مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۸
۶۳-۷۴
www.jcri.ir

مطالعه تأثیر حفاظت انجمادی به روش شیشه‌ای شدن بر جوانه‌زنی بذور پنبه ارقام ورامین و ساجدی

مهدی کاکایی*

استادیار گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک) دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۲

چکیده

ژرم‌پلاسم از جمله منابع ارزشمند در حوزه علوم‌زیستی و کشاورزی محسوب می‌شود که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف اصلی این تحقیق مطالعه تأثیر حفاظت فراسرد به‌روش شیشه‌ای شدن بر شاخص‌های رشد و نموی بذور گیاه پنبه می‌باشد. تکنیک نگهداری در نیتروژن مایع از جمله روش‌های نگهداری بذر و سایر بافت‌های گیاهی است که در آن مواد گیاهی به‌طور نامحدود و بدون از دست دادن قوه نامیه قابل ذخیره‌سازی است. آزمایش حاضر به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی بذور پنبه (بر روی صفات درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه) انجام گرفت. فاکتور اول رقم با دو سطح (ورامین و ساجدی) و فاکتور دوم زمان آب‌گیری با پنج سطح شامل (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه) و فاکتور سوم نوع محلول آب‌گیری در دو سطح (PVS2 و PVS3) و شاهد در نظر گرفته شد. تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم، زمان تیمار و نوع محلول بر روی صفات درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) معنی‌دار است. اثر متقابل رقم × زمان تیمار برای دو صفت طول ریشه‌چه و درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود ($P<0.01$). اثر رقم × نوع محلول نیز روی کلیه صفات معنی‌دار بود. زمان تیمار × نوع محلول تنها در صفت طول ساقه‌چه معنی‌دار بود و اثرات سه‌گانه رقم × زمان تیمار × نوع محلول تنها در صفت درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود ($P<0.01$). از نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان در حفاظت از ژرم‌پلاسم بذور پنبه بهره‌مند گردید.

واژه‌های کلیدی: پنبه، جوانه‌زنی، زمان آبگیری، فراسرد، نیتروژن مایع

---

*نویسنده مسئول: mehdikakaei37@gmail.com

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) در بیش از ۸۰ کشور مورد کشت‌وکار می‌باشد و در اکثر این کشورها به‌عنوان یک محصول پردرآمد و ارزآور مطرح می‌باشد (دیوت و همکاران، ۲۰۰۴). پنبه زراعت اصلی و مهم بسیاری از کشورهای در حال توسعه و پیشرفته می‌باشد. در ایران حدود ۱۴ استان کشور مورد کشت‌وکار پنبه می‌باشد که دارای ارزش افزوده بالایی نیز هست (حدادی و همکاران، ۲۰۱۶؛ اردکانی و همکاران، ۲۰۰۹). پنبه گیاهی است که دارای اهمیت خاص اقتصادی و کشاورزی در جهان می‌باشد و به طلای سفید معروف است (کاکایی و همکاران، ۲۰۱۶). پنبه کاربردهای فراوانی در صنایع فرش، نساجی و کارخانجات روغن نباتی داشته، منبع مهمی برای تهیه روغن و مارگارین است و بذور این گیاه ۱۴/۶ تا ۲۵/۶ درصد روغن دارد (وفایی‌تبار، ۲۰۱۲). پنبه به‌عنوان گیاهی راهبردی و مهمترین گیاه لیفی، از جمله مهمترین گیاهان زراعی است که ارتباط بین دو بخش کشاورزی و صنعت را فراهم نموده و نقش بسیار با ارزشی در اقتصاد برخی کشورها ایفا می‌کند (برزعلی و همکاران، ۲۰۱۶). موضوع حفاظت از گیاهان و پوشش‌های گیاهی در اکثر کشورهای دنیا جهت جلوگیری از انهدام آن‌ها در حال توسعه می‌باشد. در کنار تمهیداتی که در گذشته صورت گرفته است، روش حفاظت انجمادی به‌عنوان روشی تکمیلی و مطمئن همراه با حفاظت آنها در بانک ژن، بانک بذر، حفاظت آن‌ها در باغ گیاه‌شناسی و حفاظت آنها در مناطق قرق شده طبیعی بکار می‌رود (غنوی، ۲۰۰۲). حفاظت انجمادی از جمله مهمترین ابزار جهت نگهداری طولانی مدت مواد بیولوژیکی می‌باشد. در دمای نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سلسیوس)، همه‌ی فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها متوقف می‌شود (ساکی، ۱۹۹۵). خیلی از تکنیک‌های جدید حفاظت انجمادی نظیر فریز کردن ساده، شیشه‌ای شدن، کپسوله کردن-آبگیری و کپسوله کردن-شیشه‌ای شدن به طور موفقیت‌آمیزی برای بسیاری از سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در گونه‌های گیاهی انجام شده است (اینگلمن، ۲۰۰۰). توفیق در روش حفاظت انجمادی، بسته به عوامل بسیاری همچون مواد اولیه، شرایط پیش تیمار و تیمارها دارد (رین‌هوود و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین جهت موفقیت در حفاظت انجمادی بایستی هر گونه یا رقم به‌طور جداگانه مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. روش شیشه‌ای شدن روشی ساده، سریع و مؤثر جهت حفاظت انجمادی می‌باشد، که از این روش محققین بسیاری در انجام حفاظت انجمادی استفاده کرده‌اند از جمله (هیرانو و همکاران، ۲۰۰۹ در Phaius tankervilleae و جیتسوپاکول و همکاران، ۲۰۱۲ در Vanda tricolor). طباطبایی‌پور و همکاران، ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای با عنوان بررسی اثر حفاظت فراسرد به روش شیشه‌ای کردن در جنین‌های زیگوتی برنج، ابراز نمودند که تفاوت در شاخص‌های رشدونموی جنین‌های زیگوتی حفاظت فراسرد شده به جهت تفاوت ژنتیکی ارقام و پاسخ متفاوت آن‌ها به شرایط انجماد است و همچنین بیان نمودند که نگهداری جنین‌های زیگوتی در ازت مایع امکان‌پذیر است. منصوری و همکاران ۲۰۱۳، در

مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا به روش شیشه‌ای شدن ابراز نمودند که تیمار بذور کلزا با محلول‌های محافظت‌کننده نظیر PVS21 و PVS32 جهت حفاظت بذور کلزا در دمای ازت مایع مؤثر بوده‌اند و حفاظت فراسرد را روشی مناسب جهت نگهداری بذور ارزشمند گیاهان تشخیص دادند. روش حفاظت انجمادی با استفاده از ازت مایع، روش امیدوار کننده‌تر و مقرون به صرفه‌تری برای حفظ ژرم‌پلاسم در دوره‌های بلند مدت می‌باشد (باقری و ساکی، ۲۰۱۶). همچنین غفارزاده نمازی و همکاران ۲۰۱۵، در مطالعه حفاظت انجمادی بذور گیاه دارویی *Satureja bachtiarica*، از حفاظت انجمادی به‌عنوان یک روش مطلوب برای حفظ و حراست از ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی یاد کردند. کاکایی و منصوری ۲۰۱۸، در بررسی و مطالعه نگهداری بذر گیاه دارویی سیاه دانه با کمک تیمارهای محافظتی ابراز نمودند که متغیر زمان تیمار برای صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد داری تفاوت معنی‌دار بود. متغیر نوع محلول برای کلیه صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد و نهایتاً ابراز نمودند که نتایج تحقیق گویای این پیام می‌باشد که حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاه دارویی سیاه‌دانه با تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق مفید می‌باشد. بر اساس آزمونی استانوود و باس، ۱۹۷۸ گزارش نمودند که درصد جوانه‌زنی بالایی در بذور پنبه با محتوای رطوبت پایین بعد از تیمار حفاظت انجمادی مشاهده شده است. با توجه به بررسی‌های حاصله، تاکنون پژوهشی در خصوص نگهداری ژرم‌پلاسم ارقام پنبه مذکور از طریق حفاظت انجمادی صورت نگرفته است، لذا نتایج این پژوهش می‌تواند در حفاظت از ژرم‌پلاسم این گونه ارزشمند حائز توجه باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی بذور پنبه انجام گرفت. فاکتور اول رقم با دو سطح (ورامین و ساجدی) و فاکتور دوم زمان آب‌گیری با پنج سطح شامل (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه) و فاکتور سوم محلول آب‌گیری در دو سطح (PVS2 و PVS3) در کنار تیمار شاهد در نظر گرفته شد. در این تحقیق از بذور دو رقم ورامین و ساجدی جهت تشخیص روش مطلوب حفاظت انجمادی در خصوص ژرم‌پلاسم پنبه در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور اسدآباد، استفاده گردید. منشا پنبه احتمالاً مناطق استوایی آفریقا است. رقم ورامین از جمله یافته‌های ارزشمند تحقیقات پنبه ایران است که با تلاش گروه تحقیقات پنبه در مرکز ورامین از طریق دورگ‌گیری ساده در سال ۱۳۳۸ هجری شمسی بین رقم کوکر ۱۰۰، ویلت و استرین ۵۳۹ بوجود آمده

