

بررسی تأثیر کلشی سین و تری فلورالین بر خصوصیات سیتوژنتیکی سلول‌های مریستمی ریشه گیاه دارویی سنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

الهام افشاری^{۱*}، غلامعلی رنجبر^۲، سیدکمال کاظمی تبار^۲، مهرناز ریاست^۳ و حسین کاظمی پشت‌مساری^۴

*- نویسنده مسئول، مربی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

پست الکترونیک: elhamafshari2010@yahoo.com

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز

۴- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۰

چکیده

دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های یک گیاه دارویی، منجر به ایجاد تنوع در ترکیب‌های آلی و گوناگونی آنزیم‌های فعال مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود و می‌تواند روند متابولیسم ثانویه را تسهیل و میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. این تحقیق به منظور مطالعه اثر کلشی سین و تری فلورالین بر القاء پلی‌پلوئیدی و بررسی تأثیر این مواد بر خصوصیات سیتوژنتیکی سلول‌های مریستمی ریشه گیاه دارویی سنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) انجام شد. از مریستم انتهایی ریشه برای مطالعات کاربوتیپی استفاده شد. جهت تیمار کردن بذرها، جوانه زده از محلول کلشی سین به غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ gr.L⁻¹ و محلول تری فلورالین ۰/۴۸٪ به غلظت‌های ۷/۵، ۱۵ و ۲۲/۵ μM، در دو مدت زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت استفاده شد. خصوصیات سیتوژنتیکی با استفاده از روش تحلیل تصویری مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کروموزوم پایه در گونه مورد بررسی $X=8$ بود. نتایج نشان داد که هر یک از عوامل غلظت تیمارها، مدت زمان القاء تیمارها و همچنین اثرات متقابل آنها، در القاء پلی‌پلوئیدی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ دارند. بالاترین درصد القای پلی‌پلوئیدی، به دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۲۲/۵ μM تری فلورالین در مدت زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۵ gr.L⁻¹ کلشی سین در مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد. به طوری که تیمارها بر طول کروموزوم‌ها و بالطبع بر فرمول کاربوتیپی اثر گذاشته بودند. البته بین کاربوتیپ‌ها در تمام ویژگی‌های کروموزومی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. از این رو میزان پلی‌پلوئیدی القاء شده تحت تأثیر تری فلورالین بیشتر از کلشی سین بود، اگرچه غلظت‌های تری فلورالین تقریباً ۱۰۰ برابر کمتر از غلظت‌های کلشی سین مورد استفاده بود که این امر بیانگر توانایی بیشتر تری فلورالین در القاء پلی‌پلوئیدی در این گیاه است.

واژه‌های کلیدی: سنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، خصوصیات سیتوژنتیکی، القاء پلی‌پلوئیدی، کلشی سین، تری فلورالین.

مقدمه

شنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) گیاهی یکساله و علفی از خانواده لگومینوز، بومی ایران و غرب آسیا می باشد (نجف پور نوایی، ۱۳۷۳). هر ۱۰۰ گرم برگ آن شامل ۴/۶gr پروتئین، ۶/۲gr کربوهیدرات و ۰/۲gr چربی است (نجف پور نوایی، ۱۳۷۳). Tapadia و همکاران (۱۹۹۵) بررسی هایی مبنی بر وجود ویتامین C در برگ های گیاه شنبليله انجام دادند. کلسیم، آهن، کاروتن، اسید آسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریوفلاوین از جمله مواد با اهمیت در برگ شنبليله است. جوانه ها سرشار از ویتامین A و فسفر هستند. Nour و Magboul (۱۹۸۶) در تحقیقی دیگر بر روی دانه های شنبليله، دریافتند که این دانه ها شامل مقادیر فراوانی سدیم، پتاسیم، آهن، کلسیم، فسفر، منگنز، روی و مس است و از نظر لوسین، والین، لیزین و فنیل آلانین نیز غنی می باشند.

در تحقیقات متعددی که توسط محققان بعمل آمده از این گیاه به عنوان دارویی مؤثر برای بیماران دیابتی نام برده شده است (Sharma et al., 1996). به طوری که مصرف پودر دانه های شنبليله سبب کاهش کلسترول و گلوکز خون شده است (Neeraja & Rajyalakshmi., 1996). دانه شنبليله نه تنها اثر نرم کننده و رفع تحریکات جلدی دارد، بلکه در برخی از مناطق آفریقا برای درمان دردهای نقرس، فشارهای عصبی، سیاتیک، تورم غدد لنفاوی، زخم ها، جراحات و تحریکات پوستی بکار می رود. به علاوه از این گیاه برای درمان موضعی ترک خوردگی لب و زخم های دهان هم استفاده می شود. گزارش شده که شنبليله میزان ترشح شیر را در مادران افزایش می دهد (رجحان، ۱۳۷۹).

در اغلب گونه های گیاهی، القاء پلی پلوئیدی با افزایش در اندازه سلول ها، توانایی تولید اندام های رویشی قویتر را بوجود آورده است. اندام های رویشی، منبع بسیاری از متابولیت های ثانویه با ارزش تجاری هستند (Adaniya & Shira, 2001). بنابراین ممکن است که القاء پلی پلوئیدی در افزایش کمیّت و کیفیت این ترکیب های با ارزش دارویی نقش مهمی داشته باشد (Dhawan & Lavania, 1996). در مقایسه تعداد زیادی از گیاهان پلی پلوئید با همتای دیپلوئیدشان، افزایش در تولید ترکیب های شیمیایی و متابولیت های ثانویه مشاهده شده است؛ مثلاً گزارش شده که تتراپلوئیدهای دو گیاه دارویی بابونه و مریم گلی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای بیشتری را نسبت به حالت دیپلوئید تولید می کنند یا میزان آرتیمیزینین در درمنه تتراپلوئید، ۲۰٪ بیشتر از دیپلوئید آن است (Jesus, 2003). کلسی سین با فرمول مولکولی $C_{22}H_{25}NO_6$ نام شیمیایی N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro oxobenzo(a)heptalen-7-yl)-acetamide 1,2,3,10-tetramethoxy-9- شده از پیازهای گل حسرت با نام علمی *Colchicum autumnale* است. کلسی سین مهمترین عامل شیمیایی دو برابر نمودن کروموزومی است که در سطح وسیعی بکار می رود. این ماده از تشکیل و پلیمر شدن میکروتوبول ها، از طریق پیوند با زیرواحد پروتئینی میکروتوبولی به نام توبولین ممانعت می کند، بنابراین کروموزوم ها در مرحله متافاز، یکجا وارد سلول می گردند که این امر آن را به یک القاگر فعال پلی پلوئیدی تبدیل کرده است (Elliot, 1958؛ Alishah & Bagherieh-Najjar, 2008؛ Rauf et al., 2006؛ Hansen & Andersen, 1996).

