مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا (*Brassica napus* L.) به‌روش شیشه‌ای‌شدن

Study of Cryopreservation in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seeds Via Vitrification Method

محسن منصوری[۱]، مهدی کاکایی[۲*]، محمدرضا عبداللهی[۳] و شیرین شریفی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۳۱

چکیده

در این آزمایش، حفاظت انجمادی به روش شیشه‌ای‌شدن بذور دو ژنوتیپ کلزا به نام‌های آرک-۲ (ARC-2) و میلینا (Milena) با دو نوع محلول حفاظت‌کننده PVS2 و PVS3 در ۵ سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه) انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفت درصد جوانه‌زنی تفاوت‌های معنی‌داری را بین زمان‌های مختلف تیمار بذور، ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل این دو فاکتور در سطح ۱ درصد و همچنین اثر متقابل زمان تیمار با نوع محلول حفاظت‌کننده در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. تیمار بذور کلزا رقم میلینا (Milena) با محلول‌های محافظت-کننده به‌مدت ۱۰۰ دقیقه بیش‌ترین میزان جوانه‌زنی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. همچنین تیمار بذور کلزا به‌مدت ۱۰۰ دقیقه با محلول PVS2 و زمان‌های ۲۰ و ۶۰ دقیقه با محلول PVS3 در مقایسه با سایر ترکیبات تیماری بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی را نشان دادند. زمان‌های مختلف تیمار بذور، ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل این دو تفاوت‌های معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل ژنوتیپ در نوع محلول و اثر متقابل سه‌گانه تفاوت‌های معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد برای صفت طول ریشه‌چه نشان دادند. به‌طوری‌که ۲۰ دقیقه تیمار بذور کلزا رقم میلینا (Milena) با محلول حفاظت‌کننده PVS3 بیش‌ترین میزان طول ریشه‌چه را ایجاد کرد. در ارتباط با صفت طول ساقه‌چه زمان‌های مختلف تیمار بذور و همچنین اثرات متقابل سه‌گانه ژنوتیپ، نوع محلول و زمان تیمار در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شدند که ترکیب تیماری ۶۰ دقیقه تیمار بذور کلزا رقم آرک-۲ (ARC-2) با محلول PVS3 بیش‌ترین میزان طول ساقه‌چه را در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، حفاظت انجمادی، شیشه‌ای‌شدن، محلول حفاظت‌کننده، جوانه‌زنی بذر

۱. کارشناس‌ارشد اصلاح‌نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کرمانشاه
۲. دانشجوی دوره دکتری اصلاح‌نباتات (ژنتیک)، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۴. کارشناس بخش پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
*: نویسنده مسوول Email: Mehdikakaei37@gmail.com

