نگهداری بذر اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) در شرایط فراسرد

مریم جبلّی[۱*]، محبت علی نادری شهاب[۲]، علی اشرف جعفری[۳] و فیروزه حاتمی[۴]

[۱] کارشناس پژوهشی گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
[۲] استادیار پژوهش مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
[۳] استاد پژوهش مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
[۴] کارشناس ارشد مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۵)

چکیده

ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد (۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد) روشی جدید و بسیار کارامد برای نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم گونه‌های گیاهی است. با استفاده از روش فراسرد می‌توان بذر، اندام‌های رویشی، سلول و دانهٔ گرده گیاهان را برای بلندمدت نگهداری کرد. در شرایط فراسرد، فعالیت‌های متابولیکی سلول تقریباً متوقف می‌شود و طول مدت نگهداری به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. بذر گونهٔ جنگلی اقاقیا (*Robinia pseudoacacia*) از پارک جنگلی چیتگر جمع‌آوری شد. قبل از ورود بذور به نیتروژن مایع با سه پیش‌تیمار شامل ویتریفیکاسیون با استفاده از PVS2، آبگیری یا Desiccation و گلیسرول ۳۰درصد تیمار و سپس وارد نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد شدند. بذرها پس از یک ماه از نیتروژن مایع خارج و در دمای ۴۲+ درجهٔ سانتی‌گراد به منظور ایجاد شوک حرارتی قرار گرفتند. بذور شست‌وشو داده شد و در شرایط آزمایشگاه درون پتری‌دیش و در شرایط گلخانه درون گلدان کشت شدند. در بررسی‌های آزمایشگاهی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، بنیهٔ بذر، سرعت جوانه‌زنی و نسبت طول ریشه به طول ساقه اندازه‌گیری و تجزیه‌وتحلیل آماری شد. جوانه زنی و رشد بذور فراسردی، نشان‌دهندهٔ مقاومت بذر گونهٔ بررسی‌شده به شرایط فراسرد است. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، گیاهانی که از بذور فراسردی تولید شده بودند به‌خوبی رشد کردند و در مقایسه با گیاهان شاهد علائم سوء یا غیرطبیعی نشان ندادند. در بین پیش‌تیمارها، آبگیری بهترین پیش‌تیمار بود. بنابراین استفاده از روش فراسرد برای ذخیره‌سازی بلندمدت بذور این گونهٔ گیاهی امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی: ذخیره‌سازی در فراسرد، گلیسرول ۳۰ درصد، محلول ویتریفیکاسیون، نیتروژن مایع، *Robinia pseudoacacia*

* نویسندهٔ مسئول شمارهٔ تماس: ۰۲۶۳۶۷۷۰۸۱۰ ایمیل: Jebelly@rifr-ac.ir

مقدمه و هدف

اقاقیا *Robinia pseudoacacia* L. از خانواده Fabaceae (Papilionaceae)، جزء گیاهان معطر و تندرشد و بومی آمریکای شمالی است. این گیاه از بقولات درختی حداکثر به بلندی ۲۵ متر و گستردگی تاج ۱۵ متر مربع می‌رسد که استعداد استقرار و رشد در اکثر مناطق سرد، معتدله و نیمه‌گرم دنیا را دارد (مظفریان، ۱۳۸۳). این گونه در قرن هفدهم میلادی از آمریکا وارد اروپا شد و به‌خوبی در این قاره استقرار یافت. برای مثال در مجارستان نقش بسیار مهمی در مدیریت جنگل‌های دست‌کاشت این کشور دارد، به‌طوری که ۲۳درصد از عرصه‌های جنگلی زیر پوشش این گونه است و ۱۹درصد از چوب مورد نیاز این کشور از این گونه تأمین می‌شود (Rédei *et al.*, 2008). اقاقیا از دیرباز وارد کشور ما شده و در اغلب مناطق سرد و معتدل با اهداف مختلف کشت و مستقر شده است. از این درخت در پارک‌ها، طرح‌های جنگلکاری، بادشکن‌ها برای از فرسایش خاک و تولید چوب استفاده می‌شود. این گونه در مقابل شرایط نامناسب و تنش‌های محیطی مقاومت به نسبت خوبی دارد. اقاقیا اغلب از طریق بذر یا جدا کردن و کاشت ریشه‌جوش‌ها در فصل پاییز، یا قلمه‌های ریشه در فصل زمستان تکثیر می‌شود و به‌واسطهٔ غده‌هایی که در ریشه دارد به کمک ریزوبیوم‌های موجود، توان تثبیت نیتروژن را داشته و موجب تقویت خاک می‌شود (ثابتی، ۱۳۴۴).

