الكشف المبكر عن التضاعف الكروموسومي الناتج عن تاثير الكولشسين في نبات الكاسيا *Cassia angustifolia*.

جَنان قاسم حسين*

* أستاذ مساعد-قسم البستنة و هندسة الحدائق-كلية الزراعة-جامعة القاسم الخضراء-بابل dr.janan77@yahoo.com

المستخلص

نفذت التجربة في مختبرات الزراعة النسيجية والتقانات الاحيائية-كلية الزراعة - جامعة الرازي - كرمنشاة- ايران. خلال الموسم الصيفي لعام 2014، للكشف المبكر عن حدوث التضاعف الكروموسومي الناتج عن نقع البذور المستنبتة لنبات الكاسيا في ثلاثة تراكيز من الكولشسين هي 0.01 ، 0.025 ، 0.05 % ولثلاث فترات زمنية هي 6 ، 12 ، 24 ساعة. تم الكشف عن وجود التضاعف الكروموسومي بالاعتماد على مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة Randomly (RAPD) DNA Amplified Polymorphic DNA، واكدت نتائج التضاعف الكروموسومي للنباتات التي اعطت اعلى بعد وراثي بحساب عدد الكروموسومات لها في خلايا اطراف الجذور. بينت نتائج تقانة (RAPD) وجود تغايرات وراثية بين معاملات الكولشسين، حيث اعطت 9 بادئات 78 حزمة (35 حزمة متشابهة و 43 حزمة متباينة) وقدرت نسبة التباين ب55.43% ، اعطت معاملة الكولشسين T6 (0.025% 24X ساعة) اكبر بعد وراثي 0.39% وتلتها نباتات المعاملات T3 (0.01 X 24ساعة) وT7 (0.05 X 6 ساعة) وبنسبة بعد وراثي 0.35% و 0.33% على الترتيب. بينت النتائج المختبرية لحساب عدد الكروموسومات حدوث تضاعف كروموسومي(4N=56) في بعض نباتات المعاملات T7, T3, T6 ، اذ كانت اعلى نسبة تضاعف كروموسومي64.71% في نباتات المعاملة T7 تلتها نباتات المعاملات T6 (57.14%) وT3 (26.09%).

الكلمات المفتاحية: كاسيا ، كولشيسين ، التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA

المقدمة

ينتمي نبات السنا (كاسيا) *Cassia angustifolia* الى العائلة البقولية Leguminosae وهو نبات عشبي معمر لا يزيد ارتفاعه في الغالب على مترين ويحمل النبات أوراقا مركبة ريشة الشكل تتكون من زوجين إلى سبعة أزواج من الوريقات، وأزهار في قمم الأغصان على هيئة مجاميع ما بين زهرتين إلى سبع زهرات في شكل عناقيد ذات لون اصفر إلى برتقالي. الثمار قرنية تشبه ثمار الفاصوليا أو الفول جلدية الملمس ذات لون بني مصفر تحتوي بداخلها بذورا ذات لون رمادي وقوامها صلب. الموطن الأصلي لنبات السنا هي الجزيرة العربية ومصر والسودان والهند واليابان وإيران، ويعتبر السنا من نباتات الزينة المرغوبة في الحدائق والمتنزهات لجمال ازهاره ووفرتها كونه يزهر في الربيع والخريف ويستمر ازهاره لفترة طويلة، اما من الناحية الطبية تحتوي أوراق وثمار السنا على جلوكوزيدات انثراكينونية وتعرف بمجموعة سنوزايد (Sennoes) ويوجد منها أربعة أ، ب، ج، د. كما تحتوي على جلوكوزيدات نفثالينية ومواد هلامية ومواد فلافونيدية وزيت طيار لذلك يدخل في مجالات طبية عديدة، وتعتبر مصر والسودان والهند واليابان الدول المصدرة للسنا على مستوى تجاري كبير(Mohanty واخرون، 2010). لقد اصبح التضاعف الكروموسومي من اهتمامات مربي النبات لما له من اهمية في تحسين الصفات البستنية لبعض النباتات كالازهار الكبيرة والاوراق السميكة ذات الخضرة الداكنة وزيادة نسبة العرض للطول في المسطح الورقي او اطالة فترة التزهير او زيادة تراكيز المواد الفعالة في النبات (Gao واخرون، 1996).