1- Plant Vitrification Solution number 2
2- Plant Vitrification Solution number 3

است. ورامین رقمی پربار و با کیفیت ممتاز حدود ۷۰ درصد از سطح پنبه‌کاری کشور را برای مدت زیادی به خود اختصاص داد (صالحی و همکاران، ۲۰۰۲). رقم ساجدی در سال ۱۳۹۵ معرفی شده و از ارقام برتر در آزمایش‌های ارقام امیدبخش پنبه در ایستگاه‌های مختلف کشور بوده و کارهای اولیه و تکثیر توده اولیه این رقم از سال ۱۳۶۵ همزمان با آزمون‌های قرنطینه آغاز گردیده بود. بذور مورد نظر از مرکز تحقیقات پنبه کشور تهیه شدند. بذور ارقام مذکور با کمک هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۵ دقیقه و الکل ۷۰ درصد به مدت ۷۰ ثانیه ضد عفونی شدند و تعداد ۱۰ عدد بذر هر رقم پس از خشک شدن به ویال‌های انجمادی ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و با استفاده از محلول‌های حفاظت‌کننده، تیمار شدند. محلول‌های استفاده شده دو محلول پرکاربرد در حفاظت انجمادی بافت‌های گیاهی (PVS2 شامل ۳۰ درصد گلیسرول، ۱۵ درصد اتیلن‌گلایکول و ۱۵ درصد دی‌متیل‌سولفوکساید با زمینه محیط کشت موراشینگ و اسکوگ[1]، ۱۹۶۲ و PVS3 شامل ۴۰ درصد گلیسرول و ۴۰ درصد ساکارز) قرار گرفتند (وولک و همکاران، ۲۰۰۶). محلول‌های مذکور ابتدا با فیلتر مناسب استریل شدند و با کمک هود لامینار تیمار بذور با این محلول‌ها صورت گرفت. تیمار بذور در پنج سطح زمانی جهت آب‌گیری شامل ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه انجام شد. بعداز اینکه زمان‌های مذکور سپری شدند محلول خارج گردید و محلول تازه وارد ویال‌های حفاظت انجمادی قرار گرفت و نهایتاً به مدت ۲۴ ساعت در نیتروژن مایع در تانک نیتروژن مایع قرار گرفتند. بعداز طی این مدت، ویال‌ها از نیتروژن مایع خارج شدند و در حمام آب داغ (بن ماری) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و برای مدت کوتاهی در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند و سپس محلول‌های حفاظت‌کننده دور ریخته شدند و جهت پاک کردن محلول‌های حفاظت‌کننده از نمونه‌های بذری با محلول غلیظ ساکارز ۵٪ مولار شستشو شدند و سپس با آب مقطر چند بار شستشو صورت گرفت (کاکایی و منصوری، ۲۰۱۸). نهایتاً این بذرها درون پتری‌های ۱۰ سانتی‌متری روی دو لایه کاغذ صافی کشت گردیدند و با آب مقطر تغذیه شدند. سپس پتری‌ها درون اتاقک رشد قرار داده و هر روز تعداد بذرهای جوانه‌زده شمارش و ثبت شد. آزمایش با آرایش طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بصورت فاکتوریل انجام پذیرفت. بذرهایی که اندازه ریشه‌چه آنها دو میلی‌متر یا بیشتر بود، به‌عنوان بذور جوانه‌زده در نظر گرفته شدند. در پایان روز آزمایش، درصد جوانه‌زنی از رابطه زیر محاسبه گردید.

