بررسی میزان تحمل به تنش خشکی کالوس های گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) تحت تابش پرتو UV-C

رویا رضوی زاده و علی اکبر احسانپور

دانشگاه اصفهان ـ دانشکده علوم ـ گروه زیست شناسی

چکیده

در این تحقیق کالوس های حاصل از گیاه یونجه در محیط کشت (invitro) تحت تابش پرتو UV-C به مدت ۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه قرار گرفت و سپس به محیط های کشت MS حاوی ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰و ۳۰ درصدPEG منتقل و در اتاق کشت تاریک نگهداری شدند. کالوس های متحمل به تنش خشکی بر اساس وزن تر گزینش شدند. نتایج نشان داد که تابش UV-C به مدت ۶۰ دقیقه ، تحمل به تنش اسموتیک را افزایش می‌دهد واز اثرات تنش خشکی در محیط های کشت حاوی ۱۰و۲۰ درصد PEG می‌کاهد. فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نیز تحت تابش UV-C کاهش یافته، در حالیکه فعالیت این آنزیم در کالوس های تابش ندیده تا غلظت ۲۰ درصد PEG در محیط کشت افزایش می‌یابد. بهرحال به نظر می رسد که پرتو UV-C سیستم دفاعی داخلی گیاه رافعال کرده وممکن است بیان ژن های مشخص در مسیر سنتز مشتقات فنلی را القاء نماید.

واژه های کلیدی: یونجه , تنش خشکی , پلی اتیلن گلیکول (PEG) , اسید فسفاتاز , پرتو UV-C

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یونجه (alfalfa) یکی ازمناسبترین گیاهان علوفه ای جهان برای مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می شود(۲). گیاه یونجه از سیستم ریشه أی قوی برخوردار است که عامل موفقیت آن در مقاومت به کلیه عوامل نامساعد و همچنین استفاده از مواد غذایی زمین به شمار می‌آید. کاشت این گیاه تأثیر مهمی در اصلاح زمین زراعی از راه تهویه ، برقراری تناوب و پایین بردن آب سطحی (زهکشی)، افزایش مواد آلی و ازدیاد ازت خاک دارد . یونجه به دلیل داشتن ریشه‌های عمیق و اینکه پس از استقرار مقاومت ویژه‌ای نسبت به خشکی نشان می دهد، بخوبی برای برخی از مناطق دیمزار کشور جهت احیاء و اصلاح مراتع سازگاری دارد (۲).ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی از طریق روش های سنتی بسیار وقت گیر وگاهی غیر ممکن است. بنابراین امروزه از شیوه های جدید تر از جمله کشت بافت برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی وسایر عوامل نامساعد استفاده می شود (۱۳). از پدیده های رایج در کشت بافت تنوع بدنی یا Somaclonal variation می‌باشدکه هرگونه تغییر از نظر ژنتیکی یا کروموزومی در سلولهای بدنی است و می‌تواند منجر به پیدایش صفات و ویژگی های جدید در گیاهان حاصل از آنها شود(۱۳). در سال های اخیر تمایل به استفاده از تنوع بدنی برای بهسازی (به نژادی) و اصلاح گیاهان افزایش یافته و بدین منظور در سلولها از جهش زاهای مختلفی استفاده می شود. مشخص شده است که پرتو UV جهشهای تغییر چهارچوب یا frame shift (کاهش یا اضافه شدن بازها اما نه در شکل سه تایی) و جایگزینی جفت بازها را القاء و تحریک می‌کند. علاوه بر این تشکیل دایمرهای پیریمیدین در پاسخ به پرتو UV و به دنبال آن مکانیسم ترمیم برشی (Excision repair) و قطع DNA منجر به ایجاد قطعات تک رشته‌ای در DNA می‌شود. این امر مدل اساسی القاء جهش توسط پرتوUV می‌باشد (۲۰). پرتوهایUV گستره‌ای از طیف الکترومغناطیسی با طول موجهای بین nm ۴۰۰-۲۱۰ می باشد، و برای سهولت جهت مطالعه اثرات‌آن،به‌سه‌دسته تقسیم می‌شوند(٦):UV-A (۴۰۰-۳۲۰ nm)، UV-B (۳۲۰-۲۹۰ nm) و UV-C (۲۹۰-۲۱۰ nm)(٦). پرتو-UV C درمقایسه با دو نوع دیگر به دلیل جذب شدید توسط لایه اوزون مقدار نفوذ آن به جو کره زمین بسیار اندک می باشد ، در نتیجه اثرات کمتری نسبت به UV-B بر موجودات کره زمین می گذارد.

از میان پرتوهای جهش‌زا، پرتوهای UV ، شاید بهترین و ارزانترین منبع قابل دسترس برای استفاده باشد. گرچه بدلیل طول موج نسبتاً بلند پرتوهای UV نفوذپذیری آن در بافتها محدود می باشد، اما UV برای القاء جهش در کشت سلولها ، پروتوپلاست و همچنین برای کالوسها بکار رفته است (۲۰).

