فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال اول، شماره ۴، پاییز ۱۳۸۸

بررسی اثر محیط های کشت و هورمون‌های مختلف بر ریزازدیادی گیاه کروتن *Codiaeum* (*aucobifolium* L.)

گیتی برزین*[۱]، مه‌لقا قربانلی[۲]

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

E-Mail: gitibarzin@iiau.ac.ir

چکیده

گیاه کروتن اکوبی‌فولیوم (*Codiaeum aucobifolium* L.)از تیرهٔ فرفیون (*Euphorbiaceae*) یکی از گیاهانی است که تولید آن به روش سنتی قلمه‌زدن ساقه‌های برگ‌دار صورت می‌پذیرد. متاسفانه این روش به طور کامل موفقیت آمیز نیست و تلفات قلمه‌ها زیاد است، به همین منظور نمونه‌های برگی و میانگره‌دار گیاه مزبور را روی محیط‌های کشت مختلف (Mitra & chaturvedi, Anderson, Murashige & Skoog) دارای غلظت ثابت هورمونی 2,4-D(1mg/lit) قرار داده شدند. حجیم‌ترین وشاداب ترین کال‌ها در محیط آندرسون بدست آمد. در آزمایش دیگری روند کال‌زایی جداکشت ها، با استفاده از هورمون BAP در غلظت‌های مختلف (0,0.5,1,2mg/lit) توام با هر یک از هورمون‌های اکسینی IAA ,2,4-D,NAA در غلظت‌های مختلف در محیط کشت آندرسون بررسی شد. نتایج نشان داد محیط An دارای BAP(1mg/lit), BAP (1mg/lit)+NAA(2mg/lit)+2,4-D(1mg/lit) + IAA(4mg/lit)

از نظر کال‌زایی مناسبتراست. به‌منظور تشکیل گیاهک کامل، کال‌های حاصله به محیط کشت آندرسون دارای هورمون‌های مختلف و یا شیر نارگیل (CM)انتقال داده‌شدند. تنها محیط مناسب برای تشکیل گیاهک کامل، محیط CM (20%) + 2, 4-D (1mg/lit) بود. برای ریزازدیادی، محیط An دارای غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین و سیتوکینین مورد استفاده قرار گرفت. بهترین غلظت هورمونی برای تکثیر شاخه محیط An دارای +IAA (0/5mg/lit) 2iP (1mg/lit) بود. بهترین غلظت هورمونی برای طویل شدن ساقه محیط An دارای IAA (2mg/lit) + BAP (1mg/lit) بود.

واژه های کلیدی: کروتن، اندام زایی، کال‌زایی، ریزازدیادی، هورمون‌های گیاهی.

مقدمه

گیاه کروتن (*Codiaeum aucobifolium* L.) یکی از گیاهانی است که تولید آن در دنیا و نیز در ایران به روش سنتی قلمه‌زدن ساقه‌های برگ‌دار صورت می‌پذیرد و از پرفروش‌ترین گیاهان زینتی است که این امر به دلیل رنگ‌های درخشان برگ‌ها واشکال متنوع برگی آن می باشد. کروتن از خانواده *Euphorbiaceae* و بومی اندونزی و مالزی می باشد. علاوه بر ارزش زینتی این گیاه، کروتن‌ها دارای ارزش دارویی نیز می باشند بطوریکه عصاره‌های برگها کروتن دارای خواص درمانی همچون ضدسرطانی، مسهل، مسکن، ضد قارچ و ضد آمیب می‌باشد (۱،۲). این گیاه همچنین به خاطر تولید متابولیت‌های ثانویه الکالوئید، ترپن ها و فلاونوئیدها ارزشمند است(۵،۴،۳).

* عهده دار مکاتبات

Archive of SID

www.SID.ir

کروتن می تواند توسط روش‌های هم چون قلمه زدن وازدیاد توسط دانه تکثیر یابد.اما این روش‌ها با میزان تولید کم گیاه حاصله همراه می‌باشد و به خاطر نرخ کند تکثیر این گیاه، تقاضا برای این گیاه بسیار وسیع است. ریزازدیادی نسبتا تکنیک جدیدی است و کاربرد این روش در غلبه بر سدهای تکثیری گیاهان ارزشمند است. کشت در شیشه به طور قابل توجهی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف ژنوتیپی، سن، سایز و تعداد گیاه مادر و جداکشت، شرایط رشد،ترکیب محیط و دیگر فاکتورهای فیزیولوژیکی است. برای رهایی از پاتوژن‌ها، کشت مریستم راسی ایده‌آل می‌باشد. مضاید دیگر تولید گیاه در یک زمان کوتاه بدون در نظر گرفتن فصل رویشی است(۶،۹،۸،۷).

