



## تأثیر کلشی سین بر خصوصیات رشدی و سیتوژنتیکی لاله واژگون (*Fritillaria raddeana* Regel.) در شرایط درون شیشه‌ای

سلاله صلاحی صدر<sup>۱</sup>، هدایت زکی زاده<sup>۲\*</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۳</sup>، جمالعلی الفتی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

<sup>۳</sup> استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> 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 به دست آید. این مطالعه در ابتدا با هدف امکان ایجاد گیاهان پلی‌پلوئید با استفاده از کلشی سین انجام شد. کالوس‌های حاصل از کشت اندام‌های مختلف *F. raddeana* در محیط حاوی غلظت‌های متفاوت کلشی سین (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 کاملاً 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 باززایی شده از بین رفتند و علی‌رغم افزایش در سرعت رشد و کاهش تعداد روزنه‌ها در غلظت ۰/۰۱ درصد کلشی سین، تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرد و القای پلوییدی در گیاهان تیمار شده مشاهده نشد.

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

واژگونی با ساقه محکم‌تر و افزایش‌دهنده‌تر، 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 پلی‌پلوئید 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 پلی‌پلوئیدی 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 پلی‌پلوئید کافی

لاله واژگون (*F. raddeana*) گیاهی زینتی - دارویی مهم متعلق به خانواده سوسن است که در منابع مختلف، دیپلوئید، 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 به دلایل متعددی از جمله برداشت بی‌رویه از طبیعت، چرای دام، آلودگی شدید قارچی و باکتریایی درون‌زاد و همچنین سرعت پایین تکثیر رویشی و زایشی به شدت 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 بررسی‌های 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 پلوئیدی در شرایط درون-شیشه‌ای در گونه‌های جدید گیاهی با پتانسیل زینتی ضروری به نظر می‌رسد. ایجاد لاله‌های

Camper, 1981). گزارش شده است که فعالیت بیوشیمیایی کلشی سین نیز نسبت به عملکرد سیتولوژیکی آن تقریباً مبهم است (Paul et al., 1978). مطالعات روی تاثیر فیزیولوژیکی کلشی-سین بر بافت‌های گیاهی بسیار کم و قدیمی است. افزایش رشد دانه‌های درختان بر اثر اسپری محلول رقیق کلشی سین 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 و تعداد کلروپلاست در سلول می‌شود. تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های نگهبان روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. با افزایش سطح پلوئیدی، طول و عرض روزنه‌ها افزایش یافته و در نتیجه تراکم روزنه‌ای کاهش می‌یابد (Watrous & Wimber, 1988).

آنچه در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته- است تاثیر کلشی سین بر تعداد کروموزوم‌های *F. raddeana* و تراکم روزنه‌ای آن است. این بررسی‌ها از طریق مطالعات سیتوژنتیکی، مطالعات روزنه‌ای و بررسی‌های فلوسایتومتری است. در صورتی که کلشی سین اثر مثبتی بر *F. raddeana* داشته باشد می‌توان از آن برای تبدیل لاله واژگون

نیست (Caperta et al., 2006)؛ القای پلوئیدی 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، کلشی سین با غلظت ۰/۱ درصد به مدت پنج ساعت تیمار شد و ۸۰ درصد گیاهان زنده مانده کروموزوم‌های ژنومی دو برابر داشتند (Hasandokht & Ebrahimi, 2006). با این حال تیمار درون‌شیشه‌ای گیاهچه‌های حاصل از بذر در گیاه آزالیا با غلظت کلشی سین ۰/۰۵ و ۰/۲۵ درصد اثری بر سطح پلوئیدی گیاه مورد نظر نداشت (Eeckhaut et al., 2001).

در پژوهش‌های انجام شده روی *F. cirrhosa* با استفاده از کلشی سین یک درصد در محیط کشت جهت القای پلوئیدی، تا ۷۰ درصد کالوس‌های ایجاد شده تتراپلوئید بودند (Wang et al., 2002; Wang, 2004). در آزمایش دیگری با به‌کارگیری ۰/۵ درصد کلشی سین در گونه *F. assuriensis* با روش غوطه‌وری به مدت ۲۴ ساعت، گیاهانی تتراپلوئید با محتوای آلکالوئیدی بیشتر به دست آمد (Sui, 2013). در پژوهش روی آزالیا با استفاده از کلشی سین یک درصد، در بین نمونه‌های تیمار شده نمونه‌هایی بدون تغییر در سطح کروموزومی دیده شد که اختلاف رشد ظاهری بسیار زیادی نسبت به نمونه‌های شاهد و پلی‌پلوئید نشان دادند (Eiselein, 1994). کلشی سین هم‌چنین می‌تواند بر فرایندهای متابولیکی اثر بگذارد بدون اینکه ارتباطی با میکروتوبول‌ها داشته باشد (Sloan &