تنش خشکی سبب تغییرات متعددی در سلول ها ودر کل گیاهان می شود. تغییر در متابولیسم اولیه یک پاسخ معمول به تنش خشکی در گیاهان می باشد. از جمله آنزیم هایی که در اثر تنش خشکی در گیاه افزایش می یابد، آنزیم اسید فسفاتاز(Apase) است. عوامل محیطی متعددی باعث افزایش فعالیت اسید فسفاتازهای درون سلولی و برون سلولی می‌شوند که مهمترین آنها قرار گرفتن ریشه های گیاه در معرض کاتیون هایی مانند Ni^{2+} ، Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، تنش شوری و تنش خشکی می باشد (٤و٧و٨). اهمیت این آنزیم را می توان به تولید، انتقال و بازیافت (recycling) فسفرمعدنی (pi) نسبت داد(۱۷).

برخی از پژوهشهارابطه متقابل بین تنش خشکی وپرتوUV-B رادر گیاهان ثابت کرده است. به عنوان مثال این پرتوها می توانند شدت تنش خشکی را در گیاهان از طریق کاهش میزان از دست دادن آب گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

با کاهش هدایت روزنـه‌ای و سطح برگ کاهش داده و بتأخیر اندازند . (۱۵). همچنین تحمل گیاه با قرار گرفتن در معرض یک تنش قابل برگشت، نسبت به یک یا چند تنش دیگر بیشتر خواهد شد. گیاهان با دریافت پرتو UV موجود در محیط ، بیان ژن‌های مشخص بویژه آنزیم‌های کلیدی در مسیرسنتز فنیل پروپانوئید را القاء می کنند و منجر به تولید زیاد مشتقات فنولیک می‌شوند (۱۲و۱۸).

علیرغم مطالعاتی که در رابطه با اثرات پرتو UV-B بر روی گیاهان صورت گرفته، گزارشات علمی معدودی در زمینه اثر پرتو UV-C روی گیاهان ارائه شده است ، بنابراین در این تحقیق سعی شد اثرات UV-C بر چگونگی مقاومت به خشکی کالوس های یونجه بررسی گردد.

مواد وروشها

برای انجام تمام آزمایـشها در این تحقیق ازمحیط کشت پایهMS (Murashige and Skoog, 1962) استفـاده گردید (١٤) و برای تولید کالوس، هورمون های گیاهی Kin (kinetin) ، 2, 4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) و NAA(Naphtalene acetic acid) مقدار ۲ میلی گرم در لیتربه محیط کشت اضافه شد(۱). برای ایجاد تنش خشکی پلی اتیلن گلیکول (PEG) با وزن مولکولی ٦٠٠٠ (ساخت کارخانه Merck) و مقدار ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به محیط کشت‌های موردنظر افزوده شد. برای ساخت محیط کشت حاوی PEG در این تحقیق از متد انتشار (Diffusion-based method) استفاده گردید.در این روش ابتدا محیط کشت MS حاوی ۹گرم در لیتر آگار که پس از ریختن در ظروف کشت استریل گردید. محیط کشت مایع (بدون آگار) MS حاویPEG نیز با دو برابر غلظت مورد نظر تهیه و اتوکلاو گردید. سپس به ظروف حاوی محیط کشت جامددر شرایط استریل ، هم حجم آن محیط کشت مایع حاوی PEG اضافه شد و پس از ٢٤ ساعت محیط کشت مایع رویی دور ریخته شد و محیط کشت جامد حاوی PEG استفاده گردید(۲۰). با کمک دستگاه اسمومتر (Vapor pressure osmometer. S/N model 5520) اسمولاریته محیط کشت مایع در ابتدا و پس از ٢٤ ساعت قرار گرفتن برروی محیط کشت جامد اندازه گیری شد . قابل ذکر است که اسمولاریته نهایی بدست آمده از محیط های کشت ، بترتیب برابر با ۲۱۷، ۲۳۰، ۲۷۰، ۳۲۱، ۷۱۰، ۱۳۲۰ میلی مول بر کیلوگرم بود.

تولید کالوس والقای تیما ر خشکی وUV-C بر روی آن

برای تولید کالوس، بذر های یونجه در محیط کشتMS کشت شدند وپس از ۳۰ روز از ساقه گیاهان حاصل جداکشت ها تهیه و در محیط کشت تولید کالوس قرار گرفتند. پس از ٤ هفته کالوس ایجاد شد. کالوسهای حاصل هر دو هفته یکبار درهمان محیط های کشت واکشت شدند و سپس کالوسهای نسل چهارم به محیط کشت هایی با غلظت های مختلف PEG منتقل گردیدند.

برای بررسی اثر UV-C برروی کالوس، ظروف کشت حاوی کالوس در زیر لامپ UV-C (٢٥٤ nm) در فاصله ۱۰ سانتی‌متری از آن قرار گرفتند. درب ظروف برداشته شد و کالوسها یک بار در معرض تابش اشعه UV-C با زمان های مختلف ۱۵، ۳۰ و ٦٠ دقیقه قرار گرفتند. سپس کالوسها به محیط کشت حاوی غلظت های مختلف PEG (۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و۳۰ درصد) انتقال یافتند و در اتاق کشت در محیط تاریک و بدون نور نگهداری شدند که پس از ۱۸ روز میزان رشد آنها بر اساس وزن تر اندازه گیری شد. (علت نگهداری کالوسها در تاریکی ، مکانیسم تجدید فعالیت نوری (photoreactivation)بوسیله آنزیم فوتولیاز

Archive of SID

www.SID.ir

در سلولها، جهت ترمیم تغییرات ناشی از پرتو UV روی DNA می باشد. این آنزیم وابسته به نور بوده ودر حضور پرتو ۶۰۰nm- ۴۰۰ فعالیت می کند(۸)).

