



علوم و تحقیقات بذر ایران  
سال سوم / شماره اول / ۱۳۹۵ (۱۲۰ - ۱۱۱)



## بررسی امکان نگهداری بذر گنار [*Ziziphus spina-christi* (L.) Desf.] در شرایط فراسرد

محبتهلی نادری شهاب<sup>۱</sup>، مریم جبلی<sup>۲\*</sup>، علی اشرف جعفری<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲

### چکیده

گونه *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. گونه‌ای است درختی که در مناطق جنوبی کشور رویش دارد. به دلیل محدود بودن دامنه اکولوژیک، تخریب بعضی از عرصه‌های رویشگاهی و وجود توده‌های بومی متنوع لازم است از فرسایش ژنتیکی و از بین رفتن این ذخایر جلوگیری به عمل آید. به منظور بررسی امکان نگهداری بلند مدت بذر این گونه در شرایط فراسرد یا برودت  $196^{\circ}\text{C}$ - و بررسی رشد بذرهای فراسردی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، بذر این گونه از رویشگاه طبیعی آن، جمع‌آوری و قبل از ذخیره‌سازی در فراسرد از سه پیش تیمار شامل Desiccation, PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد همراه با شاهد استفاده شد. بذرهای تیمار شده به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در شرایط فراسرد یا  $196^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند. بذرهای پس از خروج از این شرایط، در آزمایشگاه و گلخانه مورد آزمایش قرار گرفتند و تعدادی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر و استقرار بررسی شد. نتایج نشان داد بذر کنار قابل نگهداری در شرایط فراسرد می‌باشد. در بررسی اثر پیش تیمارها در حفاظت از بذر در شرایط فراسرد، مشخص شد تفاوت معنی‌داری بین پیش تیمارهای Desiccation, PVS2 و گلیسرول ۳۰ درصد برای اغلب صفات وجود دارد. اثر متقابل مدت زمان نگهداری بذر در شرایط فراسرد و پیش تیمارهای مختلف بر میانگین صفات نشان داد که در تعدادی از صفات، تفاوت بین زمان‌ها وجود دارد ولی در تعداد دیگری از صفات، این تفاوت معنی‌دار نبود. بذرهای جوانه‌زده فراسرد در شرایط گلخانه به خوبی مستقر شدند. در این مطالعه، بهترین پیش تیمار برای نگهداری بذر کنار در شرایط فراسرد، پیش تیمار Desiccation یا آبیگری بود.

### واژه‌های کلیدی: تیمار آبیگری، ذخیره سازی در فراسرد، گنار، گونه جنگلی

۱- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع؛ سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی؛ تهران؛ ایران

۲- محقق؛ موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع؛ سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی؛ تهران؛ ایران

۳- استاد پژوهش موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع؛ سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی؛ تهران؛ ایران

\* نویسنده مسئول: Jebelly@riff-ac.ir

## مقدمه

مؤثر بر زنده‌مانی بذر و نمونه‌ها و تولید گیاه کامل باید مورد تجزیه و تحلیل علمی قرار گرفته و کارآیی هر روش مورد ارزیابی قرار گیرد. در همین راستا فناوری فراسرد برای نگهداری بلندمدت جوانه‌های جانبی ژرم‌پلاسم انگور با استفاده از روش دهیدراتاسیون-کپسوله‌کردن استفاده شده که زنده‌مانی و بازیافت پس از فراسرد نتایج مثبتی داشت (Zhao *et al.*, 2001). بهینه‌سازی رطوبت بذر قبل از ورود به شرایط فراسرد یا برودت  $196^{\circ}\text{C}$ - نیز تأثیر مهمی در زنده‌مانی نمونه گیاهی در شرایط فراسرد دارد. در همین رابطه بذر سه گونه پسته شامل *P. vera*، *P. terebinthus* و *P. lenticus* که جزء بذرهای روغنی و درشت‌اند، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار رطوبت بذر هر یک از گونه‌ها برای نگهداری در شرایط فراسرد متفاوت بود (Ozden-Tokatli *et al.*, 2007). در آزمایش دیگری فاکتورهای مؤثر بر نگهداری ژرم‌پلاسم بلوط گونه *Q. robur* از طریق اندام رویشی در شرایط فراسرد گزارش شده است (Sanchez, 2008). در مورد بذر پده نیز تیمار کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به فراسرد بهترین نتیجه را در جوانه‌زنی و استقرار بذر در شرایط آزمایشگاه و گلخانه داشت (Jebelli *et al.*, 2015). همچنین پیش‌تیمارهای آبیگری و گلیسرول ۳۰ درصد بهترین نتیجه را در نگهداری بذر *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* در شرایط فرا سرد داشتند. در صورتی‌که بذر اقلایا تنها در تیمار کاهش رطوبت بهترین نتیجه را در زنده‌مانی فرا سرد داشت (Jebelli *et al.*, 2014).

