مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، سال ۱۳۸۰(۶۷۰-۶۶۱)

ذخیره‌سازی طولانی سوسپانسیون سلولی چند رقم برنج (*Oryza sativa* L.) ایرانی به عنوان ژرم‌پلاسم در مافوق سرما

نادعلی بابائیان جلودار[1]، مایک دیوی[2] و ادوارد کوکینگ[3]
۱-دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران ۲و۳- اساتید دانشگاه ناتینگهام انگلستان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۳/۳۰

خلاصه

نگهداری مواد ژنتیکی در مافوق سرما تکنیکی است که در بسیاری از مراکز تحقیقاتی دنیا برای نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهی در مدت زمان طولانی از آن استفاده می‌نمایند. جهت استفاده این تکنیک در نگهداری ژرم‌پلاسم برنج، آزمایشی انجام شده تا دریافته شود سوسپانسیون سلولی را حداکثر چه مدت می‌توان با حفظ باززایی آن درمافوق سرما نگهداری نمود؟ برای این منظور ابتدا در محیط کشت LS2.5 از بذور سه رقم برنج ایرانی (آمل-۳، خزر و طارم) کالوس تولید شد. سپس در محیط کشت‌های مایع AA2 و R2 سوسپانسیون سلولی برای ارقام مختلف تشکیل شد. جهت ذخیره کردن سوسپانسیون سلولی در ازت مایع، سلول‌ها را در محیط کشت‌های مایع AA_2 و R_2 به مدت ۳ الی ۴ روز واکشت[1] نموده سپس ۰/۲ گرم از این سلول‌ها به داخل ظروف کوچک[2] از جنس پولی پروپیلن[3] انتقال داده و همزمان ۰/۷۵ سانتی‌متر مکعب از مخلوط مواد 342.3g/l Sucrose؛ pH 5.8 39 g/l؛ DMSO[4]؛ 46 g/l Glycerol همراه با پرولین ۵ گرم در لیتر اضافه نموده تا سوسپانسیون سلولی بتواند سرمای زیاد را تحمل نماید. بعد از این عمل ظروف حامل سلول‌ها را به مدت یک ساعت در داخل یخ نگهداری نموده و سپس آنها را در داخل ظروف آلومینیومی گذاشته تا به داخل ازت مایع انتقال داده شود. جهت انتقال به داخل تانک ازت مایع ابتدا به مدت ۳۵ دقیقه در دمای منهای ۳۵ °c نگهداری و بعد از آن در مافوق سرما (۱۹۶ °c-) به مدت دوازده ماه نگهداری گردید. بعد از یک سال ظروف از ازت مایع بیرون آورده شد و بلافاصله در داخل آب گرم سترون ۴۵ °c برای مدت یک تا دو دقیقه نگهداری شد. بعد از اینکه سلول‌ها از یخ‌زدگی به حالت اولیه برگشت مواد اضافه شده با پیپت جدا شده و سلول‌ها بر روی محیط کشت نیمه جامد R_2 و AA_2 که روی آن دو فیلتر از نوع واتمن گذاشته شده بود، کشت گردید و در دمای ۱ °c ±۲۶ و در تاریکی نگهداری شد. نتیجه این مطالعه نشان داد که بعد از دوازده ماه نگهداری سلول‌ها در مافوق سرما مجدداً برای همه رقم‌ها سوسپانسیون سلولی تشکیل شد. سوسپانسیون سلولی تشکیل شده برای تولید پروتوپلاست استفاده گردید. ارقام آمل-۳ و طارم در مقایسه با شاهد تقریباً دو برابر افزایش تولید پروتوپلاست داشته ولی رقم خزر در مقایسه با شاهد ۲۰٪ افزایش داشته است. همچنین در مقایسه باززایی پروتوپلاستها با پروتوپلاست‌های شاهد نتایج نشان داد که ارقام آمل -۳ و خزر به طور معنی‌داری کاهش باززایی داشته اما برای رقم طارم در مقایسه با شاهد اختلاف‌معنی‌داری مشاهده نشده است. دراین آزمایش به ترتیب برای ارقام آمل -۳، خزر و طارم تعداد ۲۴، ۳۲ و ۴۹ گیاه سبز به دست آمده است.

واژه‌های کلیدی: سوسپانسیون‌سلولی،برنج،پروتوپلاست،باززایی، مافوق سرما، ژرم‌پلاسم، ذخیره‌سازی طولانی.

مکاتبه کننده: نادعلی بابائیان جلودار

1 . Sub - culture
2 . Vials
3 . Polyprophylene
4 . Dimethyl Sulphoxide

مقدمه

برای حفظ و نگهداری مواد ژنتیکی در مدت زمان طولانی، تکنیک ذخیره‌سازی در مافوق سرما[1] یکی از روش‌هایی است که در حال حاضر در دسترس محققین می‌باشد. در این درجه سرما کلیه فعالیت‌های متابولیسمی و تقسیمات سلولی متوقف می‌شود. از نظر تئوری سلولها و بافت‌ها را می‌توان در چنین شرایطی برای مدت زمان نامحدود نگهداری نمود (۱۰). سلول‌ها را می‌توان به ظروف بسیار کوچک انتقال و سپس آنها را بدون هر گونه آلودگی در محیطی که هزینه نگهداری آنها بسیار پایین است حفظ نمود (۳۰).

یکی از مشکلاتی که در ارتباط با سوسپانسیون سلولی مطرح است این است که آنها قدرت باززایی خود را در مدت زمان اندک، از دست می‌دهند (۱۹ و ۲۶). از طرفی نگهداری سوسپانسیون سلولی در درازمدت مستلزم صرف هزینه زیاد و زمان می‌باشد (۲).

