نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 33، شماره 1، بهار 1398، ص. 139-127
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 127-139
ISSN: 2008 - 4730

# بررسی اثر کلشیسین بر القاء پلی‌پلوئیدی و اثرات آن بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شنبلیله

امیر حسین کشتکار[1]*- نوشین فلاحی[2]- محمد رضا عبداللهی[3]- حسن ساری‌خانی[4]- هوشمند صفری[5]- ژاله محسنی عراقی[6]

تاریخ دریافت: 1396/01/29
تاریخ پذیرش: 1397/11/07

## چکیده

القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا یکی از روش‌های به‌نژادی گیاهان دارویی به منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه است. کلشیسین موثرترین ماده شیمیائی جهش‌زا در القا پلی‌پلوئیدی گیاهان می‌باشد. به منظور بررسی تاثیر تیمار کلشیسین بر القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) پژوهشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور کلشیسین (صفر، 0/05، 0/1، 0/2، 0/5 درصد وزن به حجم)، زمان (12، 24، 48 و 72 ساعت) و نمونه (بذر، مریستم ریشه و مریستم انتهایی) در 3 تکرار انجام شد. در این آزمایش اثر کلشیسین بر درصد صفات زنده‌مانی، میکسوپلوئیدی و تتراپلوئیدی در نمونه‌های بذر، جوانه انتهایی و ریشه ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که بعد از تیمار شاهد بیشترین درصد زنده‌مانی مربوط به غلظت 0/05 درصد کلشیسین برای نمونه جوانه انتهایی است و بالاترین درصد میکسوپلوئیدی مربوط به نمونه جوانه انتهایی با غلظت تیمار 0/1 و 0/2 درصد کلشیسین می‌باشد. نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی، فلوسایتومتری و بیوشیمیایی نشان داد که نمونه جوانه انتهایی در غلظت 0/5 درصد کلشیسین در مدت زمان 72 ساعت موثرترین تیمار در القاء تتراپلوئیدی در گیاه شنبلیله است. همچنین نتایج حاصل از GC/MS بیانگر افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید شنبلیله بود.

واژه‌های کلیدی: تتراپلوئیدی- فلوسایتومتری- کروماتوگرافی گازی توده‌ای- میکسوپلوئیدی

## مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum–graecum*) گیاهی یکساله، علفی و از تیره بقولات می‌باشد که بعنوان یک گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت فراوان است (1). این گیاه بومی ایران بوده و بیشتر در آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان و دامغان می‌روید. شنبلیله دارای خواص ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد میکروبی، ضد التهاب و تسکین دهنده درد مفاصل بوده و سرشار از پروتئین، انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه است (3، 14 و 26). نتایج مطالعات سیتوژنتیکی انجام شده روی گونه های شنبلیله نشان داده که تعداد کروموزوم ها در کلیه گونه‌ها برابر2n= 2x=16 است (33).

دست ورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در به‌نژادی بسیاری از گیاهان از جمله در گیاهان دارویی است (22). تیمار کلشیسین یکی از رایج‌ترین روش‌هایی است که اغلب برای القاء پلی پلوئیدی در گیاهان از آن استفاده می‌شود و نسبت به مواد جهش‌زای دیگر تغییرات مورفولوژیکی بیشتر و فراوانی گیاهان جهش یافته بالاتری ایجاد می‌کند (29). به منظور تعیین سطح پلوئیدی از روش‌های مستقیم (شمارش کروموزوم و فلوسایتومتری) و همچنین از روش‌های غیرمستقیم (اندازه گیری طول و عرض سلول‌های روزنه، تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه و مشاهدات مورفولوژیکی) استفاده می‌گردد (38). در اغلب گونه‌های گیاهی، القاء پلی‌پلوئیدی با افزایش در اندازه سلول‌ها، توانایی تولید اندام‌های رویشی پررشدتر را سبب شده است. اندام‌های رویشی منبع بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش تجاری هستند (2). القاء پلی پلوئیدی درگیاهان اغلب موجب تولید واریانته‌های جدید با کیفیت متمایز می‌شود. همچنین از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان کننده ترکیبات موادمؤثره و افزایش جثه گیاه، موجب بیشتر شدن

1، 2، 3 و 6- به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(*- نویسنده مسئول: Email: akesht@gmail.com)
4- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
5- عضو هیأت علمی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i1.71781

ترکیبات ثانویه و دارویی آن می‌شود (41).

لاوانیا و همکاران (20) در پژوهشی گزارش کردند که در گونه‌ای از علف لیمو افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش مواد مؤثره گردید. گیاه پلی‌پلوئید پونه دشتی(*Mentha arvensis*) در مقایسه با والدین دیپلوئید، 30 درصد اسانس بیشتری داشته ولی در گونه ( *Mentha spicata*) میزان اسانس کاهش یافته است. گزارش شده است که تتراپلوئیدهای دو گیاه دارویی بابونه و مریم گلی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای بیشتری نسبت به حالت دیپلوئید تولید می‌کنند، همچنین میزان آرتمیزین در درمنه تتراپلوئید، 20 درصد بیشتر از دیپلوئید آن گزارش شده است (15 و 16).

برای استخراج و ارزیابی ترکیبات موثره دارویی فرار از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود که از میان آن‌ها روش میکرواستخراج فاز جامد (SPME) روشی ساده اما بسیار قدرتمند برای آماده سازی نمونه است که تغلیظ، استخراج و ورود نمونه به دستگاه کروماتوگرافی را در یک مرحله انجام می‌دهد. در این روش تنها چند میلی‌لیتر نمونه، کافی است و در آماده سازی نمونه‌های شیمیایی، زیست دارویی، محیطی و غذایی کاربرد فراوان دارد (17). به طور معمول ارزیابی ترکیبات فرار مانند اسانس‌ها در گیاهان دارویی توسط دستگاه GC-MS انجام می‌شود. در دستگاه GC-MS اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا شده و پس از حذف گاز حاصل، وارد منبع یونش طیف‌سنج جرمی شده و بواسطه تولید میدان‌های الکتریکی پرقدرت، اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آنها می‌گردد (18). در پژوهشی با تهیه نمونه خشک و آسیاب شده از برگ گیاه آویشن بوسیله تکنیک های SMPE و GC-MS، 29 ترکیب فرار در این گیاه شناسایی شد (31).

