اثر علف کش تري فلورالين بر القاء پلي پلوئيدي و تغييرات كروموزومي سلول هاي مريستمي ريشه شنبليله (*Trigonella foenum- graecum*)

ا. افشاري[۱]، غ. ع. رنجبر[۲]، س. ک. كاظمي‌تبار[۳]، م. رياست[۴] و ح. كاظمي پشت مساري[۵]

چكيده

شنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) گياهي يک ساله و علفي از خانواده بقولات مي‌باشد و به عنوان يک گياه دارويي، زراعي و مرتعي حائز اهميت فراوان است. به منظور مطالعه اثر تري فلورالين بر القاء پلي پلوئيدي و بررسي تأثير اين ماده بر خصوصيات سيتوژنتيكي سلول هاي مريستمي ريشه گياه دارويي شنبليله، تعدادي بذر در انكوباتور كشت و پس از جوانه زني بذرها، از مريستم انتهايي ريشه براي مطالعات كاريوتيپي استفاده شد. جهت تيمار كردن بذرها از محلول تري فلورالين ۴۸ درصد با غلظت‌هاي ۷/۵، ۱۵ و ۲۲/۵ ميكرومولار در دو مدت زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت و براي بررسي خصوصيات سيتوژنتيكي از روش تحليل تصويري استفاده شد. تعداد كروموزوم پايه در گونه مورد بررسي X=۸ بود. نتايج نشان داد كه تفاوت معني داري در سطح احتمال يک درصد بين غلظت هاي تريفلورالين، مدت زمان القاء و اثر متقابل غلظت × زمان القاء در ايجاد پلي پلوئيدي وجود داشت. بيشترين درصد القاي پلي پلوئيدي، به دنبال غوطه‌وري گياهچه‌ها در غلظت ۲۲/۵ ميكرومولار در مدت زمان ۲۴ ساعت به دست آمد. تجزيه واريانس داده هاي مربوط به مشخصات كروموزوم ها در قالب طرح كاملاً تصادفي نشان دهنده اختلاف معني‌دار بين كاريوتيپ‌ها در سطح احتمال يک درصد بود. تري‌فلورالين به شدت بر طول كروموزوم و در نتيجه بر كاريوتيپ گياه اثر گذاشت، به طوري كه بلندترين كروموزوم ها متعلق به كاريوتيپ نمونه شاهد و كوتاه ترين كروموزوم ها پس از تيمار با تري فلورالين مشاهده شدند. پس از اعمال تيمار از درصد كروموزوم هاي ساب متاسانتريک كاسته و به درصد كروموزوم هاي متاسانتريک اضافه شد.

واژه هاي كليدي: كروموزوم، تغييرات سيتوژنتيكي، القاء پلي پلوئيدي، تري فلورالين، شنبليله

---

[۱] ۱- دانش آموخته كارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامي واحد شيراز

[۲] ۲- استاديار، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري

[۳] ۳- دانشيار، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري

[۴] ۴- مربي پژوهشي، مركز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي، شيراز

[۵] ۵- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامي واحد رشت

مقدمه

شنبليله (.*Trigonella foenum-graecum* L)، گياهي يک ساله و علفي از خانواده بقولات مي باشد که به عنوان يک گياه دارويي، زراعي، مرتعي، آرايشي و بهداشتي حائز اهميت فراوان است. ۳۳ گونه مختلف از جنس *Trigonella* در ايران گزارش شده که مهمترين آن گونه *T. foenum-graecum* است (۱۴).

برگ شنبليله حاوي عناصر و ترکيبات مهمي چون کلسيم، آهن، کاروتن، اسيد آسکوربيک، پروتاين، تيامين و ريبوفلاوين و جوانه‌هاي آن سرشار از ويتامين A و فسفر هستند. از مهمترين ترکيبات شيميايي موجود در دانه شنبليله، ساپوژنين‌هاي استروئيدي به ويژه ديوسژنين است که به عنوان هسته اوليه در سنتز استروئيدهاي دارويي از جمله هورمون پروژسترون، هيدروکورتيزون، تستسترون و در قالب قرص هاي ضد بارداري کاربرد فراوان دارد (۱۳). محققين از طريق به نژادي و ايجاد موتان‌ها و دو رگ هاي مختلف توانسته‌اند ميزان ديوسژنين موجود در دانه را از ۱ درصد به ۳/۱ درصد برسانند (۱۴).

شنبليله در درمان بسياري از بيماريها از جمله ديابت، آترواسکلروز يا تجمع چربي و سفت و سخت شدن جدار شريانها، هپاتومگالي (بزرگي کبد)، اسپلنومگالي (بزرگ شدن طحال)، زخم معده، التهاب گلو و يبوست مورد استفاده قرار مي‌گيرد. چاي شنبليله به عنوان يک ماده خونساز و آرام بخش اعصاب، استفاده فراوان دارد. پودر دانه شنبليله به علت دارا بودن تريگونلين براي درمان بيماري پارکينسون مفيد است (۱۵). با توجه به اينکه کروموزوم‌ها حامل ژنها بوده و خصوصيات گياهي تا حدود زيادي تحت کنترل مواد ژنتيکي هسته‌اي مي‌باشند، لذا از جمله روش‌هاي ايجاد تنوع در ارقام و گونه‌هاي مختلف گياهي، القاء تغييرات سيتوژنتيکي و کاريوتيپي و ايجاد پلي پلوئيدي مي باشد. در اغلب گونه هاي گياهي، القاء پلي پلوئيدي با افزايش در اندازه سلول ها، توانايي توليد اندام هاي رويشي قويتر را بوجود آورده است. اندام هاي رويشي، منبع بسياري از متابوليت هاي ثانويه با ارزش تجاري هستند (۱). بنابراين ممکن است که القاء پلي پلوئيدي، در افزايش کميت و کيفيت اين ترکيبات با ارزش دارويي نقش مهمي داشته باشد (Đ). در مقايسه تعداد زيادي از گياهان پلي پلوئيد با همتاي ديپلوئيد شان، افزايش در توليد ترکيبات شيميايي و متابوليت هاي ثانويه مشاهده شده است، مثلاً گزارش شده است که تتراپلوئيد هاي دو گياه دارويي بابونه (.*Matricaria recutita* L) و مريم گلي (.*Salvia officinalis* L) فلاونوئيدها و ترپنوئيدهاي بيشتري را نسبت به حالت ديپلوئيد توليد مي‌کنند يا ميزان آرتميزينين در درمنه (.*Artemisia sieberi* L) در حالت تتراپلوئيد، čċ درصد بيشتر از ديپلوئيد آن گزارش شده است (۹).