مراحل مختلف ذخیره‌سازی مواد ژنتیکی در مافوق سرما عبارتند از: رشد قبل از انجماد، اضافه کردن مواد حفظ کننده از سرما، سردکردن، ذخیره‌سازی در مافوق سرما و بازیافت آن از مافوق سرما (۶). این مراحل از گونه‌ای به گونه دیگر گیاهی متفاوت است (۱۹). برای رشد قبل از انجماد مواد ژنتیکی و آماده کردن آنها برای تحمل آسیب شدید مافوق سرما، از موادی نظیر ساکارز، سوربیتول، مانیتول، دی متیل سولفوکسید (DMSO) یا پلی اتیلن گلیکول[2] استفاده می‌شود. این مواد با کاهش میزان آب سلولی درصد زنده ماندن سلول‌ها را بعد از ذخیره‌سازی در مافوق سرما افزایش می دهند. به خصوص در سلول‌هایی که دارای واکوئولهای بزرگ هستند، مواد فوق تاثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش درصد زنده‌مانی این نوع سلولها خواهند گذاشت (۶ و ۲۹). مانیتول با کاهش حجم سلول سبب افزایش میزان زنده‌مانی سلول‌ها بعد از تحمل مافوق سرما می‌شود (۳۱ و ۳۲). ایزومر مانیتول یعنی سوربیتول برای نگهداری سوسپانسیون سلولی کلم، سویا و داتوره در مافوق سرما استفاده شده است(۲۸). پلی اتیلن گلیکول برای نگهداری کلم در مافوق سرما استفاده شده است تا سلول‌ها حالت شیشه‌ای[3] به خود بگیرند و از آسیب سرما جلوگیری شود و یا آسیب یخ‌زدگی سلولی به حداقل برسد (۱۶). اضافه نمودن موادی نظیر DMSO یا گلیسرول به بافت‌های گیاهی تقریباً یک ساعت قبل از انجماد، از نفوذ آب به داخل سلول جلوگیری می‌کند و در نتیجه نقطه یخ‌زدگی داخل سلول پایین می‌آید و بدین ترتیب نه تنها آسیب انجماد کاهش می‌یابد بلکه از آسیب بازیافت از انجماد هم جلوگیری می‌شود. از طرف دیگر نیز شکل‌گیری کریستال یخ چه در زمان منجمد کردن و چه در زمان برگشت از انجماد هم جلوگیری می کند و بدین ترتیب میزان اسیب به غشا و ارگانلهای سلولی به حداقل خود می‌رسد (۲۷). اگر سلول‌های منجمد شده خیلی آهسته از حالت انجماد بازیافت شوند. بلحاظ شکل‌گیری کریستال یخ باعث آسیب به آنها می‌گردد لذا جهت به حداقل رساندن آسیب ذکر شده باید سلول‌ها را به سرعت در داخل‌حمام‌آب گرم حاوی آب ولرم سترون با ۴۵ °c حرارت قرار داد تا از شکل‌گیری کریستال‌های یخ جلوگیری شود (۱۹).

عملیات بازگشت سلول‌ها از حالت انجماد باید در تاریکی صورت پذیرد تا از آسیب اکسیداسیون نوری جلوگیری گردد. این موضوع اولین بار توسط بنسون و همکاران در سال ۱۹۸۹ برای نگهداری مریستم‌های سیب‌زمینی به عنوان ژرم‌پلاسم در مافوق سرما گزارش شده است (۷). همه مواد جلوگیری کننده از آسیب سرما که قبل از انجماد به محیط کشت سلول اضافه می‌شود در درازمدت سمی هستند و بایستی به نوعی از دسترس سلولها و بافت‌های گیاهی خارج گردند. جهت جدا کردن مواد مورد نظر، سلول‌ها پس از بازیافت از انجماد، روی فیلتر کاغذی دو لایه که بر روی محیط کشت نیمه جامد قرار می‌گیرد، کشت می‌شوند (۱۰ و ۱۸). بهترین نشانه زنده بودن سلول‌ها پس از بازیافت از انجماد، ادامه رشد این سلولها روی محیط کشت است اما تکنیک‌های دیگری نظیر استفاده از روش رنگ‌آمیزی حیاتی[4] با فلوروسنت یا آزمون تری فنیل تترازولیوم کلرید[5] (TTC) برای دریافت سریع وضعیت زنده بودن سلول‌ها هم استفاده می‌شود (۲۵).

1 . Cryopreservation
2 . Polyethylene Glycol (PEG)
3 . Vitrification
4 . Vital Stains
5 . Triphenyl Tetrazolium Chloride

گزارش‌های متعددی مبنی بر باززایی گیاه پس از دریافت از سوسپانسیون سلولی ذخیره شده در مافوق سرما وجود دارد. لینچ و همکاران پس از ۸ ماه نگهداری سوسپانسیون سلولی برنج از نوع ژاپونیکا در مافوق سرما گزارش نموده‌اند که باززایی آنها به اندازه باززایی سوسپانسیون سلولی شاهد بوده است. همچنین باززایی از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما برای گیاهانی نظیر گندم (۱۵)، کلم (۸)، مارچوبه (۲۳)، جو (۱۲)، لولیوم جاپونیکم[1] (۲۰) و شبدر (۳۴) نیز گزارش شده است.

با توجه به اهمیت سوسپانسیون به عنوان منبع تولید پروتوپلاست در غلات، هدف این مطالعه ارزیابی نگهداری سوسپانسیون سلولی برنج‌های ایرانی به عنوان ژرم‌پلاسم در مافوق سرما بوده است.

