DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.4316

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۹۵۱-۹۳٦ (۱۳۹۲)

بررسی تأثیر کلشی‌سین و تری‌فلورالین بر خصوصیات سیتوژنتیکی سلول‌های مریستمی ریشه گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

الهام افشاری[1*]، غلامعلی رنجبر[2]، سیدکمال کاظمی‌تبار[2]، مهرناز ریاست[3] و حسین کاظمی پشت‌مساری[4]

۱*- 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
٤- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های یک گیاه دارویی، منجر به ایجاد تنوع در ترکیب‌های آللی 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 به‌منظور مطالعه اثر کلشی‌سین و تری‌فلورالین بر القاء پلی‌پلوئیدی و بررسی تأثیر این مواد بر خصوصیات سیتوژنتیکی سلول‌های مریستمی ریشه گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) انجام شد. از مریستم انتهایی ریشه برای مطالعات کاریوتیپی استفاده شد. جهت تیمار کردن بذرهای جوانه زده از محلول کلشی‌سین به غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ $gr.L^{-1}$ و محلول تری‌فلورالین ٤۸٪ به غلظت‌های ۷/۵ ، ۱۵ و ۲۲/۵ μM، در دو مدت زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت استفاده شد. خصوصیات سیتوژنتیکی با استفاده از روش تحلیل تصویری مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کروموزوم پایه در گونه مورد بررسی X=۸ 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 ۲۲/۵μM تری‌فلورالین در مدت زمان ۲٤ ساعت و غلظت ۰/۵$gr.L^{-1}$ کلشی‌سین در مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد. به‌طوری‌که تیمارها بر طول کروموزوم‌ها و بالطبع بر فرمول کاریوتیپی اثر گذاشته بودند. البته بین کاریوتیپ‌ها در تمام ویژگی‌های کروموزومی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. ازاین‌رو میزان پلی‌پلوئیدی القاء شده تحت تأثیر تری‌فلورالین بیشتر از کلشی‌سین بود، اگرچه غلظت‌های تری‌فلورالین تقریباً ۱۰۰ برابر کمتر از غلظت‌های کلشی‌سین مورد استفاده بود که این امر بیانگر توانایی بیشتر تری‌فلورالین در القاء پلی‌پلوئیدی در این گیاه است.

واژه‌های کلیدی: شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، خصوصیات سیتوژنتیکی، القاء پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، تری‌فلورالین.

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، گیاهی یک‌ساله و علفی از خانواده لگومینوز، بومی ایران و غرب آسیا می‌باشد (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳). هر ۱۰۰ گرم برگ آن شامل ٤/٦gr پروتئین، ٦/۲gr کربوهیدرات و ۰/۲gr چربی است (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳). Tapadia و همکاران (۱۹۹۵) بررسی‌هایی مبنی بر وجود ویتامین C در برگ‌های گیاه شنبلیله انجام دادند. کلسیم، آهن، کاروتن، اسید آسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریبوفلاوین ازجمله مواد با اهمیت در برگ شنبلیله است. جوانه‌ها سرشار از ویتامین A و فسفر هستند. Nour و Magboul (۱۹۸٦) در تحقیقی دیگر بر روی دانه‌های شنبلیله، دریافتند که این دانه‌ها شامل مقادیر فراوانی سدیم، پتاسیم، آهن، کلسیم، فسفر، منگنز، روی و مس است و از نظر لوسین، والین، لیزین و فنیل آلانین نیز غنی می‌باشند.

در تحقیقات متعددی که توسط محققان بعمل آمده از این گیاه به‌عنوان دارویی مؤثر برای بیماران دیابتی نام برده شده‌است (Sharma *et al*., 1996). به‌طوری که مصرف پودر دانه‌های شنبلیله سبب کاهش کلسترول و گلوکز خون شده‌است (Neeraja & Rajyalakshmi., 1996). دانه شنبلیله نه تنها اثر نرم‌کننده و رفع تحریکات جلدی دارد، بلکه در برخی از مناطق آفریقا برای درمان دردهای نقرس، فشارهای عصبی، سیاتیک، تورم غدد لنفاوی، زخم‌ها، جراحت‌ها و تحریکات پوستی بکار می‌رود. به‌علاوه از این گیاه برای درمان موضعی ترک‌خوردگی لب و زخم‌های دهان هم استفاده می‌شود. گزارش شده که شنبلیله میزان ترشح شیر را در مادران افزایش می‌دهد (رجحان، ۱۳۷۹).

