

القای پلی پلوئیدی در پایه پسته رقم بادامی زرندی توسط کلشی سین

محمد رضا ابوالحسن زاده¹

دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، ایران

Email: Abolhasani_mohamadreza@yahoo.com

ایرج توسلیان²

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

Email: itavasoli@uk.ac.ir

چکیده

پسته یکی از مهمترین میوه های آجیلی است و کشور ایران بزرگترین تولید کننده آن در جهان است. پسته معمولاً توسط پیوند بر روی پایه تکثیر می شود. پلی پلوئیدی سبب تقویت و مقاومت بیشتر گیاهان به تنش ها می شود. هدف از این پژوهش القاء پلی پلوئیدی توسط کلشی سین در پایه پسته بادامی زرد بعنوان مهمترین و رایجترین پایه پسته اهلی است. تیمار کلشی سین با غلظت های 0، 0/5، 1، 1/5، 1/5 مول در دو روش تیمار بذری و گیاهچه انجام گرفت. مقایسه برگ های گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید نشان داد که برگ های گیاهان پلی پلوئید از نظر اندازه دارای طول و عرض کمتری نسبت به دیپلوئید بودند اما دمبرگ گیاهان پلی پلوئید به طور معنی داری بزرگتر از گیاهان شاهد بود. همچنین مقایسه ارتفاع بین گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید نشان داد که ارتفاع گیاهان پلی پلوئید اختلاف معنی داری نسبت به دیپلوئید ندارد. بررسی تراکم و ابعاد روزنه نیز نشان داد که در گیاهان پلی پلوئید در مقایسه با دیپلوئید تراکم روزنه کاهش یافته، اما ابعاد روزنه افزایش می یابد. همچنین بررسی میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل گیاهان پسته رقم بادامی ریز زرندی تیمار شده با کلشیسین افزایش معنی داری را نشان می دهد به طوری که میزان آنها با افزایش غلظت تیمارها افزایش یافت. درصد جوانه زنی بذور و درصد سبز شدن جوانه های کاشته شده درون گلدان نشان داد اختلاف معنی داری بین گیاهان پلی پلوئید و گیاهان دیپلوئید وجود دارد.

واژه های کلیدی: پسته رقم بادامی زرد، کلشی سین، پلی پلوئیدی، تیمار گیاهچه و بذری، تراکم و طول روزنه

The Induction Of Polyploidy In Pistachio Almond Zarandi Root stock By Colchicin

Mohamad reza Abolhasanzadeh¹

Graduate Student, College of Agriculture, Azad University of Jiroft, Iran

Iraj Tavasolian²

Department of Horticulture, College of Agriculture, University of Bahonar Kerman, Kerman, Iran

Abstract



Pistachio is one of the most important nut crops and Iran is the leading producer of it. Pistachios usually propagate by budding on suitable rootstocks. Polyploidy makes robust plants and increase their tolerance to biotic and abiotic stresses. The aim of this study was to induce polyploidy in *Pistacia vera* "Badami Zarand" rootstock using colchicine. Treatments consist of three colchicine concentrations (0.5% , 1% ,1.5%) and control. The experiment was completely randomized design with 4 replications. Treatments application were divided in two stages: half of seeds used for seed priming by colchicine and the other half seeds were sown and when they had four leaves, their apical meristem immersed by different concentrations of colchicine. Diploid and polyploid plants showed that polyploid seedlings were smaller in terms of length and width of leaves compared to control, although petiole of polyploidy plants was longer than diploids. The difference between the height of diploid and polyplid plants was not significant. Stomatal density of polyploid plants was lower than diploids but the length and width of them were higher. Chlorophyll a and b and total of treated Badami Zarand cultivar were significantly higher in polyploids compared to control and showed positive regression to the increase of treatment concentrations. Seeds percentage germination and survival rates from treatments were significantly different in polyploids.

