حفاظت انجمادی بذر گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) به روش شیشه‌ای شدن

مهدی کاکایی[1*]، محسن منصوری[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

چکیده

در این تحقیق، حفاظت انجمادی به روش شیشه‌ای شدن بذر کنجد با دو نوع محلول حفاظت‌کننده PVS2 و PVS3 در هفت سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) صورت پذیرفت. این آزمون به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با دو فاکتور محلول حفاظت‌کننده (دو سطح) و سطوح زمانی (هفت سطح) و سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای زمان تیمار و نوع محلول جهت سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P<0.01$) معنی‌دار مشاهده گردید. اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P<0.01$) و برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد ($P<0.05$) معنی‌دار بود. بطورکلی نتایج تجزیه واریانس، نوع محلول حفاظت‌کننده و سطوح زمانی تیمار در فرآیند شیشه‌ای شدن و حفاظت انجمادی گیاه کنجد در شاخص‌های مورد ارزیابی را مؤثر نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ***روغن، مواد ضدانجماد، شیشه‌ای شدن.***

مقدمه

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یکی از گیاهان دیرینه زراعی و با ارزش و مهم‌ترین گیاه روغنی دنیا بوده که در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران کشت‌وکار می‌شود (Sepaskhah & Andam, 2001؛ رضوانی‌مقدم و سیدی، ۱۳۹۵). دانه کنجد بیشترین میزان روغن را در بین گیاهان دانه روغنی دارا است. این روغن کمتر از ۱۵ درصد اسید چرب اشباع دارد که بیشترین مقدار آن پالمیتیک و استئاریک و بیش از ۸۵ درصد مجموع اسیدهای چرب آن غیراشباع است که شامل ۴۵ درصد اسیداولئیک و ۴۰ درصد اسیدلینولئیک می‌باشد (حسینی‌خواه و همکاران، ۱۳۹۳). استفاده از کنجد با واسطه چند سازوکار متفاوت به صورت قابل توجهی سبب افزایش سطح ویتامین E در بافت‌ها می‌شود (Parker *et al.*, 2000). عوامل بسیاری در فرسودگی بذر مشارکت دارند

۱- استادیار دانشگاه پیام‌نور، بخش مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک)
* (رایانامه نویسنده مسئول: M_Kakaei@pnu.ac.ir, Mehdikakaei37@gmail.com)
۲- مرکز تحقیقات طب سنتی ایرانی در رزم و بحران

که شامل ژنتیک، خسارت‌های مکانیکی، شرایط دما و رطوبت محیط، ذخیره بذر، رطوبت محتوی بذر، وجود موجودات ذره‌بینی و رسیدگی بذر است که در این میان رطوبت و گرما از مهمترین این عوامل هستند (Miller & Mc Donald, 1994).

