

Arpa bitkisinin Kallus Toxumasının İnduksiyasına Ammonium Nitratın Təsiri

S.Ş. Əsədova^{1,2}

¹AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti, 2a, Bakı AZ1073, Azərbaycan

²Azərbaycan Respublikası KTN Əkinçilik Elmi-Tədqiqat İnstitutu, 2 N-li sovxoz, Bakı AZ1098, Azərbaycan;
E-mail: biotexnoloqaz@mail.ru

Hüceyrə kulturasının alınması məqsədilə arpanın bəzi sort və sort nümunələrinin toxumları *in vitro* şəraitində ammonium nitratın müxtəlif qatılıqlısu qida mühitlərində kultivasiya edilmişdir. Ammonium nitratın kallusəmələgəlmə prosesinə təsiri öyrənilmişdir.

Açar sözlər: Arpa, toxum, *in vitro* kultura, ammonium nitrat, kallusun induksiya

GİRİŞ

Dənli bitkilərin inkişaf və məhsuldarlığının tənzimlənməsində torpağın mineral tərkibinin rolu əvəzolunmazdır. Sortun potensial məhsuldarlığı yalnız optimal torpaq-iqlim şəraitində realizə oluna bilər. Bitkilərin qidalanmasının əsas elementlərindən biri azotdur. Azot zülal, nuklein turşuları, ferment və digər vacib biomolekulların tərkib hissəsidir. Bitkilər yeganə canlı alı orqanizmlərdir ki, azotun mineral birləşmələrini mənimsəməklə üzvi maddələri sintez etmək qabiliyyətinə malikdirlər. Bitkinin böyümə və inkişafı üçün torpaqda kifayət qədər azotun geyri-üzvi birləşmələri və digər mineral elementlər vardır. Lakin bitkinin mineral elementləri mənimsəmə sürəti yalnız torpaqda olan bu elementlərin miqdarından asılı deyil, həm də bitkinin elementə olan tələbatından, inkişaf mərhələsindən və böyümə intensivliyindən asılıdır (İmsandə, 1994).

Azərbaycanda dənli bitkilər arasında əkin sahəsi və məhsulun həcminə görə 2-ci yeri tutan bitki arpadır (ARSK məlumatları, 2006). Yüksək məhsuldar arpa sortlarının seleksiyası üçün Azərbaycanda biokimyəvi, genetik yanaşmalar istifadə olunmuşdur. Lakin müasir dövrdə dünyanın bir çox elm mərkəzlərində arpanın tədqiqində hüceyrə kulturası metodundan geniş istifadə edirlər. Hüceyrə kulturası metodunun istifadəsi proseslərin həm intakt bitki, həm də hüceyrə səviyyəsində öyrənilməsinə mümkün edir. Bu da böyük əhəmiyyət kəsb edən faktır, çünki bitkilərdə mübadilə proseslərinin tənzimlənməsi müxtəlif hüceyrə, toxuma və orqanizm səviyyələrdə həyata keçirilir (Цапи др., 2007, 2008). Təcrübələrin süni iqlim və qida mühiti şəraitində aparılması müxtəlif istiqamətli becərilmə modellərinin işlənilib hazırlanması üçün imkan yaradır. Buna görə də hüceyrə kulturasının istifadəsi vasitəsilə azot və digər elementlərin təsir effekti bütün səviyyələrdə öyrənilə bilər. Süni qida mühitlərinin tərkibinə azotun həm nitrat, həm də ammonium ionları

