مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۲، سال ۱۳۸۴ (۴۳۴-۴۲۵)

پرتوتابی گاما به پینه های رویان‌زا و رویان‌زایی از پینه‌های عادت کرده لیمو آب (*Citrus aurantifolia* var. Mexican lime)

محمود رقامی[1] و رضا فتوحی قزوینی[2]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱۰/۱۷

خلاصه

پینه های رویان‌زای حاصل از تخمکهای تلقیح نشده لیموآب شیراز روی محیط کشت موراشیگی و توکر[1] (MT) به همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو نگهداری شد. پینه‌های رویان‌زا در معرض پرتوتابی گاما در دوزهای مختلف ٦٠، ٨٠، ١٠٠ و ١٢٠ گری قرار گرفت. با استفاده از آزمون ترا زولیوم، بیشترین درصد زنده ماندن یاخته‌ها در دوز ٦٠ گری به میزان ۷۳/۷۲ بود که با افزایش دوز گاما از درصد زنده ماندن یاخته‌ها کاسته شد. رویان‌زایی از پینه‌ها روی محیط کشت MT حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک[2] (GA_3) تیجه داد. در این پژوهش پس از ۸ ماه از کشت پینه ها و پرتوتابی، رویان‌زایی با مشکل مواجه شد در عین حال پینه‌ها عادت به رشد کرده بودند. تنش پینه‌ها در محیط کشت MT بدون قند طی ٤ هفته و سپس انتقال به محیط کشت MT حاوی GA_3 mgl^{-1} ۱ رویان‌زایی را تحریک نمود. پس از ۲ هفته از انتقال، به ازای هر ۲۵۰ میلی‌گرم پینه حدود ۱۵۰ رویان حاصل شد. افزودن مقادیر بالای تنظیم‌کننده‌های رشد GA_3 و ٦- بنزیل آمینوپیورین[3] (BA) به پینه‌های عادت کرده، از رویان‌زایی جلوگیری نمود و سبب تولید مجدد پینه از شبه رویانها گردید. از پینه های پرتو دیده در دوزهای ٦٠ و ١٠٠ گری، حدود ۷۰ و ۸۵ درصد رویان زایی نسبت به پینه‌های تیمار نشده کمتر بود و در دوز ۱۲۰ گری رویان‌زایی رخ نداد. میزان فعالیت پراکسیداز پینه‌ها اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در پینه‌های تیمار نشده ۱/۷۲ بود که با افزایش دوز گاما میزان فعالیت پراکسیداز کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: لیمو آب، پینه رویان‌زا، پرتوتابی گاما، پینه عادت کرده، فعالیت پراکسیداز

مقدمه

جهش‌زایی در مواد بیولوژیکی با عوامل جهش‌زا، موجب تغییرات ژنتیکی می‌شود. فنون کشت بافت و یاخته، کاربرد جهشهای القایی درون شیشه‌ای را گسترش داد. بهنژادی جهشی در مرکبات ابتدا بر انتخاب جهشهای خودبخودی مطلوب متمرکز شده بود و بعدها با القای یاخته‌ها و بافتها بوسیله پرتوهای گاما و دیگر جهش‌زاها، گیاهان جهش‌یافته بدون بذر تولیدشد(۴). پرتوهای گاما تاکنون برای القای جهش در بافتهای مختلف گیاهی از قبیل بذر، جوانه و قطعات درون شیشه‌ای بکار رفته‌اند (۹).

اولین کوششها در پرتقال برای تولید جهش‌یافته‌های مقاوم به دمای پایین، با پرتوتابی گاما در سال ۱۹۶۵ گزارش شد(۴). در مرکبات برای جلوگیری از تولید شیمر، کشت درون شیشه‌ای بافتهای خورش، بعنوان منبع گیاهی پایه در بررسیهای فیزیولوژیک و بهنژادی محسوب می‌شود(۶). رویانهای رویشی در مرکبات بطور مستقیم از تخمک (۱۴) یا از پینه سفید

1. Murashige & Tucker (16)
2. Gibberellic acid
3. Benzylaminopurine

مکاتبه کننده: رضا فتوحی قزوینی

تخمکهای تلقیح نشده و در مواردی از پینه‌های زیرلپه دانهالها تولید شده است(۶). یاخته‌هایی که مولد رویانها هستند، ویژگیهای یاخته‌های مریستمی را از خود نشان می‌دهند(۹). فرایند رویان‌زایی و تولید گیاه از ریزنمونه‌های تیمار شده با گاما حائز اهمیت است، زیرا نتایج قطعی استفاده از پرتوتابی در گیاهان بدست آمده قابل پیش‌بینی خواهد بود. از طرفی بالا بودن درصد تولید گیاهان عادی از نمونه‌های تیمار شده، نشان می‌دهد که جهشهای القا شده محدود بوده و سبب تولید گیاهان غیر طبیعی نشده است(۱۰). دوز بهینه، مقداری است که حداکثر فراوانی جهشهای مطلوب را دارد و سبب کمترین تلفات می‌گردد(۱). پژوهشگران غالبا دوز نزدیک به LD50 را دوز بهینه می‌دانند(۱). در برنامه‌های پرتوتابی، آزمایشهای مقدماتی برای تعیین دوز مناسب جهش‌زا انجام می‌شود. انتخاب مقدار دوز گاما برای پرتوتابی بسته به نوع گیاه، اندام مورد استفاده و مرحله رشدی گیاه متفاوت است.

