تأثیر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر روی صفات کروموزومی گونه اهلی بز نجدی

محمدصادق ملک‌پور[۱]، علی باقرپور*[۲]

(تاریخ دریافت ۹۲/۸/۳؛ تاریخ پذیرش ۹۲/۱۱/۱۵)

چکیده

به منظور بررسی تاثیر غلظت کلشیسین در سه سطح (۱۰۰، ۱۵۰ و۲۰۰ میکرولیتر) و زمان تأثیر در سه سطح (۱، ۲ و ۳ ساعت) بر روی صفات کروموزومی میان ده محیط کشت سلول‌های سفید خون بز نجدی، مطالعات سیتوژنتیکی بر روی آنها صورت گرفت. در نمونه های فوق ویژگی‌های کروموزومی از قبیل بازوی بلند و کوتاه کروموزومی اندازه‌گیری شد و بر اساس اطلاعات به دست آمده، طول کل کروموزوم‌ها، نسبت طول بازوی کوتاه به بلند و به عکس نیز محاسبه گردید. بر روی داده‌های حاصل از صفات کاریوتیپی فوق تجزیه واریانس در قالب طرح فاکتوریل در طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس برای تمام صفات فوق در سطح ۱٪ نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت و کروموزوم‌ها وجود دارد. برای گروه‌بندی محیط‌های کشت و کروموزوم‌ها از آزمون دانکن استفاده شد که به کمک این روش کروموزوم‌های هر محیط کشت گروه‌بندی شدند. تمام کاریوتایپ‌ها دارای ۳۰ جفت کروموزوم بودند. حداقل طول کروموزومی مربوط به غلظت ۱۰۰µl و زمان ۱ ساعت و حداکثر طول کروموزومی مربوط به غلظت۲۰۰µl و زمان ۲ ساعت بود. اثرات متقابل بین تیمارها معنی‌دار نبودند.

کلمات کلیدی: سیتوژنتیک، کلشی سین، صفات کروموزومی، بز.

[۱] عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

[۲] عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

* نویسنده مسئول msmalekpoor@yahoo.com

مقدمه

برای به دست آوردن یک گستر شکر و موزومیخوب باید در مورد تمام عوامل مربوط در آماده‌سازی کروموزوم دقت فراوان نمود. عوامل مهم عبارتند از: تهیه محیط کشت، افزودن مکمل‌های محیط کشت نظیر سرمجنینگاوی، آنتی‌بیوتیک و فیتوهم‌آگلوتیتین، دوره کشت درانکوباتور، افزودن کلشی‌سین برای قطع تقسیم میتوز در مرحله متافازودرن‌های تبرداشت سلول‌های سفید خونواستخراجکروموزوم‌ها (۱). در بین عوامل ذکرشده فوق افزودن کلشیسین بسیار حائز اهمیت است. کلشیسین با جلوگیری از تشکیل دوک در مرحله متافاز تقسیم میتوز از تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند (۱ و ۲). در اکثر منابع از کلشیسین به همین منظور استفاده شده است و گاهی همراه با تیمیدین برای تشخیص مراحل مختلف چرخه سلولی استفاده می‌شود (۶). کلشیسین در مرحله اینترفاز به پروتئین و شاید DNA متصل می‌شود (۷). به گزارش بسیاری از منابع کلشیسین به جز متافاز بر روی دیگر مراحل چرخه سلولی و سنتز ماکرومولکول‌ها بی‌تأثیر است (۶ و ۷). مقایسه تمام اثرات مثبت و منفی کلشیسین بر روی چرخه سلولی خارج از حوصله این تحقیق است چون تعداد زیادی سلول با غلظت و زمان‌های مختلف کلشیسین باید بررسی گردد. همچنین در سلول‌هایی که چرخه طولانی دارند تشخیص اثرات مختلف ترکیبات کلشیسین ممکن نیست. در این تحقیق غلظت‌های مختلف کلشیسین در سه دوره زمانی کشت سلول‌های سفید خون کامل گونه اهلی بز نژاد نجدی مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این تحقیق دستیابی به غلظت و زمان مناسب تأثیر کلشیسین در توقف تقسیم میتوز در مرحله متافاز است. لنفوسیت‌های نوع T در محیط کشت وادار به تقسیم شده و برای مشاهده کروموزوم‌ها با حداکثر کشیدگی و وضوح باندها تقسیم سلولی در مرحله متافاز مهار می‌شوند. با اعمال تیمارهای مختلف کلشیسین می‌توان غلظت و زمان مناسب تشکیل بهترین گسترش‌های کروموزومی را تعیین کرد. سه سؤال مهم این تحقیق به قرار زیر می‌باشند:

