تأثیر تیمار کلشی‌سین بر القاء اتوتتراپلوئیدی و تغییر صفات مورفوفیزیولوژیک در گل پروانش (*Catharanthus roseus*) رقم alba

Effect of Colchicine Treatment on the Autotetraploidy Induction and Morpho-Physiological Traits Alteration in *Catharanthus roseus* cv. alba

حمیدرضا حسینی[۱*]، مهرانگیز چهرازی[۲]، داریوش نباتی‌احمدی[۳] و محمد محمودی‌سورستانی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۴

چکیده

به‌منظور ارزیابی تأثیر تیمار کلشی‌سین بر القاء اتوتتراپلوئیدی در گل پروانش (*Catharanthus roseus* cv. alba)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ غلظت کلشی‌سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد) و ۶ تکرار انجام شد. بعد از اعمال تیمار کلشی‌سین در مرحله‌ی گلدهی کامل، از فلوسایتومتری جهت اندازه‌گیری سطح پلوئیدی استفاده شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت تیمار کلشی‌سین تأثیر قابل‌توجهی بر درصد اتوتتراپلوئیدی و مرگ‌ومیر داشت. بیشترین میزان اتوتتراپلوئیدی مربوط به غلظت ۰/۴ درصد کلشی‌سین (۴۴ درصد) بود. درحالی‌که بیشترین زنده‌مانی پس از تیمار شاهد، در تیمار ۰/۱ درصد کلشی‌سین ثبت شد. نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار قطر ساقه، تعداد شاخه جانبی، تعداد برگ، سطح برگ، قطر گل، قطر دمگل، میزان کلروفیل‌های a، b و کل در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بود. با افزایش سطح پلوئیدی ارتفاع گیاه کاهش یافت، درصورتی‌که طول دمگل در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تغییری نکرده و از نظر رشد دارای تیپ یکسان بودند.

واژه‌های کلیدی: اتو تتراپلوئیدی، فلوسایتومتری، کلشی‌سین، مورفوفیزیولوژیک و گل پروانش

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲ و ۴. استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

*: نویسنده مسئول Email: hhosseini2929@yahoo.com

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد.

