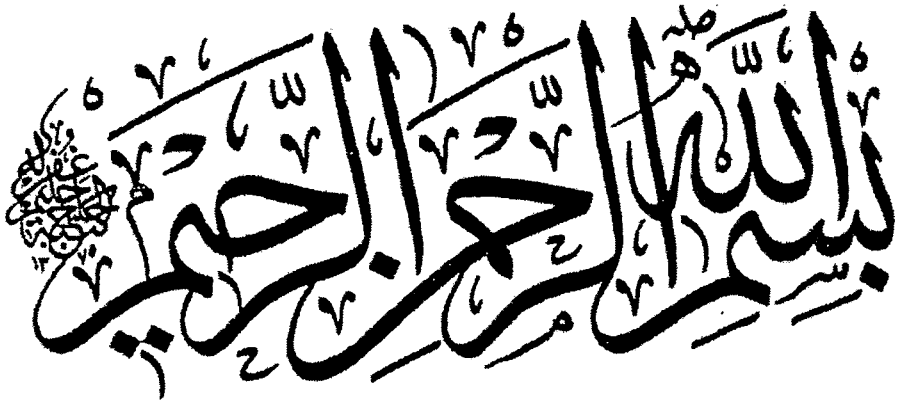

٩٥٨٦٣

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم‌پایه

گروه زیست‌شناسی

عنوان پایان نامه

بررسی امکان نگهداری جوانه‌های انتهایی، بذور و سلول‌های *Secale montanum* در شرایط فراسرد

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست‌شناسی(علوم‌گیاهی)

مؤلف

راحله احمدی اتویی

مرکز اطلاعات علمی

استاد راهنما

دکتر عباس قمری‌زارع دکتر غلامرضا بخشی‌خانیکی

استاد مشاور

دکتر محبت‌علی نادری‌شهاب

۱۳۸۷/۲/۱۱

ماه و سال انتشار

آذرماه ۱۳۸۶

۹۶۸۶۳

دانشگاه پیام نور

تصویب نامه

پایان نامه تحت عنوان:

بررسی امکان نگهداری جوانه های انتهایی، جانبی ، بذر و سلول Secal montanum در دمای فراسرد

تاریخ دفاع: ۸۶/۰۹/۱۸ **نمره:** ۱۹/۳ **درجه :** عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱. آقای دکتر عباس قمری زارع	استاد راهنمای اول		
۲. آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی	استاد راهنمای دوم		
۳. آقای دکتر محبت علی نادری شهاب	استاد مشاور		
٤. خانم دکتر مه لقا قربانلی	استاد داورداخلی		
۵. آقای دکتر یونس عصری	استاد داور خارجی		
۶. ~~خانم فرشته شاه محمدی~~ آقای دکتر رضا حاجی حسینی	نماینده گروه		

تقدیم به

همسرم که با سعه‌صدر، تحمل فراوان و همراهی صمیمانه به نتیجه رسیدن این رساله را امکان‌پذیر ساخت، فرزندم کیانا که نظاره‌گر پرتحمل این بخش از زندگی من بوده است و پدر دوست‌داشتنی و مادر مهربانم که یار و مشوق من در تمام مراحل زندگی بوده‌اند.

این تحقیق با مساعدت و پشتیبانی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع صورت گرفت.

سپاس و قدردانی

خداوندا سپاس که مرا در مسیر دانش قرار دادی و توانایی عطا فرمودی که در کسب علم کوشا باشم.

در اینجا وظیفه خود می‌دانم از اساتید بزرگوارم که با حمایت و مساعدت‌های بی‌دریغ خویش، انجام این پایان‌نامه را برای من امکان‌پذیر ساختند، تشکر و قدردانی کنم.

از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر عباس قمری زارع که راهنمایی‌های بسیار ارزنده و مساعدت‌های بی‌دریغ ایشان در اجرای این پایان‌نامه، پیوسته شامل حال من بوده، سپاسگزارم.

از استاد راهنمای محترم، جناب آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی که افتخار شاگردی ایشان و بهره‌مندی از لطف و راهنمایی‌های ایشان را داشته‌ام، سپاسگزارم.

از استاد مشاورم، جناب آقای دکتر محبت علی نادری شهاب که همواره از راهنمایی‌های بی‌دریغ ایشان بهره‌مند بوده‌ام، سپاسگزارم.

از سرکار خانم مهندس شکوفه شهرزاد که در طول اجرای این پژوهش تجارب ارزشمند خود را در اختیار من قرار دادند، بی‌نهایت سپاسگزارم.

از سایر همکاران گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی از جمله سرکار خانم‌ها مهندس امام، مهندس آبروش، مهندس نراقی و مهندس شریعت تشکر می‌کنم.

از خانم مهرآبادی به خاطر زحماتی که در آزمایشگاه متحمل شده‌اند، تشکر می‌کنم.

