در
پژوهش و سازندگی
زراعت و باغبانی شماره ۷۶، پاییز ۱۳۸۶

بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد بر شاخساره‌زایی

Anthurium andreanum (Lind.)

ابراهیم بیرامی زاده و پژمان آزادی
بخش بیوتکنولوژی، مرکز ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات

Email: abreeder2000@yahoo.com

چکیده

آنتوریوم از خانواده شـیپوری سـانان بوده و بومی منطقه مرکزی و جنوبی آمریکا می‌باشـد. ازدیاد سنتی شامل جدا کردن پاجوش و قلمه زدن می‌باشـد. امروزه کشـت بافت آنتوریوم به علت تکثیر سریع و حذف بیماری‌ها اهمیت خاصی دارد. در این پژوهش ریز ازدیادی A.andreanum با اسـتفاده از روش شاخسـاره زایی مورد بررسـی قرار گرفته اسـت. این تحقیق در مرکز ملی تحقیقات گل وگیاهان زینتی محلات در طی سـال های۸۴ -۸۲ انجام شـد. رقم مورد اسـتفاده در این پژوهش، ترا(Tera) و ریز نمونه اسـتفاده شـده قطعات برگ می‌باشـد که پس از تقسیم به قطعات ۱×۱ سانتی متری در پتری دیش کشت گردید. برای ضد عفونی ریزنمونه‌ها از سدیم هیپوکلرید ۳ درصد به مدت نیم ساعت استفاده شد. برای القای کالوس محیط MS همراه با ۳۰ گرم برلیتر ساکارز، ۸ گرم برلیتر آگار و هورمون 2,4-D با سطوح صفر تا ۰/۲۴ میلی گرم برلیتر و BA با سطوح ۰/۵ تا ۱/۵ میلی گرم برلیتر مورد استفاده قرار گرفت. ریز نمونه‌ها تحت شـرایط تاریکی و در دمای ۲۵درجه سـانتی‌گراد نگهداری شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۶ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. برای القای شاخساره زایی کالوس‌های حاصل به محیط حاوی BA با سطوح صفر تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شـدند. نتایج آزمایش نشـان داد که تیمار هورمونی ۰/۱۶ میلی گرم برلیتر 2,4-D همراه با یک میلی گرم برلیتر BA بهترین جواب‌دهی را داشتند. همچنین محیط فاقد تنظیم کننده رشد دارای بهترین گیاهچه‌ها از لحاظ تعداد، طول و اندازه برگ در محیط شاخساره زایی بود. گیاهچه‌ها پس از طی مراحل سازگاری به گلخانه منتقل گردیدند.

کلمات کلیدی: آنتوریوم، ریز ازدیادی، تنظیم کننده رشد، شاخساره زایی، باززایی

Pajouhesh & Sazandegi No 76 pp: 179-184

Effect of growth regulators on shoot formation of Anthurium andreanum Lind.

By:A. Beyramizadeh and P. Azadi

Department of Biotechnology, National Research Center of Ornamental Plants,Mahallat,Iran.

Anthurium is belonging to the family araceae and native to central and south American. Conventional propagation relies upon division, cutting methods. In vitro propagation of Anthurium has special importance for rapid clonally propagation and disease elimination. In this research micropropagation of Anthurium andreanum was investigated through shoot regeneration method. The study was done during 2003- 2005 in the National Research Center of Ornamental Plants – Mahallat. Leaf plate explants of Tera cultivar were used. The leaves were cut into 1×1 cm sections. Segments of leaf were sterilized with 3% NaClO for 30 minutes. Explants were cultured on MS media with 2,4–D (0-0.24 mg/l) and BA(0.5 -1.5 mg/l), 30 g/l sucrose and 8 g/l agar for callus induction. Cultures were maintained in dark at 25˚c. The experiment was conducted as a completely randomized design (CRD) with factorial arrangement and 6 replications. Callus were cultured on MS media supplemented with 0-1 mg/l BA for shoot induction in light condition. Best result for callus induction was obtained from medium containing 0.16 mg/l 2, 4-D and 1 mg/l BA. Also the media without hormones showed the best result for number of shoot. Plantlets were transferred into pot and grown in the greenhouse.

