

## **Germplasm Conservation and Cryopreservation:**

### **Germplasm Conservation:**

Germplasm broadly refers to the hereditary material (total content of genes) transmitted to the offspring through germ cells.

Germplasm provides the raw material for the breeder to develop various crops. Thus, conservation of germplasm assumes significance in all breeding programmes.

As the primitive man learnt about the utility of plants for food and shelter, he cultivated the habit of saving selected seeds or vegetative propagules from one season to the next one. In other words, this may be regarded as primitive but conventional germplasm preservation and management, which is highly valuable in breeding programmes.

The very objective of germplasm conservation (or storage) is to preserve the genetic diversity of a particular plant or genetic stock for its use at any time in future. In recent years, many new plant species with desired and improved characteristics have started replacing the primitive and conventionally used agricultural plants. It is important to conserve the endangered plants or else some of the valuable genetic traits present in the primitive plants may be lost.

A global body namely International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR) has been established for germplasm conservation. Its main objective is to provide necessary support for collection, conservation and utilization of plant genetic resources throughout the world.

There are two approaches for germplasm conservation of plant genetic materials:

1. In-situ conservation
2. Ex-situ conservation

#### **1. In-Situ Conservation:**

The conservation of germplasm in their natural environment by establishing biosphere reserves (or national parks/gene sanctuaries) is regarded as in-situ conservation. This approach is particularly useful for preservation of land plants in a near natural habitat along with several wild relatives with genetic diversity. The in-situ conservation is considered as a high priority germplasm preservation programme.

**The major limitations of in-situ conservation are listed below:**

- i. The risk of losing germplasm due to environmental hazards
- ii. The cost of maintenance of a large number of genotypes is very high.

#### **2. Ex-Situ Conservation:**

Ex-situ conservation is the chief method for the preservation of germplasm obtained from cultivated and wild plant materials. The genetic materials in the form of seeds or from in vitro cultures (plant cells, tissues or organs) can be preserved as gene banks for long term storage under suitable conditions. For successful establishment of gene banks, adequate knowledge of genetic structure of plant populations, and the techniques involved in sampling, regeneration, maintenance of gene pools etc. are essential.

#### **Germplasm conservation in the form of seeds:**

Usually, seeds are the most common and convenient materials to conserve plant germplasm. This is because many plants are propagated through seeds, and seeds occupy relatively small space. Further, seeds can be easily transported to various places.

There are however, certain limitations in the conservation of seeds:

- i. Viability of seeds is reduced or lost with passage of time.
- ii. Seeds are susceptible to insect or pathogen attack, often leading to their destruction.

iii. This approach is exclusively confined to seed propagating plants, and therefore it is of no use for vegetatively propagated plants e.g. potato, Ipomoea, Dioscorea.

iv. It is difficult to maintain clones through seed conservation.

Certain seeds are heterogeneous and therefore, are not suitable for true genotype maintenance.

#### **In vitro methods for germplasm conservation:**

In vitro methods employing shoots, meristems and embryos are ideally suited for the conservation of germplasm of vegetatively propagated plants. The plants with recalcitrant seeds and genetically engineered materials can also be preserved by this in vitro approach.

#### **There are several advantages associated with in vitro germplasm conservation:**

i. Large quantities of materials can be preserved in small space.

ii. The germplasm preserved can be maintained in an environment, free from pathogens.

iii. It can be protected against the nature's hazards.

iv. From the germplasm stock, large number of plants can be obtained whenever needed.

v. Obstacles for their transport through national and international borders are minimal (since the germplasm is maintained under aseptic conditions).

#### **There are mainly three approaches for the in vitro conservation of germplasm:**

1. Cryopreservation (freeze-preservation)

2. Cold storage

3. Low-pressure and low-oxygen storage

#### **Cryopreservation:**

Cryopreservation (Greek, krayos-frost) literally means preservation in the frozen state. The principle involved in cryopreservation is to bring the plant cell and tissue cultures to a zero metabolism or non-dividing state by reducing the temperature in the presence of cryoprotectants.

#### **Cryopreservation broadly means the storage of germplasm at very low temperatures:**

i. Over solid carbon dioxide (at  $-79^{\circ}\text{C}$ )

ii. Low temperature deep freezers (at  $-80^{\circ}\text{C}$ )

iii. In vapour phase nitrogen (at  $-150^{\circ}\text{C}$ )

iv. In liquid nitrogen (at  $-196^{\circ}\text{C}$ )

Among these, the most commonly used cryopreservation is by employing liquid nitrogen. At the temperature of liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), the cells stay in a completely inactive state and thus can be conserved for long periods.

In fact, cryopreservation has been successfully applied for germplasm conservation of a wide range of plant species e.g. rice, wheat, peanut, cassava, sugarcane, strawberry, coconut. Several plants can be regenerated from cells, meristems and embryos stored in cryopreservation.

#### **Mechanism of Cryopreservation:**

The technique of freeze preservation is based on the transfer of water present in the cells from a liquid to a solid state. Due to the presence of salts and organic molecules in the cells, the cell water requires much more lower temperature to freeze (even up to  $-68^{\circ}\text{C}$ ) compared to the freezing point of pure water (around  $0^{\circ}\text{C}$ ). When stored at low temperature, the metabolic processes and biological deteriorations in the cells/tissues almost come to a standstill.

Precautions/Limitations for Successful Cryopreservation:

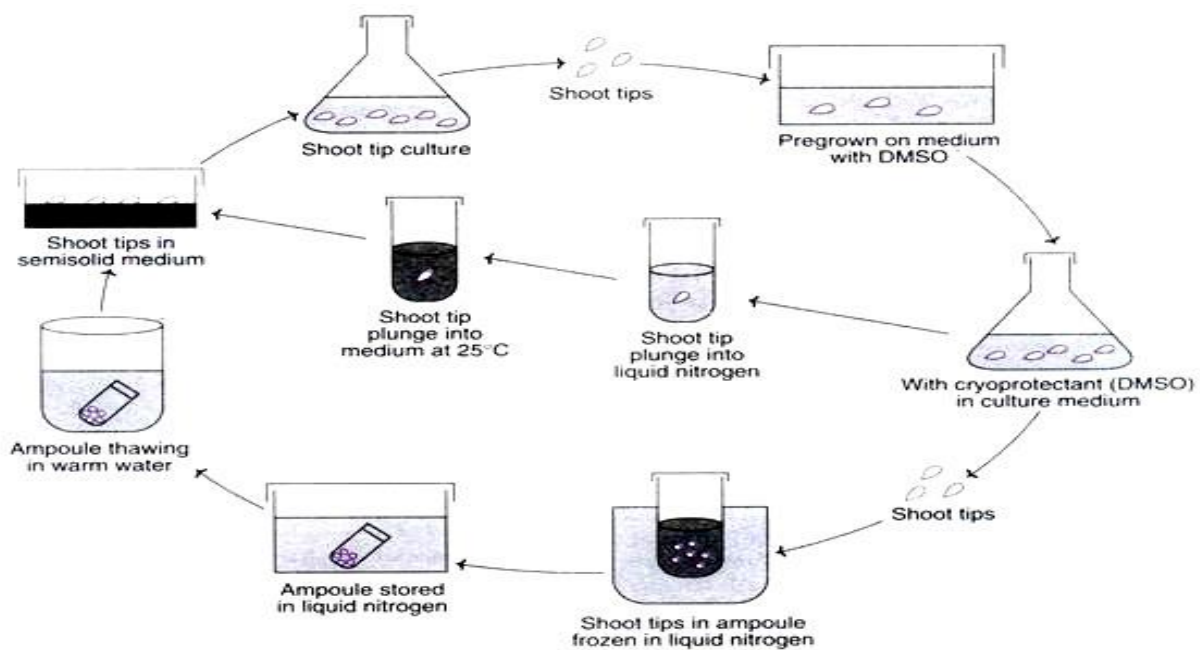
Good technical and theoretical knowledge of living plant cells and as well as cryopreservation technique are essential.

**Other precautions (the limitations that should be overcome) for successful cryopreservation are listed below:**

- i. Formation ice crystals inside the cells should be prevented as they cause injury to the organelles and the cell.
- ii. High intracellular concentration of solutes may also damage cells.
- iii. Sometimes, certain solutes from the cell may leak out during freezing.
- iv. Cryoprotectants also affect the viability of cells.
- v. The physiological status of the plant material is also important.