در پایان از کلیه کسانی که در طول این مدت مرا یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱- مراتع ۲
۱-۱-۱- اهمیت مرتعی گیاهان گرامینه: ۳
۱-۲- گندمیان ۳
۱-۲-۱- اهمیت گندمیان ٤
۱-۳- چاودار ٥
۱-۳-۱- بذر چاودار ۷
۱-۳-۲- نیاز چاودار به مواد غذایی ۸
۱-۳-۳- تفاوت‌های گندم و چاودار ۸
۱-۳-۴- طبقه‌بندی جنس چاودار ۹
۱-۳-۵- نکات مهم به‌نژادی چاودار ۹
۱-۳-۶- اهمیت گیاه چاودار ۱۰
۱-۴- خلاصه رده‌بندی گیاه شناسی: ۱۲
۱-۴-۱- مشخصات گیاه شناسی راسته *Poales* ۱۲
۱-۴-۲- مشخصات گیاه شناسی تیره *Poaceae* ۱۳
۱-۴-۳- مشخصات گیاهشناسی جنس *Secale* ۱۳
۱-۴-۴- مشخصات گیاهشناسی گونه *Secale montanum* ۱۳
۱-۴-۴-۱- خصوصیات گونه *Secale montanum* ۱٤
۱-۴-۴-۲- اهمیت گونه *S. montanum* ۱٥
۱-٥- کشت بافت گیاهی ۱٦
۱-٥-۱- ریزازدیادی: ۱۸
۱-٥-۲- اندام‌زایی ۱۹
۱-۶- ضرورت تاریخچه استفاده از روش فراسرد جهت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی ۱۹
۱-۷- پایه‌های تئوری فراسرد ۲۲
۱-۷-۱- فراسرمایی (ابرسرمایش) ۲۲
۱-۷-۲- کاهش نقطه انجماد ۲۳
۱-۷-۳- دهیدراسیون (آبگیری) ۲۳
۱-۷-۳-۱- تکنیک‌های مورد استفاده در دهیدراسیون ۲٤

۱-۷-۳-۱-۱- هوای خشک کننده ۲٤
۱-۷-۳-۱-۲- انجماد و خشک کردن ۲٤
۱-۷-۳-۱-۳- کاربرد مواد محافظت‌کننده در برابر انجماد ۲۵
۱-۷-۳-۱-۳-۱- مواد محافظت‌کننده غیرنفوذکننده ۲۵
۱-۷-۳-۱-۳-۲- مواد محافظت‌کننده نفوذکننده ۲٦
۱-۷-۳-۱-۳-۲-۱- دی متیل سولفاکساید ۲٦
۱-۷-۳-۱-۳-۲-۲- گلیسرول ۲۷
۱-۷-۳-۱-۴- متابولیسم سازشی (مقاوم‌سازی): ۲۹
۱-۸- مکانیسم‌های تحمل تنش سرما در گیاهان ۳۰
۱-۹- معمولترین پروتکل‌های فراسرد ۳۲
۱-۹-۱- هوای خشکان ۳۲
۱-۹-۲- پروتکل سرمایش کند کلاسیک ۳۲
۱-۹-۳- کپسوله‌شدن-دهیدراسیون ۳۳
۱-۹-۴- ویتریفیکاسیون (شیشه‌ای‌شدن) ۳٤
۱-۹-۴-۱- مکانیسم تشکیل ویتریفیکاسیون ۳۵
۱-۱۰- مراحل گوناگون در پروتکل فراسرد ۳٦
۱-۱۰-۱- پیش رشد: ۳٦
۱-۱۰-۲- پیش‌تیمار محافظت‌کننده: ۳٦
۱-۱۰-۳- انجماد: ۳٦
۱-۱۰-۴- ذخیره‌سازی، گرمادهی و رشد دوباره: ۳٦
۱-۱۱- کاربرد روش فراسرد در گونه‌های علفی ۳۷
۱-۱۱-۱- سوسپانسیون سلولی و کشت‌های کالوس ۳۷
۱-۱۱-۱-۱- دمای پائین ۳۷
۱-۱۱-۱-۲- تشکیل کریستال‌های یخ ۳۸
۱-۱۱-۱-۳- دهیدراسیون شدید ۳۸
۱-۱۱-۱-۴- تشکیل رادیکال‌های آزاد ۳۸
۱-۱۱-۲- دانه گرده ٤٤
۱-۱۱-۳- بافت‌های مریستمی ٤۵
۱-۱۱-۴- بذرها ۵۵
۱-۱۲- اهداف اصلی پژوهش ۵۹
فصل دوم: مواد و روشها ٦۱

۲-۱- مواد گیاهی ٦۲
۲-۲- محیط کشت ٦۳
۲-۲-۱- ترکیبات محیط کشت MS ٦۳
۲-۲-۱-۱- عناصر ماکرو ٦۳
۲-۲-۱-۲- عناصر میکرو ٦۳
۲-۲-۱-۳- ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ضروری ٦۳
۲-۲-۱-۴- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ٦٤
۲-۲-۱-۵- ماده دیگر ٦٥
۲-۳- وسایل و تجهیزات ٦٥
۲-۳-۱- تجهیزات آزمایشگاهی ٦٥
۲-۳-۱-۱- اتاق نگهداری مواد شیمیایی ٦٥
۲-۳-۱-۲- اتاق آماده سازی محیط یا فضای اصلی آزمایشگاه ٦٦
۲-۳-۱-۳- اتاق کشت ٦٦
۲-۳-۱-۴- اتاق رشد ٦٦
۲-۳-۱-۵- گلخانه تحقیقاتی ٦٦
۲-۳-۱-۶- هود مخصوص کشت بافت ٦٦
۲-۳-۱-۷- اتوکلاو ٦۷
۲-۳-۱-۸- دستگاه همزن ٦۷
۲-۳-۱-۹- ترازو ٦۷
۲-۳-۱-۱۰- pH متر ٦۷
۲-۳-۱-۱۱- ظروف مورد استفاده برای کشت ریزنمونه‌ها ٦۷
۲-۳-۱-۱۲- ظروف مورد استفاده در فناوری فراسرد ٦۸
۲-۴- آماده سازی محیط کشت ٦۹
۲-۴-۱- تهیه محلول‌های پایه محیط کشت MS ٦۹
۲-۴-۲- روش تهیه محیط کشت ۷۱
۲-۴-۳- سترون‌سازی محیط کشت و ابزارکار ۷۲
۲-۴-۳-۱- ریزنمونه ۷۲
۲-۴-۳-۲- فرد آزمایش کننده ۷۲
۲-۴-۳-۳- ابزار و وسایل آزمایشگاهی ۷۲
۲-۴-۳-۴- فیلتر استریل ۷۲
۲-۴-۳-۵- آماده کردن هود مخصوص کشت بافت ۷۳

