حفظ منابع ژنتیکی سوسن چلچراغ با نگهداری ژرم‌پلاسم در ازت مایع و استفاده از روش‌های کپسوله‌کردن–آب‌برداری و کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌شدن

بهزاد کاویانی (۱)، محمدنقی پاداشت دهکائی (۲)، داود هاشم‌آبادی (۱)، امیرحسین دارابی (۳)، افشین احمدی حصار (٤)، سارا غفاری (٤)، سید حسین سیدی (٤)، سید مرتضی افضلیان (٤)

۱- اعضای هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی ۲- استادیار ایستگاه تحقیقات گل ها و گیاهان زینتی، لاهیجان ۳- کارشناس آزمایشگاه بیماری های گیاهی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده کشاورزی ٤- دانشجویان دوره کارشناسی ارشد باغبانی، گرایش گیاهان زینتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

نگهداری ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پائین ازت مایع (۱۹٦°C-) روشی مناسب برای حفظ درازمدت منابع ژنتیکی گیاهی است. ژرم‌پلاسم‌های سوسن چلچراغ [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.](دانه‌ها، محورهای جنینی، جوانه‌های محوری و پیازچه‌ها) با استفاده از روش کپسوله‌کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن، در ازت مایع نگهداری شدند. پیش‌تیمارهای مورد استفاده برای کاهش تنش ناشی از انجماد در ازت مایع، سوکروز، سوکروز-آب‌برداری،کپسوله‌کردن-آب-برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن بودند. از غلظت ۰/۷۵ مولار سوکروز، همچنین از جریان هوای تمیز اتاق کشت، به-مدت یک ساعت استفاده شد. ژرم‌پلاسم‌ها با استفاده از آلژینات‌سدیم (۳ درصد) و کلریدکلسیم (۱۰۰ میلی‌مولار)، کپسوله (پوشش‌دار) شدند. ژرم‌پلاسم‌ها همچنین در محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، با ترکیب۳۰ درصد (وزن به حجم) گلیسرول، ۱۵ درصد (وزن به حجم) اتیلن گلیکول و ۱۵ درصد (وزن به حجم) دی متیل سولفوکسایدشیشه‌ای شدند. ژرم‌پلاسم‌ها بعد از قرارگرفتن در پیش‌تیمارها، به‌مدت حداقل یک ساعت در ازت مایع غوطه‌ور شدند. بعد از نگهداری در ازت مایع، ژرم-پلاسم‌ها برای ذوب‌شدن، به‌مدت ۲ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۸°C-۳۷ قرار گرفتند. سپس ژرم‌پلاسم‌ها در محیط جامد موراشیگ و اسکوگ کشت شدند. روش کپسوله‌کردن-آب‌برداری برای دانه‌ها و روش کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن برای دانه‌ها، محورهای جنینی، جوانه‌های محوری و پیازچه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در روش کپسوله‌کردن-آب‌برداری، درصد بقای دانه‌ها بعد از نگهداری در ازت مایع، برای دانه‌های شاهد، صفر، برای دانه‌های پیش‌تیمارشده با سوکروز و آب‌برداری، ۷۵ درصد و برای دانه‌های کپسوله‌شده‌ی پیش‌تیمارشده با سوکروز و آب‌برداری،۵۰ درصد بود. در روش کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن، حدود ۱۰ درصد از دانه‌ها و محورهای جنینی منجمدشده‌ی پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدنگیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز و کپسوله‌شده، در محیط کشت، جوانه زدند، درحالی‌که دانه‌ها و محورهای جنینی شاهد و پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز، بدون کپسول، بقایی را نشان ندادند. هیچ‌یک از جوانه‌های محوری و پیازچه‌های شاهد و پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز و آب‌برداری، علائمی از رشد را نشان ندادند. نتایج این مطالعه نشان داد که، مناسب‌ترین اندام گیاه سوسن چلچراغ برای نگهداری در ازت مایع، دانه، مناسب-ترین پیش‌تیمار، سوکروز-آب‌برداری و مناسب‌ترین روش، کپسوله‌کردن است.