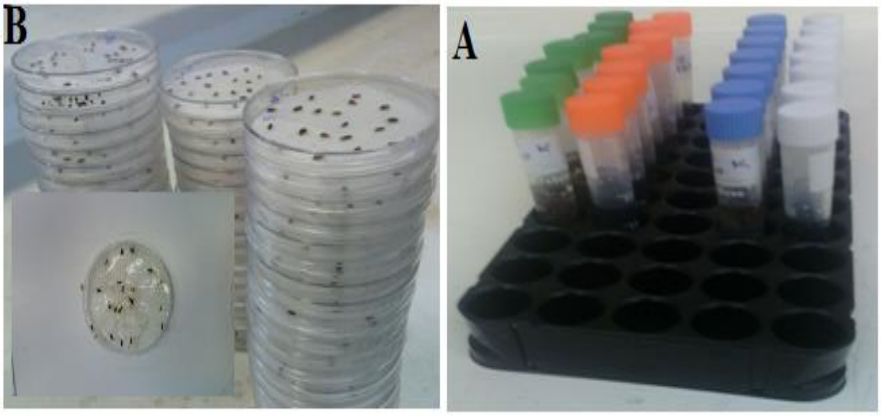
حفاظت و نگهداری بذر یکی از عوامل مهم جلوگیری از این عوامل است که در این میان تکنیک حفاظت انجمادی یک روش توانا جهت حفظ و نگهداری بذرهای این گیاه می‌باشد. شیشه‌ایی شدن یک روش ساده و سریع برای حفاظت انجمادی است که از تشکیل کریستال‌های یخ در حین انجماد جلوگیری می‌کند (منصوری و همکاران الف، ۱۳۹۲). در برخی از این مطالعات، پیش تیمارهایی برای محافظت از بافت‌ها در برابر انجماد معرفی شده است که در برخی موارد می‌توانند طولانی و پیچیده باشند. سوکروز که تحمل به آبگیری را افزایش داده و باعث حفظ توانایی زیستی بافت‌ها می‌شود، اغلب به عنوان پیش تیمار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dumet *et al*., 1993). شایان ذکر است تاکنون بالغ بر ۱۵۰ گونه مختلف گیاهی در بانک کرایو مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران حفظ و نگهداری می‌شوند (http://ibrc.ir). امروزه اهمیت تنوع‌زیستی در توسعه پایدار بر کسی پوشیده نیست. مرکز بین‌المللی منابع ژنتیک گیاهی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی را به عنوان ماده ژنتیکی گیاهان که ویژگی و توانایی سازگاری و بقای آن‌ها را تعیین کرده و قابل حفظ و استفاده شدن هستند، معرفی کرده است (FAO, FLD & IPGRI, 2004). مواد ژنتیکی گیاهی شامل توده‌های بومی، واریته‌های سنتی، قدیمی، فرم وحشی و علف‌هرز، گونه‌های وحشی وابسته، پایه‌های ژنتیکی، لاین‌های اینبرد و ارقام امروزی می‌باشند. این مواد شامل ژن‌های خاص و آلل‌های آن‌ها، پیوستگی و لینکاژ ژن‌ها، مجموعه‌ای از اپیستازی ترکیبات ژنی و ترکیب ژنوم‌های مختلف و غیره می‌باشند. امروزه از ژن‌های موجود در ژرم‌پلاسم‌های طبیعی برای انتقال ژن استفاده می‌شود در نتیجه حفظ ژرم‌پلاسم‌های گیاهی اهمیت خیلی بیشتری می‌یابد (Tay, 2005 & Tray, 2006). نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی، ذخیره سالم تنوع ژنتیکی گیاه و گونه‌های وابسته به آن بصورت بذر یا گیاه زنده برای استفاده در آینده می‌باشد. روش‌های مختلفی از جمله برای همین منظور وجود دارند که روش حفاظت انجمادی با استفاده از ازت مایع روش امیدوارکننده‌تر و مقرون به‌صرفه‌تری برای حفظ ژرم‌پلاسم‌ها در دوره‌های بلندمدت در این زمینه می‌باشد (باقری و ساکی، ۱۳۹۵). مسئله حفاظت از گیاهان و پوشش‌های گیاهی در بسیاری از کشورهای جهان به طور جدی دنبال می‌شود و فعالیت‌های وسیعی برای جلوگیری از انهدام آن‌ها صورت گرفته است. در کنار تمهیداتی که تاکنون در این زمینه انجام شده است روش حفاظت انجمادی می‌تواند به عنوان روش تکمیلی و مطمئنی در کنار حفاظت آن‌ها در بانک ژن و بانک بذر و یا حفاظت آن‌ها در باغ گیاه‌شناسی و حتی حفاظت آن‌ها در مناطق قرق‌شده طبیعی بکار رود. روش حفاظت انجمادی به منظور حفاظت گونه‌های جانوری در حال انقراض برای سال‌های طولانی روش متداولی بوده ولی تاکنون این روش برای سلول‌های گیاهی بصورت محدودی صورت گرفته است. منصوری و همکاران، (۱۳۹۲) در تحقیقی با عنوان مطالعه حفاظت انجمادی بذرهای گیاه کلزا به روش شیشه‌ای شدن ابراز داشتند که برای صفت طول ریشه‌چه دو فاکتور زمان تیمار و ژنوتیپ و اثر متقابل این دو فاکتور دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بودند. در مطالعه‌ی خولینا و وارونکوا (Kholina and Voronkova, ۲۰۱۲) از تکنیک حفاظت انجمادی در دانه برخی