Keywords: *Pistachia vera* cv. Badami Zarand, Polyploidy, Colchicine, Seed and Seedling treatment, Stomatal length and density

1-مقدمه

جنس پسته عضوی از خانواده *Anacardiceae* با 11 گونه می باشد که در این میان *Pistacia vera* تنها گونه دارای میوه خوراکی با اهمیت اقتصادی است. جنس پسته را بر اساس تعداد کروموزومها به سه گروه: *P.lentiscus* (با $n=24$)، *P.atlantica* (با $n=282$) و *P.vera* L (با $n=302$) تقسیم کردند. گیاهان پلی پلوئید دارای سازگاری اکولوژیکی بیشتری نسبت به همتا دیپلوئید خود می باشند و امکان استقرار و بقا تحت شرایط سخت را دارند. (Levin DA.2002). بیشتر گیاهان حاصل از پلی پلوئیدی مصنوعی اغلب با افزایش اندازه سلول همراه هستند که به تولید اندام های رویشی و زایشی بزرگتر منجر می شود (Byrne et al;1981). پلی پلوئیدی مصنوعی از طریق وارد کردن شوک های محیطی یا استفاده از مواد شیمیایی که مانع از تقسیم کروموزوم ها می شوند مثل گیاهان پلی پلوئید دارای گلها و بذرهایی بزرگتر، دمگل ضخیمتر و پرزهای سپری بزرگتر روی برگ نسبت به همتهای دیپلوئید خود بودند (Urwin and, 2007). روش دو برابر کردن کروموزوم ها با استفاده از کلشی سین، به طور وسیعی در برنامه های اصلاحی گیاهان استفاده می شود (Hancock,1997;hartwell.et al.,2004). این ماده از تشکیل و پلیمر شدن میکروتوبول ها به نام توبولین ممانعت میکند، بنابراین کروموزومها در مرحله متافاز، یکجا وارد سلول میگردند که این امر آن را به یک القاگر فعال پلی پلوئیدی تبدیل کرده است. هدف از این پژوهش، بررسی امکان استفاده از پلی پلوئیدی بعنوان روشی اصلاحی جهت مقایسه و بررسی برخی ویژگیهای رشدی و کمی و کیفی در گیاهان پلی پلوئید حاصل از گیاهان دیپلوئید در پایه پسته رقم بادامی ریز زرنده است. برای رسیدن به این هدف از ماده شیمیایی کلشی سین در غلظت های 0، 0/5، 1، و 1/5 استفاده گردید.

2-روش تحقیق

این آزمایش در اردیبهشت ماه سال 1394 در گلخانه ای به مساحت 16 متر مربع واقع در استان کرمان شهر ماهان در قالب طرح کاملا تصادفی با تیمار کلشیسین در چهار سطح 0، 0/5، 1، و 1/5 انجام گرفت. در این پژوهش، برای القاء پلی پلوئیدی از روش تیمار بذر و تیمار مریستم انتهایی گیاهچه با غلظت های مختلف کلشیسین استفاده شد. در تیمار بذر بعد از تهیه غلظت های مختلف کلشیسین بذر مورد نظر به مدت 36 ساعت درون آنها قرار گرفتند و برای جلوگیری از خفگی بذر که درون محلول قرار گرفته اند، از پمپ هوا استفاده شد. بذر پس از تیمار برای جوانه زنی به درون ظروف استریلی که پوشیده از پنبه مرطوب بوده منتقل شدند. بعد از گذشت 4 روز و ظاهر شدن جوانه ها به گلدان هایی که درون محیط ایزوله گلخانه قرار داشتند منتقل گردید. در 50 روز پس از تیمار بذر نهال های

With the focus on Sustainable Development and Safe Production

پسته رقم بادامی زیر زرداری مورد ارزیابی قرار گرفتند، همچنین در تیمار مریستم انتهایی گیاهچه ها در مراحل دوبرگ حقیقی اولیه در سه روز متوالی با استفاده از غلظت های مختلف محلول آبی کلشیسین (0، 0.5، 1 و 1.5 درصد) و توپین 20 (برای افزایش جذب سطحی) باروش قطره چکان با استفاده از سمپلر هرروز بمیزان 7 میکرولیتر و به مدت سه روز متوالی تیمار شدند.

