پیشرفت های اخیر به سوی کاربرد بیوتکنولوژی در حفاظت درون شیشه ای منابع ژنتیکی گیاهان زینتی کمیاب و در حال انقراض

بهزاد کاویانی

دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، b.kaviani@yahoo.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹

Recent advances towards the application of biotechnology in *in vitro* conservation (slow growth and cryopreservation) of genetic resources of rare and endangered ornamental plants

Behzad Kaviani

Associate Professor, Department of Horticultural Science, Agriculture college, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, b.kaviani@yahoo.com

Received: March 2020 Accepted: April 2020

Abstract

Every year hundreds of new cultivars are produced and introduced. Each ornamental plant is a valuable genetic pool that is used as a source for breeding program. In the last decade there has been an alarming increase in the number of disappearing and dangered species. Several valuable ornamental plants such as *Fritillaria imperialis*, *Buxus hyrcana*, *Lilium ledebourii*, *Taxus sempervirens* and some orchids are in danger of extinction. Some of these species have medicinal value in addition to aesthetic value. Therefore, the rapid development of approaches to long-term preservation of germplasm of these species under extinction seems to be necessary. Many of these plants are preserved in seed banks or as live plants in natural conditions. These preservation methods are unreliable, hard and costly. Therefore, complementary *in vitro* approaches represent an important tool for *ex situ* conservation of plants germplasm. Today, the conservation of ornamentals germplasm can take advantage of innovative techniques which allow preservation *in vitro* (slow growth storage and cryopreservation) of plant material. Periodic subcultures decrease in slow growth storage. Cryopreservation is the storage of explants at ultra-low temperature (−196°C/−321ºF). At such temperature, all the biological reactions within the cells are hampered; hence the technique makes available the storage of plant material for theoretically unlimited periods of time. Cryopreservation is the only technique currently available for the long-term preservation of the germplasm of plant species that are vegetatively propagated or has recalcitrant seeds. In recent years, some cryopreservation methods based on vitrification of intracellular solution such as encapsulation-vitrification and droplet-vitrification and the use of aluminum cryo-plate (D and V types) have been developed. Today, the encapsulation-dehydration technique is most often used. In the future, combined techniques, DNA conservation, survey of genetic stability of cryopreserved species, especially chimeras, cryotherapy and finding a simple, reliable and inexpensive approach and simpler regeneration of preserved explants will probably be the much popular. Unlike micropropagation, there is not much study on cryopreservation of ornamental plants especially those under danger of extinction and rare. Thus, the aim of this review paper is to evaluate different *in vitro* conservation and cryopreservation techniques and their use for the storage, breeding and exchange of genetic sources of ornamental plants especially those under the threat of extinction.

Key words: Artificial seed, Cryoprotectants, Gene bank, Liquid nitrogen, Plant germplasm

چکیده

هر ساله صدها رقم جدید از گیاهان زینتی تولید و معرفی می‌شوند. هر گیاه زینتی یک خزانه‌ی ژنتیکی با ارزش است که به‌عنوان یک منبع برای برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در دهه‌ی گذشته یک افزایش هشداردهنده‌ای در تعداد گونه‌های منقرض‌شده و در حال انقراض وجود داشته است. تعدادی از گیاهان زینتی با ارزش از جمله لاله‌ی واژگون، شمشاد خزری، سوسن چلچراغ، سرخدار و برخی ارکیدها در معرض خطر انقراض قراردارند. برخی از این گونه‌ها علاوه بر ارزش زینتی، ارزش دارویی نیز دارند. بنابراین، توسعه‌ی سریع رویکردهایی برای حفظ و نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم این گونه‌های در حال انقراض ضروری به‌نظر می‌رسد. بسیاری از این گیاهان در بانک‌های بذر و یا به‌عنوان گیاهان زنده در شرایط طبیعی، نگهداری می‌شوند. این روش‌های نگهداری؛ غیرقابل اطمینان، سخت و هزینه‌بر هستند. بنابراین، رویکردهای درون‌شیشه‌ای به‌عنوان روش‌های مکمل، ابزار مهمی برای حفاظت خارج از محل طبیعی ژرم‌پلاسم گیاهان در نظر گرفته می‌شوند. امروزه، حفاظت ژرم‌پلاسم گیاهان زینتی با فنون نوآورانه به‌ویژه با فناوری تولید بذر مصنوعی که اجازه‌ی نگهداری درون‌شیشه‌ای (ذخیره‌ی رشد آهسته و حفاظت انجمادی) مواد گیاهی را می‌دهد، انجام می‌شود. در ذخیره‌ی رشد آهسته، واکشت‌های دوره‌ای کاهش می‌یابند. حفاظت انجمادی، ذخیره‌ی ریزنمونه‌ها در دمای بسیار پایین (ازت مایع، ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد/۳۲۱- درجه‌ی فارنهایت) است. در چنین دمایی همه‌ی فعالیت‌های درون سلولی متوقف می‌شوند، بنابراین از نظر تئوری؛ این فن، نگهداری مواد گیاهی را برای دوره‌های نامحدود زمانی ممکن می‌سازد. حفاظت انجمادی تنها فن قابل‌دسترس حال حاضر برای نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم گونه‌هایی است که به‌صورت رویشی تکثیر می‌شوند یا بذر حساس به خشکی دارند. در سال‌های اخیر چندین روش حفاظت انجمادی بر اساس شیشه‌ای‌کردن محلول درون‌سلولی از جمله کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن، قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن و استفاده از صفحات انجمادی آلومینیومی (نوع V و D) توسعه یافته است. امروزه، پرکاربردترین روش حفاظت انجمادی، کپسوله‌کردن-آب‌برداری است. در آینده؛ فنون ترکیبی، نگهداری DNA، بررسی ثبات ژنتیکی گونه‌های منجمدشده به‌ویژه کایمرها، انجماد درمانی و یافتن رویکردهای ساده، قابل اعتماد و ارزان و باززایی راحت‌تر ریزنمونه‌های نگهداری‌شده، بیشتر مورد توجه قرار خواهند گرفت. برخلاف ریزازدیادی، مطالعه‌ی زیادی روی نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان زینتی به‌ویژه گیاهان زینتی کمیاب و در حال انقراض انجام نشده است. بنابراین، هدف این مقاله‌ی مروری، بررسی فنون مختلف حفاظت درون‌شیشه‌ای و حفاظت انجمادی و استفاده از آنها برای ذخیره، اصلاح و مبادله‌ی منابع ژنتیکی گیاهان زینتی به‌ویژه گیاهان زینتی در حال انقراض است.