Keywords: Anthurium, Micropropagation, Growth regulator, Shoot formation, Regeneration

مقدمه

گیاهA.andreanum از مهمترین گونه‌های جنس آنتوریوم است که به جهت دارا بودن گل‌های بسیار زیبا و جذاب با طول عمر مفید زیاد و دم گل طویل برای تولید گل شاخه بریده مورد بهره برداری قرار می‌گیرد.

اهمیت و جایگاه گلA.andreanum در میان گیاهان زینتی به لحاظ قیمت بالای آن (ارزش چهل شاخه گل آن برابر یک بشکه نفت است) در حدی است که لزوم استفاده از روش‌های نوین جهت نیل به اهداف اقتصادی را ایجاب می‌کند. روش سنتی افزایش آنتوریوم تقسیم بوته از طریق جدا کردن پاجوش‌های کوچک اطراف گیاه مادری و انتقال آن‌ها به گلدانهای جدید و یا جداسازی قلمه‌های انتهایی دو یا سه برگ و ریشه دار کردن آنها زیر مه افشان می‌باشد (۲). راندمان تولید در این روش‌ها پائین است و سالانه حداکثر ۸ گیاه از یک گیاه مادری قابل تولید است، افزایش از طریق بذر نیز موجب تفرق صفات در نتاج گردیده و گیاهان حاصل نیز جهت به گل رفتن به سه سال وقت نیاز دارند (۶).

برای تشکیل گیاهچه از بافت کالوس آنتوریوم آزمایش‌هایی در محیط کشت حاوی عناصر پرمصرف MS ۲ /۱، عناصر کم مصرف MS، ساکارز ۳٪ و آگار ۷ گرم در لیتر انجام گرفت. انگیزش کالوس و واکشت آن در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تاریکی انجام یافت. در محیط کشت یاد شده همراه با یک میلی گرم درلیتر BA در مدت ۱۶-۱۲ هفته رشد کالوس کامل شد. برای نمو جوانه ریز نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به روشنایی دائم با نور کم منتقل شدند ریشه زائی در محیط کشت اولیه بدون هورمون و آگار در محیط کشت مایع در مقابل نور موفقیت آمیز بود (۱۰). پژوهش‌های انجام شده در آنتوریوم نشان داد که برای کالوس زایی و باززایی مطلوب ریز نمونه‌ها نیاز به این است که تغییرات جزئی درمحیط‌های کشت پایه MS ونیچ بوجود آید.کاهش ازت به فرم یون‌های آمونیوم عامل مهمی در تولید کالوس در ریز نمونه‌های آنتوریوم بوده و سبب تسریع در تشکیل بافت کالوس می‌گردد (۸).

حمیده و همکاران در سال ۱۹۹۴ افزایش انبوه A.andreanum از طریق یاخته‌های خوشه‌ای شبه مریستمی و شاخساره با کاربرد کند کننده‌های رشد و با استفاده از ریز نمونه‌های جوانه حاصل از آنتوریوم‌های تکثیر شده از طریق کشت بافت انجام دادند. بعد از ۱۰ هفته در محیط کشت MS مایع محتوی ۱/۵ میلی گرم درلیتر پاکلوبوترازول و ۰/۵ میلی گرم درلیتر 2ip نتایج رضایت بخش بود. شاخساره‌ها عادی و یکنواخت بودند و تعداد زیادی شاخساره تشکیل شد. باززائی یاخته‌های خوشه‌ای شبه مریستمی به نظر می‌رسید که به طریق اندام زائی باشد. شاخساره‌های ایجاد شده در محیط کشت MS مایع بدون هورمون واکشت شدند و تولید ریشه نمودند (۵).

