Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۸۵-۷۱ (۱۳۹۸)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.121801.1302
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.73.53.1.1575.1583

امکان‌سنجی نگهداری بذرهای شب‌خسب (*Albizia julibrissin* Durazz.) در شرایط فراسرد

صالح سخاوت[۱]، امید اسماعیل‌زاده[۲] و مریم جبلی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
پست الکترونیک: oesmailzadeh@modares.ac.ir
۳- کارشناس ارشد پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲

چکیده

شب‌خسب یکی از گونه‌های درختی نیام‌دار بومی جنگل‌های جلگه‌ای و پایین‌بند ناحیه هیرکانی است که به‌دلیل ابتلا به بیماری قارچی دچار صدمات زیادی شده است. در این تحقیق، امکان استفاده از فناوری فراسرد برای ذخیره‌سازی بذرهای شب‌خسب مورد بررسی قرار گرفت. جمع‌آوری بذر از تعداد ۱۰ پایه درختی از جنگل‌های پایین‌بند حوزه غرب هراز واقع در استان مازندران انجام شد. به‌منظور امکان‌سنجی قابلیت نگهداری بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد از نتایج خصوصیات جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب در دو حالت نگهداری در شرایط فراسرد (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) با چهار پیش‌تیمار آماده‌سازی شامل: ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار به همراه تیمار شاهد (نگهداری در شرایط خشک و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. بذرها پس از نگهداری یک‌هفته و یک‌ماه در شرایط فراسرد خارج و در آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد (شوک حرارتی) قرار داده شدند. سپس برای جوانه‌زنی درون پتری‌دیش قرار گرفته و به ژرمیناتور با دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. ثبت و شمارش بذرهای جوانه‌زده بصورت روزانه تا زمانی که دیگر هیچ بذری جوانه نزد انجام شد. نتایج تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون مقایسه میانگین دانکن نشان داد که صفات مختلف جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب در ۴ پیش‌تیمار مربوط به فراسرد با تیمار شاهد تفاوت فاحشی نداشت. ازاین‌رو نتیجه‌گیری شد که نگهداری بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد امکان‌پذیر است. نتایج این تحقیق همچنین تصریح می‌کند که بذرهای گونه شب‌خسب به دلیل داشتن پوسته سخت بذر و محتوای رطوبتی بسیار پایین می‌توانند بدون استفاده از مواد ضدانجماد (بدون پیش‌تیمار) در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. ازاین‌رو می‌توان بدون انجام پیش‌تیمار نسبت به ذخیره‌سازی بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد اقدام نمود و بانک بذر فراسرد را به‌عنوان راهبردی مؤثر برای حفاظت از ظرفیت ژنتیکی این گونه ارزشمند در سطح جنگل‌های هیرکانی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: بانک بذر فراسرد، جوانه‌زنی بذر، شب‌خسب، کاهش رطوبت، گلیسرول، ویتریفیکاسیون.

مقدمه

شب‌خسب (*Albizia julibrissin* Durazz.) یکی از گونه‌های درختی نیام‌دار بومی جنگل‌های هیرکانی است که با توجه به نورپسند و گرمادوست بودن، در رویشگاه‌های باز و نورگیر نواحی جلگه‌ای و پایین‌بند (تا ارتفاع ۴۰۰ متر از سطح دریا) پراکنش دارد (Sabeti, 1995). رویشگاه اصلی شب‌خسب، ناحیه رویشی هند و مالزی (شامل جنگل-های حاره‌ای میانمار، بوتان، نپال، پاکستان و میانمار) است

www.SID.ir

Archive of SID

ولی در نواحی معتدله آسیا (شامل جنگل‌های ژاپن، چین، تایوان، ایران، ترکیه و جمهوری آذربایجان) به‌طور طبیعی گسترش دارد (Cheatham *et al.*, 1995; Orwa *et al.*, 2009). قدمت حضور این گونه درختی در جنگل‌های هیرکانی مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی می‌باشد و از این نظر به‌عنوان یکی از درختان بازمانده اقلیمی دوره ترشیاری (Tertiary) در جنگل‌های هیرکانی محسوب می‌شود (Akhani *et al.*, 2010).

شب‌خسب در گذشته به‌عنوان یکی از گونه‌های درختی پیشاهنگ حضور چشمگیری در جنگل‌های شمال داشته (Sabeti, 1995) ولی متأسفانه امروزه به دلیل ابتلاء به بیماری قارچی *Fusarium oxysporum* (Rahnama, 2010 & Panahian)، حضور آن فقط به تعدادی از تک درختان جوان، آن هم در عرصه‌های دستخوش تخریب جنگل‌های جلگه‌ای و پایین‌بند هیرکانی محدود شده است. با توجه به پراکنش این گونه در مناطق جلگه‌ای و پایین‌بند، در نیم قرن اخیر به دلیل فعالیت‌های بی‌رویه انسانی ازجمله سکونت، واگذاری جنگل‌های جلگه به روستاییان، ورود دام و بهره‌برداری از آن به دلیل تولید چوب با ارزش سبب شده تا رویشگاه‌های طبیعی این گونه بسیار محدود شود تا حدی که این گونه در طبقه در معرض خطر اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت یا IUCN معرفی شود (Jalili & Jamzad, 1999).

یکی از راه‌های مناسب حفاظت ظرفیت تنوع‌ژنتیکی گیاهی در خارج از رویشگاه، استفاده از فناوری فراسرد است (Engelman, 2004). فناوری فراسرد (Cryopreservation)، روش ذخیره‌سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی در شرایط دمایی کمتر از ۸۰- (دی‌اکسیدکربن) تا ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (ازت مایع) است (Popov *et al.*, 2006; Reed, 2008). با این فناوری می‌توان به نگهداری طولانی‌مدت بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه‌گرده که فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک آنها در شرایط دمایی فوق سرد (عدم تقسیم سلولی و کاهش شدید سوخت‌وساز) تقریبا متوقف شده کمک کرد (Kaviani *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2016). منابع ژنتیکی گیاهی را می‌توان در داخل رویشگاه اصلی (با حفاظت از رویشگاه طبیعی که در آن گونه هدف استقرار دارد) و یا خارج از رویشگاه اصلی (حفاظت و نگهداری در مناطقی امن مانند باغ‌های گیاه‌شناسی یا به صورت نمونه یا بذر در شرایط آزمایشگاهی) ذخیره و حفاظت کرد. اخیراً بهره‌گیری از روش فراسرد در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیک حفاظت از گونه‌های گیاهی مانند ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی ملی و منطقه‌ای، بانک ژن بذرهای جنگلی و مرتعی و عرصه‌های حفاظت شده جنگلی، برای حفاظت از گونه‌های گیاهی به سرعت در حال توسعه می‌باشد (Hatami *et al.*, 2010). این روش به‌ویژه برای مواقعی که امکان نگهداری بلندمدت بذرها با استفاده از روش‌های معمول سردخانه‌ای (کاهش دمای محیط به همراه کاهش رطوبت بذر) فراهم نباشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Michalak *et al.*, 2013).