دیپلوئید به تتراپلوئید با ویژگی‌های برتر استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

مطالعات کشت بافت: به منظور اطمینان از یکنواختی ژنتیکی و هم‌چنین عدم وجود آلودگی خارجی و داخلی مواد گیاهی، در این آزمایش از کالوس‌ها و ریزنمونه‌های به دست 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 به دست آمده در محیط مناسب ریشه‌زایی قرار گرفت. بهترین محیط کالوس‌زایی، محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیاورون (TDZ) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینیتین (KIN) و مناسب‌ترین محیط ریشه‌زایی، محیط MS شامل ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بود (Salahi Sadr, 2016; Unpublished data).

مطالعات سیتوژنتیکی: ریشه‌های استخراج شده از کالوس برای به دست آوردن بهترین و مناسب‌ترین شیوه بررسی سیتوژنتیک، با روش‌های مختلف پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی شد. برای تشخیص بهترین پیش‌تیمار، نوک ریشه جدا و در هر یک از تیمارهای زیر به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت:

۱- تیمار با محلول ۰/۰۰۲ مولار ۸-هیدروکسی کوئینولین<sup>۱</sup> 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 کوئینولین ۰/۰۰۲ مولار: کلشی‌سین (۳/۳ درصد وزن به حجم) به مدت ۳ ساعت (Kamari, 1984). ۳- تیمار با محلول ۰/۰۰۳ مولار ۸-هیدروکسی کوئینولین به مدت ۳ الی ۳/۵ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس (Agayev, 2002). ۴- تیمار با محلول ۰/۰۵ درصد وزن به حجم کلشی‌سین به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و تاریکی (Karimzadeh, 2010 and 2011). ۵- تیمار در محلول آبی مونوبرومونفتالن<sup>۲</sup> (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<sup>۳</sup> (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 (به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ الی ۱۰ درجه سلسیوس) و همچنین محلول لویتسکی<sup>۴</sup> (فرمالدئید ۱۰ درصد با اکسید کروم) (به مدت ۱۸ الی ۳۰ ساعت در دمای ۴ الی ۱۰ درجه سلسیوس) به عنوان محلول تثبیت‌کننده برای ریشه‌های پیش‌تیمار شده با روش سه استفاده گردید. هم‌چنین به منظور تثبیت ریشه‌های

<sup>1</sup>-8-hydroxyquinolin

<sup>2</sup>- $\alpha$ -bromonaphthalene

<sup>3</sup>-Carnoy

<sup>4</sup>-Levitsky

الی دو میلی متر انتهایی آن‌ها جدا گردید پس از افزودن یک قطره استیک اسید ۴۵ درصد عمل له کردن<sup>۳</sup> 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 میکرومتر ( 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 میلی گرم 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 می‌کاهد. قابل ذکر است که کلشی‌سین عملکرد ژن-های مسئول فعالیت‌های H<sup>+</sup>-PPase و PPI-ATP را کاهش می‌دهد و IBA با اثر اکسینی خود، موجب افزایش دامنه فعالیت انتقال H<sup>+</sup> و تنظیم فعالیت ژن‌های ذکر شده می‌گردد ( Wang et al., 2001). کالوس‌های به‌دست آمده از مراحل قبل که بالای ۵۰ میلی گرم وزن داشتند با سطوح متفاوت کلشی‌سین (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد) و شاهد در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸

پیش‌تیمار شده با روش چهارم، ابتدا ریشه‌ها به مدت 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 مجدداً با آب مقطر آبشویی گردیدند. برای رنگ آمیزی نمونه‌ها روش‌های استوآیرون هماتوکسیلین<sup>۱</sup> (۱۷-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس) (Agayev, 1998)، استوآیرون هماتوکسیلین (یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس) (Agayev, 2002)، استوآرسئین<sup>۲</sup> (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

