



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "حفاظت زیست بوم گیاهان"

دوره ششم، شماره دوازدهم، بهار و تابستان ۹۷

<http://pec.gonbad.ac.ir>

حفاظت فراسرد بذرهای بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschy*) (Boiss.) با استفاده از روش‌های شیشه‌ای شدن و کپسوله-آبگیری

حدیثه شهاب‌فر^۱، وحید پوزش^{۲*}، سعید زواره^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان

^۲ استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان

^۳ دانشیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۵

چکیده

امروزه حفظ تنوع گونه‌های گیاهی دارویی-مرتعی و جلوگیری از فرسایش تنوع ژنتیکی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. گیاه بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschy* Boiss.) از جمله گیاهان مهمی است که بر اثر برداشت‌های بی‌رویه و تغییرهای آب و هوایی در معرض خطر و نابودی قرار گرفته است. از این‌رو در پژوهش حاضر اثر تیمارهای کپسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن با دو محلول انجماد شیشه‌ای گیاه (PVS2 و PVS3) بر بذرهای بادرنجبویه دنایی مورد مطالعه قرار گرفتند. بذرهای پس از تیمار با محلول‌های PVS2 و PVS3 با دو روش کپسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن منجمد شده و به مدت ۲۰ ساعت در تانک ازت مایع در دمای °C ۱۹۶- نگهداری شدند. سپس بذرهای در بن ماری °C ۴۰ ذوب شدند. بذرهای در پتری‌دیش و درون گلدان کشت شدند. درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر و خشک گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیمار کپسوله-آبگیری درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر را

* نویسنده مسئول: poozesh@du.ac.ir

به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شیشه‌ای شدن کاهش داد. کمترین طول دانه‌رست در تیمار کپسوله-آبگیری و بیشترین در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 به‌دست آمد. وزن خشک ریشه تحت تأثیر تیمارهای مختلف فراسرد قرار نگرفت، اما تیمار کپسوله-آبگیری وزن خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نتایج به‌خوبی نشان داد که تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 می‌تواند به‌خوبی تنش‌های ناشی از انتقال به شرایط فراسرد را کاهش دهد و کیفیت رشد بذرهای گیاه بادرنجبویه دناپی را بهبود ببخشد.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه دناپی، محلول انجماد شیشه‌ای، کپسوله-آبگیری

مقدمه

گیاه بادرنجبویه از مهم‌ترین جنس‌های تیره نعنایان می‌باشد که شامل ۱۸۶ گونه است که از این میان ۸ گونه در ایران می‌روید. یکی از گونه‌های مهم و بومی این گیاه در ایران *Dracocephalum kotschyi* است که در بخش‌هایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می‌شود (Rechinger, 1986). این گونه انحصاری، با نام زرین گیاه و بادرنجبویه دناپی شناخته می‌شود (مظفریان، ۱۳۷۵). به‌علت برداشت‌های بی‌رویه و غیراصولی به‌ویژه در مرحله گلدهی گیاه که مانع از به‌بذر نشستن این گیاه و در نتیجه باعث کاهش جمعیت این گیاه شده است؛ بنابراین گیاه بادرنجبویه دناپی در معرض خطر نابودی می‌باشد (Jalali et al., 1999). در حال حاضر تقاضا برای گیاهان دارویی به‌عنوان تولیدات قابل مصرف در صنایع بهداشتی و دارویی روز به روز در حال افزایش است (Koocheki et al., 2008).

رویکرد روز افزون استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهان، اهمیت کشت و تولید این گیاهان را روشن‌تر می‌سازد. پژوهش‌های اخیر نشان داده است که بادرنجبویه دناپی از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و در طب سنتی در کاهش تب، درد مفاصل، روماتیسم و همچنین به‌عنوان ضدالتهاب و التیام دهنده زخم استفاده می‌شود؛ این گیاه در تقویت سیستم ایمنی نیز نقش دارد (آزادبخت، ۱۳۷۸). در برگ‌های گیاه بادرنجبویه ترکیبی به نام Spinal-z وجود دارد که از سال‌ها پیش در درمان سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Jahanian et al., 2005). از دیگر ترکیبات مهم این گیاه می‌توان به اسانس (Yaghmai et al., 1988) فلاونوئید، رزماریک اسید (Amirghofran et al., 2000) و گلیکوزیدهای مونوترپن (Saeidnia et al., 2004) اشاره نمود. گزارش شده است که از هر ۱۰۰ گرم گیاه دارویی بادرنجبویه دناپی، ۹۵۵ میلی‌گرم ترکیب فلاونوئیدی لوتئین به‌دست می‌آید که در بیماری MS اثر درمانی مثبت دارد (کمالی و همکاران، ۱۳۹۳).

ژرم پلاسما گیاهی از مهم‌ترین منابع و ثروت‌های هر کشور محسوب می‌شود و بایستی در حفظ و نگهداری آن اقدام‌های لازم انجام گیرد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نگهداری و حفظ بذر گونه‌های گیاهی ارزشمند و در حال انقراض در سردخانه برای مدت زمان طولانی میسر نیست. در این میان روش حفاظت فراسرد^۲ که به معنای ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی (یاخته، بافت یا اندام‌ها) در ازت مایع با دمای °C-۱۹۶ است، از جمله اصلی‌ترین و موفق‌ترین روش‌های نگهداری درازمدت ژرم پلاسما گیاهان ارزشمند در حال انقراض به‌شمار می‌رود (Benson, 2008). در این دما، فعالیت‌های متابولیسمی به حالت تعلیق می‌ماند و ماده گیاهی بدون هیچ تغییری، به مدت نامحدود ذخیره می‌شود و در صورت لزوم فرآیندهای بازیابی صورت می‌گیرد (Sant et al., 2006). بنابراین حفاظت فراسرد، یک فناوری توسعه یافته‌ای برای بقای مواد ژنتیکی است؛ از این رو خطر فرسایش ژنی و از دست رفتن ذخایر ژنتیکی کاهش می‌یابد.

