



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور



کرایو بانک گیاهان بومی ایران



نگارندگان:

لیلا میرجانی

عباس قمری زارع

تیر ۱۴۰۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

کاتالوگ کرایوبانک گیاهان بومی ایران

نگارنده: لیلا میرجانی، عباس قمری زارع

ناشر: مرکز ملی مدیریت منابع ژنتیکی کشاورزی و منابع طبیعی کشور
سال انتشار: ۱۴۰۱

شماره ثبت در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی: ۶۱۹۶۵

نشانی: کرج، بلوار شهید فهمیده، مجموعه موسسات تحقیقاتی کشاورزی کشور، بلوار پژوهش،
خیابان بنفشه

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
ضرورت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی	۱
اهمیت ایجاد کرایو بانک	۳
مشکلات و تنگناهای نگهداری گونه‌های گیاهی در شرایط متعارف	۴
پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی گیاهان در شرایط فراسرد	۵
سابقه و وضعیت کرایو بانک‌ها در جهان	۷
-کرایو بانک آمریکا	۷
-کرایو بانک هندوستان	۸
-کرایو بانک نروژ	۹
-کرایو بانک انگلستان	۱۰
-کرایو بانک برزیل	۱۰
وضعیت کرایو بانک‌ها در جمهوری اسلامی ایران	۱۱
- مرکز رویان جهاد دانشگاهی	۱۱
- بانک سلولی انستیتو پاستور ایران	۱۱
- بانک سلولی سازمان تحقیقات علمی و صنعتی	۱۱
- دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی وابسته	۱۱
- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی	۱۲
- شرکت جاهد (بهبود شیر سابق)	۱۲
- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور	۱۲
- وضعیت موجود	۱۲
- قوت‌ها	۱۲
- ضعف‌ها	۱۳
- فرصت‌ها	۱۴
- تهدیدها	۱۴
اهداف اهمیت و ضرورت بانک فراسرد گیاهان بومی ایران	۱۵
اولویت حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی ایران در فراسرد (CRYOPRESERVATION)	۱۵
شرایط نگهداری در شرایط فراسرد	۱۸
نحوه ارزیابی زنده‌مانی و ذخیره‌سازی بذرها	۲۱
جمع‌بندی	۲۲
منابع	۲۳

مقدمه

در اجرای اصل یک‌صد و بیست و سوم قانون اساسی جمهوری اسلامی ایران «قانون حفاظت و بهره‌برداری از منابع ژنتیکی کشور» که جهت اجرا به وزارت جهاد کشاورزی ابلاغ گردید. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور اولین نهاد ایرانی است که از سال ۱۳۸۲ تاکنون به صورت گسترده و عمیق در زمینه امکان نگهداری ژرم پلاسما گیاهی در فراسرد (Cryopreservation) فعالیت دارد. این مؤسسه تنها مؤسسه‌ای است که پیشرو در زمینه کرایوبیولوژی و تکنولوژی ذخیره‌سازی گیاهان منابع طبیعی در فراسرد می‌باشد. در گام نخست مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور اقدام به بومی‌سازی دانش حفظ و نگهداری ژرم پلاسما گیاهی گونه‌های منابع طبیعی در فراسرد (Cryopreservation) نمود. هدف اصلی این اقدام، "بهبود و استفاده از تکنیک‌های پیشرفته تکنولوژی برای حفظ گیاهان منابع طبیعی ایران با تأکید اصلی بر حفاظت درازمدت از طریق حفظ فراسرد" است. به منظور دستیابی به این هدف، "کارگروه فراسرد" در بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور شکل گرفت. در گام دوم با شروع به حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های درختی و درختچه‌ای جنگلی اقدام به تأسیس بانک فراسرد گیاهان بومی ایران (Iranian CryoBank of Natural Plant Species) نموده است. بانک فراسرد گیاهان بومی ایران آمادگی انتقال این تکنولوژی را به سایر ارگان‌های داخل و خارج از کشور را نیز دارد.

ضرورت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی

در ایران تقریباً ۸۰۰۰ گونه از گیاهان اسپریماتوفیت وجود دارد که در ۱۵۰ خانواده جای دارند. از این تعداد ۲۲٪ را گونه‌های انحصاری (Endemic) تشکیل داده که متعلق به ۸۵ خانواده می‌باشند. در مجموع ۱۷۲۷ تاکسون انحصاری در کشور گزارش شده است. گیاه‌شناسان معتقدند که این رقم خیلی بیشتر و احتمالاً از مرز ۲۵۰۰ تاکسون هم می‌گذرد. از ۸ هزار گونه موجود در کشور، تقریباً ۱۹۲۷ گونه در معرض خطر یا انقراض قرار دارند (Jalili and Jamzad, 1999). ایجاد تغییرات اساسی در عوامل اکوسیستم و به هم خوردن تعادل اکوسیستم‌های طبیعی در اثر بهره‌برداری‌های بی‌رویه، آثار سوء فعالیت‌های انسانی، ایجاد تغییرات در عوامل جوی، فرسایش شدید خاک، آتش‌سوزی، تخریب رویشگاه‌ها، شیوع آفات و بیماری‌ها، آلودگی‌های زیست‌محیطی و غیره باعث تشدید انقراض ذخایر توارثی، به‌ویژه ذخایر توارثی عرصه‌های منابع طبیعی گردیده است. کشور ما با داشتن حدود ۱۲/۴ میلیون هکتار اراضی جنگلی، در حال حاضر جزء کشورهای فقیر از نظر پوشش جنگل محسوب می‌شود. برداشت بی‌رویه

چوب از منابع جنگلی، به خصوص چوب صنعتی و سوخت، فشار زیادی را به جنگل‌ها وارد می‌کند. عواملی از قبیل تبدیل اراضی جنگلی به اراضی کشاورزی، تبدیل عرصه‌های جنگلی خاص مانند جنگل‌های حراء به عرصه‌های پرورش آبزیان و غیره، باعث تخریب شدید این جنگل‌های ارزشمند در ایران و سایر نقاط جهان گردیده است.

از اواخر قرن بیستم، با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی و همچنین حفظ تنوع زیستی، تلاش‌های جدی در سطح جامعه جهانی صورت گرفته تا از نابودی گونه‌ها و صدمه به تنوع زیستی جلوگیری گردد. سازمان‌های جهانی مانند، (GEF) Global Environmental Facility، (CBD) Convention on Biodiversity، (UNEP) United Nations Environmental Programme و ... تلاش‌های زیادی برای حفظ ذخایر توارثی و تنوع زیستی و همچنین جلوگیری از خطرات زیست‌محیطی به عمل آورده‌اند و با برگزاری نشست‌ها و تصویب کنوانسیون‌های جهانی درصدد ملزم ساختن دولت‌ها و جامعه جهانی برای حفظ ذخایر توارثی و تنوع زیستی می‌باشند.

در اواسط قرن بیستم به منظور حفاظت از منابع ژنتیکی گیاهی با کمک سازمان‌هایی مانند FAO، اقدام به ایجاد بانک ژن‌های (Gene Banks) یا بانک بذر) گیاهان زراعی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه گردیده است. هدف اصلی از ایجاد این نوع بانک ژن‌ها جمع‌آوری و نگهداری مواد ژنتیکی به منظور دسترسی پژوهشگران و فعالان سایر بخش‌ها و مراکز به اکسشن‌های گونه‌های ذخیره‌شده در بانک‌های ژن است. با اینکه اقدام بسیار ارزشمندی بوده است ولیکن فعالیت و حیطه کاری اغلب کلکسیون‌های بذر و بانک‌های ژن در زمینه محصولات زراعی و باغبانی است که متأسفانه گونه‌های منابع طبیعی در بسیاری از موارد مورد توجه قرار نگرفته‌اند. عدم توجه به مسائل زیست‌محیطی و نگرش اقتصاد محور بر حفظ ذخایر توارثی گیاهی، عواقب فاجعه‌باری از قبیل روند شتابان در انقراض گونه‌ها و فرسایش شدید ژنتیکی در زیر بخش منابع طبیعی را در جهان و از جمله ایران به همراه داشته است. این نگرش اقتصادی باعث گردید تقریباً کلیه امکانات در جهت حفظ و نگهداری از گونه‌های زراعی، باغی و گونه‌های صنعتی و توده‌ها و جمعیت‌های آن‌ها هدایت شود و مباحث منابع طبیعی مغفول واقع شود. متأسفانه نتیجه این برخورد یک‌سویه موجب وارد آمدن بزرگ‌ترین ضربه و آسیب بر گونه‌های منابع طبیعی گردید که حاصل آن انقراض گسترده گونه‌ها، فرسایش ژنتیکی و کاهش جبران‌ناپذیر تنوع زیستی در جهان شده است.