آیا کمترین غلظت کلشیسین بر تعداد کروموزوم‌هایی که به مرحله متافاز رسیده‌اند تأثیر دارد؟

آیا میزان غلظت کلشیسین با میزان تأثیر آن بر طول چرخه سلولی متغیر است؟

چهار تباطیبین کوتاه‌ترین زمان تأثیر کلشیسین و سرعت قطع تقسیم سلولی وجود دارد؟

کلشیسین یک ترکیب آلکالوئیدی قوی ضد تقسیم میتوزی است. این ماده شیمیایی می‌تواند از تشکیل دوک‌های تقسیم در محل سانترومر کروموزوم جلوگیری کند و فعالیت سانتروزوم را مختل می‌کند. وظیفه سانتروزوم ساخت فیبرهای دوک تقسیم است (۸). این ترکیب دارای ساختار شیمیایی سه حلقه‌ای با فرمول $C_{22}H_{25}O_6N$ می‌باشد. این ترکیب مانع از تشکیل دوک در هنگام تقسیم سلولی شده، کروموزوم‌ها را در مرحله متافاز متوقف می‌کند و مانع وقوع آنافاز می‌شود ۸). این مطالعه با هدف امکان ایجاد تعداد زیادی گسترش کروموزومی در کشت سلول‌های سفید خون بز نژاد نجدی با استفاده از غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف تیمار با کلشیسین و تعیین بهترین تیمار برای این منظور انجام شد. با توجه به اینکه مطالع اتکروموزوم‌ها در مرحله متافاز که بلندترین طول و بهترین شرایط را برای مطالعه دارند صورت می‌پذیرد، ضروری است بافت مورد مطالعه طوری آماده گردد که درصد بالایی از سلول‌های آن در مرحله متافازمیتوز باشند، در این مراحل، برای دست‌یابی به کروموزوم‌ها با حداکثر فشردگی در داخل سلول با استفاده از مواد شیمیایی، عمل رشته‌های دوک مختل شد تا

کروموزوم‌ها از ادامه بقیه مراحل میتوز بازمانده و در مرحله متافاز تجمع یابند. این مواد با مختل نمودن رشته‌های دوکاز حرکت کروموزوم‌ها به قطبینسلول جلوگیری می‌کند (۷و۸). کلشیسین که اولین بار در سال ۱۸۲۰ جداسازی و شناسایی شد، عمدتاً از منابع گیاهی به دست می‌آید زیرا تولید آن به روش سنتز شیمیایی اقتصادی نمی‌باشد. در پزشکی مدرن خواص شناخته شده کلشیسین، شامل اثرات متوقف کننده سرطان، ضد رماتیسم، ضد التهاب، مسهل، قی‌آور، درمان اختصاصی نقرس حاد و بیماری تب مدیترانه‌ای خانوادگی می‌باشد. همچنین در به نژادی گیاهان به منظور القاء پلی پلوئیدی کاربرد دارد (۶).

