مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تاثیر کلشی‌سین بر خصوصیات رشدی و سیتوژنتیکی لاله واژگون (*Fritillaria raddeana* Regel.) در شرایط درون شیشه‌ای

سلاله صلاحی صدر[۱]، هدایت زکی زاده*[۲و۴]، محمدرضا نقوی[۳]، جمالعلی الفتی[۴و۲]

[۱] دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

[۲] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

[۳] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[۴] استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۹

چکیده

لاله واژگون گرگانی (*Fritillaria raddeana* Regel.) متعلق به خانواده سوسن است. دارای ارزش زینتی-دارویی و مقاومت نسبی به خشکی و مناطق سنگلاخی می‌باشد. القای پلوییدی در شرایط درون شیشه‌ای به عنوان راهکاری برای ایجاد گیاهان زینتی با خصوصیات و اشکال جدید و هم‌چنین دستیابی به گیاهانی با مقاومت بیشتر به خشکی و دمای پایین، از اهمیت بسزایی برخوردار است که این امر از طریق دو برابر کردن کروموزوم‌ها امکان‌پذیر است. در این راستا از مواد و روش‌های متعددی استفاده می‌شود که ممکن است در مواردی نه تنها در برخی گونه‌ها پلی‌پلوییدی ایجاد نشود، بلکه نتیجه‌ای بر خلاف نتایج معمول نیز به‌دست آید. این مطالعه در ابتدا با هدف امکان ایجاد گیاهان پلی‌پلویید با استفاده از کلشی‌سین انجام شد. کالوس‌های حاصل از کشت اندام‌های مختلف *F. raddeana* در محیط حاوی غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ درصد) به مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بازکشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. به علت پایین بودن سرعت رشد گیاه، درصد زنده‌مانی تا دو ماه پس از اعمال تیمار محاسبه شد. شمارش کروموزوم‌های نوک ریشه، مطالعات روزنه‌ای و آزمایشات فلوسایتومتری جهت تایید یا رد افزایش سطح پلوییدی انجام گرفت. نتایج نشان داد در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۱ درصد و زمان تیمار بیشتر از ۴۸ ساعت، درصد بالایی از کالوس‌ها یا گیاهچه‌های باززایی‌شده از بین رفتند و علی‌رغم افزایش در سرعت رشد و کاهش تعداد روزنه-ها در غلظت ۰/۰۱ درصد کلشی‌سین، تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرد و القای پلوییدی در گیاهان تیمار شده مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: *پلی‌پلوییدی، فلوسایتومتری، روزنه، کروموزوم.*

*نویسنده مسئول: هدایت زکی زاده تلفن: ۰۹۱۲۱۸۲۸۵۰۸ Email: Zakizadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

لاله واژگون (*F. raddeana*) گیاهی زینتی-دارویی مهم متعلق به خانواده سوسن است که در منابع مختلف، دیپلویید، با تعداد کروموزوم 2n=2x=24 گزارش شده‌است (Darlington, 1937; Bakhshi Khaniki, 1998; Jafari *et al*., 2014). این گیاه بومی و انحصاری در سال‌های اخیر به‌دلایل متعددی از جمله برداشت بی‌رویه از طبیعت، چرای دام، آلودگی شدید قارچی و باکتریایی درون‌زاد و هم‌چنین سرعت پایین تکثیر رویشی و زایشی به‌شدت در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. ریزازدیادی این گونه برای نخستین بار با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و ریزنمونه‌های متفاوت انجام گرفت (Salahi Sadr *et al*., 2015) و علی‌رغم آلودگی داخلی زیاد و زمان‌بر بودن پژوهش، ریزازدیادی با موفقیت انجام گرفت. علی‌رغم اینکه مطالعات کروموزومی می‌تواند در بررسی-های فیلوژنتیک و تاکسونومی گیاهان مفید باشد (Mirzaei et al., 2014)، مطالعات سیتوژنتیکی محدودی روی این گونه انجام گرفته است (Bakhshi Khaniki, 1998; Jafari *et al*., 2014, Ahmadi roshan *et al*., 2016). از آن‌جا که یکی از جنبه‌های مطالعات اصلاحی در جهان بر پایه ایجاد تنوع در خصوصیات گیاهان به خصوص گیاهان زینتی استوار است، انجام پژوهش برای ایجاد تنوع یا القای پلوییدی در شرایط درون-شیشه‌ای در گونه‌های جدید گیاهی با پتانسیل زینتی ضروری به‌نظر می‌رسد. ایجاد لاله‌های واژگونی با ساقه محکم‌تر و افراشته‌تر، ماندگاری بیشتر، دامنه کشت وسیع‌تر و گل‌های درشت‌تر و هم‌چنین مقاوم به تنش‌های محیطی می‌تواند از اهداف اصلی به‌نژادی در این گونه (*F.raddeana*) باشد. پیشرفت سیتوژنتیک مولکولی و امکان استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری و آنالیز تصویری کرموزوم‌ها باعث افزایش اطلاعات سیتوژنتیکی (Farjaminezhad *et al*., 2011) و ایجاد روش‌های متفاوت در به-نژادی گیاهان زینتی گردیده‌است که در این بین، تکنیک‌های القای پلی‌پلوئیدی درون‌شیشه‌ای توسط کلشی‌سین به عنوان روشی مؤثر در بهبود صفات کمی و کیفی این گیاهان به‌کاررفته است (Escandon *et al*., 2007). به‌صورت مصنوعی امکان ایجاد گیاهان پلی پلویید با دخالت بر تقسیم سلولی وجود دارد. کلشی‌سین از مواد طبیعی است که با اختلال بر تشکیل رشته‌های دوک و جلوگیری از تقسیم سلول و هسته این کار را انجام می‌دهد (Ganga & Chezhiyan, 2002). این ماده در کنار ایجاد حالت پلی‌پلوییدی اثرات جنبی دیگری از جمله تاثیر بر فرایندهای رشد و نموی و اندام‌زایی در گیاهان نیز دارد (Mohammadi *et al*., 2013). نوع پاسخ همه گونه‌های گیاهی به کلشی‌سین یکسان نیست و این ماده می‌تواند بر ویژگی‌های رشد و نموی گیاهان تاثیر منفی نیز داشته‌باشد (Chakraborti *et al*., 1998). اختلال در رشته‌های دوک به تنهایی برای تولید سلول‌های پلی‌پلویید کافی

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

نیست (Caperta *et al*., 2006)؛ القای پلوییدی به غلظت مورد استفاده، مدت زمان تیماردهی، نوع ریزنمونه و میزان نفوذپذیری بافت بستگی دارد (Allum *et al*., 2007). در آزمایش درون‌شیشه‌ای بر روی گیاه اطلسی، کلشی‌سین با غلظت ۰/۱ درصد به مدت پنج ساعت تیمار شد و ۸۰ درصد گیاهان زنده‌مانده کروموزوم‌های ژنومی دو برابر داشتند (Hasandokht & Ebrahimi, 2006). با این‌حال تیمار درون‌شیشه‌ای گیاهچه‌های حاصل از بذر در گیاه آزالیا با غلظت کلشی‌سین ۰/۰۵ و ۰/۲۵ درصد اثری بر سطح پلوییدی گیاه مورد نظر نداشت (Eeckhaut *et al*.,2001).

