تهیه کشت سوسپانسیون درچغندرقندوکال زائی سلولهای حاصل درمحیط کشت جامد

پیمان نوروزی [1]، سیروس عبدمیشانی [2] سیدیعقوب صادقیان [1] وعلیرضاطالعی [2]

۱- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج، ۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

به منظورتهیه کشت سوسپانسیون سلولی وارزیابی بعضی از خصوصیات آن، نیاز به کالوس شکننده است تاسلولهاودستجات کوچک سلولی بتوانندرمحیط کشت مایع باحرکت ملایم روی دستگاه شیکر براحتی آزاد گردند برای این کاراز کالوس های واکشت شده حاصل از بافت هیپوکوتیل مربوط به دو رقم مولتی ژرم ومنوژرم استفاده گردید بدین ترتیب ابتدا یک گرم از قطعات سفید وشکننده کالوس در ۶۰ میلی لیتر محیط مایع MS یا PGOB به همراه یک میلی گرم درلیتر توفوردی +۰/۵ میلی گرم درلیتر کینتین +۲۵۰ میلی گرم درلیتر کازئین هیدرولیزات درداخل ظروف ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد.این کشت بر روی شیکر دورانی در ۹۰ دور دردقیقه ودمای ۳ ± ۲۷ درجه سانتی گرادقرار گرفت و هر روز یک مرتبه بااضافه نمودن ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی به ۳۰ میلی لیتر محیط کشت تازه عمل واکشت سلولی انجام گردید.دراولین واکشت از صافی آستریل بامنافذ ۲۹۰ میکرومتری استفاده شد.درمراحلی از کشت سوسپانسیون، وضعیت ظاهری سلولها مشاهده وقدرت زیست وتراکم سلولی آنها تعیین گردید.سلولهاازنظر وضعیت ظاهری، بهاشکال مختلفی مانندکروی، دمبلی شکل، درازوکشیده دیده شدند.برای تعیین قدرت زیست سلولهای سوسپانسیون از رنگ قرمزخنثی باغلظت ۰/۱ میلی گرم رنگ در۱ میلی لیتر محیط کشت سلولی استفاده گردید.باقراردادن یک قطره از محلول حاصل برروی لام ومشاهده درزیرمیکروسکوپ نوری سلولهای زیست شناسائی شدند.بدین ترتیب که سلولهای دارای قدرت زیست وسالم، رنگ قرمز خنثی رادرواکوئل خود جذب نموده، ولی سلولهای غیر زنده، این رنگ رادرسرتاسرحجم خود پخش نموده وظاهری قرمز تیره رنگ داشتند

برای تعیین تراکم سلولی ازلام هموسیتومتر نئوبار استفاده گردید.بدین ترتیب که پس ازبرداشت ۳ نمونه ۵ میلی لیتری از هر تیمار درشرایط استریل وبااضافه نمودن ۱۰ میلی لیتر تری آکسیدکروم ۸٪ به هریک ازنمونه ها وحرارت دادن به مدت ۳ دقیقه در۷۰ درجه سانتی گراد،کلونی های سلولی تفکیک وسلولهای آزاد درزیرمیکروسکوپ موردشمارش قرار گرفتند.سپس بااستفاده از رابطه مربوطه، تراکم سلولی برای رقم مولتی ژرم ومنوژرم به ترتیب برابر ۵۱۰۰۰ و۶۳۰۰۰ سلول درمیلی لیتر محیط کشت بدست آمد درارتباط باکال زائی سلولهاپس از ۳تا۵ واکشت درمحیط مایع، سوسپانسیون سلولی پس از عبور از صافی بامنافذ ۲۹۰ میکرومتر،

کال زائی و استفاده از کالوسهای حاصل برای تهیه کشت سوسپانسیون سلولی، سه فاکتور رقم، ریزنمونه و ترکیب هورمونی هریک در دوسطح به صورت آزمایش فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار مقایسه شدند. دراین بررسی از ارقام منوژرم ۹۵۹۷ و مولتی ژرم ۱۰۷ - P - ۷۲۳۳، بافتهای هیپوکوتیل و کوتیلدون، وترکیبهای هورمونی شامل محیط کشت MS به همراه ۱ میلی گرم درلیتر بنزیل آدنین ومحیط کشت MS +۱ میلی گرم درلیتر توفوردی +۰/۵ میلی گرم درلیتر کینتین استفاده شد. صفاتی از قبیل افزایش حجم ریزنمونه، درصد کال زائی ومیزان رشد کالوس پس از گذشت یک ماه از شروع کشت اندازه گیری شدند. قبل ازتجزیه آماری برای افزایش حجم ریز نمونه ومیزان زائی از تبدیل زاویه ای استفاده گردید.

بیشترین افزایش حجم ریز نمونه از قراردادن بافت کوتیلدون رقم منوژرم درمحیط کشت حاوی ۱ میلی گرم درلیتر بنزیل آدنین بدست آمد. بیشترین درصد کال زائی ومیزان رشد کالوس از قرار دادن بافت هیپوکوتیل رقم مولتی ژرم درمحیط کشت حاوی ۱ میلی گرم درلیتر توفوردی و۰/۵ میلی گرم درلیتر کینتین بدست آمد. همچنین با توجه به شکننده بودن بافت کالوس حاصل از هیپو کوتیل درمحیط کشت حاوی توفوردی و کینتین نتیجه گیری گردید که درصورت تهیه کشت سوسپانسیون سلولی می توان ازتیمار فوق جهت این منظور استفاده نمود.

بررسی تحمل به شوری و تنوع کروموزومی در سلولهای کالوس چغندر قند

پیمان نوروزی [۱] سیروس عبدمیشانی [۲] سیدیعقوب صادقیان [۱] وعلیرضا طالعی [۳]

۱ - موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه بذر چغندر قند، ۲ - دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

به منظور بررسی تحمل به شوری وگزینش لینه های سلولی مقاوم یامتحمل به شوری، آزمایشی بر روی سلولها و قطعات کالوس حاصل از هیپوکوتیل دو رقم مولتی ژرم ۷۲۳۳ پروژنی ۱۰۷ و منوژرم ۹۵۹۷ پروژنی ۳۷ صورت گرفت. همچنین تنوع کروموزومی درسطح سلولهای کالوس حاصل از کشت سوسپانسیون دو رقم بررسی گردید. برای بررسی تحمل به شوری مقدار مشخصی از کالوس درشرایط استریل به درون حجم معینی از محیط کشت مایع ریخته وبامیله شیشه ای به هم زده شد تاشرایط برای آزاد شدن سلولها ودستجات سلولی فراهم گردد. پس از عبور مخلوط از صافی بامنافذ ۲۹۰ میکرومتری، محلول سلولی از صافی عبور نموده وقطعات کالوس قرار گرفته بر روی صافی، جداگانه با تراکم مشخصی بر روی محیط کشت PGob حاوی غلظتهای ۰، ۱۰۰،

بر روی محیط کشت جامد جهت تولید میکروکالوس قرار داده شد

پس از گذشت یک ماه و واکشت میکروکالوس در محیط کشت

تازه کالوس های شکننده تولید گردیدند که تعدادی از آنها به محیط

باززائی منتقل شدند