تري‌فلورالين[1] با نام تجاري ترفلان و با فرمول مولکولي $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ و نام شيميايي 2,6-dinitro-N,-dipropyl-4-(trifluoromethyl)benzenamine، شبيه به کلشي‌سين مي‌باشد و با جلوگيري از تشکيل

---

[1] 1- Trifluralin

دوک به عنوان يک عامل ضد ميتوزي منجر به القاء پلي‌پلوئيدي در گياه مي‌شود. اين ماده پرمصرف‌ترين علف‌کش از گروه دي نيتروآنيلين‌ها[1] و يکي از مهمترين علف‌کش‌هاي انتخابي در گياهان زراعي است که از طريق هيپوکوتيل جذب مي‌شود. اثر علف‌کش تري‌فلورالين به خاطر جلوگيري از رشد ريشه علف‌هاي هرز مي‌باشد که علائم آن بصورت متورم شدن نوک ريشه‌ها و ممانعت از تشکيل ريشه‌هاي جانبي و اختلال در جذب عناصر غذايي است. اين امر ناشي از اختلال در تقسيم سلولي از طريق دپليمر کردن ريزلوله ها[2] است (۱ĝ و آ۱).

مطالعات کاريوتيپي انجام شده در گونه *T. foenum-graecum* نشان مي‌دهند که تعداد کروموزوم پايه ۸ مي‌باشد (۲، ۴، ۱۱، آ۱ و ۱۸). رياست (۱۸) اظهار داشت که فرمول کاريوتيپي *T. foenum-graecum* ۱m + ۷sm مي‌باشد. راگووانشي و پانت (آ۱) طي مطالعاتي به اين نتيجه دست يافتند که سلول‌هاي سوماتيکي و ميوزي گونه مذکور، داراي ۲ کروموزوم B است و عدد کروموزومي آن ۲n=۱آ+۲B مي‌باشد. لاديزينسکي و وسا (۱۱) اظهار داشتند که اين گونه با عدد کروموزومي ۲n=۱آ، داراي کاريوتيپ نامتقارن و کروموزوم‌هاي آکروسانتريک است.

حس و باير (۸) از اثر تري‌فلورالين بر تقسيم غير طبيعي ميتوز در سلول‌هاي مريستمي ريشه پنبه گزارش دادند. هانسن و آندرسن (۷) توانايي سه علف‌کش دپليمرکننده ريزلوله ها، شامل تري فلورالين، اريزالين[3] و آمي پروفازمتيل[4] را بر دو برابر کردن کروموزوم‌ها طي کشت درون شيشه‌اي ميکروسپور کلزا مطالعه کردند. هر سه علف‌کش در طول ۱۲ ساعت تيمار، تقريباً ۵آ درصد ديپلوئيدي توليد کردند. هانسن و همکاران (آ) تأثير علف‌کش تري فلورالين را بر دو برابر شدن کروموزوم ها در کشت درون شيشه اي تخمک چغندرقند مطالعه و بيشترين ميزان دوبل شدگي کروموزوم‌ها را در غلظت ۱ĝ ميکرومولار مشاهده کردند. ري و همکاران (۱۷) تأثير تري‌فلورالين و اريزالين را بر توليد گياهان تتراپلوئيد حاصل از باززايي جنين‌هاي سوماتيکي گياه *Ilex paraguariensis* مطالعه و در نتايج خود به عدم تأثير دو ماده مذکور در دو برابر کردن کروموزوم‌ها اشاره کردند. کليما و همکاران (۱ĝ) اثر کلشي سين، تري فلورالين و اريزالين را بر تشکيل و رشد جنين، باززايي گياه و ميزان ديپلوئيد شدن هيبريدهاي F_1 حاصل از کشت ميکروسپور کلزا مقايسه کردند. نتايج نشان داد که هر سه ماده به طور معني دار، درصد هاپلوئيدهاي مضاعف را افزايش دادند و تري‌فلورالين با توليد ۸۵/۷ درصد ديپلوئيدي، مناسب‌ترين و بهترين تيمار بود.

اگرچه به طورکلي اثرات پلي پلوئيدي قابل پيش بيني نيست و بايستي هر گونه گياهي را به طور مجزا مورد تحقيق قرار داد، اما دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌هاي يک گياه دارويي، منجر به ايجاد تنوع در ترکيبات آللي و آنزيم‌هاي فعال مسير بيوسنتز متابوليت‌هاي ثانويه مي‌شود و مي‌تواند روند متابوليسم ثانويه را تسهيل و ميزان متابوليت هاي ثانويه را

1- Dinitroaniline 2- Microtube 3- Oryzalin 4- Ami Prophos-methyl (APM)

