

İN VİTRO ŞƏRAİTİNƏ KOMPETENTLİYİNƏ GÖRƏ PERSPEKTİVLİ YONCA SORTLARININ ÇEŞİDLƏNMƏSİ

S.Ş.ƏSƏDOVA^{1,2}

¹AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu,
AZ 1073, İzzət Nəbiyev küç., 11, Bakı, Azərbaycan;

²Əkinçilik Elmi-Tədqiqat İnstitutu,
Az 1098, Sovxoz №2, Pırşağı qəs., Bakı, Azərbaycan;
biotexnoloqaz@mail.ru

RANKING OF PERSPECTIVE VARIETIES OF ALFALFA BY COMPETENCE FOR IN VITRO CONDITIONS

S.SH.ASADOVA^{1,2}

¹ANAS Institute of Molecular Biology and Biotechnologies;

²Research Institute of Crop Husbandry;
biotexnoloqaz@mail.ru

Alfalfa varieties were evaluated for their competence to in vitro conditions in order to carry out the selection process at the cellular level. In view of this, 7 promising alfalfa varieties of various origins were introduced into in vitro culture: Aran, Agstafa-1, Geyazan, Absheron, Agstafa-2, Yaz chichiyai, Leader. Aseptic seedlings, which served as sources of explants for the induction of callusogenesis, were obtained from the seeds of these varieties. There were no significant differences between the varieties in the formation, structure and proliferation of callus tissue. However, the varieties differed in their ability to morphogenesis. Under the same cultivation conditions, the varieties showed different pathways of morphogenesis: embryogenesis, rhizogenesis, gemmagenesis. Regenerated plants were obtained only for the Aran and Leader varieties. Based on the realization of the regeneration potential of plants under the given conditions of cultivation, the varieties were ranked as follows: 1. Aran, Leader; 2. Absheron, Goyazan, Agstafa-1; 3. Agstafa-2, Yaz chichiai.

Açar sözlər: yonca, in vitro kultura, kompetentlik, morfogjen kallus, regenerasiya, çeşidlənmə

Ключевые слова: люцерна, культура in vitro, компетентность, морфогенный каллус, регенерация, ранжирование

Keywords: alfalfa, in vitro culture, competence, morphogenic callus, regeneration, sorting

GİRİŞ

Yonca çox qiymətli yem bitkisidir və qida dəyərində görə dünya kənd təsərrüfatında aparıcı yerlərdən birini tutur. Yüksək keyfiyyətli yem zülalı mənbəyinin olması ilə yanaşı, bu bitki torpağın məhsuldarlığını da artırır. Son illərdə yoncanın terapevtik xassələri də aşkar edilmişdir. Belə ki, yoncadan alınmış ekstrakt insanın MCF-7, MDA-MB-231, SiHa xərçəng hüceyrə çoxalmasını dayandırır [9]. Bəlkə də bu bitkinin insanın qida rasionuna daxil edilməsinin vaxtı çatmışdır.

Azərbaycanda yoncanın 21 növü məlumdur. Qabaqcıl təsərrüfatlarda il ərzində yoncadan

1000-1500 sentnerdək yaşıl kütlə və ya 200-300 sentner quru ot məhsulu əldə edilir. Lakin son zamanlar alimlər kənd təsərrüfatı bitkilərinin məhsuldarlığının azalmasını bəyan edir, bunun səbəbini isə iqlimin istiləşməsində görürlər. Artıq bu əsrdə havanın temperaturunun 1,1-2,9⁰C-dək artması gözlənilir, maksimal artım isə - 2,4 – 6,4 °C-dək çata bilər [18].

