه‌های کپسوله‌نشده، بعد از نگهداری در ازت مایع و کشت در محیط باززایی، بقایی نداشتند و جوانه نزدند. تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی در جوانه‌زنی جوانه‌های راسی کپسوله-شده موثر بودند، به‌طوری که بالاترین درصد جوانه‌زنی این جوانه‌های کپسوله‌شده، در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد.

تشکر و قدردانی:

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

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 Dereuddre, J. (1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoots tips. Cryo-Letter 11: 413-426.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

Engelmann, F. (2012) Germplasm collection, storage and preservation. In: Plant Biotechnology and Agriculture — Prospects for the 21st 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 Lampur, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]

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[1*] and Naser Negahdar[1, 2]

[1] Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2]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 industeries. 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^{-1} 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^{-1} BAP along with 1.5 mg l^{-1} NAA. Medium containing 0.5 mg l^{-1} 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.22.5]