**Technique of Cryopreservation:**

An outline of the protocol for cryopreservation of shoot tip is depicted in Fig. 48.1. The cryopreservation of plant cell culture followed by the regeneration of plants broadly involves the following stages.



**Fig. 48.1 :** An outline of the protocol for cryopreservation of shoot tip (DMSO–Dimethyl sulfoxide).

**Protocol for Cryopreservation of Shoot Tip**

1. Development of sterile tissue cultures
2. Addition of cryoprotectants and pretreatment
3. Freezing
4. Storage
5. Thawing
6. Re-culture
7. Measurement of survival/viability
8. Plant regeneration.

The salient features of the above stages are briefly described.

**Development of sterile tissue culture:**

The selection of plant species and the tissues with particular reference to the morphological and physiological characters largely influence the ability of the explant to survive in cryopreservation. Any tissue from a plant can be used for cryopreservation e.g. meristems, embryos, endosperms,

ovules, seeds, cultured plant cells, protoplasts, calluses. Among these, meristematic cells and suspension cell cultures, in the late lag phase or log phase are most suitable.

### **Addition of cryoprotectants and pretreatment:**

Cryoprotectants are the compounds that can prevent the damage caused to cells by freezing or thawing. The freezing point and super-cooling point of water are reduced by the presence of cryoprotectants. As a result, the ice crystal formation is retarded during the process of cryopreservation.

There are several cryoprotectants which include dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene, propylene, sucrose, mannose, glucose, proline and acetamide. Among these, DMSO, sucrose and glycerol are most widely used. Generally, a mixture of cryoprotectants instead of a single one is used for more effective cryopreservation without damage to cells/tissues.

### **Freezing:**

The sensitivity of the cells to low temperature is variable and largely depends on the plant species. Four different types of freezing methods are used:

#### **1. Slow-freezing method:**

The tissue or the requisite plant material is slowly frozen at a slow cooling rates of 0.5-5°C/min from 0°C to -100°C, and then transferred to liquid nitrogen. The advantage of slow-freezing method is that some amount of water flows from the cells to the outside. This promotes extracellular ice formation rather than intracellular freezing. As a result of this, the plant cells are partially dehydrated and survive better. The slow-freezing procedure is successfully used for the cryopreservation of suspension cultures.

#### **2. Rapid freezing method:**

This technique is quite simple and involves plunging of the vial containing plant material into liquid nitrogen. During rapid freezing, a decrease in temperature -300° to -1000°C/min occurs. The freezing process is carried out so quickly that small ice crystals are formed within the cells. Further, the growth of intracellular ice crystals is also minimal. Rapid freezing technique is used for the cryopreservation of shoot tips and somatic embryos.

#### **3. Stepwise freezing method:**

This is a combination of slow and rapid freezing procedures (with the advantages of both), and is carried out in a stepwise manner. The plant material is first cooled to an intermediate temperature and maintained there for about 30 minutes and then rapidly cooled by plunging it into liquid nitrogen. Stepwise freezing method has been successfully used for cryopreservation of suspension cultures, shoot apices and buds.

#### **4. Dry freezing method:**

Some workers have reported that the non-germinated dry seeds can survive freezing at very low temperature in contrast to water-imbibing seeds which are susceptible to cryogenic injuries. In a similar fashion, dehydrated cells are found to have a better survival rate after cryopreservation.

### **Storage:**

Maintenance of the frozen cultures at the specific temperature is as important as freezing. In general, the frozen cells/tissues are kept for storage at temperatures in the range of -70 to -196°C. However, with temperatures above -130°C, ice crystal growth may occur inside the cells which reduces viability of cells. Storage is ideally done in liquid nitrogen refrigerator — at 150°C in the vapour phase, or at -196°C in the liquid phase.

The ultimate objective of storage is to stop all the cellular metabolic activities and maintain their viability. For long term storage, temperature at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen is ideal. A regular and constant supply of liquid nitrogen to the liquid nitrogen refrigerator is essential. It is necessary to check the viability of the germplasm periodically in some samples. Proper documentation of the germplasm storage has to be done.

The documented information must be comprehensive with the following particulars:

- i. Taxonomic classification of the material
- ii. History of culture
- iii. Morphogenic potential
- iv. Genetic manipulations done
- v. Somaclonal variations
- vi. Culture medium
- vii. Growth kinetics

### **Thawing:**

Thawing is usually carried out by plunging the frozen samples in ampoules into a warm water (temperature  $37-45^{\circ}\text{C}$ ) bath with vigorous swirling. By this approach, rapid thawing (at the rate of  $500-750^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) occurs, and this protects the cells from the damaging effects ice crystal formation.

As the thawing occurs (ice completely melts) the ampoules are quickly transferred to a water bath at temperature  $20-25^{\circ}\text{C}$ . This transfer is necessary since the cells get damaged if left for long in warm ( $37-45^{\circ}\text{C}$ ) water bath. For the cryopreserved material (cells/tissues) where the water content has been reduced to an optimal level before freezing, the process of thawing becomes less critical.

### **Re-culture:**

In general, thawed germplasm is washed several times to remove cryoprotectants. This material is then re-cultured in a fresh medium following standard procedures. Some workers prefer to directly culture the thawed material without washing. This is because certain vital substances, released from the cells during freezing, are believed to promote in vitro cultures.

### **Measurement of survival/viability:**

The viability/survival of the frozen cells can be measured at any stage of cryopreservation or after thawing or re-culture.

The techniques employed to determine viability of cryopreserved cells are the same as used for cell cultures. Staining techniques using triphenyl tetrazolium chloride (TTC), Evan's blue and fluorescein diacetate (FDA) are commonly used.

The best indicator to measure the viability of cryopreserved cells is their entry into cell division and regrowth in culture. This can be evaluated by the following expression.

### **Plant regeneration:**

The ultimate purpose of cryopreservation of germplasm is to regenerate the desired plant. For appropriate plant growth and regeneration, the cryopreserved cells/tissues have to be carefully nursed, and grown. Addition of certain growth promoting substances, besides maintenance of appropriate environmental conditions is often necessary for successful plant regeneration.

A selected list of plants (in various forms) that have been successfully used for cryopreservation is given in Table 48.1.

**TABLE 48.1 A selected list of plants in various forms that are successfully cryopreserved**

<i>Plant material</i>	<i>Plant species</i>
Cell suspensions	<i>Oryza sativa</i>
	<i>Glycine max</i>
	<i>Zea mays</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>
	<i>Capsicum annum</i>
Callus	<i>Oryza sativa</i>
	<i>Capsicum annum</i>
	<i>Saccharum sp</i>
Protoplast	<i>Zea mays</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>
Meristems	<i>Solanum tuberosum</i>
	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>Zea mays</i>
Zygotic embryos	<i>Hordeum vulgare</i>
	<i>Manihot esculenta</i>
	<i>Citrus sinensis</i>
Somatic embryos	<i>Daucus carota</i>
	<i>Coffea arabica</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>
Pollen embryos	<i>Citrus sp</i>
	<i>Atropa belladonna</i>

