نشریه حفاظت و بهره‌برداری از منابع طبیعی
جلد چهارم، شماره اول، ۱۳۹٤
http://ejang.gau.ac.ir

بررسی امکان نگهداری بذر پسته وحشی خوراکی (*Pistacia vera*) در شرایط فراسرد (Cryopreservation)

*مریم جبلّی[۱]، مسعود طبری کوچکسرایی[۲]، فیروزه حاتمی[۱] و شهین مهرپور[۳]
[۱]کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، [۲]دانشیار، دانشکده منابع‌طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، [۳]استادیار دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۲/۲۵

چکیده

پسته وحشی (*Pistacia vera* L.) از گونه‌های پهن‌برگ جنگلی می‌باشد که در استان‌هایی نظیر خراسان رضوی، خراسان شمالی و شمال‌شرقی گلستان می‌روید. سطح پراکنش محدود، عدم زادآوری و استقرار طبیعی به‌دلیل تخریب کف عرصه‌های رویشگاهی و بهره‌برداری‌های غیراصولی، این‌گونهٔ ارزشمند را در معرض خطر قرار داده بنابراین حفظ و حراست آن دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. جهت بررسی امکان نگهداری بلندمدت بذر این‌گونه در شرایط فراسرد یا برودت ۱۹٦ درجه سانتی‌گراد و مقایسه آن با شرایط نگهداری در سردخانه، بذر این گونه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و امکان زنده‌مانی بذر در شرایط فراسرد بررسی گردید. جهت تعیین بهترین پیش‌تیمار ذخیره‌سازی بذر در فراسرد، سه پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون گیاهی یا Desiccation, PVS2 و 30% Glycerol همراه با شاهد مورد آزمایش قرار گرفت. در آزمایشات مزرعه‌ای بذور تیمارشده به‌مدت یکماه در شرایط فراسرد نگهداری و سپس در مزرعه در شرایط دیم کشت گردیدند. در شرایط آزمایشگاه، بذور تیمارشده یک هفته، یکماه و یکسال در درون ازت مایع نگهداری و پس از خروج، تعدادی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی و استقرار بذر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بذر این‌گونه به‌خوبی قابل نگهداری در شرایط فراسرد و قادر به رشد و استقرار در شرایط مزرعه بوده و

*مسئول مکاتبه: Jebelly@rifr-ac.ir

این گیاهان پس از ٦ سال تولید گل و میوه نمودند. در آزمایشگاه مشخص گردید تفاوت معنی‌داری بین پیش‌تیمارها برای اغلب صفات وجود دارد و بهترین پیش‌تیمار PVS2 می‌باشد. پس، بذر این‌گونه ارزشمند و در حال خطر را می‌توان برای زمان بسیار طولانی در شرایط فراسرد حفظ و در صورت رخداد هرگونه خطر، از این ذخائر جهت احیاء عرصه‌های از بین رفته استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پسته وحشی، حفاظت فراسرد، گونه جنگلی، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی

مقدمه

پسته وحشی یا پسته خوراکی با نام علمی (*Pistacia vera* L.) از خانواده *Anacardiaceae* یا *Terebinthaceae*، جنس *Pistacia* و گونه *vera* (رضایی‌نژاد، ۲۰۰۱) درختی به ارتفاع ۱۰-۳ متر با پوست قهوه‌ای تا خاکستری (نقره‌ای) و برگ‌های خزان‌کننده است (مظفریان، ۲۰۰٤).

پراکنش جهانی *P.vera* منحصر به شمال شرق ایران، شمال افغانستان، ترکمنستان، ازبکستان و تاجیکستان می‌باشد. رویشگاه پسته وحشی در ایران جنگل‌های طبیعی می‌باشند که به‌صورت تنک در خراسان رضوی و شمالی از شمال‌غربی تا جنوب‌شرقی سرخس، چهچهه، خواجه، امند، شورلق و در استان گلستان در حوالی مراوه‌تپه، به‌صورت جنگل‌های تنک و پراکنده دیده می‌شود (ثابتی، ١٩٦٦).

طبق طبقه‌بندی ثاقب طالبی و همکاران (۲۰۰٤) گونه *Pistacia vera* L. جزء گونه‌های درحال انقراض و در گروه ذخایر طبیعی مدیریت یافته قرار می‌گیرد. برداشت مستمر از رویشگاه‌های پسته طی سال‌های اخیر به‌صورت مستقیم از چوب، میوه، محصولات فرعی و بهره‌برداری‌های غیرمستقیم از عرصه‌های رویشگاهی در قالب چرای مفرط، منجربه فرسایش رویشگاه‌ها و عدم تجدید حیات پسته در رویشگاه‌های طبیعی آن گردیده است (رمضانی، ۲۰۰٦).

جهت حفاظت از گونه‌های در معرض خطر راهکارهایی از قبیل ایجاد عرصه‌های جنگلی حفاظت شده، ایجاد باغ‌های گیاهشناسی و ایجاد بانک ژن‌های منابع طبیعی به‌کار گرفته می‌شود (جواچیم و همکاران، ۲۰۰٦). در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیک، استفاده از تکنولوژی فراسرد[1] یا دمای ١٩٦- درجه سانتی‌گراد راهکاری منحصر به‌فرد و تحولی ژرف در حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی از بذر تا اندام‌های گیاهی است (لامباردی و همکاران، ۲۰۰۵). در شرایط فراسرد به‌دلیل کاهش شدید و نزدیک

1- Cryopreservation

به صفر فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک سلول، می‌توان بسیاری از بذور، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را برای بسیار طولانی مدت نگهداری کرد (اوزکاواکا واردملی، ۲۰۰۲).

