

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 نیم‌دار بومی جنگل‌های جلگه‌ای و پایین‌بند ناحیه هیرکانی است که به دلیل 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. به منظور 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. از این رو 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. از این رو می‌توان بدون انجام پیش‌تیمار نسبت به ذخیره‌سازی بذرهای شب‌خسب در شرایط فراسرد اقدام نمود و بانک بذر فراسرد را به عنوان 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

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

شب‌خسب (*Albizia julibrissin* Durazz.) یکی از گونه‌های درختی نیم‌دار بومی جنگل‌های هیرکانی است که با توجه به نورپسند و گرمادوست بودن، در رویشگاه‌های

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*) (Rahnema, 2010; Panahian & 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 از جمله 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 تنوع‌زنتیکی 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) تقریباً متوقف شده کمک کرد (Kaviani *et al.*, 2011; Araújo *et*

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 اقاچیا (*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 *et al.*, 2015b) و چش یا کرت (*Acacia nilotica* L.) (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 پیش‌ تیمار درصد کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به ترتیب به دلیل کاهش رطوبت بذر و تبدیل ماهیت رطوبت بذر به یک حالت ژله‌ای که فاقد ساختار کریستالی است سبب می‌شود امکان

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 منابع طبیعی نور و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. پیش‌تیمارهای فراسرد یا تیمارهای قبل از ورود بذرهای شب‌خسب به شرایط فراسرد به شرح 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 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد در ژرminatور نگهداری شدند. سپس محلول را کاملاً تخلیه کرده و به لوله‌های حاوی بذر محلول ویتریفیکاسیون شامل اتیلن گلیکول (Ethylenglycol) ۱۵ درصد و دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide) 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 بذرهای به مدت ۷۲ ساعت در آون و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Ghassemi & Dalil, 2011)، پس از قرار گرفتن در آون نیز وزن بذرهای محاسبه گردید. درصد رطوبت بذر از حاصل تقسیم اختلاف وزن بذرهای، قبل و بعد از قرارگیری در آون به وزن اولیه تعیین شد (رابطه ۱).

نگهداری بذرهای 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 به منظور جلوگیری از خطر انقراض آنها می‌باشد.

شب‌خسب اگرچه به دلیل 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 (*Mirabolathy et al., Calonecteria pseudonaviculata* (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 فوزاریوم 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. از این رو 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

$$100 \times [\text{وزن اولیه بذر} / (\text{وزن بذر پس از خشک شدن} - \text{وزن اولیه بذر})]$$

(رابطه ۱)

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، بذرهای 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 بذرهای اندازه‌گیری گردید.

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

$ni =$ تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز $di =$ 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).

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

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 $۲ / ۱ \pm ۴$ درصد برآورد شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های

در تیمار کاهش رطوبت بذر، بذرهای 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 بذرهای 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. بذرهای 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 آب مقطر 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

آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور پیش‌تیمارهای فراسرد و زمان ذخیره‌سازی در قالب طرح کاملاً 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 هر یک حاوی حداقل

گیاهچه به جز 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).

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

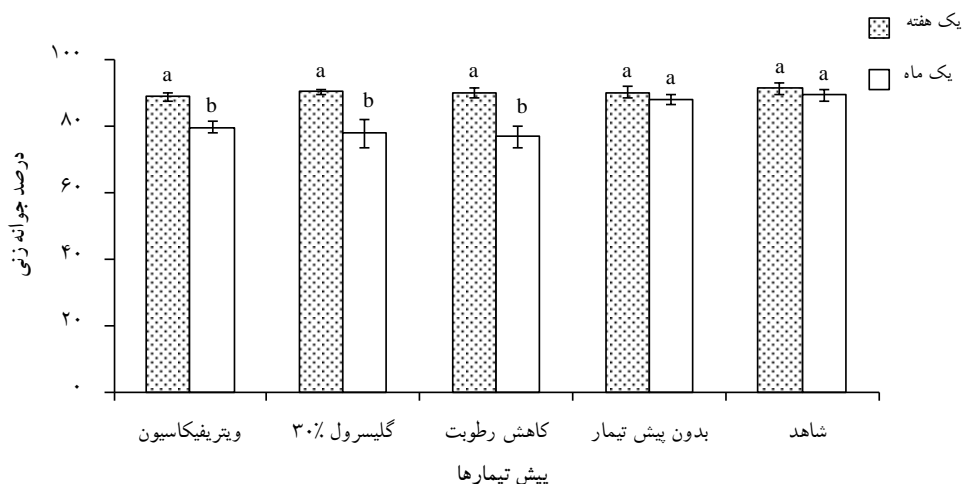
جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمارها، زمان‌ها و اثر متقابل آنها بر نگهداری بذرهای گونه شب‌خسب در شرایط آزمایشگاهی پس از خروج از دمای 196°C -