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تیمار کلشیسین بر سطح پلوئیدی و مقایسه برخی ویژگی‌های سیتوژنتیکی، مورفولوژیکی، و بیوشیمیایی گیاه شنبلیله دیپلوئید نسبت به تتراپلوئید می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

بذر شنبلیله (*Trigonella foenum - graecum*) از توده‌های بومی استان کرمانشاه تهیه شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در 3 تکرار انجام شد. آزمایش شامل فاکتورهای نمونه در سه سطح (بذر، مریستم ریشه و مریستم انتهایی)، غلظت کلشیسین در 5 سطح (صفر، 0/05، 0/1، 0/2، 0/5 درصد وزن به حجم) و زمان تیمار کلشیسین در چهار سطح (12، 24، 48 و 72 ساعت) بود. در این آزمایش جهت اعمال تیمار، تعداد 3 گروه 5 تایی نمونه برای هر تیمار در نظر گرفته شد. آزمایش شامل سه قسمت بود:

### تیمار بذر

ابتدا بذور توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت 10 دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو، در محلول‌های تهیه شده کلشیسین (ساخت شرکت مرک آلمان) قرارداده شدند. پس از سپری شدن زمان تیمار کلشیسین، بذرها به خوبی شستشو و به ژرمیناتور (28 درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. بعد از 4 روز، بخش انتهایی ریشه جهت رنگ آمیزی کروموزوم‌ها و تعیین سطح پلوئیدی جدا و جوانه‌ها در گلدان‌هایی در گلخانه کشت شدند.

### تیمار ریشه

بذور در ابتدا ضدعفونی و بعد از شستشو در گلدان‌هایی حاوی پرلیت کشت شدند. پس از رشد گیاهچه (مرحله 3 برگی) و شستشو، ریشه‌ها به تیمار کلشیسین منتقل شدند. برای افزایش جذب و نفوذ محلول کلشیسین این عمل زمانی صورت گرفت که از آخرین آبیاری گیاهچه‌ها مدتی گذشته و گیاهچه‌ها به آب نیاز داشتند. عمل انتقال گیاهچه‌ها به تیمار کلشیسین در زیر نور لامپ انجام شد تا تبخیر و تعرق گیاه افزایش یافته و محلول کلشیسین بهتر جذب گردد. پس از گذشت مدت زمان تیمار، ریشه‌ها از داخل محلول خارج شده و به مدت 10 دقیقه شستشو شدند، سپس به گلدان‌هایی حاوی پرلیت و کوکوپیت منتقل شدند. 15 روز بعد از کشت، نمونه‌برداری از ریشه انجام گرفته و گیاهان به گلدان‌هایی بزرگتر حاوی ماسه، پرلیت و کود دامی به نسبت 1:1:1 انتقال و در دمای 28 درجه با دوره روشنایی 14 ساعت نگهداری شدند.

### تیمار جوانه انتهایی

هفت روز بعد پس از خروج کوتیلدون‌ها، گلوله‌های پنبه‌ای کوچک آغشته به محلول کلشیسین، روی جوانه انتهایی قرار داده شد. برای جلوگیری از تبخیر و خشک شدن گلوله‌های پنبه‌ایی، دور گلدان ها با کیسه های پلاستیکی پوشانیده شد و پس از گذشت مدت زمان تیمار جوانه‌های انتهایی به خوبی شستشو شدند. 15 روز پس از اعمال تیمارها از ریشه‌ها به منظور بررسی تعداد کروموزوم‌ها از ریشه‌ها نمونه برداری شد و گیاهچه‌ها به گلدان‌هایی با ابعاد بزرگتر حاوی ماسه، خاک و کود دامی به نسبت 1:1:1 منتقل شدند.

### ارزیابی سطح پلوئیدی از طریق فلوسایتومتری

آنالیز سطح پلوئیدی برگ‌های جوان گیاه توسط دستگاه فلوسایتومتری (Germany, Partec)، مجهز به لامپ HBO انجام شد. جهت تهیه سوسپانسیون هسته‌ای، به مقدار مساوی بافت برگی از برگ‌های سوم و چهارم از بالا و ترجیحا قسمت‌های بدون رگبرگ از گیاه نمونه،گیاه شاهد (شنبلیله 2n) و گیاه استاندارد (رزتتراپلوئید)، به

مقدار تقریبی 0/5 سانتی‌متر مربع برداشته شد. بافت نمونه در پتری دیش پلاستیکی حاوی 400 میکرولیتر بافر استخراج هسته متعلق به شرکت Partec قرار گرفته و با استفاده از تیغ تیز خرد شدند. سپس به نمونه‌ها 1600 میکرولیتر محلول فلوروکروم DAPI اضافه و توسط فیلتر 500 نانومتری فیلتر شدند. آنگاه نمونه‌های صاف شده به داخل لوله پلاستیکی متعلق به دستگاه فلوسایتومتری منتقل و وضعیت پلوئیدی در بافت‌های مورد نظر بررسی گردید. سپس داده ها توسط نرم افزار Fit LT 3.1 آنالیز شد.

## ارزیابی سطح پلوئیدی از طریق سیتوژنتیک

ابتدا قسمت کوچکی از انتهای ریشه‌چه‌ها توسط تیغ اسکالپل برش داده شد و برای مدت 4 ساعت به محلول پیش‌تیمار آلفا برومونفتالین 0/5 درصد منتقل شدند. پس از خارج کردن ریشه‌ها از محلول پیش تیمار، به مدت یک ساعت شستشو و در محلول تثبیت کننده لویتسکی (نسبت 1 به 1 فرمالدهید 40 درصد و اکسیدکرم 1 درصد) در یخچال نگهداری گردیدند و با گذشت 20 تا 24 ساعت، برای مدت 30 دقیقه در آب جاری شستشو داده شدند. ریشه‌ها در محلول سدیم هیدروکسید یک نرمال به مدت 20 دقیقه در حمام آبی 60 درجه سانتی گراد هیدرولیز و پس از شستشو به مدت 2 دقیقه رنگ آمیزی با رنگ استوهماتوکسیلین ( پودر هماتوکسیلین، اسید استیک و آمونیوم سولفات آهن (III)) صورت گرفت. در مرحله آخر نمونه‌ها روی لام قرار داده شد و بعد از اسکواش، شمارش کروموزوم توسط میکروسکوپ، با بزرگنمایی 40x انجام شد.

اندازه‌گیری‌های برخی از صفات مورفولوژیکی توسط خط کش و کولیس انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان فنل کل از معرف فولین - سیکالتو (36) استفاده شد و میزان فنل کل در مقایسه با منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. همچنین برای تعیین میزان کلروفیل، از روش آرنون، (5) استفاده شد. به منظور تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ابتدا محلول با غلظت 0/05 میلی مولار با حل کردن مقدار 2 میلی گرم از ماده 2 و2-دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل در مقدار 100 میلی‌لیتر متانول 85 درصد بدست آمد. این محلول برای اندازه گیری درصد بازدارندگی به صورت روزانه تهیه گردید. از نمونه‌های قبلی که برای سنجش میزان فنل استفاده شده بود مقدار 500 میکرولیتر برداشته و پس از مخلوط شدن با مقدار250 میکرو لیتر آب در درون تیوب‌هایی ریخته شد. آنگاه عمل سانتریفیوژ به مدت 5 دقیقه (10000 دور در دقیقه) انجام شد. سپس مقدار 37/5 میکرولیتر از این نمونه برداشت و به آن 1462/5 میکرو لیتر DPPH اضافه گردید. بلافاصله پس از تکان دادن میزان جذب کارتنوئید در طول موج 515 نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل کری 100، واریان، آمریکا) قرائت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید.

