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

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

محبتعلی نادری شهاب[۱]، مریم جبلّی[۲*]، علی‌اشرف جعفری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۳

چکیده

گونهٔ *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. گونه‌ای است درختی که در مناطق جنوبی کشور رویش دارد. به‌دلیل 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. به‌منظور بررسی امکان نگهداری بلند مدت بذر این گونه در شرایط فراسرد یا برودت ۱۹۶°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 به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در شرایط فراسرد یا ۱۹۶°C- نگهداری شدند. بذرها 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 پیش‌تیمارها در حفاظت از بذر در شرایط فراسرد، مشخص شد تفاوت معنی‌داری بین پیش‌تیمارهای Desiccation, PVS2 وگلیسرول ۳۰ درصد برای اغلب صفات وجود دارد. اثر متقابل مدت زمان نگهداری بذر در شرایط فراسرد و پیش‌تیمارهای مختلف بر میانگین صفات نشان داد که در تعدادی از صفات، تفاوت بین زمان‌ها وجود دارد ولی در تعداد دیگری از صفات، این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. بذرهای جوانه‌زده فراسرد در شرایط گلخانه به خوبی مستقر شدند. در این مطالعه، بهترین پیش‌تیمار برای نگهداری بذر کنار در شرایط فراسرد، پیش‌تیمار Desiccation یا آبگیری بود.

واژه‌های کلیدی: تیمار آبگیری، ذخیره سازی در فراسرد، کُنار، 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@rifr-ac.ir

مقدمه

کُنار با نام علمی *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. از خانواده رامناسه[1] بوده و در ایران، افغانستان، عراق، اردن، لبنان، سوریه، فلسطین، شبه جزیره عربستان، هند، پاکستان و در برخی از کشورهای افریقایی 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 دگرگشنی آن بالا می‌باشد (Assareh and Sabagzadeh, 2002).

کُنار 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 دانه گرده وجود دارد. تیمار بذر قبل از ورود به فراسرد یا نیتروژن مایع، مانند کاهش رطوبت بذر یا جوانه، استفاده از ترکیب‌های محافظت کننده[2] 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 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 ۱۹۶°C- نیز تأثیر مهمی در زنده‌مانی نمونهٔ 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 آبگیری و گلیسرول ۳۰ درصد بهترین نتیجه را در نگهداری بذر *Acasia nilotica* و *Acasia tortilis* در شرایط فرا سرد داشتند. در صورتی‌که بذر اقاقیا 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

[1] Rhamnaceae

[2] Cryoprotectants

حال خطر انقراض *Dioscorea deltoidea* (Mandal and 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.

گونهٔ کُنار به‌دلیل 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. به‌همین دلیل اضافه بر حفظ گونه، حفظ تنوع ژنتیکی آن نیز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. متأسفانه در عرصه‌های طبیعی به‌دلیل 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 به‌طور 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 (پوستهٔ 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

۱) PVS_2 [3]: 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 ۲۲°C+ قرار داده شدند. بعد محلول لودینگ از تیوپ‌ها کاملاً تخلیه و محلول PVS_2 ۴°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 به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C+ قرار داده شدند. در پایان درب تیوپ‌ها بسته و در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

۲) آبگیری [4]: ابتدا به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۵ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌عنوان وزن اولیه بذر (FW) یادداشت شد. سپس بذرها به‌مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و وزن خشک آنها به‌دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر (۵/۶۸) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

Total Seed Moisture Content (%) = (FW-DW)/DW×100

پس از مشخص شدن رطوبت کل و به‌منظور 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 ۴°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 به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲°C+ قرار داده شدند. پس از این مرحله در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

[3] Plant Vitrification Solution

[4] Desiccation

بذرها در هر سه پیش تیمار فراسرد به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در نیتروژن مایع نگهداری شدند. سه نمونه بذر نیز به‌عنوان بذر شاهد جهت استفاده در آزمایش‌ها، به‌مدت یک هفته، یک ماه و یک سال در ۴°C+ نگهداری شد.

تیمارهای پس از خروج بذر از فراسرد

به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، بذرها پس از خارج شدن از نیتروژن مایع به‌مدت دو دقیقه در آب ۴۲°C+ قرار داده شدند. سپس از آب گرم خارج و به‌مدت 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 ۴+ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۱۳ روز، بذرها در ژرمیناتور با دمای ۲۲°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 پیش‌تیمارهای فراسرد و زمان ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع با بکارگیری طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. پیش‌تیمارهای فراسرد شامل PVS_2، Desiccation، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد تشکیل دهنده سطح فاکتور A و سه دوره زمانی یک‌هفته، 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_I)، و نسبت طول ریشه‌چه بر طول ساقه‌چه (R/S). شاخص بنیه بذر با استفاده از فرمول شماره (۱) ارایه شده توسط Abdul–Baki and Anderson (1973) محاسبه شد.

۱۰۰/ درصد جوانه‌زنی × میانگین طول گیاهچه به میلی‌متر (مجموع طول ساقه‌چه و ریشه‌چه)= 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 ۲۲±۲°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.