۲-۵- طرز تهیه محلول‌های فراسرد ۷۳
۲-۵-۱- محلول بارگیری ۷۳
۲-۵-۲- محلول‌های پیش‌تیمار ۷۳
۲-۵-۲-۱- محیط مایع MS همراه با سوکروز ۰/۵M و ABA (۷۵µmol) ۷۳
۲-۵-۲-۲- محیط جامد MS همراه با سوکروز ۰/۷۵M و ABA (۷۵µmol) ۷۳
۲-۵-۲-۳- محیط جامد MS همراه با سوکروز ۰/۷M ۷۴
۲-۵-۲-۴- سایر محلول‌های پیش‌تیمار ۷۴
۲-۵-۳- محلول شیشه‌ای‌شدن (PVS_2) ۷۴
۲-۵-۴- بستر آلژنیات ۷۴
۲-۵-۵- محیط‌های پس‌تیمار ۷۵
۲-۶- کشت اولیه ۷۵
۲-۶-۱- پیش سترون‌سازی بذور ۷۵
۲-۶-۲- سترون‌سازی بذور ۷۶
۲-۶-۳- مرحله استقرار ۷۶
۲-۷- روش بازکشت نمونه‌ها ۷۶
۲-۷-۱- مرحله ریزازدیادی ۷۶
۲-۷-۲- شرایط محیطی رشد نمونه ۷۷
۲-۷-۳- واکشت ریزنمونه‌های شاخه‌زایی ۷۷
۲-۸- تولید کالوس ۷۸
۲-۹- مواد گیاهی مورد استفاده در تکنیک فراسرد ۷۹
۲-۹-۱- بذور ۷۹
۲-۹-۲- جوانه ۸۶
۲-۹-۲-۱- پروتکل ۱: ویتریفیکاسیون ۸۶
۲-۹-۲-۲- پروتکل ۲: کپسوله‌شدن-دهیدراسیون ۹۰
۲-۹-۳- سلول ۹۲
فصل سوم: نتایج ۹۸
۳-۱- نتایج حاصل از سترون‌سازی بذور *S. montanum* ۹۹
۳-۲- نتایج حاصل از ریزازدیادی ۱۰۰
۳-۳- نتایج حاصل از تولید کالوس ۱۰۲
۳-۴- نتایج حاصل از حفاظت فراسرد بذور گونه *S. montanum* ۱۰۴
۳-۴-۱- ویتریفیکاسیون (Vitrification) ۱۰۴

۳-۴-۲- کپسوله‌شدن-دهیدراسیون (E-D) ۱۱۱
۳-۵- نتایج حاصل از حفاظت فراسرد جوانه‌های گونه *S. montanum* ۱۲۲
۳-۵-۱- ویتریفیکاسیون (Vitrification) ۱۲۲
۳-۵-۲- کپسوله‌شدن-دهیدراسیون (encapsulation-dehydration) ۱۲۶
۳-۶- نتایج حاصل از حفاظت فراسرد سلول‌های *S. montanum* ۱۳۱
۳-۶-۱- پروتکل ویتریفیکاسیون ۱۳۱
۳-۶-۲- پروتکل کپسوله‌شده-دهیدراسیون ۱۳۶
۳-۷: ارگان‌زایی ۱۴۱
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۱۵۱
۴-۱- سترون‌سازی بذور *S. montanum* ۱۵۲
۴-۲- ریزازدیادی شاخه *S. montanum* ۱۵۲
۴-۳- تولید کالوس از جنین بذور *S. montanum* ۱۵۳
۴-۴- فناوری حفاظت فراسرد ریزنمونه‌ها (جوانه، بذور، سلول) جهت حفظ ذخایر ژرم پلاسم *S. montanum* ۱۵۴
۴-۴-۱- سازگاری سرمایی و نقش پیش‌تیمارهای سوکروز و ABA بر زنده‌مانی ۱۵۴
۴-۴-۲- اثرات محلول بارگیری ۱۵۹
۴-۴-۳- اثرات محلول ویتریفیکاسیون (PVS_2) ۱۶۰
۴-۴-۴- اثرات ذوب شدن، شستشوی ریزنمونه‌ها و محیط بازیابی آنها ۱۶۳
پیشنهادات ۱۶۷
منابع ۱۶۸

