

کاربرد پلی‌پلوئیدی در به‌نژادی گیاهان زینتی

جعفرخانی کرمانی مریم^{*}، عمادپور معصومه^۲

۱. بخش کشت بافت و سلول پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی.

صندوق پستی: ۳۱۵۳۵۱۸۹۷ البرز. ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۳۳۶-۱۴۱۱۵، تهران، ایران



m.j.kermani@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۵، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

گونه‌های گیاهی با بیش از دو سری کروموزوم را پلی‌پلوئید یا چندگان می‌نامند که معمولاً با نوعی جهش در طول دوره تکامل گیاهان به‌طور خودبخودی در طبیعت ایجاد می‌شوند و به علت افزایش تنوع ژنتیکی در سلسله گیاهان، در سازگار ساختن آن‌ها در محیط‌های جدید و تکامل طبیعی و به‌نژادی گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. هدف از این مطالعه، بررسی برخی جنبه‌های القا چندگانی و تأثیر آن بر به‌نژادی گیاهان زینتی است. مقاله حاضر ضمن اشاره به مزایا و معایب چندگانی و معرفی مواد افزاینده سطح پلوئیدی، به کاربرد روش افزایش سطح پلوئیدی در به‌نژادی گیاهان زینتی با ذکر مثال‌هایی از القا چندگانی در گیاهان زینتی اشاره کرده است. نتایج این بررسی نشان داد که اگر چه در برخی گیاهان، چندگانی با معایبی همراه است اما در کل این گیاهان دارای مزایای عمده‌ای نسبت به گیاهان دیگر هستند. همچنین به دلیل پیچیدگی عملکرد مواد افزاینده سطح پلوئیدی و نیز پاسخ گیاهان مختلف به این مواد، نوع و غلظت مواد القاء کننده چندگانی، زمان تیمار و نوع ریزنمونه برای هر گیاه باید مستقلاً بهینه شود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که القا چندگانی عموماً با تغییراتی از جمله تغییر در قدرت رشد گیاه، اندازه میوه و گل، اندازه برگ و ضخامت برگ، میزان باروی و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی همراه است و می‌توان از آن به عنوان یک روش مدرن برای به‌نژادی گیاهان زینتی استفاده نمود.

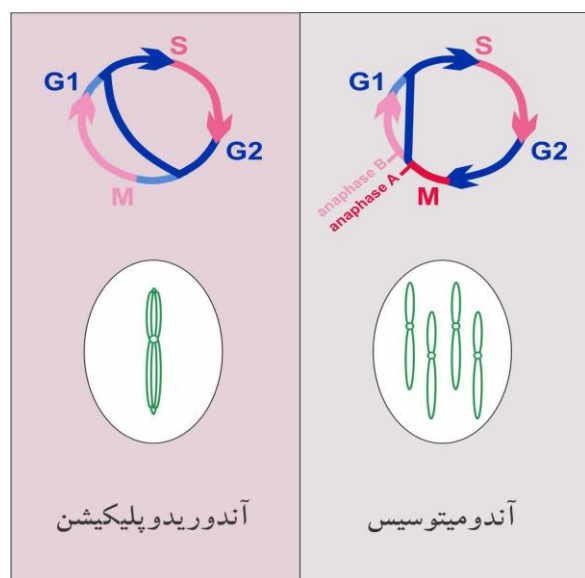
کلمات کلیدی: پلی‌پلوئیدی، تغییرات مورفولوژیکی، دسته‌های کروموزومی، گیاهان زینتی

مقدمه

شده است (Gallardo et al. 2006). در گیاهان چندگانی نسبت به جانوران رایج‌تر است و گونه‌های زیادی از گیاهان معمولاً پلی‌پلوئید هستند. اگر آن‌ها دارای سه، چهار، پنج، شش و ... دسته کروموزوم باشند به ترتیب تریپلوئید (۳x)،

سطح پلوئیدی اشاره به تعداد دسته‌های کروموزومی دارد و با علامت "x" نمایش داده می‌شود. اکثر جانوران دارای دو دسته کروموزوم بوده و دیپلوئید (۲x) می‌باشند البته موارد نادر مانند موش صحرایی تتراپلوئید در آرژانتین گزارش

با این تفاوت که دوک‌های کروموزومی ایجاد نشده و در نتیجه کروماتیدهای خواهری به دو سوی سلول کشیده نشده و سلول چندگان ایجاد می‌شود. شایان ذکر است که فرآیند اندومیتوز بیشتر در سلول‌های جانوری اتفاق می‌افتد و به‌ندرت در گیاهان گل‌دهنده (angiosperms) و (Joubes & Chevalier 2000). در فرآیند اندوردوپلیکشن که معمولاً در سلول‌های گیاهی اتفاق می‌افتد، DNA هسته سلولی تکثیر می‌یابد اما انقباض کروماتیدها صورت نمی‌گیرد و در نتیجه بدون این‌که تعداد کروموزوم‌های سلول تغییر کند، کروماتیدهای $2n$ ایجاد می‌شوند. هسته اندوردوپلیکیت شده قابلیت این را دارد که دوباره DNA را تکثیر نماید بدون این‌که وارد فرآیند میتوز شود و سلول‌های $4n$ ، $8n$ ، $16n$ و غیره را ایجاد نماید (شکل ۱).