در اغلب گونه‌های گیاهی، القاء پلی‌پلوئیدی با افزایش در اندازه سلول‌ها، توانایی تولید اندام‌های رویشی قویتر را بوجود آورده‌است. اندام‌های رویشی، منبع بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش تجاری هستند (Adaniya & Shira, 2001). بنابراین ممکن است که القاء پلی‌پلوئیدی در افزایش کمّیت و کیفیت این ترکیب‌های با ارزش دارویی نقش مهمی داشته باشد (Dhawan & Lavania, 1996). در مقایسه تعداد زیادی از گیاهان پلی‌پلوئید با همتای دیپلوئیدشان، افزایش در تولید ترکیب‌های شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه مشاهده شده است؛ مثلاً گزارش شده که تتراپلوئیدهای دو گیاه دارویی بابونه و مریم‌گلی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای بیشتری را نسبت به حالت دیپلوئید تولید می‌کنند یا میزان آرتمیزینین در درمنه تتراپلوئید، ۲۰٪ بیشتر از دیپلوئید آن است (Jesus, 2003).

کلشی‌سین با فرمول مولکولی $C_{22}H_{25}NO_6$، نام شیمیایی N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)-acetamide، یک آمین آلکالوئید سه حلقه‌ای مشتق شده از پیازهای گل حسرت با نام علمی *Colchicum autumnale* است. کلشی‌سین مهمترین عامل شیمیایی دو برابر نمودن کروموزومی است که در سطح وسیعی بکار می‌رود. این ماده از تشکیل و پلیمرشدن میکروتوبول‌ها، از طریق پیوند با زیرواحد پروتئینی میکروتوبولی به نام توبولین ممانعت می‌کند، بنابراین کروموزوم‌ها در مرحله متافاز، یک‌جا وارد سلول می‌گردند که این امر آن را به یک القاگر فعال پلی‌پلوئیدی تبدیل کرده‌است (Elliot, 1958؛ Alishah & Bagherieh-Najjar, 2008؛ Rauf *et al*., 2006؛ Hansen & Andersen, 1996).

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

(trifluoromethyl)benzenamine)، شبیه کلشی‌سین با جلوگیری از تشکیل دوک به‌عنوان یک عامل ضدمیتوزی منجر به القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه می‌شود (رودی، ۱۳۷٦؛ Hansen & Andersen, 1996؛ Grzebelus & Adamus, 2004). 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 دپلیمر کردن ریزلوله‌ها و میکروتوبول‌ها است (رودی، ۱۳۷٦؛ Klima *et al*., 2008).

مطالعات کاریوتیپی انجام شده در گونه *T. foenum-graecum* نشان می‌دهند که تعداد کروموزوم پایه ۸ می‌باشد (ریاست، ۱۳۸۰؛ Raghuvanshi & Pant, 1980؛ Ladizinsky & Vosa, 1986؛ Ahmad *et al*., 1999). ریاست (۱۳۸۰) اظهار داشت که فرمول کاریوتیپی *T. foenum-graecum*، ۲m + ۱٤Sm 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 ۲n = ۱٦ + ۲β می‌باشد. Ladizinsky و Vosa (۱۹۸٦) اظهار داشتند که این گونه با عدد کروموزومی ۲n = ۱٦، دارای کاریوتیپ نامتقارن و کروموزوم‌های آکروسانتریک است.

Hansen و Anderse (۱۹۹٦) توانایی کلشی‌سین و علف‌کش تری‌فلورالین را بر دو برابر کردن کروموزوم‌ها طی کشت درون شیشه‌ای میکروسپور کلزا مطالعه کردند. طبق گزارش‌های آنها بالاترین میزان دیپلوئیدی (٪۹٤) پس از ۲٤ ساعت تیمار با ۱ mM کلشی‌سین مشاهده شد و در طول ۱۲ ساعت تیمار با تری‌فلورالین، تقریباً ٦٥٪ دیپلوئیدی تولید شد. Hansen و همکاران (۱۹۹۸) تأثیر علف‌کش تری‌فلورالین بر دو برابر شدن کروموزوم‌ها در کشت درون شیشه‌ای تخمک چغندرقند را مطالعه و بیشترین میزان دوبل‌شدگی 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 ٤۸ ساعت قادر به تولید دو گیاه تتراپلوئید شده و دو تیمار دیگر در دو برابر کردن کروموزوم‌ها بی‌اثر بوده‌اند. Grzebelus و Adamus (۲۰۰٤) از عوامل ضدمیتوزی تری‌فلورالین و کلشی‌سین، برای دیپلوئیدسازی جنین‌های ژینوژنیک 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

پلی‌پلوئیدی در دو گونه دیپلوئید پنبه از تیمار کردن بذر، مریستم 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 آللی 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 مریستمی این گیاه می‌باشد.