در گونه آلو (*Prunus domestica*) زنده‌مانی جوانه انتهایی گیاهان درون شیشه‌ای در شرایط فراسرد بررسی شد. بقاء جوانه‌های پیش‌تیمار شده با سرما و اضافه نمودن ساکارز در فراسرد تأثیر معنی‌داری داشت (De Carlo *et al.*, 2000).

در گونه *Fraxinus excelsior* جوانه انتهایی پس از اعمال روش ویتریفیکاسیون بهینه شده، وارد فراسرد شدند. جوانه‌ها پس از گذراندن شرایط فراسرد قادر به زنده‌مانی و تولید گیاهان کامل بودند (Schoenweiss *et al.*, 2005). جوانه انتهایی تعدادی زیادی از گونه‌ها مانند درخت دارویی *Cratera nurvala* (Sanayaima *et al.*, 2006)، سیب درختی (Kushnarenko *et al.*, 2009)، گیاه دارویی و در

کنار با نام علمی *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. از خانواده رامناسه<sup>۱</sup> بوده و در ایران، افغانستان، عراق، اردن، لبنان، سوریه، فلسطین، شبه جزیره عربستان، هند، پاکستان و در برخی از کشورهای آفریقایی پراکنش دارد. این گونه در مناطق جنوبی ایران در استان‌های بوشهر، خوزستان، فارس، هرمزگان و سیستان و بلوچستان رویش دارد (Sabeti, 2006). کنار در استان خوزستان بیشتر از سایر استان‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Motamedi *et al.*, 2009; Dinarvand and Zarinkamar, 2006). این گونه درختی در طبیعت از طریق بذر تکثیر می‌شود و درصد دگرگشتی آن بالا می‌باشد (Assareh and Sabagzadeh, 2002).

کنار مقاوم به شرایط خشک و گرم بوده و علاوه بر عرصه‌های طبیعی، در فضای سبز شهری نواحی جنوبی استفاده شده و در حاشیه مزارع نیز کشت می‌شود. میوه این گیاه خوراکی است و از برگ آن سدر تهیه می‌گردد. جوانه‌زنی بذر این گونه در طبیعت مشروط به تغییر در پوسته سخت چوبی آن مانند شکاف، ترک و پوسیدگی بوده و در شرایط خارج از عرصه‌های طبیعی، جوانه‌زنی بذر منوط به ایجاد ترک در پوسته چوبی بذر و یا شکستن و حذف کامل پوسته می‌باشد (Moustafa *et al.*, 1998). با توجه به گستردگی عرصه‌های رویشگاهی و تنوع نسبتاً زیاد کنار در شرایط رویشگاهی و عدم دخالت انسانی در رشد و استقرار آن در عرصه‌های طبیعی، این گونه از تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی برخوردار می‌باشد. در روش فراسرد، امکان نگهداری بذر، اندام رویشی، سلول و دانه‌گرده وجود دارد. تیمار بذر قبل از ورود به فراسرد یا نیتروژن مایع، مانند کاهش رطوبت بذر یا جوانه، استفاده از ترکیب‌های محافظت‌کننده<sup>۲</sup> و سایر فاکتورها ممکن است نقش اساسی در نتایج نهایی آزمایشات داشته باشد (Chang and Reed, 1999). به همین دلیل بهینه‌سازی روش‌ها از کارهای ضروری بوده و زنده‌مانی بذر و نمونه‌های گیاهی در فراسرد و میزان رشد مجدد نمونه‌ها پس از خروج، نیاز به بررسی‌های متعدد دارد. بنابراین فاکتورهای

<sup>1</sup> Rhamnaceae

<sup>2</sup> Cryoprotectants

۱)  $PVS_2$  <sup>۳</sup>: ابتدا به تیوپ‌های ۵۰ میلی‌لیتری درب‌دار حاوی بذر، محلول لودینگ شامل ۰/۴ مول ساکارز و ۲ مول گلیسرول (Matsumoto *et al.*, 1994) اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای  $22^{\circ}C$  + قرار داده شدند. بعد محلول لودینگ از تیوپ‌ها کاملاً تخلیه و محلول  $PVS_2$   $4^{\circ}C$  + شامل ۱۵ درصد اتیلن گلیکول (w/v)، ۱۵ درصد DMSO (w/v)، ۳۰ درصد گلیسرول (w/v) و ۰/۴ مول ساکاروز (Sakai *et al.*, 1991) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در  $4^{\circ}C$  + قرار داده شدند. در پایان درب تیوپ‌ها بسته و در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

۲) **آبگیری** <sup>۴</sup>: ابتدا به منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به عنوان وزن اولیه بذر (FW) یادداشت شد. سپس بذرها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای  $75^{\circ}C$  + درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و وزن خشک آنها به دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر (۵/۶۸) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Total Seed Moisture Content (\%)} = (FW - DW) / DW \times 100$$