کلمات کلیدی: خزانه ژنتیکی- پیش تیمار- پوشش دار کردن- آبگیری

مقدمه

یکی از بهترین روش‌های حفظ خزانه‌ی ژنتیکی گیاهان، نگهداری ژرم‌پلاسم آنها در شرایط فراسرد (ازت مایع، ۱۹٦°C-) است. در این شرایط، همه‌ی فعالیت‌های سوخت‌وسازی سلول‌ها متوقف می‌شود. برای کاهش اثر تنش‌زای ازت مایع، استفاده از ترکیباتی همانند سوکروز و روش‌هایی همانند کپسوله‌کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن به‌عنوان پیش‌تیمار ضروری است. استفاده از این ترکیبات و روش‌ها برای افزایش مقاومت ژرم‌پلاسم‌ها در برابر ازت مایع و نگهداری درازمدت آنها در این شرایط در مطالعات زیادی نشان داده شده است (انگلمن، ۲۰۰۰؛ پنیس و لامباردی، ۲۰۰۵). هدف مطالعه‌ی حاضر، اثر سوکروز، کپسوله‌کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌شدن بر روی بقای ژرم‌پلاسم‌های سوسن چلچراغ بعد از نگهداری در ازت مایع بود.

مواد و روش‌ها

ژرم‌پلاسم‌های سوسن چلچراغ [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] (دانه، محور جنینی، جوانه‌ی محوری و پیازچه) از منطقه‌ی داماش گیلان جمع‌آوری شدند. برای کپسوله‌کردن-آب‌برداری، ژرم‌پلاسم‌ها بعد از ضدعفونی سطحی با اتانول هفتاد درصد و هیپوکلریت سدیم نیم درصد، به محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ حاوی هفتاد و پنج صدم مولار ساکاروز منتقل شدند و یک ساعت در آن ماندند. سپس ژرم‌پلاسم‌ها به محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ حاوی هفتاد و

پنج صدم مولار ساکاروز همراه با سه درصد آلژینات سدیم منتقل شدند و بعد از یک ساعت در محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ حاوی هفتاد و پنج صدم مولار ساکاروز همراه با صد میلی‌مولار کلرید کلسیم قرار داده شدند. تیله‌های حاوی یک ژرم‌پلاسم، به‌مدت یک ساعت در زیر اتاق کشت با جریان هوای تمیز، آب‌برداری شدند. برای کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌شدن، ژرم‌پلاسم‌ها در محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲ حاوی سی درصد (وزن به حجم) گلیسرول پانزده درصد (وزن به حجم) اتیلن گلیکول و پانزده درصد (وزن به حجم) دی متیل سولفوکساید تهیه شده در محیط مایع موراشیگ و اسکوگ قرار گرفتند. تمام ژرم‌پلاسم‌ها به‌مدت حداقل یک ساعت در ازت مایع نگهداری شدند. بعد از آن دو دقیقه در حمام آب‌گرم سی و هفت تا سی و هشت درجه‌ی سانتی‌گراد ذوب شدند و در نهایت در محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ برای باززایی کشت گردیدند و به اتاق رشد منتقل شدند.

نتایج و بحث

درصد باززایی در دانه‌های تیمارشده با کپسوله‌کردن–آب‌برداری بعد از نگهداری در ازت مایع، برای دانه‌های شاهد، صفر، برای دانه‌های پیش‌تیمارشده با سوکروز و آب‌برداری، ۷۵ درصد و برای دانه‌های کپسوله‌شده‌ی پیش‌تیمارشده با سوکروز و آب‌برداری، ۵۰ درصد بود. نتایج مشابهی در برخی گیاهان گزارش شد (برنارد و همکاران، ۲۰۰۲؛ رید و همکاران، ٢٠٠٦). بر خلاف این نتیجه مطالعه بر روی ژرم‌پلاسم چای و صنوبر نشان داد که این ژرم‌پلاسم‌ها بدون هیچ پیش‌تیماری بعد از نگهداری در ازت مایع رشد کردند (جانیرو و همکاران، ١٩٩٦؛ بنلی و همکاران، ۲۰۰۸). مناسب بودن روش کپسوله‌کردن–آب‌برداری و استفاده از سوکروز به‌عنوان یک پیش‌تیمار در مطالعه‌ی بسیاری از محققان نشان داده شد (سوزوکی و همکاران، ٢٠٠٦؛ کاویانی، ۲۰۱۰). در روش کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌شدن، حدود ۱۰ درصد از دانه‌ها و محورهای جنینی منجمدشده‌ی پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز و کپسوله‌شده، در محیط کشت، جوانه زدند، درحالی‌که دانه‌ها و محورهای جنینی شاهد و پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز، بدون کپسول، بقایی را نشان ندادند. هیچ‌یک از جوانه‌های محوری و پیازچه‌های شاهد و پیش‌تیمارشده با محلول شیشه‌ای‌شدن گیاهی ۲، ۷۵/. مولار سوکروز و آب‌برداری، علائمی از رشد را نشان ندادند.مطالعه‌ی سانچز–رومرو و پنیس (۲۰۰۸) بر روی کشت‌های جنینی زیتون همچنین مطالعه‌ی ناداراجان و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که بهترین پاسخ ژرم‌پلاسم‌ها بعد از نگهداری در ازت مایع هنگامی است که به‌مدت یک ساعت در محلول شیشه‌ای‌شدن آب‌برداری شوند. مطالعه‌ی زیادی مناسب بودن روش کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌شدن را نشان دادند (پنیس و لامباردی، ۲۰۰۵؛ تاماسیری و سومکول، ۲۰۰۷).

منابع

Benelli, C., M. Capuana,A. de Carlo and I. Tsvetkov. 2008. Application of cryopreservation to the long-term storage of popular and aspen (*Populus* spp.) germplasm. 2nd meeting of working groups. Cryopreservation of crop science in Europe, Cryoplanet-cost action 871, Oulu, Finland, 20-23 February, pp. 47-48.

Bernard, F., H. Shaker-Bazarnov and B. Kaviani. 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. 2000. Improvement of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: cryopreservation of tropical plant germplasm (Edited by Engelmann F and Takagi H). Italy, IPGRI.

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* L.). Plant Omics J. 3 (6): 177-182.

Janeiro, L., A.M. Vieitez and A. Ballester. 1996. Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L. Plant Cell Rep. 15: 699-703.
Nadarajan, J., M. Mansor, B. Krishnapillary, H. Staines, E. Benson and K. Harding. 2008. Development of cryopreservation strategies for a recalcitrant seed species using calorimetry. Cryopreservation of crop science in Europe, Cryoplanet-cost action 871, Oulu, Finland, 20-23 February, pp. 34-35.
Panis, B. and M. Lambardi. 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.
Reed, B.M., L. Schumacher, N. Wang, J. Achino and R.E. Barker. 2006. Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. Crop Sci. 46: 6-11.
Sanchez-Romero, C. and B. Panis. 2008. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. 2nd meeting of working groups. Cryopreservation of Crop Science in Europe, Cryoplanet-cost action 871, Oulu, Finland, 20-23 February, pp. 24-25.
Suzuki, M., M. Ishikawa, H. Okuda, K. Noda, T. Kishimoto, T. Nakamura, I. Ogiwara, I. Shimura and T. Akihama. 2006. Physiological changes in gentian axillary buds during two-step pre-culture with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. Annals Bot. 97: 1073-1081.
Thammasiri, K. and L. Soamkul. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea*Griff. ex Lindle. seeds by vitrification. Sci. Asia 33: 223-227.

Conservation of genetic resources of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] by germplasm storage in liquid nitrogen and the use of encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification methods

Kaviani, B., Padasht Dehkaei, M.N., Hashemabadi, D., Darabi, A.H., Ahmadi Hesar, A., Ghafari, S., Seyedi, S.H., Afzalian, S.M.

Abstract

Cryopreservation is a perfect method for long-term conservation of plant genetic resources at very low temperature (liquid nitrogen, -196°C). Lily germplasms (seeds, embryonic axes, lateral buds and bulblets)were cryopreserved using an encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification methods. Pretreatments applied for reduction of LN stress were sucrose (0.75 M), dehydration (1 h in laminar air flow cabinet), encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. The germplasms were encapsulated in sodium alginate (3%) and calcium chloride (100 mM).Germplasms were vitrified in plant vitrification solution 2 (PVS2)consisted of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulphoxide. Germplasms were plunged in LN for 1 h and then were re-warmed rapidly in a water-bath at 37-38°C for 2 min.Following cryopreservation, germplasms were cultured on solid MS medium.Encapsulation-dehydration method was used for seeds and encapsulation-vitrification method for seeds, embryonic axes, lateral buds and bulblets. In encapsulation-dehydration method, control seeds did not survive after LN treatment. The rate of viability in non-encapsulated seeds but pretreated with sucrose and dehydration was 75% and the rate of viability in pretreated, encapsulated seeds was 50%. About 10% of cryopreserved seeds and embryonic axes pretreated with PVS2 solution, sucrose (0.75 M) and encapsulation were able to sprouting, while there was no survival after LN storage for seeds and embryonic axes pretreated with PVS2 solution and sucrose. None of lateral buds and bulblets pretreated with sucrose and encapsulation-vitrification was survival after cryopreservation. The results of these studies showed that the best organs, pretreatment and method were seeds, sucrose-dehydration and encapsulation, respectively.