درصد جوانه‌زنی= $Ni/N \times 100$

در این رابطه Ni تعداد بذور جوانه‌زده در روز iام و N تعداد کل بذور آزمون شده است (آریاکیا و همکاران، ۲۰۱۲ و نیکولس و هایدیکر، ۱۹۶۸).

1- Murashige and Skoog

شاخص‌های رشدی نظیر درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طـول سـاقه‌چه در تعـداد پـنج گیاهچـه بـا کمک روش‌های استاندارد و معمول مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (به منظور بررسی روند رشد گیاهچه در پایان روز آزمایش، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه دانه‌رُست‌ها اندازه‌گیری شد. طول ساقه‌چه از یقـه تـا جوانـه انتهایی و طول ریشه‌چه از یقه تا نوک ریشه اصلی بر حسب میلی‌متر با خط‌کش اندازه‌گیری گردید). تمـام صفات در پتری اندازه‌گیری شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن به کمک نرم‌افزار SAS 9.1 صورت گرفت.

شکل ۱، تصویر A: بذور کشت شـده در پتـری و B: بـذور جوانـه‌زده پنبـه، C: آمـاده کـردن کرایـو ویال[1]ها جهت قرار دادن در ازت مایع و D: تصویر قرار دادن کرایو ویال‌های حاوی بـذر در درون حمـام آب داغ بعداز مورد تیمار قرار گرفتن در نیتروژن مایع، را نشان می‌دهد.

شکل ۱– تصویر A: بذور کشت شده در پتری‌دیش و B: بذور جوانه‌زده پنبه، C: آماده کردن کرایو ویال‌ها جهت قرار دادن در ازت مایع و D: تصویر قرار دادن کرایو ویال‌های حاوی بذر در درون بن ماری بعداز مورد تیمار قرار گرفتن در ازت مایع

1- Cryo Vial

نتایج و بحث

تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر رقم برای سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود ($P<0.01$). که نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که ارقام در سطح احتمالی یاد شده دارای تنوع می‌باشند و قابلیت گزینش را دارا هستند که این نتیجه احتمالاً تحقیقات بر روی سایر بذور را نیز تأیید می‌کند لذا می‌توان از ارقام بیشتری جهت گزینش مطلوب‌تر در چنین آزمایشاتی بهره‌مند شد. در خصوص متغیر، زمان تیمار (با محلول حفاظت‌کننده) با توجه به جدول تجزیه واریانس اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه درسطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار هستند ($P<0.01$) و زمان‌های مختلف توانسته است نتایج مختلفی را روی بذور نتیجه دهد بعبارت دیگر هر صفت در مواجه با هر زمان تیماری تنوع از خود نشان می‌دهد یعنی زمان‌های مختلف اثرات مختلفی نیز روی صفات داشته‌اند که با نتایج منصوری و همکاران، ۲۰۱۳ همسو می‌باشد. تیمار نوع محلول در خصوص صفات درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) معنی‌دار است که مؤید این مهم می‌باشد که نوع محلول در کلیه صفات با احتمال ذکر شده اختلافاتی را در هر سه صفت محرز نموده است. در خصوص اثر متقابل رقم در زمان تیمار، صفات درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و برای این اثر متقابل، صفت طول ساقه‌چه نتوانست اثر معنی‌داری را به خود اختصاص دهد. اثر متقابل رقم در نوع محلول برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال ۵ درصد و برای دو صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ساقه‌چه معنی‌دار ولی دو صفت درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه نتوانستند اثر معنی‌داری را ایجاد کنند. تنها صفت درصد جوانه‌زنی اثر سه‌گانه (رقم در زمان تیمار در نوع محلول) معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد را به خود اختصاص داد. مفهوم این اثر متقابل سه‌گانه یعنی اینکه زمان‌های مختلف تیمار در هر دو نوع محلول در کلیه ارقام تأثیر معنی‌داری در بهبود جوانه‌زنی داشته‌اند. در خصوص معنی‌دار بودن اثر متقابل سه‌گانه ایزدخواه شیشوان و همکاران ۲۰۱۶ در مطالعه بررسی تأثیر پیش تیمار و اندازه‌ی بذر بر ویژگی‌های کمی و کیفی دو ژنوتیپ پیاز خوراکی ابراز نمودند که اثر متقابل سه‌گانه اندازه بذر، پرایمینگ و ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد بر این صفات معنی‌دار شده است. با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل رقم در زمان تیمار، ژنوتیپ در نوع محلول و رقم در زمان تیمار در نوع محلول در صفت درصد جوانه‌زنی و همچنین اثرات متقابل معنی‌دار رقم در زمان تیمار و رقم در نوع محلول در خصوص صفت طول ریشه‌چه و نیز اثرات معنی‌دار ژنوتیپ در نوع محلول و زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ساقه‌چه، مقایسه میانگین‌ها جهت اثرات ساده رقم، زمان اعمال تیمار (زمان آبگیری) و نوع محلول

