دستورزی کروموزومی گیاهان جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی: چشم‌اندازها و تکنیک‌های القا و گزینش گیاهان پلی‌پلوئید

الناز قطبی راوندی[1]، اسماعیل دهقان[2,3*]، علیرضا استاجی[4]، حسنعلی نقدی‌بادی[5]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد سلولی تکوینی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- مرکز تحقیقات شیمی رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، اصفهان، ایران

٤- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۵- دانشیار پژوهش، گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران

*آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات شیمی رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، انتهای خیابان پاسداران، شهرضا، صندوق‌پستی: ۳۱۱ – ۸٦۱٤۵، تلفن و نمابر: ۵۳۵۱۳۱۰۳ (۰۳۱)

پست الکترونیک: es.dehghanshahreza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۹/۱٦

چکیده

پلی‌پلوئیدی از فرآیندهای رایج در سلسله گیاهان بوده که نقش مهمی در تکامل و گونه‌زایی آنها دارد و معمولاً با تغییرات چشمگیری در ریخت‌شناسی، اندازه سلول‌ها و اندام‌ها، الگوی بیان ژن‌ها، میزان فتوسنتز و تنفس، قابلیت باززایی، باروری، بیوشیمی و متابولوم گیاهان همراه می‌باشد. از این رو در دهه‌های اخیر پلی‌پلوئیدی، بخصوص تتراپلوئیدی، به صورت گسترده‌ای در ایجاد تنوع و اصلاح صفات مختلف گیاهان به کار گرفته شده است. تنوع و گوناگونی صفات ایجاد شده در اثر القای پلی‌پلوئیدی، وابسته به گونه و ژنوتیپ متفاوت بوده و در برخی موارد نه تنها مفید نبوده، بلکه زیان‌آور می‌باشد. اگرچه تتراپلوئیدی با کاهش باروری و تولید بذر و در برخی موارد عقیمی همراه می‌باشد، ولی زمانی که افزایش زیست توده گیاهان و غلظت ترکیبات دارویی خاص آنها مد نظر است، القای آن می‌تواند مطلوب باشد. اتوپلی‌پلوئیدی و آلو پلی‌پلوئیدی به ترتیب با افزایش محتوای ژنی و تجمیع آلل‌های مفید یک مسیر بیوسنتزی متابولیت ثانویه در هیبرید به دست آمده و به عبارتی تکمیل ژنتیکی مسیر مربوطه و سایر صفات مهم می‌توانند بهبود تولید را به همراه داشته باشند. با توجه به اهمیت داروهای گیاهی و نیاز رو به افزایش برای متابولیت‌های دارویی – گیاهی در کشور، در مقاله حاضر به اثرات گسترده پلی‌پلوئیدی بر صفات مختلف و اهمیت آن در گیاهان دارویی، روش‌های کارای القا و گزینش مستقیم و غیرمستقیم گیاهان پلی‌پلوئید پرداخته شده است.

گل‌واژگان: اتوتتراپلوئیدی، درون شیشه، فلوسیتومتری، کلشی‌سین، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه

www.SID.ir

مقدمه

ارگانیسم‌هایی با بیش از دو سری کروموزومی را پلی‌پلوئید می‌گویند که از جدا شدن کروموزومی غیرمعمول در طول تقسیم سلولی حاصل می‌شوند. پلی‌پلوئیدی در حقیقت نوعی جهش است که باعث تغییر در تعداد کروموزم‌ها می‌شود و به علت افزایش تنوع ژنتیکی در سلسله گیاهان، در تکامل طبیعی و اصلاح نباتات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱]. با استفاده از پلی‌پلوئیدی می‌توان صفات یک گیاه را از طریق تغییر دسته‌های کروموزمی و به دنبال آن تعداد ژن‌های یک سلول تغییر داد که پیامد این کار متفاوت بوده و ممکن است مطلوب یا نامطلوب باشد [۲]. پلی‌پلوئیدی در بیش از ۸۰ درصد گیاهان دیده شده و توجیه‌کننده‌ی ۲ تا ٤ درصد حوادث گونه‌زایی در گیاهان گل‌دار می‌باشد [۳].

غلات اهلی شده‌ای همچون گندم دوروم، پنبه، تنباکو و سیب‌زمینی پلی‌پلوئید هستند. گل‌های زینتی مانند گل داوودی، بنفشه‌ی فرنگی و زنبق نیز پلی‌پلوئید می‌باشند. پلی‌پلوئیدی در جانوران نسبت به گیاهان بسیار نادر است [٤]. وجود کروموزوم‌های جنسی در جانوران با کمیاب بودن پلی‌پلوئیدی در بین آنها مرتبط می‌باشد. وجود چندین سری از کروموزوم‌های جنسی در جانوران ممکن است در نهایت منجر به اختلالات کشنده‌ی هورمونی و نمو جنسی در آنها شود [۵].

پلی‌پلوئیدی را می‌توان با توجه به منشاء آن به دو دسته اتوپلی‌پلوئیدی یا آلوپلی‌پلوئیدی طبقه‌بندی کرد [٦] که در ذیل تشریح شده است.

اتوپلی‌پلوئیدی

به طور معمول زمانی که کروموزوم‌ها مضاعف شده اما به دلیلی جدا نشوند اتوپلی‌پلوئیدها به وجود می‌آیند. وقتی که دوک‌ها تخریب شوند، سلول به درستی قادر به تقسیم نبوده و بنابراین عدد کروموزومی سلول‌های به دست آمده و محتوای ژنی آنها دو برابر می‌شود، در حالی که ماده‌ی ژنتیکی پایه آنها تغییر نیافته است. عدم جداشدگی کروموزومی ممکن است به طور طبیعی به علت مضاعف شدگی تصادفی ژنوم دیپلوئید (۲X) به ژنوم تتراپلوئید (٤X) اتفاق افتد و یا می‌تواند توسط فاکتورهای محیطی، مواد شیمیایی و تکنیک‌های آزمایشگاهی القا شود [۸، ۷]. اتوپلی‌پلوئیدی به طور طبیعی در بسیاری از جنس‌های گیاهی اتفاق می‌افتد، اما به منظور توسعه‌ی صفات مطلوب، می‌تواند به صورت مصنوعی انجام شود. البته محدودیت‌هایی در زمینه‌ی تولید گیاهان اتوتتراپلوئید وجود دارد، برای مثال بزرگ‌تر شدن پیکره‌ی گیاه در اثر تتراپلوئیدی ممکن است به گونه و ژنوتیپ بستگی داشته باشد. در بعضی موارد برگشت سطح پلوئیدی به حالت پایه اولیه نیز مشاهده شده است، بنابراین می‌توان گفت که هر گیاهی به سطح پلوئیدی خاصی تحمل نشان می‌دهد [۳].

آلوپلی‌پلوئیدی

آلوپلی‌پلوئیدها دارای دو یا تعداد بیشتری سری متفاوت کروموزومی هستند که از پلی‌پلوئید شدن هیبریدهای دارای سری‌های کروموزومی مخلوط به وجود آمده‌اند. ترکیب پلی‌پلوئیدی با هیبریداسیون به عنوان نیروی پیش‌برنده‌ی غالب و طبیعی در تکامل گیاهان جهت استقرار جمعیت‌هایی با قدرت سازش بیشتر و پتانسیل رشدی بالاتر به خدمت گرفته شده است [۱]. آلوپلی‌پلوئیدها، می‌توانند زیست‌پذیری جنسی را در یک هیبرید عقیم احیا کنند. هیبریدها دارای یک سری کروموزومی از هر والد هستند، ولی از آنجاکه این کروموزوم‌ها همولوگ نبوده و قادر به سیناپس نیستند، عقیم می‌باشند. اگر این کروموزوم‌ها در ابتدا مضاعف شوند (به صورت مصنوعی) به طوری که سلول‌های سوماتیک دارای دو سری کروموزوم از هر والد شوند، میوز به طور طبیعی رخ خواهد داد و هیبرید نسل اول زایا خواهد بود. پلی‌پلوئیدی، همولوگی کروموزومی و باروری را احیا می‌سازد، در نتیجه آلوپلی‌پلوئید حاصل شده قادر به تولید مثل با والدین نخواهد بود و تبدیل به گونه‌ی جدیدی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

دستورزی ژنتیکی گیاهان دارویی از طریق پلی‌پلوئیدی

به علت استفاده درصد قابل توجهی از جمعیت جهان از گیاهان برای درمان بیماری‌ها و نیازهای اولیه درمانی خود، کشت گیاهان دارویی و اصلاح واریته‌های مهم و ارزشمند دارویی در سرلوحه برنامه‌های کشاورزی و صنعتی جوامع قرار دارد. کشت و کار گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می‌گردد اما تاکنون در مورد اصلاح آنها پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است. در حال حاضر تعداد ارقام به دست آمده از طریق اصلاح گیاهان دارویی بسیار کم و ناچیز است [۹]. بهره‌برداری از توانمندی ژنتیکی گیاهان دارویی هنوز در مراحل اولیه خود قرار دارد. امروزه القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا، به عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی به منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. در گیاهان پلی‌پلوئید اغلب اندازه گل‌ها، برگ‌ها، میوه و بذر افزایش می‌یابد [۱۱]. در مواردی که اندام‌های رویشی گیاه منبع مواد مؤثره هستند، مانند برخی گیاهان دارویی، افزایش سطح کروموزومی می‌تواند به عنوان روشی ارزشمند و سریع جهت افزایش تولید ترکیبات دارویی، مورد توجه قرار گیرد [۱]. گیاهان پلی‌پلوئید ممکن است نسبت به اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر افزایش مقاومت به خشکی و آفات، آپومیکسی، افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیب‌های فعال گیاهی برتری یافته و در نتیجه این عمل، شانس انتخاب آنها در کشاورزی افزایش می‌یابد. به عبارتی دستورزی سطح کروموزومی با ایجاد تنوعات گسترده در سطوح متفاوت ژنتیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و غیره صفات جدیدی را ایجاد نموده بنابراین تنوع گسترده‌تری برای اصلاح‌کنندگان فراهم آورده که کار گزینش و اصلاح گیاهان دارویی را تسهیل می‌نماید.