daxil edilir. Lakin azotun bu formalarının bitki orqanizmi və onun hüceyrələrinə təsir dərəcəsi eyni deyildir. Bu faktı bir sıra alimlərin apardığı təcrübələrin nəticələri təsdiq edirlər. Belə ki, sərbəst nitrata nisbətən ammoniumun utilizasiyası zamanı bitki az enerji sərf edir, bu da bitkinin məhsuldarlığının artmasının müsbət əlamətlərindən biridir (Смолов и др., 2003). Qida mühitində ammonium olmayan zaman kallus hüceyrələrində zülalın miqdarı kəskin sürətdə aşağı düşür (Смолов и др., 2013). Hüceyrələrin uzun müddət ammonium olmayan mühitdə becərilməsi isə kallus toxumasının tam məhvinə gətirib çıxarır. Kallus hüceyrələrində nitratın ammoniuma çevrilməsi prosesinin çox ləng getməsi zülal sintezinə mənfi təsir göstərir və nəticədə kallus hüceyrələrin böyüməsi dayanır. Bu səbəbə görə kallus kulturasının becərilmə tsiklinin sonunda qida mühitində kifayət qədər sərbəst nitrat toplanır, sərbəst ammonium isə qida mühitindən hələ böyümənin hətti mərhələsi zamanı yox olur (Цапи др., 2008).

Ammonium ionlarının bitki hüceyrəsinin həyat fəaliyyətini təşkil edən bir sıra proseslərdə iştirakı haqqında da kifayət qədər təcrübi faktlar vardır. Belə ki, ammonium ionları hüceyrənin böyüməsi (Mohanty et al., 1978), hüceyrə divarı polisaxaridlərin biosintezi (Gunter et al., 2005), zülalların sintezi (Mohanty et al., 1980), fermentlərin aktivləşməsi (Leleu et al., 2004), embriogenezin stimullaşması (Асадова, 2002) və s. proseslərdə iştirak edirlər.

Ammonium ionlarının qarğıdalı cücərtilərinin köklərinə, xlamidomonada yosununa, arpa, soya və yasəmənin hüceyrə kulturasına daxil olunma intensivliyinin tədqiqi göstərmişdir ki, bu bitkilərin biribirindən sistematik cəhətdən uzaq olmasına baxmayaraq, ammoniumun nəql sisteminin fəaliyyəti oxşardır və hər bir hüceyrənin ciddi mübadilə nəzarəti altında gedir (Цапи др., 2008) və NH_4^+ -ın xarici mühitdə qatılığından asılıdır (Bassirirad et al., 2000; Kronzucker et al., 2004). Qida mühitinə ammonium ionlarının cüzi miqdarı (0,1 mM) əlavə edildikdə

belə suspenziya kulturasında mitoxondri və xloroplastların membran törəmələrinin və ribosomların sayı artır (Смолов и др., 2008, 2013).

Ribosom strukturlarının formalaşmasında iştirak edən sərbəsr ammonium bitki heceyrələrinin inkişafı üçün əvəzolunmaz element sayılır. Yalnız nitrat və ammoniumun müəyyən nisbəti bitkinin optimal böyümə və inkişafını təmin edən şərait yaradır (Mohanty et al., 1980; Kronzucker et al., 2004; Gunter et al., 2005; Смолов и др., 2013).

Müxtəlif çoxaldılma sistemlərində morfogeneza yollarının universallığı konsepsiyasını təsdiq edən tədqiqatların nəticələrini nəzərə alaraq (Зайцев и др., 2013), ammonium nitratın arpanın hüceyrə kulturasına təsirinin öyrənilməsinə məqsəduyğun hesab etmək olar.

MATERIAL VƏ METODLAR

İlkin material kimi, arpanın Naxçıvandəni, Baxarlı, Sadlıq, Qarabaq 22, Qarabaq 7, Dəyənətli, Qudrətli 48, Cəlalə forması və İCARDA-dan introduksiya edilmiş IBSTrGP pitomnikin entry 14 sort-nümunəsindən istifadə edilmişdir.

Öyrənilən sort və sort-nümunələri bitkinin boyuna, cərgələrin sayına, tam yetişmə müddətinə, unlu şəh, sarı pas xəstəliklərinə və torpaq-iqlim şəraitinə uyğunlaşma dərəcəsinə görə biri-birindən fərqlənilir.