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

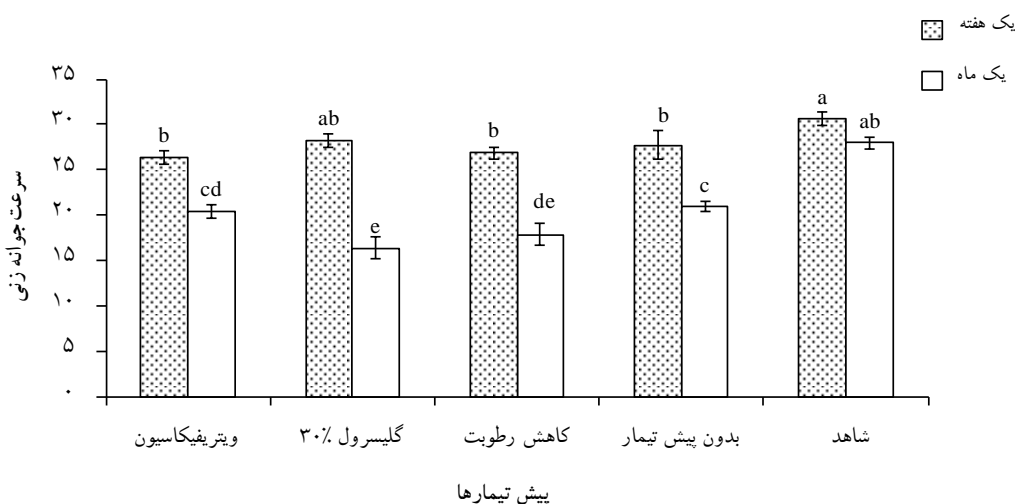
** و ^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد و عدم معنی‌داری

هفته نگهداری در دمای یخچال 4°C با میانگین $30/60$ بیشترین مقدار و پیش‌تیمار گلیسرول ۳۰ درصد با یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد با میانگین $16/36$ کمترین مقدار بود. در بین پیش‌تیمارهای فراسردی یک هفته ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع، گلیسرول ۳۰ درصد با میانگین $28/21$ بیشترین مقدار و سه پیش‌تیمار دیگر شامل بدون پیش‌تیمار، کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به ترتیب با میانگین $27/71$ ، $26/87$ و $26/42$ کمترین مقدار بودند اما در بین پیش‌تیمارهای فراسردی یک ماه ذخیره‌سازی بدون پیش‌تیمار با میانگین $20/86$ بیشترین و گلیسرول ۳۰ درصد با میانگین $16/36$ 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 ($11/85$) بیشترین و ویتریفیکاسیون و بدون پیش‌تیمار (به ترتیب $5/95$ و $6/85$) دارای کمترین مقدار بودند (شکل ۲).

در بررسی درصد جوانه‌زنی بذرها، پیش‌تیمارها در زمان‌های نگهداری نشان داد که درصد جوانه‌زنی تمامی پیش‌تیمار-های یک هفته شامل گلیسرول ۳۰ درصد، بدون پیش‌تیمار، کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون به ترتیب با درصد جوانه‌زنی $90/10$ ، 90 ، $89/90$ و $88/65$ به همراه شاهد در یک هفته ($91/07$) و یک ماه ($89/06$) و بدون پیش‌تیمار در یک ماه ($87/94$) دارای بیشترین مقدار و پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی در دمای 196°C - (به ترتیب با درصد جوانه‌زنی $79/33$ ، $77/60$ و $76/62$) کمترین مقدار بودند. بنابراین روند نزولی درصد جوانه‌زنی از یک هفته به یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد و نسبت به شاهد در بین پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت به ترتیب $9/32$ ، $12/50$ و $13/28$ بیشترین و بدون پیش‌تیمار ($2/06$) کمترین بود (شکل ۱). سرعت جوانه‌زنی در بین پیش‌تیمارها، تیمار شاهد با یک



