بررسی امکان نگهداری بذر گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) در شرایط فراسرد

لیلا غفارزاده نمازی[1*]

۱–استادیار، گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران.

*صندوق پستی: ۵۶۱۹۶۸۳۶۱۷، اردبیل، ایران
namazi@uma.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۱

چکیده

گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) عضوی از خانواده Boraginaceae است که دارای خواص دارویی بسیار با ارزش بوده که در طب سنتی ایرانی بسیار مورد توجه می‌باشد. از آنجایی‌که، گونه‌های مختلف گیاه گل گاوزبان بر اثر برداشت بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی توسط انسان، تنش‌های زنده و غیرزنده تهدید شده و کشت کار پی‌درپی یک گونه باعث کاهش تنوع ژنتیکی آنها می‌شود، حفظ ذخایر ژنتیک این گونه‌ها از اهمیت بالایی بر خوردار است. با استفاده از تکنیک نگهداری بذر در دمای فراسرد که یکی از روش‌های نگهداری ژرم پلاسم در شرایط خارج از رویشگاه است، می‌توان بذر را طولانی مدت ذخیره‌سازی کرد. برای نگهداری *E. amoenum* در فراسرد از پیش‌تیمارهای گلیسرول، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (PVS2) و کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به نیتروژن مایع استفاده شد. بذرهای تیمار شده به‌مدت یک هفته در دمای ۱۹۶– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مقاله شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد (درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی) *E. amoenum* پس از یک هفته نگهداری در فراسرد ارزیابی شد. بین پیش‌تیمارهای مختلف، از لحاظ شاخص جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

بهترین تیمار، تیمار کاهش رطوبت بود. نتایج نشان داد که نگهداری بلندمدت بذر این گونه در دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد امکان‌پذیر است.

کلید واژگان: گل گاوزبان ایرانی، فراسرد، ژرم پلاسم، گلیسرول، PVS2

۱-مقدمه

ایران با داشتن حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی گلدار کـه از ایـن تعـداد نزدیـک بـه ۲۰۰۰ گونـه آن بـومی مـی‌باشـند، از کشورهای غنی از نظـر تعـداد و تنـوع گونـه‌های گیـاهی است. حفظ ذخائر توارثی گیاهی و جلوگیری از فرسـایش و انقراض این گونه‌ها به‌ویژه گونـه‌های بـومی و در حـال خطر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد [٦].

گل گاوزبان ایرانی با نام علمـی *E. amoenum* عضـوی از خانواده Boraginaceae می‌باشد. این گیاه دو یا چند سـاله بوده و ارتفاع آن به‌صورت تقریبی به ۸۰–۲۰ سانتی‌متر نیز می‌رسد [۱۲].

این گیاه از کرک‌های نسبتا نرمی پوشیده شده است. سـاقه هـای آن تـا حـدودی سـاده و بـه سـمت بـالا مـی‌باشـد. برگ‌های قاعده‌ای شکل آن به طول حدود ۲۰ سانتی‌متر و عرض ۵ سانتی‌متر بـه‌صـورت سـر نیـزه‌ای و در قسـمت دمبرگ باریـک شـده و نـوک تیـز هسـتند [۲۰]. بـه‌دلیـل خواص دارویـی مهـم ایـن گیـاه از جملـه خـواص آنتـی اکسیدانی، ضدسرطان، ضـد میکربـی و همچنـین خـواص ضد قارچی این گیاه، مطالعات گسترده‌ای جهـت افـزایش کمی، کیفی این گیاه انجام شده است [۱].

در طب سنتی ایرانی از گل‌های این گیاه برای رفـع علائـم سـرماخوردگی، کـاهش فشـارخون، ضـد افسـردگی، ضدالتهاب، آرام‌بخش و ادرارآور استفاده می‌شود [۱۰].