اهمیت ایجاد کرایو بانک

ازجمله عملکردهای حفاظتی انجام شده در زمینه حفظ گونه های گیاهی، ایجاد بانک های ژن گیاهی و نگهداری بذر گیاهان در شرایط مناسب برای میان مدت و یا نگهداری در دمای زیر صفر برای مدت های نسبتاً طولانی تر می باشد. در شرایط یاد شده، بذرها پس از مدتی قوه نامیه خود را از دست می دهند که برای جلوگیری از نابودی آنها، نیاز به بازیابی بذور می باشد. در برخی از گونه ها، به ویژه گونه های جنگلی مدت زمان لازم برای تکمیل رشد رویشی و شروع بذردهی بسیار طولانی و ده ها سال طول می کشد. مضافاً اینکه برخی از بذور قوه نامیه کمی دارند و یا اینکه مانند گونه های ریکالسیترانت (Recalcitrant) و گونه های حد واسط (Intermediate) به سرعت قوه نامیه و جوانه زنی خود را از دست می دهند.

از دیگر فعالیت های حفاظتی، ایجاد مناطق حفاظت شده در عرصه های طبیعی و احداث باغ های گیاه شناسی می باشد. بیش از چند هزار باغ گیاه شناسی در جهان احداث شده که هزینه مراقبت و نگهداری گونه های گیاهی در این باغ ها بسیار سنگین و سرسام آور می باشد.

نگهداری در دمای فراسرد (Cryopreservation)، امکان نگهداری طولانی مدت بذور و اندام های گیاهی را امکان پذیر نموده است. طول زمان نگهداری نمونه های گیاهی در شرایط فراسرد غیر قابل تصور می باشد. زیرا بر اساس معادله ترمودینامیکی Avrami (۱۹۴۱)، که این معادله توسط Walters و همکاران (۲۰۰۴) بر روی بذر کاهو و با استفاده از دماهای مختلف شامل دامنه ای از دماهای بالای صفر و زیر صفر صورت گرفت، مدت زمان رسیدن جوانه زنی بذر کاهو به نیمه عمر در شرایط نیتروژن مایع ۳۴۰۰ سال محاسبه گردید. در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی از سال ۱۳۸۲ چندین طرح/پروژه در زمینه نگهداری بذر، جوانه و سلول گونه های جنگلی، مرتعی و بیابانی را شروع نمود. کاربرد روش های فراسرد باعث کاهش هزینه های گزاف نگهداری، بازکشت و تجدید حیات بذور می گردد. تکنولوژی ذخیره ژرم پلاسما گیاهی در دمای فراسرد (Cryopreservation)، اولین بار در دهه ۱۹۷۰ شروع و در دهه ۱۹۸۰ توسعه یافت. این روش در اواخر قرن گذشته وارد فاز عملی گردید.

در حال حاضر در دنیا تعدادی از اندام های رویشی و بافت های گیاهی گونه های مختلف گیاهی در بانک های فراسرد (CryoBank) ذخیره و این تعداد به سرعت در حال افزایش می باشد. نگهداری کلن های مربوط به جنس های مختلف گیاهی با

به‌کارگیری تکنولوژی ذخیره در دمای فراسرد، باعث نگهداری امن و دسترسی آسان به ذخایر ژنتیکی که نقش حیاتی در امنیت غذایی دارند گردیده است. این تکنولوژی زمینه نگهداری و بهره‌برداری از تعداد زیادی از گونه‌های عرصه‌های منابع طبیعی و زراعی را که از طریق کلن تکثیر می‌گردند را نیز فراهم آورده است.

هم‌اکنون رقابت بسیار شدید و تنگاتنگی در کشورهای پیشرفته دنیا برای استقرار کرایوبانک‌های ژرم‌پلاسما گیاهی (Plant Germplasm CryoBanks) مشاهده می‌شود و این بانک‌ها به‌سرعت در حال شکل‌گیری هستند. سرمایه‌گذاری‌های بسیار گسترده‌ای در زمینه ایجاد کرایوبانک‌ها و انتقال تکنولوژی از روش‌های متعارف به کرایوبانک‌ها صورت می‌گیرد.

مشکلات و تنگناهای نگهداری گونه‌های گیاهی در شرایط متعارف

از ۸۰۰۰ گونه گیاه گل‌دار کشور حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ گونه انحصاری ایران می‌باشند که در صورت انقراض به‌طورکلی از لیست موجودی دنیا حذف می‌گردد. اکثر این گونه‌ها بذر Orthodox تولید می‌نمایند که قابل نگهداری کوتاه و یا میان‌مدت در شرایط متعارف و در بانک ژن می‌باشد. طول مدت نگهداری آن‌ها بین یک سال تا حدود ۵۰ سال می‌باشد. قبل از اینکه قوه‌نامیه این بذور از بین برود باید نسبت به بازکشت آن‌ها و تهیه بذر جدید اقدام نمود. در غیر این صورت بذر از بین خواهد رفت.

در سطح جهانی اساسی‌ترین و مهم‌ترین دغدغه و چالش، حفظ ذخایر توارثی گیاهان با بذره‌های غیر ارتدکس (Recalcitrant و Intermedicte) و گونه‌های که منحصراً از طریق کلن یا اندام رویشی تکثیر می‌یابند می‌باشد. زیرا به‌هیچ‌عنوان امکان نگهداری این گونه‌ها در بانک‌های ژن متعارف وجود ندارد. بنابراین این گروه از گیاهان در معرض خطر انقراض هستند که در قسمت‌های بعدی به آن‌ها اشاره شده است:

۱- عمر بذر تعدادی از گونه‌های گیاهی کمتر از یک سال می‌باشد. مانند *Camphorosma marsperiaca* از خانواده *Chenopodiaceae* و تعداد بسیاری از گونه‌های مربوط به جنس‌ها و خانواده‌های مختلف.

۲- بذر تعدادی از گونه‌ها بیش از چند ماه قابل نگهداری در شرایط متعارف نمی‌باشند. مانند بذر خانواده *Salicaceae*، به‌ویژه گونه‌های جنس بید (*Salix*) و گونه‌های جنس صنوبر (*Populus*). برای تهیه مجدد بذر این گونه‌ها حداقل بین ۱۰-۵ سال زمان

برای بلوغ گونه و تولید بذر نیاز می‌باشد. مضافاً اینکه این گونه‌ها در شرایط متعارف از طریق کلن تکثیر می‌گردند و امکان نگهداری کلن در بانک ژن برای این گونه‌ها وجود ندارد.

۳- نگهداری بذر تعداد قابل توجهی از گونه‌های بسیار مهم جنگلی و غیر جنگلی که از نوع Recalcitrant بوده و به‌طور کلی نگهداری بذر این گروه از گیاهان در شرایط بانک ژن وجود ندارد. مانند کلیه گونه‌های جنس بلوط (*Quercus*) در کشور و سایر کشورهای دنیا.

۴- تعدادی از گونه‌ها ممکن است منحصراً به‌صورت کلن تکثیر گردند. در این صورت نیز نگهداری آن‌ها در بانک ژن امکان‌پذیر نمی‌باشد.

۵- گونه‌های آبری که عموماً بذر آن‌ها Recalcitrant می‌باشد، نگهداری بذر آن‌ها امکان‌پذیر نبوده و در معرض خطر و انقراض می‌باشند.

۶- گونه‌های فاقد سیستم آوندی مانند جلبک‌های چند سلولی، نیز قابل نگهداری در شرایط متعارف نمی‌باشند.