در پژوهشی بر روی کشت بافت ۳۸ رقم A.andreanum در ۳۱ رقم موفق به تولید کالوس شدند، کالوس ۴ رقم در مرحله واکشت از بین رفت و ۳ رقم اصلاً کالوس ندادند. ریز نمونه‌ها از برگ انتخاب شدند که در طول سه ماه تولید کالوس نمودند دو ماه جهت افزونگری کالوس، چهار ماه برای انگیزش جوانه، یک ماه برای تشکیل سبزینه در نور و رشد برگ‌ها و دو ماه برای تشکیل ریشه طول کشید (۱۰). در سال ۱۹۹۱ KuehnleوSugii ریز نمونه‌هایی از برگ و دمبرگ A.andreanum برای کشت بافت انتخاب و روی محیط کشت MS تغییر یافته قرار دادند ریز نمونه برگ بهتر تولید کالوس نمود. تفاوت‌هایی در رشد پینه و باززایی گیاه به خاطر نژادگان و منبع گیاهی به دست آمد (۶). در آزمایشی کالوس دهیA.andreanum

هورمون‌های 2,4-D و BA و 2ip مورد بررسی قرار گرفت و محیط کشت محتوی ۳ میلی گرم برلیتر BA بالاترین میزان باززایی را نشان داد (۱۲). استفاده از ویتامین‌های تیامین، پیرودوکسین و نیکوتینیک اسید به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۴، و ۰/۵ میلی گرم برلیتر در کشت درون شیشه‌ای آنتوریوم نیز توصیه شده است (۱۴).همچنین در پژوهشی که بر روی ریز ازدیادی A.andreanum صورت گرفت، بهترین محیط کشت برای انگیزش کالوس در گیاهA.andreanum محیط کشت MS تغییر یافته با غلظت ۱ و ۱/۵ میلی گرم درلیتر BA همراه ۰/۱ میلی گرم درلیتر 2,4-D از ریز نمونه‌های برگ به اندازه یک سانتی متر مربع و ریز نمونه‌های دمبرگ به طول یک سانتیمتر در محیط رشد تاریکی گزارش گردید. کالوس زایی در ریز نمونه‌های برگ بهتر از ریزنمونه‌های دمبرگ بود (۲).

در پژوهش دیگری جهت ریز ازدیادی دو رقم گیاه A.andreanum بهترین محیط کشت جهت کالوس زایی برای هر دو رقم را محیط کشت نیچ تغییر یافته که حاوی 2,4-D به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر و BA به میزان ۱ میلی گرم بر لیتر بود گزارش کرد. به همین ترتیب باززایی مطلوب در محیط نیچ که حاوی2,4-D به میزان ۰/۱ میلی گرم برلیتر و BA به میزان ۰/۵ میلی گرم برلیتر بود اتفاق افتاد (۱). همچنین در مطالعه اثر ۳ نوع سیتوکینین Kinetin، 2ip، BA از نظر تعداد شاخساره غلظت ۱ میلی گرم BA و از نظر ارتفاع شاخساره غلظت ۱ میلی گرم درلیتر 2ip بهترین پاسخ را نشان دادند (۳). در آزمایشی ریز قلمه هایی(حاصل از بذر) ازآنتوریوم در محیط حاوی۴/۴ میکرو مول BA و ۰/۰۵ میکرومول NAA واکشت گردید، که به طور متوسط ۳/۶ شاخه بدست آمد. قسمت پایه این ریز قلمه‌ها پس از چهار هفته پرآوری کالوس نشان دادند.این کالوس‌ها در محیط حاوی ۸/۹ میکرومول BA و ۲/۷ میکرومولNAA برای تولید شاخساره از کالوس واکشت گردید و به طور متوسط ۴۳/۸ گیاهچه پس از شش هفته از هر سانتی مترمربع کالوس بدست آمده است(۱۵).