3-اندازه گیری ها

برای بدست آوردن طول، عرض و تراکم روزنه، از اپیدرم زیرین برگ با استفاده از لاک ناخن توسط نوارچسب جدا شد که به صورت لایه شفاف بسیار نازکی روی لام چسبانده شد. ویژگی های روزنه همه نمونه ها با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی 40 و 100 بررسی شد (Smith et al., 1989). ارزیابی سطح برگ، برگهای دوم از رأس ساقه گیاه هرگلدان جدا شد. از برگهای جدا شده، کپی کاغذی تهیه و وزن کپی موردنظر با ترازو اندازه گیری شد. یک سانتی مترمربع از کادر کاغذ نیز جدا وزن شد. با محاسبه نسبت وزن برگ به وزن یک سانتی متر مربع از کاغذ (رابطه تناسبی) سطح هر برگ محاسبه و مقایسه شد (سلطانی وهمکاران، 1385). برای اندازه گیری میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید از برگ دوم، دیسک های برگی تهیه، در 5 میلی لیتر استون 80٪ درهون چینی همگن میشود، سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار دردمای 4 درجه سانتیگراد و با 3000 دور در دقیقه بمدت 5 دقیقه محلول جداسازی میگردد. سپس شدت جذب نوری محلول توسط دستگاه اسپکتوفتومتر linear ساخت شرکت Pharmacia biotech کشور آلمان در طول موج های 470، 646.8 و 663.2 نانومتر در مقابل شاهد خوانده میشود. سپس با استفاده از فرمول های زیر میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید در هر Cm مربع از سطح برگ محاسبه میشود.

$$\text{Chla} = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chlb} = 21.50 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$\text{ChT} = \text{Chla} + \text{Chlb}$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{Chla} - 85.02 \text{Chlb}) / 198$$

که در این فرمول $C_x + c$, Ca, Cb به ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید هاست (بر حسب $\mu\text{g/ml}$ عصاره گیاهی).

در تاریخ مشخصی بذور تیمار شده با کلشی سین که جوانه زده بودند، درون گلدان های مخصوص پلاستیکی کشت شدند درصد سبز شدن این بذور که در غلظت های متفاوت تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت 50 روز از تیمار گیاهان پسته رقم بادامی زرداری با کلشی سین، این گیاهان از نظر ارتفاع اندازه گیری و با یکدیگر و گیاه شاهد مقایسه شدند. کلشی سین بخاطر درجه سمیت آنها حتی می تواند باعث جلوگیری از جوانه زنی بذور شود یا جوانه زنی را به تاخیر بیندازد در همین راستا میزان جوانه زنی بذور تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری مقیاس طول و عرض برگ گیاهان پلی پلوئید بهتر است از کولیس دیجیتال استفاده شود به طوری که برگ های دوم از راس گیاه به طور تصادفی انتخاب شود و برای اندازه گیری، از بزرگترین قسمت پهنک برگ طول و عرض برگ اندازه گیری میشود و با گیاهان دیپلوئید مقایسه میشوند. مراحل مختلف آزمایش با چهار تکرار انجام شد و سپس آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون آماری دانکن در نرم افزار SAS صورت گرفت. نمودارهای مربوط به تغییرات در نرم افزار Excel رسم شد. طرح مورد استفاده در آزمایشات طرح کاملاً تصادفی بوده است.

