دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۱۱۱-۱۰۳ (۱۳۹۴)

نگهداری بذر گَبر (*Acacia tortilis*) و چش (*Acacia nilotica*) در شرایط فراسرد

مریم جبلّی[1*]، محبت‌علی نادری‌شهاب[2] و علی‌اشرف جعفری[3]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست الکترونیک: Jebelly@rifr-ac.ir
۲- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۰۴

چکیده

ذخیره‌سازی در فراسرد یا ۱۹۶°C- روشی جدید و بسیار کارآمد در نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم گونه‌های گیاهیست. با استفاده از روش فراسرد می‌توان بذر، اندام رویشی، سلول و دانه گرده گیاهان را برای بلندمدت نگهداری و در صورت بروز هر گونه تهدید یا خطر انقراض نسبت به بازگشت و احیاء گونه اقدام کرد. در شرایط فراسرد، اغلب فعالیت‌های متابولیکی سلول تقریباً متوقف و طول مدت نگهداری بطور چشمگیری افزایش می‌یابد. بذر گونه‌های جنگلی *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* از رویشگاه‌های آنها جمع‌آوری شد. قبل از ورود بذرها به نیتروژن مایع با سه پیش‌تیمار شامل ویتریفیکاسیون با استفاده از PVS2، آبگیری و گلیسرول ۳۰٪ تیمار و بعد وارد نیتروژن مایع شدند. بذرها پس از یک ماه از نیتروژن مایع خارج و در معرض شوک حرارتی یا دمای ۴۲°C+ قرار گرفته، سپس شستشو و در شرایط آزمایشگاه و گلخانه کشت شدند. در بررسی‌های آزمایشگاهی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، بنیه بذر، سرعت جوانه‌زنی و نسبت طول ریشه به ساقه اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل آماری شد. درصد بالای جوانه‌زنی بذرهای فراسردی بیشتر از ۸۰٪ و ۷۵٪ به‌ترتیب در گونه‌های *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* مشاهده شد. میانگین سایر صفات بالا بود که این نشان‌دهنده مقاومت بذرهای گونه‌های مورد بررسی به شرایط فراسرد می‌باشد. در آزمایش‌های گلخانه‌ای گیاهانی که از بذرهای فراسردی تولید شدند به‌خوبی رشد کرده و در مقایسه با گیاهان شاهد هیچگونه علائم سوء یا غیر طبیعی نشان ندادند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از روش فراسرد برای ذخیره‌سازی بلندمدت بذر گونه‌های *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* امکان‌پذیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ذخیره‌سازی در فراسرد، PVS2، آبگیری، گلیسرول، ویتریفیکاسیون، *Acacia nilotica, Acacia tortilis.*

مقدمه

گونه *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne یا گَبر، گونه درختی از خانواده Fabaceae (Papilionaceae) بوده و در مناطق گرم و خشک رویش دارد. پراکنش آن در جهان شامل اغلب کشورهای آفریقایی، شبه جزیره عربستان و ایران می‌باشد. این گونه گرمای شدید و دوره خشکی بیش از ۸ ماه را به‌خوبی تحمل می‌کند. بندر لنگه با متوسط دمای سالانه ۲۷ درجه سانتی‌گراد و بارندگی سالانه ۱۷۰ میلی‌متر یکی از رویشگاه‌های اصلی این گونه می‌باشد. بذر این گونه به‌دلیل وجود مانع فیزیکی که همان پوسته بذر است در شرایط عادی

جوانه‌زنی نداشته و یا درصد بسیار ناچیزی از بذرها جوانه می‌زنند (Loth *et al.*, 2005). همچنین بذر آنها توسط سوسک‌های خانواده Bruchidae به‌شدت پارازیته می‌شود (Al Jaber Ahmed, 2008؛ Ernst *et al.*, 1989). از فواید این درختچه می‌توان به داشتن چوب محکم و بادوام، بالا بودن ارزش کالری، تولید ذغال، جذب زنبور عسل، استفاده در کشت تلفیقی، خوراک دام‌ها به‌ویژه شتر، کنترل ماسه‌زارهای روان به‌عنوان بادشکن حفاظتی و مأمنی برای حیات وحش نام برد (Emtehani). این گونه یکی از ارزشمندترین درختان مناطق جنوبی کشور به‌ویژه هرمزگان می‌باشد که از اهمیت زیست محیطی، اکولوژیک و اقتصادی برخوردار بوده و توان استقرار در عرصه‌های گرم، خشک، کم باران و خاک با کیفیت پائین را دارد. تغییرات عوامل اکولوژیک ناشی از فعالیت‌های صنعتی و عمرانی، پروژه‌های بهره‌برداری از آب و تخریب بعضی از عرصه‌های رویشگاهی حیات این گونه را به‌خطر انداخته است. بنابراین با توجه به خطرات ذکر شده حفظ و حراست از این گونه ارزشمند در اولویت قرار دارد.