Azərbaycan 9 iqlim qurşağı ilə xarakterizə olunur. Buna baxmayaraq, bir çox rayonlarda bitkilər həm torpaq, həm də atmosfer quraqlığına məruz qalır və bunun nəticəsində kənd təsərrüfatı bitkilərindən alınan məhsul ildən ilə azalır. Stres zamanı bitkilərdə mübadilə proseslərinin pozulması baş verir, lakin eyni zamanda quraqlıq torpaqlarda şoranlığın yaranmasına gətirib çıxarır [14]. Məhz quraqlıq, şoran torpaqlar və aşağı temperatur bitkidə su qıtlığını əmələ gətirən amillərdir. Təbii ki, bu amillərə toleranlığa göstərmək üçün osmotik cəhətdən dayanıqlı bitkilər alınmalıdır. Nəzərə alsaq ki, son zamanlar bitki biomüxtəlifliyi getdikcə azalır, bu problem ön plana çıxır və seleksiyaçıları artıq müəyyən bitkilərin quraqlığa və duza davamlı sort və formalarını əldə etmişlər [7]. Davamlı bitkilərin alınmasında həm ənənəvi seleksiya üsullarından, həm də in vitro texnologiyadan istifadə edilir [5; 12]. Belə ki, in vitro texnologiyada polietilenqlol [6] və mannitdən istifadə etməklə aşağı temperatura, quraqlığa [6; 8;10] və şoranlığa [7; 16; 17] davamlı müxtəlif bitki növləri alınır.

Qeyd etmək lazımdır ki, in vitro kulturada regenerant bitkilərin formalaşması süni iqlim və süni qida mühiti şəraitində aparılır. Kultivasiya şəraitinin dəyişməsi ilə müxtəlif modelləşdirilmiş sistem yaradıla bilər ki, bu zaman hüceyrə kulturası texnologiyaları əsasında regenerasiya etmiş bitkilər artıq tələb edilən şəraitə uyğunlaşmış olur [5]. Lakin alınmış bitkilər davamlılıqla yanaşı erkən yetişmə, yüksək toxum və yaşıl kütlə məhsulu, təkmilləşdirilmiş kimyəvi tərkibə də malik olmalıdır, bu da bitki biotexnologiyasının vacib istiqamətlərindən biridir [4;13].

Bizim işin ümumi məqsədi də hüceyrə seleksiyası vasitəsilə quraqlığa davamlı yonca formalarının alınmasıdır. Lakin in vitro texnologiyası vasitəsilə tədqiqatların aparılması üçün əsas və çox vacib şərt stabil regenerasiyanı təmin edən morfogenez hüceyrə kulturasının alınması və regenerant bitkilərin əldə edilməsidir. Məhz yüksək regenerasiya potensialına malik olan bitkilər in vitro texnologiyalara cəlb oluna bilər [4;5;10]. Bunu nəzərə alaraq, tədqiqatın birinci mərhələsinin məqsədi müxtəlif mənşəli yonca bitkilərinin in vitro şəraitinə kompetentliyinin tədqiqi və qiymətləndirilməsindən ibarət olmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Tədqiqat materialı kimi müxtəlif mənşəli 7 yonca sortundan istifadə edilmişdir: Aran; Ağstafa-1; Ağstafa-2; Göyözən; Abşeron; Yaz çiçəyi; Lider. Sortların toxumları steril şəraitdə süni qida mühitinə əkilməzdən əvvəl sterilizasiya edilmişdir. 9 sterilizasiya rejimi yoxlanılmış, və

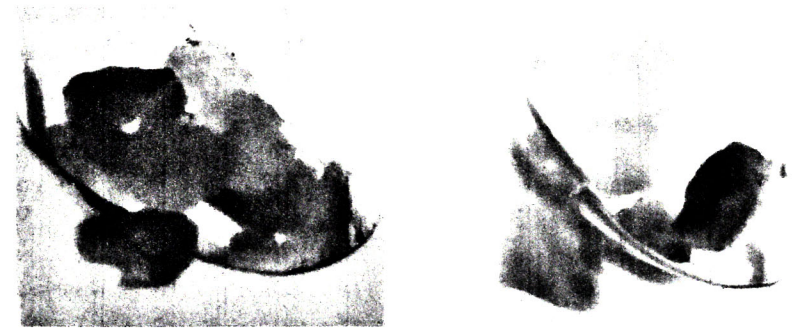
toxumların sterilliyini təmin edən və cücərmə qabiliyyətini optimal səviyyədə saxlayan sterilizasiya rejimi seçilmişdir. Steril toxumlar fitohormon və vitaminlər əlavə edilməyən ½ B₅ [15] süni qida mühitinə əkilmişlər.