اثرات القای پلی‌پلوئیدی بر ویژگی‌های گیاهی

پلی‌پلوئیدی معمولاً بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی (ضخامت، اندازه و شکل اندام‌های رویشی و زایشی گیاه)، میکروسکوپی (اندازه و تراکم روزنه و سلول‌های نگهبان روزنه، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه)، فیزیولوژیکی (زمان و طول مدت گل‌دهی، باروری گیاه، ویژگی‌های دانه و قدرت باروری دانه‌های گرده، فتوسنتز، مقاومت در برابر تنش‌ها و غیره) و فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه نیز مؤثر بوده که به طور خلاصه در این مقاله مرور خواهد شد.

اثر پلی‌پلوئیدی بر کیفیت و کمیت مواد مؤثره

پلی‌پلوئیدی به عنوان روشی برای افزایش پتانسیل تولید و یا بهبود کیفی الگوی متابولیت‌های ثانویه مورد توجه قرار گرفته است. شواهد به دست آمده از آنالیزهای بیوشیمیایی بسیاری از آلوپلی‌پلوئیدها، نشان می‌دهد که چنین پلی‌پلوئیدهایی نسبت به والدین خود تنوع آنزیمی بیشتری نشان داده و همچنین از لحاظ ترکیبات فنولی غنی‌تر هستند. [۱]]. از آنجاکه اتوپلی‌پلوئیدی در نتیجه‌ی مضاعف شدگی مستقیم ژنومی ایجاد می‌شود، مواد ژنتیکی پایه ثابت باقی مانده و محتوای ژنی دو یا چند برابر می‌شود. به دنبال این افزایش در محتوای ژنی، ممکن است فعالیت ژن‌های ضعیف یک مسیر افزایش یابد، از این رو افزایش تولید متابولیت‌ها در اتوپلی‌پلوئیدها انتظار می‌رود [۳]. القای پلی‌پلوئیدی با اثرگذاری بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه، مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های اولیه و ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یک مدل رایج جهت توضیح این تغییرات، کاهش نسبت غشای هسته به مقدار کروماتین می‌باشد. این کاهش سطح منجر به افزایش تماس ماده‌ی کروماتینی با غشای هسته‌ای می‌شود و در نتیجه افزایش فعالیت ژنی به ازای هر سلول را به دنبال دارد [۱۲]. حجم و سطح سلولی سلول‌های تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید به ترتیب ۲ و ۱/۵ برابر می‌باشد، بنابراین در حالتی که تولیدات سلول به فعالیت متابولیکی سطح سلول مرتبط باشد، یک مزیت محسوب می‌شود [۱]. همچنین گزارش شده است که افزایش سطح پلوئیدی با تغییر و آرایش مجدد ژن‌ها همراه است. تغییر بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه ممکن است محدودیت موجود در بیان یک ژن کلیدی مسیر را تغییر دهد یا اینکه به روشن یا خاموش شدن ژن خاصی در مسیر انجامد که به افزایش تولید ترکیب یا ترکیبات خاص و همچنین تغییر الگوی تولید منتهی شود. مطالعات انجام شده مؤید این امر در

Archive of SID
www.SID.ir

تعدادی از گیاهان دارویی از جمله آرتمیزیا می‌باشد [۱۳]. تغییرات در پروفیل متابولیتی در اتوپلی‌پلوئیدها را می‌توان به خاطر بر هم خوردن مکانیسم‌های متابولیک تنظیم کننده بیوسنتز ترکیبات منفرد توجیه نمود. از دست رفتن ترکیبات دیپلوئید در اتوتتراپلوئیدها را می‌توان به خاطر سرکوبی ژن‌های ساختاری موجود و به دست آوردن ترکیبات جدید در اتوتتراپلوئیدها را به واسطه فعال شدن مجدد ژن‌های ساختاری که قبلاً در دیپلوئیدها خاموش بوده‌اند، تفسیر نمود [۱٤].

دو برابر شدن کروموزومی ممکن است شیمی ثانویه گیاه را به شیوه‌ای کیفی نیز تغییر دهد [۱]. در تحقیقی که اخیراً توسط مؤلفین به منظور افزایش سطح پلوئیدی در گیاه دارویی ارزشمند نوروزک (*Salvia leriifolia*) انجام پذیرفت نتایج جالبی دیده شد. در مجموع ۱۵ ترکیب در اسانس نمونه‌های دیپلوئید و ۲۲ ترکیب در اسانس نمونه‌های تتراپلوئید نوروزک شناسایی شد که میزان اکثر این ترکیبات به صورت معنی‌داری تحت تأثیر سطح پلوئیدی قرار گرفت. میانگین میزان برخی از ترکیبات با افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافت. همچنین تعدادی از ترکیبات جدید در نمونه‌های تتراپلوئید تولید شده بودند، در حالی‌که نمونه‌های دیپلوئید به طور کلی فاقد این ترکیبات بودند. از طرفی افزایش سطح پلوئیدی سبب شد که میزان برخی دیگر از ترکیبات اسانس به طور معنی‌داری کاهش یابد [۱۵]. همچنین تحقیقات دهقان و همکاران [۱٦] نشان داد که گیاهان پایدار اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری (*Hyoscyamus muticus*) ایجاد شده در نسل پنجم پس از القا تتراپلوئیدی قادر به تولید ۲۰۰ درصد اسکوپولامین بیشتر نسبت به نمونه‌های دیپلوئید می‌باشند.

همان طور که در جدول شماره ۱ دیده می‌شود، اتوپلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی از جمله *Atropa*، *Camellia*، *Hyoscyamus* و *Solanum* افزایش شدید متابولیت‌های ثانویه به ازای واحد وزن خشک را سبب شده، در حالی که در گونه‌هایی مانند *Datura* و *Mentha*، کاهش تولید این ترکیبات مشاهده شده است [۱]. گیاه کاسنی از گیاهان دارویی ارزشمند با کاربرد گسترده در طب می‌باشد. اخیراً مولفین مشاهده نمودند که گیاهان اتوتتراپلوئید کاسنی فنول تام بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند، ضمن اینکه قابلیت تولید ۱۰ برابری کلروژنیک اسید آنها تأیید شد [۱۷]. میزان اسانس در گیاهان اتوتتراپلوئید گونه‌ای از نعناع (*Mentha arvensis* L.)، به میزان ۳۰ درصد [۱۸] و در گیاه زیره (*Carum carvi* L.)، به میزان ۳۵ تا ۸۵ درصد [۱۹] نسبت به گیاهان دیپلوئید شاهد افزایش نشان داده است.

جدول شماره ۱- تأثیر تغییر سطح پلوئیدی بر تولید تعدادی از متابولیت‌های ثانویه

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر میزان متابولیت‌های ثانویه	سطح پلوئیدی	گونه گیاهی
افزایش ۳۸ درصد آرتمیزینین در خود گیاه و افزایش ٦۰۰ درصد در ریشه‌های موئین	٤X	*Artemisia annua*
افزایش ۱/۵ برابر آرتمیزینین در گیاهان تتراپلوئید	٤X	
افزایش ٦۸ درصد در آلکالوئیدهای تروپانی	٤X	*Atropa belladonna*
افزایش غلظت پلی‌فنل‌ها، کاتکین‌ها، اکستراکتین‌ها و کافئین در برگ	٤X	*Camelia sinensis*
بیش از ۸۰ درصد افزایش فعالیت شبه ماریجوانا	٤X	*Cannabis sativa*
کاهش محتوی آجامالیسین ریشه و افزایش کاتارنتن، ویندولین و وینکریستین، اما کاهش در وینبلاستین	٤X	*Catharanthus roseus*
افزایش غلظت فلاونوئید آپیژنین	٤X	*Chamomila recutita*
افزایش ۱۰۰ درصد کوینین	٤X	*Cincona succirubra*
کاهش کافئین	٤X	*Coffea Arabica*