در روش فراسرد، اغلب گونه‌های گیاهی را که تکثیر جنسی آنها با موانعی روبه‌روست یا نگهداری بذر آنها در شرایط متعارف امکان‌پذیر نیست، را انتخاب و جوانه انتهایی آنها را در شرایط ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری کرده و در هنگام نیاز نسبت به خروج از فراسرد و تکثیر آنها اقدام می‌کنند. در بعضی از گونه‌ها، بذر و محور جنینی محتوای آب فراوانی دارند و در صورت کاهش آب، جوانه‌زنی و زنده‌مانی آنها دچار مشکل می‌شود. در این نوع بذور، روش و مقدار کاهش رطوبت بذر یا محور جنینی قبل از ورود به نیتروژن مایع بسیار مهم است (Makeen *et al.*, 2005). پس از خروج بذر از نیتروژن مایع، رشد بذر و دستیابی به گیاه کامل نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. بذور ذخیره‌شدهٔ ارکید هیبرید Bratonia در فراسرد، پس از خروج از نیتروژن مایع همانند بذور شاهد رشد کرده و گیاه کامل تولید کردند (Popov *et al.*, 2004). در اغلب موارد، کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به نیتروژن مایع سبب زنده‌مانی بذر می‌شود. در حالی‌که همین کاهش رطوبت ممکن است جوانه‌زنی بعضی از بذور را پس از خروج از نیتروژن مایع کاهش دهد (Thammasiri, 2000). اثر دمای فراسرد بر جوانه زنی بذر روغنی دو گونه از *Brassicaceae* و سه گونه متفاوت از *Compositae* بررسی شد (Gonzãles-Benito and Pérez-Garcia, 2001). جوانه زنی بذرها پس از خروج از ازت مایع اختلاف خاصی با نمونه‌های شاهد نشان ندادند. نتایج این آزمایشات حاکی از امکان نگهداری طیف گسترده‌ای از بذور روغنی گونه‌های مختلف با درصد روغن متفاوت در شرایط فراسرد می‌باشد. نتیجهٔ این آزمون‌ها حکایت از امکان نگهداری دامنهٔ گسترده‌ای از بذرهای روغنی گونه‌های مختلف با درصد روغن متفاوت در شرایط فراسرد دارد.

گونه‌های جنس بید از اهمیت اقتصادی، زیست‌محیطی و تنوع زیستی بسیار زیادی برخوردارند. بذر گونه‌های این جنس بسیار ریزند و زنده‌مانی کوتاهی دارند. نگهداری بذور این جنس حتی در میان‌مدت در شرایط متعارف غیرممکن است. با توجه به این موارد، تنها از طریق فراسرد می‌توان بذور گونه‌های این جنس را به‌مدت طولانی نگهداری کرد (Wood *et al.*, 2003) اثر دمای فراسرد در نگهداری بذر دو رقم هیبرید بید *S. capreola*×*S. rehderiana* و *S. viminalis*×*S. sericans* را بررسی کردند. تأثیرات خشک کردن و دمای ذخیره‌ای بر توانایی زیستی و قدرت بقای بذور هیبرید