Hər bir sort üzrə in vitro şəraitində əkilmiş toxumlardan aseptik cücərtilər alınmışdır. 5-6 günlük cücərtilər doğranılmış və kəsiklər hüceyrə kulturasının alınması üçün tərkibində 5 mq/l 2,4-D, 5 mq/l KIN və 0,5 mq/l NST olan modifikasiya edilmiş Gamborg (B₅) süni qida mühitinə əkilmişdir [11].

Morfogenezin induksiyası məqsədi ilə hüceyrə toxumaları 0,2 mq/l 6-benzilaminopurin (6-BAP) tərkibli süni qida mühitinə keçirilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Müəyyən edilmişdir ki, yoncanın in vitro kulturaya daxil edilməsi və müvəffəqiyyətli regenerasiyanın alınması bilvasitə eksplantın təbiətindən asılıdır. Belə ki, müxtəlif yonca eksplantları ilə aparılmış tədqiqatlar göstərir ki, bitkilərin yuxarı hissəsindən (40-60 sm) götürülmüş eksplantlardan regenerasiya almaq daha çətin olur. In vitro kulturaya daxil etmək üçün ən effektiv nəticələr bitkinin aşağı hissəsindən (20 sm hündürlüyə qədər) götürülmüş eksplantların istifadəsi zamanı alınır [3]. Bu xüsusiyyəti nəzərə alaraq, biz işimizi ana bitkiləri ilə yox, aseptik cücərtilərlə apardıq. Bunun üçün sterilizasiya edilmiş 7 yonca sortunun toxumları in vitro şəraitdə ½ B₅ [15] süni qida mühitinə əkilmiş, hər bir növ üçün toxumlardan aseptik cücərtilər alınmışdır (şəkil 1). 5-6 günlük cücərtilərin gövdə və yarpaq hissələri doğranılmışdır. Kəsiklər çətiləndən sonra onlar, tərkibində müəyyən nisbət və qatılıqda olan fitohormonlar əlavə edilmiş, kallusogenezin induksiyasını təmin edən süni qida mühitinə köçürülmüşdür. Öyrənilən bütün sortların eksplantlarında hüceyrə toxumasının əmələ gəlməsi və proliferasiyası qeydə alınmışdır (şəkil 1. 2).