تاريخ تسلم البحث 31 / 12 / 2014 .
تاريخ قبول النشر 10 / 5 / 2015 .
http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

يمكن للتضاعف الكروموسومي ان يحدث بشكل طبيعي وخاصه في النباتات الاحادية المجموعة الكروموسومية حيث تعتبر الاخيرة حالة غير طبيعية، او بشكل اصطناعي بأستخدام العديد من المواد الكيميائية مثل الكولشيسين Colchicine (وهي مادة كيمياوية تساعد على منع تكون خيوط المغزل اثناء الانقسام الاعتيادي للخلايا الجسمية مما يمنع سحب الكروموسومات الى اقطاب الخلية فتنتج عن ذلك خلية متضاعفة العدد الكروموسومي) تستخدم هذه المادة بتراكيز مختلفة وازمنة مختلفة وطرق مختلفة حسب الجزء النباتي المراد مضاعفتة (Petersen واخرون ، 2002)، وقد اجرى Bir و Kumari (1982) دراسة وراثية لحساب الاعداد الكروموسومية لانواع مختلفة من الكاسيا وقد وجد ان Cassia angustifolia تحتوي على 2n=28 كروموسوم.

تحتاج برامج التحسين النباتي دائما وبشكل متزايد الى ادوات اكثر فعالية في عملية التربية، وقد بين De Laat واخرون (1987) بأن الطرق التقليدية المستخدمة مباشرة في تقدير العدد الكروموسومي وتحديد مستوى التضاعف في النباتات طويلة ومعقدة جدا وتحتاج الى مختبرات جيدة التجهيز وكادر مدرب وذو خبرة، وتجرى على جميع النباتات المعاملة دون تحديد مسبق لاي النباتات التي حدث فيها التضاعف، لذلك فالحاجة ماسة لايجاد طرق غير مباشرة وفعالة في تحديد مستوى التضاعف وبشكل مبكر مثل اجراء البصمة الوراثية للنباتات في مرحلة البادرة وعند ظهور اول ورقة حقيقية بالاعتماد على تقانات عديدة لفحص وتقدير ال DNA ومن هذه التقانات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) DNA تعتمد هذه التقانة على إكثار قطع DNA النباتية في تسلسلها النيوكليوتيدي عشوائيا حيث تضخم قطع DNA الحاوية على تتاليات نيوكليوتيدية، والتي يمكنها أن تشكل تتامية مع البادئات العشوائية في نهايتها. يمكن رؤيتها على شكل حزم bands مختلفة الوزن الجزيئي في هلامة من الاكاروزAgarose gel (حسين،2007) . تتميز تقانة RAPD بانها لاتحتاج لمعرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها، ومفيدة لدراسة العشائر ذات الاعداد الكبيرة من الافراد، كما لا يتطلب انجازها وقتا طويلا وانها غير معقدة ولا تحتاج الى وجود مواد مشعة، وتوفر عدد كبير جدا من البادئات التي يمكن تبادلها بين مراكز البحث، إضافة الى سهولة معرفة التسلسل النيوكليوتيدي للبادئ(الخولاني،2008).

وجدَ Liu واخرون(2009) ان معاملة نباتات الداتورة المنتجة في الزراعة النسيجية بالكولشسين بتركيز 750ملغم/لتر ادى الى تضاعف العدد الكروموسومي والتي تم الكشف عنها بوقت مبكر بالاعتماد على تقانة RAPD وبأستعمال 14 بادىء، وفي دراسة للتنوع الوراثي على 28 نوعا من الكاسيا استعملت تقانات RAPD، SSR ،ISSR لتحديد درجة القرابة الوراثية بين هذه الانواع وبالرغم من ان تقانة SSR كانت الاكثر دقة في كشف القرابة الوراثية ألا ان البادئات المستعملة بتقانة RAPD اعطت اختلافات وعدد حزم اعلى بكثير من التقانات الاخرى (Mohanty واخرون، 2010).