از لگوم‌های دارویی استفاده کردند و ابراز نمودند که حفاظت انجمادی فاقد اثر منفی بر جوانه‌زنی و رشد گیاه‌چه می‌باشد. در پژوهش دیگری مارتینکوا و هونیک (Martinkova and Honek, ۲۰۰۷) با عنوان اثر حفاظت انجمادی روی جوانه‌زنی بذر قاصدک بیان کردند که حفاظت انجمادی روشی مناسب جهت حفظ و نگهداری دانه می‌باشد چرا که در اثر استفاده این تکنیک هیچ تغییری در درصد جوانه‌زنی ایجاد نشده و تنها یک تغییر کوچک و سیستماتیک در سرعت جوانه‌زنی رخ داده است. تکنیک حفاظت انجمادی یک روش سودمند و کم هزینه برای نگهداری بذرها و اندام‌های گیاهی می‌باشد که هدف این مطالعه تعیین محلول و زمان آبگیری برای حفاظت انجمادی بذرهای گیاه دارویی کنجد به روش شیشه‌ایی شدن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذر دانه روغنی گیاه کنجد جهت یافتن روش مناسب برای حفاظت انجمادی ژرم‌پلاسم این گیاه در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور اسدآباد صورت پذیرفت. شکل ۱ تیمار نمونه‌های بذر کنجد با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی (A) و نمونه‌های بذر کنجد کشت شده در درون پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی (B) را نشان می‌دهد. بذور کنجد با کمک هیپوکلریت سدیم ۳ درصد برای مدت ۲۰ دقیقه و الکل (متانول) ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه استریل شدند و تعداد ۲۰ بذر پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، به ویال‌های انجمادی ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و مورد تیمار با محلول‌های حفاظت‌کننده قرار گرفتند. محلول‌های استفاده شده دو محلول پرکاربرد در حفاظت انجمادی بافت گیاهی به اسامی محلول شیشه‌ای کردن گیاهی۲ (PVS2)) (Plant Vitrification Solution 2 و محلول شیشه‌ای کردن گیاهی ۳((PVS3) Plant Vitrification Solution 3) (Volk *et al*., 2006). این محلول‌ها با کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل گردیدند و در زیر هود لامینار با کمک محلول‌های مذکور، تیمار بذرها صورت پذیرفت. محلول PVS2 شامل ۳۰٪ گلیسرول، ۱۵٪ اتیلن‌گلایکول، ۱۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید با زمینه محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) و محلول PVS3 شامل ۴۰٪ گلیسرول و ۴۰٪ ساکارز (WV) بود. جهت تیمار کردن بذرها در دمای آزمایشگاه در هفت سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) آبگیری صورت گرفت. پس از اتمام زمان‌های یاد شده، محلول‌های قبلی از ویال‌های مربوط خارج گردید و محلول تازه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر در ویال قرار گرفت. سپس به مدت ۵۰ ساعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان مربوطه ویال‌ها در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۱۵ دقیقه ویال‌ها در دمای محیط به مدت ۰/۵ ساعت قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعدی محلول‌های حفاظت‌کننده از ویال‌ها خارج گردیده و جهت تمیز کردن محلول‌های حفاظت‌کننده از نمونه‌های بذری، نمونه‌ها با یک محلول غلیظ (ساکارز ۰/۵ مولار) شستشو شدند. بعد از این مرحله بذرها با آب مقطر استریل چند بار شستشو شدند و در نهایت در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری روی کاغذ صافی کشت و با آب مقطر تغذیه شدند (شکل ۱). جوانه‌زنی بذرها بعد از

۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه یادداشت‌برداری گردید و طول ریشه‌چه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (در هر پتری‌دیش ۲۰ عدد بذر قرار گرفت). عملیات آماری برای سه صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی با کمک نرم‌افزار SPSS صورت پذیرفت.



شکل ۱: تیمار نمونه‌های بذر کنجد با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی (A)، نمونه‌های بذر کنجد کشت شده در درون پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی (B).

نتیجه و بحث

حفاظت از تنوع‌زیستی گیاهی برای طبقه‌بندی گیاهان و مهندسی ژنتیک در برنامه‌های به‌نژادی ضروری به نظر می‌رسد (Panis & Lambardi, 2005) که این مطالعه پیرامون این ضرورت صورت پذیرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) برای زمان تیمار جهت سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P<0.01$) معنی‌دار بود و نوع محلول برای صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و صفت طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد نیز ($P<0.01$) معنی‌دار مشاهده گردید و اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P<0.01$) معنی‌دار و برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد ($P<0.01$) معنی‌دار بود این نتیجه مؤید این مطلب است که اثر متقابل مدت زمان تیمار در نوع محلول، در کلیه صفات مؤثر بوده است. در بخشی از مطالعه اثر حفاظت انجمادی روی جوانه‌زنی بذور *Vanda tricolor*، جایتسوپاکول و همکاران (Jitsopakul et al.,۲۰۱۲) بیان کردند که تفاوت معنی‌داری بین رشدونمو بذرها تحت حفاظت انجمادی و فاقد تیمار حفاظت انجمادی وجود ندارد. جدول ۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان تیمار روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذر کنجد را نشان می‌دهد. بر این اساس صفت طول ساقه‌چه در زمان‌های ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه بیشترین رشد را داشته است که در یک گروه آماری نیز قرار دارند. که این مطلب نشان‌دهنده این است که هر چقدر مدت زمان تیمار با مواد انجمادی افزایش یابد (البته تا حدی)، صفت طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه افزایش می‌یابد. بر این اساس صفت طول ریشه‌چه متناسب با صفت طول ساقه‌چه، دارای بیشترین میزان هستند

که در یک گروه بر اساس روش مقایسه میانگین دانکن قرار گرفتند. در خصوص صفت درصد جوانه‌زنی نیز نظیر دو صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در زمان ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه بیشترین مقدار به این زمان مربوط می‌شود.