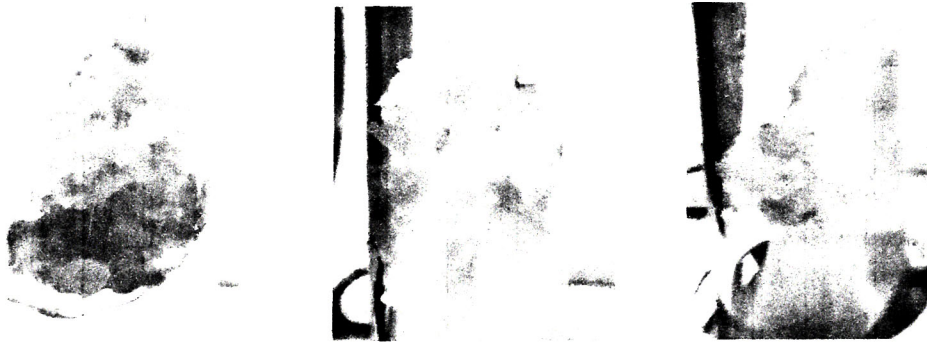


Şəkil 1. Yonca sortlarının eksplantlarında kallus toxumasının əmələ gəlməsi



Şəkil 2. Proliferasiya nəticəsində kallus toxumalarının kütləsinin artması

Həm kallusların induksiyası, həm də hüceyrə toxumasının proliferasiyası prosesləri zamanı sortlar arasında əhəmiyyətli fərq nəzərə çarpmamışdır. Hər bir sortdan alınmış kallus toxumasının kütləsi asanlıqla artıb, kultivasiyanın 6-cı həftəsində ilkin eksplantın kütləsindən 6-8 dəfə çox olmuşdur. Strukturuna görə kallus toxumaları oxşar olmuşdur. Belə ki, toxumalar sıxlığı az, bir birindən asanlıqla ayrılan hüceyrələrdən ibarət olmuşlar (şəkil 2), bu da müxtəlif yonca sortlarının morfojen hüceyrə kulturasının ümumi xassəsidir [1; 2; 13]. Digər tədqiqatlarda olduğu kimi [3;4;5;12] toxumaların rəngi ilk əvvəl sarımtıl olmuş, kultivasiyanın sonunda isə kalluslarda meristematik ocaqların əmələ gəlməsi səbəbindən yaşıllaşma müşahidə edilmişdir (şəkil 3).



Şəkil 3. Hüceyrə toxumalarında meristematik ocaqların əmələ gəlməsi

Kalluslar BAP-6 əlavə edilmiş qida mühitinə əkiləndən sonra somatik embriogeneza və morfoqenez hadisələri qeydə alınmışdır (şəkil 4). Embrioidlərin inkişafını təmin etmək üçün, onlar kalluslardan ayrılıb, fitohormonsuz qida mühitinə əkilmişlər. Bəzi embrioidlər birbaşa regenerant bitkiyə qədər inkişaf edirdi, bəzilərinə eyni zamanda kalluslar da əmələ gəlirdilər (şəkil 5). Məlumdur ki, bitkinin yerüstü hissəsinin və kök sisteminin inkişafı bir-biri ilə əlaqəli olub, bir-birindən asılıdır. Bu zaman kök indeksi (kökün orta uzunluğunun gövdənin orta uzunluğuna nisbəti) hesablanmalıdır. Kök indeksinin aşağı olması onu göstərir ki, torpağa əkilən regenerant bitkilərin çoxu normal inkişaf edə bilməyib, məhv olacaq. Məsələn, yoncanın 6-12 yarpağı, 68 kökü, 7-10 sm gövdə uzunluğu və 5-6 sm kök uzunluğu olan regenerant bitkilərinin sağ qalması orta hesabla 56% təşkil etmişdir. Bu bitkilərin avtotrof qidalanmaya keçməsi isə 2 həftə təşkil etmişdir [12].



Şəkil 4. Kallus toxumasında morfoqenez halları: a- gemmagenez; b- rizogenez

Bizim tədqiqatda hər iki halda gövdə və kök sistemi normal inkişaf etmişdi (şəkil. 5, 6, 7).

Növlər arasında regenerasiya prosesləri fərqli gəldirdi ki, bu da sortların genetik əlamətləri ilə izah olunur [5;10;12]. Beləliklə, Aran və Lider sortlarında somatik embrioidlər və morfojen strukturlar meydana gəlmişdi. Ağstafa-1 sortunda yalnız natamam morfoqenez, Göyözən sortunda isə rizogenez fenomeni müşahidə edilmişdir.



Şəkil 5. Kallus toxumasında somatik embrioidlərin cücərməsi



Şəkil 6. Morfojen strukturların kalluslardan ayrılması və hormonsuz qida mühitinə köçürülməsi

Abşeron, Ağstafa-2 və Yaz çiçəyi sortlarında kallusların meristematik sahələrində nə somatik embrioidlər, nə də morfogen strukturlar müşahidə olunmamışdır. Kallus toxumaları tədricən böyüyüb, yaşllaşmış, hüceyrələri bir-biri ilə sıx birləşərək, kallusların struktur cəhətdən bərkiməsinə səbəb olmuşdur (şəkil 8). Beləliklə, eyni becərilmə şəraitində Abşeron, Ağstafa-2 və Yaz çiçəyi sortlarından regenerant bitkilər əldə edilməmişdir.