فهرست جداول

عنوان — صفحه

جدول ۲-۱: ترکیبات محیط کشت MS (Murashige and Skoog، ۱۹۶۲) ۷۰
جدول ۲-۲: هورمون‌ها و ویتامین‌های مورد استفاده و حلال آنها ۷۱
جدول ۲-۳: تیمارهای هورمونی شاخه‌زایی مورد استفاده در تکثیر درون شیشه‌ای ۷۷
جدول ۲-۴: تیمار هورمونی مورد استفاده در تولید کالوس ۷۸
جدول ۳-۱: استریل بذرها ۹۹
جدول ۳-۲: خلاصه تجزیه واریانس آزمایش اثر هورمون‌های مختلف بر شاخه‌زایی دانه‌رست‌های *S. montanum* ۱۰۰
جدول ۳-۳: خلاصه تجزیه واریانس صفات مختلف کالوس‌های تولید شده از جنین بذور *S. montanum* در تیمارهای مختلف هورمون 2,4-D ۱۰۲
جدول ۳-۴: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمارهای *ex vitro* ویتریفیکاسیون بر جوانه‌زنی و تولید گیاهچه از بذور *S. montanum*. تیمارهای ۱ و ۲ *ex vitro*: ((½ Vit) h با (½ h) Control و Vit(24h) با (Control(24h) ۱۰۵
جدول ۳-۵: تجزیه واریانس اثر تیمارهای *ex vitro* (Control 24h، ½ h Control، Vit 24h و ½ h Vit) بر جوانه‌زنی و تولید گیاهچه از بذور *S. montanum* ۱۰۷
جدول ۳-۶: تجزیه واریانس اثر تیمار *in vitro* (Vit, Control) بر جوانه‌زنی و تولید گیاهچه از بذور *S. montanum* ۱۰۸
جدول ۳-۷: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمارهای *ex vitro* و *in vitro* بر رشد طولی گیاهچه، تیمارهای *ex vitro* (24h و ½ Vit h، ½ Control h و 24h)، تیمارهای *in vitro* (Vit (*in vitro*), Control (*in vitro*) ۱۰۹
جدول ۳-۸: مقایسه میانگین اثر تیمارهای *ex vitro* و *in vitro* بر رشد طولی گیاهچه‌های *S. montanum* ۱۱۱
جدول ۳-۹: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمارهای *ex vitro* کپسوله‌شدن-دهیدراسیون بر جوانه‌زنی و تولید گیاهچه از بذور *S. montanum*. تیمارهای ۲ و ۱ *ex vitro* شامل Control (24h) با E-D (24h) و Control (½ h) با (E-D) ۱۱۲
جدول ۳-۱۰: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار *in vitro* (E-D, Control) کپسوله‌شدن-دهیدراسیون بر جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بذور *S. montanum* ۱۱۵
جدول ۳-۱۱: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمارهای *ex vitro* و *in vitro* بر رشد طولی گیاهچه‌های *S. montanum* تیمارهای *ex vitro* (E-D، ½ h Control، ½ h E-D و E-D۲۴h)، تیمارهای *in vitro* (E-D, Control) ۱۱۶
جدول ۳-۱۲: خلاصه تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارها و پس‌تیمارهای مختلف ویتریفیکاسیون بر زنده‌مانی جوانه‌های *S. montanum* ۱۲۳

جدول ۳-۱۳: تجزیه واریانس اثر تیمارهای PVS_2 بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد ۱۲۵

جدول ۳-۱۴: تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار ABA با سوکروز در محیط‌های بازیابی بر زنده‌مانی جوانه‌های *S. montanum* ۱۲۵

جدول ۳-۱۵: خلاصه تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارها و پس‌تیمارهای مختلف کپسوله‌شده بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد ۱۲۷

جدول ۳-۱۶: تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار ABA در محیط‌های پس‌تیمار اعمال‌شده بر زنده‌مانی جوانه‌های کپسوله‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد ۱۲۹

جدول ۳-۱۷: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار بر رشد و رنگ سلول‌ها *S. montanum* اثر محیط کشت بر رشد و رنگ سلول‌های *S. montanum*، اثر متقابل تیمار محیط بر رشد و رنگ سلول در پروتکل ویتریفیکاسیون. تیمارها شامل (P_1، P_2، P_3، P_4، $P_{.1}$، $P_{.2}$، $P_{.3}$، $P_{.4}$) محیط شامل (2,4-D و 2,4-D + GA) ۱۳۲

جدول ۳-۱۸: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار بر رشد و رنگ سلول‌ها، اثر محیط کشت بر رشد و رنگ سلول‌ها و اثر متقابل محیط و تیمار در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون. تیمارها شامل (E/D_1، E/D_2، E/D_3، E/D_4، $E/D_{.1}$، $E/D_{.2}$، $E/D_{.3}$، $E/D_{.4}$)، محیط‌ها شامل (2,4-D و 2,4-D + GA) بود. ۱۳۷

جدول ۳-۱۹: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار بر رشد و تمایز سلول‌های *S. montanum*، اثر محیط بر رشد و تمایز سلول‌های *S. montanum* و همچنین اثر متقابل تیمار محیط در پروتکل ویتریفیکاسیون. تیمارها شامل (P_1، P_2، P_3، P_4، $P_{.1}$، $P_{.2}$، $P_{.3}$، $P_{.4}$). محیط‌ها شامل (TDZ، TDZ,BA و TDZ-2ip) بود. ۱۴۲

جدول ۳-۲۰: خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار بر رشد و تمایز سلول‌های *S. montanum*، اثر محیط بر رشد و تمایز سلول‌های *S. montanum* و اثر متقابل محیط تیمار در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون. تیمارها (E/D_1، E/D_2، E/D_3، E/D_4، $E/D_{.1}$، $E/D_{.2}$، $E/D_{.3}$ و $E/D_{.4}$) محیط‌ها (TDZ، TDZ,2ip و TDZ,BA) ۱۴۷