تاکنون مطالعات پراکنده‌ای در ارتباط با نگهداری بذر درختان در شرایط فراسرد انجام شده که از آن جمله می‌توان به مطالعه گونه‌هایی مانند اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) (Jebeli *et al.*, 2014)، گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.) (Chmielarz, 2009)، کیکم (*Acer monspessulanum* L.) (Hatami *et al.*, 2010a)، اکالیپتوس (*Eucalyptus microtheca* F. Muell.) (Hatami *et al.*, 2010b)، ملج (*Ulmus glabra* Huds.) (Chmielarz, 2010)، فندق (*Coryllus avellana* L.) (Michalak *et al.*, 2013)، پده (*Populus euphratica* Oliv.) (Jebeli *et al.*, 2015a)، گبر (*Acacia tortilis* (Forssk. Jebeli) و چش یا کرت (*Acacia nilotica* L.) (Jebeli *et al.*, 2015b)، سرو خمره‌ای (*Biota orientalis* L.) (Naderi Shahab *et al.*, 2009) و ملج (*Ulmus glabra* Huds.) (Naderi Shahab *et al.*, 2017) اشاره نمود. نتایج این تحقیقات نشان داد که بهره‌گیری از دو پیش‌تیمار درصد کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب به دلیل کاهش رطوبت بذر و تبدیل ماهیت رطوبت بذر به یک حالت ژله‌ای که فاقد ساختار کریستالی است سبب می‌شود امکان

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری بذرها در شرایط دمایی فراسرد فراهم شود. حصول چنین شرایطی که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر بسیار اندک بوده و امکان فعالیت عوامل بیماری‌زا نیز وجود ندارد، نویدبخش امکان ذخیره‌سازی بذرهای گونه‌های مزبور برای دوره‌های طولانی‌مدت به‌منظور جلوگیری از خطر انقراض آنها می‌باشد.

شب‌خسب اگرچه به‌دلیل تولید بذرهای سخت و قابلیت تشکیل بانک بذر خاک دائمی بلندمدت قادر است ظرفیت تنوع ژنتیکی خود را در سطح جنگل‌های شمال حفظ کند اما با توجه به اینکه بخشی از گستره رویشگاهی این گونه در توده‌های جنگلی شمشاد هیرکانی مثل سی‌سنگان و مزگاء (نوشهر)، انجیلی‌سرا (شیرگاه) و چشمه‌بلبل (بندرگز) بوده، متأسفانه به دلیل انهدام تاج‌پوشش درختان شمشاد در جنگل‌های مزبور به دلیل بیماری سوختگی برگ شمشاد توسط قارچ *Calonecteria pseudonaviculata* (Mirabolfathy *et al.*, 2013) و آفت شب‌پره شمشاد (*Cydalima perspectalis*) (Ahangaran, 2017)، نور زیادی به زیراشکوب جنگل رسیده که این امر منجر به جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب مدفون در داخل خاک این رویشگاه‌ها شده و سبب گردیده تا از ذخایر ژنتیکی شب‌خسب کاسته شود. چون نونهال‌های رشد کرده به دلیل ابتلا به بیماری قارچی فوزاریم محکوم به فنا می‌باشد. به دیگر سخن جوانه‌زنی از محل بانک بذر خاک سبب می‌شود تا همواره از ظرفیت تنوع ژنتیکی بانک بذر خاک شب‌خسب در رویشگاه‌های شمشاد هیرکانی کاسته شود. ازاین‌رو این تحقیق در نظر دارد تا با امکان‌سنجی قابلیت نگهداری بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد نسبت به ارائه یک روش حفاظتی مناسب خارج از رویشگاهی در قالب بانک بذر فراسرد (Cryo seed bank) اقدام کند.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام آزمایش امکان‌سنجی نگهداری بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد، جمع‌آوری بذرهای شب‌خسب از تعداد ۱۰ پایه درختی با قطر ۱۵–۲۵ سانتی‌متری از جنگل‌های پایین‌بند حوزه غرب هراز واقع در استان مازندران در آبان‌ماه سال ۹۴ انجام شد. آزمایش فراسرد در آزمایشگاه مرکزی دانشکده منابع‌طبیعی نور و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. پیش‌تیمارهای فراسرد یا تیمارهای قبل از ورود بذرهای شب‌خسب به شرایط فراسرد به‌شرح زیر است.

پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification): در این پیش‌تیمار از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و لودینگ (Loading) استفاده شد. برای این منظور نخست به کرایوتیوپ‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، محلول لودینگ شامل ساکارز (Sucrose) ۰/۴ مولار و گلیسرول (Glycerol) ۲ مولار افزوده شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد در ژرمیناتور نگهداری شدند. سپس محلول را کاملاً تخلیه کرده و به لوله‌های حاوی بذر محلول ویتریفیکاسیون شامل اتیلن گلیکول (Ethylenglycol) ۱۵ درصد و دی‌متیل‌سولفوکسید (Dimethyl soulfoxide) یا DMSO ۱۵ درصد، گلیسرول ۳۰ درصد و ساکارز ۰/۴ مولار اضافه شده و پس از بستن در لوله‌های حاوی بذر به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۴+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت لوله‌های بذر وارد شرایط فراسرد (ازت مایع) شدند.

پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation): در این تیمار، وزن اولیه بذر با ترازوی حساس (۰/۰۰۰۱ گرمی) تعیین گردید. سپس بذرها به مدت ۷۲ ساعت در آون و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Ghassemi-Golezani & Dalil, 2011)، پس از قرار گرفتن در آون نیز وزن بذرها محاسبه گردید. درصد رطوبت بذر از حاصل تقسیم اختلاف وزن بذرها، قبل و بعد از قرارگیری در آون به وزن اولیه تعیین شد (رابطه ۱).

(رابطه ۱) ۱۰۰ × [وزن اولیه بذر/ (وزن بذر پس از خشک شدن– وزن اولیه بذر)]

www.SID.ir

Archive of SID

در تیمار کاهش رطوبت بذر، بذرها به مدت یک هفته در دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر سیلیکاژل خشک (۱۰ برابر وزن بذر) منتقل و به‌مدت یک هفته در سردخانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس بذرها از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس توزین گردیدند. درصد رطوبت بذر پس از رطوبت‌گیری در دسیکاتور با استفاده از رابطه ۱ برآورد شد. از تفاضل رطوبت اولیه بذر از رطوبت بذر در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر محاسبه شد. در نهایت درصد کاهش رطوبت بذر در تیمار کاهش رطوبت از نسبت درصد رطوبت کاهش یافته به درصد رطوبت بذر (که از طریق قرار دادن در آون بدست می‌آید) مشخص شد. بذرها پس از خروج از دسیکاتور به کرایوتیوپ‌ها منتقل و بعد وارد ازت مایع شدند.

پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد: ابتدا محلول گلیسرول ۳۰ درصد با اضافه نمودن ۳۰ میلی‌لیتر گلیسرول خالص به ۷۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر تهیه شد. سپس محلول آماده شده به کرایوتیوپ‌های حاوی بذر اضافه شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند . پس از آن کرایوتیوپ‌ها وارد ازت مایع گردید.

بدون پیش‌تیمار: در این حالت بذرهای شب‌خسب بدون اعمال هیچ‌گونه پیش‌تیماری (بدون استفاده از مواد ضد انجمادی) در درون لوله آزمایش قرار داده شد و مستقیم وارد ازت مایع شدند.