از جمله روش‌های مؤثر و استاندارد در افزایش کارایی نگهداری و زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد، روش شیشه‌ای شدن با استفاده از محلول‌های آبگیری PVS2^۳ و PVS3^۴ و روش کپسوله-آبگیری می‌باشد. روش شیشه‌ای شدن فرآیندی است که در آن آب از حالت مایع وارد فاز شیشه‌ای می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است (Gale et al., 2008). شیشه‌ای شدن مستلزم استفاده از محلول‌های تعادلی با ویسکوزیته و قابلیت آبگیری و بالا است (Luo and Read, 1997). به‌منظور انجام فرآیند شیشه‌ای شدن، کاهش میزان آب یاخته به ۲۰-۳۰٪ ضروری است (Wolf and Bryant, 1999). محلول‌های آبگیری PVS2 و PVS3 در فرآیند فراسرد به‌عنوان محلول محافظت-کننده در مقابل انجماد استفاده می‌شوند؛ به‌طوری‌که نقطه انجماد را پایین آورده و از تشکیل بلورهای یخ جلوگیری می‌کند. بنابراین آب مانند شیشه سخت شده و مانع از آسیب جدی به نمونه‌های گیاهی خواهد شد (Turner et al., 2001). طی دو دهه گذشته استفاده از این روش به‌عنوان یکی از گسترده‌ترین پروتکل‌های انجمادی رو به افزایش بوده است. از دلایل موفقیت این روش، سهولت انجام آن است. به نحوی که این روش برای محدوده وسیعی از گونه‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Panis and Lambardi, 2005).

^۲ Cryopreservation

^۳ Plant vitrification solution

^۴ Plant vitrification solution

روش کپسوله-آبگیری از جمله روش‌های حفاظتی فراسرد است که در اواخر دهه بیست میلادی توسعه یافت و امروزه برای انواع زیادی از ژرم پلاسماهای گیاهی استفاده می‌شود. این روش یکی از پروتکل‌های پایه‌ای و مهم حفاظت فراسرد است که تاکنون با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Benson, 1999; Fabre and Dereuddre, 1990). در این روش نمونه‌ها در مهره‌های آلزینات کپسوله و در محلول‌های ساکارز با غلظت بالا پیش تیمار می‌گردند و پس از خشک شدن به روش‌های مختلف، در ازت مایع غوطه‌ور می‌گردند. پس از خروج مهره‌ها از ازت مایع و ذوب شدن آن‌ها در حمام آب گرم به محیط بازیابی مناسب منتقل می‌گردند (Blakesley et al., 1995).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر روش‌های شیشه‌ای شدن و کپسوله-آبگیری با استفاده از دو محلول PVS2 و PVS3 بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر بادرنجیویه دناپی بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی

این پژوهش در آذر سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی و گلخانه پژوهشی دانشگاه دامغان انجام گرفت. بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. در ابتدا بذرها یکنواخت با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و سپس سه بار با آب مقطر شستشو و برای اعمال تیمارهای موردنظر آماده شدند. تیمارهای اعمال شده در این پژوهش، شامل تیمار شیشه‌ای شدن با محلول انجماد شیشه‌ای گیاه ۲^۵ (PVS₂) شیشه‌ای شدن با محلول انجماد شیشه‌ای گیاه ۳^۶ (PVS₃) و همچنین روش کپسوله کردن-آبگیری می‌باشد. لازم به ذکر است که برای تیمار شاهد، تعدادی از بذرها بدون اعمال تیمار مشخصی برای جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ مرطوب سترون منتقل و وارد دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شدند. در شرایط گلخانه هم کشت بذرها در داخل خاک لوم رسی انجام گرفت. در شرایط آزمایشگاهی، درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه اندازه‌گیری شدند. در آزمایش‌های

⁵ Plant Vitrification Solution

⁶ Plant Vitrification Solution

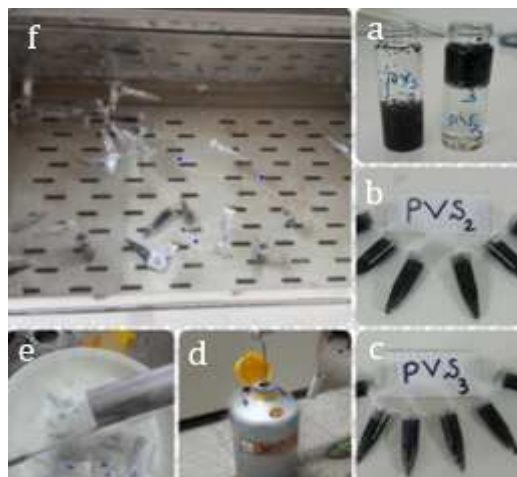
گلخانه‌ای، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و وزن اندام‌هوایی اندازه‌گیری شدند. برای اجرای فرآیندهای آزمایشگاهی و گلخانه‌ای که به‌صورت جداگانه برای هر گروه از بذرهای انجام گرفت از طرح کامل تصادفی با چهار تکرار استفاده شد؛ به‌طوری‌که در فرآیند آزمایشگاهی برای هر تکرار ۳۰ عدد بذر استفاده گردید و در آزمایش گلخانه‌ایی در نهایت ۷ بوته در هر گلدان نگه داشته شد.