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۲-۱: تصویری از بذور *Secale montanum* از ایستگاه تحقیقات گیاهان مرتعی همند و آبسرد، الف) رویشگاه، ب) یک بوته کامل و ج) خوشه‌های رسیده ۶۲
شکل ۲-۲: تانک ذخیره‌سازی و محفظه‌های قرار گرفته در آن جهت جاگیری کرایوویال‌ها ۶۸
شکل ۲-۳: کرایوویال‌های قرارگرفته در بشر آب‌گرم (۴۰°C) ۶۸
شکل ۲-۴: بستر آلژنیات ساخته شده. ۷۵
شکل ۲-۵: کاشت بذور در شرایط استریل جهت تولید گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی ۷۶
الف: بذور *S. montanum* بعد از انجام عملیات سترون‌سازی، ب: استقرار بذر در محیط MS فاقد هورمون با نصف غلظت نیترات ۷۶
شکل ۲-۶: آبگیری بذور توسط سیلیکاژل در دسیکاتور ۷۹
شکل ۲-۷: محصور شدن بذور در کرایوویال حاوی ۰/۵cc PVS_2 (صفر درجه سانتی‌گراد) ۸۰
شکل ۲-۸: کپسوله‌شدن-دهیدراسیون بذور *S. montanum* الف- قرارگیری بذور در بستر آلژنیات، ب- بذور در محلول کلریدکلسیم، ج- قرارگیری بذور در پتری‌دیش‌ها در فضای آزمایشگاه جهت خشک شدن ۸۰
شکل ۲-۹: پس‌تیمار بذور کپسوله‌شده بعد از شستشو در محلول سوکروز ۱/۲M حاوی نمک‌های MS ۸۱
شکل ۲-۱۰: الف- بذور شاهد در مدت زمان نیم ساعت زیر آب جاری، ب- بذور ویتریفاید در مدت زمان $\frac{1}{2}$ h زیر آب جاری، ج- بذور کپسوله در مدت زمان $\frac{1}{2}$ h زیر آب جاری ۸۲
شکل ۲-۱۱: الف- بذور شاهد در مدت زمان ۲۴h زیر آب جاری، ب- بذور ویتریفاید در مدت زمان ۲۴h در زیر آب جاری، ج- بذور کپسوله‌شده در مدت زمان ۲۴h در زیر آب جاری ۸۳
شکل ۲-۱۲: قرارگیری بذور Vit، E-D و شاهد در شیشه ویال‌ها بعد از انجام عملیات سترون‌سازی ۸۴
شکل ۲-۱۳: مراحل کاشت گیاهچه‌های *in vitro* در گلدان الف- گیاهچه‌های E-D و انتقال آنها به گلخانه، ب- گیاهچه‌های Vit و انتقال آنها به گلخانه، ج- گیاهچه‌های Control و انتقال آنها به گلخانه ۸۵
شکل ۲-۱۴: مراحل اصلی انجام کار در پروتکل ویتریفیکاسیون، الف- محلول بارگیری، ب- خروج از محلول بارگیری، پ- قرارگیری جوانه‌ها در کرایوویال‌ها، ج- محلول PVS_2، چ- قرارگیری محلول PVS_2 در کرایوویال، خ- تانک ذخیره ازت مایع، هـ- جاگیری کرایوویال‌ها در محفظه تانک، د- ذوب شدن نمونه‌ها در حمام آب‌گرم استریل، ذ- شستشوی پس ذوب در سوکروز ۱/۲M ۸۹
شکل ۲-۱۵: مراحل کپسول‌دار کردن جوانه‌ها و سپس خشک شدن آنها در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون ۹۱
۱- محلول آلژنیات کلسیم، ۲- کپسول‌دار شدن جوانه‌ها، ۳- جوانه‌های کپسوله‌شده بر روی کاغذ خشک‌کن استریل در زیر هود جهت خشک‌شدن، ۴- تصویری از جوانه‌های خشک‌شده، ۵- قرارگیری جوانه‌های خشک شده در کرایوویال، ۶- قرارگیری کرایوویال در تانک ذخیره نیتروژن مایع، ۷- حمام آب گرم و ۸- شستشوی پس‌ذوب جوانه‌ها ۹۱

شکل ۲-۱۶: سلول‌های ویتریفاید *S. montanum* در محیط‌های بازیابی، الف- Vit گرما (معمولی) تاریکی، ب- Vit گرما روشنایی، ج- Vit سرما روشنایی و د- Vit سرما تاریکی ۹۴
شکل ۲-۱۷: سلول‌های کپسوله‌شده *S. montanum* در محیط‌های بازیابی، الف- E-D سرما روشنایی، ب- E-D گرما (معمولی) تاریکی، ج- E-D گرما روشنایی و د- E-D سرما تاریکی ۹۵
شکل۳-۱: الف- جوانه‌زنی بذر *S. montanum* در محیط MS فاقد هورمون ۹۹
ب- گیاهچه‌های تولیدشده از بذور *S. montanum* ۹۹
شکل ۳-۲: الف- استقرار گیاهچه‌های *S. montanum* در محیط MS با هورمون‌های شاخه‌زایی، ب- تولید و ازدیاد شاخه‌های *S. montanum* در محیط شاخه‌زایی IBA: ۰/۱ و ۰/۵ :2ip (mgL^{-1}) ۱۰۱
شکل ۳-۳: کالوس‌های تولید شده از جنین بذور رسیده *S. montanum* ۱۰۳
الف: مشاهده دیسک‌های برگی در محیط تولید کالوس و نکروزه شدن و از بین رفتن آن ۱۰۳
ب: مشاهده جنین‌های کاشته شده *S. montanum* در محیط تولید کالوس و کالوس‌هاس تولید شده از آن ۱۰۳
شکل ۳-۴: جوانه‌زنی و تولید گیاهچه در بذور ویتریفاید و شاهد نیم ساعت زیر آب جاری *S. montanum*، الف: بذور Vit($\frac{1}{2}$ h)، ب: بذور Control($\frac{1}{2}$ h) و ج: مقایسه دو بذور Vit($\frac{1}{2}$ h) و Control($\frac{1}{2}$ h) ۱۰۶
شکل ۳-۵: بذور جوانه‌زده گیاهچه‌های تولیدشده در پروتکل ویتریفیکاسیون با تیمار ۲۴ ساعت در زیر آب جاری، الف- بذور Vit (24h)، ب- بذور Control (24h)، ج- مقایسه دو بذور Vit (24h) و Control (24) ۱۰۷
شکل ۳-۶: گیاهچه‌های حاصل از بذور Vit و Control در روش *in vitro* پروتکل ویتریفیکاسیون الف: بذور Vit *invitro*، ب: Control *in vitro* ۱۰۹
شکل ۳-۷: گیاهچه‌های رشد یافته *S. montanum* بعد از ۱۴ روز از زمان کشت در گلدان، الف: Vit $\frac{1}{2}$ h، ب: Vit 24h، پ: Vit *in vitro*، ج: Vit and Control $\frac{1}{2}$ h، د: Vit and Control 24h، هـ: Control *in vitro*، و: Vit and Control *in vitro* و ی: Control (24h) ۱۱۰
ج ۱۱۴
شکل ۳-۸: بذرو جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولید شده *S. montanum* در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون در روش *ex vitro*، الف: E-D $\frac{1}{2}$ h، ب: E-D 24h، ج: مقایسه بذور Vit و E-D (24h و 1/2h)در روش *ex vitro*، د: مقایسه بذور جوانه‌زده و گیاهچه‌های E-D $\frac{1}{2}$ h E-D 24h و:مقایسه بذور جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولید شده E-D $\frac{1}{2}$ h و Control $\frac{1}{2}$ h ۱۱۴
شکل ۳-۹: گیاهچه تولید شده از بذور کپسوله‌شده *S. montanum* ۱۱۶
شکل ۳-۱۰: گیاهچه‌های رشد یافته *S. montanum* از بذور کپسوله‌شده و شاهد آنها و مقایسه آنها با گیاهان Vit، الف: Control $\frac{1}{2}$ h، ب: E-D 24h، پ: E-D $\frac{1}{2}$ h، ج: Control 24h، د: مقایسه گیاهان Vit، E-D و Control $\frac{1}{2}$ h, 24h، هـ: مقایسه گیاهان Vit، E-D و Control (*in vitro*)، و: Control and E-D *in vitro*، ی: مجموعه گیاهچه‌های رشد یافته پس از خروج از گلخانه ۱۱۸