در شرایط متعارف، حفظ و نگهداری گونه‌ها به شـیوه‌های مختلفی انجـام مـی‌شـود کـه از مهمتـرین آنهـا نگهـداری بذرهای گونه‌ها در بانـک ژن‌هـا و در شـرایط نزدیـک بـه صفر و یا حدود ۲۰- درجه سـانتی‌گراد مـی‌باشـد. مـدت زمان نگهداری در این شرایط کوتـاه بـوده و پـس از یـک دوره ۲۰ - ۱۰ ساله نیاز به بازکشت بذرهای ذخیـره شـده می‌باشد که اضافه بر مشـکلات فنـی، هزینـه‌های تجدیـد کشت بـذور، امـری مشـکل و پرهزینـه بـوده و فرسـایش ژنتیکی را در پی دارد. از جمله روش‌هایی که برای حفـظ ژرم‌پلاسم گیاهـان وجـود دارد مـی‌تـوان بـه حفاظـت در رویشگاه و یا حفاظت در خارج از رویشـگاه اشـاره کـرد. در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیک حفاظت از گونه‌های منابع طبیعی مانند ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی ملـی و منطقـه ای، بانک ژن بذرهای گونه‌های جنگلی و مرتعی و عرصه هـای حفاظـت شـده جنگلـی، اسـتفاده از بیوتکنولـوژی راهکاری منحصر به فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهی است که به سرعت در حال توسعه می‌باشد. یکـی از ایـن فناوری‌ها، نگهداری بذر و اندام‌هـای رویشـی در فراسـرد است. تکنولوژی استفاده از دمای فراسرد (نیتروژن مایع بـا دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) اولین بـار بـرای نگهـداری میکروارگانیسم‌ها با موفقیت جنبه کاربردی پیدا کـرد و بـه دنبال آن استفاده از این تکنولـوژی در انجمـاد سـلول‌های جنسی و بعضی از اندام‌های موجودات عالی مورد استفاده قرار گرفت. نگه‌داری از منابع ژنتیکی گیاهی بـرای حفـظ امنیت غـذایی و تنـوع زیسـتی ضـروری مـی‌باشـد. تنـوع ژنتیکی امکان انتخاب و اصلاح گیاهـان زراعـی جدیـد و پرمحصول، مقاوم به تنش‌های زیستی و محیطی را فـراهم می‌کند [۱۵]. از آنجایی‌که، گل گاوزبـان بـر اثـر برداشـت بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی توسط انسان، تنش‌های زنـده و غیرزنده تهدید شده و کشت کـار پـی‌درپـی یـک گونـه باعث کاهش تنوع ژنتیکی آنها می‌شود حفظ ذخایر ژنتیک این گونه‌ها از اهمیـت بـالایی برخـوردار اسـت. از جملـه

روش‌هایی که برای حفظ ژرم‌پلاسم گیاهان وجود دارد می‌توان به حفاظت در رویشگاه و یا حفاظت در خارج از رویشگاه اشاره کرد [٤]. حفاظت گیاه در رویشگاه می تواند بسیار پرهزینه باشد [٩].

فناوری فراسرد روش ذخیره‌سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی است [١٤]. با این فناوری می‌توان بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در دمای ١٩٦- درجه سانتی‌گراد که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام متوقف شده است، برای مدت زمان طولانی حفظ کرد [١١]. از مزایای این تکنیک می‌توان به حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های حفاظت در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به‌صورت کلون تکثیر می شوند و نیز به‌عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم اشاره کرد [١٦].

حفاظت فراسرد بافت‌های زیستی تنها زمانی می‌تواند با موفقیت انجام شود که از تشکیل کریستال های یخ درون سلولی در حین غوطه‌وری در نیتروژن مایع اجتناب شود. زیرا این کریستال‌ها می‌توانند آسیب‌های جدی به غشاء سلولی وارد کنند و قابلیت غشاء پلاسمایی را مختل کنند [٢٢].

مواد محافظ انجماد برای حفظ بافت‌ها یا سلول‌ها استفاده می‌شوند. این مواد سرعت تشکیل کریستال‌های یخ را در سیتوپلاسم سلول‌ها در دمای معین کاهش می‌دهند، اما شرط این است که این مواد محافظ انجمادی در سیتوپلاسم سلول‌ها نفوذ کرده و سمیت کمی داشته باشند. لازم به ذکر است که انجماد داخل سلولی مضر و انجماد خارج سلولی بی‌ضرر است. ویتریفیکاسیون یا شیشه‌ای شدن یک روش مهم در جلوگیری از تشکیل یخ در فضای داخل سلولی است. فرآیند اسمز نقش مهمی در عملکرد مواد محافظ انجماد دارد [١٣].