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول شماره ۱-

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر میزان متابولیت‌های ثانویه	سطح پلوئیدی	گونه گیاهی
افزایش غلظت کل آلکالوئیدها	٤X	*Coffea canephora*
کاهش هیوسین و آتروپین	١X	*Datura innoxia*
افزایش٨٦ درصد تروپان آلکالوئیدها	٤X	
افزایش تروپان آلکالوئیدها در گیاه و ریشه‌های موئین و افزایش نسبت هیوسین به هیوسیامین در برگ و ریشه	٤X	*Datura stramoinium*
افزایش ١٠٠ درصد الکالوئیدها	٤X	*Datura tubula*
غلظت کمتر یا به همان اندازه گلیکوزید	٤X	*Digitalis purpurea*
غلظت کمتر یا به همان اندازه گلیکوزید اما محتوی لاناتوزیدهای A و B بیشتر	٤X	*Digitalis lanata*
افزایش ١٦ درصد تروپان آلکالوئیدها	٤X	*Hyoscyamus albus*
افزایش ٣٦ درصد تروپان آلکالوئیدها	٤X	*Hyoscyamus muticus*
افزایش ٢٠٠ درصد اسکوپولامین	٤X	
افزایش ٢٢/٥ درصد تروپان آلکالوئیدها و ٩٦٪ کل آلکالوئیدها	٤X	*Hyoscyamus niger*
افزایش ٣٤ درصد تروپان آلکالوئیدها	٨X	
٥٢ – ١٥٢ درصد افزایش در تولید آلکالوئیدها	٤X	*Lobelia inflate*
افزایش تبائین فقط در نسل اول	٣X	*Papaver bracteatum*
افزایش بیش از ١٠٠ درصد در محتوی مورفین	٤X	*Papaver somniferum*
افزایش محتوی متابولیت کوئرستین٣- سوفوروزید	٤X	*Petunia (Mitchell)*
افزایش قابل توجه آلکالوئیدها	٤X	*Psychotria ipecacuenha*
افزایش ٧٩ درصد داشینون	٤X	*Salvia miltiorrhiza*
افزایش ٣٥ – ٥٠ درصد سولازودین	٤X	*Solanum khasianum*
کاهش دیورژنین	٤X	*Trigonella*
افزایش بیش از ١٠ برابری پروسیلاریدین و اسکیلارن	٤X و ٣X	*Urginea indica*

لازم به ذکر است که القا تتراپلوئیدی را می‌توان در مورد کشت‌های درون شیشه (*In vitro*) نیز استفاده نمود. در این راستا افزایش سطح پلوئیدی کشت‌های ریشه مویین در چندین گیاه به صورت موفقیت‌آمیزی جهت تغییر الگوی کمی و کیفی تولید متابولیت‌های ثانویه به کار گرفته شده است.

برکو (Berkov) و همکاران در سال ۲۰۰۳، برای اولین بار اثرات القا تتراپلوئیدی را روی ریشه‌های مویین داتوره بررسی کردند. آنها پس از مقایسه طیف آلکالوئیدهای تروپانی ریشه‌های مویین دیپلوئید و تتراپلوئید گیاه *Datura stramonium* مشاهده نمودند که این آلکالوئیدها هم از لحاظ کیفی و هم کمی تغییراتی نموده‌اند. از ۲۰ نوع آلکالوئید بررسی شده در این آزمایش ۱۹ نوع آن در دیپلوئیدها دیده شده در حالی که تتراپلوئیدها ۹ نوع آلکالوئید تروپانی را نشان دادند که یکی از آنها استر کاملاً جدیدی بود که در دیپلوئیدها وجود نداشت. به هر حال در مورد اینکه چگونه پلی‌پلوئیدی ممکن است رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین را متأثر کند، اطلاعات کمی وجود دارد [۲۰].

دیژسوس و ویترز در سال ۲۰۰۳ با به کار بردن کلشی‌سین موفق به القا تتراپلوئیدی در ریشه‌های مویین *Artemisia annua* شدند. آنها چهار کلون ریشه مویین تتراپلوئید به دست آوردند که همه آنها از لحاظ خصوصیات رشدی و محتوی آرتمیزین با ریشه مویین دیپلوئید تفاوت داشتند. تمام کلون‌های تتراپلوئید هر چند که سرعت رشد کمتری داشتند اما ۳ تا ٦ برابر آرتمیزین بیشتری نسبت به

Archive of SID
www.SID.ir

والدین دیپلوئید خود تولید می‌کردند [۲۱]. دهقان و همکاران [۲۲] پس از القا ریشه‌های مویین در گیاهان دیپلوئید و اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری مشاهده نمودند که ریشه‌های مویین تتراپلوئید، در محیط کشت B5، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین بیشتری در مقایسه با کلون دیپلوئید دارا بودند. مطالعات اخیر مؤلفین (۲۰۱۳) نشان دهنده موفقیت بیشتر ریشه‌های مویین ترانسژنیک تتراپلوئید گیاه بذرالبنج مصری در افزایش بیان ترانسژن *h6h* (۹۰ برابری) در مقایسه با ریشه‌های مویین ترانسژنیک دیپلوئید بود [۲۳]. علاوه بر اهمیت اتوپلی‌پلوئیدی در اصلاح گیاهان دارویی، آلوپلی‌پلوئیدی نیز بسیار ارزشمند بوده و در مواردی قادر به ایجاد نتایج چشمگیری در بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های دارویی می‌باشد. برخلاف اتوتتراپلوئیدها که ممکن است از سرعت رشد خوبی بهره‌مند نباشند، آلوپلی‌پلوئیدها ممکن است هیبرید نیرومندی باشند و از سرعت رشد و قابلیت تولید بیومس زیاد نیز برخوردار باشند. با این وجود عدم امکان تلاقی جنسی یکی از عوامل محدود کننده استفاده از چنین پتانسیلی در گیاهان دارویی است. گامت‌های کاهش نیافته یکی از عوامل اصلی ایجاد آلوپلی‌پلوئیدها به صورت طبیعی هستند و امکان ایجاد آنها به صورت مصنوعی و از طریق هیبریداسیون بین گونه‌ای نیز وجود دارد. هیبریدهای به دست آمده معمولاً عقیم می‌باشند که از روش‌های مختلفی می‌توان باروری آنها را احیاء نمود. یکی از بهترین روش‌ها دو برابر نمودن عدد کروموزومی آنها از طریق تیمار با موادی مانند کلشی‌سین بوده که به این طریق آلوتتراپلوئیدها ایجاد می‌شوند. تکنیک تولید هیبرید از طریق امتزاج پروتوپلاست‌های جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی و سپس رشد و نمو هتروکاریون را هیبریداسیون سوماتیکی گویند. این تکنیک موقعیتی جهت تولید هیبرید بین گیاهانی که از نظر تاکسونومیک دور از هم بوده و امکان تلاقی جنسی بین آنها وجود ندارد، ایجاد می‌کند [۲۳].

H. muticus یکی از منابع مهم آلکالوئیدهای تروپانی است، اما به پاتوژن‌های مختلف از جمله شته‌ها و ویروس‌ها حساس بوده که سبب کاهش عملکرد آن می‌شود. از طرفی *H. albus* خصوصیات زراعی مطلوبی داشته که سبب برطرف شدن چنین حساسیت‌هایی می‌شود و از طرفی میزان اسکوپولامین بیشتری در ریشه سنتز می‌کند. هیبرید سوماتیک ایجاد شده بین این دوگونه عقیم بود، بنابراین محققان اقدام به القا ریشه‌های مویین در هیبرید به دست آمده نمودند. آنها گزارش دادند که ریشه‌های مویین هیبرید نه تنها رشد زیادی داشته بلکه آلکالوئیدهای تروپانی بیشتری نیز نسبت به والدین خود تولید می‌نمودند [۲٤].

در مواردی بعضی از گیاهان ممکن است پیش ماده یک متابولیت ارزشمند را به میزان زیاد تولید کرده در حالی که توانایی تبدیل آن به ترکیب نهایی را نداشته یا اینکه این کار را با راندمان بسیار کم انجام می‌دهند. از سوی دیگر این توانایی ممکن است در گونه دیگر وجود داشته باشد. به عبارتی قسمتی از یک مسیر بیوسنتزی در یک گیاه و قسمت دیگر آن در گیاهی دیگر موجود باشد. در این موارد می‌توان با تکمیل‌سازی ژنتیکی به واسطه پلوئیدی (Ploidy-mediated genetic complementation) مسیر کاملاً فعال را در هیبرید دو گونه جمع نمود. برای مثال گیاه *Digitalis lanata* مقدار زیادی دیگوکسین تولید می‌نماید. دیگوکسین تولیدی به راحتی و در شرایط درون شیشه با استفاده از عصاره گیاه *D. purpurea* به ترکیب با ارزش بالاتر دیجیتوکسین تبدیل می‌شود. با تکمیل‌سازی ژنتیکی از طریق تلاقی بین گونه‌ای گیاهان مذکور، تولید برون شیشه دیجیتوکسین میسر شد [۳]. این تکمیل‌سازی از طریق مهندسی ژنتیک با انتقال ژن مورد نظر و بیوترانسفورماسیون متابولیت مربوطه نیز میسر است. غلظت کدئین فقط در حدود یک درصد لاتکس گیاه *Papaver somniferum* می‌باشد که با تلاقی این گیاه با *P. setigerum* و به دنبال آن گزینش هیبریدهای دارای ثبات ژنتیکی و کدئین بالا می‌توان غلظت این ترکیب دارویی ارزشمند را تا بیش از ۱۰ درصد افزایش داد [۳].