تا به‌حال از روش حفاظت فراسرد برای نگهداری تعداد زیادی از گونه‌ها و واریته‌های گیاهی استفاده شده و روش‌های مختلفی نظیر انجماد ساده، ویتریفیکاسیون توسط ونگ و همکاران (۲۰۰۵) همچنین ماتسوموتو و همکاران (۲۰۰۱) و کاهش رطوبت- کپسوله کردن توسط پانچیندداوان و همکاران (۱۹۹۷) به‌کار گرفته شده است.

پیتال و همکاران (۱۹۹۸)، در مطالعه اثرات ذخیره‌سازی بذور ۷ گونه کاج اسپانیایی در ازت مایع به‌این نتیجه رسیدند که در بیشتر این‌گونه‌ها تفاوت معنی‌داری در جوانه‌زنی بذور قبل و بعد از حفاظت در فراسرد وجود ندارد. در بررسی دیگری اثرات برودت فراسرد بر روی بذور ۷ گونه وحشی از جنس چلیپائیان (*Brassica*) بررسی گردید. درصد جوانه‌زنی بذور پس از یک و ۳۰ روز ذخیره‌سازی در ازت مایع، تفاوت معنی‌داری با بذور شاهد نشان ندادند (پرزگارسیا و همکاران، ۱۹۹٦).

روش‌هایی که برای ذخیره بذر و نمونه‌های گیاهی به‌کار می‌رود استفاده از روش ویتریفیکاسیون[1] با استفاده از محلول PVS2 (اسچونویس و همکاران، ۲۰۰۵)، کاهش رطوبت/ کپسوله‌کردن، ویتریفیکاسیون/ کپسوله‌کردن می‌باشد. روش دیگری که در ذخیره‌سازی بذر و اندام‌های گیاهی در ازت گزارش گردیده کاهش درصد رطوبت بذر و نمونه گیاهی است که بسته به نوع گونه گیاهی و نمونه متفاوت می‌باشد. به‌طور کلی کاهش درصد محتوای رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع تأثیر مثبت در زنده‌مانی بذور در شرایط فراسرد دارد (استن‌وود، ۱۹۸۵)، (وود و همکاران، ۲۰۰۳) (باهت و همکاران، ۱۹۹٤). اوزدن‌توکاتلی و همکاران (۲۰۰۷) نیز جهت نگهداری بذور سه گونه پسته شامل *P.vera* اهلی (باغی)، *P.terebinthus* و *P.lentiscus* در فراسرد از پروتکل‌های کاهش رطوبت بذر و انجماد یک مرحله‌ای استفاده کردند. درصد زنده‌مانی گونه‌های *P.vera*، *P.terebinthus* و *P.lentiscus* به‌ترتیب در حالت عادی ۱۰۰، ۱۷ و ۸۱ درصد بود و پس از فراسرد حداکثر زنده‌مانی گونه‌های یاد شده به‌ترتیب به ۹۰، ١٦ و ٤٧ کاهش یافت. از آن‌جایی که نگهداری بذر گونه‌های گیاهی در سردخانه برای مدت زمان طولانی میسر نیست، مطالعه صورت گرفته نشان داد که با به‌کارگیری تکنولوژی فراسرد و استفاده از پیش‌تیمارهای مناسب، بذر این‌گونه ارزشمند و در حال خطر را می‌توان

1- Vitrification

برای زمان بسیار طولانی حفظ و در صورت رخداد هر گونه خطر انقراض، به‌عنوان ذخایر ژنتیکی جهت احیاء عرصه‌های از بین رفته استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های آزمایشگاهی: بذر پسته وحشی (*Pistacia vera* L.) از استان خراسان رضوی، شهرستان تربت‌جام بخش صالح‌آباد نیقلعه، باغ کشمیر جمع‌آوری گردید. نخست بذور آلوده و بذور با پوسته آندوکارپ باز شده (خندان) جدا و حذف گردید. سپس بذور سالم و دهان بسته با دقت شکسته و مغز پسته‌ها از پوسته آندوکارپ خارج گردید. قبل از قرارگیری بذور در ازت مایع یا دمای ۹۶۱- درجه سانتی‌گراد از پیش‌تیمارهای زیر استفاده شد:

تیمار گلیسرول ۳۰ درصد[1]، محلول گلیسرول ۳۰ درصد با اضافه کردن آب مقطرخالص به گلیسرول تهیه شد. نمونه بذور به لوله‌های آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری درب دار منتقل و به آن‌ها محلول گلیسرول ۳۰ درصد اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس بلافاصله وارد ازت مایع گردیدند.

تیمار ویتریفیکاسیون[2]، در این تیمار از ۲ محلول PVS2 و لودینگ به‌عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 شامل ساکاروز ۰/٤ مولار، گلیسرول ۳۰ درصد، اتیلن گلیکول ۱۵ درصد و DMSO ۱۵ درصد (اسکای و همکاران، ۱۹۹۰) و محلول Loading شامل گلیسرول ۲ مولار و ساکاروز ۰/٤ مولار بود (ساکای و انگلمن، ۲۰۰۷) (نیشیمازا و همکاران، ۱۹۹۳). بذور داخل لوله‌های آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری درب دار منتقل و به آن‌ها محلول لودینگ اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۲۰ دقیقه محلول را تخلیه و به فالکون‌های حاوی بذر محلول PVS2 سرد اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای ٤+ درجه سانتی‌گراد (آب و یخ) قرار گرفتند، سپس درب لوله‌ها بسته و وارد ازت مایع گردیدند.