شکل ۳-۱۱: گیاهان رشد یافته *S. montanum* در فضای بیرون پس از یکماه..... ۱۲۰
الف- گیاهان 24h و (½h)Vit، ب- گیاهان 24h و (½h)Control، ج گیاه 24h و (½h)E-D، د- مجموعه گیاهان *ex vitro*، هـ- مجموعه گیاهان *in vitro*..... ۱۲۰
شکل ۳-۱۲: انتقال گیاهان به مزرعه، الف- (½h)E-D، E-D24h، ب- ½h، Vit24h، ج- 24h، Control(½h)، د- *in vitro* E-D, Vit، هـ- *in vitro* Control..... ۱۲۱
شکل ۳-۱۳: جوانه‌های رشد یافته *S. montanum* بعد از حفاظت فراسرد در محیط بازیابی MS بدون هورمون و پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M به‌مدت یک هفته ۱۲٤
شکل ۳-۱۴: جوانه‌های رشدیافته بعد از حفاظت فراسرد در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون ۱۲۹
شکل ۳-۱۵: سلول‌های رشدیافته *S. montanum* در محیط تولید کالوس بعد از مدت زمان یک ماه در پروتکل ویتریفیکاسیون، الف- شاهد سرما تاریکی و سرما روشنایی، ب- شاهد گرما تاریکی و گرما روشنایی، ج- Vit گرما تاریکی و گرما روشنایی، د- Vit سرما تاریکی و سرما روشنایی، هـ- Vit سرما تاریکی و شاهد سرما تاریکی، و- Vit گرما روشنایی و شاهد گرما روشنایی و ز- Vit گرما تاریکی و شاهد گرما تاریکی..... ۱۳۵
شکل ۳-۱۶: سلول‌های رشدیافته *S. montanum* در محیط کالوس‌زا در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون ۱٤۰
شکل ۳-۱۷: سلول‌های رشدیافته *S. montanum* در محیط اندام‌زایی در پروتکل ویتریفیکاسیون همراه با سلول‌های شاهد ۱٤۵
شکل ۳-۱۸: سلول‌های *S. montanum* در محیط اندام‌زایی در پروتکل کپسوله‌شده-دهیدراسیون ۱۵۰

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۳-۱: بررسی اثر تیمارهای شاخه‌زایی (۱: ۰/۱ IBA + ۰/۲ BA، ۲: ۰/۱ IBA + ۰/۲ 2ip، ۳: ۰/۱ IBA + ۰/۵ BA، ۴: ۰/۱ IBA + ۱ BA، ۵: ۰/۱ IBA + ۱ 2ip، ۶: ۰/۱ IBA + ۰/۵ 2ip، ۷: ۰/۱ IBA + ۰/۲ BA + ۰/۲ 2ip و ۸: ۰/۱ IBA + ۰/۵ BA + ۰/۵ 2ip (mgL^{-1})بر تعداد شاخه (A) و طول شاخه (غلاف) cm.....۱۰۱

نمودار ۳-۲: مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های هورمون 2,4-D بر رشد کالوس، طول (A) و عرض آن (B).....۱۰۳

نمودار ۳-۳: اثر تیمارهای *ex vitro* ((24h و $\frac{1}{2}$h) Control، Vit(24h) و (Vit($\frac{1}{2}$h) بر جوانه‌زنی (A) و تولید گیاهچه (B).....۱۰۸

نمودار ۳-۴: اثر تیمار *in vitro* (Control, Vit) بر جوانه‌زنی (A) و تولید گیاهچه (B) از بذور *S. montanum*.....۱۰۸

نمودار ۳-۵: اثر تیمارهای *ex vitro*2 ((24h) Control و E-D) بر جوانه‌زنی (A) و تولید گیاهچه (B) بذور *S. montanum*.....۱۱۲