کلمات کلیدی: ازت مایع، بانک ژن، بذر مصنوعی، حمایت‌کننده‌های انجمادی، ژرم‌پلاسم

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

سال ۱۳۹۹، دوره ۱۵، شماره ۲، صص۳۷-۲۳

مقدمه و کلیات

بسیاری از گیاهان زینتی از جمله گیاهان خانواده‌های ارکید، کاکتوس و جنتیاناسه در معرض خطر انقراض قرار دارند. حفظ و نگهداری تنوع زیستی گیاهی برای برنامه‌های اصلاح گیاهی و مهندسی ژنتیک ضروری است. نگهداری منابع ژنتیکی گیاهی می‌تواند یا در زیستگاه‌های طبیعی (نواحی بکر و پارک‌های طبیعی) و یا در خارج از این زیستگاه‌ها (*Ex situ*) انجام شود. نگهداری در زیستگاه طبیعی و برخی روش‌های نگهداری در خارج از زیستگاه طبیعی مانند نگهداری ژرم‌پلاسم در بانک ژن، به‌دلیل فرسایش ژنتیکی (Genetic erosion) حاصل از آلودگی‌ها، بیماری‌ها، آسیب توسط انسان و شرایط نامناسب آب و هوایی، سخت و پرهزینه است (Engelmann, 2004). از انواع روش‌های نگهداری خارج از زیستگاه طبیعی گونه‌ها می‌توان به روش‌هایی مانند نگهداری بذر در بانک‌های ژن، بانک‌های ژن زراعی، باغ‌های گیاه‌شناسی و ذخیره‌ی DNA و دانه‌ی گرده اشاره کرد (Rao, 2004; Panis and Lambardi, 2005). کشت درون‌شیشه‌ای، یک روش مناسب جای‌گزین برای نگهداری خزانه‌ی ژنتیکی گیاهان است که امکان نگهداری به‌صورت بانک بذر وجود ندارد. این روش نه تنها شرایط را برای تکثیر کلونی و مبادله‌ی امن مواد گیاهی فراهم می‌کند بلکه می‌تواند برای نگهداری میان‌مدت و درازمدت ژرم‌پلاسم مورد استفاده قرار گیرد. چند رویکرد درون‌شیشه‌ای برای ذخیره‌ی گونه‌هایی که به‌صورت رویشی تکثیر می‌شوند و گونه‌های دارای بذرهای حساس به خشکی، توسعه یافته است (Kaviani, 2011). این فنون را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم بندی کرد: روش‌های رشد آهسته (Slow growth procedures) که در آن، ژرم‌پلاسم به‌صورت کشت‌های گیاهی استریل یا گیاهچه‌ها، برای ذخیره‌ی کوتاه‌مدت و میان‌مدت در محیط‌های مغذی قرار داده می‌شوند، و نگهداری در دمای بسیار پایین یا حفاظت انجمادی (Cryopreservation) که در آن مواد گیاهی در ازت مایع برای درازمدت، ذخیره می‌شوند (Engelmann and Engels, 2002). فنون حفاظت درون‌شیشه‌ای می‌توانند برای غلبه بر مشکلات خفتگی، نیاز به نیروی انسانی و نیاز به فضای کشت و کار مفید باشند. اخیرا، حفاظت انجمادی به‌عنوان یک ابزار حذف ویروس‌ها از گیاهان آلوده‌شده (Cryotherapy) جانشین روش‌های مرسوم از بین بردن ویروس‌ها مانند کشت مریستم و گرمادرمانی (Thermotherapy) شده است (Helliot *et al.*, 2002). در روش‌های رشد آهسته، ریزنمونه در محیط حاوی کاهنده‌های رشد کشت می‌شوند یا کشت‌ها در شرایط محیطی نامساعد مانند تاریکی و سرما قرار داده می‌شوند. این شرایط فاصله‌ی بین واکشت‌ها را زیاد می‌کند. در این روش نیاز به واکشت از بین نمی‌رود و احتمال آلودگی و تنوع سوماکلونال، علی‌رغم کم‌شدن، وجود دارد. مزیت این روش، حفظ کشت‌ها در حالت رشد فعال است (Vendrame *et al.*, 2014). قوانین سخت‌گیرانه‌ی بین‌المللی، برای مبادله‌ی مواد گیاهی عاری از هر گونه بیماری، وضع شده‌اند. نگهداری در شرایط رشد آهسته با حفاظت کوتاه‌مدت و میان‌مدت ژرم‌پلاسم

یک روش امن برای این مبادله است. در طی ۱۰ سال گذشته، در مقایسه با روش‌های کلاسیک حفاظت انجمادی، پیشرفت‌های جدید بر اساس شیشه‌ای‌شدن و کپسوله کردن-آب‌برداری ایجاد شده‌اند که برای طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی کاربرد دارند، اگرچه استفاده‌ی معمول اینها هنوز محدود است (Engelmann, 2004). در گونه‌های زینتی، فنون انجماد یک‌مرحله‌ای (مانند شیشه‌ای‌کردن، کپسوله-کردن-آب‌برداری و کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن) به‌طور گسترده‌ای نسبت به سردکردن آهسته ارجح است (Özüdoğru *et al*., 2010). فنون حفاظت انجمادی بر اساس ذخیره‌ی بافت به‌ویژه بافت‌های با میزان آب کم و تقسیم سلولی زیاد مانند مریستم‌ها و جنین‌ها در دمای بسیار پایین ازت مایع (۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد/۳۲۱- درجه‌ی فارنهایت) یا مرحله‌ی بخار آن (۱۵۰- درجه‌ی سانتی‌گراد/۲۳۸- درجه‌ی فارنهایت) بدون آسیب هستند. در این دما فعالیت‌های سوخت‌وسازی، بیوشیمیایی و تقسیم سلولی متوقف می‌شوند که ذخیره‌ی درازمدت امکان‌پذیر می‌گردد (Bernard *et al*., 2002; Sakai, 2004; Engelmann, 2011). مزیت عمده‌ی این روش؛ کاهش نرخ کشت‌های درون‌شیشه‌ای، فضا و لوازم کم مورد نیاز، خطر کم آلودگی و کاهش تنوع سوماکلونال (حفظ ثبات فنوتیپی و ژنوتیپی)، همچنین تسهیل مبادله‌ی بین‌المللی ژرم‌پلاسم است (Gonzalez-Arnao *et al*., 2008). حفاظت انجمادی درازمدت لاین‌های سلولی جنین‌زا یک ابزار با ارزش در تغییر ژنتیکی است (Kulus and Zalewska, 2014). حفاظت انجمادی همچنین در حفظ تنوع ژنتیکی با ذخیره‌ی گونه‌های وحشی برای اهداف اصلاحی به‌ویژه گونه‌های در حال انقراض کمک می‌کند. حفاظت انجمادی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بسیاری از گونه‌های زراعی و باغی از جمله گیاهان زینتی در حال انقراض استفاده شده است (Kaviani, 2011). توسعه‌ی روش‌های حفاظت انجمادی اجازه‌ی ذخیره‌ی انواع مختلف مواد گیاهی مانند مریستم‌ها، کالوس، بذرها، سرشاخه‌ها، اجسام شبه‌پروتوکورم و جنین‌های زیگوتی و سوماتیک را می‌دهد (Panis and Lambardi, 2005; Khoddamzadeh *et al*., 2011; Kaviani, 2011). در مجموع؛ مراحل کلی برای حفاظت انجمادی به سه مرحله تقسیم می‌شود، شرایط گیاهان مادری؛ شرایط کرایوژنیک شامل کاربرد محلول‌های حفاظتی، میزان سردشدن و گرم‌شدن؛ مراحل باززایی. حفاظت انجمادی یک روش امیدوارکننده برای حفظ گیاهان کمیاب و در معرض خطر انقراض است. مطالعه‌ی کمی روی حفاظت درون‌شیشه‌ای و حفاظت‌انجمادی گیاهان زینتی به‌ویژه گیاهان زینتی در حال انقراض انجام شده است.

هدف از این مقاله‌ی مروری، بررسی انواع روش‌های نگهداری، ارائه‌ی دست‌آوردهای پیشین، مشکلات حفاظت درون‌شیشه‌ای و حفاظت‌انجمادی، یافته‌های جدید و چشم‌انداز آینده در مورد حفاظت گیاهان زینتی به‌ویژه گیاهان زینتی در حال انقراض است.

