دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

مقایسه روش‌های نگهداری فراسرد ژرم‌پلاسم گیاهی بر شاخص‌های رشدی و جوانه‌زنی بذر گیاه آویشن دنایی

الهه عبدالله‌نژاد[۱]، وحید پوزش[۲] و سعید زواره[۳]

۱ و ۳- دانشجو کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان
۲- استادیار، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، (نویسنده مسوول: poozesh@du.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۹

چکیده

روند نابودی گونه‌های ارزشمند گیاهی از جمله آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*) در اثر عوامل مختلف زیستی و غیرزیستی نیازمند بازنگری در روش نگهداری این گیاهان می‌باشد. یکی از این روش‌ها تکنیک‌های انجمادی و نگهداری بذر در شرایط خارج از رویشگاه‌ها است. درپژوهش حاضر، اثر محلول‌های مختلف انجمادی (PVS2 و PVS3) با استفاده از دو روش انجماد (کپسوله-شیشه‌ای و قطره‌ای-شیشه‌ای) بر شاخص‌های طولی و جوانه‌زنی بذرهای گیاه آویشن دنایی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی بذرها (۹۸٪) و شاخص بنیه بذر (۲۶) بعد از انجماد قطره‌ای-شیشه‌ای و استفاده از محلول آبگیری PVS3 در سطح معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) بدست آمد. همچنین کمترین ارتفاع گیاهچه پس از انجماد روش کپسوله-شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS2 مشاهده شد (۱۷/۳۳ میلی‌متر، $p< ۰/۰۵$). بنابراین روش قطره‌ای-شیشه‌ای با استفاده از PVS3 در مقایسه با روش‌های دیگر برای حفظ بلند مدت بذرهای گیاه آویشن دنایی مطلوب‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی، انجماد شیشه‌ای، محلول آبگیری

مقدمه

گیاهان دارویی و مرتعی به دلیل برداشت‌های بی‌رویه و همچنین بروز تنش‌های زیستی و غیرزیستی با خطر روزافزون نابودی و انقراض روبرو هستند (۲). آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) یکی از این گیاهان در معرض نابودی می‌باشد (۲۷). با توجه به اهمیت دارویی و مرتعی گیاه آویشن دنایی، حفظ و نگهداری این گونه گیاهی ضروری می‌باشد. استفاده از روش‌های نوین زیست فناوری از جمله فن حفاظت فراسرد در کنار روش‌های مرسوم حفظ گونه‌های گیاهی منابع طبیعی ملی و منطقه‌ای در حال گسترش می‌باشد (۱۱). فناوری نگهداری در شرایط فراسرد، روشی برای ذخیره‌سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی است (۲۴،۱۵،۱۰). در این روش، بخش‌های مختلف گیاه در ازت مایع (دمای $-۱۹۶^{o}C$) برای مدت طولانی نگهداری می‌شود (۲۲). در این ارتباط مطالعات نشان داده است که با توجه به کاهش شدید یا توقف فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام گیاهی در دماهای بسیار پایین، مدت زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر میزان زنده‌مانی بذر ندارد (۲۲). آبگیری یاخته گیاهی، ویژگی مشترک روش‌های مختلف حفاظت فراسرد است که پیش از انجماد صورت می گیرد. بنابراین محلول‌های آبگیری مختلفی طراحی شده است (۲۶،۹) و از آنجایی که در محلول‌های آبگیری از مواد مختلفی استفاده می‌شود، انتظار می‌رود هر کدام از این مواد نقش حفاظتی خاصی را ایفا کنند (۳۵،۲۸). حفاظت فراسرد می‌تواند باعث اعمال تنش سرمایی‌شود و بر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی گیاهان تأثیر گذارد (۳۰،۱۲). حفاظت فراسرد بافت‌های زیستی تنها زمانی می‌تواند با موفقیت انجام شود که از تشکیل کریستال‌هایی یخی درون یاخته‌ای در زمان غوطه‌وری در ازت مایع اجتناب گردد، زیرا این کریستال‌ها می‌توانند آسیب‌های جدی به غشای یاخته‌ایی وارد کنند و قابلیت غشای پلاسمایی را مختل کنند (۳۴،۷). برای این منظور، معمولا محلول‌های قندی با غلظت‌های بالا (۵۰٪-۱۰) ساخته می شود و نمونه‌ها قبل از ورود به نیتروژن مایع به مدت چند دقیقه تا چند روز در این محلول‌ها قرار می‌گیرند. از تأثیرات غلظت‌های بالای قند ها می‌توان به دفع کافی آب از نمونه‌ها اشاره نمود. بنابراین زمانیکه فشار اسمزی محلول‌های پیش تیمار بالا باشد نسبت زنده‌مانی افزایش می‌یابد. این اثر قندها باعث می‌شود تا از تشکیل کریستال یخ درون یاخته حین انجماد جلوگیری شود. بنابراین هرچه غلظت قندها و از جمله ساکارز در محیط پیش تیمار بالاتر باشد آبگیری بیشتری صورت می‌گیرد و احتمال تشکیل کریستال یخ کاهش می‌یابد (۱۱). روش‌های مختلفی برای نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی به روش فراسرد از جمله روش کپسوله-شیشه‌ای معرفی شده است که ترکیبی از روش‌های کپسوله کردن و شیشه‌ای شدن است (۲۶). کپسوله کردن در واقع ایجاد نوعی پوشش مصنوعی در اطراف نمونه‌ها می‌باشد که نقش پوسته بذر را ایفا می‌کند. ولی این پوشش علاوه بر حفاظت، به دلیل داشتن مواد مغذی طی نگه‌داری یا هنگام کشت در محیط بازیابی می‌تواند مفید واقع گردد. کپسوله کردن نمونه‌ها در پوشش آلژینات شرایطی ایجاد می‌کند که تنفس و رشد به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر پوشش آلژینات با ممانعت از تبادل هوا، رشد را در حالت ذخیره به حداقل ممکن رساند (۴). همچنین گزارش شده است که آلژینات می‌توانند به صورت یک سیستم محافظتی در مقابل تنش عمل کرده و باعث شیشه‌ای شدن آب و جلوگیری از تشکیل دوباره بلور یخ طی عمل ذوب گردد (۱). روش قطره‌ای-شیشه‌ای نوع دیگری از فرآیند حافظت فراسرد است. در این روش هر بخش از گیاه در