پدیده عادت کردن پینه‌ها به تنظیم کننده‌های رشد، حالتی است که در آن پینه‌ها قادرند به مدت طولانی و بدون اینکه از شدت رشد آنها کاسته شود، به رشد خود در محیط کشت عاری از تنظیم کننده‌های رشد ادامه دهند. پدیده عادت کردن به رشد در پینه‌ها و نگهداری طولانی مدت آنها در محیط فاقد تنظیم کننده رشد توسط پژوهشگران دیگر در سایر گونه‌های مرکبات نیز گزارش شده است (۷، ۹، ۱۰). با وجود حفظ قدرت ازدیاد پینه‌های عادت کرده، رویان‌زایی از این پینه‌ها غالبا با مشکل مواجه است(۱۰).

اگرچه تعداد پژوهشهای به‌زراعی و بهنژادی در ایران کم نبوده است، ولی بهره‌گیری از فناوری زیستی جدید، در مرکبات و پرتوتابی برای تولید لاین‌های مقاوم به تنشها و بیماریها، کم گزارش شده است(۲). رقم لیموآب شیراز[1] از گروه مرکبات لایم، به بیماری شانکر باکتریایی حساس است. برای دستیابی به لاین‌های مقاوم به شانکر و یا تنشهای دیگر، در این بررسی تاثیر پرتوتابی روی پینه‌های رویان‌زای لیمو آب مطالعه می‌شود. سپس توانایی رویان‌زایی از پینه‌های تیمار شده ارزیابی خواهد شد.

1-Mexican lime

مواد و روش‌ها

میوه‌های رسیده لیمو آب شیراز (مکزیکن لایم) جهت استخراج تخمکهای تلقیح نشده یا توسعه نیافته با هدف تهیه پینه رویان‌زا، از بازار تهیه گردید. میوه‌ها قبل از گندزدایی با مایع ظرف شویی شسته شد. در مرحله بعد با غوطه وری میوه‌ها در الکل ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و شعله‌ور ساختن سطح میوه در اتاقک با جریان هوای سترون، عمل گندزدایی میوه‌ها صورت گرفت. در اتاقک با جریان هوای سترون، تخمکهای تلقیح نشده یا توسعه نیافته روی محیط کشت MT (۱۶) به همراه ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره جو[2](ME) و ۵ درصد سوکروز کشت شد (۲). رشد پینه‌های بدست آمده، روی محیط کشت MT دارای غلظتهای ۳۰۰ ، ۵۰۰ ، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو ارزیابی شد. زیرکشت پینه‌ها روی محیط کشت MT همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ME با تنظیم فواصل هر ۳ هفته ادامه یافت. نمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی ۱۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی و دمای ثابت ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پس از ۸ ماه با تولید حدود ۳۰ گرم پینه امکان انجام تیمارهای مختلف با پرتوهای گاما میسر گردید (شکل ۱). پینه‌های رویان‌زا در ۸ پتری هر یک شامل سه توده پینه به قطر ۲ سانتی متر، برای تیمار با پرتوهای گاما به مرکز کشاورزی و پزشکی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران- کرج انتقال یافت. در اتاق منبع گاما ظروف پتری در فاصله مشخصی از مرکز گاما درون دستگاه به صورت افقی در برابر دوزهای مختلف ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ گری (Gy)گاما قرار گرفت. با توجه به دوزیمتری منبع کبالت سازمان انرژی اتمی، نمونه‌ها بر حسب دوزهای مورد نیاز به ترتیب ۷۰، ۹۵، ۱۱۵ و ۱۴۰ ثانیه پرتوتابی شد.

آزمون زنده ماندن پینه‌ها با استفاده از تترا زولیوم کلراید به روش توویل و مازور(۱۸)، یک هفته پس از پرتوتابی انجام گرفت. محلول تترازولیوم کلراید[3] TTC از حل کردن ۰/۵ گرم TTC در بافر سدیم فسفات با غلظت ۰/۰۵ گرم و pH = ۷/۵،

2 . Malt extract

3- 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride

تهیه شد. از محلول TTC، ۳ میلی‌لیتر به هر ۱۰۰ میلی‌گرم پینه رویان‌زا از هر تیمار افزوده گردید. پینه‌های تیمار شده با گاما در محلول معرف به مدت ۲۲- ۱۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بدون تکان دادن باقی ماندند. سپس پینه‌ها با آب مقطر شسته شد و ۳ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به هر یک برای جداسازی رنگ قرمز فورمازان افزوده گردید. محلول قرمز پس از ۳۰ دقیقه جدا شد و بر حسب شدت رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر، میزان زنده ماندن یاخته‌ها معین گردید. به منظور باززایی از محیطهای کشت جامد و مایع جدول ۱ استفاده شد. اثر اسید جیبرلیک با غلظتهای متفاوت برای رویان‌زایی پینه‌ها بررسی شد. طی فرایند رویان‌زایی، نمونه‌ها در روشنایی ۱۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی در شبانه‌روز و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داشت. تنشها و محرکهای مختلفی برای رویان‌زایی آزمایش شد: ۱) خودداری از زیرکشت پینه‌ها، ۲)تعویض نوع قند در محیط کشت، ۳)کشت پینه روی محیط کشت بدون قند، ۴)کشت پینه‌های حاصل از شبه رویان‌ها، ۵)زیرکشت‌های متوالی با فواصل کم، ۶)استفاده از مقادیر بالای هورمون، ۷) استفاده از کشت تعلیقی.