انتخاب ماده‌ی گیاهی: به‌طور معمول از همه‌ی ریزنمونه‌ها می‌توان برای حفاظت درون‌شیشه‌ای استفاده کرد، اما ریزنمونه‌هایی که بعد از مدت زمان نگهداری بدون گذر از فاز کالوس به‌طور مستقیم

باززایی شوند، مناسب‌تر هستند. بنابراین، از بذر، جنین، محور جنینی و سرشاخه بیشتر استفاده می‌شود (جدول ۱). این ریزنمونه‌ها به‌دلیل اندازه‌ی بزرگ‌تر، آسان‌تر جداسازی می‌شوند و میزان بقای بیشتری دارند. به‌علاوه، به‌دلیل اینکه امروزه تولید تجاری گیاهان زینتی به‌طور عمده بر اساس ریزازدیادی است، استفاده از ریزنمونه‌های مشتق‌شده از کشت درون‌شیشه‌ای نیز مناسب هستند (Rout *et al*., 2006). در مجموع مشخص شده است که با فنون بر اساس کپسوله‌کردن، ریزنمونه‌های بزرگ‌تر و با فنون بر اساس شیشه‌ای‌کردن، ریزنمونه‌های کوچک‌تر مناسب‌ترند (Kulus and Zalewska, 2014).

جدول ۱- نگهداری در شرایط حفاظت انجمادی برخی گیاهان زینتی در حال انقراض یا کمیاب توسط ریزنمونه‌ها و فنون مختلف

Table 1- Storage some endangered or rare ornamental plants under freezing protection conditions by various explants and techniques

گونه‌ی گیاهی	نوع ریزنمونه	فن یا پیش‌تیمار	درصد بقا	منبع
Lilium sp.	سرشاخه، نوک ریشه	شیشه‌ای‌کردن	۶۰-۹۰	Bouman *et al*., 2003
Lilium ledebourii	بذر	غوطه‌ورکردن مستقیم در ازت مایع	۰-۷۵	Kaviani *et al*., 2008, 2009, 2010
	محور جنینی	کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن	۰-۱۰	
	جوانه‌ی محوری	شیشه‌ای‌کردن	۰	
	پیازچه	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۰	
Lilium ledebourii	سرشاخه از جوانه‌های نابجا	پیش‌کشت-خشک‌کردن	۵۸-۹۰	Yi *et al*., 2013
		قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن	۵۳-۸۸	
Lilium hybrids	مریستم راسی از جوانه‌های نابجا	شیشه‌ای‌کردن و قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن	۳۵-۸٤	Chen *et al*., 2011
Bletilla striata	بذر نابالغ	غوطه‌ورکردن مستقیم در ازت مایع	۸	Hirano *et al*., 2005
		شیشه‌ای‌کردن	۸۱-۹۲	
Dendrobium cruentum	پروتوکورم	شیشه‌ای‌کردن	۳۳	Thammasiri, 2008
		کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۲۷	
Dendrobium cariniferum	پروتوکورم	کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن	۱۵	Thammasiri, 2008
Vanda tricolor	بذر بالغ	غوطه‌ورکردن مستقیم در ازت مایع	۱۰	Jitsopakul *et al*., 2012
		شیشه‌ای‌کردن	۱٤	
Lilium japonicum	مریستم راسی	شیشه‌ای‌کردن	٦۰	Matsumoto *et al*., 1995
Vanda coerulea	اجسام شبه‌پروتوکورم	قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن	۵	Jitsopakul *et al*., 2009
Vanda planifolia	راس شاخه	قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن	۱۰-۳۰	Gonzalez-Arnao *et al*., 2009b
Grammatophyllum speciosum	پروتوکورم	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۲٤	Sopalun *et al*., 2010
Oncidium bifolium	بذر	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۵-٦۷	Flachsland *et al*., 2006
	پروتوکورم	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۱۱-۸۲	
Phalaenopsis bellina	اجسام شبه‌پروتوکورم	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۳۰-٤۷	Khoddamzadeh *et al*., 2011
Dendrobium nobile	اجسام شبه‌پروتوکورم	کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن	۷٦-۷۸	Mohanty *et al*., 2012
Buxus hyrcana Pojark.	سرشاخه	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	٦۰	Kaviani and Negahdar, 2017
Dendrobium spp.	اجسام شبه‌پروتوکورم	کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن	٤۰-۹۵	Teixeira da Silva *et al*., 2014
		کپسوله‌کردن-آب‌برداری	٤۰-۹۵	
Dendrobium hybrids	دانه‌ی گرده	شیشه‌ای‌کردن	٦۰	Vendrame *et al*., 2008
Doritis pulcherrima	پروتوکورم	شیشه‌ای‌کردن	۰-۹۰	Thammasiri, 2000
Rhynchostylis gigantea	پروتوکورم	شیشه‌ای‌کردن	۱۹	Thammasiri, 2008
Seidenfadenia mitrata	پروتوکورم	شیشه‌ای‌کردن	٦۷	Thammasiri, 2008

Dendrobium candidum Wall.	پروتوکورم	کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن	۸۵	Yin; Hong, 2009
Oncidium bifolium Sims	بذر	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	۸۰	Flachsland *et al*., 2006
Vanda coerulea	بذر	شیشه‌ای‌کردن	٦٧	Thammasiri, 2008
Cyrtopodium hatschbachii Pabst	بذر	کپسوله‌کردن-آب‌برداری	٦٤	Surenciski *et al*., 2012
Bletilla striata Rchb. f.	جنین زیگوتی	شیشه‌ای‌کردن	٦٠	Ishikawa *et al*., 1997
Brassidium Shooting Star	اجسام شبه‌پروتوکورم	قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن	۳۰	Rahmah *et al*., 2015
Vanda Kaseem's Delight	اجسام شبه‌پروتوکورم	شیشه‌ای‌کردن	۵۱	Poobathy *et al*., 2012

حفاظت درون‌شیشه‌ای

رشد آهسته (ذخیره‌ی میان‌مدت): با استفاده از روش‌های رشد آهسته می‌توان مواد گیاهی را به‌مدت چند سال در شرایط کشت بافت با واکشت دوره‌ای نگهداری کرد. کشت‌های رشد آهسته می‌توانند یا در یک اتاق کشت بافت یا در یک محل با دمای پایین (معمولا ۱۵-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شوند (Engelmann, 2004). این روش برای نگهداری کوتاه و میان‌مدت نمونه‌ی گیاهی با حداقل رشد به‌کار می‌رود. در مورد گیاهان زینتی در حال انقراض به‌ویژه ارکیدها استفاده از اجسام شبه‌پروتوکورم و بذر و همچنین استفاده از بافت‌های رویشی مانند سرشاخه‌ها مرسوم است (Engelmann, 2011; Teixeira da Silva, 2014). در این روش نمونه‌های گیاهی به‌مدت ۱۲-۱ ماه نگهداری می‌شوند و عوامل مختلف از جمله حضور یا غیاب نور، سن، اندازه و حالت فیزیولوژیکی کشت‌ها می‌توانند روی زمان بیشینه‌ی ذخیره اثر داشته باشند (Özüdoğru *et al*., 2010). برای نگهداری میان‌مدت، هدف کاهش رشد و در نتیجه افزایش فواصل بین واکشت‌ها است. این روش‌ها قادرند دوره‌ی واکشت را از ۱۲ ماه تا بیش از ٤ سال برای برخی گونه‌ها افزایش دهند. کاهش رشد ژرم‌پلاسم گیاهی با تغییر ترکیب محیط کشت و به‌طور عمده توسط کاهش سوکروز، مانیتول یا غلظت عناصر معدنی، کاربرد اسید آبسیزیک و کاهش سطح اکسیژن قابل‌دسترس به ژرم‌پلاسم توسط پوشاندن ریزنمونه‌ها با یک لایه از محیط مایع یا روغن یا توسط قراردادن آنها در اتمسفر کنترل‌شده نیز ممکن است (Engelmann and Engels, 2002). رطوبت نمونه باید بین ۵۰-٤۰ درصد باشد. دما و تراکم نوری پایین، پیامدهای فیزیولوژیکی همانند کاهش تنفس، از دست رفتن آب، پژمردگی و تولید اتیلن را به‌دنبال دارد که باعث ذخیره‌ی امن ژرم‌پلاسم می‌شود (Withers and Engelmann, 1997). بذرهای مصنوعی، تیله‌ها (Artificial seeds) اولین بار در دهه‌ی ۱۹۷۰ به‌عنوان یک مورد