مواد و روشها

مطالعات سیتوژنتیکی گیاه شنبلیله در سال ۱۳۸۸ 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 مریستم انتهایی ریشه، بذرها به ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و پس از افزودن آب مقطر، در انکوباتور با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲٤°C–۲۳ و رطوبت ۵۰ تا ٦۰٪ قرار داده شدند. بعد از گذشت سه روز، بذرهای جوانه زده با طول ریشه‌چه ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر آماده تیمار شدن بودند. برای تیمار کردن از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ $gr.L^{-1}$ و از محلول تری‌فلورالین ٤۸٪ با غلظت‌های ۷/۵، ۱۵ و ۲۲/۵ µM و در دو مدت زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت استفاده شد. پس از شستشوی بذرهای تیمار شده، بذرها به مدت ۲٤ 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 (۰/۵٪ محلول اشباع شده آلفا برومونفتالین) به مدت ۳ ساعت، تثبیت (محلول لویتسکی مرکب از محلول کرومیوم تری‌اکسید و فرمالدئید ٤۰٪ به نسبت ۳: ۲) به مدت ۲۰–۱٦ ساعت در دمای ٤°C، هیدرولیز (هیدروکسیدسدیم یک نرمال) به مدت ۲۰–۱۷ دقیقه در دمای ٦۰°C و رنگ‌آمیزی (مخلوط هماتوکسیلین ٤٪ و یک گرم سولفات‌آمونیوم فریک) به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. برای تهیه نمونه میکروسکوپی ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده را روی لام گذاشته و قسمت انتهایی نوک ریشه (منطقه مریستمی) 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 ٤۵٪ 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 مریستمی نیز در یک سطح پخش شوند. به این ترتیب نمونه میکروسکوپی آماده شد.

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 سیتوژنتیکی نظیر طول کروموزوم (TL)، طول 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 (۱۹٦٤) 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.

شکل ۱- نمونه‌ای از کاریوتیپ اندازه‌گیری شده با نرم‌افزار میکرومیژر

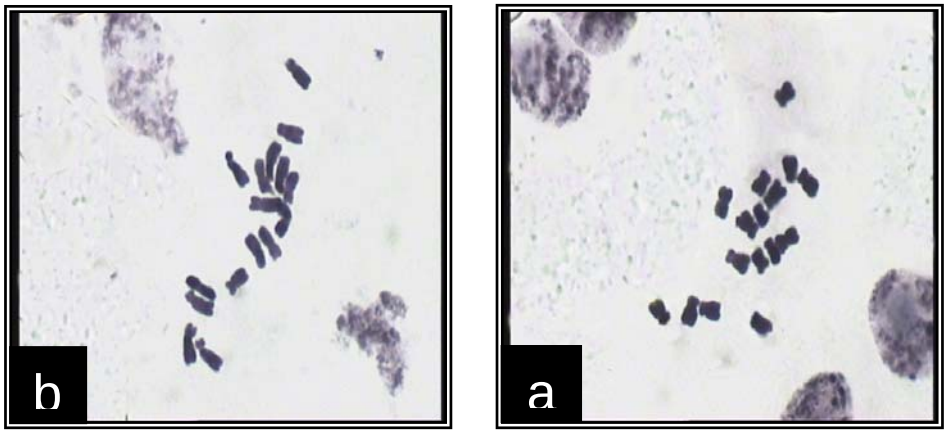
جدول ۱- دسته‌بندی کروموزوم‌های هر کاریوتیپ براساس روش Levan و همکاران (۱۹٦٤)

نوع کروموزوم	موقعیت سانترومر	نسبت بازوها
M	Median point	۱
m	Median region	۱/۱۰-۱/٦۹
Sm	Submedian region	۱/۷-۲/۹۹
St	Subterminal region	۳-٦/۹۹
t	Terminal region	۷-۳٦/۹۹
T	Terminal point	۳۷

نتایج

پس از تهیه اسلاید و عکسبرداری از نمونه‌های شاهد، عدد کروموزومی توده بذر مورد نظر مربوط به گونه *T. foenum-graecum*، ۲n=۲x=۱٦ بدست آمد (شکل ۲).

