جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۹، جلد ۳، شماره ۲، بهار ۸۹، صفحه ۵۳ تا صفحه ۵۹

کالوس‌زائی و اندام‌زائی گیاه داوودی *Chrysanthemum morifolium Ramat L.*

مریم پیوندی[۱]، میترا مرادتهرانی[۱]، احمد مجد[۲]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران-شمال. m_peyvandi@iau-tnb.ac.ir
۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۲

چکیده

داوودی گیاه زینتی با ارزشی است که در روش‌های سنتی با کشت قلمه و یا بذر تکثیر و ریز ازدیادی آن با روش‌های مختلف از جمله باز زایی گیاه از کالوس انجام می گیرد. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر سیتوکینین‌های مختلف (بنزیل آمینو پورین (BAP) و کینتین (Kin)) همراه با اکسین‌های مختلف(۲و۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (D-۲,۴) و اندول بوتیریک اسید (IBA) بر کالوس زائی و اندام زائی داوودی زینتی می‌باشد. قطعاتی از برگ‌های سترون شده در محیط کشت پایه MS دارای هورمون‌های مختلف سیتوکینین و اکسین کشت شد. نتایج کشت جدا کشت‌ها در محیط دارای هورمون‌های IBA و BAP نشان داد که در کالوس‌های حاصل از محیط کشت دارای ۲میلی گرم بر لیتر IBAو۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP ریشه و در محیط کشت دارای ۱میلی گرم بر لیتر IBA و ۱میلی گرم بر لیتر BAP اندام هوائی تولید می شوند. نتایج حاصل از کشت جداکشت‌ها در محیط کشت دارای D-۲,۴ و Kin نشان دادکه در مرحله کشت فقط ریشه زائی در محیط‌های دارای۰/۵ یا۴میلی گرم بر لیتر۲و۴ دی نیترو فنل و۲میلی گرم بر لیتر Kinصورت می گیرد. ریشه زائی در واکشت‌های بعدی در محیط اولیه یا محیط فاقد هورمون افزایش می‌یابد. در مرحله کشت تولید ساقه مشاهده نشد، اما در کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی۰/۵ میلی گرم بر لیتر۲و۴ دی نیتروفنل و۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin یک ماه پس از واکشت نمونه‌ها در محیط کشت MS فاقد هورمون ساقه و برگ تولید شد. هم چنین در حضور ترکیب هورمونی ۲و۴-DوBAP، بیشترین رشد کالوس و ریشه زایی در تیمار ۴میلی گرم بر لیتر۲و۴ دی نیترو فنل و۲میلی گرم بر لیتر BAP به دست آمد. روی کالوس‌های حاصل از محیط کشت دارای۴میلی گرم بر لیتر۲و۴ دی نیترو فنل و ۱میلی گرم بر لیتر BAP به ریشه و برگ به طور هم زمان تولید شد.

کلید واژه: گل داوودی، اکسین، سیتوکینین، کالوس زائی، اندام زائی.

مقدمه

گل داوودی *Chrysanthemum morifolium Ramat.* در ردیف دومین گل شاخه بریده پس از رز می باشد(۱). داوودی از لحاظ گیاه‌شناسی به تیره *Asteraceae* تعلق دارد که در حدود ۳۰ گونه یک‌ساله و چند ساله علفی، چوبی و نیمه چوبی معطر از آن در عالم وجود دارد.

در ازدیاد گل داوودی به عنوان گیاهی تزئینی، توجه بسیاری به رنگ گل، اندازه و شکل آن شده است. محدود بودن خزانه ژنی آن، محدودیت در آمیزش این گیاهان به واسطه ناسازگاری یا اختلاف در سطوح پلوئیدی بین والدین، رشد یکنواخت و گلدهی متقارن آن استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک برای اصلاح ارقام را

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مشکل کرده است (۲). با توجه به اهمیت این گیاه در دنیا، استفاده از روش‌های کشت آزمایشگاهی جهت باززایی گیاهچه‌های آن از ریز نمونه‌ها، تکثیر، تولید گیاهان عاری از ویروس، اصلاح و معرفی ارقام جدید گستردگی روز افزونی یافته است. ریز ازدیادی داوودی با روش‌های مختلف از جمله باززایی گیاه از بخش‌های مریستمی(۴و۳) باز زایی گیاه از کالوس(۷، ۶و۵) و رویان‌زائی بدنی (۸) انجام می گیرد.