<sup>۱</sup>- Aceto-Iron-Hematoxline

<sup>۲</sup>-Aceto Orcein

<sup>۳</sup> - Squash

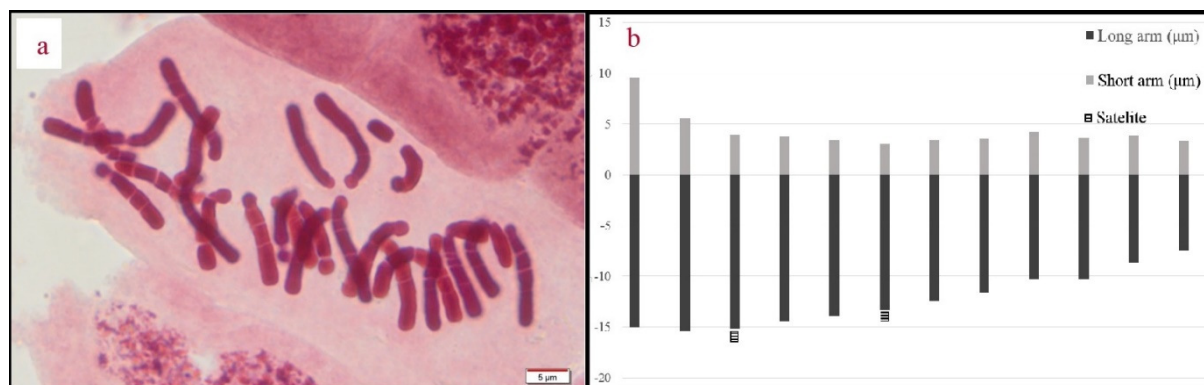
در شرایط استریل جدا نموده و سطح برگ‌ها توسط لاک بی‌رنگ کاملاً پوشانده شدند و بعد از خشک شدن لاک، تکه‌ای چسب نواری روی قسمت لاک خورده چسبانده و بلافاصله برداشته شد. بدین صورت روزنه‌ها روی سطح نوارچسب چسبیده می‌شوند. در آخرین مرحله نوار چسب به آرامی و با دقت بدون ایجاد حباب روی لام چسبانده و با میکروسکوپ نوری مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت. آزمایشات فلوسایتومتری نیز توسط دستگاه فلوسایتومتر BD FACSCanta 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, *Vicia faba*, 2010) به همراه گیاه استاندارد باقلا (*Vicia faba*, 2C value = 26.56 pg., Kotseruba et al., 2000) و بار دیگر نمونه‌های تیمار شده 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 دست آمده با نرم‌افزار فلومکس (Flowmax 2.4) مورد ارزیابی قرار گرفت.

و ۷۲ ساعت تیمار شدند و به منظور 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. به دلیل 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 ذکر شده پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ آمیزی گردیدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً 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 به وسیله 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 دست آمده و نیز گیاهان شاهد را

نتایج و بحث

ها 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 متاستریک، پنج جفت ساب متاستریک و شش جفت ساب تلوستریک و عموماً 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 a-b).

مطالعات سیتوژنتیکی: بهترین روش مطالعات سیتوژنتیکی در گونه *F. raddeana* شامل پیش تیمار با کلشی سین 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 استوارسین به مدت ۳ تا ۵ ساعت (Karimzadeh *et al.*, 2011) بود. بررسی‌های سیتوژنتیکی انجام شده روی کالوس‌های شاهد ریشه‌دار شده نشان داد که تعداد کروموزوم نمونه-



شکل ۱- a: کروموزوم‌های دیپلوئید (*Fritillaria raddeana* ( $2n=2x=24$ )) (با استفاده از عدسی  $\times 100$ )

b- ایدیوگرام کروموزوم‌های هاپلوئید *F. raddeana* (bar = 5 μm).

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

*raddeana* با کلشی سین تیمار شدند. ابتدا درصد بقای کالوس در محیط‌های حاوی کلشی سین اندازه‌گیری شد. جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) و نتایج بررسی آماری تاثیر مدت زمان تیمار با

مطالعات پلوئیدی: پس از دستیابی به بهترین روش مطالعات کروموزومی و ارزیابی خصوصیات سیتوژنتیکی نمونه‌های شاهد، به‌منظور القای پلوئیدی، کالوس‌های *F.*

به طور معمول کلشی سین بسته به نوع گیاه در غلظت های کمتر از ۰/۵ درصد به مدت چند ساعت تا چند روز به کار می رود ( Farsi & Bagheri, 1992). غلظت های بیشتر معمولاً باعث سوختگی کامل و از بین رفتن گیاهچه ها یا کالوس های تیمار شده می شوند. به نظر می رسد فعالیت کلشی سین در مریستم متمرکز باشد و یک اختلال فیزیولوژیکی در کاهش تقسیم سلولی و یا مرگ ریزنمونه ها ایجاد کند (Gu et al., 2005).