List of Plants

**Cold Storage:**

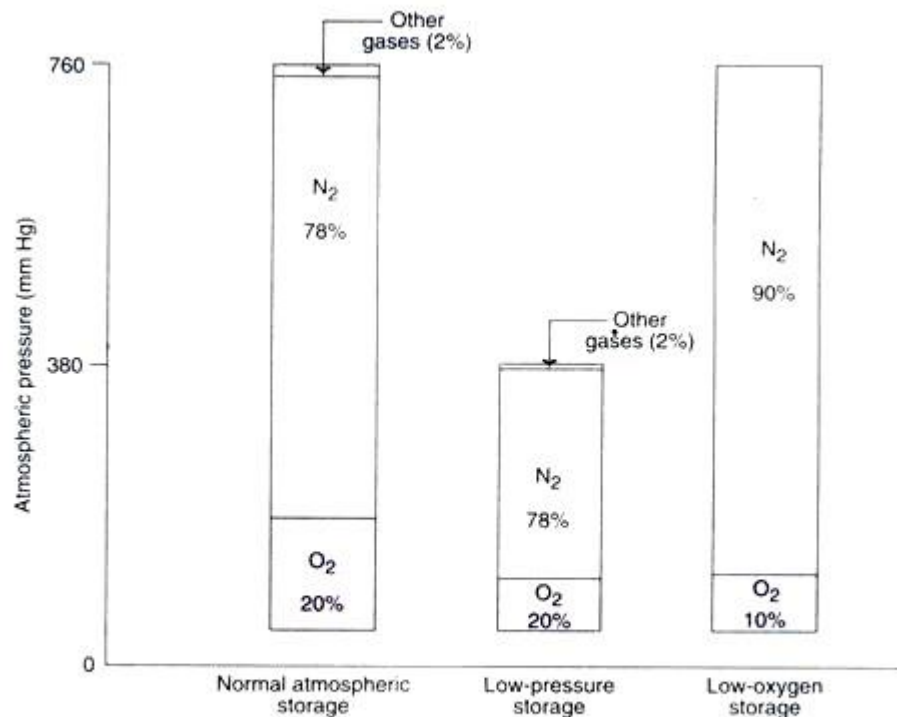
Cold storage basically involves germplasm conservation at a low and non-freezing temperatures (1-9°C). The growth of the plant material is slowed down in cold storage in contrast to complete stoppage in cryopreservation. Hence, cold storage is regarded as a slow growth germplasm conservation method. The major advantage of this approach is that the plant material (cells/tissues) is not subjected to cryogenic injuries.

Long-term cold storage is simple, cost-effective and yields germplasm with good survival rate. Many in vitro developed shoots/plants of fruit tree species have been successfully stored by this approach e.g. grape plants, strawberry plants.

Virus-free strawberry plants could be preserved at 10°C for about 6 years, with the addition of a few drops of medium periodically (once in 2-3 months). Several grape plants have been stored for over 15 years by cold storage (at around 9°C) by transferring them yearly to a fresh medium.

**Low-Pressure and Low-Oxygen Storage:**

As alternatives to cryopreservation and cold storage, low-pressure storage (LPS) and low-oxygen storage (LOS) have been developed for germplasm conservation. A graphic representation of tissue culture storage under normal atmospheric pressure, low-pressure and low-oxygen is depicted in Fig. 48.2.



**Fig. 48.2 :** A graphic representation of tissue culture storage under normal atmospheric pressure, low-pressure, and low-oxygen.

### Tissue Culture Storage

#### Low-Pressure Storage (LPS):

In low-pressure storage, the atmospheric pressure surrounding the plant material is reduced. This results in a partial decrease of the pressure exerted by the gases around the germplasm. The lowered partial pressure reduces the in vitro growth of plants (of organized or unorganized tissues). Low-pressure storage systems are useful for short-term and long-term storage of plant materials.

The short-term storage is particularly useful to increase the shelf life of many plant materials e.g. fruits, vegetables, cut flowers, plant cuttings. The germplasm grown in cultures can be stored for long term under low pressure. Besides germplasm preservation, LPS reduces the activity of pathogenic organisms and inhibits spore germination in the plant culture systems.

#### Low-Oxygen Storage (LOS):

In the low-oxygen storage, the oxygen concentration is reduced, but the atmospheric pressure (260 mm Hg) is maintained by the addition of inert gases (particularly nitrogen). The partial pressure of oxygen below 50 mm Hg reduces plant tissue growth (organized or unorganized tissue). This is due to the fact that with reduced availability of O<sub>2</sub>, the production of CO<sub>2</sub> is low. As a consequence, the photosynthetic activity is reduced, thereby inhibiting the plant tissue growth and dimension.

#### Limitations of LOS:

The long-term conservation of plant materials by low-oxygen storage is likely to inhibit the plant growth after certain dimensions.

Applications of Germplasm Storage:

The germplasm storage has become a boon to plant breeders and biotechnologists.

**Some of the applications are briefly described:**

1. Maintenance of stock cultures: Plant materials (cell/tissue cultures) of several species can be cryopreserved and maintained for several years, and used as and when needed. This is in contrast to an in vitro cell line maintenance which has to be sub-cultured and transferred periodically to extend viability. Thus, germplasm storage is an ideal method to avoid sub-culturing, and maintain cells/ tissues in a viable state for many years.
2. Cryopreservation is an ideal method for long term conservation of cell cultures which produce secondary metabolites (e.g. medicines).
3. Disease (pathogen)-free plant materials can be frozen, and propagated whenever required.
4. Recalcitrant seeds can be maintained for long.
5. Conservation of somaclonal and gametoclonal variations in cultures.
6. Plant materials from endangered species can be conserved.
7. Conservation of pollen for enhancing longevity.
8. Rare germplasms developed through somatic hybridization and other genetic manipulations can be stored.
9. Cryopreservation is a good method for the selection of cold resistant mutant cell lines which could develop into frost resistant plants.
10. Establishment of germplasm banks for exchange of information at the international level.

Limitations of Germplasm Storage:

The major limitations of germplasm storage are the expensive equipment and the trained personnel. It may, however, be possible in the near future to develop low cost technology for cryopreservation of plant materials.

## જર્મપ્લાઝમ કન્ઝર્વેશન એન્ડ કાયોપ્રીઝર્વેશન:

### જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ:

જર્મપ્લાઝમ વ્યાપકપણે જર્મ કોશિકાઓ દ્વારા સંતાનમાં પ્રસારિત વારસાગત સામગ્રી (જિન્સની કુલ સામગ્રી) નો સંદર્ભ આપે છે.

જર્મપ્લાઝમ સંવર્ધકને વિવિધ પાકો વિકસાવવા માટે કાયો માલ પૂરો પાડે છે. આમ, જર્મપ્લાઝમનું સંરક્ષણ તમામ સંવર્ધન કાર્યક્રમોમાં મહત્વ ધરાવે છે.

જેમ જેમ આદિમ માણસ ખોરાક અને આશ્રય માટે છોડની ઉપયોગિતા વિશે જાણતો ગયો તેમ, તેણે પસંદ કરેલા બીજ અથવા વનસ્પતિ પ્રજનનને એક સીઝનથી બીજી સીઝન સુધી સાચવવાની આદત કેળવી. બીજા શબ્દોમાં કહીએ તો, આને આદિમ પરંતુ પરંપરાગત જર્મપ્લાઝમ જાળવણી અને વ્યવસ્થાપન તરીકે ગણી શકાય, જે સંવર્ધન કાર્યક્રમોમાં અત્યંત મૂલ્યવાન છે.

જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ (અથવા સંગ્રહ)નો ઉદ્દેશ્ય ચોક્કસ છોડની આનુવંશિક વિવિધતા અથવા ભવિષ્યમાં કોઈપણ સમયે તેના ઉપયોગ માટે આનુવંશિક સ્ટોકને જાળવી રાખવાનો છે. તાજેતરના વર્ષોમાં, ઇચ્છિત અને સુધારેલ લાક્ષણિકતાઓ સાથે ઘણી નવી વનસ્પતિ પ્રજાતિઓએ આદિમ અને પરંપરાગત રીતે ઉપયોગમાં લેવાતા કૃષિ છોડને બદલવાનું શરૂ કર્યું છે. લુપ્ત થઈ રહેલા છોડનું જતન કરવું અગત્યનું છે અન્યથા આદિમ છોડમાં હાજર કેટલાક મૂલ્યવાન આનુવંશિક લક્ષણો નષ્ટ થઈ શકે છે.



જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ માટે ઇન્ટરનેશનલ બોર્ડ ઓફ પ્લાન્ટ જિનેટિક રિસોર્સિસ (IBPGR) નામની વૈશ્વિક સંસ્થાની સ્થાપના કરવામાં આવી છે. તેનો મુખ્ય ઉદ્દેશ્ય સમગ્ર વિશ્વમાં છોડના આનુવંશિક સંસાધનોના સંગ્રહ, સંરક્ષણ અને ઉપયોગ માટે જરૂરી સહાય પૂરી પાડવાનો છે.