تری فلورالین با فرمول مولکولی $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ نام شیمیایی 2,6-dinitro-N,N-dipropyl-4-

طی کشت درون شیشه‌ای میکروسپور کلزا مطالعه کردند. طبق گزارش‌های آنها بالاترین میزان دیپلوئیدی (۹۴٪) پس از ۲۴ ساعت تیمار با ۱ mM کلشی‌سین مشاهده شد و در طول ۱۲ ساعت تیمار با تری‌فلورالین، تقریباً ۶۵٪ دیپلوئیدی تولید شد. Hansen و همکاران (۱۹۹۸) تأثیر علف‌کش تری‌فلورالین بر دو برابر شدن کروموزوم‌ها در کشت درون شیشه‌ای تخمک چغندرقد را مطالعه و بیشترین میزان دابل‌شدگی کروموزوم‌ها را در غلظت ۱۰ μM مشاهده کردند. Rey و همکاران (۲۰۰۲) تأثیر کلشی‌سین، تری‌فلورالین و اریزالین بر تولید گیاهان تتراپلوئید حاصل از باززایی جنین‌های سوماتیکی گیاه *Ilex paraguariensis* را مطالعه کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنها تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت قادر به تولید دو گیاه تتراپلوئید شده و دو تیمار دیگر در دو برابر کردن کروموزوم‌ها بی‌اثر بوده‌اند. Grzebelus و Adamus (۲۰۰۴) از عوامل ضد میتوزی تری‌فلورالین و کلشی‌سین، برای دیپلوئیدسازی جنین‌های ژینوزنیک پیاز، در محیط کشت باززایی استفاده کردند. آنها بالاترین میزان دو برابر شدن کروموزوم‌ها را در محیط‌های تکمیل‌شده با ۵۰ μM تری‌فلورالین مشاهده کردند.

Klima و همکاران (۲۰۰۸) اثر کلشی‌سین، تری‌فلورالین و اریزالین را بر تشکیل و رشد جنین، باززایی گیاه و میزان دیپلوئید شدن هیبریدهای F_1 حاصل از کشت میکروسپور کلزا *Brassica napus* مقایسه کردند. نتایج نشان داد که هر سه عامل به‌طور معنی‌دار درصد هاپلوئیدی مضاعف را افزایش داده‌است و تری‌فلورالین با ۸۵/۷٪ فعالیت، مناسب‌ترین و بهترین تیمار بوده‌است. Alishah و Bagherieh-Najjar (۲۰۰۸)، جهت القاء

(trifluoromethyl)benzenamine، شبیه کلشی‌سین با جلوگیری از تشکیل دوک به‌عنوان یک عامل ضد میتوزی منجر به القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه می‌شود (رودی، ۱۳۷۶؛ Grzebelus & Adamus, Hansen & Andersen, 1996). این ماده پرمصرف‌ترین علف‌کش از گروه دی‌نیتروآنیلین‌ها و یکی از مهمترین علف‌کش‌های انتخابی در گیاهان زراعی است که از طریق هیپوکوتیل جذب می‌شود. اثر علف‌کش تری‌فلورالین به دلیل جلوگیری از رشد ریشه علف‌های هرز می‌باشد که علائم آن به‌صورت متورم شدن نوک ریشه‌ها و ممانعت از تشکیل ریشه‌های جانبی و اختلال در جذب عناصر غذایی است. این امر ناشی از اختلال در تقسیم سلولی از طریق دپلیم کردن ریزولوله‌ها و میکروتوبول‌ها است (رودی، ۱۳۷۶؛ Klima *et al.*, 2008).

مطالعات کاربوتیپی انجام شده در گونه *T. foenum-graecum* نشان می‌دهند که تعداد کروموزوم پایه ۸ می‌باشد (ریاست، ۱۳۸۰؛ Raghuvanshi & Pant, 1980؛ Ahmad *et al.*, 1999؛ Ladizinsky & Vosa, 1986). ریاست (۱۳۸۰) اظهار داشت که فرمول کاربوتیپی *T. foenum-graecum* $14Sm + 2m$ می‌باشد. Raghuvanshi و Pant (۱۹۸۰) طی مطالعاتی به این نتیجه دست یافتند که سلول‌های سوماتیکی و میوزی گونه مذکور، دارای ۲ کروموزوم β است و عدد کروموزومی آن $2n = 16 + 2\beta$ می‌باشد. Ladizinsky و Vosa (۱۹۸۶) اظهار داشتند که این گونه با عدد کروموزومی $2n = 16$ ، دارای کاربوتیپ نامتقارن و کروموزوم‌های آکروسانتریک است.

Hansen و Anderse (۱۹۹۶) توانایی کلشی‌سین و علف‌کش تری‌فلورالین را بر دو برابر کردن کروموزوم‌ها

بعد از گذشت سه روز، بذرهای جوانه زده با طول ریشه‌چه $1/5$ تا 2 سانتی‌متر آماده تیمار شدن بودند. برای تیمار کردن از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های $0/5$ ، $0/25$ ، 1 و $gr.L^{-1}$ و از محلول تری‌فلورالین 48% با غلظت‌های $7/5$ ، 15 و $22/5 \mu M$ و در دو مدت زمان 12 و 24 ساعت استفاده شد. پس از شستشوی بذرهای تیمار شده، بذرها به مدت 24 ساعت در شیشه‌های حاوی آب مقطر روی قالب‌های یخ قرار داده شدند.

به‌منظور مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها، تهیه کاریوتیپ و آنالیز ژنوم و همچنین بررسی تغییرات کروموزومی در سلول‌های در حال تقسیم، به‌ترتیب مراحل پیش‌تیمار ($0/5\%$ محلول اشباع شده آلفا بروموناتالین) به مدت 3 ساعت، تثبیت (محلول لویتسکی مرکب از محلول کرومیوم تری‌اکسید و فرمالدئید 40% به نسبت $3:2$) به مدت $20-16$ ساعت در دمای $4^{\circ}C$ ، هیدرولیز (هیدروکسیدسدیم یک نرمال) به مدت $20-17$ دقیقه در دمای $60^{\circ}C$ و رنگ‌آمیزی (مخلوط هماتوکسیلین 4% و یک گرم سولفات آمونیوم فریک) به مدت 120 دقیقه انجام شد. برای تهیه نمونه میکروسکوپی ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده را روی لام گذاشته و قسمت انتهایی نوک ریشه (منطقه مرستمی) که به‌دلیل وجود سلول‌های در حال تقسیم میتوز، رنگ غلیظ‌تری به خود گرفته بودند، با استفاده از تیغ مخصوص برش داده شدند، سپس یک قطره محلول حاوی اسیدلاکتیک و اسید استیک 45% روی نمونه ریخته و لامل روی آن گذاشته شد، به‌طوری که لامل حرکت نکند؛ سپس با انگشت شصت روی لامل فشار وارد آورده تا ضمن خروج رنگ‌های اضافی سلول‌های مرستمی نیز در یک سطح پخش شوند. به این ترتیب نمونه میکروسکوپی آماده شد.