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

قطراتی از محلول انجمادی به سرعت وارد نیتروژن مایع می‌شود (۳۷). سهولت و سرعت اجرای این روش از مزایای آن است که آن را به یکی از تکنیک‌های معمول برای نگه‌داری طولانی مدت ذخایر ژنتیک گیاهان مبدل کرده است (۹). از این رو، روش نگهداری در شرایط فراسرد منجر به افزایش ضریب اطمینان نگهداری نمونه‌های مختلف گونه‌های گیاهی در معرض خطر انقراض شده است. بنابراین در مطالعه حاضر دو روش تکنیک فراسرد کپسوله-شیشه‌ای و قطره‌ای-شیشه‌ای به منظور معرفی روش کارآمد و موثر حفاظت ژرم‌پلاسم آویشن دنایی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذرهای یکنواخت و همگن گیاه آویشن دنایی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی و سپس بطور کامل با آب مقطر شستشو شدند. بذرهای ضدعفونی شده در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه دامغان به گروه‌های: شاهد (عدم اعمال روش انجماد) و انجمادی تقسیم شدند که گروه انجمادی به نوبه خود به زیر گروه‌های قطره‌ای-شیشه‌ای و کپسوله-شیشه‌ای تقسیم شد.

روش انجماد قطره‌ای-شیشه‌ای

انجماد قطره‌ای-شیشه‌ای بذرهای گیاه آویشن دنایی با استفاده از روش ساکایی و انگلمن انجام شد (۲۶). بذرها پیش از آبگیری به مدت۲۰دقیقه در دمای۲۵درجه سانتیگراد در محلول بارگیری حاوی گلیسرول ۲ مولار و ساکارز ۰/۶ مولار قرار گرفتند. در ادامه بذرها به دو گروه تقسیم شدند و هر گروه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای محیط بترتیب با محلول شیشه‌ای شدن گیاهی ۲ (PVS2) [۱۵٪ (وزنی/حجمی) اتیلن گلیکول، ۱۵٪ (وزنی/حجمی) دی میتل سولفوکساید،۳۰ % (وزنی/حجمی) گلیسرول و ۱/۲ مولار ساکارز] و محلول شیشه‌ای شدن گیاهی ۳ (PVS3)[۵۰٪ (وزنی/حجمی) ساکارز، ٪۵۰ (وزنی/حجمی) گلیسرول] آبگیری شدند. در ۵ دقیقه‌ی پایانی فرآیند آبگیری، ۱۰ عدد از بذرها همراه با ۱۰۰ میکرولیتر ازمحلول‌های آبگیری PVS2 و PVS3 درون کرایوویال ۲ml قرار گرفت و در پایان به طور مستقیم به مدت ۲۴ ساعت در تانک ازت مایع نگه‌داری شدند.