Eksplant kimi nümunələrin toxumlarından istifadə edilmişdir. Toxumlar 5 dəqiqə ərzində 70% etanol, 20 dəqiqə ərzində 5% natrium hipoxloritlə ardıcıl sterilizasiya edildikdən sonra üç dəfə steril su ilə yuyulmuşdur (hər yuyulmada 1 dəqiqə). Kallusların induksiyası üçün toxumlar 2 mq/l 2,4-dixlorfenoksisirkə turşusu, 3 mM və 10 mM/l NH_4NO_3 əlavə edilmiş Qamborq (B₅) qida mühitində becərilmişdir. Kultivasiya qaranlıqda 24°- 26°C temperatur şəraitində aparılmışdır.

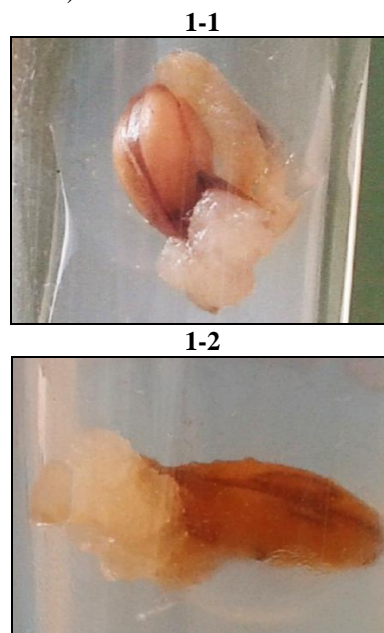
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Regenerant bitkilərin *in vitro* şəraitində alınması üçün kifayət gədar kütləsi olan kallus toxuması əmələ gəlməlidir. Bəzi müəlliflər arpa genotiplərinin aşağı regenerasiya potensialını məhz kallus toxumalarının çətin əmələgəlməsi və zəif proliferasiyası ilə izah edirlər (Jiang, 1998; Чернов и др. 2011; Лашина, 2015). Ammonium nitratın bəzi bitkilərin hüceyrə kulturasının böyüməsi və zülalın sintezinə təsirinin tədqiqi göstərmişdir ki, hüceyrələrdə zülalın sintezinin artması ammonium nitratın 2-10 mM/l qatılıq diapazonunda müşahidə olunur

(Смолов и др., 2008) və bununla bağlı embriogeneza prosesi aktivləşir (Асадова, 2002). Mühitdə NH_4^+ qatılığı 1-2 mM/l olduqda, zülal sintezinin aktivliyi artır və 10 mM/l qatılıqda isə öz maksimal nöqtəsinə çatır (Смолов и др., 2008; Смолов и др., 2013).

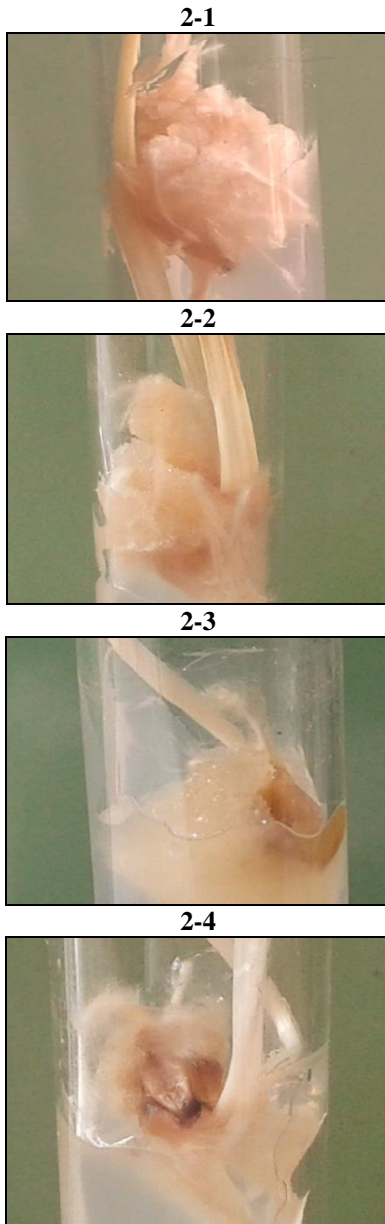
Bu məlumatları nəzərə alaraq, biz təcrübələrimizdə 3 mM və 10 mM qatılığı olan ammonium nitratdan istifadə etmişik.