افزايش دهد (Đ). با وجود مطالعه و تحقيقات قابل توجه در توليد گياهان پلي پلوئيد، موارد بسيار محدودي از گياهان دارويي پلي پلوئيد گزارش شده اند (Đ). با توجه به اينكه تا كنون تأثير تري فلورالين بر خصوصيات كاريوتيپي گياه دارويي شنبليله بررسي نشده است، اين پژوهش اجراء شد. هدف از اين پژوهش مطالعه اثر تري فلورالين بر القاء پلي پلوئيدي و بررسي تأثير اين ماده بر خصوصيات سيتوژنتيكي سلول هاي مريستمي اين گياه مي باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعات سيتوژنتيكي گياه شنبليله در سال ۱۳۸۷ در آزمايشگاه ژنتيک مرکز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي استان فارس در شيراز انجام شد. بذر گياه از شركت پاكان بذر اصفهان تهيه شد. جهت بدست آوردن مريستم انتهايي ريشه، بذرها به ظروف پتري حاوي كاغذ صافي مرطوب منتقل و پس از افزودن آب مقطر، در انكوباتور با فتوپريود ۱۶ ساعت روشنايي و درجه حرارت ۲۴-۲۳ درجه سانتي‌گراد و رطوبت ۵ğ تا ۶ğ درصد قرار داده شدند. بعد از گذشت سه روز، بذرهاي جوانه‌زده با طول ريشه‌چه ۱/۵ تا ۲ سانتي‌متر با محلول تري‌فلورالين ۴۸ درصد با غلظت‌هاي ۷/۵، ۱۵ و ۲۲/۵ ميكرومولار به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تيمار شدند. پس از شستشوي بذرهاي تيمار شده، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در شيشه‌هاي حاوي آب مقطر روي قالب‌هاي يخ قرار داده شدند.

در مرحله بعد، جهت مشاهده و شمارش كروموزوم‌ها، تهيه كاريوتيپ و تحليل ژنوم و همچنين بررسي تغييرات كروموزومي در سلول‌هاي در حال تقسيم، به ترتيب مراحل پيش تيمار (ğ/۵ درصد محلول اشباع شده آلفا برومونفتالين) به مدت ۳ ساعت، تثبيت (محلول لويتسكي مركب از محلول كروميوم تري اكسيد و فرمالدئيد ۴ğ درصد به نسبت ۲:۳) به مدت ۲ğ-۱۶ ساعت در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد، هيدروليز (هيدروكسيد سديم يک نرمال) به مدت ۲ğ-۱۷ دقيقه در دماي ٦ċ درجه سانتي‌گراد و رنگ آميزي (مخلوط هماتوكسيلين ۴ درصد و يک گرم سولفات آمونيوم فريک) به مدت ۱۲ğ دقيقه انجام شد. براي تهيه نمونه ميكروسكوپي ريشه‌هاي رنگ‌آميزي شده روي لام گذاشته و قسمت انتهايي نوک ريشه (منطقه مريستمي) كه به دليل وجود سلول‌هاي در حال تقسيم ميتوز، رنگ غليظ‌تري به خود گرفته بودند، با استفاده از تيغ مخصوص برش داده شدند، سپس يک قطره محلول حاوي اسيدلاكتيک و اسيد استيک ďĐ درصد روي نمونه ريخته و لامل روي آن گذاشته شد به طوري كه لامل حركت نكند. سپس با انگشت شصت روي لامل فشار وارد آورده تا ضمن خروج رنگ‌هاي اضافي سلول‌هاي مريستمي نيز در يک سطح پخش گردند. به اين ترتيب نمونه ميكروسكوپي آماده شد. عكسبرداري از نمونه‌هاي تهيه شده با استفاده از روش تحليل تصويري با بزرگنمايي ۱۸ĚĒ برابر (ميكروسكوپ BH-2 Digital Color Video Camera, Olympus مدل SSC, DC18P) انجام شد به طوري كه تصاوير كروموزومي از طريق Color Video Camera كه روي ميكروسكوپ

نوري نصب شده بود به مانيتور منتقل شده و ضبط گرديد. ابتدا تصاوير تهيه شده به برنامه فتوشاپ منتقل شد و پس از مرتب كردن كروموزوم‌ها روي يك صفحه و تهيه كاريوتيپ در دو مرحله، قبل و بعد از اعمال تيمار، ويژگي‌هاي كروموزومي گياه با استفاده از نرم افزار (MICROMEASURE3.3) ارزيابي شد. در اين نرم‌افزار از طريق مشخص كردن ابتدا، انتها و محل سانترومر كروموزوم‌ها، يكسري از ويژگي‌هاي كروموزومي محاسبه و در محيط EXCEL نمايش داده مي شود. از هر اسلايد مورد بررسي حداقل پنج سلول (تكرار) انتخاب و تعدادي از پارامترهاي سيتوژنتيكي نظير طول كروموزوم (TL)، طول بازوي بلند (LA)، طول بازوي كوتاه (SA)، نسبت بازوها (L/S) و شاخص سانترومري (CI) كه بيانگر نسبت بازوي كوتاه به طول كل كروموزوم است، محاسبه گرديد. براي تعيين نوع كروموزوم‌ها از روش لوان و همكاران (١č) براساس جدول ١ استفاده شد. پس از اندازه‌گيري كروموزوم‌ها، ايديوگرام مربوط به كاريوتيپ براساس طول بازوي كوتاه و بلند رسم شد.

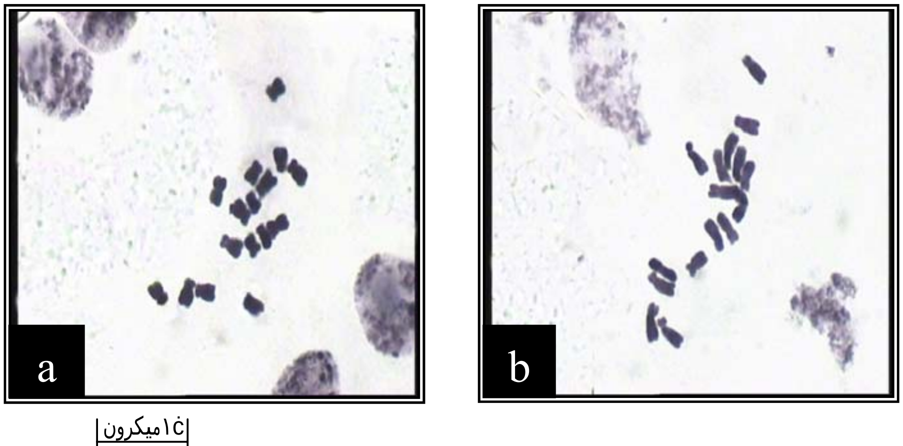
جهت تجزيه آماري داده‌هاي بدست آمده از ميزان پلي‌پلوئيدي ناشي از كاربرد تري‌فلورالين از آزمايش فاكتوريل در قالب طرح كاملاً تصادفي در ۴ تكرار و براي داده‌هاي مربوط به پارامترهاي كاريوتيپي از طرح كاملاً تصادفي در ۵ تكرار استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده SAS بود. براي مقايسه ميانگين‌ها نيز از آزمون چند دامنه‌اي دانكن و نرم افزار MSTATC استفاده گرديد.