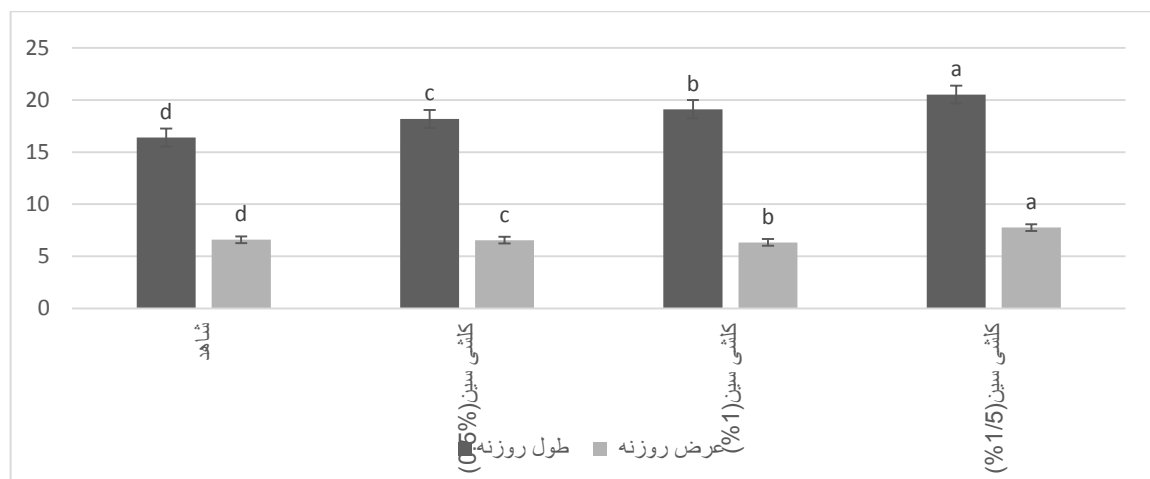
4-یافته ها

در نتایج تجزیه واریانس بدست آمده از اندازه گیری و مقایسه طول و عرض روزنه، گیاهان پلی پلوئید با گیاهان دیپلوئید، نشان داد که اختلاف معنی داری در طول روزنه بین گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید وجود دارد. اما در عرض روزنه اختلاف معنی داری بین گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید وجود نداشت (نمودار 9-1). بدین معنا که روزنه های گیاهان پلی پلوئید بیشتر کشیده تر از گیاهان دیپلوئید بودند. بیشترین طول روزنه مربوط به کلشی سین 1/5٪ می باشد (جدول 9-1). در نتایج تجزیه واریانس تراکم بیشترین تراکم را در گیاهان دیپلوئید و کمترین آن مربوط به غلظت کلشی سین 1/5٪ می باشد. (شکل 9-1). در نتایج ویژگی های سلول های محافظ روزنه شامل طول و عرض سلول های محافظ بیشترین عرض و طول مربوط به غلظت 1.5٪ کلشی سین می باشد. کمترین آن هم مربوط به گیاه شاهد



است. بررسی تجزیه واریانس نشان داد که سطح برگ در گیاهان پلی پلوئید تیمار شده توسط کلشی سین، از نظر اندازه بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بوده ولی تفاوت معنی داری در غلظت های متفاوت کلشی سین دیده نشد. از لحاظ شکل، شکل برگ های گیاهان پلی پلوئید کمی چین خورده و نا صاف بودند اما تغییر چشمگیری در آن دیده نمیشود. نتایج تجزیه واریانس کلروفیل a, b و کلروفیل کل اختلاف معنی داری بین گیاهان تیمار شده نشان می دهد بیشترین کلروفیل a و b مربوط به غلظت 1/5 کلشی سین می باشد. نتایج تجزیه واریانس سبز شدن جوانه های کاشته شده درون گلدان نشان داد اختلاف معنی داری بین جوانه های شاهد و جوانه های بذور تیمار شده وجود دارد همچنین اختلاف زیادی بین سطوح مختلف تیمار کلشیسین وجود دارد که بیشترین اختلاف مربوط به کلشی سین 1/5 می باشد. همچنین تجزیه واریانس داده ها نشان داد که در جوانه زنی بذوری که پس از تیمار با کلشی سین اختلاف معنی داری وجود دارد. این اختلاف در بین تمامی غلظت ها وجود دارد. ارتفاع گیاهان پلی پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید تفاوت معنی داری ندارند بدین صورت که تیمار های کلشی سین در هر غلظتی تاثیر معنی داری بر روی پسته رقم بادامی ریز زرنندی نگذاشته اند. در نتایج تجزیه واریانس داده های طول و عرض کمترین طول و عرض مربوط به گیاهان تیمار شده با غلظت 1/5 کلشی سین می باشد و بیشترین طول و عرض هم مربوط به گیاهان شاهد می باشد. در ارزیابی دمبرگ گیاهات تیمار شده با شاهد اختلاف معنی داری در نتایج تجزیه واریانس وجود دارد بطوری که با افزایش غلظت تیمار ها دمبرگ برگ هم افزایش یافت.