این آزمایش حداقل با سه تکرارو در هر تکرار با ۵ قطعه کالوس تقریبا یکنواخت در یک طرح کاملاً تصادفی با مقایسه آزمون چند دامنه دانکن انجام گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز

۱۸ روز پس از انتقال کالوس ها به محیط های کشت حاوی غلظت های ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد PEG و زمان های مختلف تابش UV-C ، برای محاسبه تغییرات فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز از کالوس های موردنظر عصاره گیری شد. به این ترتیب که برای اندازه گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در کالوس‌هایی که تحت تیمار تنش خشکی و UV-C بودند، از هر کشت به تعداد۳ تکرار، مقدار ۱ گرم کالوس تازه وزن و به هاون منتقل گردید و برروی آن یک میلی لیتر بافر شامل Tris-HCl (۰/۰۲ مولار) ، Triton (۰/۱ درصد)، گلیسرول (۱۰ درصد) و PVP (Polyvinylpyrrolidone)(۵ درصد وزن به حجم) با pH ۶/۸ اضافه شد. پس از خرد کردن و سائیدن کامل کالوس در دمای ۴ درجه سانتی گراد عصاره به دستگاه میکروسانتریفوژ (مدل eppendorf 5415D) منتقل و با rpm ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. پس از آن بخش رویی(سوپرناتانت) جدا وبرای اندازه‌گیری فعالیت اسید فسفاتاز استفاده شد. از هر لوله مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی جدا و براساس روش Julie *et al.*, 1999 (۱۰) فعالیت اسید فسفاتازکل توسط اسپکتروفتومتر (مدل Pharmacia Novaspec -LKB) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج براساس واحد (Unit) آنزیم در گرم وزن تر کالوس گزارش گردید.

نتایج

اثر تابش UV-C بر رشد کالوس

نتایج حاصل از اثر زمانهای مختلف تابش UV-C بر تغییرات رشد کالوسهای یونجه، تحت تیمار غلظتهای مختلف PEG، در شکل ۱ ارائه شده است. کالوسهای تحت تابش UV-C به مدت ۱۵ دقیقه در غلظت صفرPEG نسبت به نمونه های بدون تابش UV-C مقدار مختصری افزایش رشد نشان دادند. همانطور که درشکل ۱ مشخص است در کالوسهایی که به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش UV-C بودند ، بین غلظت های صفر وسایر غلظتهای PEG (بجز غلظت ۲٪) اختلاف معنی داری از نظر رشد کالوس مشاهده می شود. مقایسه الگوی رشد کالوسهایی که به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش UV-C قرار گرفتند ، با کالوسهای که تحت تابشUV-C قرار نداشتند، نشان می دهد که تابش UV توانسته است در غلظت PEG ۲۰٪ رشد نسبی کالوسها را ۱۰ درصد افزایش دهد(جدول ۱).

مقایسه بین درصد رشد کالوسها در غلظتهای مختلف PEG بدون تیمار UV، با کالوسهای تحت تیمارUV به مدت ۳۰ دقیقه نشان می دهد که تابش UV-C به مدت ۳۰ دقیقه توانسته است میزان رشد کالوسها را بطور متوسط ۱۷/۳۷ درصد افزایش دهد. اگرچه واضح است که روند عمومی رشد کالوسها با افزایش غلظتPEG کاهش می یابد ولی رشد کالوس های تحت تابش UV-C به مدت ۳۰دقیقه در غلظت ۲۰ درصد PEG ، ۵۷/۱۴ درصد نسبت به کالوسهای تیمار نشده با UV افزایش نشان می دهد(جدول ۱).

تابش ۶۰دقیقه ایUV-C بر روی کالوسهای یونجه در این مطالعه توانست اثر قابل ملاحظه ای در افزایش

Archive of SID
www.SID.ir

رشد نسبت به کالوس های تیمارنشده با UV نشان دهد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده در تمام غلظتهایPEG تابشUV به مدت۶۰ دقیقه موجب افزایش رشد کالوس شده است. بطوریکه میانگین افزایش رشد در کالوسهای تحت تیمار شوک اسموتیک ۳۶/۶۳ درصد بوده واختلاف معنی داری نسبت به تیمارUV-C به مدت ۳۰دقیقه و۱۵ دقیقه نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). اثر تابش UV-C به مدت ۶۰ دقیقه در غلظت ۲۰درصدPEG نسبت به شاهد بسیار محسوس است. بطوریکه UV-C توانست رشد کالوسهای تابش دیده را نسبت به کالوسهای تابش ندیده به مقدار قابل ملاحظه ای (۱۰۸/۵۷درصد) افزایش دهد. این در حالی است که رشد نسبی در غلظت ۱۰درصد PEG نیز تا بیش از ۵۰ درصد افزایش یافته است.