پس از مشخص شدن رطوبت کل و به منظور تهیه بذر برای تیمار Desiccation، حدود ۳۰ گرم بذر تازه توزین و به دسیکاتور حاوی ۳۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و به مدت ۷ روز در سردخانه با دمای  $4^{\circ}C$  + نگهداری شدند. سپس بذرها از دسیکاتور خارج و توزین شده و در نهایت درصد رطوبت بذر با استفاده از رابطه فوق محاسبه شد. با در دست داشتن رطوبت کل بذر و مقدار رطوبت بذر پس از قرار گرفتن در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر در دسیکاتور محاسبه شد که این کاهش معادل ۳۲/۳۶ درصد رطوبت کل بذر بود. در پایان، بذرها پس از خروج از دسیکاتور و توزین، بلافاصله وارد تیوپ‌های ۵۰ میلی‌لیتری منفذدار شده و در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

۳) **گلیسرول ۳۰ درصد**: تیوپ‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، با گلیسرول ۳۰ درصد پر شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $22^{\circ}C$  + قرار داده شدند. پس از این مرحله در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

حال خطر انقراض (*Mandal and Dioscorea deltoidea*, Dixit - Sharma, 2007) پس از اعمال تیمارها و روش‌های مختلف وارد فراسرد شده و پس از خروج از شرایط فراسرد قادر به زنده‌مانی و تولید گیاه شده‌اند.

گونه کُنار به دلیل گستردگی رویشگاه‌های طبیعی و وسعت دامنه اکولوژیک آن در کشور، که از خوزستان تا سیستان و بلوچستان را شامل می‌شود، بدون تردید تنوع ژنتیکی گسترده‌ای دارد. به همین دلیل اضافه بر حفظ گونه، حفظ تنوع ژنتیکی آن نیز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. متأسفانه در عرصه‌های طبیعی به دلیل چرای مفرط رویشگاه‌ها، شخم عرصه‌های رویشگاهی، فرسایش خاک، برداشت میوه و سایر عوامل انسانی و غیر انسانی زادآوری آن در زیستگاه‌های طبیعی به شدت کاهش یافته و بیم آن می‌رود که با از بین رفتن پایه‌های مسن کنونی و یا تخریب رویشگاه‌ها، این گونه به طور کلی از عرصه‌های طبیعی کشور در بلند مدت حذف گردد. لذا جمع‌آوری، حفظ و نگهداری بلندمدت بذر از رویشگاه‌های مختلف با هدف حفظ ذخائر ژنتیکی آن و احیاء مجدد گونه در صورت بروز خطرات احتمالی، از اولویت ویژه‌ای برخوردار است.

## مواد و روش‌ها

**محل جمع‌آوری بذر**: بذر این گونه از استان خوزستان، شهرستان دزفول در فروردین‌ماه جمع‌آوری شد.

## بررسی جوانه‌زنی بذر

۱- **آماده‌سازی بذر**: آماده‌سازی بذر از طریق حذف پریکارپ (پوسته گوشتی) و شکستن آندوکارپ و بیرون آوردن بذر از داخل آندوکارپ انجام شد. در نتیجه، آزمایش‌ها روی بذر بدون آندوکارپ (مغز بذر) صورت گرفت.

۲- **جوانه‌زنی بذر**: قبل از شروع آزمایش‌های اصلی، آزمایش‌های مقدماتی مختلف جهت دستیابی به بهترین روش سبز کردن بذر شامل تیمارهای سرمایی، شستشو زیر آب سرد، کشت با پوسته و بدون پوسته انجام گرفت و از نتایج آن جهت انجام آزمایش اصلی استفاده شد.

تیمارهای قبل از ورود بذر به نیتروژن مایع یا پیش‌تیمارهای فراسرد

<sup>3</sup> Plant Vitrification Solution

<sup>4</sup> Desiccation

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین نیز با نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن میانگین مربعات زمان نگهداری، پیش‌ تیمار فراسرد و اثر متقابل زمان نگهداری در پیش‌ تیمار فراسرد در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که اثر زمان نگهداری برای همه صفات به جز نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود و به عبارت دیگر تفاوت بین زمان‌های مختلف نگهداری در کاهش ویژگی‌های جوانه‌زنی مشاهده نشد (جدول ۱). اثر پیش‌ تیمار فراسرد بر روی کلیه صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده اثر متفاوت پیش‌ تیمارها بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، شاخص بنیه بذر و درصد استقرار از نظر آماری است. اثر متقابل زمان نگهداری در پیش‌ تیمار فراسرد به جز نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه برای سایر صفات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده این است که پیش‌ تیمارهای مختلف در همه زمان‌های نگهداری تقریباً روند مشابهی داشته‌اند (جدول ۱). لازم به ذکر است که با توجه به عدم معنی‌دار بودن اثرات متقابل زمان نگهداری در پیش‌ تیمار فراسرد. فقط جداول اثرات اصلی ارائه شد.