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از قطعات ۱×۱ سانتی متری برگ‌های جوان گیاه A.andreanum رقم ترا(Tera)، رشد یافته در شرایط هیدروپونیک به عنوان ریزنمونه استفاده گردید، برای ضد عفونی ریزنمونه‌ها از سدیم هیپوکلرید ۳ درصد به مدت نیم ساعت استفاده شد. سپس ۳ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد، ریزنمونه‌ها به داخل پتری دیش‌های حاوی ۱۵ میلیلیتر محیط کشت منتقل گردید. برای مطالعه شاخساره زایی از محیط پایه MS همراه با هورمونهای 2,4-D در ۴ سطح (۰/۲۴، ۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰ میلی گرم بر لیتر) و هورمون BA در سه سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر) همراه با ۸ گرم درلیتر آگار و ۳۰ گرم درلیتر ساکاروز استفاده گردید. pH محیط بر روی ۵/۷ تنظیم شد. محیط‌های کشت درون اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد، فشار۱/۲ اتمسفر و به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. شرایط انکوباتور جهت نگهداری ریز نمونه‌های مورد نظر دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی بود. ریزنمونه‌ها بعد از ۳ ماه (با یک بار واکشت بعد از ۴۵ روز) تولید کالوس نمودند، این کالوس‌ها در شرایط سترون با استفاده از چاقو و پنس جدا و بر روی محیط‌های رشد باززایی با محیط پایه MS حاوی BA در۶ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در لیتر) درون ظروف شیشه مربایی کشت شدند. کالوس‌های کشت شده جهت باززایی در انکوباتور در دمای ۱+۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. این پژوهش‌ها بر پایه آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار و ۴ نمونه در هر تکرار انجام گردید. صفات تعداد شاخساره، ارتفاع بلندترین شاخساره، میزان رشد کالوس، به طور دقیق مورد ارزیابی و یادداشت برداری قرارگرفت. داده‌های آماری حاصل با استفاده از نرم افزارهای MSTATC و Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

اثر غلظت BA بر کالوس زایی

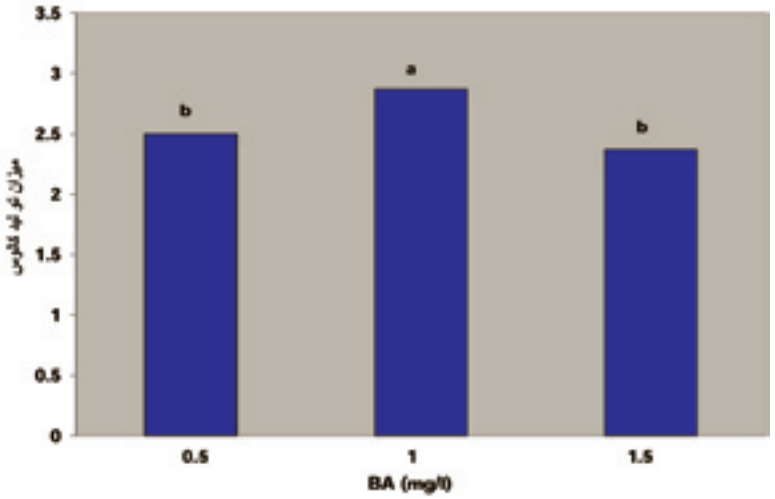
جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر غلظت BA بر روی حجم کالوس و درصد کالوس زایی در سطح ۱٪ معنی دار است. مقایسه میانگین با روش دانکن (نمودار ۱) که به مقایسه اثرات اصلی غلظت BA بدون در نظر گرفتن2,4-D می‌پردازد، بیانگر آن است که بین سه غلظت BA استفاده شده در این آزمایش از نظر درصدکالوس زایی و حجم کالوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوریکه غلظت‌های ۱ میلی گرم درلیتر BA باعث بالاترین درصد کالوس زایی گردیده هرچند غلظت ۰/۵ میلی گرم درلیتر نیزدرصد بالایی از کالوس زایی را نشان داد. استفاده از غلظت بیشتر (BA ۱/۵ mg/l) سبب کاهش درصد کالوس زایی گردیده است.

بهترین حجم کالوس‌ها در غلظت ۱ mg/l بدست آمد و افزایش و یا کاهش غلظت آن (۱/۵ mg/l و۰/۵ mg/l) باعث عدم رشد مناسب کالوس گردیده که با نتایج بدست آمده توسط سایرمحققان مطابقت دارد (۴، ۶، ۷، ۱۱).