مقدمه

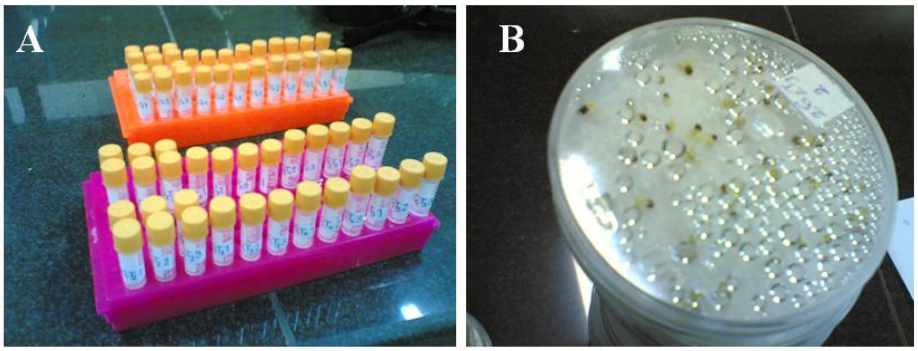
کلزا گیاهی است یک‌ساله از خانواده چلیپائیان (*براسیکاسه*) (Brassicaceae) با نام علمی *براسیکا نیپوس* (*Brassica napus* L.)، در جنس *براسیکا*، کلزا مهم‌ترین دانه روغنی بوده که ارقام پاییزه آن در شرایط آب‌وهوایی معتدل، خنک و مرطوب بیشینه عملکرد تولید را دارند *کاکایی* (Kakaei, 2009). ژرم-پلاسم گیاهانی که دارای تکثیر رویشی یا بذرهای رکالسیترانت هستند عموماً به روش بانک‌های مزرعه‌ای حفاظت می‌شوند. روش مزرعه‌ای با وجود ایجاد ذخایر ژنتیکی در دسترس، به-دلیل هزینه بالا و قرار گرفتن ذخایر ژنتیکی در معرض حمله آفات و بیماری‌ها و شرایط بد آب‌وهوایی ، روش چندان مناسبی نیست. بنابراین حفاظت انجمادی روشی مناسب جهت نگهداری ذخایر ژنتیکی گیاهان می‌باشد *لاینچ* و همکاران (Lynch *et al*., 2007). حفاظت انجمادی شامل نگهداری ژرم-پلاسم در درازمدت و دمای بسیار پایین می‌باشد که با کاهش و یا توقف فعالیت‌های متابولیکی همراه است. استفاده از این روش امکان نگهداری مواد بدون آسیب آفات، بیماری‌ها و تغییرات ژنتیکی را در مدت‌های طولانی فراهم می‌کند *بینسون* و همکاران؛ *موکادیری* و همکاران (Benson *et al*., 1996; Moukadiri *et al*., 1999). حفاظت انجمادی بر روی بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی انجام شده و در برخی موارد جوانه-زنی غیر عادی و یا مرگ به علت آسیب‌های درونی گزارش شده است. این مشکلات اغلب به دلیل خصوصیات بذر مانند اندازه، رطوبت و ترکیبات شیمیایی بوده است *بیلیتی* و همکاران (Belletti *et al*., 1990). برای حفاظت انجمادی بافت‌های گیاهی، به‌طور وسیعی از محلول PVS2 استفاده شده است که توسط *ساکای* و همکاران (Sakai *et al*., 1990) ارائه شده است. این محلول دارای پتانسیل بالایی در حفظ بافت‌های گیاهی می‌باشد. حفاظت انجمادی می‌تواند در نیتروژن مایع و یا فاز گازی این ماده انجام شود که برای جلوگیری از شکل گیری کریستال‌های یخ، نمونه‌ها بایستی در دمایی پایین‌تر از ۱۳۰- قرار گیرند. برای بازیابی نمونه‌ها معمولاً از ذوب سریع در آب ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود تا امکان تشکیل دوباره کریستال و آسیب به بافت به حداقل برسد *توواید* (Towill, 1991). حفاظت انجمادی بذر در بسیاری از گونه‌های گیاهی با موفقیت انجام شده اما در برخی گزارش‌ها به مشکلاتی از قبیل جوانه‌زنی غیرعادی و مرگ بذر به‌دلیل آسیب داخلی اشاره شده است *چمیلارز* (Chmielarz, 2010). *خولینا و ورونکووا* (Kholina and Voronkova, 2012) در تحقیقی بر روی چندگونه وحشی لگوم در روسیه اعلام کردند که بذرهای خشک لگوم‌ها در شرایط حفاظت انجمادی بدون-تیمار اولیه بین ۸۵-۳ درصد قدرت جوانه‌زنی خود را حفظ می‌کنند. *مارتینکوا و هونک* (Martinkova and Honek, 2007) بذور گیاه *داندیلیون* (Dandelion) را با استفاده از چند پیش‌تیمار دمایی و خشک‌کردن با ترتیب‌های مختلف مورد حفاظت انجمادی قرار دادند. براساس نتایج به‌دست آمده کاهش رطوبت بذر بر روی جوانه‌زنی پس از انجماد مؤثر بوده است اما رژیم‌های دمایی قبل از انجماد، تأثیری بر توانایی بذور برای جوانه‌زنی پس از انجماد نداشته است. *واکویی* و همکاران (Wakui *et al*., 1998) جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا را با موفقیت مورد حفاظت انجمادی قرار دادند. این جنین‌ها تحت تیمار کاهش رطوبت با اسمز و همچنین دماها و زمان‌های مختلف نگهداری در شرایط انجماد قرار گرفتند. در این تحقیق جنین‌های قرار گرفته در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه روز که قبلاً با استفاده از محلول نمک ۸۰ درصد تیمار شده بودند، بالاترین درصد باززایی را نشان دادند. در تحقیق حاضر به‌منظور یافتن روش مناسب جهت حفظ ژرم‌پلاسم کلزا، بذور دو رقم مختلف کلزا تحت تیمار با محلول‌های مورد استفاده در حفاظت انجمادی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از بذرهای دو ژنوتیپ گیاه کلزا به نام‌های آرک-۲ (ARC-2) و میلینا (Milena) برای یافتن روش مناسب جهت حفاظت انجمادی ژرم‌پلاسم این گیاه در آزمایشگاه تحقیقاتی کشاورزی دانشگاه آزاد کرمانشاه و آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه بوعلی‌سینا صورت گرفت. بذور دو رقم با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۳٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه و الکل ۷۰٪ به‌مدت ۷۰ ثانیه استریل شدند و تعداد ۴۰ بذر پس از خشک‌شدن در دمای اتاق، به ویال‌های انجمادی ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند (شکل 1A) و مورد تیمار با محلول‌های حفاظت‌کننده قرار گرفتند. محلول‌های استفاده شده دو محلول پرکاربرد در حفاظت انجمادی بافت گیاهی به نام‌های PVS2 و PVS3 بودند *وولک* و همکاران (Volk *et al*., 2006). این محلول‌ها با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شدند و تیمار بذور با این محلول‌ها در فضای هود لامینار انجام شد.