جدول ١- دسته‌بندي كروموزوم‌هاي هر كاريوتيپ براساس روش لوان و همكاران (١č)

نسبت بازوها	موقعيت سانترومر	نوع كروموزوم
١	Median point	M
١/١ċ-١/٦٩	Median region	m
١/Ē-č/٩٩	Submedian region	sm
٣-٦/٩٩	Subterminal region	st
Ē-٣٦/٩٩	Terminal region	t
٣Ē	Terminal point	T

نتايج و بحث

مطالعات كاريوتيپي انجام شده در اين تحقيق نشان داد كه تعداد كروموزوم پايه در گونه *T. foenum- graecum* ۸ (X=۸) و عدد كروموزومي آن $\text{č}n=\text{č}x=$۱۶ مي‌باشد (شكل ۱) كه مشابه نتايج تعداد زيادي از محققين بود (۲، ۴، ۱۱، ۱۶ و ۱۸).



شĜل ۱- a، b: تصاوير كروموزومي از مرحله متافاز ميتوز نمونه‌هاي شاهد در گونه *T. foenum- graecum*.

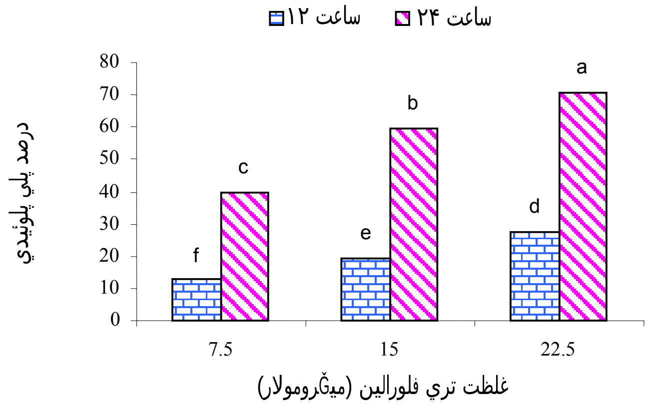
تيمار با تري فلورالين

تجزيه واريانس داده‌ها نشان داد كه اثر غلظت، زمان و اثر متقابل غلظت × زمان در القاء پلي‌پلوئيدي، در سطح احتمال ۱ درصد معني‌دار بود (جدول č). در اين آزمايش افزايش غلظت و زمان تيمار با تري‌فلورالين منجر به افزايش درصد پلي‌پلوئيدي شد به طوري كه در غلظت čč/Đ ميكرومولار و مدت زمان čď ساعت، بيشترين درصد پلي پلوئيدي القاء شد (شكل č).

جدول č- خلاصه تجزيه واريانس القاء پلي‌پلوئيدي پس از تيمار با تري فلورالين

منابع تغييرات	درجه آزادي	ميانگين مربعات
غلظت	۲	ģ/ģ۷۳**
زمان	۱	ģ/۵۷**
غلظت × زمان	۲	ģ/ģ۸۶**
خطاي آزمايش	۱۸	ģ/ģģ۱۶
ضريب تغييرات (درصد)		۶/۸۲

**: معني‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شكل č- مقايسه ميانگين اثر متقابل غلظت×زمان تيمار با تري‌فلورالين بر ميانگين درصد القاء پلي‌پلوئيدي
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌دار بين ميانگين‌ها است.

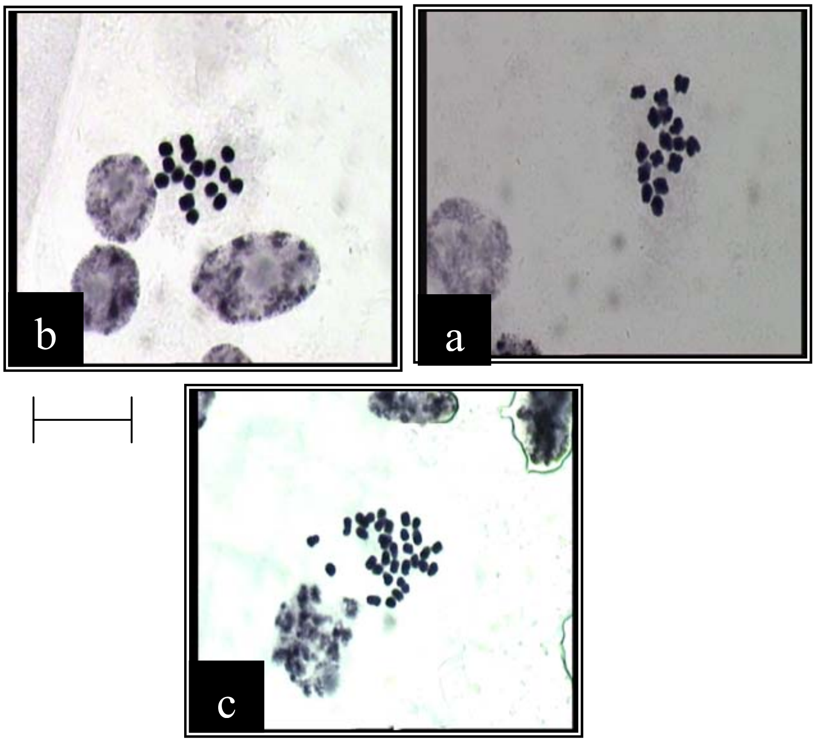
با توجه به شكل č مشاهده مي‌شود كه در غلظت‌هاي يكسان، با افزايش مدت زمان القاء تري‌فلورالين، افزايش درصد پلي‌پلوئيدي بسيار بيشتر از حالتي است كه در زمان‌هاي يكسان، غلظت تري‌فلورالين افزوده شده است. در اين تحقيق با افزايش غلظت و زمان القاء تيمار، درصد سلول‌هاي پلي‌پلوئيد افزايش پيدا كرد كه با گزارشات هانسن و همكاران (٦) راجع به اثر تري‌فلورالين بر دو برابر شدن كروموزوم‌هاي تخمک در šغندرقند و مطالعات عاليشاه و باقريه نجار (۳) مربوط به القاء پلي‌پلوئيدي در پنبه توسǌ كلشي‌سين مطابقت داشت. بهترين تيمار جهت القاء پلي‌پلوئيدي، čč/Đ ميكرومولار تري‌فلورالين در مدت زمان čď ساعت بود. اين در حاليست كه هانسن و آندرسن (Ē) با افزايش مدت زمان القاء تري‌فلورالين (čď ساعت) با كاهش ميزان ديپلوئيدي ميكروسپورها مواجه شدند كه علت آنرا سميت بالاي اين ماده در غلظت‌هاي بالا يا مدت زمان طولاني القاي تيمار بيان كردند.