شکل ۱- تفاوت فرآیند اندومیتوسیز و اندوردوپلیکشن (برگرفته از سایت:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Endoreduplication>

با توجه به نقش چندگانی در تکامل گیاهان و با کشف بازدارنده‌های میتوزی در دهه ۱۹۳۰، بسیاری از به‌نژادگران برای ایجاد ارقام جدید گیاهی از این مواد در به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی استفاده کردند. با افزایش سطح

تتراپلوئید ($4x$) پنتاپلوئید ($5x$)، هگزاپلوئید ($6x$) و غیره نامیده می‌شوند. به‌عنوان مثال یک گل رز دیپلوئید به‌صورت $2n = 4x = 28$ و رز تتراپلوئید به‌صورت $2n = 4x = 28$ مشخص می‌شود. در طول دوره تکامل گیاهان، چندگانی در انعطاف‌پذیری و سازگار ساختن آنها در محیط‌های جدید نقش بسیار مهمی داشته است. اما تحقیقات نشان داده‌اند که برخی چندگان‌ها پایدار نیستند (Comai et al. 2000; Mayer & Aguilera 1990) دیپلوئید خود یا به سوی دیپلوئید شدن (diploidization) می‌روند یعنی دسته‌های کروموزومی اضافه را از دست می‌دهند و یا به سوی "ساب‌فانکشن" (subfunctionalization) و "نئوفانکشن" (neofunctionalization) تغییر می‌نمایند. آنچه که مهم است در "ساب‌فانکشن" ژن‌های دو برابر شده، کدکننده فعالیت‌های موجود در گیاه می‌شوند در حالی‌که در "نئوفانکشن" ژن‌های دو برابر شده فعالیت‌های جدیدی را در گیاه کد می‌نمایند که باعث ایجاد تغییر در صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه می‌شوند. چندگانی سلولی هم در گیاهان و هم در جانوران با دو فرآیند اندومیتوز (endomitosis) و اندوردوپلیکشن (endoreduplication) پدید می‌آید (D'Amito 1964; Brodsky & Uryvaeva 1977). فرآیندهای دیگر همانند میتوز بی‌ثمر (abortive mitosis)، همجوشی هسته‌ها (nuclear fusion) و یا ظهور سلول‌های چند هسته‌ای (multinuclear cells) نیز سلول‌های چندگان را ایجاد می‌کنند اما محدود به بافت‌های اپیدرمی هستند (Joubes & Chevalier 2000). فرآیند اندومیتوز برخلاف میتوز نرمال در حالی رخ می‌دهد که غشاء سلولی از بین نرفته و میتوز درون غشاء هسته سلولی صورت می‌گیرد، تعداد کروموزوم‌ها دو برابر شده و منقبض می‌شوند و احتمال دارد که کروماتیدهای خواهر جدا شوند و به وضعیت اینترفاز باز گردند درست همانطور که در چرخه میتوزی اتفاق می‌افتد،

پلوئیدی تعداد کپی‌های کروموزوم‌های موجود افزایش می‌یابد در نتیجه در گیاهان با سطوح پلوئیدی بسیار بالا مانند اکتاپلوئیدها، اندازه بزرگ تر سلول‌ها و یا هسته‌های بزرگتر، تعادل سلولی گیاه را مختل و در نتیجه آناتومی آنها را نامتعارف می‌سازد. علیرغم ایراد ذکر شده، چندانگانی در به‌نژادی بسیاری از گیاهان نقش مهمی داشته است مخصوصا پلی پلوئیدی در آلپلوئیدها که دارای دسته‌های کروموزومی از دو والد جداگانه هستند در افزایش قدرت هتروزیگوسی بسیار ارزشمند بوده است.

مزایای چندانگانی

در مجموع ۴ مزیت اصلی برای ایجاد چندانگان‌ها وجود دارد:

(۱) **هتروزیس:** هتروزیس باعث می‌شود که بنیه چندانگان‌ها از والدین دیپلوئیدشان بیشتر باشد. چندانگان‌ها در مقایسه با والدین دیپلوئیدشان از سطح هتروزیگوسی بیشتری برخوردار هستند، زیرا به‌طور طبیعی در هر تقسیم میوزی در نتاج F1 گیاهان دیپلوئید، نیمی از مکان‌های ژنی هتروزیگوس از بین می‌روند. در حالی که جفت شدن کروموزوم‌های همولوگ در آلپلوئیدها از نوترکیبی ژن‌ها جلوگیری نموده و هتروزیگوسی را در نسل‌های بعدی حفظ می‌نماید (Comai 2005). به طور کلی هیبریدهای آتوپلی‌پلوئید، از توان هتروزیس بیشتری نسبت به هیبریدهای دیپلوئید برخوردارند در حالی که نتاج حاصل از خودگشتی آتوپلی پلوئیدها قدرت رشدی کمتری نسبت به نتاج حاصل از دیپلوئیدهای خودگشتن دارند (Comai 2005).

(۲) **افزایش کپی ژن:** افزایش کپی ژن نوعی محافظ در برابر جهش‌های تخریبی است زیرا عموماً در گامت‌های هاپلوئید حاصل از گیاهان دیپلوئید امکان ایجاد جهش وجود دارد در حالی که در گامت‌های دیپلوئید گیاهان تتراپلوئید، آلل‌های

مغلوب توسط آلل‌های غالب محافظت می‌شوند و کمتر در معرض جهش‌های خودبخودی قرار می‌گیرند. طبق قوانین مندل در یک گیاه دیپلوئید هتروزیگوت (Aa) ۱/۴ (۰/۲۵ درصد) نتاج هموزیگوت (aa) هستند در حالی که در یک گیاه آتوپلی‌پلوئید (AAaa) بین ۱/۲۲ (۰/۰۴ درصد) تا ۱/۳۶ (۰/۰۳ درصد) از نتاج هموزیگوت (aaaa) بوده و در یک گیاه آلپلی‌پلوئید (AaAa) فقط ۱/۱۶ (۰/۰۶ درصد) نتاج (aaaa) هموزیگوس می‌باشند. این نقش محافظتی پلی‌پلوئیدها در گیاهانی که به طور خودگشتن تولید می‌نمایند و یا در مناطقی قرار دادند که فقط امکان تلاقی‌های درون جمعیتی دارند، بسیار ارزشمند است (Comai 2005).

(۳) **تسهیل خودباروری:** در گیاهان چندانگان با از بین رفتن سیستم‌های خودناسازگاری و یا افزایش تولید مثل غیر جنسی، تولید مثل در آن‌ها نسبت به والدین دیپلوئیدشان آسان‌تر می‌شود. چندانگانی با از بین بردن سیستم‌های خودناسازگاری باعث افزایش میزان خودباروری در گیاهان می‌شود (Comai 2005). این مکانیسم هنوز به‌طور کامل شناخته شده نیست اما به‌عنوان مثال در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) با تعامل بین ژنوم والدین و در گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) تعامل بین آلل‌ها در دانه‌های گرده دیپلوئید حاصل از گیاه تتراپلوئید کاهش میزان خودناسازگاری و افزایش میزان خودباروری مشاهده شده است (Nasrallah et al. 2000; Entani et al. 1999). افزایش میزان تولید مثل غیر جنسی در گیاهان چندانگان ارتباط نزدیکی با افزایش میزان آپومیکسی در این گیاهان دارد. آپومیکسی در زمانی که امکان تولید مثل جنسی وجود ندارد بقای موجودات را تضمین می‌نماید (Comai 2005).