هدف این مطالعه بود. بذور تازه برداشت‌شده از نمونه‌های یادشده 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 بذرهای خارج‌شده از نیتروژن مایع، تحت تأثیر درصد رطوبت بذر و رطوبت نسبی محیطی بود که این بذرها قبل از انتقال به نیتروژن مایع در آن نگهداری شده بودند. در ایران تاکنون تحقیق گسترده‌ای در مورد نگهداری بذر درختان و درختچه‌های جنگلی بومی یا در معرض خطر انجام نگرفته است. هدف از این تحقیق، استفاده از تکنیک فراسرد و دستیابی به بهترین تیمار برای نگهداری بذر این گونهٔ جنگلی و تعمیم آن به دیگر بذور گونه‌های بومی در شرایط بحرانی است. در صورتی‌که امکان نگهداری بذر این گونه در شرایط فراسرد فراهم شود، می‌توان بذر آن را به‌مدت طولانی و در مقیاس زمانی صد یا چند هزار سال نگهداری کرد و در صورت بروز هر گونه تهدید یا خطر انقراض، برای بازگشت و احیای دوبارهٔ آن اقدام به‌عمل آورد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۰ در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام گرفت. بذر اقاقیا (*R. pseudoacacia*) از پارک جنگلی چیتگر واقع در کیلومتر ۵ اتوبان تهران- کرج جمع‌آوری شد. به‌منظور دستیابی به بهترین روش سبز کردن و جوانه‌زنی بذرها، ابتدا پوستهٔ بذر *R. pseudoacacia* با سمباده شمارهٔ ۱۰۰ خراشیده شد و کیفیت خراش در زیر بینوکولار بررسی شد. سپس بذور با آب معمولی چند بار شست‌وشوی کامل شد و در شرایط سترون به شیشه‌های حاوی بذر محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵درصد افزوده شد و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از این مرحله بذرها باز هم سه مرتبه با آب سترون شست‌وشو شده و بین کاغذ مرطوب سترون در داخل پتری دیش منتقل و در ژرمیناتور قرار داده شدند تا جوانه‌زنی آنها بررسی شود. در شرایط گلخانه کشت بذور در داخل ماسه و انجام گرفت.

پیش‌تیمارها و نگهداری بذر در شرایط فراسرد

پیش‌تیمارهای فراسرد یا تیمارهای قبل از ورود بذر به نیتروژن مایع شامل ویتریفیکاسیون (PVS2)، آبگیری و گلیسرول ۳۰درصد (30%Glycerol) بودند.

تیمار PVS2: در مرحلهٔ اول به تیوب‌های درب دار ۵۰ میلی لیتری حاوی بذر، محلول لودینگ شامل ۰/۴ مول ساکاروز و ۲ مول گلیسرول (Matsumoto *et al*., 1994) اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای۲۲+ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول لودینگ کاملاً تخلیه شده و به تیوب‌های حاوی بذر، محلول ویتریفیکاسیون یا PVS2 شامل اتیلن گلیکول ۱۵ درصد (w/v)، دی متیل سولفوکساید ۱۵ درصد (w/v)، گلیسرول ۳۰درصد (w/v) و ۰/۴ مول ساکاروز (Sakai *et al*., 1991) اضافه شد، درب آنها بسته شد و ۲۰ دقیقه در آب ۴+ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس تیوب‌های حاوی بذر وارد نیتروژن مایع شدند.

تیمار آبگیری: در تیمار آبگیری، آزمون‌های مقدماتی به‌منظور یافتن حداقل رطوبت بذر بدون وارد آمدن صدمه به جوانه‌زنی آن انجام گرفت. به‌منظور تعیین رطوبت کل بذر، حدود ۱۰ گرم بذر با ترازوی حساس توزین و به‌عنوان وزن اولیهٔ بذر (FW) یادداشت گردید. سپس بذور به‌مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بذرها از آون خارج و بلا فاصله با ترازوی حساس توزین شدند و وزن خشک آنها به‌دست آمد (DW). درصد رطوبت کل بذر *R. pseudoacacia* به مقدار ۳/۹۱ درصد از رابطهٔ زیر به‌دست آمد:

رابطهٔ ۱

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

همچنین ۶۰ گرم بذر تازهٔ گونهٔ *R. pseudoacacia* توزین و به دسیکاتور حاوی ۱۵۰۰

گرم سیلیکاژل منتقل شد و ۷ روز در سردخانه با دمای ۴+ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید. بذور از دسیکاتور خارج و با ترازوی حساس یک‌ده‌هزارم توزین شدند و درصد رطوبتشان پس از رطوبت گیری در دسیکاتور، با استفاده از رابطهٔ بالا 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 نسبت به رطوبت کل بذر محاسبه شد که این کاهش برای *R. pseudoacacia* ۴۹/۵۹ درصد بود. (وزن هزاردانهٔ بذر *R. pseudoacacia* ۱/۷۰ گرم بود).