تیمار (شاهد): در این حالت بذرهای شب‌خسب بدون اعمال هیچ‌گونه تیماری در داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شد و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کلیه تیمارها به‌جز شاهد به مدت یک‌هفته و یک‌ماه در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان نگهداری در ازت مایع، بذرها از ازت مایع خارج و همراه بذرهای شاهد به مدت ۲ دقیقه در آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد (شوک حرارتی) قرار داده شدند (Hatami *et al.*, 2010a). پس از شوک حرارتی، نمونه بذرهای فراسرد و شاهد برای تعیین درصد جوانه‌زنی در پتری‌دیش حاوی ماسه استریل قرار گرفته و در ژرمیناتور با دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

درصد جوانه‌زنی بذرها، سرعت جوانه‌زنی (رابطه ۲)، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه پس از سبز شدن بذرها اندازه‌گیری گردید.

$$\text{سرعت جوانه‌زنی} = \sum ni/di \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

n_i = تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز d_i = تعداد روزهای پس از کاشت

با مشخص شدن درصد جوانه‌زنی بذرها و میانگین مجموع طول ریشه‌چه و ساقه‌چه (طول گیاهچه) در شرایط آزمایشگاهی، شاخص بنیه بذر با استفاده از رابطه ۳ برآورد شد (Abdul Baki & Anderson, 1973).

$$\text{شاخص بنیه‌بذر} = \text{درصد جوانه‌زنی} \times \text{میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر} / ۱۰۰ \qquad \text{(رابطه ۳)}$$

آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور پیش‌تیمارهای فراسرد و زمان ذخیره‌سازی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تکرار انجام شد. فاکتور اول تیمارهای قبل از فراسرد شامل کاهش رطوبت (از طریق دسیکاتور)، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و بدون پیش‌تیمار (بدون استفاده از مواد ضد انجماد) و شاهد و فاکتور دوم دو بازه زمانی (یک هفته‌ای و یک‌ماه) بودند. پتری‌دیش‌ها هریک حاوی حداقل ۵۰ عدد بذر به‌عنوان واحدهای آزمایشی به‌شمار می‌روند. آزمون مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

براساس نتایج این تحقیق، وزن هزار دانه و درصد رطوبت بذر شب‌خسب به‌ترتیب ۱۲±۸۸ گرم و ۰/۲±۴/۱ درصد برآورد شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های

www.SID.ir

Archive of SID

بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد نشان داد که بین تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار (بدون استفاده از مواد ضد انجماد) بر صفاتی مانند درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه به‌جز نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد. همچنین مدت - زمان‌های یک هفته و یک ماه نگهداری در شرایط فراسرد و اثر متقابل پیش‌تیمارها و زمان بر صفات مذکور اختلاف معنی‌داری را در سطح ۱ درصد نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمارها، زمان‌ها و اثر متقابل آنها بر نگهداری بذرهای گونه شب‌خسب در شرایط آزمایشگاهی پس از خروج از دمای ۱۹۶°C-

ویژگی‌های مطالعاتی	پیش‌تیمار		زمان		پیش‌تیمار* زمان		خطا
	MS	F	MS	F	MS	F	MS
درصد جوانه‌زنی	۱۶۶/۱۹	۴/۳۵**	۱۲۲۷/۴۹	۳۲/۱۳**	۱۲۰/۸۸	۳/۱۶**	۳۸/۲۰
سرعت جوانه‌زنی	۱۳۳/۵۵	۱۹/۲۸**	۱۰۵۳/۴۴	۱۵۲/۰۴**	۴۷/۵۳	۶/۸۶**	۶/۹۳
شاخص بنیه بذر	۱۰۶۹/۷۱	۱۱/۱۹**	۱۶۶۷۵/۱۹	۱۷۴/۴۱**	۶۷۱/۱۷	۷/۰۲**	۹۵/۶۱
طول ریشه‌چه	۲۶۶/۳۰	۸/۵۶**	۷۴۶۷/۲۸	۲۳۹/۹۰**	۲۳۸/۳۵	۷/۶۶**	۳۱/۱۳
طول ساقه‌چه	۹۳/۰۷	۲۵/۱۹**	۲۹۰/۹۷	۷۸/۷۶**	۲۶/۰۱	۷/۰۴**	۳/۶۹
طول گیاهچه	۶۴۵/۴۳	۱۴/۰۱**	۱۰۶۴۷/۱۲	۲۳۱/۱۱**	۳۵۸/۷۹	۷/۷۹**	۴۶/۰۷
نسبت‌طول ریشه‌چه به ساقه‌چه	۰/۰۱	۱/۴۶ns	۱/۶۳	۱۶۰/۸۵**	۰/۰۷	۷/۱۷**	۰/۰۱

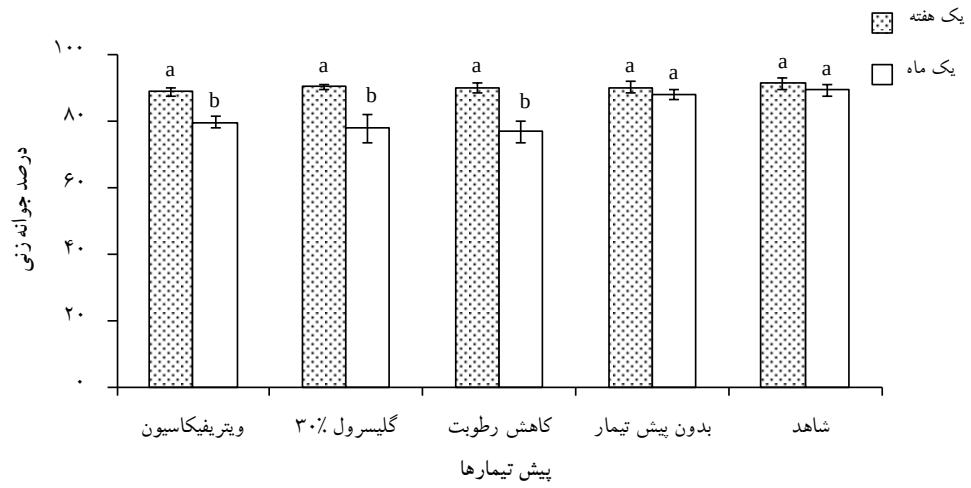
** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد و عدم معنی‌داری

در بررسی درصد جوانه‌زنی بذرها، پیش‌تیمارها در زمان-های نگهداری نشان داد که درصد جوانه‌زنی تمامی پیش‌تیمار-های یک هفته شامل گلیسرول ۳۰ درصد، بدون پیش‌تیمار، کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب با درصد جوانه‌زنی ۹۰/۱۰، ۹۰، ۸۹/۹۰ و ۸۸/۶۵ به همراه شاهد در یک هفته (۹۱/۰۷) و یک ماه (۸۹/۰۶) و بدون پیش‌تیمار در یک ماه (۸۷/۹۴) دارای بیشترین مقدار و پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶ °C- (به ترتیب با درصد جوانه‌زنی ۷۹/۳۳، ۷۷/۶۰ و ۷۶/۶۲) کمترین مقدار بودند. بنابراین روند نزولی درصد جوانه‌زنی از یک هفته به یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد و نسبت به شاهد در بین پیش-تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت به‌ترتیب ۹/۳۲، ۱۲/۵۰ و ۱۳/۲۸ بیشترین و بدون پیش‌تیمار (۲/۰۶) کمترین بود (شکل ۱).