کلشی سین بر زندهمانی کالوسها (شکل ۲) نشان می دهد که با افزایش مدت زمان تیمار از درصد زندهمانی کالوسها کاسته می شود و بیشترین میانگین در تیمار ۲۴ ساعت دیده شد (۶۴/۴۴ درصد). در بین نمونه های 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 ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد در تمام بازه های زمانی تفاوت معنی داری از لحاظ بقا دیده نشد، در نتیجه به منظور صرفه جویی در زمان، اولویت با تیمار زمانی ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد (شکل ۳).

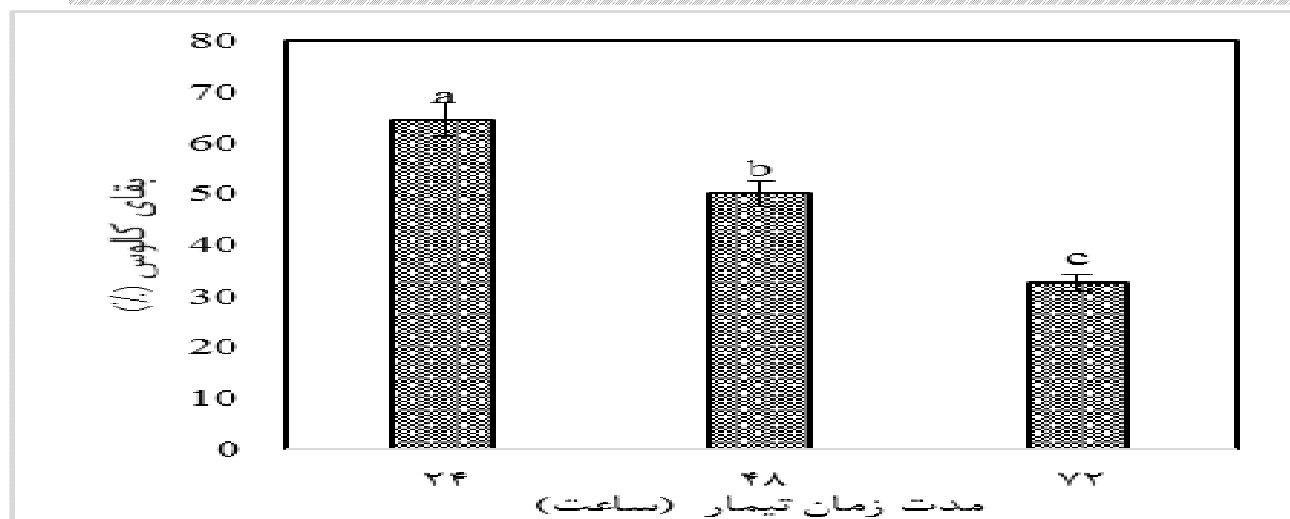
جدول ۱- جدول تجزیه واریانس درصد بقای کالوس های *Fritillaria raddeana*

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 کلشی سین Colchicine concentration	4	6828.70**
مدت زمان * غلظت Duration * Concentration	8	241.89**
خطا Error	30	29.32
ضریب تغییرات C.V		11.03

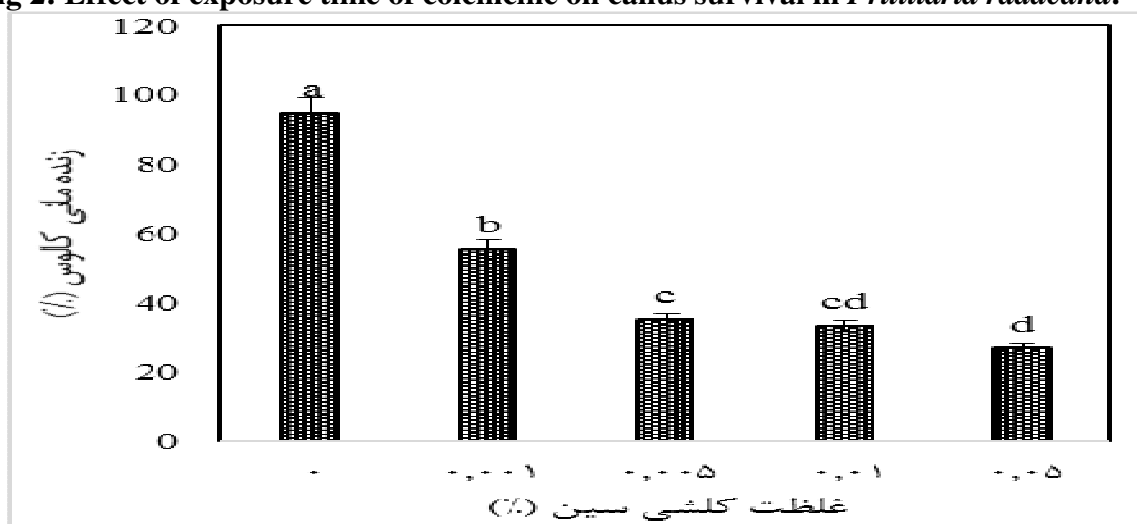
\*\* The significance is indicated P < 0.01.