تیمار گلیسرول ۳۰٪ (30%Glycerol): به تیوب‌های ۵۰ میلی لیتری حاوی بذر، گلیسرول ۳۰درصد اضافه کرده و ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن تیوب‌های حاوی بذر به‌طور مستقیم وارد نیتروژن مایع شدند. مدت زمان نگهداری بذور در نیتروژن مایع یک ماه بوده و بذور شاهد برای استفاده در آزمایش‌ها در دمای ۴+ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس‌تیمارها (تیمارهای پس از خروج بذر از نیتروژن مایع)

بذور پس از خروج از نیتروژن مایع به‌مدت ۲ دقیقه در حمام آب گرم ۴۲+ درجهٔ سانتی‌گراد قرار و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول ساکاروز ۱/۵ مول سترون قرار گرفتند. در شرایط سترون بذور ۴ بار با آب مقطر شست‌وشو داده شده و سپس بین کاغذ مرطوب سترون قرار داده شدند. پتری‌های حاوی بذر به ژرمیناتور با دمای ۲۲+ درجهٔ سانتی‌گراد و دارای شدت نور ۱۰ وات بر متر مربع (مداوم) منتقل شدند. این بذرها در شرایط گلخانه درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسهٔ منطقهٔ بیابانی کشت شدند.

طرح آزمایشی

در اجرای مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، که جداگانه برای هر یک از گونه‌ها انجام گرفت از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل ویتریفیکاسیون، آبگیری و گلیسرول ۳۰ درصد (پیش‌تیمارهای فراسرد) و شاهد بود. در آزمایش‌های آزمایشگاهی 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 بنیهٔ بذر با استفاده از فرمول ارائه‌شده توسط Abdul–Baki و Anderson (۱۹۷۳) محاسبه شد. در آزمایش‌های گلخانه درصد استقرار بذر و تولید نهال‌های جوان اندازه‌گیری شد. تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین‌ها با نرم افزار SAS انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به اثر پیش‌تیمارهای مختلف شامل ویتریفیکاسیون، آبگیری، و گلیسرول ۳۰ درصد در یک ماه نگهداری بذور گونه *R. pseudoacacia* در نیتروژن مایع همراه با بذور شاهد بر صفات مختلف (جدول ۱) ارائه شد. درصد جوانه‌زنی تیمارهای فراسردی و شاهد این گونه از نظر آماری تفاوتی نشان ندادند. جوانه‌زنی این گونه بین ۵۷/۳۳ درصد در تیمار شاهد، ۴۵/۶۷ درصد در تیمار گلیسرول، ۵۰/۳۳٪ در تیمار آبگیری و ۴۱/۶۷ درصد در تیمار PVS2 از نظر آماری تفاوت نداشتند. لیکن، در سایر صفات مانند طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیهٔ بذر (VI) و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه بین بذور شاهد و پیش‌تیمارهای فراسردی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و در کلیهٔ صفات اندازه‌گیری‌شده (به جز طول ریشه‌چه) تیمار شاهد، میانگین بیشتری نشان داد.

در آزمون‌های گلخانه‌ای، اثر پیش‌تیمارهای مختلف و یک ماه ذخیره‌سازی بذور در نیتروژن مایع بر استقرار و تولید نهال در شرایط گلخانه در جدول ۲ ارائه شده است. درصد استقرار و تولید نهال *R. pseudoacacia* در تیمار شاهد ۴۵ درصد با بیشترین مقدار و از بین پیش‌تیمارهای مختلف فراسردی به‌ترتیب تیمار آبگیری، گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون با ۳۶/۶۷درصد، ۳۱/۶۷ درصد و ۳۰ درصد بیشترین درصد استقرار و تولید نهال را نشان دادند.

جدول ۱- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و یک ماه نگهداری بذور *R. pseudoacacia* در نیتروژن مایع بر میانگین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیهٔ بذر و نسبت طول ریشه‌چه/طول ساقه‌چه (R/S)

گونه	پیش‌تیمارهای فراسردی	درصد جوانه‌زنی	طول ریشه (میلیمتر)	طول ساقه (میلیمتر)	طول گیاهچه (میلیمتر)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر	طول ریشه‌چه/طول ساقه‌چه
Robinia pseudoacacia	شاهد	۵۳/۳۳ a	۳۱/۳۳ a	۲۰/۶۷ ab	۵۲/۰۰ a	۱۴/۳۴ a	۲۹/۶۵ a	۱/۵۱ a
	گلیسرول ۳۰٪	۴۵/۶۷ a	۲۳/۶۷ ab	۲۰/۶۷ a	۴۸/۳۳ ab	۱۱/۸۷ ab	۲۲/۰۴ ab	۰/۹۷ b
	آبگیری	۵۰/۳۳ a	۲۸/۰۰ ab	۲۰/۰۰ ab	۴۸/۰۰ ab	۱۳/۷۲ ab	۲۴/۴۹ ab	۱/۴۱ ab
	ویتریفیکاسیون	۴۱/۶۷ a	۱۹/۳۳ b	۱۴/۳۳ b	۳۳/۶۷ b	۹/۳۷ b	۱۴/۳۰ b	۱/۳۸ ab