گونه کِرت یا چش (*Acacia nilotica* (L.) Delile) درختی است که در نواحی گرم و خشک رویش دارد. عرصه‌های رویشگاهی این گیاه در دنیا شامل ایران، آفریقا، شبه جزیره عربستان، غرب آسیا، شبه قاره هند و منطقه استوایی آمریکای جنوبی می‌باشد. پراکنش این گونه در ایران در استان بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان است (Mozaffarian, 2004; Emtehani, 2003). پوسته سخت بذر در این گونه مانع فیزیکی برای جوانه‌زنی بوده و خواب بذر ناشی از وجود این مانع فیزیکی است (Warrag and Eltigani, 2005). با اینکه این درخت در بعضی از کشورهای افریقایی به‌عنوان گونه مهاجم شناخته می‌شود، اما در بعضی از کشورها مانند اندونزی به‌عنوان گونه وارداتی کشت و به‌خوبی مستقر شده و تأثیر زیست‌محیطی خوبی در مناطق کشت شده داشته است (Tarmuzi, 2009).

از مهمترین مصارف آن در ایران می‌توان در صنعت لنج‌سازی و ساخت وسایل کشاورزی، استفاده در دباغی، استفاده از برگ‌ها، سرشاخه و میوه آن به‌عنوان خوراک دام، تهیه ذغال، استفاده از صمغ آن در کارخانجات کبریت، مرکب‌سازی، رنگ و شیرینی‌سازی و صنایع دارویی نام برد (Emtehani, 2003). گونه *Acacia. Nilotica* در طرح‌های جنگل‌داری مناطق گرم و خشک جنوب کشور به‌ویژه هرمزگان جایگاه ویژه‌ای داشته و به‌عنوان گونه بومی در مشجرکردن عرصه‌های منابع طبیعی این مناطق اهمیتی ویژه دارد (Soltanipour, 1999). استفاده از روش فراسرد در نگهداری بذر و اندام‌های گیاهی به‌ویژه اندام‌های رویشی و بافت‌های گیاهی، نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد (Reed, 2001). در نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان در دمای فراسرد می‌توان از قسمت‌های مختلف گیاه مانند بذر، اندام، کالوس، سلول‌های تمایز یافته، مریستم و دانه گرده استفاده کرد. در این روش امکان جمع‌آوری و ذخیره‌سازی گونه‌های گیاهی عرصه‌های مختلف در مکان واحد و شرایط یکسان میسر می‌باشد. در دمای فراسرد، مولکول‌های آب بدون اینکه فرصت حرکت به بیرون سلول و تجمع و تبدیل به کریستال را داشته باشند، در جای خود متوقف و تبدیل به فرم جامد می‌شوند. هنگامی که مولکول‌های آب قبل از تجمع و تبدیل به یخ، در جای خود منجمد گردند به این حالت شیشه‌ای شدن یا ویتریفیکاسیون می‌گویند. در حالت ویتریفیکاسیون چون کریستال یخ یا توده منجمد آب تشکیل نمی‌شود به بافت گیاهی و ساختار مولکولی آن صدمه‌ای وارد نمی‌شود (Reed, 2001).