قابل‌قیاس جدید با بذرهای گیاهی، مناسب برای ذخیره‌ی میان‌مدت معرفی شدند. بذرهای مصنوعی توسط پوشش‌دارکردن یک ماده‌ی گیاهی در یک محیط کشت حاوی آلژینات سدیم و سپس یک محیط کشت حاوی کلرید کلسیم تولید می‌شوند (Engelmann, 2011). امروزه تنها تعداد معدودی گزارش در ارتباط با نگهداری درون‌شیشه‌ای گیاهان زینتی کمیاب و در حال انقراض به‌چشم می‌خورد که همگی بر اساس رویکرد ذخیره‌ی سرمایی هستند (Kaviani, 2011).

روش‌های رشد آهسته

روش‌های فیزیکی: دمای پایین (۱۰-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای گیاهان معتدله و ۲۵-۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای گیاهان گرمسیری)، تراکم نوری پایین، دوره‌ی نوری کوتاه، تاریکی مطلق، کاهش اندازه‌ی ظرف کشت، افزایش تراکم گیاهی در هر ظرف، تغییر اتمسفر فضای کشت از روش‌های فیزیکی نگهداری در شرایط با رشد آهسته هستند (Engelmann, 2011).

روش‌های شیمیایی: تغییر ترکیب محیط کشت، کاربرد ممانعت‌کننده‌های اتیلن، محیط‌های کمینه (Minimal media)، تغییر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (کاهش یا حذف)، استفاده از کاهنده‌های رشد مانند اسید آبسیزیک، سایکوسل، فلورپریمیدول، اسید تری‌یودوبنزوییک، آنسیمیدول، تغییر پتانسیل اسمزی با استفاده از موادی مانند سوکروز و مانیتول، کاهش کربن، کاهش مواد معدنی، کاهش سطح اکسیژن قابل‌دسترس به‌ژرم‌پلاسم توسط پوشاندن ریزنمونه‌ها با یک لایه از محیط مایع یا روغن یا توسط قراردادن آنها در اتمسفر کنترل‌شده از روش‌های شیمیایی نگهداری در شرایط با رشد آهسته هستند (Vasile *et al*., 2011). عمومی‌ترین روش مورد استفاده، کاهش دما همراه با کاهش تراکم نوری است. این عوامل، یک پیامد فیزیولوژیکی برای القای کاهش قابل‌توجه در واکنش‌های فیزیولوژیکی و در نهایت کاهش رشد نمونه دارد.

روش‌های ترکیبی: مهم‌ترین روش ترکیبی استفاده از کاهنده‌های رشد در محیط کشت به‌همراه نگهداری کشت‌ها در دمای پایین است.

حفاظت انجمادی

مقدار آب سلول مهم‌ترین عامل اثرگذار روی توانایی نمونه‌ی گیاهی برای نگهداری در ازت مایع است، بنابراین مقدار بهینه‌ی آب باید تعیین شود. سلول‌ها برای اجتناب از تشکیل بلورهای یخ باید آب‌برداری شوند. بیشترین آسیب در طی نگهداری ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پایین، آسیب غیرقابل‌برگشت ایجادشده توسط تشکیل کریستال‌های یخی درون‌سلولی است (Dumet and Benson, 2000). یکی از بهترین روش‌ها برای پیشگیری از تشکیل کریستال یخ در ازت مایع بدون آسیب به غشای پلاسمایی و کاهش حداکثری در آب سلولی، شیشه‌ای‌کردن، یعنی جامدشدن غیرکریستالی آب است (Panis and Lambardi, 2005). شیشه‌ای‌کردن (تولید یک حالت شیشه‌ای بی‌شکل) مشکلات حاصل از تشکیل یخ را پیشگیری می‌کند. برای شیشه‌ای‌کردن یک محلول دو شرط لازم است، غلظت کافی محلول؛ میزان سردشدن کافی محلول (Panis and Lambardi, 2005). روش دوم برای خشک‌کردن، استفاده از یک

جعبه‌ی جریان (Flow box)، با جریان هوا، دما و رطوبت مشخص و یا خشک‌کردن با انواع محلول‌های نمکی اشباع‌شده است (Zamecnik *et al.*, 2009). به‌طورکلی، روش‌هایی که باعث کاهش آب سلول، کاهش حجم سلول و افزایش غلظت محلول‌های درون‌سلولی می‌شوند عبارتند از خشک‌کردن در معرض جریان هوا (Air drying or air desiccation)، آب‌برداری انجمادی (Freeze dehydration)، آب‌برداری اسمزی با استفاده از ترکیبات حمایت‌کننده‌ی نفوذناپذیر مانند قندها، قند-الکل‌ها و افزودنی‌های با وزن ملکولی بالا مانند پلی اتیلن گلایکول، استفاده از ترکیبات نفوذکننده به‌درون سلول مانند دی متیل سولفوکساید، گلیسرول و برخی اسیدهای آمینه مانند پرولین و سازگاری، عادت‌کردن با افزایش در میزان قندها، پروتئین‌ها، گلیسرول، پرولین و گلایسین بتائین.