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

جدول ۲- اثر پیش‌تیمارهای مختلف و یک ماه ذخیره‌سازی بذور *R. pseudoacacia* در نیتروژن مایع بر استقرار و تولید نهال در شرایط گلخانه

گونه	پیش‌تیمارهای فراسردی	میانگین درصد استقرار
Robinia pseudoacacia	شاهد	۴۵ a
	گلیسرول ۳۰ درصد	۳۱/۶۷ b
	آبگیری	۳۶/۶۷ ab
	ویتریفیکاسیون	۳۰ b

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

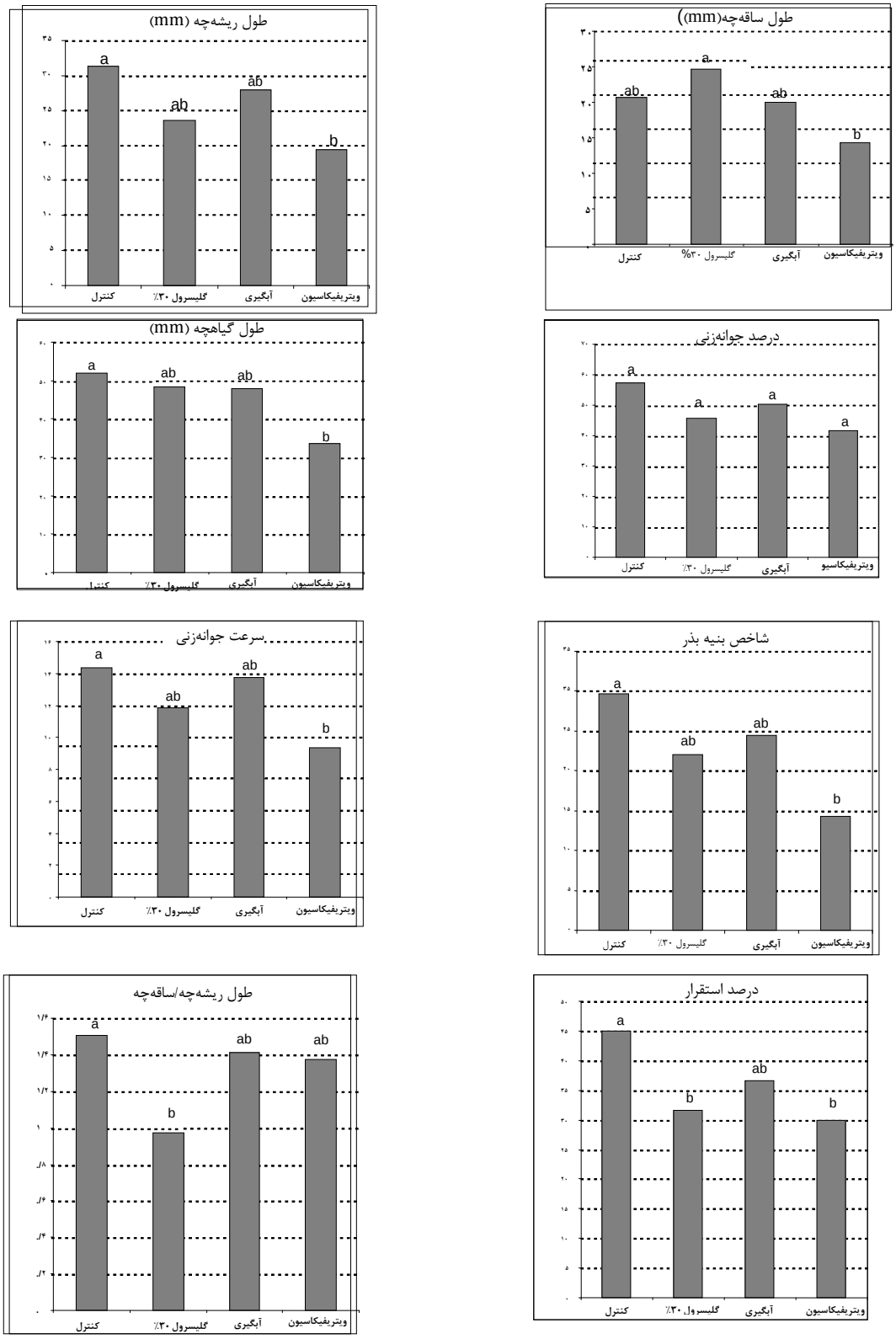
براساس نتایج این آزمایش مشخص شد که تیمار آبگیری[1] نسبت به دیگر تیمارها بر طول گیاهچه، طول ریشه‌چه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر (VI)، و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه اثر مثبتی داشت و سایر تیمارها به جز طول ساقه‌چه که در تیمار گلیسرول بیشتر بود، تأثیر معنی‌داری نداشتند (شکل ۱).