پس نتیجه می‌شود که در خصوص صفت جوانه‌زنی نیز افزایش مدت زمان تیمار با مواد حفاظت انجمادی افزایش درصد جوانه‌زنی را بدنبال دارد. جدول ۳، مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی را نشان می‌دهد. بر اساس این جدول، کلیه صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی در شرایط شاهد از وضعیت مطلوب‌تری برخوردار است که این نشان‌دهنده اثرات محدود تخریبی مواد ضد انجماد نسبت به شرایط شاهد می‌باشد. جدول ۴ و ۵ به ترتیب مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر کنجد را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۴، در خصوص ماده PVS2 در زمان ۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۷/۹۵) و زمان ۸۰ دقیقه (۴/۷۹) دارای کمترین مقدار بود و در خصوص ماده PVS3 زمان ۶۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۷/۵۶) و زمان ۴۰ دقیقه دارای کمترین مقدار(۵/۹۲) بود. در خصوص شاهد بیشترین میزان مربوط به زمان ۲۰ دقیقه بود و کمترین آن مربوط به زمان ۸۰ دقیقه تظاهر نشان داد. بر اساس جدول ۵، در خصوص ماده PVS2 در زمان ۱۰۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۳/۵۷) و زمان ۸۰ دقیقه (۲/۴۱) دارای کمترین مقدار بود و در خصوص ماده PVS3 زمان ۱۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۳/۸) و زمان ۸۰ دقیقه دارای کمترین مقدار (۲/۹۵) بود. در خصوص شاهد نیز بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب زمان‌های ۱۴۰ و ۸۰ دقیقه بود. بر اساس جدول ۶ که مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت درصد جوانه‌زنی بذر کنجد را نشان می‌دهد بیشترین مقدار PVS2 مربوط به زمان ۱۲۰ دقیقه و کمترین آن مربوط به زمان ۲۰ دقیقه بود یعنی هر چقدر زمان تیمار با محلول PVS2 بیشتر شود (۱۲۰ دقیقه) درصد جوانه‌زنی بهبود می‌یابد و در خصوص محلول PVS3 نیز بیشترین مقدار مربوط به زمان ۱۲۰ دقیقه می‌باشد. در مورد شرایط کنترل بایستی ابراز نمود که زمان ۱۲۰ دقیقه مناسب‌ترین حالت بود.

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تیمار و نوع محلول محافظت‌کننده روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر گیاه کنجد

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه
زمان تیمار	۶	۲۰/۵۴**	۵۹/۹۵ **	۹/۲۶**
نوع محلول	۲	۲۵/۲۰ **	۹۷/۷۲ **	۱۲/۳۲ **
زمان تیمار × نوع محلول	۶	۳/۶۳ *	۳۴/۷۸ **	۱/۷۶**
اشتباه	۸۲۶	۱/۳۸	۲/۵۵	۰/۵۵
ضریب تغییرات (٪)		۶/۷۹	۲۳/۴۵	۲۲/۱۸

*، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیرمعنی‌دار

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان تیمار روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذر کنجد

زمان اعمال تیمار (دقیقه)	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر)	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)
۲۰	۰/۷۴ ± ۰/۰۴ d	۷/۵۵ ± ۰/۳۳ a	۳/۴۹ ± ۰/۱۳ ab
۴۰	۰/۸۶ ± ۰/۰۳ c	۶/۴۱ ± ۰/۲۹ d	۳/۳۲ ± ۰/۱۲ bc
۶۰	۰/۸۷ ± ۰/۰۳ bc	۶/۶۹ ± ۰/۲۹ cd	۳/۳۰ ± ۰/۱۳ c
۸۰	۰/۸۹ ± ۰/۰۲ bc	۵/۶۴ ± ۰/۲۲ e	۲/۸۳ ± ۰/۰۹ d
۱۰۰	۰/۹۳ ± ۰/۰۲ ab	۶/۹۱ ± ۰/۲۳ bc	۳/۵۲ ± ۰/۰۸ a
۱۲۰	۰/۹۵ ± ۰/۰۲ a	۷/۱۸ ± ۰/۲۵ ab	۳/۵۴ ± ۰/۰۹ a
۱۴۰	۰/۷۸ ± ۰/۰۳ d	۷/۳۳ ± ۰/۳۱ a	۳/۵۳ ± ۰/۱۳ a