محلول PVS2 شامل ۳۰٪ گلیسرول، ۱۵ درصد اتیلن‌گلایکول، ۱۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید با زمینه محیط‌کشت مایع MS و محلول PVS3 شامل ۴۰٪ گلیسرول و ۴۰ ٪ ساکارز می‌باشد (WV). تیمار بذور با دو محلول در دمای اتاق و

در ۵ سطح زمانی برای آب‌گیری شامل۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه انجام گردید. پس از اتمام زمان تیمار بذور، محلول‌های قدیمی از ویال‌ها خارج شده و محلول تازه به‌میزان میلی‌لیتر (ml) ۰/۵ در ویال‌ها ریخته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شده و مستقیماً در نیتروژن مایع قرار داده شدند. زمان ماندن نمونه‌ها در نیتروژن مایع ۲۰ ساعت بود. پس از این مدت ویال‌ها از نیتروژن مایع خارج شده و در بن‌ماری حاوی آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۱۰ دقیقه ویال‌ها از بن‌ماری خارج شدند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. در مرحله‌ی بعد محلول‌های حافظت‌کننده از ویال‌ها خارج شده و برای پاک شدن محلول-های حفاظت‌کننده از نمونه‌های بذری، نمونه‌ها با یک محلول غلیظ که در اینجا محلول ساکارز ۰/۵ مولار بود شستشو داده شدند. بعد از این کار بذرها با آب مقطر استریل چند بار شستشو داده شدند و در نهـــایت در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری روی کاغذ صافی کشت شدند و با آب مقطر تغذیه شدند (شکل 1B). جوانه‌زنی بذرها پس از ۱۰ روز یادداشت برداری شد و طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (در هر پتری‌دیش ۴۰ بذر قرار گرفت) انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن برای سه صفت درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت.



شکل ۱: تیمار نمونه‌های بذور کلزا با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی (A)، نمونه‌های بذور کلزا کشت شده در داخل پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی (B)

Fig. 1: Treatment of rapeseed seeds with different protective solutions before cryopreservation (A), rapeseed seed samples cultured in Petri dishes containing the filter paper after cryopreservation (B)

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها برای سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در جدول ۱ نشان داده شده است. برای صفت درصد جوانه‌زنی زمان‌های مختلف تیمار، ژنوتیپ‌های مختلف و اثرات متقابل این دو فاکتور تفاوت‌های معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نشان دادند (جدول ۱). همچنین اثرات متقابل زمان تیمار با نوع محلول‌های حفاظت-کننده اختلافات معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ نشان دادند (جدول ۱).