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



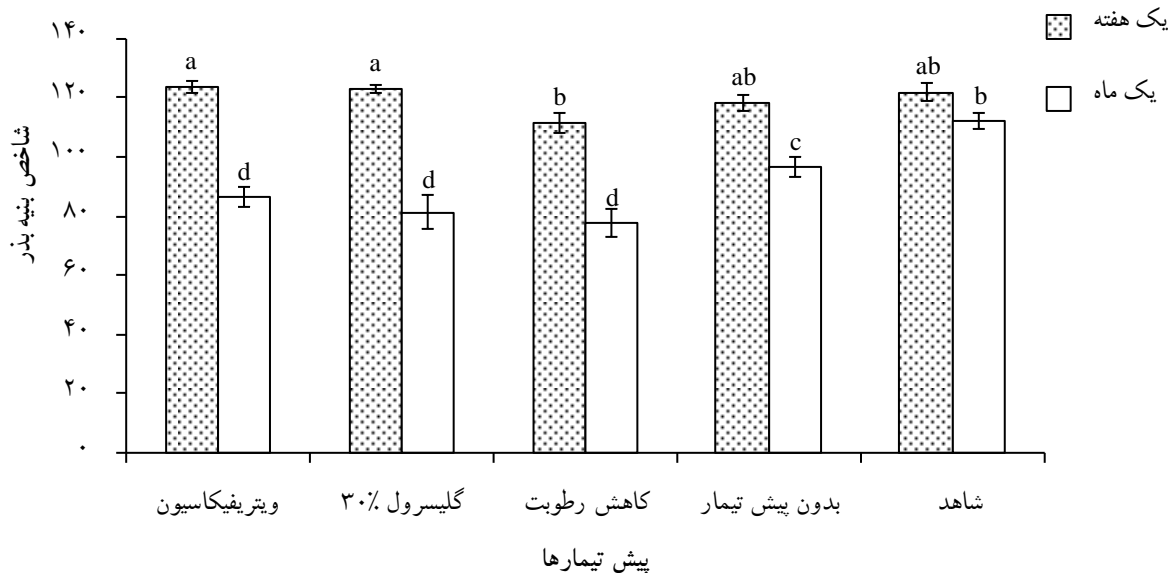
شکل ۲- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش تیمار بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای ۱۹۶°C-

شرایط فراسرد، بیشترین مقدار مربوط به بدون پیش تیمار (۹۶/۴۶) و کمترین مقدار مربوط به سه پیش تیمار دیگر است. از نظر شاخص بنیه بذر پیش تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد با یک هفته نگهداری به ترتیب با ۱۲۳/۰۵ و ۱۲۳/۵۴ از بیشترین مقدار و ویتریفیکاسیون،

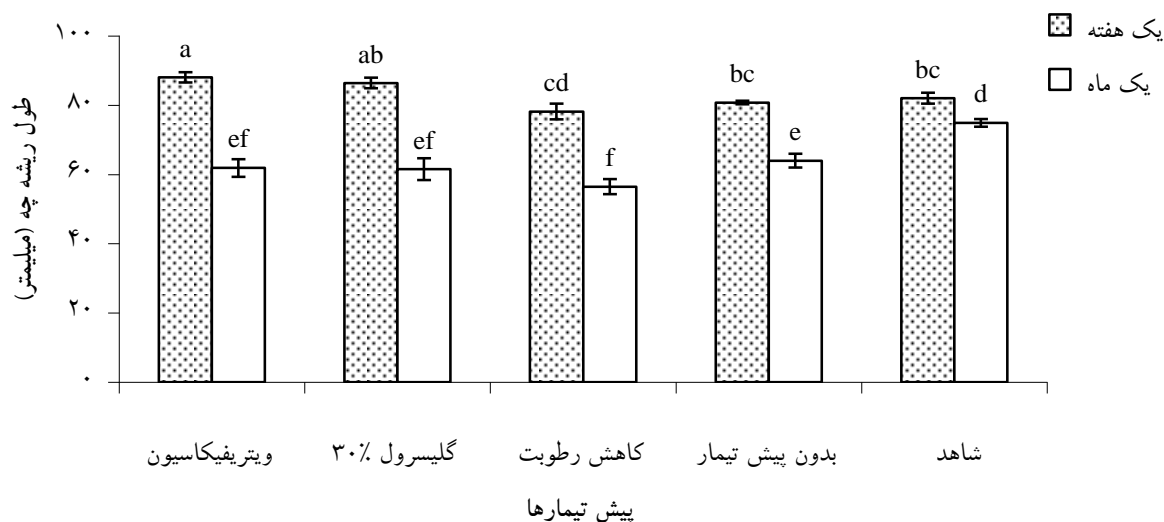
در بررسی شاخص بنیه بذر در بین پیش تیمارها با یک هفته نگهداری پیش تیمارهای ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد به ترتیب با مقادیر ۱۲۳/۵۴ و ۱۲۳/۰۵ دارای بالاترین مقدار و کاهش رطوبت دارای کمترین مقدار بودند، اما در این رابطه بین تیمارها با یک ماه ذخیره‌سازی در