پیش تیمارها و نگهداری بذر در شرایط فراسرد

تیمارهای فراسرد، پیش از ورود بذرهای به ازت مایع شامل تیمار کیسوله-آبگیری و شیشه‌ای شدن با محلول‌های آبگیری PVS2 در برگیرنده 15% (W/V) اتیلن گلیکول، 15% (W/V) دی متیل سولفوکساید، 30% (W/V) گلیسرول و 0/4 مولار ساکارز (Sakai et al., 1990) و PVS3 در برگیرنده 50% (W/V) ساکارز و 50% (W/V) گلیسرول بودند (Nishizawa et al., 1993).

روش شیشه‌ای شدن با محلول‌های آبگیری PVS2 و PVS3:

بذرهای ضدعفونی شده به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بارگیری سترون (حاوی گلیسرول ۲ مولار و ساکاروز ۰/۴ مولار) قرار گرفتند و یک ساعت با دستگاه شیکر، تکان داده شدند (۹۰ دور در دقیقه) و در نهایت محلول بارگیری تخلیه شد. سپس نیمی از بذرهای بارگیری شده با محلول آبگیری PVS2 و نیمی دیگر با محلول آبگیری PVS3 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C انکوبه شدند. در نهایت بذرهای درون فالكون‌های پلاستیکی بارگیری شدند و به مدت ۲۰ ساعت در تانک ازت مایع نگهداری شدند (شکل ۱).



شکل ۱- مراحل شیشه‌ای شدن و ذوب بذرها: قرارگیری بذرها در محلول‌های آگیری (a)، انتقال بذرها به فالكون پلاستیکی (b و c)، قرار دادن فالكون‌ها در تانک ازت (d)، خروج نمونه‌ها از تانک ازت پس از ۲۰ ساعت (e)، ذوب نمونه‌ها در بن ماری ۴۰°C (f)

روش کپسوله-آگیری:

تعدادی از بذره‌ای ضدعفونی شده به مدت پنج دقیقه در بستر حاوی اسیدآلژینیک قرار گرفتند؛ سپس به‌منظور تشکیل کپسول موردنظر به مدت ۱۵ دقیقه درون محلول کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار غوطه‌ور شدند. در ادامه بذره‌ای کپسوله شده بر روی کاغذ صافی استریل، به مدت ۲۰ ساعت در معرض جریان هود لامینار قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس نمونه‌ها در فالكون‌های پلاستیکی در شرایط استریل بارگیری شدند و در تانک ازت مایع قرار گرفتند. پس از ۲۰ ساعت، بذره‌ای موجود در تانک نیتروژن مایع خارج شدند و بلافاصله به مدت ۱۰۰ ثانیه در بن ماری ۴۰°C قرار گرفتند تا عمل ذوب صورت گیرد (Engelmann, 1990). به‌منظور حذف مواد محافظ سرما، بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ذوب (۱/۲ مولار ساکارز) قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- مراحل کپسوله-آبگیری و ذوب: کپسوله کردن بذرها (a)، آبگیری بذرها در معرض هوای استریل و انتقال به فالكون پلاستیکی (b)، قرار دادن فالكونها در تانک نیتروژن (c)، خروج نمونه‌ها از تانک نیتروژن پس از ۲۰ ساعت (d)، ذوب نمونه‌ها در بن ماری ۴۰°C (e)

اندازه‌گیری شاخص‌های جوانه‌زنی

با استفاده از معادله‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب پارامترهای درصد جوانه‌زنی (Jebeli et al., 2014)، سرعت جوانه‌زنی (Hartman et al., 1990) و شاخص بنیه بذر (Abdul-baki and Anderson, 1973) بذرهای بادرنجبویه دناپی محاسبه شدند.

$$GP = \frac{\sum Ni}{N} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

Ni = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز nام، N = تعداد کل بذرها، GP^v = درصد جوانه‌زنی

^v Germination Percent

$$GR = \Sigma \left(\frac{ni}{di} \right) \quad \text{رابطه ۲}$$

ni = تعداد بذرهای جوانه زده در روز ln ، di = تعداد روز تا شمارش ln ، GR^{\wedge} = سرعت جوانه زنی

$$SVI = (LS \times GP) / 100 \quad \text{رابطه ۳}$$

LS = طول گیاهچه (mm)، GP = درصد جوانه زنی، SVI^{\wedge} = شاخص بنیه بذر

اندازه گیری وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و وزن اندام هوایی به وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام شد. به منظور تعیین وزن خشک ریشه و اندام هوایی، نمونه های مورد نظر در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند و سپس با ترازو اندازه گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از بررسی توزیع نرمال داده های به دست آمده، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way analysis of variance) و تست تکمیلی دانکن (Duncan) برای مقایسه بین گروه ها استفاده شد. از لحاظ آماری $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

شاخص های جوانه زنی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بذرهای بادرنجبویه دناپی پس از خروج از تانک ازت مایع توانایی زنده ماندن خود را حفظ می کنند. آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که از لحاظ آماری بین درصد جوانه زنی بذرهای تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری وجود دارد ($P = 0/003$ ، $F(3,11) = 11/462$ ؛ جدول ۱).