مواد محافظ در برابر فراسرد یا Cryoprotectants شامل گلیسرول، دی متیل سولفوکساید، ساکاروز، دکستران، اتیلن گلایکول، پلی وینیل پیرولیدون، نشاسته، هیدروکسی اتیل و مواد دیگری می‌باشند؛ که ضمن حلالیت بالا حداقل سمیت را برای سلول دارند. این مواد در عین حالی که از تشکیل یخ جلوگیری می‌نمایند باید حداقل آثار منفی را برای سلول داشته باشند. در روش فراسرد اغلب گونه‌های گیاهی که تکثیر جنسی آنها با مانعی روبروست و یا نگهداری بذر آنها در شرایط متعارف امکان‌پذیر نمی‌باشد، می‌توان نسبت به نگهداری بلندمدت جوانه انتهایی آنها در شرایط ۱۹۶- ^{o}C اقدام و در هنگام نیاز نسبت به خروج از فراسرد و تکثیر

آنها اقدام کرد. این روش به‌ویژه در گونه‌هایی که بذر ریکالسیترنت (انبار مرطوب یا آبدار) دارند و یا مدت زنده‌مانی بذر آنها کوتاه می‌باشد مانند جنسهای *Salix*، *Populus* و *Camphorosma* و یا تکثیر آنها به‌هر دلیلی از طریق بذر مشکل است، قابل استفاده می‌باشد.

پس از خروج بذر از نیتروژن مایع، رشد بذر و دستیابی به گیاه کامل از اهمیت خاصی برخوردار است. بذرهای ذخیره شده ارکید هیبریدی به‌نام Bratonia در فراسرد، پس از خروج از نیتروژن مایع همانند بذرهای شاهد رشد کرده و تولید پیازچه اولیه و گیاه کامل کردند (Popov *et al.*, 2004). در اغلب موارد کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به نیتروژن مایع باعث زنده‌مانی بذر می‌شود. در حالیکه همین کاهش رطوبت ممکن است جوانه‌زنی بذر را پس از خروج از نیتروژن مایع کاهش دهد.

گونه‌های جنس بید از اهمیت اقتصادی، زیست‌محیطی و تنوع زیستی بسیار بالایی برخوردار می‌باشند. بذر گونه‌های این جنس بسیار ریز و زنده‌مانی کوتاهی دارند. نگهداری بذرهای این جنس حتی در میان‌مدت در شرایط متعارف غیرممکن می‌باشد. با توجه به این موارد تنها از طریق فراسرد می‌توان بذرهای گونه‌های این جنس را برای مدت زمان طولانی نگهداری کرد. اثر دمای فراسرد در نگهداری بذر دو رقم هیبرید بید *Salix capreola* × *Salix rehderiana* و *Salix viminalis* × *sericans* توسط Wood و همکاران (۲۰۰۳)، مورد بررسی قرار گرفت. البته اثرات خشک‌کردن و دمای ذخیره‌ای روی توانایی زیستی و قدرت بقای بذرهای هیبرید هدف این مطالعه بود. بذرهای تازه‌برداشت‌شده از دو تلاقی فوق با استفاده از سیلیکاژل خشک شدند تا محتوای رطوبت آنها به ۳ تا ۵ درصد رسید. بذرها در نیتروژن مایع به‌مدت ۳ روز ذخیره شدند. توانایی رشد مجدد بذرهایی که از نیتروژن مایع خارج شده بودند تحت تأثیر درصد رطوبت بذرها و رطوبت نسبی محیطی بود که بذرها قبل از انتقال به نیتروژن مایع در آن نگهداری شده بودند؛ در صورتی‌که امکان نگهداری بذر این گونه‌های آکاسیا در شرایط فراسرد فراهم گردد، می‌توان بذر این گونه را در مقیاس زمانی بلندمدت با حداقل فضا و هزینه و حداکثر اطمینان نگهداری کرد و در صورت بروز هرگونه تهدید یا خطر انقراض نسبت به بازگشت و احیاء گونه اقدام کرد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سالهای ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۰ در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد. بذر گونه‌های *Acacia tortilis* و *Acacia nilotica* از استان هرمزگان جمع‌آوری شدند. به‌منظور دستیابی به بهترین روش سبزکردن و جوانه‌زنی بذر روش‌های مختلفی اعمال شد. ابتدا پوسته بذر *Acacia tortilis* با سمباده شماره ۱۰۰ چندین بار خراش داده شد و بعد کیفیت خراش در زیر بینوکولار بررسی شد. سپس کناره بذر *Acacia nilotica* با سمباده به‌نحوی که تقریباً سفیدی آندوسپرم مشخص شود سائیده شد. پس از آن شستشوی کامل بذرها با آب معمولی برای چندین بار انجام شد و در شرایط استریل به شیشه‌های حاوی بذرها محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ اضافه و مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از این مرحله دوباره بذرها ۳ مرتبه با آب استریل شستشو شدند. سپس بذرها را بین کاغذ مرطوب استریل درون پتری‌دیش گذاشته و در ژرمیناتور قرار داده تا جوانه‌زنی آنها بررسی گردد. همچنین کشت در داخل ماسه و در شرایط گلخانه انجام شد.