همچنین گیاهچه‌های حاصل از بذرهای فراسردی مربوط به شاهد (شکل ۲ الف) و پیش تیمارهای مختلف (شکل ۲ ب) در گلخانه نشان می‌دهد که این بذرها به‌خوبی در گلخانه استقرار یافته و نهال جوان بدون آثار غیرطبیعی تولید کردند.

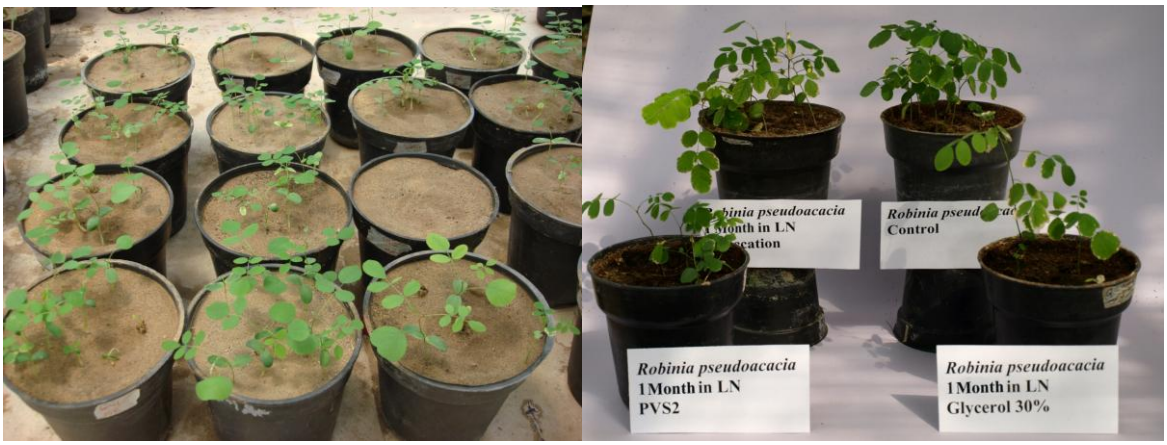
بحث

بذرهای گونهٔ *R. pseudoacacia* 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- درجهٔ سانتی‌گراد می‌توان بذرهای این گونه را جزو بذرهای Orthodox (Roberts and Ellis, 1989; Engelman, 1990) قرار داد. همچنین تفاوت معنی‌داری از نظر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیهٔ بذر (VI) و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه بین بذور شاهد و پیش‌تیمارهای ویتریفیکاسیون (PVS2)، گلیسرول و کاهش رطوبت بذر مشاهده نشد. در تیمار ویتریفیکاسیون آب موجود در نمونه‌ها از حالت مایع وارد یک فاز شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگهداری بافت‌های گیاهی در نیتروژن مایع بدون شکل‌گیری کریستال‌های یخی امکان‌پذیر خواهد بود (Wang *et al*., 2005; Gale *et al*., 2008).

1 Desiccation



شکل ۱- اثر پیش‌تیمارهای مختلف بذر *R. pseudoacacia* در نیتروژن مایع بر میانگین صفات و درصد استقرار و رشد نهال در گلخانه



ب الف

شکل ۲- نمای کلی از استقرار بذر گیاه *R. pseudoacacia* در شرایط گلخانه (الف).
تولید نهال‌های جوان پس از تیمارهای فراسردی (ب)