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

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

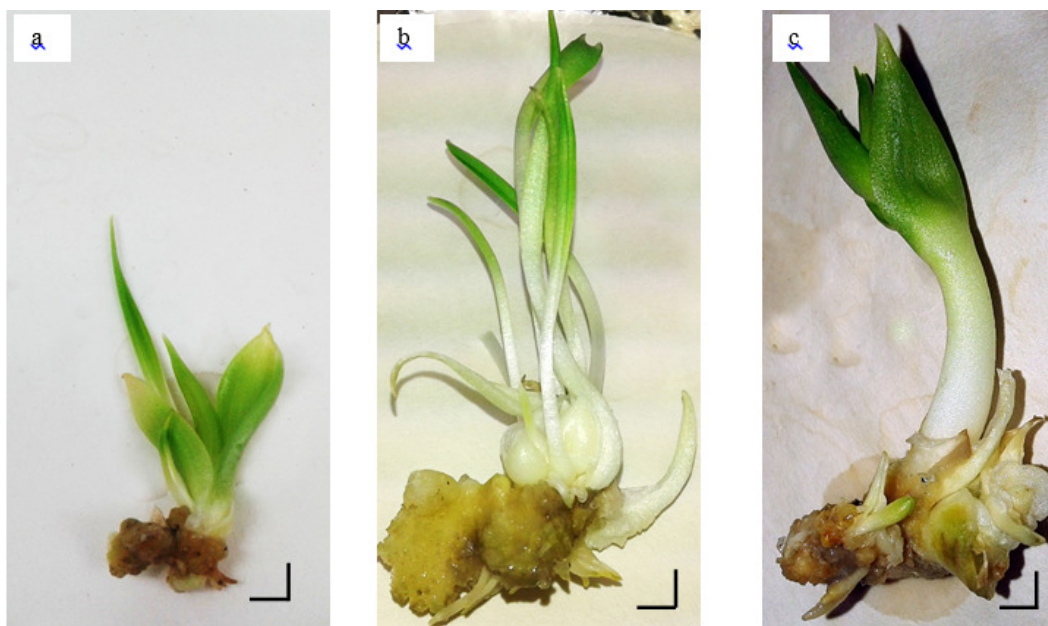
معکوس بین زمان تیمار و غلظت کلشی سین با بقای نمونه‌ها، در مورد مطالعات درون و برون شیشه‌ای گیاهان دیگر نیز صدق می‌کند (Chen & Gao, 2007). همان‌طور که ذکر شد، علاوه بر غلظت کلشی سین، زمان تیمار نیز عامل موثری در زنده‌مانی گیاهچه‌ها است (Rubuluza et al., 2003; Thao et al., 2007) و با افزایش زمان تیماردهی، میانگین زنده‌مانی در ریزنمونه‌ها

در تحقیق حاضر بالاترین درصد سوختگی و تلفات ریزنمونه در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد و در تیمار زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد و نمونه‌های 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

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 به-دست‌آمده 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 عموماً 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 (در حدود ۱۵ روز) نسبت به شاهد افزایش یافت (Ghasemi et al., 2014). در گونه‌ای حنا (*Impatiens patula*) نیز افزایش سطح پلوئیدی با تیمارهای ۰/۰۳ تا ۰/۰۹ درصد کلشی‌سین دیده‌شد و گیاهان تتراپلوئید 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 (شکل‌های 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 پلوئیدی 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 تیمار شده با کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد (bar = 1cm).