آزمایش نگهداری بذر در فراسرد

پیش‌تیمارهای فراسرد، یا تیمارهای قبل از ورود بذرها به نیتروژن مایع به‌شرح زیر می‌باشند:

تیمار ویتریفیکاسیون یا PVS2: به تیوب‌های درب‌دار ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، محلول بارگیری شامل: ۰/۴ مول ساکاروز و ۲ مول گلیسرول (Matsumoto *et al.*, 1994) اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول بارگیری کاملاً تخلیه و به تیوب‌های حاوی بذر محلول PVS2 با دمای ۴+ درجه شامل: ۱۵٪ اتیلن گلیکول (w/v)، ۱۵٪ دی‌متیل سولفوکساید (w/v)، ۳۰٪ گلیسرول (w/v) و ۰/۴ مول ساکاروز (Sakai *et al.*, 1991) اضافه و

درب آنها را بسته و به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب ۴+ درجه قرار داده شدند. تیوب‌های حاوی بذر وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار آبگیری: آزمایش‌های مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوب بذر، بدون واردآمدن صدمه به جوانه‌زنی آن انجام شد تا حداقل رطوبت بذر به‌دست آید. به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۱۰ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌عنوان وزن اولیه یادداشت شد. سپس بذرها به‌مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بذرها از آون خارج و بلافاصله با ترازوی حساس توزین و وزن خشک آنها به‌دست آمد. درصد کل رطوبت بذر در *Acacia tortilis* ۶/۶۱ درصد و در *Acacia nilotica* ۵/۵۱ درصد بود که با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد کل رطوبت بذر = (FW - DW)/DW*100

در این فرمول FW وزن ثانویه پس از خشک‌کردن و DW وزن اولیه قبل از خشک‌کردن است. سپس ۶۰ گرم بذر تازه از گونه *Acacia tortilis* و ۱۸۰ گرم بذر از گونه *Acacia tortilis* توزین و به دسیکاتور حاوی ۱۵۰۰ گرم سیلیکاژل منتقل و به‌مدت ۷ روز در سردخانه با دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بذرها از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ توزین و درصد رطوبتشان پس از خشک‌شدن در دسیکاتور با استفاده از فرمول فوق محاسبه شد. با در دست داشتن رطوبت کل بذر و مقدار رطوبت بذر پس از قرارگرفتن در دسیکاتور، درصد کاهش رطوبت بذر در دسیکاتور محاسبه شد که این کاهش برای گونه *Acacia nilotica* ۴۲/۸۶ درصد و برای گونه *Acacia tortilis* ۳۷/۹۷ درصد رطوبت کل بذر بود.

گلیسرول ۳۰٪: درون تیوب‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی بذر، گلیسرول ۳۰٪ ریخته و مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن تیوبها وارد نیتروژن مایع شدند.

بذرهای شاهد: بذر مناطق جمع‌آوری شده، برای کاشت در پتری و گلدان در ۴+ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌ماه نگهداری شدند.

تیمارهای پس از خروج بذر از نیتروژن مایع

در این آزمایش پس از یک‌ماه بذرها از نیتروژن مایع خارج شده و به‌منظور ایجاد شوک حرارتی به‌مدت ۲ دقیقه در آب ۴۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بذرها از آب گرم خارج و مدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکاروز ۱/۵ مول استریل قرار داده شدند. قسمتی از بذرها در شرایط استریل ۴ بار با آب مقطر شستشو و بین کاغذ مرطوب استریل درون پتری‌دیش قرار داده شده و به ژرمیناتور با دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰ وات بر مترمربع (مداوم) منتقل شدند. قسمت دیگری از بذرها در شرایط گلخانه درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه منطقه بیابانی کشت شدند.