مواد و روش‌ها

بذور ارقام برنج طارم، خزر و آمل – ۳ پس از دریافت از موسسه تحقیقاتی برنج آمل، جهت مشخص کردن تیپ آنها به موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) واقع در فیلیپین ارسال شد. پس از مطالعه با ایزوزایم مشخص شد طارم و خزر از نوع ژاپونیکا و آمل – ۳ از تیپ ایندیکا است.

بذور ارقام فوق پس از جدا کردن گلوم و گلومل، ضد عفونی شده و با قرار دادن روی محیط کشت LS (۱۷) حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بعد از ۴ هفته کالوس بدست آمد. جهت تولید کالوس‌های رویانزا[2] مجدداً روی همان محیط کشت واکشت گردید. جهت تشکیل سوسپانسیون سلولی، به میزان یک گرم از کالوس‌های فوق در ارلن مایر ۲۵ سانتی‌متر مکعبی که حاوی ۱۰ سانتی‌متر مکعب از محیط کشت‌های مایع AA_2 (۲۲) و R_2 (۲۴) بوده، انتقال یافته و سپس روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵±۱ °c در تاریکی نگهداری شد. سوسپانسیون سلولی ارقام آمل – ۳ و خزر در محیط کشت AA_2 و سوسپانسیون سلولی رقم طارم در محیط کشت R_2 بدست آمد. در ماه اول هفته‌ای دو بار واکشت انجام می‌شد، بدین ترتیب که محیط کشت قدیم با همان حجم محیط کشت جدید جایگزین می‌شد. سپس محیط کشت همراه با کالوس به ارلن مایر ۵۰ سانتی‌متر مکعبی انتقال یافته و هفته‌ای یکبار با ۲۰ سانتی‌متر مکعب از محیط کشت جدید جایگزین می‌گردید، به این ترتیب بعد از ۳ تا ۶ ماه، سوسپانسیون سلولی برای ارقام فوق تشکیل شد. جهت آماده کردن سوسپانسیون سلولی برای تحمل شرایط مافوق سرما، یک سانتی‌متر مکعب از سوسپانسیون سلولی قبل از ذخیره نمودن در مافوق سرما، در ۲۶ سانتی‌متر مکعب محیط کشت‌های AA_2 (برای ارقام آمل – ۳ و خزر) و R_2 (برای طارم) که حاوی ۶۰ گرم در لیتر مانیتول بود، انتقال یافت. سه الی چهار روز بعد یک سانتی‌متر مکعب از سوسپانسیون سلولی را با پیپت برداشته و روی میکروغربال[3] سترون با قطر سوراخ‌های ۴۵ µm، انتقال داده تا محیط کشت از دسترس سلول‌ها خارج شود. سپس ۰/۲ گرم از سلول‌ها را به داخل ظروف کوچک از نوع پولی پروپیلن انتقال داده و ۰/۷۵ سانتی‌متر مکعب از مخلوط مواد حفظ کننده از سرما؛ Sucrose 342.3 g/l، pH=5.8، 39 g/l ، DMSO؛ Glycerol ،46 g/l (همراه با پرولین ۵ گرم در لیتر) به آنها اضافه شد. هر یک از ظروف کوچک را تکان داده تا این مواد با سلول‌ها مخلوط شود (۲۱). ظروف کوچک حاوی سلول‌ها را داخل ظروف آلومینیومی گذاشته و سپس یک ساعت قبل از اینکه به انبار ذخیره نیتروژن انتقال داده شوند در داخل حمام آب یخ قرار داده شدند تا دمای آنها پایین بیاید. سلول‌ها را با استفاده از روش ویترزو کینگ (۳۱) و با استفاده از یک دستگاه فریزری که مجهز به برنامه کامپیوتری بوده به داخل نیتروژن مایع انتقال داده شد. در این روش ابتدا به سلول‌ها اجازه داده می‌شود در هر دقیقه یک درجه سانتی‌گراد برودت آنها افزایش یابد. تا اینکه برودت این سلول‌ها ظرف مدت ۳۵ دقیقه، به منهای ۳۵°c برسد و بعد از آن برای مدت طولانی در ازت مایع (-۱۹۶ °c) ذخیره می‌شود.

بعد از دوازده ماه نگهداری سوسپانسیون سلولی در مافوق سرما، سلول‌ها از ازت مایع بیرون آورده شد و بلافاصله در حمام آب گرم که حاوی آب ولرم سترون ۴۵ °c بود به مدت یک تا دو دقیقه نگهداری شد. وقتی که سلول‌ها از حالت انجماد خارج

1 . Lolium japonicum
2 . Embryogenic Callus
3 . Sieves

شدند مواد نگهداری کننده از سرما[1] با استفاده از میکروپیپت[2] از دسترس سلول‌ها خارج شدند. سلول‌ها روی فیلترهای کاغذی دو لایه از نوع واتمن که قطر آنها ۵/۵ سانتی‌متر بود و در داخل پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری روی محیط کشت‌های AA_2 (برای ارقام طارم و آمل – ۳) و R_2 (برای رقم خزر) قرار داشت، کشت گردیدند. بدین ترتیب محتویات هر ظرف کوچک در داخل یک پتری دیش ۹ سانتی‌متری انتقال داده شد. پتری‌دیشها با نسکوفیلم[3] بسته و در تاریکی در دمای ۲۶±۱ °c نگهداری شدند. جهت اینکه مواد نگهداری کننده از سرما سریعتر از دسترس گیاه خارج شوند بعد از سه روز سلول‌ها روی محیط کشت جدید واکشت شدند. جهت جلوگیری از آسیب اکسیداسیون نوری کلیه عملیات بازیافت سلول‌ها از حالت انجماد، در تاریکی بانور بسیار کم انجام شد.