در پژوهش‌های انجام شده روی *F. cirrhosa* با استفاده از کلشی‌سین یک درصد در محیط کشت جهت القای پلوییدی، تا ۷۰ درصد کالوس‌های ایجاد شده تتراپلویید بودند (Wang *et al*., 2002; Wang, 2004). در آزمایش دیگری با به‌کارگیری ۰/۵ درصد کلشی‌سین در گونه *F. ussuriensis*، با روش غوطه‌وری به مدت ۲۴ساعت، گیاهانی تتراپلویید با محتوای آلکالوییدی بیشتر به‌دست آمد (Sui, 2013). در پژوهش روی آزالیا با استفاده از کلشی‌سین یک درصد، در بین نمونه‌های تیمارشده نمونه‌هایی بدون تغییر در سطح کروموزومی‌دیده‌شد که اختلاف رشد ظاهری بسیار زیادی نسبت به نمونه‌های شاهد و پلی‌پلویید نشان دادند (Eiselein, 1994). کلشی‌سین هم‌چنین می‌تواند بر فرایندهای متابولیکی اثر بگذارد بدون اینکه ارتباطی با میکروتوبول‌ها داشته باشد(Sloan & Camper, 1981). گزارش شده‌است که فعالیت بیوشیمیایی کلشی‌سین نیز نسبت به عملکرد سیتولوژیکی آن تقریبا مبهم است (Paul *et al*., 1978). مطالعات روی تاثیر فیزیولوژیکی کلشی-سین بر بافت‌های گیاهی بسیار کم و قدیمی است. افزایش رشد دانهال‌های درختان بر اثر اسپری محلول رقیق کلشی‌سین روی مریستم انتهایی گزارش شده است(Newcomer, 1945)، هم‌چنین این ماده به عنوان یک محرک قوی در افزایش پنجه‌زنی، عملکرد و زودرسی برنج بیان شده است (Ghosh, 1950).

افزایش سطح پلوئیدی هسته، اغلب باعث تغییرات ساختاری از قبیل تراکم روزنه، افزایش اندازه سلول‌های روزنه‌ای وتعداد کلروپلاست درسلول می‌شود. تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های نگهبان روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر ازعوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. با افزایش سطح پلوئیدی، طول وعرض روزنه‌ها افزایش یافته و در نتیجه تراکم روزنه‌ای کاهش می‌یابد (Watrous & Wimber, 1988).

آن‌چه در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته-است تاثیر کلشی‌سین بر تعداد کروموزوم‌های *F. raddeana* و تراکم روزنه‌ای آن است. این بررسی‌ها از طریق مطالعات سیتوژنتیکی، مطالعات روزنه‌ای و بررسی‌های فلوسایتومتری است. در صورتی‌که کلشی‌سین اثر مثبتی بر *F. raddaena* داشته‌باشد می‌توان از آن برای تبدیل لاله واژگون

دیپلویید به تتراپلویید با ویژگی‌های برتر استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مطالعات کشت بافت: به‌منظور اطمینان از یکنواختی ژنتیکی و هم‌چنین عدم وجود آلودگی خارجی و داخلی مواد گیاهی، در این آزمایش از کالوس‌ها و ریزنمونه‌های به‌دست آمده توسط کشت درون شیشه‌ای لاله واژگون (*F. raddeana*) استفاده شد. آزمایشات کشت بافت این گونه گیاهی رو به انقراض، طی دو سال از ریزنمونه‌های مختلف (سوخ، بذر، گلبرگ و برگ) و در محیط کشت‌های متفاوت انجام شد و کالوس‌های به‌دست آمده در محیط مناسب ریشه-زایی قرار گرفت. بهترین محیط کالوس‌زایی، محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۲ میلی-گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین (KIN) و مناسب‌ترین محیط ریشه‌زایی، محیط MS شامل ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتراینداول بوتیریک اسید (IBA) و ۰/۲۵ میلی-گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بود (Salahi Sadr, 2016; Unpublished data).

مطالعات سیتوژنتیکی: ریشه‌های استخراج شده از کالوس برای به‌دست آوردن بهترین و مناسب‌ترین شیوه بررسی سیتوژنتیک، با روش-های مختلف پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ-آمیزی شد. برای تشخیص بهترین پیش‌تیمار، نوک ریشه جدا و در هر یک از تیمارهای زیر به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت:

۱- تیمار با محلول ۰/۰۰۲ مولار ۸-هیدروکسی کوینولین[1] به مدت ۲/۵ الی ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس (روش لاکتو پروپیونیک ارسئین، Bosemark, 1963). ۲- تیمار با محلول ترکیبی ۱:۱ از ۸- هیدروکسی کوینولین ۰/۰۰۲ مولار: کلشی‌سین (۰/۳درصد وزن به حجم) به مدت ۳ ساعت (Kamari, 1984). ۳- تیمار با محلول ۰/۰۰۳ مولار ۸-هیدروکسی کوینولین به مدت ۳ الی ۳/۵ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس (Agayev, 2002). ۴- تیمار با محلول ۰/۰۵درصد وزن به حجم کلشی‌سین به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و تاریکی (Karimzadeh, 2010 and 2011). ۵- تیمار در محلول آبی مونوبرومونفتالن[2] (در اتانول) به مدت ۶ ساعت در ۵ درجه سلسیوس (Zaharof, 1987).

نمونه‌های پیش‌تیمار شده با روش‌های یک و دو که در بالا به آن‌ها اشاره شد در محلول تثبیت‌کننده کارنوی[3] (استیک اسید - اتانول ، ۱: ۳ سه حجم اتانول به یک حجم اسید)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ تا ۱۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. از محلول کارنوی (به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ الی ۱۰ درجه سلسیوس) و همچنین محلول لویتسکی[4] (فرمالدئید ۱۰درصد با اکسید کروم) (به مدت ۱۸ الی ۳۰ ساعت در دمای ۴ الی ۱۰ درجه سلسیوس) به‌عنوان محلول تثبیت کننده برای ریشه‌های پیش‌تیمار شده با روش سه استفاده گردید. هم‌چنین به‌منظور تثبیت ریشه‌های

[1]-8-hydroxyquinolin
[2] -α-bromonaphthalene
[3]-Carnoy
[4]-Levitsky

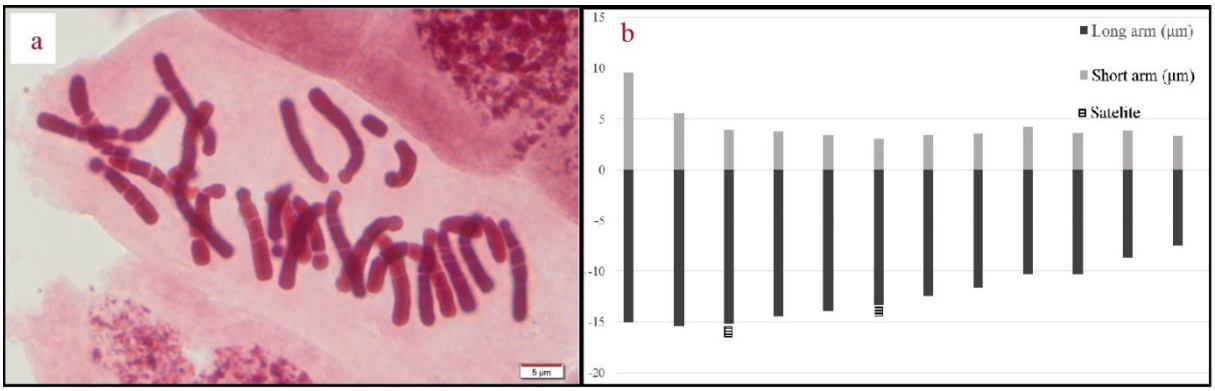
پیش‌تیمار شده با روش چهارم، ابتدا ریشه‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در KCl (۰/۱ مولار ، ۰/۵۶ درصد وزنی به وزنی) و سپس در محلول کارنوی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. برای تثبیت ریشه‌های پیش‌تیمار شده با روش پنجم از محلول کارنوی، به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استفاده گردید. پس از مرحله تثبیت، نمونه‌ها درون صافی‌های به مدت ۳ ساعت در زیر آب جاری قرار داده شدند. از آن‌جا که نتایج هضم دیواره سلولی در مرحله هیدرولیز، پس از مشاهدات میکروسکوپی مشخص می‌شود غلظت و بازه زمانی مورد نیاز در این مرحله به روش آزمون و خطا به‌دست آمد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر با استفاده از NaOH و HCl یک نرمال و با تیمارهای دمایی مختلف شامل ۴۵، ۵۰ و ۶۰ درجه سلسیوس در بن‌ماری و دمای اتاق هیدرولیز شدند تا بهترین شرایط دمایی و زمانی به دست آید، سپس مجددا با آب مقطر آبشویی گردیدند. برای رنگ آمیزی نمونه‌ها روش‌های استوآیرون هماتوکسیلین[1] (۱۷-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس) (Agayev, 1998)، استوآیرون هماتوکسیلین (یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس) (Agayev, 2002)، استو ارسئین[2](۱۵-۲۰ دقیقه در دمای اتاق) (Karimzadeh *et al*., 2011) مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها ۳۰ دقیقه با چند بار تعویض در آب مقطر شسته شده و یک الی دو میلی‌متر انتهایی آن‌ها جدا گردید پس از افزودن یک قطره استیک اسید ۴۵ درصد عمل له کردن [3] انجام گرفت. از بهترین صفحه‌های متافازی با میکروسکوپ نوری (BX51, Olympus Optical, Tokyo, Japan) عکس-برداری و پنج صفحه متافازی مناسب انتخاب شد. کروموزوم‌ها با نرم‌افزار میکرومژر (Micromeasure 3.3) و ایدیوکار (Ideokar 1.2) اندازه‌گیری و داده‌ها با برنامه اکسل (Excel, 2013) ارزیابی شدند و پس از آن شناسایی و نام-گذاری موقعیت سانترومرها به‌روش لوان (Levan *et al*., 1964) و بررسی تقارن کاریوتایپ به‌روش استبینز (Stebbins, 1971) انجام گرفت. جهت مطالعات پلوییدی، محیط‌های MS حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA آماده و اتوکلاو شدند. پیش از جامد شدن محیط‌ها و در زیر هود، کلشی‌سین در غلظت‌های مورد نظر به هریک از محیط‌ها تزریق شد. افزودن تنظیم‌کننده رشد IBA به محیط کشت از اثرات بازدارندگی کلشی‌سین می-کاهد. قابل ذکر است که کلشی‌سین عملکرد ژن-های مسئول فعالیت‌های H^+-PPase و PPi-ATP را کاهش می‌دهد و IBA با اثر اکسینی خود، موجب افزایش دامنه فعالیت انتقال H^+ و تنظیم فعالیت ژن‌های ذکرشده می‌گردد (Wang *et al*., 2001). کالوس‌های به‌دست آمده از مراحل قبل که بالای ۵۰ میلی‌گرم وزن داشتند با سطوح متفاوت کلشی‌سین (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد) و شاهد در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸

[1]- Aceto-Iron-Hematoxline
[2]-Aceto Orcein
[3] - Squash

و ۷۲ ساعت تیمار شدند و به‌منظور کاهش تلفات ریزنمونه‌ها بر اثر سمیت کلشی‌سین درون جعبه و در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند (Chen & Goeden-Kallemey, 1979). پس از اتمام مدت زمان تیمار، کالوس‌ها از محیط حاوی کلشی‌سین خارج و به محیط MS پایه انتقال یافتند. به‌دلیل سرعت رشد پایین *F. raddeana*، درصد بقای کالوس حدود ۲ ماه پس از تیمار با کلشی‌سین با تقسیم تعداد کالوس زنده مانده به تعداد کل کالوس‌های تیمار شده محاسبه شد، کالوس‌ها از این محیط خارج و در محیط ریشه-زایی کشت شدند. سپس یک الی دو سانتی‌متر ریشه‌ها در شرایط استریل جدا شده و به روش ذکرشده پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ آمیزی گردیدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار (سه شیشه کشت، سه ریزنمونه در هر شیشه) انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام و مقایسه میانگین تیمارها به‌وسیله آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. برای مطالعات روزنه‌ای، کالوس‌های ریشه‌دار شده به محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA انتقال یافتند. طبق نتایج قبلی، این محیط بهترین محیط برای شاخساره‌زایی گونه *F. raddeana* تشخیص داده شده بود (Salahi Sadr, 2016; Unpublished data). پس از گذشت حدود هشت‌ماه از تیمار اولیه با کلشی‌سین، برگ‌های گیاهچه‌های به دست‌آمده و نیز گیاهان شاهد را در شرایط استریل جدا نموده و سطح برگ‌ها توسط لاک بی‌رنگ کاملا پوشانده‌شدند و بعد از خشک شدن لاک، تکه‌ای چسب نواری روی قسمت لاک خورده چسبانده و بلافاصله برداشته شد. بدین صورت روزنه‌ها روی سطح نوارچسب چسبیده می‌شوند. در آخرین مرحله نوار چسب به آرامی و با دقت بدون ایجاد حباب روی لام چسبانده و با میکروسکوپ نوری مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت. آزمایشات فلوسایتومتری نیز توسط دستگاه فلوسایتومتر BD FACSConta II (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) موجود در دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام شد تا سطح پلوییدی نمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین تاییدی بر نتایج آزمایشات سیتوژنتیک باشد. یک بار نمونه‌های شاهد (*F. raddeana*, 2c value = 91.1, Zonneveld, 2010) به همراه گیاه استاندارد باقلا (*Vicia faba*, 2C value= 26.56 pg., Kotseruba *et al.*, 2000) و بار دیگر نمونه‌های تیمارشده به همراه گیاه استاندارد در پتری دیش حاوی بافر گیاهان چوبی (Woody Plant Buffer, WPB) قرار گرفتند و با تیغ تیز به قطعات کوچک تقسیم و از فیلترهای مخصوص ۳۰ و ۵۰ میکرومتر عبور داده شدند. به عصاره استخراج شده ۵۰ میکرولیتر RNase و ۵۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یدید (PI) افزوده و داده‌های به دست‌آمده با نرم‌افزار فلومکس (Flowmax 2.4) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

مطالعات سیتوژنتیکی: بهترین روش مطالعات سیتوژنتیکی در گونه *F. raddeana* شامل پیش تیمار با کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ ساعت در تاریکی و دمای اتاق، تثبیت در کارنوی (۳ حجم اتانول، یک حجم استیک اسید) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس، هیدرولیز با کلریدریک اسید در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ دقیقه، شستشو با آب مقطر و رنگ آمیزی با استواورسئین به مدت ۳ تا ۵ ساعت (Karimzadeh *et al*., 2011) بود. بررسی‌های سیتوژنتیکی انجام شده روی کالوس‌های شاهد ریشه‌دارشده نشان داد که تعداد کروموزوم نمونه‌ها همانند منابع 2n=24 بود (Darlington, 1930; Bakhshi Khaniki, 2002; Ahmadi Roshan *et al*., 2016). کاریوتایپ این گونه مطابق روش لوان و همکاران (Levan *et al*., 1964)، دارای یک جفت کروموزوم متاسنتریک، پنج جفت ساب متاسنتریک و شش جفت ساب تلوسنتریک و عموما دارای ماهواره روی بازوهای بلند جفت کروموزوم‌های شماره سه و شش بود و مطابق طبقه‌بندی استبینز (Stebbins, 1971) از لحاظ تقارن کاریوتایپ در کلاس 3A قرار گرفت که نشان‌دهنده تقارن نسبی و ابتدایی بودن گونه مورد بررسی است (شکل ۱ a-b).



شکل ۱- a: کروموزوم‌های دیپلویید (2n=2x=24) *Fritillaria raddeana* (با استفاده از عدسی ۱۰۰x) (bar =5 µm)، b- ایدیوگرام کروموزوم‌های هاپلویید *F. raddeana*.

Figure 1- a: Diploid chromosomes (2n=2x=24) of *Fritillaria raddeana* (using a ×100 microscope objective) (bar =5 µm), b: Idiograms of haploid chromosomes in *F. raddeana*.