جدول ۱- ترکیب محیطهای کشت برای باززایی پینه‌های رویان‌زا از تخمکهای تلقیح نشده لیموآب شیراز

	ترکیب
محیطهای کشت جامد	MT+GA_3(0.1 mg l^{-1})+Adenin (40 mg l^{-1})
	MT+GA_3 (1 mg l^{-1})+Adenin (40 mg l^{-1})
	MT+ Lactose(5%)+ Adenin(40 mg l^{-1})
	MT+ BA(5 mg l^{-1})+ GA_3(10 mg l^{-1})
	MT+ GA_3(10 mg l^{-1})
محیطهای کشت مایع	MT+ Galactose(2%)
	MT+ Galactose(2%) + GA_3(2 mg l^{-1})
	MT+ BA(5 mg l^{-1})
	MT+ BA(5 mg l^{-1})+ GA_3(2 mg l^{-1})

در این پژوهش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش یوگاروا و همکاران (۲۰) در پینه‌های رویان‌زای حاصل از تخمکهای تلقیح نشده لیمو آب شیراز بررسی شد. به این منظور یک گرم از بافت گیاهی با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۲ (pH=۷) در داخل بوته چینی به مدت ۴۰ دقیقه به خوبی سائیده شد و سپس عصاره صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت g ۱۰۰۰۰ (۸۴۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. با پایان یافتن سانتریفیوژ، محلول رویی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بلافاصله بررسیهای آنزیمی بر روی آن انجام گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز به وسیله معرفهای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۰۰۱۷ مولار و ۴- آمینو آنتی پیرین ۰/۰۰۲۵ مولار به همراه فنل ۰/۱۷ مولار سنجیده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر (A_{510}) توسط اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. سرعت فعالیت پراکسیداز و واحد پراکسیداز در میلی‌گرم نمونه، با استفاده از نمودار محاسبه شد. بعلاوه درجه خلوص پراکسیداز (Rz) از روی نسبت A_{403}/A_{275} تعیین گردید.

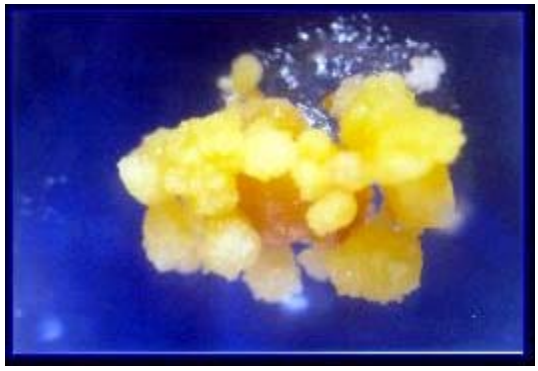
نتایج

۱- تولید پینه رویان‌زا و رویان‌زایی

حدود یک گرم پینه رویان‌زا از کشت تخمک روی محیط کشت MT همراه با ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو تولید شد. پینه حاصل از تخمک و رویانهای رویشی، روی محیط کشت MT همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو نگهداری شد. محیط کشت MT به همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو سبب رشد بهینه پینه‌ها و جلوگیری از رویان‌زایی شد. در مراحل اولیه فواصل زیرکشت پینه‌ها قبل از پرتوتابی هر ۱۵ روز بود و تأخیر از زیرکشت نمونه‌ها روی محیط کشت MT به همراه ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو سبب باززایی آنها و سفت شدن پینه‌ها بود. محیط کشت MT به همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو مانع رویان‌زایی بود ولی تأخیر در زیرکشت، سبب گسترش باززایی شد. غلظتهای ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو، در مقایسه با۳۰۰میلی گرم در لیتر به ترتیب حدود ۳۵ و ۷۰ در صد سبب کاهش رویان‌زایی شد. با شروع رویان‌زایی، ابتدا رویانهای کروی تشکیل شد و پس از یک ماه رویانهای کامل تولید گردید.

پینه‌ها طی ماههای نخست تولید، در محیط کشت MT با ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3، دو هفته پس از کشت، باززایی نشان دادند ولی با کاهش غلظت GA_3 تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، تاخیر

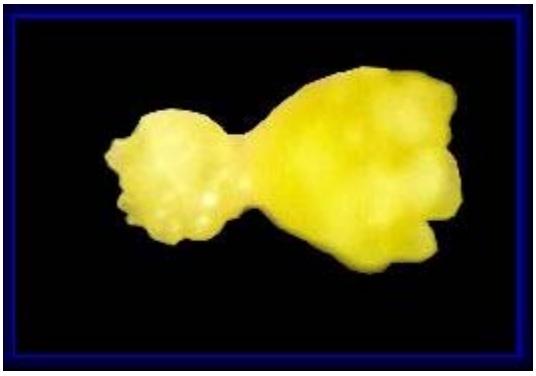
در باززایی دیده شد. در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3، تولید شبه رویانهای با رنگ کرم مایل به قهوه‌ای، تولید شد که بلافاصله شروع به تشکیل پینه نمودند. نگهداری طولانی مدت (بیش از ۶ هفته) در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3، تشکیل رویان از پینه و شبه رویانها را سبب گردید (شکل ۱). تکامل رویانها به گیاهچه روی محیط کشت MT حاوی آدنین سولفات و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 انجام گرفت.



شکل ۱- تشکیل رویان‌های کروی از پینه‌های اطراف شبه رویان روی محیط کشت MT+ ۱۰ mgl^{-1} GA_3 پس از ۶ هفته

یاخته‌های پیش‌رویان ابتدا به صورت کروی رشد و نمو یافتند (شکل ۲). در مراحل بعدی نمو به ترتیب اشکال کشیده، قلبی (شکل۳)، اژدری (شکل ۴) وگیاهچه را پدید آوردند. بعضی از رویانها در مرحله کروی به شبه رویانهای با قطری حدود ۴ میلی‌متر تبدیل شدند(شکل ۱)، که رشد ونمو آن‌ها از مرحله کروی فراتر نرفت.