[^] Germination Rate

[^] Seedling Vigor Index

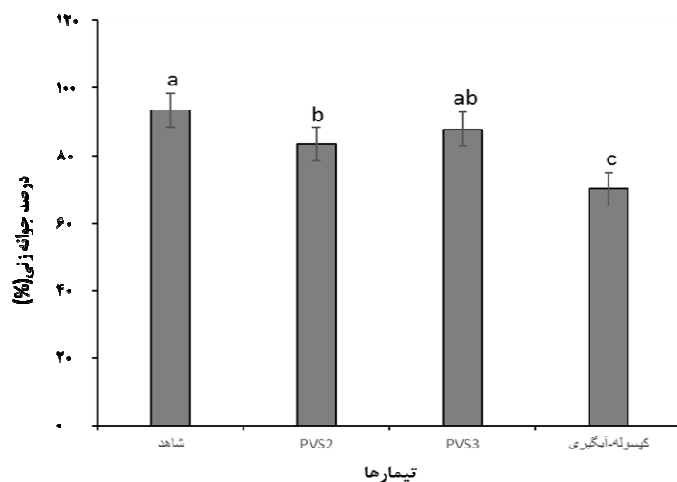
جدول ۱- تجزیه واریانس پارامترهای طولی بخش‌های مختلف گیاهچه‌های بادرنجبویه دنایی تحت تیمارهای مختلف

نام متغیرها	جمع مربع	درجه آزادی	میانگین مربع	F	معنی‌داری (P)
بین گروه‌ها	۵۳/۱۸۲	۳	۱۷/۷۲۷		
طول ساقچه	۱۳/۲۰۰	۸	۱/۶۵۰	۱۰/۷۴۴	۰/۰۰۴
جمع	۶۶/۳۸۲	۱۱			
بین گروه‌ها	۵۱/۵۶۳	۳	۱۷/۱۸۸		
طول ریشه‌چه	۲۶/۰۶۰	۸	۳/۲۵۷	۵/۲۷۶	۰/۰۲۷
جمع	۷۷/۶۲۳	۱۱			
بین گروه‌ها	۲۰۸/۴۲۰	۳	۶۹/۴۷۳		
طول گیاهچه	۵۰/۰۴۰	۸	۶/۲۵۵	۱۱/۱۰۷	۰/۰۰۳
جمع	۲۵۸/۴۶۰	۱۱			

ادامه جدول (۱)

نام متغیرها	جمع مربع	درجه آزادی	میانگین مربع	F	معنی داری (P)
بین گروه‌ها	۰/۱۱	۳	۰/۰۰۴		
طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه	۰/۱۹۸	۸	۰/۰۲۵	۰/۱۵۳	۰/۹۲۵
جمع	۰/۲۰۹	۱۱			
بین گروه‌ها	۸۹۱/۶۳۹	۳	۲۹۷/۲۱۳		
درصد جوانه‌زنی	۲۰۷/۴۳۷	۸	۲۵/۹۳۰	۱۱/۴۶۲	۰/۰۰۳
جمع	۱۰۹۹/۰۷۶	۱۱			
بین گروه‌ها	۰/۸۱۴	۳	۰/۲۷۱		
سرعت جوانه‌زنی	۰/۱۳۵	۸	۰/۰۱۷	۱۶/۰۳۷	۰/۰۰۱
جمع	۰/۹۴۹	۱۱			
بین گروه‌ها	۴۵۷/۹۵۱	۳	۱۵۲/۶۵۰		
شاخص بنیه بذر	۳۹/۰۲۰	۸	۴/۸۷۸	۳۱/۲۹۶	۰/۰۰۰
جمع	۴۹۶/۹۷۲	۱۱			

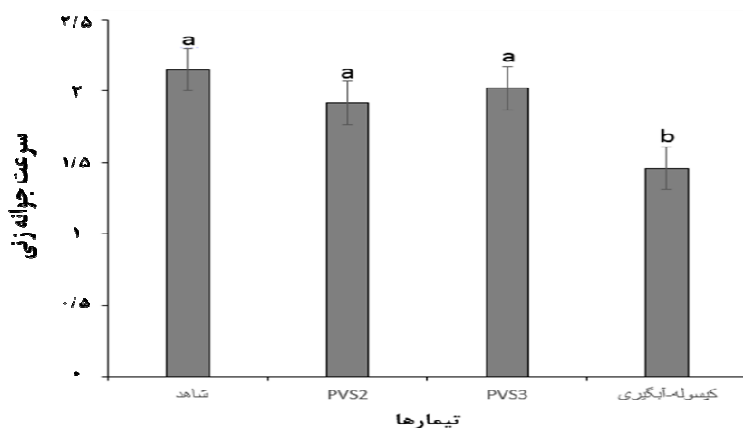
در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمار کپسوله-آبگیری (E-D) و تیمار شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS2 به‌طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود ($P < ۰/۰۵$: شکل ۳). بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 به میزان ۸۷/۷۷٪ و کمترین مقدار در تیمار کپسوله-آبگیری (E-D) به میزان ۶۹/۹۹٪ مشاهده شد.