(۴) **افزایش اندازه چندانگان‌ها:** معمولاً با افزایش سطح پلوئیدی اندازه سلول‌ها و بافت‌های گیاهان چندانگان افزایش



می‌یابد. ساده‌ترین فرضیه برای افزایش اندازه گیاهان چندگان این است که با افزایش تعداد کپی ژن، تولید پروتئین افزایش می‌یابد و در نتیجه حجم سلول بزرگتر می‌شود. اما تحقیقات اولیه نشان داده است که با القاء چندگانی تعداد کلروپلاست‌ها و در نتیجه میزان فتوسنتز در سلول افزایش می‌یابد (Warner & Edwards 1993) که منجر به افزایش اندازه سلول‌ها می‌شود. البته مکانیسم‌های تنظیم کننده اندازه سلول و یا تقسیم و تکثیر سلول‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و تحقیقات در این زمینه در دست انجام است.

معایب چندگانی

در مورد معایب چندگانی سه اشکال اصلی گزارش شده است:

۱) تغییر در ساختار سلولی و سیستم‌های کنترل کننده: با افزایش سطح پلوئیدی حجم ژنوم هسته‌ای دو برابر می‌شود اما پوشش هسته‌ای فقط $1/6$ ($0/06$) برابر افزایش می‌یابد اگرچه این تفاوت زیاد نیست اما تعادل سلول و در نتیجه برخی از فرایندهای کنترل کننده را تحت تاثیر قرار خواهد داد. البته در برخی از گزارشات ذکر شده است که افزایش مقدار DNA و در نتیجه افزایش اندازه سلول برای سلول‌هایی که متابولیسم آن‌ها بالا است یک مزیت محسوب می‌شود (Comai 2005) زیرا در این سلول‌ها متابولیسم بالا نیازمند افزایش اندازه سلول‌ها، بخش‌های داخل سلولی و بیان پروتئین‌های مربوط به فعالیت‌های سلول است و به همین دلیل است که دو برابر شدن طبیعی سلول‌ها در برخی از گیاهان به صورت خودبخودی اتفاق می‌افتد.

۲) مشکلات مربوط به تقسیم‌های میتوزی و میوزی: گزارشات زیادی در مورد مشکلات تقسیمات میتوزی در جانوران و قارچ‌های پلی‌پلوئید وجود دارد اما در مورد ناپایداری میتوزی گیاهان پلی‌پلوئید این گزارشات دارای

تناقض هستند. تئوری‌ها و نظریه‌های متعددی بیان شده که در تقسیم میوزی، آتو تتراپلوئیدها به‌جای تشکیل بای والنت‌ها (bivalents) مجموعه‌های مولتی والنت (multivalents) را تشکیل می‌دهند که منجر به تفکیک‌های ۳:۱ و ۲:۱ کروموزوم‌ها بجای تفکیک ۲:۲ می‌شود و در نتیجه آنیوپلوئیدها (aneuploids) ایجاد می‌شوند (Warner & Edwards 1993). در مطالعات کروموزوم‌های در حال تقسیم میتوزی در گیاه علفی کانگو (*Brachiaria ruziziensis*) مشاهده شد که تعداد بیشتری از دوک‌های کروموزومی در گیاه آتوتتراپلوئید در مقایسه با گیاه دیپلوئید تشکیل می‌شود (Risso-Pascotto et al. 2005) بنابراین تقسیم میتوزی کمتر دچار اشکال می‌گردد. همچنین اگر سلول‌های آنیوپلوئید از گیاهان پلی‌پلوئید تشکیل شوند به دلیل این‌که سرعت رشد آن‌ها از سلول‌های یوپلوئید (euploid) اطرافشان کمتر است در طول زمان حذف می‌شوند. مطالعات Mastenbroek و همکاران در سال ۱۹۸۲ نشان داد که در گیاه ذرت آتوتتراپلوئید برای تفکیک ۲:۲ ایجاد بای والنت‌ها ضروری نمی‌باشد اما در آلپلی‌پلوئیدها تشکیل بای والنت‌ها یک امر ضروری است زیرا در این موجودات کروموزوم‌های هر دو والد باید به نتاج انتقال یابند. البته موجودات آلپلی‌پلوئید برای حل این مشکل راهکارهایی را بکار گرفته‌اند (Mastenbroek et al. 1982). به‌عنوان مثال در گندم هگزاپلوئید یک ژن به‌نام *pairing homeologous 1* از جفت شدن کروموزوم‌های همولوگ در تقسیم میوز ممانعت می‌نماید (Preito et al. 2004). چنین سیستمی در گونه‌های آتوتتراپلوئید در خانواده کلمیان هم مشاهده شده است (Jenczewski et al. 2003).