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



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

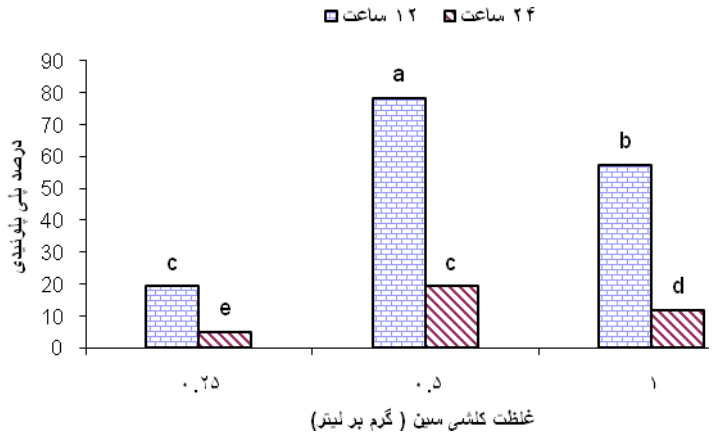
تیمار با کلشی‌سین و تری‌فلورالین

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در هر دو تیمار اثر غلظت، زمان و اثر متقابل غلظت × زمان در القاء پلی‌پلوئیدی، در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). در این آزمایش بالاترین درصد القای پلی‌پلوئیدی، به دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۵gr.L^{-1} کلشی‌سین در مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد (شکل ۳). افزایش غلظت و زمان تیمار با تری‌فلورالین منجر به افزایش درصد پلی‌پلوئیدی شد، به‌طوری که در غلظت ۲۲/۵ µM و مدت زمان ۲٤ ساعت بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی القاء شد (شکل ٤).

جدول ۲- تجزیه واریانس القاء پلی‌پلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین و تری‌فلورالین

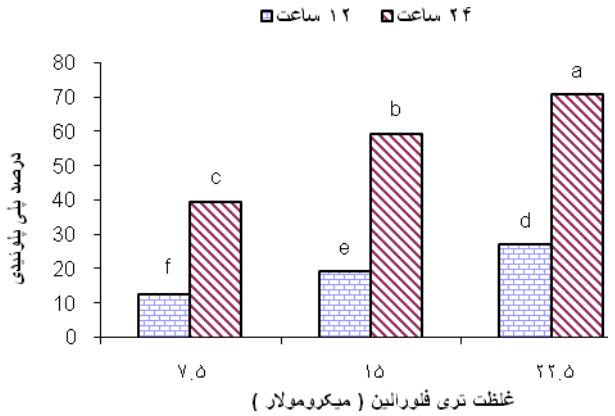
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کلشی‌سین	تری‌فلورالین
غلظت	۲	۰/۱۰۲ **	۰/۰۷۳ **
زمان	۱	۰/٤۹۸ **	۰/۵۷ **
غلظت × زمان	۲	۰/۱۲۵ **	۰/۰۸٦ **
خطای آزمایش	۱۸	۰/۰۰۱٦	۰/۰۰۱٦
ضریب تغییرات (٪)		۷/۳۷	٦/۸۲

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان تیمار با کلشی‌سین بر میانگین درصد القاء پلی‌پلوئیدی

(حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست.)



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان تیمار با تری‌فلورالین بر میانگین درصد القاء پلی‌پلوئیدی