حفاظت‌کننده انجام نگرفت. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در زمان تیمار با محلول حفاظت‌کننده (زمان آبگیری) (جدول ۲) نشان می‌دهد در خصوص هر دو رقم ورامین و ساجدی در مورد صفت درصد جوانه‌زنی، بیشترین میزان زمانی، مربوط به زمان ۶۰ دقیقه بود. گلیسرول موجود در محلول‌های حفاظت‌کننده از تشکیل کریستال در اطراف بذر جلوگیری می‌کنند که زمان ۶۰ دقیقه در خصوص هر دو نوع ماده حفاظت‌کننده (PVS2 و PVS3) بر توان جوانه‌زنی مؤثرتر بودند. بر اساس مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم در نوع محلول حفاظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی (جدول ۳) بایستی خاطر نشان نمود که بیشترین مقدار در هر دو رقم مورد تحقیق در این مطالعه مربوط به زمان شاهد بود اگرچه با محلول‌های PVS2 و PVS3 در یک گروه آماری طبقه‌بندی شدند. بالا بودن میزان جوانه‌زنی در دو رقم در تیمار شاهد به این علت است که در تیمار شاهد هیچگونه ماده شیمیایی جهت حفاظت بذر استفاده نشده و در شرایط عادی و طبیعی جوانه‌زنی آن‌ها ثبت شده است و بعداز تیمار شاهد محلول PVS3 در هر دو رقم میزان بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. جدول ۴ اثرات سه‌گانه مقایسه میانگین را در خصوص صفت درصد جوانه‌زنی نشان می‌دهد که در خصوص هر دو رقم در PVS2، PVS3 و شاهد بیشترین مقدار جوانه‌زنی را زمان ۶۰ دقیقه به خود اختصاص داد که تأییدکننده نتایج جدول ۲ می‌باشد که در حقیقت نتیجه جدول ۲ جزئی از نتیجه کلی اثر متقابل سه‌گانه در جدول ۴ می‌باشد. بر مبنای جدول ۵ که مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و زمان تیمار با محلول حفاظت‌کننده بر روی صفت طول ریشه‌چه نشان داد که هر دو رقم در زمان ۱۰۰ دقیقه بیشترین طول ریشه‌چه را ایجاد کردند. که بر این اساس هر چه مدت زمان تیمار کردن بیشتر شود طول ریشه‌چه رشد بیشتری را محتمل می‌شود. شاید علت نتیجه حاصله این باشد که مواد مورد استفاده فرصت کافی جهت جذب مواد را داشته و توانسته است رشد ریشه‌چه را مؤثر کند. میانگین اثر متقابل رقم در نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه در جدول ۶ مشخص است. بر این اساس در هر دو رقم تیمار شاهد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد بر مبنای جدول ۷ که مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور پنبه با محلول‌های حفاظتی را روی صفت طول ساقه‌چه نشان می‌دهد در مورد ماده PVS2 بیشترین مقدار مربوط به زمان ۸۰ دقیقه بود (اگرچه با زمان ۱۰۰ دقیقه نیز در یک گروه آماری قرار گرفتند) و در خصوص PVS3 و شاهد بیشترین مقدار مربوط به زمان ۱۰۰ دقیقه بود. این نتایج نشان می‌دهد که با کاهش بیشتر رطوبت بذور در اثر استفاده از محلول‌های حفاظت‌کننده، میزان رشد ساقه‌چه افزایش یافته است که با نتایج منصوری و همکاران ۲۰۱۳ همسو بود. جدول ۸ مقایسه میانگین اثرات متقابل محلول حفاظت‌کننده و رقم بر روی صفت طول ساقه‌چه را نشان می‌دهد که هر دو رقم در تیمار شاهد نسبت به دو ماده PVS2 و PVS3 برتری داشتند. در مورد رقم ورامین دو ماده PVS2 و PVS3 در یک گروه آماری قرار گرفتند و در خصوص رقم ساجدی تیمارهای برتر به ترتیب