છોડની આનુવંશિક સામગ્રીના જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ માટે બે અભિગમો છે:

1. ઇન-સીટુ સંરક્ષણ
2. એક્સ-સીટુ સંરક્ષણ

### 1. ઇન-સીટુ સંરક્ષણ:

બાયોસ્ફિયર અનામત (અથવા રાષ્ટ્રીય ઉદ્યાનો/જીન અભયારણ્યો)ની સ્થાપના કરીને તેમના કુદરતી વાતાવરણમાં જર્મપ્લાઝમના સંરક્ષણને ઇન-સીટુ સંરક્ષણ તરીકે ગણવામાં આવે છે. આ અભિગમ ખાસ કરીને આનુવંશિક વિવિધતા ધરાવતા કેટલાક જંગલી સંબંધીઓ સાથે નજીકના કુદરતી વસવાટમાં જમીનના છોડની જાળવણી માટે ઉપયોગી છે. ઇન-સીટુ સંરક્ષણને ઉચ્ચ અગ્રતા ધરાવતા જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ કાર્યક્રમ તરીકે ગણવામાં આવે છે.

ઇન-સીટુ સંરક્ષણની મુખ્ય મર્યાદાઓ નીચે સૂચિબદ્ધ છે:

- i પર્યાવરણીય જોખમોને કારણે જર્મપ્લાઝમ ગુમાવવાનું જોખમ
- ii. મોટી સંખ્યામાં જીનોટાઇપ્સની જાળવણીની કિંમત ખૂબ ઊંચી છે.

### 2. એક્સ-સીટુ સંરક્ષણ:

પૂર્વ-સ્થિતિ સંરક્ષણ એ ખેતી અને જંગલી છોડની સામગ્રીમાંથી મેળવેલા જર્મપ્લાઝમની જાળવણી માટેની મુખ્ય પદ્ધતિ છે. બીજના સ્વરૂપમાં અથવા ઇન વિટ્રો સંસ્કૃતિઓ (છોડના કોષો, પેશીઓ અથવા અવયવો) માંથી આનુવંશિક સામગ્રીને યોગ્ય પરિસ્થિતિઓમાં લાંબા ગાળાના સંગ્રહ માટે જનીન બેંક તરીકે સાચવી શકાય છે. જનીન બેંકોની સફળ સ્થાપના માટે, છોડની વસ્તીના આનુવંશિક બંધારણનું પર્યાપ્ત જ્ઞાન અને નમૂના લેવા, પુનઃઉત્પાદન, જનીન પૂલની જાળવણી વગેરેમાં સામેલ તકનીકો આવશ્યક છે.

### બીજના સ્વરૂપમાં જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ :

સામાન્ય રીતે, છોડના જર્મપ્લાઝમને બચાવવા માટે બીજ એ સૌથી સામાન્ય અને અનુકૂળ સામગ્રી છે. આ એટલા માટે છે કારણ કે ઘણા છોડ બીજ દ્વારા ફેલાય છે, અને બીજ પ્રમાણમાં નાની જગ્યા ધરાવે છે. વધુમાં, બીજ સરળતાથી વિવિધ સ્થળોએ લઈ જઈ શકાય છે.

જો કે, બીજના સંરક્ષણમાં કેટલીક મર્યાદાઓ છે:

- i સમયની સાથે બીજની સધ્ધરતા ઘટી જાય છે અથવા ખોવાઈ જાય છે.
- ii. બીજ જંતુઓ અથવા પેથોજેન્સના હુમલા માટે સંવેદનશીલ હોય છે, જે ઘણીવાર તેમના વિનાશ તરફ દોરી જાય છે.

iii આ અભિગમ ફક્ત બીજ ફેલાવતા છોડ પૂરતો જ સીમિત છે, અને તેથી તે વનસ્પતિ પ્રચારિત છોડ જેવા કે બટેટા, ઇપોમોઆ, ડાયોસ્કોરિયા માટે કોઈ ઉપયોગી નથી.

iv બીજ સંરક્ષણ દ્વારા ક્લોન્સની જાળવણી કરવી મુશ્કેલ છે.

અમુક બીજ વિજાતીય હોય છે અને તેથી સાચા જીનોટાઈપની જાળવણી માટે યોગ્ય નથી.

**જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ માટેની ઇન વિટ્રો પદ્ધતિઓ:**

અંકુર, મેરીસ્ટેમ્સ અને એમ્બ્રોયોનો ઉપયોગ કરતી વિટ્રો પદ્ધતિઓ વનસ્પતિ પ્રચારિત છોડના જર્મપ્લાઝમના સંરક્ષણ માટે આદર્શ રીતે અનુકૂળ છે. અવ્યવસ્થિત બીજ અને આનુવંશિક રીતે એન્જિનિયર્ડ સામગ્રીવાળા છોડને પણ આ ઇન વિટ્રો અભિગમ દ્વારા સાચવી શકાય છે.

ઇન વિટ્રો જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ સાથે સંકળાયેલા ઘણા ફાયદા છે:

i નાની જગ્યામાં મોટી માત્રામાં સામગ્રી સાચવી શકાય છે.

ii. સાચવેલ જર્મપ્લાઝમને પેથોજેન્સથી મુક્ત વાતાવરણમાં જાળવી શકાય છે.

iii તે પ્રકૃતિના જોખમો સામે રક્ષણ મેળવી શકે છે.

iv જર્મપ્લાઝમના સ્ટોકમાંથી જ્યારે પણ જરૂર પડે ત્યારે મોટી સંખ્યામાં છોડ મેળવી શકાય છે.

v. રાષ્ટ્રીય અને આંતરરાષ્ટ્રીય સરહદો દ્વારા તેમના પરિવહન માટેના અવરોધો ન્યૂનતમ છે (કારણ કે જર્મપ્લાઝમ વિશિષ્ટ પરિસ્થિતિઓમાં જાળવવામાં આવે છે).

જર્મપ્લાઝમના ઇન વિટ્રો સંરક્ષણ માટે મુખ્યત્વે ત્રણ અભિગમો છે:

1. ક્રાયોપ્રિઝર્વેશન (ફ્રીઝ-પ્રિઝર્વેશન)

2. કોલ્ડ સ્ટોરેજ

3. લો-પ્રેશર અને લો-ઓક્સિજન સ્ટોરેજ

**ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન :**

ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન (ગ્રીક, ક્રાયોસ-ફ્રોસ્ટ) નો શાબ્દિક અર્થ થાય છે સ્થિર સ્થિતિમાં સાચવવું. ક્રિઓપ્રિઝર્વેશનમાં સામેલ સિદ્ધાંત એ છે કે ક્રાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સની હાજરીમાં તાપમાન ઘટાડીને છોડના કોષ અને ટીશ્યુ કલ્ચરને શૂન્ય ચયાપચય અથવા બિન-વિભાજન સ્થિતિમાં લાવવાનો છે.

ક્રાયોપ્રિઝર્વેશનનો વ્યાપક અર્થ થાય છે અત્યંત નીચા તાપમાને જર્મપ્લાઝમનો સંગ્રહ:

i ઘન કાર્બન ડાયોક્સાઇડથી વધુ (-79 ° સે પર)

ii. નીચા તાપમાન ડીપ ફ્રીઝર (-80 ° સે પર)

iii બાષ્પ તબક્કામાં નાઇટ્રોજન (-150 ° સે પર)

iv પ્રવાહી નાઇટ્રોજનમાં (-196 ° સે પર)

આ પૈકી, પ્રવાહી નાઇટ્રોજનનો ઉપયોગ કરીને સૌથી વધુ ઉપયોગમાં લેવાતી ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન છે. પ્રવાહી નાઇટ્રોજન (-196 ° સે) ના તાપમાને, કોષો સંપૂર્ણપણે નિષ્ક્રિય સ્થિતિમાં રહે છે અને તેથી લાંબા સમય સુધી શકાય છે.

વાસ્તવમાં સાચવી, ચોખા, ઘઉં, મગફળી, કસાવા, શેરડી, સ્ટ્રોબેરી, નાળિયેર જેવા છોડની વિશાળ શ્રેણીના જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ માટે કાયોપ્રીઝરવેશન સફળતાપૂર્વક લાગુ કરવામાં આવ્યું છે. કાયોપ્રિઝરવેશનમાં સંગ્રહિત કોષો, મેરીસ્ટેમ્સ અને એમ્બ્રોયોમાંથી કેટલાક છોડને પુનર્જીવિત કરી શકાય છે.