شکل ۲- تشکیل رویانهای کروی چسبیده به هم روی محیط کشت MT + ۱ mgl^{-1} GA_3 پس از ۴ هفته



شکل ۳- رویان در مرحله قلبی شکل

شکل ۴- رویانهای لپه دار روی محیط کشت MT+ ۱mgl^{-1} GA_3 +۴۰mgl^{-1} آدنین سولفات

۲-تیماربا‌پرتوهای گاماوآزمون یاخته‌های زنده پس از پرتوتابی

یک هفته بعد از پرتوتابی پینه‌ها با دوزهای ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ گری به منظور انتخاب مناسب‌ترین دوز جهت جهش‌زایی، آزمون تترازولیوم پینه‌های تیمار شده، انجام گرفت. درصد یاخته‌های زنده پینه‌ها با اندازه‌گیری شدت رنگ محلول اتانول فورمازان از هر تیمار گاما، بوسیله اسپکتروفوتومتر در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج جدول ۱، دوزهایی که کمترین اثر سوء را بر زنده ماندن یاخته‌ها داشته است، دوز ۶۰ گری شناخته شد.

۳- رویان‌زایی از پینه‌های تیمار شده با پرتوهای گاما

پس از پرتوتابی پینه‌ها، تأخیر در فواصل زیرکشت تا ۶ هفته نیز سبب گسترش باززایی نگردید. نتایج استفاده از محیط کشت MT به همراه ۱ میلی‌گرم GA_3 ، نشان داد که پس از دو ماه رویانهای کروی اندکی از تیمارهای ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ گری تولید شد و در بقیه، تغییری مشاهده نشد (جدول ۲). بعلاوه رویان‌زایی در پینه‌های تیمار شده نسبت به شاهد به طور

معنی‌دار کمتر بود. در این مرحله در توانایی رویان‌زایی برخی از پینه‌ها، تغییراتی رخ داده بود که در آنها باززایی آغاز شد، ولی بقیه به رشد خود در حالت عدم تمایز ادامه دادند. رویانهای تولید شده اعم از عادی یا غیر عادی(شکل ۵) پس از ۳ تا ۴ هفته قهوه‌ای شده از بین رفتند.

۴- پینه‌های عادت کرده و رویان‌زایی

پس از پرتوتابی، رویان‌زایی از پینه‌ها انجام نشد و در محیطهای کشت باززایی،پینه‌ها به رشد و تقسیم یاخته‌ای عادت کرده[1] بودند. این وضعیت در پینه‌های تیمار نشده نیز وجود داشت. برای حل مشکل رویان‌زایی از پینه‌های عادت کرده، نتایج حاصل از روشهای تحریک پینه متفاوت بود:

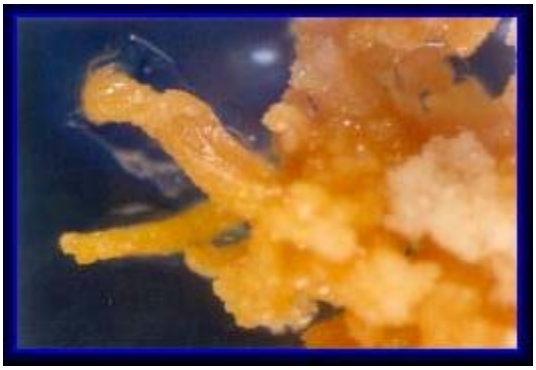
جدول ۲- درصد یاخته‌های زنده پس از پرتوتابی، میانگین تعداد جنین از ۱۰۰ میلی گرم پینه، میزان واحد آنزیم پراکسیداز در یک میلی‌گرم پینه و نسبت Rz یا درجه خلوص پراکسیداز در نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده

	شاهد	دوز های پرتو گاما به گری			
		۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰
درصد یاخته‌های زنده	۱۰۰	۷۳/۷۲	۶۳/۶۴	۳۳/۵	۳۳/۱۸
تعداد جنین	۱۱۰	۳۶	۱۲	۲۰	۰
واحد آنزیم در میلی‌گرم نمونه	۱/۷۲	۰/۸۰	۰/۴۴۳	۰/۱۷۴	۰/۰۴۷
نسبت Rz	۰/۱۶۶	۰/۱۷۵	۰/۱۱۰	۰/۱۰۴	۰/۰۹

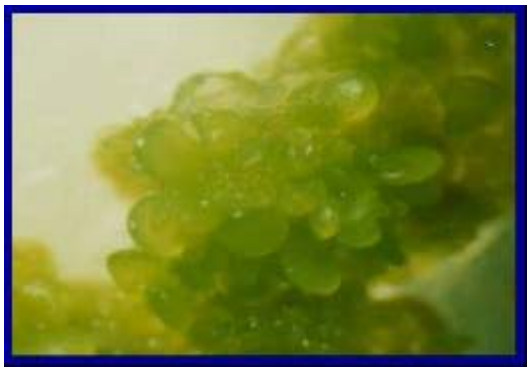
- **خودداری از زیرکشت پینه‌ها برای مدت طولانی:** از زیرکشت پینه‌ها به مدت ۱۲ هفته خودداری شد و سپس به محیط کشت MT همراه با ۱ میلی‌گرم GA_3 منتقل شد. در مرحله بعد در محیط کشت MT حاوی GA_3 و آدنین سولفات، پینه‌ها در طی یک ماه اول تکثیر یافته و در طی ماههای بعدی تغییری در باززایی آنها مشاهده نگردید. پینه‌های هر ۴ تیمار گاما واکنشهای مشابه نشان دادند.

- **تعویض نوع قند در محیط کشت:** به منظور تحت تنش قرار دادن پینه‌ها و باززایی پینه‌ها، از قند لاکتوز به میزان ۵ درصد به جای سوکروز در محیط کشت MT به همراه ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات استفاده شد. پس از ۴ هفته تغییری در باززایی پینه‌ها مشاهده نشد. از گالاکتوز نیز به میزان ۲ درصد به جای سوکروز استفاده شد. این پینه‌ها ۳ هفته بعد به همان محیط MT دارای ۱ میلی‌گرم GA_3 منتقل گردید اما باززایی از نمونه‌ها مشاهده نشد.