جدول ۳: مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی گیاه کنجد

صفت	نوع محلول		
	PVS2	PVS3	شاهد
طول ریشه‌چه (سانتیمتر)	۶/۴۲ ± ۰/۱۶ b	۶/۶۳ ± ۰/۱۶ b	۷/۴۳ a
طول ساقه‌چه (سانتیمتر)	۳/۱۵ ± ۰/۰۵ b	۳/۴۶ ± ۰/۰۶ a	۳/۴۹ ± ۰/۰۲ a
درصد جوانه‌زنی	۰/۸۱ ± ۰/۰۱ c	۰/۸۶ ± ۰/۰۱ b	۰/۹۱ ± ۰/۰۵ a

جدول ۴: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه در بذرکنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)						
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰
ماده PVS2	۷/۹۵a	۷/۱۵b	۴/۸۷d	۴/۷۹d	۶/۴۵c	۶/۴۸c	۷/۲۳ab
ماده PVS3	۶/۳۱a	۵/۹۲e	۷/۵۶a	۶/۱۰d	۶/۵۲d	۷/۲۳ab	۶/۷۷b
شاهد	۸/۴۱a	۶/۱۵bc	۸/۱۰a	۶/۰۱c	۷/۷۶c	۷/۸۲b	۷/۹۸ab

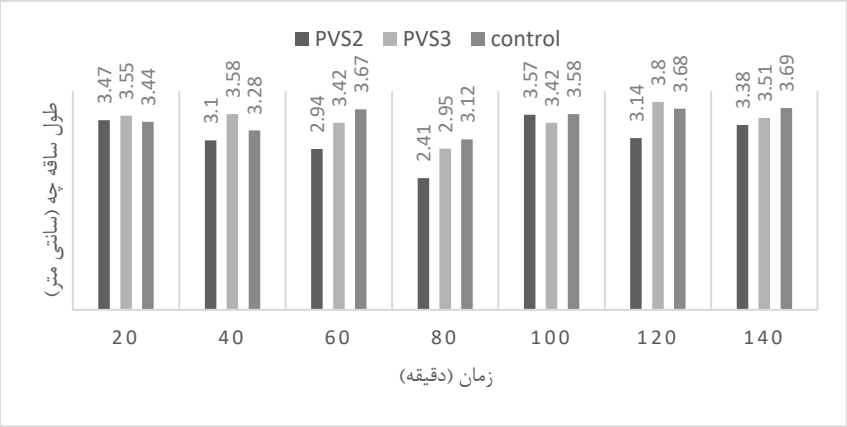
جدول ۵: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ساقه‌چه در بذر کنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)						
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰
ماده PVS2	۳/۴۷ab	۳/۱bc	۲/۹۴c	۲/۴۱d	۳/۵۷a	۳/۱۴bc	۳/۳۸b
ماده PVS3	۳/۵۵b	۳/۵۸b	۳/۴۲c	۲/۹۵d	۳/۴۲bc	۳/۸a	۳/۵۱b
شاهد	۳/۴۴bc	۳/۲۸c	۳/۶۷a	۳/۱۲d	۳/۵۸b	۳/۶۸a	۳/۶۹a

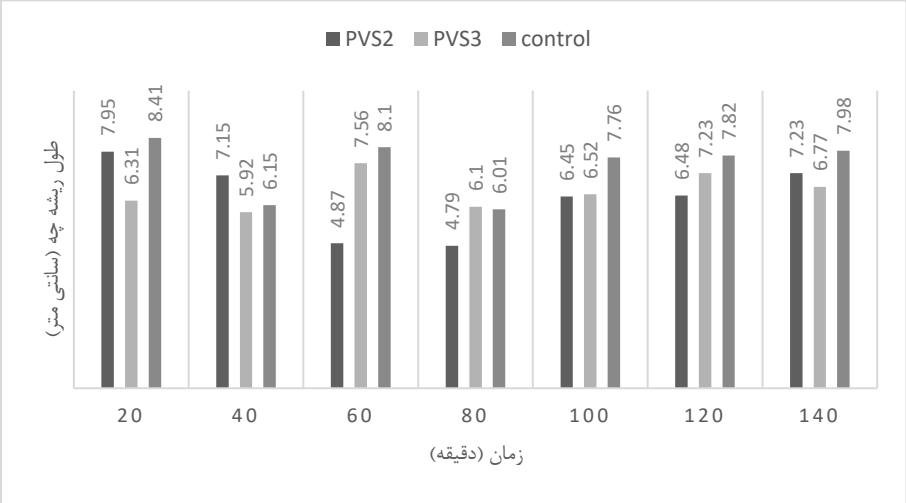
جدول ۶: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت درصد جوانه‌زنی بذر کنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)						
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰
ماده PVS2	۰/۶۳d	۰/۷۵b	۰/۷۶d	۰/۸۶d	۰/۹۵c	۰/۹۶c	۰/۷۳ab
ماده PVS3	۰/۷۳c	۰/۹۰e	۰/۹۳a	۰/۹۰d	۰/۹۰d	۰/۹۳ab	۰/۷۶b
شاهد	۰/۸۶a	۰/۹۳bc	۰/۹۳a	۰/۹۱c	۰/۹۵c	۰/۹۶b	۰/۸۶ab