مطالعه اخیر با هدف استقرار یک پروتوکل عمومی و سودمند برای تکثیر در شیشه کروتن انجام شد.

مواد و روش ها

در این بررسی از محیط‌های کشت پایه 1984 Mitra & chaturvedi, Murashige & Skoog, 1962; Anderson, 1975;با نسبت‌های هورمونی مختلف(جدول ۱) به‌منظور کال‌زایی و محیط آندرسون (با توجه به مناسب بودن این محیط نسبت به دو محیط دیگر) با نسبت‌های هورمونی مختلف(جدول ۲) به‌همراه شیرنارگیل(CM) با غلظت‌های ۵۰%، ۲۰%، ۱۰%، ۵% جهت تشکیل گیاهک کامل و ریزازدیادی استفاده شد.

جدول۱: محیط های کشت به منظور کال زایی

سیتوکینین/اکسین	۰	۰/۵	۱	۲	۴
۰	۰	۰/۵	۱	۲	۴
۰/۵	۰	۰/۵	۱	۲	۴
۱	۰	۰/۵	۱	۲	۴
۲	۰	۰/۵	۱	۲	۴
۴	۰	۰/۵	۱	۲	۴

جدول۲: محیط کشت آندرسون به منظور تشکیل گیاهک کامل و ریزازدیادی

	۱ mg/l BAP	۱ mg/l 2ip	۱mg/l Kin
IAA 0/25	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵
IAA ۰/۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵
2,4,D ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵
2,4,D ۰/۵	۱ ۰/۵	۱ ۰/۵	۱ ۰/۵
NAA ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵	۱ ۰/۲۵
NAA ۰/۵	۱ ۰/۵	۱ ۰/۵	۱ ۰/۵

از قطعات برگی به منظور کال زایی و از قطعات میانگره ای جهت ریزازدیادی استفاده شد.نمونه‌های گیاهی (قطعات برگی و میانگره) پس از شستشو با آب جاری و شوینده، با الکل ۹۶% و شستشو با آب مقطر سترون (۲ بار) استریل گردید. نمونه ها پس از کشت در محیط‌های کشت ذکر شده در بالا با دمای $۲۵ \pm ۲^{0}C$ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. قطر کالوس‌ها با استفاده از کاغذ شطرنجی و خط‌کش اندازه‌گیری شد. هر آزمایش با طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با ۳ تکرار و در هر تکرار ۴ نمونه اجرا شد. جهت بررسی بیشتر و تجزیه تحلیل آماری نتایج حاصل از تولید کالوس و گیاهک کامل گیاه کروتن از نرم افزار , SPSS ver:10, استفاده گردید.

نتایج

روند کال زایی

روند تغییرات میانگین اندازه کال، رنگ کال و ریشه‌زایی در جداول زیر به تفکیک آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: بررسی اندازه رنگ و ریشه زایی از کالوس

محیط‌های کشت	رنگ کالوس	میانگین اندازه کال در۰/۰۵> P	ریشه‌زایی
۰/۵ mg/l BAP	زرد	۱۵۰ b (mm)	
۱mg/l BAP	زرد	۴۰۰ a	
۲mg/l BAP	زرد - قرمز	۱۸۰ b	
۰/۵ mg/l NAA	زرد	۸۰۰a	
۱ mg/l NAA	زرد	۷۹۰ a	
۲mg/l NNA	زرد	۸۲۰ a	
۴mg/l NAA	زرد	۸۱۰ a	
۰/۵/۰/۵ mg/l BAP /NA	زرد	۸۱۰ ab	
۰/۵/۱ mg/l BAP /NAA	زرد	۷۹۰ ab	
۰/۵/۲ mg/l BAP /NAA	سبز روشن	۷۲۰ ab	
۰/۵/۴ mg/l BAP /NAA	سبز روشن	۷۹۰ c	
۱/۰/۵ mg/l BAP /NAA	زرد	۱۰۰۰ ab	
۱/۱ mg/l BAP /NAA	زرد	۱۱۰۰ ab	
۱/۲ mg/l BAP /NAA	زرد	۱۵۰۰a	
۱/۴ mg/l BAP /NAA	زرد مایل به سبز	۱۰۰۰ ab	
۲/۰/۵ mg/l BAP /NAA	زرد مایل به سبز	۱۱۰۰ ab	ریشه‌زایی
۲/۱ mg/l BAP /NAA	زرد	۷۹۰ ab	
۲/۲ mg/l BAP /NAA	زرد	۷۹۰ ab	
۲/۴ mg/l BAP /NAA	سبز	۹۰۰ ab	
۴/۰/۵ mg/l BAP /NAA	زرد	۸۹۰ ab	
۴/۱ mg/l BAP /NAA	سبز	۱۲۰۰ ab	
۴/۲ mg/l BAP /NAA	زرد	۱۲۰۰ ab	
۴/۴ mg/l BAP /NAA	زرد مایل به سبز	۵۰۰ b	

