

■ РЕФЕРАТИ СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ В «CYTOLOGY AND GENETICS», № 2, 2022 р.

POLYPLOIDY INDUCTION AND PLOIDY LEVEL DETERMINATION IN ANNUAL AND PERENNIAL DIPLOID MEDICAGO SPECIES USING THE ENUMERATION OF CHLOROPLASTS OF STOMATA GUARD CELLS

E. ANSARI¹, M. KHOSROWSHAHLI^{1*},
A. ETMINAN², A.A. JAFARI³

¹ Department of Plant breeding, Science and Research Branch,
Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Plant breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch,
Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

³ Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research,
Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

E-mail: mkhosrowchahli@yahoo.com

*Primary screening of original diploid species and induced autotetraploids after induction of single node cutting of three populations of perennial diploid *Medicago sativa* ssp *caerulea*: (Karaj1, Karaj2 and Tehran) and five annual diploid alfalfa species: (*M. lupulina*, *M. radiata*, *M. rigidula*, *M. truncatula*, *M. turbinata*) with three concentrations (0.10, 0.50, 1 %) of colchicine counting the chloroplasts number in the stomata guard cells was done. In addition, the ploidy levels of species were determined using usual method of chromosomes counting in the metaphase cells of root tip meristems. Results of ANOVA showed significant effects of species, colchicine concentration and their interaction for survival and polyploidy induction rate ($p < 0.01$). The highest and lowest survival rate (80.2 and 8.9 %) and tetraploidy induction (74.3 and 20.8 %) were obtained in 0.10 and 1.0 % colchicine concentration, respectively. In comparison, between species, the highest survival and tetraploidy induction rate were observed in *M. truncatula* (80.2 and 100 %) followed by *M. lupulina* (73.6 and 73.6 %), respectively. In contrast, the lowest survival and tetraploidy induction rate were observed in *M. turbinata* with 34 and 27.4 %, respectively. Chloroplasts enumeration in stomata cell guards showed that in the survived species the number of chloroplasts of stomata guard cells were ranged between 8.07 to 9.15 in diploids and between 14.94 to*

15.38 in tetraploids from induced diploids and five local tetraploid cultivated alfalfa cultivars, respectively. There was no significant difference between overall means of perennials and annual diploid alfalfa species for survival and tetraploidy induction. Ploidy levels have shown strong relationships with mean numbers of chloroplasts in stomata guard cells. It was concluded that enumeration of chloroplasts in stomata guard cells is an indirect and precise method for evaluating ploidy level in alfalfa.

Key words: alfalfa, ploidy, colchicine, chloroplasts, stomata guard cells.

ІНДУКЦІЯ ПОЛІПЛОЇДІЇ І ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ПЛОЇДНОСТІ В ОДНОРІЧНИХ І БАГАТОРІЧНИХ ДИПЛОЇДНИХ ВИДАХ *MEDICAGO* ЗА ДОПОМОГОЮ ВСТАНОВЛЕННЯ КІЛЬКОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ У ЗАМИКАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ПРОДИХІВ

Було проведено первинний скринінг вихідних диплоїдних видів і індукованих аутотетраплоїдів після індукції листкових живців трьох популяцій багаторічних диплоїдних видів медунки *Medicago sativa* ssp *caerulea*: (Karaj1, Karaj2 і Tehran) і п'яти однорічних диплоїдних видів люцерни: (*M. lupulina*, *M. radiata*, *M. rigidula*, *M. truncatula*, *M. turbinata*) за використання трьох концентрацій (0,10, 0,50, 1 %) колхіцину для підрахунку кількості хлоропластів у замикальних клітинах продихів. Окрім того, було визначено рівні плоїдності видів за допомогою звичайного методу підрахунку хромосом у метафазних клітинах меристем кореневих кінчиків. Результати ANOVA продемонстрували суттєвий вплив видів, концентрації колхіцину та їх взаємодії на рівень виживання та індукції поліплоїдії ($p < 0,01$). Найвищий та найнижчий рівні виживання (80,2 і 8,9 %) та індукції тетраплоїдії (74,3 і 20,8 %) було отримано за концентрації колхіцину 0,10 і 1,0 %, відповідно. При порівнянні видів найвищий рівень виживання та індукції тетраплоїдії спостерігали у *M. truncatula* (80,2 і 100 %) та у *M. lupulina* (73,6 і 73,6 %), відповідно. На відміну від цього, найнижчий рівень виживання та індукції тетраплоїдії було відмічено для *M. turbinata* – 34 і 27,4 %, відповідно. Підрахунок хлоропластів у замикальних клітинах продихів продемонстрував, що у видів, які вижили, кількість хлоропластів у замикальних клітинах продихів були у діапазоні від 8,07 до 9,15 у диплоїдів і від 14,94 до

© E. ANSARI, M. KHOSROWSHAHLI,
A. ETMINAN, A.A. JAFARI, 2022

15,38 у тетраплоїдів від індукованих диплоїдів та п'яти місцевих тетраплоїдних культурних сортів люцерни, відповідно. Не було значних відмінностей між загальними середніми показниками багаторічних і однорічних диплоїдних видів люцерни у плані виживання та індукції тетраплоїдії. Рівні плоїдності продемонстрували сильну кореляцію з середніми показниками хлоропластів у замикальних клітинах прорихів. Було зроблено висновок, що підрахунок хлоропластів у замикальних клітинах прорихів – це непрямий точний метод оцінки рівня плоїдності люцерни.