درس Stephan واخرون (2011) التنوع الوراثي لخمسة تراكيب وراثية لنبات الكاسيا حصلو عليها من من خمسة مناطق مختلفة في الهند، بالاعتماد على البصمة الوراثية بتقانة RAPD وبستة بادئات، وقد توزعت الاختلافات الوراثية بين التراكيب الخمسة ضمن المدى (0.2059-0.9302) وبثلاث مجموعات حسب الشجرة الوراثية للتراكيب الداخلة في الدراسة. وجد Tiwariو Mishra (2012) حدوث تضاعف كروموسومي لنبات الفلوكس عند نقع بذوره بتركيز 0.05% ولمدة 36 ساعة، وقد شخص التضاعف في النباتات المعاملة بعد الوصول الى الجيل الثالث من خلال متابعة عدد وطول الثغور وباقي الصفات المورفولوجية للنباتات. وفي دراسة على نباتات القديفة المزروعة نسيجيا وجد حدوث تضاعف كروموسومي عند اضافة الكوشسين بتركيز 0.01% و 0.05% الى وسط الزراعة (Sajjad واخرون، 2013).

ونظرا لأهمية نبات الكاسيا من الناحية الجمالية والطبية هدف البحث الى :

- تحديد افضل تركيز للكولشسين والفترة الزمنية اللازمة لنقع بذور الكاسيا في أحداث التضاعف الكروموسومي وتحسين الصفات الخضرية والزهرية وزيادة المواد الفعاله بالنبات .
- الكشف المبكر (مرحلة البادرة) للنباتات المتضاعفة بالاعتماد على البصمة الوراثية لتقانة RAPD.

المواد وطرائق البحث

نفذت التجربة في مختبرات الزراعة النسيجية والتقانات الاحيائية-كلية الزراعة-جامعة الرازي- كرمنشاة - ايران، استعملت بذور نبات الكاسيا الناتجه عن التلقيح الذاتي لازهار نبات واحد ولموسمين، نقعت البذور المستنبتة بثلاث تراكيز من الكولشسين 0.01 ، 0.025 ، 0.05% ولثلاث فترات زمنية 6 ، 12 ، 24 ساعة فضلا عن معاملة المقارنة (الجدول1)، احتوت كل معاملة على 50 بذرة وغسلت بماء جاري لمدة ساعة للتخلص من تأثير الكولشسين الزائد. زرعت البذور المسنبتة والمعاملة في اطباق فلينية حاوية على وسط الزراعة البيت موس.

جدول1 . رموز معاملات الكولشسين وفترات نقع البذور المستنبتة لنبات الكاسيا.

فترة المعاملة (ساعة)	تركيز الكولشسين (%)	رمز المعاملة
0	0	Con.
6	0.010	T1
12	0.010	T2
24	0.010	T3
6	0.025	T4
12	0.025	T5
24	0.025	T6
6	0.050	T7
12	0.050	T8
24	0.050	T9

بعد ظهور الاوراق الفلقية تم حساب نسبة الانبات لمعرفة فيما أذا كانت هنالك بذور ميتة بسبب تأثير الكولشسين، وعند ظهور الاوراق الحقيقية اخذت من كل معاملة 2غرام من الاوراق النظيفة والخالية من المسببات المرضية لغرض عزل وتحليل DNA بالاعتماد على تقانة RAPD .

عزلت الاحماض النووية بأستعمال كت Kit منتج من شركة Geneaid وقدرت كمية الحامض النووي DNA في العينات باستخدام جهاز Spectrophotometer Beckman Du-61 بوجود الاشعة فوق البنفسجية UV وطول موجي 260 نانوميتر، وكانت كل قراءة للكثافة الضوئية على الجهاز مقدارها 1 تعادل 50 ميكروغرام من DNA/1مل من السائل. كما قدرت نقاوة DNA من خلال قسمة رقم قراءة الكثافة الضوئية عند طول موجي 260 نانومتر على رقم قراءة الكثافة الضوئية على طول 280 نانو متر ، ويعد الحمض النووي نقيا اذا تراوح حاصل قسمة القرائتين بين المدى 1.8- 2.

جُرب 15 بادىء مصنعة لدى شركة OPERON Technologies,Inc. واختير منها 9 بادئات تميزت بقدرتها على اعطاء اختلافات واضحة في DNA (الجدول 2). أجريت كافة تفاعلات التضخيم العشوائي وفقاً لطريقة Haley واخرين (1994)، ومررت نواتج التفاعل عبر هلام من الآكاروز تركيزه 1.2%في جهاز الترحيل الكهربائي الافقي.