طرح آزمایشی: در انجام مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، از طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل ویتریفیکاسیون، آبگیری، گلیسرول ۳۰٪ و شاهد بود. در آزمایشگاه درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (R/S) اندازه‌گیری شد. شاخص بنیه بذر با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Abdul – Baki و Anderson (۱۹۷۳) محاسبه شد. در آزمایش‌های گلخانه درصد استقرار بذر و تولید نهال‌های جوان اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار SAS انجام گردید.

نتایج

نتایج مربوط به اثر پیش‌تیمارهای مختلف شامل ویتریفیکاسیون، آبگیری و گلیسرول ۳۰٪ در یک ماه نگهداری بذرهای *Acacia tortilis* و *Acacia tortilis* در نیتروژن مایع همراه با بذر شاهد در صفات مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. در گونه *Acacia nilotica*، از نظر آماری تفاوتی بین درصد جوانه‌زنی بذر شاهد و بذرهایی که با پیش‌تیمارهای مختلف در نیتروژن مایع نگهداری شدند، مشاهده نشد. حداکثر جوانه‌زنی بذر این گونه ۸۵٪ در تیمار شاهد و حداقل ۷۸/۳۳ در تیمارهای آبگیری و گلیسرول

۳۰٪ بدون اختلاف آماری بود که این درصد جوانه‌زنی برای گونه‌ای که در عرصه‌های منابع طبیعی رویش دارد درصد بالایی است (شکل ۱-الف). درصد جوانه‌زنی و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه بین شاهد و پیش‌تیمارهای فراسردی اختلاف آماری نشان نداد. در سایر صفات مانند شاخص بنیه بذر (VI)، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه تفاوت نسبتاً کم، ولی از نظر آماری بین تیمار شاهد و تیمارهای فراسردی معنی‌دار بود. اما در اغلب موارد (به استثناء طول ساقه‌چه) بین تیمارهای فراسردی اختلاف آماری مشاهده نشد.

در گونه *Acacia tortilis* به استثناء طول ساقه‌چه در تیمار گلیسرول ۳۰٪، تفاوت آماری بین میانگین صفات مورد بررسی مشاهده نشد. درصد جوانه‌زنی بذر این گونه که مخصوص اقلیم گرم و خشک و شرایط محیطی بسیار سخت است در نمونه شاهد و تیمار آبگیری بسیار بالا به‌ترتیب ۷۵/۳۳ درصد و ۷۲ درصد بود.

در رابطه با استقرار بذر بین شاهد و پیش‌تیمارهای فراسردی *Acacia nilotica* در شرایط گلخانه، نتایج حکایت از استقرار نسبتاً بالای بذر این گونه در شرایط گلخانه داشت (جدول ۲). حداکثر استقرار ۵۸٪ در تیمار شاهد و حداقل ۴۵٪ در تیمار گلیسرول ۳۰٪ و بدون اختلاف آماری بود که این ارقام حکایت از استقرار بسیار خوب بذر این گونه در شرایط گلخانه دارد. البته براساس نتایج این جدول تفاوت آماری بین تیمارهای شاهد و فراسردی وجود نداشت.

استقرار بذرهای شاهد و فراسردی *Acacia tortilis* در شرایط گلخانه نیز از نظر آماری تفاوتی با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۲). درصد استقرار و تولید نهال در گلخانه بین ۵۶/۶۷٪ تا ۵۱/۶۷٪ بود که این رقم بسیار خوب و در حد بالایی می‌باشد. براساس داده‌های جدول ۲ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بذرهای فراسردی این گونه همانند بذرهای شاهد به‌خوبی مستقر و تولید نهال می‌کنند (شکل ۱-ب).