اثر پلی‌پلوئیدی بر خاموش و روشن شدن ژن‌ها

پلی‌پلوئیدی دارای اثرات قابل توجهی در بیان ژن‌های مضاعف شده می‌باشد و می‌تواند به خاموش شدن، کاهش و یا افزایش بیان یک ژن منجر شود. این تغییرات می‌تواند با شروع

Archive of SID
www.SID.ir

پلی‌پلوئیدی و یا با گذشت چند نسل پس از آن رخ دهد. همچنین تغییرات مذکور می‌تواند تحت تأثیر عوامل اپی‌ژنتیکی نیز قرار گیرد. از طرفی بسیاری از تغییراتی که در بیان ژن‌ها ایجاد می‌شود اختصاصی است و در یک اندام خاص رخ می‌دهد، به این صورت که خاموشی و بیان نسبی ژن‌ها در حالت پلی‌پلوئیدی در قسمت‌های مختلف گیاه می‌تواند متغیر باشد که بیانگر تنظیم متمایز ژن‌های دو برابر شده در خلال نمو گیاه می‌باشد. در جریان پدیده پلی‌پلوئیدی الگوی فعالیت ژن‌ها بسیار متغیر است. در پژوهش‌های انجام گرفته در مورد گیاه آرابیدوپسیس، نشان داده شده است که برخی از ژن‌ها که در هنگام دیپلوئیدی فعال بودند در حالت اوتوتراپلوئیدی خاموش شدند، اما تلاقی بین دو گونه تتراپلوئید آرابیدوپسیس منجر به تولید گیاهان آلوتتراپلوئیدی شد که در آن ژن‌های مذکور دوباره فعال شدند. همچنین ژنی تحت عنوان *rad54* که در حالت دیپلوئیدی در برگ‌های آرابیدوپسیس بیان نمی‌شد در حالت آتوتتراپلوئیدی در برگ‌ها فعال شد. آزمایش‌های اخیر نشان دهنده این حقیقت می‌باشند که سطوح مختلف پلوئیدی و نحوه تشکیل پلی‌پلوئیدها (اتوپلوئیدها و یا آلوپلوئیدها) و حتی نسل‌های سپری شده از زندگی یک گیاه پلی‌پلوئید در بیان ژن‌ها و یا خاموشی آنها دخیل می‌باشد، به عبارتی الگوی بیان ژن در پلی‌پلوئیدها دچار دگرگونی می‌شود. در مطالعه اخیر مؤلفین تفاوت قابل توجهی در الگوی بیان ژن‌های مسیر آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین تتراپلوئید بذرالبنج مصری در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید مشاهده شد [۲۵]. بحث‌های فراوانی در مورد عواملی که در خاموش و روشن شدن ژن‌ها و میزان بیان آنها در پلی‌پلوئیدها موثرند، وجود دارد. یکی از این عوامل، فعال شدن عناصر ترانسپوزونی خفته در پلی‌پلوئیدهای مصنوعی می‌باشد که سبب خاموش شدن تعدادی از ژن‌ها می‌شود. از سایر عوامل که سبب خاموشی ژن‌های دو برابر شده در پلی‌پلوئیدها می‌شود می‌توان به داستیله شدن، متیله شدن و سایر تغییراتی که در هیستون‌ها و ساختار کروماتین رخ می‌دهد، اشاره نمود [۲۶]. به نظر می‌رسد که RNA های کوچک مانند miRNAs (MicroRNAs)، siRNAs (Small interfering RNAs) و ta-siRNAs (Trans-acting siRNAs) در تنظیم بیان ژن و تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از پلی‌پلوئیدی نقش مهمی دارند [۲۷]. از مجموع مباحث بالا چنین استنباط می‌شود که پلی‌پلوئیدی، مکانیسم‌هایی را در سلول فعال کرده که در نتیجه آن میزان DNA الگو و به دنبال آن نسخه‌برداری و ترجمه نیز تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به افزایش، کاهش و یا حتی خاموشی ژن می‌شود و به این صورت بسیاری از صفات فیزیولوژیک و ریخت‌شناسی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۶].

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ساختاری و فیزیولوژیک

افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان سبب ایجاد تغییرات ریختی و ساختاری در آنها می‌شود. در بسیاری از گونه‌های دارویی، القای پلی‌پلوئیدی سبب افزایش اندازه‌ی سلول‌ها و به دنبال آن افزایش اندازه گل، گل آذین و برگ‌ها شده و در نتیجه اندام‌های رویشی و زایشی و به طور کلی اندام‌های حاوی مواد مؤثره در مقایسه با گیاهان دیپلوئید والدینی بزرگ‌تر شده و در نهایت تولید ترکیبات دارویی مهم افزایش می‌یابد [۲۸، ۲۷]. این امر از طریق افزایش اندازه سلول‌ها و به دلیل افزایش سرعت بزرگ شدن سلولی، و نه به خاطر افزایش طول دورهٔ بزرگ شدن آنها، تحقق می‌یابد. پلی‌پلوئیدی در بسیاری موارد بر رنگ، شکل و ضخامت برگ و تعداد و اندازهٔ دندانه‌ها و بریدگی‌های حاشیه‌ای آن نیز تأثیر می‌گذارد [۲۹، ۹، ۸]. میلو (Milo) و همکاران با آزمایشی روی گیاه شقایق نشان دادند که تتراپلوئیدی سبب تیره‌گی و ضخامت بیشتر برگ‌ها و کمتر شدن دندانه‌های آنها می‌شود [۳۰]. در مقابل القای تتراپلوئیدی در گیاه رازک بر ضخامت، طول و دندانه برگ آن تأثیری نداشت [۳۱]. گیاهان پلی‌پلوئید به طور معمول بذرهای بزرگ‌تر با تعداد کمتر نسبت به گیاهان دیپلوئید تولید می‌کنند [۱]. گیاهان اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری بذرهای درشت‌تری نسبت به نمونه‌های دیپلوئید خود داشتند به نحوی که در جمعیت‌های مخلوط گزینش آنها از نمونه‌های دیپلوئید را مقدور نموده بود [۱۶]. درصد جوانه‌زنی بذر تتراپلوئیدها نیز بر حسب گونه متفاوت می‌باشد [۶]. در گیاه بادرشبی و ریحان

Archive of SID
www.SID.ir

با افزایش سطح پلوئیدی اندازه بذرها درشت‌تر و میزان تشکیل و درصد جوانه زنی آنها کاهش یافت [۸].

افزایش سطح پلوئیدی هسته، اغلب باعث تغییرات ساختاری از قبیل تراکم روزنه، افزایش اندازه سلول‌های روزنه‌ای و تعداد کلروپلاست در سلول می‌شود. تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های نگهبان روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد [۲۹]. با افزایش سطح پلوئیدی، طول و عرض روزنه‌ها افزایش یافته و در نتیجه تراکم روزنه‌ای کاهش می‌یابد. افزایش سطح پلوئیدی بر تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه نیز می‌افزاید. مطالعات مؤلفان روی کاسنی و بذرالبنج مصری نشان داد که تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های نگهبان روزنه گیاهان تتراپلوئید بیشتر از انواع دیپلوئید است [۱۷]. در مقابل در گیاهان تتراپلوئید رازک به رغم افزایش اندازه‌ی روزنه، تفاوت معنی‌داری در تراکم روزنه‌ها در واحد سطح در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده نشد [۳۱]. بنابراین چنین استنباط می‌شود که نوع گونه مورد مطالعه نقش مهمی در شاخص‌های روزنه‌ای در تعیین سطوح مختلف پلوئیدی داشته باشد.

به دنبال افزایش حجم ژنوم میزان فتوسنتز نیز متأثر خواهد شد. در گیاهان پلی‌پلوئید میزان فتوسنتز در هر سلول با مقدار DNA سلولی، مرتبط است. از طرفی میزان فتوسنتز به ازای واحد سطح برگ، مرتبط با تعداد سلول‌های فتوسنتزی در واحد سطح است. بنابراین چنانچه در سطوح پلوئیدی بالاتر افزایش نسبی در حجم سلول کمتر اتفاق بیفتد و نحوه قرارگیری سلول‌ها به صورتی باشد که سلول‌های بیشتری در واحد سطح قرار گیرند، میزان فتوسنتز به ازای واحد سطح برگ افزایش خواهد یافت [۳۲]. در برخی موارد میزان فتوسنتز به ازای واحد حجم سلول در تتراپلوئیدها نسبت به دیپلوئیدها افزایش می‌یابد اما چون با افزایش سطح پلوئیدی، تعداد سلول به ازای واحد سطح برگ کاهش نسبی پیدا می‌کند، بنابراین در میزان فتوسنتز به ازای سطح برگ تغییری ایجاد نمی‌شود [۳۲]. به طور کلی افزایش در سطح پلوئیدی هسته می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه اثر گذاشته و طی آن میزان فتوسنتز [۳۲]، تنفس [۳۳]، انتقال الکترون‌های فتوسنتزی [۳٤]، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و بیان ایزوآنزیم‌ها [۳۵] را تغییر دهد. به طور معمول در اثر افزایش سطح پلوئیدی، میزان تنفس کاهش یافته ولی فتوسنتز، فعالیت ژنی و تنوع آنزیمی افزایش می‌یابد.