روش‌های حفاظت انجمادی

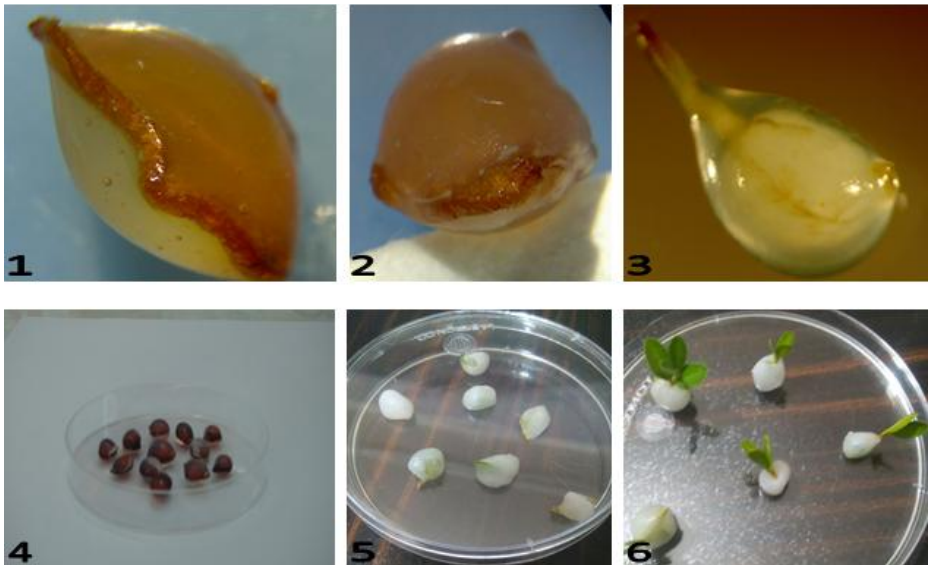
انجماد آهسته یا انجماد دو مرحله‌ای، Tow-step freezing **(روش سنتی)**: روش انجماد آهسته برای نگهداری مواد گیاهی تمایزنیافته مانند کالوس و سوسپانسیون سلولی مناسب است. پیش‌کشت روی محیط حاوی حمایت‌کننده‌های انجمادی مانند گلوکز، سوکروز، پلی‌اتیل‌گلایکول و دی‌متیل‌سولفوکساید که اغلب با سازگاری سرمایی، سازگاری قندی یا آب‌برداری اسمزی همراه است، برای افزایش بقای مواد نگهداری‌شده در ازت مایع برای برخی گونه‌ها مفید تشخیص داده شده است (Kulus and Zalewska, 2014). بیشترین مطالعه در زمینه‌ی نگهداری نمونه‌های گیاهی گیاهان زینتی با روش انجماد آهسته روی جنس‌های مختلف میخک از جمله میخک‌های در حال انقراض انجام شده است (Fukai *et al.*, 1991b).

پیش‌کشت و پیش‌کشت-آب‌برداری: آب‌برداری سلول‌های گیاهی قبل از نگهداری در ازت مایع باید انجام شود. پیش‌کشت ریزنمونه‌ها با سوکروز قبل از نگهداری در ازت مایع یک مرحله‌ی بنیادی در بسیاری از دستورالعمل‌های حفاظت انجمادی برای گیاهان زینتی است (Özüdoğru *et al.*, 2010). در طی آب‌برداری و انجماد در ازت مایع، پروتیین‌ها و غشاها وقتی که قندهای محلول مانند سوکروز در سلول تجمع می‌یابند، تحت حمایت قرار می‌گیرند (Sakai and Engelmann, 2007). در اغلب مطالعات حفاظت انجمادی، پیش‌کشت مواد گیاهی روی محیط‌های جامد حاوی ۰/۳ تا ۰/۷۵ مولار سوکروز به‌مدت ۱ تا ۲ روز، بیشترین موفقیت در حفاظت انجمادی را به دنبال داشت (Kim *et al.*, 2006). علاوه بر سوکروز (پرکاربردترین کربوهیدرات)، برخی قند-الکل‌ها و کربوهیدرات‌های دیگر از جمله سوربیتول، مانیتول، تری‌هالوز و گلوکز نیز مورد استفاده قرارگرفتند.

خشک‌کردن: خشک‌کردن مواد گیاهی، آب‌برداری ساده تحت جریان هوای استریل هود لامینار فلو یا روی سیلیکاژل به‌مدت ۱ تا ۵ ساعت قبل از غوطه‌ورکردن در ازت مایع است. این روش برای برخی از گیاهان زینتی در حال انقراض مانند سوسن چلچراغ و برخی ارکیدها گزارش شد (Lin *et al.*, 2004; Kaviani *et al.*, 2009).

پوشش‌دارکردن-آب‌برداری: روش پوشش‌دارکردن-آب‌برداری توسط Fabre و Dereuddre (۱۹۹۰) بر اساس تولید بذر مصنوعی توسعه یافت. در فنون بر اساس پوشش‌دار یا کپسوله‌کردن، تولید بذرهای مصنوعی (Synthetic seeds or artificial seeds) با کیفیت بالا نیاز است (شکل ۱). کپسوله‌کردن، محصورکردن ریزنمونه‌ها در یک کپسول حمایتی غیرسمی است. این روش آسان و ارزان می‌باشد. این فناوری در ابتدا برای تولید بذر مصنوعی به‌کار رفت. امروزه، سایر ریزنمونه‌ها مانند سرشاخه‌ها، قطعات گره‌ای، پیازچه‌ها و حتی نمونه‌های کالوس نیز کپسوله می‌شوند و کپسوله‌کردن به‌عنوان یک فن برای ریزازدیادی بسیاری از گیاهان زینتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ozden-Tokatli *et al.*, 2008). در یک روش نگهداری انجمادی کپسوله-کردن-آب‌برداری معمول، ریزنمونه‌ها ابتدا در ۳ درصد آلژینات سدیم (همراه با سوکروز در غلظت آغازین) قرار داده می‌شوند، سپس ریزنمونه‌ها در محلول ۰/۱ مولار کلرید کلسیم به‌مدت ۲۰ تا ٤٥ دقیقه (پلیمریزه‌شدن تیله) غوطه‌ور می‌گردند.

تیله‌های ایجادشده، در محلول اسموتیک با غلظت بالای سوکروز و یا در شرایط فیزیکی (زیر هود لامینار فلو یا در سیلیکاژل) آب‌برداری می‌شوند. بنابراین، بعد از آب‌برداری اسمزی، خشک‌کردن تیله‌ها به‌مدت ۲ تا ٦ ساعت ضروری است (Moges *et al.*, 2004). تیله‌های آلژینات، از مواد گیاهی خشک‌شده در برابر تنش‌های مکانیکی، اکسیداتیو و اسموتیک (غلظت بالای سوکروز) در طی ذخیره حفاظت می‌کند و کار با نمونه‌های کوچک را قبل و بعد از حفاظت انجمادی آسان می‌کند(Teixeira da Silva *et al.*, 2014). میزان آب اغلب مواد گیاهی بعد از آب‌برداری باید بین ۱۵ تا ۲۰ درصد باشد (Kaviani, 2011).



شکل ۱- ریزنمونه‌های کپسوله شده‌ی برخی گیاهان زینتی در حال انقراض. ۱) بذر سوسن چلچراغ از روبرو، ۲) بذر سوسن چلچراغ از نمایی دیگر، ۳) پیاز سوسن چلچراغ، ٤) بذرهای سوسن چلچراغ، ٥) سرشاخه‌ی شمشاد خزری، ٦) سرشاخه‌ی شمشاد خزری در حال جوانه‌زنی (برگرفته از مقالات مولف).

Fig 1- Capsule explants some endangered ornamental plants. 1) Seeds of Lilium ledebourii from the front, 2) Lilium ledebourii seeds from another view, 3) Lilium ledebourii bulb, 4) Lilium ledebourii seeds, 5) *Buxus sempervirens* ranch, 6) *Buxus sempervirens* branch sprouting(Taken from the author's articles).

تجربه نشان می‌دهد که کپسوله‌کردن-آب‌برداری، حمایت بهتری ازریزنمونه نسبت به شیشه‌ای‌کردن و استفاده از سوکروز به‌تنهایی را فراهم می‌نماید (Kaviani *et al*., 2008, 2010; Sopalun *et al*., 2010).