برای بررسی کارآمدی فناوری فراسرد به‌عنوان یک روش جایگزین ذخیره بلند مدت بذرهای ارتودکس در مراکز ژرم‌پلاسمی، شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر گونه *E. amoenum* در پاسخ به دمای فراسرد ارزیابی شد.

در این مقاله بذر گیاه گل گاوزبان ایرانی، بااستفاده از نیتروژن مایع در دمای ١٩٦- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نگهداری بذر از پیش‌تیمارهای مختلف گلیسرول، ویتریفیکاسیون، کاهش رطوبت بذر و شاهد استفاده شد و تاثیر پیش‌تیمارها بر درصد و سرعت جوانه زنی به دقت بررسی شد.

٢-مواد و روش‌ها

ابتدا بذرهای گواهی شده از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. پیش از قرارگیری نمونه بذرها در نیتروژن مایع (١٩٦- درجه سانتی‌گراد) مراحل زیر انجام شد:

٢-١ پیش‌تیمار گلیسرول (Glycerol) ٣٠ درصد

بذرها به کرایو ویال‌های حاوی گلیسرول ٣٠ درصد منتقل شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، کرایو ویال‌ها وارد نیتروژن مایع شد. محلول گلیسرول پس از اتوکلاو استفاده شد.

٢-٢پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification)

از دو محلول محلول ویتریفیکاسیون گیاهی[1] PVS2 و محلول بارگیری یا لود کننده[2] به‌عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 حاوی ١٥ درصد وزنی-حجمی اتیلن‌گلیکول، ١٥ درصد وزنی-حجمی دی‌میتل‌سولفوکساید، ٣٠ درصد وزنی-حجمی گلیسرول در محیط کشت مایع MS ساکارز ٠/٤ مولار (pH=٥/٨) است.

لازم به ذکر است که pH محلول PVS2 پیش از اضافه کردن دی‌متیل سولفوکسید تنظیم شده و محلول مذکور در

[1] Plant Vitrification Solution 2
[2] Loading

اتوکلاو استریل شد. سپس، دی‌میتل‌سولفوکساید در زیر هودلامینار به محلول اضافه شد [۱۹].

برای تهیه محلول بارگیری از گلیسرول ۲ مولار و ساکارز ٠/٤ مولار در محیط‌کشت مایع MS استفاده شد. مواد ذکر شده بر اساس وزن مورد نیاز مخلوط شده و پس از اتوکلاو استفاده شد [۱۸].

ابتدا بذور به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بارگیری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، محلول بارگیری تخلیه و محلول PVS2 (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) جایگزین شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، کرایو ویال ها وارد نیتروژن مایع شد.

۲-۳ پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation)

در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی حساس (٠/٠٠٠١ گرمی) تعیین شد. ابتدا محتوای رطوبتی بذرها بر اساس اختلاف وزن تر و وزن خشک نمونه‌ها محاسبه شد. خشک کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۷ ساعت انجام شد [٥]. برای کاهش محتوای رطوبتی به حداقل ممکن، بذرها بر روی کاغذ صافی در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک منتقل شد و به‌مدت ۱۹ ساعت در دستگاه آون و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. درصد محتوای رطوبت قبل از آبگیری ٦/٨ و پس از آبگیری ٥ به‌دست آمد. برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذرهای آبگیری شده، درب ظروف محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایو ویال قرار داده شده و مستقیماً وارد نیتروژن مایع شد.

۲-٤ پیش‌تیمار (شاهد یا Control)

بذرها به‌عنوان شاهد به کرایو ویال‌ها منتقل شده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شد. کلیه تیمارها بجز شاهد به مدت یک هفته در نیتروژن مایع با دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای گرم کردن سریع، نمونه‌ها بلافاصله از تانک نیتروژن خارج و در بن ماری ٤٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ ثانیه قرار داده شد [۳]. سپس، بذور به محیط کشت مایع MS ساکارز ۱/۲ مولار منتقل شدند و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. عمل ضدعفونی بذرها پس از خروج از شرایط تیمار انجام شد تا از مرطوب شدن بذرها قبل از اعمال تیمار و متعاقبا آسیب دیدن در هنگام نگه‌داری دمای فراسرد، جلوگیری شود. بذور، پس از قرارگیری زیر آب جاری به مدت ۱۲۰ دقیقه، با استفاده از هیپوکلریت ۱/٥درصد (V/V) به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل شده، به درون پتری‌دیش سترون شده با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی یک عدد کاغذ صافی واتمن منتقل شد. به هر ظرف پتری ۳ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شده و درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود و در نهایت به اتاقک کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. شمارش بذرها به‌صورت روزانه و در ساعت معین انجام شد. پس از طی زمان جوانه‌زنی محاسبه شاخص های درصد، سرعت به روش زیر انجام شد [۱۷].