یکی دیگر از نتایج معمول پلی‌پلوئیدی در گیاهان، کاهش رشد به دلیل کاهش و کم شدن تقسیم سلولی می‌باشد که در نتیجه اختلال در محتوای اکسین سلول‌ها رخ می‌دهد. در این راستا میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها نیز کاهش می‌یابد [٦]. در موارد زیادی گزارش شده است که گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه و ارتفاع کوچک‌تر و یا مساوی با گیاهان دیپلوئید بوده‌اند. گیاهان تتراپلوئید گوشتی‌تر بوده و میزان آب بیشتری دارند از این جهت وزن تر آنها بیشتر از نمونه‌های دیپلوئید است. با وجود کاهش سرعت رشد، به خاطر چثه درشت‌تر میزان تولید بیومس و وزن خشک در تتراپلوئیدها بیشتر می‌باشد. به هر حال این تغییرات می‌تواند وابسته به ژنوتیپ و گونه گیاه متفاوت باشد. برای مثال مطالعه‌ی انجام شده روی چهار کلون مختلف از *Mentha arvensis* نشان دهنده پاسخ‌های متفاوتی به اتوتتراپلوئیدی بود. به طوری که القای تتراپلوئیدی در کلونی که قادر به تولید بیومس بالا ولی اسانس کم بود منجر به کاهش چشمگیر در تولید بیومس اما افزایش تولید اسانس شد، در حالی که اتوتتراپلوئیدی در دو کلون دیگر با تولید بیومس کم، افزایش تولید بیومس و اسانس را به همراه داشت [۳].

دو برابر شدن کروموزمی ممکن است گل‌دهی را نیز تحت تأثیر قرار دهد. به طور کلی مرحله گل‌دهی در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید دیرتر آغاز شده اما طول مدت گل‌دهی در آنها بیشتر است. بررسی‌های انجام شده روی گیاهان زیره‌ی تتراپلوئید نشان داد که گل‌دهی و رسیدن میوه در این گیاهان نسبت به مشابه دیپلوئید آنها با تأخیر انجام می‌شود [۱۹]. تأخیر در گلدهی و رسیدن میوه هر چند فرصتی برای رشد و تولید بیومس بیشتر برای گیاه فراهم می‌نماید ولی ممکن است در مواردی، مخصوصاً گیاهانی که در طبیعت با تنش خشکی مواجه می‌شوند، یک عیب بزرگ محسوب شود.

Archive of SID
www.SID.ir

زیست‌پذیری، شکل، اندازه، میزان تولید و رنگ‌پذیری دانه‌های گرده تحت تأثیر سطح پلوئیدی قرار می‌گیرد. دیجیکسترا (Dijlkstra) و اسپکمان (Spekmann) (۱۹۸۰) گزارش دادند که در اثر القای تتراپلوئیدی در زیره نه تنها اندازه و قدرت رنگ‌پذیری دانه‌های گرده‌ی تتراپلوئید نسبت به گرده‌های دیپلوئید افزایش یافت، بلکه شکل دانه‌های گرده تولید شده توسط گیاهان تتراپلوئید (سه گوشه) نسبت به دیپلوئید (کشیده و مستطیلی شکل) نیز تغییراتی را نشان داد [۱۹]. در گیاه اتوتتراپلوئید شقایق، دانه‌های گرده قدرت رنگ‌پذیری بیشتری (۱۰۰ درصد) نسبت به انواع دیپلوئید (۵۰ درصد) داشتند و از قدرت باروری بالایی نیز برخوردار بودند [۳۰]. تولید بذر در گیاهانی که از طریق جنسی تکثیر می‌شوند، بسیار مهم است. در اثر پلی‌پلوئید شدن به دلیل اختلالات سیتوژنتیکی - فیزیولوژیکی، ممکن است پایداری ژنتیکی و ظرفیت باروری گیاه تحت تأثیر قرار گیرد. در دیپلوئیدها میوز شامل جفت شدگی دو کروموزوم همولوگ می‌باشد که در نهایت برای ایجاد دو گامت مجزا جدا می‌شوند. در اتوتتراپلوئیدها وجود چهار کروموزوم همولوگ معمولاً سبب جفت شدن بیش از دو کروموزوم با هم شده و مولتی والان‌هایی به وجود می‌آیند که منجر به بی‌نظمی در مهاجرت کروموزوم‌ها به قطب‌های سلولی و به دنبال آن تولید گامت‌هایی با عدد کروموزومی نامساوی شده و مشکلات نازایی ایجاد می‌کنند، بنابراین احتمال ناباروری و یا تولید بذرهای کمتر در اتوتتراپلوئیدها زیاد می‌باشد. با این وجود گزارش‌هایی وجود دارد که حاکی از عدم کاهش باروری در گیاهان اتوتتراپلوئید می‌باشد. برای مثال با القای پلی‌پلوئیدی در دو گونه بذرالبنج، باروری گیاهان تتراپلوئید به دست آمده کاسته نشد [۳۶]. با توجه به مشکلات ناشی از افزایش سطح پلوئیدی، مخصوصاً اتوپلوئیدی، بر میزان باروری و تولید بذر، در گیاهانی مانند نعناع که تکثیر آنها از طریق غیرجنسی انجام می‌شود افزایش سطح پلوئیدی به راحتی قابل تحمل می‌باشد.

گیاهان پلی‌پلوئید به دلیل داشتن آلل‌های بیشتر در مقایسه با انواع دیپلوئید، انعطاف‌پذیری ژنتیکی و بیوشیمیایی بالاتری داشته و همین امر آنها را نسبت به شرایط مختلف محیطی و اکولوژیکی سازگارتر و نسبت به تنش‌های زنده (بیماری‌ها و آفات) و غیره زنده (مواد غذایی، خشکی، سرما و غیره) مقاوم‌تر می‌سازد [٦]. در اثر اتوپلی‌پلوئیدی تحمل به سرما افزوده شده و گیاهان اتوپلی‌پلوئید در ارتفاعات بالاتر و عرض‌های جغرافیایی قطبی‌تر نسبت به دیپلوئیدهای مربوطه یافت می‌شوند [٦]. اتوپلی‌پلوئیدهای طبیعی در شرایط سخت، که فشارهای گزینشی شدید است، متداول‌تر می‌باشند.

در گزارش‌های متعددی به اثر سطح پلوئیدی بر قابلیت باززایی در گونه‌های گیاهی متفاوت اشاره شده است. بررسی‌های انجام گرفته روی کشت بافت گیاهان پلی‌پلوئید *Pyrus communis* نشان داد که میزان باززایی ریشه و نوشاخه در پلی‌پلوئیدها در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید به طور محسوسی کاهش یافت [۳۷]. همچنین گزارش شده است که پلی‌پلوئید شدن کشت‌های کالوس خیار (*Cucumis sativus* L.) با از دست دادن تدریجی توان باززایی همراه بود، به طوری که میزان گیاهان باززایی شده از کشت‌های کالوس در گیاهان دیپلوئید ۵۷ درصد، تتراپلوئید ۱۸ درصد و اکتاپلوئید ٤ درصد گزارش شد [۳۸]. القای تتراپلوئیدی در کاسنی (*Cichorium intybus*) نیز منجر به از دست دادن توان باززایی در این گیاه شد و در حالی باززایی گیاهان کامل کاسنی از کالوس‌های دیپلوئید با موفقیت همراه بود که کالوس‌های تتراپلوئید بدون اثری از باززایی از بین رفتند [۳۹]. تغییر در بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز هورمون‌های دورن‌زا، فاکتورهای رشد و یا برخی ترکیبات ثانویه می‌تواند از جمله دلایلی باشد که منجر به از دست دادن و یا کاهش توان باززایی گیاهان تتراپلوئید می‌شود.

روش‌های افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان

میزان کارایی و موفقیت در القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان به علت عواملی همانند ایجاد تغییرات کروموزمی نامطلوب، ایجاد گیاهان شیمر، عدم تولید ریشه و یا حتی مرگ گیاهان تیمار شده، کم می‌باشد. افزایش سطح کروموزومی را می‌توان به صورت برون شیشه و یا درون شیشه و با روش‌های مختلف انجام داد که در این قسمت به طور خلاصه به برخی موارد

Archive of SID
www.SID.ir

اشاره خواهد شد.

در مواردی از روش بازیابی رشد (در نتیجه برش مریستم راسی ساقه و القاء بافت کالوسی شکل و باززایی ساقه‌های جدید) و شوک‌های حرارتی جهت افزایش سطح پلوئیدی استفاده شده است، با این وجود استفاده از عوامل شیمیایی ضدمیتوزی کارایی و کاربرد گسترده‌تری دارد. از عوامل ضدمیتوزی می‌توان به کلشی‌سین، ترفلان، ارایزالین، نیترواکسید، لاکتاسیستین و اپوکسومیسین اشاره کرد. پرکاربردترین و معمول‌ترین ماده‌ی شیمیایی برای القای پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین می‌باشد که از دانه و پیاز گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) استخراج می‌شود. کلشی‌سین با اتصال به توبولین (زیر واحد پروتئینی میکروتوبول‌ها) تشکیل میکروتوبول‌ها و مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها را مهار کرده که در نتیجه سلولی با عدد کروموزومی دو برابر شده ایجاد می‌شود. یکی از مزایای کلشی‌سین که کار با آن در شرایط درون شیشه را آسان‌تر نموده عدم کاهش توانایی آن در افزایش سطح پلوئیدی پس از اتوکلاو شدن است. با این وجود در بسیاری از گونه‌های گیاهی، کلشی‌سین اثرات جانبی مانند عقیمی، رشد غیرطبیعی، بازآرایی یا کاهش کروموزومی و موتاسیون ژنی همراه است [٤٠]. در مطالعه‌ای که مولفین روی گیاه کاسنی انجام دادند، تغییرات شدید در ساختار ظاهری جمعیت تیمار شده با کلشی‌سین مشاهده شد [١٧]. کلشی‌سین به صورت ضعیف به توبولین‌های گیاهی متصل می‌شود بنابراین جهت افزایش سطح پلوئیدی به غلظت‌های نسبتاً بالای آن نیاز می‌باشد. در مقابل تمایل زیادی جهت اتصال به میکروتوبول‌های سلول‌های جانوری دارد. بنابراین برای انسان سمی و سرطان‌زا بوده و تماس پوستی و حتی استنشاق آن بسیار مضر و خطرناک می‌باشد. این معایب سبب شد محققان به دنبال ترکیبات جایگزین مناسب‌تر از کلشی‌سین باشند.