کپسوله‌کردن به ریزنمونه اجازه‌ی مقاومت بیشتر در برابر شرایط تنش‌زای اسمزی، کمبود آب و انجماد را می‌دهد. کپسوله‌کردن ریزنمونه‌ها می‌تواند رشد آنها را بعد از ذوب‌کردن تحریک کند. فن کپسوله‌کردن-آب‌برداری، محبوب‌ترین فن در میان گیاهان زینتی است (Kulus and Zalewska, 2014). این فن به‌طور گسترده‌ای برای بذر و اجسام شبه‌پروتوکورم ارکیدها (از جمله ارکیدهای در حال انقراض) مورد استفاده قرار گرفت (Khoddamzadeh *et al*., 2011; Vendrame *et al*., 2014). افزودن برخی ترکیبات از جمله ترکیبات ثانویه‌ای مانند اسید سالیسیلیک به‌درون کپسول می‌تواند موفقیت این روش را اصلاح کند. اسید سالیسیلیک تحمل ریزنمونه به خشکی را افزایش می‌دهد (Bernard *et al*., 2002). یک تغیر جالب بررسی استفاده از ژنراتور قطره‌ای الکترواستاتیک (Electrostatic droplet generator) است که اجازه‌ی اتوماسیون این روش را می‌دهد (Al-Hajry *et al*., 1999).

شیشه‌ای‌کردن

اغلب روش‌های حفاظت انجمادی بر پایه‌ی روش شیشه‌ای‌کردن است. روش شیشه‌ای‌کردن به‌طور موفقیت‌آمیزی در حفاظت انجمادی سلول‌های گیاهی (به‌ویژه گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری) در آغاز دهه‌ی ۱۹۹۰ استفاده شد. این روش نیاز به استفاده از یک محلول بسیار غلیظ دارد تا بافت‌های گیاهی را بدون آسیب، آب‌برداری کند. روش شیشه‌ای‌کردن بر اساس خروج اکثر یا تمامی آب قابل انجماد سلول‌ها است که بعد از آن انجماد بسیار سریع منجر به شیشه‌ای‌کردن (ساختار شیشه‌ای بی‌شکل بدون تشکیل کریستال‌های یخی) محلول‌های درون‌سلولی می‌شود. این روش به‌ویژه برای گونه‌های حساس به دمای پایین به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (Panis and Lambardi, 2005). شیشه‌ای‌کردن، یک افزایش در چسبندگی سلولی است، بنابراین قابلیت مقاومت گیاه در برابر تنش‌های آب‌برداری اسمزی و انجماد افزایش می‌یابد (Reed *et al*., 2005). در مجموع، کلید حفاظت انجمادی موفق توسط شیشه‌ای‌کردن، میزان تحمل آب‌برداری مواد گیاهی است (Sakai and Engelmann, 2007). تحمل به محلول شیشه‌ای‌کردن توسط بهینه‌کردن تیمارهای پیش‌شرط (Preconditioning)، سازگاری سرمایی و کشت روی محیط با غلظت بالای قند، ۰/۷-۰/۳ مولار، به مدت‌های مختلف، ۱ یا ۲ روز) و بارگیری، همچنین مدت زمان (۱۰ تا ۲۵ دقیقه برای اغلب گیاهان علفی) و دمای در معرض قرار گرفتن به محلول شیشه‌ای‌کردن (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) حاصل می‌شود (Sakai and Engelmann, 2007). اولین مرحله در فن شیشه‌ای‌کردن، بارگیری ریزنمونه‌ها با یک مخلوط رقیق‌شده از حمایت‌کننده‌ها در برابر انجماد است (پیش-شیشه‌ای‌کردن، Pre-vitrification)، تا مقاومت مواد گیاهی به محلول‌های غلیظ‌تر و سمی که در شیشه‌ای‌کردن

استفاده می‌شود، افزایش یابد. پرکاربردترین محلول بارگیری (Loading) ، شامل ۲ مولار گلیسرول + ۰/٤ مولار سوکروز است (Sakai, 2000). زمان استفاده از این محلول (عمدتا ۱۵ تا ۲۵ دقیقه) نقش مهمی در موفقیت این روش دارد که در مورد برخی گونه‌ها از جمله *Lilium japonicum* نشان داده شد (Matsumoto *et al*., 1995; Thinh and Takagi, 2002). محلول بارگیری، نفوذپذیری غشای پلاسمایی به مواد حمایت‌کننده در برابر انجماد را افزایش می‌دهد و از آسیب سلول‌ها طی در معرض قرارگرفتن با محلول شیشه‌ای‌کردن پیشگیری می‌کند. در مرحله‌ی بعد، مواد گیاهی می‌توانند با حمایت‌کننده‌های غلیظ‌تر و موثرتر تیمار شوند. پرکاربردترین محلول شیشه‌ای‌کردن، محلول شیشه‌ای‌کردن گیاهی ۲ (PVS_2)، شامل مخلوطی از ترکیبات حمایت‌کننده‌ی نفوذناپذیر و نفوذپذیر به درون سلول (۳۰ درصد وزن به حجم گلیسرول + ۱۵ درصد وزن به حجم اتیلن گلایکول + ۱۵ درصد وزن به حجم DMSO در محیط مایع با ۰/٤ مولار سوکروز و pH ۵/۸) است. این محلول می‌تواند به‌راحتی تا زیر ۷۰= درجه‌ی سانتی‌گراد، سرد شود و در دمای ۱۱۵- درجه‌ی سانتی‌گراد به‌صورت یک حالت شیشه‌ی نسبتا ثابت در آید. افزایش مرحله به مرحله‌ی غلظت PVS_2 اثر سمی آن را کاهش می‌دهد. بررسی مقاله‌ی مروری که توسط Vendrame و همکاران (۲۰۱٤) با عنوان حفاظت انجمادی ارکیدها (شامل جنس‌ها و گونه‌های تعداد زیادی از ارکیدها از جمله ارکیدهای در حال انقراض و کمیاب) همچنین مقاله‌ی Galdiano و همکاران (۲۰۱۲) نوشته شده است نشان داد که پرکاربردترین فن حفاظت انجمادی، شیشه‌ای‌کردن است. حفاظت انجمادی یک ارکید در حال انقراض (*Dendrobium chrysanthum*) و برخی ارقام هیبرید آن با روش شیشه‌ای‌کردن با موفقیت انجام شد (Teixeira da Silva *et al*., 2014). قبل از باززایی نمونه‌های گیاهی نگهداری‌شده در ازت مایع، محلول شیشه‌ای‌کردن باید خارج شود. بنابراین، بعد از ذوب‌کردن، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول تخلیه (Unloading) ۱/۲ مولار سوکروز قرار داده شدند، سپس کشت گردیدند. محلول تخلیه، در برداشت حمایت‌کننده‌ها در برابر انجماد و در پیشگیری از شوک اسمزی بعد از ذوب‌کردن مهم است (Kim *et al*., 2006). امروزه محلول‌های شیشه‌ای‌کردن گیاهی ۳ و ٤ (PVS_3 و PVS_4) نیز معرفی و مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kobayashi *et al*., 2006). برخی محققان، محلول-های جدید شیشه‌ای‌کردن را معرفی کرده‌اند که از آن جمله می‌توان به "محلول تغییریافته‌ی شیشه‌ای‌کردن پایه توسط افزودن گلیسرول و سوکروز و یا کاهش غلظت DMSO و PEG، یا تغییر PVS_3 با کاهش غلظت گلیسرول و سوکروز" و شیشه‌ای‌کردن دو مرحله‌ای (Two-step vitrification) اشاره کرد (Kim *et al*., 2009). کاربرد این محلول‌های شیشه-ای‌کردن برای برخی گونه‌ها در یک روش قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن، مناسب‌تربودن PVS_3 نسبت به PVS_2 را نشان داد (Kim *et al*., 2009). اخیرا یک روش حفاظت انجمادی نوآورانه توسط Nadarajan و Pritchard (۲۰۱٤) توسعه یافت. این روش که شیشه‌ای‌کردن نفوذ خلا (Vacuum infiltration

vitrification) نامیده می‌شود، نفوذ سریع و یکنواخت محلول شیشه‌ای‌کردن را تضمین می‌کند که منتج به بازیابی موفقیت‌آمیز بعد از ذوب‌کردن می‌گردد.

قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن

روش قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن، نوعی روش جدید شیشه‌ای‌کردن است که ترکیبی از روش قطره‌ای انجماد می‌باشد (Rahmah *et al*., 2015). در این روش ریزنمونه‌هایی که قبلا با محلول بارگیری یا محلول شیشه‌ای‌کردن تیمار شده‌اند، در یک قطره از محلول شیشه‌ای‌کردن گیاهی (۱۵-۵ میکرولیتر) روی نوارهای فویل آلومینیوم قرار می‌گیرند، سپس درون ازت مایع غوطه‌ور می‌شوند. روش قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن به‌عنوان یک روش امیدوارکننده برای حفاظت انجمادی موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Sakai and Engelmann, 2007; Gonzalez-Arnao *et al*., 2008). این فن بر اساس هدایت حرارتی بالای آلومینیوم که سرعت سردشدن (۱۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در هر دقیقه) و ذوب‌کردن را افزایش می‌دهد، بنا شده است، درحالی‌که سرعت سردشدن کریوویال پلی‌پروپیلن و بذر مصنوعی حدود ٦ درجه‌ی سانتی‌گراد در هر دقیقه است (Dumet *et al*., 2002). از آنجایی که مواد گیاهی در یک قطره‌ی کوچک از محلول PVS روی نوارهای آلومینیوم منجمد می‌شوند و مستقیما در معرض ازت مایع قرار می‌گیرند، این روش انتقال حرارت سریع‌تر را تسهیل می‌کند و احتمال به‌دست‌آمدن حالت شیشه‌ای در طی مراحل سردکردن بالاتر است. یک دلیل برای عدم استفاده‌ی گسترده از این روش حفاظت انجمادی، نیاز به مهارت فنی زیاد است. این مشکل توسط Yamamoto و همکاران (۲۰۱۱) با طراحی یک صفحه‌ی آلومینیومی جدید (صفحه‌ی انجمادی، Cryo-plate) (نوع D و V) حل شد. حفاظت انجمادی یک ارکید در حال انقراض (*Dendrobium chrysanthum*) و برخی ارقام هیبرید آن با روش قطره-شیشه‌ای‌کردن با موفقیت انجام شد (Teixeira da Silva *et al*., 2014). استفاده از روش قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن برای حفاظت انجمادی برخی گونه‌ها طی سال‌های اخیر رو به افزایش است.

فنون ترکیبی به‌ویژه کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن

طی ۱۰ سال گذشته، روش‌های جدید و ترکیبی نگهداری ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پایین، بر اساس شیشه‌ای‌کردن توسعه یافته است. کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن ترکیبی از فنون کپسوله‌کردن-آب‌برداری و شیشه‌ای‌کردن است. این فن مزیت‌های شیشه‌ای‌کردن (سرعت اجرا) و کپسوله‌کردن-آب‌برداری (راحتی دست‌کاری ریزنمونه‌های کپسوله‌شده) را ترکیب می‌کند (Sakai and Engelmann, 2007). این روش زمان مورد نیاز برای آب‌برداری را کاهش می‌دهد. کاویانی و همکاران (۲۰۱۰) از فن کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن برای سوسن چلچراغ استفاده کردند. این فن برای برخی ارکیدهای در حال انقراض مورد استفاده قرار گرفت (Teixeira da Silva *et al*., 2014). البته، درصد موفقیت در برخی از این مطالعات پایین بود. Teixeira da Silva و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که از ۳۷ مقاله‌ی کارشده روی حفاظت انجمادی نوعی ارکید (*Dendrobium*)، ۱۲ مقاله با روش

کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن انجام شد. بیشترین ریزنمونه‌ی مورد استفاده؛ بذر و پروتوکورم بود (Vendrame *et al*., 2014).

برتری روش کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن بر روش کپسوله‌کردن در برخی مطالعات نشان داده شده است (Matsumoto, 2017). روش ترکیبی دیگر کپسوله‌کردن و قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن است که Sekizawa و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از فن صفحه‌ی انجمادی V انجام دادند. تا کنون فنون ترکیبی در مورد گیاهان زینتی زیاد به‌کار گرفته نشده است. علت اصلی آن در معرض قرار گرفتن طولانی ریزنمونه با DMSO است که کپسول را متلاشی می‌کند. کاربرد این روش با اصلاح معایب آن احتمالا در آینده افزایش خواهد یافت.

نتیجه‌گیری کلی

بیوتکنولوژی مشارکت قابل‌توجهی در حفاظت اصلاح‌شده و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی داشته است. پیشرفت سریع در فنون کشت بافت، حفاظت انجمادی و مارکرهای ملکولی در اصلاح ذخیره‌ی ژرم‌پلاسم گیاهی، دستکاری ژنتیکی و مبادله‌ی ژرم‌پلاسم کمک شایانی کرده است. برای حمایت از تعداد زیادی از گیاهان زینتی، به‌ویژه گیاهان زینتی در حال انقراض و کمیاب نیاز به کاربرد ابزارهای بیوتکنولوژیکی مدرن است. نقش پیش‌تیمارها یا حفاظت‌کننده‌ها در برابر انجماد برای بقای ریزنمونه‌ها و ثبات ژنتیکی آنها بسیار حائز اهمیت است. یافتن این حمایت‌کننده‌ها و روش‌های مورد استفاده که تحمل مواد گیاهی به انجماد را افزایش دهد، از اولویت‌های محققان حفاظت انجمادی گیاهان است. معرفی فنون انجمادی موثر و ارزان بر اساس القای تحمل به آب‌برداری و شیشه‌ای‌کردن باید مورد توجه باشد. برخی روش‌های حفاظت انجمادی مانند روش شیشه‌ای‌کردن نفوذ خلا، روش‌های ترکیبی به‌ویژه کپسوله‌کردن-شیشه‌ای‌کردن و قطره‌ای-شیشه‌ای‌کردن و استفاده از صفحات انجمادی، جدید هستند، اما نیاز به مطالعه‌ی بیشتر روی آنها وجود دارد. کشف و توسعه‌ی مارکرهای ملکولی جدید برای تعیین دقیق ثبات و تنوع ژنتیکی مواد گیاهی حفاظت انجمادی‌شده حائز اهمیت است. ذخیره‌ی DNA، به‌عنوان روش جدید بانک ژن، به‌سرعت در حال توسعه است. این فن برای تبدیل‌شدن به یک رویکرد نگهداری عملی، نیاز به بررسی بیشتری دارد.