مقدمه

گل پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* Don. گیاهی چندساله و دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) از خانواده خرزهره است که از جنبه‌های زینتی و دارویی قابل‌توجه می‌باشد (*ورما*[1] و همکاران، 2011). پروانش گیاه گرمسیری و حساس به سرما می‌باشد که با فراهم‌کردن شرایط مناسب می‌توان آن را به‌مدت طولانی نگهداری کرد. در باغبانی این گیاه زینتی جزء گل‌های یک‌ساله بوده در باغچه‌ها به‌عنوان گل حاشیه‌ای در بهار کشت می‌شود و ارتفاع آن در شرایط اقلیمی مختلف، متفاوت و بین ۴۰ تا ۹۰ سانتی‌متر می‌باشد (قاسمی‌قهساره و کافی، ۱۳۸۸). سه واریته این گیاه براساس رنگ گل متمایز می‌شوند که شامل rosea با گل‌های صورتی، alba با گل‌های سفید و گل‌های سفید با حلقه صورتی یا زرد می‌باشد. گیاه پروانش دارای تعداد زیادی ترپنوئید ایندول‌آلکالوئید با بیش از ۱۳۰ ترکیب جداسازی و شناسایی شده می‌باشد (*واندرهجدن*[2] و همکاران، 2004). افزایش سطح پلوئیدی به‌طریق مصنوعی درگیاهان زینتی و دارویی، علاوه‌بر تأثیرات مثبت بر ویژگی‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بهبود محصول باعث ایجاد تنوع در جمعیت‌های گیاهی، می‌شود. در باغبانی نیز از پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک ابزار اصلاحی در افزایش صفاتی از قبیل اندازه گیاه، ضخامت برگ، نسبت طول به عرض برگ و اندازه گل استفاده شده است (*شائو*[3] و همکاران، 2003). افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان سبب ایجاد تغییرات آناتومی و ساختمانی در آن‌ها می‌شود (*داوان و لاوانیا*[4]، 1996). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، انگیزش پلی‌پلوئیدی سبب افزایش اندازه سلول‌ها و متعاقباً افزایش اندازه‌ی گل، گل‌آذین و برگ‌ها شده و در نتیجه اندام‌های رویشی و زایشی و به‌طورکلی اندام‌های حاوی مواد مؤثره در مقایسه با گیاهان دیپلوئید (والدین) بزرگ‌تر شده که در نهایت تولید ترکیبات دارویی آنها افزایش می‌یابد (*آدانیا و شایرای*[5]، 2001). *امیدبیگی*[6] و همکاران (2010) پس از تیمار گیاه بادرشبویه (*Dracocephlum moldarica* L.) با کلشی‌سین در دو مرحله (مرحله‌ی اول پس از ظهور برگ‌های کوتیلدونی و مرحله‌ی دوم پس از ظهور دو برگ حقیقی) اظهار داشتند که تیمار گیاهچه‌ها در مرحله‌ی خروج دو برگ حقیقی با محلول کلشی‌سین ۰/۱ درصد بیشترین تأثیر را در ایجاد اتوتتراپلوئیدی دارد و سبب افزایش تعداد کروموزم‌ها از (۲n=۲x=۱۰) به (۲n=۴x=۲۰) شد و از طرفی هم باعث تغییر در صفاتی ازجمله افزایش طول روزنه، قطر روزنه، طول سلول‌های محافظ روزنه، سطح برگ، وزن تر و خشک گیاه، حجم هزار دانه، روغن ضروری، و کاهش تعداد روزنه و ارتفاع گیاه شد. همچنین در این تحقیق به‌تدریج با افزایش غلظت کلشی‌سین درصد پلی‌پلوئیدی افزایش اما بقاء گیاه کاهش یافت. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین به‌منظور القاء اتوتتراپلوئیدی در گل پروانش رقم alba بوده تا با ایجاد تغییرات سیتوژنتیکی، مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی، قادر به شناسایی تنوعات گیاهی شد که بتوان از آن‌ها در جهت اصلاح، بهبود کیفیت و ساختار ژنتیکی بهتر این گیاه گام مثبتی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۱-۱۳۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ سطح (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد و با pH=۶) تیمار کلشی‌سین و ۶ تکرار انجام شد. بذور گل پروانش رقم alba از بانک ژن ایران واقع در مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر شهرستان کرج تهیه شد. کلشی‌سین مورد استفاده در این تحقیق (با ۹۹٪ خلوص) از شرکت سیگما تهیه گردید. بذور در سینی کشت با محیط‌کشت کوکوپیت کشت گردید. سینی‌های کشت در شرایط گلخانه و با دمای روز ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت‌نسبی ۵±۷۰ درصد نگهداری شدند. پس ازجوانه‌زدن بذور، گیاهچه‌ها در مرحله‌ی ظهور کامل دو برگ حقیقی به‌صورت اسپری تحت تیمار کلشی‌سین قرار گرفتند. به این منظور مریستم انتهایی ۳۰۰ گیاهچه (در هر تیمار) با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد و با pH=۶) طی هفت روز متوالی تیمار شدند. از محلول توئین ۲۰ به‌منظور افزایش تماس سطحی محلول کلشی‌سین با برگ استفاده شد. در مرحله ۴ تا ۶ برگ حقیقی، نشاها به گلدان‌های حاوی ماسه، رس و کود دامی پوسیده (به نسبت ۱: ۱:۱) منتقل شدند. تا پایان پروژه تمام گلدان‌ها با محلول غذایی هوگلند کامل به‌طور یکسان تغذیه شدند. آبیاری گلدان‌ها با فاصله سه روز انجام شد و گیاهان در گلخانه با شرایط نور طبیعی رشدونمو یافتند. تعیین سطح پلوئیدی گیاهان با دستگاه فلوسایتومتری (مدل PA, Partec, Germany D-48161)، مجهز به لامپ HBO و لیزر اشعه ماوراءبنفش در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (پژوهشکده

1. Verma *et al*.
2. Van der Heijden *et al*.
3. Shao *et al*.
4. Dhawan and Lavania
5. Adaniya and Shirai
6. Omidbagi *et al*.