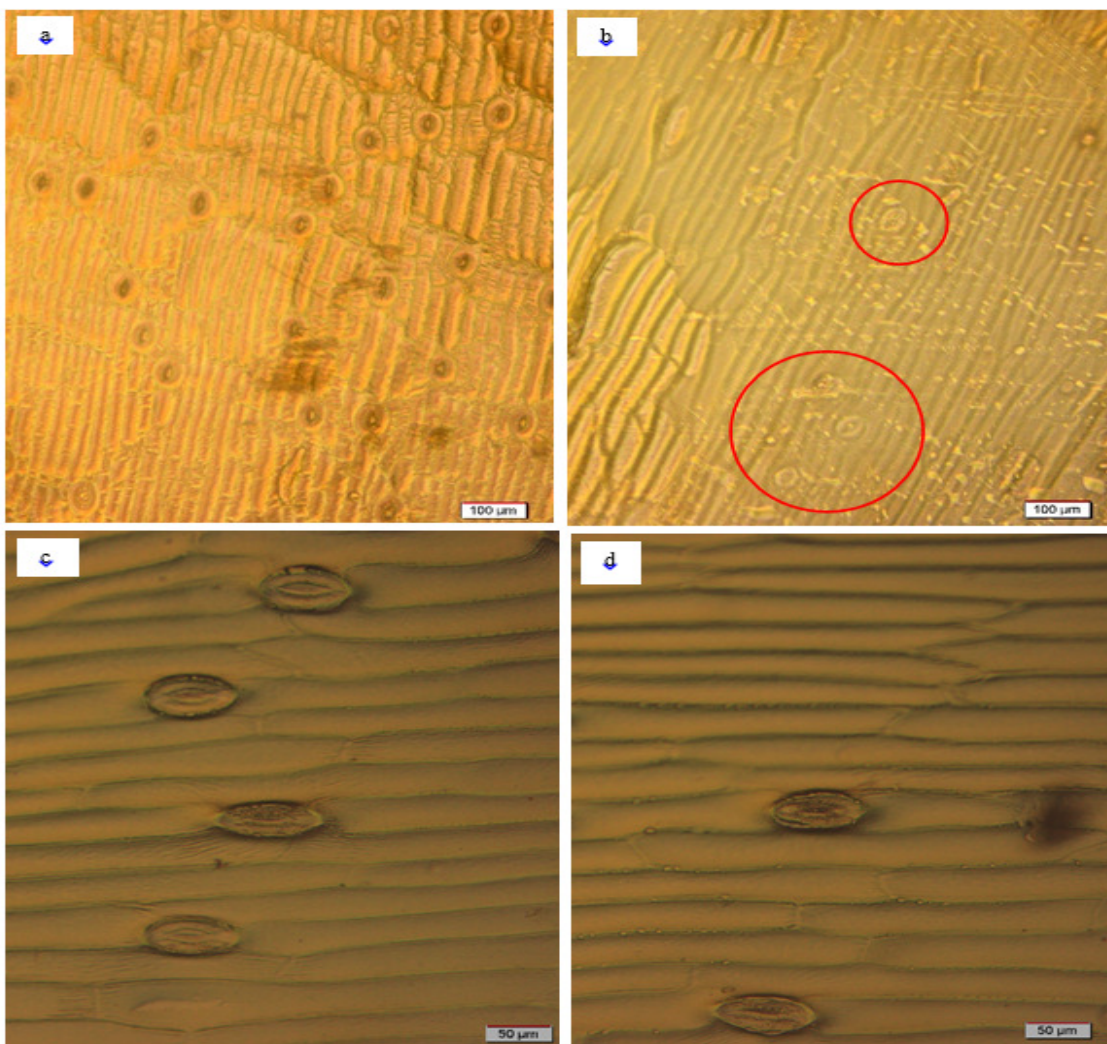
Figure 4- a: Regenerated plantlet from callus of control plant of *Fritillaria raddeana* after 2 months, b: Regenerated plantlet from 0.05% colchicine treated plant after 2 months, c: Regenerated plantlet from 0.01% colchicine treated plant after 2 months (bar = 1 cm).