۷- گونه‌های گیاهی که با اندام‌های جنسی (مانند هاگ) تکثیر می‌گردند نیز قابل نگهداری در شرایط متعارف نمی‌باشند. این گونه‌ها به‌شدت در معرض خطر انقراض قرار دارند.

۸- گونه‌های آبری تک‌سلولی مانند جلبک‌های تک‌سلولی نیز قابل نگهداری در شرایط بانک ژن نمی‌باشند.

۹- نگهداری اندام‌های جنسی و رویشی گونه‌های ساپروفیت مانند قارچ‌های چند سلولی که در کشاورزی و منابع طبیعی اهمیت زیادی دارند نیز قابل نگهداری در شرایط متعارف نمی‌باشند.

۱۰- گل‌سنگ‌ها گروه دیگری از موجودات می‌باشند که تاکنون روشی برای حراست از آن‌ها در محیط‌های بانک ژن تعریف نشده است.

پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی گیاهان در شرایط فراسرد

مطالعات زیادی بر روی ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از فراسرد در بسیاری از نقاط جهان صورت گرفته است. برای بررسی ثبات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی چندین تکنیک مولکولی به‌کاربرده شده است، که بیشترین مارکرهای مورد استفاده MSAP و AFLP و RAPD می‌باشد، مشاهدات نشان می‌دهد که هیچ تغییر ژنتیکی در گیاهان قرار گرفته در شرایط فراسرد در مقایسه با گیاهان شاهد

دیده نمی‌شود، این در حالی است که تغییرات متیلاسیون (تغییرات اپی ژنتیک) به مقدار قابل توجهی دیده می‌شود و این‌که آیا تغییرات اپی ژنتیک در رفتار گیاه اثر می‌گذارد یا نه بایستی مورد توجه قرار گیرد (Peredo *et al.*, 2008). به تعدادی از مطالعات و تکنیک‌های به کار گرفته شده در این زمینه در سایر گیاهان به طور اختصار اشاره می‌گردد.

در این رابطه آزمایش‌های در زمینه DNA چندشکلی بر روی هیبریدهای صنوبر لرزان گویای پایداری ژنتیکی آن‌ها پس از خروج از شرایط فراسرد بود (Jokipii *et al.*, 2004).

ارزیابی ثبات ژنتیکی گیاه *Wsabi* که به مدت طولانی در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت، تفاوت معنی‌داری برای طول دم برگ، تعداد ساقه و شاخص سطح برگ مشاهده نشد (Matsumoto *et al.*, 2013).

اثر نگهداری در فراسرد بر روی بیان ژن و انتقال ژن گیاه *Arabidopsis Thaliana* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بعد از نگهداری در شرایط فراسرد هیچ افزایش قابل توجهی در کارایی انتقال ژن وجود ندارد ولی انجماد می‌تواند بیان ژن آگروژن را بهبود بخشد (li *et al.*, 2013).

پایداری ژنتیکی در ژرم پلاسما *Melia* (Scocchi *et al.*, 2004)، در انگور و کیوی (Zhai *et al.*, 2003) و گلایی (Condello *et al.*, 2009) گیاهان باززایی شده از جوانه‌هایی که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند، به میزان صد درصد از لحاظ ژنتیکی مشابه گیاهان مادری بودند که یکی از جنبه‌های مهم در حفاظت رویشی می‌باشد.

از نشانگرهای مولکولی RAPD و AFLP برای بررسی ثبات ژنتیکی گیاه رازک، (*Humulu slupulus* L) نگهداری در شرایط فراسرد استفاده گردید و نتایج نشان داد که در بین گیاهان شاهد و گیاهان که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند هیچ تنوع ژنتیکی دیده نشد (Peredo *et al.*, 2008).

سابقه و وضعیت کرایو بانک‌ها در جهان

در دانش Cryopreservation یا نگهداری موجود زنده یا اندام موجود زنده در فراسرد (اغلب در دمای -196°C - نیتروژن مایع) به بررسی اثرات دمای فراسرد بر روی سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف موجود زنده شامل گیاهان، جانوران، حشرات، میکروارگانیسم، انسان و سایر موجودات پرداخته می‌شود.

با استفاده از تکنولوژی فراسرد، می‌توان سلول، بافت، اندام موجود زنده را برای مدت زمان بسیار طولانی نگهداری نمود. دمای فراسرد تمامی فرایندهای متابولیک، فیزیولوژیک و حیاتی سلول را تقریباً متوقف و مدت زمان زنده‌مانی را به شدت افزایش می‌دهد. به عنوان مثال براساس محاسبات ترمودینامیکی می‌توان بذر کاهو را تا ۳۴۰۰ سال در دماهای فراسرد مانند دمای -196°C - نیتروژن مایع نگهداری نمود (Walters et al., 2004).

دانش کرایوبیولوژی یا استفاده از دمای فراسرد برای نگهداری بلندمدت سلول‌ها و بافت‌ها، اندام‌ها و موجودات زنده تقریباً از اواسط قرن بیستم وارد مرحله تحقیقاتی گردید و به سرعت گسترش یافت. طی یک دوره ۲۰ ساله از ۱۹۸۰-۱۹۶۰ کرایوبیولوژی از یک سطح نظری به یک سطح عملی و کاربردی تبدیل و توسط پیشگامان کرایوبیولوژی توسعه یافت (Lambardi et al., 2005). استفاده از شرایط فراسرد برای نگهداری ژرم‌پلاسما گیاهی و کاربرد مواد Cryoprotectan در نگهداری بذر، سلول، بافت و اندام‌های گیاهی از حدود دهه‌های آخر قرن بیستم وارد فاز عملی گردید و فعالیت‌های تحقیقاتی با سرعت گسترش یافت. ایده تشکیل کرایو بانک ژرم‌پلاسما گیاهی از همین سال‌ها شروع و قدم‌های بزرگی در جهت استقرار کرایو بانک‌های ملی به عنوان اقدامی راهبردی در تعدادی از کشورهای پیشگام برداشته شده است، که به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

-کرایو بانک آمریکا

بیشترین کرایو بانک‌ها در زمینه اسپرم، سلول‌ها و بافت‌های انسانی است و مهم‌ترین و بزرگ‌ترین آن‌ها در کشور آمریکا وجود دارد. به دلیل اهمیت بهداشت انسانی و برطرف کردن بیماری‌ها و نارسائی‌های انسانی و جایگاه اقتصادی و درآمدزایی موضوعات مرتبط با مباحث انسانی، بیشترین سرمایه‌گذاری‌های اقتصادی و رشد دانش فنی مربوط به کرایو بانک‌های انسانی می‌باشد. مانند کرایو بانک‌های کالیفرنیا ...

همچنین وزارت کشاورزی امریکا (USDA) تشویق به ذخیره‌سازی ژرمپلاسم گیاهی در the USDA Agricultural Research Service's National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, Oregon شد.

- آزمایشگاه ذخیره‌سازی بذر ملی (NSSL) فورت کالینز (ایالات متحده آمریکا)، با حدود ۲,۱۰۰ واریته سیب (جوانه‌های خفته).
- مخزن ملی Clonal Germplasm (NCGR) Corvallis (ایالات متحده آمریکا)، با بیش از ۱۰۰ واریته گلایی (سرشاخه).

- کرایوبانک روسیه

روسیه از پیشگامان ایجاد CryoBank های گیاهی است و در چند سال اخیر اقدام به سرمایه‌گذاری و تشکیل کرایوبانک‌های ژرمپلاسم گیاهی نموده است. به عنوان مثال:

۱- کرایوبانک CryoBank of Plant Genetic Resources در مؤسسه Timiryazev، که از زیرمجموعه‌های Russian Academy of Sciences می‌باشد. این کرایوبانک برای نگهداری بلندمدت ژرمپلاسم گیاهی گونه‌های استراتژیک زراعی، باغی، زینتی و دارویی است که در چند سال اخیر احداث گردیده است.

۲- کرایوبانک ارکیده‌های نادر مناطق استوایی Rare Tropical Orchid CryoBank. کرایوبانک تک محصولی و اختصاصی در روسیه می‌باشد.