روش انجماد کپسوله-شیشه‌ای

انجماد کپسوله-شیشه‌ای بذرهای گیاه آویشن دنایی با استفاده از روش بلاک انجام شد (۳). بذرها ابتدا در محلول آلژینات (۰.۴ مولار ساکارز و ۳ درصد وزنی حجمی اسید آلژنیک با ویسکوزیته پایین) قرار گرفته و سپس بذرها به منظور تشکیل کپسول، درون محلول کلریدکلسیم ۱۰۰میلی‌مولار غوطه‌ور شدند. دانه‌های محصور شده در آلژینات پیش از آبگیری و انتقال به ازت مایع، در محلول بارگیری سترون حاوی گلیسرول ۲ مولار و ساکارز ۰/۶ مولار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس دانه‌های کپسوله شده به دو گروه تقسیم شدند؛ گروه اول با محلول آبگیری PVS2 [۱۵٪ (وزنی/حجمی) اتیلن گلیکول، ۱۵٪ (وزنی/حجمی) دی میتل سولفوکساید، ۳۰٪ (وزنی/حجمی) گلیسرول و ۰/۴ مولار ساکارز] و گروه دوم با محلول آبگیری PVS3 [۵۰٪ (وزنی/حجمی) ساکارز، ۵۰٪ (وزنی/حجمی) گلیسرول] در دمای محیط در شرایط استریل آبگیری شدند. بذرها پس از آبگیری به کرایوویال‌های ۲ml منتقل شدند. سپس در تانک‌های ازت مایع به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند.

ذوب و کشت بذر

پس از قرار گرفتن نمونه‌های گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در ازت مایع، فرآیند ذوب شدن کرایوویال‌های حاوی نمونه، با غوطه‌وری در حمام آب گرم با دمای حدود ۴۰C° دنبال شد. بذرها پس از ذوب شدن وارد محلول ذوب (حاوی ۱/۲ مولار ساکارز) شدند. بذرها برای بررسی و اندازه‌گیری شاخص‌های جوانه‌زنی (سرعت و درصد جوانه‌زنی) و طولی (طول ساقه‌چه و ریشه‌چه) در دستگاه انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند.

هر تیمار با سه تکرار و هر تکرار با ۳۰ نمونه انجام شد. جوانه‌زنی بذرها هر روز و به مدت ۱۰ روز در ساعت معینی بررسی و تعداد بذرهای جوانه زده ثبت گردید. علاوه بر میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، شاخص‌های درصد جوانه‌زنی[1]، سرعت جوانه‌زنی[2] و شاخص بنیه بذر[3] بترتیب زیر محاسبه گردیدند (۱۳).

رابطه (۱) $$GP = \frac{\sum Ni}{\sum N}$$

GP: مجموع تعداد بذور جوانه زده، Ni: تعداد بذر جوانه‌زده در هر شمارش، N: تعداد کل بذرها

رابطه (۱) $$GR = \frac{\sum (Si)}{\sum Di)}$$

GR: سرعت جوانه زنی (تعداد بذر در روز)، Si: تعداد بذر جوانه زده در هر شمارش، Di: تعداد روز تا شمارش nام

رابطه (۲) $$VI = SL \times GP$$

VI: شاخص بنیه بذر، SL: میانگین طول گیاهچه، GP: درصد جوانه‌زنی نهایی

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) انجام شد. آزمون تکمیلی دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌های مختلف با $p< ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه در بذرهای تحت تیمار کپسوله-شیشه‌ای (E-V) برای هر دو محلول آبگیری PVS3 و PVS2 در مقایسه با تیمار قطره‌ای-شیشه‌ای (D-V) با دو محلول آبگیری (PVS3 و PVS2) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p< ۰/۰۵$). تیمار کپسوله-شیشه‌ای (E-V) برای هر دو محلول آبگیری PVS3 و PVS2 منجر به کاهش معنی دار ($p< ۰/۰۵$) طول ریشه‌چه، طول‌ساقه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر نسبت به شاهد شد (جدول