مواد و روش‌ها

این طرح با استفاده از جمعیت بزهای دامداران اطراف شوشتر و آزمایشگاه ژنتیک مجتمع آزمایشگاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر به انجام رسیده است. نمونه‌ها از بین جمعیت بزهای منطقه و از تعداد ۶۰ رأس جمع‌آوری گردیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتیپی از بافت کامل خون وریدی استفاده شد. نیم میلی لیتر خون به ونوجکت‌های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل $RPMI_{1650}$ اضافه شد که این نمونه کاملاً مخلوط شده و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در حالت مورب در این دما لنفوسیت‌های خون کشت داده شد. برای اینکه مواد غذایی پیوسته در دسترس سلول‌ها قرار گیرد، نمونه‌ها روزانه دو بار به آرامی به هم زده شد (۲، ۳ و ۴). ۳-۱ ساعت قبل از برداشت با استفاده از سمپلر غلظت‌های مختلف کلشیسین به محیط‌های کشت مورد مطالعه اضافه شدند و دوباره لوله‌های کشت به مدت ۳-۱ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند (۳، ۴ و ۵). مرحله بعدی، مرحله تثبیت سلول‌ها بود. بعد از اضافه کردن ۵ میلی لیتر فیکساتور، به مدت ۶ دقیقه در۷۵۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ مایع بالایی به غیر از ۱-۰/۵ میلی‌لیتر دور ریخته شده و به هم زده می‌شود. این کار تا مرحله شفاف شدن محلول چندین بار تکرار شد تا در نهایت رسوبی کاملاً سفید به دست آمد (۴ و ۵). بر روی لام‌های منجمد گسترش‌های کروموزومی تهیه شدند و پس از خشک شدن در هوای آزاد با محلول ۱۰٪ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعد، لام‌ها به وسیله میکروسکوپ بررسی و در هر لام حداقل ۵ گسترش متافازی مورد مطالعه قرار گرفتند (۷). لام‌هایی که دارای تصویر واضح بودند با چسباندن لامل دائمی شدند (۴ و ۵). عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین انجام گرفت و در نهایت عکس‌ها به کامپیوتر منتقل و مورد آنالیز قرار گرفتند. ابتدا به منظور بررسی و تشخیص تفاوت بین نمونه‌های مورد مطالعه از نظر ابعاد کروموزوم یونیز تفاوت بین کروموزوم‌های هر نمونه، داده‌های کاریوتی پیرا در قالب یک طرح فاکتوریل در طرح پایه کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. محیط-های کشت به عنوان عامل اصلی وکروموزوم‌ها به عنوان عامل فرعی قلمداد شدند پس از مشاهده اختلاف بین داده‌های لام‌ها وکروموزوم‌ها توسط جدول تجزیه واریانس با استفاده از روش دسته‌بندی میانگین‌ها دانکن، محیط‌های کشت و کروموزوم‌ها دسته بندی شدند (۶،۷ و۸).

نتایج و بحث

در این بررسی نمونه‌های خونی اخذ شده به محیط کشت منتقل گردید تا اثر سه غلظت مختلف کلشیسین در سه زمان متفاوت بر روی صفات کروموزوم‌ها بررسی شود. بنابراین داده‌ها در یک طرح فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی قرار