ارایزلین علف‌کشی است که امروزه کاربرد نسبتاً زیادی در پروژه‌های دستورزی سطح کروموزومی گیاهان پیدا کرده است. این ترکیب به توبولین‌های گیاهی متصل می‌شود و فعالیت دپلیمریزاسیون میکروتوبولی بالایی دارد، اما بر خلاف کلشی‌سین نسبت به توبولین‌های انسان و حیوانات میل ترکیبی بسیار کمی داشته و بنابراین سمیت کمتری برای انسان دارد که سبب ترجیح استفاده از آن نسبت به کلشی‌سین می‌شود. از معایب ارایزلین می‌توان تولید زیاد شیمر، اثرات مخرب شدیدتر روی بافت‌های برگی نسبت به کلشی‌سین و عدم آگاهی از اثرات جانبی آن روی صفات گیاهی نام برد [٤٠]. در طی سال‌های ١٩٩٧٠ نیتروس اکسید از عوامل اصلی ضدمیتوزی به شمار می‌آمد. این گاز روی مرحله متافاز اثر می‌گذارد، اما شیوه کار آن هنوز مشخص نشده است. هر چند گفته شده غلظت بالای آن باعث شکستن زنجیره‌های پلی‌مریزه شده‌ی میکروتوبول‌های گیاهی می‌شود. تیمار نیتروس اکسید به عنوان تیمار مکمل با سایر ترکیبات نیز قابلیت استفاده دارد. با توجه به توان نفوذ آن، نیتروس اکسید برای تیمار اندام‌های داخلی مانند میکروسپورهای در حال نمو مناسب است. به علاوه اینکه با اتمام تیمار، سریعاً از محیط و نسوج گیاهی حذف شده و خسارت کمتری به بافت هدف وارد می‌شود [٤٠]. روش‌های مختلفی جهت تیمار گیاهان با عوامل ضدمیتوزی، مخصوصاً کلشی‌سین ایجاد شده است. تیمار با کلشی‌سین را می‌توان روی اندام‌های مختلف از جمله بذر، دانه‌رست، مریستم انتهایی یا مریستم جانبی ساقه، ریشه یا ریزوم انجام داد. در روشی محلول کلشی‌سین به طور مستقیم به رگبرگ‌ها تزریق می‌شود. روش رباتیاگو یا خیساندن بذر در محلول کلشی‌سین، روش گلوله پنبه‌ای یا تیمار مریستم انتهایی (با پوشش‌های جاذب مانند پنبه، خمیر لانولین یا آگار آغشته به محلول کلشی‌سین)، روش خیساندن مخروط رویشی (The vegetative cone soaking technique) یا غوطه‌ورسازی (خیساندن انتهای شاخساره‌های انعطاف‌پذیر در غلظت‌های متفاوت محلول کلشی‌سین)، روش غوطه‌ورسازی ریشه گیاهچه در محلول حاوی ماده القاکننده پلی‌پلوئیدی، روش مه‌افشانی برگ‌های لپه‌ای و روش استفاده از باند موئین (Capillary string method) که یک انتهای باند در محلول کلشی‌سین غوطه‌ور شده و انتهای دیگر آن در اطراف جوانه پیچیده می‌شود، از روش‌های تیمار گیاهان در شرایط برون‌شیشه با عوامل ضد میتوزی می‌باشد [٤١]. در موارد

Archive of SID
www.SID.ir

بسیاری نیز تیمار گیاه با کلشی‌سین و القا پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه و با استفاده از فنون کشت بافت انجام می‌گیرد. در هر روش اعمال تیمار ممکن است خود به طرق مختلف صورت گیرد. دو برابر نمودن سطح پلوئیدی گیاهان از طریق روش‌های برون‌شیشه از دهه ۱۹۳۰ آغاز شده و عدد کروموزومی تعداد زیادی از گیاهان از این طریق با موفقیت مضاعف شده است. با این وجود تولید تعداد کم گیاهان پلی‌پلوئید و تعداد زیادی گیاه میکسوپلوئید از معایب این روش‌هاست. برای اولین بار موراشیگ (Murashige) و ناکانو (Nakano) (۱۹٦٦) القا پلی‌پلوئیدی را به صورت درون شیشه در تنباکو گزارش نمودند [٤۲]. با تکامل و پیشرفت کشت بافت گیاهی القا پلی‌پلوئیدی به صورت درون شیشه نیز رایج شد. دستورزی کروموزومی به صورت درون شیشه مخصوصاً از دهه ۱۹۹۰ به بعد روشی کاملاً مرسوم در کشت بافت گیاهی شد [٤۳]. کلشی‌سین، ارایزالین و تری‌فلورالین از عوامل ضدمیتوزی پرکاربرد در مطالعات پلی‌پلوئیداسیون درون شیشه بوده‌اند. ریزنمونه‌های مختلفی مانند جوانه‌های انتهایی یا جانبی، ریزنمونه‌های برگی، گره، شاخه‌های کوچک، قطعات غده‌ای و ریزوم، گیاهچه‌های کوچک، دانه‌رست‌ها، جنین‌های جنسی یا سوماتیک، کالوس و کشت‌های سوسپانسیون سلولی نیز جهت تیمار با عوامل ضد میتوزی و سپس باززایی گیاهان پلی‌پلوئید مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در القا درون شیشه، بسته به گونه گیاه و نحوه تیمار با عوامل ضد میتوزی، محیط کشت‌های مختلف به صورت جامد، نیمه جامد و یا مایع می‌تواند استفاده شود. مدت زمان تیمار نیز بسته به عامل ضدمیتوزی مورد استفاده، گونه گیاهی، نوع محیط کشت، همچنین اندازه و نوع ریزنمونه‌ها متفاوت است [٤۳].

روش‌های مورد استفاده در تعیین سطح پلوئیدی

به منظور تعیین سطح پلوئیدی از روش‌های غیرمستقیم نظیر بررسی و مقایسه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و میکروسکوپی و همچنین روش‌های مستقیم (شمارش کروموزومی و فلوسایتومتری) استفاده می‌شود. روش‌های غیرمستقیم آسان و سریع بوده ولی مستلزم گذشت زمان برای رشد گیاهان بوده و از طرفی قطعیت آنها نسبت به روش‌های مستقیم کمتر است [۳٤]. ازسوی دیگر گیاهان شیمر یا آنیوپلوئید را نیز نمی‌توان با قطعیت توسط این روش‌ها شناسایی نمود. در روش‌های مستقیم حجم DNA هسته‌ای (آنالیز فلوسیتومتری) و یا تعداد کروموزوم‌ها (شمارش کروموزومی) به طور مستقیم اندازه‌گیری و شمارش می‌شود. این روش‌ها در مقایسه با روش‌های غیرمستقیم بسیار دقیق‌تر بوده ولی مستلزم هزینه و امکانات خاص خود می‌باشد.

شمارش کروموزمی

رنگ‌آمیزی کروموزم‌های سلول‌های مریستمی و مشاهده آنها در زیر میکروسکوپ، یک روش سیتولوژی برای تشخیص سطح پلوئیدی گیاهان محسوب می‌شود. این روش در تعیین عدد کروموزومی و حتی شناسایی آنیوپلوئیدها دقیق و قابل اعتماد بوده اما نیاز به امکانات سیتولوژی و آماده‌سازی نمونه‌ها دارد. این روش به مواد گیاهی با سلول‌های فعال از نظر تقسیمات سلولی نیاز داشته ضمن اینکه برای شناسایی گیاهان شیمر (میکسوپلوئید) نیز کارا نمی‌باشد. تعداد کمی از سلول‌های گیاهی با این روش قابل بررسی بوده و در صورتی که گیاه مورد مطالعه دارای تعداد زیادی کروموزوم‌های کوچک باشد احتمال خطا در شمارش نیز به راحتی اتفاق می‌افتد. در مجموع شمارش کروموزومی روشی وقت‌گیر و پر زحمت، مخصوصاً در رابطه با گیاهان دارای کروموزم‌های ریز و یا تعداد کروموزم‌های زیاد، می‌باشد [٤٤].