5- جداول، شکل ها و نمودار ها:



نمودار 5-1: اثر تیمار کلشی سین بر طول و عرض روزنه (μm) پسته رقم بادامی زرنندی. میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون، اختلاف معنی داری در سطح 1% آزمون دانکن ندارند.

جداول:

جدول 5-1- نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به تاثیر سطوح مختلف کلشی سین بر روی پایه پسته رقم بادامی ریز زرنندی

میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول روزنه (mm)	عرض روزنه (mm)	تراکم روزنه (mm^2)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	مغزهای سلولهای محافظ (mm)
تیمار	3	12.00**	1.66**	1.677**	0.212 ^{ns}	0.244 ^{ns}	34.76**

GLOBAL CONFERENCE ON

New Approaches in Agriculture and Environment

With the focus on Sustainable Development and Safe Production



0.04	0.02	0.207	0.25	9.678	0.14	0.11	12	خطای آزمایش
0.69	0.87	17.58	12.67	5.214	5.54	1.86		ضریب تغییرات
							15	کل

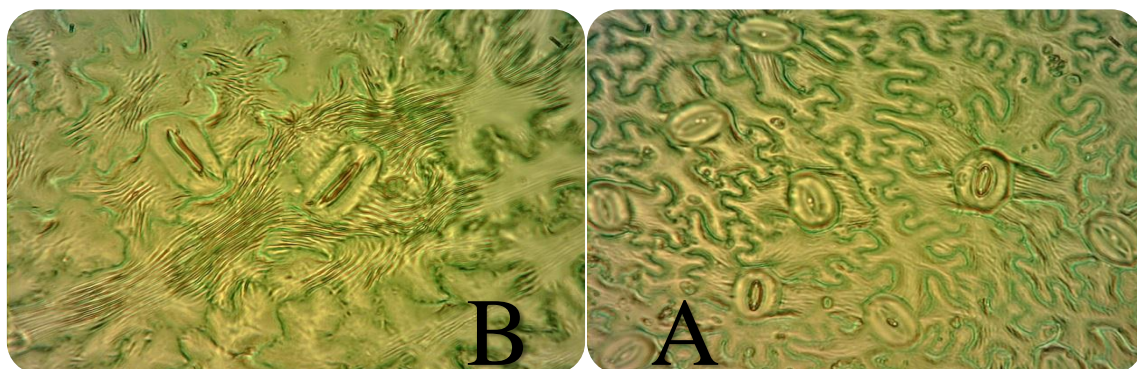
* وجود اختلاف معنی دار در سطح 5٪، ** وجود اختلاف معنی دار در سطح 1٪، ns عدم وجود اختلاف معنی دار

جدول 5-2- نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به تاثیر سطوح مختلف کلشی سین بر روی پایه پسته رقم بادامی ریز زرنندی

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد سبز شدن جوانه	درصد جوانه زنی بذر	ارتفاع (cm)	طول دمبرگ (cm)	سطح برگ (mm ²)
تیمار	3	7934.84**	64.22**	0.85 ^{ns}	1.052*	0.02**
خطای آزمایش	12	0.00	0.00	19.90	0.191	0.001
ضریب تغییرات		0.00	0.00	26.14	29.79	6.70
کل						
15						