رتبت نتائج تقانة RAPD في جدول خاص بالاعتماد على برنامج SIMQUL لغرض ايجاد نسبة التشابه بين نباتات المقارنة والمعاملات بالاعتماد على معادلة قيم التشابه Similarity المقدرة (Nei و Li، 1979) الذي يعتمد على المعادلة:

$$Similarity = 2nxy / nx + ny$$

حيث ان :

nxy : تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y والتي تمثل صنفين من الاصناف

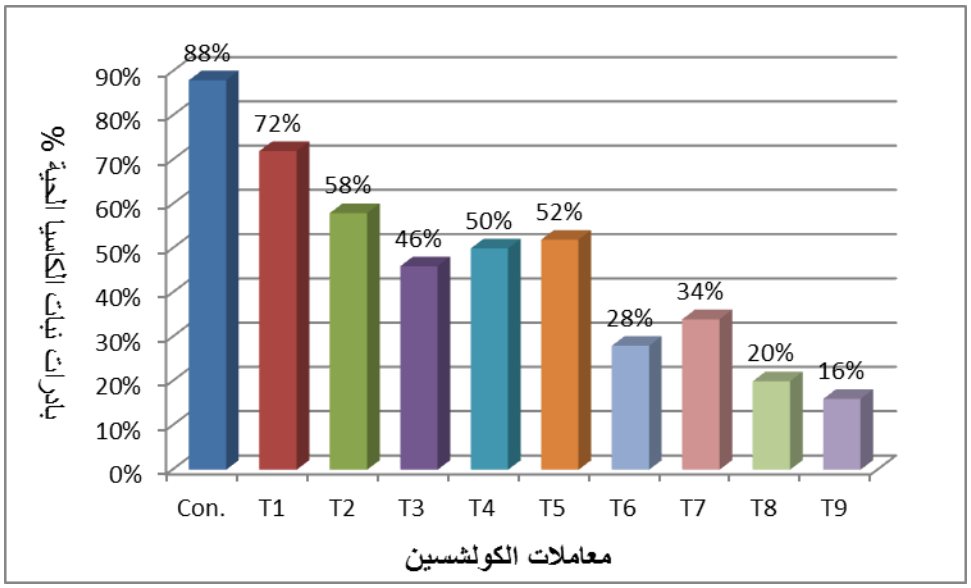
nx : عدد الحزم الكلية في النموذج x

ny : عدد الحزم الكلية في النموذج y .

بعد التعرف على نسبة التشابه الوراثي بين المعاملات ونباتات المقارنة عزلت النباتات المعاملة التي اعطت اقل تشابه وراثي مع المقارنة (اختلفت وراثيا عنها) وحسب لها عدد الكروموسومات بالاعتماد على طريقة Sharma و Sharma (1980) في خلايا النهايات الجذرية بعد استأصالها من البادرات.

النتائج والمناقشة

يتضح من الشكل1 وجود فروقات واضحة في نسبة البذور المستنبتة الحية بعد معاملتها بتراكيز الكولشسين المختلفة ، حيث كانت اعلى نسبة للبادرات الحية 88% عند نقع البذور المستنبتة بالماء فقط (المقارنة)، واقل نسبة للبادرات الحية كانت 16% عند نقع البذور المستنبتة بتركيز 0.05% كولشسين ولفترة 24 ساعة، واختلفت نسبة البادرات الحية لباقي المعاملات بين هاتين النسبتين. كما نلاحظ من نفس الشكل ان نسبة البادرات الحية تقل كلما زاد تركيز الكولشسين وفترة النقع ويعود هذا الى التأثير السمي للكولشسين على البذور المستنبتة لنباتات الكاسيا ، اتفقت هذه النتائج مع Tiwari و Mishra (2012) عند معاملة بذور نبات الفلوكس بتراكيز مختلفة من الكولشسين.



الشكل1. النسبة المئوية لبادرات الكاسيا الحية بعد معاملتها بتراكيز الكولشسين ولفترت زمنية مختلفة.