جدول ۴: بررسی اندازه رنگ و ریشه زایی از کالوس

محیط کشت	رنگ کالوس	میانگین اندازه کال در۰/۰۵> P
۰/۵ mg/l IAA	زرد	۴۰۰b
۱mg/l IAA	سبز	۸۵۰ab
۲mg/l IAA	سبز	۸۵۰ab
۴mg/l IAA	زرد	۱۲۰۰a
۰/۵/۰/۵ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۴۰۰b
۰/۵/۱ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۶۰۰b
۰/۵/۲ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۶۰۰b
۰/۵/۴ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۱۲۰۰a
۱/۰/۵ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۹۰۰b
۱/۱ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۱۰۰۰b
۱/۲ mg/l BAP / IAA	سبز روشن	۱۰۰۰b
۱/۴ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۱۷۰۰a
۲/۰/۵ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۶۵۰b
۲/۱ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۷۰۰b

Archive of SID

www.SID.ir

۲/۲ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۹۰۰ab
۲/۴ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۱۴۰۰a
۴/۰/۵ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۱۰۰c
۴/۱ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۵۰۰b
۴/۲ mg/l BAP / IAA	زرد-قرمز	۵۰۰b
۴/۴ mg/l BAP /IAA	زرد-قرمز	۷۹۰a

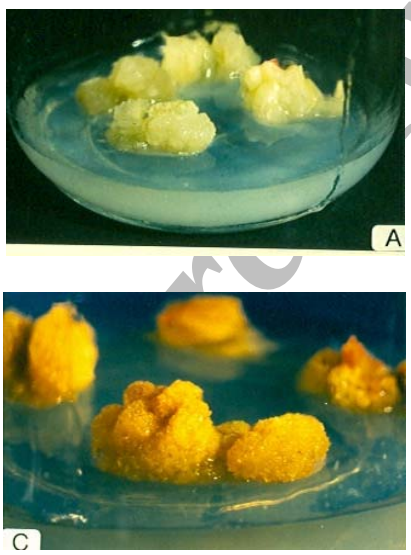
جدول ۵: بررسی اندازه رنگ و ریشه زایی از کالوس

محیط کشت	رنگ کالوس	میانگین اندازه کال در P <۰/۰۵
۰/۵ mg/l 2,4-D	زرد	۲۰۰۰ b
۱ mg/l 2,4-D	زرد	۴۰۰۰ a
۲ mg/l 2,4-D	زرد	۱۵۰۰ b
۴ mg/l 2,4-D	زرد	۱۰۰۰ b
۰/۵/۰/۵ mg/l BAP/2,4-D	زرد مایل به سبز	۱۰۰۰ b
۰/۵/۱ mg/l BAP/2,4-D	زرد مایل به سبز	۱۷۰۰ a
۰/۵/۲ mg/l BAP/2,4-D	زرد مایل به سبز	۱۶۰۰ a
۱/۰/۵ mg/l BAP/2,4-D	سبز	۱۰۰۰ b
۱/۱ mg/l BAP/2,4-D	سبز	۱۴۰۰ a
۱/۲ mg/l BAP/2,4-D	سبز	۱۰۰۰ b
۲/۰/۵ mg/l BAP/2,4-D	سبز روشن	۱۰۰۰ a
۲/۱ mg/l BAP/2,4-D	سبز	۵۰۰ b
۲/۲ mg/l BAP/2,4-D	زرد	۵۰۰ b

درخصوص کال‌زایی از بین ۳ هورمون اکسینی NAA,2 ,4-D,IAA، بهترین هورمونها به ترتیب ۴-۱ mg/lNAA<۴mg/lIAA<۱mg/l2 ,4-D می باشند.