در روش باززائی گیاه از کالوس، تمایززدائی از جداکشت در محیط دارای هورمون صورت و کالوس تولید می‌شود. کالوس در اصل بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که معمولاً در محل زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته، ایجاد می‌شود که گاهی به طور خود به خودی اندام‌های نا بجا و یا رویان از یک کالوس ایجاد می‌شوند. اگر در یک جداکشت فقط سلول‌های تمایز یافته وجود داشته باشد، قبل از تقسیم سلولی، باید تمایز زدایی صورت بگیرد که معمولاً در سلول‌های پارانشیمی‌انجام می شود. کنترل فرایندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را از کالوس سبب می شود.گرچه میزان تنظیم کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه (۱۰ و۹) حتی پتانسیل ریخت زایی به غلظت اجزایی چون نمک‌های ماکرو، نمک‌های میکرو و ویتامین‌ها ارتباط دارد (۱). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کالوس‌های برگ و ساقه داوودی نقشی همانند گره و شاخه‌های رأسی را در تکثیر سریع این گیاه دارا می‌باشند. تاثیر سیتوکینین‌ها و اکسین‌های مختلف بر اندام‌زائی جداکشت‌های مختلف توسط محققان مختلف مطالعه شده است(۱، ۱۱ و ۱۲).

در پژوهش حاضر برای بهینه نمودن شرایط کالوس‌زائی و اندام‌زائی، تاثیر سیتوکینین‌های مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP) و کینتین (Kin) همراه با اکسین‌های مختلف ۲و۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (D-۲,۴) و اندول بوتیریک اسید (IBA) بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

این پروژه در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت.

نمونه گیاهی: نمونه‌های گیاهان گلدانی داوودی از باغچه پرورش گیاهان زینتی در تهران تهیه و پس از جدا کردن گل‌های خشک شده، بذرهای آن برای انجام پژوهش استفاده شد.

بذرها با اتانول ۷۰ درجه (۱ دقیقه)، وایتکس ۳۰٪ (۱۵ دقیقه)، شستشو با آب مقطر (سه بار) سترون گردیدند. برای تهیه محیط کشت، پس از افزودن ترکیبات محیط کشت MS (۱۱)، pH (۵/۸) قبل از اضافه کردن آگار (۷ گرم بر لیتر) به محیط کشت، تنظیم و با اتوکلاو در دمای ۱۲۰درجه سانتی‌گراد سترون گردید.

سپس بذرها در محیط کشت MS حاوی BAP (۰/۲میلی‌گرم‌برلیتر) کشت شدند. ۶ هفته بعد واکشت نمونه‌ها در محیط کشت MS (۱۳) دارای ۲ ایزوپنتیل پیروفسفات (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) انجام شد. از گیاهچه‌های سه ماهه سترون در مراحل بعدی استفاده شد.

کشت جدا کشت‌های برگ: قطعات برگ گیاه سترون در ابعاد ۰/۵ سانتی متر در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی مختلف کشت و در اتاق رشد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت نور فلورسنت در دمای ۲ ±۲۵ درجه سانتی‌گرادنگهداری شدند.. روند کالوس زائی و اندام زائی ۴۵ روز پس از هر تیمار بررسی شد.

تحلیل آماری: هر تیمار حداقل با ۲۰ تکرار انجام شد. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS(ver. ۱۴) آنالیز و آنالیز واریانس میانگین‌ها با برنامه ANOVA و گروه بندی میانگین‌ها با آزمون دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) بررسی شد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نتایج

تاثیر هورمون‌های IBA و BAP

در غلظت‌های مختلف IBA وBAP تورم و تولید کالوس روی قطعات برگی سه هفته پس از کشت، به وقوع پیوست. پیشرفت در وضعیت کال‌زایی و رشد کالوس در ناحیه دمبرگ چشم‌گیر بود و کالوس‌ها در حاشیه لبه برگ به وجود می‌آیند. کمترین اندازه کالوس در تیمار BAP (۱میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۱میلی‌گرم بر لیتر) و بیشترین اندازه کالوس در تیمار BAP (۰/۵میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۱میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد(جدول۱).