Şəkil 7. Regenerant bitkilərin inkişaf etməsi



Şəkil 8. Morfogen kallusun morfogenezi xassəsinin itirilməsi

Ümumilikdə, tədqiq edilmiş sortların hər biri *in vitro* şəraitində asanlıqla morfogen və qeyri-morfogen hüceyrə toxumasını əmələ gətirmişdi. Regenerasiya potensialına görə isə növlər aşağıdakı kimi sıralana bilər:

Aran, Lider;
Abşeron, Göyəzən, Ağstafa-1;
Ağstafa-2, Yaz çiçəyi.

ƏDƏBİYYAT

1. Асадова С.Ш. Влияние различных комбинаций фитогормонов на каллусо- и морфогенез некоторых генотипов люцерны. // АМЕА-ның Хəбərləri, Биологиya elmləri seriyası. 2002, №1-6, s. 355-364.

2. Асадова С.Ш. Оптимизация питательных сред для микроразмножения люцерны. // АМЕА-ның Хəбərləri, Биологиya elmləri seriyası. 2002, №1-6, s. 366-372.
3. Бородаева Ж.А., Чернявских В.И., Думачева. Изучение особенностей введения в культуру *in vitro* индивидуальных отборов *Medicago varia* Mart. для ускоренного размножения селекционных образцов. // Сб. науч. раб. плодоводство и ягодоводство России, ФГБНУ ВСТИСП. 2019, том 59, с. 19-24.
4. Дарханова В.Г., Строева Н.С. Изучение генетического разнообразия люцерны методом *in vitro*. // Успехи современного естествознания. 2004, № 7, с. 51-52.
5. Рожанская О. International kindle paper white. – 2018. – 412 p.
6. Долгих Ю.И., Ларина С.Н., Шамина З.Б., Пустовойтова Т.Н., Жданова Н.Е. Засухоустойчивость клеток кукурузы, полученных из устойчивых к осмотическому действию полиэтиленгликоля клеточных линий. // Физиология растений. 1994, том 41(6), с. 853-858.
7. Дзюбенко Н.И., Бухтеева, А.В., Кочегина А.А.. Многолетние и однолетние засухо- и солеустойчивые растения Вавилонской коллекции. // Ж. Изучение и использование генетических ресурсов растений. 2017, №1, с. 5-23. doi:10.30901/2227-8834
8. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro*// Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2013, вып. 8, с. 93-100.
9. Еременко Р.Ф., Малоштан Л.Н., Шаталова О.М. Изучение антипролиферативной активности экстракта из травы люцерны посевной на моделях *in vitro*. // Украинский биофармацевтический журнал. 2015, №1, с. 57-60.
10. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro*. // Биополимеры и клетка. 2000, том 16, № 3, с. 159-185.
11. Мезенцев А.В. Методические указания по регенерации и размножению люцерны с использованием культуры тканей, клеток и протопластов. – М., 1980. – 25 с.
12. Строева Н.С., Дарханова В.Г., Воронов И.В., Филиппова Г.В. Клональное микроразмножение и селекция *Medicago varia* в условиях Центральной Якутии. // Наука и образование. 2017, №3, с. 124-129.
13. Строева Н.С., Дарханова В.Г. Получение растений-регенерантов *Medicago varia* индукцией каллусообразования листовых эксплантов в культуре *in vitro*. // Наука и образование. 2017, №1, с. 110-113.
14. Edmeades G.O. Drought tolerance in maize: an emerging reality. // Companion Document to Executive Summary ISAAA Briefs. 2008, 39 p.
15. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. // Exp. CellRes. 1968, vol. 50(1), p. 151-158.
16. Tantau H., Balko C., Brettschneider B., Melz G., Dorffling K. Improved frost tolerance and winter survival in winter barley (*Hordeum vulgare* L.) by *in vitro* selection of proline over accumulating lines. // Euphytica. 2004, vol. 139, p. 19-32.
17. Zair I., Chlyah A., Sabounji K., Tittahsen M., Chlyah H. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. // Plant Cell, Tissue Organ Culture. 2003, vol. 73(3), p. 237-244. doi:10.1023/A:1023014328638
18. IPCC-intergovernmental panel on climate change <https://www.ipcc.ch/sr15/>