۳) ناپایداری اپی‌ژنتیکی: در خصوص ناپایداری اپی‌ژنتیکی آتوپلی‌پلوئیدها مستندات کمی موجود است اما در خصوص ناپایداری اپی‌ژنتیکی آلپلی‌پلوئیدها مطالعات زیادی انجام گرفته است. برخی از این مطالعات گزارش نموده‌اند که این

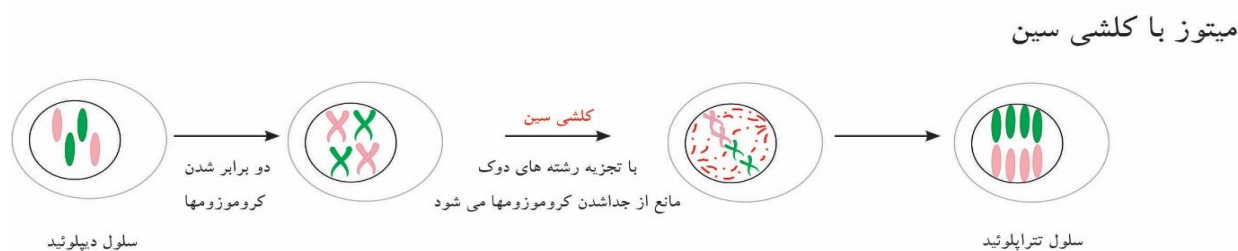
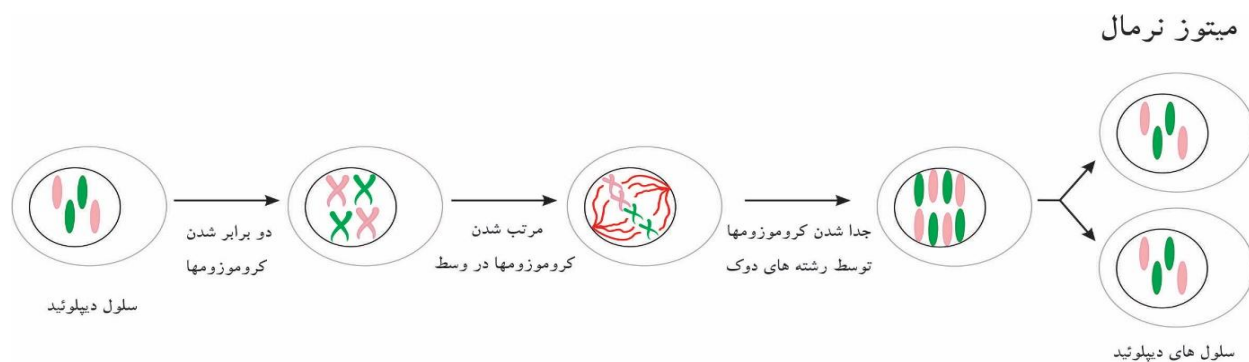


سلولی در گیاهان شامل مراحل G1 (مرحله بعد از فاز میتوز)، S (مرحله ساخت DNA)، G2 (مرحله قبل از فاز میتوز) و M (میتوز) می باشد و سلول از مرحله S تا انتهای مرحله M دارای دسته های کروموزومی دوبرابر شده است بنابراین ایجاد اختلال در چرخه تقسیم سلولی از انتهای مرحله S تا انتهای مرحله M با استفاده از مواد بازدارنده میتوزی منجر به افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان می شود (شکل ۲).

تغییرات اپی ژنتیکی بدلیل ایجاد آنیوپلوئیدها و در نتیجه عدم بیان ژن های کنترل کننده فعالیت های گیاه پلی پلوئید می باشد (Comai 2005). آنچه مسلم است همه تغییرات اپی ژنتیکی، مخرب نیستند زیرا این تغییرات منجر به ایجاد تنوع در گیاه شده که در فرآیند گزینش پلی پلوئیدهای سازگار با محیط نقش موثر ایفا می نمایند.

مواد افزایش دهنده سطح پلوئیدی

افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان با دخالت در چرخه تقسیم سلولی امکان پذیر است. با توجه به این که چرخه تقسیم



شکل ۲- القا چندگانگی با استفاده از مواد بازدارنده میتوزی. این مواد از تشکیل دوک های کروموزومی در مرحله متافاز تقسیم سلولی جلوگیری می نماید، در نتیجه کروموزوم هایی که تکثیر شده اند به دو سمت سلول کشیده نشده و سلول چندگان حاصل می شود.

در اواخر دهه ۱۹۳۰ ترکیب کلشی سین (Cholchicine) که یک متابولیت ثانویه استخراج شده از گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) است، کشف شد. این ماده از تشکیل دوک‌های کروموزومی در مرحله متافاز تقسیم سلولی جلوگیری می‌نماید در نتیجه کروموزوم‌هایی که تکثیر شده‌اند به دو سمت سلول کشیده نشده و سلول‌های پلی‌پلوئید حاصل می‌شوند. در سال‌های بعد Darlington & La Cour (۱۹۷۶) گزارش کردند که تنش‌های فیزیکی از جمله اعمال تنش سرمایی در دمای صفر درجه سانتیگراد در گیاه و یا دمای ۵- درجه سانتیگراد در لاله واژگون (*Fritillaria meleagris*) از تشکیل دوک‌های کروموزومی جلوگیری می‌نمایند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که تنش گرمایی مانند دماهای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ساعت، تقسیم میوز و میتوز را در دو گیاه تریلیوم و لاله واژگون متوقف کرد (Darlington et al. 1976). Zhou و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تنش‌های دمایی به طور معنی داری باعث ایجاد گامت‌های کاهش نیافته می‌شوند. شایان ذکر است که یک عامل افزایشنده سطح پلوئیدی مناسب علاوه بر این که باید دارای قابلیت کاربرد سریع، موثر و قابل اطمینان برای طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی باشد، نباید باعث ایجاد مشکلات فیزیولوژیکی و تغییرات ژنتیکی به غیر از افزایش سطح پلوئیدی در گیاه شود. تقریباً یک چهارم تمام علفکش‌هایی که به بازار عرضه شده است به‌عنوان مکانیسم اولیه عمل خود، میتوز را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این علفکش‌ها مستقیماً و یا به‌طور غیر مستقیم با میکروتوبول‌ها (*microtubule*) واکنش نشان داده و ترکیب علفکش و توبولین (*tubulin*) را ایجاد نموده و افزایش طول میکروتوبول‌ها را متوقف می‌سازند. به این صورت که میکروتوبول‌ها از یک سو باز شده و بطور پیش روندهای کوتاه‌تر شده تا در نهایت ناپدید گردند (Vaughn & Lehen 1991). مطالعات ایمنی زیست شیمیایی در گونه