درصد جوانه‌زنی (درصد بذرهای جوانه زده) (Germination Percent=Ni/N) که در آن Ni تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز i ام و N تعداد کل بذرهای آزمون شده است.

سرعت جوانه‌زنی (Germination rate=ΣNi/Ti) که در آن Ni تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و Ti شمار روز پس از کاشت است.

تعداد بذر در هر ظرف پتری ۳۰ عدد و ۳ تکرار در نظر گرفته شد. با استفاده از طرح آماری پایه کاملاً تصادفی تیمارها مقایسه شد. تیمارهای قبل از فراسرد شامل گلیسرول، ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت

(Desiccation) و شاهد می‌باشد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده شد و میانگین داده ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شد.

۳-نتایج

در خصوص درصد و سرعت جوانه‌زنی، بین تیمار شاهد و تیمارهای مختلف گلیسرول، ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت (Desiccation) تفاوت در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن نشان داد که درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در تیمار ویتریفیکاسیون به‌ترتیب به میزان ۱۷/۹۵ و ۰/۰۸۰۵ از کمترین مقدار برخوردار بود (جدول ۲).

همچنین، درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در تیمار کاهش رطوبت تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. به‌طوری که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۵۰/۷) و بیشترین سرعت جوانه‌زنی به‌دست آمده (۰/٤٥٣) مربوط به پیش‌تیمار کاهش رطوبت می‌باشد. تیمار کاهش رطوبت در مقایسه با تیمار ویتریفیکاسیون و تیمار گلیسرول ۳۰ درصد بهترین تیمار بود. این در حالی است که استفاده از گلیسرول به‌عنوان پیش‌تیمار درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب از ۵۱/۹۵ درصد به٦٢/ ٣٤ و از ۰/۵۱۰ درصد به ۰/۲٦۳درصد کاهش می دهد.

جدول۱ نتایج تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار مورد استفاده برای حفاظت انجمادی بذر *E. amoenum* بر روی درصد و سرعت جوانه‌زنی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
تیمار	۳	۷٦۸/٤۳۷*	۰/ ۱۱٤*
خطا	۸	۳۸/۵٤۸	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات ٪		۱۵/۹۹ درصد	۹/۵۷ درصد
*تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال۵ درصد			

جدول۲ مقایسه میانگین اثر تیمارها در نگه‌داری بذر گونه *E. amoenum* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از نیتروژن مایع به روش آزمون دانکن

تیمار	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
ویتریفیکاسیون	۱۷/۹۵c	۰/۰۸۰۵c
گلیسرول	۳٤/٦۲b	۰/۲٦۳b
کاهش رطوبت	۵۰/۷۷a	۰/٤۵۳a
شاهد	۵۱/۹۵a	۰/۵۱۰a