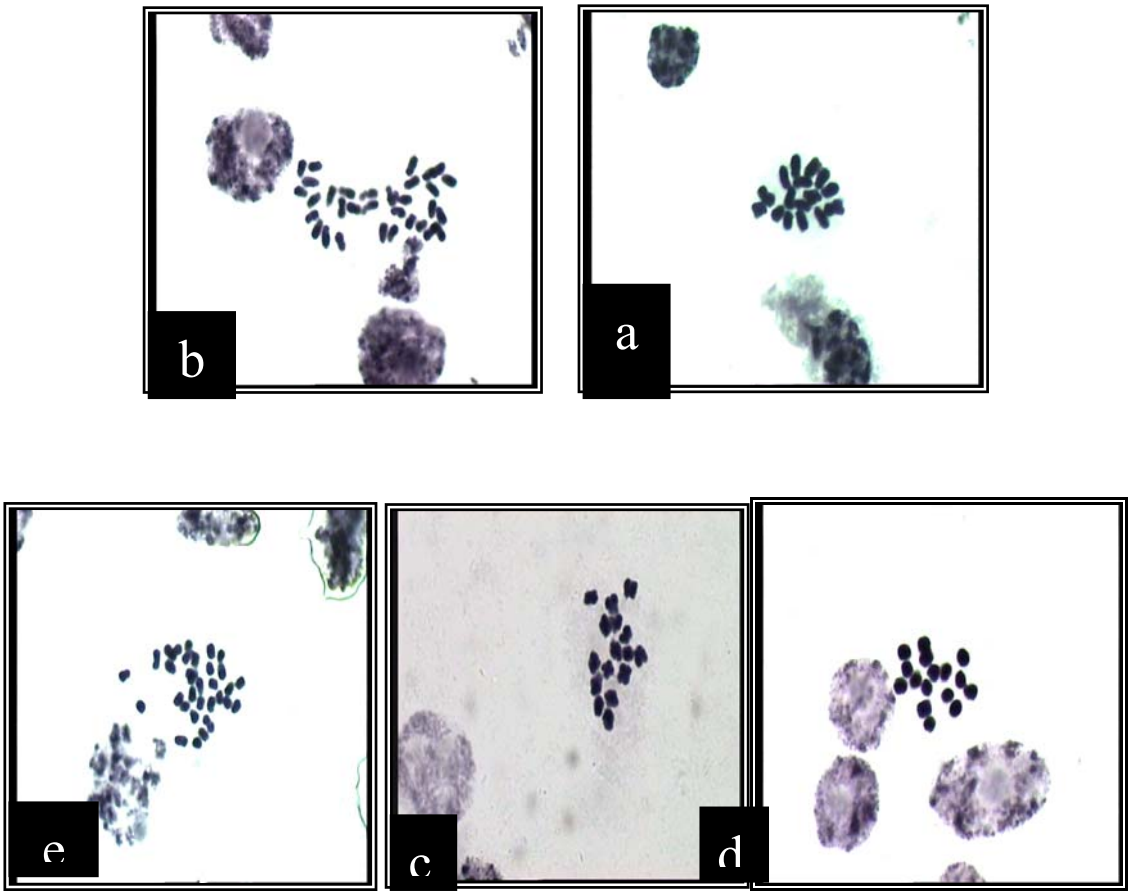
(حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست.)

تغییرات کمّی و کیفی کروموزومی تحت تأثیر کلشی‌سین و تری‌فلورالین 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 نیز دو برابر شدند و سلول‌های تتراپلوئید ایجاد شد (شکل ۵- b و e).

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



شکل ٥- 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 و e: حاصل از تیمار با تری‌فلورالین

تصاویر کاریوتیپ گونه مورد مطالعه، قبل و بعد از اعمال تیمار در شکل ٦ و ۷ نشان داده شده‌است.

شکل ٦- 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 کاریوتیپی قبل و پس از تیمار با تری‌فلورالین

تجزیه کاریوتیپ نمونه شاهد

تجزیه کاریوتیپ نمونه شاهد نشان داد که این گونه با ۲n=۲x=۱٦ گونه‌ای دیپلوئید و تعداد کروموزوم پایه در آن X= ۸ بود. طول کل کروموزوم‌های هاپلوئید ٤۰/۲۸µm، مجموع طول بازوهای بلند ۲۷/۰٦µm و مجموع طول بازوهای کوتاه ۱۳/۲۲µm بود. همچنین بلندترین کروموزوم ٦/۲۰µm، کوتاه‌ترین کروموزوم ٤/۰۷µm و متوسط طول هر کروموزوم نیز ۵/۰۳µm بود. فرمول کاریوتیپی این ژنوتیپ ۷sm + ۱m بود که ۸۷/۵٪ از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ۱۲/۵٪ از آنها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ این ژنوتیپ در جدول ۳ نشان داده شده‌است.

جدول ۳- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ شاهد

کروموزوم	بازوی بلند (µm)	بازوی کوتاه (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
۱	٤/۳۷	۱/۸۲	٦/۲۰	۲/٤۰	۰/۲۹	sm
۲	۳/۵	۲/۰٦	۵/۵٦	۱/٦۹	۰/۳۷	m
۳	۳/٤۸	۱/۸٦	۵/۳٤	۱/۸۸	۰/۳۵	sm
٤	۳/۵۱	۱/٦۳	۵/۱٤	۲/۱۵	۰/۳۲	sm
۵	۳/۳٦	۱/۵۵	٤/۹۱	۲/۱٦	۰/۳۲	sm
٦	۳/۱۸	۱/۵۲	٤/۷۰	۲/۱۰	۰/۳۲	sm
۷	۲/۹۸	۱/۳۸	٤/۳٦	۲/۱۷	۰/۳۲	sm
۸	۲/٦۷	۱/٤۰	٤/۰۷	۱/۹۱	۰/۳٤	sm

sm و m: به‌ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک

تجزیه کاریوتیپ نمونه دیپلوئید (پس از تیمار با کلشی‌سین)

مطالعه این کاریوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی همچنان به‌صورت ۲n=۲x=۱٦ باقی ماند. البته کلشی‌سین تنها بر شکل و اندازه کروموزوم‌ها تأثیر گذاشته‌است و تعداد کروموزوم‌ها افزایش نیافت. فرمول کاریوتیپی این ژنوتیپ ٤sm + ٤m بود که ۵۰٪ کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ۵۰٪ دیگر متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ در جدول ٤ نشان داده شده‌است.

جدول ٤- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین

کروموزوم	بازوی بلند (µm)	بازوی کوتاه (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
۱	۳/۱۵	۱/۷۳	٤/۸۷	۱/۸۲	۰/۳۵	sm
۲	۲/۸۲	۱/٦٦	٤/٤۸	۱/۷۰	۰/۳۷	m
۳	۲/٦٤	۱/٥٤	٤/۱۸	۱/۷۳	۰/۳۷	sm
٤	۲/٤٤	۱/٥٦	٤/۰۱	۱/٥٦	۰/۳۹	m
٥	۲/٤٤	۱/۳٦	۳/۸۰	۱/۷۹	۰/۳٦	sm
٦	۲/۲۱	۱/٤۰	۳/٦۲	۱/٥۸	۰/۳۹	m
۷	۲/۲۲	۱/۲۲	۳/٤٤	۱/۸۲	۰/۳٦	sm
۸	۱/۹۳	۱/۲۱	۳/۱٤	۱/٥۹	۰/۳۹	m

sm و m: به‌ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک

تجزیه کاریوتیپ نمونه تتراپلوئید (پس از تیمار با کلشی‌سین)

مطالعه این کاریوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی به‌صورت ۲n=٤x=۳۲ افزایش یافت. در این حالت هم شکل و اندازه کروموزوم‌ها و هم تعداد کروموزوم‌ها تغییر کرد. فرمول کاریوتیپی ۱۲sm + ٤m و ۷۵٪ از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ۲۵٪ از کروموزوم‌ها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ در جدول ۵ نشان داده شده‌است.

تجزیه کاریوتیپ نمونه دیپلوئید (پس از تیمار با تری‌فلورالین)

مطالعه این کاریوتیپ نشان داد که عدد کروموزومی همان ۲n=۲x=۱٦ بود و تری‌فلورالین فقط شکل و اندازه کروموزوم‌ها را تغییر داده و تأثیری بر تعداد کروموزوم‌ها نداشت. فرمول کاریوتیپی این ژنوتیپ ۸m و کل کروموزوم‌ها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ در جدول ٦ نشان داده شده‌است.

جدول ٥- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده درکاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین

کروموزوم	بازوی بلند (µm)	بازوی کوتاه (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
١	٢/٥٢	١/٩٢	٤/٤٤	١/٣١	٠/٤٣	m
٢	٢/٦١	١/٥١	٤/١٢	١/٧٢	٠/٣٧	sm
٣	٢/٥٦	١/٥٢	٤/٠٧	١/٦٩	٠/٣٧	m
٤	٢/٤٤	١/٥٣	٣/٩٧	١/٦٠	٠/٣٨	m
٥	٢/٣٢	١/٥٤	٣/٨٦	١/٥٠	٠/٤٠	m
٦	٢/٤٣	١/٢٩	٣/٧٢	١/٨٨	٠/٣٥	sm
٧	٢/٣١	١/٣٢	٣/٦٢	١/٧٥	٠/٣٦	sm
٨	٢/٣٩	١/١٥	٣/٥٥	٢/٠٨	٠/٣٣	sm
٩	٢/٢٢	١/٢٤	٣/٤٦	١/٧٩	٠/٣٦	sm
١٠	٢/٢١	١/١٣	٣/٣٣	١/٦٩	٠/٣٤	sm
١١	٢/١٨	١/٠٥	٣/٢٣	٢/٠٧	٠/٣٣	sm
١٢	٢/١٤	١/٠٣	٣/١٧	٢/٠٩	٠/٣٢	sm
١٣	١/٩٣	١/٠٣	٢/٩٦	١/٨٨	٠/٣٥	sm
١٤	١/٨٨	١	٢/٨٨	١/٨٨	٠/٣٥	sm
١٥	١/٨٥	٠/٩١	٢/٧٧	٢/٠٣	٠/٣٣	sm
١٦	١/٦٣	٠/٨٦	٢/٤٩	١/٨٨	٠/٣٥	sm