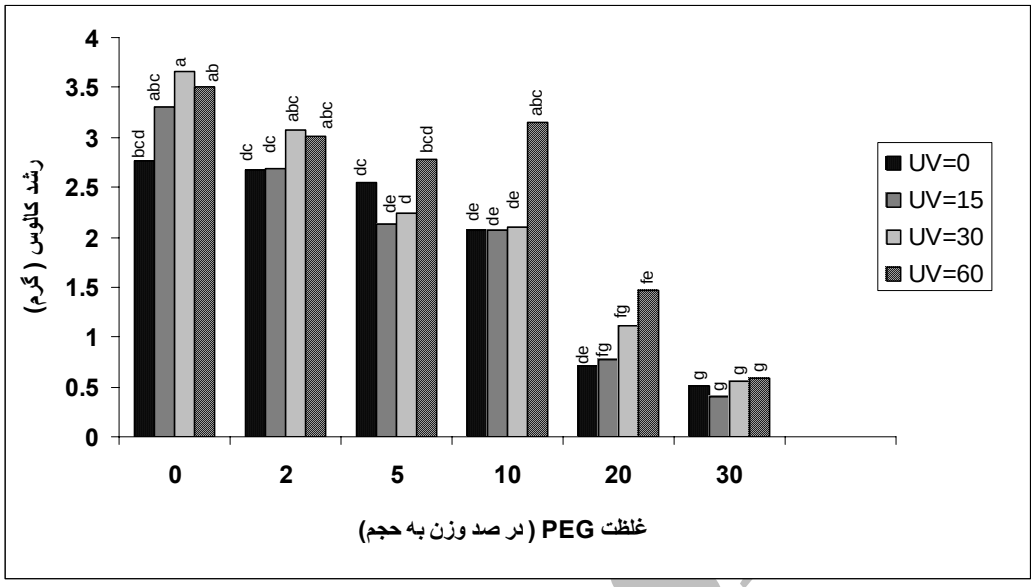
جدول۱: اختلاف درصد رشد (بر حسب گرم وزن تر) کالوسهای تحت تابش UV نسبت به کالوسهای تیمار نشده با UV .

غلظتPEG (٪) / مدت تابشUV (دقیقه)	۰	۲	۵	۱۰	۲۰	۳۰
۱۵دقیقه	+۱۹/۵۶	+./۷۵	−۱۶	۰	+۱۰	−۲۰
۳۰دقیقه	+۳۲/۲۴	+۱۵/۴۱	−۱۲	+۱/۴۴	+۵۷/۱۴	+۱۰
۶۰دقیقه	+۲۶/۸۱	+۱۲/۷۸	+۹/۴۴	+۵۲/۱۷	+۱۰۸/۵۷	+۱۸

علامت (+) بیانگر افزایش رشد و علامت (ـ) بیانگر کاهش رشد نسبت به گیاه شاهدمی‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: میانگین رشد کالوسها در غلظتهای مختلف PEG (۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) و تحت تابش UV-C زمانهای مختلف (۰، ۱۵، ۳۰و ۶۰ دقیقه) ۱۸ روز پس از کشت حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ($P<0.05$) می باشد.

اثرUV -C بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز

نتایج حاصل از این آزمایش ها در شکل ۲ ارائه شده است .

همانطور که در این شکل نشان داده شده، در کالوسهای اشعه ندیده با افزایش غلظت PEG(تا غلظت ۲۰٪) ودر نتیجه افزایش تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش یافته واختلاف معنی داری نسبت به غلظت صفر PEG نشان می دهد. فعالیت آنزیم در غلظت های ۲،۵،۱۰،۲۰ درصدPEG تفاوت معنی داری نشان نمی دهد. در غلظت ۳۰درصد PEGکمترین مقدار فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز مشاهده می‌شود.

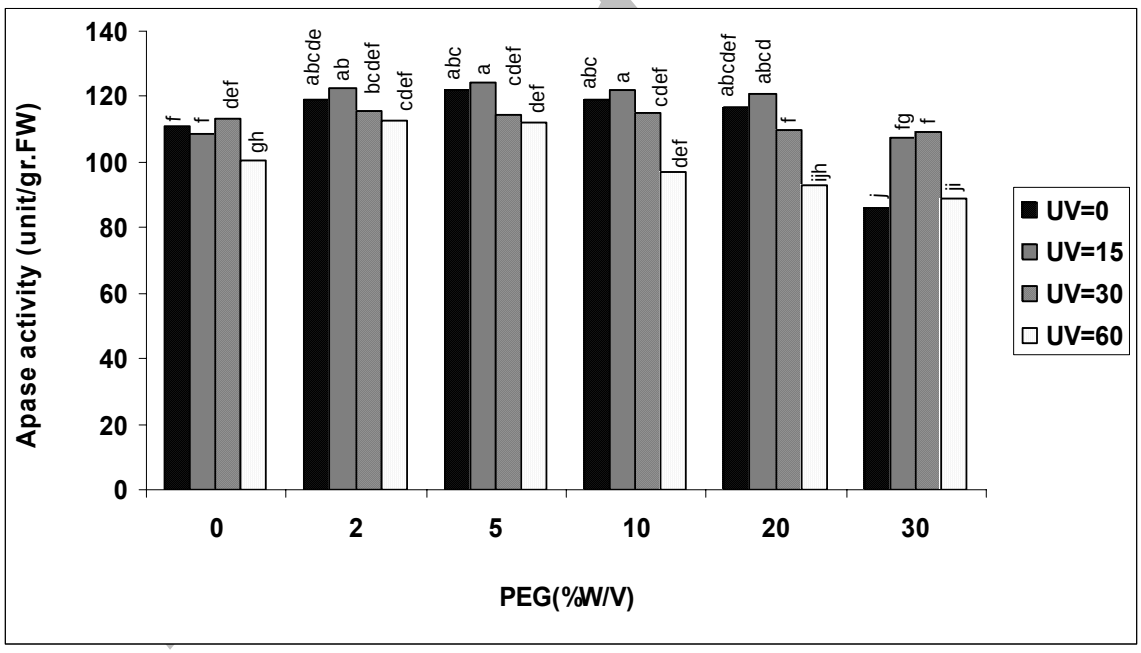
اندازه گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در کالوس هایی که تحت تابش UV-C به مدت ۱۵دقیقه قرار داشتند مشخص کرد که در این مرحله نیز با افزایش تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتازتا غلظت ۲۰ درصدPEG افزایش یافته واختلاف معنی داری نشان می دهد ولی غلظت ۳۰درصد PEG باشاهد تفاوت معنی داری نشان نداد. با تابشUV به مدت ۱۵ دقیقه ، در غلظت ۳۰ درصد PEG فعالیت آنزیم ۲۰/۲۹ در صد نسبت به کالوس های تابش ندیده افزایش یافته واختلاف معنی داری با آن نشان داد.

