

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

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

## دستورالعمل فنی

روش ذخیره بذرهای دو گونه جنگلی

مورد (*Myrtus communis* L.) و آکاسیا (*Acacia nilotica*)

در فراسرد

نگارش:

لیلاسادات میرجانی

میترا امام

عباس قمری زارع

زهرا آبروش

سیدموسی صادقی

۱۴۰۳

کد مصوب	عنوان پروژه منتج به دستورالعمل فنی
12-09-09-058-97015-970605	حفظ ذخیره ژنتیکی بذرهای دو گونه جنگلی مورد ( <i>Myrtus communis</i> L.) و آکاسیا ( <i>Acacia nilotica</i> ) در شرایط فراسرد



**عنوان نشریه:** روش ذخیره بذرهای دو گونه جنگلی مورد (*Myrtus communis* L.) و آکاسیا (*Acacia nilotica*) در فراسرد

**نگارندگان:** لیلادادات میرجانی، پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

**میترا امام:** استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

**عباس قمری زارع:** دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

**زهرا آبروش:** پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

**سیدموسی صادقی:** استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

**تهیه شده در:** مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور / اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی

**مدیر داخلی:** فاطمه عباسپور

**ویراستار ادبی:** اصغر احمدی

**صفحه آرا:** مریم نوبخت

**نشانی:** بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

**تلفن:** ۰۲۱-۴۴۷۸۷۲۸۲-۵ **وبسایت:** www.rifr-ac.ir

**نوبت و سال انتشار:** اول - ۱۴۰۳

این نشریه به شماره ۶۶۱۱۱ در تاریخ ۱۴۰۳/۰۷/۱۵ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

ISBN : 978-964-473-546-2



9 789644 735462

## فهرست مطالب

۱.....	چکیده
۲.....	مقدمه
۴.....	دستورالعمل
۴.....	روش نگهداری بذر مورد ( <i>Myrtus communis</i> L.) در فراسرد
۴.....	روش نگهداری بذر آکاسیا ( <i>Acacia nilotica</i> ) در فراسرد
۷.....	بازبایی بذرهای خارج شده از فراسرد
۸.....	کشت بذرهای بازبایی شده
۹.....	منابع

---

## دامنه:

این شیوه‌نامه برای کلیه کارشناسان، پژوهشگران و اعضای هیئت علمی بخش‌های زیست فناوری، بانک ژن و مؤسسات تحقیقاتی و دانشگاه‌ها قابل استفاده است.

## اهداف آموزشی:

شما خواننده گرامی در این نشریه با نحوه روش آب‌گیری بهینه بذرهای دو گونه آکاسیا و مورد برای نگهداری در فراسرد (Cryopreservation) برای ذخیره طولانی مدت بذرهای آنها آشنا می‌شوید.

---

## چکیده

حفاظت فراسرد (cryopreservation)، ذخیره‌سازی نمونه‌های بیولوژیکی در مخازن پر از نیتروژن مایع، مؤثرترین روش حفظ بلندمدت منابع ژنتیکی گیاهی می‌باشد. این روش جایگزینی برای بانک‌های بذر در شرایط آزمایشگاهی است، که می‌تواند هم برای قسمت‌های تکثیر شده به روش درون شیشه‌ای به صورت رویشی و هم به صورت زایشی (از طریق بذر) استفاده شود. اجتناب از صدمات شیمیایی و فیزیکی در هنگام فراسرد هدف اصلی حفاظت در برابر سرماست. تشکیل یخ خارج سلولی می‌تواند برای یکپارچگی ساختارهای سلولی مضر باشد، اما یخ درون سلولی کشنده است. بنابراین، در تمام روش‌های حفاظت فراسرد، حذف آب نقش کلیدی در جلوگیری از آسیب یخ‌زدگی و ایمن‌سازی زنده‌مانی پس از ذوب نمونه‌های خارج شده از نیتروژن مایع دارد. مورد (*Myrtus communis* L.) درختچه همیشه سبز از خانواده Myrtaceae با خواص دارویی و زینتی می‌باشد. گونه درختی *Acacia nilotica* (L.) Delile از خانواده Fabaceae است و با گرهک‌هایی که در ریشه‌های ظریف خود دارد به‌عنوان تثبیت‌کننده نیتروژن جوی در خاک نقش فوق‌العاده‌ای را در افزایش حاصلخیزی خاک بر عهده دارد. با توجه به ارزش این گیاهان و بومی بودن آنها، حفظ ذخائر توارثی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این نشریه، با نحوه نگهداری بذرهای این دو گونه در فراسرد (cryopreservstion) آشنا خواهید شد.