تغييرات كمي و كيĀي كروموزوϘها تϢƠ تƆثير تري‌فلورالين به ϒو ǅورت بوϒ:

۱- در بعضي از سلول‌ها، شكل، اندازه كروموزوم‌ها و فرمول كاريوتيپي تغيير كرد، اما سطح پلوئيدي بدون تغيير ماند (شكل ۳- a و b).

č- در تعداد ديگري از سلول‌ها، شكل، اندازه كروموزوم‌ها و فرمول كاريوتيپي تغيير كرد و كروموزوم‌ها نيز دو برابر شدند و سلول‌هاي تتراپلوئيد ايجاد شد (شكل ۳- c).

نتايج اين پژوهش نشان داد كه كروموزوم‌ها تحت تأثير اين ماده، šه درحالت ديپلوئيدي و šه در حالت تتراپلوئيدي به شدت كوšک شده و شكل، نوع كروموزوم و فرمول كاريوتيپي تغيير كرد (شكل ۳).



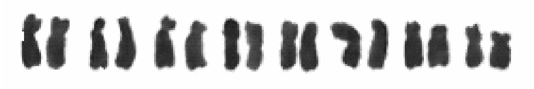
شکل ۳ - تصاوير كروموزومي از مرحله متافاز ميتوز نمونه‌هاي تيمار شده با تري‌فلورالين در گونه *T. foenum- graecum*.

شكل a: غلظت ۱۵ ميكرومولار در مدت ۱۲ ساعت

شكل b: غلظت ۱۵ ميكرومولار در مدت ۲۴ ساعت

شكل c: غلظت ۲۲/۵ ميكرومولار در مدت ۲۴ ساعت

تصاويركاريوتيپ گونه مورد مطالعه، قبل و بعد از تيمار با تري‌فلورالين در شکل ۴ نشان داده شده است.

شاهد (قبل از تيمار) **2n=16**	
پس از تيمار **2 n=16**	
پس از تيمار **2n=4x=32**	

شكل ۴- تصاوير كاريوتيپي قبل و پس از تيمار با تري‌فلورالين.

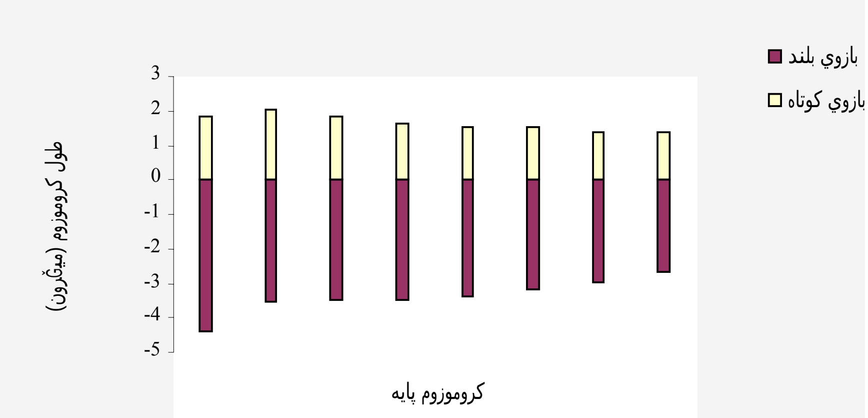
تجزیه کاریوتیپ نمونه شاهد

تجزیه کاریوتیپ نمونه شاهد نشان داد که این گونه با čn=čx=١٦ کروموزوم گونه‌اي دیپلوئید و تعداد کروموزوم پایه در آن X=٨ بود. طول کل کروموزوم‌هاي هاپلوئید ďċ/č٨ میکرومتر، مجموع طول بازوهاي بلند čĒ/ċ٦ میکرومتر و مجموع طول بازوهاي کوتاه ١٣/čč میکرومتر بود. همچنین بلندترین کروموزوم٦/čċ میکرومتر، کوتاه‌ترین کروموزوم ď/ċĒ میکرومتر و متوسط طول هرکروموزوم نیز Đ/ċ٣ میکرومتر بود. فرمول کاریوتیپي این ژنوتیپ ١m+٧sm بود که ٨٧/٥ درصد از کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و ١٢/٥ درصد از آنها متاسانتریک بودند که با نتیجه ریاست (١٨) مطابقت داشت. نتایج این تحقیق با نتایج لادیزینسکي و وسا (١١) که اظهار داشتند کلیه کروموزوم‌هاي این گونه آکروسانتریک است و راگووانشي و پانت (١٦) که از وجود ٢ کروموزوم B در کاریوتیپ این گونه گزارش دادند و عدد کروموزومي آنرا čn=١٦+٢B اعلام کردند، مغایرت داشت. سایر اطلاعات مربوط به کاریوتیپ این ژنوتیپ در جدول ٣ و ایدیوگرام مربوط به آن در شکل Đ نشان داده شده است.