میانگین کل صفات مختلف مربوط به یک هفته، یک‌ماه و یک‌سال نگهداری بذر کُنار در فراسرد یا دمای  $196^{\circ}\text{C}$  در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس داده‌های این جدول، میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر از نظر آماری بین زمان‌های نگهداری بذر در نیتروژن مایع تفاوتی با هم ندارند. لذا زمان نگهداری تأثیری در میانگین این صفات نداشته و زمانی که بذر این گونه وارد نیتروژن مایع گردیده، گذر زمان باعث کاهش میانگین صفات مورد بررسی نمی‌شود. در این رابطه، نتیجه بررسی‌های انجام شده توسط والترز و همکاران (Walters et al., 2004) بر روی بذر کاهو و مکیس و همکاران (Mix-Wagner et al., 2003) روی جوانه انتهایی سیب‌زمینی، نشان داد که به دلیل کاهش شدید فعالیت‌های

بذرها در هر سه پیش تیمار فراسرد به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در نیتروژن مایع نگهداری شدند. سه نمونه بذر نیز به‌عنوان بذر شاهد جهت استفاده در آزمایش‌ها، به مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

### تیمارهای پس از خروج بذر از فراسرد

به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، بذرهای پس از خارج شدن از نیتروژن مایع به مدت دو دقیقه در آب  $42^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. سپس از آب گرم خارج و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکارز ۱/۵ مول استریل قرار گرفتند. پس از ۶ بار شستشو با آب استریل، پتری‌های حاوی بذر به سردخانه با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۱۳ روز، بذرهای در ژرمیناتور با دمای  $22^{\circ}\text{C}$  با شدت نور ۱۰ وات بر متر مربع با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

### طرح آزمایشی

طرح آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل پیش- تیمارهای فراسرد و زمان ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع با بکارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. پیش‌ تیمارهای فراسرد شامل  $\text{PVS}_2$ ، Desiccation، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد تشکیل دهنده سطح فاکتور A و سه دوره زمانی یک هفته، یک‌ماه و یک‌سال ذخیره‌سازی بذور در ازت مایع تشکیل دهنده فاکتور B در این آزمایش بودند. صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش عبارت بودند از درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، شاخص بنیه بذر ( $V_1$ )، و نسبت طول ریشه‌چه بر طول ساقه‌چه ( $R/S$ ). شاخص بنیه بذر با استفاده از فرمول شماره (۱) ارائه شده توسط Abdul-Baki and (1973) Anderson محاسبه شد.

$100 / \text{درصد جوانه‌زنی} \times \text{میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر (مجموع طول ساقه‌چه و ریشه‌چه)} = \text{شاخص بنیه بذر}$

**آزمایشات گلخانه‌ای:** بذر تیمارهای مختلف پس از خروج از نیتروژن مایع و اعمال تیمارهای پس از خروج به همراه نمونه‌های شاهد در شرایط گلخانه با دمای  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  کشت شدند. خاک گلدان شامل یک‌سوم ماسه، یک‌سوم پیت‌ماس و یک‌سوم خاک بود. درصد استقرار بذر و رشد بذر تا تولید نهال‌های جوان یادداشت برداری شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پیش تیمارها، زمان‌ها و اثر متقابل آنها بر نگهداری بذرهای *Ziziphus spina-christi*Table 1. Analysis of variance the effect of pre-treatments, times and their interaction effect on *Ziziphus spina-christi* seeds storage

منابع تغییرات	df	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	طول گیاهچه	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	درصد استقرار
Source of variation		Germination percentage	Radicle length mm	Shoot length mm	Seedling Length mm	Vigor Index	Radicle length/shoot length	Establishment percent
زمان نگهداری	2	13.78	3.92	0.65	3.96	6.08	0.061*	10.75
Incubation period								
پیش تیمار فراسرد	3	537.7**	133.81**	7.43**	193.84**	227.57**	0.825**	175.59**
Pre-Cryopreservation Treatment								
زمان در پیش تیمار	6	10.81	3.60	0.42	4.34	4.17	0.041*	3.68
Time*Pre-Treatment								
خطا	24	113.64	3.90	0.65	6.92	15.36	0.016	11.11
Error								
درصد ضریب تغییرات		17.14	11.79	8.37	9.98	21.73	7.279	19.42
CV%								

\* و \*\* به ترتیب نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

\* and \*\* show significant differences at levels of 5% and 1% respectively

## جدول ۲- اثر زمان‌های نگهداری بذر در نیتروژن مایع بر میانگین صفات مختلف

Table 2. The effect of seed storage times in liquid nitrogen on average of different characteristics