## استخراج ترکیبات فرار با استفاده از روش SMPE و جداسازی و شناسایی ترکیبات توسط GC/MS

بعد از آسیاب کردن برگ‌های خشک شده یک گرم از آن در ظرف مخصوص SMPE با در پوش تفلونی ریخته شد. آنگاه 500 میکرو لیتر آب دیونیزه به آن اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد تحت امواج فرا صوت قرار گرفت. در مرحله بعد فیبر مخصوص SMPE با نام PDMS را به مدت 40 دقیقه در فضای فوقانی گذاشته تا جذب صورت گیرد. در نهایت فیبر را به آرامی درون نگهدارنده فیبر کشیده و بلافاصله برای عمل واجذب به محل تزریق دستگاه GC/MS منتقل گردید. برای شناسایی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 6890 N متصل به دتکتور جرمی Agilent 5973 N که نوع ستون در آن با HP-5 دارای ستون موئینه به طول 30 متر و قطر داخلی 25 میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر 0/25 میکرون بود استفاده شد و تزریق به صورت Splitless انجام گرفت.

## درصد زنده مانی

به منظور بررسی درصد زنده مانی بوته های کاشته شده نسبت تعداد بوته‌های باقیمانده در پایان آزمایش (S) به تعداد نهال های اولیه(n) به صورت درصد زنده مانی(SP) منظور و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

$$SP=S/n\times100$$

از نرم افزارهای SAS و SPSS برای اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، همچنین مقایسه میانگین تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نیز با استفاده از آزمون t در سطح معنی‌دار 1 درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفت درصد زنده‌مانی نشان داد تمامی اثرات به جز دو مورد (اثر متقابل نمونه در زمان و اثر متقابل سه‌گانه نمونه در کلشیسین در زمان) برای صفت درصد زنده‌مانی در سطح 0/01 معنی‌دار شدند. همچنین بررسی جدول تجزیه واریانس صفت میکسوپلوئیدی نشان داد که عوامل اصلی شامل نمونه، کلشیسین و زمان در سطح 0/01 معنی دارند. همچنین در بین تمامی اثرت متقابل، اثر متقابل نمونه در کلشیسین و کلشیسین در زمان در سطح 0/01 بسیار معنی دار شد و بقیه اثرات متقابل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (جدول1).

**جدول1- نتایج تجزیه واریانس اثر کلشیسین بر درصد زنده‌مانی نمونه‌های بذر، ریشه و جوانه انتهایی گیاه شنبلیله**

**Table1-ANOVA for the effect of colchicine on viability percentage of seed, root and terminal bud samples of fenugreek**

| منابع تغییر Treatments | درجه آزادی df | میانگین مربعات(MS) | |
|---|---|---|---|
| | | درصد زنده‌مانی Viability percentage | درصد میکسوپلوئید Mixoploid percentage |
| نمونه Sample | 2 | 0.83 ** | 0.28** |
| کلشسین Colchicine | 4 | 0.62** | 0.15** |
| زمان Time | 3 | 0.12* | 0.046** |
| نمونه × کلشیسین Colchicine × Sample | 8 | 0.05** | 0.034** |
| نمونه × زمان Sample× Time | 6 | 0.02ns | 0.007 ns |
| کلشیسین × زمان Colchicine × Time | 12 | 0.03** | **0.042 |
| نمونه × کلشیسین × زمان Time × Colchicine × Sample | 24 | 0.017ns | 0.011ns |
| خطای آزمایشی Erorr) | 120 | 0.013 | 0.008 |
| ضریب تغیرات C.V. (%) | - | 11.87 | 10.9 |

ns ، * و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی دار، وجود اختلاف معنی دار در سطح 0/05 و 0/01

ns= Non significant, ** = $p < 0.01$, and * = $p < 0.05$

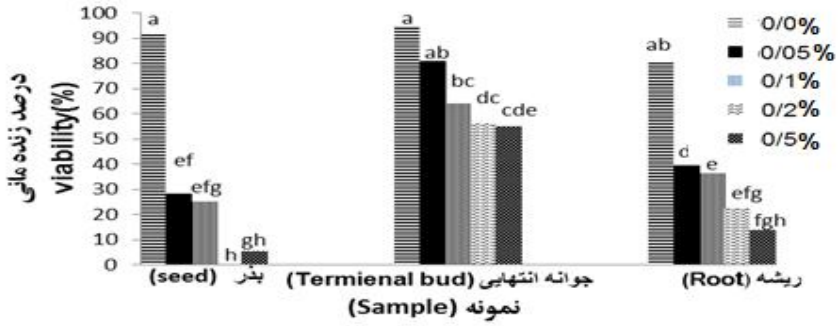
همچنین آنالیز دادها حاصل از مقایسه میانگین حاکی از این بود که بعد از تیمار شاهد بالاترین درصد زنده‌مانی مربوط به نمونه جوانه انتهایی در غلظت 0/05درصد کلشیسین و پایین‌ترین درصد زنده‌مانی مربوط به نمونه بذر در غلظت 0/2درصد کلشیسین بود. بطور کلی در نتایج حاصل از این پژوهش نمونه جوانه انتهایی درصد بالاتری از زنده‌مانی را نسبت به دو نمونه دیگر (بذر و ریشه) به خود اختصاص داده و نمونه بذر پایین‌ترین درصد زنده‌مانی را داشته است (شکل 1). القا پلی‌پلوئیدی در گیاهان توسط کلشیسین به روش‌های مختلفی مانند تیمار بذر(35) ، تیمار جوانه‌گل (42) ، تیمار مریستم انتهایی (24)، و شرایط درون شیشه‌ای (2 و 10) انجام می‌شود. حنظلکا و کوبزا[1] (12) در آزمایشی که به‌منظور انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاه نخود انجام گرفت مشاهده کردند که افزایش غلظت محلول کلشیسین میزان مرگ و میر در گیاهان تیمار شده را افزایش داد. تیمار بذر با عوامل القاء کننده پلی پلوئیدی، مانند کلشیسین، جوانه زنی بذر را کاهش داده در حالیکه میزان مرگ و میر گیاهچه را افزایش می دهد (3، 6، 40 و 42). همچنین سحرخیز (37) نشان داد که بین غلظت‌های مختلف کلشیسین و میزان مرگ‌ومیر در گیاهچه‌های بابونه‌کبیر رابطه مستقیمی وجود دارد. ایجاد حالت مسمومیت و گیاه‌سوزی در گیاهان تیمار شده با کلشیسین دلیل اصلی مرگ‌ومیر گیاهان پس از تیمار با این ماده جهش‌زا است (11).

در جدول مقایسه میانگین صفت میکسوپلوئیدی مشخص شد که بالاترین درصد میکسوپلوئیدی متعلق به نمونه جوانه انتهایی برای غلظت 0/1 و 0/2 درصد کلشیسین در گروه a و کمترین درصد میکسوپلوئیدی در گروه e متعلق به غلظت صفر در تمامی نمونه‌ها و غلظت 0/2 درصد کلشیسین در نمونه بذر است. مرزوقی و همکاران (25) با بررسی سیتوژنتیکی ریشه 38 گونه از شنبلیله تونسی ثابت کردند اعمال تیمار 0/05 درصد کلشیسین به مدت 72 ساعت از طریق نمونه جوانه انتهایی در بدست آوردن گیاه میکسوپلوئید موثر است. نتایج بدست آمده از آزمایش دوم مبنی بر وجود گیاه میکسوپلوئید در نمونه جوانه انتهایی با غلظت کلشیسین 0/5 درصد در مدت زمان 72 ساعت، نتایج مرزوقی و همکاران (25) را تایید می‌کند.