در کالوس هایی که تحت تابش UV-C به مدت ۳۰، دقیقه قرار گرفتند ، میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز با افزایش غلظت PEG ، افزایش چندانی پیدا نکرده و اختلاف معنی داری با شاهد نشان نداد. در غلظت های ۵،۲ ،۱۰و ۲۰درصدPEG، فعالیت آنزیم تحت تابش UV-C به مدت ۳۰دقیقه نسبت به زمان تابش ۱۵ دقیقه و بدون تابش کاهش یافت این تفاوت در غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد نسبت به نمونه های تحت تابش UV-C به مدت ۱۵ دقیقه معنی دار است، در حالیکه در مقایسه با نمونه های بدون تابش، کاهش معنی داری مشاهده نشد. فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در کالوسهای تیمار شده با ۳۰در صدPEG و

www.SID.ir

تابش UV-C به مدت ۳۰ دقیقه در مقایسه با شرایط بدون تابش در حدود ۲۲ درصد افزایش نشان داد.

فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در کالوسهای تحت تابش به مدت ٦٠دقیقه و غلظتهای ۲و٥درصد PEG درمقایسه با نمونه های بدون PEG ، افزایش یافته و تفاوت معنی داری را با آنها نشان داد. کالوس هایی که در۳۰ در صدPEG قرار داشتند از نظر فعالیت آنزیم تفاوت معنی داری نسبت به غلظت صفر PEG داشتند. در غلظتهای ۲و٥درصد PEG و تابش ۳۰و ٦٠دقیقه ای UV-C نسبت به یکدیگر تفاوت معنی داری از نظر فعالیت آنزیم دیده نشد، ولی نسبت به زمان تابش ۱٥ دقیقه و همچنین مرحله بدون تابش UV-C، فعالیت آنزیم در این غلظت ها کاهش یافت. در غلظتهای ۲۰و۳۰ درصد PEG، در کالوس هایی که به مدت ٦٠ دقیقه تحت تیمارUV-C بودند ، نسبت به زمان های دیگرتابش UV-C، کاهش فعالیت آنزیم با اختلاف آشکاری مشاهده شد، که نسبت به نمونه های بدون تابش در غلظت ۳۰ درصد، کاهش معنی دار نبود. بطور کلی می توان بیان کرد که با افزایش مدت زمان تابشUV-C، فعالیت آنزیم اسید فسفاتازدر غلظتهای مختلف PEG کاهش نشان می دهد اما فعالیت آنزیم درتیمار ٦٠دقیقه تابشUV-C کمتر از زمانهای دیگر تابش یعنی ۱٥و ۳۰ دقیقه می باشد واختلاف معنی داری با آنها نشان می دهد.



شکل ۲: فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در غلظتهای مختلف PEG (۰، ۳۰، ۲، ۱۰، ٥، ۲ و۰ درصد) و تحت تابش زمان های مختلف UV-C (۰، ۱٥، ۳۰و ٦٠ دقیقه). ۱۸روز پس ازکشت. حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار($P<0.05$) بر اساس آزمون دانکن می باشد.

www.SID.ir

بحث

همان طور که در شکل ۱مشخص است، تابش UV-C به مدت ۶۰ دقیقه موجب افزایش میزان مقاومت کالوس ها نسبت به تنش خشکی تا ۲۰ درصد PEG گردیده است. این امر نشان دهنده این است که کالوسها تا حدود زیادی خشکی را تحمل نموده اند و UV-C توانسته است از شدت اثرات منفی تنش خشکی بکاهد.