زمان نگهداری	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	طول گیاهچه	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	درصد استقرار
Incubation period	Germination percentage	Radicle length mm	Shoot length mm	Seedling Length mm	Vigor Index	Radicle length/shoot length	Establishment percent
یک هفته	68.67 a*	17.36 a	9.67 a	27.03 a	18.86 a	1.77 a	18.25 a
1week							
دو هفته	67.00 a	16.22 a	9.82 a	26.04 a	17.65 a	1.65 b	16.50 a
2week							
سه هفته	66.67 a	16.67a	9.36 a	26.03 a	17.61 a	1.77 a	16.75 a
3week							

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Means with the same letter are not significantly different ( $p < 1\%$ )

## جدول ۳- اثر پیش تیمارهای قبل از ورود بذر به نیتروژن مایع بر میانگین صفات مختلف

Table 3. Effect of seed pre-treatments before entering to liquid nitrogen on means of different characteristics

پیش تیمارهای فراسرد	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	طول گیاهچه	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه شاخص بنیه بذر	درصد استقرار
Pre-cryopreservation treatments	Germination percentage	Radicle length mm	Shoot length mm	Seedling Length mm	Vigor Index	Radicle length/shoot length	Establishment percent
شاهد Control	77.22 a	19.49 a	10.78 a	30.27 a	23.58a	1.81 a	23.56 a
30%Glycerol گلیسرول ۳۰٪	66.67 ab	17.71a	9.27 bc	26.98 b	17.88b	1.91 a	13.44 b
Desiccation آبگیری	67.56 ab	18.73 a	9.78 b	28.51 ab	19.27b	1.92 a	15.44 b
PVS <sub>2</sub>	58.33 b	11.07b	8.63 c	19.70 c	11.44c	1.28 b	16.22 b

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Means with the same letter are not significantly different ( $p < 1\%$ )

PVS2 در صفت طول ریشه‌چه) تأثیری در این صفات ندارند. لیکن تعداد دیگری از صفات مانند طول ساقچه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر اولاً با قرار گرفتن در نیتروژن مایع میانگین آنها کاهش می‌یابد و از طرف دیگر تأثیر پیش- تیمارهای مختلف در میانگین این صفات به‌طور معنی‌داری متفاوت می‌باشد.

جمع‌بندی نتایج آزمایشگاهی نشان می‌دهد که، با قرار گرفتن بذر گنار در نیتروژن مایع، بعضی از صفات تغییری نشان نمی‌دهند و میانگین تعدادی از صفات نیز در حد بسیار ناچیز کاهش می‌یابند. از بین پیش تیمارهای مختلف، پیش- تیمار Desiccation مناسب‌ترین پیش تیمار برای نگهداری بذر گنار در شرایط فراسرد می‌باشد. همچنین بذر این‌گونه قابل نگهداری در نیتروژن مایع برای مدت‌زمان بسیار طولانی می‌باشد (شکل ۱). در رابطه با پیش تیمار Desiccation، آزمایش‌های انجام شده بر روی بذر و نمونه‌های رویشی نشان می‌دهد که در بعضی از گونه‌ها به‌دلیل کاهش محتوای آب بذر یا نمونه گیاهی، نگهداری در شرایط فراسرد نتیجه بهتری نسبت به روش‌های دیگر ارائه می‌دهد (Cho *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2001) و در پاره‌ای موارد به‌دلیل سمیت بعضی از مواد موجود در PVS<sub>2</sub> (Kuleshova *et al.*, 1999) این پیش تیمار تأثیر منفی در زنده‌مانی نمونه در شرایط فراسرد دارد که یافته‌های فوق در اغلب صفات همسو با نتایج تحقیقات حاضر می‌باشد.

در جمع‌بندی نتایج گلخانه‌ای می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در این بخش از آزمایش‌ها نیز مناسب‌ترین پیش تیمار برای نگهداری بذر این‌گونه در نیتروژن مایع، پیش تیمار Desiccation بوده است. در بررسی نهال‌های جوان در آزمایش‌های گلخانه‌ای و بذرهای جوانه‌زده در آزمایشگاه هیچ‌گونه علائم سوئی در بذرها و نهال‌های جوان گلخانه‌ای مشاهده نشد. در نتیجه، ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از بذرهای فراسردی همان‌گونه که توسط سایرین گزارش گردیده (Hao *et al.*, 2002؛ Dixit *et al.*, 2003؛ Sanchez *et al.*, 2008) در این بررسی نیز مشاهده شد (شکل ۲).

متابولیسم و حیاتی بذر، مدت زمان زنده‌مانی نمونه گیاهی در فراسرد، به‌شدت افزایش می‌یابد.

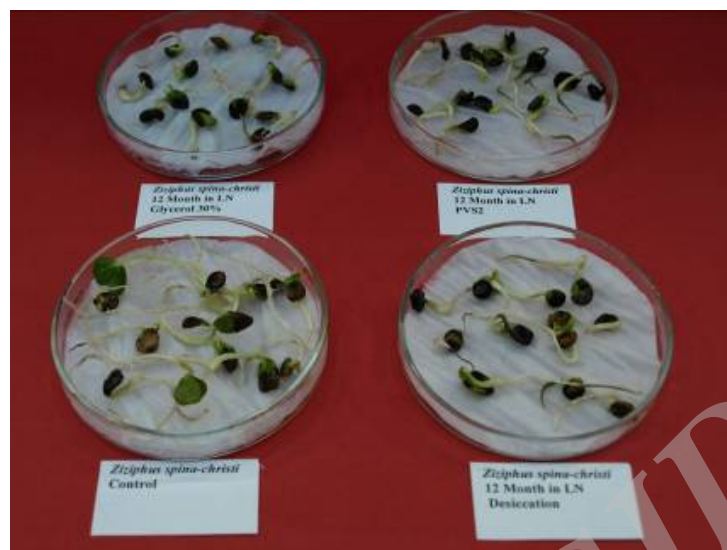
اثر پیش تیمارهای مختلف بر میانگین صفات مختلف و مقایسه آنها با تیمار شاهد در جدول ۳ ارائه شده است. در اغلب صفات، میانگین شاهد بیشتر از میانگین بذرهای پیش- تیمارهای فراسرد است. نتیجه این که در اغلب موارد قرار گرفتن بذر در نیتروژن مایع باعث کاهش درصد جوانه‌زنی و میانگین سایر صفات می‌شود. به‌عنوان نمونه، میانگین کل جوانه‌زنی در تیمارهای شاهد، گلیسرول ۳۰ درصد، Desiccation و PVS<sub>2</sub> به ترتیب ۷۷/۲ درصد، ۶۶/۶ درصد، ۶۷/۵ درصد و ۵۸/۳ درصد می‌باشد، به طوری که جوانه‌زنی بذرهای فراسرد به‌طور معنی‌داری کمتر از بذرهای شاهد می‌باشد (جدول ۳). در مقایسه بین پیش تیمارهای فراسرد نیز، تیمار PVS<sub>2</sub> میانگین کمتری را نشان می‌دهد.

در بین پیش تیمارهای فراسردی، Desiccation با بیشترین میانگین طول ریشه‌چه، گیاهچه و شاخص بنیه بذر از روند با ثباتی در زمان‌های یک‌هفته، یک‌ماه و یک‌سال ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع نشان می‌دهد. پس از آن تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و PVS<sub>2</sub> در رده‌های بعدی قرار دارند.

بررسی‌های گلخانه‌ای و میانگین سبز کردن و استقرار بذر و تولید نهال‌های جوان در گلخانه مربوط به پیش تیمارها و زمان‌های ماندگاری بذر در نیتروژن مایع، همراه با بذرهای شاهد نیز در یک‌هفته، یک‌ماه و یک‌سال از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

نتایج در جدول‌های قبل نشان می‌دهند که استفاده از هر یک از پیش تیمارهای فراسردی و مدت‌زمان نگهداری بذر در نیتروژن مایع تأثیری در میانگین جوانه‌زنی بذر گنار ندارد. نکته قابل تأمل در انجام پژوهش فوق این بود انتخاب صفات مختلف در این‌گونه مقایسه‌ها منجر به دستیابی به اطلاعات متفاوت و گسترده‌تری می‌شود که در نتیجه‌گیری نهایی بسیار مهم می‌باشد.

به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند که عکس‌العمل صفات مختلف به ذخیره‌سازی بذر در نیتروژن مایع متفاوت بود. در بعضی از صفات مانند درصد جوانه‌زنی بذر و طول ریشه‌چه، زمان نگهداری در نیتروژن مایع و پیش تیمارها (به استثناء



شکل ۱: جوانه زنی بذرهای تیمار شده با پیش تیمارهای مختلف که یک سال در نیتروژن مایع ذخیره شده‌اند همراه با بذرهای شاهد

Figure 1. Germination of treated seeds with different pre-cryopreserved that are stored in liquid nitrogen for a year with control seeds



شکل ۲: استقرار و رشد نهال‌های حاصل از یک هفته، یک ماه و یک سال ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع با پیش تیمارهای مختلف همراه با شاهد در شرایط گلخانه

Figure 2. Establishment and growth of one week, one month and one year seedlings of cryopreserved in liquid nitrogen with various pre-treatment and control in greenhouse condition

فشار چرا، شخم و غیره، گیاه فرصت زادآوری نداشته و در صورت از بین رفتن پایه‌های مسن، نابودی گونه و از بین رفتن رویشگاه‌ها دور از انتظار نیست. از طرفی با ورود ارقام اصلاح شده با میوه درشت و بازارپسندی بالا از خارج از کشور، امکان جایگزینی ارقام اصلاح شده و حذف گونه‌های بومی از باغ‌های جنوب کشور حتمی است. جایگزینی گونه داخلی با ارقام خارجی، فرسایش ژنتیکی این گونه ارزشمند را

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، این گونه گرمسیری از دو دیدگاه دارای اهمیت می‌باشد. نخست به‌عنوان یکی از گونه‌های سازگار مناطق جنوبی کشور که برای فضای سبز شهری، روستایی و داخل مزارع دارای اهمیت است. دوم به‌عنوان گونه منابع طبیعی که تقریباً کلیه رویشگاه‌های طبیعی آن در معرض خطر می‌باشد. در بازدید نگارنده از عرصه‌های رویشگاهی مختلف گیاه در خوزستان، مشاهده شد که به‌دلیل

## سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که اعتبارات مورد نیاز این تحقیق را در قالب طرح مصوب "بررسی امکان نگهداری بذر تعدادی از گونه‌های جنگلی در شرایط فراسرد" تأمین نمود، تشکر می‌شود. از جناب آقای دکتر قمری زارع رئیس وقت گروه زیست‌فناوری منابع طبیعی ایران به دلیل مساعدت‌های بی‌دریغ‌شان تشکر می‌شود.

در پی خواهد داشت. لذا توصیه می‌شود، قبل از نابودی پایه‌های موجود در رویشگاه‌های طبیعی در خوزستان و سایر مناطق کشور ابتدا نسبت به شناسایی و مشخص نمودن عرصه‌های رویشگاهی گیاه با درج مختصات بر روی نقشه جغرافیایی و سپس با جمع‌آوری و نگهداری بذر از رویشگاه‌های طبیعی و نگهداری آنها در شرایط فراسرد این امکان فراهم شود تا در صورت از بین رفتن پایه‌های موجود، زمینه احیای گونه و رویشگاه‌ها وجود داشته باشد.

## منابع

- Assareh, M.A. and Sabaghzadeh, F. 2002. Asexual proppagation of Christ's Thorn Jujube *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. by tissue culture. Pajohesh and Sazandegi, 55: 19-22. (In Persian) **(Journal)**
- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13: 630-633. **(Journal)**
- Chang, Y. and Reed, B.M. 1999. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. *CryoLetters*, 20(6): 371-376. **(Journal)**
- Cho, E.G., Noor, N.M., Kim, H.H., Rao, V.R. and Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of *Citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a desiccation protocol. *CryoLetters*, 23(5): 309-316. **(Journal)**
- De Carlo, A., Benelli, C. and Lambardi, M. 2000. Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters*, 21: 215-222. **(Journal)**
- Dinarvand, M. and Zarinkamar, F. 2006. Anatomy-taxonomy of the genus *Ziziphus* in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 12(1): 36-41. (In Persian)**(Journal)**
- Dixit, S., Mandal, B.B., Sangeeta, A. and Srivastava, P.S. 2003. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *CryoLetters*, 24 (2): 77-84. **(Journal)**
- Jebelli, M., Naderishahab, M.A. and Jafari, A.A. 2014. Cryopreservation of seeds of some of the forest species (*Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne) and *Acacia nilotica* (L.) Delile. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23 (1): 1103-111. (In Persian)**(Journal)**
- Jebelli, M., Naderishahab, M.A., Feizi, H. and Jafari, A A. 2015. Cryopreservation of *Populus Euphratica* Oliv. seeds and establishment of the cryopreserved seeds under laboratory and green house conditions. *Iranian Journal of Horticultural*, 46(2): 313-322. (In Persian)**(Journal)**
- Jebelli, M., Naderishahab, M.A., Jafari, A.A. and Hatami, F. 2014 Seed cryopreservation of *Robinia pseudoacacia* L. *Iranian Journal of Forest*, 6(2): 245-254. (In Persian)**(Journal)**
- Hao, Y., Cheng, Y. and Deng, X. 2003. *Gus* gene remains stable in transgenic *citrus* callus recovered from cryopreservation. *CryoLetters*, 24(6): 375-380. (In Persian)**(Journal)**
- Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. and Shaw, J.M. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38 (2): 119-130. (In Persian)**(Journal)**
- Kushnarenko, S.V., Romadanova, N.V. and Reed, B.M. 2009. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips. *CryoLetters*, 30(1): 47-54. (In Persian)**(Journal)**
- Mandal, B.B. and Dixit-Sharma, S. 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of *dioscorea deltoidea* Wall., an endangered medicinal plant: effect of cryogenic procedure and storage duration. *CryoLetters*, 28(6): 461-470. (In Persian)**(Journal)**