1- Germination Percent 2- Germination rate 3- Vigor Index

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

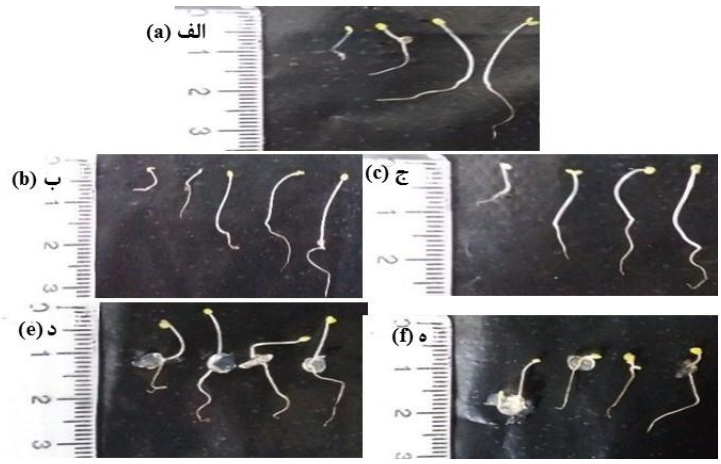
۱). همچنین نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه در تیمارهای مختلف فراسرد نسبت به شاهد افزایش داشت که این افزایش در روش کپسوله–شیشه‌ای (E-V) و برای هر دو محلول آبگیری PVS3 (۱/۵۳) و PVS2 (۱/۵۵) معنی‌دار (p< ۰/۰۵) بود (جدول ۱). ارتفاع گیاه بعد از انجماد فراسرد در هر دو تیمار کاهش یافت که فقط در روش کپسوله–شیشه‌ای معنی‌دار (PVS2 = ۱۷/۳۳ میلی‌متر و PVS3 = ۲۱/۶۶ میلی‌متر، p< ۰/۰۵) بود (شکل ۱). در تائید این نتایج، کاهش ارتفاع در گیاهان بازیابی شده به دنبال حفاظت فراسرد ژرم‌پلاسم گزارش شده است (۲۹). در حالیکه ماتسوموتو و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که سطوح بالایی از بازیابی اندام هوایی گیاه واسابی پس از تیمار راس ساقه گیاه با روش‌های کپسوله–شیشه‌ای و شیشه‌ای شدن بدست می‌آید. همچنین طول اندام هوایی گیاه واسابی در هر دو روش از افزایش قابل توجه‌ای برخوردار بود (۱۸). مشخص شده است که کاهش محتوای رطوبتی بذر و نگه‌داری در دمای فراسرد با افزایش ویسکوزیته یاخته‌ای و تغییر شکل سیتوپلاسم به حالت شیشه‌ای می‌تواند از زوال تدریجی بذر جلوگیری کند (۳۳،۵). بدین منظور از محلول‌های آبگیری مختلفی به منظور کاهش آب درون یاخته‌ایی و برای جلوگیری از تشکیل یخ درون یاخته استفاده می شود (۳۵).

جدول ۱– شاخص‌های طولی گیاه آویشن‌دنایی پس از بازیابی بذرهای منجمد شده

Table 1. The longitudinal indices of *Thymus daenensis* after recovering of vitrified seeds

منابع تغییرات	میانگین داده‌ها			
	طول ساقه‌چه (mm)	طول ریشه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	نسبت طول ریشه‌چه بر ساقه‌چه
Control	16.55±2.03^{a}	12.99±2.02^{a}	32.1±4.11^{a}	0.78±0.12^{a}
D-Vpvs3	14.33±2.08^{a}	12.66±1.52^{ab}	26.33±2.08^{ab}	0.88±0.06^{a}
D-Vpvs2	14.77±2.45^{a}	10.44±1.26^{ab}	27±2.64^{ab}	0.72±0.17^{a}
E-Vpvs3	8±2.45^{b}	12±1.26^{ab}	21.66±2.46^{bc}	1.53±0.17^{b}
E-Vpvs2	6±1^{b}	9.33±2.08^{b}	17.33±3.55^{c}	1.55±0.24^{b}

D-V: قطره‌ای–شیشه‌ای، E-V: کپسوله–شیشه‌ای، PVS: محلول انجماد شیشه ای گیاه: حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار است (مقادیر، میانگین سه تکرار ±SE، p ≤0.05).



شکل ۱– مقایسه طول گیاهچه آویشن دنایی پس از انجمادفراسرد (الف) شاهد، (ب) قطره‌ای–شیشه‌ای با محلول PVS3، (ج) قطره‌ای–شیشه‌ای با محلول PVS2، (د) کپسوله–شیشه‌ای با محلول PVS3 و (ه) کپسوله–شیشه‌ای با محلول PVS2.

Figure 1 Comparison of *Thymus daenensis* length after cryopreservation : (a) control, (b) Droplet-vitrification with PVS3, (c) Droplet-vitrification with PVS2, (e) Encapsulation-vitrification with PVS3, (f) Encapsulation-vitrification with PVS2 .

بنابراین تیمارهای کاهش رطوبت می‌تواند در حفظ و زنده‌مانی بذرها پیش از ورود به دمای ۱۹۶– درجه سانتی‌گراد تأثیر مثبت داشته باشد (۲۰) که این مطلب مطابق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد.