هفته به یک ماه و در مقایسه با تیمار شاهد، کمترین نوسانها مربوط به بدون پیش تیمار (۲۱/۷۰) و بیشترین نوسانها مربوط به گلیسرول ۳۰ درصد (۴۱/۷۱) می باشد (شکل ۳).

گلیسرول ۳۰ درصد و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره سازی در شرایط فراسرد به ترتیب با ۸۶/۳۳، ۸۱/۳۴ و ۷۷/۵۷ از کمترین مقدار برخوردار بودند. به طور کلی، در این روند نزولی شاخص بینه بذر در بین پیش تیمارها از یک



شکل ۳- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش تیمار بر شاخص بنیه بذرهای شب خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره سازی در دمای 196°C -

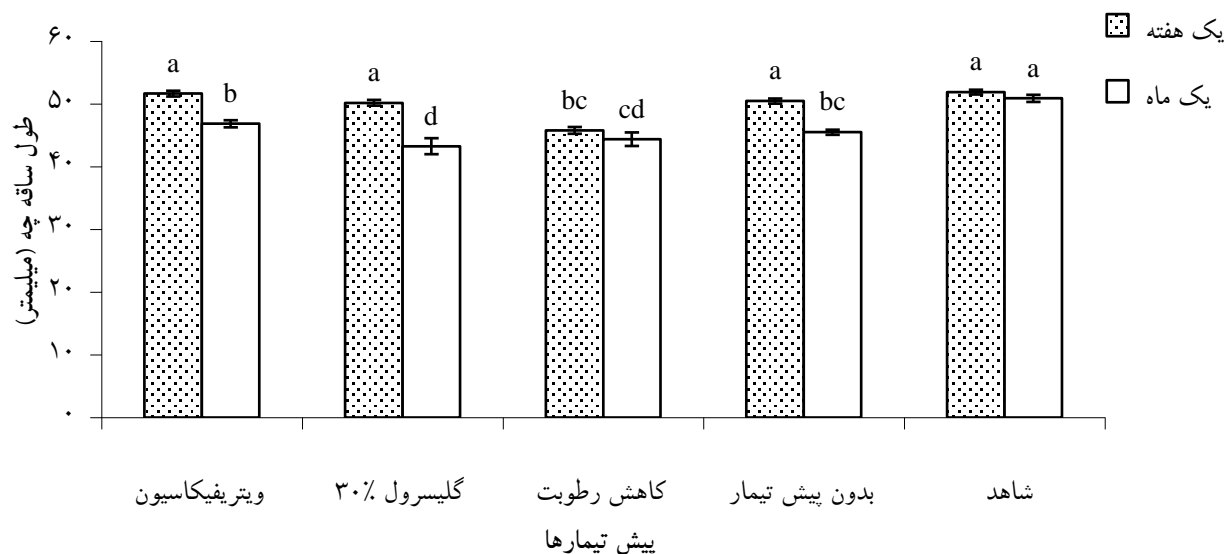


شکل ۴- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش تیمار بر طول ریشه چه بذرهای شب خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره سازی در دمای 196°C -

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 به جز کاهش رطوبت دارای بالاترین مقادیر بودند. اما مقایسه بین پیش‌تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی، ویتریفیکاسیون و گلیسرول ۳۰ درصد به ترتیب 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) به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند (شکل ۵).