پلی‌پلوئیدی در دو گونه دیپلوئید پنبه از تیمار کردن بذر، مرستم جوانه و جنین با کلشی‌سین استفاده کردند. نتایج نشان داد که غلظت و مدت زمان القاء تیمار و اثرات متقابل آنها بر میزان پلی‌پلوئیدی تأثیر معنی‌داری دارد. آنها همچنین گزارش کردند که بیشترین میزان پلی‌پلوئیدی از تیمار کردن بذرها بدست آمده‌است.

اگرچه به‌طور کلی اثرات پلی‌پلوئیدی قابل پیش‌بینی نیست و باید هر گونه گیاهی را به‌طور مجزا مورد تحقیق قرار داد، اما دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های یک گیاه دارویی، منجر به ایجاد تنوع در ترکیب‌های آلی و گوناگونی آنزیم‌های فعال مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود و می‌تواند روند متابولیسم ثانویه را تسهیل و میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. البته با وجود مطالعه و تحقیقات قابل‌توجه بر گیاهان پلی‌پلوئید، موارد بسیار محدودی از گیاهان دارویی پلی‌پلوئید گزارش شده‌است (Dhawan & Lavania, 1996). هدف از این پژوهش مطالعه اثر این تیمارها بر القاء پلی‌پلوئیدی و بررسی تأثیر این مواد بر خصوصیات سیتوژنتیکی سلول‌های مرستمی این گیاه می‌باشد.

مواد و روشها

مطالعات سیتوژنتیکی گیاه شنبلیله در سال 1388 در آزمایشگاه ژنتیک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس در شیراز انجام شد. بذر گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور بدست آوردن مرستم انتهایی ریشه، بذرها به ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و پس از افزودن آب مقطر، در انکوباتور با دوره نوری 16 ساعت روشنایی و درجه حرارت $24-23^{\circ}C$ و رطوبت 50 تا 60% قرار داده شدند.

بازوی بلند (LA)، طول بازوی کوتاه (SA)، نسبت بازوها (L/S) و شاخص سانترومری (CI) که بیانگر نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم است، محاسبه و در نرم‌افزار Excel نمایش داده می‌شود. برای تعیین نوع کروموزوم‌ها از روش Levan و همکاران (۱۹۶۴) براساس جدول ۱ استفاده شد.

به‌منظور تجزیه آماری داده‌های بدست آمده از میزان پلی‌پلوئیدی ناشی از کاربرد کلشی‌سین و تری‌فلورالین از آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و برای آنالیز داده‌های مربوط به پارامترهای کاریوتیپی از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده برای آنالیزها ANOVA و SAS بود. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و نرم‌افزار MSTATC استفاده گردید.

عکس‌برداری از نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش تحلیل تصویری با بزرگنمایی ۱۸۷۷ برابر انجام شد، به‌طوری‌که تصاویر کروموزومی از طریق Color Video Camera که بر روی میکروسکوپ نوری (میکروسکوپ BH-2 Digital Color Video Camera, Olympus مدل SSC, DC18P) نصب شده بود به مانیتور منتقل شده و ضبط گردید. ابتدا تصاویر تهیه شده به برنامه Photoshop (version 1.04) منتقل شد و پس از مرتب کردن کروموزوم‌ها بر روی یک صفحه و تهیه کاریوتیپ در دو مرحله، قبل و بعد از اعمال تیمار، ویژگی‌های کروموزومی گیاه با استفاده از نرم‌افزار Micromeasure (version 3.3) ارزیابی شد. در این نرم‌افزار از طریق مشخص کردن ابتدا، انتها و محل سانترومر کروموزوم‌ها (شکل ۱)، یکسری از پارامترهای سیتوزنتیکی نظیر طول کروموزوم (TL)، طول



شکل ۱- نمونه‌ای از کاریوتیپ اندازه‌گیری شده با نرم‌افزار میکرومیژر

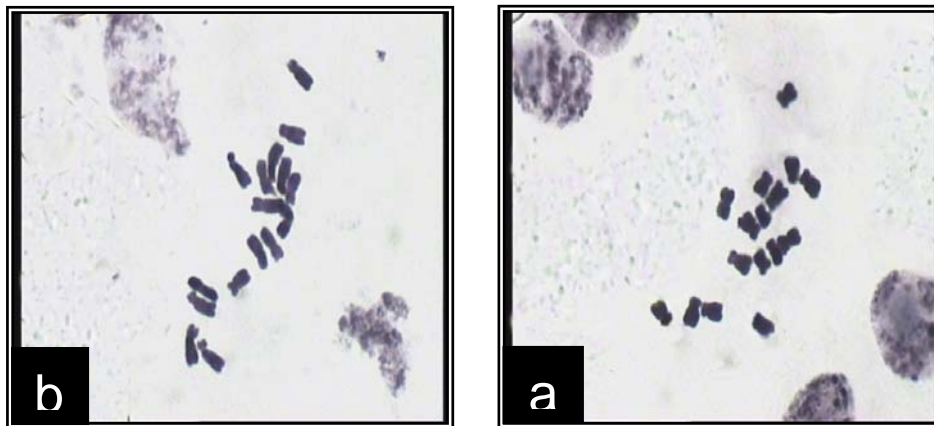
جدول ۱- دسته‌بندی کروموزوم‌های هر کاریوتیپ براساس روش Levan و همکاران (۱۹۶۴)

نسبت بازوها	موقعیت سانترومر	نوع کروموزوم
۱	Median point	M
۱/۱۰-۱/۶۹	Median region	m
۱/۷-۲/۹۹	Submedian region	Sm
۳-۶/۹۹	Subterminal region	St
۷-۳۶/۹۹	Terminal region	t
۳۷	Terminal point	T

نتایج

برای بررسی تأثیر تیمارها بر کروموزومها و مقایسه میزان فعالیت آنها در القاء پلی پلوئیدی، پس از اعمال تیمار، تهیه اسلاید و عکسبرداری، تغییرات کمی و کیفی کروموزومها مورد مطالعه قرار گرفت.