شکل ۳- درصد جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

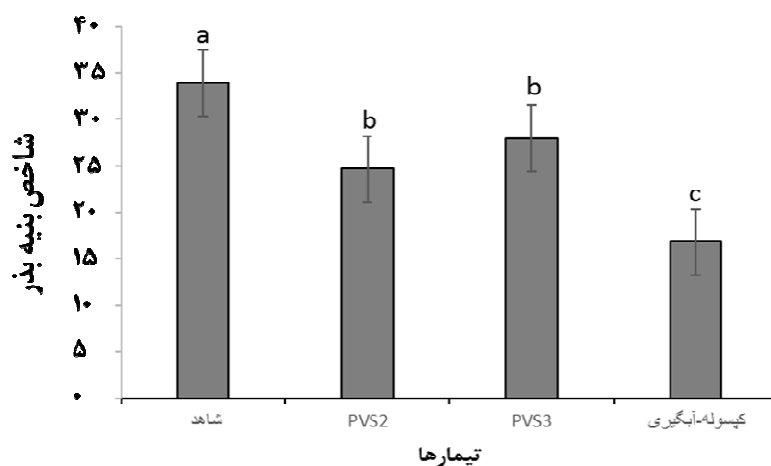
آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که از لحاظ آماری بین سرعت جوانه‌زنی بذرهای تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P = 0.001$, $F(3,11) = 16.037$; جدول شماره ۱). در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که سرعت جوانه زنی تیمار کیسوله-آبگیری (E-D) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در حالی که سرعت جوانه‌زنی بذرهای دو محلول آبگیری PVS2 و PVS3 در روش شیشه‌ای شدن به ترتیب با مقادیر ۱/۲۹ و ۲/۰۲ واحد در روز بود که نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($P < 0.05$; شکل ۴).



شکل ۴- سرعت جوانه زنی در تیمارهای مختلف

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0/05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین شاخص بنیه بذر بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف بود ($F(3,11) = 31/296, P = 0/000$; جدول شماره ۱). در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که شاخص بنیه بذر در تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود. کمینه شاخص بنیه بذر مربوط به روش کپسوله-آبگیری (E-D) و بیشینه شاخص مربوط به روش شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 بود ($P < 0/05$; شکل ۵). تفاوت معنی‌داری بین شاخص بنیه بذر بین دو تیمار PVS2 و PVS3 مشاهده نشد ($P > 0/05$).



شکل ۵- شاخص بنیه بذر در تیمارهای مختلف

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0/05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه بیان‌کننده عدم تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف بود ($P = 0/925$, $F(3,11) = 0/153$; جدول ۱). درحالی‌که میانگین طول ریشه‌چه ($P = 0/027$, $F(3,11) = 5/276$; جدول ۱)، گیاهچه ($P = 0/003$, $F(3,11) = 11/107$; جدول ۱) و ساقه‌چه ($P = 0/004$, $F(3,11) = 10/744$; جدول شماره ۱) بین گروه‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که طول ساقه‌چه در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شیشه‌ای با PVS2 و کپسوله آبگیری بود ($P < 0/05$) درحالی‌که تفاوت معنی‌داری با تیمار شیشه‌ای با PVS3 نداشت ($P > 0/05$). طول ریشه‌چه در گروه کپسوله آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دیگر گروه‌ها کمتر بود ($P < 0/05$). همچنین نتایج نشان داد که طول گیاهچه نیز در گروه کپسوله آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دیگر گروه‌ها کمتر بود ($P < 0/05$; جدول ۲).

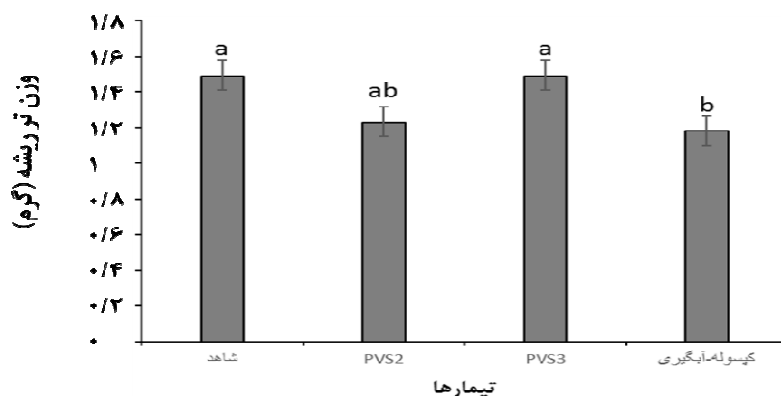
جدول ۲- پارامترهای طولی بخش‌های مختلف گیاهچه‌های بادرنجبویه دنیایی تحت تیمارهای مختلف

تیمار	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	طول گیاهچه	طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه
شاهد	17.13 ± 1.5^a	18.5 ± 1^a	35.63 ± 2.5^a	1.08 ± 0.3^a
شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS2	14 ± 1^b	15 ± 2^{ab}	27 ± 1.9^{bc}	1.08 ± 0.1^a
شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS3	15.23	17 ± 1^a	32.23	1.12 ± 0.5^a
کپسوله-آبیگری	11.33 ± 1.5^c	13 ± 2.6^b	24.33 ± 3.5^c	1.15 ± 0.3^a

×حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P < 0/05$)