منابع

1) Al-Hajry, H.A., S.A. Al-Maskry, L.M. Al-Kharousi, O. El-Mardi, W.H. Shayya and M.F.A. Goosen, 1999. Electrostatic encapsulation and growth of plant cell cultures in alginate. Biotechnology Progress,
2) 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.
3) Dumet, D. and E.E. Benson, 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Italy, IPGRI.
4) Dumet, D., A. Grapin, C. Bailly and N. Dorion, 2002. Revisiting crucial steps of anencapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance ofthawing method in the case of

14) Kaviani, B., 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Aus. J. Crop Sci. 5: 778–800.
15) Kaviani, B., D. Hashemabadi, A. Mohammadi Torkashvand and S. Sedaghat Hoor, 2009. Cryopreservation of seeds of lily (*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.): use of sucrose and dehydration. Afr. J. Biotechnol. 8 (16): 3809–3810.
16) Kaviani, B., M.N. Padasht Dahkaei, D. Hashemabadi and A.H. Darabi, 2010. Cryopreservation of *Lilium ledebourii* (Baker) Bioss. by encapsulation-vitrification and *in vivo* media for planting of germplasm. Amer-Eur. J. Agric. Environ. Sci. 8 (5): 556–560.
17) Kaviani, B., M.R. Safari-Motlagh, M.N. Padasht-Dehkaei, A.H. Darabi and A. Rafizadeh, 2008. Cryopreservation of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] germplasm by encapsulation-dehydration. Intl. J. Bot. 4 (4): 491–493.
18) Khoddamzadeh, A.A., U.R. Sinniah, P. Lynch, M.A. Kadir, S.B. Kadzimin and M. Mahmood, 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson by encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 107: 471–481.
19) Kim, H.H., Y.G. Lee, D.J. Shin, H.C. Ko, J. Gwag, E.G. Cho and F. Engelmann, 2009. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. Cryobiol. 59 (3): 370–418.
20) Kim, H.M., J.H. Shin and J.K. Sohn, 2006. Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying. Cryobiol. 1 (53): 69–74.
21) Kulus, D. and M. Zalewska, 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. Sci. Hortic. 168: 88–107.
22) Lin, W.Q., H.W. Bian, J.H. Wang and M.Y. Zhu, 2004. Analysis of dehydrins in cryopreservation of protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. Acta Hortic. Sinica, *Pelargonium* meristems. Plant Sci. 163: 1121–1127.
5) Engelmann, F., 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro* Cell. Dev.–Biol. Plant, 40: 427–433.
6) Engelmann, F. and J.M.M. Engles, 2002. Technology and strategies for *ex situ* conservation. In: Ramanatha Rao, V., Brown, A. H. D., Jackson, M. T. (eds.) Managing Plant Genetic Diversity, Wallingford, Rome, CAB International, IPGRI, pp. 89–104.
7) Engelmann, F., 2011. Use of biotechnology for conservation of plant biodiversity. *In Vitro* Cell. Dev.–Biol. Plant, 47: 5–16.
8) Fabre, J. and J. Dereuddre, 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. CryoLett. 11: 413–426.
9) Fukai, S., M. Goi and M. Tanaka, 1991b. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. Euphytica, 56: 149–153.
10) Galdiano, R.F.J., E.G.M. Lemos, R.T. Faria and W.A. Vendrame, 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and supercool X1000. Sci. Hortic. 148: 154–160.
11) González-Arnao, M.T., A. Panta, W.M. Roca, R.H. Escobar and F. Engelmann, 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 92: 1–13.
12) Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, R. Swennen, P. Lepoivre and E. Frison, 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). Plant Cell Rep. 20: 1117–1122.
13) Kobayashi, T., T. Niino and M. Kobayashi, 2006. Cryopreservation of tobacco BY-2 suspension cell cultures by vitrification with encapsulation. Plant Biotechnol. 23: 333–337.

31: 64–68 (in Chinese with English abstract).
23) Matsumoto, T., 2017. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. Rev. Agric. Sci. 5: 13–20.
24) Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada, 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 41: 237–241.
25) Moges, A.D., R.A. Shibli and N.S. Karam, 2004. Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *In Vitro* Cell. Dev.–Biology Plant, 40: 389–395.
26) Nadarajan, J. and H.W. Pritchard, 2014. Biophysical characteristics of successfuloilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. PLoS One, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096169.
27) Ozden-Tokatli, Y., A. De Carlo, F. Gumusel1, S. Pignattelli and M. Lambardi, 2008. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental species. Prop. Ornamen. Plants, 8 (1): 17–22.
28) Özüdoğru, E.A., A. Previati and M. Lambardi, 2010. *In vitro* conservation and cryopreservation of ornamental plants. In: Jain, S. M. (Ed.), Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants, 589, 1st ed. Humana Press, Hertfordshire, pp. 303–305.
29) 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.
30) Rahmah, R., S.A. Mubbarakha, U.R. Sinniahb and S. Subramaniam, 2015. Effects of droplet-vitrification on *Brassidium* Shooting Star's orchid protocorm-like bodies (PLBs). Sci. Hortic. 197: 254–260.
31) Rao, N.K., 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. Afr. J. Biotechnol. 3 (2): 136–145.
32) Reed, B.M., L. Schumacher, D. Dumet and E.E. Benson, 2005. Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure in corporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of *Ribes* germplasm. *In Vitro* Cell. Dev.–Biol. Plant, 41: 431–436.
33) Rout, G.R., A. Mohapatra and S.M. Jain, 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. Biotechnol. Adv. 24: 531–560.
34) Sakai, A. and F. Engelmann, 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLett. 28 (3): 151–172.
35) Sakai, A., 2000. Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. International of Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp. 1–7.
36) Sakai, A., 2004. Plant cryopreservation. In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E. E. (eds.). Life in the Frozen State, London, CRC Press, pp. 329–346.
37) Sekizawa, K., S. Yamamoto, T. Rafique, K. Fukui and T. Niino, 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitryfication method using aluminium cryo-plates. Plant Biotechnol. 28: 401–405.
38) Sopalun, K., K. Kanchit and K. Ishikawa, 2010. Vitrification-based cryopreservation of *Grammatophyllum speciosum* protocorm. CryoLett. 31 (4): 347–357.
39) Teixeira da Silva, J.A., 2014. Successful storage of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) under low temperature conditions. J. Gen. Eng. Biotechnol. 12: 71–74.
40) Teixeira da Silva, J.A., S. Zeng, R.F. Galdiano, J. Dobra´nszki, J.C. Cardoso and W.A. Vendrame, 2014. *In vitro*

conservation of *Dendrobium* germplasm. Plant Cell Rep. 33: 1413–1423.

41) Thinh, N.T. and H. Takagi, 2002. Cryopreservation of *Colocasia esculenta* L. Schott (Taro). In: Towill, L. E., Bajaj, Y.P.S. (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 50. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 96–119.
42) Vasile, L., V. Simona, A. Eliza and Z. Maria, 2011. Methods of conservation of the plant germplasm. *In vitro* techniques. Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Protectia Mediului Vol. XVII.
43) Vendrame, W.A., R.T. de Faria, M. Sorace and S.A. Sahyun, **2014. Orchid cryopreservation.**Ciênc Agrotechnique, Lavras, 38 (3): 213–229.
44) Withers, L.A. and F. Engelmann, 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: Altman, A. (ed.). Biotechnology in Agriculture, Marcel Dekker, NY, pp. 57-88.
45) Yamamoto, S., K. Fukui and T. Niino, 2011. A new cryopreservation method for vegetatively propagated plant genetic resources using aluminum cryo-plates. Dev. Technol. 10: 10–11.
46) Zamecnik, J., M. Faltus and R. Kotkova, 2009. Glass transition determination in *Allium* shoot tips after dehydration. The 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, Leuven, Belgium, 5-9 April 2009.