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، پیش‌تیمار فراسرد و اثر متقابل زمان نگهداری در پیش‌تیمار فراسرد در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که اثر زمان نگهداری برای همه صفات به‌جز 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 پیش‌تیمار فراسرد بر روی کلیه صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده اثر متفاوت پیش‌تیمارها 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 پیش‌تیمار فراسرد به‌جز نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه برای سایر صفات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده این است که پیش‌تیمارهای 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 پیش‌تیمار 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 ۱۹۶°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 زمانی‌که 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 به‌دلیل کاهش شدید فعالیت‌های

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارها، 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 Source of variation	df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	طول ریشه‌چه Radicle length mm	طول ساقه‌چه Shoot length mm	طول گیاهچه Seedling Length mm	شاخص بنیه بذر Vigor Index	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه Radicle length/ shoot length	درصد استقرار Establishment percent
زمان نگهداری Incubation period	2	13.78	3.92	0.65	3.96	6.08	0.061*	10.75
پیش‌تیمار فراسرد Pre-Cryopreservation Treatment	3	537.7**	133.81**	7.43**	193.84**	227.57**	0.825**	175.59**
زمان در پیش‌تیمار Time*Pre-Treatment	6	10.81	3.60	0.42	4.34	4.17	0.041*	3.68
خطا Error	24	113.64	3.90	0.65	6.92	15.36	0.016	11.11
درصد ضریب تغییرات CV%		17.14	11.79	8.37	9.98	21.73	7.279	19.42

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

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 (ρ< 1%)

جدول ۳- اثر پیش‌تیمارهای 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

پیش‌تیمارهای فراسرد Pre-cryopreservation treatments	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	طول ریشه‌چه Radicle length mm	طول ساقه‌چه Shoot length mm	طول گیاهچه Seedling Length mm	شاخص بنیه بذر Vigor Index	طول ریشه‌چه/ساقه‌چه Radicle length/ shoot length	درصد استقرار Establishment percent
شاهد Control	77.22 a	19.49 a	10.78 a	30.27 a	23.58a	1.81 a	23.56 a
گلیسرول ۳۰٪ 30%Glycerol	66.67 ab	17.71a	9.27 bc	26.98 b	17.88b	1.91 a	13.44 b
آبگیری Desiccation	67.56 ab	18.73 a	9.78 b	28.51 ab	19.27b	1.92 a	15.44 b
PVS_2	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 (ρ< 1%)

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

اثر پیش‌تیمارهای 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 این‌که 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_2 به‌ترتیب ۷۷/۲ درصد، ۶۶/۶ درصد، ۶۷/۵ درصد و ۵۸/۳ درصد می‌باشد، به‌طوری‌که جوانه‌زنی بذرهای فراسرد به‌طور معنی‌داری کمتر از بذرهای شاهد می‌باشد (جدول ۳). در مقایسه بین پیش‌تیمارهای فراسرد نیز، تیمار PVS_2 میانگین کمتری را نشان می‌دهد.

در بین پیش‌تیمارهای 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_2 در رده‌های بعدی قرار دارند.

بررسی‌های گلخانه‌ای و میانگین سبز کردن و استقرار بذر و تولید نهال‌های جوان در گلخانه مربوط به پیش‌تیمارها 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 پیش‌تیمارهای فراسردی و مدت‌زمان نگهداری بذر در نیتروژن مایع تأثیری در میانگین جوانه‌زنی بذر کُنار 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 پیش‌تیمارها (به استثناء PVS2 در صفت طول ریشه‌چه) تأثیری در این صفات ندارند. لیکن تعداد دیگری از صفات مانند طول ساقه‌چه، 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 کُنار در نیتروژن مایع، بعضی از صفات تغییری نشان نمی‌دهند و میانگین تعدادی از صفات نیز در حد بسیار ناچیز کاهش می‌یابند. از بین پیش‌تیمارهای مختلف، پیش-تیمار Desiccation مناسب‌ترین پیش‌تیمار برای نگهداری بذر کُنار در شرایط فراسرد می‌باشد. همچنین بذر این‌گونه قابل نگهداری در نیتروژن مایع برای مدت‌زمان بسیار طولانی می‌باشد (شکل۱). در رابطه با پیش‌تیمار 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_2 (Kuleshova *et al.,* 1999)، این پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار برای نگهداری بذر این‌گونه در نیتروژن مایع، پیش‌تیمار 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).

شکل ۱: جوانه‌زنی بذرهای تیمارشده با پیش‌تیمارهای مختلف که یک‌سال 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 یک‌هفته، یک‌ماه و یک‌سال ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع با پیش‌تیمارهای 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

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، این گونه گرمسیری از دو دیدگاه دارای اهمیت می‌باشد. نخست به‌عنوان یکی از گونه-های 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 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

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 رویشگاه-های 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.

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 به‌دلیل مساعدت‌های بی‌دریغشان تشکر می‌شود.

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 desication 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 Horticaltural, 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°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 Yohannes, 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[1], Maryam Jebelli[2*], Ali Ashraf Jafari[3]

Received: January 12, 2015 Accepted: July 4, 2015

Abstract

Ziziphus spina-christi (L.) Desf. Is an arboreal species which grows in hot natuarl 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 lipuid 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