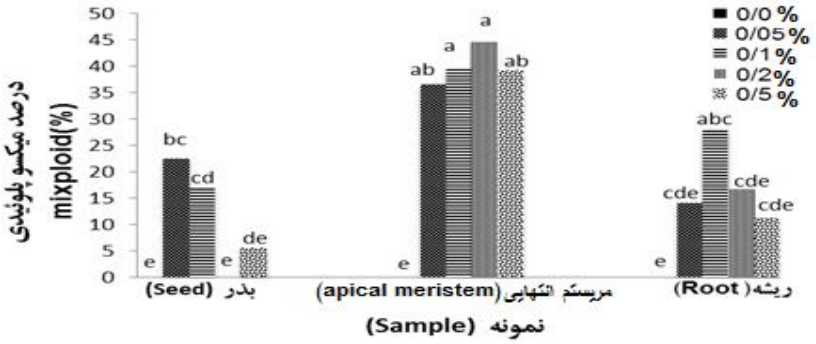
در این آزمایش مشاهده شد که اعمال تیمار شیمیایی کلشیسین در گیاهان شنبلیله میکسوپلوئید موجب پدیدآمدن ناهنجاری‌هایی در برگ این گیاهان می‌گردد که با نتایج بدست آمده از تولید گیاهان با برگ‌های غیرعادی و نامناسب در اثر انگیزش پلوئیدی در گیاه دارویی

1- Hanzelka and Kobza

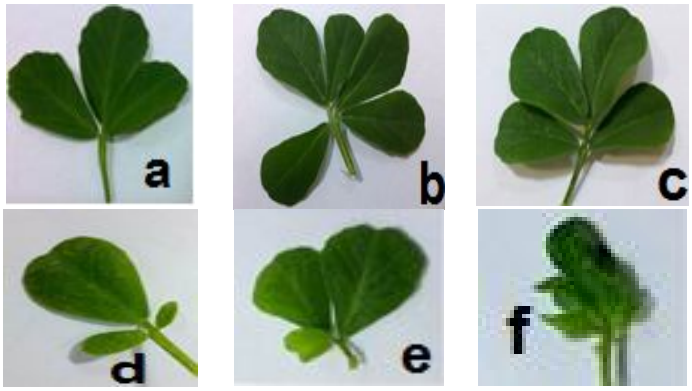
بنگدانه مطابقت داشت (19). برقعی و همکاران (7) بعد از اعمال تیمار کلشیسین روی جوانه انتهایی گیاه بادرنجبویه مشاهده نمودند در مراحل اولیه رشد در گیاهان میکسوپلوئید ناهنجاری‌هایی در برگ‌ها ایجاد می‌شود.




**شکل 1- اثر غلظت کلشی‌سین بر زنده‌مانی در نمونه‌های بذر، ریشه و جوانه انتهایی شنبلیله**
**Figure 1- The effect of colchicine concentration on viability of seed, root and terminal bud samples of fenugreek**



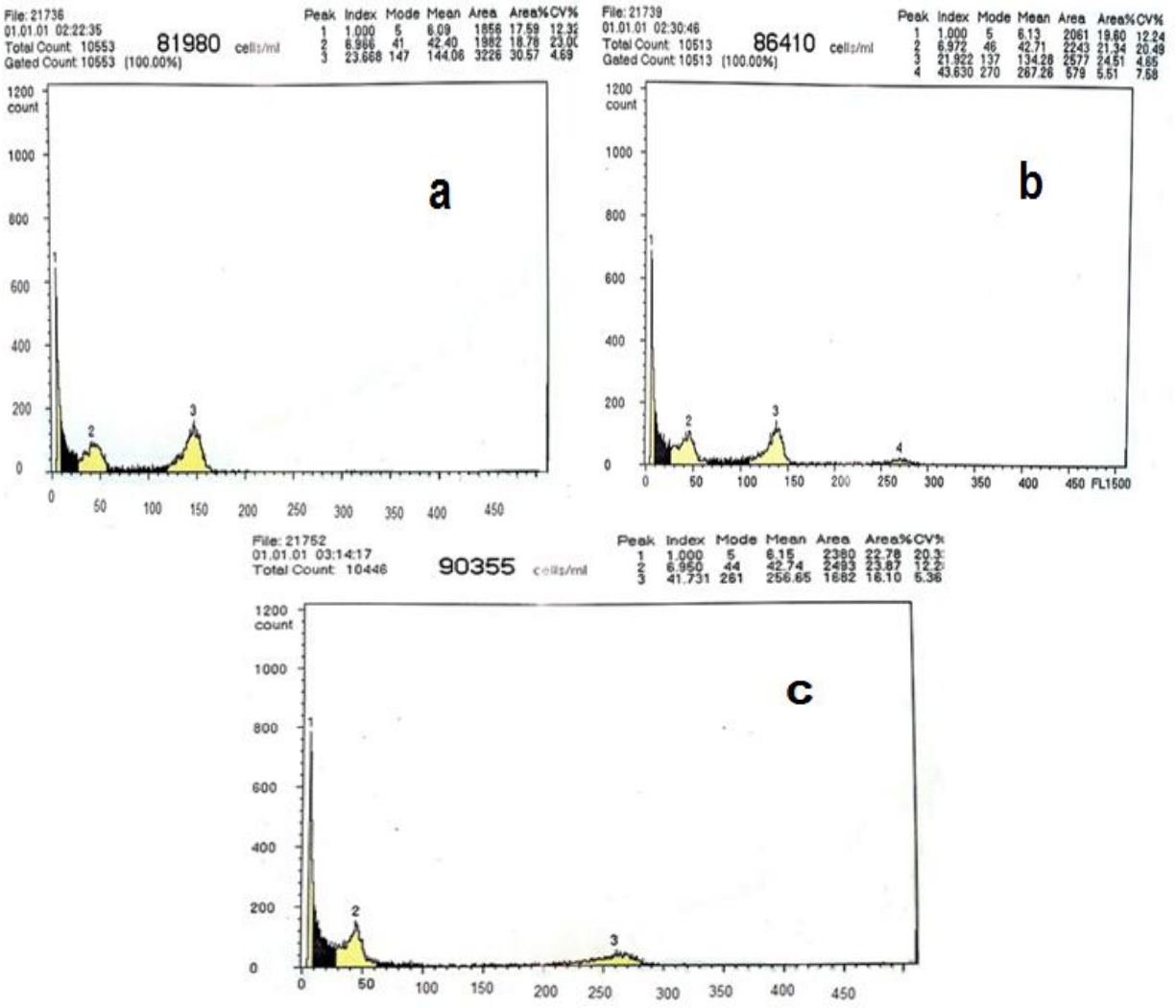

**شکل2- درصد میکسوپلوئیدی تیمارهای بذر، ریشه و جوانه انتهایی در گیاه دارویی شنبلیله**
**Figure 2- Mixoploidy percentage of seed, root, and terminal bud samples of fenugreek**