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

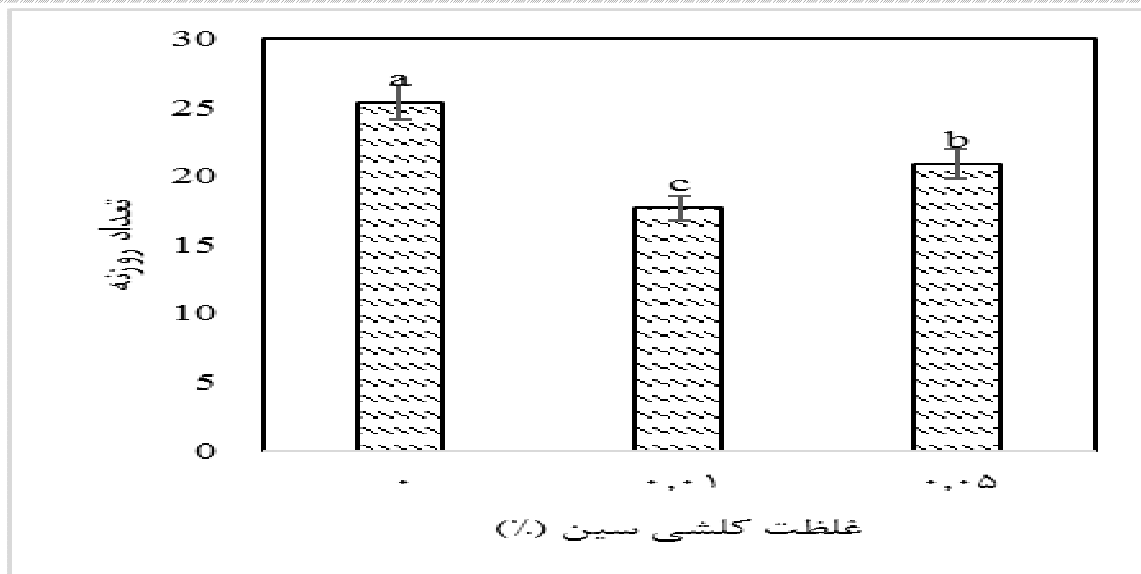
Table 2- Anova table of stomata number after colchicine treatment in *Fritillaria raddeana*.

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

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

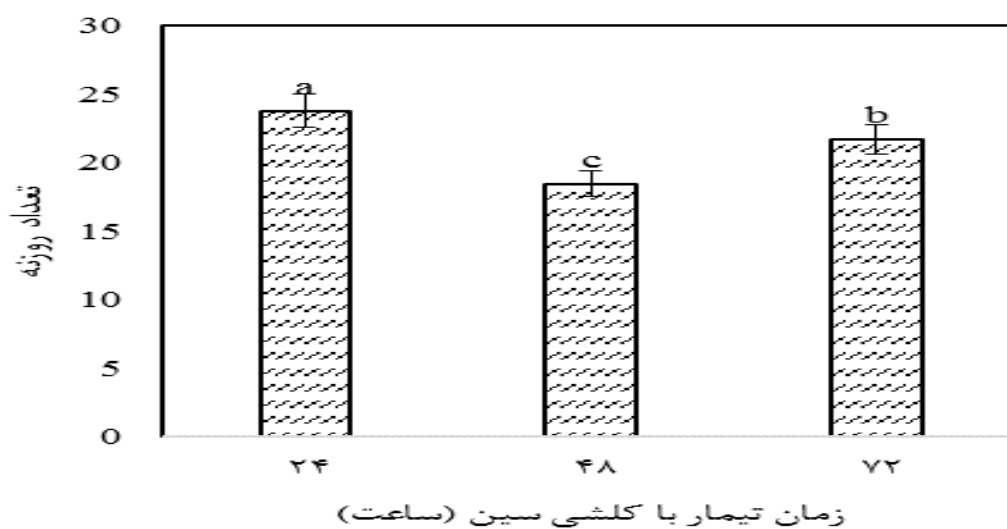


شکل ۵- تراکم روزنه در برگ گیاه *Fritillaria raddeana* a و c: به ترتیب نمونه شاهد با بزرگنمایی ۱۰x و ۲۰x، b و d: به ترتیب نمونه تیمار شده با کلشی سین ۰/۰۱ درصد با بزرگنمایی ۱۰x و ۲۰x.  
**Fig 5- Stomata aggregation on *Fritillaria raddeana* leaf. a and c: Control plant (using 10x and 20x microscope objective, 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 کلشی سین 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 کلشی سین بر تعداد روزنه در *Fritillaria raddeana*