مطالعات پلوییدی: پس از دستیابی به بهترین روش مطالعات کروموزومی و ارزیابی خصوصیات سیتوژنتیکی نمونه‌های شاهد، به‌منظور القای پلوییدی، کالوس‌های *F. raddeana* با کلشی‌سین تیمار شدند. ابتدا درصد بقای کالوس در محیط‌های حاوی کلشی‌سین اندازه‌گیری شد. جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) و نتایج بررسی آماری تاثیر مدت زمان تیمار با

کلشی‌سین بر زنده‌مانی کالوس‌ها (شکل ۲) نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تیمار از درصد زنده‌مانی کالوس‌ها کاسته می‌شود و بیشترین میانگین در تیمار ۲۴ ساعت دیده شد (۶۴/۴۴ درصد) . در بین نمونه‌های شاهد، بیشترین درصد بقا مربوط به تیمار زمانی ۲۴ ساعت بود و پس از آن سایر تیمارهای شاهد دارای بالاترین درصد زنده‌مانی بودند. بین تیمارهای ۰/۰۰۱ و ۰/۰۵ درصد در تمام بازه‌های زمانی تفاوت معنی‌داری از لحاظ بقا دیده‌نشد، در نتیجه به‌منظور صرفه-جویی در زمان، اولویت با تیمار زمانی ۲۴ ساعت در نظر گرفته‌شد (شکل ۳).

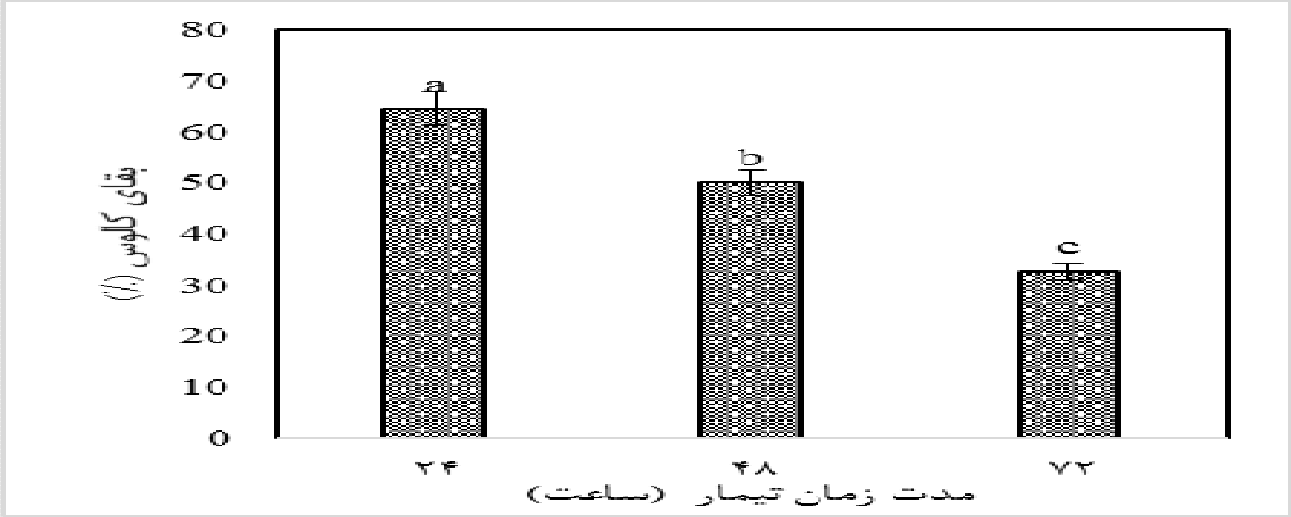
به‌طور معمول کلشی‌سین بسته به نوع گیاه در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد به‌مدت چند ساعت تا چند روز به‌کار می‌رود (Farsi & Bagheri, 1992). غلظت‌های بیشتر معمولا باعث سوختگی کامل و از بین رفتن گیاهچه‌ها یا کالوس‌های تیمار شده می‌شوند. به‌نظر می‌رسد فعالیت کلشی‌سین در مریستم متمرکز باشد و یک اختلال فیزیولوژیکی در کاهش تقسیم سلولی و یا مرگ ریزنمونه‌ها ایجاد کند (Gu *et al*., 2005).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس درصد بقای کالوس‌های *Fritillaria raddeana*.

Table 1- Anova table of callus survival percent in *Fritillaria raddeana*.

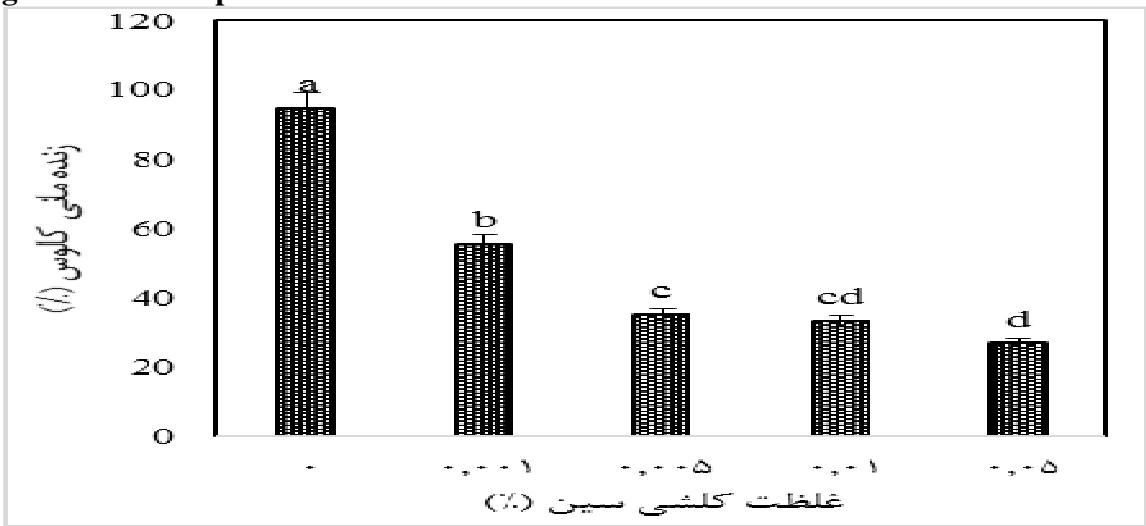
منابع تغییرات **S.O.V**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **MS**
مدت زمان تیماردهی **Treatment duration**	2	3770.06**
غلظت کلشی‌سین **Colchicine concentration**	4	6828.70**
مدت زمان * غلظت **Duration * Concentration**	8	241.89**
خطا **Error**	30	29.32
ضریب تغییرات **C.V**		11.03

**** The significance is indicated P< 0.01.**



شکل ۲- اثر مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر درصد بقای کالوس در *Fritillaria raddeana*.

Fig 2: Effect of exposure time of colchicine on callus survival in *Fritillaria raddeana*.



شکل ۳- مقایسه اثر غلظت کلشی‌سین بر درصد بقای کالوس در *Fritillaria raddeana*.

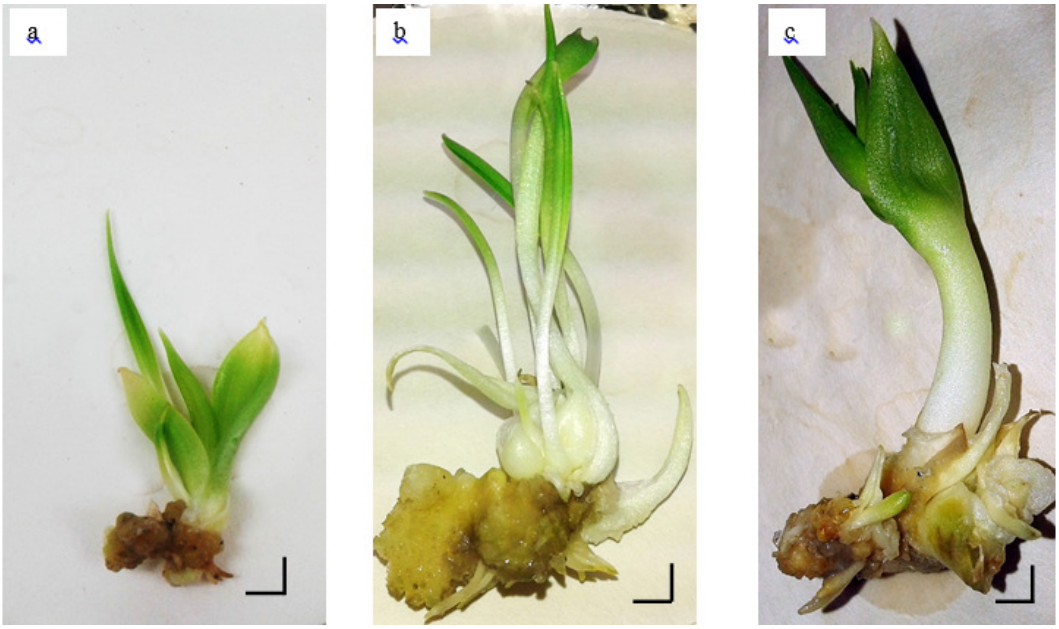
Figure 3- Effect of colchicine concentration on callus survival in *Fritillaria raddeana*.