در استفاده توام هورمون های BAP وNAA بهترین محیط BAP /NAA ۱/۲ mg/l بود(شکل1A) و کوچکترین کال ها در محیط دارای BAP /NAA ۴/۴mg/l حاصل شدند.بیشترین اندازه کال در غلظت های مختلف توام BAPوIAA مربوط به غلظت BAP / IAA ۱/۴ mg/l(شکل1B) و کوچکترین کال ها در محیط دارای ۴/۰/۵ mgl BAP / IAA بود.

در استفاده همزمان دو هورمون BAP و2,4-D بهترین محیط ها ۱mg/Lbap-۰/۵و۱mg/l2,4-D-۲و کوچکترین کال ها در محیط دارای mg/l2,4-D۱و۲+۲mg/lBAP حاصل شدند.



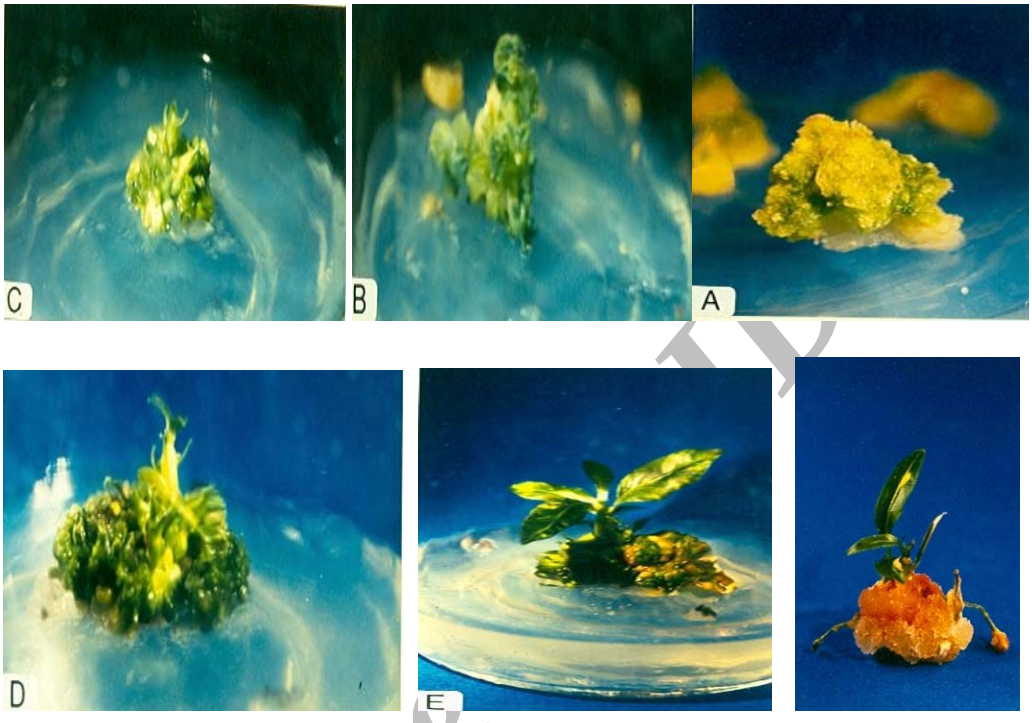
شکل:۱بهترین محیط ها برای کال زایی:A :مخیط An شامل2 mg/lNAAو, BAP=1mg/l C :محیط شاملBAP=1mg/lوIAA=2mg/l An

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج تشکیل گیاهک کامل

برای القای اندام زایی و تشکیل گیاهک کامل، کال های حاصله به محیط An (جدول۲)انتقال داده شدند.از بین غلظت های مختلف هورمونی و شیره نارگیل،تنها کال هایی که به محیط An دارای ۲۰%CM+۱mg/l2,4-D انتقال داده شده بودند،قدرت تشکیل گیاهک کامل داشتند(شکل۳).