-**کشت پینه‌ها روی محیط کشت بدون قند:** پینه‌های عادت کرده به محیط کشت MT بدون سوکروز منتقل شد. پس از ۶ هفته پینه‌ها به محیط کشت MT همراه با ۱ میلی‌گرم GA_3 انتقال یافت. پس از ۲ هفته پرآوری رویانها در مرحله کروی به مقدار زیادی مشاهده شد. سپس این رویانها روی محیط کشت MT حاوی GA_3 و آدنین منتقل شد. ۲ هفته بعد به ازای هر ۲۵۰ میلی‌گرم پینه حدود ۱۵۰ رویان در مرحله اژدری تولید شد (شکل ۶). بیشترین مقدار رویانها در پینه‌های تیمار شده با دوز ۶۰ و ۱۰۰ گری مشاهده شد (جدول ۲). جداسازی رویانها برای کشت بر خلاف مجموعه رویانهایی که در سایر محیط کشتها دیده شده بود، بسهولت انجام گرفت.



شکل۵- غیرطبیعی شدن رویانها و قهوه‌ای شدن آنها پس از پرتوتابی با دوز ۸۰ گری



شکل۶- پرآوری رویانهای اژدری ۴ هفته پس از انتقال از محیط کشت بدون سوکروز

1. Habituated callus

-کشت پینه‌های حاصل از شبه رویانها: برخی از رویانها در مرحله کروی شکل به شبه رویانهای با قطر تقریبی ۴ میلی متر تبدیل شدند. این رویانها به ندرت قابلیت رشد و نمو و تبدیل به گیاهچه را داشتند. تعداد ۸ عدد از شبه رویانها، هر کدام به قطر تقریبی ۴ میلی متر در هر یک از محیطهای کشت MT حاوی BA ۵ mgl^{-1} + GA_3 ۱۰ mgl^{-1} و MT حاوی GA_3 در غلظتهای مختلف ۱۰ mgl^{-1} ، ۱ ،۰/۱، کشت شدند. در محیط حاوی BA و GA_3 بعد از ۴ هفته مقدار ۱/۱ گرم پینه تولید شد. رنگ پینه‌ها کرم مایل به سفید و رنگ رویانها قهوه‌ای کمرنگ بود. در محیط کشت MT حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک نیز پس از دو هفته پینه‌های سفید رنگی دیده شد که از پینه‌های حاصل از تخمکهای تلقیح نشده روشن‌تر ولی سفت‌تر بودند. هر شبه رویان طی ۸ هفته ۱۵۰ میلی‌گرم پینه تولید نمود. از کشت شبه رویانهادر محیط کشتهای MT حاوی ۱ و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر GA_3 پینه‌زایی مشاهده نشد و پس از ۶ هفته این رویانها تیره رنگ شده و از بین رفتند. پینه‌های ایجاد شده از اطراف شبه رویانها جمع‌آوری شد و در محیط کشت MT به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 جهت باززایی کشت شدند. پینه‌های جدید و منتج از شبه رویانها بعد از ۴ هفته شروع به رویان‌زایی نمودند.

- **زیرکشتهای متوالی با فواصل کم:** زیرکشت پینه‌های عادت کرده در فواصل یک هفته‌ای روی محیط کشت MT حاوی ۱ میلی‌گرم GA_3 انجام گرفت و پنج بار تکرار شد. پس از ۵ هفته از زیرکشت، متفاوت از پینه‌های ماههای نخست، مقدار بسیار کمی از پینه‌ها رویانهای کروی تولید نمودند. پینه‌ها باز هم به رشد خود ادامه دادند و رنگ برخی از آنها به سبز گرایید.

- **استفاده از مقادیر بالای تنظیم کننده‌های رشد:** تنظیم‌کننده های رشد BA و GA_3 به ترتیب به میزان ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MT استفاده شد. رشد بسیار زیاد پینه‌ها و تولید پینه از شبه رویانها درمحیط کشتهای دارای BA و GA_3 مشاهده شد. بعلاوه تغییری در بهبود رویان‌زایی مشاهده نشد.

- **استفاده از کشت تعلیقی:** در دو محیط کشت مختلف MT به همراه گالاکتوز و MT به همراه ۵ میلی‌گرم BA استفاده شد. پینه‌ها در شرایط ۱۴۰ دور در دقیقه به رشد ادامه دادند. دو هفته بعد به محیطهای کشت MT حاوی گالاکتوز (۲ درصد) و ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و MT حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 منتقل گردیدند. تعویض قند سوکروز با گالاکتوز و استفاده از کشت تعلیقی نه تنها بهبودی در رویان‌زایی نداشت بلکه تغییری در رنگ پینه‌ها نیز مشاهده نشد.

۵- اندازه‌گیری پراکسیداز

منحنی تغییرات جذب نور در طول موج ۵۱۰ نانومتر به مدت ۵۰۰ ثانیه ثبت گردید. نتایج بدست آمده از میزان فعالیت پراکسیداز در یک میلی‌گرم نمونه (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در پینه‌های تیمار نشده است. در پینه‌های تیمار شده بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در دوز ۶۰ گری بدست آمد. با افزایش دوز از مقدار فعالیت پراکسیداز در پینه‌ها کاسته شد. به طور کلی میزان فعالیت پراکسیداز در پینه‌ها بالا نبود. فعالیت پراکسیداز با توجه به نتایج بالا، می‌تواند نشانگر دخالت این آنزیم در تمایزیابی باشد. به نظر می‌رسد که گاما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار آن در بافت پینه اثر سوء داشته است.