## مقدمه

از جمله عملکردهای حفاظتی انجام شده در زمینه حفظ گونه‌های گیاهی، ایجاد بانک ژن‌های گیاهی (بانک بذر) و نگهداری بذر گیاهان در شرایط مناسب برای میان‌مدت و یا نگهداری در دمای زیر صفر برای مدت‌های طولانی‌تر است. در شرایط یادشده، بذرها پس از مدتی قوه‌نامیه خود را از دست می‌دهند که برای جلوگیری از نابودی آنها، نیاز به بازکشت بذرها می‌باشد. از سویی، برخی از گونه‌ها، به‌ویژه گونه‌های جنگلی، مدت زمان لازم برای تکمیل رشد رویشی و شروع بذردهی بسیار طولانی دارند. علاوه بر اینکه برخی از بذرها، قوه‌نامیه کمی دارند و یا اینکه به‌سرعت قوه جوانه‌زنی را از دست می‌دهند. از دیگر فعالیت‌های حفاظتی، ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی و مناطق حفاظت شده در عرصه‌های طبیعی می‌باشد. بیش از چند هزار باغ گیاه‌شناسی در جهان ایجاد شده که هزینه مراقبت و نگهداری گونه‌های گیاهی در این باغ‌ها بسیار سنگین و سرسام‌آور است.

حفاظت فراسرد (cryopreservation) به ذخیره‌سازی بافت‌ها در نیتروژن مایع (LN، °C -196)، یا، بخار LN (تقریباً °C -190 تا -165) اشاره دارد. در LN، فرایندهای متابولیک و بیوشیمیایی (از جمله تنفس و فعالیت آنزیمی که منجر به پیری سلول و مرگ سلولی می‌شود) و تقسیم سلولی به‌طور مؤثر متوقف می‌شوند، در نتیجه ذخیره‌سازی طولانی‌مدت را ممکن می‌کند (Li et al., 2019). حفاظت فراسرد تنها روش امکان‌پذیر برای حفظ طولانی‌مدت مواد ژنتیکی از قسمت‌های مختلف گیاهان، به عنوان مثال، گونه‌های بذر غیر ارتدکس (حساس به کم آبی)، گیاهان تکثیرشونده رویشی، گونه‌های کمیاب و در حال انقراض و لاین‌های سلولی ارزشمند گیاهیست (Cruz-Cruz et al., 2013).