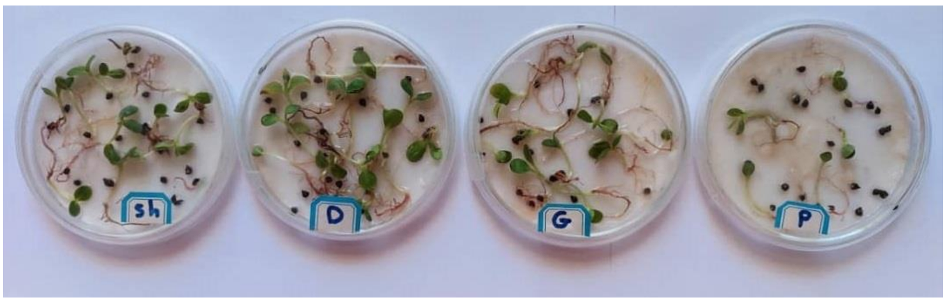
٤-بحث

زنده‌مانی و رشد بذوری که از نیتروژن مایع یا فراسرد (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) خارج می‌شوند، تحت تأثیر درصد رطوبت بذر است. بنابراین، خشک کردن بیش از حد بذرها سبب کاهش جوانه زنی می‌شود [۲۱]. در همین رابطه، بهینه کردن رطوبت بذر قبل از ورود به شرایط فراسرد اهمیت زیادی دارد. از بین تمام روش‌های ویتریفیکاسیون و انجماد قطره‌ای و غیره، ساده‌ترین روش آبگیری است. زیرا تنها شامل آبگیری ریزنمونه‌ها و سپس غوطه‌وری مستقیم در ازت مایع است. از جنین‌های جدا شده از دانه‌ها عمدتاً استفاده می‌شود. کاهش رطوبت معمولاً با جریان هوای آرام هود لامینار ایرفلو یا روی سیلیکاژل حاصل می‌شود [۱۸].

کاهش یا تنظیم محتوای آب بذر یا نمونهٔ گیاهی قبل از ورود به شرایط فراسرد نقش مهمی در زنده‌مانی نمونهٔ گیاهی دارد. در گونهٔ *Bletilla striata* پس از فراسرد درصدزنده‌مانی بذور رسیده و خشک به‌دلیل درصد آب کمتر در مقایسه با بذور آب جذب کرده، بیشتر است [۷]. در این آزمایش با مقایسه بین تیمارها با تیمار شاهد درصد سرعت جوانه‌زنی در تیمار کاهش رطوبت از بیشترین مقدار برخوردار بود (شکل ۱).

استفاده از تیمار کاهش رطوبت با هدف تقلیل رطوبت بذر قبل از ورود به دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد تأثیر مثبتی در درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی داشت. در این بررسی مشاهده شد که این تیمار باعث حفاظت از بذر در فراسرد می‌شود و کاربرد این روش با موفقیت همراه می باشد. بنابراین، از این روش می‌توان در مقیاس کاربردی استفاده کرد. همچنین، به‌کارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذر موفقیت‌آمیز گزارش کردند [۲].

نتایج نگهداری بذور در فراسرد (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد)، نشان داد که پیش تیمارهای فراسردی شامل کاهش رطوبت، محلولPVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد تأثیر متفاوتی در ذخیره‌سازی بذور در فراسرد (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) دارند. تیمارهای محلول PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد به‌ترتیب کمترین تأثیر را در درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی دارند. در تیمار محلول PVS2، مواد مانند DMSO، گلیسرول، ساکارز و اتیلن گلیکول احتمالاً سبب بروز آثار سوء در بذر شده است. در برخی موارد به دلیل سمّیت بعضی از مواد موجود در محلول PVS2، این پیش‌تیمار تأثیر منفی در زنده‌مانی نمونه‌های فراسردی دارد [۸]. یافته‌های این پژوهش‌گر با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. در تیمارگلیسرول ۳۰ درصد احتمالاً به‌دلیل نفوذ گلیسرول به داخل بذر و ایجاد اختلال در تبادل اکسیژن، گازها و مولکول های آب بین فضای درونی و بیرونی بذر قرار گرفته و موجب آثار سوء در جوانه‌زنی بذر گل گاوزبان ایرانی شده است. این در حالی است که گلیسرول برای سلول‌های گیاهی سمی است و چنانچه مدت طولانی در معرض آن قرار گیرد، مشکل آفرین می‌شود [۲۳].



شکل۱ مقایسه جوانه‌زنی بذور شاهد و حفاظت انجمادی گیاه گل گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*). (sh)شاهد؛ (D)کاهش رطوبت؛ (G)گلیسرول؛ (P) ویتریفیکاسیون.

۵-نتیجه‌گیری

برای نگهداری بذر گل گاوزبان در شرایط فراسرد، تیمار کاهش رطوبت مناسب‌ترین تیمار است و از کاربرد تیمارهایی مانند گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون باید خودداری کرد .استفاده از فناوری فراسرد امکان نگهداری طولانی مدت بذر تعداد زیادی ازگونه‌های گیاهی در معرض خطر را فراهم کرده و حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های ارزشمند را موجب می‌شود. بنابراین، با استفاده از این فناوری امکان احیاء و حفاظت گونه‌های در معرض خطر در اکوسیستم‌های منابع طبیعی فراهم می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مساعدت و همکاری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری برای اجرای این پژوهش قدردانی می‌شود.