sm و m: به‌ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک

جدول ٦- پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین

کروموزوم	بازوی بلند (µm)	بازوی کوتاه (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
١	٢/٢٦	١/٥٧	٣/٨٢	١/٤٤	٠/٤١	m
٢	١/٩٨	١/٥٣	٣/٥١	١/٣٠	٠/٤٤	m
٣	١/٨٦	١/٣٨	٣/٢٤	١/٣٥	٠/٤٣	m
٤	١/٨٣	١/٣٠	٣/١٣	١/٤٠	٠/٤٢	m
٥	١/٧٨	١/٢٩	٣/٠٧	١/٣٨	٠/٤٢	m
٦	١/٧٣	١/٢٥	٢/٩٨	١/٣٨	٠/٤٢	m
٧	١/٦٦	١/٢٥	٢/٩١	١/٣٢	٠/٤٣	m
٨	١/٤٨	١/١٥	٢/٦٣	١/٢٨	٠/٤٤	m

m: کروموزوم متاسانتریک

تجزیه کاریوتیپ نمونه تتراپلوئید (پس از تیمار با تری‌فلورالین)

در این حالت نه تنها شکل و اندازه کروموزوم‌ها تغییر یافت بلکه تعداد کروموزوم‌ها نیز دو برابر شد و عدد کروموزومی به‌صورت ۲n=٤x=۳۲ افزایش یافت. فرمول کاریوتیپی ۳sm + ۱۳m و ۱۸/۷۵٪ از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ۸۱/۲۵٪ از کروموزوم‌ها متاسانتریک بودند. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ در جدول ۷ نشان داده شده‌است.

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

کروموزوم	بازوی بلند (µm)	بازوی کوتاه (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری	فرمول کاریوتیپی
۱	۱/۷۱	۰/۹٤	۲/٦٥	۱/۸۱	۰/۳٦	sm
۲	۱/٤۳	۰/۹۸	۲/٤۱	۱/٤٦	۰/٤۱	m
۳	۱/٤۹	۰/۸۷	۲/۳٦	۱/۷۲	۰/۳۷	sm
٤	۱/۳٥	۰/۹٥	۲/۳۱	۱/٤۲	۰/٤۱	m
٥	۱/۳۸	۰/۸۷	۲/۲٤	۱/٥۹	۰/۳۹	m
٦	۱/۳٥	۰/۸٥	۲/۲۱	۱/٥۹	۰/۳۹	m
۷	۱/۲٤	۰/۹۳	۲/۱۷	۱/۳٤	۰/٤۳	m
۸	۱/۳۲	۰/۸۰	۲/۱۲	۱/٦٤	۰/۳۸	m
۹	۱/۲۰	۰/۸۹	۲/۰۹	۱/۳٥	۰/٤۳	m
۱۰	۱/۲٤	۰/۸۳	۲/۰۷	۱/٥۰	۰/٤۰	m
۱۱	۱/۲۳	۰/۸۰	۲/۰۳	۱/٥۳	۰/٤۰	m
۱۲	۱/۱۹	۰/۷۹	۱/۹۸	۱/٥۱	۰/٤۰	m
۱۳	۱/۱٤	۰/۸۰	۱/۹٤	۱/٤۲	۰/٤۱	m
۱٤	۱/۱۸	۰/٦۹	۱/۸۷	۱/۷۱	۰/۳۷	sm
۱٥	۱/۱۰	۰/٦۹	۱/۷۹	۱/٦۰	۰/۳۸	m
۱٦	۰/۹۷	۰/۷۱	۱/٦۸	۱/۳٥	۰/٤۳	m

sm و m: به‌ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک

مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی نمونه‌ها

بین کاریوتیپ‌ها در تمام صفات کروموزومی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت که این امر بیانگر تأثیر معنی‌دار کلشی‌سین و تری‌فلورالین 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 قرارگرفتند (جدولهای ۸ و ۹).