فلوسیتومتری (FCM)

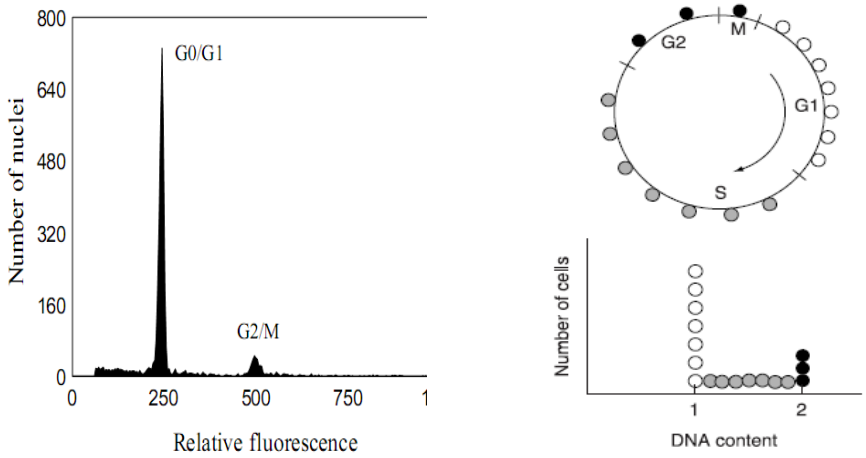
فلوسیتومتری تکنیکی است که امکان مطالعه‌ی سریع محتوای ژنومی جمعیت‌های بزرگ سلولی یا اندامک‌های سلولی را فراهم می‌آورد. برای مطالعه سطح پلوئیدی نمونه‌های گیاهی معمولاً از مدل‌های ساده دستگاه‌های فلوسیتومتر، مانند آنالیزور پلوئیدی PA (شرکت Partec) استفاده می‌شود. تئوری فلوسیتومتری در مطالعه سطح پلوئیدی گیاهان بر اساس رابطه موجود بین شدت فلورسنس ساطع شده توسط هسته‌های سلولی (پس از رنگ‌آمیزی آنها با یک رنگ فلورسنس مناسب)

Archive of SID
www.SID.ir

با میزان محتوای کروموزومی یا به عبارتی حجم ژنوم آنها می‌باشد (شکل شماره ۱). در ارتباط با تعیین محتوای ژنومی سلول‌ها، ابتدا هسته‌ی سلول‌ها طی فرایندی استخراج می‌شود، این هسته‌ها پس از خارج‌سازی از سلول‌ها توسط یک رنگ فلورسنس که خاصیت اتصال به DNA موجود در هسته را دارد، رنگ‌آمیزی می‌شوند. هر چه محتوای ژنومی سلول بیشتر باشد، رنگ بیشتری به خود جذب کرده و پس از عبور از منبع نوری شدت فلورسنس بیشتری تولید خواهند کرد. این هسته‌ها پس از ورود به دستگاه به طور پیوسته از مقابل منبع نوری دستگاه، که ممکن است لامپ UV یا لیزر باشند، ایجاد سیگنال‌های فلورسنس نموده که پس از عبور از فیلترها به آشکارسازهای مربوطه می‌رسند. سیگنال‌های نوری به واسطه آشکارسازها به پالس‌های الکتریکی تبدیل شده و در نهایت با کمک قسمت انفورماتیک دستگاه داده‌های دیجیتال در قالب نمودارهای ویژه‌ای روئیت و ضبط خواهند شد [٤٥].

در مطالعات فلوسیتومتری جهت تعیین سطح پلوئیدی روش کار به این صورت خواهد بود که معمولاً از قطعات کوچک برگی (حدود چند سانتی‌متر مربع) جهت استخراج هسته‌های سلولی استفاده می‌شود، ولی به طور کلی از هر نوع بافتی که دارای هسته‌های سالم و دست نخورده باشد، از جمله بافت‌های مختلف رشد یافته در شرایط درون شیشه مانند ریشه‌های موئین و کالوس، نیز جهت کار در فلوسیتومتری می‌توان استفاده نمود. هر چند در بعضی موارد مانند تخمین پلوئیدی DNA، از نمونه‌های خشک شده توسط سیلیکا، نمونه‌های هرباریومی و بذور بالغ می‌توان استفاده نمود، با این وجود جهت حذف اثرات ناخواسته ناشی از خشک شدگی و یا فیکس نمودن روی کروماتین و رنگ‌آمیزی DNA، فقط بافت‌های گیاهی زنده و تازه برای تخمین دقیق محتوای DNA توصیه می‌شود [٤٦].

جهت استخراج هسته‌های سالم و یکپارچه، از محلول‌های مختلفی که به صورت تجاری موجود بوده و یا به صورت دستی در آزمایشگاه قابل آماده‌سازی است می‌توان استفاده نمود. بافر گالبریاث (Galbraith's buffer)، $Tris.MgCl_2$، Otto I و Otto II از بافرهای رایج جهت استخراج هسته می‌باشند [٤٦]. بافت گیاهی در مجاورت بافر استخراج هسته توسط تیغ تیز، به نحوی که از له‌شدگی آن جلوگیری شود، به قطعات ریز بریده شده تا هسته‌ها از محفظه سلول‌ها خارج شوند. پس از فیلتر نمودن محلول، هسته‌ها توسط یک محلول رنگی با قابلیت فلورسنس (جدول شماره ۲) رنگ‌آمیزی شده و به دستگاه داده می‌شوند. پس از خوانش نمونه‌های رنگ‌آمیزی



شکل شماره ۱- اساس استفاده از تکنیک فلوسیتومتری در مطالعات تعیین سطح پلوئیدی. رابطه چرخه سلولی و محتوای DNA با شدت فلورسنس نسبی

www.SID.ir

شده ممکن است دو قله (Peak) مشاهده شود. سطح زیر منحنی هر قله، بیانگر تعداد سلول‌های دارای محتوای ژنومی یکسان در نمونه‌ی مورد مطالعه است. قله‌ی اول که دارای شدت فلورسنس کمتر اما معمولاً تعداد بیشتری است مرتبط با سلول‌های موجود در فاز G_1 و G_0 می‌باشد، در حالی که قله‌ی دوم که دارای مقدار محتوی DNA و شدت فلورسنس دو برابر قله‌ی اول است، متعلق به سلول‌های موجود در فاز G_2 می‌باشد (شکل شماره ۱). داده‌های دستگاه فلوسیتومتر را می‌توان با نرم‌افزارهای آماری ویژه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. این نرم‌افزارها علاوه بر شناسایی سطوح مختلف ژنومی پارامترهایی نظیر درصد سلول‌ها در هر یک از این سطوح، درصد سلول‌ها در هر یک از فازهای G_1، G_2 و S و پارامترهای آماری دیگری را در اختیار محقق قرار می‌دهند [٤٥].

نکته مهم در تعیین سطح پلوئیدی توسط تکنیک فلوسیتومتری، انتخاب استاندارد مناسب می‌باشد. به طور کلی نمونه‌های استاندارد به دو صورت داخلی و خارجی قابل استفاده می‌باشند. در مطالعات تعیین سطح پلوئیدی معمولاً از گیاهان شاهد از همان گونه که مطالعات به روی آن انجام شده و سطح پلوئیدی آنها شناخته شده است، به صورت استاندارد خارجی استفاده می‌شود. در این حالت ابتدا نمونه‌های شاهد به صورت استاندارد خارجی جداگانه به دستگاه داده شده و پس از خوانش آنها توسط دستگاه و تعیین محل قله‌های (پیک) G0/G1 آن، نمونه‌های مجهول آن گیاه که ممکن است به صورت طبیعی در سطوح پلوئیدی مختلف موجود باشند و یا به صورت مصنوعی توسط تیمار کلشی‌سین ایجاد شده باشند آماده‌سازی و به دستگاه داده می‌شوند. سپس با توجه به موقعیت پیک آنها نسبت به نمونه‌های شاهد تفسیر نتایج آنها انجام می‌شود [٤٥]. استاندارد داخلی بیشتر برای آنالیزهای دقیق و مطلق کاربرد دارد. برای مثال در تعیین مقدار مطلق اندازه ژنوم (تعیین C-value) و یا شناسایی آنیوپلوئیدها کاربرد دارند. در این حالت نیاز نیست که نمونه استاندارد گیاه شاهد گونه مورد مطالعه باشد بلکه می‌توان از گونه‌های دیگر گیاهی با حجم ژنوم مشخص، یا حتی سلول‌های جانوری مانند سلول‌های خونی جوجه استفاده نمود [٤٥].

جدول شماره ۲- ویژگی‌های مهم تعدادی از فلوروکروم‌های رایج مورد استفاده جهت رنگ‌آمیزی DNA در مطالعات فلوسیتومری [٤٦]

رنگ فلورسنس	روش اتصال	غلظت مورد استفاده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	طول موج برانگیزش (نانومتر)	طول موج انتشار فلورسنس (نانومتر)	منبع نوری مناسب جهت برانگیزش
پروپودیوم یدید	درج شونده در DNA بدون ترجیح بازی	۱۵۰ – ۵۰	۵۳۸	٦١٧	لیزر حالت – جامد سبز (۵۳۲ نانومتر)، لیزر یون – آرگون (٤٨٨ نانومتر)
اتیدیوم بروماید	درج شونده در DNA بدون ترجیح بازی	۱۵۰ – ۵۰	۵۲۳	٦٠٣	لیزر حالت – جامد سبز (۵۳۲ نانومتر)، لیزر یون – آرگون (٤٨٨ نانومتر)
DAPI	اتصال ترجیحی به AT	٤ – ٢	۳۵۹	٤٦١	لامپ آرک (UV)
Hoechst 33258	اتصال ترجیحی به AT	٤ – ٢	۳۵۲	٤٥٥	لامپ آرک (UV)

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه‌گیری و چشم‌اندازها

پلی‌پلوئیدی از پدیده‌های رایج در گیاهان می‌باشد. امکان دستورزی مصنوعی سطح پلوئیدی نیز به صورت برون شیشه و درون شیشه با کمک مواد شیمیایی و روش‌های مختلف وجود داشته که هر کدام مزایا و معایب خود را داراست. پلی‌پلوئیدی با تغییرات ساختاری، نموی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گسترده‌ای در گیاهان همراه می‌باشد که نتیجه آن ایجاد تنوع گسترده در این صفات می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که پلی‌پلوئیدی با ایجاد تنوع در صفات مختلف، گزینه‌های جدیدی برای اصلاح‌گران ایجاد می‌کند تا بسته به هدف که ممکن است کاربردهای دارویی، زینتی، مقاومتی و غیره باشد، گیاهان مطلوب گزینش شوند. سطح پلوئیدی به نحو مؤثری فعالیت آنزیمی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه و به دنبال آن الگوی کمی و کیفی تولید ترکیبات ثانویه گیاهی را متأثر می‌نماید. افزایش تولید بیوماس همراه با تغییر تولید ترکیبات ثانویه دارویی گزینه کارآمدی جهت گزینش گیاهان پر تولید پیش روی محققین قرار داده است.