تیمار کاهش رطوبت بذر[3]، در این تیمار ابتدا وزن اولیه بذر با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ اندازه‌گیری شده و سپس بذور به‌مدت ۷۲ ساعت در آون ۷۲+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اختلاف وزن قبل

1- 30% Glycerol
2- PVS2
3- Desiccation

و بعد از آون درصد رطوبت را مشخص نمود (٣/٢١ درصد). رطوبت کل بذر معادل ١٠٠ درصد در نظر گرفته شد. در تیمار کاهش رطوبت بذر مقدار رطوبت کاهش‌یافته از طریق قرار دادن بذور به مدت یک‌هفته در دسیکاتور تعیین شد. برای این کار نخست وزن بذور با ترازوی حساس ٠/٠٠٠١ گرم محاسبه گردید. بذور پس از توزین، به دسیکاتور حاوی سیلیکاژل منتقل شده و سپس هوای داخل دسیکاتور تخلیه گردید. دسیکاتور به‌مدت یک‌هفته در سردخانه با دمای ٤+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یک‌هفته، بذور از دسیکاتور خارج و مجدداً توزین گردید. مقدار رطوبت کاهش یافته معادل ١/٥٣ درصد بود. مقدار رطوبت کاهش یافته در دسیکاتور نسبت به کل رطوبت بذر محاسبه و درصد آن که همان درصد کاهش رطوبت بذر در تیمار رطوبت بذر بود محاسبه گردید. (درصد کاهش رطوبت معادل ٥٢/٣٤ درصد=٤٧/٦٤ درصد- ١٠٠ درصد بود). بذور پس از خروج از دسیکاتور به لوله‌های درب دار ٥٠ میلی‌لیتری منتقل، درب آن‌ها بسته و وارد ازت مایع گردیدند. نمونه بذور به‌مدت یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال در ازت مایع با برودت ١٩٦- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت مقایسه تیمارهای ازت مایع از تیمار شاهد نیز استفاده گردید. بذور شاهد به فالکون‌های ٥٠ میلی‌لیتری منتقل و در سردخانه نگهداری گردیدند. پس از سپری شدن تیمارهای زمانی، بذور از ازت مایع خارج و همراه بذور شاهد به‌مدت ٢ دقیقه در آب ٤٢+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (انگلمن، ١٩٩٠). بذور پس از دریافت شوک حرارتی، به شیشه‌های دردار ٢٥٠ میلی‌لیتری منتقل، در داخل هود لامینارفلو ٣ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. آب نمونه‌ها تخلیه و به هر شیشه محلول هیپوکلریت سدیم ٢٠ درصد اضافه و پس از ١٥ دقیقه این محلول تخلیه و نمونه‌ها ٢ بار با آب استریل شسته شدند. آب شیشه‌ها تخلیه و مقدار ٢٠٠ میلی‌لیتر ساکاروز ١/٢ مولار استریل اضافه گردید (ماتسوموتو و همکاران، ٢٠٠١)، پس از ٢٠ دقیقه محلول ساکاروز تخلیه و نمونه‌ها ٢ بار با آب استریل شسته شدند. آب تخلیه و نمونه‌ها بر روی کاغذ استریل قرار داده شدند. پس از آبگیری، نمونه‌ها به شیشه‌های درب‌دار ٢٥٠ میلی‌لیتری حاوی ٥٠ میلی‌لیتر آگار ٠/٨ درصد استریل منتقل و در ژرمیناتور با دمای ٢٥+ درجه سانتی‌گراد و با تناوب نوری ٨/١٦ ساعت نگهداری شدند. پس از ١٣ روز درصد جوانه‌زنی از طریق شمارش بذور جوانه‌زده مشخص و پس از ٢٠ روز طول ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری گردید. با مشخص‌شدن درصد جوانه‌زنی و میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، شاخص بنیه بذر به روش عبدالباقی و آندرسون (١٩٧٣) محاسبه گردید.

طرح آماری: آزمایش در قالب طرح فاکتوریل به‌کار گرفته شد. تیمارهای قبل از فراسرد شامل کاهش رطوبت یا ویتریفیکاسیون یا PVS2، گلیسرول ۳۰ درصد و شاهد به‌عنوان تیمارهای اصلی در ۳ تکرار و در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و زمان‌های ذخیره‌سازی یک‌هفته، یکماه و یکسال به‌عنوان تیمارهای فرعی در نظر گرفته شد. داده‌های به‌دست آمده از درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، ریشه‌چه، گیاهچه، نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری قرار گردید.

بررسی‌های مزرعه‌ای: آزمایشات مزرعه‌ای قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی و در سال ۱۳۸۳ شروع گردید. در این آزمایشات بذور پسته پس از اعمال پیش تیمارهای یاد شده و یکماه ماندگاری در ازت مایع، در اواخر آذر ۱۳۸۳ در عرصه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع به‌صورت ردیفی کشت شدند. فاصلهٔ تقریبی ردیف‌ها ۲ متر و فاصلهٔ کپه‌ها (در هر کپه ۵ عدد بذر) در روی ردیف‌ها ۵۰ سانتی‌متر بود. کشت بذور به‌صورت دیم انجام شد.