بیوتکنولوژی کشاورزی ایران) طبق روش جو[1] و همکاران (2005) انجام شد. محلول بافر استخراج هسته و رنگ ۴ و ۶ دی‌آمیدو -۲- فنیل ایندول[2] با نام .Cystain UV Persices از شرکت پارتک تهیه شده بودند. گیاه جعفری با وزن هسته ۴/۴۶ پیکوگرم به‌عنوان گیاه استاندارد در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله گل‌دهی کامل (۱۵ هفته پس از انتقال نشاء) (*سری‌واسوکی*[3] و همکاران، 1980). تجزیه و تحلیل سطح پلوئیدی (محتوای DNA) با استفاده از نسبت $\frac{mean\ peak\ 1}{mean\ peak\ 2}$ محاسبه گردید (*ولنت*[4] و همکاران، 1998).

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، ۰/۱ گرم از برگ گیاه وزن شد و در هاون چینی با ۲ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به آرامی بافت برگ له و به‌صورت مخلوطی یکنواخت و همگن درآمد سپس با استون ۸۰٪ به‌حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ (دور در دقیقه) به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzo Japan UV-1201) در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر میزان جذب برای کلروفیل قرائت گردید. با استفاده از فرمول زیر محتوای کلروفیل کل محاسبه شد (*آرنون*[5]، 1949).

Coll a=12.25(A663)-2.55(A645)×V/W

Coll b=20.31(A645)-4.91(A663)×V/W

Total Chl=17.76(A645)+7.34(A663)×V/W

V= حجم عصاره (میلی‌لیتر) و W= وزن بافت (میلی‌گرم)

همچنین ارتفاع بوته با استفاده از خط‌کش (با دقت ۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری قطر ساقه، قطر گل، طول و قطر دمگل از کولیس دیجیتالی (با دقت ۰/۱ میلی‌متر) استفاده شد. سطح برگ با دستگاه (Leaf area meter DELTA-T SCAN مدل CV-S 3200) ساخت کشور ژاپن بر حسب (cm^2) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS، مقایسه میانگین‌ها با آزمون t در سطح معنی‌دار ۱ درصد و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

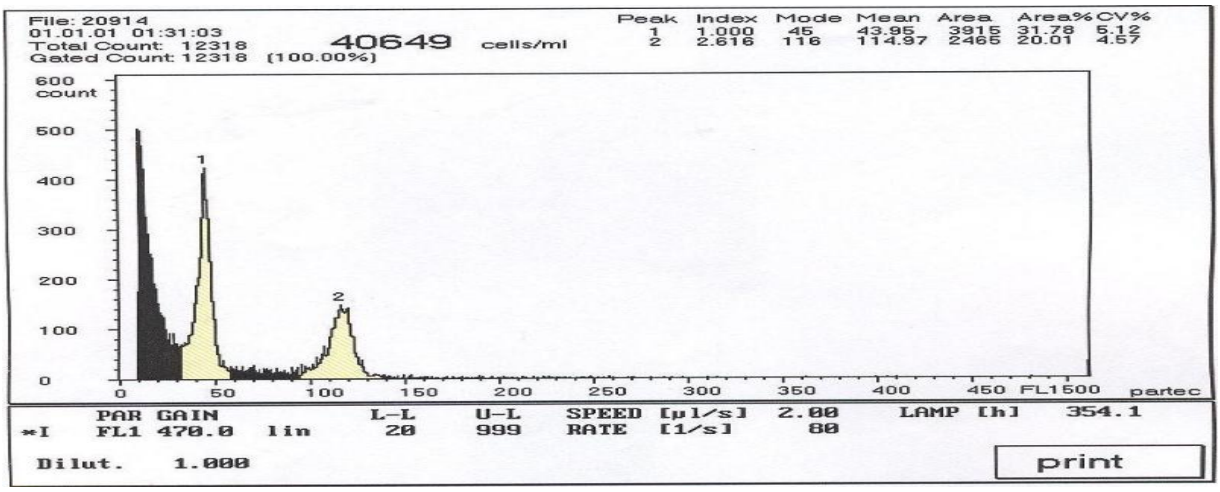
نتیجه‌گیری و بحث

نتایج تجزیه سطح پلوئیدی گیاهان با دستگاه فلوسایتومتری نشان داد نسبت میانگین پیک ۱ به پیک ۲ در گیاهان دیپلوئید برابر با ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ و در گیاهان تتراپلوئید این نسبت برابر با ۰/۷ تا ۰/۹ بود (شکل ۱ و ۲). یکی از روش‌های تأیید وقوع پلی‌پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری است. به‌طوری‌که پیک‌های حاصل مطابق شکل‌های ۱ و ۲ در مرحله G1 تقسیم سلولی، مقدار ماده وراثتی را نشان داده و موقعیت نسبی آنها سطح پلوئیدی را تأیید می‌نماید (*ولنت* و همکاران، 1998). این نتایج با یافته‌های محققان بر روی گیاه ریحان مطابقت دارد (ملک‌زاده شفارودی و همکاران، ۱۳۸۷).