آنها تا زمان دریافت این گزارش از ۲۷ لاین سلولی از ۴۰ لاین سلولی از کلتیوارهای سیب‌زمینی، رز، توت‌فرنگی و رازبری پس از خروج از نیتروژن مایع با موفقیت در شرایط درون‌شیشه‌ای باززایی کردند. همچنین ۲۴ نژاد سلولی از گونه‌های نادر گیاهان دارویی از سراسر روسیه را در کرایوبانک نگهداری می‌کنند. قدیم‌ترین نمونه گیاهی کرایوبانک در زمان گزارش از ۲۵ سال قبل در نیتروژن مایع بوده است.

- کرایوبانک هندوستان

در هندوستان کرایوبانک بذر، سلول و اندام‌های گیاهی در مرکز ملی ذخیره منابع ژنتیکی هند (National Bureau of Plant Genetic Resources) NBPGR که در سال ۱۹۰۵ تأسیس شده است، به صورت مشترک با کشورهایی مانند آمریکا راه‌اندازی

شده است. تا سال ۲۰۱۴ تعداد ۳۸۳۴۶۴ اکسشن از ۱۵۸۳ گونه بذر در شرایط بانک ژن متعارف و از جوانه انتهایی، بذر، محور جنینی و کالوس تعداد ۹۳۷۴ اکسشن از ۷۱۸ گونه عمدتاً Non-orthodox شامل گونه‌های درختان منطقه معتدله مانند *Citrus*, *Almond*, *Walnut*, *Mulberry* (مانند *Citrus latipes* و *Citrus medica*, *Citrus paradisi*), *Capparis decidua*, درختان ریز بذر منطقه حاره مانند *Mimusops*, *Phoenix sylvestris*, *Carissa cranadus*, *Wild* و *Carica papaya*, *Citrus limon*, *Psidium guajava*, *Moringa oleofera*, *Cordia myxa*, *elengi* و *Apricot* در شرایط کرایوبانک نگهداری کرده‌اند.

-کرایوبانک نروژ

کرایو بانک مرجان‌های دریایی یا The Coral CryoBank در سال ۲۰۰۸ تکمیل گردید. در حال حاضر ۵۰۰۰۰۰ نمونه از مرجان‌های دریایی جمع و در این کرایو بانک نگهداری می‌گردد. دانشگاه هاوایی و بنیادهای مالی، حامی کرایو بانک مرجان‌های دریایی هستند که در حال حاضر به‌سرعت در حال غنی شدن می‌باشد.

-کرایوبانک کره جنوبی

کرایو بانک ژرمپلاس تنوع زیستی کشاورزی کره جنوبی یا RDA GeneBank, National Agrobiodiversity Centre, Sout Korea, Suwon یکی از مراکز بزرگ ذخیره‌سازی ژرمپلاس گیاهی در آسیا می‌باشد. این کرایو بانک که در Suwon کره جنوبی قرار دارد، طی چند سال اخیر سرمایه‌گذاری‌های گسترده‌ای برای ایجاد کرایو بانک گونه‌های گیاهی انجام داده است. این کرایو بانک به‌سرعت در حال تکمیل و غنا بخشیدن به تعداد گونه‌ها و نمونه‌ها در کرایو بانک می‌باشد.

-کرایوبانک انگلستان

CryoBank بذور Recalcitrant در پروژه بانک بذر هزاره سوم انگلستان (MSB) Millenium Seed Bank Project

تصویب شده است و هدف آن جمع‌آوری ژرم‌پلاسما گیاهی از نقاط مختلف دنیا است. در این پروژه بین‌المللی ۵۴ کشور از آمریکا شمالی جنوبی، اروپائی، آسیایی و اقیانوسیه شرکت دارند. این پروژه شامل نگهداری بذور اغلب گونه‌ها در شرایط متعارف می‌باشد. نگهداری بذور Recalcitrant به‌طور ویژه در کرایوبانک می‌باشد. آن‌ها تا سال ۲۰۱۰ تعداد ۲۹۰۰۰ گونه را در شرایط متعارف و ۱۵ گونه را در فراسرد نگهداری کرده‌اند.

-کرایوبانک برزیل

تا سال ۲۰۱۴ در کرایوبانک برزیل بذور تعداد ۱۵۱ گونه از ۲۴ خانواده در شرایط فراسرد آزمون شد. از این تعداد بذور ۶۶ گونه جنگلی حاره از ۲۱ خانواده در شرایط فراسرد آزمون شد که جوانه‌زنی ۵۱ گونه پس از فراسرد تغییر نکرد. جوانه‌زنی بذور ۹ گونه پس از فراسرد افزایش یافت یا خواب آن‌ها تحت فریز شدن شکسته شد. همچنین جوانه‌زنی بذور ۶ گونه پس از فراسرد کاهش یافت. در نتیجه ژرم‌پلاسما بذور درختان گونه‌های جنگلی بومی برزیل را می‌توان در شرایط فراسرد ذخیره کرد.

-کرایوبانک لهستان

بانک ژن جنگلی Kostrzyca در لهستان اخیراً یک مرکز جدید برای نگهداری بذرها در دمای بسیار پایین افتتاح کرده است. کرایوبانک جدید کاری را که FGB از سال ۲۰۰۵ انجام داده است، گسترش می‌دهد و ظرفیت خود را برای حفاظت از تنوع ژنتیکی درختانی مانند بلوط (*Quercus spp*) و سایر گونه‌های گیاهی در معرض تهدید که نمی‌توانند به‌سادگی به‌عنوان دانه‌های خشک ذخیره شوند، افزایش می‌دهد. تاکنون، در فهرست منابع ژنتیکی ذخیره‌شده در FGB Kostrzyca به شکل بذور، قطعات بذور و جوانه‌های زمستانه از جمله موارد زیر است: درختچه توس *Betula humilis*، راش اروپایی *Fagus sylvatica*، توس کرکی *Betula pubescens*، توس نقره‌ای *Betula pendula*، نارون *Ulmus glabra*، سرخدار معمولی *Taxus baccata*، بلوط بی‌صدا *Quercus petraea*، بلوط اروپایی *Quercus robur*، مرز معمولی *Carpinus betulus*، صنوبر نقره‌ای

Abies alba، درخت خدمات وحشی *Sorbus torminalis* و *Fraxinus excelsior*، چنار *Acer pseudoplatanus*، کاج اروپایی *Larix decidua*، کاج اسکاتلندی *Pinus sylvestris*، نارون سفید اروپایی *Ulmus laevis* و غیره.

وضعیت کرایو بانک‌ها در جمهوری اسلامی ایران

– مرکز رویان جهاد دانشگاهی

با هدف نگهداری نمونه‌های مرتبط با سلول بنیادی و بافت‌های انسانی فعالیت می‌نماید. این مرکز جهت حفظ و نگهداری نمونه‌های انسانی، دامی و میکروارگانیسم‌ها از روش کرایو استفاده می‌نماید و از مراکز پیشرو می‌باشد.

– بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

در زمینه نگهداری سلول‌های انسانی و میکروارگانیسم‌های مرتبط با بهداشت و بیماری‌های انسان فعالیت می‌نماید. در این انستیتو جهت نگهداری نمونه‌ها از روش کرایو استفاده می‌شود.

– بانک سلولی سازمان تحقیقات علمی و صنعتی

در رابطه با سلول‌ها و میکروارگانیسم‌های مختلف فعالیت دارد.

– دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی وابسته

به‌صورت پراکنده در تعدادی از دانشگاه‌های علوم پزشکی و سایر دانشگاه‌ها و در سطح رفع نیاز برای نگهداری نمونه‌ها از کرایوتانک‌ها استفاده می‌گردد.

- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

در رابطه سلول‌ها و میکروارگانیسم‌های مرتبط با دام و انسان فعالیت دارد.

- شرکت جاهد (بهبود شیر سابق)

بزرگترین کرایو بانک اسپرم گاوهای شیری و گوشتی کشور می‌باشد که در کرج مستقر می‌باشد. این مرکز نقش اول را در نگهداری و توزیع اسپرم گاوهای اصلاح شده در کشور دارد و از مجموعه‌های راهبردی در اصلاح دام و ارتقاء بهره‌وری در زیر بخش دام کشور می‌باشد.

- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور از اوایل دهه ۱۳۸۰ تحقیقات کرایوبیولوژی و نگهداری ژرم‌پلاسما گیاهی در شرایط فراسرد را شروع نموده است. این مؤسسه پیشگام در اجراء تحقیقات کرایوبیولوژی، تهیه پروتوکل‌ها و استقرار دانش فنی فراسرد در زیر بخش منابع طبیعی کشور می‌باشد. با دستیابی به دانش فنی، زیر بنای علمی، تیم تحقیقاتی تراز اول و توان و کارشناسی، آمادگی استقرار کرایو بانک گونه‌های منابع طبیعی کشور را دارا می‌باشد. این مؤسسه تا کنون تعداد زیادی پروژه تحقیقاتی را به اتمام رسانیده و از نظر تجربه تحقیقاتی و فنی جایگاه نخست را در نگهداری گونه‌های منابع طبیعی کشور را در شرایط فراسرد دارد.

- وضعیت موجود

- قوت‌ها

۱- بومی سازی دانش نگهداری گیاهان در شرایط فراسرد

۲- دارا بودن متخصصین رشته‌های مختلف منابع طبیعی نظیر متخصصین گیاه‌شناس، گیاه‌شناس‌جنگل، مرتع، بیابان، گیاهان دارویی و برای شناخت گونه‌های گیاهان منابع طبیعی و آشنایی با وضعیت موجود آنها

۳- نشر فلور فارسی با دربرگرفتن تقریباً همه گونه‌های موجود در ایران

- ضعف‌ها

۱- یکی از مهمترین وسایل مورد نیاز کرایوبانک، تانک‌های ذخیره نیتروژن مایع می‌باشد که تولید داخلی ندارد و هزینه تهیه آن بسیار قابل توجه می‌باشد.

۲- ضرورت مراجعه مکرر نیروی انسانی متخصص به عرصه‌های مختلف برای جمع‌آوری بذر بالغ و رسیده هر یک از گونه‌ها (زمان برداشت بذر جمعیت‌های مختلف یک گونه در مکان‌های مختلف متفاوت است).

۳- نامشخص بودن روش جوانه‌زنی و زمانبر بودن تعیین درصد جوانه‌زنی بسیاری از گونه‌ها به‌طوری‌که جوانه‌زنی بعضی از آنها بیش از یکسال طول می‌کشد.

۴- پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذور بسیاری از گونه‌های گیاهان منابع طبیعی. از این رو نیاز به نگهداری تعداد زیادی بذر از هر اکسشن است. اما بخاطر کمبود تانک، امکان نگهداری مقدار بذر استاندارد و مناسبی از این گونه‌ها مقدور نمی‌باشد.

۵- کمبود دانش فنی در مورد جوانه‌زنی بعضی از بذور

۶- کمبود امکانات لجستیکی و نیروی متخصص جمع‌آوری کننده بذر

– فرصت‌ها

- ۱- وجود تنوع بالای ژنتیکی در ایران و داشتن رویشگاه‌های منحصر به فرد در جهان مانند جنگل‌های هیرکانی که می‌توان گفت یک بانک ژن طبیعی (*in situ*) برای جهان می‌باشد که باقی‌مانده از دوران پالئوژن می‌باشد.
- ۲- تصویب اصل یکصد و بیست و سوم قانون اساسی جمهوری اسلامی ایران مبنی بر «قانون حفاظت و بهره‌برداری از منابع ژنتیکی کشور» که جهت اجرا به وزارت جهاد کشاورزی ابلاغ گردیده است. همچنین استقرار مرکزیت حفظ ذخایر ژنتیکی در کشور به وزارت متبوع سپرده شده است.
- ۳- واگذاری مسئولیت شناخت و حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های منابع طبیعی به مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

– تهدیدها

- ۱- وجود تحریم برای واردات تانک ذخیره و امکانات وابسته به آن
- ۲- با توجه به تغییرات اقلیمی در جهان بسیاری از گونه‌ها در معرض تهدید، خطر و انقراض می‌باشند.
- ۳- ضرورت اهتمام و توجه همه مسئولین اجرایی به حفظ ذخائر ژنتیکی و حمایت به موقع مالی از آن. به عنوان مثال تامین نشدن به موقع نیتروژن مایع، نه تنها باعث از بین رفتن کل نمونه‌های نگهداری شده در نیتروژن مایع زحمات چندین ساله خواهد شد؛ بلکه ممکن است امکان جمع‌آوری دوباره آن منابع ژنتیکی میسر نخواهد شد.
- ۴- عوامل طبیعی و خطاهای انسانی مانند آتش سوزی، شیوع همه‌گیری بیماری‌ها و آفات، خشکسالی‌های شدید و پیاپی، وقوع سرمای ناگهانی و نا مناسب باعث مانع تشکیل بذر و پوکی بذر در بسیار از گونه‌های منابع طبیعی می‌گردد.

اهداف اهمیت و ضرورت بانک فراسرد گیاهان بومی ایران

- ۱- حفظ تنوع زیستی در برابر تغییرات آب و هوایی و جلوگیری از تخریب زیستگاه‌ها و محیط زیست.
- ۲- حفاظت از جنگل‌ها که نقشی مهم در تولید انرژی، ضمانت هوای سالم، حفاظت خاک، تولید و ذخیره آب دارند.
- ۳- حفظ تنوع زیستی گیاهان که برای برنامه‌های کلاسیک و مدرن (مهندسی ژنتیک) اصلاح نباتات گیاه ضروری است. علاوه بر این، این تنوع زیستی منبعی از ترکیبات را برای صنایع دارویی، غذایی فراهم می‌کند.
- ۴- حفظ ذخایر توارثی گیاهی عرصه‌های منابع کشور برای مراحل بلندمدت، در مقیاس قرن‌ها و حتی چند هزار سال.
- ۵- افزایش ضریب اطمینان نگهداری ذخایر توارثی گیاهی و جلوگیری انقراض گونه‌ها با اتکا به مواد ذخیره‌شده.
- ۶- کاهش قابل توجه هزینه‌های نگهداری بذر و اندام‌های گیاهی در بانک ژن‌ها (بانک‌های بذر) یا عرصه‌های منابع طبیعی حفاظت‌شده و غیره.
- ۷- نگهداری اندام‌های رویشی مانند جوانه‌ها و سلول‌های گیاهی که بذر آن‌ها قابل نگهداری در بانک ژن‌های معمولی نبوده و این گونه‌ها به‌شدت در معرض انقراض می‌باشند. مانند گونه‌هایی با بذر Recalcitrant، intermediate و ...
- ۸- حفظ گونه‌هایی که منحصراً به‌صورت کلن تکثیر می‌گردند و نگهداری آن‌ها در بانک‌های ژن معمولی به‌هیچ‌وجه امکان‌پذیر نبوده و تنها راهکار و حفاظت از آن‌ها ذخیره‌سازی در شرایط فراسرد می‌باشد.

اولویت حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی ایران در فراسرد (Cryopreservation)

درختان و درختچه‌های جنگلی به‌دلیل سن زیاد و غیرارتدوکس بودن بذرهايشان، از اولویت حفظ ذخایر ژنتیکی بیشتری در شرایط فراسرد (Cryopreservation) نسبت به سایر گونه‌ها برخوردارند. در جدول ۱ لیستی از اسامی این گونه‌ها که در برنامه حفظ ذخایر ژنتیکی آن‌ها در کرایو بانک گیاهان بومی ایران نگهداری است، آورده شده است.