شاخص‌های وزنی

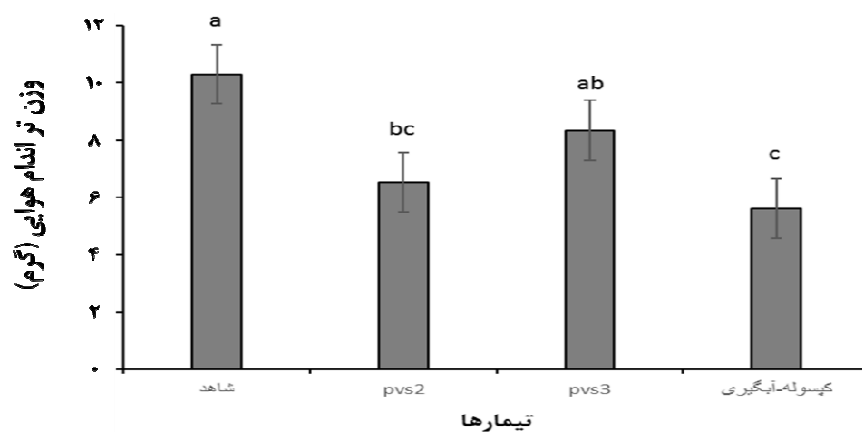
آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن تر ریشه در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که وزن تر ریشه گیاه بادرنجبویه دنیایی در گروه کپسوله-آبیگری در مقایسه با دیگر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$). درحالی‌که وزن تر ریشه بین گروه‌های شاهد، انجماد شیشه‌ای PVS2 و انجماد شیشه‌ای PVS3 تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$; شکل ۶). آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن خشک ریشه بیان‌کننده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف فراسرد و شاهد بود.



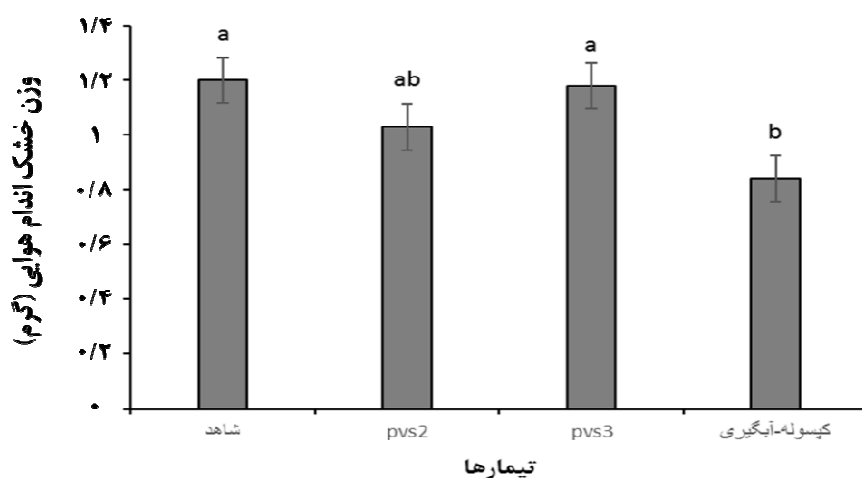
شکل ۶- وزن تر ریشه در تیمارهای مختلف (گرم)

تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0/05$)

آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن تر اندام هوایی در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که کمترین وزن تر اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی تحت تیمار کپسوله-آبگیری به‌دست آمد ($P < 0/05$). درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در وزن تر اندام هوایی بین تیمار روش شیشه‌ای شدن با محلول آبگیری PVS3 و گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۷). همچنین آنالیز واریانس یک‌طرفه میانگین وزن خشک اندام هوایی در آزمایش گلخانه‌ای بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. تست تکمیلی دانکن نشان داد که بین وزن خشک اندام هوایی گروه تیمار با PVS3 و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. درحالی‌که وزن خشک اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی تحت تیمار کپسوله-آبگیری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ($P < 0/05$; شکل ۸).



شکل ۷- وزن تر اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی در تیمارهای مختلف (گرم)
تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0/05$)



شکل ۸- وزن خشک اندام هوایی گیاه بادرنجبویه دنایی در تیمارهای مختلف (گرم)
تیمارهایی که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0/05$)

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش قابلیت بقاء و رشد بذرهای حفاظت‌شده گیاه مرتعی-دارویی بادرنجبویه دنیایی با استفاده از روش‌های مختلف تکنیک فراسرد ارزیابی شد. این بذرها پس از خروج از ازت مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند. بنابراین با توجه به امکان بقاء و رشد بذرها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد می‌توان بذرهای این گونه را جزء بذرهای ارتودوکس^{۱۰} (orthodox) قرار داد (Engelmann, 1990).

حفاظت فراسرد بافت‌های زیستی تنها زمانی می‌تواند با موفقیت انجام شود که از تشکیل کریستال‌های یخی درون یاخته‌ایی در زمان غوطه‌وری در ازت مایع اجتناب گردد. زیرا این کریستال‌ها می‌توانند آسیب‌های جدی به غشای یاخته وارد کنند و قابلیت غشای پلاسمایی را مختل کنند و از آن-جایی که آسیب یاخته‌ایی در تکنیک حفاظت فراسرد قابل جبران نیست، بنابراین پیش تیمارها و تکنیک‌های آبیگری به‌منظور کاهش آب درون یاخته‌ایی صورت می‌گیرد (2006; Wang et al., 2005; Roland et al.,

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر مربوط به تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS3 است؛ به‌نظر می‌رسد، محلول آبیگری در این تیمار به‌دلیل وجود مقدار بالای غلظت ساکارز (۵۰٪ (W/V)) در محافظت از سرما مؤثرتر از سایر تیمارها می‌باشد درحالی‌که به‌نظر می‌رسد که قدرت آبیگری در تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS2 که حاوی ۰/۴ مولار ساکارز و تیمار کپسوله-آبیگری در ارتباط با گیاه بادرنجبویه کارآمد نمی‌باشد که همین امر سبب کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر در این دو تیمار اخیر نسبت به تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS3 شده است. ساکارز طبیعی به‌دلیل کارایی بالا و فقدان سمیت، یک ماده شیمیایی مهم در آبیگری و مقاومت سرمایی است که در محلول‌های بارگیری و آبیگری، پیش از انجماد استفاده می‌گردد (Chang, 2001). نشان داده شده است که روش و نوع محلول آبیگری به‌کار گرفته شده در فرآیند فراسرد بر پارامترهای جوانه‌زنی و رشد بذرها مؤثر می‌باشد (Pennycooke and Towill, 2000). بنابراین، غلظت بالای قند، مقدار آب آزاد

^{۱۰} بذری که می‌توان خشک کرد و در دمای پایین بدون از دست دادن قوه نامیه نگهداری کرد.