PVS2، شاهد و PVS3 بودند. با توجه به نتایج ارائه شده بذر پنبه قابلیت نگهداری در دمای نیتروژن مایع را دارد. البته توفیق در این روش‌ها به تحمل مواد گیاهی نسبت به تنش‌های اسمزی، شیمیایی، آبگیری و سرمایی و نیز القای شیشه‌ای شدن دارد (کولوس و زالیوسکا، ۲۰۱۴). با توجه به مطالعات مرتبط هزینه استفاده از روش‌های حفاظت انجمادی به طور معنی‌داری کمتر از هزینه نگهداری در مزرعه می‌باشد.

جدول ۱- میانگین مربعات اثر زمان اعمال تیمار، رقم و نوع محلول حفاظت‌کننده بر روی سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذور پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه
رقم	۱	۱۲۸۴/۴۴**	۲/۷۸**	۱/۵۹۲**
زمان تیمار	۴	۱۳۵۷/۲۲**	۱۲/۴۰۶**	۸/۴۶۸**
نوع محلول	۲	۸۸۰۳/۳۳**	۳/۵۱۵**	۱/۸۴۱**
رقم × زمان تیمار	۴	۹۴۲/۷۷**	۲/۷۲۵**	۰/۲۴۷ns
رقم × نوع محلول	۲	۴۵۴/۴۴*	۱/۳۸۴**	۱/۴۲۷**
زمان تیمار × نوع محلول	۸	۱۲۱/۳۸ns	۰/۴۱۲ns	۰/۶۰۷**
رقم × زمان تیمار × نوع محلول	۸	۳۰۸/۶۱۱**	۰/۳۶۴ns	۰/۱۸۹ns
اشتباه	۶۰	۱۰۰	۰/۲۵۱	۰/۱۸۰
ضریب تغییرات ٪		۱۷/۰۴	۱۱/۰۵۵	۱۳/۵۴

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و زمان تیمار با محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی

رقم	زمان اعمال تیمار (دقیقه)				
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
ورامین	۴۵/۵c	۶۰bc	۷۶/۶a	۶۶/۶b	۶۱/۱bc
ساجدی	۵۶/۶b	۳۷/۷c	۶۸/۸a	۵۲/۲bc	۶۲/۲ab

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و نوع محلول حفاظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی در بذور پنبه

نوع محلول	رقم		
	PVS2	PVS3	شاهد
ورامین	۴۶/۶a	۶۲/۶a	۷۶/۶a
ساجدی	۳۲b	۶۰/۶b	۷۴b

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، زمان تیمار و نوع محلول بر روی صفت درصد جوانه‌زنی

رقم	نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)				
		۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
ورامین	PVS2	۴۶/۶b	۴۰c	۵۶/۶a	۴۶/۶b	۴۳/۳bc
	PVS3	۳۳/۳d	۶۰c	۸۶/۶a	۷۰b	۶۳/۳c
	شاهد	۵۶/۶c	۸۰ab	۸۶/۶a	۸۰ab	۷۶/۶b
ساجدی	PVS2	۲۳/۳cd	۲۰d	۴۳/۳a	۳۰b	۴۳/۳a
	PVS3	۶۳/۳bc	۴۳/۳d	۷۶/۶a	۵۳/۳c	۶۶/۶b
	شاهد	۸۳/۳ab	۵۰c	۸۶/۶a	۷۳/۳bc	۷۶/۶b