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 ریشه‌چه مربوط به پیش‌تیمار کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی به طول ۵۶/۴۷ میلی‌متر می‌باشد. طول ریشه‌چه در بین پیش‌تیمارهای یک هفته در شرایط فراسردی ویتریفیکاسیون با طول ۸۸/۰۵ میلی‌متر بیشترین و پیش‌تیمار کاهش رطوبت با طول ۷۸/۷۶ میلی‌متر کمترین مقدار بود. در روند کاهش طول ریشه از یک هفته به یک ماه نگهداری در دمای 196°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



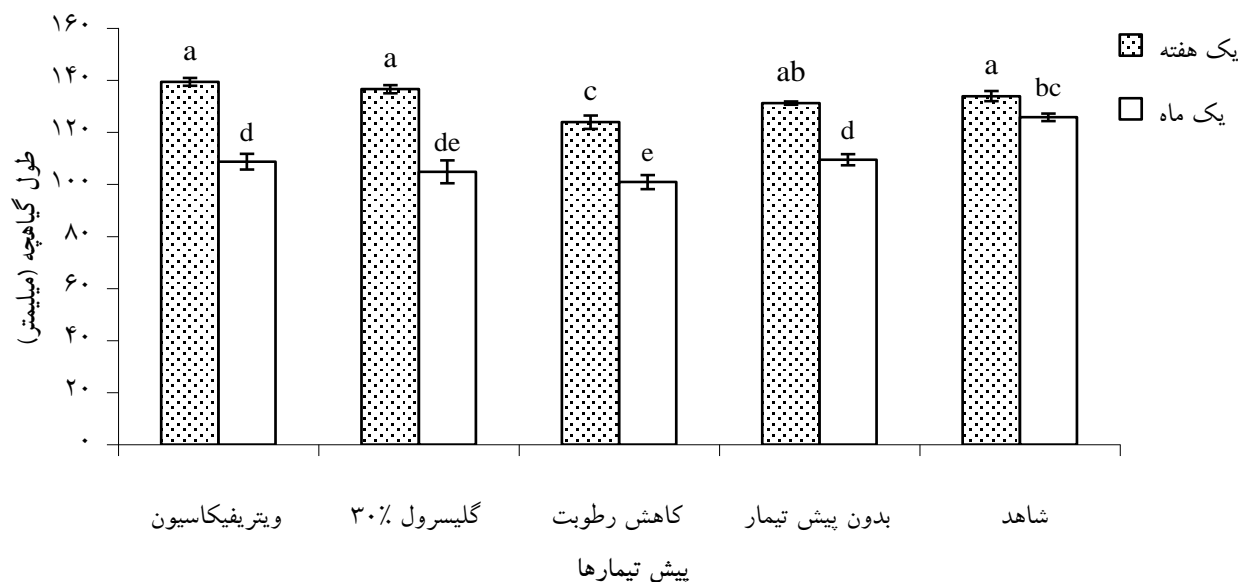
شکل ۵- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر طول ساقه‌چه شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای 196°C -

ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد با یک هفته نگهداری در دمای 196°C - به همراه شاهد با یک هفته نگهداری در

نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول گیاهچه (طول ریشه‌چه + طول ساقه‌چه) نشان داد که پیش‌تیمارهای

تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی در دمای فراسرد شامل بدون پیش‌تیمار و ویتریفیکاسیون به ترتیب با طول ۱۰۹/۴۶ و ۱۰۸/۷۲ میلی‌متر و کاهش رطوبت با طول ۱۰۰/۸۷ میلی‌متر به ترتیب 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 پیش‌تیمار به ترتیب با طول ۳۱/۷۸ و ۲۱/۷۸ میلی‌متر بیشترین و کمترین میزان تغییرات را از خود نشان دادند (شکل ۶).

یخچال با دمای 4°C به ترتیب ۱۳۹/۳۸، ۱۳۶/۵۹ و ۱۳۳/۹۱ میلی‌متر دارای بیشترین مقادیر و بیش‌تیمار کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی در دمای -196°C 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 به ترتیب با طول ۱۳۶/۵۹ و ۱۳۹/۳۸ میلی‌متر بیشترین مقادیر و کاهش رطوبت با طول ۱۲۳/۸۹ میلی‌متر کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند، اما در مقایسه بین پیش-