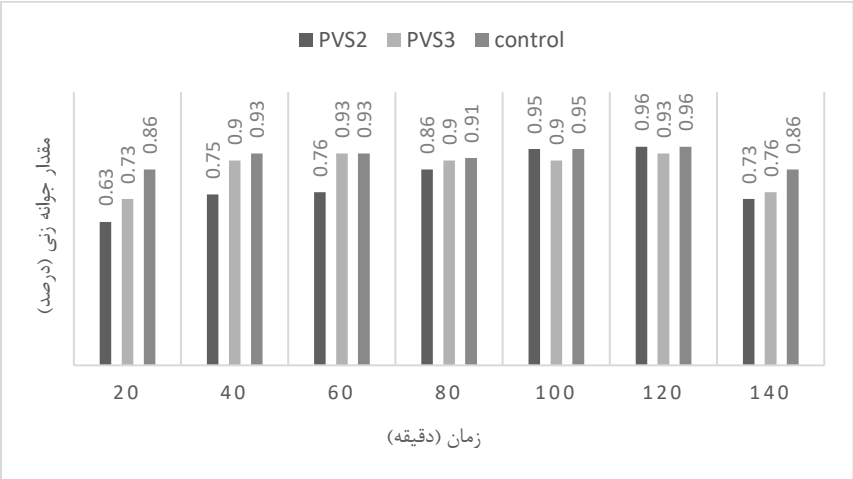
به ترتیب شکل ۲ و ۳ نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ساقه‌چه و ریشه‌چه را نشان می‌دهد. همانطوری از شکل ۲ مشخص است تأثیر محلول PVS2 در زمان ۱۰۰ دقیقه بر صفت طول ساقه‌چه زیاد بوده است و در زمان ۸۰ دقیقه کمترین اثر را روی طول ساقه‌چه داشته است. کمترین اثر را محلول PVS3 در زمان ۸۰ دقیقه روی صفت طول ساقه‌چه داشته است و این محلول در زمان ۱۲۰ دقیقه بیشترین اثر را روی صفت طول ساقه‌چه ایجاد کرده است. بر اساس شکل ۳ تیمار شاهد نسبت به سایر مواد پیش تیمار نظیر PVS2 و PVS3 از طول ریشه‌چه بیشتری برخوردار بوده است. لذا نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که احتمالاً و شاید قطعاً مواد پیش تیمار نمی‌توانند بطور کامل و صددرصد از بذرها محافظت نمایند. بر اساس نمودار مذکور بیشترین و کمترین مقدار عددی به ترتیب مربوط به زمان‌های ۲۰ و ۴۰ دقیقه در تیمار شاهد بود. محلول PVS2 در زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۴۰ دقیقه از وضعیت رشد ریشه‌چه مطلوب‌تری نسبت به محلول PVS3 برخوردار بوده و در زمان‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۲۰ دقیقه دارای وضعیت مطلوب‌تری نسبت به محلول PVS2 از نظر رشد ریشه‌چه بود و در زمان ۱۰۰ دقیقه تقریباً هر دو محلول اثر یکسانی روی رشد ریشه‌چه داشتند. شکل ۴ نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی را نشان می‌دهد. کمترین و بیشترین مقدار PVS2 به ترتیب مربوط به زمان‌های ۲۰ و (تواماً ۱۰۰ و ۱۲۰) دقیقه بود. درمورد PVS3 کمترین میزان مربوط به زمان ۱۴۰ دقیقه و بیشترین آن مربوط به زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بود. در خصوص شاهد بیشترین و کمترین میزان به ترتیب در زمان‌های ۴۰ و ۱۴۰ دقیقه مشاهده شد. در زمان ۱۲۰ دقیقه بر اساس تصویر شماره ۴، توان جوانه‌زنی هر دو محلول بالا می‌باشد با این تفاوت که محلول PVS2 اندکی در این زمان توان جوانه‌زنی بالاتری نسبت به PVS3 دارد. در زمان‌های پایین‌تر مثلاً ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ دقیقه PVS3 در توان جوانه‌زنی، موفق‌تر بوده در حالی که در زمان‌های بالاتر محلول PVS2 توان جوانه‌زنی بالاتری داشته است که این نتیجه با نتایج منصوری و همکاران ۱۳۹۲ کاملاً منطبق می‌باشد و آنها این علت تفاوت را وجود ماده دی‌متیل سولفوکساید دانستند. چرا که این ماده قابلیت نفوذ در سلول‌ها را دارد و با افزایش زمان توانسته است بیشترین نفوذ را داشته باشد. محققین بسیاری از حفاظت انجمادی در حوزه گیاهی در تحقیقات خود استفاده نموده‌اند جایتسوپاکول و همکاران (Jitsopakul *et al.*, 2012) در گونه *Vanda tricolor*: سوربسیسکای و همکاران (Surebciski *et al.*, 2012) بر روی گونه *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae): سوربسیسکای و همکاران (Surebciski *et al.*, 2012) در گیاه *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae): تیکان و همکاران (Tecan *et al.*, 2017) در بذر و محور جنین گیاه *Phaseolus vulgaris*: کاویانی (Kaviani, 2010) در Lilac (*Melia azedarach* L.), و tea (*Camellia sinensis* L.) و همچنین مهاجر و همکاران (Mohajer *et al.*, 2016) در بذر *Onobrychis viciifolia*).