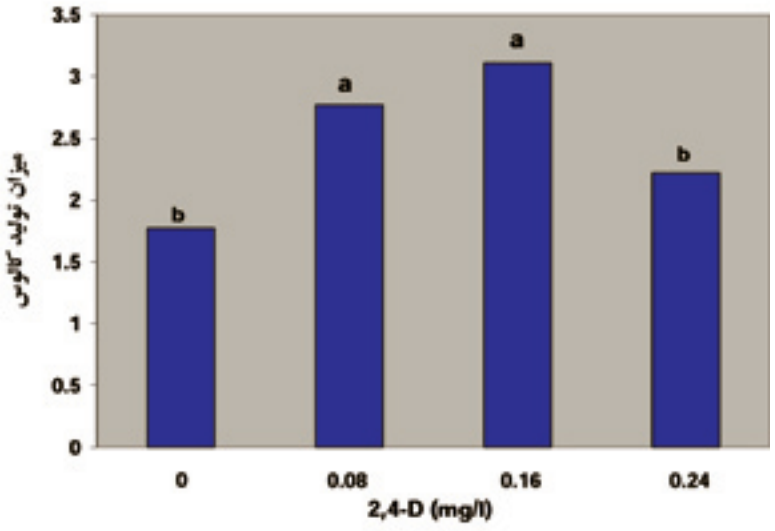
جدول۱: تجزیه واریانس درصد کالوس زایی و حجم کالوس مربوط به مرحله کالوس زایی در A.andreanum

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس زایی	حجم کالوس
2,4-D	۳	۵۲۱۴/۸۹**	۱۱/۵۱**
BA	۲	۷۴۴/۶۲**	۲/۱۹**
2,4-D *BA	۶	۱۱۸۹/۷۱**	۲/۵۳**
خطا	۸۴	۹۱/۷۱	۰/۲۶

** معنی‌داری در سطح ۱٪



نمودار ۱- مقایسه اثر سطوح مختلف BA بر میزان تولید کالوس درA.andreanum



نمودار ۲- مقایسه اثر سطوح مختلف2,4-D بر روی میزان تولید کالوس در A.andreanum

اثر غلظت 2,4-D بر کالوس زایی

نتایج بدست آمده از کالوس زایی ریز نمونه‌ها حاکی از معنی دار بودن اثر سطوح 2,4-D بر کالوس زایی ریز نمونه در سطح ۱٪ بود (جدول ۱). همچنین مقایسات میانگین داده‌ها در سطح ۱٪ توسط آزمون دانکن انجام شد.بنابر نتایج بدست آمده کالوس زایی در تمام محیط‌های کشت صورت گرفت. بنابراین وجود اکسین مانند 2,4-D برای تحریک (القاء) کالوس زایی ضروری نیست. به طوری که حتی در سه تیمار که فاقد 2,4-D بودند نیز کالوس زایی صورت گرفت. بنابراین حضور یک منبع BA به تنهایی برای القاء کالوس در ریز نمونه‌های برگ A.andreanum کافی است. با این وجود جدول تجزیه واریانس اثر معنی دار غلظت 2,4-D را بر روی حجم کالوس و درصد کالوس زایی نشان می‌دهد بنابراین اگرچه حضور اکسین (2,4-D) برای تولید کالوس ضروری نیست ولی اثر غلظت آن بر روی صفات ارزیابی شده معنی دار است. بالاترین میزان حجم کالوس و درصد کالوس زایی در غلظت ۰/۱۶ میلی گرم درلیتر 2,4-D حاصل شده است عدم 2,4-D و افزایش غلظت آن در حد ۰/۲۴ میلی گرم درلیتر باعث کاهش حجم کالوس و درصد کالوس زایی شده است. در مورد فقدان 2,4-D نیز چنین است (نمودار ۲). این نتیجه با نتایج سایرپژوهشگران مطابقت داشت (۴، ۶ ، ۷، ۹، ۱۱).