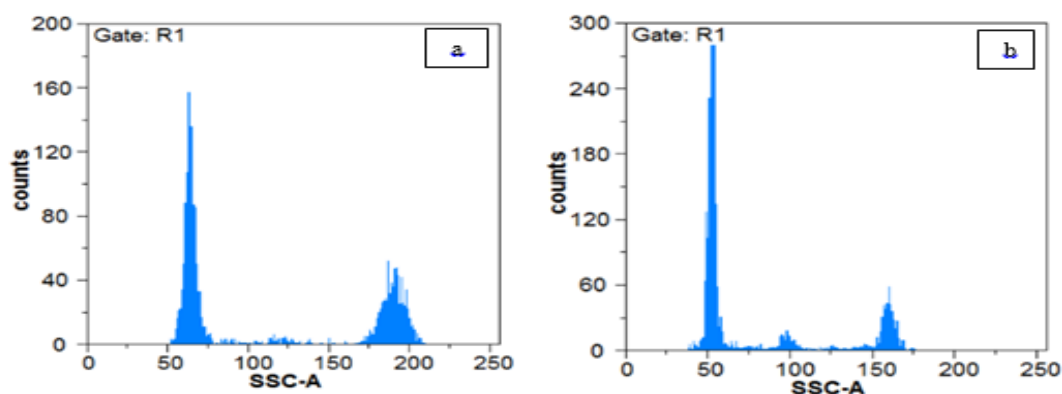
Figure 7- Effect of exposure time of colchicine on stomata number in *Fritillaria raddeana*.

نمونه‌ها برای آزمایشات فلوسایتومتری آماده گردیدند. نتایج این بررسی‌ها نیز نشان داد که پیک‌های به‌دست آمده در کلیه نمونه‌های دیپلوئید و تیمار شده همگی در یک محدوده قرار داشتند. همچنین اعداد حاصل از نرم افزار فلومکس

علی‌رغم اینکه پس از مطالعات سیتوژنتیکی در سطح پلوئیدی کروموزوم‌ها (در هیچ‌یک از غلظت‌های کلشی سین) تغییری مشاهده نشد، اما با توجه به کاهش تعداد روزنه و رشد بیشتر نمونه‌ها در تیمار ۰/۰۱ درصد کلشی سین، این

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 می‌بایست به طور گسترده‌تر و تخصصی‌تری بررسی گردد (Eiselein, 1994).

میانگین اندازه ژنوم نمونه‌های شاهد دیپلوئید را برابر ۷۹/۵۰ پیکوگرم و میانگین اندازه ژنوم نمونه‌های تیمار شده با کلشی‌سین را ۸۱/۶۵ پیکوگرم مشخص کرد. این داده‌ها یکسان بودن تقریبی مقدار DNA را در مقایسه با گیاهان شاهد دیپلوئید نشان می‌دهند (شکل ۸). سایر اثرات کلشی‌سین علاوه بر تغییرات کروموزومی شامل تغییرات هورمونی و شیمیایی، جهش‌های نقطه‌ای،



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

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

های مختلف یک گیاه نیز ندارد (Mohammadi et al., 2013). دوام سطح پلوئیدی در گیاهان نیز پس از القا، روندی زمان‌بر داشته و با موفقیت چندان بالایی همراه نیست (Lavania, 2005)؛ در اغلب آزمایشات، گیاهان به دست آمده میکسوپلوئید بوده (Ascough et al., 2008) و پس از زیرکشت‌های متوالی گیاهچه‌های زنده مانده، گیاه تتراپلوئید خالص مشاهده نشده است (Ahmadi Majd et al., 2013). در گیاهان نهان-

با توجه به تایید نتایج سیتوژنتیکی توسط روش فلوسایتومتری، می‌توان گفت کلشی‌سین در غلظت‌های به کار برده شده، ماده مناسبی جهت القای پلی‌پلوئیدی 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-

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-پلوئیدی 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 راهنمایی‌های تمامی اساتید و هم‌چنین کمک‌های بی‌دریغ سرکار خانم سیما داوودی تشکر نمایند.

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 تتراپلوئید خالص افزایش سطح پلوئیدی در تمامی لایه‌های مریستمی ضروری است (Jones et al., 2008).

### نتیجه‌گیری

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

### 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, Bringle 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). In vitro 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 (5<sup>th</sup> 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.
- Lavana UC (1986). Genetic improvement of Egyptian henbane, *Hyoscyamus muticus* L. through induced tetraploidy. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 292 - 8.
- Lavana, 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  $\alpha$ -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*. 9<sup>th</sup> 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<sup>+</sup>-pyrophosphatase and H<sup>+</sup>-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.<sup>1</sup>, Zakizadeh H. <sup>\*2,4</sup>, Naghavi M.R.<sup>3</sup>, Olfati J.A.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran.

<sup>\*2</sup> Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran.

<sup>4</sup> 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, flowcytometry, stomata, chromosome.*

\* Corresponding Author: Hedayat Zakizadeh.

Tel: 09121828508

Email: Zakizadeh@guilan.ac.ir