تم تطبيق مؤشرات ألـ RAPD باختبار 15 بادئ ووجد بان بعض البادئات لم تظهر نواتج تضاعف مع دنا مجين الكاسيا والتي تدل على عدم وجود المواقع المكملة لتلك البادئات في مجين الكاسيا ، وأظهرت المجموعة الأخرى من البادئات نواتج تضاعف مشتركة بين النباتات المدروسة تدل على ارتباطها بالمناطق المحافظة من المجين (Conserved Sequence) أما المجموعة الأخيرة من البادئات وهي الأهم في هذه الدراسة (9 بادئات) وهي التي أظهرت نواتج تضاعف متباينة بين العينات المدروسة، حيث اعطت 78حزمة في النباتات المدروسة كافة من بينها 35حزمة متشابهة و43 حزمة متباينة وقدرت نسبة التباينات ب55.43 %، وبلغ متوسط عدد الحزم مع البادىء الواحد 8.66 حزمة ومتوسط عدد الحزم المتباينة مع كل بادىء 4.77 حزمة. اعطى البادىء OPB-18 اعلى عدد من الحزم (13حزمة) ، في حين اعطى البادىء OPX-18 اقل عدد من الحزم (5حزمة). كما اختلفت البادئات المستخدمة في كشف التباينات الوراثية بين نباتات المعاملات المدروسة فقد كان البادىء OPX-18 افضل البادئات التي اعطت عدد كبير من الحزم (5حزمة، منها 4حزمة متباينة بين المعاملات) بنسبة تباين 80%، في حين اعطى البادىء OPB-12 اقل مستوى من التباين (8حزمة منها 2حزمة متباينة بين المعاملات) وبنسبة تباين 25 %(الجدول2).

جدول2. عدد الحزم الكلي وعدد الحزم المتباينة والنسبة المئوية للتباينات الناتجة عن البادئات المستخدمة في تقنية الـ RAPD لمعاملات نباتات الكاسيا بتراكيز الكولشسين.

البادئات	التسلسل النيوكليوتيدي 5→ 3	عدد الحزم المتضاعفة	عدد الحزم المتباينة	الحزم المتباينة %
OPB-05	TGCGCCCTTC	6	3	50
OPX-18	GACTAGGTGG	5	4	80
OPX-04	CCGCTACCGA	8	3	37.5
OPX-12	TCGCCAGCCA	12	7	58.33
OPX-07	GAGCGAGGCT	9	6	66.66
OPB-12	CCTTGACGCA	8	2	25
OPB-18	CCACAGCAGT	13	9	69.23
OPB-17	AGGGAACGAG	6	4	66.66
OPA-10	GTGATCGCAG	11	5	45.45
المجموع	ـــــ	78	43	498.83
المتوسط	ـــــ	8.66	4.77	55.43

اعتمدت نتائج البادئات لتكمله تحليل نتائج تفاعلات ألـ RAPD وذلك بإيجاد العلاقة الوراثية بينها او البعد الوراثي (Genetic distance) والتي تستند على وجود الحزم المشتركة بين كل نباتين من النباتات المدروسة (Pair Wise Comparison) ، ويذكر بان من العوامل التي تؤثر على البعد الوراثي الذي يتم الحصول عليه من تطبيق مؤشرات ألـ RAPD هو عدد الحزم الناتجة والذي يعتمد على عدد ونوع البادئات المستخدمة فـــــــي التحلـــــيل ،اذ وجد بان العامل الأهم في تقدير البعد الوراثي هو نسبة عدد الحزم المتباينة إلى عدد الحزم الكلية (Bai واخرون ،1997) اذ كلما زادت تلك النسبة كلما كانت النتائج اكثر دقة وثباتا وفي هذه الدراسة تم الحصول على 78 حزمة باستخدام 9 بادئات. بعدها ادخلت العينات الناتجة من استخدام تلك البادئات في البرنامج المعد خصيصا لهذا الغرض على الحاسب الالي ، تم ايجاد البعد الوراثي والمتمثلة في الجدول3 والذي يظهر بان نسبة البعد الوراثي بين المعاملات تراوحت بين 0.06%–0.39% والتي تدل على وجود نسبة التشابه الوراثي بينها والتي تراوحت بين 0.61%-0.94% .