های مختلف گیاهی نشان داده‌است که علفکش اورایزالین (*oryzalin*) (۴-دی پروپیلامینو-۳ و ۵-دی نیتروبنزین-سولفورامید)، توبولین‌های گیاهی را محصور می‌کند و باعث فعالیت بالای واسرشته شدن میکروتوبول‌ها می‌شود (Morejohn et al. 1987). اورایزالین نسبت به کلشی سین در دو برابر کردن کروموزوم‌ها موثرتر است و پاسخ گیاهان به غلظت‌های میکرومولار این علفکش مشابه پاسخ گیاهان به غلظت‌های میلی‌مولار کلشی سین می‌باشد (Morejohn et al. 1987). علفکش پرونامید (*pronamide*) (۳ و ۵-دی کلرو (۱-N و ۱-دی متیل ۲-۱ پروپینیل) بنزینامید) به علفکش‌های آمیدی تعلق دارد و عنصر فعال علفکش‌های KERB می‌باشد (Vaughn & Vaughn 1987). این علفکش هم مشابه اورایزالین در غلظت‌های کم باعث افزایش سطح پلوئیدی می‌شود. Dhoogh و همکاران (۲۰۱۱) مواد افزایشنده سطح پلوئیدی را به دو گروه تقسیم کردند. گروه اول که شامل مواد شیمیایی کلشی‌سین، کلسمید، وینبلاستین، آسفاتین، اورایزالین، تیرفلورالین، بنفلورالین، اتافلورالین، پن‌دی‌متالین، بوترالین، دی‌نیترامین، امی‌پروفسوموتیل، کلرتال‌دی‌متیل، دی‌نیترامین، دی‌تیوپیر، تیاژوپیر و پرونامید هستند از پلیمراز شدن میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌نمایند و گروه دوم که شامل کلروپروفام، پروفام و کاربتامید هستند با مختل و قطعه قطعه کردن مرکز سازماندهی میکروتوبول‌ها (*microtubule organizing center*) چرخه سلولی را متوقف می‌سازند. از آنجا که مکانیسم اثر مواد افزایشنده سطح پلوئیدی به‌طور کامل شناخته نشده است بنابراین ارائه یک دستورالعمل بهینه برای افزایش سطح پلوئیدی امکان پذیر نیست زیرا در گیاهان مختلف، نوع و غلظت بهینه مواد افزایشنده سطح پلوئیدی، مدت زمان بهینه تیمار و نوع ریزنمونه استفاده شده بسته به نوع گیاه متفاوت است. عموماً با افزایش غلظت مواد افزایشنده سطح پلوئیدی و یا مدت زمان تیمار با این مواد رشد و زنده ماندن ریزنمونه‌های تحت تیمار کاهش می‌یابد. گزارشات متعددی



موفقیت آمیز و در رزهای تتراپلوئید همراه با عدم موفقیت بود. از سوی دیگر سطوح پلوئیدی نتاج حاصله نیز متأثر از سطوح پلوئیدی والدین است. Abdolmohammadi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که در تلاقی بین گونه‌ای رزهای تتراپلوئید، نتاج تتراپلوئید حاصل شد در حالی که در تلاقی بین گونه‌های رز تتراپلوئید به‌عنوان والد مادری با رزهای پنتاپلوئید و هگزاپلوئید، نتاج تریپلوئید یا تتراپلوئید حاصل شدند. در مطالعه مذکور، جنین پلی‌پلوئید حاصل از تمامی تلاقی‌های بین گونه‌ای در محیط آزمایشگاه از بذر گیاه مادری جدا شده و در محیط کشت بافت حاوی ترکیب بهینه از بنزیل آمین و جیبرلیک اسید نجات داده شدند. اخیراً در گزارش Eeckhaut و همکاران ۲۰۱۸ جدولی شامل تحقیقات اخیر در زمینه القا چندگانی با مواد افزاینده سطح پلوئیدی در گیاهان زینتی مختلف منتشر شده است.

در بسیاری از تحقیقات درصد القا چندگانی کم (کمتر از ۲۰٪) گزارش شده است بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه مکانیسم اثر مواد افزاینده سطح پلوئیدی از جمله چگونگی نفوذ آنها در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی لازم است تا بتوان چندگانی را با درصد موفقیت بیشتر القا نمود. البته از آنجا که القا چندگانی معمولاً در شرایط درون شیشه صورت می‌گیرد حتی در مواردی که درصد القاء چندگانی کم است می‌توان گیاهان چندگان حاصله را در شرایط درون شیشه در سطح انبوه تکثیر نمود.

افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان زینتی

بین ۵۰ تا ۸۰ درصد گیاهان گل‌دهنده (Angiosperms) از جمله بسیاری از گیاهان باغی چندگان هستند (Sun et al. 2015) و چندگانی در آنها باعث شده تا گونه‌های مختلف این گیاهان بتوانند در شرایط مختلف آب و هوایی سازگار شوند. Jowkar و همکاران (۲۰۰۹) پس از مطالعه سیتوژنتیکی بر روی ۱۰ گونه از رزهای وحشی ایران، نشان دادند که سطح پلوئیدی در این رزها از دیپلوئیدی تا