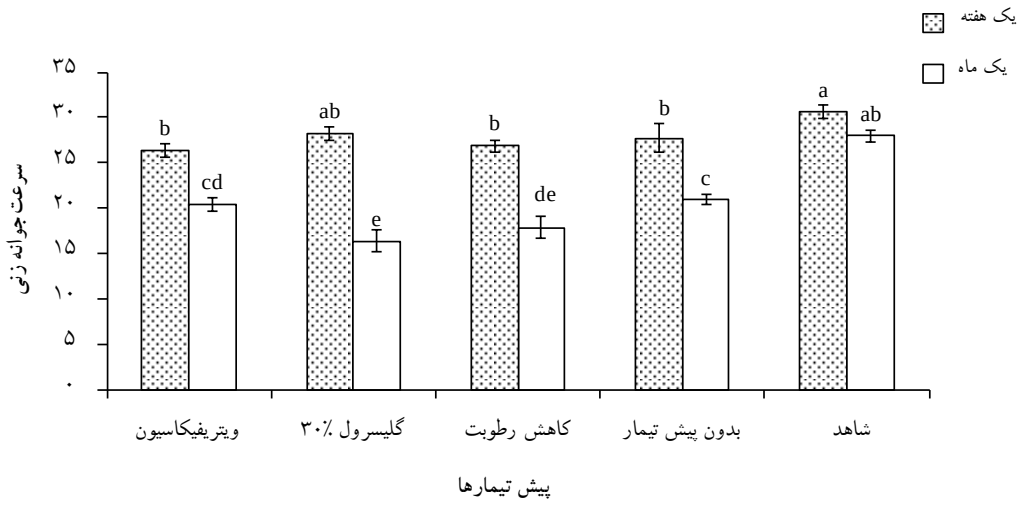
سرعت جوانه‌زنی در بین پیش‌تیمارها، تیمار شاهد با یک هفته نگهداری در دمای یخچال ۴+ °C با میانگین ۳۰/۶۰ بیشترین مقدار و پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد با یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد با میانگین ۱۶/۳۶ کمترین مقدار بود. در بین پیش‌تیمارهای فراسردی یک هفته ذخیره-سازی در نیتروژن مایع، گلیسرول ۳۰ درصد با میانگین ۲۸/۲۱ بیشترین مقدار و سه پیش‌تیمار دیگر شامل بدون پیش‌تیمار، کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب با میانگین ۲۷/۷۱، ۲۶/۸۷ و ۲۶/۴۲ کمترین مقدار بودند اما در بین پیش‌تیمارهای فراسردی یک ماه ذخیره‌سازی بدون پیش‌تیمار با میانگین ۲۰/۸۶ بیشترین و گلیسرول ۳۰ درصد با میانگین ۱۶/۳۶ کمترین مقدار بود. به‌طورکلی روند کاهشی سرعت جوانه‌زنی از یک هفته به یک ماه در شرایط فراسرد و نسبت به شاهد در پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد (۱۱/۸۵) بیشترین و ویتریفیکاسیون و بدون پیش‌تیمار (به‌ترتیب ۵/۹۵ و ۶/۸۵) دارای کمترین مقدار بودند (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر درصد جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶ºC-



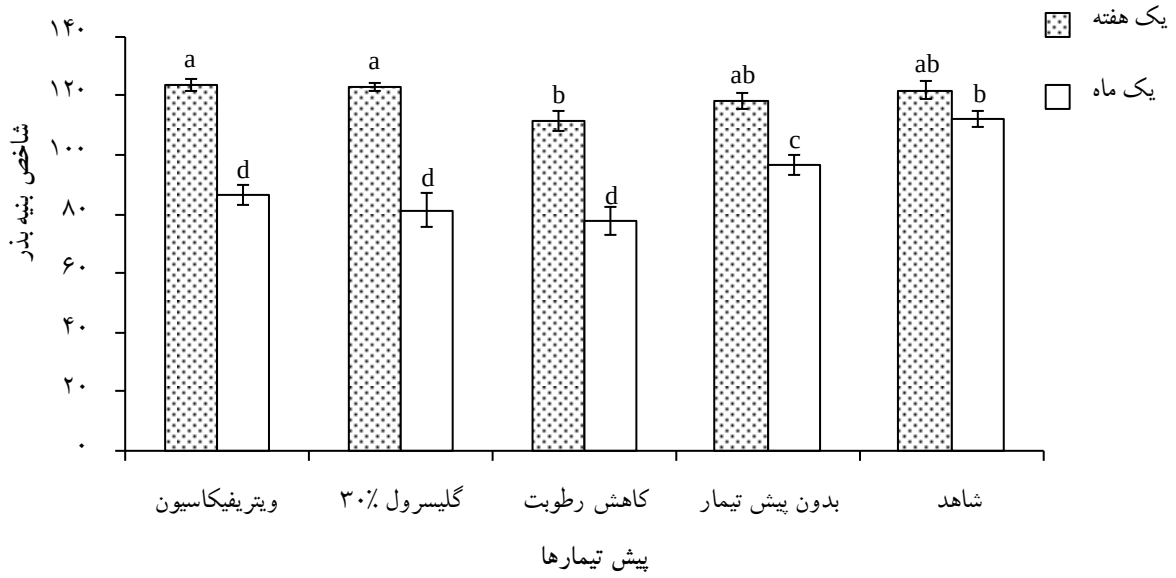
شکل ۲- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶ºC-

در بررسی شاخص بنیه بذر در بین پیش‌تیمارها با یک هفته نگهداری پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد به‌ترتیب با مقادیر ۱۲۳/۵۴ و ۱۲۳/۰۵ دارای بالاترین مقدار و کاهش رطوبت دارای کمترین مقدار بودند، اما در این رابطه بین تیمارها با یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد، بیشترین مقدار مربوط به بدون پیش‌تیمار (۹۶/۴۶) و کمترین مقدار مربوط به سه پیش‌تیمار دیگر است. از نظر شاخص بنیه بذر پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد با یک هفته نگهداری به‌ترتیب با ۱۲۳/۵۴ و ۱۲۳/۰۵ از بیشترین مقدار و ویتریفیکاسیون،

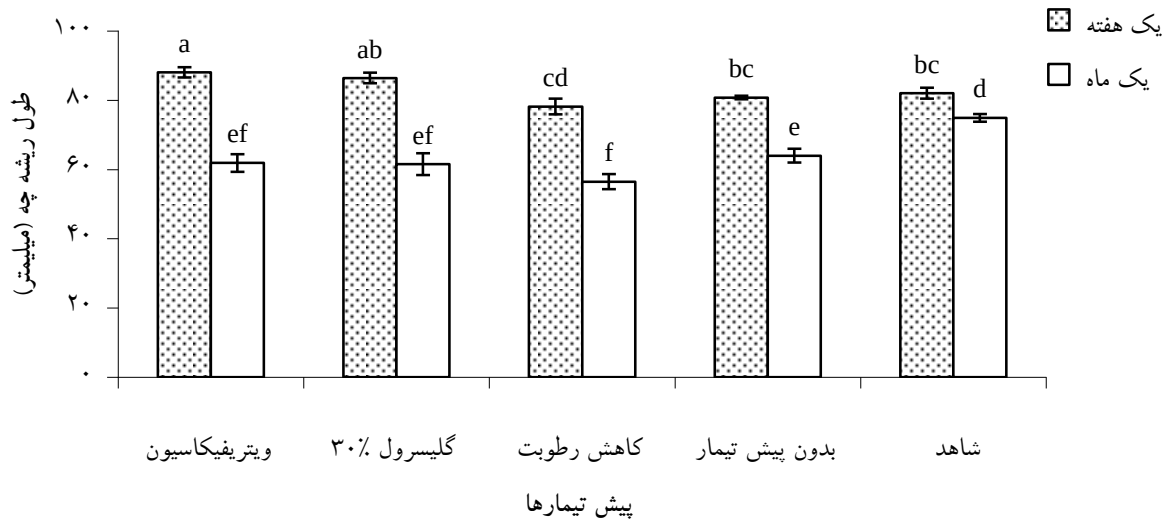
www.SID.ir

Archive of SID

گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره-سازی در شرایط فراسرد به‌ترتیب با ۸۶/۳۳، ۸۱/۳۴ و ۷۷/۵۷ از کمترین مقدار برخوردار بودند. به‌طور کلی، در این روند نزولی شاخص بینه بذر در بین پیش‌تیمارها از یک هفته به یک ماه و در مقایسه با تیمار شاهد، کمترین نوسانها مربوط به بدون پیش‌تیمار (۲۱/۷۰) و بیشترین نوسانها مربوط به گلیسرول ۳۰ درصد (۴۱/۷۱) می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر شاخص بنیه بذرهای شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶°C-