شکل۳:مراحل تشکیل گیاهک کامل از کال در محیط An حاوی(1mg/l)2,4-D و(20%) CM

A - کال در این محیط در مناطق سبز شده، کانون های اولیه اندام زایی تشکیل می گردد. B- کال سبز رنگ بعد از ۱/۵ ماه که اثاری از تمایز برگها و تا حدودی جوانه های رویشی ساقه در انها قابل رویت است. C- در توده کال های سبز رنگ بعد از دو ماه اثار تشکیل جوانه های رویشی متعددی را می توان دید. D- بعد از ۳ ماه سطح کال توسط جوانه های رویشی اشغال شده است که یکی از جوانه ها به علتچیرگی راسی نسبت به سایر جوانه ها رشد بیشتری دارد. E- رشد جوانه رویشی ساقه همراه با ۴ برگ مشخص شده است. F - محیط ریشه دارشدن ساقه های حاصل از جداکشت An دارای ۲mg/lNAA+۲mg/lBAP

نتایج ریزازدیادی با استفاده از میانگره

برای ریزازدیادی محیطAn باغلظت های موجود در جدول۲ مورد استفاده قرار گرفت.بهترین غلظت هورمونی برای تکثیر شاخه محیط An دارای ۲mg/lIAA +۱mg/lBAP بود(شکل۴).

برای طویل شدن شاخه محیط An دارای 2ip ۱ mg/l (دی متیل آلیل آمینو پورین) و ۰/۵ mg/l IAA می باشند.

شکل۴: بهترین محیط برای ریزازدیادی IAA=2mg/l و BAP=1mg/l

www.SID.ir

بحث

اندازه کال‌های تشکیل شده در BAP به تنهایی در غلظت‌های مختلف (۲و۱و۰/۵ میلی گرم در لیتر)همواره کوچکتر از کال های تشکیل شده در محیط های دارای فقط اکسین‌ها(NAA,IAA) می‌باشد و حتی در غلظت BAP(۴ mg/l) هیچگونه کالی تشکیل نشد، در حالی که در محیط‌های دارای غلظت‌های بالا(۴ mg/l)از هر یک از هورمون های اکسینی مورد بررسی، کال تشکیل شده است. در مجموع می توان این فرض را مطرح کرد که محیط‌های دارای اکسین به تنهایی یا توام با غلظت‌های مطلوب سیتوکینینی در این گیاه محیط‌های مناسبی برای کال‌زایی است. این نتایج با نتایج Caracas و همکاران در سال ۲۰۰۸ که هورمون BAP را برای کال‌زایی از جداکشت‌های برگی *C.urucurana* مفید نمی‌داند همخوانی دارد (۱۰).

در ارتباط با مقایسه عملکرد هر یک از هورمونهای اکسینی NAA و IAA می‌توان این نتیجه را گرفت که غلظت های مناسب برای تولید کال‌های بزرگتر به ترتیب زیر می‌باشند: NAA mg/l< ۴ mg/l IAA ۱ - ۴ است. این ترتیب برحسب اندازه کال در محیط های An که دارای فقط هورمون‌های اکسینی تنظیم شده‌است. در استفاده توام هورمون‌های BAP وNAA با غلظت های مختلف بزرگترین کال‌های تشکیل شده در محیط دارای(۱ mg/l)BAP +(۲mg/l)NAA و کوچکترین کال ها در محیط BAP(۴mg/l)+ BAP(۴mg/l) +(۴ mg/l)NAA و تنها در محیط هایی که غلظت یکی از دو هورمون NAA یا BAP که توام با هم استفاده شده‌اند، بیش از ۲mg/l بوده است، کال‌ها دارای رنگ زرد مایل به سبز یا سبز بودند. در غلظت های افراطی هر دو هورمون بخش‌هایی از کال علاوه بر رنگ زرد - سبز دارای رنگیزه‌های آنتوسینین قرمز می باشند، که به نظر می رسد که این حد غلظت های هورمونی و برهم کنش آنها با هم عامل موثر در تحریک بیوژنز کلروپلاست و نیز بیوسنتز آنتوسیانین‌ها می‌باشد. در غلظت های پایین BAP/NAA کال هازرد و سست و در غلظت های بالا کال‌ها سفت بودند. با توجه به اینکه در غلظت‌های طراحی شده هدف بررسی اثرات غلظت های هورمونی بر روند کال زایی،اندام زایی و یا رویان زایی بوده است، به جز محیط‌های 2mg/lBAP+2mg/lNAA و 4mg/ lBAP + 1mg/lNAA که توانایی تشکیل ریشه داشتند، در سایر محیط‌ها، قطعات جداکشت برگی و میانگره‌ای تنها توانایی کال‌زایی را دارند این نتایج با نتایج Catapan در سال ۲۰۰۱ بر روی گیاه *Phyllanthus stipulatus* که هورمون NAA را در ریشه زایی کالوس موثر می داند مطابقت دارد(۱۱).در خصوص BAP/IAA با اندازه متوسط کال‌های تشکیل شده در محیط دارای BAP/IAA و IAA به تنهایی بزرگتر از اندازه کال های تشکیل شده در محیط دارای غلظت های مختلف BAP به تنهایی است که این موضوع همچنین نشانگر اثر برهم کنش مطلوب کاربرد توام دو هورمون سیتوکینین و اکسین در روند کال‌زایی این گیاه است این نتایج با نتایج Caracas و همکاران در سال ۲۰۰۸ که اثر دو هورمون BAP/NAA را در کال‌زایی از جداکشت‌های برگی *C.urucurana* نسبت به دو هورمون BAP/IAA چندان مفید نمی‌داند همخوانی دارد(۱۰).