جدول ۱- فهرست گونه‌های درختی و درختچه‌ای در معرض خطر ایران

ردیف	نام علمی گیاه	ردیف	نام علمی گیاه
۱	<i>Acacia nilotica</i>	۳۵	<i>Carpinus orientalis</i>
۲	<i>Acacia oerfota</i>	۳۶	<i>Castanea sativa</i>
۳	<i>Acer campestre</i>	۳۷	<i>Celtis australis</i>
۴	<i>Acer cappadocicum</i>	۳۸	<i>Celtis caucasica</i>
۵	<i>Acer hyrcanum</i>	۳۹	<i>Cerasus khorassanica</i>
۶	<i>Acer mazandaranicum</i>	۴۰	<i>Cerasus mahaleb</i>
۷	<i>Acer monspessolanum</i>	۴۱	<i>Cerasus microcarpa</i>
۸	<i>Acer turcomanicum</i>	۴۲	<i>Ceratonia siliqua</i>
۹	<i>Acer velutinum</i>	۴۳	<i>Cercis siliquastrum</i>
۱۰	<i>Albizia lebbeck</i>	۴۴	<i>Cocolus pendulus</i>
۱۱	<i>Albizzia julibrissin</i>	۴۵	<i>Colutea buhsei</i>
۱۲	<i>Ammodendron persicum</i>	۴۶	<i>Colutea cilicica</i>
۱۳	<i>Ammodendron persicum</i>	۴۷	<i>Colutea gifana</i>
۱۴	<i>Amygdalus brahuica</i>	۴۸	<i>Colutea gracilis</i>
۱۵	<i>Amygdalus carduchorum</i>	۴۹	<i>Colutea persica</i>
۱۶	<i>Amygdalus eburnea</i>	۵۰	<i>Colutea porphyrogramma</i>
۱۷	<i>Amygdalus eleagnifolia</i>	۵۱	<i>Colutea uniflora</i>
۱۸	<i>Amygdalus erioclada</i>	۵۲	<i>Cordia crenata</i>
۱۹	<i>Amygdalus fenzliana</i>	۵۳	<i>Cornus mas</i>
۲۰	<i>Amygdalus glauca</i>	۵۴	<i>Corylus avellana</i>
۲۱	<i>Amygdalus korshinskyi</i>	۵۵	<i>Cotinus coggygria</i>
۲۲	<i>Amygdalus orientalis</i>	۵۶	<i>Cotoneaster assadii</i>
۲۳	<i>Amygdalus reticulate</i>	۵۷	<i>Cotoneaster esfandiarii</i>
۲۴	<i>Amygdalus trichamygdalus</i>	۵۸	<i>Cotoneaster persica</i>
۲۵	<i>Amygdalus wendelboi</i>	۵۹	<i>Cotoneaster persicus</i>
۲۶	<i>Anagyris foetida</i>	۶۰	<i>Cotoneaster pruinosis</i>
۲۷	<i>Berberis integrissima</i>	۶۱	<i>Cotoneaster rechingeri</i>
۲۸	<i>Betula pendula</i>	۶۲	<i>Cotoneaster suavis</i>
۲۹	<i>Caligunum bungei</i>	۶۳	<i>Crataegus assadii</i>
۳۰	<i>Calotropis procera</i>	۶۴	<i>Crataegus azarolus</i>
۳۱	<i>Capparis decidua</i>	۶۵	<i>Juniperus communis</i>
۳۲	<i>Crataegus babakhanloui</i>	۶۶	<i>Juniperus foetidissima</i>
۳۳	<i>Crataegus caucasica</i>	۶۷	<i>Juniperus foetidissima</i>
۳۴	<i>Crataegus monogyna</i>	۶۸	<i>Juniperus oblonga</i>

ردیف	نام علمی گیاه	ردیف	نام علمی گیاه
۶۹	<i>Crataegus orientale</i>	۱۰۵	<i>Laurocerasus officinalis</i>
۷۰	<i>Crataegus persica</i>	۱۰۶	<i>Leptadenia spartium</i>
۷۱	<i>Crataegus pontica</i>	۱۰۷	<i>Liquidambar styraciflua</i>
۷۲	<i>Crataegus sakranensis</i>	۱۰۸	<i>Lonicera hypoleuca</i>
۷۳	<i>Crataegus songarica</i>	۱۰۹	<i>Lonicera nummularifolia</i>
۷۴	<i>Crataegus szovitsii</i>	۱۱۰	<i>Malacocarpus crithmifolius</i>
۷۵	<i>Crataegus wattiana</i>	۱۱۱	<i>Malus orientalis</i>
۷۶	<i>Crataegus zagrica</i>	۱۱۲	<i>Melia azedarach</i>
۷۷	<i>Crataegus zareii</i>	۱۱۳	<i>Mespilus germanica</i>
۷۸	<i>Cuppresus sempervirens</i>	۱۱۴	<i>Moringa peregrina</i>
۷۹	<i>Dalbergia sissoo</i>	۱۱۵	<i>Moringa peregrina</i>
۸۰	<i>Diospyrus lotus</i>	۱۱۶	<i>Nannorhops ritchieana</i>
۸۱	<i>Dodonea viscosa</i>	۱۱۷	<i>Nerium oleander</i>
۸۲	<i>Ehretia obtusifolia</i>	۱۱۸	<i>Nitraria schoberi</i>
۸۳	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	۱۱۹	<i>Olea ferruginea</i>
۸۴	<i>Eleagnus angustifolia</i>	۱۲۰	<i>Padus avium</i>
۸۵	<i>Ephedra distachya</i>	۱۲۱	<i>Paliurus spina- christi</i>
۸۶	<i>Ephedra foliata</i>	۱۲۲	<i>Parrotia persica</i>
۸۷	<i>Ephedra laristanica</i>	۱۲۳	<i>Periploca aphylla</i>
۸۸	<i>Fagus orientalis</i>	۱۲۴	<i>Pistacia atlantica</i>
۸۹	<i>Ficus carica</i>	۱۲۵	<i>Pistacia khinjuk</i>
۹۰	<i>Ficus johannis</i>	۱۲۶	<i>Pistacia vera</i>
۹۱	<i>Fraxinus excelsior</i>	۱۲۷	<i>Platanus orientalis</i>
۹۲	<i>Fraxinus excelsior</i>	۱۲۸	<i>Populus caspica</i>
۹۳	<i>Fraxinus rotundifolia</i>	۱۲۹	<i>Populus euphratica</i>
۹۴	<i>Gleditschia caspica</i>	۱۳۰	<i>Prosopis aphylla</i>
۹۵	<i>Haloxylon ammodendron</i>	۱۳۱	<i>Prosopis cineraria</i>
۹۶	<i>Haloxylon persicum</i>	۱۳۲	<i>Prosopis cineraria</i>
۹۷	<i>Haloxylon persicum</i>	۱۳۳	<i>Prosopis farecta</i>
۹۸	<i>Hippophae rhamnoides</i>	۱۳۴	<i>Prunus avium</i>
۹۹	<i>Hippophae rhamnoides</i>	۱۳۵	<i>Pterocarya fraxinifolia</i>
۱۰۰	<i>Juglans regia</i>	۱۳۶	<i>Punica granatum</i>
۱۰۱	<i>Pyrus communis</i>	۱۳۷	<i>Pyrus boissieriana</i>
۱۰۲	<i>Pyrus farsistanica</i>	۱۳۸	<i>Tecomella undulata</i>
۱۰۳	<i>Pyrus glabra</i>	۱۳۹	<i>Tecomella undulata</i>
۱۰۴	<i>Pyrus grossheimii</i>	۱۴۰	<i>Thuja orientalis</i>