همانگونه که دیگر محققین نیز به آن اشاره نموده اند گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی پیچیده ای هستند که آنها را نسبت به عوامل نامساعد در محیط اطراف سازگار می‌کند و گیاه را قادر می‌سازد تا با قرار گرفتن در معرض یک تنش، تحمل به یک یا چند تنش دیگر را بدست آورد. این مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان با حضور پیام های تنش فعال می‌شوند و پرتوUV نیز یک عامل تنش زا در محیط زندگی گیاه است که احتمالا چنین نقشی ایفا میکند . گیاهان با دریافت پرتوUV بیان ژنهای مربوط به آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنولیک را تحریک و القاء می‌کنند(۳و۵). ترکیبات فنولی و مشتقات آنها سبب یکسری واکنش‌های دفاعی در گیاه از قبیل حفاظت در برابر پرتو UV ، مقاومت در برابر آنتی‌اکسیدانها، مقاومت به بیماری و سایر تنش‌ها می‌شوند(۵و۱۸). پرتو UV سنتز پلی آمین‌ها و پروتئین‌های شوک حرارتی(Heat Shock) را که قسمتی از سیستم های دفاعی طبیعی در گیاه هستندرا نیز فعال می‌کنند. این ترکیبات سبب می‌شوند که گیاهان در مقابل تنش‌های بعدی محافظت شوند(۱۲و۱۸). بهرحال در تحقیق حاضر ممکن است تابشUV-C علاوه بر تغییر مقاومت سلولهای کالوس در برابر خشکی، سلولها را در مقابل سایر تنش ها از جمله شوری و یا سرما مقاومتر ساخته باشد که بدین منظور نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

پرتو UV و خشکی در گیاهان دارای اثرات متقابل می باشند که در برخی موارد مورد مطالعه قرار گرفته است. اثر اشعه UV و خشکی در گیاه نخود بررسی شده و مشخص شده که اشعه UV باعث کاهش هدایت روزنه‌ای می شود، همچنین از توسعه سلول‌های اپیدرمی برگها جلوگیری می‌کند(۱۵). یک اندرکنش بینUV و تیمار خشکی وجود دارد. اشعه UV شدت تنش خشکی را کاهش داده و به تأخیر می‌اندازد و این کار را از طریق کاهش میزان از دست دادن آب گیاهان، هدایت روزنه‌ای و سطح برگ انجام می‌دهد(۳و۱۵). همچنین مشخص شده‌که زی توده (بیوماس) گیاهانی که اشعه را قبل از اینکه تحت تنش خشکی قرار گیرند دریافت نموده اند نسبت به گیاهانی که مستقیماً تحت تنش قرار داشته اند کاهش کمتری نشان می دهد چون UV سطح برگ و هدایت روزنه‌ای را کاهش می‌دهد(۱۵).

تنش‌های کم آبی تجمع ترکیبات جذب کننده UV را تحریک می‌کندکه احتمالاً باعث حفاظت در مقابل UV می شود. بعنوان مثال تنش خشکی غلظت فلاوونوئیدها را افزایش می دهد و یک اثر هم افزایی با UV اعمال می‌کند. بنابراین ارتباط داخلی بین تنش خشکی و پرتوUV در پاسخ‌های گیاهی وجود دارد (۱۹). در مطالعات انجام شده در تحقیق اخیر نیز پس از تابش UV-C بعضی از کالوسها بنفش رنگ شده که حاکی از تجمع آنتوسیانین در سلولها می‌باشد.

تابش نسبت به تنش خشکی UV سبب تغییرات غشایی بیشتری می‌شود که این نتایج با پراکسیداسیون لیپید و همچنین با تراوش و نفوذ اسمولیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته است(۱۵). در گیاه نخود و گندم پرولین تحت تیمار خشکی افزایش می‌یابد و ممکن است یک فاکتور القاء شده در اثر

Archive of SID

www.SID.ir

خشکی باشد که نقش حفاظتی در پاسخ به UV دارد (۳). بنابراین دو تنش محیطی بطور هم افزایی (synergism) عمل کرده تا مکانیسم‌های حفاظتی و دفاعی را القاء کنند، بطوریکه بکارگیری زودتر یک تنش، آسیب های وارد شده توسط تنش بعدی را روی گیاه کاهش می‌دهد(۳). تنش های محیطی معمولاً وقتی در گیاهان اعمال می شوند منجر به افزایش موقتی و زود گذر در کلسیم آزاد سیتوپلاسمی می‌شود. این پیام های کلسیم سلولی (Ca^{2+}) در نهایت منجر به افزایش پاسخ های ژنی در گونه‌های گیاهی نسبت به تنش‌ها می‌شود که این ژن ها پروتئین هایی را رمز می‌کنند که وظیفه حفاظتی را بعهده دارند.جنبش و مقدار بزرگی پیام Ca^{2+} ، در بین محرک‌های مختلف متفاوت است. مشخص شده که افزایش کلسیم القاء شده در اثر تنش می تواند بوسیله تماس های قبلی با تنش‌های اسموتیک و یا اکسیداتیو، بطور قابل توجهی تغییر کند(۲۲). یافته‌ها نشان می‌دهدکه ترکیب متفاوت تنش‌های محیطی می تواند پیام‌های جدیدی را تولید کند و پیشنهاد می‌شود که تغییر پاسخ کلسیم در اثر تنش‌هایی که در گذشته با آنها مواجه بوده است ممکن است سبب سازگاری به تنش‌های محیطی بعدی گردد(۲۲).