از جمله مهم‌ترین مزایای حفاظت فراسرد، می‌توان به حفظ تنوع ژنتیکی با نگهداری

### ◆ روش حفظ ذخیره‌ی بذرهای دو گونه جنگلی مورد و آکاسیا در فراسرد / ۳

گونه‌های وحشی و در معرض انقراض (به‌ویژه برای اصلاح نژاد)، حذف ویروس‌ها از گیاهان آلوده به روش سرمادرمانی جوانه رأسی، حداقل نیازهای ذخیره‌سازی، حفظ پایداری فنوتیپ و ژنوتیپ شرایط ایمن در برابر بیماری‌ها یا آسیب‌های ناشی از محیط‌زیست، بدون نیاز به کشت فرعی مستمر و متوالی و تسهیل تبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسم اشاره کرد (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014). با این حال، توسعه روش‌های مؤثر برای حفاظت فراسرد کار آسانی نیست. مشکلات ناشی از قرار دادن مواد بیولوژیکی در معرض دماهای پایین و فوق کم، شامل تأثیر بر انواع فرایندها، یعنی کاهش یا توقف واکنش‌های بیوشیمیایی (و در نتیجه متابولیسم)، ناپایداری و از دست دادن نیمه نفوذپذیری غشاها، شکستن بافت‌ها و سلول‌ها، پلاسمولیز غیرقابل برگشت و در نهایت مرگ سلولی است (Zamecnik *et al.*, 2021). اجتناب از صدمات شیمیایی و فیزیکی در هنگام حفاظت فراسرد، هدف اصلی حفاظت در برابر سرماست. تشکیل یخ خارج سلولی می‌تواند برای یکپارچگی ساختارهای سلولی مضر باشد، اما یخ درون سلولی کشنده است. بنابراین، در تمام روش‌های حفاظت فراسرد، حذف آب نقش کلیدی در جلوگیری از آسیب یخ‌زدگی و ایمن‌سازی زنده‌مانی پس از ذوب نمونه‌های مشتق‌شده از LN دارد. آن را می‌توان با استفاده از محافظت‌کننده‌های فراسرد به دست آورد. محافظت‌کننده‌های فراسرد ترکیبات شیمیایی هستند که توزیع آب را در داخل/خارج سلولها تعدیل و آنها را کم آب می‌کنند. این مواد باعث افزایش پایداری غشای پلاسمایی، در پایین‌تر از نقطه یخ‌زدگی آنها و افزایش ویسکوزیته سیتوزول می‌شوند و در عین حال از سلول‌ها در برابر صدمات یخ‌زدگی محافظت می‌کنند (Kaviani and Kulus, 2022).

مورد (*Myrtus communis* L.) درختچه همیشه سبز از خانواده Myrtaceae با خواص دارویی و زینتی می‌باشد. گونه درختی *Acacia nilotica* (L.) Delile از خانواده Fabaceae

#### ۴ / روش حفظ ذخیره‌ی بذرهای دو گونه جنگلی مورد و آکاسیا در فراسرد

است و با گرهک‌هایی که در ریشه‌های ظریف خود دارد، به‌عنوان تثبیت‌کننده نیتروژن خاک نقش فوق‌العاده‌ای در افزایش حاصلخیزی خاک بر عهده دارد. با توجه به ارزش این گیاهان و بومی بودن آنها، باعث شده تا حفظ ذخائر توارثی و جلوگیری از فرسایش و انقراض آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد.

### دستورالعمل

بذرهای سالم مورد و آکاسیا را از رویشگاه مورد نظر جمع‌آوری کنید. ابتدا بذر را به وسیله هیپو کلرید سدیم (۱ درصد کلر فعال) به ترتیب به مدت ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه استریل کنید و بعد سه بار با آب مقطر استریل شستشو دهید. بعد از استریل، بهترین تیمار برای بذرهای هر گونه را اعمال کنید و بعد در نیتروژن مایع ( $196^{\circ}\text{C}$ ) قرار دهید.

### روش نگهداری بذر مورد (*Myrtus communis* L.) در فراسرد

بهترین تیمار برای ذخیره‌سازی بذر مورد در نیتروژن مایع، تیمار گلیسرول ۳۰ درصد می‌باشد. در این تیمار، ابتدا بذر را به درون کرایوپوئال‌ها منتقل می‌شوند و کرایوپوئال‌ها توسط گلیسرول ۳۰٪ پر شده و اطراف درب کرایوپوئال‌ها با استفاده از پارافیلیم مسدود می‌گردد، سپس کرایوپوئال‌های حاوی نمونه بلافاصله در نیتروژن مایع ( $196^{\circ}\text{C}$ ) قرار داده می‌شوند.

### روش نگهداری بذر آکاسیا (*Acacia nilotica*) در فراسرد

بهترین تیمار برای ذخیره‌سازی بذر آکاسیا در نیتروژن مایع، تیمار شیشه‌ای شدن می‌باشد. برای تیمار شیشه‌ای شدن دو محلول بارگیری LS و محلول PVS2 مورد نیاز است.

◆ روش حفظ ذخیره‌ی بذرهای دو گونه جنگلی مورد و آکاسیا در فراسرد / ۵

### الف) ابتدا محلول بارگیری LS را بسازید.

این محلول از دو ماده گلیسرول (۲ مولار) و ساکارز (۰/۴ مولار) تشکیل شده است که با محیط کشت پایه MS به حجم می‌رسد. برای ساخت محلول بارگیری به شرح زیر عمل کنید.