جدول ۱- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و یک ماه نگهداری در نیتروژن مایع بر ویژگی‌های بذر گونه‌های *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis*

گونه	پیش‌تیمارهای فراسردی	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول گیاهچه (میلی‌متر)	سرعت جوانه‌زنی	VI	R/S
Acacia nilotica	کنترل	۸۵.۰۰ a	۵۴/۶۷ a	۲۶/۳۳ a	۸۱/۰۰ a	۱۸/۸۰ a	۶۸/۶۵ a	۲/۰۸a
	گلیسرول ۳۰٪	۷۸.۳۳a	۴۳/۳۳b	۱۹/۶۷b	۶۳/۰۰ b	۱۶/۶۱ a	۴۹/۲۵ b	۲/۲۴ a
	آبگیری	۷۸.۳۳a	۴۶/۰۰b	۲۳/۰۰ab	۶۹/۰۰ b	۱۵/۱۳ a	۵۴/۲۰ b	۲/۰۰ a
	PVS2	۸۰.۰۰ a	۴۳/۳۳b	۱۹/۰۰b	۶۲/۳۳ b	۱۳/۸۴ a	۴۹/۸۷ b	۲/۲۸ a
	اثر متقابل	*	**	**	**		**	*
Acacia tortilis	کنترل	۷۳/۳۳ a	۶۲/۳۳ a	۳۱/۶۷ a	۹۴/۰۰a	۱۹/۵۰ a	۶۹/۵۳ a	۱/۹۶ a
	گلیسرول ۳۰٪	۶۲/۳۳a	۵۶/۰۰a	۲۳/۳۳ b	۷۹/۳۳ a	۱۶/۵۱ a	۴۹/۹۳ a	۲/۴۱ a
	آبگیری	۷۲/۰۰a	۵۷/۶۷ a	۲۹/۴۷ a	۸۷/۱۳ a	۱۷/۷۸ a	۶۳/۲۹ a	۱/۹۹ a
	PVS2	۶۶/۰۰a	۵۸/۰ a۰	۲۹/۳۳ a	۸۷/۳۳ a	۱۵/۹۶ a	۵۸/۴۸ a	۱/۹۷ a
	اثر متقابل	*	*	**	*	*	*	*

در هر ستون، اختلاف میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک هستند در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

*و **: اثر متقابل پیش‌تیمارها و دو گونه آکاسیا در اندازه صفات مختلف که در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار است.

R/S : نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و VI: شاخص بنیه بذر

جدول ۲- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و یک هفته ذخیره‌سازی بذرهای *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* در نیتروژن مایع بر استقرار و تولید نهال در شرایط گلخانه

گونه‌ها	پیش‌تیمارهای فراسردی	استقرار
Acacia nilotica	کنترل	۵۸/۳۳a
	گلیسرول ۳۰٪	۴۵/۰۰a
	آبگیری	۴۶/۶۷a
	PVS2	۴۶/۶۷a
Acacia tortilis	کنترل	۵۶/۶۷a
	گلیسرول ۳۰٪	۵۱/۶۷a
	آبگیری	۵۳/۳۳a
	PVS2	۵۱/۶۷a

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشترک هستند در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

الف

ب

شکل ۱- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و نگهداری بذر در شرایط فراسرد در گونه‌های *A.nilotica* (الف) *A. tortilis* (ب) همراه با بذرهای شاهد بر جوانه‌زنی و استقرار بذر در شرایط گلخانه

بحث

از آنجایی‌که دستیابی به اطلاعات در مورد نگهداری بلندمدت بذر درختان لگوم مناطق گرمسیری ایران دارای اهمیت بود، تیمار یک ماه نگهداری بذرها در نیتروژن مایع اجرا گردید تا نتایج آن بررسی شود. در مطالعه اثر فراسرد بر روی بذرهای *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* مشاهده شد که بذرها پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند. با توجه به امکان زنده‌مانی بذرها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد می‌توان بذرهای این گونه را جزو بذرهای ارتدکس (Engelman, 1990; Roberts & Ellis, 1989) قرار داد. در بررسی زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی گونه‌های مورد مطالعه، تفاوت آماری میان تیمارهای ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت بذر و گلیسرول ۳۰ درصد با تیمار شاهد مشاهده نشد. براساس یک تئوری، در صورتی که بذر در محیط نیتروژن مایع زنده بماند، نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه‌مدت و میان‌مدت وجود داشته باشد. زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی، مسئله مدت زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌گردد.

ویتریفیکاسیون فرایندی است که آب از حالت مایع وارد یک مرحله شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگهداری بافت‌های گیاهی در نیتروژن مایع بدون شکل‌گیری کریستال‌های یخی امکان‌پذیر خواهد بود (Gale *et al*., 2008; Matsumoto *et al*., 2001; Wang *et al*., 2005). در این مطالعه تفاوتی بین پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون و سایر پیش‌تیمارها مشاهده نشد. زیرا در هیچ یک از صفات (درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر) اثر محسوسی دیده نشد و این در حالیست که در بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی گونه‌هایی مانند موز، ارکیده و آناناس (Thinh, 1997)، توت فرنگی (Hirai *et al*., 1998) و سپیدار (Lambardi *et al*., 2000) اثر مثبت این تیمار گزارش شده است.

عدم وجود اختلاف بین پیش‌تیمارهای فراسردی، حکایت از امکان استفاده از هر یک پیش‌تیمارها در نگهداری بذر این دو گونه در شرایط فراسرد دارد، زیرا به‌دلیل وجود پوسته بسیار سخت بذر نفوذ مواد شیمیایی موجود در PVS2 و گلیسرول به‌درون بذر تقریباً غیرممکن می‌شود. از این‌رو در بذرهایی مانند بذر *Acacia nilotica* و *Acacia tortilis* که پوسته سخت و نفوذناپذیر دارند، بعکس نمونه‌های رویشی مانند مریستم، جوانه، سلول و محور جنینی و یا بذرهای فاقد پوسته که محلول PVS2 یا هر محلول دیگری به‌راحتی به درون آنها نفوذ می‌کند، این محلولها به درون بذر نفوذ نکرده و در نتیجه به آندوسپرم و جنین بذر آسیب نمی‌رسانند. نتیجه اینکه کاربرد مواد محلول در این گونه بذرها به‌نظر ضرورتی ندارد و استفاده از پیش‌تیمارهای ساده، سریع و کم هزینه مانند آبگیری مناسب است. در همین رابطه Beardmore و Whittle (۲۰۰۵) نیز بکارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذر گونه *Acer saccharinum* موفقیت‌آمیز گزارش کردند. همچنین نتیجه بررسی‌های انجام شده توسط Warters و همکاران (2004) بر روی بذر کاهو و Mix-Wagner و همکارانش (2003) بر روی جوانه انتهایی سیب‌زمینی نشان داد که به‌دلیل کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی بذر نمونه‌های گیاهی، مدت زمان زنده‌مانی به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. به‌طور کلی، نتایج آزمون‌های این تحقیق نشان داد که بذر دو گونه درختی مورد بررسی که هر دو در خانواده Fabaceae قرار دارند، به‌خوبی توان ماندگاری در شرایط فراسرد را داشته و پس از خروج از فراسرد قادر به جوانه‌زنی، استقرار و تولید نهال می‌باشند.

قابل ذکر است که با استفاده از فناوری فراسرد می‌توان علاوه بر بذر، سایر اندام‌های گیاهی مانند جوانه‌های جانبی یا انتهایی، سلول، دانه گرده و جنین را برای مدت زمان بسیار طولانی نگهداری کرد. در این صورت حفظ و بقای گونه‌هایی که نگهداری بذر آنها امکان‌پذیر نیست مانند بذرهای ریکالسیترنت (آبدار) یا گیاهانی که فقط از طریق کلن تکثیر می‌شوند، قابل اجرا خواهد بود (Berjak & Pammenter, 2002). از این‌رو استفاده از فناوری حفاظت در شرایط فراسرد امکان نگهداری طولانی‌مدت بذر تعداد

زیادی از گونه‌های گیاهی در معرض خطر را فراهم کرده و حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های ارزشمند جنگلی و مرتعی را موجب می‌شود. بنابراین با استفاده از این فناوری امکان احیاء و حفاظت گونه‌های مختلف در معرض خطر در اکوسیستم‌های منابع طبیعی فراهم می‌شود.

منابع مورد استفاده

-Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D., 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. Crop Science, 13: 630-633.

-Al Jaber Ahmed, M., 2008. Effect of bruchid beetles (*Burchidius arabicus* decelle) infestation on the germination of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne) seeds. American Journal of Environmental Sciences, 4: 285-288.

-Berjak, P. and Pammenter N.W., 2002 . Orthodox and Recalcitrant Seeds. Plant Cell Biology Research Unit, School of Life Sciences University of Natal, Durban, 4041 South Africa.