در تحقیق حاضر بالاترین درصد سوختگی و تلفات ریزنمونه در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد و در تیمار زمانی ۷۲ ساعت مشاهده‌شد و نمونه-های شاهد همگی به رشد معمول خود ادامه دادند. این نتایج با بررسی‌های انجام شده روی گل‌های نرگس (Ahmadi Majd *et al*., 2013)، سوسن (Wu *et al*., 2007) و گیاه زرشک (Lehrer *et al*., 2008) مطابقت دارد. رابطه معکوس بین زمان تیمار و غلظت کلشی‌سین با بقای نمونه‌ها، در مورد مطالعات درون و برون شیشه‌ای گیاهان دیگر نیز صدق می‌کند (Chen & Gao, 2007). همان‌طور که ذکر شد، علاوه بر غلظت کلشی‌سین، زمان تیمار نیز عامل موثری در زنده‌مانی گیاهچه‌ها است (Rubuluza *et al*., 2007Thao *et al*., 2003;) و با افزایش زمان تیماردهی، میانگین زنده‌مانی در ریزنمونه‌ها

کاهش می‌یابد. در این پژوهش،همزمان با افزایش غلظت کلشی‌سین و زمان قرارگیری در محیط حاوی کلشی‌سین بر تلفات ریزنمونه‌ها افزوده شد. این رابطه بدین صورت است که بازه‌های زمانی بیشتر نسبت به غلظت‌های بالاتر، در سوختگی ریزنمونه‌ها تاثیر بیشتری داشت. هرچه مدت زمان قرارگیری نمونه‌های *F. raddeana* در محیط حاوی کلشی‌سین بیشتر شد، نفوذ به درون بافت بیشتر و سمیت ماده نیز بیشتر بود.

مشاهدات نشان داد که گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کالوس‌های زنده مانده در تیمار کلشی‌سین ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد از نظر سرعت رشد و اندازه برگ و ساقه با گیاهان شاهد تفاوت بسیار زیادی نشان دادند. این گیاهچه‌ها عموما برگ‌های پهن‌تر، طول میانگره بلندتر، سرعت رشد بسیار بیشتر و از نظر زمانی سوخ‌دهی سریع‌تری داشتند (شکل ۴)؛ این اثر کلشی‌سین بر روی افزایش رشد می‌تواند به دلیل تاثیر شبه هورمونی و تقویتی آن بر روی رشد گیاه باشد. اما در آزمایش روی کنجد گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین میانگره‌های کوتاه‌تر، برگ‌های دفرمه و جهش‌های کلروفیل داشتند و در غلظت‌های پایین (کمتر از ۰/۱۲ درصد) جهش‌یافته‌ها زودرس‌تر با عملکرد بالاتر بودند (Mensah *et al*., 2007).

نتایج در مورد سایر اثرات کلشی‌سین در گیاهان متفاوت است. به‌عنوان مثال در پژوهشی دیگر در زمینه تاثیر کلشی‌سین بر طول عمر زنبق، با به‌کارگیری تیمار ۰/۲ گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۴ ساعت، کربوهیدرات کل،تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، طول و عرض برگ‌ها و طول عمر گیاه (درحدود ۱۵ روز) نسبت به شاهد افزایش یافت (Ghasemi *et al*., 2014). در گونه‌ای حنا (*Impatiens patula*) نیز افزایش سطح پلوییدی با تیمارهای ۰/۰۳ تا ۰/۰۹ درصد کلشی‌سین دیده‌شد و گیاهان تتراپلویید ایجاد شده دارای تعداد روزنه کمتر، سلول‌های نگهبان روزنه بزرگ‌تر و ضخامت برگ بیشتر بودند، ولی در اندازه گل تغییری ایجاد نشد (Tharawoot *et al*., 2012). افزایش کلروپلاست سلول‌های نگهبان روزنه عملکرد آن را بالا برده و در نتیجه تراکم روزنه کاهش می‌یابد (Ghotbi-Ravandi *et al*., 2013). مشاهدات میکروسکوپی روزنه *F. raddeana* در این پژوهش (شکل ۵) و بررسی‌های آماری غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر روی روزنه (شکل های ۶ و ۷)، کمتر بودن میانگین تعداد روزنه را در گیاهان تیمار شده با سطح ۰/۰۱ درصد کلشی‌سین و تیمار زمانی ۴۸ ساعت نشان داد. در بررسی مقایسات میانگین با آزمون توکی و نتایج حاصل از تجزیه واریانس نیز اختلاف معنی‌داری مابین غلظت و زمان از نظر تعداد روزنه دیده شد (جدول ۲)؛ این درحالی بود که بررسی‌های سیتوژنتیکی هیچ‌گونه تغییری در سطح پلوییدی این تیمارها نشان ندادند.



شکل ۴- a: گیاهچه ۲ ماهه باززایی شده از کالوس‌های شاهد *Fritillaria raddeana*، b: گیاهچه ۲ ماهه باززایی شده از کالوس تیمار شده با کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد،c: نمونه گیاه ۲ ماهه باززایی شده از کالوس تیمارشده با کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد (bar = 1cm).

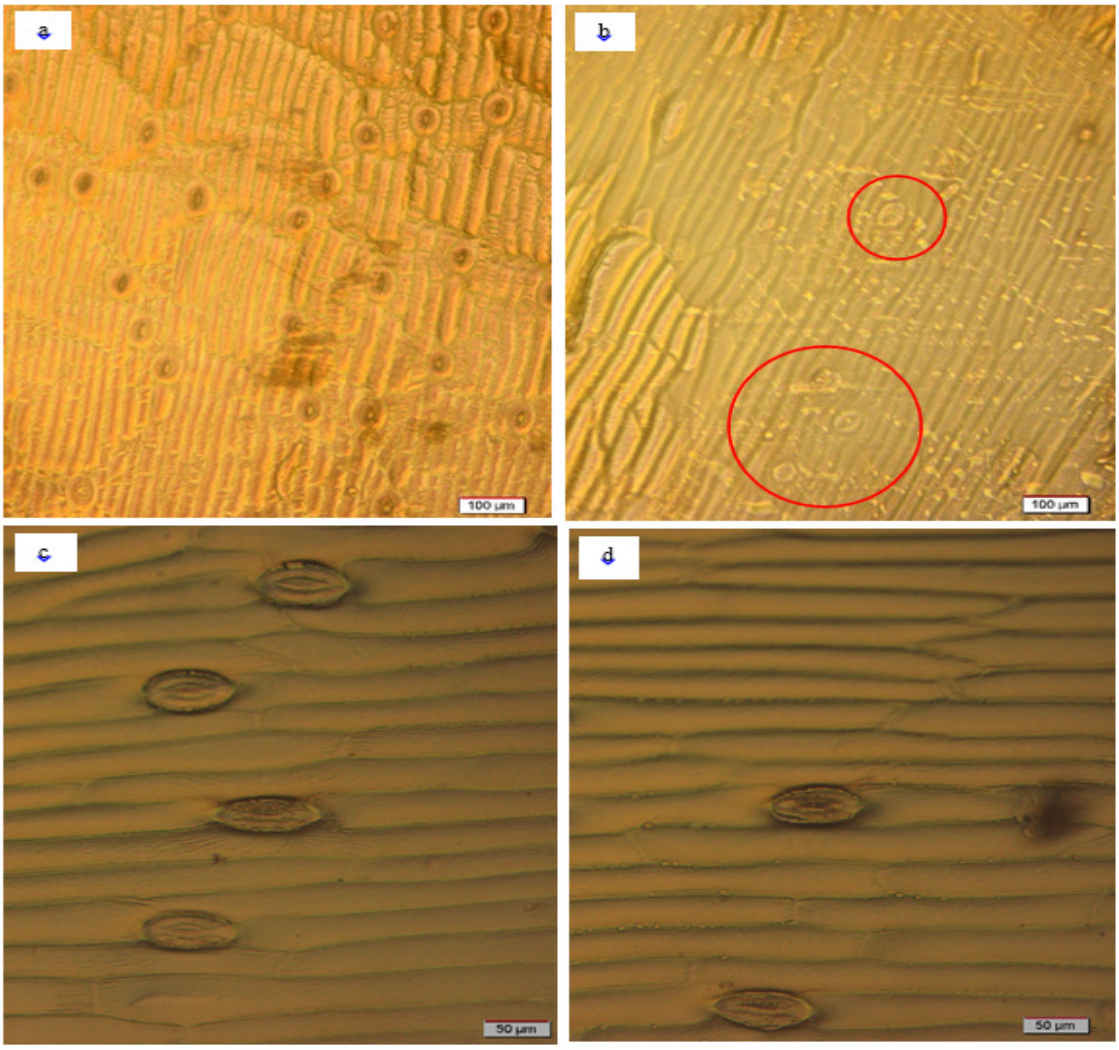
Figure 4- a: Regenerated plantlet from callus of control plant of *Fritillaria raddeana* after 2 months, b: Regenerated plantlet from 0.05% colchicine treated plant after 2 months, c: Regenerated plantlet from 0.01% colchicine treated plant after 2 months (bar = 1 cm).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس تعداد روزنه پس از تیمار با کلشی‌سین در *Fritillaria raddeana*.