نتایج نشان داد که در بین گیاهان تیمار شده، فقط در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد کلشی‌سین گیاهان تتراپلوئید ایجاد شدند. همچنین نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، سیتوژنتیکی و مورفولوژیکی نشان داد که بیشترین میزان اتوتتراپلوئیدی مربوط به‌غلظت ۰/۴ درصد کلشی‌سین (با میانگین ۴۲ درصد) بود. بیشترین میزان مرگ‌ومیر نیز در تیمار ۰/۴ مشاهده شد (جدول ۱). در آزمایشی که به‌منظور القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه زینتی دندروبیوم انجام گرفت مشاهده کردند که با افزایش غلظت محلول کلشی‌سین، میزان مرگ‌و-میر در گیاهان تیمار شده افزایش یافت (*سارانوم*[6] و همکاران، 2010). سحرخیز (۱۳۸۵) نیز نشان داد که بین غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و میزان مرگ‌ومیر در گیاهچه‌های زینتی-دارویی بابونه‌کبیر پس از اعمال تیمار، رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد. در پژوهشی که توسط *هان*[7] و همکاران (1992) انجام گرفت، اظهار کردند که ایجاد حالت مسمومیت و گیاه‌سوزی در گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین دلیل اصلی مرگ و میر گیاهان پس از تیمار با این ماده جهش‌زا می‌باشد.

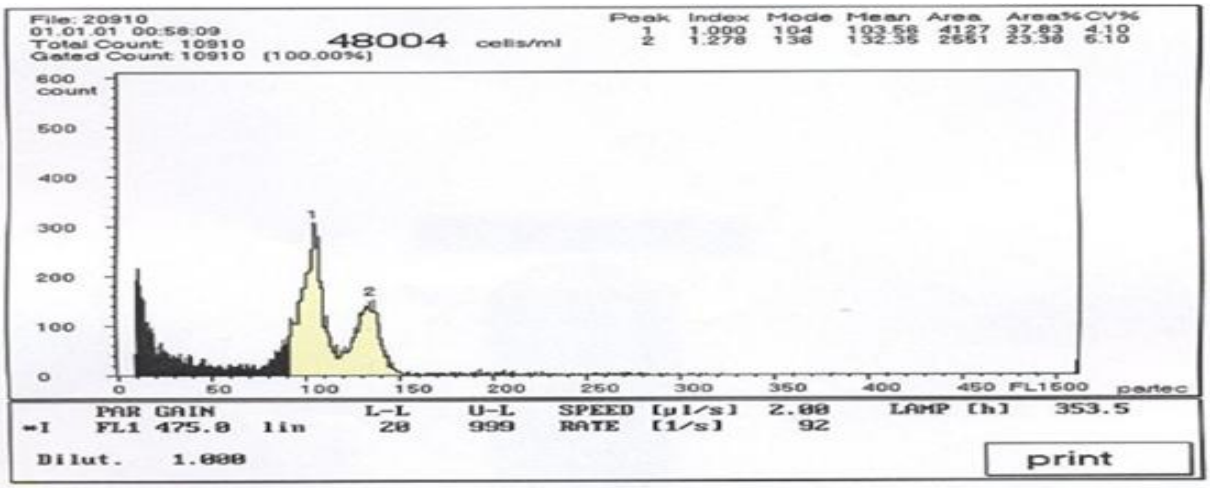
با افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان ارتفاع بوته به میزان قابل‌توجهی کاهش یافت. به‌طوری‌که ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید ۳۴ و در گیاهان دیپلوئید ۵۳ سانتی‌متر بود (جدول ۲). ولی تفاوت معنی‌داری از نظر طول دمگل در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده نشد (جدول ۲). محققان اظهار داشتند تیمار کلشی‌سین ارتفاع گیاه گل میخک را به میزان قابل‌توجهی کاهش داد (*رویکوردهوری*[8] و همکاران، 2011). همچنین *مادون و تا*[9](2005) دریافتند با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه بذرالبنج ارتفاع گیاه به‌میزان قابل‌توجهی کاهش یافت. از گل پروانش در فضای سبز به‌عنوان گیاه حاشیه‌ای استفاده می‌شود و کاهش ارتفاع با افزایش سطح پلوئیدی موجب کاهش هرس شده، یکی از برتری‌های گیاه تتراپلوئید در مقایسه با گیاه دیپلوئید می‌باشد.