* وجود اختلاف معنی دار در سطح 5٪ - ** وجود اختلاف معنی دار در سطح 1٪ - ns عدم وجود اختلاف معنی دار

تصاویر:





شکل 5-1: مقایسه تراکم، طول و عرض روزنه و سلول های محافظ روزنه بین گیاه شاهد دیپلوئید و گیاه پلی پلوئید پسته رقم بادامی زرنندی زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 100

6- بحث و نتیجه گیری

نتیج حاصل از این تحقیق در اثر تیمار های کلشی سین 0/5٪، 1٪، 1/5٪ بر روی بذر و گیاهچه پسته رقم بادامی ریز زرنندی نشان داد که اختلاف معنی داری در طول روزنه ی گیاهان تیمار شده با شاهد داشتند ولی در عرض روزنه اختلاف معنی داری به مشاهده نگردید اما در تحقیقات (Omidbeigi et al 2010) مشاهده کردند که اندازه عرض روزنه در گیاهان پلی پلوئید ریحان بطور غیرمنتظره ای بیشتر از گیاهان دیپلوئید است، بطوریکه عرض روزنه در گیاهان پلی پلوئید بیش از 3 برابر گیاهان دیپلوئید بود. در تراکم روزنه در این پژوهش مشاهده گردید که اختلاف معنی داری بین تراکم گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده وجود دارد به طوری که با افزایش غلظت تیمار ها به دلیل بزرگ شدن روزنه ها تراکم روزنه کاهش یافت که بیشترین تراکم مربوط به گیاهان شاهد می باشد. همچنین (افشار محمدیان و همکاران 1390) در پژوهشی که بر روی لیمو ترش انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تراکم روزنه در گیاهان پلی پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید به طور معنی داری کاهش یافته است. در مشاهدات سطح برگ بین غلظت های متفاوت تیمار ها با یکدیگر در سطح 0/1 درصد از مون دانکن وجود نداشت. همچنین برگ های گیاهان پلی پلوئید تا حدودی چین خورده و نا صاف بودند. در ارتباط با سطح برگ با القای پلی پلوئیدی در گیاه *Spathiphyllum wallisii* سبب کاهش سطح برگ و نسبت طول به عرض گیاه پلی پلوئید نسبت به دیپلوئید شد (Van laere et al., 2010). که نتایج آن با این پژوهش مغایرت دارد شاید دلیل آن این می باشد که طول دمبرگ در گیاهان پلی پلوئید بزرگتر از گیاهات دیپلوئید می باشد و همین باعث می شود در محاسبات سطح برگ به این نتایج رسید در نتایج تجزیه واریانس این پژوهش اختلاف معنی داری در کلروفیل a, b و کلروفیل کل بین گیاهان دیپلوئید و پلی پلوئید وجود دارد با افزایش درصد تیمار ها کلروفیل آ و ب و کلروفیل کل افزایش می یابد. حسنی و همکاران (1390) گزارش کردند که با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه ریحان میزان کلروفیل a, b و کلروفیل کل بطور معنی داری افزایش میابد. البته در پژوهشی دیگر که روی گیاه *Urgenia indica* انجام شد نشان داد که میزان کلروفیل در گیاه پلی پلوئید و دیپلوئید تغییر معنی داری نمیکنند (Phulari, 2011). نتایج سبز شدن جوانه های کاشته شده درون گلدان در این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی داری در نتایج تجزیه واریانس وجود دارد به طوریکه اختلاف قابل توجهی بین گیاهان تیمار شده با گیاهان شاهد وجود دارد همچنین اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف تیمار با یکدیگر وجود دارد همچنین در این پژوهش اختلاف معنی داری بین ارتفاع گیاهان تیمار شده توسط گیاهچه انتهایی با یکدیگر وجود ندارد که با نتایج حاصله مطابق نمی باشد که در انگیزش پلی پلوئیدی در *Ziziphus jujube* بدست آمد، گیاهان پلی پلوئید بصورت معنی داری کوتاهتر از دیپلوئید بودند. سحرخیز (1385) نیز در گیاه بابونه کبیر مشاهده کرد که با افزایش غلظت کلشیسین، ارتفاع گیاه کاهش میابد. کاهش ارتفاع ممکن است بعلت پلی پلوئیدی شدن باشد زیرا گیاهان پلی پلوئید مناطق کوهستانی که کوتاهتر از گیاهان معمول هستند، سازگاری بیشتری بامحیط خود دارند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گیاهان پلی پلوئید دارای اختلاف معنی داری در طول، عرض و برگ با گیاهان شاهد دیپلوئید می باشند با افزایش غلظت تیمار ها طول و عرض برگ هم کاهش یافته است. که با نتایج افشار محمدیان و همکاران مطابقت دارد آنها در پژوهش خود بر روی سطح پلی پلوئیدی لیمو ترش به این نتیجه رسیدند که برگ گیاه لیمو ترش پلی پلوئید دارای طول و عرض کمتری نسبت به همتای دیپلوئید خود دارند. القای پلی پلوئیدی در گیاه *Spathiphyllum wallisii* سبب کاهش نسبت طول به عرض گیاه پلی پلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید شد. (Van Laere et al., 2010) همچنین اختلاف معنی داری در دم برگ گیاهان پلی پلوئید با دیپلوئید وجود دارد بدین صورت که با افزایش غلظت تیمار ها دمبرگ گیاهان افزایش یافت.