جدول ٣- پارامترهاي سیتوژنتیکي محاسبه شده در کاریوتیپ شاهد

فرمول کاریوتیپي	شاخص سانترومتري	نسبت بازوها	طول کل کروموزوم (µm)	بازوي کوتاه (µm)	بازوي بلند (µm)	کروموزوم
sm	ċ/č٩	č/ďċ	٦/čċ	١/٨č	ď/٣Ē	١
m	ċ/٣Ē	١/٦٩	Đ/Đ٦	č/ċ٦	٣/Đ	č
sm	ċ/٣Đ	١/٨٨	Đ/٣ď	١/٨٦	٣/ď٨	٣
sm	ċ/٣č	č/١Đ	Đ/١ď	١/٦٣	٣/Đ١	ď
sm	ċ/٣č	č/١٦	ď/٩١	١/ĐĐ	٣/٣٦	Đ
sm	ċ/٣č	č/١ċ	ď/Ēċ	١/Đč	٣/١٨	٦
sm	ċ/٣č	č/١Ē	ď/٣٦	١/٣٨	č/٩٨	Ē
sm	ċ/٣ď	١/٩١	ď/ċĒ	١/ďċ	č/٦Ē	٨

sm و m: به ترتیب کروموزوم ساب‌متاسانتریک و متاسانتریک



شکل Đ- ایدیوگرام کاریوتیپ شاهد.

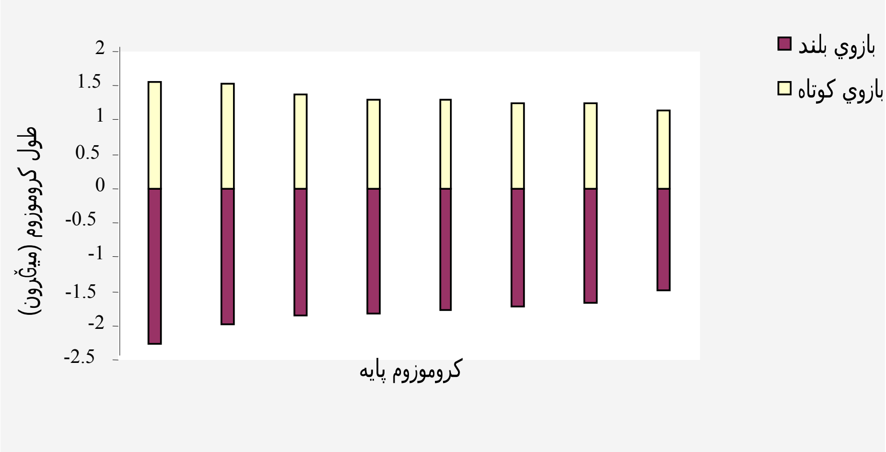
تǅیه کاریوتیŘ نموله ۲یŚلوئید (پ5 از تیمار با تري فلورالين)

مطالعه اين کاريوتيپ نشان داد که عدد کروموزومي همان Čn=Čx=١٦ بود و تري فلورالين فقǐ شکل و اندازه کروموزوم ها را تغيير داده و تأثيري بر تعداد کروموزوم ها نداشت. فرمول کاريوتيپي اين ژنوتيپ ٨m و کل کروموزوم ها متاسانتريک بودند. ساير اطلاعات مربوط به کاريوتيپ در جدول ď و ايديوگرام مربوط به آن در شکل ٦ نشان داده شده است.

جدول ď- پارامترهاي سيتوژنتيکي محاسبه شده در کاريوتيپ ديپلوئيد حاصل از تيمار با تريفلورالين

فرمول کاريوتيپي	DŽشاخ سانترومتري	نسبت بازوها	طول‌کل کروموزوم (µm)	بازوي کوتاه (µm)	بازوي بلند (µm)	کروموزوم
m	ċ/ď١	١/ďď	٣/٨č	١/ĐĒ	č/č٦	١
m	ċ/ďď	١/٣ċ	٣/Đ١	١/Đ٣	١/٩٨	č
m	ċ/ď٣	١/٣Đ	٣/čď	١/٣٨	١/٨٦	٣
m	ċ/ďč	١/ďċ	٣/١٣	١/٣ċ	١/٨٣	ď
m	ċ/ďč	١/٣٨	٣/ċĒ	١/č٩	١/Ē٨	Đ
m	ċ/ďč	١/٣٨	č/٩٨	١/čĐ	١/Ē٣	٦
m	ċ/ď٣	١/٣č	č/٩١	١/čĐ	١/٦٦	Ē
m	ċ/ďď	١/č٨	č/٦٣	١/١Đ	١/ď٨	٨

m: کروموزوم متاسانتريک.



شکل ٦- ايديوگرام کاريوتيپ نمونه ديپلوئيد حاصل از تيمار با تريفلورالين.

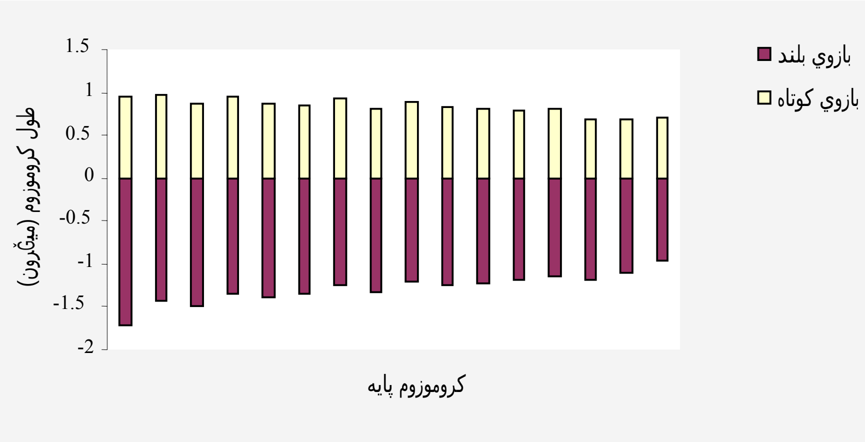
تهيه كاريوتيپ نمونه تتراپلوئيد (پس از تيمار با تريفلورالين)

در اين حالت نه تنها شكل و اندازه كروموزوم‌ها تغيير يافت بلكه تعداد كروموزوم‌ها نيز دو برابر شد و عدد كروموزومي به صورت ۲n=۴x=۳۲ افزايش يافت. فرمول كاريوتيپي ۱۳m+۳sm و ۱۸/۷۵ درصد از كروموزوم‌ها ساب‌متاسانتريک و ۸۱/۲۵ درصد از كروموزوم‌ها متاسانتريک بودند. ساير اطلاعات مربوط به كاريوتيپ در جدول ۵ و ايديوگرام مربوط به آن در شكل ۷ نشان داده شده است.