#### طرز تهیه محلول ساکارز ۰/۴ مولار:

از آنجایی که وزن مولکولی ساکارز ۳۴۲/۳ گرم می‌باشد. ۱۳۶/۹۲ گرم از آن را وزن کنید و به حجم یک لیتر برسانید (البته چون به این حجم نیاز ندارید به اندازه حجم مورد نیاز وزن کنید).

$$\frac{1}{0.4} = \frac{342/3}{136/92}$$

#### طرز تهیه محلول گلیسرول ۲ مولار:

روی موادی که به صورت مایع هستند نوشته شده که هر لیتر چند گرم می‌باشد. یک لیتر گلیسرول ۱۲۳۰ گرم است.

از آنجایی که وزن مولکولی گلیسرول ۹۲/۱ گرم می‌باشد. ۱۸۴/۲ گرم از آن ۲ مولار می‌شود که چون مایع است ۱۴۹/۷۶ سی‌سی از آن را برداشته و به حجم یک لیتر می‌رسانیم (البته چون به این حجم نیاز ندارید به اندازه حجم مورد نیاز وزن کنید).

$$\frac{1}{2} = \frac{92/1 \cdot 1000}{184/2149/76} = \frac{1230}{184/2}$$

#### طرز تهیه محیط کشت MS:

سپس محیط کشت MS (فقط نمک‌ها و یک‌دوم عناصر ماکرو) مطابق با جدول (۱) زیر

بسازید.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت پایه MS

مواد شیمیایی	غلظت در محیط کشت (میلی‌گرم در لیتر)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	۸۲۵
KNO <sub>3</sub>	۹۵۰
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۱۸۵
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۸۵
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	۲۲۰
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	۱۶/۹
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۸/۶
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	۰/۰۲۵
KI	۰/۸۳
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	۰/۰۲۵
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	۶/۲
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۰/۲۵
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	۳۷/۳
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۲۷/۸

#### طرز تهیه محلول نهایی LS:

در یک بالن با حجم مورد نظر، ابتدا محیط کشت MS را بریزید. بعد گلیسرول ۲ مولار و سپس ساکارز ۰/۴ مولار را کم کم اضافه کنید، بعد به حجم مورد نظر برسانید و به‌منظور استفاده اتوکلاو نمایید (Sakai et al., 1990).

### ب) طرز تهیه محلول PVS2:

محلول PVS<sub>2</sub> از اجزاء زیر تشکیل شده است.

۱) اتیلن گلیکول (۱۵٪ وزن به حجم)

۲) دی‌متیل سولفوکساید (۱۵٪ وزن به حجم)

۳) گلیسرول (۳۰٪ وزن به حجم)

۱۳/۷ درصد وزن به حجم محیط کشت MS با نصف نمک‌های ماکرو حاوی محلول ساکارز

۰/۴ مولار (Sakai *et al.*, 1990)

برای تهیه محلول PVS<sub>2</sub>، ابتدا ۱۵ گرم اتیلن گلیکول، ۱۵ گرم دی‌متیل سولفوکساید (۱۳/۶ سی‌سی) و ۳۰ گرم گلیسرول (۲۴/۴ سی‌سی) را با محیط کشت MS (۱/۲ نمک‌های ماکرو و ساکارز ۰/۴ مولار) مخلوط کنید و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده و بعد اتوکلاو کنید و پس از اتوکلاو در یخچال نگهداری نمایید.

بعد از ساخت محلول‌ها، ابتدا بذرهای آکاسیا را استریل کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بازرگیری قرار دهید. بعد از طی مدت مورد نظر از آن خارج و وارد محلول PVS<sub>2</sub> کنید و به همراه این محلول درون کرایو ویال‌ها قرار داده و به تانک نیتروژن مایع مخصوص ذخیره انتقال دهید.