به طور کلی می توان از این پژوهش نتیجه گرفت که بین تیمار بذر و تیمار گیاهچه، بیشترین نتیجه را میتوان از تیمار گیاهچه گرفت مقایسه برگ های گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید نشان داد که برگ های گیاهان پلی پلوئید از نظر اندازه دارای طول و عرض کمتری نسبت به دیپلوئید بودند. مقایسه ارتفاع بین گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید اختلاف معنی داری را نشان نداد. بررسی تراکم و ابعاد روزنه نیز نشان داد که در گیاهان پلی پلوئید در مقایسه با دیپلوئید تراکم روزنه کاهش یافته، اما ابعاد روزنه افزایش می یابد. همچنین بررسی میزان کلروفیل a, b و کلروفیل و کارتنوئید کل گیاهان پسته رقم بادامی ریز زرنندی تیمار شده با کلشیسین افزایش معنی داری در سطوح مختلف تیمار ها وجود داشت. درصد بالای غلظت تیمار ها باعث کاهش درصد سبز شدن جوانه های کاشته شده در گلدان می شود.



7-منابع

افشار، م و همکاران. 1390. تأثیرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک القای پل پلوئیدی در گیاه لیموترش. زیست شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره دوازدهم، تابستان 1391، صفحه 13-24

سحرخیز، م، ج. (1385). تأثیر برخی از عوامل اقلیمی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی زینتی بابونه کبیر (Tanacetum parthenium L). رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) علوم باغبانی. دانشگاه تربیت مدرس، 155 صفحه.

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

Hancock, J.F. (1997). The Colchicine story. *Hortscience*, 32: 1011-1012.

Levin DA. 2002. The Role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press. New York. 240 p.

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

Phulari, S. S. (2011) Polyploidy breeding in *Urgenia indica* - to study the effect of colchicines treatment on morphological character of *Urgenia indica*. *Botany* 1: 207- 210.

Smith, S., Weyers, J. D. B. and Berry, W. G. (1989) Variation in stomatal characteristics over the lower surface of *Commelina communis* leaves. *Journal of Plant Cell and Environment* 12: 653-654.

Urwin, N. A. R. and Horsnell, J. (2007) Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica* 156: 257-266.

Van Laere, K., Franca, S. C., Vansteenkiste, H., Van Huylenbroeck, J., Steppe, K. and Van Labeke, M. C. (2010) Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1149-1156.