پنج روز بعد از کشت سلول‌ها، درصد زنده بودن سلول‌ها از روش کاهش تری‌فنیل تترازولیوم کلرید (TTC) (۲۵) اندازه‌گیری شد. سه سانتی‌متر مکعب از TTC (۰/۶ درصد وزنی به حجمی) در بافر Na_2HPO_4 (۵ درصد مول) و توئین[4] ۸۰ (۵ درصد حجمی) با pH=۷/۴ همراه با ۵۰ میلی‌گرم سلول‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ ۱۶ سانتی‌متر مکعبی انتقال داده شد. سلول‌ها در تاریکی در ۲۸ °c برای ۱۲ تا ۱۸ ساعت نگهداری شدند. سپس ۱۰ سانتی‌متر مکعب اتانول ۹۵٪ به هر لوله سانتریفیوژ اضافه شد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در حرارت °c ۱۰۰ در حمام آب گرم در حال جوش نگهداری شدند تا نمک تترازولیوم از سلول‌ها استخراج شود. بعد از این مرحله لوله‌های سانتریفیوژ از حمام آب گرم بیرون آورده و به محتویات هر یک از آنها با اضافه نمودن الکل ۹۵ درصد به ۷ سانتی‌متر مکعب رسانده شد. میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. این عمل برای سلول‌های شاهد (انجماد نشده) انجام شد و درصد زنده‌ماندن هر یک از نمونه‌ها در مقایسه با شاهد بیان شد. سوسپانسیون سلولی تشکیل شده برای تولید بازیافت از انجماد، با استفاده از روش بابائیان (۳) تشکیل شد، سوسپانسیون سلولی تشکیل شده برای تولید پروتوپلاست مورد استفاده قرار گرفت. پروتوپلاست‌ها از سوسپانسیون‌های هر ۳ رقم و شاهد با استفاده از روش بابائیان و همکاران (۴) استخراج شد. میزان عملکرد، درصد زنده بودن پروتوپلاست‌ها و درصد استخراج خودبخودی آنها بر اساس روش بابائیان و همکاران (۴) اندازه‌گیری شد. پروتوپلاست‌ها به میزان $۰/۲\times۱۰^{۶}$ با استفاده از روش آنتونی و همکاران (۱) روی محیط کشت KPR (۱۴) با استفاده از روش کشت پرستار[5] کشت گردیدند. درصد کالوس‌ها بعد از ۲۸ روز از کشت پروتوپلاست با استفاده از استریومیکروسکوپ محاسبه گردید. هنگامی که قطر کالوس‌ها به ۱ تا ۲ میلی‌لیتر رسید (۵ تا ۸ هفته) روی محیط کشت باززایی[6] (MSKN) که دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳٪ وزنی به حجمی (w/v) ساکارز و با pH=۵/۸ بود، انتقال داده شد. پتری دیش‌ها با نسکوفیلم بسته و در دمای ۲۶±۱ °c در تاریکی نگهداری شد. کالوس‌ها به تدریج بعد از دو هفته شروع به باززایی نمودند. برای تکثیر گیاهان تولیدی از محیط کشت ریزازدیادی[7](MSBP) استفاده شده است. همچنین برای ایجاد ریشه از محیط کشت ریشه‌زایی[8] (MSN1.5) و تحت شرایط نور فلورسنت استفاده شده است. با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید و از روش آزمون t – استیودنت و روش دانکن مقایسه میانگین‌ها انجام شد.

نتایج و بحث

با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که کالوس‌ها از بذور ارقام طارم، آمل – ۳ و خزر تولید شد. کالوس‌های تولید شده در ارقام مختلف با هم اختلاف معنی‌داری نداشته‌اند. درصد کالوس‌های رویانزا رقم طارم به طور معنی‌داری بیشتر از دو رقم دیگر بوده است. همچنین با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که کالوس‌های رقم آمل – ۳ به طور معنی‌داری در تولید ریشه با دیگر ارقام تفاوت داشته‌اند. کالوس رویانزای تمام ارقام مورد

1 . Cryoprotectant
2 . Pasteur pipette
3 . Nescofilm
4 . Tween
5 . Nurse Culture
6 . Plant Regeneration Medium
7. Plant Micropropagation Medium
8 . Plant Rooting Medium

مطالعه برای تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شده است. بعد از ۳ تا ۵ ماه سوسپانسیون سلولی برای هر سه رقم تشکیل شد. سوسپانسیون تمام ارقام جنین‌زا و دارای قدرت باززایی مطلوب بوده‌اند. سوسپانسیون سلولی هر سه رقم بعد از ۶ ماه از تشکیل، در مافوق سرما ذخیره شدند.