نمودار ۳-۶: اثر تیمارهای *ex vitro* (Control۲۴h و Control $\frac{1}{2}$h، E-D۲۴h و E-D $\frac{1}{2}$h) بر جوانه‌زنی (A) و تولید گیاهچه (B) بذور *S. montanum*.....۱۱۳

نمودار ۳-۷: اثر تیمار *in vitro* کپسوله‌شدن-دهیدراسیون بر جوانه‌زنی (A) و تولید گیاهچه (B).....۱۱۵

نمودار ۳-۸: اثر تیمارهای *in vitro* (A) و *ex vitro* (B) بر رشد طولی گیاهچه‌های *S. montanum*.....۱۱۷

نمودار ۳-۹: اثر پیش‌تیمار سوکروز (V_1: سوکروز ۰/۳M در محیط مایع در زمان ۲۴h برای جوانه‌های غیرسازگار به سرما، V_2: سوکروز ۰/۳M در محیط مایع در زمان ۲۴h برای جوانه‌های سازگارشده به سرما، V_3: سوکروز ۰/۷M به‌مدت یک هفته برای جوانه‌های سازگارشده به سرما، V_4: سوکروز ۰/۷M به‌مدت یک هفته برای جوانه‌های غیرسازگار به سرما) بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد در پروتکل ویتریفیکاسیون (A) و اثر پس‌تیمارهای ویتریفیکاسیون (V_2: MS بدون هورمون، V_5: (کربن فعال) MS+ C°، V_6: MS+GA+ C°، V_7: MS+PVP و V_8: MS+$AgNO_3$) بر زنده‌مانی جوانه‌های *S. montanum*.....۱۲۴

نمودار ۳-۱۰: اثر پیش‌تیمار ABA با سوکروز در محیط‌های بازیابی قیدشده، بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* از انجماد در تیمارهای ویتریفیکاسیون، تیمارها: V_5: پیش‌تیمار آبگیری با سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی (۳ در هزار) MS+C°، V_6: پیش‌تیمار آبگیری با سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی MS+GA(mgL^{-1})+ C°، V_7: پیش‌تیمار آبگیری سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی (MS+PVP(mgL^{-1})، V_8: پیش‌تیمار آبگیری سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی (mgL^{-1}) MS+$AgNO_3$)، V_{17}: پیش‌تیمار آبگیری سوکروز ۰/۷M + ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی ، V_{18}: پیش‌تیمار آبگیری سوکروز ۰/۷M + ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی MS+GA+C°، V_{19}: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M + ABA ۷۵µmol و محیط بازیابی MS+PVP، V_{20}: پیش‌تیمار آبگیری سوکروز ۰/۷M + ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی MS+$AgNO_3$.....۱۲۶

نمودار۳-۱۱: اثر پیش‌تیمار سوکروز (EN_1: جوانه‌های سازگارشده به سرما در مدت ۲۰ ساعت در سوکروز ۰/۷۵M، EN_2: جوانه‌های غیرسازگار به سرما به‌مدت ۲۰ ساعت در سوکروز ۰/۷۵M، EN_3: جوانه سازگار به سرما به‌مدت یک هفته در سوکروز ۰/۷M، EN_4: جوانه‌های غیرسازگار به سرما به‌مدت یک هفته در سوکروز ۰/۷M) بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون (A) و اثر پس‌تیمارهای مختلف (EN_2: MS-H، EN_5: MS+ C°، EN_6: MS+GA+ C°، EN_7: MS+PVP، EN_8 : $MS+AgNo_3$) بر زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد در پروتکل کپسوله‌شدن-دهیدراسیون (B) ۱۲۸

نمودار ۳-۱۲: اثر پیش‌تیمار ABA همراه با سوکروز در محیط‌های پس‌تیمار اعمال‌شده بر زنده‌مانی جوانه‌های کپسوله‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد در تیمارهای کپسوله‌شدن-دهیدراسیون. تیمارها: EN_5: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی MS+C°، EN_6: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی MS+GA+C°، EN_7: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی MS+PVP ، EN_8: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M و محیط بازیابی $MS+AgNO_3$، EN_9: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M+ ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی ، EN_{10}: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M+ ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی MS+GA+C°، EN_{11}: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M+ ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی MS+PVP، EN_{12}: پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M+ ۷۵µmol ABA و محیط بازیابی $MS+AgNO_3$ ۱۳۰

نمودار ۳-۱۳: مقایسه اثر پیش‌تیمار دو پروتکل ویتریفیکاسیون و کپسوله‌شدن-دهیدراسیون در زنده‌مانی جوانه‌های حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد ۱۳۰

نمودار ۳-۱۴: اثر تیمارهای ویتریفیکاسیون (P_1: Vit سرما تاریکی، P_2: Vit سرما روشنایی، P_3: Vit گرما تاریکی، P_4: Vit گرما روشنایی، $P_{.1}$: شاهد سرما تاریکی، $P_{.2}$: شاهد سرما روشنایی، $P_{.3}$: شاهد گرما تاریکی و $P_{.4}$: شاهد گرما روشنایی) بر رشد سلول‌ها (A) و رنگ آنها (B) ۱۳۳

نمودار ۳-۱۵: اثر تیمارهای کپسوله‌شدن-دهیدراسیون [E/D_1: E-D سرما تاریکی، E/D_2: E-D سرما روشنایی، E/D_3: E-D گرما روشنایی، E/D_4: E-D گرما تاریکی، $E/D_{.1}$: شاهد سرما تاریکی، $E/D_{.2}$: شاهد سرما روشنایی، $E/D_{.3}$: شاهد گرما روشنایی و $E/D_{.4}$: شاهد گرما تاریکی] بر رشد سلول‌ها (A) و رنگ آنها (B) ۱۳۸