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و زمان تیمار با محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ریشه‌چه بذور پنبه

رقم	زمان اعمال تیمار (دقیقه)				
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
ورامین	۴/۲۹bc	۴/۱۷c	۴/۶۹b	۵/۰۵ab	۵/۳۶a
ساجدی	۳/۹۱c	۲/۴۸d	۴/۸۰b	۵/۲۶a	۵/۳۵a

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ریشه‌چه

رقم	نوع محلول		
	PVS2	PVS3	شاهد
ورامین	۴/۶۱b	۴/۲۱c	۵/۳۱a
ساجدی	۴/۳۵bc	۴/۲۴c	۴/۴۹a

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور پنبه با نوع محلول‌های محافظت‌کننده بر روی صفت طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)

نوع محلول حفاظت‌کننده	زمان اعمال تیمار (دقیقه)				
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
PVS2	۱/۹۰۱d	۲/۰۵c	۳/۴۹b	۳/۹۴a	۳/۷۷ab
PVS3	۲/۵۴cd	۲/۵۱d	۳/۰۱b	۳/۳۱ab	۳/۴۲a
شاهد	۲/۸۲b	۲/۷۱b	۳/۲۹ab	۴/۱۹a	۴/۰۸a

جدول ۸- مقایسه میانگین اثرات دوگانه نوع محلول حفاظت‌کننده و رقم بر روی صفت طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)

نوع محلول	رقم	
	ورامین	ساجدی
PVS2	۲/۷۵۱b	۳/۳۱۵a
PVS3	۲/۷۲۶b	۳/۱۹۴a
شاهد	۳/۵۳۸a	۳/۳۰۴a

نتیجه‌گیری کلی

بطورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که نگهداری ژرم‌پلاسم پنبه در نیتروژن مایع امکان‌پذیر است. نگهداری ژرم‌پلاسم به روش انجماد در نیتروژن مایع[1] از جمله روش‌های نگهداری گیاهان در شرایط برون محیطی[2] می‌باشد که در حفظ طولانی مدت ذخایر توارثی، حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های نگهداری در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلونی تکثیر می‌شوند و یا به‌عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم محسوب می‌شود (http://ibrc.ir). روش‌های ترکیبی درون شیشه‌ای حفاظت انجمادی در آینده توسعه بیشتری خواهد یافت (باقری و ساکی، ۲۰۱۶). استفاده از جنین ژنوتیپ‌های پنبه جهت ارزیابی قابلیت حفاظت انجمادی در مطالعات آتی و همچنین ارزیابی سایر بذور ارقام ارزشمند گیاه پنبه (ایجاد شده در شرایط کشور) جهت آزمون قابلیت نگهداری در شرایط انجماد، قابل پیشنهاد می‌باشد.

سپاسگزاری

از همه عزیزانی که در شکل‌گیری این پژوهش نقش ایفا نمودند بویژه جناب آقای دکتر سید افشین مساوات که در تهیه بذور این مطالعه همکاری داشتند قدردانی می‌گردد.

منابع

1 Ardekani, S., Heydari, A., Khorasani, N., Arjmandi, M. and Ehteshami, R. 2009. Preparation of new biofungicides using antagonistic bacteria and mineral compounds for controlling cotton seedling damping-off disease. Plant Protection Research Journal, 49: 49-55.

2. Aryakia, E., Ramazani, H., Ghafoori, H., Dolatyari, A., Naghavi, M.R. and Shahzadeh fazeli, S.A. 2012. The effect of cryopreservation on germination and growth indices of some orthodox seeds. Iranian Journal of Rangelands and