بعد از ۱۲ ماه ذخیره‌سازی سوسپانسیون سلولی در مافوق سرما هر یک از ظروف کوچک با محتوی سوسپانسیون سلولی به طور مستقیم در داخل حمام آب گرم حاوی آب ولرم سترون ۴۵ °c انتقال داده شد. بعد از اینکه سلول‌ها از حالت یخزدگی بیرون آمدند همراه با شاهد (بدون ذخیره‌سازی در مافوق سرما) روی فیلترهای کاغذی از نوع واتمن که به صورت دو لایه روی محیط کشت‌های AA_2 و R_2 گذاشته شده بودند کشت گردیدند. دو لایه کردن کاغذ فیلتر سبب می‌شود که مواد اضافه شده سریع از دسترس سلول‌ها خارج شود و بدین ترتیب آسیب دیدن سلول‌ها به حداقل برسد (۱۸). این سلول‌ها ۶ الی ۱۰ روز بعد از کشت از نظر رنگ و رشد به حالت اولیه برگشت نمودند. تجزیه آماری نشان داده است که سلول‌های بازیافت شده از مافوق سرما، در مقایسه با شاهد از رشد کمتری برخوردار بودند (جدول ۲). رشد سلول‌ها روی محیط کشت بهترین گواه زنده ماندن سلول‌هاست، اما میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از روش TTC برای هر سه رقم همچنانکه در جدول ۳ آمده است محاسبه گردید. این روش شامل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دهیدروژناز[1] سلولها است تا TTC را احیا کند و به محصولات فورمازان قرمز[2] تبدیل نماید که این مواد با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. تجزیه آماری نشان داده است که اختلاف بسیار معنی‌داری بین قدرت زنده ماندن سلول‌های شاهد و سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما مشاهده شده است. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، واریته خزر بالاترین قدرت زنده بودن سلول‌ها و ارقام آمل – ۳ و طارم کمترین را در مقایسه با شاهد دارا بوده‌اند (جدول ۳).

از سلول‌های بازیافت شده در مافوق سرما سوسپانسیون سلولی تشکیل شد. سوسپانسیون سلولی تشکیل شده به عنوان یک منبع جهت تولید پروتوپلاست استفاده گردید.

سوسپانسیون‌های تمام ارقام در مقایسه با شاهد به صور معنی‌داری افزایش در تولید پروتوپلاست نشان دادند (جدول ۴). البته پروتوپلاست‌های الحاق یافته خود بخودی که یک ارزش منفی در استخراج پروتوپلاست محسوب می‌شود در بین پروتوپلاست‌های تولید شده از سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما بیشتر از شاهد بوده است (جدول ۴). درصد زنده بودن پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما استخراج شده‌اند در مقایسه با درصد زنده بودن پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی شاهد استخراج شده‌اند تفاوت معنی‌دار نشان نداده‌اند (جدول ۵).

میزان ۰/۲ سانتی‌متر مکعب محیط کشت KPR که حاوی ۲×۱۰^{۵} پروتوپلاست بود با استفاده از روش کشت پرستار روی فیلترهای کاغذی از نوع واتمن که روی محیط کشت نیمه جامد KPR گذاشته شده بود، کشت گردیدند. بعد از ۲ تا ۳ هفته کالوس‌های رویان‌زا تولید شده که قطر آنها ۱ تا ۲ میلی لیتر بوده است. تجزیه آماری نشان داده است که در بین ۳ رقم، طارم بیشترین درصد تولید کالوس را دارا بوده است. اما در مقایسه بین ۳ رقم با شاهد آنها، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در تولید کالوس مشاهده نشده است (جدول ۶). این موضوع نشان می‌دهد که مافوق سرما تاثیری در تولید پروتوپلاست‌های سوسپانسیون سلولی نگذاشته است. کالوس‌های به دست آمده از سوسپانسیون سلولی که قطر آنها ۱ تا ۲ میلی‌متر بوده و ۶ تا ۸ هفته عمر داشته‌اند روی محیط کشت باززایی انتقال داده شدند. ظرف مدت ۳ تا ۴ هفته بعد از کشت، باززایی مشاهده شده است. همان‌طور که در جدول ۶، مشاهده می‌شود تولید گیاه از پروتوپلاست‌های هر سه رقم کاهش یافته است، اما این کاهش از لحاظ آماری برای طارم معنی‌دار نبوده است، لکن باززایی برای آمل – ۳ و خزر به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

گزارش‌های متعددی در ارتباط با ذخیره‌سازی سوسپانسیون سلولی برنج، بازیافت آن از مافوق سرما، تولید پروتوپلاست و باززایی از آن وجود دارد (۲۱، ۱۹ و ۱۳). در مطالعه حاضر از دو رقم برنج از نوع ژاپونیکا ایرانی (طارم و خزر) و یک رقم ایندیکا (آمل –۳) استفاده شده است. رشد سلول‌ها پس از انتقال

1 . Dehydrogenase

2 . Red Formazan

سلول‌ها از مافوق سرما روی محیط کشت سریع بوده است که این موضوع با نتایج لینچ و همکاران (۱۹)، هوآنگ و همکاران (۱۳) مطابقت دارد.

پروتوپلاست‌های استخراج شده از سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما، دارای میزان درصد زنده‌مانی بالا بودند. پروتوپلاست‌ها بعد از تقسیم، کالوس تولید نمودند اما درصد باززایی آنها در مقایسه با شاهد برای هر سه رقم کاهش یافته که این موضوع توسط کورنجو و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش شده است (۹). زو و ارل در سال ۱۹۹۵ در مورد ذخیره‌سازی در مافوق سرما، بازیافت سوسپانسیون سلولی و همچنین استخراج پروتوپلاست از این سلول‌ها و باززایی از پروتوپلاست‌های ۳ رقم برنج از نوع ژاپونیکا گزارش نموده‌اند که رقم IR58024A کمترین میزان پروتوپلاست را تولید نموده اما حداکثر باززایی را بین سه رقم مورد مطالعه داشته است (۳۳). لینچ و همکاران (۱۹) و هوآنگ و همکاران (۱۳) گزارش نموده‌اند که مافوق سرما تاثیر منفی شدیدی روی میزان پروتوپلاست‌ها و باززایی آنها نداشته است.