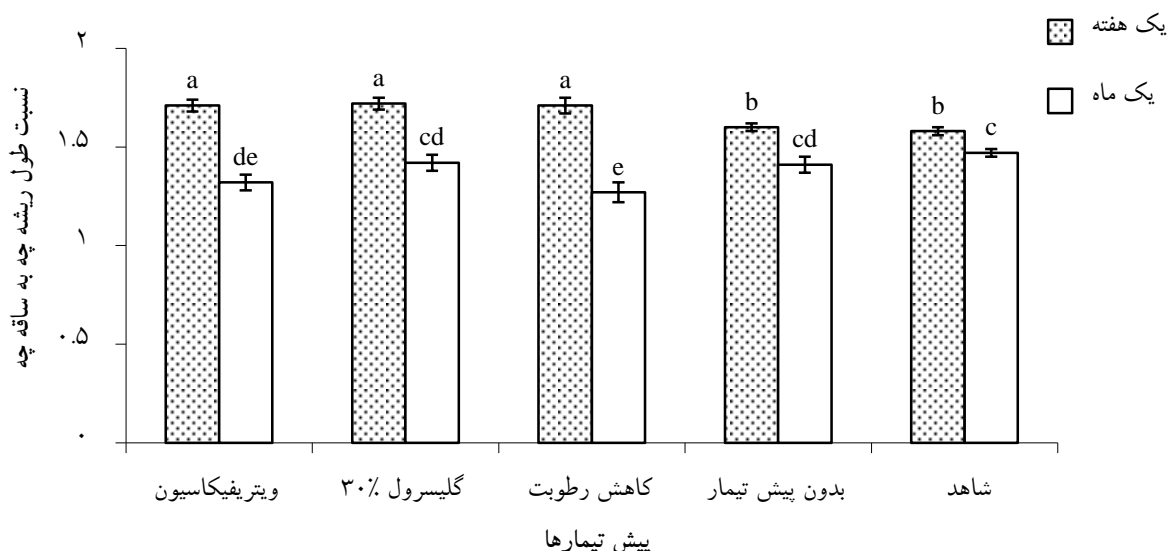
شکل ۶- بررسی اثر تیمارهای شاهد، ویتریفیکاسیون، گلیسرول ۳۰ درصد، کاهش رطوبت و بدون پیش‌تیمار بر طول گیاهچه شب‌خسب پس از یک هفته و یک ماه ذخیره‌سازی در دمای -196°C

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. با این حال در بین پیش‌تیمارهای یک ماه ذخیره‌سازی، گلیسرول ۳۰ درصد و بدون پیش‌تیمار به ترتیب با ۱/۴۲ و ۱/۴۱ بیشترین و کاهش رطوبت با ۱/۲۷ کمترین نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه را به خود

بررسی نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه در نونهال‌های شب‌خسب نتایج نشان داد که پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، ویتریفیکاسیون و کاهش رطوبت با یک هفته ذخیره‌سازی در دمای فراسرد به ترتیب با نسبت ۱/۷۲، ۱/۷۱ و ۱/۷۱ بالاترین مقادیر و کاهش رطوبت با یک ماه ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد با مقدار ۱/۲۷ از کمترین مقدار برخوردار بودند. در بین پیش‌تیمارهای یک هفته ذخیره‌سازی

بدون پیش‌ تیمار با مقدار ۰/۱۹ کمترین نوسان‌ها را از خود نشان دادند (شکل ۷).

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



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

بحث

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 تقریباً 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.,

بذر شب‌خسب پس از خروج از نیتروژن مایع و انتقال به نتری‌دیش 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 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 پیش‌ تیمار (بدون استفاده از مواد ضد انجمادی) همانند تیمار شاهد (نگهداری در یخچال با دمای ۴°C+) اختلاف معنی‌داری بین مدت زمان‌های ذخیره‌سازی یک هفته و یک ماه در نیتروژن مایع مشاهده نشد. براساس

به جز درصد جوانه زنی بذرها و نسبت طول ریشه چه به ساقه چه با یک هفته نگهداری در شرایط فراسرد مقادیر پایینی نسبت به تیمار شاهد و بدون پیش تیمار از خود نشان داد. همچنین با یک ماه ذخیره سازی در دمای نیتروژن مایع، در تمامی صفات مورد مطالعه پیش تیمار کاهش رطوبت روند نزولی بیشتری در مقایسه با تیمار شاهد و بدون پیش تیمار از خود نشان داد. در اغلب موارد، کاهش رطوبت بذرها قبل از ورود به شرایط فراسرد سبب زنده ماندن می شود. در همین رابطه بکارگیری روش کاهش رطوبت برای بذرهای گونه هایی مانند *Acer saccharinum* (Beardmore & Whittle, 2005)، فندق (*Coryllus L.*) (avellana) (Michalak et al., 2013) و ملج (*Ulmus glabra* Huds.) (Chmielarz, 2010) موفقیت آمیز گزارش شده است. در حالی که همین کاهش رطوبت ممکن است جوانه زنی بعضی از بذرها را پس از خروج از نیتروژن مایع کاهش دهد (Thammasiri, 2000). بافت بذر طی کاهش رطوبت به راحتی نسبت به بافت هایی که در آن متابولیسم کاهش یافته آسیب می بیند. 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 یافته های این پژوهش در مورد بذرهای شب خسب مطابقت دارد.