نسبت Rz تیمارهای مختلف (جدول ۲) که واحد فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌گرم آنزیم است. در بررسیهای گیاهی، بالا بودن این نسبت نشان دهنده خلوص بالای آنزیم و مناسب بودن آن جهت استخراج است. هر چه مقدار Rz بیشتر باشد، مقدار پراکسیداز نسبت به کل پروتئین بیشتر است. این مساله می‌تواند در مواردی که نیاز به استخراج آنزیم از یک منبع گیاهی است، مفید واقع شود. زیرا بالا بودن آن نشان دهنده مناسب بودن آن منبع (نوع گیاه و نوع بافت) برای استخراج آنزیم است. بیشترین مقدار نسبت Rz در پینه‌های تیمار شده با دوز ۶۰ گری مشاهده شد. به این ترتیب به نظر می‌رسد که پرتوتابی در مقادیر بالاتر از ۶۰ گری برای بالا بردن خلوص آنزیم، در مواردی که هدف استخراج آنزیم است، مفید واقع نمی‌گردد. با توجه به جدول ۲ در مقایسه بین پینه‌های شاهد و پینه‌های تیمار شده اختلاف معنی‌دار نسبت Rz بین شاهد و

دوز ۶۰ گری وجود ندارد ولی بین تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده می‌شود.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که عصاره جو بطور مؤثری سبب افزایش یاخته‌ها می‌شود که با پژوهشهای انجام گرفته در مورد سایر گونه‌های مرکبات مطابقت دارد (۱۳،۹). عصاره جو در غلظتهای کمتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در افزایش رویان‌زایی از پینه‌ها مؤثر بود که با نتایج گمیتر و مور(۶) مشابه است. رشد یاخته‌های رویان‌زا در محیط MT بدون تنظیم کننده‌های رشد بهینه بود که با نتایج کوچبا و اسپیگل- روی (۱۰) همخوانی دارد. در این پژوهش پینه‌ها در محیط MT دارای عصاره جو به مدت یکسال و بدون اینکه از شدت رشد پینه‌ها کاسته شود، نگهداری شد. نگهداری طولانی مدت پینه‌ها در محیط فاقد تنظیم کننده رشد توسط پژوهشگران دیگر در سایر گونه‌های مرکبات نیز گزارش شده است(۱۶،۹،۳). تولید مجدد پینه از شبه رویانها و رویانهای طبیعی در این بررسی با پژوهشهای پرز و همکاران (۱۹۹۸) همخوانی دارد. پدیده عادت کردن پینه‌ها به هر محیط کشت پس از زیرکشتهای متعدد مشاهده شد، که در برخی گزارش‌ها (۱۰،۸،۵،۴) نیز اشاره شده است. نتایج این بررسی نشان داد که بهترین محیط کشت برای رشد گیاهچه‌ها، MT همراه با GA_3 و آدنین است که با نتایج دیگران (۲، ۱۱) مشابه بود. غلظت GA_3 برای رشد و تکامل گیاهچه‌های نارنگی ساتسوما (۵)، بیشتر از غلظتی بود که برای نمو رویانها و باززایی در لیموآب شیراز مصرف شد. چگونگی اثر GA_3 روی بقای رویانهای تولید شده کاملا مشخص نیست. بر اساس بررسیهای کوچبا و همکاران (۱۹۷۴) GA_3 و آدنین سولفات، آغازش ریشه و نمو رویان را تحریک می‌کند. گمیتر و مور(۱۹۸۶) محیط کشتی را که فقط دارای GA_3 باشد، برای تحریک جوانه‌زنی رویانها کافی دانستند. البته نقش منفی GA_3 در رویان‌زایی پینه‌های حاصل از تخمک پرتقال شاموتی نیز گزارش شده است(۱۲). در این پژوهش افزایش غلظت BA، تاثیر بازدارندگی روی تکامل گیاهچه‌ها نشان داد. افزودن سیتوکنینهای مختلف به پینه‌های عادت کرده پرتقال شاموتی نیز بر اساس نتایج گمیتر(۱۹۸۵)، سبب افزایش رویان‌زایی نشد.

برخی از رویانهای بدست آمده از پینه‌ها قابلیت تبدیل به گیاهچه را نداشتند که شبه رویان نامیده شدند. مشابه این رویانها در سایر مرکبات نیز گزارش شده است(۱۷،۶،۵). همچنین تولید رویان ثانوی از رویانهای زیرکشت شده روی محیط کشت دارای GA_3 نیز مشاهده شد. رویانهای غیرطبیعی در بین رویانهای ایجاد شده روی تمامی محیطهای کشت بکار رفته بصورتهای چند لپه‌ای و چسبیده به هم مشاهده شد. چنین رویانهایی در بعضی ارقام مرکبات، قبلا(۱۷،۶،۵) گزارش شده است.

زیرکشتهای مداوم با فواصل ۳ تا ۴ هفته و در طی ۶ ماه، پدیده عادت پینه‌ها به محیط کشت و کاهش رویان‌زایی را بدنبال داشت. با فرض تاثیر تنش افزایش فواصل زیرکشت، بعنوان محرک رویان‌زایی، از زیرکشت پینه‌ها به مدت ۱۲ تا ۱۵ هفته خودداری شد ولی رویان‌زایی از پینه‌ها مشاهده نشد که با نتایج گمیتر و همکاران (۱۹۸۶) منطبق نبود. پینه‌های عادت کرده در محیط کشت فاقد سوکروز به مدت ۴ هفته و زیرکشت مجدد آن در محیط کشت دارای جیبرلین، سبب فراوانی رویانها و پرآوری آنها شد. این نتیجه با پژوهشهای کوچبا و اسپیگل- روی (۱۹۷۷) و مور (۱۹۸۶) مطابقت داشت. از طرف دیگر در پینه‌های عادت کرده، جایگزینی قند گالاکتوز یا لاکتوز به جای سوکروز رویان‌زایی را تحریک نکرد.

به نظر می‌رسد که خودداری از زیرکشت پینه‌ها به مدت طولانی و کشت پینه‌ها روی محیط کشت فاقد منبع کربوهیدرات و سپس بازگرداندن پینه‌ها به محیط قبلی می‌تواند سبب ایجاد تنشی در پینه‌ها گردد که اعمال فیزیولوژیک پینه را در جهت رویان‌زایی تحریک می‌کند. این یافته‌ها با نتایج پژوهشگران پیشین(۱۵) مطابقت دارد.

استفاده از پینه‌های رویان‌زای مرکبات به عنوان ریزنمونه برای تیمار با پرتوهای گاما، در پژوهشهای پیشین نیز گزارش شده است (۹). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پرتوتابی سبب کاهش رویان‌زایی پینه‌ها است. بیشترین میزان رویان‌زایی در دوز ۶۰ گری مشاهده شد. دوز ۱۲۰ گری کشنده بود که با نتایج پاسکال و همکاران (نقل از۱۹) بر روی پرتقال شاموتی مشابه بود. بعد از چند بار زیرکشت، در توانایی رویان‌زایی

پینه‌ها، تغییراتی مشاهده گردید. برخی از پینه‌ها تولید رویانهای فراوانی کردند، در حالیکه بقیه پینه‌ها بسیار کم و یا اصلا تولید رویان ننمودند. این حالت در پرتقال شاموتی نیز گزارش شده است(۹). شاید یکی از دلایل کاهش توانایی رویان‌زایی پینه‌ها، پیامدهای حاصل از پرتوتابی پینه‌ها باشد. بالاترین درصد زنده ماندن یاخته‌ها با استفاده از داده‌های بدست آمده از آزمون تترازولیوم در تیمار ۶۰ گری، به میزان ۷۳/۷۲ درصد بود و با افزایش مقدار دوز از زنده ماندن یاخته‌ها کاسته شد. بعد از تیمار با مواد جهش‌زا، پینه‌ها و رویانهای تلف شده قابل ملاحظه‌ای در مراحل رشد بدست آمد که قدرت بقای آنها به طور معنی‌داری کاهش یافت. اگر تابش پرتوها زیاد باشد، میزان تقسیم یاخته‌ها به یکباره پایین می‌آید و پس از دو ساعت به کلی متوقف می‌شود. هر چند تقسیم یاخته‌ها دوباره شروع می‌شود ولی میزان آن به میزان قبل از تابش نخواهد رسید(۱). وجود ساز و کارهای ترمیمی در یاخته‌ها پس از پرتوتابی، برخی از آسیب‌های ناشی از پرتوتابی را ترمیم می‌نماید. به همین دلیل آزمون زنده بودن یاخته‌ها یک هفته بعد انجام شد. پس از گذشت یک هفته از پرتوتابی، آغاز تکثیر پینه‌ها محسوس بود. کثرت یاخته‌های در حال تقسیم بعد از پرتودهی به خاطر تشدید تقسیم در اثر پرتوها نیست بلکه ناشی از تقسیم یاخته‌ها پس از یک مرحله تاخیری است (۱). کند شدن میتوز به سبب اثر تاخیری موادجهش‌زا در سنتز IAA و تولید ATP است(۱). کاهش قدرت بقای یاخته‌ها پس از پرتوتابی، ممکن است تنها مربوط به اثرات مستقیم پرتودهی بر یاخته‌ها نباشد. بلکه به اثرات غیر مستقیم ناشی از پرتودهی بر محیط کشت نیز مربوط شود. زیرا بخشی از این اثر مربوط به تغییر pH محیط است. بعلاوه دو ماده آب اکسیژنه و پراکسیدهای آلی نیز در چنین محیطهایی پدید می‌آیند (۱). در این پژوهش انجام تیمارهای پرتوتابی در شرایطی انجام شد که پینه‌ها در محیط کشت MT حاوی عصاره جو (جهت گسترش رشد پینه‌ها) قرار داشتند. بنابراین نباید اثر مضاعف محیط کشت بر پینه‌ها بعلت پرتوتابی را نادیده گرفت. اثر مضاعف پرتوتابی روی محیط کشت و پینه در برخی از نوشته‌های پیشین(۹،۱) اشاره شده است.

تیمارهایی که رویان‌زایی را کاهش می‌دهند، فعالیت پراکسیداز را نیز می‌کاهند(۹). بر اساس نتایج این پژوهش رویان‌زایی پینه‌های پرتوتابی شده کاهش یافت و در دوز ۱۲۰ گری رویان‌زایی مشاهده نشد. فعالیت پراکسیداز نیز با افزایش دوز گاما کم شد. شاید یکی از دلایل کم شدن فعالیت پراکسیداز پینه‌های پرتوتابی‌شده، کاهش رویان‌زایی در اثر تیمارهای پرتوی است. بنابراین پرتوگاما بر فعالیت پراکسیداز اثر سوء داشته است که نشان دهنده اثر تخریبی پرتوگاما بر متابولیتهای ثانوی است. فعالیت پراکسیداز به دلیل نقش آن، در زمان تمایزیابی افزایش می‌یابد. شاید یکی از دلایل عدم تمایز پینه‌ها در این پژوهش، کم بودن فعالیت پراکسیداز بوده است. فعالیت پراکسیداز در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد و این واکنش غالبا در پاسخ به آسیبهای اولیه از نوع زخم، صدمه به دیواره و تجزیه بافتی برای مقاومت یا التیام رخ می‌دهد (۳). در تیمارهای پرتوتابی، تعیین فعالیت پراکسیداز یاخته‌های جهش‌یافته، که ممکن است گیاهان مقاوم به تنشها را تولید نمایند، مقدور نبود. بنابراین، سطح آنزیم در توده یاخته‌ای هر چه باشد، به نظر می‌رسد که در یاخته های جهش یافته مقاوم، فعالیت پراکسیداز بالا باشد.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. دیده ور، ف. و م. راعی، ۱۳۶۷. زیست شناسی پرتوی(ترجمه). انتشارات سمت. ۴۲۵ صفحه .