Müşahidələr göstərmişdir ki, öyrənilən variantların heç birində Qarabaq 22 sortunun eksplantlarından kallus toxumasını almaq mümkün deyil. IBSTrGP pitomnikin entry 14 sort-nümunəsinin toxumlarında olduqca zəif proliferasiya edən ayrı-ayrı kallus hüceyrələri əmələ gəlir. Əvvəlki illərdə apardığımız təcrübələrdə eksplant kimi yetişmiş rüşeymlərdən istifadə zamanı kallus əmələgəlmə prosesində sortasililiq müşahidə edilirdi (Əsədova, 2015). Yeni tədqiqatlarda başqa eksplantlardan istifadə etdiyimizə baxmayaraq, yenə də Naxçıvandəni, Baxarlı, Sadlıq, Qarabaq 22, Qarabaq 7, Dəyənətli, Qudrətli 48 sortlarının və Cəlalə formasının toxumlarından proliferasiya edən kallus kütlələri alınmışdır. Bütün variantlarda Naxçıvandəni, Dəyənətli, Qudrətli 48 sortlarının və Cəlalə formasının eksplantlarında kallus əmələgəlmə prosesi digər sortlardan 4-5 gün tez başlamışdır (Şəkil 1).



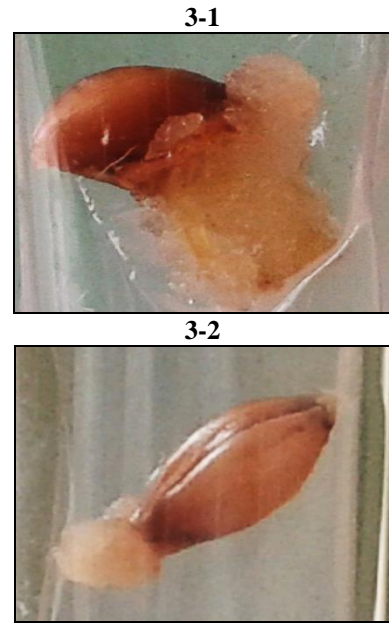
Şəkil 1. Arpanın Naxçıvandəni (1-1) və Dəyənətli (1-2) sortlarının toxumlarındakallusun induksiyası.

Qeyd etmək lazımdır ki, qida mühitlərinə əkiləndən sonra, toxumların çoxunda kallusun induksiyası, digərlərində isə cücərmə prosesi başlanmışdır. Lakin cücərməyə baxmayaraq onların üzərində intensiv proliferasiya edən kallus kütlələri formalaşmışdır (Şəkil 2).

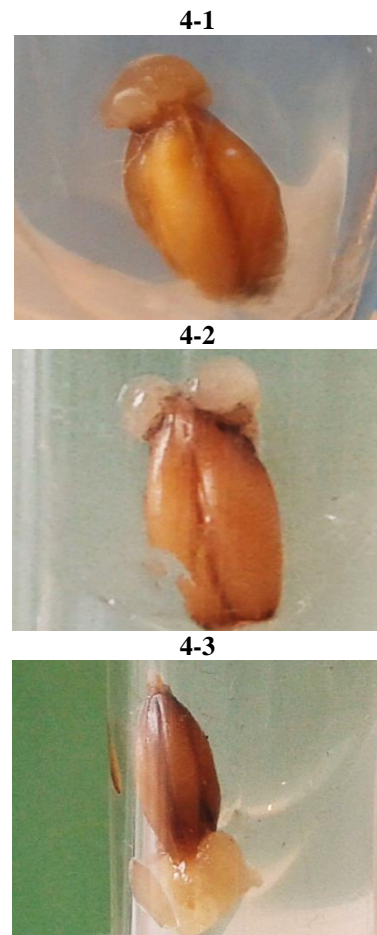


Şəkil 2. Qudrətli 48 (2-1), Qarabaq 7(2-2) sortlarının, Cəlalə formasının (2-3) və İBSTrGp pitomnikin entry 14 sortnümünəsinin(2-4) cücərmiş toxumlarındakallus kütlələri.