### ક્રિઓપ્રીઝરવેશનની પદ્ધતિ:

ફીઝ પ્રિઝરવેશનની તકનીક કોષોમાં હાજર પાણીને પ્રવાહીમાંથી ઘન સ્થિતિમાં સ્થાનાંતરિત કરવા પર આધારિત છે. કોષોમાં ક્ષાર અને કાર્બનિક પરમાણુઓની હાજરીને કારણે, શુદ્ધ પાણીના ઠંડું બિંદુ (આશરે 0 ° સે) ની તુલનામાં કોષના પાણીને સ્થિર થવા માટે (-68 ° સે સુધી પણ) વધુ નીચા તાપમાનની જરૂર પડે છે. જ્યારે નીચા તાપમાને સંગ્રહિત કરવામાં આવે છે, ત્યારે કોષો/પેશીઓમાં મેટાબોલિક પ્રક્રિયાઓ અને જૈવિક બગાડ લગભગ બંધ થઈ જાય છે.

### સફળ કાયોપ્રિઝરવેશન માટે સાવચેતીઓ/મર્યાદાઓ:

જીવંત છોડના કોષોનું સારું ટેકનિકલ અને સૈદ્ધાંતિક જ્ઞાન તેમજ કાયોપ્રિઝરવેશન ટેકનિક આવશ્યક છે.

સફળ ક્રિઓપ્રિઝરવેશન માટે અન્ય સાવચેતીઓ (મર્યાદાઓ જેને દૂર કરવી જોઈએ) નીચે સૂચિબદ્ધ છે:

i કોશિકાઓની અંદર બરફના સ્ફટિકોની રચના અટકાવવી જોઈએ કારણ કે તે ઓર્ગેનેલ્સ અને કોષને ઈજા પહોંચાડે છે.

ii. દ્રાવ્યોની ઉચ્ચ અંતઃકોશિક સાંદ્રતા પણ કોષોને નુકસાન પહોંચાડી શકે છે.

iii કેટલીકવાર, કોષમાંથી અમુક દ્રાવ્ય ઠંડું દરમિયાન બહાર નીકળી શકે છે.

iv કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સ કોશિકાઓની કાર્યક્ષમતાને પણ અસર કરે છે.

v. છોડની સામગ્રીની શારીરિક સ્થિતિ પણ મહત્વપૂર્ણ છે.

### કાયોપ્રિઝરવેશનની તકનીક:

શૂટ ટીપના ક્રિઓપ્રીઝરવેશન માટેના પ્રોટોકોલની રૂપરેખા આકૃતિ 48.1 માં દર્શાવવામાં આવી છે. છોડના પુનઃજનન પછી છોડના કોષની સંસ્કૃતિનું કાયોપ્રિઝરવેશન વ્યાપકપણે નીચેના તબક્કાઓનો સમાવેશ કરે છે

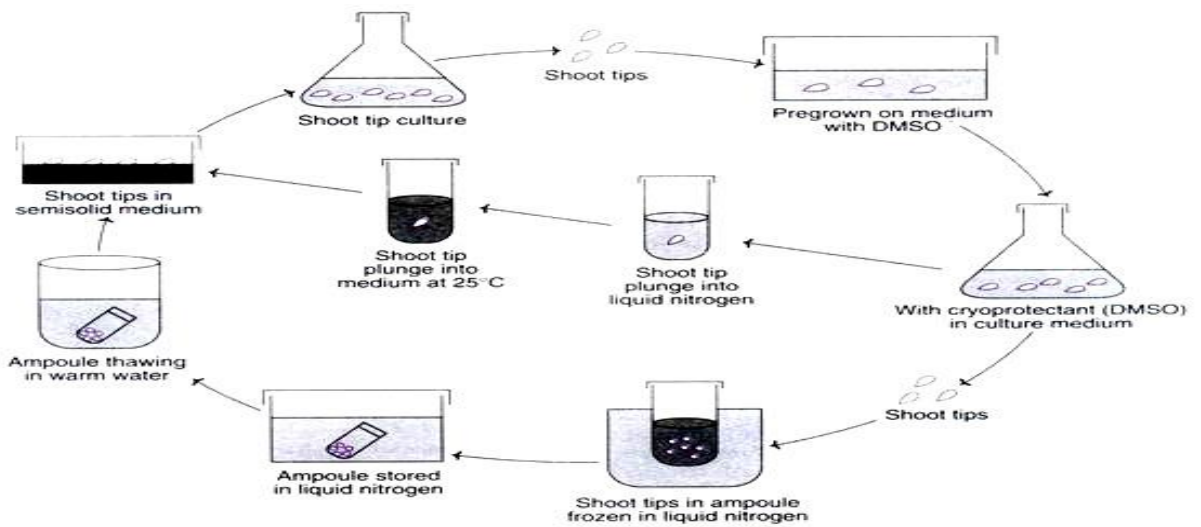


Fig. 48.1 : An outline of the protocol for cryopreservation of shoot tip (DMSO-Dimethyl sulfoxide).

શૂટ ટીપના ક્રિઓપ્રીઝરવેશન માટે પ્રોટોકોલ

1. જંતુરહિત પેશી સંસ્કૃતિનો વિકાસ
2. કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સ અને પ્રીટ્રીટમેન્ટનો ઉમેરો
3. ઠંડું
4. સંગ્રહ
5. પીગળવું
6. પુનઃસંસ્કૃતિ
7. અસ્તિત્વ/સધ્ધરતાનું માપન
8. છોડનું પુનર્જીવન.

ઉપરોક્ત તબક્કાના મુખ્ય લક્ષણોનું ટૂંકમાં વર્ણન કરવામાં આવ્યું છે.

### જંતુરહિત પેશી સંસ્કૃતિનો વિકાસ:

મોર્ફોલોજિકલ અને ફિઝિયોલોજિકલ પાત્રોના ચોક્કસ સંદર્ભ સાથે છોડની પ્રજાતિઓ અને પેશીઓની પસંદગી મોટાભાગે કાયોપ્રોત્રિઝવેશનમાં જીવિત રહેવાની એક્સ્પ્લાન્ટની ક્ષમતાને પ્રભાવિત કરે છે. છોડમાંથી કોઈપણ પેશીનો ઉપયોગ ક્રિઓપ્રિઝવેશન માટે થઈ શકે છે જેમ કે મેરીસ્ટેમ્સ, એમ્બ્રીયો, એન્ડોસ્પર્મ્સ, ઓવ્યુલ્સ, બીજ, સંવર્ધિત છોડના કોષો, પ્રોટોપ્લાસ્ટ્સ, કોલ્વ્યુસ. આ પૈકી, મેરિસ્ટેમેટિક કોષો અને સસ્પેન્શન સેલ કલ્ચર, લેટ લેગ ફેઝ અથવા લોગ તબક્કામાં સૌથી વધુ યોગ્ય છે.

### કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સનો ઉમેરો અને પ્રીટ્રીટમેન્ટ :

કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સ એવા સંયોજનો છે જે કોષોને ઠંડું અથવા પીગળવાથી થતા નુકસાનને અટકાવી શકે છે. કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સની હાજરીથી પાણીનું ઠંડું બિંદુ અને સુપર-ફ્રીઝિંગ પોઈન્ટ ઘટે છે. પરિણામે, ક્રિઓપ્રિઝવેશનની પ્રક્રિયા દરમિયાન બરફના સ્ફટિકનું નિર્માણ મંદ પડે છે.

ઘણા કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સ છે જેમાં ડાયમિથાઈલ સલ્ફોક્સાઈડ (DMSO), ગ્લિસરોલ, ઇથિલિન, પ્રોપીલીન, સુક્રોઝ, મેનોઝ, ઝુક્રોઝ, પ્રોલાઇન અને એસેટામાઇડનો સમાવેશ થાય છે. આ પૈકી, DMSO, સુક્રોઝ અને ગ્લિસરોલનો સૌથી વધુ ઉપયોગ થાય છે. સામાન્ય રીતે, કોષો/ટીશ્યુને નુકસાન કર્યા વિના વધુ અસરકારક ક્રિઓપ્રિઝવેશન માટે એકને બદલે કાયોપ્રોટેક્ટન્ટના મિશ્રણનો ઉપયોગ કરવામાં આવે છે.