نتایج

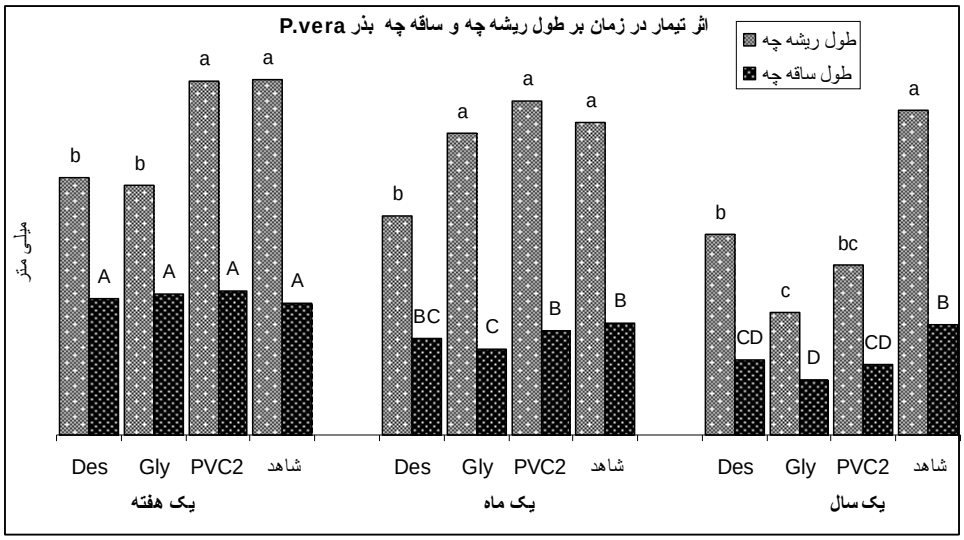
بررسی‌های آزمایشگاهی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها که حاصل تأثیر تیمارها و زمان‌ها و اثرات متقابل آن‌ها می‌باشد در جدول ۱ ارائه شده است. براین‌اساس بین تیمار شاهد و تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد، Desiccation و PVS2 در صفت جوانه‌زنی بذور پسته تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد دیده می‌شود. طول ساقه‌چه و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نشان نداد. در صفت رشد ریشه‌چه، گیاهچه و شاخص بنیه بذر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود دارد که نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تیمارهای محافظت‌کننده در صفات یاد شده است. در ردیف سوم جدول ۱ تأثیر زمان‌ها بیانگر وجود تفاوت‌های معنی‌دار در مدت زمان‌های یک‌هفته، یکماه و یکسال نگهداری نمونه بذور پسته وحشی در ازت مایع بود. در رشد ساقه‌چه، ریشه‌چه، گیاهچه و شاخص بنیه بذر تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین زمان‌های نگهداری نشان داد که زمان نگهداری بذور پسته در شرایط فراسرد اثر کمی در صفات یاد شده دارد. در صفت نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه تفاوت معنی‌دار ۵ درصد بین مدت زمان‌های نگهداری در ازت مایع دیده می‌شود.

جدول ١- تجزیه واریانس و سطح معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمارها، زمان‌ها و اثر متقابل آن‌ها بر نگهداری بذور پسته در ازت مایع.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه (mm)	طول ریشه‌چه (mm)	طول گیاهچه (mm)	طول ریشه‌چه/ طول ساقه‌چه (mm)	بنیه بذر (vigor)
پیش تیمار	٣	٢٤٧/٢٨**	٩٣/٥٣^{ns}	٣٢٧٧/٧٧**	٤٤٠٣/٩٤**	١/٠٢ ^{ns}	٣٠٢٠/٥٦**
زمان‌نگهداری	٢	١٣٧/٢٠^{ns}	١١٧٦/٤٩**	٢٧٣٠/٥٤**	٦٩٣٥/٤٧**	١/٧٤*	٣١٦٢/٩٧**
اثر متقابل پیش‌تیمار* زمان	١١	٩٧/٥٣^{ns}	٢٧٤/٠٠**	٢٠٧٣/١٩**	٣٣٦٧/٥٤**	١/٠٨*	١٧٢٥/٣٤**
خطا	٢٤	٤٥/٤٣	٥٩/٥٤	٤٧٣/٤٧	٧٢٧/٦٨	٠/٤٠	٢٩٥/٩٤
ضریب‌تغییرات (CV%)		١٢/٤٧	٢٢/٦٨	٢٤/٨٠	٢٢/١٥	٢٣/٨٦	٢٥/٦١

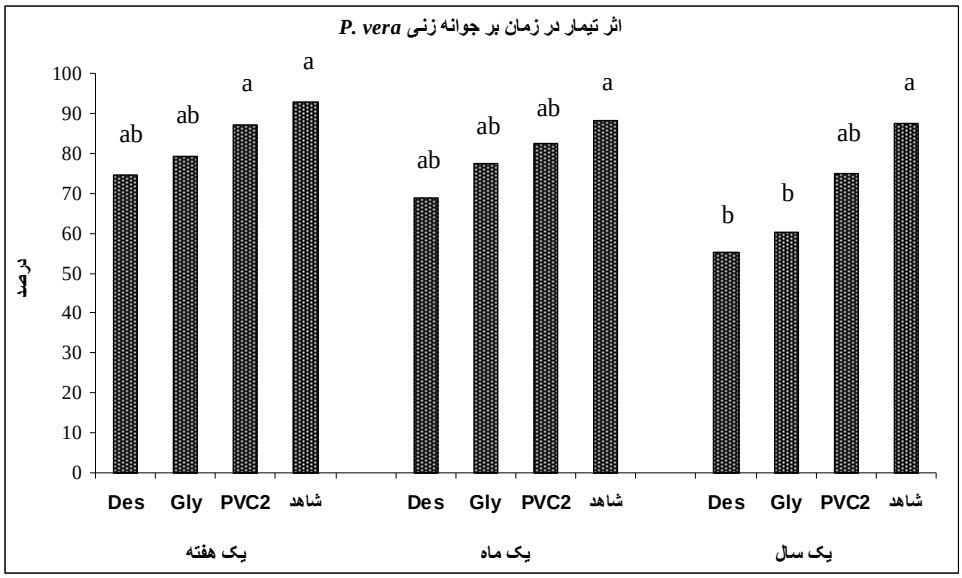
*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ٥ درصد، ١ درصد و معنی‌دار نیستند.