1- Cryopreservation
2- ex situ

Forests Plant Breeding and Genetic Research, 19, 218-230. (In Persian with English abstract).
3 Bagheri, H. and Saki, S. 2016. Requirements and Guidelines for the Preservation of Genetic Resources of Ornamental Plants in Iran. Scientific Journal of Ornamental Flowers and Ornamental Plants, 1(2): 24-33.
4.Borzali, M., Mali, M. and alyshah, A. 2016. Evaluation of the effects of drought stress on some germination characteristics and growth of seedlings of tetraploid cultivars and cotton indigenous populations. Iranian Journal of Cotton Research, 4(1): 27-46. (In Persian with English abstract).
5.Dutt, Y., Wang, X.D., Zhu, Y.G. and Li, Y.Y. 2004. Breeding for high yield and fiber quality in coloured cotton. Plant Breed Journal, 123: 145-151.
6. Engelmann, F. 2000. Improvement of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: cryopreservation of tropical plant germplasm (Edited by Engelmann F and Takagi H). Italy, IPGRI.
7.Ezadkhah sheshvan, M., Tajbakhsh sheshvan, M., Jalilian, J. and Pasbaneslam, B. 2016. Effect of Pre-treatment and Seed Size on Quantitative and Qualitative Characteristics of Two Onion (*Allium cepa* L.) Genotypes. Journal of Plant Productions, 39(4): 15-30. (In Persian with English abstract).
8 Ghanavi, Z. 2003. Freezing protection method for conservation of extinct plants. Sixth National Conference on Environmental Health.
9.Ghaffarzadeh-Namazi, N., Babaeian, N., Ghamari-zare, A. and Nematzadeh, G.H. 2015. Cryopreservation the seeds of the medicinal plant Satureja bachtiarica Bunge. International Journal of Biosciences, 6(2): 24-29. (In Persian with English abstract).
10.Hadadi, M.H., Faez, R.A., Mohseni, M. and Alyshah, A. 2016. Investigation of the influence of chemical and non-chemical on yield and yield components of cotton. Journal of Iranian Cotton Research, 4(1): 17-26.
11.Hirano, T., Godo, T., Miyoshi, K., Ishikawa, K., Ishikawa, M. and Mii, M. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. Plant Biotechnology Reports, 3: 103-109.
12.http://ibrc.ir.
13.Jitsopakula, N., Thammasirib, K., Yukawac, T. and Ishikawad, K. 2012. Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. Science Asia, 38: 244-249.
14.Kakaei, M., Kahrizi, D. and Mosavi, S.S. 2016. Evaluation of its yield relationships and cotton yields with some of the agaromorphological traits of varamin variety through path analysis. Iranian Journal of Cotton Research, 4(2): 101-114. (In Persian with English abstract).
15.Kakaei, M. and Mansouri, M. 2018. The investigation and study of Black Cumin seeds (*Nigella sativa*) preservation by frost method using protective

treatments. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 7(2): 247-258. (In Persian with English abstract).
16.Kulus, D. and Zalewska, M. 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species a review. Scientia Horticulturae, 168: 88-107.
17.Mansouri, M., Kakaei, M., Abdollahi, M.R. and Sharifi, Sh. 2013. Study on the conservation of rapeseed (*Brassica napus* L.) seeds in vitro. Agricultural Biotechnology, 12(2): 33-39. (In Persian with English abstract).
18.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.
19.Nicholls, M.A. and Heydecker, W. 1968. Two approaches to the study of germination data. Proceedings of the International Seed Testing Association, 33: 531-540.
20.Reinhoud, P.J., Iren, F.V. and Kijne, J.W. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm (Edited by Engelmann F and Takagi H). IPGRI.
21.Sakai, A. 1995. Biotechnology in agriculture and forestry. In: Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 32: Cryopreservation plant germplasm (Edited by Engelmann F and Takagi H). Italy, IPGRI.
22.Stanwood, P.C. and Bass, L.N. 1978. Ultra cold preservation of seed germplasm. In: SAKAI, A., LI, P. (Eds.). Plant cold hardiness and freezing stress. New York: Academic Press. P. 361-371.
23.Salehi, K., Hosseinzadeh, a. r. and Familian, H. 2002. Study on cotton stem for cellulosic industries. Iranian Journal of Wood and Paper Science, 18 (2): 239-267. (In Persian with English abstract).
24.Tabatabaei-pour, S.Z., Moeini, A. and Sabet, M.S. 2015. Investigation on the effect of ultrasound protection on vitreous growth parameters on rice zygote embryos. Journal of Iranian Crop Science, 46(1): 122-115.
25.Vafaie-Tabar, M. 2013. Check the quantity and quality of cotton fiber and its diversification tetraploid cultivars. Iranian Journal of Cotton Researches, 1: 43-50. (In Persian with English abstract).