- Matsumoto, T., Sakai, A. and Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant. *Plant Cell Report*, 13: 442-446. **(Journal)**
- Mix-Wagner, G., Schumacher, H.M. and Cross, R.J. 2003. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetters*, 24 (1): 33-42. **(Journal)**
- Motamedi, H., Safary, A., Maleki, S. and Seyyednejad, S.M. 2009. *Ziziphus spina-christi*, a native plant from Khuzestan, Iran, as a potential source for discovery new antimicrobial agents. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(2): 187-190. **(Journal)**
- Moustafa, A.E.A., El-Wahab, R.H.A., Helmy, M.A. and Batanouny, K.H. 1998. Phenology, germination and propagation of some wild trees and shrubs in south Sinai, Egypt. *Egyptian Journal of Botany*, 36: 91-107. **(Journal)**
- Mozaffarian, V. 2004. Trees and shrubs of Iran. Farhang Moaser Publication, Tehran, Iran. (In Persian) **(Book)**
- Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E.A., Gumusel, F. and Lambardi, M. 2007. Cryopreservation of *Pistacia* spp. seeds by dehydration and one-step freezing. *CryoLetters*, 28(2): 83-94. **(Journal)**
- Sabeti, H. 2004. Forests trees and shrubs of Iran. Yazd University Publication. pp:536. (In Persian) **(Book)**
- Sakai A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Journal of Plant Physiology*, 137: 465-470. **(Journal)**
- Sanayaima, R.K., Kaur, A., Agrawal, A. and Babbar, S.B. 2006. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Crateva nurvala* Buch. Ham, and important medicinal tree. *CryoLetters*, 27(6): 375-386. **(Journal)**
- Sánchez, C., Martinez, M.T., Vidal, N., San-José, M.C., Valladares, S. and Vieitez, A.M. 2008. Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters*, 29 (6): 493-504. **(Journal)**
- Sant, R., Taylor, M. and Tyagi, A. 2006. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification. *CryoLetters*, 27(3): 133-142. **(Journal)**
- Schoenweiss, K., Meier-Dinkel, A. and Grotha, R. 2005. Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *CryoLetters*, 26(3): 201-212. **(Journal)**
- Senula, A., Keller, E.R.J., Sanduijav, T. and Johannes, T. 2007. Cryopreservation of cold-acclimated mint (*Mentha* spp.) shoot tips using a simple vitrification protocol. *Cryoletters*, 28(1): 1-12. **(Journal)**
- Seo, M.J., Shin, J.H. and Sohn, J.K. 2007. Cryopreservation of dormant herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) shoot-tips by desiccation. *CryoLetters*, 28(3): 207-213. **(Journal)**
- Sherlock, G., Block, W. and Benson, E.E. 2005. Thermal analysis of the plant encapsulation-dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant. *CryoLetters*, 26(1): 45-54. **(Journal)**
- Stewart, P., Taylor, M. and Mycock, D. 2001. The sequence of the preparative procedures affects the success of cryostorage of cassava somatic embryos. *CryoLetters*, 22(1): 35-42. **(Journal)**
- Towill, L.E., Bonnart, R. and Volk, G.M. 2006. Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* shoot tips. *CryoLetters*, 27(6): 352-360. **(Journal)**
- Walters, C., Wheeler, L.J. and Stanwood, P.C. 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244. **(Journal)**
- Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F. and Zhou, M. 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *CryoLetters*, 22(5): 321-328. **(Journal)**

## Assesment of maintenance of *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. seed under cryogenic conditions

Mohabbatali Naderi-Shahab<sup>1</sup>, Maryam Jebelli<sup>2\*</sup>, Ali Ashraf Jafari<sup>3</sup>

Received: January 12, 2015

Accepted: July 4, 2015

### Abstract

*Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. Is an arboreal species which grows in hot natural habitats of Southern Iran. Regarding the genetic diversity of the species in the country, collection and long-term preservation of seed germplasm in order to prevent genetic erosion and risk, have a great priority. To evaluate the possibility of long-term preservation of the *Ziziphus spina-christi* seeds under cryogenic conditions, three pre-cryopreservation methods including PVS2, Desiccation, and 30%Glycerol were applied before incubation of the seeds under cryopreservation conditions (-196°C) or liquid nitrogen (LN). The treated seeds were incubated in LN for periods of 1 week, 1 month and 1 year. Subsequently, the cryopreserved seeds were removed from cryogenic condition and evaluated under laboratory and greenhouse conditions. The results showed that seeds of *Ziziphus spina-christi* are able to tolerate cryogenic conditions. Effects of the cryopreservation pre-treatments including 30%Glycerol, Desiccation and PVS2 were significantly different on seed attributes and, Desiccation showed the best effects on survival rates and other attributes of the cryopreserved seeds. The interaction effects between cryogenic storage periods and pretreatments were significant for some of the attributes. However some of the attributes did not show different means in different incubation periods. In greenhouse conditions, the cryopreserved seeds were germinated and established well and, Desiccation method showed better results compare to those of the 30%Glycerol and PVS2.

**Key words:** Cryopreservation; Desiccation; Forest species; *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf

1. Faculty member; Research Institute of Forests and Rangelands; Agricultural Research, Education and Extension Organization; Tehran; Iran.
2. Researcher, Research Institute of Forests and Rangelands; Agricultural Research, Education and Extension Organization; Tehran; Iran.
3. Research Professor, Research Institute of Forests and Rangelands; Agricultural Research, Education and Extension Organization; Tehran; Iran.

\*Corresponding author: Jebelly@rifr-ac.ir