جدول ۵- پارامترهاي سيتوژنتيكي محاسبه شده در كاريوتيپ تتراپلوئيد حاصل از تيمار با تريفلورالين

كروموزوم	بازوي بلند (μm)	بازوي كوتاه (μm)	طول‌كل كروموزوم (μm)	نسبت بازوها	شاخص سانترومتري	فرمول كاريوتيپي
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 ترتيب كروموزوم ساب‌متاسانتريک و متاسانتر.



شكل ۷- ايديوگرام كاريوتيپ نمونه تتراپلوئيد حاصل از تيمار با تريفلورالين.

مقایسه کاریوتیپ‌ها در نمونه مورد مطالعه

براي هر کاريوتيپ سطح پلوئيدي، تعداد کل کروموزوم ها، تعداد کروموزوم پايه (X)، طول کل کروموزوم هاي هاپلوئيدي، بلندترين و کوتاه ترين کروموزوم ها، متوسط طول هر کروموزوم به همراه فرمول کاريوتيپي تعيين گرديد و نتايج حاصل در جدول ٦ ارائه شد.

جدول ٦- ويژگي هاي کاريوتيپي نمونه ها قبل و پس از تيمار با تري فلورالين

کاريوتيپ	سطح پلوئيدي	۲n	X	طول کل کروموزوم هاي هاپلوئيدي (µm)	بلندترين کروموزوم (µm)	کوتاه ترين کروموزوم (µm)	متوسط طول هر کروموزوم (µm)	فرمول کاريوتيپي
شاهد	ديپلوئيد	۲n=۲x=آ۱	۸	۴ġ/۲۸	Ĩ/۲ġ	۴/ġ۷	۵/ġ۳	۱m+۷sm
تيمارشده	ديپلوئيد	۲n=۲x=آ۱	۸	۲۵/۳	۳/۸۲	۲/آ۳	۳/۱آ	۸m
تيمارشده	تتراپلوئيد	۲n=۴x=۳۲	۸	۳۳/آ۲	۲/آ۵	۱/آ۸	۲/۱۲	۱۳m+۳sm

sm و m: به ترتيب کروموزوم ساب‌متاسانتريک و متاسانتريک.

با توجه به جدول ٦ مشاهده مي‌شود که پس از انجام تيمار از درصد کروموزوم‌هاي ساب متاسانتريک کاسته و به درصد کروموزوم هاي متاسانتريک افزوده شد. تري فلورالين به شدت بر طول کروموزوم ها و بالطبع بر فرمول کاريوتيپي اثر گذاشته بود، به طوري که بلندترين کروموزوم ها متعلق به کاريوتيپ شاهد و کوتاه ترين کروموزوم ها پس از تيمار با تري فلورالين مشاهده شدند که با نتايج عاليشاه و باقريه نجار (۳) که اظهار داشتند کلشي سين باعث کوتاه تر و فشرده تر شدن کروموزوم ها در دو گونه پنبه مي شود مطابقت داشت.

تجزیه واریانس و مقايسه میانگین صفات کاریوتیپی نمونه‌ها

نتايج تجزيه واريانس نشان داد که بين کاريوتيپ‌ها در تمام صفات کروموزومي، اختلاف معني‌داري در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت که اين امر بيانگر تأثير معني‌دار تري‌فلورالين در ايجاد تغييرات کروموزومي در گونه مورد نظر بود (جدول ۷).

پس از تأييد اختلاف بين کاريوتيپ ها، کاريوتيپ ها با استفاده از آزمون چند دامنه اي دانکن مورد مقايسه قرارگرفتند (جدول ۸).

جدول ۷- خلاصه تجزیه واریانس صفات کروموزومي کاریوتیپ‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادي	طول کل کروموزوم	بازوي بلند	بازوي کوتاه	نسبت بازوها	شاخDž سانترومري
کاریوتیپ	۲	۱۱۳/۳۲**	۵Ĭ/۱Ĩ**	Ĭ/ĨĨ**	Ĩ/۲ĝ**	ĝ/ĝĬĨ**
خطاي آزمایش	۱۲	Ĩ/۳ĝ	۳/ ۴۵	۱/ĝ۵۸	ĝ/۸۸	ĝ/ĝ۱
ضریب تغییرات (درصد)		۸/ĨĬ	Ĭ/۵۷	۸/۸	۸/۴۷	۴/۷۵

**: اختلاف معني‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۸- مقایسه میانگین ویژگي‌هاي کروموزومي در کاریوتیپ نمونه شاهد و نمونه‌هاي حاصل از تیمار با تري‌فلورالین

کاریوتیپ	متوسnj طول کل کروموزوم	متوسnj بازوي بلند	متوسnj بازوي کوتاه	نسبت بازوها	شاخDž سانترومري
دیپلوئید (شاهد)	۵/ĝ۳^{a}	۳/۳۸^{a}	۱/Ĩ۵^{a}	۲/۱۱^{a}	ĝ/۳۳ĝ^{c}
دیپلوئید	۳/۱Ĩ^{b}	۱/۸۲^{b}	۱/۳۴^{b}	۱/۳۷^{c}	ĝ/۴۲۵^{a}
تتراپلوئید	۲/۱۱^{c}	۱/۲۸^{c}	ĝ/۸۳^{c}	۱/۵Ĩ^{b}	ĝ/۳ĬĨ^{b}

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معني دار بین میانگین ها است.