در این زمینه وجود دارد به عنوان مثال مطالعه Ghayoor Karimiani و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار اورایزالین، رشد درون شیشه‌ای گیاهچه‌های ژبراً کاهش یافت. همچنین Talebi و همکاران (2017) گزارش کردند که در ریزنمونه‌های تیمار شده گل مغربی (*Agastache foeniculum* L) با افزایش غلظت مواد القاکننده پلی‌پلوئیدی از جمله اورایزالین، تریفلورالین و کلشی سین، زنده‌مانی و شاخص‌های رشد کاهش یافت. با افزایش غلظت مواد القاکننده پلی‌پلوئیدی از جمله اورایزالین، تریفلورالین و کلشی سین، زنده‌مانی و شاخص‌های رشد کاهش یافت (Talebi et al. 2017). Keshavarz Alizadeh و همکاران (۲۰۱۶) اثرات غلظت و زمان‌های مختلف تیمار با مواد کلشی‌سین، اورایزالین و تری‌فلورالین را در دوبرابر کردن کروموزوم‌ها در بافت‌های سوماتیکی گیاه عتاب (*Ziziphus jujuba* Mill) بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که با افزایش غلظت و یا مدت زمان تیمار با هر یک از مواد افزاینده سطح پلوئیدی درصد زنده‌مانی کاهش یافت اما بیشترین درصد افزایش سطح پلوئیدی با افزایش غلظت مواد ضد میتوزی و مدت زمان تیمار حاصل نشد (Keshavarz- Alizadeh et al. 2016). بنابراین تعیین غلظت و مدت زمان تیمار با مواد افزاینده سطح پلوئیدی، در یک برنامه القاء پلی‌پلوئیدی موفق ضروری است اما متأسفانه در بسیاری از موارد، پروتکل ارائه شده برای یک ژنوتیپ برای ژنوتیپ‌های دیگر از همان گونه گیاهی نیز موفقیت آمیز نیست و در بسیاری از موارد برای هر ژنوتیپ به‌طور جداگانه باید بهینه شود. نکته حائز اهمیت دیگر در یک برنامه ریزی به‌نژادی با روش القاء پلی‌پلوئیدی، سطوح پلوئیدی والدین است. Jafarkhani Kermani و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که سطح پلوئیدی والدین در میزان دوبرابر شدن کروموزوم‌های نتاج حاصله نقش اساسی دارد، به‌طوری‌که در رزهای مورد بررسی توسط آنها، القاء چندگانی در گیاهان دیپلوئید بسیار

هگزاپلوئیدی متغیر بود. چندانگانها معمولا خصوصیات فنوتیپی جدیدی را نشان می‌دهند که در والدین دیپلوئیدشان وجود ندارد و در مواردی حتی در گونه‌های مشابه هم این خصوصیات مشاهده نشده است. برخی از این صفات شامل رشد متراکم، مقاومت به خشکی، مقاومت به تنش‌ها، آپومیکسی، مقاومت به آفات، تغییر در زمان گل‌دهی، تغییر در اندازه و تغییر در حجم توده‌های زیستی است که آن‌ها را برای گزینش در برنامه‌های به‌نژادی مناسب می‌سازد (Lu et al. 2006; Pieres et al. 2004; Ranney 2006; Viehmannova et al. 2012). مطالعه Talebi و همکاران (2016) در گل مغربی نشان داد که در گیاهان تتراپلوئید حاصل از دو برابر کردن کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید، میزان ژنوم هسته ای بیش از دو برابر گیاهان دیپلوئید بود. علاوه بر این، محتوای روغن‌های ضروری در گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید به ترتیب ۲/۷۸ و ۱/۳۲ درصد بود که حاکی از افزایش قابل ملاحظه‌ای در گیاه تتراپلوئید است.

القا چندانگانی در گیاهان زینتی با هدف ایجاد ارقام تجاری جدید و متفاوت از والدین، از دیرباز مورد توجه به‌نژادگران بوده است. القاء چندانگانی در گل سیکلامن (*Cyclamen*) توسط Takamura & Miyajima (1996) با استفاده از کلشیسین انجام شد. آنها گزارش کردند که گیاهان تتراپلوئید نسبت به والدین دیپلوئیدشان گلبرگ‌های با اندازه بزرگتر و میزان chalcone بیشتر و در نتیجه گل‌های با رنگ زرد پررنگ‌تری داشتند. در پلارگونوم ($\times Pelargonium hortorum$) نیز چندانگانی با استفاده از کلشیسین القاء شد که همراه با تغییر در رنگ برگ و فرم گل بود (Jadrna et al. 2010). با القاء تتراپلوئیدی در ژربرا (*Gerbera jamesonii*) افزایش ضخامت برگها، افزایش اندازه گل، افزایش طول دمگل و افزایش ماندگاری پس از برداشت گل‌ها مشاهده شد که بازارپسندی آنها را افزایش داد (Gantait et al. 2011). القاء چندانگانی در ۴ رقم دیپلوئید و ۲ رقم تتراپلوئید گل رز تجاری (*Rosa hybrida*) توسط

Kermani و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از اورایزالین انجام شد. آن‌ها گزارش کردند که ضخامت برگ‌ها در گیاهان تتراپلوئید و هگزاپلوئید بیشتر از والدین دیپلوئید و تتراپلوئیدشان بود. همچنین برگ‌های نتوپلی‌پلوئیدها رنگ سبز پر رنگ‌تر، نسبت عرض به طول برگ بیشتر و دانه‌های گرده با زنده ماننی بیشتری نسبت به والدین خود داشتند. در این تحقیق گزارش شد که فاصله میان‌گره‌ها در گیاهان تتراپلوئید بلندتر از دیپلوئیدها بود اما فاصله میان‌گره‌ها در هگزاپلوئیدها، کوتاه‌تر از تتراپلوئیدها بود و تعداد گلبرگ‌ها در یکی از رزهای تتراپلوئید دو برابر والد دیپلوئیدش بود. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که میتوان از روش افزایش سطح پلوئیدی به‌عنوان یک راهکار به‌نژادی در انتقال ژن‌های افزایش مقاومت به تنش‌ها از گونه‌های وحشی رز به ارقام تجاری استفاده کرد. زیرا بسیاری از گونه‌های رز دیپلوئید هستند در حالی‌که ارقام تجاری تتراپلوئید می‌باشند و در برنامه‌های به‌نژادی بین این دو، معمولا نتاج تتراپلوئید عقیم و یا با باروری کم ایجاد می‌شوند که با افزایش سطح پلوئیدی گونه‌های وحشی دیپلوئید به تتراپلوئید و یا افزایش سطح پلوئیدی نتاج تتراپلوئید به هگزاپلوئید این ایراد رفع می‌شود. در تحقیقات بعدی توسط Khosravi و همکاران (۲۰۰۸) رزهای تتراپلوئید از گونه‌های رز دیپلوئید (*Rosa persica*) و رزهای هگزاپلوئید از رز تجاری تتراپلوئید آیس برگ (*Rosa hybrida* cv Iceberg) ایجاد شدند. Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) صفات مورفولوژیکی رزهای آیس برگ را با هگزاپلوئیدهای حاصل از افزایش سطح پلوئیدی مقایسه کرده و گزارش نمودند ضمن این که خصوصیات فنوتیپی این دو بسیار متفاوت بود (شکل ۳)، زنده‌ماننی دانه‌های گرده و جوانه زنی گرده‌ها در گیاهان هگزاپلوئید تقریبا ۳ برابر والدین تتراپلوئیدشان بود. همچنین میزان تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هگزاپلوئید با میزان تولید آن‌ها در گیاهان تتراپلوئید متفاوت بود. این

تفاوت را می‌توان به تفاوت در بیان ژن‌های کد کننده ترکیبات مورد مطالعه نسبت داد.