ردیف	نام علمی گیاه	ردیف	نام علمی گیاه
۱۴۱	<i>Pyrus hyrcana</i>	۱۶۱	<i>Thuja orientalis</i>
۱۴۲	<i>Pyrus kandavanica</i>	۱۶۲	<i>Tilia cordata</i>
۱۴۳	<i>Pyrus mazanderanica</i>	۱۶۳	<i>Tilia dasystyla</i>
۱۴۴	<i>Pyrus turcomanica</i>	۱۶۴	<i>Tilia platyphyllos</i>
۱۴۵	<i>Quercus monspesolanum</i>	۱۶۵	<i>Tilia sabetii</i>
۱۴۶	<i>Quercus infectoria</i>	۱۶۶	<i>Tilia stellate-pilosa</i>
۱۴۷	<i>Quercus longipes</i>	۱۶۷	<i>Ulmus carpinifolia (minor)</i>
۱۴۸	<i>Quercus macranthera</i>	۱۶۸	<i>Ulmus glabra</i>
۱۴۹	<i>Quercus robur</i>	۱۶۹	<i>Viburnum lantana</i>
۱۵۰	<i>Quercus brantii</i>	۱۷۰	<i>viburnum opulus</i>
۱۵۱	<i>Quercus castaneifolia</i>	۱۷۱	<i>Zelkova carpinifolia</i>
۱۵۲	<i>Quercus castaneifolia</i>	۱۷۲	<i>Ziziphus nummularia</i>
۱۵۳	<i>Quercus libani</i>	۱۷۳	<i>Ziziphus spina-christi</i>
۱۵۴	<i>Quercus macranthera</i>	۱۷۴	<i>Ruscus hyrcanus</i>
۱۵۵	<i>Quercus petraea</i>	۱۷۵	<i>Salvadora oleoides</i>
۱۵۶	<i>Quercus robur</i>	۱۷۶	<i>Salvadora persica</i>
۱۵۷	<i>Rhamnus pallasii</i>	۱۷۷	<i>Sorbus luristanica</i>
۱۵۸	<i>Rhizophora mucronata</i>	۱۷۸	<i>Sorbus torminalis</i>
۱۵۹	<i>Rhus coriaria</i>	۱۷۹	<i>Stocksia brahuica</i>
۱۶۰	<i>Taxus baccata</i>	۱۸۰	

شرایط نگهداری در شرایط فراسرد

برای تیمار بذرها به منظور نگهداری در شرایط فراسرد، پیش از قرارگیری بذرهای نمونه در نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه

سانتی گراد، ابتدا به منظور جلوگیری از کریستاله شدن آب آزاد و پاره شدن غشا پلاسمایی در دمای فراسرد، آبگیری بذرها توسط

اعمال تیمارهای مختلف اعمال می شود.

روش‌های حفاظت فراسرد

- انجماد تدریجی

این روش اولین پروتکل استاندارد بود که برای بافت‌های گیاهی آبدار توسعه یافت. اساس این روش، سرد کردن تدریجی نمونه‌ها در حضور یک محلول حفاظت‌کننده سرمایی است که شامل دی‌متیل سولفو کسید در غلظت ۱۵-۵٪ است. زمانی که در طی فرایند سرمازایی تدریجی دما به -40°C برسد محلول درون سلولی به اندازه کافی تلغیظ می‌شود تا به مجرد غوطه‌وری در نیتروژن مایع شیشه‌ای شود (Panis and Lambardi, 2005). هدف از کنترل سرمایش، بهینه کردن دو عامل آسیب، آسیب ناشی از غلظت مواد محلول و آسیب ناشی از تشکیل یخ است. این عوامل با کنترل دقیق سرعت سرمایش، انتقال و نگهداری در دماهای زیر صفر میانی و کاربرد فراسرمادهنده‌ها تعدیل می‌شوند. اصل اساسی تعیین‌کننده زنده‌مانی در این روش، سرعت سرمایش است (Mazur, 2004).

در روش انجماد سریع، نمونه‌ها به‌طور مستقیم در نیتروژن مایع قرار می‌گیرند. در این حالت آب درون‌یاخته‌ای، فرصت خروج از درون سلول را پیدا نمی‌کند و در همان‌جا یخ می‌زند و باعث آسیب‌های جدی می‌شود (Purohit, 2004). از طرفی به دلیل عدم فرصت کافی برای تشکیل کریستال‌های بزرگ یخی، بافت گیاهی را کمتر تهدید می‌کند. هنگامی که سرمایش به صورت تدریجی اعمال شود، یخ ابتدا در خارج از سلول تشکیل شده و در نتیجه شیب غلظت باعث حرکت آب از داخل به خارج سلول می‌شود. این موضوع به علت کاهش آب در دسترس برای تشکیل یخ، اثر نگهداشتی مهمی دربردارد. سلول‌های گیاهی به ندرت دارای هسته‌های یخی هستند. بنابراین در طی سرمازایی تدریجی، تشکیل کریستال یخی در فضای خارج سلولی آغاز می‌شود. به دلیل آنکه فقط نسبت معینی از آب خارج سلولی به یخ تبدیل می‌شود محلول باقیمانده به مراتب غلیظ‌تر می‌شود و نسبت به محلول درون سلولی غلظت بیشتری پیدا می‌کند. در نتیجه برای تأمین تعادل اسمزی، آب پروتوپلاست را ترک می‌کند. در این حالت سلول آب‌گیری می‌شود. به‌طور کلی سرعت انجماد بین دقیقه -2°C تا -5°C و بسته به نوع و مرحله فیزیولوژیکی ماده گیاهی به کار گرفته می‌شود. معمولاً این گونه سرعت‌های تدریجی با استفاده از ابزارهای سرمازای کامپیوتری یا نگهداری ظروف پروپانول در دمای -70°C به دست می‌آیند (Wolf and Bryant, 1999).

- شیشه‌ای شدن

اولین گزارشات در زمینه استفاده از محلول شیشه‌ای شدن در سال ۱۹۸۹ داده شد. ۱۵ سال بعد از اولین گزارش این روش به عنوان

گسترده‌ترین پروتکل حفاظت فراسرد استفاده گردید. موفقیت این روش سهولت آن است. همچنین این روش به‌خوبی برای محدوده وسیعی از گونه‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Panis and Lambardi, 2005). شیشه‌ای شدن شامل استفاده از محلول‌هایی با ویسکوزیته و قابلیت آبگیری بالا است (Luo and Reed, 1997).

در این روش محتوای آب نمونه‌ها کاهش می‌یابد و به سطحی می‌رسد که کریستال یخی تشکیل نشود و آب باقیمانده، مستقیماً از فاز مایع به فاز بی‌شکل انتقال یابد. در این حالت خطری از جانب فاز بی‌شکل اجزای سلولی را تهدید نخواهد کرد. از طرفی با استفاده از این روش می‌توان از تشکیل کریستال یخی بدون آنکه کاهش قابل‌توجهی در آب درون‌سلولی مشاهده شود جلوگیری کرد (Panis and Lambardi, 2005). به‌منظور انجام فرایند شیشه‌ای شدن، کاهش میزان آب سلول به ۳۰-۲۰٪ ضروری است (Wolf and Bryant, 1999).

– کپسوله-آبگیری (Encapsulation-Dehydration)

روش کپسوله-آبگیری یکی از روش‌های تکنولوژی حفاظت فراسرد است. این تکنیک یکی از دستورالعمل‌های پایه‌ای و مهم حفاظت فراسرد است که تاکنون با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش ریزنمونه‌ها در مهره‌های آلژینات کپسوله می‌شوند و در محلول‌های سوکروز با غلظت بالا پیش‌تیمار می‌گردند و پس از خشک شدن به روش‌های مختلف، در نیتروژن مایع غوطه‌ور می‌گردند. سپس مهره‌ها پس از خروج از نیتروژن مایع و ذوب شدن در حمام آب گرم به محیط بازبازی مناسب منتقل می‌گردند (Blakesley *et al.*, 1995).

– کپسوله-شیشه‌ای شدن (Encapsulation-Vitrification)

این روش، یکی از مورد اعتمادترین روش‌هاست که تلفیقی از دو روش قبلی است و می‌تواند برای حفاظت ماده ژنتیکی گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (Panis and Lambardi, 2005).

۱-۲-۵- پیش رشد

این روش شامل کشت نمونه‌ها در حضور نگه‌دارنده‌های سرمایی و انجماد سریع با غوطه‌وری آنها به طور مستقیم در نیتروژن مایع است و تاکنون برای بافت‌های مریستمی گیاه *Musa* مورد استفاده قرار گرفته است (Panis *et al.*, 2002).

- پیش رشد-آبگیری

در این تکنیک ریزنمونه‌ها در حضور نگه‌دارنده‌های سرمایی کشت‌شده، زیر هود لامینار و یا استفاده از سیلیکاژل آبگیری می‌شوند و سپس به سرعت منجمد می‌گردند. این روش به‌خصوص برای قطعات ساقه‌های گیاه مارچوبه کشت‌های چند رویانی نخل روغنی و جنین‌های تخمی نارگیل به کار گرفته شده است (Assy-Bah and Engelmann, 1992).