**شکل 3- برگ گیاه شنبلیله دیپلوئید (a) و برگ گیاهان میکسوپلوئید (e, d, c, b و f)**
**Figure 3- Leaf of diploid fenugreek (a) and leaf of mixoploid fenugreek plants (e, d, c, b and f)**

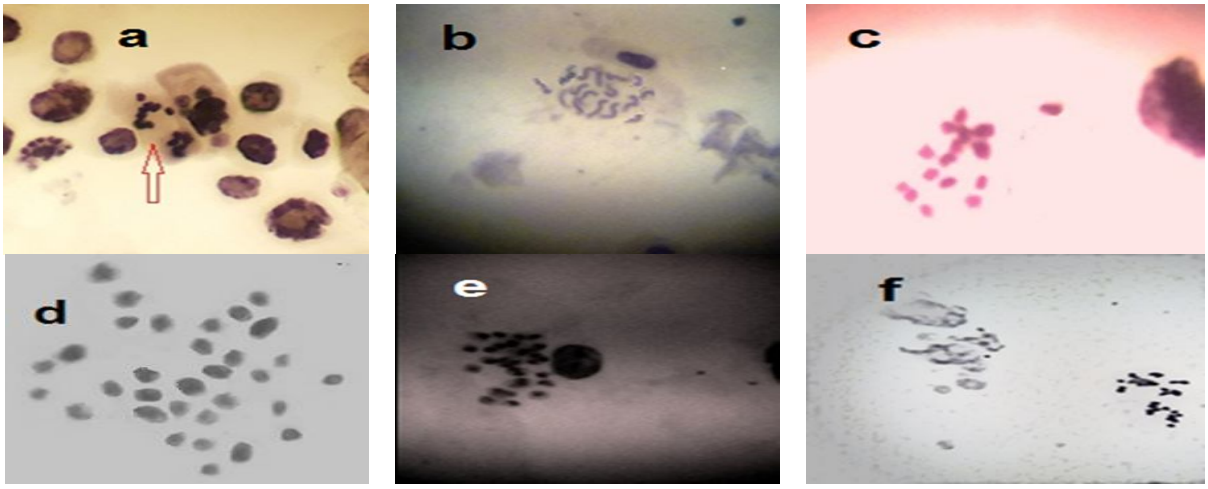
نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، سیتوژنتیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در این پژوهش نشان داد که با اعمال تیمار غلظت 0/5 درصد کلشیسین در مدت زمان 72 ساعت در نمونه جوانه انتهایی گیاه شنبلیله با تعداد کروموزوم 2n=4x=32 تولید شد.

غلظت موثر برای القاء تتراپلوئیدی در گیاهان مختلف متفاوت است. تحقیقات نشان می‌دهد که در بسیاری از گیاهان، تیمار مریستم انتهایی به طور موثری در بوجود آمدن گیاه تتراپلوئید موثر است (23). در گیاه بابونه کبیر در مراحل ظهور برگ‌های لپه ای و ظهور دو برگ حقیقی، غلظت 0/2 درصد کلشیسین بهترین تیمار برای به دست آوردن اتوتتراپلوئیدی معرفی شد (37). همچنین در گیاه بادرشبی بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید را در غلظت 0/1درصد گزارش کردند (43).



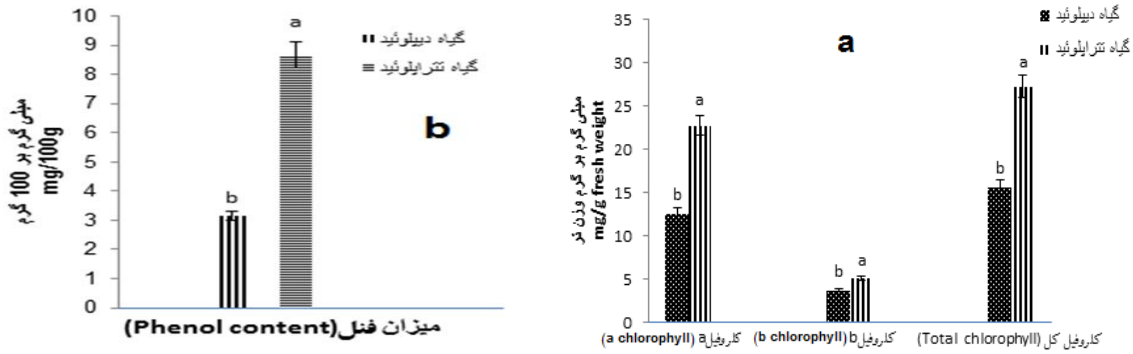

**شکل 4- فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه شنبلیله در حالت دیپلوئید (پیک 3) و گیاه شاخص (رز تتراپلوئید) در حالت دیپلوئید (پیک 2) (a)- تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه شنبلیله در حالت میکسو پلوئید پیک 2 شاخص (رز تتراپلوئید) پیک 3 سلول دیپلوئید و پیک 4 سلول‌های تتراپلوئید گیاه شنبلیله (b)- تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه شنبلیله در حالت تتراپلوئید (پیک 3) و گیاه شاخص (رز تتراپلوئید) (پیک 2)(c).**

**Figur 4- Flow cytometry analysis of index plant cell nuclei (rose) (internal standard) (peak 2) and fenugreek (diploid) (peak3) (a)- Flow cytometry analysis of index plant cell nuclei (rose) (internal standard) (peak 2) and fenugreek mixoploid (peak 3and 4) (b)– Flow cytometry analysis of index plant cell nuclei (rose) (internal standard) (peak 2) and fenugreek in tetraploid ststus (peak 3) (c).**




**شکل 5- تعدادکروموزوم ها در شنبلیله دیپلوئید (2n=2x=16)(a، b و c) و تعداد کروموزوم ها در شنبلیله تتراپلوئید (2n=4x=32) (d، e و f).**

**Figure 5. Chromosome numbers in a diploploid (2n=2x=16) (a, b and c) and chromosome numbers in a tetraploid (2n=4x=32) fenugreek (d, e and f).**




**شکل6- مقایسه میزان کلروفیل در شنبلیه دیپلوئید و تتراپلوئید (a) و مقایسه میزان فنل در شنبلیه دیپلوئید و تتراپلوئید (b)**

**Figure 6-Comparison of chlorophyll content in diploid and tetraploid fenugreek (a) and comparison of phenol content in diploid and tetraploid fenugreek (b).**

## نتایج حاصل از فلوسایتومتری

در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از تجزیه پلوئیدی گیاهان با دستگاه فلوسایتومتری سه سطح پلوئیدی را نشان داد. فلوسایتومتری روشی بسیار کارآمد است که در زمان بسیار کوتاه و تنها با استفاده از یک نمونه بسیار کوچک از برگ می‌تواند با دقت بالایی سطح پلوئیدی گیاه مورد آزمایش را مشخص کند (35).