در شکل ١ اثر متقابل تیمارهای گلیسرول ٣٠ درصد، ویتریفیکاسیون، کاهش رطوبت بذر در مدت زمان‌های یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال نگهداری در ازت مایع و مقایسه با تیمار شاهد نشان داده شده است. طول ساقه‌چه و گیاهچه در تیمار گلیسرول ٣٠ درصد و یکسال نگهداری در ازت مایع ١٧/٩٢ و در تیمار PVS2 در یک هفته ماندگاری در ازت مایع ٥٧/٤٩ میلی‌متر بود (شکل ١-الف). در صفت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری در شرایط فراسرد وجود دارد (شکل ٣-ب). طول ریشه‌چه و شاخص بنیه بذر نیز در تیمار گلیسرول ٣٠ درصد در یکسال نگهداری شده در ازت مایع به‌ترتیب با ٣٩/٥٦ و ٢٨/٤٠ میلی‌متر از کمترین و در تیمار شاهد و یک‌هفته نگهداری شده در ازت مایع با ١١٤/٩٢ و ١١٨/٦٠ میلی‌متر از بیشترین مقادیر برخوردار می‌باشند (شکل ١-الف).



الف

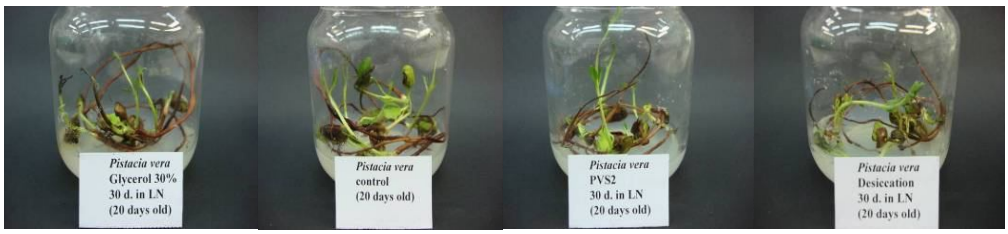
حروف کوچک مقایسه اثر متقابل تیمار در زمان برای طول ریشه‌چه و حروف بزرگ برای مقایسه اثرات متقابل طول ساقچه.



ب

شکل ۱- بررسی اثر تیمارها در زمان‌های آزمایش، طول ساقه‌چه، ریشه‌چه و گیاهچه (الف) و درصد جوانه‌زنی (ب).

بررسی‌های مزرعه‌ای: با توجه به این‌که این‌گونه اساساً وحشی بوده و زراعت نیز به‌صورت دیم انجام شد، استقرار گونه‌ها کم و به‌صورت پراکنده بود. لذا نتایج به‌صورت مشاهده‌ای انجام شد. بر اساس نتایج، بذور فراسردی که جوانه‌زده و مستقر گردیدند به‌خوبی رشد کرده و پس از ٦ سال (در فروردین ١٣٨٩) گلدهی مشاهده و در پایه‌های ماده میوه تشکیل گردید. میوه‌ها در اواسط شهریور ١٣٨٩ به مرحلهٔ رسیدگی رسیدند (شکل ٢ و ٣).



شکل ٢- رشد بذور پسته در تیمارهای مختلف فراسرد همراه با شاهد در مدت زمان یکماه ذخیره‌سازی در ازت مایع.

شکل ٣- رشد بذور پسته پس از یکماه ذخیره‌سازی در ازت مایع (تیمار ویتریفیکاسیون) در شرایط مزرعه. کشت بذر در اواخر آذر ١٣٨٣، گلدهی در فروردین ١٣٨٩ و رسیدگی میوه در اواسط شهریور ١٣٨٩.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی‌های آزمایشگاهی نگهداری بذور پسته در شرایط ازت مایع یا برودت ١٩٦- درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌هفته، یک‌ماه و یکسال نشان داد که بذر پسته به‌عنوان بذر روغنی، بدون این‌که دچار اثرات سویی شود سرمای فراسرد را به‌خوبی تحمل کرده و پس از خروج از ازت مایع قادر به جوانه‌زنی (٤٨/٤٨ درصد) است، درصد جوانه‌زنی این‌گونه تغییر معنی‌داری را در مقایسه با بذور شاهد نشان نمی‌دهند و به‌خوبی تولید ریشه‌چه و ساقه‌چه می‌نمایند. با توجه به رطوبت پائین بذر

(۳/۲۱ درصد) و امکان زنده‌مانی در برودت ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد، بذر این‌گونه جزء بذور ارتدوکس می‌باشد (ربرتس، ۱۹۷۳ و گنزالس بنیتو، ۱۹۹۵).

در مطالعه صورت گرفته بر روی زنده‌مانی و درصد جوانه‌زنی *P.vera* در ازت مایع در بین تیمارهای مختلف فرا سردی و همچنین تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد دیده می‌شود. تیمار شاهد با ۸۹/۲۳ و تیمار ویتریفیکاسیون با ٦٦/۱۳ درصد به‌ترتیب از بیشترین و کمترین مقادیر درصد جوانه‌زنی بین سایر تیمارها برخوردارند. این در حالی است که بذور فراسردی در میان مدت زمان‌های یک‌هفته، یکماه و یکسال نگهداری در ازت مایع تفاوتی وجود ندارد و در اثر متقابل بین تیمارها و زمان‌ها نیز تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود.

در میان تیمارهای نگهداری بذور *P.vera* در ازت مایع، در بیشتر صفات مورد بررسی در بحث جوانه‌زنی، تفاوت محسوسی بین تیمارهای PVS2 و شاهد دیده نمی‌شود. در کلیه صفات مورد بررسی و در مقایسه تیمارها، در ابتدا تیمار شاهد از بیشترین مقدار و پس از آن تیمار PVS2 در درجه دوم قرار دارد. در بررسی میانگین اثرات متقابل زمان‌های ذخیره‌سازی بذر در فراسرد و پیش‌تیمارهای مختلف بر طول ساقه‌چه و طول گیاهچه مشاهده می‌گردد پیش تیمار PVS2 به‌ویژه در یک هفته ذخیره‌سازی در فراسرد نتیجه بسیار خوبی در مقایسه با سایر پیش تیمارها نشان می‌دهد. در واقع تیمار PVS2 به‌دلیل ایجاد حالت شیشه‌ای و جلوگیری از شکل‌گیری کریستال‌های یخ درون سلولی که برای سلول کشنده است، شرایط امنی را برای زنده‌مانی سلول فراهم آورده است (ولک و همکاران، ۲۰۰٦). با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز تیمار PVS2، می‌توان به‌کارگیری این تکنیک را جهت نگهداری بذور پسته در فراسرد توصیه نمود. در همین رابطه رید و یوو (۱۹۹۵) اظهار داشتند که مقاومت به سرما و زنده‌مانی ژرم‌پلاسم گیاهی را می‌توان با استفاده از تیمارهای با غلظت بالای ساکاروز (مانند PVS2) قبل از ورود به ازت مایع افزایش داد. غلظت بالای ساکاروز در محلول PVS2 به‌عنوان محلول پیش‌تیمار، محتوای آب نمونه‌ها را کاهش داده و آن‌ها را برای ورود به ازت مایع آماده می‌کنند و از وارد آمدن آسیب به غشا پلاسمایی در طی فرایند انجماد جلوگیری می‌نماید (ولف و بریانت، ۱۹۹۹ و چنگ، ۲۰۰۱). وجود غلظت‌های بالای ساکاروز در پیش‌تیمارها در افزایش رشد سلول‌ها پس از خروج از ازت مایع توسط چنگ و رید (۲۰۰۰) گزارش شد. ولک (۲۰۰۰) نیز جهت حفاظت فراسرد نعناع و سیر از پروتوکل‌های ویتریفیکاسیون استفاده نمود. گزارشات بسیاری مبنی‌بر اثرات کاربردی محلول بارگیری (Loading) در افزایش تحمل استرس اسمزی ناشی از محلول ویتریفیکاسیون وجود

دارد که در مورد گونه‌های موز، ارکیده، آناناس (تین، ۱۹۹۷)، توت فرنگی (هیرای و همکاران، ۱۹۹۸) و سپیدار (لامباردی و همکاران، ۲۰۰۰) به اثبات رسیده است.

اثر کاهش رطوبت بذر یا Desiccation بر زنده‌مانی و یا افزایش زنده‌مانی بذور پس از خروج از شرایط فراسرد (Recovery) در تعدادی از گونه‌ها دارای اثر مثبت و در تعدادی دارای اثر منفی می‌باشد. کاهش رطوبت بذر یا Desiccation فرایندی است که طی آن محتوای آب بین سلولی کاهش و در نتیجه اثرات مخرب تشکیل کریستال‌های یخی در مرحله انجماد بذور و اندام‌های گیاهی کم شده و زنده‌مانی و یا افزایش درصد زنده‌مانی بذور پس از مرحله فراسرد را موجب می‌گردد (بت و همکاران، ۲۰۰۵، لویی و همکاران، ۲۰۰۳). در مورد بذور ***P.vera*** و در مقایسه میانگین تیمارها در صفات درصد جوانه‌زنی، نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه و بنیه بذر تأثیر کم تیمار کاهش رطوبت دیده می‌شود. در رابطه با اثر متقابل بین تیمارها و زمان‌های ذخیره‌سازی بذر در فراسرد، صفت درصد جوانه‌زنی بذور ***P.vera*** در یکسال ذخیره‌سازی بذر در ازت مایع، تیمار کاهش رطوبت کمترین جوانه‌زنی را داشته است. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش با نتایج ارائه شده توسط ونگ و همکاران (١٩٩٤) منطبق می‌باشد. این درحالی است که در مورد بسیاری از گونه‌ها مانند ***Zizania texana***، ***Najas flexiti*** و ***Licopersicum*** تأثیر مثبت این تیمار دیده شده است (والترز و همکاران، ۲۰۰۲، های و همکاران، ۲۰۰۰ و هیرای و ساکای، ۱۹۹۹). تفاوت در نتایج به‌دست آمده احتمالا به‌دلیل پاسخ متفاوت گونه‌ها به کاهش رطوبت قبل از ورود به ازت مایع می‌باشد.

میانگین صفات طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و طول گیاهچه در تیمار گلیسرول ۳۰ درصد نیز در مقایسه با PVS2 کم می‌باشد. همچنین در مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار و زمان ذخیره‌سازی نیز در صفات طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه و بنیه بذر که به‌مدت یکسال در ازت مایع نگهداری شده‌اند، نیز اثر کم گلیسرول ۳۰ درصد دیده می‌شود. اثر کم پیش‌تیمارهای گلیسرول ۳۰ درصد و ویتریفیکاسیون در مقایسه با PVS2 مشاهده می‌شود. نتایج مثبت PVS2 در نگهداری بذر در شرایط فراسرد نشان می‌دهد که به‌کارگیری این تیمار در نگهداری بذر این‌گونه در شرایط فراسرد بهترین تأثیر را دارد. نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی مزرعه‌ای بررسی‌های مزرعه‌ای نشان داد که بذور پستهٔ وحشی پس از خروج از شرایط فراسرد قادر به رشد و استقرار و در شرایط طبیعی بوده و نهال‌های فراسردی پس از رشد رویشی به‌طور طبیعی و بدون هیچ‌گونه اثر سوئی وارد مرحلهٔ زایشی

شده و با تولید گل و میوه تمام مراحل رشدی را سپری می‌نمایند. در بررسی نسبت پایه‌های نر و ماده مشخص شد حدود ۳۰ درصد از پایه های فراسردی نر و حدود ۷۰ درصد پایه‌های ماده هستند.

با توجه به این‌که بذور پسته (*P.vera*) پس از خروج از ازت مایع به راحتی قادر به جوانه‌زنی بوده و برای سبزشدن نیازی به تیمار سرما و سایر مواد شیمیایی ندارند، لذا ذخیره‌سازی ژرم‌پلاسم این گونه در فراسرد دارای مزایای زیادی می‌باشد (بخیت و همکاران، ۲۰۰۷). بذور پسته به واسطه روغنی بودن به شدت فسادپذیر می‌باشند و نگهداری آن‌ها در شرایط عادی و برای طولانی مدت امکان‌پذیر نیست. با استفاده از روش فراسرد می‌توان بذر این‌گونهٔ ارزشمند و در حال خطر را از عرصه‌های رویشگاهی آن جمع‌آوری و در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد برای طولانی مدت نگهداری نمود. به‌دلیل تقلیل فعالیت متابولیکی بذر در شرایط فراسرد تا نزدیک صفر، زنده‌مانی بذر یا اندام گیاهی برای طولانی مدت امکان‌پذیر است (اوزکاوک و اردملی، ۲۰۰۲). به‌طور کلی می‌توان با استفاده از این تکنولوژی[1] اضافه بر بذر سایر اندام‌های گیاهی مانند جوانه‌های جانبی یا انتهایی، سلول، دانه گرده و جنین را برای مدت زمان بسیار طولانی نگهداری نمود که در این صورت امکان حفظ و بقای گونه‌هایی که از طریق کلون تکثیر می‌شوند و یا مشکل سبزشدن بذر آن‌ها وجود دارد فراهم خواهد شد (پاکواس و همکاران، ۲۰۰۰). در مورد دسته دیگری از بذور که شامل ریکالسیترانت‌ها می‌باشند و نگهداری آن‌ها در شرایط معمولی و فراسرد وجود ندارد، می‌توان نسبت به نگهداری جنین و یا محور جنینی آن‌ها در شرایط فراسرد اقدام نمود (برجاک و پامنتر، ۲۰۰۲) در واقع استفاده از این تکنیک می‌تواند محدودیت مشکل نگهداری آن‌ها در فراسرد را از میان بردارد.

رهیافت‌های ترویجی

استفاده از تکنولوژی حفاظت فراسرد جهت نگهداری طولانی‌مدت بذر تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در حال خطر حفاظت از ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری از انقراض گونه‌های ارزشمند منابع طبیعی از جمله پسته وحشی *Pistacia vera* L. به‌کارگیری توصیه‌های فنی این پژوهش برای جمع‌آوری بذر، اعمال پیش تیمار PVS2، نگهداری و نحوه خروج از ازت مایع، روش‌های رویاندن بذر در آزمایشگاه و کشت آن در مزرعه تا تولید نهال بالغ.

1- Cryopreservation

منابع

1.Abdul-baki, A.A., and Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiplication. Crop Science, 3: 630-633.

2.Bekheet, S.A., Taha, H.S., Saker, M.M., and Solliman, M.E. 2007. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. Journal of Applied Science Research, 3(9): 859-866.

3.Berjak, P., and Pammenter, N.W. 2002. Orthodox and recalcitrant seeds. Plant Cell Biology Research Unit, School of Life Sciences University of Natal, Durban, South Africa, 12p.

4.Bhat, S.N., Sharma, A., and Bhat, S.V. 2005. Vitrification and glass transition of water: insights from spin probe ESR. Physical Review Letters, 95(23): 1-13.

5.Bhat, S.R., Bhat, K.H., and Chandel, K.P.S. 1994. Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. Seed Science and Technology, 22(3): 637-640.

6.Chang, Y., and Reed, B.M. 2000. Extended alternating- temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. Cryobiology, 40: 311-322.

7.Chang, Y. 2001. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. Horti Sccience, 36: 1329-1333.

8.Engelman, F. 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation-case history: *Oil palm* somatic embryos. Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology, Bogor, Indonesia,12p.

9.Gonzalés-Benito, M.E., Iriondo, J.M., Pita, J.M., and Perez-Garcia, F. 1995. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. Annals of Botany, 75: 1-4.

10.Hay, F.R., and Muir, J.S.K. 2000. Low temperature survival of slender Naiad (*Najas flexilis*) seeds. CryoLetters, 21(5): 271-278.

11.Hirai, D., and Sakai, A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-verification. Potato Research, 42: 153–160.

12.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.

13.Joachim, K.E.R., Senula, A., Leunufna, S., and Grube, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation- tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. International Journal of Refrigeration, 29: 411–417.

14.Lambardi, M., and DeCarlo, A. 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain, S.M., and Ishii, K. (EDs). Micro propagation of woody trees and fruts. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 815-840.