Ключові слова: люцерна, плоїдність, колхіцин, хлоропласти, замикальні клітини прорихів.

REFERENCES

- Cardi T, Carpoto D, Frusciante L. (1992) *In vitro* shoot regeneration and chromosome doubling in 2X and 3X potato cloned Am Potato J 69:1–12. doi: 10.1007/BF02853404
- Callum JB, Dixon RA, Farmer AD et al. (2001) The Medicago Genome Initiative: a model legume database Nucl Acid Res s29:114–117. doi: 10.1093/nar/29.1.114
- Chen LL, Gao Sh L. (2007) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus* Scientia Hort 112:339–334. doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.045
- Ghanavati F, Mozafari J, Masumi AA. (2004) Determination of ploidy level by counting the chloroplast number in stomata guard cells in *Medicago* sp. Seed Plant J 20:117–127 (In Persian)
- Ghanavati F, Nematpajooch N. (2012) Study of ploidy level of annual species of *Onobrychis* in Iran. Ca-ryologia 65(4):328–334. doi: 10.1080/00087114.2012.760880
- Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR. (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep 24:671–676. doi: 10.1007/s00299-005-0017-1
- Han DS, Niimi Y, Nakamo M. (1999) Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived haploid cell in Asiatic hybrid lily. J Japan Soc Hort Sci 68:979–983. doi:10.2503/jjshs.68.979
- Hawke JC, Leech RM. (1990) Acetyl coenzyme A carboxylase in species of Triticum of different ploidy Planta 81(4):543–546. doi:10.1007/BF00193008
- Koorneef M, Van Dieepen JAM, Hanhart CJ, et al. (1989) Chromosome instability in cell and tissue cultures of tomato haploid and diploid Euphytica 43:179–186. doi: 10.1007/BF00037911
- Lapiņa L, Grauda D, Rashal I. (2011) Characterization of Latvian alfalfa *Medicago sativa* genetic resources Acta Biol Universit Daugavpils 11(2):134–140
- Leech RM. (1981) Observation of the mechanism of chloroplast division in higher plants New Phytol 87(1):1–9. doi:10.1111/j.1469-8137.1981.tb01686.x
- Malekzadeh Shafaroodi SA, Ghani AS, Habibi MP, Amiri A. (2011) Evaluation of Polyploidy Induction in Basil (*Ocimumbasilicum*. L) J Hort Sci 25(4):461–469 (In Persian)
- Melnychuk OV, Ozheredov SP, Rakhmetov DB et al (2020a) The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock The Open Agr J 14:164–173. doi: 10.2174/1874331502014010164
- Melnychuk OV, Ozheredov SP, Rakhmetov DB et al. (2020b) Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.) Proc Latvian Acad Sci Section B 74(3):20–30. doi: 10.2478/prolas-2020-0032
- Mirzai NeduShen H. (2001) Annual medics (Genetics and Breeding). Research Institute of Forests and Rangelands publication. pp. 214. Tehran, Iran (In Persian)
- Murray H, Standing L. (1992) Genomic constancy during the development of *Lathyrus odoratus* cultivars Heredity 68:321–327. doi: 10.1038/hdy.1992.46
- Niazian M, Nalouisi AM. (2020) Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants Plant Cell Tiss Organ Cult 142(3):447–469. doi: 10.1007/s11240-020-01888-1
- Omidbaigi R, Mirzaee M, Hassani ME, Sedghi Moghadam M. (2010) Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment Int J Plant Prod 4(2):87–98. doi: 10.22069/IJPP.2012.686
- Quan K, Guolu L, Qigao G, Xiaolin L. (2004) Polyploid induction of *Arctium lappa* by colchicine Plant Physiol Commun 40:157–158
- Sakiroglu M, Sherman-Broyles S, Story A, Moore KJ, Doyle JJ, Brummer EC. (2012) Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*M. sativa* L.). Theor Appl Genet 125:577–590. doi: 10.1007/s00122-012-1854-2
- Sarathum S, Hegele M, Tantivivat S, Nanakorn M. (2010) Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy iInduction in *Dendrobium scabrilingue* L. Euro J Hort Sci 75:123–127
- Singsit C, Oaias-Akians P. (1992) Rapid estimation of ploidy levels of *in vitro* regenerated interspecific *Arachis* hybrids Euphytica 64:183–188. doi: 10.1007/BF00046047
- Sleper DA, Poehlman JM. (2006) Breeding Field Crops. Fifth edition. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 424, ISBN 1-56022-278-6
- Su-Jin B, Mazharul Islam Md, Hong-Yul K, and Ki-Byung L. (2020) Induction of Tetraploidy in Watermelon with Oryzalin Treatments Hort Sci Tech 38(3):385–393. doi: 10.7235/HORT.20200037
- Touchell DH, Palmer IE, Ranney TG. (2020) *In vitro* ploidy manipulation for crop improvement Front Plant Sci 11:722. doi: 10.3389/fpls.2020.00722

Received January 28, 2020
Received February 02, 2021
Accepted March 18, 2022