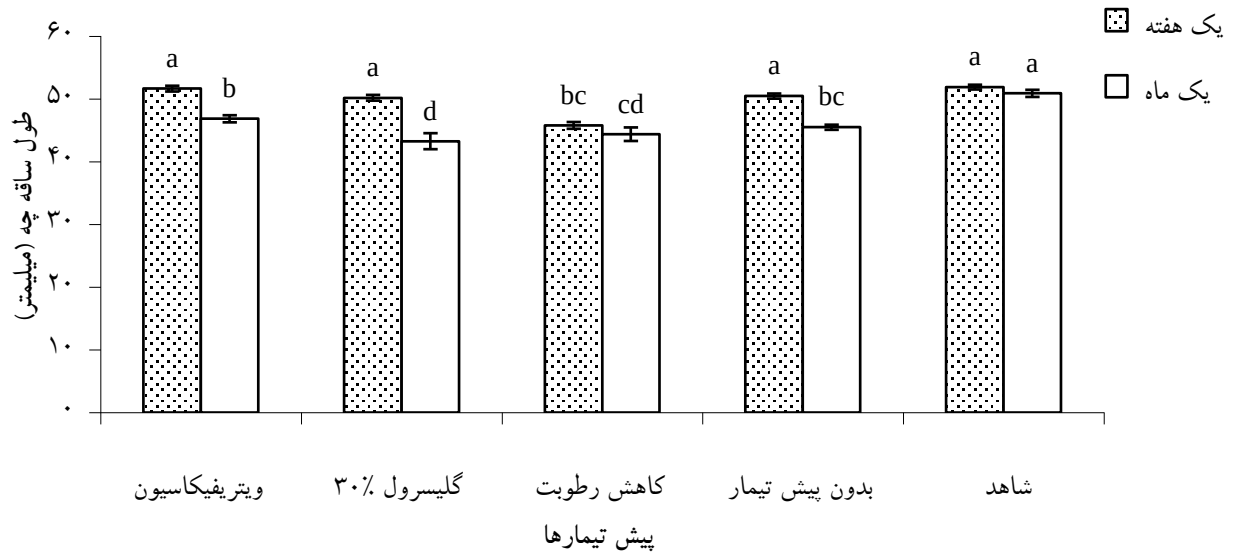
شکل ۴- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر طول ریشه‌چه بذرهای شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶ °C-

www.SID.ir

Archive of SID

با بررسی طول ریشه‌چه نتایج نشان داد که بیشترین طول ریشه‌چه مربوط به پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون با یک هفته ذخیره‌سازی به طول ۸۸/۰۵ میلی‌متر و کمترین طول ریشه-چه مربوط به پیش‌تیمار کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره-سازی به طول ۵۶/۴۷ میلی‌متر می‌باشد. طول ریشه‌چه در بین پیش‌تیمارهای یک هفته در شرایط فراسردی ویتریفیکاسیون با طول ۸۸/۰۵ میلی‌متر بیشترین و پیش-تیمار کاهش رطوبت با طول ۷۸/۷۶ میلی‌متر کمترین مقدار بود. در روند کاهش طول ریشه از یک هفته به یک ماه نگهداری در دمای ۱۹۶- °C و در مقایسه با تیمار شاهد، پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون به طول ۲۶/۱۷ میلی‌متر بیشترین و بدون پیش‌تیمار به طول ۱۶/۷۹ میلی‌متر کمترین بود (شکل ۴).

اندازه‌گیری طول ساقه‌چه نونهال‌های شب‌خسب نشان داد که پیش‌تیمارهای یک هفته ذخیره‌سازی شامل ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و بدون پیش‌تیمار به همراه شاهد در یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع دارای بیشترین مقادیر بودند و پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد با یک ماه ذخیره‌سازی از کمترین مقدار برخوردار بود. در مقایسه پیش‌تیمارهای یک هفته ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد، تمامی پیش‌تیمارها به‌جز کاهش رطوبت دارای بالاترین مقادیر بودند. اما مقایسه بین پیش‌تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد به‌ترتیب با طول ۴۶/۸۴ و ۴۳/۲۵ میلی‌متر بیشترین و کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. بنابراین روند کاهشی پیش‌تیمارها از یک هفته به یک ماه ذخیره‌سازی و در مقایسه با تیمار شاهد، پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد (۶/۹۲ میلی‌متر) و کاهش رطوبت (۱/۳۶ میلی‌متر) به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند (شکل ۵).



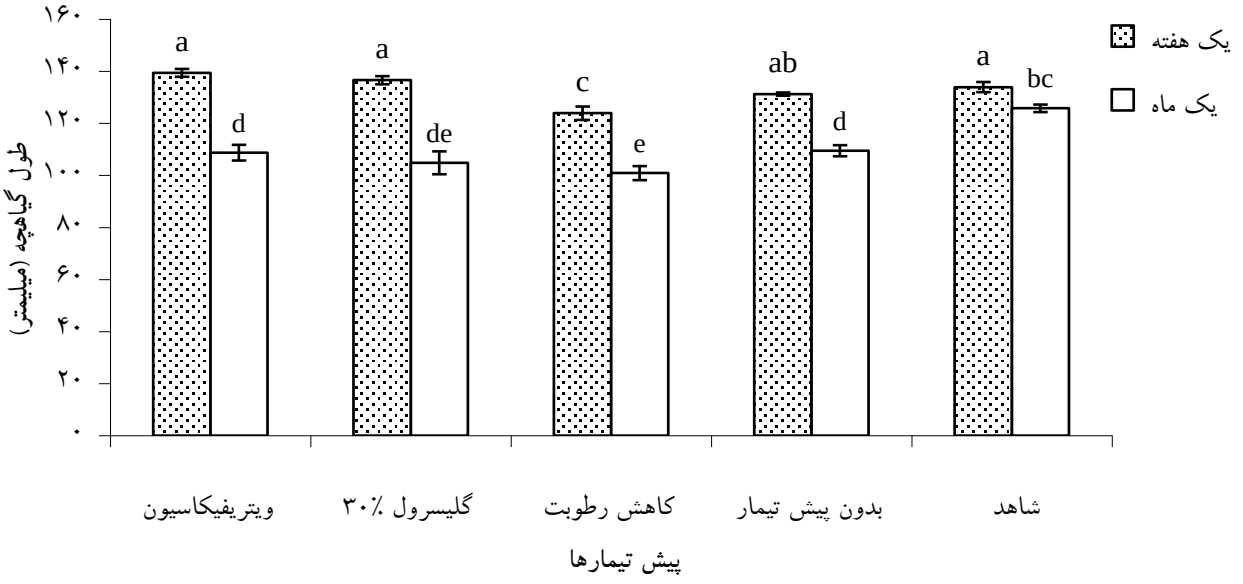
شکل ۵- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر طول ساقه‌چه شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶- ºC

نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول گیاهچه (طول ریشه‌چه + طول ساقه‌چه) نشان داد که پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد با یک هفته نگهداری در دمای ۱۹۶- °C به همراه شاهد با یک هفته نگهداری در

www.SID.ir

Archive of SID

یخچال با دمای ۴+ ^{o}C به‌ترتیب ۱۳۹/۳۸، ۱۳۶/۵۹ و ۱۳۳/۹۱ میلی‌متر دارای بیشترین مقادیر و پیش‌تیمار کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد با طول ۱۰۰/۸۷ میلی‌متر دارای کمترین مقدار بودند. در مقایسه بین پیش‌تیمارهای یک هفته نگهداری در دمای فراسرد شامل ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد به‌ترتیب با طول ۱۳۹/۳۸ و ۱۳۶/۵۹ میلی‌متر بیشترین مقادیر و کاهش رطوبت با طول ۱۲۳/۸۹ میلی‌متر کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند، اما در مقایسه بین پیش-تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی در دمای فراسرد شامل بدون پیش‌تیمار و ویتریفیکاسیون به‌ترتیب با طول ۱۰۹/۴۶ و ۱۰۸/۷۲ میلی‌متر و کاهش رطوبت با طول ۱۰۰/۸۷ میلی-متر به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقادیر بودند. با توجه به روند نزولی طول گیاهچه از یک هفته به یک ماه در دمای نیتروژن مایع، پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد و بدون پیش-تیمار به‌ترتیب با طول ۳۱/۷۸ و ۲۱/۷۸ میلی‌متر بیشترین و کمترین میزان تغییرات را از خود نشان دادند (شکل ۶).