- انجماد قطره‌ای-شیشه‌ای شدن

روش انجماد قطره‌ای در حال حاضر برای جوانه‌های رأسی سیب‌زمینی (Schafer-Menuhr, 1996)، مارچوبه (Mix-Wanger et al., 2003)، سیب (Zhao et al., 1999) به کار می‌رود.

جوانه‌های رأسی با محیط‌های مایع حاوی نگه‌دارنده‌های سرمایی تیمار می‌شوند و سپس به صورت قطره‌های بسیار کوچک همراه با مواد نگه‌دارنده سرمایی روی آلومینیوم فویل قرار داده می‌شوند و به سرعت (برای سیب‌زمینی) یا به آهستگی (برای سیب) در نیتروژن مایع قرار می‌گیرند. برتری چشمگیر این تکنیک‌های جدید، سهولت به کارگیری آن‌هاست. به طوریکه می‌توانند در کشورهای استوایی در حال توسعه، جایی که بزرگ‌ترین ذخایر ژنتیکی گونه‌ها قرار دارد مورد استفاده قرار بگیرند (Engelmann, 2004).

به‌طور واقع‌بینانه انتظار می‌رود که در سال‌های آتی فراسرما نگهداشت یکی از تکنیک‌های معمول برای نگهداشت طولانی‌مدت ذخایر ژنتیکی گیاهان شود (Engelmann, 2004).

نحوه ارزیابی زنده‌مانی و ذخیره‌سازی بذرها

یکی از مسائل مهمی که در حفاظت فراسرد مورد بحث قرار می‌گیرد، زنده‌مانی (Viability) نمونه‌ها پس از خروج از ازت مایع می‌باشد. رشد نیافتن سلول یا بافت در مرحله رشد مجدد نشان‌دهنده نامساعد بودن یکی از تیمارهای فراسرد است. جهت بررسی زنده‌مانی مواد پس از ذوب شدن آن‌ها، یک روش سریع استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی است که عبارت‌اند از:

دی‌استات‌فلورسین یا (Fluorescein Diacetate) FDA: دی‌استات‌فلورسین توسط سلول‌های زنده جذب و به فلورسین تبدیل می‌شود که فلورسنس در UV اندازه‌گیری می‌شود. وجود رنگ سبز در سلول‌ها نشانگر زنده بودن آن است این آزمایش کمی است.

آبی‌ایوانز (Ivans blue) که سلولها در محلول آبی‌ایوانز تیمار شده و سپس از نظر نفوذ با عدم نفوذ رنگ در سلول بررسی می‌شوند. عدم وجود رنگ آبی در سلول‌ها نشانگر زنده بودن آن است.

تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید یا TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) TTC در Formazon کاهش داده می‌شود و در میتوکندری سلول‌های زنده قرمز رنگ می‌شود. این روش جهت سوسپانسیون‌های سلولی، کمی و برای بافت‌های بزرگ و ارگان‌ها کیفی می‌باشد (Engelman, 1999).

جوانه‌زنی: ویژگی‌های بذر طبق دستورالعمل‌ها از نظر زنده‌مانی، درصد رطوبت بذر، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول گیاهچه اندازه‌گیری می‌گردد. بعد از بدست آوردن بهترین پروتکل (Protocol) از نظر ویژگی‌های ذکر شده، بذرهای هر گونه پس از اعمال تیمار بهینه در تانک‌های نیتروژن مایع مخصوص و کدگذاری ذخیره می‌شود و کلیه اطلاعات در سایت بانک اطلاعاتی کرایوبانک موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ضبط می‌شود.

جمع‌بندی

ایجاد بانک فراسرد گونه‌های منابع طبیعی کشور، یک طرح راهبردی و بلندمدت ملی است که نوید حفاظت بسیار طولانی مدت، کم‌هزینه و ایمن ذخایر توارثی گیاهی کشور را می‌دهد. با این اقدام مدبرانه و در اولویت قرار گرفتن گونه‌های در معرض انقراض، در معرض تهدید و گونه‌های نادر و انحصاری، می‌توان مطمئن و امیدوار بود که در آینده شاهد انقراض گونه‌های منابع طبیعی کشور نباشیم. همچنین در صورت نیاز می‌توان گونه منقرض شده را دوباره به طبیعت برگرداند.

- Assy-Bah, B. F. Engelman. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera*) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryoletters*, 13: 117-126
- Avrami, M. 1941. Kinetics of phase change 3. Granulation, phase change, and microstructure. *Journal of chemical physics*, 9: 177-184
- Blakesley, D., S. AL-Mazrooi and G.G. Henshaw. 1997. Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato. (*Ipomoea batatas*): Use of sucrose and dehydration for cryopreservation. *Plant Cell Reports*. 15: 259- 263.
- Condello, E., M. palombi, m. Tonelli, C. Damiano, E. Caboni. 2009. Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyrausta*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Cryoletters*. 18(18): 136-143.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation progress and prospects. *In vitro cell and Dev. Bio- plant*, 40: 427-433.
- Jalili, A. Jamzad, Z. (1999): Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests & Rangelands, 748pp. Tehran
- Jokipii, S., L. Ryynanen, P.T. Kallio, T. Aronen and H. Haggman. 2004. A cryopreservation method maintaining the genetic of a model forest tree, *Populus tremula* l x *Populus tremuloides* michx. *Plant science*, 166: 799- 806.
- Li, Z.A., Du, Y.Q and Wang Z.C. 2013. Effect of cryopreservation on the efficiency of exogenous gene, genetic transformation and expression level of *Arabidopsis thaliana*. *Electronic journal of biotechnology*, 16(6).
- Luo, J. and B.M. Reed. 1997. Absciscic acid responsive protein, BOVIN Serum Albumin, and praline pretreatments improve recovery of in vitro currant shoot- tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 34: 240- 250.
- Matsumoto, T., T. Akihiro, S. Maki, K. Mochida, M. Kitagawa, D. Tanaka, S. Yamamoto and T. Niino. 2013. Genetic stability assessment of Wasabi plants regenerated from long- term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis.
- Mazur, P. 2004. The freezing of biological systems. *Cryobiology*. 168: 939- 949.
- Mix- Wanger, G., A.J. Conner and R.J. Cross. 2000. Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the droplet method. *NZJ. Crop Hort. Sci*, 28: 283- 287.
- Panis, B. and M. Lambardi. 2005. Status of cryopreservation technology in plant (Crops and forest trees). *The rol of biotechnology*, 43- 50.
- Panis, B., H. Strosse, S.V.D. Hende and R. Swennen. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem culture. *Cryoletters*, 23(6): 375- 384.
- Peredo, E.L., R. Arroyo- Garcia, B.M. Reed and M.A Revilla. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold- stored hops (*Humulus lupulus* L). *Cryobiology*, 224- 234.
- Purohit, S.S. 2004. Plant tissue culture. Student Edition, 366p. Contents: preface. 1: 228- 238.
- Schafer- Menuhr, A. 1996. Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final report for the period. Rom. IPGRI.
- Scocchi, A., M. Falici, R. Medina, S. Olmos and L. Mroginski. 2004. Plant recovery of cryopreserved apical meristems- tips of *Melia azadarach* L. using encapsulation/ dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica*. 135: 29- 38.
- Walters, C., L.J. Wheeler, and P.C. Stanwood. 2004. Longevity of cryogenically- stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229- 244
- Wolf, J. and G. Bryant. 1999. Freezing drying and/ or vitrification of membrane solute water system. *Cryobiology*, 39: 129- 130.
- Zhai, Z., Y. Wu, F. Engelmann, R. Chen and Y. Zhao. 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultures grape and kiwi shoot tips using RAPD. *Cryoletters*, 24(5): 315- 322
- Zhao, Y., Y. WU, F. Engelmann, M. Zhou and S. Chen. 1999. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips the droplet freezing method. *Cryoletters*, 20: 109- 112.