۲. فتوحی قزوینی، ر. و س. شیرانی، ۱۳۸۱. بررسی محیط کشتهای مختلف در جنین‌زایی غیرجنسی از تخمکهای تلقیح نشده لیموآب شیراز. مجله علوم و فنون کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. جلد ۶ (۲): ۵۲-۴۳

3. Chudhry, Z., H. Rashid, & A. Quraishi. 1993. Analysis of protein and peroxidase from embryogenic and non-embryogenic cultures of *Citrus reticulata* . Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 36: 1, 20-22.

4. Fotouhi Ghazvini, R. 1996. Tissue Culture and Frost Tolerance Studies in *Citrus* Spp. Ph.D. Thesis, University of Salford,UK.
5. Gmitter, F. G. 1985. *Citrus* embryogenesis *in vitro*: culture initiation, plant regeneration and phenotypic characterization. Ph.D. Thesis, University of Florida. USA.
6. Gmitter, F. G., & G. A. Moore. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: Embryo production, germination and plant survival. Plant Cell, and Organ Culture. 6: 139-147.
7. Jimenez, V. M., E. Guevara, J. Herrera, & F. Bangerth. 2001. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. Plant Cell Reports. 20: 1, 92-100.
8. Kochba, J. & J. Button. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange *(Citrus sinensis)* as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol. 73: 415-421.
9. Kochba, J., & P. Spiegel-Roy. 1977. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of *Citrus*. HortScience. Vol. 12(2): 110-114.
10. Kochba, J. & P. Spiegel-Roy, 1977. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange as affected by auxin and by tissue age. Environ. Expt. Bot. 17 : 151-159.
11. Kochba, J., J. Button, P. Spiegel-Roy, C.H. Bornmann, & M. Kochba. 1974. Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberelic acid and adenine sulfate. Ann. Bot. 38: 415-421.
12. Kochba, J., P. Spiegel-Roy, H. Neumann, & S. Saad. 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA_3. Z. Pflanzenphysiol. 82: 427-432.
13. Lorenzo, J. C., G. Garcia, M. Escalona, M. A. Daquinta, R. Castillo, & Z. Fundora. 1994. *In vitro* somatic embryogenesis in cleopatra mandarin (*C. reshni*). Centro Agricola. 21: 3, 85-91.
14. Maheshwari, P. & N. S. Rangaswamy. 1958. Polyembryony and *in vitro* culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. Ind. J. Hort. 15: 275-282.
15. Moore, G. A. 1986. *In vitro* propagation of *Citrus* rootstock. Hortscience. 21(2): 300-301.
16. Murashige, T., & D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. p. 1155-1161. In: H. D. Chapman(ed.), Proceeding First International *Citrus* Symposiom, Vol.3. University of California, Riverside.
17. Perez, R. M., O. Mas, L. Navarro, & N. Duran Vila. 1998. Production and cryopreservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 55: 1, 71-74.
18. Towill, L. E., & P. Mazur. 1975. Studies on the reduction of 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. Can. J. Bot. 53, 1097-1102.
19. Tulmann-Neto, A., M. Cristofani, B. M. J. Mendes, & A. Ando. 1994. Use of *in vitro* mutagenesis in *Citrus* breeding. I. Sensitivity to gamma rays of explant of the cultivar Pera. Bragantia. 53: 2, 167-176.
20. Ugarova, N. N., I. V. Berezin, B.M. Kershengolts, & I. D. Artimonov, Biokhim. 1976. Use of 4-amino antipyrine in peroxidase assay of *Raphanus* 41(10), 1829.

Gamma Irradiation on Embryogenic Callus and Embryogenesis from Habituated Calli in Lime (*Citrus aurantifolia* var. Mexican lime)

M. RAGHAMI[1] AND R. FOTOUHI GHAZVINI[2]
1, 2, Former Graduate Student and Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Guilan
Accepted. Jan. 7, 2004

SUMMARY

Embryogenic callus from unfertilized lime ovules, was subcultured on MT basal medium supplemented with 1000 mg/l malt extract (ME). The calli were exposed to gamma irradiation at 60, 80, 100 and 120 Gy doses. Percentage of cell viability was determined through tetrazolium assay. The highest viability of cells was 73.72% in 60 Gy, and further increase in gamma dose, decreased cell viability. Embryogenesis resulted when calli cultured on MT medium containing 1 mgl^{-1} GA_3. during the study, embryo formation from the calli was difficult, however the calli habituated to growth after 8 months. Calli when subcultured on MT medium without sucrose for 4 weeks as a stress, then subcultured on MT+GA3 medium resulted in stimulated embryogenesis. Mean embryo formation from each 250 mg callus, was approximately 150 after 2 weeks. Addition of high concentrations of GA_3 and BA to habituated calli inhibited embryogenesis and then produced callus from pseudobulbils. In irradiated calli, the perentage of embryos from 60 and 100 Gy treatments were 70 and 85 and embryogenesis did not happen at 120 Gy. Activity of peroxidase in irradiated and non-irradiated calli was assessed. Maximum activity of peroxidase was 1.72 in non-irradiated calli. Increase in gamma dose, decreased activity of peroxidase.

Key words: Lime, Embryogenic callus, Gamma irradiation, Habituated callus, Proxidase activity.