به منظور اندام‌زایی، کال‌های زرد رنگ به انواع محیط‌های مناسب با هورمون‌های مختلف و نیز محیط‌های دارای شیره‌نارگیل + 2,4 -D انتقال داده شدند. آنچه مشهود و اشکار است آن است که کال های زرد رنگ قبل از هر گونه اندام زایی در محیط Cm20%+(1mg/l)2,4-D شروع به سبز رنگ شدن می کنند. pillai در سال ۱۹۶۹ نشان داد که کال‌هایی که در نور ممتد قرار دارند سفید رنگ باقی مانده، اندام زایی نمی کنند(۱۲). بهترین محیط برای تکثیر شاخه کروتن محیط (1mg/l) BAP(+(2mg/l))NAA و محیط طویل شدن شاخه ها در محیط An دارای 2ip(1 /lit)+IAA(.5mg/lit) می‌باشد.این نتایج با نتایج Asokan و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر روی کایوچو Kin(0.5-1.5mg/lit)+IAA(1.5-3mg/lit) که برای رشد و نمو ساقه مناسب است از نظر نسبت هورمونی همخوانی دارد(۱۳). یعنی برای رشد و نمو شاخه ها در گیاه کروتن اکوبیفولیوم نسبت هورمون‌های اکسینی باید بالاتر از سیتوکینینی باشد که نتایج Konan همکاران در سال ۱۹۹۷بیشترین بازده القا ساقه و تکثیر ان را در گیاه کاساوا در محیط دارای BAP میداند ونیز با نتایج Gunatileke در سال ۱۹۸۸ بر روی کائوچو که بهترین

Archive of SID

www.SID.ir

محیط را برای تکثیر جوانه محیط دارای هورمون BAP (نسبت به Kin و2ip) می داند همخوانی دارد(۱۵،۱۴). همچنین با نتایج Nasib و همکاران در سال ۲۰۰۸ که هورمون BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را در بازرایی ساقه در جداکشت های میانگره مفید می داند(۱۶)و Sen و همکاران در سال ۲۰۰۹ که هورمون BAP را در باززایی ساقه از جداکشت های میانگره *Phyllanthus tipulatus* و Kalidas در 2009 برروی گیاه *Phyllanthus urinaria* و2001 Thoyajasksha بر روی گیاه *Dictyospermum ovalifolium* مفید می دانند همخوانی دارد (۱۹، ۱۸،۱۷). برای ریشه‌دار کردن نمونه های گیاهی هنگامیکه این گیاهان به محیط An دارای NAA (2mg/lit)+ BAP (2mg/lit)انتقال داده شدند در این محیط بخش قاعده‌ای گیاه که در تماس با محیط کشت بود ضمن تشکیل کال شروع به تشکیل ریشه های نابجا نمودند، که این با نتایج Sujatha& Mukta در سال ۱۹۹۶ بر روی گیاه جاتروفا از نظر نوع هورمون اکسینی بکار رفته همخوانی دارد(۲۰) این محقق از هورمون NAA به تنهایی استفاده کرده در حالیکه قطعات گیاهی Codiaeum در غلظت های مختلف NAA تولید کال میکندو تنها محیط مناسب برای ریشه زایی محیط دارای هورمون BAP و NAA می باشد.

منابع

1- Kupchan, S.M., I. Uchida, A.R. Branfman, R.C. Dailey and B.Y. Fei. Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. Sci., 191:571-572. 1976.