کاهش فاکتورهای رشدی اندازه‌گیری‌شده در اقاقیا در مقایسه با تیمار شاهد احتمالاً به‌دلیل نازک بودن پوسته بذر این گونه است که نفوذپذیری بیشتری نسبت به مواد پیش‌تیماری و نیتروژن مایع دارند. در زمینهٔ سمیت مواد موجود در PVS2 بعضی از گزارش‌ها نشان می‌دهند که مواد محلول موجود در آن مانند اتیلن گلایکول تأثیر منفی در نگهداری نمونه در فراسرد دارد (Kuleshova *et al.*, 1999). این در حالی است که بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌هایی مانند موز، ارکیده، آناناس (Thinh, 1997)، توت‌فرنگی (Hirai *et al.*, 1998) و سپیدار (Lambardi *et al.*, 2000) اثر مثبت این تیمار گزارش شده است. در مورد پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر یا Desiccation، آزمون‌های انجام شده روی تعدادی از بذرها و نمونه‌های رویشی نشان می‌دهد که در بعضی از گونه‌ها به‌دلیل کاهش محتوای آب بذر یا نمونهٔ گیاهی، نگهداری در شرایط فراسرد نتیجهٔ بهتری نسبت به روش‌های دیگر ارائه می‌دهد (Cho *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2001)، این یافته‌های محققان در اغلب صفات همسو با نتایج تحقیقات حاضر بودند. جمع‌بندی نتایج آزمایشگاهی پیش‌تیمارها نشان داد که با قرار گرفتن بذر اقاقیا در نیتروژن مایع بعضی از صفات تغییر معنی‌داری نشان ندادند و میانگین تعدادی از صفات هم در حد بسیار ناچیز کاهش یافت. بنابراین از بین پیش‌تیمارهای مختلف، تیمار کاهش رطوبت بذر یا Desiccation مناسب‌ترین پیش‌تیمار برای نگهداری بذر اقاقیا در شرایط فراسرد بود. به‌طور کلی، بذر گونهٔ درختی مورد مطالعه که از خانواده Fabaceae است به‌خوبی توان ماندگاری در شرایط فراسرد را دارد و پس از خروج از فراسرد قادر به جوانه‌زنی و استقرار و تولید نهال است. قرارگیری بذر کاهو (Walters *et al.*, 2004) و جوانهٔ انتهایی سیب‌زمینی (Mix-Wagner *et al.*, 2003) در نیتروژن مایع، به‌دلیل کاهش فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی نمونهٔ گیاهی مدت زمان زنده‌مانی به‌شدت افزایش می‌یابد. همچنین از رشد نهال‌های حاصل از بذور فراسردی مربوط به پیش‌تیمارهای مختلف و شاهد و عدم مشاهده هیچ‌گونه علائم نامطلوب می‌توان دریافت که نگهداری بذور گونهٔ *R. pseudoacacia* در شرایط فراسرد تأثیر سوئی در گیاهان حاصل از این بذرها ندارد. بررسی‌های محققان دیگر نیز نشان می‌دهد که قرار گرفتن بذور یا نمونه‌های گیاهی در شرایط فراسرد، در گیاهان تغییرات ژنتیکی ایجاد نمی‌کند (Zhai *et al.*, 2003; Dixit *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2008).

با استفاده از فناوری فراسرد می‌توان علاوه بر بذر،

سایر اندام‌های گیاهی مانند جوانه‌های جانبی یا انتهایی، سلول، دانهٔ گرده و جنین را به‌مدت بسیار طولانی نگهداری کرد. در این صورت حفظ و بقای گونه‌هایی که نگهداری بذر آنها امکان‌پذیر نیست، مانند بذرهای رکالسیترانت یا گونه‌هایی که فقط از طریق کلن تکثیر می‌شوند، ممکن خواهد بود (Pâques *et al*., 2000; Berjak and Pammenter, 2002). بنابراین استفاده از فناوری حفاظت در شرایط فراسرد امکان نگهداری طولانی‌مدت بذر تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در معرض خطر را فراهم می‌کند و حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های ارزشمند جنگلی و مرتعی را موجب می‌شود.

منابع

ثابتی، حبیب الله، ۱۳۴۴. جنگلها، درختان و درختچه های ایران، انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، ۶۲۸ ص.

مظفریان، ولی الله، ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، ۹۹۱ ص.

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

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

Cho, E.G., Y.L. Hor, H.H. Kim, V.R. Rao, and F. Engelmann, 2002. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification soulution, *CryoLetters*, 23(5): 317-324.

Dixit, S., B.B. Mandal, A. Sangeeta, and P.S. Srivastava, 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.

Engelmann, F., 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation casehistory: *Oil Palm* somatic embryos, *International Journal of Refrigeration*, 13(1): 26-30.