(free water) بذرها را کاهش داده و آن‌ها را برای ورود به ازت مایع با حداقل آسیب بافتی آماده‌تر می‌کند. گزارش شده است که اتیلن گلیکول موجود در PVS2 می‌تواند تأثیر منفی در محافظت از نمونه‌ها حین انجماد داشته باشند (Kuleshova et al., 1999). اتیلن گلیکول، پلیمری محلول در آب و انعطاف‌پذیر است که به‌منظور تأمین فشار اسمزی بالا در فرآیند انجماد به جای ساکارز استفاده می‌شود، درحالی‌که اتیلن گلیکول سمی می‌باشد و استفاده از غلظت‌های بالای آن می‌تواند منجر به مرگ سلولی گردد (Chang, 2001).

در مطالعه‌ای مشخص شد که شاخص بنیه بذرهایی که به مدت طولانی در سردخانه با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند، تغییری نکرده است. همچنین بررسی بر روی شاخص بنیه بذر چهار گونه گیاه از خانواده چلیپاییان نشان داده است بذرهایی که به مدت ۲۴ تا ۳۰ سال در دمای ۱۳- درجه سانتی‌گراد و محتوای رطوبتی ۳ درصد نگهداری شده بودند، در مقایسه با نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸ درصد، بنیه بذر آن‌ها بیشتر حفظ شده بود که بیان‌کننده تأثیر دماهای پایین‌تر بر حفظ گونه‌های گیاهی می‌باشد (Maselli et al., 1999). شاخص بنیه بذر ارتباط مستقیم با درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه دارد که نشان‌دهنده هماهنگی قدرت جوانه‌زنی و قدرت رویش گیاه است و می‌تواند به عملکرد بیشتر گیاهان منجر شود (Aryakia et al., 2012). کاهش ارتفاع گیاه در گیاهان باززایی شده از ژرم‌پلاسما تحت تکنیک‌های انجمادی در بسیاری از پژوهش‌ها گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Harding and Benson, 2000). گزارش‌های متفاوتی از پاسخ‌های رشدی و مورفولوژیکی از گیاهچه‌های باززایی شده پس از حفاظت انجمادی وجود دارد (Sershen et al., 2012). با این حال، به‌خوبی نشان داده شده است که با افزایش دمای نگهداری بذر، طول گیاهچه کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از زوال تدریجی و تجزیه شیمیایی ترکیبات بذر باشد که در طی فرآیند خسارت اکسیداتیو رخ می‌دهد که سرعت این فرآیندها به‌طور عمده به دو عامل رطوبت و دما بستگی دارد (Walters et al., 2009).

تغییرات وزن خشک و وزن تر در هر دو اندام ریشه و بخش هوایی بادرنجبویه دنیایی تحت تأثیر تیمارهای مختلف فراسرد نشان‌دهنده وضعیت مناسب سبز شدن و استقرار بذر و تولید گیاه در گلخانه می‌باشد. وزن گیاه جوان همبستگی زیادی با اندازه و کیفیت بذر دارد، به‌طوری‌که بذرهایی سالم‌تر، گیاهانی با وزن تر و وزن خشک بیش‌تری دارند و می‌توانند عملکرد مزرعه را تحت تأثیر قرار دهند

(Sawan et al., 2009). در آزمایش حاضر شرایط فراسرد و به‌ویژه تیمار شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS3 توانست کیفیت بذر و به‌دنبال آن وزن تر و خشک گیاه بادرنجبویه دناپی را به‌خوبی حفظ نماید. گزارش شده است که افزایش دمای نگهداری بذر منجر به کاهش وزن تر و وزن خشک گیاه می‌گردد (Setyowati, 2009) که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر این‌که با آبیگری بذر و نگهداری در شرایط فراسرد، کیفیت بذر و لذا شاخص‌های وزنی به‌خوبی حفظ می‌شوند، مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر به‌خوبی نشان داده شد که در میان همه روش‌های مورد استفاده در فرآیند فراسرد، روش شیشه‌ای شدن با محلول آبیگری PVS3 در نگهداری بذرهای بادرنجبویه دناپی در شرایط فراسرد مؤثرتر می‌باشد. زیرا محلول آبیگری PVS3 در ارتباط با شاخص‌های جوانه‌زنی و وزن خشک و وزن تر اندام‌های گیاه نسبت به محلول آبیگری PVS2 و روش کپسوله-آبیگری بهتر عمل کرده است. به‌نظر می‌رسد که استفاده از غلظت بالاتر ساکارز در محلول آبیگری PVS3 عامل موفقیت بیشتر آن نسبت به محلول آبیگری PVS2 باشد. همچنین به‌نظر می‌رسد که مهره‌های آلزینات در روش کپسوله-آبیگری مانع از تنفس بذر و رشد طبیعی آن شده و در نتیجه رشد گیاهان حاصل از بذرهای که تیمار کپسوله-آبیگری بر آن‌ها اعمال شده ضعیف می‌باشند؛ بنابراین می‌توان با استفاده از این روش در مقیاس کاربردی به‌عنوان یک نسخه پشتیبان و جایگزین مناسب و مطمئن برای نگهداری طولانی مدت بذرهای گیاه بادرنجبویه دناپی در مراکز نگهداری ذخایر ژرم‌پلاسمی استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه دامغان بابت حمایت مالی و معنوی پروژه کمال سپاسگزاری را داریم.