اثر متقابلD-2,4 و BA بر کالوس زایی

جدول تجزیه واریانس (جدول۱) وجود اثر متقابل معنی‌داری را بین غلظت 2,4-D ,BA بر روی درصد کالوس زایی و حجم کالوس نشان می‌دهد. تیمارهای محتوی۰/۰۸، ۰/۱۶ میلی گرم درلیترD-2,4 و به ترتیب محتوی ۰/۵ و ۱ میلی گرم درلیتر BA بهترین تیمارها از نظر تولید کالوس با حجم بالا بودند. در مجموع محیط محتوی ۰/۱۶ میلی گرم درلیترD-2,4 و ۱ میلی گرم درلیتر BA به دلیل ظرفیت بالای آن در تولید کالوس با حجم بزرگ‌تر و درصد کالوس زایی بالا به عنوان سطح هورمون مناسب جهت القاء کالوس زایی بر روی ریز نمونه‌های برگ A.andreanum رقم Tera شناخته شد (نمودار ۳).

اثر غلظت‌های مختلف BA بر باززایی

جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف BA بر روی تعداد شاخساره، طول بلندترین شاخساره و رشد کالوس در سطح ۱٪ معنی داراست. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول۳) که به مقایسه اثرات غلظت BA می‌پردازد بیانگر آن است که بین شش غلظت BA استفاده شده در این آزمایش از نظر تعداد شاخساره، طول بلندترین شاخساره و رشد کالوس اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید، به طوری که بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت فاقد BA حاصل گردید. همچنین محیط کشت فاقد BA به همراه محیط کشت‌های محتوی ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی گرم درلیتر بلندترین شاخساره‌ها را داشتند و افزایش بیشتر آن (۱ mg/l و۰/۸) سبب کاهش ارتفاع گردید.

از نظر رشد پینه در محیط باززایی که یک صفت نامطلوب محسوب می‌شود محیط فاقد BA از کمترین رشد پینه برخوردار بود و افزایش میزان BA سبب رشد پینه‌ها در محیط باززایی گردید.

بهترین سطوح غلظت BA جهت باززایی با مطالعات Kuniaski و Sreelatha مغایرت داشت، که می‌تواند به دلیل تفاوت ریز نمونه‌های استفاده شده و رقم مورد استفاده باشد، به طوریکه Uniaski (۷) غلظت BA ۰/۲ mg/lit و Sreelatha و همکاران (۱۳) غلظت BA ۱ mg/lit را مطلوب دانسته‌اند.

با توجه به اینکه همزمان در محیط باززایی، ریشه زایی نیز صورت گرفت از تیمار خاصی جهت ریشه زایی

جدول۲: تجزیه واریانس تعداد شاخساره، طول بلندترین شاخساره و رشد کالوس در محیط باززایی در A. andreanum

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد شاخساره	طول بلندترین شاخساره	رشد کالوس
BA	۵	۴/۱۵۷**	۲/۲۲۹**	۱۲/۰۲۴**
خطا	۳۶	۰/۰۲۳	۰/۰۳۹	۰/۰۴۷

** معنی‌داری در سطح ۱٪

جدول ۳: مقایسه میانگین سطوح غلظت BA از نظر تعداد شاخساره و طول بلندترین شاخساره و رشد کالوس در محیط باززایی در A.andreanum

سطح غلظت BA mg/L	تعداد شاخساره	طول بلندترین شاخساره	رشد کالوس
۰	۳/۸۵a	۳/۲۸a	۱/۱۴c
۰/۲	۳b	۳a	۱/۸۵ b
۰/۴	۲c	۳a	۴a
۰/۶	۲c	۳a	۴ a
۰/۸	۳b	۲ b	۴ a
۱	۲c	۲ b	۴ a

استفاده نگردید که با نتایج Sreelatha و همکاران مطابقت داشت، این امر می‌تواند به علت باقی ماندن اکسین(2,4-D) مرحله کالوس زایی در ریزنمونه و همچنین به علت خصوصیات ژنتیکی آنتوریوم باشد (۱۳).