شکل ۲: نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ساقه‌چه



شکل ۳: نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ریشه‌چه



شکل ۴: نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی

نتیجه‌گیری کلی

نگهداری ژرم‌پلاسم به روش انجماد در ازت مایع از جمله روش‌های نگهداری گیاهان در شرایط برون محیطی (ex situ) می‌باشد که در حفظ طولانی مدت ذخایر توارثی، حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های نگهداری در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلونی تکثیر می‌شوند و یا به عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های ویژه محسوب می‌شود، نقش دارند. در این تکنولوژی با استفاده از تکنیک‌های مختلف، ماده ژرم‌پلاسم تا حد ممکن آبگیری شده و در دمای بسیار پایین نیتروژن مایع (۱۹۶ºC-) به مدت طولانی (ده‌ها سال) ذخیره می‌گردد. با استفاده از تکنیک نگهداری در ازت مایع می‌توان روش نگهداری بذر و سایر بافت‌های گیاهی را فراهم ساخت که در آن مواد گیاهی را به طور نامحدودی و بدون از دست دادن قوه‌نامیه ذخیره‌سازی می‌کنند. منابع ژنتیکی بومی هر کشور، حاصل میلیون‌ها سال تکامل و سازگاری با شرایط اقلیمی هر کشور می‌باشند. این منابع ذخایر ژنتیکی ارزشمند و مورد نیاز برای اصلاح و استفاده از ژن‌های مفید در پژوهش‌های جاری و آینده کشور هستند. (باقری و ساکی، ۱۳۹۵). که در این مطالعه نیز اثر دو ماده ضدانجماد PVS2 و PVS3 بررسی شد و ارتباط صفات اندازه‌گیری شده با زمان تیمار در مواد ضدانجمادی مشخص گردید. در مطالعات آتی استفاده از سایر توده‌ها و ژنوتیپ‌های کنجد جهت مطالعات حفاظت انجمادی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه دانشگاه پیام‌نور اسدآباد و همه‌ی عزیزانی که در مسیر انجام این گزارش علمی، اینجانبان را یاری کردند بویژه دکتر محسن سعیدی دانشیار دانشگاه رازی قدردانی می‌گردد.

منابع

باقری، ه. و ساکی، س. (۱۳۹۵) ضرورت و راهکارهای حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی گل و گیاهان زینتی کشور. مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی. ۱ (۲): ۳۳-۲۴.

حسینی‌خواه، ف.، پارسا، س.، توکل‌افشاری، ر.، جامی‌الاحمدی، م. و اسماعیلی، ع. (۱۳۹۳). تأثیر هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و اسید جیبرلیک بر فرآیندهای پیشگیری و بهبود زوال دو رقم کنجد. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴ (۴۵): ۶۲۴-۶۱۳.

رضوانی‌مقدم، پ. و سیدی، س.م. (۱۳۹۵). بررسی صفات جوانه‌زنی کنجد در ارتباط با اسیدهای چرب. مجله نهال و بذر ایران. ۵ (۲): ۱۱۹-۱۳۱.