گرفتند. فاکتور غلظت با سه سطح ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرولیتر و فاکتور زمان با سه سطح ۳،۲،۱ ساعت به عنوان تیمار و در چهار تکرار بر روی محیط‌های کشت اعمال شدند. لذا محیط‌های کشت عامل اصلی و کروموزوم‌ها عامل فرعی در نظر گرفته شدند (جدول شماره ۱). پس از شمارش کروموزومی همه تیمارها ۲n=۶۰ تشخیص داده شد. صفات کروموزوم‌ها از قبیل: طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول کل کروموزوم اندازه گیری شدند. نتیجه تجزیه واریانس نشان داد که کروموزوم‌ها از نظر صفات مزبور با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند (جدول شماره ۲). لذا صفات مذکور به روش دانکن دسته‌بندی شدند (جدول شماره ۳). صفات بیشتر کروموزوم‌های مورد مطالعه با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند ولی تیمارهای شماره M_2، M_5 وM_8 از لحاظ صفات کروموزومی در دسته-های متفاوت با بقیه بودند. ابعاد کروموزوم‌ها و نسبت طول بازوهای کروموزوم‌های مورد مطالعه با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. در نتیجه غلظت‌های مختلف کلشیسین در زمان‌های مختلف بر صفات کروموزومی تأثیر داشته است. نکته مهمی که در این بررسی به دست آمد زمان دقیق افزودن کلشی‌سین و اثر آن در قطع تقسیم میتوز بود. افزودن کلشی‌سین در تیمار ۱ ساعت دوره کشت نتیجه مطلوبی را نداشت و به صورت شکل (۲) و شکل (۴) دیده می‌شدند. اعمال تیمار ۳ ساعت نیز جواب مناسب نداشت، چرا که کروموزوم‌ها کوتاه و قطور بودند و همانطور که در شکل شماره (۱) نیز دیده می‌شود کروموزوم‌ها در مرحله پروفاز می‌باشند و دارای طول و قطر مناسب برای نواربندی نیستند. لذا با تغییر ساعت افزودن کلشی‌سین در این بررسی بهترین زمان برای به دست آوردن کروموزوم‌های متافازی با طول و قطر مناسب، تیمار ۲ ساعت می‌باشد. آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر روی فعالیت دوک تقسیم و گسترش‌های کروموزومی نتایج مشابهی با کار گالدن و کارلسون داشت (۱۱). آنها تأثیر غلظت‌های ۰/۰۰۱٪، ۰/۰۱٪، ۰/۱٪ کلشیسین را بر روی سلول‌های نوروبلاست ملخ آزمایش کردند. کمترین غلظت نتوانست فعالیت دوک تقسیم را قطع کند ولی آن را به تأخیر انداخت. به عبارت دیگر، سلول‌ها به طور موقت مهار شدند اما متوقف نشدند و با تأخیر به مرحله متافاز رسیدند. البته این سلول‌ها پس از مدتی مرحله متافاز را رد کرده و وارد مرحله آنافاز شدند (۱۱). گسترش‌های سلولی با کمترین غلظت کلشی-سین کمترین تعداد متافازی را داشتند. دو غلظت دیگر کلشیسین تقسیم سلولی را در مرحله متافاز تقسیم میتوز قطع کردند و کروموزوم‌ها در متافاز ماندند. در این دو سطح غلظت کمترین تعداد گسترش‌های آنافازی مشاهده شدند (۷، ۸، ۹و۱۰). البته تفاوت بین دو غلظت بالا از نظر کیفیت گسترش‌های کروموزومی با حداکثر طول و کشیدگی در نتایج مشهود است. در این بررسی نیز کمترین غلظت یعنی ۱۰۰ میکرولیتر نتوانست تقسیم سلولی را در مرحله متافاز مهار کند و در دو غلظت دیگر کلشیسین تقسیم سلولی را در مرحله متافاز تقسیم میتوز قطع کردند و کروموزوم‌ها در متافاز ماندند. تفاوت بین غلظت‌های ۱۵۰و۲۰۰ میکرولیتر در تجزیه واریانس داده‌ها نشان داده شده است. کلشی‌سین با جلوگیری از تشکیل دوک در مرحله متافاز تقسیم میتوز را در این مرحله قطع می‌نماید ولی زمان‌بندی دقیق در این مرحله بسیار حائز اهمیت است. در شکل (۱) همانطور که مشاهده می‌شود، کروموزوم‌ها دارای طول بسیار کوتاه و قطر بیش از اندازه مطلوب مشاهده می‌شوند و این به دلیل تراکم بیش از اندازه کروموزوم در مرحله پروفاز است که هنوز فرصت کافی نیافته است تا به اندازه کافی طویل گردد. این نوع کروموزوم برای تهیه کاری و تایپ مناسب

نمی‌باشد ودلیل آن اینست که کلشی‌سین زودتر از موعد مقرر به محیط کشت اضافه شده است. در شکل شماره (۲) نیز همانطور که ملاحظه می‌شود، کروموزوم‌ها دوباره دارای طول مناسبی برای تهیه کاری و تایپ نبوده و به شکل مگسی مشاهده می‌شوند. اینکروموزوم‌ها در مرحله آنافاز می‌باشند یعنی مرحله متافاز را که کروموزوم‌ها در حداکثر طول و مناسب‌ترین قطر می‌باشند طی نموده‌اند و دلیل آن اینست که کلشی‌سین دیرتر از موعد مقرر به محیط کشت اضافه شده است. در این مرحله تقسیم به طور کامل انجام گرفته و کروموزوم‌ها همانندسازی نموده و طول و قطر آنها برای انجام عمل نواربندی و تهیه کاری و تایپ مطلوب نمی‌باشند. در شکل شماره (۳) همانطور که مشاهده می‌شود، کروموزوم‌ها در حداکثر طول خود می‌باشند، قطر کروموزوم‌ها بسیار خوب است، کناره‌های کروموزومی صاف و بدون بریدگی است و این امر نشان دهنده تأثیر مناسب کلشی‌سین برای به دست آمدن طول مناسب و تأثیر مناسب آنزیم برای انجام عمل نواربندی است. در این شکل کروموزوم‌ها بخوبی رنگ‌پذیر بوده و نوارها را به خوبی نشان می‌دهند.