٦-منابع

[1] Asree, H. J., Amirah Imran, H., Gatea, A. A., & Khirallah, A. A. (2019). In Vitro Induced Callus of *Thevetia Neriifolia* Juss. *Plant Archives*, 19(2), 642-645.

[2] Beardmore, T. and Whittle, C. A. (2005). Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree Phisiology*, 25, 965-972.

[3] Engelmann, F. (1990). Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation. Case history: Oil Palm somatic embryos. *International Journal of Refrigeration*, 13, 26-30.

[4] Hawksworth, D. L. and Bull, A. T. (2007). *Plant Conservation and Biodiversity*. Springer, 420 p.

[5] ISTA [International Seed Testing Association]. (1996). International Rules for Seed Testing, 1996. Seed Science and Technology, 21(Suppl.), 1B288.

[6] Jalili, A., and Jamzad, Z. (1999). Red data book of Iran, a preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. 784 p.

[7] Jitsopakul, N., Tammasiri, K. & Ishikawa, K. (2008). Cryopreservation of *Bletilla striata* seeds, 3-day germinating seeds and protocorms by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29(6), 517-526.

[8] Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O. & Shaw, J. M. (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.

[9] Li, D. Z. and Pritchard, H. W. (2009). The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14, 614-621.

[10] Noorhosseini-Niyaki, S. A., & Ashoori-Latmahalleh, D. (2013). Strategies toward sustainable development of *Echium amoenum* in Iran. *Journal of Novel Applied Sciences*, *2*(8), 206-2.

[11] Ozkavukcu, S. and Erdemli, E. (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24, 187-196.

[12] Patocka, J. and Navratilova, Z. (2019). Bioactivity of *Echium amoenum*: Amini review. *Pharmacology*.;20(2), 14915-7.

[13] Preciado, J. and Rubinsky, B. (2018). The effect of isochoric freezing on mammalian cells in an extracellular phosphate buffered solution. *Cryobiology*, 82, 155-8.

[14] Popov, A. S., Popova, E. V., Nikishina, T. V. and Vysotskaya, O. N. (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29, 403–410.

[15] Rao, N. K. (2004). Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3, 136-145.

[16] Reed, B. M. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, Chap 19. 515pp.

[17] Ruan, S., Xue, Q. and Tylkowska, K. (2002). The influence of priming on germination of rice seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. *Seed Science and Technology*, 30, 61-67.

[18] Sakai, A. and Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28(3), 151-172.
[19] Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis Tanaka*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9, 30-33.
[20] Sarris, J., McIntyre, E., Camfield, D. A. (2013). Plant-based medicines for anxiety disorders, part 1. *CNS drugs*. 27(3), 207-19.
[21] Walters, C., Touchell, D. H., Power, P., Wesley-Smith, J. & Antolin, M. F. (2002). A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. *CryoLetters*, 23, 291-298.
[22] 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.
[23] Volk, G. M., Harris, J. L. & Rotindo, K. E. (2006). Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52, 305-308.

Assesment of maintenance of *Echium amoenum* seed under cryogenic conditions

Leila Ghaffarzadeh-Namazi[1*]

1. Assistant professor of Department of Plant Science and Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

namazi@uma.ac.ir

Receipt: 2023/12/06 Accepted: 2025/12/02

Abstract

Echium amoenum is a member of the Boraginaceae family, which has very valuable medicinal properties that are highly regarded in traditional Iranian medicine. Because different plant species Echium inappropriate harvesting of natural areas by humans, and the growing threat of biotic and abiotic stresses following the work resulted in reduced genetic diversity of a species is, a species of genetically keep reserves Curb upper's. Using seed cryopreservation, as one of the Ex situ plant germplasm conservation method we can store seed for long-term, with much lower expenses and without losing seed viability. In order to preserve E. amoenum seed under -196 ºC condition, three pre cryopreservation treatments, PVS2 solution, Desiccation and Glycerol were applied. The treated seeds were transferred into Liquid Nitrogen (LN) and stored for 1 week. In this study the effect of cryopreservation on germination and growth indices (germination percent, germination rate of plant species (*E. amoenum*) in storage conditions of cryopreservation (-196ºC) were evaluated for 1 week. Comparing treatments, significant differences were observed on germination percent and germination rate. The best treatment was desiccation. The results showed that, the long-term preservation of the species, seed in -196 ºC is possible.

Keywords: Echium amoenum, Cryopreservation, Germplasm, Glycerol, PVS2

Copyright© 2025, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.