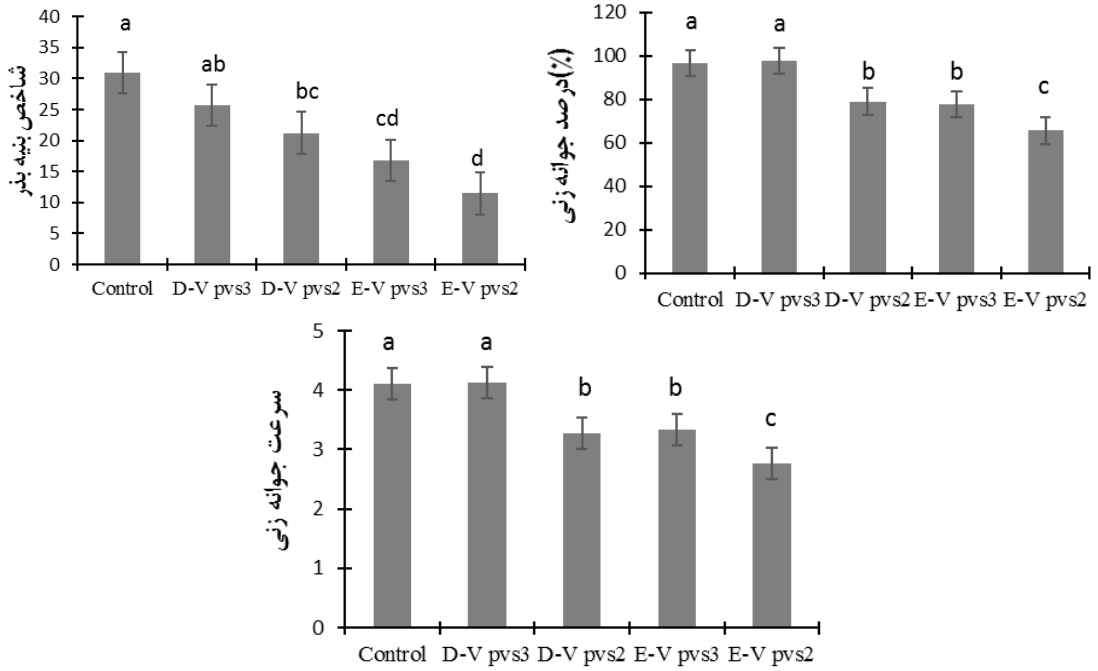
شاخص‌های جوانه‌زنی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که شاخص بنیه بذر تحت تیمارهای مختلف حفاظت فراسرد بطور معنی‌داری (p< ۰/۰۵) کاهش یافت، بطوریکه بیشترین کاهش در تیمار کپسوله–شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS2 بدست آمد. اما این کاهش در تیمار قطره‌ای–شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS3 تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد (شکل ۲). همچنین اختلاف معنی‌داری بین شاخص‌های درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمارهای مختلف فراسرد دیده شد، بطوریکه بیشترین و کمترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بترتیب در تیمارهای قطره‌ای–شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS3 (بترتیب ۹۸٪ و ۴/۱۳) و تیمار کپسوله–شیشه‌ای با محلول

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

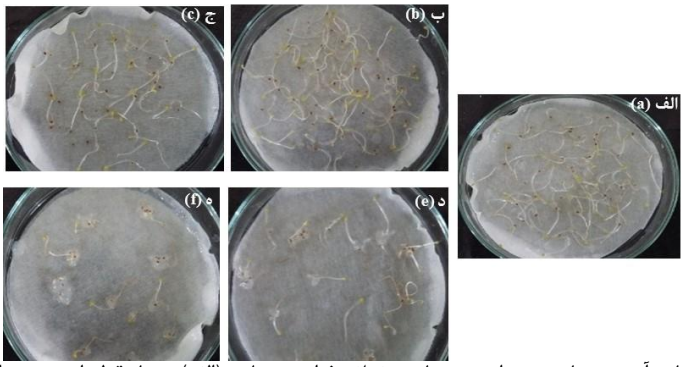
[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

آبگیری PVS2 (به‌ترتیب ۶۶٪ و ۲/۷۷) بدست آمد (شکل ۲، $p< ۰/۰۵$). در هر دو روش قطره‌ای–شیشه‌ای و کپسوله–شیشه‌ای، درصد و سرعت جوانه‌زنی در هنگام استفاده از محلول آبگیری PVS2 نسبت به PVS3 کاهش نشان داد (شکل ۳). گزارش شده است که حضور مواد توکسیک ضد یخ در محلول آبگیری PVS2 می‌توانند بر صفت‌های مورد سنجش در تکنیک فراسرد تأثیر منفی داشته باشند که می‌تواند به عنوان یکی از دلایل تفاوت بین گروه‌های شاهد و انجمادی در نظرگرفته شود (۱۴). این مشاهدات با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد زیرا نتایج نشان داد که محلول آبگیری PVS3 نسبت به PVS2 اثر بهتر و کارآمدتری بر میزان قوه بذر دارد. درصد بالای جوانه‌زنی در روش قطره‌ای–شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS3 (۹۷٪/۷۷) بیان کننده این مطلب می‌باشد که ذخیره‌سازی بذرهای گیاه آویشن‌دنایی با این روش در ازت مایع نه تنها بر زنده‌مانی بذرها اثر منفی ندارد بلکه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها و همچنین افزایش رشد گیاهچه‌ها پس از خروج از ازت مایع می‌شود. به‌طورکلی قوه زنده‌مانی بذرهای گیاه آویشن‌دنایی تحت تیمارها مختلف فراسرد پس از خروج از ازت مایع حفظ شد. شاخص بنیه بذر با درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه ارتباط مستقیم دارد که نشان‌دهنده هماهنگی توان جوانه‌زنی و قدرت رویش گیاه می‌باشد که منجر به عملکرد بیشتر می‌شود (۱).