Bizim əvvəlki illərdə apardığımız təcrübələrdə göstərilmişdir ki, etiolə edilmiş cücərtilərdən alınmış kallus toxumaları intensiv proliferasiya etdiyindən, kütlələri yetişmiş rüşeymlərə nisbətən böyük olmuşdur (Əsədova, 2015). Hazırkı tədqiqatda eksplantların bir qisminin qaranlıq şəraitdə cücərməsi səbəbindən, müqayisəli müşahidələrin aparılmasına imkan yarandı. Ümumiyyətlə etiolə edilmiş cücərtilərin spesifik hormon statusu ilə xarakterizə olunmasına dair ədəbiyyatda kifayət qədər məlumatlar vardır. Bu məlumatlara görə qaranlıq şəraitdə becərilən cücərtilərdə hormonların əksəriyyətini aktiv sərbəst formalar təşkil edirlər (Полевой, 1998; Оглова, 2004, Kravtsov, 2011), bu da kallus induksiyası və proliferasiyasına müsbət təsir göstərir.



Şəkil 3. Ammonium nitratın 10mM/l qatılığında (3-1) və nəzarət variantda (3-2) kallusogenezi prosesi.



Şəkil 4. Sadlıq sortunun nəzarət (4-1), ammonium nitratın 3 mM/l(4-2) və 10 mM/l qatılıqlarında (4-3) sulu kallus hüceyrələrinin əmələgəlməsi.

Ammonium nitratın 3mM və 10 mM/l qatılıqları vizual olaraq kallusun əmələgəlmə intensivliyinə mənfi təsir göstərməmişdilər, əksinə bəzi sortlar üçün bu variantlarda alınmış kallus kütlələri ölçüdə nəzarət variantından üsnün olmuşdular (Şəkil 3).

Bəzi nümunələrdə sulu kallus hüceyrələri müşahidə olunurdu, lakin bunu genotipin xüsusiyyəti ilə izah etmək olar. Məsələn, Sadlıq sortunun hər bir variantında sulu kallus hüceyrələri müşahidə edilirdi (Şəkil 4).

Ümumiyyətlə, ammonium nitratın istifadə edilmiş qatılıqları nəzarət variantı ilə maqayisədə kallus toxumasının formalaşmasına. müsbət təsir göstərmişdilər.

Beləliklə, bizim və digər bitkilərlə aparılmış tədqiqatların (Mohanty et al., 1980; Imsande, 1994; Asadova, 2002; Leleu et al., 2004; Цап и др. 2008; Смолов и др., 2013) nəticələrinə əsaslanaraq, arpanın hüceyrəkulturasının alınması üçün istifadə edilən süni qida mühitinin tərkibində ammonium nitratın qatılığını 10 mM/l çatdırmaq məqsədə uyğundur.