جدول شماره ۱ صفات کروموزومی، N تعدادکروموزوم، S طول بازوی کوتاه، L بازوی بلند، L/S نسبت بازوی بلند برکوتاه، S/L نسبت بازوی کوتاه بر بلند و C.I شاخص سانترومتر.

N	S(mm)	L(mm)	TL(mm)	L/S	S/L	C.I. (%)
۱	۱۱/۸۱	۱۴/۱۹	۲۶	۱,۲	۰/۸۳	۴۵/۴۵
۲	۱۱/۱۱	۱۳/۸۹	۲۵	۱/۲۵	۰/۷۹	۴۴/۴۴
۳	۱۰/۸۳	۱۴/۱۷	۲۵	۱/۳۰	۰/۷۶	۴۳/۴۳
۴	۱۰/۲۸	۱۳/۷۲	۲۴	۱/۳۳	۰/۷۴	۴۲/۸۵
۵	۹/۲۶	۱۲/۷۴	۲۲	۱/۳۷	۰/۷۲	۴۲/۱۰
۶	۹/۱۶	۱۲/۸۴	۲۲	۱/۴۰	۰/۷۱	۴۱/۶۶
۷	۸/۷۹	۱۲/۷۱	۲۱/۵	۱/۴۴	۰/۶۹	۴۰/۹۰
۸	۸/۵۱	۱۲/۴۹	۲۱	۱/۴۶	۰/۶۸	۴۰/۵۴
۹	۸/۲	۱۲/۳	۲۰/۵	۱/۵	۰/۶۶	۴۰
۱۰	۷/۵۸	۱۱/۹۲	۱۹/۵	۱/۵۷	۰/۶۳	۳۸/۸۸
۱۱	۷/۱۱۱	۱۱/۳۹	۱۸/۵	۱/۶	۰/۶۲	۳۸/۴۶
۱۲	۶/۷۵	۱۱/۲۵	۱۸	۱/۶۶	۰/۶	۳۷/۵
۱۳	۶/۱۸	۱۰/۸۲	۱۷	۱/۷۵	۰/۵۷	۳۶/۳۶
۱۴	۵/۷۱	۱۰/۲۹	۱۶	۱/۸	۰/۵۵	۳۵/۷۱
۱۵	۵/۶	۱۰/۹	۱۶/۵	۱/۹۴	۰/۵۱	۳۵
۱۶	۵/۲۱	۹/۷۹	۱۵	۱/۸۷	۰/۵۳	۳۴/۷۸
۱۷	۴/۶۶	۹/۳۴	۱۴	۲	۰/۴۹	۳۳/۳۳
۱۸	۴/۱۳	۸/۸۷	۱۳	۲/۱۴	۰/۴۶	۱۳/۸۱