با توجه به معنی‌دارشدن اثر متقابل زمان اعمال تیمار و ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل زمان اعمال تیمار با نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی، مقایسه میانگین ها برای اثرات ساده زمان اعمال تیمار، ژنوتیپ و نوع محلول محافظت‌کننده به‌طور جداگانه انجام نگرفت. نتایج مقایسه میانگین‌ها برای اثر متقابل ژنوتیپ و زمان اعمال تیمار نشان داد که اثر متقابل ۱۰۰ دقیقه تیمار با محلول حفاظت‌کننده در ژنوتیپ میلینا (Milena) دارای تفاوت معنی‌دار با سایر اثرات متقابل بود و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۹۱/۲۵٪) را نشان داد (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محلول حفاظت‌کننده با زمان اعمال تیمار نشان داد که سه ترکیب تیمار زمان ۱۰۰ دقیقه با محلول PVS2 (با ۹۰/۰۸٪ جوانه‌زنی) و زمان‌های تیمار۲۰ و ۶۰ دقیقه با محلول PVS3 به‌ترتیب با ۸۵/۵٪ و ۸۵٪ جوانه‌زنی دارای تفاوت معنی‌داری با سایر ترکیبات تیماری بودند و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی را نشان دادند (شکل ۲). این نتایج نشان داد که با کاهش بیشتر رطوبت بذور در اثر استفاده از محلول‌های حفاظت‌کننده، میزان زنده ماندن بذرها افزایش می‌یابد که با نتایج *مارتینکوا* و همکاران مطابقت داشت *مارتینکووا و هونیک* (Martinkova *et al.* 2007). همچنین *لی* و همکاران (Li *et al.*, 2008) نیز در تحقیقی اثر کاهش حداکثری رطوبت بذر را بر میزان موفقیت

حفاظت انجمادی در گیاه *دایگوفیلوم زانتوایکسیلون* (*Zygophyllum xanthoxylon*) مورد بررسی قرار دادند. این محققین گزارش کردند که کاهش رطوبت از ۱۱ درصد تا حدود ۴ درصد باعث افزایش درصد موفقیت حفاظت انجمادی خواهد شد و تأثیر منفی بر خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهچه‌ها نخواهد داشت اما کاهش بیشتر رطوبت باعث کاهش قابل-ملاحظه در قدرت جوانه‌زنی بذرها خواهد شد.

جدول۱: میانگین مربعات اثر زمان اعمال تیمار، ژنوتیپ و نوع محلول حفاظت‌کننده بر روی سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذور کلزا

Table 1: Mean of squares for the effects of time of treatment, genotype and protective solution on germination percentage, root length and shoot length of rapeseed seeds

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	طول ریشه‌چه Root length	طول ساقه‌چه Shoot length
زمان تیمار Time of treatment (A)	4	104.825**	43.354**	3.924**
ژنوتیپ Genotype (B)	1	3204.704**	28.945**	0.218^{ns}
زمان تیمار × ژنوتیپ Time of treatment ×Genotype (A×B)	4	746.892**	7.204**	0.815^{ns}
نوع محلول Kind of solution (C)	1	100.104^{ns}	0.117^{ns}	0.002^{ns}
زمان تیمار × نوع محلول Time of treatment × Kind of solution (A×C)	4	415.354*	0.450^{ns}	0.267^{ns}
ژنوتیپ × نوع محلول Genotype × Kind of solution (B×C)	1	85.204^{ns}	5.394*	0.320^{ns}
زمان تیمار × ژنوتیپ × نوع محلول Time of treatment×Genotype × Kind of solution (A×B×C)	4	128.017^{ns}	3.075*	1.568**
اشتباه Error	40	121.121	0.866	0.3820
ضریب تغییرات ٪ Coefficient of variation		14.27	14.32	14.53

