بررسی اثر پوتریسین برمیزان کال زایی و جنین زایی سوماتیک در یونجه

بهناز علیزاده (۱)، شهلا امانی (۱)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

در این تحقیق اثر پوتریسین در کالزایی و جنین زایی سوماتیک در رقم کریساری یونجه بررسی شد. ریز نمونه های هیپو کوتیل بر روی محیط کشت SH حاوی 2,4-D (۱میلی گرم بر لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) کشت شدند. بیشترین درصد تولید کالوس و جنین کروی در محیط دارای ۱ میلی مولار پوتریسین مشاهده گردید و کمترین درصد مربوط به نمونه شاهد فاقد پوتریسین بود. این نتایج از نقش پلی آمین ها در مراحل مختلف رشد و نموی گیاه یونجه از جمله جنین زایی سوماتیکی حمایت می کند.

کلمات کلیدی: پوتریسین، جنین زایی سوماتیک، کالزایی، یونجه.

مقدمه:

پلی‌آمین‌ها (PAs) آمینهای آلیفاتیک کوچکی هستند که در همه موجودات زنده اعم از پروکاریوتی و یوکاریوتی حضور دارند. دی آمین پوتریسین، تری آمین اسپرمیدین و تترا آمین اسپرمین سه پلی‌آمین معمول در گیاهان می‌باشند این ترکیبات به واسطه ویژگی پلی کاتیونی خود قادر به اتصال به انواع ترکیبات آنیونی موجود در سلول از قبیل DNA، RNA، پروتئینها و فسفولیپیدهای غشاء و ... می‌باشند. پلی‌آمین‌ها در گیاهان در فرآیندهای مختلف رشد و نمو مانند تقسیم و تمایز سلولی، بیان ژن و سنتز انواع ماکرومولکولها، در جنین زایی، اندام زایی، گلدهی، ممانعت از پیری، همچنین در پاسخ به انواع تنشهای زیستی و غیر زیستی نقش دارند (۱و۲).

در سالهای اخیر تحقیقات زیادی در مورد پلی آمین‌ها صورت گرفته و معلوم شده است که PAs باعث بهبود رشد و نمو گیاه از جمله جنین زایی سوماتیک می‌گردند. اهمیت PAs در انواع محصولات زراعی مهم مانند Brassica campestris، .Perkinensis ssp و برنج نشان داده شده است (٤). کشتهای سلولی هویج به عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه تنظیم جنین زایی سوماتیک در گیاهان استفاده می‌شود. Feirer و همکاران (1984, 1985) گزارش کردند که تشکیل جنین‌های سوماتیک در شماری از کشت‌های هویج شدیداً توسط ۱میلی مولار DFMA (دی فلوئورو متیل آرژنین) کاهش می‌یابد. اما با افزودن ۰/۱ میلی مولار پوتریسین، اسپرمیدین یا اسپرمین به محیط کشت، جنین زایی بهبود می‌یابد. ممانعت از جنین زایی توسط DFMA از طریق جلوگیری از فعالیت ADC (آرژنین دکربوکسیلاز) و کاهش در سنتز پلی‌آمین صورت می‌گیرد (٤). DFMO (دی فلوئورو متیل اورنی تین- از بازدارنده‌های سنتز پلی‌آمین) بیشتر از DFMA در ممانعت از جنین زایی مستقیم در لپه‌های گیاه بادنجان (Solanum melangena) تاثیر داشت و افزودن پوتریسین اگزوژن تشکیل جنین را در آن نسبت به نمونه‌های شاهد به حالت اول برگرداند (۵) گزارش شده است که افزودن پلی‌آمین‌ها جنین زایی سوماتیک را در سویا و درخت کائوچو بهبود می‌بخشد. در این گیاهان جنین‌های سوماتیک به سختی در شرایط رایج و بدون افزودن PAs تولید می-شوند (٤).

گیاه یونجه با نام علمی Medicago sativa متعلق به تیره بقولات (Fabaceae) است. یونجه جزء گیاهان علوفه‌ای مهم است و از نظر غذای دام، پوشش گیاهی، تثبیت نیتروژن و از نظر دارویی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این گیاه نسبت به شوری نسبتا مقاوم بوده و بهبود رشد و نمو آن از نظر زراعی با ارزش است (۳). گزارشات اندکی در مورد اثر ترکیبات مختلف از جمله پلی آمین‌ها در جنین زایی سوماتیک انواع رقمهای یونجه ارائه شده است. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر پوتریسین در جنین زایی سوماتیک رقم کریساری یونجه می باشد.