Table 2- Anova table of stomata number after colchicine treatment in *Fritillaria raddeana.*

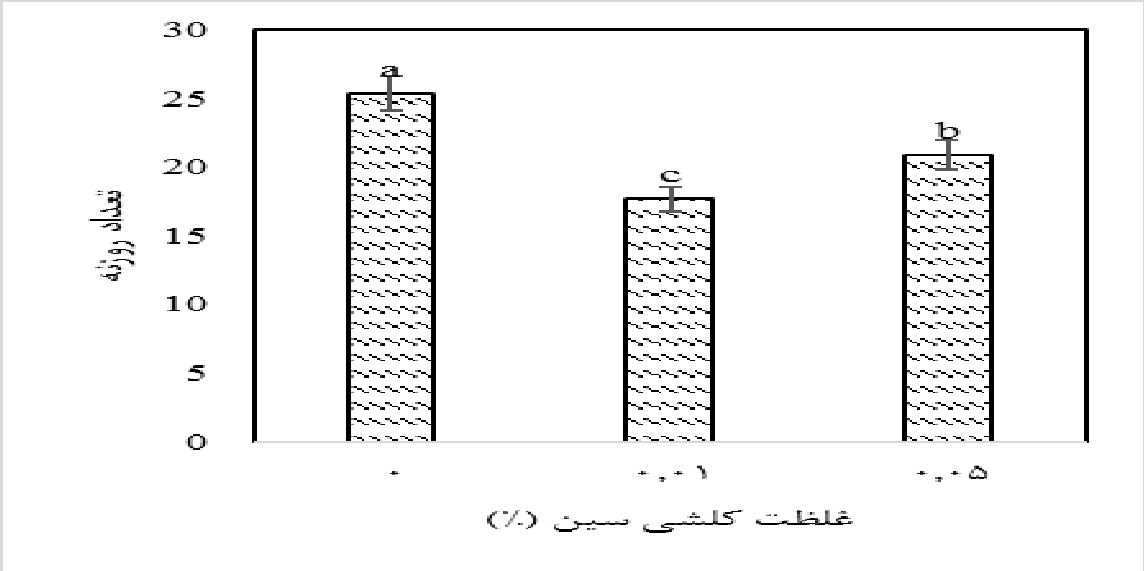
منابع تغییرات **S.O.V**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **MS**
مدت زمان تیماردهی **Treatment duration**	2	64.92**
غلظت کلشی‌سین **Colchicine concentration**	2	133.37**
مدت زمان * غلظت **Duration * Concentration**	4	23.59**
خطا **Error**	18	2.48
ضریب تغییرات **C.V**		7.39

**** The significance is indicated P< 0.01**



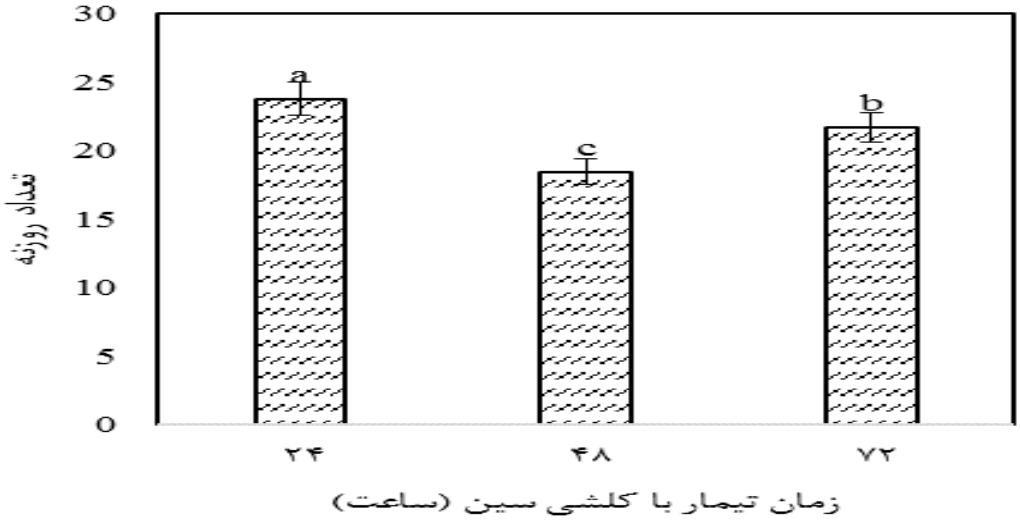
شکل ۵- تراکم روزنه در برگ گیاه *Fritillaria raddeana*. a و c: به‌ترتیب نمونه شاهد با بزرگنمایی ۱۰x و ۲۰x ، b و d: به‌ترتیب نمونه تیمار شده با کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد با بزرگنمایی ۱۰x و ۲۰x.

Fig 5- Stomata aggregation on *Fritillaria raddeana* leaf. a and c: Control plant (using 10x and 20x microscope objective, respectively)(bar =100 µm), b and d: 0.01% colchicine treated leaf (using 10x and 20x microscope objective, respectively) (bar =50 µm).



شکل ۶- اثر غلظت کلشی‌سین بر تعداد روزنه در *Fritillaria raddeana*.

Figure 6- Effect of colchicine concentration on stomata number in *Fritillaria raddeana*.

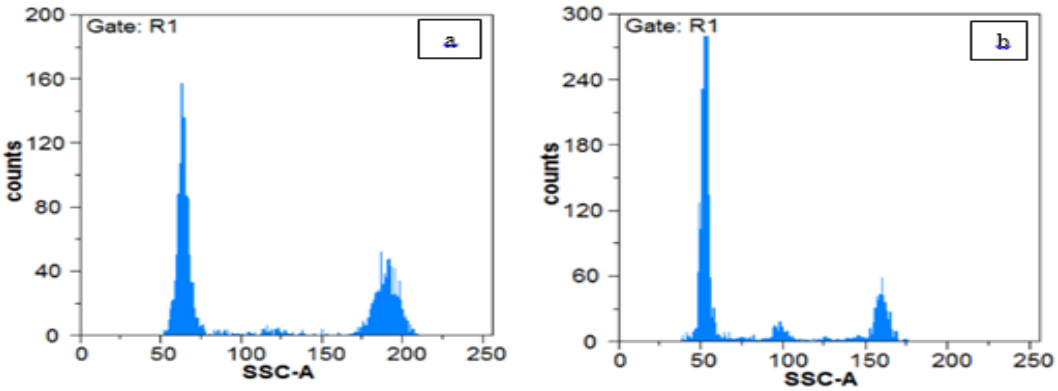


شکل ۷- اثر مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر تعداد روزنه در *Fritillaria raddeana*.