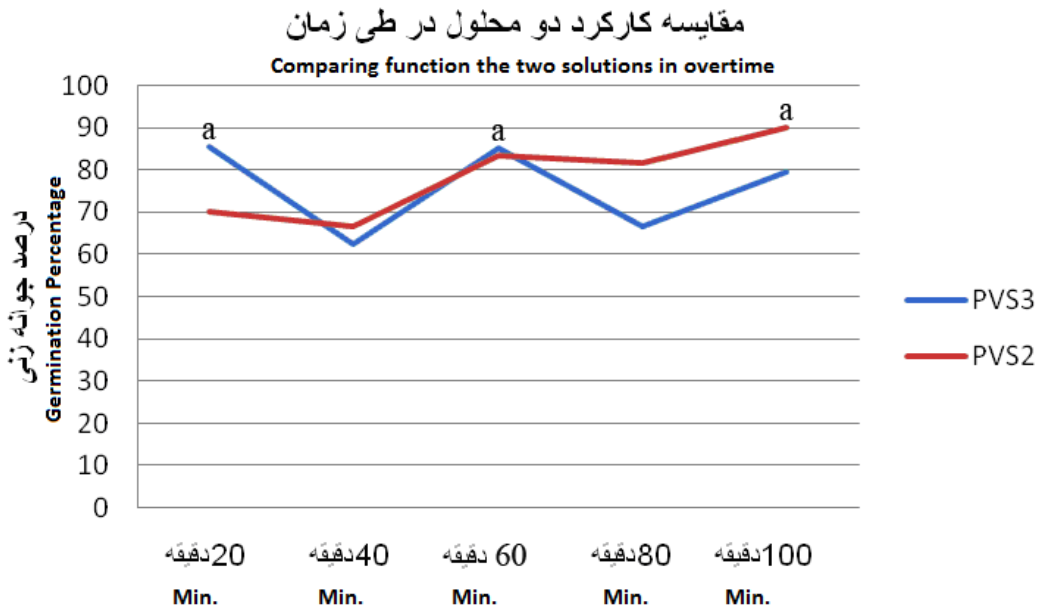
* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪، ns: غیرمعنی‌دار

* and **: Significant at level of 5% and 1% , ns: none significant

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و زمان تیمار با محلول محافظت‌کننده بر روی صفات درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه بذور کلزا

Table 2: Mean comparison for interaction effects of genotype and time of treatment with protective solutions on germination percentage and root length of rapeseed seeds

ژنوتیپ Genotype	Milena					ARC-2				
زمان اعمال تیمار (دقیقه) Time of treatment (min.)	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100
درصد جوانه‌زنی Germination percentage	85.42ab	68.33c	80.00abc	78.33abc	91.25a	75.74bc	80.08abc	43.75d	85.42ab	82.92ab
طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Root length (cm)	7.79ab	7.93ab	8.93a	7.62bc	7.40bc	3.12e	5.38d	2.87e	6.48c	7.48bc



شکل ۲: مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کلزا با دو نوع محلول حفاظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی

Fig. 2: Comparison the effect of different times of treatment with two kinds of protective solutions on germination percentage of rapeseed seeds