یکی از مشکلات نگهداری سوسپانسیون سلولی برنج، از دست دادن قدرت باززایی آن است که بعد از حداکثر ۱۵ تا ۲۰ ماه از تشکیل سوسپانسیون سلولی اتفاق می‌افتد (۱۲، ۱۱ و ۵). از طرفی نگهداری سوسپانسیون سلولی مستلزم صرف هزینه و وقت زیاد می‌باشد. بدین رو سوسپانسیون سلولی با دارا بودن حجم کم و درصد بالای باززایی، یکی از بهترین شکل ماده ژنتیکی است که می‌توان برای مدت زمان طولانی در مافوق سرما ذخیره و نگهداری نمود.

سپاسگزاری

از مسئولین دانشگاه مازندران و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به دلیل فراهم آوردن اعتبار این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از خانمها زینت‌السادات ابراهیم‌زاده و معصومه ذبیح‌نژاد به خاطر تایپ سپاسگزاری می‌شود. از پل آنتونی تکنسین بخش ذخیره‌سازی مواد ژنتیکی دانشگاه ناتینگهام به خاطر همکاری در آماده نمودن تجهیزات تشکر و قدردانی می‌شود.

جدول ۱- فراوانی کالوس‌های تولید شده از ارقام مختلف برنج

ارقام	درصد بذرهایی که کالوس تولید نموده‌اند (انحراف معیار ± میانگین)	درصد کالوس‌هایی که ریشه تولید نموده‌اند (انحراف معیار ± میانگین)	درصد کالوس‌هایی که رویانزا بوده‌اند (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۸۴±۱/۸۸ a	۲/۶۷±۰/۹۴ b	۶۸±۴/۳۳ a
خزر	۷۸±۲/۵۰ b	۵/۳۳±۰/۵۱ b	۴۳/۳۳±۳/۴۰ b
آمل-۳	۸۴/۲۷±۱/۵۹ a	۱۲/۸±۰/۹۳ a	۶۴/۴۱±۲/۸۱ a

در هر ستون میانگین‌هایی که در یک حرف مشترک هستند، طبق آزمون دانکن در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول ۲- رشد سلول‌ها پس از بازیافت از مافوق سرما (۱۹۶ °c-) روی محیط کشت AA_2 و R_2

ارقام	درصد افزایش وزن سلول‌های شاهد بعد از ۳ هفته از کشت (انحراف معیار± میانگین)	درصدافزایش‌وزن‌سلول‌های‌بازیافت‌شده‌ازمافوق سرما بعد از ۳ هفته از کشت (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۱۵۰/۲۳±۶/۶۱	۱۳۱/۲۹±۳/۶۸**
خزر	۱۵۶/۹۶±۶/۸۳	۱۳۸/۷۰±۳/۵۰**
آمل-۳	۱۴۷/۲۰±۴/۰۹	۱۲۹/۱۸±۳/۴۶**

** معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۳- کاهش TTC سلول‌های برنج ذخیره شده در مافوق سرما (۵۰ میلی گرم وزن تازه) بعد از ۱۵ روز از کشت

ارقام	سوسپانسیون سلولی شاهد (انحراف معیار± میانگین)	سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول های بازیافت شده از مافوق سرما (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۰/۸۷±۰/۰۶**	۰/۱۹±۰/۰۲
خزر	۱/۶±۰/۱۱**	۰/۵۳±۰/۰۲
آمل – ۳	۱/۵۸±۰/۰۸**	۰/۲۳±۰/۰۳

** معنی دار در سطح ۱٪

جدول ۴- پروتوپلاست‌های تولیدی و درصد پروتوپلاست‌های الحاق یافته خودبخودی از سوسپانسیون سلولی

ارقام	سوسپانسیون سلولی شاهد (بدون ذخیره در مافوق سرما)		سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول های ذخیره شده در مافوق سرما	
	عملکرد پروتوپلاست از یک گرم سوسپانسیون سلولی ($۱۰^۶$×۱) (انحراف معیار ± میانگین)	درصدالحاق‌خودبخودی‌ازیک گرم سوسپانسیون سلولی ($۱۰^۶$×۱) (انحراف معیار ± میانگین)	عملکرد پروتوپلاست از یک گرم سوسپانسیون سلولی ($۱۰^۶$×۱) (انحراف معیار ± میانگین)	درصدالحاق‌خودبخودی‌ازیک گرم سوسپانسیون سلولی ($۱۰^۶$×۱) (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۳/۴۸±۰/۴۰	۴/۹۶±۰/۷۲	۸/۲۲±۰/۱۲**	۱۱/۹۶±۰/۸۰**
خزر	۱۰/۱۰±۰/۹۶	۱/۶۵±۰/۲۹	۱۲/۹۸±۰/۸۴**	۷/۱۱±۰/۲۸**
آمل – ۳	۳/۴۰±۰/۱۲	۷/۹۶±۰/۷۲	۹/۲۱±۰/۲۵**	۱۲/۲۳±۰/۹۳**

** معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۵- درصد زنده بودن پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی استخراج شده اند

ارقام	پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی شاهد استخراج شده‌اند (انحراف معیار ± میانگین)	پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما استخراج شده‌اند (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۹۲/۰۰±۱/۱۵	۹۰/۲۹±۲/۲۴
خزر	۹۷/۷۳±۲/۳۱	۸۶/۲۷±۱/۷۸
آمل – ۳	۸۹/۲۰±۳/۴۰	۸۴/۷۳±۳/۱۲