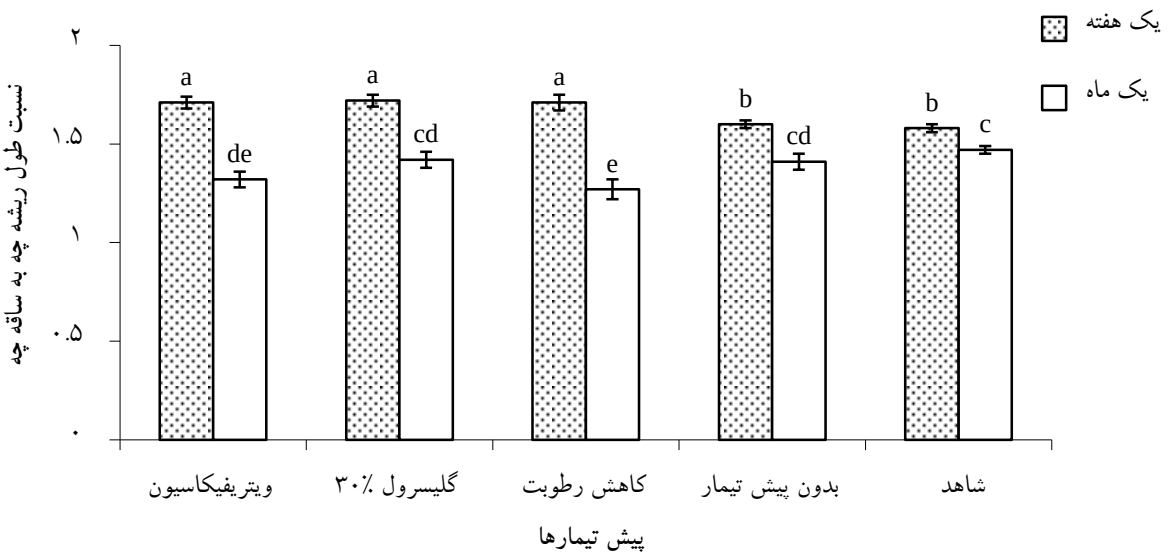
شکل ۶- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر طول گیاهچه شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ºC ۱۹۶-

بررسی نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه در نونهال‌های شب‌خسب نتایج نشان داد که پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، ویتریفیکاسیون و کاهش رطوبت با یک هفته ذخیره-سازی در دمای فراسرد به‌ترتیب با نسبت ۱/۷۲، ۱/۷۱ و ۱/۷۱ بالاترین مقادیر و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره-سازی در شرایط فراسرد با مقدار ۱/۲۷ از کمترین مقدار برخوردار بودند. در بین پیش‌تیمارهای یک هفته ذخیرسازی در نیتروژن مایع پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت دارای بیشترین مقادیر و بدون پیش‌تیمار با مقدار ۱/۶۰ همانند شاهد با مقدار ۱/۵۸ دارای کمترین مقدار بودند. بااین‌حال در بین پیش‌تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی، گلیسرول ۳۰ درصد و بدون پیش‌تیمار به‌ترتیب با ۱/۴۲ و ۱/۴۱ بیشترین و کاهش رطوبت با ۱/۲۷ کمترین نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه را به خود

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاص دادند. بنابراین روند کاهشی نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه از یک هفته به یک ماه در دمای فراسرد و در مقایسه با شاهد، کاهش رطوبت با مقدار ۰/۴۴ بیشترین و بدون پیش‌تیمار با مقدار ۰/۱۹ کمترین نوسان‌ها را از خود نشان دادند (شکل ۷).



شکل ۷- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ºC ۱۹۶-

بحث

بذر شب‌خسب پس از خروج از نیتروژن مایع و انتقال به پتری‌دیش در ژرمیناتور بدون اینکه دچار اثرهای سوئی شوند، همانند تیمارهای شاهد دارای قابلیت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند. بنابراین از یکسو با توجه به امکان زنده‌مانی بذرهای این گونه درختی در دمای نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) و از سوی دیگر به دلیل اینکه محتوای رطوبتی این گونه کمتر از ۵ درصد است، می‌توان بذر شب‌خسب را در گروه بذرهای با قابلیت ماندگاری بلندمدت یا ارتدوکس (orthodox) طبقه‌بندی کرد (Roberts & Ellis, 1989; Engelman, 1990). در بررسی درصد جوانه‌زنی بدون پیش‌تیمار (بدون استفاده از مواد ضد انجمادی) همانند تیمار شاهد (نگهداری در یخچال با دمای ۴ºC+) اختلاف معنی‌داری بین مدت زمان‌های ذخیره‌سازی یک هفته و یک ماه در نیتروژن مایع مشاهده نشد. براساس تئوری، در محیط نیتروژن مایع هیچ تفاوت محسوسی بین ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت و میان‌مدت مشاهده نمی‌شود. بنابراین انتظار می‌رود با ذخیره‌سازی در دمای زیر ۱۶۰- درجه سانتی‌گراد، طول عمر بذر به مدت صدها و حتی هزاران سال افزایش یابد، زیرا در این شرایط بسیاری از فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی بذرها و اندام‌های گیاهی، تحرک مولکولی و واکنش‌های شیمیایی تقریبا متوقف می‌شود و به‌طور کلی از فرایندهای مخرب و افزایش سن جلوگیری می‌کند (Walters *et al.*, 2004; Benson, 2008). مرور منابع در این رابطه نشان می‌دهد که مدت زمان نگهداری اندام‌های گیاهی در شرایط فراسرد بر این نتایج تأثیر نخواهد داشت (Rong & Hua, 2009). به‌طور کلی اعتقاد بر این است در صورتی که نمونه بتواند در ازت مایع زنده بماند تفاوتی محسوسی در مدت زمان‌های مختلف نگهداری در ازت مایع وجود ندارد (Aryakia *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

2012)، زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی، مسئله مدت‌زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌شود (Tabatabaiepoor *et al.*, 2015).

براساس نتایج این تحقیق، درصد جوانه‌زنی بذرها در بدون پیش‌تیمار با یک هفته (۹۰ درصد) و یک ماه (۸۷/۹۴ درصد) ذخیره‌سازی در دمای نیتروژن مایع در مقایسه با سایر پیش‌تیمارهای فراسردی و تیمار شاهد (یک هفته ۹۱/۰۷ درصد و یک ماه ۸۹/۰۶ درصد در دمای یخچال ۴+ ^{o}C) از مقادیر بالاتری برخوردار بودند. بنابراین در کلیه صفات مورد بررسی (به‌جز طول ساقه‌چه) بدون پیش‌تیمار از یک هفته به یک ماه نگهداری در شرایط دمایی نیتروژن مایع روند نزولی کمتری نسبت به سایر پیش‌تیمارها و تیمار شاهد از خود نشان داد.

گونه درختی شب‌خسب از خانواده Fabaceae است که بذرهای این گونه به خوبی قابلیت ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد را دارد و پس از خروج از نیتروژن مایع قادر به جوانه‌زنی و استقرار و تولید نهال است. این قابلیت ماندگاری در دمای ازت مایع بدون استفاده از مواد ضدانجمادی به دلیل تولید پوسته سخت از ویژگی‌های مهم خانواده نیام‌داران مانند شب‌خسب می‌باشد (Baskin & Baskin, 1998; Merou et al., 2011). بذرهای سخت با خفتگی فیزیکی، دارای پوسته‌ها یا پریکارپ‌هایی است که نسبت به آب و محلول شیمیایی نفوذناپذیر بوده (Fenner & Thompson, 2005)، این ویژگی به‌عنوان یکی از عواملی اصلی ماندگاری بذرهای شب‌خسب در دمای نیتروژن مایع محسوب می‌شود. همچنین در بذرهای ارتدوکس فرایند کاهش رطوبت به صورت طبیعی انجام می‌شود و می‌توان بدون هیچ پیش‌تیماری فناوری فراسرد را اجرا کرد (Benelli *et al.*, 2013). در این رابطه Araújo و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که نگهداری از بذرهای *Passiflora mucronata*، *P. suberosa* و *P. edulis* بدون استفاده از مواد ضد انجماد (بدون پیش‌تیمار) در شرایط فراسرد امکان‌پذیر است.

پیش‌تیمار کاهش رطوبت در تمامی صفات مورد بررسی به‌جز درصد جوانه‌زنی بذرها و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه با یک هفته نگهداری در شرایط فراسرد مقادیر پایینی نسبت به تیمار شاهد و بدون پیش‌تیمار از خود نشان داد. همچنین با یک ماه ذخیره‌سازی در دمای نیتروژن مایع، در تمامی صفات مورد مطالعه پیش‌تیمار کاهش رطوبت روند نزولی بیشتری در مقایسه با تیمار شاهد و بدون پیش‌تیمار از خود نشان داد. در اغلب موارد، کاهش رطوبت بذرها قبل از ورود به شرایط فراسرد سبب زنده‌مانی می‌شود. در همین رابطه بکارگیری روش کاهش رطوبت برای بذرهای گونه‌هایی مانند *Acer saccharinum* (Beardmore & Whittle, 2005)، فندق (*Coryllus avellana* L.) (Michalak *et al.*, 2013) و ملج (*Ulmus glabra* Huds.) (Chmielarz, 2010) موفقیت‌آمیز گزارش شده است. در حالی که همین کاهش رطوبت ممکن است جوانه‌زنی بعضی از بذرها را پس از خروج از نیتروژن مایع کاهش دهد (Thammasiri, 2000). بافت بذر طی کاهش رطوبت به راحتی نسبت به بافت‌هایی که در آن متابولیسم کاهش یافته آسیب می‌بینند. میزان آسیب به بذرها در هنگام کاهش رطوبت عمیق وابسته به محتوای رطوبتی بافت و شرایط کاهش رطوبت مانند درجه حرارت، رطوبت و حضور اکسیژن دارد (Chmielarz, 2009) که این نتایج با یافته‌های این پژوهش در مورد بذرهای شب‌خسب مطابقت دارد.

پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون می‌تواند به‌طور مستقیم آب را از مرحله مایع به مرحله آمورف یا شیشه‌ای بی‌شکل تغییر داده و از تشکیل بلورهای یخ جلوگیری کند (Fahy *et al.*, 1984). پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون در تمامی صفات مورد بررسی به‌جز سرعت جوانه‌زنی و گلیسرول ۳۰ درصد در تمامی صفات مورد بررسی به‌جز سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه در یک هفته نگهداری در دمای نیتروژن مایع بیشترین مقادیر را از خود نشان دادند اما در این رابطه پس از یک ماه ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع روند نزولی بیشتری در صفات مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد و بدون پیش‌تیمار از خود نشان داد. باوجوداین گزارش‌های کمی به

www.SID.ir

Archive of SID

اثر سوء مواد شیمیایی موجود در این پیش‌تیمارها اشاره کرده‌اند (Kuleshova *et al.*, 1999) و برای گونه‌هایی مانند زبان‌گنجشک (*Fraxinus excelsior* L.) (Schoenweiss *et al.*, 2005)، اکالیپتوس (*Eucalyptus microtheca* F. Muell.) (Hatami *et al.*, 2010b)، *Doritis pulcherrim* Lindl. (Thammasiri, 2000) و سپیدار (*Populus alba* L.) (Lambardi *et al.*, 2000) استفاده از پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون در شرایط فراسرد موفقیت‌آمیز گزارش شده است. اما در تیمار محلول ویتریفیکاسیون، موادی مانند گلیسرول، ساکارز، اتیلن گلایکول و DMSO(Dimethyl soulfoxide) احتمالاً به دلیل نفوذ به درون بذرها به فرایندهای جوانه‌زنی و رشد بذرها آسیب جدی وارد می‌کنند (Kuleshova *et al.*, 1999; Jebelli *et al.*, 2015a; Naderi Shahab *et al.*, 2017). همچنین در پیش‌تیمار گلیسرول احتمالاً به دلیل نفوذ آن به درون بذرها و جلوگیری از فرایند تبادلات گازی، اکسیژن و مولکول‌های آب بین فضای درونی و بیرونی بذر، این عمل از جوانه‌زنی و رشد بذرها شب‌خسب ممانعت می‌کند. بنابراین استفاده از مواد ضدانجماد همیشه موفق نیست و می‌تواند مضر هم باشد (Kistnasamy *et al.*, 2011; Berjak & Pammenter, 2014). بااین‌حال نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آثار سوء این ماده بر جوانه‌زنی و سایر صفات مورد بررسی است که البته پژوهش‌های بیشتر در این زمینه ضرورت دارد.

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که نگهداری بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد امکان‌پذیر بوده و به‌دلیل پوسته سخت و محتوای رطوبتی بسیار پایین بذرهای این گونه (به صورت طبیعی)، بدون پیش‌تیمار (بدون استفاده از مواد ضد انجمادی) می‌توان در دمای ۱۹۶°C- نگهداری کرد و از بکارگیری پیش‌تیمارهایی مانند ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت خودداری کرد. زیرا این پیش‌تیمارها بر صفات جوانه‌زنی گونه درختی شب-خسب اثرهای سوئی وارد می‌کنند. با توجه به اینکه آسیب‌ها جدی و در معرض خطر انقراض قرار داده است، این گونه درختی در رویشگاه‌های طبیعی توسط بیماری قارچی پژمردگی شب‌خسب توصیه می‌شود. بذرهای این گونه را از رویشگاه‌های مختلف جمع‌آوری و با استفاده از فناوری حفاظت در شرایط فراسرد امکان نگهداری طولانی‌مدت بذرهای این گونه در معرض خطر را فراهم کرده تا در صورتی که این گونه ارزشمند جنگلی در معرض خطر جدی قرار گرفت، بتوان با استفاده از بذرهای ذخیره شده در بانک‌بذر فراسرد از انقراض آن جلوگیری کرد. البته توصیه می‌شود به‌منظور شناخت دقیق‌تر از ظرفیت ذخیره‌سازی بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد، ضمن افزایش طول دوره مطالعه، از بذرهای چندساله شب‌خسب نیز استفاده گردد.

منابع

- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D., 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria 1. Crop Science, 13(6): 630-633.
- Ahangaran, Y., 2017. The first report of *Cydalima perspectalis* in Iran. Applied Entomology and Phytopathology, 84(1): 209-211.
- Akhani, H., Djamali, M., Ghorbanalizadeh, A. and Ramezani E., 2010. Plant biodiversity of Hyrcanian relict forests, northern of Iran: an overview of the flora, vegetation, palaeoecology and conservation. Pakistan Journal of Botany, 42(1): 231-258.
- Araújo, D.S.D., Luz, P.B.D., Neves, L.G. and Paiva Sobrinho, S.D., 2016. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. Journal of Seed Science, (AHEAD), 38(3): 248-253.
- 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 Forests Plant Breeding and Genetic Research, 19: 218-230 (In Persian).
- Baskin, J.M., Nan, X. and Baskin, C.C., 1998. A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of Senna (Fabaceae). Seed Science Research, 8(04): 501-512.
- Beardmore, T. and Whittle, C.A., 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer*

www.SID.ir

Archive of SID

seeds. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 17(4): 627-636 (In Persian).
– Jalili, A., Jamzad, Z., 1999. Red data book. Research Institute of Forests and Rangelands. 748p.
– Jebelli, M., Naderi Shahab, M.A. and Jafari, A.A., 2015b. Cryopreservation of seeds of *Acacia tortilis* and *Acacia nilotica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1): 103-111 (In Persian).
– Jebelli, M., Naderi Shahab, M.A., Feizi, H.R. and Jafari, A.A., 2015a. Cryopreservation of *Populus euphratica* Oliv. Seeds and Evaluation of the Cryopreserved Seeds under Laboratory and Greenhouse Conditions. Iranian Journal of Horticultural Science, 46(2): 313-322 (In Persian).
– Jebelli, M., Naderi shahab, 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).
– Kaviani, B., 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Australian Journal of Crop Science, 5(6): 778-800.
– Kistnasamy, P., Berjak, P. and Pammenter, N.W., 2011. The Effects of Desiccation and Exposure to Cryogenic Temperatures on Embryonic Axes of *Landolphia kirkii*. CryoLetters, 32(1): 28-39.
– 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.
– Lambardi, M., Fabbri, A. and Caccavale, A., 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports, 19(3): 213-218.
– Merou, T., Takos, I., Konstantinidou, E., Galatsidas, S. and Varsamis, G., 2011. Effect of different pretreatment methods on germination of *Albizia julibrissin* seeds. Seed Science and Technology, 39(1): 248-252.
– Michalak, M., Plitta, B.P. and Chmielarz, P., 2013. Desiccation sensitivity and successful cryopreservation of oil seeds of European hazelnut (*Corylus avellana*). Annals of Applied Biology, 163(3): 351-358.
– -Mirabolfathy, M., Ahangaran, Y., Lombard, L., Crous, P. W., 2013. Leaf blight of *Buxus saccharinum*) embryonic axes. Tree physiology, 25(8): 965-972.
– Benelli, C., De Carlo, A. and Engelmann, F., 2013. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. Biotechnology Advances, 31(2): 175-185.
– Benson, E.E., 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. Critical Reviews in Plant Sciences, 27(3): 141-219.
– Cheatham, S., Johnston, M.C. and Marshall, L., 1995. The useful wild plants of Texas: the southeastern and southwestern United States, the Southern plains and northern Mexico. Austin, USA: Useful Wild Plants Inc. xxi, 568pp.
– Chmielarz, P., 2009. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). Annals of forest science, 66(4): 1-9.
– Chmielarz, P., 2010. Cryopreservation of the non-dormant orthodox seeds of *Ulmus glabra* Huds. Acta Biologica Hungarica, 61(2): 224-233.
– Engelmann, F., 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation-case history: oil palm somatic embryos. Biotrop Special Publication, 13:26-30.
– Engelmann, F., 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 40(5): 427-433.
– Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology, 21(4): 407-426.
– Fenner, M. and Thompson, K., 2005. The ecology of seeds. Cambridge University Press. 241pp.
– Ghassemi-Golezani, K. and Dalil, B., 2011. Seed germination and vigor tests. Mashhad Jehad Daneshgahi, 104pp.
– Hatami, F., Jebelli, M., Naderi Shahab, M.A., Tabari, M. and Jafari. A.A., 2010a. Cryopreservation of *Acer monspessulanum* seeds. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18(1): 12-23 (In Persian).
– Hatami, F., Naderi Shahab, M.A., Jebelli, M., Ghamari-Zare, A., Tabari, M. and Assareh, M.H., 2010(b). Investigation on possibility of cryopreservation of *Eucalyptus microtheca*

www.SID.ir

Archive of SID

considerations. In Plant cryopreservation: A practical guide. Springer New York, 513 pp.
– Roberts, E.H. and Ellis, R.H., 1989. Water and seed survival. Annals of Botany, 63(1): 39-39.
– Rong, H.S, and Hua, Y.M., 2009. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenoptervs henryi* Oliv. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99: 217-226.
– Sabeti, H., 1995. Forests, trees, and shrubs of Iran. Yazd University Press, Yazd. 876pp (In Persian).
– 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.
– Tabatabaiepoor, S.Z., Moeini, A. and Sabet, M.A., 2015. Effect of cryopreservation by vitrification on the growth and development indices of zygotic embryos. Iranian Journal of Field Crop Science (Iranian Journal of Agricultural Sciences), 46(1): 115-122 (In Persian).
– Thammasiri, K., 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* lindl.) by vitrification. Cryo letters, 21(4): 237-244.
– Walters, C., Wheeler, L. and Stanwood, P.C., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48(3): 229-244.

sempervirens in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*. Plant disease. 97 (8): 11-21.
– Naderi Shahab, M.A., Jebelli, M. and Jafari, A.A., 2017. Cryopreservation of *Ulmus glabra* Hudson seeds. Iranian Journal of Natural Recources, 69(4): 679-688 (In Persian).
– Naderi Shahab, M.N., Hatami, F., Tabari, M. and Jafari, A.A., 2009. Cryopreservation and evaluation of Chinese Arbor-Vitae (*Biota orientalis*) seeds. Journal of New Seeds, 10(4): 264-276.
– Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. and Simons, A., 2009. Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version, 4: 20-18.
– Pammenter, N.W. and Berjak, P., 2014. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. International Journal of Plant Sciences, 175(1): 21-28.
– Panahian, G. and Rahnama, K., 2010. Fusarium wilts on native silk trees (*Albizia julibrissin* Durzz.) in the north of Iran, Gorgan. International Journal of Agronomy and Plant Production1 (1): 1-5.
– Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. and Vysotskaya, O.N., 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration, 29(3): 403-410.
– Reed, B.M., 2008. Cryopreservation, practical

www.SID.ir

Archive of SID

Feasibility of cryopreservation of Persian silk tree (*Albizia julibrissin* Durazz.) seeds

S. Sakhavat[1], O. Esmailzadeh[2], M. Jebelli[3]

1- M. Sc. Of forestry, Faculty of Natural Resources, tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assistant Professor of Forest Science and Engineering Department, Faculty of Natural Resources, tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran. E-mail: oesmailzadeh@modares.ac.ir
3- M. Sc. Biotechnology research group, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.

Received: 05.10.2018 Accepted: 03.09.2018

Abstract

Persian Silk tree (*Albizia julibrissin* Durazz.) is one of the native leguminous species in plain and lowland hyrcanian forests, which has been severely damaged by fungal disease. In this research, feasibility of preservation of *A. julibrissin* seeds in cryo condition was studied. Seeds of *A. julibrissin* were collected from 10 trees in lowland forests of western part of Haraz watershed, Mazandaran province, Iran. Seed germination characteristic of this species were analyzed in cryopreservation with four pretreatments including: vitrification solutions, 30% glycerol, desiccation and without cryoprotectants as well as control treatment, storage in dry condition at 15°C temperature. Seeds after one week and one month storage in liquid nitrogen condition were removed from the liquid nitrogen and the seeds were soaked into water at +42°C (heat shock). Then, seed were placed in petri dishes and so on were transferred into germinator at +22 ºC. Seed germination was daily checked as long as no seed has been germinated. Results of two way ANOVA followed by Duncan as a post hoc multiple comparisons showed that there were no significant differences between germination traits of *A. julibrissin* seeds in four pretreatments of cryopreservation with control treatment. So we concluded that cryopreservation of *A. julibrissin* seeds is feasible. Our result indicated that having hard seed coat and as well as very low moisture content enable *A. julibrissin* seeds to be preserved in cryo condition without any cryoprotectants. Therefore, cryopreservation of *A. julibrissin* seeds could be done without any pre-treatment and it could be proposed as an effective strategy to protect the genetic recourse of this valuable species of the Hyrcanian forests in Iran.

Keywords: Germination, Seed, *Albizia julibrissin*, cryo seed bank, Glycerol, Vitrification solution, Desiccation.

www.SID.ir