برای بررسی میزان موفقیت در آزمایش حفاظت انجمادی بذور کلزا، از دو صفت فیزیولوژیکی طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه استفاده شد که تغییرات در این دو پارامتر شامل کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، کندی رشد و یا متوقف شدن زودهنگام رشد نشانه اثرات سوء دماهای بسیار پایین بر روی بذور بوده و بالا بودن مقادیر میانگین برای این دو صفت نشان‌دهنده‌ی موفقیت این روش در تولید گیاهچه‌های سالم می‌باشد. برای صفت طول ریشه‌چه دو فاکتور زمان تیمار و ژنوتیپ و اثر متقابل این دو فاکتور دارای اثر معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ بودند (جدول ۱). همچنین اثر متقابل ژنوتیپ در نوع محلول حفاظت‌کننده و اثر متقابل سه‌گانه زمان اعمال تیمار، ژنوتیپ و نوع محلول حفاظت‌کننده دارای اثر معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بودند (جدول ۱). به‌دلیل معنی‌دارشدن اثرات متقابل زمان اعمال تیمار و ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ در نوع محلول حفاظت‌کننده و اثر متقابل سه‌گانه این فاکتورها، مقایسه میانگین اثرات ساده زمان اعمال تیمار، ژنوتیپ و نوع محلول حفاظت‌کننده به‌طور جداگانه انجام نگرفت. مقایسه میانگین اثر متقابل زمان اعمال تیمار و ژنوتیپ در جدول ۲ نشان می‌دهد که زمان ۶۰ دقیقه اعمال تیمار در ژنوتیپ میلینا (Milena) با ۸/۹۳ سانتی‌متر طول ریشه‌چه بیش‌ترین تأثیر را در طول ریشه‌چه بذور کلزا داشته است (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در نوع محلول حفاظت‌کننده نشان داد که در هر دو ژنوتیپ (آرک-۲ و میلینا) (Milena و ARC-2)، استفاده از محلول حفاظت‌کننده PVS3 بیش‌ترین طول ریشه‌چه (به‌ترتیب ۷/۴۵ و ۶/۹۴ سانتی‌متر) را ایجاد کرد (جدول ۳). مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه برای صفت طول ریشه‌چه نشان داد که ۲۰ دقیقه تیمار بذور کلزا در رقم میلینا (Milena) با محلول حفاظت‌کننده PVS3 بیش‌ترین میزان طول ریشه‌چه (۹/۲۹ سانتی‌متر) را ایجاد کرد (جدول ۴). ترکیب تیماری ۴۰ دقیقه تیمار با محلول حفاظت‌کننده PVS2 در رقم آرک-۲ (ARC-2) کم‌ترین طول ریشه‌چه (۲/۴۷ سانتی‌متر) را ایجاد کرد (جدول ۴).

در تجزیه واریانس صفت صفت طول ساقه‌چه فاکتور زمان اعمال تیمار و همچنین اثر متقابل سه‌گانه زمان اعمال تیمار، ژنوتیپ و نوع محلول حفاظت‌کننده در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بودند (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین‌ها برای اثر زمان تیمار بذور بر روی صفت طول ساقه‌چه نشان داد که زمان ۸۰ دقیقه تیمار با محلول حفاظت‌کننده دارای تفاوت معنی‌دار با سایر تیمارها بود و بیشترین میزان طول ساقه‌چه (۳/۵۲ سانتی‌متر) را نشان داد (جدول ۵). مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه برای صفت طول ساقه‌چه نشان داد که ترکیب تیماری ۶۰ دقیقه تیمار بذور کلزا رقم آرک-۲ (ARC-2) با محلول PVS3 بیشترین میزان طول ساقه‌چه (۴/۲۱ سانتی‌متر) را ایجاد کرد (جدول ۶). همچنین ترکیب تیماری ۴۰ دقیقه با محلول حفاظت‌کننده PVS2 در ژنوتیپ آرک-۲ (ARC-2)

کمترین میزان طول ساقه‌چه را (۱/۳۲ سانتی‌متر) ایجاد کرد (جدول ۶).

جدول ۳: مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) در بذور کلزا
Table 3: Mean comparison for interaction effects of genotype and kind of protective solution on root length (cm) of rapeseed seeds

ژنوتیپ Genotype	نوع محلول Kind of Solution	
	PVS2	PVS3
آرک-۲ (ARC-2)	6.15b	6.94a
میلینا(Milena)	5.46c	7.45a

جدول ۴: مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه زمان تیمار، نوع محلول حافظت‌کننده و ژنوتیپ بر روی صفت طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) در بذور کلزا
Table 4: Mean comparison for triple interaction effects of time of treatment, kind of protective solution and genotype on root length (cm) of rapeseed seeds