منابع مورد استفاده

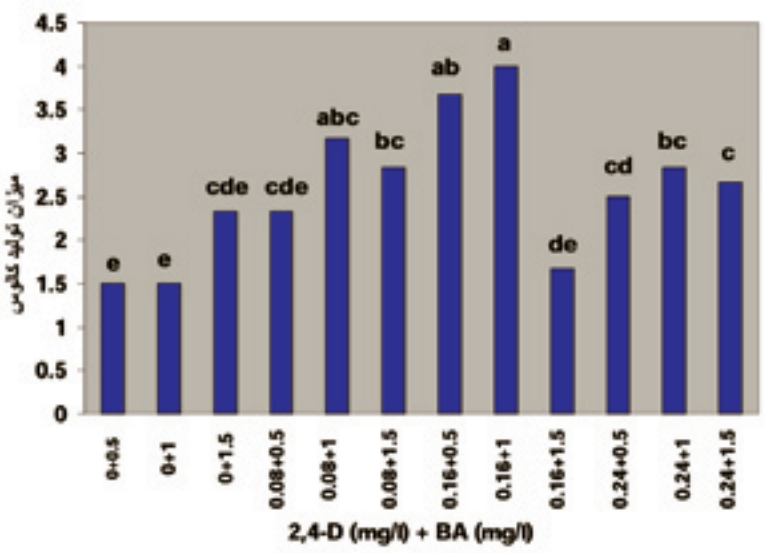
۱ - بابائی، ع. ر. ۱۳۸۱ ؛ بررسی ازدیاد دو رقم گل آنتوریوم با استفاده از سیستم کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان. ۳۹ صفحه..

۲ - توکلی حسینی، ع. ۱۳۷۹؛ پینه زایی در گونه‌های آنتوریوم. پایان نامه کارشناسی ارشد.دانشگاه شیراز. ۶۸ صفحه.

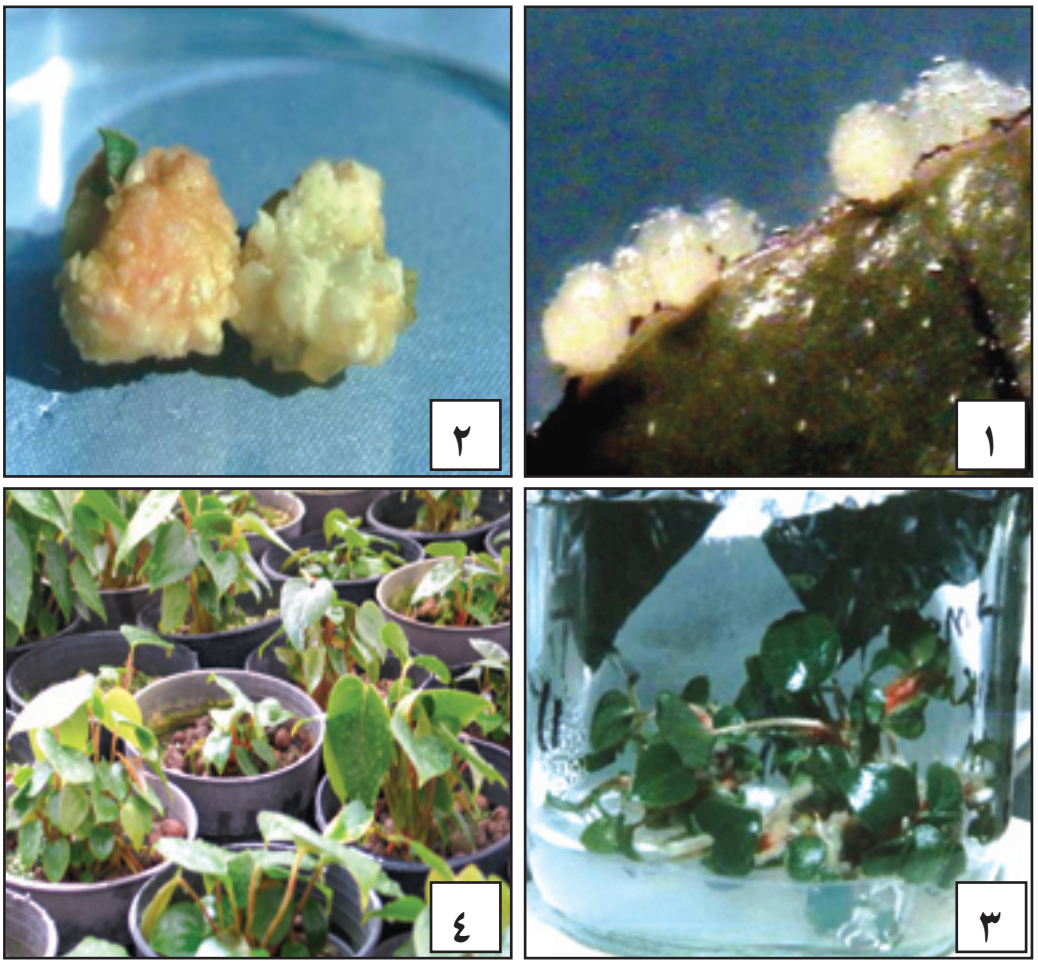
۳ - مرادی، پ. و ب. واعظ لیواری. ۱۳۸۳؛ بررسی تکثیر و تولیدA.andreanum از طریق سیستم کشت بافت اولین سمینار ملی گلهای شاخه بریده ایران.پاکدشت – تهران.