1. Gu *et al*.
2. DAPI (4,6,-Diamido-2-Phenylindole)
3. Sri-Vasuki *et al*.
4. Valente *et al*.
5. Arnon
6. Sarathum *et al*.
7. Han *et al*.
8. Roychowdhury *et al*.
9. Madon and Tah



شکل ۱: تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه پروانش در حالت دیپلوئید (پیک ۱) و گیاه شاخص (جعفری) در حالت دیپلوئید (پیک ۲)

Fig. 1: Analyzed peak range of cells nuclei periwinkle, diploid plant (peak 1) and index plant of parsley in diploid status (peak 2) using Flow-cytometry



شکل ۲: تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه پروانش در حالت تتراپلوئید(پیک ۱) و گیاه شاخص (جعفری) در حالت دیپلوئید (پیک ۲)

Fig. 2: Analyzed peak range of cells nuclei periwinkle, tetraploid plant (peak 1) and index plant of parsley in diploid status (peak 2) using Flow-cytometry

شکل ۳: اندازه و شکل گلبرگ در دیپلوئید (چپ) و تتراپلوئید (راست)، اندازه و شکل برگ در گیاه دیپلوئید (راست) و تتراپلوئید(چپ)

Fig. 3: Size and shape of petal in diploid (left) and tetraploid (right), Size and leaf figure in diploid (right) and tetraploid plants (left)

جدول ۱: درصدگیاهان زنده مانده و درصد گیاهان تتراپلوئید حاصل از تیمار گیاهچه‌های گل پروانش رقم alba با کلشی‌سین

Table 1: Percentage of remaining plants and percentage of tetraploid plants from seedlings treated with colchicine in *Catharanthus roseus* cv. alba

غلظت کلشی‌سین (درصد) Colchicine concentration (%)	گیاهان باقی‌مانده پس از تیمار (درصد) Plants remaining after treatment (%)	گیاهان تتراپلوئید (درصد) Tetraploide plants (%)
0	98±2[a]	0[c]
0.1	96±4[b]	0[c]
0.2	79±3[c]	35±2[b]
0.4	55±3[d]	44±3[a]

± خطای استاندارد (SE) ± Standard Error (SE)

جدول ۲: مقایسه میانگین ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های پروانش رقم alba

Table 2: Mean comparisons of morphological and physiological traits in *Catharanthus roseus* cv. alba

ویژگی‌های مورد بررسی Traits	گیاهان دیپلوئید Tetraploid plants	گیاهان تتراپلوئید Diploid plants
ارتفاع گیاه (cm) Plant height	53.2±0.7[a]	34±0.9[b]
قطر ساقه (mm) Stem diameter	9±0.6[b]	15±0.3[a]
تعداد شاخه جانبی Number of lateral branch	3.3±0.3[b]	8.4±0.33[a]
تعدادبرگ Leaf number	58.7±1.3[b]	96±1[a]
سطح برگ (mm^2) Leaf area	25263±1847[b]	70904±884[a]
قطرگل (mm) Flower diameter	42±0.1[b]	51±0.2[a]
طول دمگل (mm) Peduncle length	29±0.04[a]	28±.05[a]
قطر دمگل (mm) Peduncle diameter	2±0.01[b]	3±0.2[a]
مقدار کلروفیل a(mg/g) Chlorophyll a content	0.6±0.014[b]	0.91±0.012[a]
مقدار کلروفیل b (mg/g) Chlorophyll b content	0.21±0.01[b]	0.37±0.009[a]
مقدار کلروفیل کل (mg/g) Total chlorophyll content	0.8±0.01[b]	1.2±0.04[a]