در این تحقیق مشابه اغلب گزارشات قبلي ثابت شد که تري فلورالین از جمله عوامل ضد سنتز میکروتوبولها و یک پلي پلوئید کننده قوي مي‌باشد (Ĩ، ۷، ۸ و ۱ĝ). همانطور که کلیما و همکاران (۱ĝ) اظهار داشتند تهیه راحت، ارزان تر بودن، سمیت کمتر و ایمن تر بودن تري فلورالین نسبت به کلشي سین این ماده را به تیماري مناسب جهت القاء پلي پلوئیدي تبدیل کرده است. تري فلورالین با ایجاد تغییرات کمي و کیفي کروموزومي و القاء پلي پلوئیدي، احتمالاً تیمار مناسبي جهت افزایش سطح پلوئیدي و اصلاح صفات مورفولوژیکي، فیزیولوژیکي و همچنین متابولیت هاي با ارزش این گیاه باشد. به دنبال القاء پلي پلوئیدي و ایجاد تغییرات سیتوژنتیکي در سلولهاي مریستمي این گیاه دارویي، مطالعات گسترده تر جهت ارزیابي میزان تغییرات متابولیت هاي گیاه پیشنهاد مي شود.

منابع

1. Adaniya, S. and D. Shira. 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinali* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Science Horticulture, 88: 277-287.
2. Ahmad, F., S. Acharya, Z. Mir and P. Mir. 1999. Localization and activity of rRNA genes of fenugreek *in situ* hybridization and silver staining. Theoretical and Applied Genetics. 98(2): 179-185.
3. Alishah, O. and M. Bagherieh-Najjar. 2008. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* and *G. arboretum*) species by colchicine treatments. African Journal of Biotechnology. 7(2): 102-108.
4. Das, A.B., M. Pattnaik, T. thangaraj and P. Das. 1997. Cytophotometric estimation of nuclear DNA content and karyotype analysis of eight cultivars of *Trigonella foenum-graecum*. Cytobios. 91: 171-179.
5. Dhawan, O.P. and U.C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica. 87: 81-89.
6. Hansen, A.L., A. Gertz, M. Joersbo and S.B. Andersen. 1998. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. Euphytica. 101: 231-237.
7. Hansen, N.J.P. and S.B. Andersen. 1996. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. Euphytica. 88(2): 159-164.
8. Hess, D. and D. Bayer. 1974. The effect of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L. Acala 4-42). Journal of cell science. 15: 429-441.
9. Jesus, L.D. 2003. Effect of artificial polyploidy in transformed roots of *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports. 21: 809-813.
10. Klima, M., M. Vyvadilova and V. Kucera. 2008. Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. Plant Breed. 44(1): 30-36.
11. Ladizinsky, G. and C.G. Vosa. 1986. Karyotype and c-banding in *Trigonella foenum-graecum*. Plant Systematic and Evolution. 153(1): 1-5.
12. Levan, A.K., K. Fredga and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromic position on chromosomes. Hereditas. 52: 201-220.
13. Mehrafarin, A., A. Qaderi, Sh. Rezazadeh, H. Naghdi Badi, Gh. Noormohammadi and E. Zand. 2010. Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Medicinal Plants. 9(35): 1-18.
14. Najaf Poor, M. 1994. About the medicinal plant of fenugreek. Research Institute of Forests and Range. 18 pp.
15. Niknam, V. and A. Kiyani. 2004. Effects of drought and salinity stress on some biochemical parameters of fenugreek *in vitro*. 2nd medicinal plants Conference, Shahed University, Tehran. 186 pp.
16. Raghuvanshi, S.S. and M. Pant. 1980. Studies on the distribution of b chromosome in different plant parts of *Trigonella foenum-graecum*. Caryologia. 33(2): 215-225.
17. Rey, H.Y., P.A. Sansberro, M.M. Collavino, J.R. Davina, A.M. Gonzalez and L.A. Mroginski. 2002. Colchicine, trifluralin and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis*. Euphytica. 123: 49-56.

18. Riasat, M. 2001. Investigation of cytogenetic of genus fenugreek (*Trigonella*) in Fars province. M.Sc thesis, Faculty of Science Orumieh University. 121 pp.
19. Rudi, D. 1998. Trifluralin and iron influence on morphological characteristics and iron absorption of soybean varieties in greenhouse. M.Sc thesis, Faculty of Agriculture Shiraz University. 125 pp.

Effect of Trifluralin Herbicide on Polyploidy Induction and Chromosome Changes in Root Meristem Cells of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*)

E. Afshari[1], G.A. Ranjbar[2], S.K. Kazemitabar[3], M. Riasat[4] and H. Kazemi Poshtmasari[5]

Abstract

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) is an annual herbaceous plant belongs to Papilionaceae family and is important as a pharmaceutical, agronomic and pastural plant. In order to study the effect of trifluralin on ploidy induction and cytogenetic characteristics of cells in the root meristem of fenugreek some seeds of this species were planted in the incubator and after germination root tips were used for karyotypic studies. For treating the seeds trifluralin liquid 48% were applied 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. The results showed that concentration of trifluralin, treatment duration and interaction between them on the ploidy induction were statistically significant. The maximum ploidy induction was happened by immersion seedlings in 22.5 μM trifluralin at 24 h. The result of analysis of variance based on completely randomized design (CRD) showed a significant difference among the karyotypes for all chromosomal traits (P<%1). Trifluralin affected severity on the length of chromosomes and karyotypic formula so that the longest chromosomes belonged to the karyotype control sample and the shortest chromosomes were observed after treating with trifluralin. After applying treatment was reduced the percentage of submetacentric chromosomes and were added to the percentage of metacentric chromosomes.

Keywords: Chromosome, Cytogenetic changes, Ploy Ploidy induction, Trifluralin, Fenugreek

---

1- Former M.Sc. Student, Islamic Azad University, Shiraz beranch
2- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
4- Researcher Instractur, Agricultural Sciences and Natural Research Institute,Shiraz
5- Member of Young Researchers Club, Islamic Azad University, Rasht Branch