IN VITRO ŞƏRAİTİNƏ KOMPETENTLİYİNƏ GÖRƏ PERSPEKTİVLİ YONCA SORTLARININ ÇEŞİDLƏNMƏSİ

S.Ş.ƏSƏDOVA^{1,2}

¹AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu;

²Əkinçilik Elmi-Tədqiqat İnstitutu; biotexnologaz@mail.ru

Seleksiya prosesini hüceyrə səviyyəsində həyata keçirmək üçün, yonca sortu *in vitro* şəraitə kompetentliyinə görə qiymətləndirilmişdir. Bu məqsədlə *in vitro* kulturaya müxtəlif mənşəli 7 perspektivli

yonca sortu daxil edilmişdir: Aran, Ağstafa-1, Göyəzən, Abşeron, Ağstafa-2; Yaz çiçəyi, Lider. Bu sortların toxumlarından aseptik cücərtilər alınmış və eksplant mənbəyi kimi kallusogenезin induksiyası üçün istifadə edilmişdir. Kallus toxumasının əmələ gəlməsi, strukturu və proliferasiyası baxımından sortlar arasında ciddi fərqlər aşkar edilməmişdir. Sortlar ancaq morfogenез qabiliyyətləri ilə fərqlənmişdir. Eyni becərilmə şəraitində sortlarda fərqli morfogenез yolları müşahidə edilmişdir: embriogenез, rizogenез, gemmagenez. Regenerant bitkilər yalnız Aran və Lider sortları üçün alınmışdır. Seçilmiş becərilmə şəraitində, bitkilərin regenerasiya potensialının həyata keçirilməsinə əsaslanaraq, sortlar aşağıdakı kimi sıralanmışdır: 1. Aran, Lider; 2. Abşeron, Göyəzən, Ağstafa-1; 3. Ağstafa-2, Yaz çiçəyi.

РАНЖИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЛЮЦЕРНЫ ПО КОМПЕТЕНТНОСТИ К УСЛОВИЯМ IN VITRO

С.Ш.АСАДОВА^{1,2}

¹Институт Молекулярной Биологии и Биотехнологий НАНА;

²Научно-Исследовательский Институт Земледелия; biotexnologaz@mail.ru

Для осуществления процесса селекции на клеточном уровне сорта люцерны оценивались по компетентности к условиям in vitro. Исходя из этого, в культуру in vitro были введены 7 перспективных сортов люцерны различного происхождения: Aran, Ağstafa-1, Geyazan, Abşeron, Ağstafa-2 Яз чичья, Lider. Из семян указанных сортов были получены асептические проростки, которые служили источниками эксплантов для индукции каллусогенеза. По формированию, структуре и пролиферации каллусной ткани между сортами значительных различий выявлено не было. Однако сорта отличались по способности к морфогенезу. В одних и тех же условиях культивирования у сортов наблюдались разные пути морфогенеза: эмбриогенез, ризогенез, геммагенез. Растения-регенеранты были получены только для сортов Aran и Lider. Исходя из реализации в заданных условиях культивирования регенерационного потенциала растений сорта были ранжированы следующим образом: 1. Aran, Lider; 2. Апшерон, Гоязан, Ağstafa-1; 3. Ağstafa-2. Яз чичья.

Çapa təqdim etmişdir: Allahverdiyev Tofiq b.e.d., dosent

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 15.06.2021. Təkrar işlənməyə göndərilmə tarixi: 27.06.2021.

Çapa qəbul edilmə tarixi: 04.07.2021.