پیش تیمارهای ویتریفیکاسیون می تواند به طور مستقیم آب را از مرحله مایع به مرحله آمورف یا شیشه ای بی شکل تغییر داده و از تشکیل بلورهای یخ جلوگیری کند (Fahy et al., 1984). پیش تیمار ویتریفیکاسیون در تمامی صفات مورد بررسی به جز سرعت جوانه زنی و گلیسرول ۳۰ درصد در تمامی صفات مورد بررسی به جز سرعت جوانه زنی و طول ریشه چه در یک هفته نگهداری در دمای نیتروژن مایع بیشترین مقادیر را از خود نشان دادند اما در این رابطه پس از یک ماه ذخیره سازی در نیتروژن مایع روند نزولی بیشتری در صفات مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد و بدون پیش تیمار از خود نشان داد. با وجود این گزارش های کمی به

زیرا با کاهش شدید فعالیت های متابولیکی، مسئله مدت زمان نگهداری تقریباً منتفی می شود (et al., 2015). (Tabatabaiepoor).

بر اساس نتایج این تحقیق، درصد جوانه زنی بذرها در بدون پیش تیمار با یک هفته (۹۰ درصد) و یک ماه (۸۷/۹۴ درصد) ذخیره سازی در دمای نیتروژن مایع در مقایسه با سایر پیش تیمارهای فراسردی و تیمار شاهد (یک هفته ۹۱/۰۷ درصد و یک ماه ۸۹/۰۶ درصد در دمای یخچال 4°C) از مقادیر بالاتری برخوردار بودند. بنابراین در کلیه صفات مورد بررسی (به جز طول ساقه چه) بدون پیش تیمار از یک هفته به یک ماه نگهداری در شرایط دمایی نیتروژن مایع روند نزولی کمتری نسبت به سایر پیش تیمارها و تیمار شاهد از خود نشان داد.

گونه درختی شب خسب از خانواده Fabaceae است که بذرهای این گونه به خوبی قابلیت ذخیره سازی در شرایط فراسرد را دارد و پس از خروج از نیتروژن مایع قادر به جوانه زنی و استقرار و تولید نهال است. این قابلیت ماندگاری در دمای ازت مایع بدون استفاده از مواد ضدانجمادی به دلیل تولید پوسته سخت از ویژگی های مهم خانواده نیام داران مانند شب خسب می باشد (Baskin & Baskin, 1998; Merou et al., 2011). بذرهای سخت با خفتگی فیزیکی، دارای پوسته ها یا پریکارپ هایی است که نسبت به آب و محلول شیمیایی نفوذناپذیر بوده (Fenner & Thompson, 2005)، این ویژگی به عنوان یکی از عوامل اصلی ماندگاری بذرهای شب خسب در دمای نیتروژن مایع محسوب می شود. همچنین در بذرهای ارتدوکس فرایند کاهش رطوبت به صورت طبیعی انجام می شود و می توان بدون هیچ پیش تیماری فناوری فراسرد را اجرا کرد (Benelli et al., 2013). در این رابطه Araújo و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که نگهداری از بذرهای *P. edulis* و *P. suberosa*, *Passiflora mucronata* بدون استفاده از مواد ضد انجماد (بدون پیش تیمار) در شرایط فراسرد امکان پذیر است.

پیش تیمار کاهش رطوبت در تمامی صفات مورد بررسی

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., Ghafouri, 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*

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* F. Muell.) (Hatami et al., 2010b)، *Doritis pulcherrim* Lindl. و سپیدار (*Thammasiri*, 2000) (*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 گلیکول و DMSO (Dimethyl sulfoxide) 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). با این حال 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 196°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 شب‌خسب 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

- 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 Jihad 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*

- 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 *Emmenopterys 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).
 - Thammastiri, 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 Resources*, 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. Agroforestry 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* Durz.) in the north of Iran, Gorgan. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 1 (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

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

S. Sakhavat¹, O. Esmailzadeh², M. Jebelli³

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 Extension 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 °C. 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.