### ઠંડું \_

નીચા તાપમાને કોષોની સંવેદનશીલતા યલ છે અને મોટાભાગે છોડની પ્રજાતિઓ પર આધાર રાખે છે.

ચાર વિવિધ પ્રકારની ફ્રીઝિંગ પદ્ધતિઓનો ઉપયોગ થાય છે:

#### 1. ધીમી થીજવાની પદ્ધતિ:

પેશી અથવા છોડની જરૂરી સામગ્રી 0.5-5°C/મિનિટના ધીમા ઠંડક દરે 0°C થી -100°C સુધી ધીમે ધીમે સ્થિર થાય છે, અને પછી પ્રવાહી નાઇટ્રોજનમાં સ્થાનાંતરિત થાય છે. ધીમી ઠંડક પદ્ધતિનો ફાયદો એ છે કે કોષોમાંથી પાણીનો થોડો જથ્થો બહારની તરફ વહે છે. આ ઇન્ડ્રાસેલ્યુલર ફ્રીઝિંગને બદલે એક્સ્ટ્રા સેલ્યુલર બરફની રચનાને પ્રોત્સાહન આપે છે. આના પરિણામે, છોડના કોષો આંશિક રીતે નિર્જલીકૃત થાય છે અને વધુ સારી

રીતે જીવે છે. સસ્પેન્શન કલ્ચરના ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન માટે ધીમી-ફ્રીઝિંગ પ્રક્રિયાનો સફળતાપૂર્વક ઉપયોગ થાય છે.

## 2. ઝડપી ઠંડું કરવાની પદ્ધતિ:

આ તકનીક એકદમ સરળ છે અને તેમાં છોડની સામગ્રી ધરાવતી શીશીને પ્રવાહી નાઇટ્રોજનમાં ડૂબકી મારવાનો સમાવેશ થાય છે. ઝડપી ઠંડું દરમિયાન, તાપમાનમાં  $-300^{\circ}$  થી  $-1000^{\circ}\text{C}$ /મિનિટમાં ઘટાડો થાય છે. ઠંડું કરવાની પ્રક્રિયા એટલી ઝડપથી હાથ ધરવામાં આવે છે કે કોષોની અંદર નાના બરફના સ્ફટિકો બને છે. વધુમાં, અંતઃકોશિક બરફના સ્ફટિકોની વૃદ્ધિ પણ ન્યૂનતમ છે. રેપિડ ફ્રીઝિંગ ટેકનિકનો ઉપયોગ શૂટ ટીપ્સ અને સોમેટિક એમ્બ્રિયોના ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન માટે થાય છે.

## 3. સ્ટેપવાઈઝ ફ્રીઝિંગ પદ્ધતિ:

આ ધીમી અને ઝડપી ફ્રીઝિંગ પ્રક્રિયાઓનું સંયોજન છે (બંનેના ફાયદાઓ સાથે), અને તે એક પગલાવાર રીતે હાથ ધરવામાં આવે છે. છોડની સામગ્રીને પહેલા મધ્યવર્તી તાપમાને ઠંડું કરવામાં આવે છે અને લગભગ 30 મિનિટ સુધી ત્યાં જાળવવામાં આવે છે અને પછી તેને પ્રવાહી નાઇટ્રોજનમાં ડૂબાડીને ઝડપથી ઠંડું કરવામાં આવે છે. સસ્પેન્શન કલ્ચર, શૂટ એપીસ અને કળીઓના ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન માટે સ્ટેપવાઈઝ ફ્રીઝિંગ પદ્ધતિનો સફળતાપૂર્વક ઉપયોગ કરવામાં આવ્યો છે.

## 4. ડ્રાય ફ્રીઝિંગ પદ્ધતિ:

કેટલાક કામદારોએ અહેવાલ આપ્યો છે કે બિન-અંકુરિત સૂકા બીજ ખૂબ જ નીચા તાપમાને ઠંડકમાં ટકી શકે છે, જે પાણીમાં ભેળવતા બીજથી વિપરીત છે જે કાયોજેનિક ઇજાઓ માટે સંવેદનશીલ હોય છે. એવી જ રીતે, નિર્જલીકૃત કોષો ક્રિઓપ્રિઝર્વેશન પછી વધુ સારી રીતે જીવિત રહેવાનો દર ધરાવે છે.

## સંગ્રહ:

ચોક્કસ તાપમાને થીજી ગયેલી સંસ્કૃતિઓની જાળવણી ઠંડક જેટલી જ મહત્વપૂર્ણ છે. સામાન્ય રીતે, સ્થિર કોષો/પેશીઓને  $-70$  થી  $-196^{\circ}\text{C}$  ની રેન્જમાં તાપમાને સંગ્રહ માટે રાખવામાં આવે છે. જો કે,  $-130^{\circ}\text{C}$  થી વધુ તાપમાન સાથે, કોશિકાઓની અંદર બરફના સ્ફટિકની વૃદ્ધિ થઈ શકે છે જે કોષોની કાર્યક્ષમતા ઘટાડે છે. સંગ્રહ આદર્શ રીતે પ્રવાહી નાઇટ્રોજન રેફ્રિજરેટરમાં કરવામાં આવે છે - બાષ્પ તબક્કામાં  $150^{\circ}$  સે પર અથવા પ્રવાહી તબક્કામાં  $-196^{\circ}$  સે પર.

સંગ્રહનો અંતિમ ઉદ્દેશ તમામ સેલ્યુલર મેટાબોલિક પ્રવૃત્તિઓને રોકવા અને તેમની કાર્યક્ષમતા જાળવી રાખવાનો છે. લાંબા ગાળાના સંગ્રહ માટે, પ્રવાહી નાઇટ્રોજનમાં  $-196^{\circ}$  સે તાપમાન આદર્શ છે. પ્રવાહી નાઇટ્રોજન રેફ્રિજરેટરમાં પ્રવાહી નાઇટ્રોજનનો નિયમિત અને સતત પુરવઠો જરૂરી છે. કેટલાક નમૂનાઓમાં સમયાંતરે જર્મપ્લાઝમની સધ્ધરતા તપાસવી જરૂરી છે. જર્મપ્લાઝમ સ્ટોરેજનું યોગ્ય દસ્તાવેજીકરણ કરવું પડશે.

દસ્તાવેજીકૃત માહિતી નીચેની વિગતો સાથે વ્યાપક હોવી જોઈએ:

i સામગ્રીનું વર્ગીકરણ વર્ગીકરણ

ii. સંસ્કૃતિનો ઇતિહાસ

iii મોર્ફોજેનિક સંભવિત

iv આનુવંશિક મેનિપ્યુલેશન્સ કરવામાં આવે છે

v. સોમાક્લોનલ ભિન્નતા

vi સંસ્કૃતિનું માધ્યમ

vii વૃદ્ધિ ગતિશાસ્ત્ર

**પીગળવું:**

પીગળવું સામાન્ય રીતે એમ્પૂલ્સમાં સ્થિર થયેલા નમૂનાઓને જોરશોરથી ધૂમરાતો સાથે ગરમ પાણી (તાપમાન 37-45 ° સે) ના સ્નાનમાં ડૂબકીને હાથ ધરવામાં આવે છે. આ અભિગમ દ્વારા, ઝડપી પીગળવું (500- 750 °C મિનિટ -1 ના દરે ) થાય છે, અને આ કોષોને બરફના સ્ફટિકની રચનાની નુકસાનકારક અસરોથી રક્ષણ આપે છે.

જેમ જેમ પીગળવું થાય છે (બરફ સંપૂર્ણપણે પીગળી જાય છે) ત્યારે એમ્પૂલ્સ ઝડપથી 20-25 ° સે તાપમાને પાણીના સ્નાનમાં સ્થાનાંતરિત થાય છે. આ સ્થાનાંતરણ જરૂરી છે કારણ કે ગરમ (37-45°C) પાણીના સ્નાનમાં લાંબા સમય સુધી રાખવામાં આવે તો કોષોને નુકસાન થાય છે. ક્રિઓપ્રિઝર્લ સામગ્રી (કોષો/ટીશ્યુ) માટે જ્યાં પાણીનું પ્રમાણ ઠંડું થતાં પહેલાં શ્રેષ્ઠ સ્તરે ઘટાડી દેવામાં આવ્યું હોય, ત્યાં ફેકવાની પ્રક્રિયા ઓછી જટિલ બની જાય છે.

**પુનઃસંસ્કૃતિ:**

સામાન્ય રીતે, કાયોપ્રોટેક્ટન્ટ્સને દૂર કરવા માટે ઓગળેલા જર્મપ્લાઝમને ઘણી વખત ઘોવામાં આવે છે. આ સામગ્રીને પછી પ્રમાણભૂત પ્રક્રિયાઓને અનુસરીને નવા માધ્યમમાં પુનઃસંવર્ધન કરવામાં આવે છે. કેટલાક કામદારો ઘોયા વિના ઓગળેલી સામગ્રીને સીધી રીતે સંવર્ધન કરવાનું પસંદ કરે છે. આ એટલા માટે છે કારણ કે ઠંડું દરમિયાન કોશિકાઓમાંથી મુક્ત થતા કેટલાક મહત્વપૂર્ણ પદાર્થો, વિદ્રો સંસ્કૃતિમાં પ્રોત્સાહન આપતા હોવાનું માનવામાં આવે છે.

**અસ્તિત્વ/સધ્ધરતાનું માપન:**

સ્થિર કોષોની કાર્યક્ષમતા/અસ્તિત્વને કાયોપ્રિઝર્વેશનના કોઈપણ તબક્કે અથવા પીગળ્યા પછી અથવા પુનઃસંવર્ધન પછી માપી શકાય છે.

ક્રિઓપ્રિઝર્લ કોશિકાઓની કાર્યક્ષમતા નક્કી કરવા માટે ઉપયોગમાં લેવાતી તકનીકો કોષ સંસ્કૃતિઓ માટે ઉપયોગમાં લેવાતી સમાન છે. ટ્રિફેનાઇલ ટેટ્રાઝોલિયમ ક્લોરાઇડ (TTC), ઇવાન બ્લુ અને ફ્લોરોસીન ડાયસેટેટ (FDA) નો ઉપયોગ કરીને સ્ટેનિંગ તકનીકોનો સામાન્ય રીતે ઉપયોગ થાય છે.

ક્રિઓપ્રિઝર્લ કોશિકાઓની કાર્યક્ષમતા માપવા માટેનું શ્રેષ્ઠ સૂચક કોષ વિભાજનમાં તેમનો પ્રવેશ અને સંસ્કૃતિમાં ફરીથી વૃદ્ધિ છે. આનું મૂલ્યાંકન નીચેના અભિવ્યક્તિ દ્વારા કરી શકાય છે.

**છોડનું પુનર્જીવન :**

જર્મપ્લાઝમના ક્રાયોપ્રિઝર્વેશનનો અંતિમ હેતુ ઇચ્છિત છોડને પુનર્જીવિત કરવાનો છે. છોડની યોગ્ય વૃદ્ધિ અને પુનઃજનન માટે, ક્રિઓપ્રીઝર્વ્ડ કોશિકાઓ/પેશીઓને કાળજીપૂર્વક સંવર્ધન અને ઉગાડવાની જરૂર છે. છોડના સફળ પુનઃજનન માટે યોગ્ય પર્યાવરણીય પરિસ્થિતિઓની જાળવણી ઉપરાંત ચોક્કસ વૃદ્ધિને પ્રોત્સાહન આપતા પદાર્થોનો ઉમેરો કરવો જરૂરી છે.

ક્રાયોપ્રિઝર્વેશન માટે સફળતાપૂર્વક ઉપયોગમાં લેવાતા છોડની (વિવિધ સ્વરૂપોમાં) પસંદગીની યાદી કોષ્ટક 48.1 માં આપવામાં આવી છે.

<b>TABLE 48.1 A selected list of plants in various forms that are successfully cryopreserved</b>	
<b>Plant material</b>	<b>Plant species</b>
Cell suspensions	<i>Oryza sativa</i>
	<i>Glycine max</i>
	<i>Zea mays</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>
	<i>Capsicum annum</i>
Callus	<i>Oryza sativa</i>
	<i>Capsicum annum</i>
	<i>Saccharum sp</i>
Protoplast	<i>Zea mays</i>
Meristems	<i>Nicotiana tabacum</i>
	<i>Solanum tuberosum</i>
	<i>Cicer arietinum</i>
Zygotic embryos	<i>Zea mays</i>
	<i>Hordeum vulgare</i>
	<i>Manihot esculenta</i>
Somatic embryos	<i>Citrus sinensis</i>
	<i>Daucus carota</i>
	<i>Coffea arabica</i>
Pollen embryos	<i>Nicotiana tabacum</i>
	<i>Citrus sp</i>
	<i>Atropa belladonna</i>

છોડની યાદી

### કોલ્ડ સ્ટોરેજ :

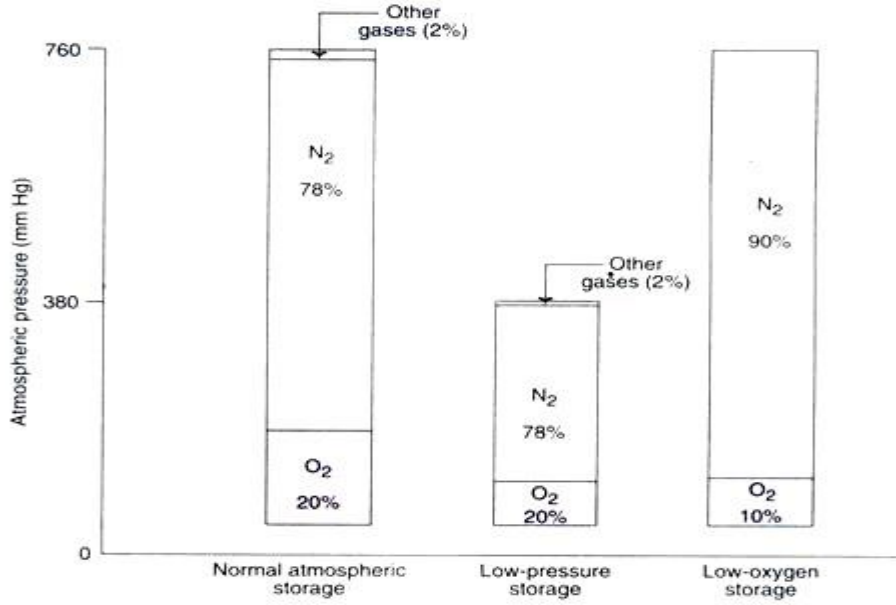
કોલ્ડ સ્ટોરેજમાં મૂળભૂત રીતે જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણનો સમાવેશ થાય છે નીચા અને ઠંડક વિનાના તાપમાને (1-9 ° સે) છોડની સામગ્રીનો વિકાસ કોલ્ડ સ્ટોરેજમાં ક્રાયોપ્રિઝર્વેશનમાં પૂર્ણ વિરામથી વિપરીત ધીમો પડી જાય છે. આથી, કોલ્ડ સ્ટોરેજને ધીમી વૃદ્ધિ જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ પદ્ધતિ તરીકે ગણવામાં આવે છે. આ અભિગમનો મુખ્ય ફાયદો એ છે કે છોડની સામગ્રી (કોષ/પેશીઓ) ક્રાયોજેનિક ઇજાઓને આધિન નથી.

લાંબા ગાળાના કોલ્ડ સ્ટોરેજ સરળ, ખર્ચ-અસરકારક છે અને સારા અસ્તિત્વ દર સાથે જર્મપ્લાઝમ આપે છે. આ અભિગમ દ્વારા ફળના ઝાડની જાતોના ઘણા વિદ્રો વિકસિત અંકુર/છોડ સફળતાપૂર્વક સંગ્રહિત કરવામાં આવ્યા છે જેમ કે દ્રાક્ષના છોડ, સ્ટ્રોબેરીના છોડ.