ژنوتیپ Genotype	نوع محلول Kind of Solution	زمان اعمال تیمار (دقیقه) Time of treatment (min)				
		20	40	60	80	100
آرک-۲(ARC-2)	PVS2	3.77ef	2.47f	4.20e	6.56cd	2.72ef
	PVS3	8.10abc	7.48bcd	8.55ab	7.31bcd	8.56ab
میلینا(Milena)	PVS2	3.02ef	6.98bcd	5.97d	7.58abcd	7.39bcd
	PVS3	9.29a	8.12abc	7.12bcd	6.85bcd	7.94abc

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کلزا با محلول‌های محافظت‌کننده بر روی صفت طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)
Table 5: Mean comparison for the effects of different times of treatment with protective solutions on shoot length (cm) of rapeseed seeds

صفت Trait	زمان اعمال تیمار (دقیقه) Time of treatment (min)				
	20	40	60	80	100
طول ساقه‌چه Shoot length	1.98c	2.45.bc	2.82b	3.52a	2.94b

جدول ۶: مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه زمان تیمار، نوع محلول محافظت‌کننده و ژنوتیپ بر روی صفت طول ســاقه‌چه (سانتی‌متر) در بذور کلزا
Table 6: Mean comparison for the triple interaction effects of time of treatment, kind of protective solution and genotype on shoot length (cm) of rapeseed seeds

ژنوتیپ Genotype	نوع محلول Kind of Solution	زمان اعمال تیمار (دقیقه) Time of treatment (min)				
		20	40	60	80	100
آرک-۲(ARC-2)	PVS2	2.04cdef	1.32f	1.67ef	2.91bcd	1.89def
	PVS3	2.98bcd	2.55bcde	4.21a	3.30ab	3.06abcd
میلینا (Milena)	PVS2	2.28bcdef	3.35ab	2.29bcdef	2.64bcde	3.11abc
	PVS3	3.50ab	2.97bcd	3.06abcd	2.57bcde	3.16abc

کاهش رطوبت بذر در بسیاری از گونه‌ها عامل افزایش توان تحمل آنها به سرما می‌باشد همچنان که به‌طور طبیعی با گذراندن فصول گرم و خشک سال این کاهش رطوبت اتفاق می‌افتد بینزینگ (Benzing, 2000). کاهش رطوبت معمولاً از دو طریق خشک‌کردن و یا اسمز صورت می‌گیرد. در این تحقیق اثر محلول‌های حفاظت‌کننده و کاهش رطوبت حاصل

از اسمز مانند روش خشک‌کردن باعث کاهش و یا عدم‌ایجاد کریستال‌های درون‌سلولی‌شده و از آسیب به بذر تا حد زیادی جلوگیری نموده است. همچنین اثر دیگر مواد موجود در محلول‌های حفاظت‌کننده مانند گلیسرول کمک به عدم‌تشکیل کریستال در اطراف بذر می‌باشد. نکته‌ی قابل‌توجه در نتایج این تحقیق تفاوت توانایی دو نوع محلول حفاظت‌کننده در زمان-های بالا و پایین می‌باشد به‌طوری‌که در زمان ۲۰ دقیقه محلول PVS3 و در زمان ۱۰۰ دقیقه محلول PVS2 دارای اثر بیشتری بر افزایش توان جوانه‌زنی پس از انجماد بوده است. این تفاوت احتمالاً به‌علت وجود ماده دی‌متیل‌سولفوکساید باشد که جزء مواد حفاظت‌کننده نفوذکننده به سلول‌ها می‌باشد و با افزایش زمان، توانایی بیشتری در نفوذ به سلول‌ها خواهد داشت. دی‌متیل‌سولفوکساید با تأثیر بر دیواره سلولی باعث تحریک و بازشدن روزنه‌ها شده و خروج آب را در اثر اسمز تسهیل می‌کند *آشمور* (Ashmore, 1997).

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۹-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه گروه زراعت و اصلاح‌نباتات دانشگاه بوعلی‌سینا و دانشگاه آزاد اسلامی کرمانشاه (جناب آقای دکتر جوکار) به جهت همکاری در انجام این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌گردد.