مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۵)، ۱(۲): ۱- ۲۳

جهش‌های القایی در کشت درون شیشه‌ای، راهکاری موثر در افزایش تنوع در گیاهان زینتی

یزدی محبوبه[۱]، باقری عبدالرضا*[۱]، خادم آزاده[۱و۲]، کیخا آخر فاطمه[۲]

۱. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد

* Bagheriyazd@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۳/۱۵، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹٤/۰۸/۱٦، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۹/۱

چکیده

اصلاح و تولید ارقام جدید گیاهان زینتی و تکثیر و پرورش آن‌ها صنعتی رو به رشد و در حال گسترش است. کاربرد گیاهان زینتی در فضای سبز و افزایش تقاضای مردم به ارقام جدید سبب شده تا اصلاح‌کنندگان برای تولید واریته‌های جدید با رنگ جذاب، عطر زیاد، دوام بیشتر و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی برنامه‌ریزی نمایند. بطور کلی تنوع یک اصل اساسی در هر برنامه اصلاحی است و اصلاح نباتات بر جمع‌آوری و یا ایجاد تنوع، انتخاب، ارزیابی و تکثیر ژنوتیپ‌های جدید تکیه دارد. یکی از راه‌های افزایش تنوع، القای جهش در شرایط درون شیشه‌ای است که با استفاده از این روش می‌توان به افزایش تنوع کمک کرده و بهره‌وری برنامه‌های اصلاحی را افزایش داد. لذا انتظار می‌رود با کاربرد این روش، علاوه بر بهبود صفات به انواع جدیدی از صفات دست یافت که در طبیعت وجود ندارند و یا احتمالا در روند تکاملی گیاهان از دست رفته‌اند. مقاله حاضر مروری بر افزایش تنوع در گیاهان زینتی از طریق القای جهش، در تلفیق با روش‌های نوین مانند کشت بافت گیاهی و کاربرد نشانگرهای مولکولی است. با توجه به مطالعه انجام شده، کاربرد عوامل جهش‌زا در کشت درون شیشه‌ای گیاهان زینتی به همراه بکارگیری نشانگرهای مولکولی به منظور تشخیص زود هنگام گیاهان جهش‌یافته و افزایش سرعت تکثیر آنها و در مجموع، افزایش بازده اصلاح گیاهان زینتی از طریق جهش پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: القای جهش، تنوع، کشت بافت، گیاهان زینتی، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

گیاهان زینتی از لحاظ اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردارند، به طوری که مصرف جهانی انواع گل در سال ۲۰۰۷ بالغ بر ۱۵۰-۱۰۰ میلیارد یورو تخمین زده شده است (Chandler & Tanaka 2007). مهم‌ترین تولیدکنندگان جهانی گیاهان زینتی به ترتیب هلند (۳۳ درصد)، ژاپن (۲٤ درصد)، آمریکا (۱۲ درصد)، ایتالیا (۱۱ درصد) و تایلند (۱۰ درصد) می‌باشند، در حالی که سایر کشورها حدود ۱٤ درصد از گیاهان زینتی جهان را تولید می‌کنند. عمده‌ترین

[Downloaded from www.ijhpr.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

کشورهای صادر کننده گیاهان زینتی به ترتیب هلند (۵۹ درصد)، ایتالیا (۱٦ درصد)، کلمبیا (۱۰ درصد)، فلسطین (٤ درصد) و اسپانیا (۲ درصد) بوده و سهم صادرات سایر کشورهای جهان ۱۸ درصد می‌باشد (Rajagopalan 2000). محدودیت تنوع ارقام موجود در بازار و حساسیت گیاهان زینتی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله عواملی است که تولید و تجارت گیاهان زینتی را محدود نموده است. این موانع، نشان‌دهنده ضرورت بکارگیری روش‌های جایگزین به منظور افزایش تنوع و بهبود عملکرد گیاهان زینتی است، زیرا هنگامی‌که ژرم پلاسم موجود قادر به ایجاد تنوع برای تولید ترکیبات مطلوب نباشد (غالب اوقات تنوع مطلوب کم است)، لازم است که به منابع دیگر تنوع متوسل شد (Afrasiab 2006). امروزه اصلاح نباتات بر ایجاد تنوع، انتخاب، ارزیابی و تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب تکیه دارد بطوری‌که اصلاح کنندگان گیاهی ژن‌های مطلوب واریته‌های گیاهی و گونه‌های خویشاوند را از طریق هیبریداسیون جنسی با هم ترکیب می‌کنند و ارقام جدیدی را با صفات مطلوب ایجاد می‌نمایند (Jain 2001). در این راستا اصلاح از طریق جهش به عنوان یکی از راه‌های دسترسی به این مهم، افزایش تنوع را در جمعیت‌های اصلاح شده از طریق هیبریداسیون واریته‌های گیاهی و گونه‌های خویشاوند در پی داشته است (Ahloowalia *et al*. 2004). القای جهش به عنوان یکی از منابع ایجاد تنوع می‌تواند قابلیت‌های بالقوه ژنتیکی را که بطور طبیعی امکان بروز نمی‌یابند، ایجاد نماید. در واقع این روش، موجب تقویت کارایی روش‌های اصلاح کلاسیک شده و عملیات اصلاحی با استفاده از آن در زمان کوتاه‌تر و با نتایج بهتری انجام‌پذیر خواهد بود (Bagheri *et al*. 2008).

جهش در گیاهان به دو صورت خودبخودی و یا با استفاده از عوامل جهش‌زا ایجاد می‌شود که در این میان، پایین بودن نرخ جهش طبیعی منجر به عدم کاربرد این روش در تولید ارقام گیاهی جدید شده است. برای اولین بار، توارث‌پذیری تغییرات فنوتیپی ایجاد شده بر اثر تیمار گونه‌های گیاهی زینتی با تابش اشعه ایکس به اثبات رسید (Pirovano 1957). پس از این گزارش، بررسی‌های بسیاری به منظور افزایش القای جهش با بکارگیری عوامل جهش‌زای مختلف صورت گرفته است که نتایج این تحقیقات نشان‌دهنده اثر معنی‌دار کاربرد عوامل جهش‌زا بر القای جهش در سلول‌های گیاهی است. از این رو در برنامه‌های اصلاحی گیاهان از طریق جهش ، معمولا از عوامل جهش‌زا به منظور القای جهش استفاده شده است (Donini & Sonnino 1998). در این راستا القای جهش در شرایط کشت بافت، راهبردی کوتاه مدت برای تولید تنوع ژنتیکی است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار گیرد (Dita *et al*. 2006).

با توجه به نیاز روز افزون بازار، تنوع در صفاتی مانند رنگ، شکل و عطر گل از مهم‌ترین اهداف اصلاحی گیاهان زینتی می‌باشند. در مقاله حاضر، افزایش تنوع در گیاهان زینتی از طریق القای جهش، همراه با کاربرد روش‌های نوین مانند کشت بافت گیاهی به منظور ایجاد تنوع در رنگ و عطر گل، افزایش ماندگاری و نیز افزایش مقاومت گیاه در برابر آفات و بیماری‌ها و سپس استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تشخیص و شناسایی جهش یافته‌ها مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

تنوع سوماکلونال

در طول دهه ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ کشت درون شیشه‌ای سلول‌های گیاهی به عنوان منبع ایجاد تنوع ژنتیکی مطرح شد (Chopra 2005). تنوع سوماکلونال در شرایط کشت بافت ایجاد شده و منجر به تغییر در گیاهان باززا شده و نتاج آنها می‌شود، به طوری که تنوع مشاهده شده در تعداد کروموزوم سلول‌های کشت شده، ظاهر کروموزومی و آنزیم‌های موجود در گیاهچه‌ها به تنوع القا شده در کشت

[Downloaded from www.ejournal.iau.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

بافت یا تنوع سوماکلونال نسبت داده می‌شود. به نظر می‌رسد نرخ جهش در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با این میزان در شرایط طبیعی بالاتر باشد (Yang *et al.* 2010). یکی از دلایل احتمالی آن، قرار گرفتن ریزنمونه در معرض انواع مواد شیمیایی محیط کشت است. حتی اگر نرخ جهش‌زایی در کشت بافت و سلول به اندازه شرایط مزرعه‌ای باشد، تعداد جهش (10^6 بعد از ۲۰ تقسیم سلولی) در یک جمعیت سلولی باعث افزایش تعداد جهش‌یافته می‌شود (Bairu *et al.* 2011). از آنجایی که با استفاده از کشت درون شیشه‌ای، سرعت تقسیم سلولی افزایش یافته و در مدت زمان کوتاه و فضایی کوچک می‌توان به جمعیت بزرگی از نمونه‌های گیاهی دست یافت، بدین منظور کشت بافت گیاهی به عنوان یکی از راهکارهای موثر در شناسایی و انتخاب جهش‌یافته‌ها شناخته شده است (Jain 2010).

تنوع سوماکلونال در حالت طبیعی غیر قابل پیش‌بینی است و می‌تواند به صورت ژنتیکی، وراثت‌پذیر، اپی‌ژنتیکی و غیروراثتی باشد. تغییرات موقت نتیجه اثرات فیزیولوژیکی یا اپی‌ژنتیکی است که این تغییرات برگشت‌پذیر هستند. اما تغییرات دائمی، ارثی هستند و اغلب نشان‌دهنده بیان تنوعی هستند که از قبل در گیاه وجود داشته است و یا از طریق مکانسیم‌های ژنتیکی نامشخص باعث ایجاد تنوع می‌گردند. بنابراین اگرچه مطالعات گسترده‌ای بر روی تنوع سوماکلونال انجام شده است اما علت آن هنوز بطور کامل مشخص نشده است. بررسی‌ها نشان داده است که تنوع سوماکلونال می‌تواند از تغییر در یک صفت خاص تا تغییر کل ژنوم گیاه باشد (Bairu *et al.* 2011). به عنوان مثال در آزمایشی رقم جدیدی از گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) با ساختار مورفولوژیکی متفاوت در شرایط کشت بافت تولید شد. بدین منظور قطعات گلبرگ در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۳، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) برای القای کالوس و شاخه‌زائی کشت شدند. در بین گیاهان بازرا شده، گیاهانی با رنگ و شکل متفاوت با تیمار شاهد مشاهده شد (Kengkarj *et al.* 2008). با این حال کاربرد این روش بصورت محدود گزارش شده است زیرا میزان بالای تنوع سوماکلونال در کشت بافت، منجر به عدم امکان بهینه‌سازی القای جهش با استفاده از این روش شده است (Chaleff 1983).

تنوع سوماکلونال می‌تواند بوسیله: ۱) کشت سوسپانسیون سلولی و کالوس در تکرار زیاد؛ ۲) باززایی گیاهان از کشت‌های طولانی مدت؛ ۳) جداسازی گیاهان مطلوب و نتاج آنها از طریق گزینش درون شیشه‌ای برای انتخاب صفات مهمی از قبیل تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی؛ ٤) آزمایش کلون‌های سوماتیکی انتخاب شده در نسل‌های متوالی به منظور پایداری ژنتیکی آنها و ٥) تکثیر کلون‌های سوماتیکی پایدار برای بهبود ارقام، افزایش یابد (Ehsanpour & Amini 2003; Dita *et al.* 2006). در واقع تنوع سوماکلونال نوعی ناپایداری ژنتیکی جدا کشت‌ها است که از مشکلات کشت بافت می‌باشد (Ehsanpour & Amini 2003)، اما از آنجایی که، به احتمال زیاد سلول‌های حاصل از تنوعات سوماکلونال متفاوت از سلول اولیه نیست، بنابراین با بهره‌گیری از تنوع سوماکلونال حاصل از کشت بافت گیاهی و انتخاب سلول در شرایط درون‌شیشه‌ای، مخصوصا زمانی‌که یک یا دو ویژگی قابل تشخیص در یک واریته موردنظر باشد، می‌توان منجر به پیشبرد اهداف اصلاحی شد. به عنوان مثال در آزمایشی فنوتیپ‌های جدید از گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) از جمله شکل برگ کروی و بیضوی و تنوع در رنگ گل (بنفش، ارغوانی و صورتی روشن) از طریق تنوع سوماکلونال و باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای مشاهده شد (Abu-Qaoud *et al.* 2010).

القای جهش با هدف افزایش تنوع ژنتیکی

[Downloaded from www.jourmap.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

اولین گزارش از القای جهش که موجب ایجاد تغییر ژنتیکی بالاتر از حد آستانه قابل مشاهده در گونه‌های وحشی شد، در سال ۱۹۲۰ با بررسی بر روی مگس سرکه، ذرت و جو گزارش گردید. با پیشرفت این تحقیقات، القای جهش بطور گسترده در علوم زیستی به منظور گسترش پایه ژنتیکی ژرم‌پلاسم برای اصلاح نباتات و به عنوان ابزاری برای مطالعه ژنومیکس کاربردی مورد استفاده قرار گرفت (Mba *et al.* 2010). تولید ارقام جدید با استفاده از القای جهش توسط عوامل جهش‌زا بسیار مورد توجه قرار گرفته است، بطوری که طبق گزارش سازمان بین‌المللی انرژی اتمی تا پایان سال ۲۰۰۰ نزدیک به ۲۵۰۰ واریته جهش یافته به ثبت رسیده که عوامل جهش‌زا بیشترین سهم را در تولید این ارقام داشته‌اند (Maluszynski *et al.* 1995). این عوامل با ایجاد تغییرات تصادفی، محتوای ژنتیکی سلول‌های گیاهی را در سطوح مختلف ژن، کروموزوم و ژنوم تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه منجر به بروز تغییرات فنوتیپی و افزایش تنوع زیستی در گونه‌های گیاهی بویژه گیاهان زینتی می‌شوند (Afrasiab 2006). اگرچه میزان وقوع جهش طبیعی بسیار پایین است اما امکان تولید واریته‌های جدید و افزایش تنوع از این طریق نیز وجود دارد. در آزمایشی واریته‌های جدیدی از گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) بدون استفاده از عوامل جهش‌زا و بطور خود بخودی با استفاده از مارکر ISSR شناسایی شد که صفات مورفولوژیکی متفاوتی در مقایسه با گیاه مادری نشان دادند. در این واریته‌ها ظهور اولین جوانه گل و ارتفاع اولین جوانه نسبت به گیاه اصلی کمتر بود. همچنین جهش خود بخودی تغییر رنگ گل را در این واریته‌ها بهمراه داشته است (Palai & Rout 2011). اما از آنجایی‌که موتاسیون‌های خود بخودی با فراوانی خیلی کم واقع می‌شوند و در نتیجه تنوع ژنتیکی ایجاد شده در جمعیت کم است، لذا محققان از تکنیک القای جهش به عنوان ابزاری مناسب برای ایجاد یا افزایش تنوع در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند (Novak & Brunner 2000). به عبارت دیگر القای جهش به یک روش پایدار برای ایجاد تنوع درون واریته‌های گیاهی تبدیل شده است. این روش، احتمال القای تنوع جدیدی را که در طبیعت وجود نداشته و یا در طول تکامل از دست رفته است، افزایش می‌دهد. هنگامی‌که ژن‌های مسئول ظهور یک صفت مطلوب در ذخایر ژرم پلاسم موجود نباشد، محققان چاره‌ای جز مبادرت به القای موتاسیون ندارند (Maluszynski *et al.* 1995).

روش‌های القای جهش

جهش در گیاهان، با قرار دادن بذر، سلول‌های مریستمی، بافت و اندام‌ها در معرض عوامل جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی القا می‌شود. هر چند در برخی موارد نیز کل گیاه در معرض مواد جهش‌زا قرار می‌گیرد. عوامل جهش‌زای فیزیکی اغلب شامل تابش‌های الکترومغناطیسی مانند اشعه گاما، اشعه ایکس، اشعه ماورابنفش (UV) و ذرات تابشی شامل نوترون‌های حرارتی، ذرات آلفا و بتا می‌باشند (Mba *et al.* 2010). تابش به دو روش تدریجی[1] و ناگهانی[2] انجام می‌شود. در تابش تدریجی، نمونه‌ها در معرض دُزهای نسبتا کم اما با مدت زمان طولانی (هفته‌ها یا حتی ماه‌ها) قرار می‌گیرند، در حالی که در تابش ناگهانی نمونه در معرض دُزهای بالا در مدت زمان بسیار کوتاه (ثانیه یا دقیقه) قرار می‌گیرد. نظر غالب بر این است که نرخ جهش در تابش ناگهانی بالاتر از تابش تدریجی است. در حال حاضر استدلال بر این است که در تابش تدریجی هیچ اثر قابل مشاهده‌ای در نتایج جهش‌های القایی وجود ندارد اما با تابش ناگهانی این تغییرات قابل مشاهده هستند (Mba *et al.* 2010). عوامل جهش‌زای فیزیکی در مقایسه با انواع شیمیایی آن به دلیل قدرت نفوذ و اثربخشی بیشتر در اصلاح

[1]Chronic
[2]Acute

[Downloaded from www.jolpp.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

از طریق جهش کاربرد بیشتری دارند (Kahal & Meksem 2010).

عوامل جهش‌زای شیمیایی در مقایسه با عوامل جهش‌زای فیزیکی به میزان بیشتری در دسترس بوده و اصلاح از طریق جهش توسط این عوامل هزینه کمتری نیز در بر خواهد داشت اما به دلیل قدرت نفوذ کم و نرخ پایین جهش، کاربرد آن‌ها در افزایش تنوع گونه‌های گیاهی و تولید ارقام جهش یافته به میزان کمتری صورت گرفته است (Kahal & Meksem 2010). عوامل جهش‌زای شیمیایی شامل مواد آلکیله کننده DNA مانند اتیل متان سولفونات (EMS)، عوامل کلات کننده مانند اتیدیوم بروماید و آنالوگ‌های بازی (مانند برمو اوراسیل که در همانندسازی DNA جانشین بازهای طبیعی می‌شود) هستند. عوامل شیمیایی باعث تغییرات ژنتیکی از جمله تشکیل تری‌استرها، پورین‌زدایی ناشی از آلکیلاسیون و آسیب‌های کروموزومی می‌شود. بطور کلی این عوامل باعث تغییر در توالی DNA و در نتیجه تغییر در بروز صفات خواهند شد. برخی از عوامل جهش‌زای شیمیایی اثر پلی‌پلوئیدی بر روی کروموزوم‌ها دارند. تیمار نمونه‌های گیاهی با عوامل جهش‌زای شیمیایی مانند ترکیبات کلشی‌سین، اوریزالین و تریفلورالین موجب جلوگیری از تشکیل رشته‌های دوکی‌شکل[3] در طی مرحله آنافاز تقسیم میتوز شده که نتیجه آن، تولید سلول‌های گیاهی پلی‌پلوئید خواهد بود (Eeckhautet *et al.* 2004). مضاعف شدن کروموزوم‌ها منجر به افزایش میزان تنوع زیستی شده و با ایجاد تغییرات مورفولوژیکی، تولید ارقام جهش یافته را بدنبال داشته است (Dhooghe *et al.*2009; Gantait *et al.* 2011).

کاربرد کشت بافت گیاهی در اصلاح از طریق جهش

القای جهش در طول کروموزوم بصورت تصادفی بوده و در بسیاری از مواقع حتی با بکارگیری عوامل جهش‌زا نیز تغییری در سطح DNA ایجاد نمی‌شود. علاوه بر آن ممکن است جهش‌های دیگری نیز در برخی از گیاهان جهش یافته مفید اتفاق افتد که عمدتا برای گیاه مضر بوده و منجر به کاهش کیفیت محصول آن خواهد شد (Jain 2010). از این رو تولید ارقام جهش یافته مفید نیازمند تیمار جمعیت بزرگی از نمونه‌های گیاهی بوسیله عوامل جهش‌زا است (Ahloowalia *et al.* 2004). همچنین به منظور بررسی اثر عوامل جهش‌زا بر القای جهش، تکثیر نمونه‌های گیاهی تیمارشده و بررسی اثر جهش در نسل‌های بعدی آن ضروری است، به نحوی که در گیاهانی که از طریق بذر تکثیر می‌شوند، عمدتا شناسایی و انتخاب جهش یافته‌های مغلوب در نسل‌های دوم و سوم پس از تیمار جهش امکان‌پذیر است. بدین منظور کشت بافت گیاهی به عنوان یکی از راهکارهای موثر در جهت رفع این محدودیت‌ها شناخته شده است، به طوری که با استفاده از کشت درون شیشه‌ای گیاه، سرعت تکثیر افزایش یافته و در مدت زمانی کوتاه و فضایی کوچک می‌توان به جمعیت بزرگی از نمونه‌های گیاهی دست یافت (Jain 2010).

القای تغییر ژنتیکی در سلول، بافت و اندام، منجر به ایجاد تنوع در داخل یک کشت و یا بین کشت‌های مختلف می‌شود. برخی از تنوع‌های القا شده ممکن است فیزیکی باشد که این تغییرات معمولا بطور خودبخودی رخ داده و تا حد زیادی غیر قابل کنترل است. تغییرات فیزیکی شامل دو نوع مختلف، تغییرات دائمی سلول‌ها وتغییرات موقتی آن‌ها که می‌تواند منشا ژنتیکی و یا محیطی داشته باشد. بطور کلی تنوع سوماکلونال در شرایط درون شیشه‌ای می‌تواند نتایجی مانند تغییرات فیزیکی یا مورفولوژیکی در کالوس تمایز نیافته، تفاوت در توانایی باززایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، تغییرات آشکار در میان گیاهان تمایز یافته و تغییرات کروموزومی در گیاهان حاصل از کشت بافت را داشته باشد (Bairu *et al.* 2011).

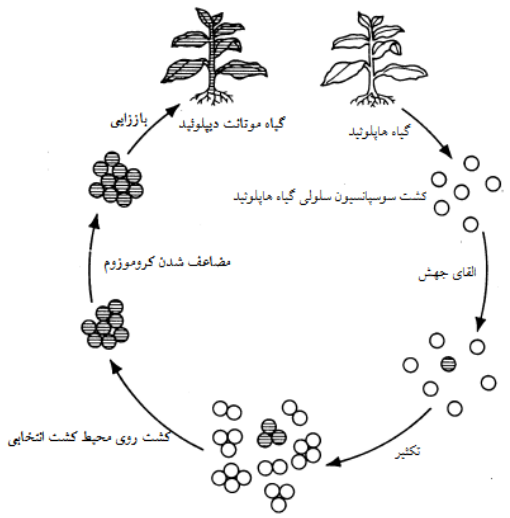
[1]Spindle

[Downloaded from www.ijoweb.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

روش‌های اصلاحی که برای بهبود ارقام استفاده می‌شوند دارای دو مشکل اصلی هستند، یکی پر زحمت بودن آنها است که برای انجام یک پروژه اصلاحی، تحقیقات و آزمایش‌های زیادی مورد نیاز است و دیگری مدت زمان طولانی است که در یک پروژه اصلاحی صرف می‌شود. از اینرو در اواخر قرن بیستم، با گسترش روش‌های کشت بافت و سلول، امکان انتقال قسمتی از کارهای اصلاحی از زمین به شرایط آزمایشگاه فراهم شده است. در این بین کاربرد اصلاح از طریق جهش به همراه کشت بافت می‌تواند نقش مهمی را در اصلاح گیاهان ایفا کند. استفاده از فناوری‌های درون شیشه‌ای مثل کشت دانه گرده، اندام‌زایی ساقه، جنین‌زایی سوماتیکی و امتزاج پروتوپلاست، می‌تواند بر برخی از محدودیت‌های اصلاح از طریق جهش در شرایط طبیعی غلبه کند (Novak & Brunner 2000).

مزیت اصلی انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای نسبت به هیبریداسیون دو واریته مختلف این است که در شرایط درون شیشه‌ای، ژنوتیپ گیاه فقط در صفت موردنظر تغییر می‌کند (Nasir *et al.*2012). همچنین ظهور جهش‌های القا شده در هموزیگوت‌هایی که از طریق کشت تخمدان، دانه گرده یا بساک حاصل شده‌اند، دستیابی سریع به صفات مطلوب را افزایش می‌دهد. علاوه بر آن، در بعضی گونه‌های دارای تکثیر رویشی، القای جهش به همراه کشت بافت تنها روش ممکن برای بهبود ارقام موجود می‌باشد (Maluszynski *et al.* 1995). دسترسی به جمعیت‌های بزرگ برای بروز جهش، پیش نیاز اساسی برای بدست آوردن تنوع کافی است. تکنیک القای جهش در کشت بافت به همراه روش‌های مولکولی، فناوری بزرگی را برای بهبود گیاهانی از جمله نرگس (*Narcissus tazetta*) (Lu *et al.* 2007)، *Rhododendron* spp. (Atak *et al.* 2011)، داوودی (Kang *et al.* 2013) و رز (Chakrabarty & Datta 2010) ایجاد کرده است. در کشت درون شیشه‌ای مقداری از بافت یا کالوس (در حد چند میلی‌گرم) را می‌توان در معرض عوامل جهش‌زا قرار داد که در آینده ممکن است این مقدار به میکروگرم نیز کاهش پیدا کند. شکل ۱ تصویر شماتیکی انتخاب جهش‌یافته‌ها را در کشت سوسپانسیون سلولی نشان می‌دهد که در این حالت انتخاب جهش‌های مغلوب از طریق کشت سلولی گیاهان هاپلوئید امکان‌پذیر می‌باشد. القای جهش، تنوع ژنتیکی جمعیت سلولی را افزایش می‌دهد و تکثیر تحت شرایط غیرانتخابی برای بیان هرگونه صفت القایی جدید ضروری می‌باشد. سپس انتقال به محیط کشت انتخابی که در آن رشد سلول‌های جهش‌یافته نسبت به غیر جهش‌یافته افزایش می‌یابد منجر به تولید جمعیت بزرگی از سلول‌های جهش‌یافته می‌شود. در نهایت مضاعف شدگی بصورت خودبخودی یا تحت تیمار مواد شیمیایی صورت می‌گیرد که برای باروری گیاهان باززا شده لازم است.



شکل ۱- تصویر شماتیکی از روند کلی انتخاب جهش‌یافته‌ها در کشت سلولی گیاه.

همچنین این عوامل احتمال تغییر یک یا چند ویژگی کوچک را در یک رقم فراهم می‌کنند. به عبارت دیگر تیمار موتاسیونی که در بافت‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای اعمال می‌شود، تغییرات ژنتیکی را به نحوی ایجاد می‌کند که ویژگی‌های دیگر آن گونه گیاهی حفظ خواهد شد

[Downloaded from www.ejournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

(Predieri & Virgilio 2007). با بهبود روش‌های باززایی گیاهان مختلف، امکان استفاده بیشتر از عوامل جهش‌زا در شرایط درون شیشه‌ای با هدف تولید ارقامی با صفات مطلوب فراهم خواهد شد (Dita *et al*. 2006).

یکی از مهمترین مشکلات القای جهش در گیاهانی که از طریق رویشی تکثیر می‌شوند، تولید گیاهان شیمر است. در بافت‌های شیمر، سلول‌های جهش‌یافته همراه با سلول‌های طبیعی حضور دارند. اندازه بخش جهش یافته ممکن است یک خط باریک روی گلبرگ، بخشی از شاخه، گل یا شاخه کامل باشد. جهش القایی در گیاهان شیمر عمدتا پایدار نبوده و در طی تکثیر، اثر جهش از بین رفته و در نتیجه فنوتیپ تغییریافته به حالت قبلی خود باز می‌گردد. کاربرد کشت بافت گیاهی در رفع این مشکل نیز بسیار موثر بوده است، به طوری که تحقیقات انجام شده به منظور بررسی اثر جهش القایی بر گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای حاکی از کاهش میزان تولید گیاهان شیمر در این شرایط است (Datta & Chakrabarty 2009). به عنوان مثال در آزمایشی که به منظور القای جهش در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد، قطعات ۰/۵ سانتی‌متری برگ گیاه بنفشه آفریقایی جداسازی و به عنوان ریزنمونه در محلول حاوی ترکیب شیمیایی EMS با غلظت ۰/۲، ۰/٤ و ۰/٦ درصد بمدت ۳۰، ٦۰، ۱۲۰ و ۲٤۰ دقیقه غوطه‌ور شد. در میان گیاهان باززا شده، گیاهانی با برگ‌های شیمر مشاهده شد که نشاندهنده القای موفقیت‌آمیز جهش در تعدادی از ریزنمونه‌ها می‌باشد. ظهور شیمر نشان می‌دهد که تشکیل شاخه نابجا در بنفشه آفریقایی ممکن است منشا چند سلولی داشته باشد. باززایی سلول‌های جهش یافته موجود در بافت شیمر برای بدست آوردن گیاهان جهش یافته پایدار ضروری است (Fang 2011). یکی از روش‌های جدید برای مدیریت بافت شیمر از طریق باززایی مستقیم گلچه‌های گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) توسط Chakrabarty و Datta (۲۰۰۹) ارائه شد. این تکنیک نه تنها برای جداسازی بافت شیمر استفاده شد بلکه برای ایجاد جهش‌یافته‌هایی با رنگ و شکل جدید گل از طریق القای جهش نیز کاربرد دارد. آن‌ها از گلچه‌های زرد رنگ موجود در گل سفید که از طریق جهش خودبخودی ایجاد شده‌اند برای باززایی مستقیم استفاده کردند. به این صورت که گیاهانی را که دارای گل‌های شیمر بودند انتخاب کرده و در محیط کشت مناسب کشت دادند. همه گیاهان باززا شده از گل‌های شیمر، خصوصیت فنوتیپ جهش یافته (دارای رنگ زرد) را به نمایش گذاشتند.

در سال‌های اخیر محدودیت‌های ذکر شده در اصلاح از طریق جهش برخی از گیاهان زینتی با کشت لایه سلولی نازک[4] (TCL) در شرایط درون شیشه‌ای برطرف شده است. لایه سلولی نازک، اساس کشت بافت همه گونه‌های گیاهی از جمله گیاهان زینتی می‌باشد. ٤۲ سال پیش، اصطلاح لایه سلولی نازک اولین بار توسط Tran Than Van در سال ۱۹۷۳ بکار گرفته شد. او ثابت کرد که امکان القای گل، جوانه و ریشه از برش‌های عرضی نازک ساقه گل‌دهنده در شرایط درون شیشه‌ای در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) وجود دارد. در این روش برش‌های نازکی از بافت اپیدرمی به همراه تعداد کمی از لایه‌های سلولی پیرامون آن به عنوان ریزنمونه از گیاه جدا و سپس تیمار جهشی بر روی آن اعمال شده و در نهایت باززایی گیاهچه‌ها از این ریزنمونه‌ها صورت می‌گیرد (TeixeiradaSilva 2010). با استفاده از این تکنیک میزان باززایی گیاه در شرایط درون شیشه‌ای افزایش می‌یابد که دلیل آن، مواد موجود در محیط کشت و یا شرایط محیطی نبوده بلکه اندازه ریزنمونه در آن تاثیر گذار بوده است. از این رو از سال ۱۹۷۳ این روش مورد توجه دانشمندان کشت بافت قرار گرفت. از آنجایی که در این روش اولین مرحله یعنی باززایی گیاه از یک یا چند سلول صورت

[1]Thin Cell Layer

[Downloaded from www.ijoweb.com at 23:03 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

می‌گیرد، بسیاری از مشکلات تکثیر گیاهان زینتی برطرف شده است (TeixeiradaSilva & Tanaka 2010). این روش، ابزاری برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی است و برای تکثیر هر نوع گونه گیاهی کاربرد دارد و در نتیجه دارای مزایای اقتصادی بسیاری می‌باشد. TCL یک سیستم ریزازدیادی ساده اما کارآمد را برای کشورهای در حال توسعه با منابع و امکانات محدود فراهم می‌آورد و می‌تواند به عنوان روش تکنیکی برای تولید کلون‌های یکنواخت از گیاهان زینتی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بررسی‌های انجام شده به منظور اصلاح از طریق جهش گیاهان زینتی نشان می‌دهد القای جهش در ریزنمونه‌های TCL در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها نیازمند کاربرد دُز کمتری از عامل جهش‌زا هستند که منجر به افزایش بازدهی تیمار جهشی شده است. در گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) ریزنمونه‌های TCL با قطر ۱ میلی‌متر از پیازچه‌های گیاه جداسازی شده و با دُزهای ۰/۵ تا ۲/۵ گری پرتو گاما تیمار شدند. نتایج نشان داد که متوسط دُز کشنده[۵] (LD_{50}) پرتو در این آزمایش بوسیله تیمار ریزنمونه‌ها با دُز ۱/۵ گری پرتو گاما بدست آمده و کاربرد این دُز پرتو با القای جهش در ۳۹/۲۷ درصد ریزنمونه‌ها به عنوان موثرترین تیمار به منظور تولید گیاهان جهش یافته شناسایی شد. با بررسی پایداری جهش القایی در طی تکثیر گیاهان جهش یافته در شرایط طبیعی و عدم مشاهده گیاهان شیمر مشخص شد که القای جهش در تمام این گیاهان بصورت پایدار بوده است (Xi *et al*. 2012). با وجود افزایش سرعت تکثیر گونه‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای، عمدتا تولید ارقام جهش یافته نیازمند رشد تمام گیاهچه‌های حاصل از تیمار جهشی در شرایط درون شیشه‌ای و سپس سازگاری آن‌ها به شرایط طبیعی و در نهایت گزینش ارقام جهش یافته از میان گیاهان موجود است. با توجه به پایین بودن درصد القای جهش در سلول‌های گیاهی، بیشتر گیاهچه‌های باززا شده بصورت جهش یافته نبوده و نگهداری این گیاهچه‌ها تا زمان شناسایی و گزینش گیاهان جهش یافته موجب افزایش هزینه‌های اصلاح از طریق جهش شده است. از اینرو در سال‌های اخیر کاربرد نشانگرهای مولکولی به عنوان راهکاری برای غلبه بر این مشکلات مورد توجه قرار گرفته است (Xi *et al*. 2012)، به طوری که با استفاده از نشانگرهای مولکولی، گزینش گیاهچه‌های جهش یافته در اولین مراحل رشد آن‌ها امکانپذیر شده است، در نتیجه با حذف زود هنگام گیاهان غیرجهش یافته هزینه‌های اصلاحی کاهش یافته و در نهایت افزایش بازدهی اصلاح جهشی گیاهان زینتی را به همراه داشته است (Atak *et al*. 2011). بنابراین با توجه به ویژگی‌های متمایز کشت درون شیشه‌ای در اصلاح از طریق جهش گیاهان زینتی و نیز کاربرد نشانگرهای مولکولی به منظور شناسایی و گزینش جهش یافته‌ها، بکارگیری این روش‌ها می‌تواند به عنوان راهکاری در جهت پیشبرد اهداف اصلاحی در گیاهان زینتی مورد توجه قرار گیرد.

اهداف اصلاح از طریق جهش گیاهان زینتی در شرایط درون شیشه‌ای

اصلاح از طریق جهش گیاهان زینتی با اهداف مختلفی از جمله ایجاد تنوع در رنگ، اندازه و شکل گل و برگ، تغییر خصوصیات رشدی گیاه مانند پاکوتاهی و یا افزایش شاخه‌دهی، تغییر فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند پاسخ به طول روز، زمان گلدهی، ماندگاری گل‌ها، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و القای پلی‌پلوئیدی به منظور افزایش عملکرد گیاهان زینتی انجام شده است، به طوری که تلاش‌های صورت گرفته نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن اصلاح از طریق جهش به منظور تولید ارقام زینتی جهش یافته با ویژگی‌های متمایز بوده است. جدول ۱ خلاصه‌ای از

[2]Median Lethal Dose

[Downloaded from www.ijlarc.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

کارهای انجام شده با استفاده از جهش در گیاهان زینتی را نشان می‌دهد.

جدول۱- ویژگی‌های گیاهان زینتی جهش یافته حاصل از تیمار با موتاژن‌های فیزیکی و شیمیایی گیاه طبیعی در شرایط درون شیشه‌ای.

گیاه	نوع موتاژن	اثر جهش القایی در گیاه	منابع
بنفشه آفریقایی (Saintpaulia cv. Crystobal)	اتیل متان سولفونات (EMS)	تنوع در شکل و رنگ گل و تولید برگ‌های شیمر	Fang 2011
داوودی (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)	اتیل متان سولفونات (EMS)	تنوع در رنگ گل	Latado *et al*. 2004
Cyrtominus caryoptideum	اتیل متان سولفونات (EMS) و نیتروس متیل اوره (NMU)	کاهش کلروفیل، تنوع در رنگ و شکل برگ	Jeong & Lee 2006
لیلیوم (*Lilium longiflorum*)	پرتو گاما	گل‌های جهش یافته کوچک و با شکل غیرطبیعی، فاقد پرچم، حاوی دو پرچم، فاقد شکل زنگوله‌ای طبیعی، تولید برگ‌هایی با ضخامت بیشتر و دارای رگه‌های با رنگ زیتونی	Xi *et al*. 2012
داوودی (*Chrysanthemum grandiflorum*)	پرتو گاما	تنوع در رنگ گل	Zalewska *et al*. 2011
داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)	پرتو گاما	تنوع در رنگ گل و تولید گل‌های شیمر. تولید حلقه‌ای نقره‌ای رنگ در مرکز گل ، تغییر گل‌های زبانه‌ای بصورت لوله‌ای. افزایش سرعت رشد گیاهان، تولید گیاهچه‌های جهش یافته پاکوتاه، رزت و بوته‌هایی با برگ‌های تیغه‌ای و گرد.	Matsumura *et al*. 2010 Datta *et al*.2005 Widiarsih &Dwimahyani 2010
سیکلامن (*Cyclamen persicum*)	پرتوی یونی $^{12}C^{6+}$	تنوع در شکل گل، تولید گل‌هایی با رگه‌های سفید	Sugiyama *et al*. 2008
گلوکسینیا (*Sinningia speciosa*)	پرتو گاما و فرابنفش	تغییر رنگ گل	Kaensaksiri & Kosakul 2006 Sirisum & Te-chato 2008

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

تورنیا (*Torenia hybrida*)	پرتوتابی با پرتوهای یونیزه نیتروژن، نئون و گاما	تنوع در رنگ گل و تغییر در میزان تولید رنگدانه‌های آنتوسیانینی	Miyazaki *et al*. 2006 Suwanseree *et al*. 2011
Anubias congensis	پرتو گاما	تولید بوته‌های با حاشیه برگ موج‌دار و گیاهان پاکوتاه با برگ‌هایی به رنگ سبز روشن	Tangpong *et al*. 2009
بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*)	تابش پرتوی یونیزه کربنی، اشعه ایکس و گاما	تولید گیاهان دارای برگ‌های با شکل غیرطبیعی و فاقد رنگدانه‌های فتوسنتزی	Farjadi-shakib *et al*. 2010 Zhou *et al*. 2006
ژربرا (*Gerbera jamesonii*)	پرتو گاما	کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش ارتفاع گیاهچه‌های جهش یافته	Hasbullah *et al*. 2012
گل چشماری (*paniculata Gypsophila*)	پرتو گاما	تفاوت خصوصیات رشدی با گیاهچه‌های طبیعی	El-Sammak& Barakat 2011
داوودی (*Dendranthema Grandiflora* Tzelev)	پرتو گاما	تولید گیاهان مقاوم به عامل بیماریزای *Septoria Obesa* Syd	Kumar *et al*. 2012

تغییر رنگ گل

اصلاح از طریق جهش در گیاهان زینتی به منظور افزایش تنوع رنگ گل‌ها به عنوان مهمترین هدف اصلاحی در این گیاهان، بسیار مورد توجه قرار گرفته است، به طوری که در برخی از گیاهان زینتی مهم مانند گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)، بیش از ۲۷۹ رقم جهش یافته به ثبت رسیده است (سازمان بین‌المللی انرژی اتمی، ۲۰۱۳). بدلیل ویژگی‌های متمایز کشت درون شیشه‌ای این گیاه مانند امکان باززایی مستقیم گیاهچه از گلچه‌های آن، بررسی‌های متعددی به منظور القای جهش در این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است. در تحقیقی گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای ۳ رقم مختلف Albugo، Alchimist و Satinbleu به ترتیب دارای گل‌های با رنگ سفید، بنفش تیره و صورتی تیره در معرض ذُز ۱۵ گری پرتوی گاما قرار گرفتند. بررسی رنگ گل در گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی نشان‌دهنده اثر معنی‌دار کاربرد عامل جهش‌زای فیزیکی بر تنوع رنگ گل این ارقام بوده است، بطوری که در گیاه جهش یافته حاصل از رقم Albugo، رنگ گل‌ها به زرد تغییر یافت، همچنین۳ جهش یافته با رنگ‌های متنوع بنفش نقره‌ای، بنفش روشن و قرمز متمایل به بنفش در رقم Alchimist مشاهده شد و ٤ جهش یافته دیگر با گل‌های صورتی روشن، صورتی، گلبهی و بنفش تیره از پرتوتابی ریزنمونه‌های رقم Satinbleu بدست آمد (Zalewska *et al*. 2011) (شکل ۲). در تحقیقی دیگر، ریزنمونه‌های گلچه

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020

شکل ۲- گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)رقم Albugo (بالا سمت چپ)، Alchimist (وسط سمت چپ)، Satinbleu (پایین سمت چپ) و جهش‌یافته های حاصل از این ارقام (Zalewska *et al*. 2011).

و برگ دو رقم Shiroyamate و H13 گیاه داوودی به ترتیب با گل‌های سفید و بنفش در معرض تابش پرتوی یونیزه کربنی با دُزهای ۱، ۲، ٤ و ۸ گری قرار گرفتند. بر طبق مشاهدات انجام‌شده، تیمار ریزنمونه‌ها با دُزهای ۲ و ٤ گری پرتوی یونی، تغییر رنگ گل‌ها از سفید به زرد روشن در رقم Shiroyamate و تولید گل‌هایی با رنگ‌های متنوع قرمز تیره، قرمز، صورتی و قرمز همراه با نقاط سفیدرنگ را در رقم H13 بدنبال داشته است (Matsumura *et al.* 2010). علاوه بر آن، پرتوتابی ریزنمونه‌های رقم H13 با دُز ۲ گری پرتوی یونی منجر به تولید گیاهان جهش یافته با گل‌های شیمر شد، بطوری‌که گلچه‌های با رنگ‌های سفید و بنفش همزمان در یک گل حضور داشتند. با باززایی گلچه‌های سفیدرنگ این گیاه، گیاهان جهش یافته با گل‌های سفیدرنگ تولید شد، با این حال اندازه گلچه‌ها کوچکتر از ریزنمونه مورد استفاده بود و شکاف‌های متعددی بر روی هریک از گلچه‌ها مشاهده شد (شکل ۳). بررسی اثر جهش القایی بر تغییر رنگ گل گونه‌های گیاهی زینتی دیگر نیز انجام شده است. Sugiyama و همکاران (۲۰۰۸)، به منظور بررسی اثر پرتوی یونی بر القای جهش در گیاه سیکلامن (*Cyclamen persicum*)، ابتدا ریزنمونه‌های کالوس، جنین سوماتیکی و گیاهچه‌های این گیاه را با دُز ۸۰-۱۰ گری پرتوی یونی $^{12}C^{6+}$ تیمار کردند.

شکل ۳- تولید جهش یافته پایدار گیاه داوودی (*C. morifolium*) از گیاه شیمر حاصل از تیمار با پرتوی یونیزه کربنی. الف) گیاه شیمر حاصل از پرتوتابی رقم H13، ب) گیاه جهش یافته پایدار حاصل از کشت بافت گیاه شیمر (Matsumura *et al*. 2010).

نتایج نشان داد میزان حساسیت ریزنمونه‌های کالوس نسبت به تابش یونی در مقایسه با گیاهچه‌ها بیشتر بود در حالی‌که جنین‌های سوماتیکی کمترین میزان حساسیت به این تابش را نشان دادند، بطوری‌که تیمار ریزنمونه‌های کالوس با دُز ٤۰ گری پرتوی یونی منجر به از بین رفتن تمام ریزنمونه‌ها شد و کاربرد دُزهای ٦۰ و ۸۰ گری این پرتو نیز مرگ

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

گیاهچه‌ها را بدنبال داشته است اما ۱۱ درصد جنین‌های سوماتیکی پس از تیمار با این شدت پرتوی یونی زنده باقی ماندند. با این وجود القای جهش در هیچکدام از گیاهچه‌های حاصل از تیمار این ۳ نوع ریزنمونه گزارش نشد. در مرحله بعدی این آزمایش، غده‌های پیازی رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای با دُزهای ٤، ٨، ١٢ و ١٦ گری پرتوی یونیزه کربنی تیمار شدند. میزان زنده‌مانی این غده‌ها پس از پرتودهی ۹۰-۵۰ درصد گزارش شد و تیمار غده‌ها با دُز ۱۲ گری، تولید گل‌هایی با رنگ‌های بنفش متمایل به قرمز و بنفش همراه با رگه‌های سفید را به همراه داشت (شکل ٤).

شکل ٤- گیاه سیکلامن (*Cyclamen persicum*) طبیعی (چپ) و جهش‌یافته‌های حاصل از پرتوتابی ریزنمونه‌ها با دُز ۱۲ گری پرتوی یونی $^{12}C^{6+}$ (Sugiyama *et al*. 2008).

با این حال بعضی از گل‌های جهش یافته همراه با گل‌های طبیعی بر روی یک گیاه حضور داشتند که این امر نشاندهنده ماهیت شیمری این جهش بوده است. اما در این آزمایش تلاشی به منظور تبدیل شیمرها به جهش یافته‌های پایدار صورت نگرفته است. همچنین تابش پرتوهای گاما و فرابنفش به ریزنمونه‌های برگ گیاه گلوکسینیا (*Siningia speciosa*) در شرایط درون‌شیشه‌ای منجر به تغییر رنگ گل‌های باززا شده نسبت به گیاه مادری شده است (Kaensaksiri & Kosakul 2006; Sirisum & Te-chato 2008) (شکل ٥). Miyazaki و همکاران (٢٠٠٦)، به منظور بررسی القای جهش در گیاه تورنیا (*Torenia hybrida*)، ریزنمونه‌های برگ و ساقه این گیاه را با دُزهای ٥، ١٠، ٢٠ و ٥٠ گری پرتوهای یونیزه نیتروژن و نئون تیمار کردند و رنگ گل‌ها را پس از باززایی در گیاهان تولید شده مورد بررسی قرار دادند.

شکل ٥- گیاه گلوکسینیا (*Siningia speciosa*) طبیعی (چپ) و جهش یافته‌های حاصل از پرتوتابی ریزنمونه‌ها با دُز ٤٠ گری پرتوی گاما در شرایط درون شیشه‌ای (Sirisum & Te-chato 2008).

نتایج این آزمایش نشاندهنده تاثیر جهش القایی بر تنوع رنگ گل‌های *T. hybrida* بود به طوری که گیاهان جهش یافته حاصل دارای گل‌هایی با رنگ‌های متنوع آبی، آبی روشن، صورتی و صورتی روشن بودند (شکل ٦). در این آزمایش میزان تولید گیاهان جهش یافته با میزان دُز پرتوی یونی نیتروژن ارتباط مستقیم داشت، به نحوی که کاربرد دُز ٥٠ گری این پرتو با القای جهش در ١٧/٨ درصد گیاهچه‌ها بیشترین میزان تولید گیاهان جهش یافته را به همراه داشت. این در حالی است که دُز ٢٠ گری پرتوی یونی نئون با تغییر رنگ گل در ١٥/٦ درصد گیاهچه‌ها بیشترین تاثیر را بر القای جهش در میان دُزهای مختلف این پرتو داشته است. همچنین بررسی میزان رنگدانه‌های آنتوسیانین موجود در گل‌های جهش یافته نشان داد مقدار این رنگدانه‌ها در گل‌های جهش یافته آبی روشن کمتر از گل‌های طبیعی بود در حالی که این میزان در گل‌های جهش یافته آبی نسبت به گل‌های طبیعی به بیش از ٣ برابر افزایش یافته بود. همچنین مقدار کل رنگدانه‌های موجود در گل‌های جهش یافته صورتی تقریبا برابر با گل‌های طبیعی بود اما مقدار رنگدانه‌های مالویدین و پتونیدین در این گل‌ها در مقایسه با گل‌های طبیعی افزایش یافته بود. این محققان افزایش تنوع رنگ گل‌های گیاه تورنیا (*T. hybrida*) را بدلیل اثر القای جهش بر جابجایی ژن‌های مسئول بیوسنتز رنگدانه‌ها دانسته‌اند که منجر به تغییر میزان بیان این ژن‌ها شده است و

[Downloaded from www.ejournal.jifpf.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

با اثر بر میزان هریک از رنگدانه‌های آنتوسیانینی موجود در گل‌های این گیاه، افزایش تنوع رنگ را به همراه داشته است. در آزمایشی دیگر نیز با پرتوتابی ریزنمونه‌های گره گیاه تورنیا (*T. hybrida*) به وسیله دُزهای ٤٠ و ٥٠ گری پرتوی گاما، به گیاهان جهش یافته با گل‌های آبی روشن، صورتی و صورتی روشن دست یافتند، در حالی که گل‌های طبیعی آبی رنگ بودند. تکثیر رویشی گیاهان جهش یافته و مشاهده اثر جهش در تمام گیاهان نسل بعدی آن‌ها نشان دهنده پایداری جهش القایی در این گیاهان بود (Suwanseree *et al*. 2011).

شکل ٦- گل طبیعی *T. hybrida* (بالا، چپ) و جهش یافته‌های حاصل از پرتوتابی ریزنمونه‌های آن (Miyazaki *et al*. 2006).

تغییر خصوصیات مورفولوژیکی گل

بررسی ژنوم گیاهان جهش یافته گونه‌های گیاهی مدل مانند آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و آنتوریوم (*Antirrhinum scherzerianum*) نشان‌دهنده دخالت ژن‌های متعدد در تعیین مورفولوژی گل‌ها است. از این رو اصلاح از طریق جهش با هدف تغییر مورفولوژی گل‌ها در گیاهان زینتی بدلیل محدودیت القای جهش موفقیت کمتری در پی داشته است. در تحقیقی که به منظور تولید گیاهان جهش یافته پایدار گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) انجام شد علاوه بر رنگ، شکل گل‌ها نیز در گیاهان جهش یافته حاصل تغییر یافت بطوری که گل‌های زبانه‌ای گیاه به صورت لوله‌ای تغییر شکل پیدا کردند. در این آزمایش تغییر رنگ گل جهش یافته‌های حاصل از رقم دارای گل‌های زرد رنگ مشاهده نشد اما شکل گل‌ها در این گیاهان جهش یافته تغییر یافت. همچنین لوله‌ای شدن گل‌های زبانه‌ای در اثر القای جهش در یکی از ارقام دارای گل‌های بنفش با سطح زیرین نقره‌ای منجر به تولید حلقه‌ای نقره‌ای رنگ در مرکز گل شد که به عنوان یک صفت اصلاحی مطلوب عنوان شده است (شکل ۷).

شکل ۷- گیاه طبیعی داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) (چپ) و جهش یافته آن (راست). الف) گل‌های جهش یافته دارای رنگ‌های متمایز نسبت به گیاه طبیعی، ب) گل‌های جهش یافته دارای رنگ و شکل تغییریافته، ج و د) گل‌های جهش یافته تغییرشکل‌یافته (Datta *et al*.2005).

مشاهده اثر جهش القایی پس از چندین نسل تکثیر نشان‌دهنده پایداری این جهش بوده است (Datta *et al*.2005). در تحقیقی دیگر تابش پرتوی گاما به منظور القای جهش در ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*)، تنوع در شکل و مورفولوژی گل‌های جهش یافته را در پی داشته است (شکل ۸). عدم ماهیت شیمری جهش القایی با مشاهده اثر آن در تمام گیاهان حاصل از تکثیر جهش یافته‌ها به اثبات رسید (Xi *et al*. 2012).

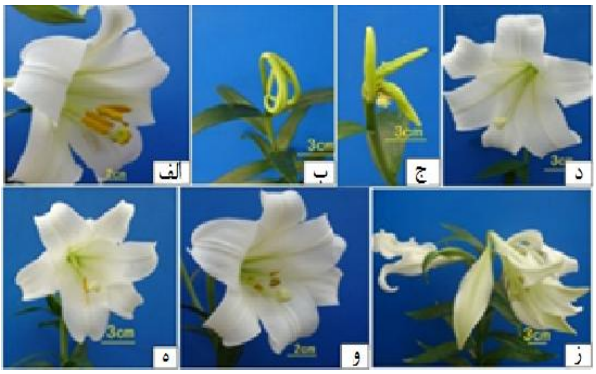
تغییر خصوصیات برگ‌ها

تغییر خصوصیات برگ در اصلاح از طریق جهش گیاهان زینتی عمدتا با هدف تغییر اندازه برگ‌ها و نیز افزایش تنوع رنگ برگ‌ها بویژه در گیاهان برگ‌زینتی صورت گرفته است، به طوری که Tangpong و همکاران (۲۰۰۹) بوسیله القای جهش در گیاه *Anubias congensis*، موفق به تولید

[Downloaded from www.ejournal.jgfv.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

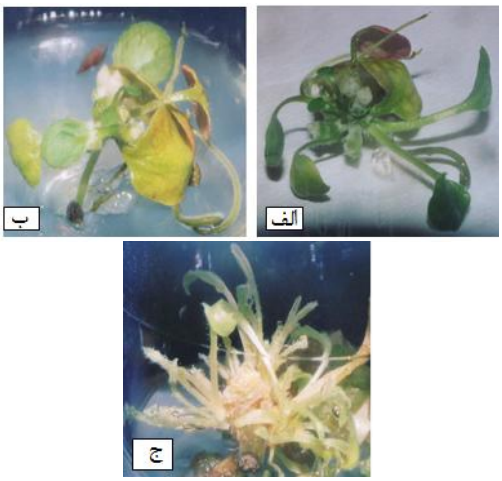
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

بوته‌های با حاشیه برگ موج‌دار و گیاهان پاکوتاه با برگ‌هایی به رنگ سبز روشن شدند. در این آزمایش، تاثیر دُزهای مختلف ۱۰۰-۲۰ گری پرتوی گاما به دو روش تدریجی و ناگهانی بر کشت درون شیشه‌ای *A. congensis* مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۸- گل‌های جهش یافته لیلیوم (*L. longiflorum*) حاصل از تابش پرتوی گاما. الف) گل طبیعی دارای ٦ پرچم، ب و ج) گل‌های جهش یافته کوچک و با شکل غیر طبیعی، د) گل جهش یافته فاقد پرچم، ه) گل جهش یافته حاوی دو پرچم، و) گل جهش یافته دارای میزان کم دانه گرده، ز) گل جهش یافته فاقد شکل زنگوله‌ای طبیعی (Xi *et al*. 2012).

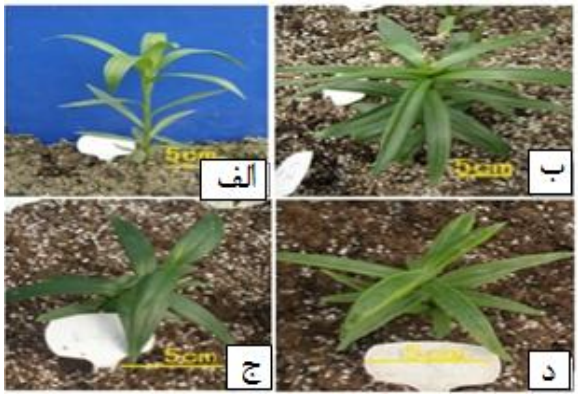
بر اساس نتایج این آزمایش، بیشترین میزان تولید بوته‌های دارای برگ‌های باریک و حاشیه موج‌دار و گیاهان پاکوتاه با برگ‌های سبز روشن با تابش ناگهانی دُز ۲۰ گری این پرتو و در نسل سوم بدست آمد، در تابش تدریجی گیاهان جهش یافته پاکوتاه و آلبینیسم در نسل سوم نیز مشاهده شد. در تحقیقی، تولید گیاهان دارای برگ‌های با شکل غیرطبیعی و فاقد رنگدانه‌های فتوسنتزی را از جمله نتایج القای جهش‌های مضر بر اثر تابش پرتوی یونیزه کربنی، اشعه ایکس و گاما بر ریزنمونه‌های برگ گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) در شرایط درون شیشه‌ای دانسته‌اند (Farjadi-shakib *et al*. 2010; Zhou *et al*. 2006)، به طوری که میزان بالای تولید گیاهان جهش یافته دارای ویژگی‌های ذکرشده با استفاده از تابش پرتوی یونیزه کربنی نسبت به اشعه ایکس بیانگر اثر نوع عامل جهش‌زای مورد استفاده بر القای جهش‌های مضر در این گیاه بوده است (Zhou *et al*. 2006). از جمله دلایل کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در اثر جهش القایی، ایجاد نقص در ژن‌های مسئول بیوسنتز رنگدانه‌ها، تخریب مسیرهای بیوسنتزی تولید رنگدانه‌ها، تخریب کلروپلاست و نیز تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌باشد (Hasbullah *et al*. 2012). در آزمایشی که توسط این محققان به منظور بررسی اثر القای جهش بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی موجود در کالوس گیاه ژربرا (*Gerbera jamesonii*) صورت گرفته است، مقدار ۲ گرم کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ این گیاه در معرض دُزهای ٦۰-۱۰ گری پرتوی گاما قرار گرفته و پس از گذشت ۷ روز از رشد کالوس‌ها در محیط کشت MS، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در آن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار جهشی موجب کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی موجود در کالوس‌ها شده و افزایش دُز پرتوی گاما تجزیه بیشتر کلروفیل‌ها را به همراه داشته است. همچنین در بیشتر تیمارها مقدار کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a بوده که احتمالا بدلیل حساسیت بالای مسیر بیوسنتزی کلروفیل a نسبت به تابش پرتوی گاما بوده است (شکل ۹).



شکل ۹- گیاهان ژربرا (*Gerbera jamesonii*) باززا شده حاصل از الف) تابش دُز ۳۰ گری، ب) ٤۰ گری، ج) ٦۰ گری پرتو گاما (Hasbullah *et al*. 2012).

[Downloaded from www.ijhpr.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

در تحقیقی دیگر القای جهش در گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) علاوه بر تغییر شکل گل‌ها، تغییر برخی خصوصیات برگ‌ها را در گیاهان جهش یافته بدنبال داشته است، بطوری‌که یکی از گیاهان جهش یافته نسبت به گیاه طبیعی تعداد برگ بیشتری تولید کرده و برگ‌های آن نیز بلندتر بوده است. همچنین برگ‌هایی با ضخامت بیشتر و دارای رگه‌های با رنگ زیتونی نیز در میان گیاهان جهش یافته مشاهده شد (شکل ۱۰). جهش القایی در تمام این گیاهان بصورت پایدار بوده است (Xi *et al.* 2012).



شکل ۱۰- گیاهان جهش یافته لیلیوم (*Lilium longiflorum*) دارای برگ‌های تغییرشکل‌یافته. الف) گیاه طبیعی، ب) گیاه جهش یافته دارای برگ‌های بلندتر با تعداد برگ بیشتر، ج) گیاه جهش یافته دارای برگ‌های با ضخامت بیشتر ، د) گیاه جهش یافته با برگ‌های پهن‌تر و دارای رگه‌های زیتونی‌رنگ (Xi *et al.* 2012).

تغییر خصوصیات رشدی گیاه

تولید گیاهان پاکوتاه و افزایش شاخه‌دهی همواره یکی از اهداف تولیدکنندگان گیاهان زینتی بوده است، بطوری‌که ابتدا از مواد شیمیایی به منظور به‌زراعی و کاهش رشد گیاهان زینتی استفاده شده است اما هزینه بالای کاربرد این مواد و نیز آلودگی زیست‌محیطی ناشی از آن، کاهش گرایش به کاربرد این مواد را بدنبال داشته است. در این راستا اصلاح از طریق جهش در گیاهان زینتی به منظور تغییر خصوصیات رشدی آن‌ها و تولید ارقام جهش یافته مفید عمدتا موفقیت‌آمیز بوده است، بطوری‌که Dwimahyani و Widiarsih (۲۰۱۰)، اثر تابش پرتوی گاما بر رشد ریزنمونه‌های گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بدین منظور، ریزنمونه‌های شاخه که ٤ برگی بودند را تحت تابش دُز ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گری پرتوی گاما قرار دادند. سپس ریزنمونه‌ها را به محیط کشت MS جامد منتقل کردند و تا ۳ نسل پس از تیمار ریزنمونه‌ها، صفات مورفولوژیکی و خصوصیات رشدی گیاهچه‌ها را بررسی کردند. طبق نتایج این آزمایش، دُز ۱۰ گری باعث افزایش سرعت رشد گیاهان در نسل اول شد اما دُز ۲۰گری مانع رشد برگ و شاخه به ترتیب در ۵۰ و ۷۳/۳ درصد ریزنمونه‌ها نسبت به تیمار شاهد شد. علاوه بر این، در میان ریزنمونه‌های تحت تیمار، گیاهچه‌های جهش یافته پاکوتاه، رزت و بوته‌هایی با برگ‌های تیغه‌ای و گرد نیز مشاهده شد.

Barakat و El-Sammak (۲۰۱۱) نیز به منظور بررسی القای جهش در گیاه زینتی گل چشماری (*Gypsophila paniculata*)، مریستم انتهایی و جوانه‌های جانبی این گیاه را به عنوان ریزنمونه جداسازی و پس از پرتوتابی با دُزهای ۱-۰/۲۵ گری پرتوی گاما، ریزنمونه‌ها را به محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی لازم برای باززایی منتقل کرده و در نهایت اثر جهش را در گیاهچه‌های باززا شده بررسی نمودند. طبق مشاهدات انجام شده، ۹ نوع گیاه جهش یافته بر اثر پرتوتابی ریزنمونه‌ها بدست آمد که ۷ نوع آن از لحاظ خصوصیات رشدی با گیاهچه‌های طبیعی متفاوت بودند (جدول ۲). همچنین در تحقیقی، با تابش دُز ٦۰ گری پرتوی گاما به ریزنمونه‌های کالوس گیاه ژربرا (*Gerbera jamesonii*) به گیاهچه‌های جهش یافته‌ای دست یافتند که ارتفاع آن‌ها به نصف ارتفاع گیاهچه‌های طبیعی کاهش یافته بود. این محققان دریافتند شدت بالای تابش با اثر بر غشا و دیواره سلولی از جذب آب توسط سلول‌های گیاهی جلوگیری کرده و در مسیر بیوسنتزی

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

هورمون‌ها نیز اختلال ایجاد می‌کند. این تغییرات فیزیولوژیکی در مجموع منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه‌های جهش یافته ژربرا شده است (Hasbullah *et al*. 2012). با توجه تحقیقات انجام‌شده مسیرهای بیوسنتزی متعددی در تعیین خصوصیات رشدی گیاهان نقش داشته که هریک از این مسیرها نیز توسط چندین ژن کنترل می‌شوند. از این رو با توجه به محدودیت تغییرات ژنتیکی حاصل از جهش، اثر هریک از این جهش‌ها ممکن است عدم ظهور تغییرات فنوتیپی بارزی را در گیاه به همراه داشته باشد. با این وجود، استفاده از این نوع جهش یافته‌ها در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی گونه‌های زینتی و تولید ارقام دارای ویژگی‌های متمایز موثر خواهد بود.

مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی

مهم‌ترین عامل در فروش گیاهان زینتی مخصوصا قلمه‌ها و گیاهان گلدانی، کیفیت بالای این محصولات است (Mork 2011). از آنجایی‌که در طول چند دهه اخیر، تقاضا برای تولید گیاهان زینتی بطور قابل توجهی افزایش یافته است، مهم‌ترین عامل محدود کننده برای کشت در مقیاس وسیع، حساسیت گیاهان به برخی پاتوژن‌ها از جمله قارچ، باکتری و ویروس است. بیماری‌های قارچی، مخرب‌ترین عامل در کاهش عملکرد و کیفیت گل‌ها عنوان شده است (Sharma *et al*. 2012). امکان تولید ارقام مقاوم از طریق اصلاح و یا انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها وجود دارد اما در تمام این تکنیک‌ها، ویژگی‌های مهم دیگر مانند رنگ، شکل و اندازه گل تغییر خواهد کرد. القای جهش در شرایط درون شیشه‌ای به منظور تولید ارقام مقاوم به تنش در گیاهان زینتی بررسی شده است. در آزمایشی اثر شرایط تنش را بر گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم ریزنمونه‌ها و پس از آن در شرایط طبیعی بررسی کردند. بدین منظور این محققان گلچه‌های زبانه‌ای گیاه داوودی را در معرض دُزهای ۵ و ۱۰ گری پرتو گاما قرار داده و سپس در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی لازم به همراه ۲۰۰ میکرومولار NaCl قرار دادند. تعدادی از ریزنمونه‌ها نیز به عنوان تیمار شاهد در معرض تابش قرار نگرفته و در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مشابه با سایر تیمارها اما فاقد NaCl کشت شدند.

جدول ۲- ویژگی‌های گیاهان جهش یافته *G.paniculata* حاصل از پرتوتابی گیاه طبیعی در شرایط درون شیشه‌ای (Barakat & El-Sammak 2011).

ژنوتیپ	نوع ریزنمونه	میزان دُز پرتو (گری)	اثر جهش القایی در گیاه
رقم موتانت ۱	مریستم انتهایی	۰/۲۵	افزایش تعداد گره و کاهش فواصل میانگره‌ها
رقم موتانت ۲	مریستم انتهایی	۰/۵	تولید برگ‌های سبز روشن
رقم موتانت ۳	مریستم انتهایی	۰/۷۵	تولید برگ‌های باریک
رقم موتانت ٤	مریستم انتهایی	۱	شاخه‌دهی در اطراف مریستم انتهایی
رقم موتانت ۵	جوانه جانبی	۰/۲۵	تولید گیاه پاکوتاه
رقم موتانت ٦	جوانه جانبی	۰/۲۵	بهبود خصوصیات مورفولوژیکی
رقم موتانت ۷	جوانه جانبی	۰/۵	افزایش شاخه‌دهی همراه با تولید برگ‌های سبز روشن
رقم موتانت ۸	جوانه جانبی	۰/۷۵	افزایش قابل توجه شاخه‌دهی همراه با افزایش اندازه برگ‌ها
رقم موتانت ۹	جوانه جانبی	۱	افزایش ارتفاع گیاه همراه با تولید برگ‌های سبز روشن

[Downloaded from www.ijlbpr.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

گیاهچه‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری باززا شده از ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS ۱/۲ منتقل شده و پس از گذشت ۱ هفته از انتقال گیاهچه‌ها به شرایط طبیعی تا زمان گلدهی، تمام بوته‌های تیمار جهشی با آب مقطر حاوی ۱۲۰ میکرومولار NaCl آبیاری شدند. آبیاری نیمی از بوته‌های تیمار شاهد به عنوان تیمار شاهد منفی با آب مقطر حاوی ۱۲۰ میکرومولار NaCl و سایر بوته‌ها نیز به عنوان تیمار شاهد مثبت با آب مقطر فاقد ترکیبات نمکی انجام شد. در طی گلدهی، ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان مانند میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید موجود در برگ‌ها، مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، میزان انجام واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدی و ترکیبات پرولین و پراکسید هیدروژن تولید شده توسط گیاهان در شرایط تنش ارزیابی شد. بر اساس نتایج بدست‌آمده تابش دُز ۵ گری پرتوی گاما به ریزنمونه‌ها به عنوان موثرترین تیمار به منظور تولید گیاهان جهش یافته مقاوم به شوری شناخته شد، بطوری که عملکرد بوته‌های حاصل از این تیمار از لحاظ بیشتر صفات مورد ارزیابی یکسان و یا مناسبتر از بوته‌های تیمار شاهد مثبت بوده است. در حالی‌که تابش دُز ۱۰ گری پرتوی گاما کاهش قابل توجه عملکرد بوته‌ها را در پاسخ به تنش شوری در پی داشته است (Hossain *et al.* 2006).

القای جهش در گیاه لیلیوم به منظور تولید ارقام جهش یافته مقاوم به بیماری و گزینش آن‌ها در سطح سلولی نیز موفقیت‌آمیز بوده است. بطور مثال در تحقیقی که به منظور تولید گیاهان لیلیوم مقاوم به قارچ فوزاریوم (*Fusarium oxysporum*) با استفاده از تکنیک گزینش سلول در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است، لاین‌های سلولی مقاوم از طریق کشت کالوس حاصل از قطعات فلس این گیاه در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت‌های متفاوتی از محلول ذخیره میسیلیوم قارچ، گزینش شدند. به منظور گزینش لاین‌های جهش یافته پس از گذشت ۱ ماه از رشد کالوس‌ها، توده‌های سلولی به محیط کشت MS جامد حاوی غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۷ درصد محلول ذخیره قارچ منتقل شدند. تقریبا در ۹٤ درصد کالوس‌ها کاهش رشد مشاهده شد و انتخاب در غلظت ۱۵ درصد محلول ذخیره قارچ صورت گرفت. کالوس‌های مقاوم دو ماهه به منظور باززایی پیازک‌ها و بررسی پایداری پیازک‌های باززا شده به محیط کشت MS حاوی ۵۰ درصد محلول ذخیره قارچ منتقل شدند. تنها ٦/٦ درصد کالوس‌ها باززا شدند و از میان گیاهچه‌های باززا شده، تقریبا ۷۵ درصد پیازک‌های مقاوم رشد نمودند و برگ‌های جدیدی تولید کردند. برای شناسایی گیاهچه‌های مقاوم، پیازک‌های باززایی پس از سازگاری به شرایط گلخانه منتقل شدند. گزینش لاین‌های مقاوم با استفاده از پاشش محلول اسپور قارچ *F. oxysporum* به گیاهان انجام شد. در نهایت ۳۳ گیاه جهش یافته مقاوم شناسایی شد درحالی‌که تمام گیاهان شاهد از بین رفتند. گیاهان جهش یافته هیچ تفاوتی در خصوصیات مورفولوژیکی نسبت به گیاهان شاهد نداشتند (Sharma *et al.* 2012).

در تحقیقی به منظور تولید گیاهان داوودی مقاوم به عامل بیماریزای *Septoria Obesa* Syd (عامل ایجاد بیماری لکه‌برگی در گیاه داوودی)، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ این گیاه در معرض دُزهای مختلف پرتوی گاما قرار گرفت. به منظور گزینش لاین‌های جهش یافته پس از گذشت ۱ ماه از رشد کالوس‌ها در محیط کشت MS مایع، توده‌های سلولی به محیط کشت MS جامد حاوی غلظت‌های ۲/۵ تا ۲۰ درصد محلول ذخیره میسیلیوم قارچ *S. Obesa* منتقل شدند. با توجه به حداکثر بقای سلول‌ها در تابش ۲۰ گری پرتو گاما، غلظت ۱۵درصد محلول ذخیره میسیلیوم به عنوان بالاترین مقدار عامل بیماریزای مورد استفاده شناسایی شده که مرگ تمام سلول‌ها

[Downloaded from www.ejournal.jsp.ac.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

را نیز به همراه نداشته است. سلول‌های باقیمانده از این تیمار در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی لازم برای باززایی کشت شده و گیاهچه‌های باززا شده از کالوس‌ها نیز پس از ریشه‌زایی به شرایط طبیعی منتقل شدند. گزینش لاین‌های مقاوم به بیماری لکه‌برگی با استفاده از پاشش محلول اسپور *S. Obesa* به گیاهان انجام شد. در نهایت ۱۵۰ گیاه جهش یافته مقاوم به بیماری لکه‌برگی شناسایی شد و پایداری جهش القایی نیز با مشاهده اثر جهش در نسل بعدی حاصل از تکثیر رویشی این گیاهان جهش یافته به اثبات رسید (Kumar *et al.* 2012).

تولید گیاهان پلی‌پلوئید

یکی از راهکارهای اصلاح از طریق جهش جهت افزایش تنوع گیاهان زینتی، القای پلی‌پلوئیدی بوسیله کاربرد عوامل جهش‌زا در طول کشت درون شیشه‌ای این گیاهان است، بطوری که گیاهان زینتی پلی‌پلوئید در مقایسه با والد خود عمدتا از ویژگی‌های مورفولوژیکی متمایزی برخوردارند. علاوه بر آن القای پلی‌پلوئیدی با مضاعف کردن تعداد کروموزوم‌ها، پایه ژنتیکی ژرم‌پلاسم وسیع‌تری را به منظور مطالعات اصلاحی فراهم می‌کند، از این رو القای پلی‌پلوئیدی در اصلاح از طریق جهش در گیاهان زینتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. نتایج بسیاری از تحقیقات انجام شده بر روی تولید ارقام گیاهی پلی‌پلوئید حاکی از موفقیت‌آمیز بودن کاربرد مواد جهش‌زا در کشت درون شیشه‌ای در مقایسه با شرایط طبیعی بوده است. در این میان، کلشی‌سین به عنوان یکی از مواد جهش‌زا در القای پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان زینتی موثر بوده است. بطور مثال، در تحقیقی که به منظور تولید ارقام تتراپلوئید در گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) صورت گرفت، گیاهچه‌های دیپلوئید رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای، در مرحله انتقال به شرایط طبیعی تحت تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد به مدت ۱۸، ۲٤ و ٤۸ ساعت قرار گرفتند. بدین منظور، پس از اینکه گیاهچه‌ها از شیشه‌های کشت خارج و شستشو شدند، به محیط کشت ریشه‌زایی شامل پیت-پرلایت منتقل شدند به طوری‌که مریستم انتهایی گیاهچه‌ها با پنبه آغشته در تیمارهای موردنظر کلشی‌سین پوشیده شده بود. نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت ۰/۰۵ درصد محلول کلشی‌سین به مدت ۲٤ ساعت بیشترین درصد تتراپلوئیدی را ایجاد کرده در حالی که، غلظت بالا و زمان بیشتر باعث از بین رفتن درصد بالاتری از گیاهان شد، به طوری که در تیمار ٤۸ ساعت همه گیاهچه‌ها از بین رفتند (امیری و همکاران ۱۳۹۳). در تحقیقی دیگر، دو آزمایش مستقل به منظور بررسی القا پلی‌پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) انجام شد. در آزمایش اول بذرها و در آزمایش دوم مریستم انتهایی تحت تیمار کلشی‌سین قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که تیمار جهشی بذرهای گیاه ریحان (*O. basilicum*) با استفاده از کلشی‌سین، تمام گیاهان غیر از تیمار شاهد از بین رفتند اما کاربرد این ماده با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد و در مدت زمان ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت در مرحله ۸-٦ برگی روی مریستم انتهایی این گیاه با استفاده از روش آغشته نمودن نوک مریستم انتهایی توسط گلوله پنبه‌ای منجر به تولید ارقام جهش یافته شده است، به طوری که بیشترین درصد تولید گیاهان جهش یافته تتراپلوئید با افزودن غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین در مدت زمان ٦ ساعت بدست آمده است (ملک‌زاده شفارودی و همکاران ۱۳۹۰).

نتیجه‌گیری

القای موتاسیون روش موثری در ایجاد تنوع و اصلاح گیاهان می‌باشد. مشکل اصلی در استفاده از این تکنیک نیاز داشتن به یک جمعیت بزرگ است که پیدا کردن صفت

[Downloaded from www.ijoveplus.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

مطلوب در آن امکان پذیر باشد. با این حال به نظر می‌رسد که با کشت بافت و انتخاب درون‌شیشه‌ای، این مشکل تسهیل شده است. علاوه بر این، کاربرد تکنیک جهش همراه با انتخاب بر اساس نشانگرها، عوامل جهش‌زا را کاربردی‌تر خواهد ساخت. تحقیقات انجام شده به منظور القای جهش در گیاهان زینتی با اهداف مختلفی شامل تغییر رنگ و شکل گل‌آذین و برگ‌ها، تفاوت در خصوصیات رشدی، ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز افزایش سطح کروموزومی صورت گرفته که نتایج آن‌ها نشان دهنده موفقیت آمیز بودن کاربرد اصلاح از طریق جهش در شرایط درون شیشه‌ای به منظور تولید ارقام جهش یافته مفید بوده است. در مجموع با توجه به بررسی-های انجام شده، ترکیب عوامل جهش‌زا با کشت درون شیشه‌ای تکنیک نسبتاً ساده و ارزانی است. روش‌های کشت درون شیشه‌ای، قابلیت استفاده از جهش را برای اصلاح گیاهان با تکثیر جنسی و غیرجنسی افزایش داده و در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی با تکثیر غیرجنسی، القای جهش در کشت بافت به روش موثری برای بهبود محصول تبدیل شده است. بنابراین هر پیشرفتی در شناخت فیزیولوژی گیاه و بهبود کارایی کشت بافت می‌تواند جهش یافته‌های جدیدی را از طریق بهبود برنامه‌های اصلاحی ایجاد کند. با توجه به کارآمد بودن روش القای جهش در شرایط درون شیشه‌ای جهت بهبود گیاهان و تولید ارقام جدید در مدت زمان کوتاه و سهولت و سرعت بیشتر این روش در مقابل سایر روش‌های اصلاحی، در تحقیقات می‌توان از عوامل جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی به عنوان القا کننده جهش در شرایط کشت بافت به منظور ایجاد جهش‌یافته‌هایی از گیاهان زینتی با فنوتیپ متمایز و معرفی ژنوتیپ‌های جدید استفاده کرد.

دستورالعمل ترویجی:

جهت افزایش تنوع و تولید ارقام با ویژگی‌های متمایز در گیاهان زینتی موارد ذیل پیشنهاد می‌گردد:

۱) شناخت فیزیولوژی گیاه و توجه به خصوصیات ژنتیکی گونه گیاهی به عنوان پیش‌نیاز تشخیص صحیح روش مناسب اعمال موتاسیون

۲) بهینه‌سازی شرایط اعمال موتاسیون مانند عامل جهش‌زای فیزیکی (تابش‌های الکترومغناطیس) و شیمیایی، شدت تیمار و مدت زمان قرارگیری در معرض این عوامل با توجه به نوع گیاه و ریزنمونه مورد استفاده

۳) بهینه‌سازی شرایط محیطی موثر بر باززایی ریزنمونه‌ها

٤) انتخاب زودهنگام گیاهان جهش یافته بر اساس نشانگرهای مولکولی

منابع

امیری ا، تقی‌زاده م، شور م، نعمتی ح و تهرانی‌فر ع (۱۳۹۳). بررسی امکان القاء پلی‌پلوئیدی در بنفشه افریقایی با استفاده از کلشی‌سین در گیاهچه‌های باززایی شده بنفشه افریقایی (*Saintpaulia ionantha*). هشتمین کنگره علوم باغبانی ایران، دانشگاه بوعلی‌سینا. ۳۲۵۹-۳۲۵٦.