Figure 7- Effect of exposure time of colchicine on stomata number in *Fritillaria raddeana*.

علی‌رغم اینکه پس از مطالعات سیتوژنتیکی در سطح پلوییدی کروموزوم‌ها (در هیچ‌یک از غلظت‌های کلشی‌سین) تغییری مشاهده نشد، اما با توجه به کاهش تعداد روزنه و رشد بیشتر نمونه‌ها در تیمار ۰/۰۱ درصد کلشی‌سین، این نمونه‌ها برای آزمایشات فلوسایتومتری آماده گردیدند. نتایج این بررسی‌ها نیز نشان داد که پیک‌های به‌دست آمده در کلیه نمونه‌های دیپلویید و تیمارشده همگی در یک محدوده قرار داشتند. هم‌چنین اعداد حاصل از نرم افزار فلومکس

میانگین اندازه ژنوم نمونه‌های شاهد دیپلویید را برابر ۷۹/۵۰ پیکوگرم و میانگین اندازه ژنوم نمونه-های تیمار شده با کلشی‌سین را ۸۱/۶۵ پیکوگرم مشخص کرد. این داده‌ها یکسان بودن تقریبی مقدار DNA را در مقایسه با گیاهان شاهد دیپلویید نشان می‌دهند (شکل۸). سایر اثرات کلشی‌سین علاوه بر تغییرات کروموزومی شامل تغییرات هورمونی و شیمیایی، جهش‌های نقطه‌ای، تغییرات کروموزومی اندامک‌ها، تاثیر بر کلروپلاست و سایر تغییرات ژنتیکی و فیزیولوژیکی می‌باشد. در کل کلشی‌سین دارای اثرات پیچیده‌ی فیزیولوژیک و شیمیایی بر محصولات زینتی، زراعی و باغی است که می-بایست به طور گسترده‌تر و تخصصی‌تری بررسی گردد (Eiselein, 1994).



شکل ۸- پیک های به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، a : پیک *Fritillaria raddeana* شاهد و استاندرد باقلا(*Vicia faba*) ؛ b : پیک *F.raddeana* تیمارشده با کلشی‌سین و استاندارد باقلا.

Figure 8- Flow cytometery peaks of a: Control plants of *Fritillaria raddeana* and standard plant (*Vicia faba*), b: Trated plant with colchicine and standard plant.

با توجه به تایید نتایج سیتوژنتیکی توسط روش فلوسایتومتری، می‌توان گفت کلشی‌سین در غلظت‌های به‌کاربرده‌شده، ماده مناسبی جهت القای پلی‌پلویدی در گیاه مورد بررسی نیست. این نتیجه هم‌چنین می‌تواند به نوع ریزنمونه مورد آزمایش (کالوس) و روش استفاده (ترکیب با محیط کشت) نیز مرتبط باشد. علاوه بر این پژوهش‌ها نشان می‌دهد این ماده اثر یکسان و یکنواختی بر گونه‌های گیاهی مختلف و بخش-های مختلف یک گیاه نیز ندارد (Mohammadi *et al.*, 2013). دوام سطح پلویدی در گیاهان نیز پس از القا،روندی زمان‌بر داشته و با موفقیت چندان بالایی همراه نیست (Lavania, 2005)؛ در اغلب آزمایشات، گیاهان به‌دست آمده میکسوپلویید بوده (Ascough *et al.*, 2008) و پس از زیرکشت‌های متوالی گیاهچه‌های زنده مانده، گیاه تتراپلویید خالص مشاهده نشده‌است (Ahmadi Majd *et al.*, 2013). در گیاهان نهان-

دانه مریستم انتهایی از دو منطقه مجزا و مشخص تشکیل شده که هر یک بخشی از گیاه را ایجاد می‌کنند؛ هرکدام از این مناطق مریستمی از لایه-های متعددی تشکیل شده‌اند و مسئول تولید بخش‌های رشدیافته جدید هستند، بنابراین برای تولید گیاهان تتراپلویید خالص افزایش سطح پلوییدی در تمامی لایه‌های مریستمی ضروری است (Jones *et al*., 2008).

نتیجه گیری

با توجه به مشاهدات این آزمایش و با توجه به کند رشد بودن *F. raddeana* می‌توان در موارد ضروری از کلشی‌سین برای تسریع رشد ریزنمونه‌های کشت بافتی این گونه استفاده کرد. این تسریع رشد می‌تواند شامل افزایش تعداد و قطر ریشه و شاخساره باززایی شده از کالوس و هم‌چنین تعداد و اندازه سوخچه‌های تولید شده باشد. در تحقیق حاضر گیاهچه‌های تیمارشده با کلشی‌سین در بازه زمانی ۳ ماهه، رشدی برابر با گیاهچه‌های یکساله داشتند. تاکنون پژوهشی روی این جنبه از اثرات کلشی‌سین بدون القای پلی-پلوییدی انجام نگرفته‌است و آزمایشات تکمیلی ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دوره دکترای تخصصی علوم باغبانی می‌باشد که در مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام شده‌است. بدین وسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا از راهنمایی-های تمامی اساتید و هم‌چنین کمک‌های بی‌دریغ سرکار خانم سیما داوودی تشکر نمایند.

منابع

Agayev YM (1998). Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. In Fourth Iranian Congress in Crop Production and Breeding Science (Aug. 25-28). Esfahan University of Technology, Esfahan.

Agayev YM (2002). New features in karyotype structure and origin of saffron, *Crocus sativus* L. Cytologia 67: 245-252.

Ahmadi Majd M, Sarikhani H, Chaichi M, Kashi A (2013). An investigation into micropropagation and the effect of colchicine on in vitro ploidy induction in Narcissus (*Narcissus tazetta*). The plant production (Scientific Journal of Agriculture) 35: 93-103.

Ahmadi-Roshan M, Karimzadeh G, Babaei A, Jafari H (2016). Karyological Studies of Fritillaria (Liliaceae) Species from Iran. Cytologia 81: 133-141.

Allum JF, Bringloe DH, Roberts AV (2007). Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant cell reports 26: 1977-1984.

Ascough GD, Van Staden J, Erwin JE (2008). Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepida* NE Brown. HortScience 43: 2248-2251.

Bakhshi Khaniki G (1998). Taxonomy and karyology of the genus *Fritillaria* s. lat. (Liliaceae) in South West Asia with special reference to the species in Iran, Ph.D. Thesis, Göteborg University, Sweden.

Bakhshi Khaniki,G (2002). Chromosome number of *Fritillaria* subgenera *Petilium* and *Theresia* (Liliaceae). Nucleus 45: 6-11.

Bosemark NO, Boromotov V.E (1971). Chromosome morphology in a homozygous line of Sugar beet. Hereditas 69: 205-211.

Caperta AD, Delgado M, Ressurreição F, Meister A, Jones RN, Viegas W,Houben A (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma 227: 147-153.

Chakraborti SP, Vijayan K, Roy BN, Qadri SMH (1998). In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports 17: 799-803.

Chen CH, Goeden-Kallemeyn YC (1979). In vitro induction of tetraploid plants from colchicine-treated diploid daylily callus. Euphytica 28: 705-709.

Chen LL, Gao SL (2007). In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia horticulturae 112: 339-344.

Darlington CD (1937). Recent Advances in Cytology (2nd Ed), Philadelphia. P. Blakiston's son and Co.,pp. 115 - 118.

Darlington CD (1930). Chromosome studies in *Fritillaria*, III. Cytologia 2: 37-55.

Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, De Schepper S, Van Labeke MC (2006). Breeding for polyploidy in Belgian azalea (*Rhododendron simsii* hybrids). XXII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding for Beauty, May 2007, Sanremo, Italy. pp. 113-118.

Eiselein JE (1994). A study of chromosome yields and growth responses in colchicine treated Rhododendrons. Journal American Rhododendron Society 48: 205-209.