شکل ۳- تفاوت خصوصیات فنوتیپی گل رز آیس برگ ترپلوئید در سمت راست (کرم رنگ) و گیاه هگزاپلوئید حاصل از القاء چندگانی (صورتی رنگ) در سمت چپ (تحقیقات انجام شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی).

افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه که با تولید عطر و رایحه گل ارتباط دارند در به‌نژادی گیاهان زینتی از اهمیت ویژه برخوردار است نتایج مطالعه‌ای که توسط Talebi و همکاران (2017) در گل مغربی انجام شد نشان داد که ضمن این که اندازه روزنه و تعداد کلروپلاست در گیاهان ترپلوئید بیشتر از والدین دیپلوئید آن‌ها بود، سایر خصوصیات مورفولوژیکی نظیر طول و عرض برگ، فاصله بین گره‌ها، سطح برگ، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک و طول خوشه گل در گیاه ترپلوئید حاصل افزایش یافته بود. شکل ۴ اندازه گیاه و خوشه گل در دو گیاه دیپلوئید و ترپلوئید حاصل از القاء چندگانی در گل مغربی را نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری سطح پلوئیدی

اندازه‌گیری سطح پلوئیدی به طور معمول به وسیله میکروسکوپ و با استفاده از روش شمارش کروموزوم سلول‌های بافت مریستمی (در اکثر گیاهان مریستم ریشه) صورت می‌گیرد. سلول‌های میتوزی در مرحله متافاز بوسیله ماده پیش تیمار متوقف شده، سپس رنگ آمیزی و آماده سازی لام انجام می‌شود که این کار دشوار و وقت گیر است.

البته تعیین سطح پلوئیدی با اندازه‌گیری دانه گرده و کلروپلاست در سلولهای محافظ اپیدرم نیز انجام پذیر است، اما این روش‌ها از دقت کافی برخوردار نیستند خصوصا در جایی که تفاوت سطح پلوئیدی بسیار کم باشد (به طور مثال مقایسه ترپلوئیدها و تتراپلوئیدها). از زمانی که روش‌های رنگ آمیزی فلوروسنس معرفی شد (De Laat et al. 1987)، روش فلوسیتومتری برای اندازه‌گیری مقدار DNA در بسیاری از گونه های گیاهی روش بسیار موفق بوده است. این روش اغلب بر روش‌های شمارش کروموزوم ترجیح داده می‌شود زیرا چند گیاه جداگانه را می‌توان در طی یک مرحله آماده سازی تهیه نمود، همچنین این روش از سرعت و دقت کافی برخوردار است (De Laat et al. 1987). روش فلوسیتومتری قادر است مقدار DNA را به سرعت از هر نوع بافت گیاهی در تعداد زیادی از گیاهان در مدت زمان کوتاه تشخیص دهد و از آنجا تایید سطح پلوئیدی پس از القاء چندگانی، که معمولا چندگان ها باید از بین تعداد زیادی از ریزنمونه‌های تیمار شده انتخاب شوند، روش مناسبی است.



شکل ۴- اندازه گیاه و اندازه خوشه گل در گل مغربی: (الف) گیاه دیپلوئید (سمت چپ) و گیاه ترپلوئید (سمت راست) (ب) خوشه گل در گیاه دیپلوئید (سمت چپ) و خوشه گل در گیاه ترپلوئید (سمت راست) (تحقیقات انجام شده توسط Talebi و همکاران در سال ۲۰۱۷).

منابع

- Abdolmohammadi, M., Jafarkhani Kermani, M., Zakizadeh, H., Hamidoghli, Y. (2014). *In vitro* embryo germination and interploidy hybridization of rose (*Rosa* sp.). *Euphytica*, 198, 255- 264.
- Ahmadi, T., Jafarkhani Kermani, M., Mashayekhi, K., Hasanloo, T., Shariatpanahi, M.E. (2014). Comparing plant morphology, fertility and secondary metabolites in *Rosa hybrida* cv Iceberg and its chromosome-doubled progenies. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4(11), 3840-3849.
- Brodsky, W.Y., Uryvaeva, I.V. (1977). Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *International Review of Cytology*, 50, 275-332.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6, 836-846.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., Byers, B. (2000) Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *The Plant Cell*, 12: 1551-1568.
- D'Amato, F. (1964). Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia*, 17, 41-52.
- Darlington, C.D., La Cour, L.F. (1976). *The Handling of Chromosomes*. 6th edition. George Allen and Unwin Ltd, London.
- Delaat, A.M.M., Gohde, W., Vogelzakg, M.J.D.C (1987). Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding*, 99(4), 303-307.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 359-373.
- Eeckhaut, T., Van der Veken, J., Dhooghe, E., Leus, L., Van Laere, K., Van Huylenbroeck, J. (2018). Ploidy breeding in ornamentals. In: *Ornamental Crops* (pp. 145-173). Springer, Cham.
- Entani, T., Takayama, S., Iwano, M., Shiba, H., Che, F.S., Isogai, A. (1999). Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 1882-1888.
- Gallardo, M.H., Gonzalez, C.A., Cebrián, I. (2006). Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae*. *Genomics*, 88, 214-221.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Kanti, P. (2011). Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106 (3), 485-493.
- Ghayoor Karimiani, Z., Bagheri, A., Jafarkhani Kermani, M., Davarynejad, G.H. (2008). Investigating the *in vitro* growth inhibition of oryzalin treated *Gerbera jamesonii*. IVCHB (Sixth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding), Brisbane, Australia.
- Jadrná, P., Plavcová, O., Kobza, F. (2010). Morphological changes in colchicine-treated *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey greenhouse plants. *Horticultural Science*, 37(1), 27-33.
- Jafarkhani Kermani, M., Abdolmohammadi, M., Hosseini, Z.S. (2016). Ploidy level of progenitors affects polyploidization and hybridized progenies in roses. 1st International and 2nd National Ornamental Plants Congress. Mashhad, Iran.
- Jenczewski, E., Eber, F., Grimaud, A., Huet, S., Lucas, M.O., Monod, H., Chevre, A.M. (2003). PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (*Brassica napus*) haploids. *Genetics*, 164(2), 645-653.
- Joubès, J., Chevalier, C. (2000). Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 43(5-6), 735-45.
- Jowkar, A., Kermani, M.J., Kafi, M., Mordi, M., Hoseini, Z.S., Koobaz, P. (2009). Cytogenetic and flow cytometry analysis of Iranian *Rosa* spp. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 3(1), 71-74.
- Kermani, M.J., Sarasan, V., Roberts, A.V., Yokoya, A., Wentworth, J., Sieber, V.K. (2003). Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effects on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1195-1200.
- Khosravi, P., Kermani, M.J., Nematzadeh, G.A., Bihamta, M.R., Yokoya, K. (2007). Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica*, 160, 267-275.
- Lu, B., Pan, X., Zhang, L., Huang, B., Sun, L., Li, B., Yi, B., Zheng, S., Yu, X., Ding, R., Chen, W. (2006). A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* affymetrix genechips. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 197-204.