پس از تهیه اسلاید و عکسبرداری از نمونه‌های شاهد، عدد کروموزومی توده بذر مورد نظر مربوط به گونه *T. foenum-graecum*، $2n=2x=16$ بدست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- a و b: تصاویر کروموزومی از مرحله متافاز میتوز نمونه‌های شاهد در گونه *T. foenum-graecum*

تیمار با کلشی‌سین و تری فلورالین

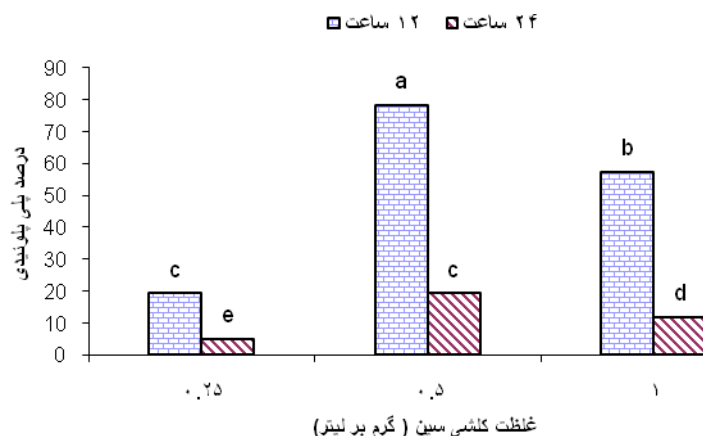
مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد (شکل ۳). افزایش غلظت و زمان تیمار با تری فلورالین منجر به افزایش درصد پلی پلوئیدی شد، به طوری که در غلظت $22/5 \mu\text{M}$ و مدت زمان ۲۴ ساعت بیشترین درصد پلی پلوئیدی القاء شد (شکل ۴).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در هر دو تیمار اثر غلظت، زمان و اثر متقابل غلظت \times زمان در القاء پلی پلوئیدی، در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). در این آزمایش بالاترین درصد القای پلی پلوئیدی، به دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت $0/5 \text{gr.L}^{-1}$ کلشی‌سین در

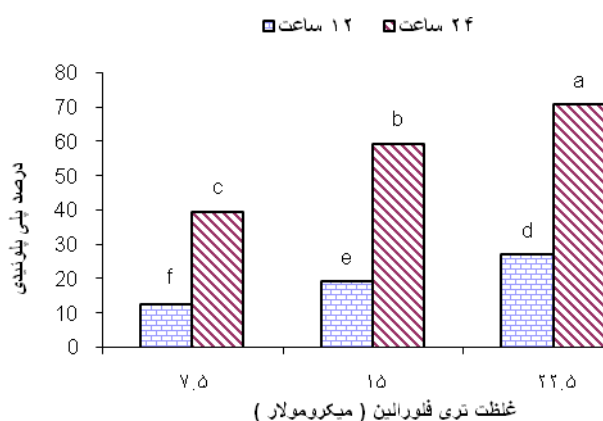
جدول ۲- تجزیه واریانس القاء پلی پلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین و تری فلورالین

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
تری فلورالین	کلشی‌سین		
۰/۰۷۳ **	۰/۱۰۲ **	۲	غلظت
۰/۵۷ **	۰/۴۹۸ **	۱	زمان
۰/۰۸۶ **	۰/۱۲۵ **	۲	غلظت \times زمان
۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۱۶	۱۸	خطای آزمایش
۶/۸۲	۷/۳۷		ضریب تغییرات (%)

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان تیمار با کلشی سین بر میانگین درصد القاء پلی پلوئیدی (حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان تیمار با تری فلورالین بر میانگین درصد القاء پلی پلوئیدی (حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست).

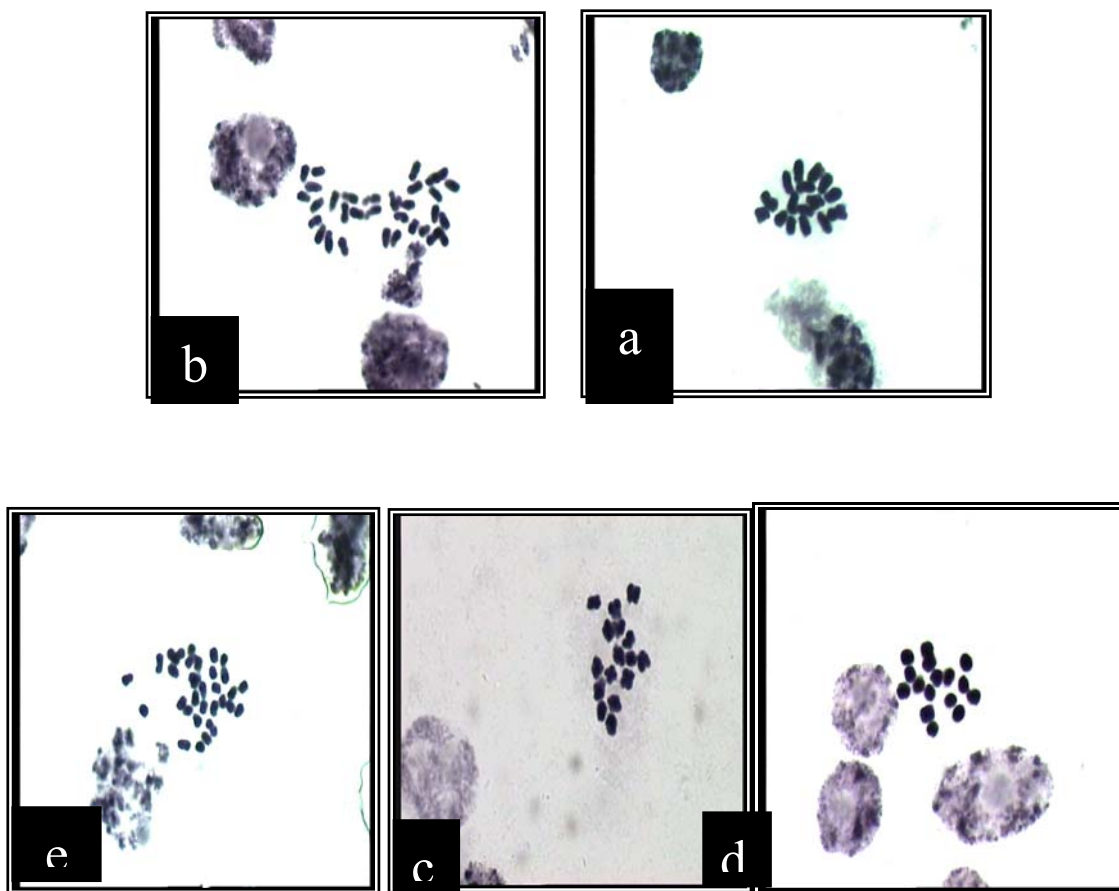
نیز دو برابر شدند و سلول‌های تتراپلوئید ایجاد شد (شکل ۵- b و e).

به عبارت دیگر کروموزوم‌ها تحت تأثیر این تیمارها، چه در حالت دیپلوئیدی و چه در حالت تتراپلوئیدی به شدت کوچک شده بودند، به طوری که این تیمارها شکل، نوع کروموزوم و فرمول کاریوتیپی را تغییر داده بودند.

تغییرات کمی و کیفی کروموزومی تحت تأثیر کلشی سین و تری فلورالین در مقایسه با نمونه شاهد

۱- در بعضی از سلول‌ها، شکل، اندازه کروموزوم‌ها و فرمول کاریوتیپی تغییر کرد، اما سطح پلوئیدی بدون تغییر ماند (شکل ۵- a، c و d).