ملک‌زاده شفارودی س، غنی ع، حبیبی م و امیری ا (۱۳۹۰). بررسی امکان القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L) با استفاده از کلشی‌سین. نشریه علوم باغبانی. ۲۵ (٤): ٤٦۹-٤٦۱.

Abu-Qaoud H, Abu-Rayya A, Yaish S (2010). *In vitro* regeneration and somaclonal variation of *Petunia hybrida*. J. Fruit Ornam. Plant Res.18:71-81.

Afrasiab H (2006). Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato. PhD

[Downloaded from www.ejournal.iau.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

thesis, university of Punjab, India.

Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K (2004). Review of global impact of mutation-derived varieties. Euphytica 135: 187-204.

Atak C, Celik O, Acik L (2011). Genetic analysis of Rhododendron mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Pak J Bot. 43: 1173-1182.

Bagheri N, Babaeian Jelodar N, Hasan Nataj E (2008). Genetic diversity if Iranian rice germplasm based on morphological traits. Iran J Agric Res. 6(2):235-243.

Bairu MW, Aremu AO, Staden JV (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul. 63:147-173.

Barakat M.N, El-Sammak, H (2011). *In vitro* mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L. Aust J Crop Sci. 5: 214-222.

Chakrabarty D, Datta SK (2010). Application of RAPD markers for characterization of γ-ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. Plant Biotechnol Rep. 4(3):237-242.

Chaleff RS (1983). Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science. 219: 676-682.

Chandler S, Tanaka Y (2007). Genetic modification in floriculture. Crit Rev Plant Sci. 26:169–197.

Chopra VL (2005). Mutagenesis: investigating the process and processing the outcome for crop improvement. Curr. Sci. 89: 353-359.

Datta SK, Chakrabarty D (2009). Management of chimera and *in vitro* mutagenesis for development of new flower color/shape and chlorophyll variegated mutants in chrysanthemum. In: Shu QY (eds) Induced Plant Mutations in Genomic Era. FAO and IAEA Publications, Vienna, Austria.

Datta SK, Misra P, Mandal AKA (2005). In vitromutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. Curr. Sci. 88: 155-158.

Dhooghe E, Denis S, Eeckhaut T, Reheul D Labeke MV (2009). *In vitro* induction of tetraploids in ornamental Ranunculus. Euphytica. 168:33–40.

Dita MA, Rispail N, Prats E, Rubiales D Singh KB (2006). Biotechnology approaches to oveacome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica. 147: 1-24.

Donini P, Sonnino A (1998). Induced mutation in mlant breeding: current Status and future outlook. In: Jain MS, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 225-291.

Dwimahyani I, Widiarsih S (2010). The Effects of Gamma Irradiation on the Growthand Propagation of *In-Vitro* Chrysanthemum Shoot Explants (cv. *Yellow Puma).* Atom Indonesia. 36 (2): 45 – 49.

Eeckhaut T, Werbrouck S, Leus L, Van Bockstaele EJ, Debergh PC (2004). Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 78: 241–246.

Ehsanpour AA, Amini F (2003). Plant cell and tissue culture. Jahad University, Isfahan.

Fang JY (2011). *In vitro* Mutation Induction of Saintpaulia Using Ethyl Methane sulfonate. J Hortic Sci. 46: 981-984.

Farjadi-shakib M, Naderi R, Mousavi A (2010). Effects of gamma-ray irradiation on African violet *in vitro* adventitious shoots. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People.

Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, Das PK (2011). Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicines treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tissue Organ Cult.. 106: 485-493.

Hasbullah NA, Taha RM, Saleh A, Mahmad N (2012). Irradiation effect onin vitroorganogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. Hort. bras. 30: 252-257.

Hossain Z, Mandal A, Datta S, Biwas A (2006). Isolation of a NaCl-tolerant mutant of *Chrysanthemum morifolium* by gamma radiation: *in vitro* mutagenesis and selection by salt stress. Funct. Plant Biol. 33: 91-101.

[Downloaded from www.ijoweb.com at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

Jain SM (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica. 118: 153-166.

Jain SM (2010). Mutagenesis in crop improvement under the climate change. Rom Biotechnol Lett. 15: 88-106.

Jeong JA, Lee CH (2006). Induction of variants of *cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum* Nakai by chemical mutagenesis *in vitro* and RAPD analysis. Korean J. Plant Res. 19: 374-380.

Kaensaksiri T, Kosakul T (2006). Effects of gamma radiation on gloxinia *Sinningia speciosa*. Journal of simple research, Keio Univ. 5: 13-23.

Kahl G, Meksem K (2010). Induced Mutations. In: Kahl G, Meksem K (Eds.) The Handbook of Plant Mutation Screening. WILEY-VCH Verlag.

Kang EJ, Lee YM, Yeop Sung S, Ha BK, Hoon Kim S, Sub Kim D, Kim JB, Kang SY (2013). Analysis of the Genetic Relationship of Gamma-irradiated *in vitro* Mutants Derived from Standard-type Chrysanthemum cv. Migok. Hortic Environ Biotechnol. 54(1):76-81.

Kengkarj P, SmitamanaP, Fujime Y (2008). Assessment of Somaclonal Variation in Chrysan-themum (*Dendranthema grandiflora* Kitam.) using RAPD and Morphological Analysis. Plant tissue cult. biotechnol. 18(2): 139-149.

Kumar B, Kumar S, Thakur M (2012). *In vitro* mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema Grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria Obesa* Syd. Int J plant res. 2: 103-107.

Latado RR, Adames AH, Neto AT (2004). *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethyl methanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell Tissue Organ Cult. 77: 103–106.

Lu G, Zhang X, Zou Y, Zou Q, Xiang X, Cao J (2007). Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Plant Cell Tiss Organ Cult. 88:319–327.

Maluszynski M, Ahloowalia BS, Sigurbjornsson B (1995). Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica. 85: 303-315.

Matsumura A, Nomizu T, Furutani N, Hayashi K (2010). Ray florets color and shape mutants induced by $^{12}C^{5+}$ ion beam irradiation in chrysanthemum. Sci Hort. 123: 558-561.

Mba C, Afza R, Bado S, Mohan Jain, S (2010). Induced Mutagenesis in Plants Using Physical and Chemical Agents. In: Davey MR, Anthony P (eds) Plant Cell Culture: Essential Methods, Wiley & Sons, Ltd. 111- 130.

Miyazaki K, Ken-ichi S, Iwaki K, Kusumi T, Abe T, Yoshida S, Fukui H (2006). Flower pigment mutations induced by heavy ion beam irradiation in an interspecific hybrid of *Torenia.* Plant Biotech. 23: 163-167.

Mork EK (2011). Disease resistance in ornamental plants. PhD thesis, University of Aarhus, Denmark.

Nasir IA, Jamal A, Rahman Z, Husnain T (2012). Molecular Analyses of Gladiolus Lines With Improved Resistance Against Fusarium Wilt. Pak J Bot. 44(1): 73-79.

Novak FJ, Brunner H (2000). Plant Breeding: induced mutation technology for crop improvement. IAEA Bulletin. 4: 25-33.

Palai SK, Rout GR (2011). Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. Hort Bras. 29: 613-617.

Pirovano A (1957). Elettrogenetica. Esperimenti su vegetali. Istituto di Frutticoltura e di Elettrogenetica, Italy.

Predieri S, Virgilio N (2007). *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication. In: Mohan Jain S, Haggman, H (eds) Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer, Netherlands. 6: 323-333.

Rajagopalan C (2000). Export potential of Indian floriculture and need of policy environment. Floric Today. 9: 29-33.

Sharma A, Kumar S, Ghani M, Thakur M, Raj H (2012). Development of Mutant Lines of Oriental Hybrid Lily Resistant to Fusarium oxysporum f.sp. Lilii Toxin(s). Plant Pathol J. 11(2) : 60-67.

Sirisum Y, Te-chato S (2008). Effect of ultraviolet-C (UV-C) on mutation of gloxinia (*Sinningia speciosa*). Warasan

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

Kaset. 141-151.

Sugiyama M, Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Ryuto H, Fukunishi N, Terakawa T, Abe T (2008). Biological effects of heavy-ion beam irradiation on cyclamen. Plant Biotech. 25: 101-104.

Suwanseree VW, Teerakathiti T, Wongchaochant S, Taychasinpitak T (2011). Petal colour and petal form mutations observed in *Torenia hybrida* following gamma irradiation in vitro. Kasetsart J Natl Sci. 45: 656-665.

Tangpong P, Taychasinpitak T, Jompuk C, Jompuk P (2009). Effects of Acute and Chronic Gamma Irradiations on *In vitro* Culture of *Anubias congensis.* Kasetsart J N S. 43: 449 – 457.

TeixeiradaSilva JA (2010). Thin Cell Layers: Power-Tool for Organogenesis of Floricultural Crops. In: Jain SM, Ochatt SJ (eds) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 377- 388.

TeixeiradaSilva JA, Tanaka M (2010). Thin Cell Layers: The Technique. In:Davey MR, Anthony P (eds) Plant Cell Culture:Essential Methods, Wiley, Japan. 25- 37.

Tran Thanh Van M (1973). The original TCL technique is described. Nat 246: 44–45.

Xi M, Sun L, Qiu S, Liu J, Xu J, Shi J (2012). *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). Plant Cell Rep. 31: 1043-1051.

Yang WR, Zhang QX, Pan HT, Sun M (2010). *In vitro* regeneration of Lilium tsingtauense Gilg and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. Propag Ornam Plants. 10:59–66.

Zalewska M, Tymoszuk A, Miler N (2011). New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explants types. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus. 10: 109-123.

Zhou LB, Li WJ, Ma S, Dong XC, Yu LX, Li Q, Zhou GM, Gao QX (2006). Effects of ion beam irradiation on adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of *Saintpaulia ionanhta.* Nucl Instrum Methods Phys Res. 244: 349-353.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]

In vitro Mutation-Breeding, an Effective Strategy for Increasing the Diversity of Ornamental Plants

Yazdi Mahboobeh[1], Bagheri Abdolreza [1*], Khadem Azadeh[1&2], Keykha Akhar Fatemeh[2]

1. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad

* Bagheriyazd@gmail.com

Abstract

Breeding and production of new varieties of ornamental plants as well as their propagation and development is an expanding industry. The application of ornamental plants in landscape and increasing the demand for new varieties has led the breeders to plan for production of new varieties with attractive colors, excessive perfumes, more durability and resistance to biotic and abiotic stresses. Generally, diversity is a basic principle in any breeding program and plant breeding relies on variety, selection, evaluation and production of new genotypes. One way to increase diversity is mutation induction at *in vitro* conditions. Application of this method can help to increase diversity and enhance the efficiency of breeding programs and improve or achieve useful traits which have been lost in the plants evolution process. This article reviews the new research outcomes for increasing the diversity via induced mutation of ornamental plants combined with modern methods such as plant tissue culture and molecular markers. According to this study, the application of mutagens at *in vitro* conditions, using the molecular markers for selection of mutant plants in the early stages and increasing the rate of their propagation for enhancing the efficiency of breeding of ornamental plants is suggested.

Key words: Diversity, Molecular markers, Mutation induction, Ornamental plants, Tissue culture.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:33 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.2.7]