دنباله جدول ۱

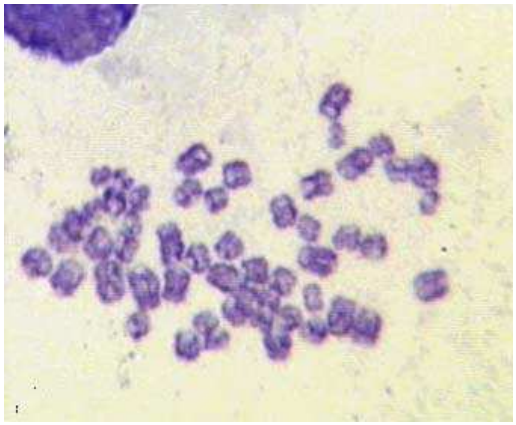
N	S (mm)	L (mm)	TL (mm)	L/S	S/L	C. I. (%)
۱۹	۳/۸۴	۸/۶۶	۱۲/۵	۲/۲۵	۰/۴۴	۳۰/۷۶
۲۰	۳/۲۵	۸/۴۸	۱۲	۲/۶	۰/۳۸	۲۹/۴۱
۲۱	۳/۱۴	۷/۴۸	۱۱	۲/۳۸	۰/۴۱	۲۸/۵۷
۲۲	۳/۱۳	۸/۳۷	۱۱/۵	۲/۶۷	۰/۳۷	۲۷/۲۷
۲۳	۲/۷۵	۸/۲۵	۱۱	۳	۰/۳۳	۲۵
۲۴	۲/۱۱	۶/۸۹	۹	۳/۲۶	۰/۳۰	۲۱/۵۲
۲۵	۱/۷۱	۶/۲۹	۸	۳/۶۷	۰/۲۷	۲۱/۴۲
۲۶	۱/۳۴	۵/۶۶	۷	۴/۲۲	۰/۲۳	۱۹/۲۳
۲۷	۱/۲۷	۵/۷۳	۷	۴/۵۱	۰/۲۲	۱۸/۱۸
۲۸	۱	۵	۶	۵	۰/۲۰	۱۶/۶۶
۲۹	۱	۴	۵	۴	۰/۲۵	۱۴/۵۸
X	۱۲/۶	۱۴/۴	۲۷	۱/۱۴	۰/۸۷	۴۶/۶۶
Y	۰/۶۷	۴/۳۳	۵	۶/۴۶	۰/۱۵	۱۳/۵۱

جدول شماره ۲- مجموع مربعات حاصل از تجزیه واریانس کلیه صفات کاری وتیپی مورد مطالعه،
*** معنی‌دار درسطح ۵٪، ** معنی‌دار در سطح ۱٪ و ns غیرمعنی دار**

منابع تغییر	درجه آزادی	طول بازوی کوتاه (s)	طول بازوی بلند (L)	طول کل (TL)	L/S	S/L
محیط کشت (A)	۹	۶/۰۱**	۱۲/۵۰**	۸/۵۱**	۲/۰۷	۰/۴۸ns
کروموزوم‌ها (B)	۲۹	۴/۵۴**	۸/۴۴**	۱۲/۹۸**	۱/۸۵**	۰/۵۴**
اثر متقابل (AB)	۲۲۳	۰/۴۱ns	۰/۵۴ ns	۰/۹۵ ns	/۳۱ns	۰/۷۵ns
خطا	۶۶۹	۰/۲۳	۰/۱۹	۰/۴۱	۰/۶۶	۰/۴۶
کل	۱۰۷۹					

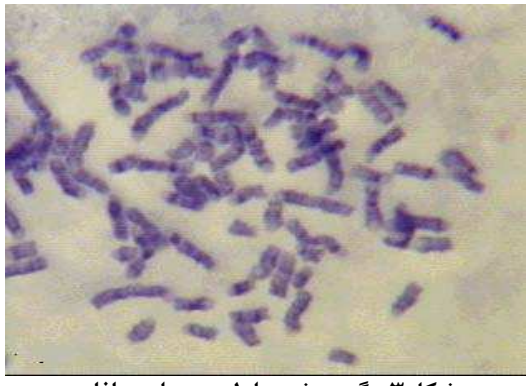
جدول شماره ۳: دسته‌بندی میانگین‌های محیط‌های کشت از نظر ویژگی‌های مختلف کروموزومی به روش دانکن. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در یک دسته قرار می‌گیرند.