۲- در تعداد دیگری از سلول‌ها، شکل، اندازه کروموزوم‌ها و فرمول کاریوتیپی تغییر کرد و کروموزوم‌ها



شکل ۵- تصاویر کروموزومی از مرحله متافاز میتوز نمونه‌های تیمار شده در گونه *T. foenum-graecum*

شکل a و b: حاصل از تیمار با کلشی‌سین
شکل c, d, e: حاصل از تیمار با تری‌فلورالین

تصاویر کاریوتیپ گونه مورد مطالعه، قبل و بعد از اعمال تیمار در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده‌است.

شاهد (قبل از تیمار)

$$2n=16$$

پس از تیمار

$$n=16$$

پس از تیمار

$$n=4x=32$$



شکل ۶- تصاویر کاریوتیپی قبل و پس از تیمار با کلشی‌سین

شاهد (قبل از تیمار)

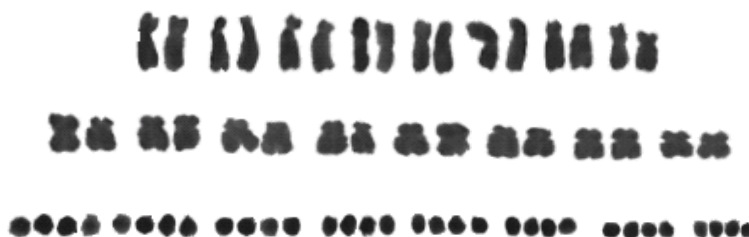
$$2n=16$$

پس از تیمار

$$n=16$$

پس از تیمار

$$n=4x=32$$



شکل ۷- تصاویر کاربوتیپی قبل و پس از تیمار با تری‌فلورالین

تجزیه کاربوتیپی نمونه شاهد

تجزیه کاربوتیپی نمونه شاهد نشان داد که این گونه با $2n=2x=16$ گونه‌ای دیپلوئید و تعداد کروموزوم پایه در آن $X=8$ بود. طول کل کروموزوم‌های هاپلوئید $40/28\mu\text{m}$ ، مجموع طول بازوهای بلند $27/06\mu\text{m}$ و مجموع طول بازوهای کوتاه $13/22\mu\text{m}$ بود. همچنین بلندترین کروموزوم $6/20\mu\text{m}$ ، کوتاه‌ترین کروموزوم

$4/07\mu\text{m}$ و متوسط طول هر کروموزوم نیز $5/03\mu\text{m}$ بود. فرمول کاربوتیپی این ژنوتیپ $7sm + 1m$ بود که $87/5\%$ از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و $12/5\%$ از آنها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاربوتیپی این ژنوتیپ در جدول ۳ نشان داده شده‌است.

جدول ۳- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاربوتیپی شاهد

فرمول کاربوتیپی	شاخص سانترومتری	نسبت بازوها	طول کل کروموزوم (μm)	بازوی کوتاه (μm)	بازوی بلند (μm)	کروموزوم
sm	۰/۲۹	۲/۴۰	۶/۲۰	۱/۸۲	۴/۳۷	۱
m	۰/۳۷	۱/۶۹	۵/۵۶	۲/۰۶	۳/۵۰	۲
sm	۰/۳۵	۱/۸۸	۵/۳۴	۱/۸۶	۳/۴۸	۳
sm	۰/۳۲	۲/۱۵	۵/۱۴	۱/۶۳	۳/۵۱	۴
sm	۰/۳۲	۲/۱۶	۴/۹۱	۱/۵۵	۳/۳۶	۵
sm	۰/۳۲	۲/۱۰	۴/۷۰	۱/۵۲	۳/۱۸	۶
sm	۰/۳۲	۲/۱۷	۴/۳۶	۱/۳۸	۲/۹۸	۷
sm	۰/۳۴	۱/۹۱	۴/۰۷	۱/۴۰	۲/۶۷	۸

sm و m: به ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک

ژنوتیپ $\epsilon m + \epsilon sm$ بود که ۵۰٪ کروموزومها سابمتاسانتریک و ۵۰٪ دیگر متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاربوتیپ در جدول ۴ نشان داده شده است.

تجزیه کاربوتیپ نمونه دیپلوئید (پس از تیمار با کلشی سین)

مطالعه این کاربوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی همچنان به صورت $2n=2x=16$ باقی ماند. البته کلشی سین تنها بر شکل و اندازه کروموزومها تأثیر گذاشته است و تعداد کروموزومها افزایش نیافت. فرمول کاربوتیپی این

جدول ۴- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاربوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با کلشی سین

کروموزوم	بازوی بلند (μm)	بازوی کوتاه (μm)	طول کل کروموزوم (μm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاربوتیپی
۱	۳/۱۵	۱/۷۳	۴/۸۷	۱/۸۲	۰/۳۵	sm
۲	۲/۸۲	۱/۶۶	۴/۴۸	۱/۷۰	۰/۳۷	m
۳	۲/۶۴	۱/۵۴	۴/۱۸	۱/۷۳	۰/۳۷	sm
۴	۲/۴۴	۱/۵۶	۴/۰۱	۱/۵۶	۰/۳۹	m
۵	۲/۴۴	۱/۳۶	۳/۸۰	۱/۷۹	۰/۳۶	sm
۶	۲/۲۱	۱/۴۰	۳/۶۲	۱/۵۸	۰/۳۹	m
۷	۲/۲۲	۱/۲۲	۳/۴۴	۱/۸۲	۰/۳۶	sm
۸	۱/۹۳	۱/۲۱	۳/۱۴	۱/۵۹	۰/۳۹	m

sm و m به ترتیب کروموزوم سابمتاسانتریک و متاسانتریک

تجزیه کاربوتیپ نمونه دیپلوئید (پس از تیمار با تری فلورالین)

مطالعه این کاربوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی همان $2n=2x=16$ بود و تری فلورالین فقط شکل و اندازه کروموزومها را تغییر داده و تأثیری بر تعداد کروموزومها نداشت. فرمول کاربوتیپی این ژنوتیپ $8m +$ و کل کروموزومها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاربوتیپ در جدول ۶ نشان داده شده است.