± خطای استاندارد (SE) ± Standard Error (SE)

دیجکسترا و اسپکمن[1] (1980) معتقدند که افزایش سطح پلوئیدی در طی مراحل اولیه رشد و نمو سبب کاهش تعداد دفعات تقسیم سلولی می‌شود، به‌همین دلیل ممکن است سرعت رشد در گیاهان تتراپلوئید کمتر از گیاهان دیپلوئید باشد. افزایش قطر ساقه گل پروانش در این تحقیق نیز در اثر افزایش سطح پلوئیدی حاصل شد. قطر ساقه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به‌ترتیب ۹ و ۱۵ میلی‌متر بود که با نتایج آزمایش انجام گرفته توسط *ربولز*[2] و همکاران (2007) بر روی گیاهچه زینتی پروانه (*Colophospermum mopane*) مطابقت دارد. تعداد شاخه جانبی از ۳ عدد در گیاهان دیپلوئید به ۸ عدد در گیاهان تتراپلوئید افزایش یافت (جدول ۲). گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید دارای برگ‌های بیشتر و

1. Dijkestra and Speckmann

2. Rubuluza *et al*.

بزرگ‌تری بودند. تعداد برگ در گیاهان دیپلوئید ۵۹ و در گیاهان تتراپلوئید ۹۶ عدد بود (جدول ۲). *ساری*[1] و همکاران (1999) در مقایسه گیاهان دیپلوئید و هاپلوئید هندوانه نیز بین افزایش سطح پلوئیدی و افزایش سطح برگ رابطه‌ی مستقیمی مشاهده کردند. افزایش اندازه برگ از طریق افزایش اندازه هسته سلول در گیاهان تتراپلوئید به‌دلیل افزایش سرعت بزرگ‌شدن سلول، نه به علت افزایش طول دوره بزرگ‌شدن آن‌ها تحقق می‌یابد (*سوگیاما*[2]، 2005). قطر گل و قطر دمگل در گیاهان تتراپلوئید (به‌ترتیب ۵۱ و ۳ میلی‌متر) نسبت به گیاهان دیپلوئید (به‌ترتیب ۴۲ و ۲ میلی‌متر) بیشتر (جدول ۲)، و همچنین شکل گلبرگ نیز در انواع تتراپلوئید به‌صورت چین‌دار بود (شکل ۳).

تیمار کلشی‌سین بر روی گل سوسن‌شرقی سطح پلوئیدی را افزایش داد که همزمان با افزایش سطح پلوئیدی، قطر گل نیز افزایش یافت (یو[3] و همکاران، 2007). در گیاهان تتراپلوئید میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری بالاتر از گیاهان دیپلوئید بود (جدول ۲). احتمال داده می‌شود که با دو برابر شدن تعداد ژنوم، فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری بالا رفته (*کندوروسی*[4] و همکاران، 2000) که این افزایش بر میزان تنفس، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و همچنین انتقال الکترون در فتوسنتز مؤثر است (*بایم*[5] و همکاران، 1981). افزایش درمیزان فتوسنتز به‌همراه کاهش میزان تعرق و سرعت رشد کمتر گیاه باعث مقاومت بیشتر گیاه تتراپلوئید به تنش‌های تغذیه‌ای و معدنی و شرایط محیطی می‌گردد (*داوان و لاوانیا*[6]، 1996).

1. Sari *et al.*
2. Sugiyama
3. Wu *et al*.
4. Kondorosi *et al*.
5. Byme *et al*.
6. Dhawan and Lavania

منابع

سحرخیز، م. ج. (۱۳۸۵)، اثرات برخی از عوامل محیطی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات گیاه دارویی و زینتی بابونه‌کبیر (*Tanacetum parthenium*). رساله دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۷۳ صفحه.

قاسمی‌قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۸۸)، گل‌کاری علمی و عملی، انتشارات دوم مؤلف. صفحه ۳۱۳.

ملک‌زاده شفارودی، س.، غنی، ع.، حبیبی، م. و امیری، ا. (۱۳۹۰)، بررسی امکان القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) با استفاده از کلشی‌سین. مجله علوم باغبانی. ۲۵: ۴۶۱-۴۶۹.

Adaniya, S. and Shirai, D. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zinger officinalis* Roscoe) and its pollen fertility germinability. Science Horticulture, 88: 277-287.