تبين النتائج ان البعد الوراثي بين نباتات المعاملات ونباتات المقارنة كان اعلاها 0.39% بين نباتات المقارنة ونباتات المعاملة T6 ، تلتها نباتات المعاملة T3 (0.35%) و T7 (0.33%) ، اما اقل بعد وراثي كان بين نباتات المقارنة ونباتات المعاملة T2 وبلغ 0.06% أي كانت نسبة التشابه بينها عالية جدا 94% ، وتوزعت باقي المعاملات بين هذه النسب(الجدول 3).

جدول3. النسبة المئوية للبعد الوراثي بين معاملات الكولشيسين لنبات الكاسيا الناتجة من استخدام تسعة بادئات في تقانة الـRAPD.

المعاملات	Con.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Con.	-									
T1	0.12	-								
T2	0.06	0.10	-							
T3*	0.35	0.22	0.18	-						
T4	0.11	0.08	0.11	0.19	-					
T5	0.08	0.09	0.08	0.17	0.13	-				
T6*	0.39	0.21	0.39	0.13	0.32	0.21	-			
T7*	0.33	0.19	0.23	0.09	0.21	0.24	0.11	-		
T8*	0.28	0.33	0.38	0.11	0.22	0.20	0.15	0.12	-	
T9	0.17	0.19	0.21	0.17	0.12	0.08	0.22	0.21	0.18	-

يشير البعد الوراثي العالي المقاس بتقانة الRAPD بين نباتات المعاملات ونباتات المقارنة الى احتمالية حدوث التضاعف الكروموسومي وتقل هذه الاحتمالية كلما قل البعد الوراثي بين النباتات. لذلك تم انتخاب نباتات المعاملات T6 ، T3 ، T7 والتي اعطت اعلى بعد وراثي لدراسة وحساب عدد الكروموسومات فيها والتأكد من حدوث التضاعف.

بينت النتائج المختبرية لحساب عدد كروموسومات انوية خلايا القمم النامية لجذور النباتات المنتخبة حدوث تضاعف كروموسومي 2n=56 في بعض نباتات المعاملاتT6 ، T3 ، T7 اذ كانت اعلى نسبة للتضاعف 64.71% في نباتات المعاملة T7 تلتها نباتات المعاملة T6 وبنسبة 57.14% ثم نباتات المعاملة T3 بنسبة 26.09% (الجدول4).

جدول4. النسبة المئوية للتضاعق الكروموسومي في نباتات المعاملات التي اعطت اعلى بعد وراثي بين نباتات الكاسيا.

اسم المعاملة	تركيز الكولشسين (%)	فترة النقع (ساعة)	البعد الوراثي عن نباتات المقارنة (%)	عدد البادرات الحية 2n	عدد البادرات المتضاعفة 4n	النباتات المتضاعفة (%)
T3	0.01	24	0.35	23	6	26.09
T6	0.025	24	0.39	14	8	57.14
T7	0.05	6	0.33	17	11	64.71

يتضح من النتائج السابقة حدوث تضاعف كروموسومي 4n في نباتات الكاسيا بعد معاملتها بالكولشسين وقد اثبتت تقانة الـRAPD دقتها وسرعتها في الكشف المبكر عن حدوث التضاعف الوراثي دون الحاجة الى الزراعة لعدة اجيال او اجراء الفحص المختبري لعدد الكروموسومات لجميع النباتات المعاملة للتأكد من حصول التضاعف، وبذلك اكدت نتائج البحث اختصار الوقت والجهد مع الدقة العالية. اتفقت هذه النتائج مع Sajjad واخرون(2013) ؛ Liu واخرون(2009) ؛ Mohanty واخرون (2010) ؛ Tiwari و Mishra (2012).

المصادر

الخولاني ، محمد العزي.2008. دراسة التباينات الوراثية لاصناف الشعير في الجمهورية اليمنية بأستخدام المؤشرات الجزيئية للـDNA . اطروحة دكتوراه . قسم المحاصيل الحقلية . كلية الزراعة . جامعة تشرين. الجمهورية العربية السورية. ع ص 132.