محیط کشت	بازوی کوتاه(S)	بازوی بلند(L)	طول کل(TL)	L/S	S/L
M_1	a۲/۴۰	a۳/۱۲	a۵/۱۶	b۱/۶۷	ab۰/۶۶
M_2	abc۱/۸۷	b۲/۹۶	cd۴/۸۱	ab۱/۸۳	ab۰/۶۲
M_3	a۲/۲۰	b۲/۹۶	ab۴/۹۸	ab۱/۵۶	a۰/۶۹
M_4	bcd۱/۷۴	cd۲/۷۶	def۴/۵۰	ab۱/۹۴	ab۰/۶۴
M_5	ab۱/۹۲	a۳/۲۷	a۵/۱۷	a۲/۰۶	b۰/۵۹
M_6	bcd۱/۷۹	cd۲/۸۳	cd۴/۶۲	ab۱/۸۲	ab۰/۶۳
M_7	d۱/۶۶	d۲/۶۵	f۴/۳۱	ab۱/۸۹	ab۰/۶۳
M_8	bcd۱/۸۱	cd۲/۷۸	cde۴/۵۸	b۱/۷۳	ab۰/۶۵
M_9	ab۱/۹۱	cd۲/۸۴	cd۴/۷۴	b۱/۷۱	ab۰/۶۷
M_{10}	cd۱/۷۱	d۲/۶۵	ef۴/۳۷	ab۱/۷۴	ab۰/۶۵

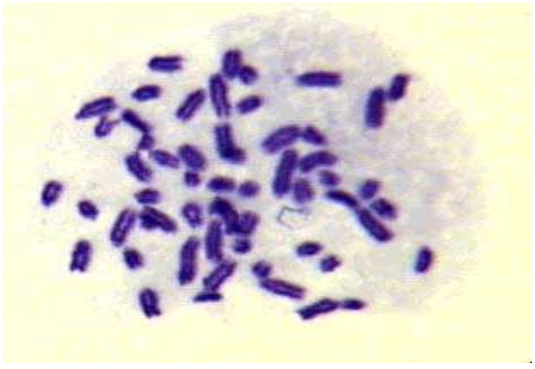


شکل۱- گسترش سلولی در مرحله پروفاز

شکل ۲- گسترش سلولی در مرحله آنافاز (بالمگسی)



شکل۳- گسترش سلولی مرحله متافاز



شکل۴ -گسترش سلولی مرحله تلوفاز

تقدیر و تشکر

این طرح پژوهشی با مساعدت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر جناب آقای دکتر پوربختیار و رئیس محترم دانشکده کشاورزی جناب آقای دکتر لرزاده که امکانات اجرای این پروژه را در اختیار ما قرار داده‌اند، سپاس‌گزاری نموده و از کلیه کارکنان دانشکده کشاورزی واحد شوشتر که در انجام این تحقیق از همراهی‌شان بهره بسیار برده‌ایم کمال تشکر را داریم.

منابع

۱-احمدیان‌تهرانی، پریچهر. ۱۳۷۶. سیتوژنتیک، کروموزوم، توارثوتکامل (ترجمه). چاپاول. تهران: دانشگاه تهران

۲-ارزانی، احمد. ۱۳۷۵. راهنمای آزمایشگاه ژنتیک وسیتوژنتیک. چاپ اول. اصفهان: نشر ارکان.

۳-ملک‌پور، محمدصادق. ۱۳۸۱. مطالعه سیتوژنتیکی بزهای رائینی، بومی و آمیخته‌های آنها با الگوی نواربندی G . پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۴-هرکی‌نژاد، محمدطاهر. ۱۳۷۸. مطالعه سیتوژنتیکی گوسفندان قزل، مغانی و آرخارمرینوس، بررسی کاریوتایپ با الگوی نواربندی G. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۵-پیراهری، ام‌البنین.۱۳۸۱. مطالعه سیتوژنتیکی گاو سرابی با الگوی نواربندی G. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان.

6.Mensha J.K., Obadoni B.O., Akomeah P.A., Ikhajiagbe B., and Ajibolu J. 2007. The effects of sodium azida and colchicines treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum*L.). African Journal of Biotechnology, 6: 534-538

7.Omidbaigi R., Mirzaee M., Hassani M.E., and SedghiMoghadam M. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimumbasilicum*L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4 (2): 87-98.

8.Omidbaigi R., Yavari S., Hassani M.E., and Yavari S. 2010. Induction of autotetraploidy in Dragonhead (*Dracocephalummoldavica*L.) by colchicines treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23-35

9.Bharathi P. and Philomina D. 2010. Effect of nutritional factors and precursors on formation of colchicine in *Gloriosasuperba*in vitro.Research in Biotechnology, 1: 29-37.

10.ShahriariAhmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M. and Azizi, M., 2008. Tetrapoloid induction of Hyoscyamusmuticus L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653-2659