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

Byrne, M., Nelson, C. and Randall, D. 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchanges of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68: 891-893.

Dhawan, O. P. and Lavani, U. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induce polyploidy, Euphytica, 87: 81-89.

Dijkestra, H. and Speckmann, G. J. 1980. Autotetraploidy in Caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of aetheric oil content of the seed. Euphytica, 29: 89-96.

Gu, X. F., Yang, A. F., Meng, H. and Zhang, J. R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill cv. Zhanhua. Plant Cell Reports, 24: 671-676.

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.

Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendreau, E. 2000. Plant cell size control: growing by ploidy?. Current opinion in Plant Biology, 3: 488-492.

Madon, M., Clyde, M. M. and Hashim, H. 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research, 17: 110-123.

Omidbagi, R., Yavari, S., Hassani, M. and Yavari, S. 2010. Induction of autotetraploidy in Dragonhead (*Dracocephalum moldavica*) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18: 23-35.

Roychowdhury, R. and Tah, J. 2011. Mutation breeding in *Dianthus caryophyllus* for economic traits. Electronic Journal of Plant Breeding. 2: 282-286.

Rubuluza, T., Nikolova, R. V., Smith, M. and Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African journal of Botany, 73: 259-261.

Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S. and Nanakorn, M. 2010. Effect of concentration and duration of Colchicine Treatment on Polyploidy Induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Horticulture Science, 75: 123-127.

Sari, N., Abak, K. and Pitra, M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in Watermelon. Science Horticulture, 82: 265-277.

Shao, J., Chen, C. and Deng, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate(*Punica granatum*). Plant cell and organ culture, 75: 241-246.

Sri Vasuki, K. P., Rao, V. S., and Rao, K. V. 1980. Effect of micronutrients and their interaction on growth and alkaloid production in *Catharanthus roseus* Don. Plant Science journal, 89: 197-201.

Sugiyama, S. I. 2005. Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: Comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium* Life. Annals of Botany, 96: 931-938.

Valente, P., Tao, W. and Verbelen, JP. 1998. Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of Tobacco. Plant Science, 134: 207-215.

Vander Hejden, R., Jabos, D. J., Snoeijer, W., Hallard, D. and Verpoorte, R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids:
Pharmacognosybiotechnol. Current Medicinal Chemistry, 11: 1241-1253.

Verma, A. K., Singh, R. R. and Singh, S. 2011. Cytogenetic effect of EMS on root meristem cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don var. Nirmal. Biological Sciences, 2: 20-24.

Wu, H., 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.

Effect of Colchicine Treatment on the Autotetraploidy Induction and Morpho-Physiological Traits Alteration in *Catharanthus roseus* cv. alba

Hosseini[1*], H. R., Chehrazi[2], M., Nabati Ahmadi[3], D. and Mahmoodi Sorestani [4], M.

Abstract

In order to evaluatem the colchicine treatments on autotetraploidy induction in Madagascar periwinkle (*catharanthus roseus* cv. alba), an experiment was carried out on the frame of completely randomized design with four concentrations of colchicine (0, 0.1, 0.2 and 0.4%) in six replications. Colchicine was applied in full bloom stage, and flow cytometry was used to determine ploidy levels. Results indicated that increment of colchicine concentration had significant effect on percentage of autotetraploidy and plant mortality in targeted plants. The highest auototetraploidy (44%) was observed at 0.4% of colchicine concentration, while the highest viability after control treatment was recorded at 0.1% of colchicine concentration. Result also showed a significant increase in stem diameter, number of lateral branches, leaf number, leaf area, flower diameter, peduncle diameter, chlorophyll a content, chlorophyll b content and total content of chlorophyll in tetraploid compared to diploid plants. In contrast, enhancement of ploidy level reduced plant height, while peduncle length remained unchanged and had the similar type in terms of growth in diploid and tetraploid plants.

Keywords: Autotetraploidy, Flow cytometry, Colchicine, Moroph-physiologic *Catharanthus roseus*

1. M.Sc student, Department of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahwaz.

2 and 4. Assistant Professors of Horticulture, Department of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahwaz

3. Assistant Professor Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Chamran University of Ahwaz

⁎: Corresponding author Email: hhosseini2929@yahoo.com