مواد و روش‌ها:

ضد عفونی و تهیه ریز نمونه

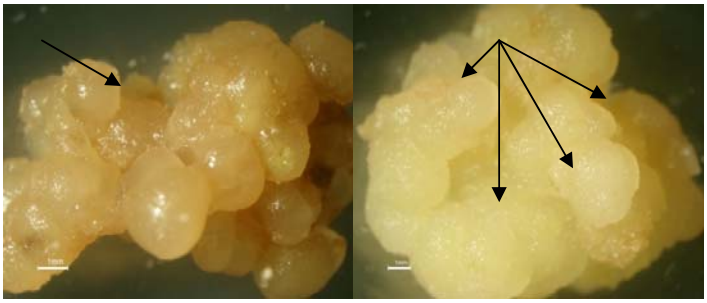
بذور رقم کریساری یونجه از مرکز تحقیقات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شد. ابتدا بذرها به مدت ۵ دقیقه با آب و مایع ظرف شویی شستشو داده شدند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه در معرض الکل ۷۰٪ قرار گرفتند و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با محلول ۲/۵٪ هیپوکلرید سدیم ضدعفونی سطحی گردیده و سه تا چهار بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور ضد عفونی شده روی محیط پایهSH کشت شده و در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲٤ نگهداری شدند. پس از ٤ الی ۷ روز هیپوکوتیل از دانه رستها قابل جدا سازی بود.

محیط کشت القاء کالوس و جنین

ریز نمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت SH حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و غلظتهای ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی مول بر لیتر پوترسین (Put) کشت داده شدند نمونه شاهد فاقد Put و تنها دارای ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D بود. pH محیط بر روی ۵/۷ تنظیم شد. لازم به ذکر است که Put بعد از اتوکلاو و با استفاده از فیلتر به محیط افزوده شد. نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲٤ نگهداری شده و بعد از یک ماه دوباره در همان محیط کشت باز کشت انجام شد. بعد از دو ماه میزان کالزایی و جنین زایی بررسی گردید.

نتایج و بحث:

استفاده از پوتریسین در هر سه غلظت باعث افزایش تولید کال و جنین نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل۱). قطر کالوسها نیز افزایش چشمگیری داشتند. بیشترین درصد کالوس زایی (۱۰۰٪) و جنین زایی (۸۰٪) در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی مولار پوتریسین به دست آمد. در حالی که کمترین میزان مربوط به نمونه شاهد بود (جدول۱). گزارشات متنوعی در مورد نقش و اهمیت انواع پلی آمین‌ها در بهبود مراحل رشد و نموی انواع گیاهان در شرایط در شیشه ارائه شده است. مشخص شده است که پلی آمین‌های اگزوژن باعث افزایش تقسیم سلولی شده و در نتیجه باززایی در کشت در شیشه افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز نشانگر تأثیر مثبت پوتریسین در کالزایی و تولید جنین کروی در رقم کریساری یونجه می‌باشد و پیشنهاد می‌شود از پلی آمینها برای بهبود و افزایش ریز ازدیادی در یونجه استفاده گردد.



شکل۱- تشکیل جنین بر روی کالوس. الف: محیط تنها حاوی 2,4-D (۱میلی گرم بر لیتر).ب: محیط حاوی 2,4-D به اضافه پوتریسین. پیکانها نشانگر جنین کروی هستند.

جدول۱- اثر پوتریسین بر تولید کالوس و جنین کروی در یونجه. mgL^{-1}: میلی گرم بر لیتر، mM: میلی مولار، mm: میلی متر،2,4-D: ۲و٤ دی کلرو فنوکسی استیک اسید، Put: پوتریسین.

تیمار	درصد کالوس‌زایی	متوسط قطر کالوس (mm)	درصد جنین زایی
$1mgL^{-1}$ 2,4-D (شاهد)	58%	7.6	17.24%
2,4-D+0/1 mM Put	68%	8.225	29.41%
2,4-D+0/5 mM Put	77%	9.000	٪٥٢.٦٣
2,4-D+1 mM Put	100%	11/111	٪٨٠

منابع:

1- Baron, K. and C. Stasolla. 2008. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. Plant Biology 44(5): 384-395.
2- Malá, J. and Cvikrová, M. and Máchová, P. and O. Martincová. 2009. Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (Picea abies L.). Journal of forest science, 55 (2): 75–80.
3- Monteiro, M and Appezzato-da-Gloria, B. 2003. Plant regeneration from protoplast of alfalfa (Medicago sativa) via somatic embryogenesis. Scientia Agricola. 60(4): 683-689.
4- Paul, A. and Mitter, K. and Raychaudhuri, S. 2009. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in Momordica charantia L. Plant Cell Tiss Organ Cult. 97: 303-311.
5- Takeda, T. and Hayakawa, F. and K. O. H. Matsuoka. 2002. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. Biochemical Engineering Journal 12: 21–28.