نمودار ۳-۱۶: اثر تیمارهای ویتریفیکاسیون (P_1: Vit سرما تاریکی، P_2: Vit سرما روشنایی، P_3: Vit گرما تاریکی، P_4: Vit گرما روشنایی، $P_{.1}$: شاهد سرما تاریکی، $P_{.2}$: شاهد سرما روشنایی، $P_{.3}$: شاهد گرما تاریکی و $P_{.4}$: شاهد گرما روشنایی) بر رشد سلول‌ها (A) و تمایز آنها (B) ۱۴۳

نمودار ۳-۱۷: اثر تیمارهای کپسوله‌شدن-دهیدراسیون (E/D_1: E-D سرما تاریکی، E/D_2: E-D سرما روشنایی، E/D_3: E-D گرما تاریکی، E/D_4: E-D گرما روشنایی، $E/D_{.1}$: شاهد سرما تاریکی، $E/D_{.2}$: شاهد سرما روشنایی، $E/D_{.3}$: شاهد گرما تاریکی و $E/D_{.4}$: شاهد گرما روشنایی بر رشد سلول‌ها (A) و تمایز آنها (B) ۱۴۸

فهرست اختصارات

Cm	centimeter
mm	millimeter
PEG	Poly Ethylen Glycol
DMSO	Dimethyle sulfoxide
v/v	volum per volum
%	percent
$^{\circ}C/min$	degrees celsius / minute
°C	degrees celsius
$^{\circ}C/s$	degrees celsius / second
mgL^{-1}	miligram / Liter
M	Molar
LN	Liquid Nitrogen
PVS_1	Plant Vitrification Solution 1
PVS_2	Plant Vitrification Solution 2
PVS_3	Plant Vitrification Solution 3
W/V	weight / volum
h	hourse
µMol	micro mol
ABA	Abscisic asid
MS	Murashige and Skoog
m mol	mili mol
E-N ؛ E-D	encapsulation-dehydration
Vit	vitrification
IBA	Indol-3-butyric acid
GA_3	Gibberlic acid
2,4-D	2,4-dichloro phenoxy acetic acid
BAP	2,6-Benzyl amino purine
PVP	Poly vinyl pyrolidone
SAS	The statistical Analysis System
2ip	6.γ.γ.d.methyl allyl amino purine
H_2O/gDW	H_2O/gram Dry Weight
LT	low temperature

چکیده

حفاظت فراسرد یا ذخیره در نیتروژن مایع (دمای ۱۹۶°C-)، مطمئن‌ترین روش ذخیره طولانی‌مدت منابع ژنتیکی گیاه است. تحت این شرایط، کلیه فرایندهای فیزیکی و بیوشیمیایی به‌طور کامل متوقف می‌شود و مواد گیاهی می‌توانند برای دوره‌های نامحدود زمان ذخیره شوند. این تکنیک به‌عنوان یک فرایند ذخیره‌سازی مواد بیولوژیکی بدون تغییرات ژنتیکی، جهت نگهداری بذور، جوانه و سلول‌های (با منشأ اولیه بذر و جنین در شرایط درون‌شیشه‌ای) *Secale montanum* بکار گرفته شد. برای تولید مواد گیاهی (جوانه و کالوس) در شرایط *in vitro*، بذور سترون‌شده (هیپوکلریدسدیم ۲٪) در محیط MS نصف غلظت نیترات مستقر شدند. محیط کشت MS نصف غلظت نیترات، mgL^{-1} IBA: ۰/۱ mgL^{-1} 2ip: ۰/۵ جهت استقرار و تکثیر شاخه‌ها انتخاب شد. تولید کالوس، از جنین‌های *S. montanum* در محیط MS با mgL^{-1} 2,4-D: ۱ بود. مواد گیاهی تولیدشده به‌طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از دو پروتکل ویتریفیکاسیون و کپسوله‌شدن-دهیدراسیون در برابر انجماد محافظت شدند. بیشترین درصد زنده‌مانی جوانه‌های *S. montanum* (۴۲٪) در پروتکل ویتریفیکاسیون بود که در آن از سازگاری سرمایی و پیش‌تیمار سوکروز ۰/۷M به‌مدت یک هفته و محیط پس‌تیمار MS بدون هورمون استفاده شد. بهترین درصد جوانه‌زنی(۹۹/۷۹٪) و تولید گیاهچه (۹۳/۹۷٪) بذور در پروتکل ویتریفیکاسیون بود که بذور تحت پس‌تیمار آب جاری در مدت زمان ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سلول‌های *S. montanum* در هر دو پروتکل ویتریفیکاسیون و کپسوله‌شدن-دهیدراسیون زنده‌مانی ۱۰۰٪ را نشان دادند و میانگین رشدشان تقریباً نزدیک به یکدیگر بود. تولید اندام ریشه‌مانند بعد از انتقال به محیط اندام‌زایی در سلول‌های کپسوله‌شده مشاهده شد. با توجه به نتایج بالای زنده‌مانی جوانه‌ها و بذور حفاظت‌شده *S. montanum* در شرایط فراسرد در پروتکل ویتریفیکاسیون (هرچند که سلول‌های آن در هر دو پروتکل، زنده ماندند) می‌توان پیشنهاد کرد که پروتکل ویتریفیکاسیون، روشی کارآمد است که به‌آسانی برای حفاظت و نگهداری گونه‌های دیگر غلات نیز، می‌تواند بکار برده شود.

کلمات کلیدی: فراسرد، نیتروژن مایع، *Secale montanum*، شرایط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*)، کالوس، ویتریفیکاسیون و کپسوله‌شدن-دهیدراسیون.