بنابراین نتایج بدست آمده در این بخش درمورد مقاومت کالوسها به خشکی در اثر تابش UV می‌تواند به دلیل یکی از عواملی باشد که در قسمتهای قبلی ذکر شد. به عبارت دیگر پرتو UV توانسته تنش خشکی را کاهش داده و مکانیسم های دفاعی را فعال کند این یافته ها می تواند به دلیل خاصیت جهش زایی UV باشد که همراه با اثرات فیزیولوژیکی کشت بافت، سبب افزایش تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول ها شده وسبب بیان ژن های خاص در مسیرهای دفاعی سلول شده باشد. این مجموعه عوامل میتواند در افزایش رشد نقش داشته باشد ولی بهر حال اظهار نظر علمی دقیق در این خصوص نیار به بررسی های بیشتری دارد(۲۰).

علیرغم کاهش رشد کالوسها در غلظتهای بالای PEG (۲۰ و ۳۰ درصد) در زمان های طولانی تر تابش UV (۳۰و ۶۰ دقیقه) کالوس‌ها از نظر ظاهری زنده بوده و مقاومت در آنهاافزایش یافته است زیرا می‌توانند در مقابل خشک شدن مقاومت کنند و میزان نکروزه شدن آنها نیزکاهش یافته است.

همانطور که قبلاًنیز اشاره شدیکی از آنزیم هایی که در اثر تنش خشکی بیان آن افزایش می یابد، آنزیم اسید فسفاتاز است که عوامل محیطی متعدد دیگری نیزمی توانند سبب افزایش فعالیت درون سلولی و برون سلولی این آنزیم شود. اهمیت این آنزیم در تولید و انتقال فسفر می باشد(۱۱)آنزیم اسید فسفاتاز در شرایط تنش شوری و کمبود آب وظیفه حفظ سطح Pi را بعهده دارد و اینکار با تبدیل فسفر استری شده به Pi صورت می‌گیرد و Pi مجدداً توسط سلول‌های کالوس جذب می‌شود. تنش شوری و خشکی موجب افزایش فعالیت اسید فسفاتاز می‌شودکه این افزایش فعالیت، همراه با کاهش میزان فسفر خارج و یا داخل سلولی می‌باشد(٤).در تحقیق اخیر نیز همانطوری که در شکل ۲ مشاهده شد درکالوس هایی که تحت تابشUV-Cنبودند، با افزایش شدت تنش خشکی تا غلظت PEG۲۰٪، میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش یافت که حداکثر فعالیت آن درPEG ٥٪ بود. فعالیت آنزیم در غلظت ۳۰٪ درصد PEG در کالوس های بدون تابش به میزان زیادی کاهش یافت. این امر به احتمال زیاد به دلیل نکروزه شدن و از بین رفتن بخشی ازسلول ها در این غلظت می‌باشد درنتیجه تعداد سلول‌های زنده حاوی آنزیم، کم بوده و بالطبع فعالیت کمتری را نیز نشان می دهند. با افزایش مدت زمان تابشUV-C فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در غلظت‌های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

PEG کاهش نشان می‌دهد بطوری که فعالیت آنزیم در ۶۰ دقیقه ، کمتر از زمان‌های دیگر تابش UV-C یعنی ۱۵ دقیقه و ۳۰ دقیقه می‌باشد، واختلاف معنی‌داری با این تیمارهای UV و همچنین مرحله بدون تابش UVنشان می‌دهد. در تابشUV به مدت ۶۰ دقیقه و در ۱۰ درصد PEG که افزایش رشد صورت گرفت، فعالیت آنزیم کاهش یافته (حدود ۳/۵ درصد) و نشان می دهدکه افزایش مدت زمان تابش UV-C برروی کالوس‌ها موجب افزایش مقاومت به خشکی شده و شدت تنش خشکی را کاهش داده و بالطبع فعالیت اسید فسفاتاز نیز کاهش یافته است. در ۳۰ درصد PEG در همین تیمارUV-C ، با وجود زنده بودن سلول‌ها فعالیت آنزیم کم شده که این پدیده یا به دلیل کاهش استرس خشکی بوده(یعنی سلول‌ها با وجود زنده بودن محتوای آنزیمی کمی داشتند) و یا ممکن است زمانهای بالای تابش UV-C به همراه تنش شدید خشکی بر بیان ژن های سنتزکننده اسید فسفاتاز تاثیر گذاشته ومانع سنتز آنزیم گردیده اند.

آنزیم اسید فسفاتاز سبب تبدیل شکل آلی فسفر (Po) به شکل معدنی(Pi) شده و آماده جذب توسط ریشه‌ها می‌کند. برخی گزارشات حاکی از کاهش میزان جذب فسفات در شرایط تنش شوری در کالوس برخی از رقم های گندم می باشد(۹). و از آنجایی که یکی از بهترین ماده معدنی در دسترس برای رشد گیاهان فسفر است و نقش اساسی و حیاتی در تنظیم انرژی و تنظیم متابولیسم بعهده دارد و در ساختمان بسیاری از مولکول های زیستی بکار می‌رود، درنتیجه جذب و ذخیره و متابولیسم فسفر معدنی (Pi) اهمیت اساسی در رشد و نمو گیاه دارد. جذب و کاربرد مؤثر فسفر به آنزیم اسید فسفاتاز نیاز دارد. در مطالعات قبلی بیان شده است که که کمبود فسفر در کالوس های نخود می‌تواند بعنوان یک نشانه برای القاء اسید فسفاتاز عمل کند. علاوه براین افزایش در میزان اسید فسفاتاز در کالوس های سازش یافته *Pissum sativum* مشاهده شده است(۱۶). بهرحال اینکه آیا ارتباطی بین افزایش فعالیت اسید فسفاتاز و تغییر میزان فسفر محیط کشت وجود دارد؟ موضوع جالبی است که می‌تواند در آینده مورد بررسی دقیقتری قرار گیرد.