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

کاریوتیپ	متوسط طول کل کروموزوم	متوسط بازوی بلند	متوسط بازوی کوتاه	نسبت بازوها	شاخص سانترومتری
دیپلوئید (شاهد)	۵/۰۳ a	۳/۳۸ a	۱/٦۵ a	۲/۱۱ a	۰/۳۳۰ b
دیپلوئید	۳/۹٤ b	۲/٤۸ b	۱/٤٦ b	۱/٦۹ b	۰/۳۷۳ a
تتراپلوئید	۳/٤۷ 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 کاریوتیپ نمونه شاهد و نمونه‌های حاصل از تیمار با تری‌فلورالین

کاریوتیپ	متوسط طول کل کروموزوم	متوسط بازوی بلند	متوسط بازوی کوتاه	نسبت بازوها	شاخص سانترومری
دیپلوئید (شاهد)	۵/۰۳ a	۳/۳۸ a	۱/٦۵ a	۲/۱۱ a	۰/۳۳۰ c
دیپلوئید	۳/۱٦ b	۱/۸۲ b	۱/۳٤ b	۱/۳۷ c	۰/٤۲۵ a
تتراپلوئید	۲/۱۱ c	۱/۲۸ c	۰/۸۳ c	۱/۵٦ b	۰/۳۹٦ b

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست.

بحث

مطالعات کاریوتیپی انجام شده در این تحقیق نشان داد که تعداد کروموزوم پایه در گونه *T. foenum-graecum* ۸ (X= ۸) بود که مشابه نتایج تعداد زیادی از محققان می‌باشد (ریاست، ۱۳۸۰؛ Raghuvanshi & Pant, 1980؛ Ladizinsky & Vosa, 1986؛ Ahmad *et al*., 1999). در این تحقیق، فرمول کاریوتیپی گونه مورد مطالعه، ۷sm + ۱m 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 (۱۹۸٦) اظهار داشتند که کلیه کروموزوم‌های این گونه آکروسانتریک است و Raghuvanshi و Pant (۱۹۸۰) از وجود ۲ کروموزوم β در کاریوتیپ این گونه گزارش دادند و عدد کروموزومی آن را ۲n = ۱٦ + ۲β اعلام کردند.

در این تحقیق مشابه اغلب گزارش‌های قبلی ثابت شد که تری‌فلورالین و کلشی‌سین ازجمله عوامل ضدسنتز میکروتوبول‌ها و پلی‌پلوئیدکننده قوی می‌باشند (Hansen *et al*., 1998؛ Grzebelus & Adamus, 2004؛ Rauf *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 (۲۰۰٤) و Klima و همکاران

(۲۰۰۸) گزارش کردند که در مطالعات آنها تری‌فلورالین در مقایسه با کلشی‌سین تیمار دوبل‌کننده بهتری بوده‌است. Klima و همکاران (۲۰۰۸) اظهار داشتند که تهیه راحت، ارزان‌تر بودن، سمّیت کمتر و ایمن‌تر بودن تری‌فلورالین نسبت به کلشی‌سین این ماده را به تیماری مناسب جهت القاء پلی‌پلوئیدی تبدیل کرده‌است. بعکس Hansen و Anderse (۱۹۹٦) 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 به‌وسیله 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، به‌دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۵gr.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-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 ٤ 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، ۲۲/۵μM تری‌فلورالین در مدت زمان ۲٤ 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 چغندرقند مطابقت داشت. این در حالیست که Hansen و Anderse (۱۹۹٦) با افزایش مدت زمان القاء تری‌فلورالین (از ۱۲ به ۲٤ ساعت) با کاهش میزان دیپلوئیدی میکروسپورهای کلزا مواجه شدند که علت آن را سمّیت 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، به‌طوری 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 ساب‌متاسانتریک کاسته و به درصد کروموزوم‌های متاسانتریک افزوده شد. تجزیه واریانس

داده‌های حاصل از ویژگی‌های کروموزومی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین کاریوتیپ نمونه‌های تیمار شده و شاهد در سطح ۱٪ بود.

کلشی‌سین و تری‌فلورالین با ایجاد تغییرات کمّی 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 تری‌فلورالین و آهن بر خصوصیات مرفولوژیک و جذب آهن ارقام سویا در گلخانه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
- ریاست، م.، ۱۳۸۰. بررسی سیتوژنتیکی جنس شنبلیله (*Trigonella*) در استان فارس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ۱۲۱ صفحه.
- نجف‌پور نوایی، م.، ۱۳۷۳. مطالبی پیرامون گیاه دارویی شنبلیله. 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. arboretum*) 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 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 arboretum* 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.

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. Ranjbar[2], S.K. Kazemitabar[2], M. Riasat[3] and H. Kazemi Poshtmasari[4]

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 gl^{-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 gl^{-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.