تجزیه کاربوتیپ نمونه تتراپلوئید (پس از تیمار با کلشی سین)

مطالعه این کاربوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی به صورت $2n=4x=32$ افزایش یافت. در این حالت هم شکل و اندازه کروموزومها و هم تعداد کروموزومها تغییر کرد. فرمول کاربوتیپی $12sm + 4m$ و ۷۵٪ از کروموزومها سابمتاسانتریک و ۲۵٪ از کروموزومها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاربوتیپ در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاربوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی سین

فرمول کاربوتیپی	شاخص سانترومتری	نسبت بازوها	طول کل کروموزوم (μm)	بازوی کوتاه (μm)	بازوی بلند (μm)	کروموزوم
m	۰/۴۳	۱/۳۱	۴/۴۴	۱/۹۲	۲/۵۲	۱
sm	۰/۳۷	۱/۷۲	۴/۱۲	۱/۵۱	۲/۶۱	۲
m	۰/۳۷	۱/۶۹	۴/۰۷	۱/۵۲	۲/۵۶	۳
m	۰/۳۸	۱/۶۰	۳/۹۷	۱/۵۳	۲/۴۴	۴
m	۰/۴۰	۱/۵۰	۳/۸۶	۱/۵۴	۲/۳۲	۵
sm	۰/۳۵	۱/۸۸	۳/۷۲	۱/۲۹	۲/۴۳	۶
sm	۰/۳۶	۱/۷۵	۳/۶۲	۱/۳۲	۲/۳۱	۷
sm	۰/۳۳	۲/۰۸	۳/۵۵	۱/۱۵	۲/۳۹	۸
sm	۰/۳۶	۱/۷۹	۳/۴۶	۱/۲۴	۲/۲۲	۹
sm	۰/۳۴	۱/۶۹	۳/۳۳	۱/۱۳	۲/۲۱	۱۰
sm	۰/۳۳	۲/۰۷	۳/۲۳	۱/۰۵	۲/۱۸	۱۱
sm	۰/۳۲	۲/۰۹	۳/۱۷	۱/۰۳	۲/۱۴	۱۲
sm	۰/۳۵	۱/۸۸	۲/۹۶	۱/۰۳	۱/۹۳	۱۳
sm	۰/۳۵	۱/۸۸	۲/۸۸	۱	۱/۸۸	۱۴
sm	۰/۳۳	۲/۰۳	۲/۷۷	۰/۹۱	۱/۸۵	۱۵
sm	۰/۳۵	۱/۸۸	۲/۴۹	۰/۸۶	۱/۶۳	۱۶

m و sm: به ترتیب کروموزوم ساب متاسانتریک و متاسانتریک

جدول ۶- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاربوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با تری فلورالین

فرمول کاربوتیپی	شاخص سانترومتری	نسبت بازوها	طول کل کروموزوم (μm)	بازوی کوتاه (μm)	بازوی بلند (μm)	کروموزوم
m	۰/۴۱	۱/۴۴	۳/۸۲	۱/۵۷	۲/۲۶	۱
m	۰/۴۴	۱/۳۰	۳/۵۱	۱/۵۳	۱/۹۸	۲
m	۰/۴۳	۱/۳۵	۳/۲۴	۱/۳۸	۱/۸۶	۳
m	۰/۴۲	۱/۴۰	۳/۱۳	۱/۳۰	۱/۸۳	۴
m	۰/۴۲	۱/۳۸	۳/۰۷	۱/۲۹	۱/۷۸	۵
m	۰/۴۲	۱/۳۸	۲/۹۸	۱/۲۵	۱/۷۳	۶
m	۰/۴۳	۱/۳۲	۲/۹۱	۱/۲۵	۱/۶۶	۷
m	۰/۴۴	۱/۲۸	۲/۶۳	۱/۱۵	۱/۴۸	۸

m: کروموزوم متاسانتریک

تجزیه کاریوتیپ نمونه تتراپلوئید (پس از تیمار با تری فلورالین)

در این حالت نه تنها شکل و اندازه کروموزومها تغییر یافت بلکه تعداد کروموزومها نیز دو برابر شد و عدد کروموزومی به صورت $2n=4x=32$ افزایش یافت. فرمول

کاریوتیپی $3sm + 13m$ و $18/75\%$ از کروموزومها سابمتاسانتریک و $81/25\%$ از کروموزومها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول ۷- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با تری فلورالین

کروموزوم	بازوی بلند (μm)	بازوی کوتاه (μm)	طول کل کروموزوم (μm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
۱	۱/۷۱	۰/۹۴	۲/۶۵	۱/۸۱	۰/۳۶	sm
۲	۱/۴۳	۰/۹۸	۲/۴۱	۱/۴۶	۰/۴۱	m
۳	۱/۴۹	۰/۸۷	۲/۳۶	۱/۷۲	۰/۳۷	sm
۴	۱/۳۵	۰/۹۵	۲/۳۱	۱/۴۲	۰/۴۱	m
۵	۱/۳۸	۰/۸۷	۲/۲۴	۱/۵۹	۰/۳۹	m
۶	۱/۳۵	۰/۸۵	۲/۲۱	۱/۵۹	۰/۳۹	m
۷	۱/۲۴	۰/۹۳	۲/۱۷	۱/۳۴	۰/۴۳	m
۸	۱/۳۲	۰/۸۰	۲/۱۲	۱/۶۴	۰/۳۸	m
۹	۱/۲۰	۰/۸۹	۲/۰۹	۱/۳۵	۰/۴۳	m
۱۰	۱/۲۴	۰/۸۳	۲/۰۷	۱/۵۰	۰/۴۰	m
۱۱	۱/۲۳	۰/۸۰	۲/۰۳	۱/۵۳	۰/۴۰	m
۱۲	۱/۱۹	۰/۷۹	۱/۹۸	۱/۵۱	۰/۴۰	m
۱۳	۱/۱۴	۰/۸۰	۱/۹۴	۱/۴۲	۰/۴۱	m
۱۴	۱/۱۸	۰/۶۹	۱/۸۷	۱/۷۱	۰/۳۷	sm
۱۵	۱/۱۰	۰/۶۹	۱/۷۹	۱/۶۰	۰/۳۸	m
۱۶	۰/۹۷	۰/۷۱	۱/۶۸	۱/۳۵	۰/۴۳	m

sm و m: به ترتیب کروموزوم سابمتاسانتریک و متاسانتریک

مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی نمونه‌ها

بین کاریوتیپها در تمام صفات کروموزومی اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت که این امر بیانگر تأثیر معنی دار کلشی سین و تری فلورالین در ایجاد تغییرات کروموزومی در گونه مورد نظر بود. پس از

تأیید اختلاف بین کاریوتیپها، کاریوتیپها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند (جدولهای ۸ و ۹).

جدول ۸- مقایسه میانگین ویژگی‌های کروموزومی در کاربوتیپ نمونه شاهد و نمونه‌های حاصل از تیمار با کلشی‌سین

کاربوتیپ	متوسط طول کل کروموزوم	متوسط بازوی بلند	متوسط بازوی کوتاه	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری
دیپلوئید (شاهد)	۵/۰۳ a	۳/۳۸ a	۱/۶۵ a	۲/۱۱ a	۰/۳۳۰ b
دیپلوئید	۳/۹۴ b	۲/۴۸ b	۱/۴۶ b	۱/۶۹ b	۰/۳۷۳ a
تتراپلوئید	۳/۴۷ c	۲/۲۲ b	۱/۲۵ c	۱/۸۵ b	۰/۳۵۸ a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون دانکن).