جدول ۶- فراوانی کالوس‌های تولید شده از کشت پروتوپلاست و درصد باززایی از آنها

ارقام	پروتوپلاست از سوسپانسیون سلولی اولیه و بدون ذخیره در مافوق سرما به عنوان شاهد		پروتوپلاست از سوسپانسیون سلولی تشکیل شده از سلول‌های ذخیره شده در مافوق سرما	
	درصد تولید کالوس از پروتوپلاست (انحراف معیار ± میانگین)	درصد گیاهان باززایی شده از کالوس (انحراف معیار ± میانگین)	درصد تولید کالوس از پروتوپلاست (انحراف معیار ± میانگین)	درصد گیاهان باززایی شده از کالوس (انحراف معیار ± میانگین)
طارم	۰/۱۱±۰/۰۱	۱۴/۳±۱/۹۸	۰/۱۰±۰/۰۴	۱۲/۲۱±۲/۴۳
خزر	۰/۰۷±۰/۰۱	۱۰/۵±۱/۶۴	۰/۰۷±۰/۰۲	۴/۳۱±۰/۹۲**
آمل – ۳	۰/۰۹±۰/۰۲	۶/۹۳±۰/۲۱	۰/۰۷±۰/۰۳	۲/۸۷±۰/۶۵**

** معنی‌دار در سطح ۱٪

REFERENCES

1. Anthony, P.; Babaeian Jelodar, N.; Lowe, K. C; Power , J. B. and Davey, M. R. 1996. Pluronic f-68 increase the post – thow growth of cryopreserved plant cells. Cryobiology. 33: 508-514.
2. Ayres, N. M., and Park, W. D. 1994. Genetic transformation of rice. Cr. Rev. Plant Sci. 13: 219-239.
3. Babaeian Jelodar, N., 1996. Protoplast culture and somatic hybridization of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and the wild relative of rice, (*Porteresia coarctata*). Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.
4. Babaeian Jelodar, N.; Blackhall, N. W. ; Hartman, T. P. V.; Brar, D. S; Khush, G.; Davey, M. R.; Cocking, E. C., and Power, J. B. 1999. Intergeneric somatic hybrids of rice [(*Oryza sativa.* L.) Porteresia coarctata (Roxb.) Tateoka] Theor. Appl. Genet. 99: 570-577.
5. Baset, A. 1992. Protoplast to plant regeneration system for cultivated and wild rices. Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.
6. Benson, E. E. 1994. Cryopreservation. In: Plant Cell Culture. A Practical Approach. Dixon, R. A., Gonzales, R. A., (eds), IRL Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. Pp. 147-167.
7. Benson, E. E., Harding, K., and Smith, H. 1989. Variation in recovery of cryopreserved shoot – tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post – freeze light regimes. Cryo- letters, 10; 323-344.
8. Chen, J. L., and Beversdrof, W. D. 1992. Cryopreservation of isolated microspores of spring rapeseed (*Brassica napus* L.) for in vitro embryo production. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 31(2): 141-149.
9. Cornejo, M. J., ; Wong, V. L.; and Blechl, A. E. 1995. Crypreserved Callus: a source of protoplasts for rice transformation. Plant Cell Rep. 14: 210-214.
10. Engelmann, F. 1991. In Vitro conservation of tropical plant germplasm a review. Euphytica, 57: 227-243.
11. Finch, R. P. 1991. Development of protoplast systems for the genetic manipulation of rice. Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.
12. Fretz, A., and Lorz, H. 1995. Cryopreservation in vitro cultures of barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and transgenic cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) J. Plant Physiol. 146(4): 489-496.
13. Huang, C-N; Wang, J- H; Yan, Q-S; Zhang , X-Q, and Yan Q-F, 1995. Plant regeneration from rice embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification. Plant Cell Rep. 14: 730-734.
14. Kao, K. N., and Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vica Hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta. 126: 105-110.
15. Kendall, E. J., Kartha. K. K.; Qureshi, J. A., and Chermak, P. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. Plant. Cell Rep. 12(2): 89-94.
16. Langis, R.; Schnabel, B.; Earle, E. D., and Stoponkus, P. L. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestries* cell suspensions by vitrification. Cryo-letters, 10: 421-428.
17. Linsmaier, E. M., and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant . 18: 100-127.
18. Lynch, P. T., and Benson, E. E. 1991. Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cell suspension cultures. In: Proc. 2nd Int. Rice Genetics symp., IRRI, Los Banos, Philipines. Pp. 321-332.
19. Lynch, P. T., Benson, E. E., Jones, J. Cocking , E. C. Power, J. B., and Davey. M. R. 1994. Rice cell cryopreservation: the influence of culture methods and the embryogenic potential of cell suspensions on post – thaw recovery. Plant Sci. 98: 185-192.
20. Matsumoto, T., Sakai, a., and amada, K. 1995. Cryopreservation of in vitro growth apical meristems of lily by vitrification. Plant. Cell, Tiss. Org. Cult. 41(3): 237-241.
21. Meijer, E. G. M., Van Iren, F. Schrijnemakers, E., Hensgens, L. A. M., Van Zijderveld, M., and Schilperoort, R. A. 1990. Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved lines of rice (*Oryza sativa* L.) Plant Cell Rep. 10: 171-174.
22. Muller, A. J., and Grafe, R. 1978. Isolation and characterization of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 161: 67-76.