## شمارش کروموزوم

برای شمارش کروموزوم‌های گیاه شنبلیله بهترین نتیجه برای ریشه‌های 1/5-1سانتی‌متر به دست آمد. بعد از نمونه برداری های مکرر از ریشه، بهترین زمان نمونه‌برداری(زمانی که بیشتر سلول‌ها در مرحله متافاز هستند) برای قطع ریشه های این گیاه 9 صبح تشخیص داده شد که با نتایج به دست آمده از تحقیقات مرادی و همکاران (30) مطابقت داشت.

در این پژوهش برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه شنبلیله تتراپلوئید نسبت به گیاه شنبلیله دیپلوئید به منظور امکان استفاده از آنها در تعیین تتراپلوئیدی احتمالی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در صفت ارتفاع، گیاه دیپلوئید شنبلیله نسبت به تتراپلوئید دارای برتری بود. افزایش سطح پلوئیدی درگیاهان سبب ایجاد تغییرات آناتومی و ساختمانی در آن‌ها می‌شود (8). مادون و همکاران (22) دریافتند با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه بذرالبنج ارتفاع گیاه به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد.

طبق نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس بین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b،کلروفیل کل و فنل در گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید در سطح آماری 0/01 اختلاف معنی‌داری وجود داشت، بطوریکه بیشترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b،کلروفیل کل و فنل متعلق به گیاه تتراپلوئید شنبلیله با گروه a بود. نتایج حاصل از اندازه-گیری مقدار کلروفیل با نتایج بدست آمده از پژوهش حسنی و همکاران (13) مطابقت داشت. آنها گزارش نمودند که با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه ریحان میزان کلروفیل a، b و کل نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. لذا، چنین استنباط می‌شود که نوع و رقم مورد مطالعه در میزان کلروفیل سطوح پلوئیدی تاثیر دارد (4).

**جدول 2- ترکیبات شیمیایی به دست آمده از تجزیه GC/MS در گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید شنبلیله**

**Table 2- Chemical compounds detected from GC / MS analysis in diploid and tetraploid fenugreek**

| شماره No. | ترکیبات اندازه‌گیری شده Measured ccompounds | شاخص بازداری RI | درصد در گیاه دیپلوئید Percentage in diploid plant | درصد در گیاه تتراپلوئید Percentage in tetraploid plant | درصد تغییر Percentage change |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | آلفا پینن Alpha-Pinene | 5.12 | 27.40 | 46.42 | +5.88 |
| 2 | دلتا کارن delta-Carene | 6.67 | 28.0 | 26.0 | +3.57 |
| 3 | 8 و1- سینئول 1,8-Cineole | 7.17 | 12 | 12 | 0 |
| 4 | گاما ترپینن Gamma-Terpinene | 7.84 | 4.0 | 5.0 | +25 |
| 5 | لینالیل استات Linalyl acetate | 12.92 | 82.0 | 83.0 | +1.21 |
| 6 | آلفا ترپنن Alpha –Terpinene | 15.44 | 1 | 95.0 | -5 |
| 7 | یلانژن Ylangene | 16.2 | 1.0 | 2.0 | +8.42 |
| 8 | آلفا کوپان alpha-Copaene | 16.15 | 41.0 | 44.0 | +7.31 |
| 9 | اُکتادین - 1- اُل Octadien-1-ol | 16.27 | 23.0 | 22.0 | -4.24 |
| 10 | بتا بوربونن Beta-Bourbonene | 16.4 | 87.0 | 1 | +14.92 |
| 11 | بتا کوبیبن Beta-Cubebene | 16.49 | 32.0 | 38.0 | +15.62 |
| 12 | آلفا گورجونن Alpha-Gurjunene | 17.05 | 46.0 | 45.0 | -2.17 |
| 13 | ترنس کاریوفیلن Trans-Caryophyllene | 17.30 | 8.3 | 4.4 | +15.78 |
| 14 | دودکاترین Dodecatriene | 18.10 | 46.1 | 49.1 | +2.05 |
| 15 | آلفا هومولین Alpha-humulene | 18.16 | 36.1 | 5.1 | +10.29 |
| 16 | گاما هیماکالین Gamma-himachalene | 18.77 | 86.0 | 98.0 | +13.92 |
| 17 | جرماسرین - دی Germacrene-D | 18.84 | 94.0 | 1 | +6.38 |
| 18 | بتا آینون Beta- Ionone | 18.93 | 5.1 | 6.1 | +6.66 |
| 19 | اسید تترا دکانوئیک متیل استر Tetradecanoic acid methel ester | 19.75 | 25.0 | 0/49 | +96 |
| 20 | اسید هگزا دکانئیک متیل استر Hexadecanoic acid methel ester | 20.90 | 4.2 | 2.3 | +33.33 |
| 21 | 9- اُکتانئیک اسید 9-Octadecenoic acid | 21.30 | 15.0 | 15.0 | 0 |

**(GC/MS)**

به منظور تجزیه تحلیل درست نتایج، ترکیبات نمونه‌ها توسط کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه نتایج حاصل از GC/MS با اطلاعات کتابخانه‌ای موجود، مقدار و نوع ترکیبات گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید شنبلیله مشخص شد. در این پژوهش از 21 ترکیب شناخته شده توسط آنالیز GC/MS گیاه تتراپلوئید شنبلیله نسبت به دیپلوئید در 15 ترکیب، مقادیر بیشتری داشت. به طور مثال در اسیدهای چرب دکانوئیک متیل استر در گیاه تتراپلوئید 96 و33 درصد نسبت به دیپلوئید افزایش مشاهده شد. این ترکیبات دارای خواص کاهندگی کلسترول و فشار خون و همچنین جلوگیری کننده از بیماری های قلب و عروق هستند(36). همچنین مواد موثره گاما ترپینن و آلفا همولین که به ترتیب 25 و 10 درصد در گیاه تتراپلوئید افزایش داشتند، دارای

خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد التهاب است (27و33). در ترکیبات بتا بوربونن، بتا کوبیبن، ترنس کاریوفیلن و گاما هیماکالین نیز افزایش بالای 10 درصد مشاهده شد.

پلی‌پلوئیدی اغلب با افزایش اندازه سلول ، افزایش میزان ژن و فعالیت آنزیم‌ها به ازاء هر سلول باعث تغییرات قابل ملاحظه درمتابولیسم ثانویه می‌شود. زمانی که مانند اکثر گیاهان دارویی، اندام-های رویشی گیاه منبع متابولیت های ثانویه باشند، دستورزی سطح پلوئیدی مانند مضاعف سازی مستقیم کروموزومی اتوپلی‌پلوئیدی یا آلوپلی پلوئیدی روشی سریع در بهبود و تولید ترکیب‌های ارزشمند دارویی می باشد (21). به طور کلی اتوپلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی از قبیل *Hyoscyamus niger*، *Atropa belladona*و *Solanum nigrum* باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه به ازاء واحد وزن خشک گیاه شده است . برای مثال در گیاهان *Atropa belladona* و *Hyoscyamus niger* افزایش سطح پلوئیدی بترتیب 68 و 38 درصد افزایش در بازده تروپان آلکالوئید، در گیاه *Solanum nigrum* 30 تا 50 درصد افزایش محتوای سولاسودین و در گیاه *Camellia sasanqua* افزایش در غلظت کاتچین‌ها، اگزتراکین‌ها و کافئین ها را در پی داشته است (16).