حسين، جَنان قاسم .2007. تأثير الصعق الكهربائي في تغايرات النمو الخضري والزهري وDNA بعض نباتات الزينة. اطروحة دكتوراة . قسم البستنة . كلية الزراعة . جامعة بغداد . جمهورية العراق.ع ص 141.

Bai, D., J. Brandle and R. Reeleder. 1997. Genetic diversity in North American ginseng (*panax quinque folius L.*) grown in Ontario by RAPD analysis. *Genome* 40: 11-17.

De Laat, A.M.M., W. Gohde, and M.J.D.C . Vogelzang. 1987**.** Determination of ploidy of single plants and plants population by flow cytometry. *Plant Breeding* 99: 303 – 307.

Gao, S.L., D.N. Zhu., Z.H. Coi and D.R. Xu. 1996. Autotetraploid plant from colchicine treated bud culture of *Saluia miltiorrhiza*. Plant Cell Tissue Culture, 47: 37 – 77.

Haley, S.D. , L.K. Afanador , P.N. Miklas , J.R. Starely and J.D. Kelly .1994. Hetergeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theor. Appl. Genet*. 88: 337-342.

LIU X. Z. , H. LIN, X. Y. MO , T. LONG and H. Y. ZHANG .2009. Genetic variation in colchicine-treated regenerated plants of *Eucalyptus globulus* Labill. Indian Academy of Sciences. *Journal of Genetics*, 88(3):345-348.

Mohanty S. , A. B. Das , N. Ghosh , B. B. Panda and D. W. Smith.2010. Genetic diversity of 28 wild species of fodder legume *Cassia* using RAPD, ISSR and SSR markers: a novel breeding strategy. *Journal of Biotech`1221 Research*, 2:44-55.

Nei, M. and W.H. Li .1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.74:5269–5273.

Petersen, K.K., P. Hagberg and K. Kristiansen. 2002. In vitro chromosome doubling of Misconthus sinensis. *Plant Breeding* 121, 445-450.

Sajjady. , J. Muhammad , M. Asim , A. Iftikhir and A. Haider .2013. Effect of Colchicine on In vitro Polyploidy Induction in African Marigold (*TAGETES ERECTA*). Pakistan. Pak. *J. Bot*., 45(3): 1255-1258.

Sharma . A . K .and A . Sharma . 1980 . Chromosome Techniques . Theory and Practice Butterworth's Lond .

Tiwari K. and S. K. Mishra . 2012. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondi. African Journal of Biotechnology* Vol. 11(39), pp. 9336-9342.

EARLY DETECTION OF CHROMOSOMAL POLYPLOIDY RESULTING FROM EFFECT OF THE COLCHICINE ON *Cassia angustifolia* .

Janan K. Hussein*

* Assist. Prof.- Dept. Of Horticulture-Coll. of Agric.,- Univ. of AL-Qasim green - dr.janan77@yahoo.com

ABSTRACT

The study was carried out at biotechnology and Tissue culture laboratories /College of Agriculture / University of Al-Razi / Kermanshah / Iran in summer season-2014. For early detection of chromosomal polyploidy, resulting from soaking the seeds cultured of *Cassia angustifolia* in three Colchicine solution concentrations (0.01 , 0.025 , 0.05 %) and three periods(6 , 12 , 24 hour). The study aimed to detect the presence of chromosomal polyploidy depending on the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Results confirmed the chromosomal polyploidy of plants which gave higher Genetic Distance counts the number of chromosomes in the cells of the roots tops. The results of RAPD analysis were clear differences in the number of DNA amplified fragments and molecular weights depending on the primers user, 9 primers gave 78 bands (35 similar bands and 43 polymorphic bands) and estimated the contrast ratio to 55.43% . Highest Genetic Distance was in Colchicine treatment T6 (0.025% X24 hour) 0.39%, followed by plants treatment T3 (0.01 X 24 hours)(0.35%) and T7 (0.05 X 6 hours)(0.33%). The results showed laboratory to calculate the number of chromosomes occur chromosomal polyploidy (4N = 56) in some plants transactions T6, T3, T7, The highest rate chromosomal polyploidy 64.71% in plants treated T7 followed T6 (57.14%) and T3 (26.09%) .

Key words*: Cassia angustifolia , Colchicine , RAPD*