23. Nishizawa, S., Sakai, a. Amano, Y., and Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Sci. 91(1): 67-73.
24. Ohira, K., Ojima, K., and Fujiwara, A. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture 1. A simple, defind medium for rapid growth in suspension culture. Plant Cell Physiol. 14: 1113-1121.
25. Steponkus, P. L., and Lamphear, F. O. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiol., 42: 1423-1426.
26. S. U., R. C., Rudert, M. L., and Hodges, T. K. 1992. Fertile japonica rice plants regenerated from protoplasts isolated from embryogenic haploid suspension cultures. Plant Cell Rep. 12: 45-49.
27. Towill, L. E. 1991. Cryopreservation. In: in vitro methods for conservation of Plant Genetic Resources, Dodds, J. H., (ed). Chapman and Hall, London pp 41-70.
28. Weber, G., Roth, E. J., and Schweiger, . G. 1983. Storage of cell suspensions and protoplasts of *Glycine max* (L.) Merr. Brassica napus (L.) Datura innoxia (Mill.), and Daucus carota. (L.) by freezing. Zeitschrift fur pflanzenphysiologie, 109: 29-39.
29. Withers, L. A. 1985. Cryopreservation of cultured cells and protoplasts. In: Cropreservation of Plant cells and Organs, Karatha, K. K., (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 244-269.
30. Withers, L. A. 1991. Maintenance of plant tissue cultures. In: Cultures, Chapter 9, FAO. Pp. 243-273.
31. Withers, L. A., and King, P. J. 1980. A simple freezing unit and cryopreservation method for plant cell suspensions. Cryo – letters. 1: 213-220.
32. Withers, L. A., and Street, H. E. 1977. Freeze preservation of plant cell cultures. In: Tissue culture and its Bio-Technological Application, Barz, W, Reinhard, E, Zenk, M. H., (eds) Springer Verlag, Berlin, pp. 226-244.
33. Xue, Q., and Earle, E. D. 1995. Plant regeneration from protoplasts of cytoplasmic male sterile lines of rice (*Oryza sativa* L.) Plant Cell Rep. 15: 76-81.
34. Yamada, T., Sakai, A., Matsumura, T., and Higuchi, S. 1993. Plant regeneration of meristematic callus of white clover (*Trifolium repens* L.) Cooled to 196°C by vitirification. Euphytica. 70(3): 197-203.

Studies on the Cryopreservation of Cell Suspension Cultures of Some Iranian *Indica* and *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars

N. BABAEIAN JELODAR[1], M. R. DAVEY[2] AND E. C. COCKING[3]
1- Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Mazandaran, Sari, Iran. 2&3- Professors of University of Nottingham U.K.
Accepted. June. 20, 2001

SUMMARY

In cereals, cell suspension culture is an essential source of protoplast. However, over a period of time suspension cultures lose the ability to release protoplasts capable of plant regeneration. In this case, cryopreservation has been investigated as a means of providing stocks of cells for re-initation of embryogenic cell suspension cultures by long term storage of biological tissues at ultra – low temperatures. In this study, dehusked rice seeds were surface sterilized in 30% (v/v) Domestos bleach incubated onto LS medium supplemented with 2.5 mgl^{-1} 2, 4 – D and made semi – solid by the addition of $4gl^{-1}$ seakem agarose. Suspension cultures were initiated from friable, globular, embryogenic callus in R_2 (cv. Tarom) and AA2 (cvs. Amol – 3 and Khazar) media, respectively. Cells were transferred to R_2 and AA2 media supplemented with 60 gl^{-1} mannitol 3-4 days before freezing. Cells were harvested on a 45μm nylon mesh and placed into 2 cm^3 polypropylene vials, (0.2 g of cells / vial.) Approximately 0.75 cm^3 of chilled (on iced water), filter sterilized, cryoprotectant mixture [glycerol, 46.0g/l; dimethyl sulphoxide (DMSO), 39.0 g/l; sucrose 342.3 g/l; proline 5.0 g/l] was added to each vial and mixed with the cells. Cells were cryoprotected for 1 h on iced water. Vials were transferred to aluminium cans and the cells frozen in a controlled rate freezer. After one year cells were thawed, by plunging the vials into sterile water (45°c; 1-2 min). The cells were then placed onto double layers of sterile 5.5 cm filter paper discs (Whatman No. 1; one disc above the other, per 9 cm petri dish) overlying aliquots of R2 and AA2 media made semi – solid with Seakem agarose (20-25 ml per dish). The Cells were maintained at (26±1°c) in dark and subcultured by transferring cells on the uppermost filter paper discs to fresh AA2/ R2 media as before , 3 d post thaw. Callus and cell suspension cultures were initiated for 3 cultivars (Amol-3, Tarom and Khazer). Cell suspensions were re-initiated for all cultivars in R2 and AA2 liquid media and maintained under the same conditions as unfrozen cultures. The post – thaw viability of cells was determined by the reduction of triphenyl tetrazolum chloride (TTC). Protoplasts were isolated from an unfrozen suspension and re-established cell suspensions. Protoplast yield of re- established cell suspensions were higher than that of unfrozen cells. Generally, protoplast yields increased for – re-established cell suspension cultures as compared with unfrozen control cultures. Shoot regeneration was achieved from protoplasts isolated from cryopreserved re-initiated cell suspension cultures of all 3 cultivars. In this study, 24 plants for cv. Amol-3 , 32 plants for cv. Kahzer and 49 Plants for cv. Tarom were produced . Cryopreservation is thus a feasible means for the secure storage of potentially unique, cell suspensions of Iranian *Indica* and *Japanica* rices of agronomic importance.

Key words: Cryopreservation, Cell suspension, Iranian *Indica* and *Japanica*