فهرست منابع

۱. احسانپور، الف. و امینی، ف. ۱۳۸۰. انتخاب کالوس مقاوم نسبت به شوری در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) رقم رهنانی. مجله زیست شناسی ایران. جلد۱۱ ،۶۰-۴۹.

۲. کریمی، ه. ۱۳۶۹. یونجه، مرکز نشر دانشگاهی تهران.

3. Alexiera, V., Sergier, I., Mapelli, S. and Karanove, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress marker in pea and wheat. Plant Cell and Environ. **24**:1337-1345

4. Barret-Lennard, E. G., Robson, A. D. and Greenway, H. 1982. Effect of phosphorous deficiency and water defiction phosphatase activities from wheat leaves. J. Exp. Bot. **33**: 682-695.

5. Daig, A., Yann, O., Huang, S., Lin, X., Pengs, S., Miranda, M. L., Chavez, A. G., Vergara, S. S. and Olszyc, D. M. 1997. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. Physiol. Plan. **101**:701-308

Archive of SID

www.SID.ir

6. Danon, A. and Gallois, P. 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. FEBs. Lett. **437**: 131-136.

7. Ehsanpour, A.A. and Amini, F. 2003. Effect of salt and drought stress on acid phsphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under *in vitro* culture. African Journal Of Biotechnology. **2**: 133-135.

8. Friedberg, E. C. 1984. DNA repair. First edition. Freeman.Publisher. 38-60.

9. Ghiung Yunch, S. and Ching-Hvel, K. 1998. Induction of acid phosphatas in detached rice leaves under stress conditions. Sot. Bull. Head. Sin. **39**: 29-32.

10. Julie, E. H., Richardson, A. E. and Simpson, R. J. 1999. Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. Aus. Plant.Physiol. **26**: 801-809

11. Julie, E. H., Simpson, R. J. and Richardson, A. E. 2000. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose-1-phosphate or inorganic phosphate. Plant and Soil. **220**: 165-174.

12. Kolb, C. A., Kaser, M. A., Kopecky, J., Zota, G., Riederer, M. and Pfundel, E. E. 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidremal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. Plant Physoil. **127**: 863-875.

13. Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation a novel source variability from cell culture for plant improvement. App. Genet. **60**: 197-214.

14. Murashige, I. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiol. **92**: 21-30.

15. Nogues, S., Allen, D. J., Merison, J. I. L. and Baker, N. R. 1998. Ultraviolet-B radiation effects on water relations, Leaf development, and photosynthesis in drought pea plants. Plant Physiol. **117**: 175-181

16. Olmos, E. and Hillen, E. 1991. Cytochemical localization of APase plasma membrane and acid phosphatase by cerium based method in a salt-adapted cell line of *pisum sativum*. J. Exp. Bot. **48**: 1529-1535.

17. Randali, D. D. and Tollert, N.E. 1971. 3-phosphoglycerate phosphatase in plants. Isolation and characterization from sugercane leaves. J. Biol. Chem. **246**: 5510-5517.

18. Rao, M. V., Paligath, G. and Ormad, D. P. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabiopsis thaliana*. Plant Physiol.**110**:125-136.

19. Stephanou, M. and Manetus, Y. 1997. The effects of seasons, exposure, enhanced UV-B radiation, and water stress on leaf epicuticular and internal UV-B absorbing capacity of *Cistus creticas*. A mediterranean field study. **48**: 1977-1985.

20. Taji, A., Kumar, P. and Lakshmanan, P. 2002. *In vitro* plant breeding. Food products. New York. P 167.

21. Vander weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E. and Baskin, T. I. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedling under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. J. Exp. Bot. **51**:1555-1562.

22. Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Ann. Rev. Plant Biol. **53**: 247-273.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of drought tolerance of alfalfa plant (Medicago sativa L.) callus under UV-C radiation

Razavizadeh, R. & Ehsanpour, A.A.
Biology, Dept.,science faculty, Esfahan university, Esfahan,Iran.

Abstract

In this study , in vitro grown calluses of M. sativa were exposed to UV-C for 0,15, 30, and 60 min, and then, were transferred to MS medium containing 0, 2, 5, 10, 20, 30% PEG, and all explants were kept in the dark in the culture room. The tolerant calluses to osmotic stress were selected according to the fresh weight. Results showed that radiation of UV-C for 60 minute increased the osmotic tolerance and decreased the effect of drought stress in medium containing 10 and 20% PEG. APase activity was decreased under UV-C radiation while the activity of this enzyme was increased in unradiated calluses up to 20% concentration of PEG in the medium. However, it seems that UV-C radiation has activated endogenous plant defense system and may induced the expression of certain genes along the pathway of phenolic derivatives synthesis.

Key words: Medicago sativa, drought stress, poly ethylene glycol(PEG), UV-C radiation, acid phosphatase

Archive of SID

www.SID.ir