15.Lambardi, M., Benelli, C., and DeCarlo, A. 2005. Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: Development of the technology at the CNR/INVALSA Institute of Florence. The Role of Biotechnology, 181-182.
16.Lambardi, M., Fabbri, A., and Caccavale, A. 2000. Cryopreservation of White poplar (*Populus alba L.*) by verification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports, 19: 213-218.
17.Liu, H., Yu, H., Dai, J., Gong, Q., Yang, K., and Lu. 2003. Cryopreservation of protoplasts of the alga (*Porphyra yezoensis)* by verification. Plant Science, 166(1): 97-102.
18.Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H., and Sakai, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by vitrifiation of dormant shoot tips. Plant Cell Reports, 20: 398-402.
19.Mozafarian, V. 2004. Trees and shrubs of Iran. Farhang Moaser Publicaion, 1003p. (In Persian)
20.Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., and Matuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science, 88: 67–73.
21.Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E.A., Gumusel, F., and Lambardi, M. 2007. Cryopreservation of Pistacia spp. Seeds by dehydration and one-step freezing. Cryo Letters, 28(2): 83-94.
22.Ozkavukcu, S., and Erdemli, E. 2002. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara Medical School, 24(4): 187-196.
23.Paques, M., Poissonnier, M., Dumas, E., and Monod, V. 2000. Cryopreservation of dormant and non dormant broad-leaved trees. ISHS Acta Horticulture, 447p.
24.Perez-Garcia, F., Gonzalez-Benito, M.E., Perez, C., and Gomez-Campo, C. 1996. Effect of cryopreservation on Brassica seeds germination. ISHS Acta Horticulture, 407p.
25.Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A., and Miyamoto, K. 1997. Cryopreservation of encapsulated shoot primordial induced in Horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. Plant Cell Reports, 16(7): 469-473.
26.Pital, J.M., Sane, V., and Escudero, A. 1998. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. Silvae Genetica, 47: 220-223.
27.Ramezani, M. 2006. The study of influencing factors on wild *pistacia* sp. distribution in Khorasan province. Final report. Research Institute of Forests and Renglands, 8p. (In Persian)
28.Reed, B.M., and Yu, X. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown gooseberry and current meristems. Cryoletters, 16: 131-136.
29.Rezaei Nejad, A. 2001. Full culture: Biology Botany Entomology. Carang publisher. 678p. (In Persian)

30.Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Sci.Technol. 1: 499-514.
31.Sageb Talebi, Kh., Sajedi, T., and Yazdian, F. 2004. Forests of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. 27p. (In Persian)
32.Sakai, A., and Engelmann, F. 2007. Verification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. Cryo Letters, 28: 151-172.
33.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): 201-12.
34.Stanwood, P.C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In K.K. Kartha (ed), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton, Florida, 199-226.
35.Sabeti, H. (1966). Forests Trees and Shrubs of Iran, Tehran. 430p. (In Persian)
36.Thinh, N.T. 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetative propagated Tropical Monocots by verification. Doctoral papers of Cobe University-Department of Agronomy, Japan, 98p.
37.Volk, G. 2000. Structural assessment of damage induced during mint cryopreservation, Abstr. Plant Biotechnol. Mol Biol Symp, Colorado State University, 19p
38.Volk, G.M., Harris, J.L., and Rotindo, K.E. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. Cryobiology, 52: 305-308.
40.Wang, H., Littrup, P.J., Duan, Y., Zhang, Y., Feng, H., and Nie, Z. 2005. Thoracic masses treated with percutaneous cryotherapy: Initial experience with more than 200 procedures. Radiolog, 235(1): 289-98.
40.Wang, X., Fu, J., Wang, X.F., and Fu, J.R. 1994. Desiccation and cryopreservation of excised embryonic axes of mango seeds. Journal of South China Agricultural University, 15(3): 88-92.
41.Wolf, J., and Bryant, G. 1999. Freezing drying and/or verification of membrane-solute water system. Cryobiology, 39: 129-103.
42.Wood, C.B., Pritchard, H.W., and Lindegard, K. 2003. Seed cryopreservation and longevity of two *Salix* hybrids. CryoLetters, 24(1): 17-26.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Conservation and Utilization of Natural Resources, Vol. 4 (1), 2015
http://ejang.gau.ac.ir

Possibility evaluation of *Pistacia vera* L. seed conservation under cryogenic condition

***M. Jebelli[1], M. Tabari Koochaksoraei[2], F. Hatami[1] and Sh. Mehrparvar[3]**

[1]M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, [2]Associate Prof., Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modarres University, Noor, Iran,
[3]Assistance Prof., Qum Azad University, Qum, Iran
Received: 2015/01/20; Accepted: 2015/05/05

Abstract

Wild *Pistacia vera* L. is one of the broad leaf species which grows in Khorasan Razavi, Khorasan Shomali and Golestan provinces of Iran. Narrow habitat range, lack of natural regeneration and establishment due to habitat degradation and inappropriate utilization has put this species under threat, therefore its protection and conservation is of importance. To evaluate the possibility of long-term preservation of *Pistacia vera* seeds, three pre-cryopreservation methods including PVS2, desiccation, and 30% glycerol in addition to control were applied. In field experiments the treated seeds were kept for one month under cryopreservation conditions, then were planted in the field under rainfed conditions. The treated seeds were kept in liquid nitrogen (LN) for periods of 1 week, 1 month, and 1 year then were removed and some traits related to seed germination and establishment were evaluated. The results showed that *Pistacia vera* seeds are able to tolerate cryopreservation conditions and are able to germinate under field conditions and the cultivated plants produced flowers and fruits after 6 years. Results showed that there is significant difference among cryopreservation pre-treatments in most traits and PVS2 was the best pre-treatment. Therefore, it is possible to preserve the seeds of this valuable and endangered species for long-term under cryopreservation condition and in case of any possible threat the preserved seeds can be used for reclamation of degraded habitats.

Keywords: *Pistacia vera* L., Seed cryopreservation, Forest specie, Plant vitrification solution

*Corresponding author: Jebelly@rifr-ac.ir