شکل ۲– بنیه بذر و نرخ جوانه‌زنی بذرهای آویشن دنایی بعد از انجماد. حروف مختلف نشانگر تفاوت معنی‌دار است (مقادیر، میانگین سه تکرار ±SE، $p\leq 0.05$).

Figure 2. Vigor index and germination rate of *Thymus daenensis* seeds after cryopreservation. Different letters indicate significant different.(values: mean of three repetitions ± SE, $p \leq 0.05$).



شکل ۳– جوانه زنی بذرهای آویشن دنایی پس از روش‌های مختلف فراسرد: شاهد (الف)، تیمار قطره‌ای–شیشه‌ای PVS3 (ب)، تیمار قطره‌ای–شیشه‌ای PVS2 (ج)، تیمار کپسوله–شیشه‌ای PVS3 (د)، تیمار کپسوله–شیشه‌ای PVS2 (ه).

Figure 3. Germination of *Thymus daenensis* seeds after different cryopreservation methods: (a) control, (b) Droplet-vitrification with PVS3, (c) Droplet-vitrification with PVS2, (e) Encapsulation-vitrification with PVS3, (f) Encapsulation-vitrification with PVS2.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

در مطالعه‌ی دیگر مشخص شد که شاخص قدرت بذرهایی که به مدت طولانی در سردخانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده‌اند، تغییری نداشتند (۸). این در حالیست که دیگران گزارش کرده‌اند که نگه‌داری بذرهای خشک در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت طولانی ممکن است منجر به تغییرات فیزیولوژی و ژنتیکی در دورهای زمانی خیلی طولانی گردد (۳۱). همچنین بررسی بر روی شاخص بنیه بذر چهار گونه گیاه از خانواده چلیپاییان نشان داده شد که 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 دردمای ۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸ درصد، بنیه آنها بهترحفظ شده بود (۱۷). ناداراجان و همکاران (۱۹) گزارش دادند که سرد کردن سریع بذرهای گیاه کاسیای سیام (*Senna siamea*) بهترین تکنیک برای یک انجماد فراسرد است. بطور کلی روش سرد کردن سریع و بکارگیری انجماد فراسرد، مناسب بافت‌هایی از گیاهانی همچون بذرهای نوع ارتدکس است که دارای سیتوپلاسم با غلظت بالا و حجم کم آب هستند (۱۶،۳۶). نگه‌داری بذرهای نوع ارتدکس و حد واسط به روش انجماد فراسرد تا زمانی که سطوح ازت مایع در سطح ثابت حفظ شود می‌تواند به افزایش طول عمر بذرها کمک نماید (۳۱). گسترش دستورالعمل‌های مختلف برای نگه‌داری بذرهای گیاهان سبب شد تا از روش حفاظت فراسرد برای حفظ گونه‌های زیادی با هزینه اندک استفاده گردد و میزان از بین رفتن بذرها را در طی فرآیند فراسرد به میزان چشم‌گیری کاهش داد (۳۲). اما اطلاعات و بررسی‌های کمی در مورد استفاده از روش فراسرد برای نگهداری بذر گونه‌های دارویی و وحشی در معرض خطر انقراض وجود دارد (۲۳). پنی کوک بیان کرد که روش آبگیری و نوع محلول آبگیری به کار گرفته شده در فرایند فراسرد بر پارامترهای جوانه زنی و رشد بذرها موثر می‌باشد (۲۱). چنگ و همکاران اظهار داشتند که مقاومت به سرما و زنده‌مانی ژرم پلاسم گیاهی را می‌توان با استفاده از تیمارهایی با غلظت بالای ساکاروز به عنوان محلول پیش از ورود به ازت مایع افزایش داد (۷). گزارش شده است که جوانه‌هایی که محتوای آب آن‌ها در اثر آبگیری مفرط به کمتر از ۱۰٪ برسد به تدریج زنده‌مانی خود را از دست خواهند داد، زیرا در طی خشک شدن