جدول ۹- مقایسه میانگین ویژگی‌های کروموزومی در کاربوتیپ نمونه شاهد و نمونه‌های حاصل از تیمار با تری‌فلورالین

کاربوتیپ	متوسط طول کل کروموزوم	متوسط بازوی بلند	متوسط بازوی کوتاه	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری
دیپلوئید (شاهد)	۵/۰۳ a	۳/۳۸ a	۱/۶۵ a	۲/۱۱ a	۰/۳۳۰ c
دیپلوئید	۳/۱۶ b	۱/۸۲ b	۱/۳۴ b	۱/۳۷ c	۰/۴۲۵ a
تتراپلوئید	۲/۱۱ c	۱/۲۸ c	۰/۸۳ c	۱/۵۶ b	۰/۳۹۶ b

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست.

بحث

مطالعات کاربوتیپی انجام شده در این تحقیق نشان داد که تعداد کروموزوم پایه در گونه *T. foenum-graecum* ۸ ($X=8$) بود که مشابه نتایج تعداد زیادی از محققان می‌باشد (ریاست، ۱۳۸۰؛ Raghuvanshi & Pant, 1980؛ Ahmad et al., 1999؛ Ladizinsky & Vosa, 1986). در این تحقیق، فرمول کاربوتیپی گونه مورد مطالعه، $2n = 4m + 4sm$ بدست آمد که ۸۷/۵٪ از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ۱۲/۵٪ از آنها متاسانتریک بودند که با نتیجه ریاست (۱۳۸۰) مطابقت داشت. مغایر با نتایج این تحقیق، Ladizinsky و Vosa (۱۹۸۶) اظهار داشتند که کلیه کروموزوم‌های این گونه آکروسانتریک است و Raghuvanshi و Pant (۱۹۸۰) از وجود ۲ کروموزوم β

در کاربوتیپ این گونه گزارش دادند و عدد کروموزومی آن را $2n = 16 + 2\beta$ اعلام کردند. در این تحقیق مشابه اغلب گزارش‌های قبلی ثابت شد که تری‌فلورالین و کلشی‌سین از جمله عوامل ضدستز میکروتوبول‌ها و پلی‌پلوئیدکننده قوی می‌باشند (Hansen Rauf et al., 1998؛ Grzebelus & Adamus, 2004؛ Klima et al., 2006؛ Klima et al., 2008). اگرچه غلظت‌های تری‌فلورالین در این پژوهش تقریباً ۱۰۰ برابر کمتر از غلظت‌های کلشی‌سین مورد استفاده بود، اما درصد کلی پلی‌پلوئیدی القاء شده تحت تأثیر تری‌فلورالین بیشتر از کلشی‌سین بود که این امر بیانگر تأثیر بیشتر تری‌فلورالین در القاء پلی‌پلوئیدی در این گیاه است. مطابق با این نتیجه، Grzebelus و Adamus (۲۰۰۴) و Klima و همکاران

Najjar (۲۰۰۸) نشان می‌دهد که بیشترین میزان القاء پلی‌پلوئیدی از تیمار کردن بذرها بدست آمده‌است. آنها اظهار داشتند که کلشی‌سین باعث کوتاه‌تر و فشرده‌تر شدن کروموزوم‌ها شده است که با نتایج حاصل از آزمایش ما مطابقت داشت.

با توجه به شکل ۴ مشاهده می‌شود که در غلظت‌های یکسان تری‌فلورالین با افزایش مدت زمان القاء تیمار، افزایش درصد پلی‌پلوئیدی بسیار بیشتر از حالتی است که در زمان‌های یکسان، غلظت تری‌فلورالین افزوده شده‌است. در این تحقیق بهترین تیمار جهت القاء پلی‌پلوئیدی، $22/5\mu\text{M}$ تری‌فلورالین در مدت زمان ۲۴ ساعت بود و با افزایش غلظت و زمان القاء تری‌فلورالین، درصد سلول‌های پلی‌پلوئید افزایش پیدا کرد که با گزارش‌های Hansen و همکاران (۱۹۹۸) راجع به اثر تری‌فلورالین بر دو برابر شدن کروموزوم‌های تخمک چغندر قند مطابقت داشت. این در حالیست که Hansen و Anderse (۱۹۹۶) با افزایش مدت زمان القاء تری‌فلورالین (از ۱۲ به ۲۴ ساعت) با کاهش میزان دیپلوئیدی میکروسپورهای کلزا مواجه شدند که علت آن را سمیت این ماده در غلظت‌های بالا یا مدت زمان طولانی القای تیمار بیان کردند.

با توجه به جدول‌های ۸ و ۹ مشاهده می‌شود که کلشی‌سین و تری‌فلورالین به شدت بر طول کروموزوم‌ها و بالطبع بر فرمول کاریوتیپی اثر گذاشته بودند، به طوری که بلندترین کروموزوم‌ها متعلق به کاریوتیپ شاهد و کوتاه‌ترین کروموزوم‌ها پس از تیمار با تری‌فلورالین مشاهده شدند. البته پس از انجام تیمار از درصد کروموزوم‌های ساب‌متاساتریک کاسته و به درصد کروموزوم‌های متاساتریک افزوده شد. تجزیه واریانس

(۲۰۰۸) گزارش کردند که در مطالعات آنها تری‌فلورالین در مقایسه با کلشی‌سین تیمار دوپل‌کننده بهتری بوده‌است. Klima و همکاران (۲۰۰۸) اظهار داشتند که تهیه راحت، ارزان‌تر بودن، سمیت کمتر و ایمن‌تر بودن تری‌فلورالین نسبت به کلشی‌سین این ماده را به تیماری مناسب جهت القاء پلی‌پلوئیدی تبدیل کرده‌است. بعکس Hansen و Anderse (۱۹۹۶) در مقایسه توان پلی‌پلوئیدکنندگی کلشی‌سین و تری‌فلورالین در کشت درون شیشه‌ای میکروسپور کلزا و Rey و همکاران (۲۰۰۲) در تولید گیاهان تتراپلوئید حاصل از باززایی جنین‌های سوماتیکی گیاه *Ilex paraguariensis* کلشی‌سین را موفق‌تر اعلام کردند.