Gale, S., A. John, K. Harding, and E. Benson, 2008. Developing Cryopreservation for *Picea stichensis* (sitca spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols, *CryoLetters*, 21: 271-278.

Gonzãlez-Benito M.E., and Pérez-Garcia F. 2001. Cryopreservation of lipid-rich seeds: effect of moisture content and cooling rate on germination, *CryoLetters*, 22(2): 135-140.

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

Kuleshova, L.L., D.R. MacFarlane, A.O. Trounson, and J.M. Shaw, 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., A. Fabbri, and A. Caccavale, 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips, *Plant Cell Reports*, 19: 213-218.

Makeen, A.M., N. M. Noor, S. Dussert, and M.M. Clyde, 2005. Cryopreservation of whole seeds and excised embryonic axes of *Citrus suhuiensis* cv. Limau Langkat in accordance to their desiccation sensitivity, *CryoLetters*, 26(4): 259-268.

Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada, 1994. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant, *Plant Cell Report*, 13: 442-446.

Mix-Wagner, G., H.M. Schumacher, and R.J.Cross, 2003. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen, *CryoLetters*, 24(1): 33-42.

Pâques, M., M. Poissonnier, E. Dumas, and V. Monod, 2000. Cryopreservation of dormant and non-dormant broad-leaved trees, International society for Horticulturae science, *Acta Horticulturae*, 447(60): 491-497.

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

Rédei K., Z. Osváth-Bujtás, and I. Veperdi, 2008. Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improvement in Hungary: a review, *Acta Silvatica. Lignaria Hungarica*, 4: 127-132.

Roberts, E.H., and R.H. Ellis, 1989. Water and seed survival, *Annals of Botany*, 63: 39-52.

Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama, 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: 465-47.

Sánchez, C., M.T. Martinez, N. Vidal, M.C. San–José, S. Valladares, and A.M. Vieitez, 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.

Stewart, P., M. Taylor, and D. Mycock, 2001. The sequence of the preparative procedures affects the success of cryostorage of cassava somatic embryos, *CryoLetters*, 22(1): 35-42.

Thammasiri, K., 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification, *CryoLetters*, 21: 237-244.

Thinh, N.T., 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral papers of Cobe University-Department of Agronomy, Japan.

Walters, C., L. J.Wheeler, and P.C. Stanwood, 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds, *Cryobiology*, 48: 229-244.

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

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

Zhai, Z., Y. Wu, F. Engelmann, R. Chen, and Y. Zhao, 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot – tips using RAPD, *CryoLetters*, 24 (5): 315–322.

Seed cryopreservation of *Robinia pseudoacacia* L.

M. Jebelli[*1], M.A. Naderishahab[2], A.A. Jafari[3], and F. Hatami[4]

[1] M.Sc., Research institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran.
[2] Assistant Prof., Research institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran.
[3] Prof., Research institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran.
[4] M.Sc., Research institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran.

(Received: 1 December 2012, Accepted: 6 July 2014)

Abstract

Cryopreservation by storing explants in liquates nitrogen (LN) at -196°C is a new and most important method of preserving plant species for a long period. Most of seeds, vegetative organs, cells and pollens can be preserved for a long time, by cryopreservation. Cryogenic conditions stop much of the metabolic processes of the cells and, period of preservation dramatically increases. Three pretreatments including vitrification (PVS2), desiccation and 30% glycerol were applied on the seeds of *Robinia pseudoacacia* L. collected from Chitgar Park at west of Tehran, before transferring them into LN. After one month storage in LN the seeds transferred into warm water bath at +42 °C as a postreatment. Then they were germinated under laboratory and greenhouse conditions. Different attributes including seed germination percentage, root and shoot lengths, germination speed, root/shoot length ratio and seed vigor index (VI) were recorded. The attributes were significant at 1% level of probability revealed the cryotolerance of the seeds. In greenhouse experiments, plants developed from cryogenic seeds grew normally and did not show any abnormality compared to those of the control plants and desiccation showed the best effects on survival rate and other attributes of the cryopreserved seeds. The results indicated that the cryopreservation (-196 °C) technology can be used for long-term preservation of the *Robinia pseudoacacia* seeds.

Keywords: Desiccation, Liquid Nitrogen, *Robinia pseudoacacia* L., Vitrification solution, 30% Glycerol.

[*] Corresponding author Tel: +982636770810 Email: Jebelly@rifr-ac.ir