Elgsti OJ, Dustin P (1955). Colchicine-in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry. Iowa State College Press. Ames 50 p.

Escandon AS, Alderete LM, Hagwara J.C (2007). Invitro polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulture 115: 56-61.

Farjaminezhad R, Asghari R, Zare N, Farjaminezhad M (2011). Study of karyological characteristics in several accessions of *Papaver bracteatum* Lindl. Journal of Agricultural Biotechnology 3, 47-58.

Farsi M, Bagheri AR (1992). Principle of Plant Breeding (5th edition) 295 p.

Ganga M, Chezhiyan N (2002). Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa spp*.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77: 572-575.

Ghasemi SJ, Rabiei V, Soleymani A, Khalighi A (2014). Investigation the morphocytological traits and ploidy level in Iris species of Iranian native in Zanjan Province. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 5: 72-81.

Ghosh BN (1950). Physiological studies on the effect of colchicine on rice—II. In The Proceedings of the National Academy of Sciences, India. 16: 135-145.

Ghotbi Ravandi E, Rezanejad F, Zolala J, Dehghan E (2013). The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus* L. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 88: 701-709.

Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR (2005). In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. Plant cell reports 24: 671-676.

Hasan dokht MR, Ebrahimi R (2006). Basis of Plant Cell and Tissue Culture, Marze Danesh Publication, Tehran, Iran.

Jafari H, Babaei A, Karimzadeh G, Ahmadi-Roshan M (2014). Cytogenetic study on some Fritillaria species of Iran. Plant systematics and evolution 300: 1373-1383.

Jones JR, Ranney TG, Eaker TA (2008). A novel method for inducing polyploidy in Rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society 62: 130-135.

Kamari G (1984). Caryosystematic studies of Fritillaria L. (Liliaceae) in Greece. Webbia, Journal of Plant Taxonomy and Geography 38: 723-731.

Karimzadeh G, Mousavi SH, Jafarkhani-Kermani M, Jalali-Javaran M (2010). Karyological and nuclear DNA variation in Iranian endemic muskmelon (*Cucumis melo*). Cytologia 75: 451–461.

Karimzadeh G, Danesh-Gilevaei M, Aghaalikhani M (2011). Karyotypic and nuclear DNA variations in *Lathyrus sativus* (Fabaceae). Caryologia 64: 42–54.

Kotseruba VV, Venora G, Blangiforti S, Castiglione MR, Cremonini R (2000). Cytology of Vicia species. Nuclear DNA amount, chromatin organization and computer aided karyotyping of a Russian accession of *Vicia faba*. L. Caryologia 53: 195-204.

Lavania UC (1986). Genetic improvement of Egyptian henbane, *Hyoscyamus muticus* L. through induced tetraploidy. Theoretical and Applied Genetics73: 292 - 8.

Lavania, UC (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 3: 170-177.

Lehrer JM, Brand MH, Lubell, D (2008). Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. atropurpurea) through exposure to colchicine and oryzalin. Scientia Horticulturae 119: 67-71.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Mensah JK, Obadoni BO, Akomeah PA, Ikhajiagbe B, Ajibolu J (2007). The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). African Journal of Biotechnology 6: 534-538.

Mirzaei S, Shahsavand Hasani H, Rameshi N, Ghasemkhani M, Ahmadi-Afzadi M (2014). Cytogenetic study and optimization of genome in situ hybridization (GISH) method in *Pistacia spp*. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 167-183.

Mohammadi S, Mazandarani, M, Geran A (2013). Study on the effect of colchicine on the growth properties and organogenesis in *Origanum vulgare* L. Journal of plant science research 8: 71-77.

Murashige T, Nakano R (1967). Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. American Journal of Botany 963-970.

Newcomer EH (1945). Colchicine as a growth stimulator. Science, 101: 677-678.

Paul AK, das Gupta B, sen Gupta T, Mukhergi S (1978) Physiological effects of colchicine on growth and metabolism of Mungbean (*Phaseolus aureus* L.) seedlings and a-amylase production in rice (*Oryza sativa* L.) endosperm. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 173: 514-520.

Rubuluza T, Nikolova RV, Smith MT, Hannweg K (2007). In vitro induction of tetraploids in Colophospermum mopane by colchicine. South African Journal of Botany 73: 259-261.

Salahi Sadr S (2016). Optimization of micropropagation and ploidy induction in Fritillaria (*Fritillaria raddeana*). PhD thesis, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran.Unpublished data.

Salahi Sadr S, Zakizadeh H, Naghavi M.R, Aryakia E (2015). Callus induction from bulb-scales explant of endangered wild species of *Fritillaria raddeana*. 9th Congress of Iranian Horticultural Science: 25-28, Ahvaz, Iran. pp 389.

Sloan ME, Camper ND (1981). Effects of colchicine on carrot callus, growth and energy status. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1: 69-75.

Stebbins GL (1971). Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Publisher, London. 216 p.

Sui B (2013). Induction of *Fritillaria Ussuriensis* Maxim tetraploid and study on the physiological and biochemical. Master thesis, Globe thesis. China. GTID: 2233330395963644.

Thao NTP, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okuba H (2003). Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19 -25.

Tharawoot WS, Suyanee V (2012). Colchicine induced polyploidy of in vitro *Impatiens patula* Craib. Thai Journal of Botany 4: 75-80.

Wang ZN, You R L, Chen-Zhu X Z (2001). Effects of colchicine on the accumulation of vacuolar H+-pyrophosphatase and H+-ATPase in germinating *Acacia mangium* seeds and the recovery effects by sucrose, indole butyric acid and 6-benzyladenine. Plant growth regulation 34: 293-303.

Wang Q (2004). In vitro induction of autopolyploid from colchicines-treated callus of *Fritillaria Cirrhosa* D.Don and the analysis of their peroxidase isoenzyme. Master Thesis. Botany. China.

Wang Q, Lan L, Fu H (2002). Induction of polyploid from colchicine-treated Fritillaria cirrhosa D.Don callus. School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China. 20: 449-452.

Watrous SB, Wimber DE (1988). Artificial induction of polyploidy in Paphiopedilum. Lindleyana 3: 177-183.

Wu H, Zheng S, He Y, Yan G, Bi Y, Zhu Y (2007). Diploid female gametes induced by colchicine in Oriental lilies. Scientia Horticulturae 114: 50-53.

Zaharof Em (1989). Karyological studies of twelve Fritillaria species from Greece. Caryologia 42: 91- 102.

Zonneveld BJM (2010). New record holders for maximum genome size in eudicots and monocots. Journal of Botany Article ID 527357, 4.

In vitro effect of colchicine on growth and cytological characteristics of *Fritillaria raddeana*

Salahi Sadr S.[1], Zakizadeh H. *[2,4], Naghavi M.R.[3], Olfati J.A.[2,4]

[1] Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran.
[*2] Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[3] Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran.
[4] Assistant Professor, University Complex, University of Guilan, Rasht, Iran.

Abstract

The induction of polyploidy is a useful tool in plant breeding, as important characteristics such as new forms and colors, resistance to both drought and low temperatures can be achieved through chromosome doubling. Several methods and materials were used to obtain polyploid varieties but in some cases these substances have unusual effects. The main purpose of the present study was to regenerate polyploidy plants. In this research, *Fritillaria raddeana* calluses were treated by colchicine at four different concentrations 0.005, 0.001, 0.05 and 0.01% for 24, 48 and 72 h to induce polyploidy. The experiment was laid out with three replications in completely randomized design. Due to its slow growth rate, survival percent were identified after 3 months. Root tip chromosome counting, stomata and flow cytometry analysis shown that dosages higher than 0.01% and exposure time of colchicine treatment higher than 48 h cause more explants lethality. Although the growth rates have been increased and stomata density decreased, neither chromosome counting nor flow cytometry analysis indicated any polyploid plantlets in colchicine treated explants.

Keywords: *Polyploidy, flowcytometery, stomata, chromosome.*

* Corresponding Author: Hedayat Zakizadeh. Tel: 09121828508 Email: Zakizadeh@guilan.ac.ir

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500