فهرست منابع

کمالی، م.، خسرویان، س.، جلیلوند، م.ر. ۱۳۹۳. جداسازی فلاونوئید لوتئولین (داروی کمکی درمان بیماری MS) از گیاه دارویی بادرنجبویه دناپی (*Dracocephalum kotschy Boiss*) با روش‌های کروماتوگرافی. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، ۹ صفحه. آزادبخت، م. ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. نشر طبیب، ۴۰۰ صفحه. مظفریان، و. ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران: لاتینی، انگلیسی، فارسی. انتشارات فرهنگ معاصر، ۷۴۰ صفحه.

- Abdul-baki, A. A., Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiplication. *Crop Sci*, 3: 630-633.
- Amirghofran, Z., Azadbakht, M., Karimi, M.H. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 167-172.
- 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 Persian)
- Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27: 141-219.
- Benson, E.E. 1999. Cryopreservation in: *Plant Conservation Biotechnology*, Talor Frances, London, 83-95.
- Blakesley, D., Al-Mazrooei, S., Henshaw, G.G. 1995. Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*): use of sucrose and dehydration for cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 15: 259-263.
- Chang, Y. 2001. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortiScience*, 36: 1329-1333
- Engelmann, F. 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation casehistory: Oil Palm somatic embryos. *International Journal of Refrigeration*, 13(1): 26-30.
- Fabre, J., Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration; A new approaches to cryopreservation of Solanum shoot tips, *Cryo- Letters*, 11: 413-426.
- 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.
- Harding, K., Benson, E.E. 2000. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from Cryopreserved Shoot-Tips of Potato. *CryoLetters*, 21(5): 279-288.
- Hartman, H., Kester, D., Davis, F. 1990. *Plant Propagation, Principle and Practices*. Prentice Hall International Editions, 647p.

- Jahanian, F., Ebrahimi S.A., Rahbar Roshandel, N., Mahmoudian, M. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry*, 66(13): 1581-1592.
- Jalali, A., Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Iran, Tehran, 748p.
- Jebeli, M.M., Nadery, A.A., Gafary, F., Hatamy, M. 2014. Robinia pseudoacacia L seed storage in cryopreservation. *Iranian journal of forest*, 6: 245-254.
- Kuleshova, L.L., Macfarlane, D.R., Trounson, A.O. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *cryobiology*, 38: 119-130.
- Koocheki, A., Tabrizi, L., Ghorbani, R. 2008. Effect of biofertilizers on agronomic and quality criteria of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 6(1): 127-37.
- Luo, J., Reed, B.M. 1997. Absciscic acid-responsive protein, Bovin Serum Albumin, and praline pretreatments improve recovery of in vitro currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 34: 240-250.
- Maselli, S., Pérez-García, F., Aguinagalde, I. 1999. Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain. *Annals of Botany*, 84: 207-212.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91 (1): 67-73.
- Panis, B., Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (Crops and Forest Trees). *The Rol of Biotechnology*, 43-50.
- Pennycooke, J.C., Towill, L.E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 19: 733-739.
- Rechinger, K.H. 1986. *Labiatae* in Flora Iranica. Akademische Druck Verlagsantalt, Graz, Austria, vol. 150: 495-504.

- Roland, A., Fleck, R.W., Pickup, J., Day, G., Benson, E. 2006. Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy. *Cryobiology*, 52: 261-268.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G., Kiuchi, F. 2004. Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(10): 1249-1250.
- Sakai, A. S., Kobayashi, I., Oiyama, R. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1): 30-33.
- Sant, S., Taylor, M., Tyagi, A. 2006. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of tropical taro (*Colocasia esculenta*) by vitrification. *CryoLetters*, 27 (3): 133-142.
- Sawan, Z.M., Fahmy, A.H., Yousef, S.E. 2009. Direct and residual effects of nitrogen fertilization, foliar application of potassium and plant growth retardant on Egyptian cotton growth, seed yield, seed viability and seedling vigor. *Acta Ecologica Sinica*, 29: 116-123.
- Setyowati, N. 2009. The effect of seed maturity, temperature, and storage period on vigor of *Picrasma javanica* Bl. seedling. *Biodiversitas*, 10: 49-53.
- Sershen, A., Berjak, P., Pammenter, N.W., Wesley-Smith, J. 2012. The effects of various parameters during. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(10):1249-1250.
- Setyowati, N. 2009. The effect of seed maturity, temperature and storage period on vigor of *Picrasma javanica* Bl. seedling. *Biodiversitas*, 10: 49-53.
- Turner, S., Seranatna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., Tan, B. 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. *Plant Science*, 160: 489-497.
- Walters, C., Volk, G.M., Towill, L.E., Forsline, P. 2009. Survival of cryogenically-stored dormant apple buds: a 20-year assessment. Paper presented at the 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, Leuven, Belgium, 5-9 April.

- Wang, Y.L., Fan, M.J., Liaw, S.I. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) But. Bull. Acad. Sin, 46: 29-34.
- Wolf, J., Bryant, G. 1999. Freezing Drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology, 39: 103-129.
- Yaghmai, M.S., Taffazoli, R. 1988. The essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Flavour and Fragrance Journal, 3(1): 33-36.