در این آزمایش هر یک از عوامل غلظت تیمارها، مدت زمان القاء تیمارها و اثرات متقابل بین آنها در القاء پلی‌پلوئیدی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان داد. این نتیجه با دستاوردهای Alishah و Bagherieh-Najjar (۲۰۰۸) مربوط به القاء پلی‌پلوئیدی در پنبه به وسیله کلشی‌سین که اظهار داشتند غلظت و مدت زمان القاء کلشی‌سین و اثرات متقابل آنها بر میزان پلی‌پلوئیدی تأثیر معنی‌دار دارد، مطابقت داشت. براساس شکل ۳، بالاترین درصد القای پلی‌پلوئیدی توسط کلشی‌سین، به دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت $0/5\text{gr.L}^{-1}$ در مدت زمان ۱۲ ساعت مشاهده شد. افزایش غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین منجر به کاهش میزان پلی‌پلوئیدی شد که احتمالاً استفاده از غلظت‌های بالاتر کلشی‌سین در مدت زمان بیشتر منجر به افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی، تداخل در تقسیمات منظم سلولی و مرگ سلول‌ها می‌شود و مانعی در ایجاد پلی‌پلوئیدی است. مطالعات Alishah و Bagherieh-

- of gynogenic onion embryos. *Plant Science*, 167(3): 569-574.
- Hansen, A.L., Gertz, A., Joersbo, M. and Andersen, S.B., 1998. Antimicrotubule herbicides for in vitro chromosome doubling in *Beta Vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica*, 101(2): 231-237.
 - Hansen, N.J.P. and Andersen, S.B., 1996. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*, 88(2): 159-164.
 - Jesus, L.D. 2003. Effect of artificial polyploidy in transformed roots of *Artemisia annua* L. A Thesis Submitted to the Faculty of Worcester Polytechnic Institute, 111p.
 - Klima, M., Vyvadilova, M. and Kucera, V., 2008. Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44(1): 30-36.
 - Ladizinsky, G. and Vosa, C.G., 1986. Karyotype and c-banding in *Trigonella* section *foenum-graecum*. *Plant Systematic and Evolution*, 153(1): 1-5.
 - Levan, A.K., Fredga, K. and Sandberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2): 201-220.
 - Neeraja, A. and Rajyalakshmi, P., 1996. Hypoglycemic effect of processed fenugreek seeds in humans. *Journal of Food Science and Technology*, 33(5): 427-430.
 - Nour, A. and Magboul, B., 1986. Chemical and amino acid composition of fenugreek seeds grown in Sudan. *Food Chemistry*, 22(1): 1-5.
 - Raghuvanshi, S.S. and Pant, M., 1980. Studies on the distribution of b chromosome in different plant parts of *Trigonella foenum-graecum*. *Caryologia*, 33(2): 215-225.
 - Rauf, S., Ahmad Khan, I. and Ahmad Khan, F., 2006. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L. *Turkish Journal of Biology*, 30: 93-100.
 - Rey, H.Y., Sansberro, P.A., Collavino, M.M., Davina, J.R., Gonzalez, A.M. and Mroginski, L.A., 2002. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis*. *Euphytica*, 123: 49-56.
 - Sharma, R.D., Sarkar, A., Hazra, D.K., Mishra, B., Singh, J.B., Sharma, S.K., Maheshwari, B.B. and Maheshwari, P.K., 1996. Use of fenugreek seed powder in the management of non insulin dependent diabetes mellitus. *Nutrition Research*, 16(8): 1331-1339.
 - Tapadia, S.B., Arya, A.B. and Devi, P.R., 1995. Vitamin C contents of processed vegetables. *Food Science and Technology*, 32(6): 513-515.
- داده‌های حاصل از ویژگی‌های کروموزومی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین کاریوتیپ نمونه‌های تیمار شده و شاهد در سطح ۱٪ بود.
- کلشی سین و تری فلورالین با ایجاد تغییرات کمی و کیفی کروموزومی و القاء پلی‌پلوئیدی، احتمالاً تیمارهای مناسبی برای افزایش سطح پلوئیدی و اصلاح صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و همچنین متابولیت‌های با ارزش این گیاه باشند.
- ### منابع مورد استفاده
- رجحان، م.ص.، ۱۳۷۹. بهداشت و درمان با گیاهان دارویی و فارماکوگنوزی. انتشارات طنین، تهران، ۲۰۶ صفحه.
 - رودی، د.، ۱۳۷۶. تأثیر تری فلورالین و آهن بر خصوصیات مورفولوژیک و جذب آهن ارقام سویا در گلخانه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
 - ریاست، م.، ۱۳۸۰. بررسی سیتوژنتیکی جنس شنبليله (*Trigonella*) در استان فارس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ۱۲۱ صفحه.
 - نجف‌پور نوایی، م.، ۱۳۷۳. مطالبی پیرامون گیاه دارویی شنبليله. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، ۱۸ صفحه.
 - Adaniya, S. and Shirai, D., 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Science Horticulture*, 88(4): 277-287.
 - Ahmad, F., Acharya, S., Mir, Z. and Mir, P.S., 1999. Localization and activity of rRNA genes of fenugreek in situ hybridization and silver staining. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(2): 179-185.
 - Alishah, O. and Bagherieh-Najjar, M.B., 2008. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* and *G. arboreum*) species by colchicine treatments. *African Journal of Biotechnology*, 7(2), 102-108.
 - Dhawan, O.P. and Lavania, U.C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 87: 81-89.
 - Elliot, F.C., 1958. *Plant Breeding and Cytogenetics*. McGraw-Hill Book Company INC., 395p.
 - Grzebelus, E. and Adamus, A., 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling

Investigation the effect of colchicine and trifluralin on cytogenetic characteristics in root meristem cells of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

E. Afshari^{1*}, G.A. Ranjbar², S.K. Kazemitabar², M. Riasat³ and H. Kazemi Poshtmasari⁴

1*- Corresponding author, Member of Young Researchers Club of Islamic Azad University of Shiraz Branch, Iran
E-mail: elhamafshari2010@yahoo.com

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources of Sari University, Sari, Iran

3- Research Center for Agriculture and Natural Resources of Fars, Shiraz, Iran

4- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: December 2011

Revised: February 2012

Accepted: February 2012

Abstract

Doubling the number of chromosomes in a medicinal plant leads to variation in allelic composition and diversity of active enzymes in secondary metabolites biosynthesis route and can facilitate the process of secondary metabolism and increase secondary metabolite. This experiment was conducted in order to study the effect of colchicine and trifluralin on ploidy induction and cytogenetic characteristics of cells in the root meristem of fenugreek. Root tips were used for karyotypic studies. Seedlings were treated by colchicine solution at 0.25, 0.5 and 1 g l^{-1} concentrations and trifluralin solution 48% at 7.5, 15 and 22.5 μM concentrations for 12 and 24 h. The Video Analysis System was used for karyotype analysis. The basic chromosome number was $X=8$. Results showed that concentration of trifluralin and colchicine, treatments duration and interaction between them on the ploidy induction were statistically significant. The maximum ploidy induction was happened by seedling immersion in 22.5 μM trifluralin for 24 h and in 0.5 g l^{-1} colchicine for 12 h. Treatments affected the length of chromosomes and karyotypic formula. Result of analysis of variance based on completely randomized design (CRD) showed significant differences among the karyotype of control and treated samples for all karyotypic traits ($p < 0.01$). Induced polyploidy affected by trifluralin was more than that of colchicines, although the concentrations of trifluralin were approximately 100 times lower than concentrations of colchicine. This indicates a greater ability of trifluralin in ploidy induction in this plant.

Key words: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), cytogenetic characteristics, ploidy induction, colchicine, trifluralin.