4- Geier, T. 1990; Anthrium. In. Ammirato PV. Evahns DA, Sharp WR , Bajaj X, P,S. (eds) Handbook of plant cell and tissue culture.Vo15. Ornamental species. Ms Graw- Hill, New York.

5- Hamideh , M. P.C. Debergh and A.G Abdul Karim. 1994; Mass propagation of Anthurium andraeanum L. through meristemoid clusters and retarded shoots. Mededilenigen. Faculteit Land bouwkundige en toegepate. Biologishe wetenschapen universities Gent



نمودار ۳- مقایسه اثر سطوح مختلف 2,4-D و BA بر میزان تولید کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در آنتوریوم آندرانوم



شکل ۱- مراحل تولید کالوس و باززایی گیاه از ریزنمونه‌های برگA.andreanum ۱-تولید کالوس در حاشیه قطعات برگ ۲- کالوس‌های جدا شده از قطعات برگ ۳- باززایی شاخساره از کالوس‌های حاصل از برگ ۴- سازگاری گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت در شرایط گلخانه ای

(Belgium). (Abstract) 59: 2491-2493.

6- Kuehnle A.R. and N. Sugii 1991; Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian anthurium. Hort Science, 26: 919-921.

7-Kunisaki, J.T. 1980; In vitro propagation of Anthurium andraeanum Lind. Hort Science, 15(4) 508-509.

8- Malhotran, S. K. Puchooa. And K. Goofoolye. 1998; Callus induction and plantlet regeneration in three varieties of Anthurium andraeanum. (Abstract).revue agricole et sucriere delile Maurice. 77,(1).25-32.

9- Matsumoto, T.K. and A.R. Kuehnle. 1997; Micropropagation of anthurium. In Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 40 High-Tech and micropropagation VI. (Bajaj Y.P.S.ed.) springer verlag. Berling. Heidelberg PP.14-29.

10- Pierik, RLM. 1979; Anthurium andraeanum plants produced from callus tissue cultivated in vitro. Physiology Plant. 37: 80-82.

11- Pierik, RLM and H. Steegmans. 1976; Vegetative propagation of Anthurium scherzerianum schott. Through callus cultures. Scientia Horticulture 4: 219-222.

12- Sanchez, R.T. O.C.Laffitle , M.D.Grandallie, L.N.Borrero, and M.B.Avila. 2000; Propagation in vitro de Anthurium andreanum lind. Variedad (Sonata). Biotechnologia vegetal. 1:33-38.

13- Sreelatha, U. SR. Nair, K Rajmohan, and N.S.Ramachandran. 1994; In vitro multiple shoot formation in anthurium. (Anthurium andraeanum Lind) South Indian Horticulture, 42(6). 348-352.

14- Teng, W.L. 1997; Regenration of Anthurium adventitious shoots using liquid or raft culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49(2): 153-156.

15- Vargas,T. E. Mejias, A. Oropeza, M.and E.Garcia.2004;Plant regeneration of Anthurium andreanum cv Rubrun.Electronic Journal of Biotechnology.