-Emtehani, M.H., 2003. Native *Acacia* Species in Iran.Yazd University Pub., Yazd

-Ernst, W.H.O., Tolsma, D.J. and Decelle, J.E., 1989. Predation of seeds of *Acacia tortilis* by insects. Oikos, 54: 294-300.

-Gale, S., John, A., Harding, K. and Benson, E., 2008. Developing cryopreservation for *Picea stichensis* (stica spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. CryoLetters, 29: 135-144.

-Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S., and Sakai, A., 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) by encapsulation- vitrification. Euphytica, 101: 109-115.

-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 Report, 19: 213-218.

-Loth, P.E., Boer, W.F.de, Heitkönig, I.M.A. and Prins, H.H.T., 2005. Germination strategy of the East Africa savanna tree *Acacia tortilis*. Journal of Tropical Ecology, 21: 509-517.

-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.

-Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H., and Sakai A., 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by vitrifiation of dormant shoot tips. Plant Cell Report, 20: 398-402.

-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: 33-42.

-Mozaffarian, V., 2004. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser Publishers. Iran. Tehran,

-Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. and Kolomeytseva, G.L., 2004. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. CryoLetters, 25: 205-212.

-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.

-Soltanipour, M.A., 1999. Comparison of plantation with four indigenus *Acacia* species and determination of least irrigation period in the first year after plantation. Forest and Poplar Research, 3: 109-154.

-Tarmuzi, Z., 2009. Impact of *Acacia nilotica* on environment at National Baluran Park, East Java-Indonesia. XIII World Forestry Congress, Buenos Aires, Argentina, 18-23 October, 1-9.

-Wang, Y.L., Fan, M.J. and liaw, S.I., 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academemia Sinica, 46: 29-34.

-Warrag, E.I. and Eltigani, M.A., 2005. Breaking seed coat dormancy of *Acacia nilotica* seeds under simulated natural habitat conditions in Sudan. Tropical Ecology, 46: 127-132.

-Wood, C.B., Pritchard, H.W. and Lin Degaard, K., 2003. Seed cryopreservation and longevity of two *Salix* hybrids. CryoLetters, 24: 17-26.

Cryopreservation of seeds of *Acacia tortilis* and *Acacia nilotica*

M. Jebelli.[*1],M.A.Naderishahab[2] and A.A.Jafari[3]

1*- Corresponding auther, M.Sc.,Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran.
E-Mail:Jebelly@rifr-ac.ir
2-Assist., Prof., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran.
3- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran.

Received: 04.09.2012 Accepted: 25.06.2013

Abstract

Cryopreservation or storage at -196°C is a new and most important method of preserving plant species materials for a long period of time. Using cryopreservation, most of seeds, vegetative organs, cells, and pollens can be preserved for a long time. Cryogenic conditions stop much of the metabolic processes of the cells and, period of preservation dramatically increases. Seeds of *Acacia nilotica* and *Acacia tortilis* were collected from Hormozgan provience, located in south part of Iran. Three pretreatments including vitrification (PVS2), desiccation and 30% glycerol were applied before transferring the seeds into liquid nitrogen. Seeds were stored in liquid nitrogen for one month. Following removal from liquid nitrogen, the seeds were subjected to heat shock (+42 °C) and germinated under laboratory conditions. Different attributes including seed germination percentage, root and shoot length, germination speed, root/shoot length ratio and seed vigor index (VI) were recorded and statistically analyzed. Second sample of the same seeds were sown in pots and grown under greenhouse conditions. High seed germination percentage (<80%, <75% and <41% for *Acacia nilotica* and *Acacia tortilis* respectively) and other attributes, either in laboratory or greenhouse conditions revealed the cryotolerance of seeds of the species. In greenhouse experiments, plants developed from cryogenic seeds grew normally and did not show any abnormality compared to those of the control plants. In general, results of the present study indicated that cryopreservation (-196 °C) technology can be used for long-term preservation of *Acacia nilotica* and *Acacia tortilis* seeds.

Keywords: PVS2, seed cryopreservation, desiccation, glycerol, vitrification, *Acacia nilotica*, *Acacia tortilis.*