دچار آسیب می‌شوند (۳۳). سرکار و نایک نشان دادند که ساکارز به عنوان یک ماده افزودنی مهم در محیط پیش تیمار به منظور ایجاد مقاومت به خشک شدن در حین اعمال دستورالعمل شیشه‌ای شدن می‌تواند نقش مهمی داشته باشد (۲۸). در این آزمایش قدرت آبگیری محلول PVS3 به دلیل وجود مقدار زیاد ساکارز می‌باشد. در واقع غلظت بالای ساکارز در محلول PVS3 به عنوان محلول پیش تیمار، محتوای آب نمونه‌ها را کاهش داده و آنها را برای ورود به ازت مایع آماده می‌کنند و از وارد آمدن آسیب به غشا پلاسمایی در طی فرآیند انجماد جلوگیری می‌نماید (۷). همچنین وجود غلظت‌های بالای ساکارز در پیش تیمارها در افزایش رشد یاخته‌ها پس از خروج از ازت مایع نشان داده شده است (۶). رد و یو (۲۵) بیان کردند مقاومت سرمایی و زنده‌مانی ژرم پلاسم گیاهی را می‌توان توسط تیمارهای غلظتی ساکارز پیش از ورود به ازت مایع القا نمود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پارامترهای مورد سنجش شامل شاخص‌های طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاه‌چه و شاخص‌های جوانه‌زنی با استفاده از محلول آبگیری PVS3 در مقایسه با محلول آبگیری PVS2 بهتر عمل کرده است. همچنین تیمار قطره‌ای- شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS3 دارای بیشترین اثر مثبت در نگهداری بذرهای آویشن دنایی بود. بنظر می‌رسد که استفاده از درصد بالاتر ساکارز در محلول آبگیریPVS3 عامل موفقیت بیشتر آن نسبت به محلول آبگیری PVS2 باشد. بنابراین روش محافظت قطره‌ای- شیشه‌ای با محلول آبگیری PVS3 روشی مناسب و مطمئن برای نگه داری طولانی مدت بذرهای گیاه آویشن دنایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Aryakia, E., H. Ramazani, H. Ghafoori, A. Dolatyari, M.R. Naghavi and S.A. Shahzadeh Fazeli. 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.
2. Arzani, A. 2004. Breeding Field Crops (Authored by: Sleper & Poehlman). 3th edition,Isfahan University of Technology Publication, 630 pp (In Persian).
3. Block, W. 2003. Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm. Cryobiology, 47: 59-72.
4. Brodelius, P., L. Linse and K. Nilsson. 1982. Viability and biosynthetic capacity of immobilized plant cells. In Fujiwara A (Ed) plant tissue culture 1982. Proc 5th int. Cong of plant tissue and cell culture Maruzen. Tokyo 371 pp.
5. Buitink, J. and O. Leprince. 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. Physiologie moléculaire des semences, 331(10): 788-95.
6. Chang, Y. and B.M. Reed. 2000. Extended alternating-temperatur cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. Cryobiology, 40: 311-322.
7. Chang, Y. and B.M. Reed. 2001. Preculture Conditions Influence Cold Hardiness and Regrowth of Pyrus cordata Shoot Tips after Cryopreservation. HortScience, 36(7): 1329-1333.
8. De Castro Lima, D., A. Sandro Dutra, F. Moura Pontes and F.T. Coelho Bezerra. 2014. Storage of sunflower seeds. Revista Ciência Agronômica, 45(2): 361-369.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

9. Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genetics Resources Newsletter, 112: 9-18.
10. Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40: 427-433.
11. Fang, J.Y., A. Wetten and P. Hadiey. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. Plant Science, 166: 669-675.
12. Ghorbani, A.F. Zarinkamar and A. Fallah. 2009. The Effect of Cold Stress on the Morphologic and Physiologic Characters of Two Rice Varieties in Seedling Stage. Journal of Crop Breeding, 1(3): 50-66. (In Persian)
13. Kandil, A.A., A.E. Sharief and E.S.E. Nassar. 2012. Response of some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to germination under salinity stress. International Journal of Agriculture Sciences, 4: 272-277.
14. Kuleshova, L.L., D.R. Mac Farlane, A.O. Trounson and J.M. Shaw. 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(2): 119-130.
15. Lambardi, M., C. Benelli and A. Decarlo. 2005. Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: development of the technology at the CNR/INVALSA Institute of Florence. The Role of Biotechnology, 181-182.
16. Li, D.Z. and H.W. Pritchard. 2009. The science and economics of ex situ plant conservation. Trends in Plant Sciences, 14: 614-621.
17. Maselli, F., M.A. Gilabert and C. Conese. 1998. Integration of high and low resolution NDVI data for monitoring vegetation in Mediterranean environments. Remote Sensing of Environment, 63: 208-218.
18. Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada. 1995a. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of wasabi (Wasabia japonica) by encapsulation-vitrification method. CryoLetters, 16: 189-196.
19. Nadarajan, J., H.J. Staines, E.E. Benson, M. Mansor, B. Krishnapillay and K. Harding. 2006. Optimization of cryopreservation for Sterculia cordata Blume. zygotic embryo using Taguchi experiments. Journal of Tropical Forest Science, 18: 166-172.
20. Ozden-Tokatli, Y., E.A. Ozudogru, F. Gumusel and M. Lambardi. 2007. Cryopreservation of *Pistacia spp.* seeds by dehydration and one-stepfreezing. CryoLetters, 28(2): 83-94.
21. Pennycooke, J.C. and L.E. Towill. 2000.Cryopreservation of shoot tips from in vitro plantsof sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. Plant Cell Reports, 19: 733-737.
22. Popov, A.S., E.V. Popova, T.V. Nikishina and O.N. Vysotskaya. 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration, 29: 403-410.
23. Rajasekharan, P.E. 2006. Prospects of new cryopreservation techniques for conservation oftropical horticultural species. Paper presented at the ICAR Short Course on In Vitro Conservation and Cryopreservation-New Options to Conserve Horticultural Genetic Resources, Banglore, India. 21-30 September.
24. Rao, N.K. 2004. Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3: 136-145.
25. Reed, B.M. and X. Yu. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown gooseberry and current meristems Cryo-Letters, 16: 131-136.
26. Sakai, A. and F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. CryoLetters, 28(3): 151-172.
27. Sardari, M., M. Talebi and A. Ghaedi. 2007. Final Report of Phase 2 from Plan of the Collection, Identification, Classification and Herbariums Formation. Research Center of Chaharmahal & Bakhtiari. (In Persian)
28. Sarkar, D. and P.S. Naik. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. Annals of Botany, 82: 455-461.
29. Sershen, B. Varghese, N.W. Pammenter and P. Berjak. 2012. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress-A case study on two amaryllid species. Journal of Plant Physiology, 169: 999-1011.
30. Sharifi, P. 2012. Evaluation of cold tolerance of coleoptile growth in some of rice cultivars at germination stage. Journal of Crop Breeding, 4(9): 108-121. (In Persian)
31. Stanwood, P.C. and L.N. Bass. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Science and Technology, 9: 423-437.
32. Stanwood, P.C. 1987. Survival of sesame seeds at the temperature (-196 °C) of liquid nitrogen. Crop Science, 27: 327-331.
33. Sun, W.Q., T.C. Irving and A.C. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. Physiology Plant, 90: 621-688.
34. Tao, D. and P.H. Li. 1986. Classification of plant cell cryoprotectants. Journal of Theoretical Biology, 123: 305-310.
35. Walters C., G.M. Volk, L.E. Towill and P.H.L. Forsline. 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 2009.
36. Withers, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplast. In: Karta, K.K. (ed). Cryopreservation of plant cells and organs. Florida, CRC Press Inc.
37. Wolf, J. and G. Bryant. 1999. Freezing Drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology, 39: 103-129.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]

Comparison of the Different Plant Germplast Cryopreservation Methods on Growth and Germination Indices of Thyme (*Thymus Daenensis*)

Elaheh Abdullahnejad[1], Vahid Pozesh[2] and Saeid Zavareh[3]

1 and 3- M.Sc. Student and Associated Professor Faculty of Biology and Research Institute of Life Sciences, Damghan University
2- Assistant Professor, Faculty of Biology and Research Institute of Life Sciences, Damghan University, (Corresponding author: poozesh@du.ac.ir)
Received: August 1, 2017 Accepted: May 30, 2018

Abstract

Increasing rate of extinction of valuable plant species such as *Thymus daenensis Celak* due to various biological and non-biological factors requires an overview of conservation and preservation methods. In this regard, cryopreservation techniques are one of the most important methods for preservation of seeds in non-habitat conditions. In the present study, the effects of different plant vitrification solutions (PVS2 and PVS3) were evaluated using two methods of vitrification (encapsulation-vitrification and droplet-vitrification) on the longitudinal and germination indices of *T. daenensis* seeds. Results showed that the highest viability rate (98%) and seed vigor index (26) was obtained after droplet-vitrification method using PVS3 ($p \leq 0.05$). Also, the lowest seedlings height was observed in encapsulation-vitrification method using PVS2 (17/33 mm; $p \leq 0.05$). Therefore, droplet-vitrification method using PVS3 is more favorable for the long-term preservation of *T. daenensis* seeds.

Keywords: Dehydration Solution, *Thymus Daenensis*, Vitrification

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-23]

[DOI: 10.29252/jcb.10.28.155]