هر چند پلی‌پلوئیدی روش اصلاحی سنتی و شناخته شده‌ای محسوب می‌شود، امروزه نگرش مولکولی و تلفیق آن با موضوعات بیوتکنولوژیک بر غنا و اهمیت آن افزوده است. القا پلی‌پلوئیدی به صورت درون شیشه از موضوعات جالب کشت بافت و اصلاح گیاهان دارویی می‌باشد که همزمان با دستورزی سطح کروموزومی، امکان ریزازدیادی آنها و تولید درون شیشه متابولیت‌های دارویی را فراهم آورده است. استفاده از روش‌های بیوتکنولوژیک مانند هیبریداسیون سوماتیک از طریق امتزاج پروتوپلاست‌ها بین دو گونه متفاوت از موضوعات جالب توجه جهت افزایش تولید متابولیت‌های خاص و یا تولید ترکیبات جدید می‌باشد. پلی‌پلوئیدی می‌تواند به عنوان راهبردی مؤثر جهت کمک به بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون شیشه مانند ریشه‌های مویین (مخصوصاً در مواردی که ترکیبات دارویی در ریشه تولید می‌شوند) یا کشت‌های سوسپانسیون سلولی به کار گرفته شود.

منابع

1. Dhawan OP and Lavania UC. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*. 1996; 87: 81 - 9.

2. Farsi M and Bagheri A. The principles of breeding. Jahad Daneshgai Press. Mashhad, Iran. 1383, pp: 376. (In persian)

3. Lavania UC. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genet. Resour*. 2005; 3: 170 - 7.

4. Otto SP and Whitton J. Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 2000; 34: 401 - 37.

5. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin DT and Gelbart WM. Chromosome mutation II: Changes in number In: Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin DT, Gelbart WM. An Introduction to Genetic Analysis. Freeman WH and Co., New York, USA. 1996, pp: 249 - 73.

6. Stebbins GL. Variation and Evolution in plants. Columbia University Press. New York. 1984, pp: 58 - 63.

7. Gao SL, Zhu DN, Cai ZH and Xu DR. Autotetraploid plants form colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1996; 47: 73 - 7.

8. Omidbaigi R, Yavari S and Hassani ME. Induction of autotetraploidy in Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *J. Fruit Ornament. Plant Res*. 2002; 18: 23 - 35.

9. Omidbaigi R. Processing and production of medicinal plants. 3rd ed. Astan Ghods Razavi Press. Iran. 1386, pp: 347.

Archive of SID
www.SID.ir

10. Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus V, Van Huylenbroeck J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2011; 104: 359 – 73.

11. Hartwell LH, Hood L, Goldberg ML, Reynolds AE, Silver LM, Veres RC. Genetics from genes to genomes. 2nd ed. McGraw Hill, Boston. USA. 2004, pp: 324.

12. Levin DA. The role of chromosomal change in plant evolution. New York, Oxford University Press. 2002, pp: 230.

13. Lin X, Zhou Y, Zhang J, Lu X, Zhang F, Shen Q, Wu S, Chen Y, Wang T and Tang K. Enhancement of artemisinin content in tetraploid *Artemisia annua* plants by modulating the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2011; 58: 50 – 7.

14. Leitch IJ and Bennett MD. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci*. 1997; 12: 470 - 6.

15. Estaji AR. Induction of Autotetraploidy in Nuruozak (*Salvia leriifolia* Bent.) by Colchicine Treatment. M.Sc. thesis, Urmia University, 2012.

16. Dehghan E, Ghotbi Ravandi E, Naghdi Ebadi H, Tanhaian A and Hosseini B. Increasing convertion of hyoscyamine to scopolamine in stable autotetraploid plants of *Hyoscyamus muticus*. *J. medicinal plants*. 2012; 9: 57 - 67.

17. Ghotbi Ravandi E, Rezanejad F, Zolala J and Dehghan E. The effects of chromosome doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus* L. *Hort. Sci. Biotech*. 88 (6): 701 - 9.

18. Janaki Amal ER and Sobti SM. The origin of the Jammu Mint. *Curr. Sci*. 1962; 31: 387 - 8.

19. Dijkstra H and Speckmann GI. Autotetrapliody in Caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. *Euphytica*. 1980; 29: 89 - 96.

20. Berkov S, Pavlov A, Kovatcheva P, Stanimirova P and Philipov S. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Z Naturforsch* 2003; 58c: 42 – 6.

21. De Jesus-Gonzalez L and Weathers PJ. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisin than diploid. *Plant Cell Rep*. 2003; 21: 809 - 13.

22. Dehghan E, Hakkinen ST, Oksman-Caldentey KM and Shahriari Ahmadi F. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 2012; 110: 35 - 44.

23. Dehghan E, Ebadi MT, Naghdi Badi H, Shahriari F, Azizi M and Asghari GR. Review on new techniques in tropane alkaloids production (In Persian). *J. Medicinal Plants* 2010; 9: 149 - 65.

24. Zehra M, Banerjee S, Naqvi AA and Kumar S. Variation in growth and tropane alkaloid production capability of the hairy roots of *Hyoscyamus albus*, *H. muticus* and their somatic hybrid. *Plant Sci.* 1998; 136: 93 - 9.

25. Dehghan E. Metabolic engineering and profiling of gene expression and metabolite accumulation pattern of tropane alkaloid pathway in plants and hairy root cultures of *Hyoscyamus senecionis* and *H. muticus*. PhD thesis, Ferdowsi University of Mashhad, 2013**.**

26. Adams KL and Wendel JF. Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. *Trends Genet*. 2005; 10: 539 - 43.

27. Adams KL. Organ- specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 2004; 168: 2217 - 26.

28. Adaniya S and Shira D. *In vitro* induction of tetraploid Ginger (*Zinger officinalis*) and its pollen fertility germinability. *HortScience*. 2001; 88: 277 - 87.

29. Watrous SB and Wimber DE. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lindleyana*. 1988; 34: 177 - 83.

Archive of SID
www.SID.ir

30. Milo J, Levy A, Palevitch D and Ladizinsky G. Thebain content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* LINDL. *Euphytica* 1987; 39: 45 - 54.

31. Roy AT, Leggett G and Koutoulis A. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant cell rep.* 2001; 20: 489 - 95.

32. Warner D and Dwards GEE. Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynth. Res*. 1993; 34: 135 - 47.

33. Byrne MC, Nelson CJ and Randall DD. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. *Plant Physiol*. 1981; 68: 891 - 3.

34. Timo MP, Vasconcelos AC and Fairbrother DE. Euploidy in *Ricinus* l. Euploidy and gene dosage effects on cellular proteins. *Biochem. Genetics*. 1980; 18: 171 - 83.

35. Randall DD, Nelson CJ and Asay KH. Ribulose bisphophate carboxylase altered expression in tall fescue. *Plant Physiol*. 1977; 59: 38 - 41.

36. Lavania UC, Strivastava S. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Euphytica.* 1991; 52: 73 - 7.

37. Sun Q, Sun H, Bell RL, Li H and Xin L. Variation of phenotype, ploidy level and organogenic potential of *in vitro* regenerated polyploids of *Pyrus communis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2011; 107: 131 – 40.

38. Kubalakova M, Dolezel J, Lebeda A. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. *Biol. Plantarum.* 1996; 38 (3): 475 –80.

39. Ghotbi Ravandi E, Rezanejad F and Dehghan E. *In vitro* regeneration ability of diploid and tetraploid plants of *Cichorium intybus* L. *Cytology and Genetics* 2014; In press.

40. Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus V and Van Huylenbroeck J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2011; 104: 359 – 73.

41. Blakslee AF and Avery AG. Methods of inducing doubling of chromosome in plants by treatment with colchicine. *J. Heridit.* 1937; 28: 393 - 411.

42. Murashige T and Nakano R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *J. Hered*. 1966; 57: 115 - 8.

43. Pickens KA and Cheng Z. Effects of colchicine and oryzalin on. callus and adventitious shoot formation of *Euphorbia pulchurrima* 'Winter Rose'. *Hort Science* 2006; 41: 1651 - 5.

44. Sari N, Abak K and Pitrat M. Comparison ploidy level screening methods in watermelon. *Sci. Hortic-Amsterdam*. 1999; 82: 265 - 77.

45. Dolezel J and Bartos J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot*. 2005; 95: 99 – 110.

46. Dolezel J, Greilhuber J and Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2007; 2 (9): 2233 – 44.

Archive of SID

www.SID.ir