2- Deshmukh, S.D. and M.N. Borle. Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products. Ind. J. Ent., 37(1):11-18. 1975.

3- Martins, A.P., L.R. Salgueiro, M.J. Conclaves, R. Vila, F. Tomi, T. Adzet, A.P. Cunha, S. Canigueral and J. CasanovaAntimicrobial activity and chemical composition of bark oil of Croton stellulifer. Planta Medi., 66: 647-652. 2002.

4- Maciel, A.M., A.C. Pinto, S.N. Brabo and M.N. Silva. Terpenoids from Croton cajura. Phytochem., 49: 823-826. 1998.

5- Puebla, P., J.L. Lopez, M. Guerrero, R. Carron, M.L. Martin, L.S. Roman and A.S. Feliciano. Neo-clerodane diterpenoids from Croton schiedeanusPhytochem., 62: 551-554. . 2003.

6- Mulabagal, V. and H.S. Tsay. Plant Cell Cultures: An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. of App. Sci. and Eng., 2(1): 29-48. 2004.

7- Orlikowska, T., I. Sabata and E. Nowak. Adventitious shoot regeneration on explants of Anthurium, Codiaeum, Dieffenbachia, Gerbera and Spathiphllum for breeding purposes. Acta Hort., 420: 115-117. 1995.

8- Orlikowska, T., I. Sabata and D. Kucharska. The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on adillary shoot proliferation of Codiaeum variegatum Blume var. pictum Muell. Arg. Cv. Excellent. Sci. Horti., 85(1-2): 103-111. 2000.

9- Shibata, W., F. Murai, T. Akiyama, M. Siriphol, E. Matsunaga and H. Morimot. Micropropagation of Croton sublyratus Kurz; a tropical tree of medicinal importance. Plant Cell Rep., 16: 147-152. 1996.

10- Ednabel Caracas LimaI; Renato PaivaII; Raírys Cravo NogueiraIII; Fernanda Pereira SoaresIV; Eduardo Bucsam EmrichV; Álvaro Augusto Naves SilvaVI Ciênc. agrotec. Callus induction in leaf segments of Croton urucurana
Baill vol.32 no.1 Lavras Jan./Feb. 20 08.

11- Catapan, E., Otuki, M.F. and Vianna, A.M. In vitro culture of Phyllanthus stipulatus

Archive of SID

www.SID.ir

(Euphorbiaceae). Revista Brasileira Botanica, Sao Paulo, 24: 25-34. 2001.

12- Pillai, S. K., & Hildebrandt A. C. Induced Differentiation of Geranium Plants from Undifferentiated in vitro. American Journal of Botany. 56(1):.52-58.1969.

13- Asokan, M.P., Sobhana, P., Sushmakumari, S. and Sethuraj, M.R. Tissue culture propagation of rubber (Hevea brasiliensis Mull.-Arg.) Clone GT1. Indian Journal of Natural Rubber Research, 1:10-12. 1988.

14- Konan, N.K., Schöpke, C., Carcamo, R., Beachy, R.N. and Fauquet, C. An efficient mass propagation system for Cassava (Manihot esculenta Crantz) based on nodal explants and axillary bud derived meristems. Plant Cell Reports, 16: 444 - 449. 1997.

15- Gunatilleke, I.D. and Samaranayake, C. Shoot tip as a methods of micropropagation of Hevea brasiliensis. Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka, 68:33-44. 1988.

16- Nasib, A., K. Ali and S. Khan 2008. In vitro propagation of Croton (Codiaeum variegatum), Pak. J. Bot. 40(1): 99-104.

17- Sen, ASharma, . M.M. Grover, D. A. Batra. In Vitro Regeneration of Phyllanthus amarus Schum. and Thonn.: An Important Medicinal Plant. Our Nature, Vol 7, No 1 2009.

18- Kalidass, C., and V.R. Mohan. In vitro rapid clonal propagation of *Phyllanthus urinaria* Linn. (Euphorbiaceae)- A medicinal plant. Researcher 1(4): 56-61. 2009.

19- Thoyajasksha and R. Ravishankar. In vitro micropropagation of *Dictyospermum ovalifolium* Wight. A rare endemic plant in Western Ghats India. *Plant Cell Biol. Mol. Biol.* ***2*****:** 57-62. 2001.

20- Sujatha, M. and Mukta, N., Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of Jatropha curcas. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44, 135–141. 1996.

.

Archive of SID

www.SID.ir