منصوری، م.، مرزبانی، خ. و مردانپور، ف. (الف) (۱۳۹۲) حفاظت انجمادی بذر کاسنی بوسیله شیشه‌ای شدن. پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اصفهان. صفحه ۴-۱.

منصوری، م.، کاکایی، م.، عبدالهی، م.ر. و شریفی، ش. (ب) (۱۳۹۲) مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا به روش شیشه‌ای شدن. مجله فن‌آوری زیستی در کشاورزی. ۴ (۲): ۳۹-۳۳.

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N., Duval, Y. and Dereuddre, J. (1993) Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to dessication and cryopreservation of oil palm somatic embryos, Cryo-letters. 14: 243-250.

FAO, FLD and IPGRI. (2004) Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Forest and Landscape Denmark (FLD) and International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

Jitsopakul, N., Thammasiri, K., Yukawa, T. and Ishikawa, K. (2012) Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of Vanda tricolor. Science Asia. 38: 244-249.

http://ibrc.ir/index.aspx.

Kholina, A.B. and Voronkova, N.M. (2012) Seed Cryopreservation of Some Medicinal Legumes. Journal of Botany. 1-7 pp.

Kaviani, B. (2010) Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [Lilium ledebourii (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (Melia azedarach L.), and tea (Camellia sinensis L.). Plant omics journal. 3 (6): 177-182.

Mohajer, S., Taha, R.M. and Mohajer, M. (2016) Effects of cryopreservation and relative humidity on viability and nutritional composition of sainfoin (Onobrychis viciifolia scop.). Journal of Animal & Plant Sciences. 26 (1): 116-122.

Martinkova, Z. and Honek, A. (2007) The effect of cryopreservation on germination of dandelion seeds. Plant Protection Science. 43: 63-67.

Miller, B. and McDonald, D. T. (1994) Viability, vigor and field performance. Seed Science and Technology. 22: 421-425.

Panis, B. and Lambardi, M. (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (Crops and forest trees). The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy. 5-7 March.

Parker, R.S., Sontag, T.J. and Swanson, J.E. (2000) Cytochrome P4503- A-dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 3 (2): 531-534.

Sepaskhah, A.R. and Andam, M. (2001) Crop coefficient of sesame in a semi-arid region of I.R. Iran. Agricultural water management. 49: 51-63.

Surenciski, M.R., Flachsland, E.A., Terada, G., Mroginski, L.A. and Rey, H.Y. (2012) Cryopreservation of Cyrtopodium hatschbachii Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. Biocell. 36 (1): 31-36.

Tay, D. (2005) Conserving herbaceous ornamental plant germplasm. In: M. McDonald and F.Y. Kwong (Eds). Flower seeds: Biology and Technology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Tray, D. (2006) Seeds: Trade, Production and Technology. The US national plant germplasm system: the ornamental plant germplasm center.

Tacan, M., Tapia, C. and Perez, C. (2017) Effects of accelerated ageing and cryopreservation on seeds and embryonic axes of Phaseolus vulgaris L and Arachis hypogaea L. Germination and seedlings vigor. PeerJ Preprints | https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3203v1 | CC BY 4.0 Open Access | rec: 29 Aug 2017.

Volk, G.M. and Walters, C. (2006) Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. Cryobiology. 52: 48-61.

Cryopreservation plant seed of sesame (*Sesamum indicum* L.) by Vitrification

M. Kakaei* [1], M. Mansouri[2]

Received: 2017.8.17
accepted: 2018.11.21

Abstract

In this research, cryopreservation was performed by vitrification method with two types of solution protecting PVS2 and PVS3 in 7 time levels (20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 minutes). This factorial experiment was conducted in completely randomized design (CRD) with two factors of protective solution (two level) and time levels (seven level) and three replications. The results of analysis of variance for treatment time and type of solution, in three traits, germination percentage, root and shoot length showed significant differences at the level of 1% ($P<0.01$). Interaction effect of time treatment in solution type for the length of root and shoot length were significant at the level of 1% ($P<0.01$) and for germination percentage was insignificant at the level of 5% ($P<0.05$). Overall, analysis of variance showed that the protective solution type and levels of treatment time in the process of vitrification and the cryopreservation sesame plant is effective in assessment indicators.

Key words: Oil, Cryoprotectants, Vitrification.

1- Assistant Professor, Department of Agriculture (Plant Breeding and Genetics), Faculty of Sciences, Payame Noor University, PO BOX 19395-4697, Tehran-Iran

* (Corresponding Author: Mehdikakaei37@gmail.com & M_Kakaei@pnu.ac.ir)

2- Persian medicine in combat and crisis research center