- Mastenbroek, I., deWet, J.M., Lu, C.Y. (1982). Chromosome behavior in early and advanced generation of tetraploid maize. *Caryologia*, 35, 463-470.
- Mayer, V.W., Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 231, 177-186.
- Morejohn, L.C., Bureau, T.E., Mole-Bajer, J., Bajer, A., Fosker, D.E. (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, 172, 252-264.
- Nasrallah, M.E., Yogeewaran, K., Snyder, S., Nasrallah, J.B. (2000). Arabidopsis species hybrids in the study of species differences and evolution of amphiploidy in plants. *Journal of Plant Physiology*, 124, 1605-1614.
- Pires, J.C., Zhao, J., Schranz, M.E., Leon, E.J., Quijada, P.A., Lukens, L.N., Osborn, T.C. (2004). Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). *Biology Journal of Linnean Society*, 82, 675-688.
- Prieto, P., Shaw, P., Moore, G. (2004). Homologue recognition during meiosis is associated with a change in chromatin conformation. *Nature Cell Biology*, 6, 906-908.
- Ranney, T.G. (2006). Polyploidy: from evolution to new plant development. *Combined Proceedings of International Plant Propagators Society*, 56, 137-142.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M.S., do Valle, C.B. (2005). Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant Cell Reports*, 23, 522-527.
- Sun, Q., Sun, H., Bell, R., Li, L., Zhou, G., Xi, L., Wei, Z. (2015). Field performance of vegetative form traits of neopolyploids produced by *in vitro* colchicine treatment in *Pyrus communis*. *Scientia Horticulturae*, 193, 182-187.
- Takamura, T., Miyajima, I. (1996). Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae*, 65(4), 305-312.
- Talebi, S.F., Saharkhiz, M.J., Jafarkhani Kermani, M., Sharafi, Y., Raof-fard, F. (2017). Effect of different antimitotic agents on polyploidy induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia*, 70(2), 184-193.
- Talebi, S.F., Saharkhiz, M.J., Jafarkhani Kermani, M.J., Sharafi, Y., Raof-fard, F. (2016). Effect of ploidy level on the nuclear genome content and essential oil composition of Anise Hyssop (*Agastache foeniculum* [Pursh.] Kuntze). *Analytical Chemistry*, 6(5), 678-687.
- Vaughan, M.A., Vaughn, K.C. (1987). Pronamide disrupts mitosis in a unique manner. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28, 182-193.
- Vaughn, K.C., Lehen, L. (1991). Mitotic disrupter herbicides. *Weed Sciences*, 39, 450-457.
- Viehmanna, I., Travnickova, M., Spatenkova, E., Cerna, M., Travnicek, P. (2012). Induced polyploidization and its influence on yield, morphological, and qualitative characteristics of microtubers in *Ullucus tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 83-90.
- Warner, D.A., Edwards, G.E. (1993). Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 35, 135-147.
- Zhou, X., Mo, X., Gui, M., Wu, X., Jiang, Y., Ma, L., Shi, Z., Luo, Y., Tang, W. (2015). Cytological, molecular mechanisms and temperature stress regulating production of diploid male gametes in *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97, 255-263.





Application of polyploidization in breeding of ornamental plants

Maryam Jafarkhani Kermani^{*1}, Masoumeh Emadpour²

1. Department of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), P.O. Box 31535-1897, Karaj, Iran

2. Department of Agricultural Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

✉ m.j.kermani@abrii.ac.ir

Abstract

Plant species with more than two sets of chromosome are called polyploids, which are usually spontaneously created by a mutation during the evolution process. The increased genetic diversity in polyploid plants is considered to be an important strategy in adapting them to new environments which are revolutionizing with time. The changes that are usually associated with auto and allopolyploids include alteration of cell size and morphological or physiological modifications. The aim of this study was to review some aspects of polyploidization and its impact on breeding of ornamental plants. Furthermore, the advantages and disadvantages of the polyploid plants, chromosome doubling agents and application of polyploidization in ornamental plants are reviewed and polyploidization as a modern breeding method is discussed. This review suggested that although there are some disadvantages with polyploid plants, however, they have major advantages over non-polyploids. In using chromosome doubling agents, results indicated that due to complexity of the mode of action of these agents and response of different plants to them, type and concentration of polyploid inducing agents, exposure period and explant type are to be optimized. Moreover, the results suggested that polyploidization induce changes in plant's vigor, size of the fruits and flowers, size and thickness of the leaves, fertility and resistance to biotic and abiotic stresses and therefore it is considered as a modern breeding method for ornamental plants.

Keywords: Chromosome sets, Ornamental plants, Morphological changes, Polyploidy.