વાયરસ-મુક્ત સ્ટ્રોબેરીના છોડને 10 ડિગ્રી સેલ્સિયસ તાપમાને 6 વર્ષ સુધી સાચવી શકાય છે, જેમાં સમયાંતરે (2-3 મહિનામાં એકવાર) મધ્યમના થોડા ટીપાં ઉમેરવામાં આવે છે. દ્રાક્ષના કેટલાંક છોડને વાર્ષિક તાજા માધ્યમમાં સ્થાનાંતરિત કરીને કોલ્ડ સ્ટોરેજ (લગભગ 9 ° સે) દ્વારા 15 વર્ષથી વધુ સમયથી સંગ્રહિત કરવામાં આવ્યા છે.

### લો-પ્રેશર અને લો-ઓક્સિજન સ્ટોરેજ :

કાયોપ્રિઝર્વેશન અને કોલ્ડ સ્ટોરેજના વિકલ્પો તરીકે, જર્મપ્લાઝમ સંરક્ષણ માટે લો-પ્રેશર સ્ટોરેજ (LPS) અને લો-ઓક્સિજન સ્ટોરેજ (LOS) વિકસાવવામાં આવ્યા છે. સામાન્ય વાતાવરણીય દબાણ, નીચા-દબાણ અને ઓછા-ઓક્સિજન હેઠળ ટીશ્યુ કલ્ચર સ્ટોરેજની ગ્રાફિક રજૂઆત ફિગ 48.2 માં દર્શાવવામાં આવી છે.



**Fig. 48.2 :** A graphic representation of tissue culture storage under normal atmospheric pressure, low-pressure, and low-oxygen.

### ટીશ્યુ કલ્ચર સ્ટોરેજ

#### લો-પ્રેશર સ્ટોરેજ (LPS) :

ઓછા દબાણના સંગ્રહમાં, છોડની સામગ્રીની આસપાસના વાતાવરણીય દબાણમાં ઘટાડો થાય છે. આના પરિણામે જર્મપ્લાઝમની આસપાસના વાયુઓ દ્વારા દબાણમાં આંશિક ઘટાડો થાય છે. નીચું આંશિક દબાણ છોડની ઇન વિટ્રો વૃદ્ધિ (સંગઠિત અથવા અસંગઠિત પેશીઓની) ઘટાડે છે. લો-પ્રેશર સ્ટોરેજ સિસ્ટમ્સ છોડની સામગ્રીના ટૂંકા ગાળાના અને લાંબા ગાળાના સંગ્રહ માટે ઉપયોગી છે.

ટૂંકા ગાળાનો સંગ્રહ ખાસ કરીને છોડની ઘણી સામગ્રીની શેલ્ફ લાઇફ વધારવા માટે ઉપયોગી છે જેમ કે ફળો, શાકભાજી, કાપેલા ફૂલો, છોડના કાપવા. સંસ્કૃતિઓમાં ઉગાડવામાં આવતા જર્મપ્લાઝમને ઓછા દબાણ હેઠળ લાંબા ગાળા માટે સંગ્રહિત કરી શકાય છે. જર્મપ્લાઝમ જાળવણી ઉપરાંત, એલપીએસ રોગકારક જીવોની પ્રવૃત્તિને ઘટાડે છે અને છોડની સંસ્કૃતિ પ્રણાલીમાં બીજકણના અંકુરણને અટકાવે છે.

#### લો-ઓક્સિજન સ્ટોરેજ (LOS) :

ઓછા ઓક્સિજન સંગ્રહમાં, ઓક્સિજનની સાંદ્રતા ઓછી થાય છે, પરંતુ નિષ્ક્રિય વાયુઓ (ખાસ કરીને નાઇટ્રોજન) ના ઉમેરા દ્વારા વાતાવરણીય દબાણ (260 mm Hg) જાળવવામાં આવે છે. 50 mm Hg ની નીચે ઓક્સિજનનું આંશિક દબાણ છોડની પેશીઓની વૃદ્ધિ (સંગઠિત અથવા અસંગઠિત પેશી) ઘટાડે છે. આ એ



હકીકતને કારણે છે કે 0 2 ની ઓછી ઉપલબ્ધતા સાથે , CO 2 નું ઉત્પાદન ઓછું છે. પરિણામે, પ્રકાશસંશ્લેષણની પ્રવૃત્તિમાં ઘટાડો થાય છે, જેનાથી છોડના પેશીઓના વિકાસ અને પરિમાણને અવરોધે છે.

### LOS ની મર્યાદાઓ:

ઓછા ઓક્સિજન સંગ્રહ દ્વારા છોડની સામગ્રીનું લાંબા ગાળાનું સંરક્ષણ ચોક્કસ પરિમાણો પછી છોડના વિકાસને અટકાવે તેવી શક્યતા છે.

જર્મપ્લાઝમ સ્ટોરેજની એપ્લિકેશન્સ :

જર્મપ્લાઝમનો સંગ્રહ છોડના સંવર્ધકો અને બાયોટેકનોલોજીસ્ટ માટે વરદાન બની ગયો છે.

કેટલીક એપ્લિકેશનોનું ટૂંકમાં વર્ણન કરવામાં આવ્યું છે:

1. સ્ટોક કલ્ચરની જાળવણી: ઘણી પ્રજાતિઓના છોડની સામગ્રી (કોષ/ટીશ્યુ કલ્ચર)ને ઘણા વર્ષો સુધી ક્રિઓપ્રીઝર્વ અને જાળવણી કરી શકાય છે અને જ્યારે જરૂર પડે ત્યારે તેનો ઉપયોગ કરી શકાય છે. આ ઇન વિટ્રો સેલ લાઇન મેન્ટેનન્સથી વિપરીત છે જે સધ્ધરતા વધારવા માટે સમયાંતરે પેટા-કલ્ચર અને ટ્રાન્સફર કરવાની હોય છે. આમ, જર્મપ્લાઝમ સ્ટોરેજ એ પેટા-સંવર્ધનને ટાળવા અને કોષો/પેશીઓને ઘણા વર્ષો સુધી સક્ષમ સ્થિતિમાં જાળવી રાખવા માટે એક આદર્શ પદ્ધતિ છે.
2. સેકન્ડરી મેટાબોલાઇટ્સ (દા.ત. દવાઓ) ઉત્પન્ન કરતી કોષ સંસ્કૃતિના લાંબા ગાળાના સંરક્ષણ માટે ક્રાયોપ્રીઝર્વેશન એ એક આદર્શ પદ્ધતિ છે.
3. રોગ (પેથોજેન)-મુક્ત છોડની સામગ્રીને સ્થિર કરી શકાય છે અને જ્યારે પણ જરૂરી હોય ત્યારે તેનો પ્રચાર કરી શકાય છે.
4. અવ્યવસ્થિત બીજ લાંબા સમય સુધી જાળવી શકાય છે.
5. સંસ્કૃતિઓમાં સોમાક્લોનલ અને ગેમેટોક્લોનલ ભિન્નતાઓનું સંરક્ષણ.
6. લુપ્તપ્રાય પ્રજાતિઓમાંથી છોડની સામગ્રીનું સંરક્ષણ કરી શકાય છે.
7. આયુષ્ય વધારવા માટે પરાગનું સંરક્ષણ.
8. સોમેટિક હાઇબ્રિડાઇઝેશન અને અન્ય આનુવંશિક મેનિપ્યુલેશન્સ દ્વારા વિકસિત દુર્લભ જર્મપ્લાઝમ સંગ્રહિત કરી શકાય છે.
9. શીત પ્રતિરોધક મ્યુટન્ટ સેલ લાઇનની પસંદગી માટે ક્રાયોપ્રીઝર્વેશન એ સારી પદ્ધતિ છે જે હિમ પ્રતિરોધક છોડમાં વિકાસ કરી શકે છે.
10. આંતરરાષ્ટ્રીય સ્તરે માહિતીની આપ-લે માટે જર્મપ્લાઝમ બેંકોની સ્થાપના.

### જર્મપ્લાઝમ સ્ટોરેજની મર્યાદાઓ:

જર્મપ્લાઝમ સંગ્રહની મુખ્ય મર્યાદાઓ મોંઘા સાધનો અને પ્રશિક્ષિત કર્મચારીઓ છે. જો કે, નજીકના ભવિષ્યમાં છોડની સામગ્રીના ક્રાયોપ્રીઝર્વેશન માટે ઓછી કિંમતની ટેકનોલોજી વિકસાવવી શક્ય બની શકે છે.