قیاسوند و همکاران (9) با استفاده از روش SMPE و GC/MS در آنالیز متابولیت های گونه گیاهی *Tagetes minuta* L. 47 ترکیب را در این گیاه شناسایی کردند.

## نتیجه گیری کلی

در این پژوهش محلول0/5 درصد کلشی‌سین به مدت 72 ساعت به عنوان بهترین غلظت به منظور تحریک تتراپلوئیدی در شنبلیله شناخته شد. میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و فنل در گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش ، اما ارتفاع بوته کاهش یافت. همچنین مشخص شد که با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه شنبلیله تغییراتی در میزان مواد شناسایی شده در GC/MS به وجود می‌آید که در بسیاری از موارد این تغییرات به صورت افزایشی بود. بنابراین، کلشی‌سین به عنوان یک ماده جهش‌زا می‌تواند بر بهبود صفات و ویژگی‌های گیاهان تأثیرگذارد، هر چند که اثر تغییرات ایجاد شده بر مقدار و محتوای مواد موثره بر سلامت مصرف کنندگان نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.

## منابع


1- Aasim M., Hussain N., Umer E.M., Zubair M., Hussain S.B., Saeed S.H., Rafique T.S. and Sancak C. 2010. *In-vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.) using different cytokinins, African Journal of Biotechnology, 42: 7174-7179.

2- Adaniya S., and Shira D. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinalis Roscoe*) and its pollen fertility and germinability, Scientia Horticulturae, 88: 277-287.

3- Al-Habori M. and Raman A. 2002. Pharmacological Properties in Fenugreek- The genus Trigonella (1st edition) by G.A. Petropoulos (ed.). Taylor and Francis, London and New York, 10: 163-182.

4- Andersson S.C. 2009. Carotenoids tocochromanols and chlorophylls in sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides*) and rose hips (*Rosa* sp.). Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden, 52:75-60.

5- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24: 1-15.

6- Beck S.L., Dunlop W.R. and Fossey A. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild), Botanical Journal of the Linnean Society, 141 177–181.

7- Borgheei S.F., Sarikhani H., Chaichi M. and Kashi A. 2010. *In vitro* induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.), Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26:283-295. (in Persian with English abstract).

8- Dhawan O.P. and Lavania U.C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy. A review, Euphytica, 87: 81-89.

9- Ghiasvand A. R., Nasseri M, Farsizaeh S., Meshkatalsadat M.H., Sadeghi-Sarabi R., Shadabi S.H. and Borzoei M .2011. Chemical characterization of cultivated *Tagetes minuta* L. by use of ultrasound-assisted head space SPME and GC–MS, Chromatographia, 73:1031–1035.

10- Gu X. and Huang W. 2002. Testing the parsimony test of genome duplications: A counterexample, Genome Research, 12**:** 1-2.

11- Han D.S., Niimi Y. and Nakamo M. 1999. Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-drived haploid calli in Asiatic hybrid lilly, Journal of Japanese Society of Horticultural Sciencs, 68: 979-983.

12- Hanzelka P. and Kobza F. 2001. Genome induced mutation in *Challistephus chinensis Nees*. Effect of colchicines application on the early plant development, Zahradnictvi Horticultural Science, 28: 15-20.

13- Hasani M.A., Mirzaei M. and Omid Baigi R. 2010. An investigation of the effect of autotetraploidy on essential oil content and some of quntitative and qualitative characteristics of basil medicinal plant (*Ocimum basilicum* L.),

Iranian Journal of Horticultural Science, 41 (2): 111-118. (in Persian with English abstract).
14- Hidvegi M., El-Kady A., Lasztity R., Bekes F. and Simon-Sarkadi L 1984. Contribution to the nutritional characterization of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. 1753), Acta Alimentaria., 13(4): 315-324.
15- Hoseini H., Chehrazi M., Nabatiahmadi D. and Mahmodisarvestani M. 2012. Induction polyploidy in *Vinca* plants and changes in phenotypic properties. First National Conference Playbooks Achieving Sustainable Development, 5pp (In Persian).
16- Jesus L.D. 2003. Effect of artificial polyploidy in transformed roots of *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports, 21: 809-813.
17- Kaykhaii M. and Saffari F. 2008. Application of polypyrrole coated stainless-steel wire to the determination of aliphatic amines using headspace solid-phase microextraction, Journal of Sciences, 2: 111-117.
18- Kitson F.G., Larsen B.S. and McEwen C.N. 1996. The fundamentals of GC/MS. p 3-35 In: Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F.G. Kitson et al. (ed.) Academic Press. San Diego, CA.
19- Lavania U.C. and Srivastava S. 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L., Euphytica, 52: 73-77.
20- Lavania U.C. 1998. Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotertraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). Euphytica, 38: 271- 276.
21- Lavania U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals, Plant Genetic Resources, 3(2): 170–177.
22- Madon M., Clyde M.M., Hashim H., Mohdyusuf Y., Mat H. and Saratha S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through Colchicine and oryzalin treatments, Journal of Oil Palm Research, 17:110-123.
23- Malekzade Shafarodi S., Ghani A. and Habibi M. 2010. The study of induction of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum*) plant, Journal of Horticulture, 25: 469-461. (in Persian).
24- Marzougui N., Boubaya A., Elfalleh W., Ferchichi A. and Beji M. 2009. Induction of polyploidy in *Trigonella foenum-graecum* L.: Morphological and chemical comparison between diploids and induced autotetraploids, Acta Botanica Gallica, 156: 379-389.
25- Marzougui N., Guasmi F., Elfalleh W., Boubaya A., Touil L., Ferchichi A., Lachieheb B. and Beji M. 2010. Physiological performa nce of induced autotetraploid genotype of *Trigonella foenum-graecum* L. compared with diploid genotypes, Acta Botanica Gallica, 157: 117-126.
26- Mathura S., Fossey A. and Beck S. 2006. Comperative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). Journal of Forestry, 79: 381- 388.
27- Massumi M., Fazeli M., Alavi S. and Ajani Y. 2007. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. fruits, Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(3): 171-6.
28- Mehrafarin A., Rezazadeh S.h., Naghdi Badi H., Zand E. and Noormohammadi G.h. 2011. A Review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose, Journal of Medicinal Plants, 1(37): 6-24.
29- Mensha J.K., Obadoni B.O., Akomeah P.A., Ikhajiagbe B. and Ajibolu J. 2007. The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.), African Journal of Biotechnology, 6: 534-538.
30- Moradi P., Kashi A., Hasandokht M.R., Khosroshahi M. and Khalighi A. 2008. Study of genetic diversity of indigenous Iranian fenugreek masses based on cytological traits, Plant and Ecosystem,, 21: 33-46.( in Persian).
31- Nezhadali A., Akbarpour M., Zarrabi Shirvanb B. and Mousavic M. 2010. Comparison of volatile organic compounds of *Thymus vulgaris* using hydrodistillation and headspace solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry, Journal of the Chinese Chemical Society, 57:40-43.
32- Razavi S.M., Zahri S., Zarrini G., Nazemiyeh H. and Mohammadi S. 2009. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 35(3): 376-8.
33- Riasat M., Karaptyan Zh. and Nasirzadeh A. 2003. Study of karyotype of some species of the genus *Trigonella* Fars Province. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 11:127-145 (in Persian with English abstract).
34- Rubuluza T., Nikolova R.V., Smith M.T. and Hannweg K. 2007. In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicines. South African Journal of Botany, 73: 259–261.
35- Quan K., Guolu L., Qigao G. and Xiaolin L. 2004. Polyploid induction of *Arctium lappa* by colchicine, Plant Physiol Communi, 40:157-158.
36- Saeedi K.A. and Omidbaigi R. 2009. Evaluation of content and composition of fatty acids, totalphenolic content of *Kelussia odoratissima* Mozaff. seed, Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25 (1): 113- 9.
37- Saharkhiz M.J. 2005. The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) medicinal ornamental plant. Ph.D. Thesis, Tarbiat Modares University, pp 173. (in Persian with English abstract).
38- Sari N., Abak, K. and Pitrat, M.1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon, Science Swedish University of Agricultural Sciences, 41: 361–390.

39- Singleton VL. and Rossi I.A. 1995. Colorimetry of total phenolics with phosphor-molybdic phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16:144-58.
40- Takamura T., and Miyajima I. 1996. Colchecine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics, Scientia Horticulturae, 65:305-312.
41- Thao N.T.P., Ureshino K., Miyajima I., Ozaki Y. and Okubo H. 2003. Induction of tetraploids *inornamental Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 19-25.
42- Wu H.Z., Zheng S., He Y., Yan G., Bi Y. and Zhu Y. 2007. Diploid female gametes induced by colchicine in oriental lilies. Scientia Horticulturae, 114: 50-53.
43- Yavari S. 2007. The study of the effect of colchicine on morphological, physiological, and active ingredients of (*Melissa officinalis* L.) medicinal plant. MSc. Thesis, Department of Horticulture. University of Tarbiat Modarres, Tehran. 140 pages. (in Persian with English abstract).

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 127-139
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 33، شماره 1، بهار 1398، ص. 139-127
شاپا: 2008 - 4730

# Effect of Colchicine on Polyploidy Induction and Its Effects on Morphophysiological and Biochemical Properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*)

**A. H. Keshtkar[2*]- N. Fallahi[2]- M. R. Abdollahi[3]- H. Sarikhani[4]- H. Safari[5]- J. Mohseni Araghi[6]**

Received: 18-04-2018
Accepted: 27-01-2019

**Introduction:** Polyploidy plays an important role in creation of genetic variability. Polyploidy induction by mutagenic chemicals such as colchicine is considered to enhance the potential of secondary metabolites production in herbs breeding. Colchicine is the most effective chemicals used in the polyploidy induction studies. The effect of colchicine is to form cells with two or multiply number of chromosomes resulting in a lack of germination and death of a large number of plant samples. Flow cytometry analysis and cytogenetic studies were effectively used to assess the ploidy levels for fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) plants. In the beginning of 90 decade, a new type of adsorption technique called solid-phase micro extraction (SPME) has been developed by Pawliszyn and co-workers. This method compared to the traditional techniques, offers many advantages such as the high sensitivity and reproducibility, does not require solvent, and combines extraction and pre-concentration in a single step without pre-treatment of samples. Moreover, it is a fast and inexpensive method, requires low sample volume and it can be easily automated. Solid-phase micro extraction (SPME) uses a fine rod (fused silica or metal) with a polymeric coating to extract organic compounds from their matrix and it directly transfer them into the gas chromatograph injector for thermal desorption and analysis (Kaykhaii, 2008). The aim of this study was to investigate the effect of colchicine treatment on ploidy levels and compare some of the morphological, physiological, cytogenetical, flow cytometric analysis and biochemical characteristics in diploid and tetraploid fenugreek plants.

**Materials and Methods:** In order to investigate the effect of polyploidy induction by colchicine on *Trigonella foenum-graecum* medicinal species, an experiment was planned as a factorial completely randomized design with five concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5%) for 12, 24, 48 and 72 hours. In this experiment the effect of colchicine was examined on the percentage of survival and tetraploidy of seed, root and terminal bud samples. Level of ploidy was identified in survival explants through root tip chromosome counting and flow cytometry of leaf samples. In addition to distinguish tetraploid from the diploids plants, morphological, physiological and biochemical characteristics were considered in treated plants. SAS and SPSS software programs were used to analysis of variance and comparison of means by Duncan's multiple test. Graphs were also drawn by EXCEL software.

**Results and Discussion:** The analysis of variance showed that all characteristic factors for survival percent and mixoploidy percentage were statistically significant. Survival percentage was decreased with increasing of colchicine concentration and increased exposure time of colchicine-treated seed. After the observation of morphological changes, the samples were considered to assess the ploidy levels by flow cytometry system. Results showed that 0.5% colchicine concentration had the highest survival rate after control treatment for the terminal bud. The highest percentage of mixoploidy was also observed in treated terminal buds with 0.1 and 0.2% of colchicine concentrations. Morphological, physiological, cytogenetic, flow cytometric analysis and biochemical studies confirmed that terminal bud treatment with 0.2% colchicine for 72 hours is the most effective treatment to induce tetraploidy in fenugreek plant. The results of GC/MS also indicated an increase in secondary metabolites content, but traits including growth rate and plant height of tetraploid reduced compared to the diploid plants. Result of this study showed a significant increase in chlorophyll a, b and total chlorophyll contents of tetraploid plants, which were higher than the levels of diploid plants.

**Conclusion:** Polyploidy induction using mutagenic chemicals is one of the methods to enhance the

2, 2, 3 and 6- Assistant Professor, Former MSc Student, Associate Professor and Former MSc student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Bu-Ali Sina University, Hamedan-Iran
(*-Corresponding Author E-mail: akesht@gmail.com)
4- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan-Iran
5- Faculty Member, Research Division of Natural Resources, Kermanshah Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Kermanshah, Iran

production of plant secondary metabolites. Colchicine is the most effective mutagenic chemical in inducing plant polyploidy. Although, flow cytometry is an expensive method, it is increasingly used for ploidy screening by analyzing of nuclear DNA content. In this study, both flow cytometry and chromosome microscopic examinations were used to test ploidy. The two methods were compared, and it was found that flow cytometry testing was fast and labor saving, especially in case of a large number of samples. Tetraploidy induction significantly affected different morphological, physiological, and biochemical characteristics of *Trigonella foenum-graecum*. These changes suggested that ploidy manipulation as a rapid and effective method for enhancing genetic diversity and metabolite production for this plant. SMPE method offers a number of practical advantages: smaller sample volume, simplicity of extraction and low cost, when compared to the other methods that are currently being used.

**Keywords:** Flow cytometry- GC/MS- Mixoploidy- Tetraploidy