### بازیابی بذرهای خارج شده از فراسرد

در زمانی که می‌خواهیم بذرها را از نیتروژن مایع خارج و استفاده کنید. ابتدا به‌منظور گرم کردن سریع، نمونه‌ها بلافاصله از تانک نیتروژن خارج و در حمام آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه قرار داده شوند (Englman, 1990). سپس بذرها با سوکروز ۱/۲ مولار به

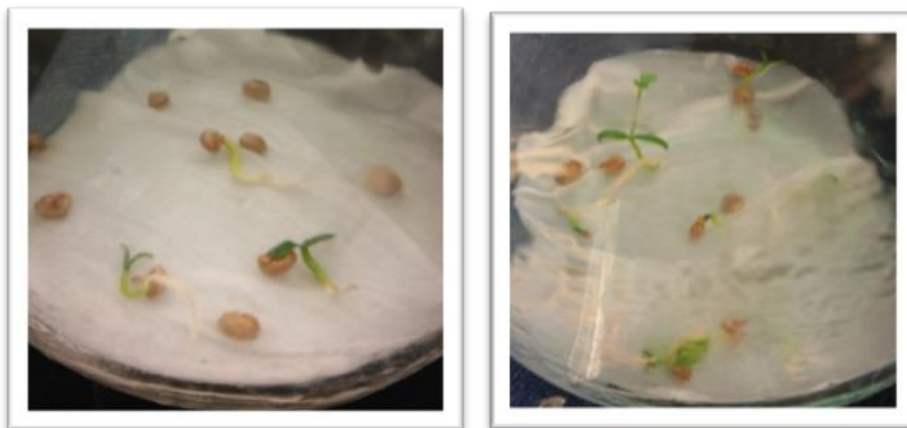
## ۸ / روش حفظ ذخیره‌ی بذرهای دو گونه جنگلی مورد و آکاسیا در فراسرد

مدت ۵ دقیقه شستشو شود. دوباره بذرها با سوکروز ۰/۷۵ مولار به مدت ۵ دقیقه شستشو شوند.

### کشت بذرهای بازیابی شده

سپس بذرهای مورد بر روی پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی نمناکی که قبلاً اتوکلاو شده منتقل شوند. سرپتری‌ها را با پارافیلیم بسته و پتری‌ها به اتاقک رشد دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شوند. بعد از چند روز شروع به جوانه‌زنی می‌کنند (شکل ۱).

بذرهای آکاسیا نیز به مدت ۳۰ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ (برای شکستن خواب بذر) قرار داده و پس از شستشو بر روی پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی نمناکی که قبلاً اتوکلاو شده منتقل شوند. سرپتری‌ها را با پارافیلیم بسته و پتری‌ها به اتاقک رشد دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردند. بعد از چند روز شروع به جوانه‌زنی می‌کنند (شکل ۲).



شکل ۱- جوانه‌زنی بذرهای مورد پس از خارج شدن از فراسرد



شکل ۲- جوانه‌زنی بذرهای آکاسیا پس از خارج شدن از فراسرد

## منابع

- Cruz-Cruz, C.A., Gonzalez-Arno, M.T. and Engelmann, F., 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2, 73–95.
- Engelmann, F. 1990. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation case history: Oil palm somatic embryos. *International Journal of refrigeration*, 13(1): 26- 30.
- Gonzalez-Arno, M.T., Martinez-Montero, M.E., Cruz-Cruz, C.A. and Engelmann, F., 2014. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity Maria Teresa. In *Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity*; Ahuja, M.R., Ramawat, K.G., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; pp. 129–170.
- Kaviani, B. and Kulus, D., 2022. Cryopreservation of Endangered Ornamental Plants and Fruit Crops from Tropical and Subtropical Regions. *Biology*, 11, 847. <https://doi.org/10.3390/biology11060847>
- Li, J.W., Zhang, X.C., Wang, M.R., Bi, W.L., Faisal, M., da Teixeira Silva, J.A., Volk, J.M. and Wang, Q.C., 2019. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp. *Plant Methods*, 15: (125) 2-12.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant cell rep*, 9: 3.
- Zamecnik, J., Faltus, M. and Bilavcik, A., 2021. Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10 (12), 2623.