ƏDƏBİYYAT

- Əsədova S.Ş. (2015) Arpanın yerli seleksiya sort və sortnümunələrinin in vitro kulturaya daxil edilməsi. *AMEA Botanika İnstitutunun elmi əsərləri*, XXXV: 173-178
- 2005-ci ildə kənd təsərrüfatı bitkilərinin əkin sahəsi, məhsul yığımı və məhsuldarlığı haqqında Azərbaycan Respublikası Statistika Komitəsinin məlumatları (2006) Bakı: 268 s.
- Асадова С.Ш. (2002) Оптимизация питательных сред для микроразмножения люцерны. *AMEA-nın Xəbərləri (Biologiya elmləri seriyası)*, 1-6: 365-372.
- Зайцев Д.Ю., Сельдиминова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н. (2013) Иммунолокализация цитокининов в клетках корней, формирующихся в каллусах пшеницы зародышевого происхождения. *Изв. Самарского научного центра Рос. Академии наук*, 15 (вып. 3, № 5): 1606-1609.
- Лашина Н.М. (2015) Создание дигаплоидов ячменя как исходного материала для селекции сортов с групповой устойчивостью к болезням. *Автореферат дисс. на соиск.уч.степени канд. биол. наук*. Санкт-Петербург, 21 с.
- Орлова А.Г. (2004) Роль индолилуксусной кислоты в развитии ответной реакции зеленых и этиолированных проростков пшеницы на тепловой шок. *Автореферат дисс. ... канд. биол. наук*. Нижний Новгород, 19с.
- Полевой В.В. (1998) Механизмы действия ауксина и его роль в системах регуляции и интеграции у растений. *Вестник Санкт-Петербурга. Ун-та, Сер. 3*, 10(2):34-39.
- Смолов А.П., Олейникова Т.А. (2003) Свет и утилизация нитрата каллусными клетками сои. *Изв. АН Сер. биол. наук.*, 6: 670-674
- Смолов А.П., Семенова Г.А. (2008) Влияние концентрации аммония на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом в клетках миксотрофного каллуса сои. *Физиол. раст.*, 55 (3): 397-403.
- Смолов А.П., Бутанаев А.М., Семенова Г.А., Ширикова Г.Н. (2013) Сравнительный анализ изменений в клетках каллуса сои и зеленой водоросли хламидомонады под действием экзогенного аммония. *Цитология*, 55(8):572-579.
- Цап Т.В., Кудряшов А.П. (2007) Поступление ионов аммония внутрь растительных клеток. *Вестник Могилевского Гос. Университета, Продовольствия*, 2 (3): 117–123.
- Цап Т.И., Шапчиц М.П., Кудряшов А.П. (2008) Закономерности поступления ионов аммония в корни проростков *Zea mays* и клетки суспензионной культуры *Syringa vulgaris* при варьировании качественного и количественного состава источников минерального азота. *Труды Белорусского Государственного Университета, Серия: Физиол., биохим. и молекулярные основы функционирования биосистем*, 3(часть 1): 60-68.
- Чернов В.Е., Пендинен Г.И. (2011) Сравнительная оценка каллусогенеза и регенерации у различных видов ячменя. *С/х биология*, 1: 44-53.
- Bassirirad H. (2000) Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change. *New phytologist*, 147(1):155–169.
- Imsande J. N., Touraine B. (1994) Demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant physiology*, 105(1): 3–7.
- Jiang W., Cho M.J., Lemaux P.G. (1998) Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant biotechnol.*, 15: 63–69.
- Gunter T.A., Ovodov Y.S. (2005) Effect of calcium, phosphate and nitrogen on the cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. *J. Biotechnol.*, 117: 385-3931.
- Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Kulaeva O.N., Yamburenko M.V. Kusnetsov V.V. (2011) Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. *Plant Growth Regulation*, 64(2): 173-183.
- Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. (2004) Kinetics of NH₄⁺ influx in spruce. *Plant physiology*, 110(3): 773–779.

Leleu O., Vuylstekker C. (2004) Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *J. Exp. Bot.*, **55**: 815-823.

Mohanty B., Fletcher J.S. (1978) Influences of ammonium on the growth and development of

suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol Plant.*, **42**: 221-225.

Mohanty B., Fletcher J.S. (1980) Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol. Plant.*, **48**: 453-459.

Влияние Нитрата Аммония На Получение Каллусной Ткани Ячменя

С.Ш. Асадова

Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАНА

Зрелые зерновки некоторых сортов и сортообразцов ячменя культивировались *in vitro* на питательных средах с различным содержанием нитрата аммония. Изучалось влияние нитрата аммония на индукцию каллусогенеза.

Ключевые слова: Ячмень, зерновка, культура *in vitro*, нитрат аммония, индукция каллусогенеза

The Effect Of Ammonium Nitrate On The Induction Of Barley Callus Tissues

S.Sh. Asadova

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, ANAS

To perform cell culture, some barley varieties and tissue samples have been cultivated *in vitro* in the nutrient media with different concentrations of ammonium nitrate. The influence of ammonium nitrate on the callus induction processes was investigated.

Key words: Barley, seed, *in vitro* culture, ammonium nitrate, callus induction