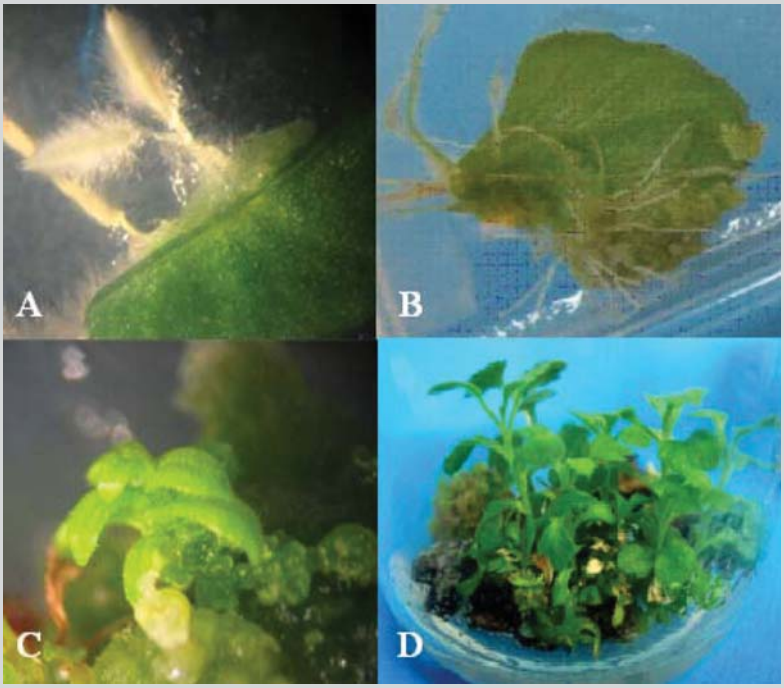
ریشه‌زایی (۵۰٪) در محیط دارای BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۲میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده و غالباً تولید ریشه از ناحیه رگبرگ میانی برگ و در نمونه‌های دارای کال‌زایی با رشد متوسط قابل رویت بود (شکل۱).

ایجاد اندام هوایی (به صورت جوانه) (۵/۵۵٪) در محیط دارای BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر) وIBA (۱میلی‌گرم بر لیتر) بر سطح کال از ناحیه دمبرگ قابل رؤیت بود که در زمانی دیرتر از ریشه‌هادر هفته پنجم پس از کشت به وجود آمد. کالوس‌های دارای جوانه، پس از انتقال به محیط کشت دارای BAP (۲/۵میلی‌گرم بر لیتر) رشد یافتند(شکل ۱).

جدول۱- میانگین اندیس کالوس، ریشه زائی و جوانه زنی از کالوس‌های قطعات برگ در تیمارهای هورمونی BAP و IBA (گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن p≤۰/۰۵)

BAP (mgL^{-1})	IBA (mgL^{-1})	میانگین اندیس کالوس	ریشه‌زایی (٪)	جوانه‌زنی (٪)
۱	۱	۱/۳۳ (a)	۰/۰۰(b)	۵/۵۵(a)
۱	۲	۱/۳۵(a)	۰/۰۰/(b)	۰/۰۰(b)
۰/۵	۲	۱/۶۸(a)	۵۰/۰۰(a)	۰/۰۰(b)

* حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن و حروف مشترک نشان دهنده معنی دار نبودن تفاوت در میانگین‌ها است.



شکل ۱- (A و B) ریشه زایی در قطعات برگی گیاهچه‌های سترون در ترکیب هورمونی BAP (۰/۵میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۲میلی‌گرم بر لیتر)، (C) جوانه زایی کالوس درمحیط کشت MS دارایBAP (۱میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۱میلی‌گرم‌برلیتر)، (D) تکثیراندام‌های هوایی در محیط کشت MS دارای BAP (۲/۵میلی‌گرم بر لیتر)

تاثیر هورمون‌های D-4,2 و Kin

کشت جداکشت‌های برگ گیاهان سترون در محیط کشت MS دارای تیمارهای D-4,2 و Kin منجر به تولید کالوس از لبه‌های بریده نمونه‌های برگی در سطح اپیدرمی‌شد. کمترین اندازه کالوس در تیمار دارای D-4,2 (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و Kin (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) (و بیشترین اندازه کالوس در تیمار دارای D-4,2 (۱میلی‌گرم‌برلیتر) و Kin (۲میلی‌گرم بر لیتر) (مشاهده شد(جدول۲).

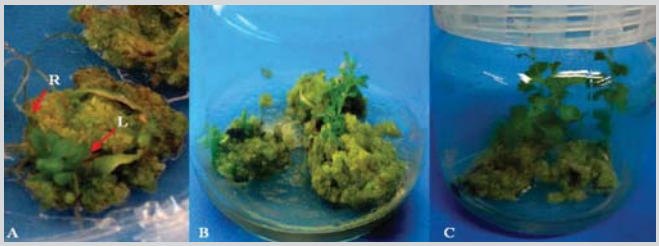
بیشترین ریشه‌زایی در تیمار دارای D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و Kin (۱میلی‌گرم‌برلیتر) که اختلاف معنی داری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد(جدول ۲)(شکل ۳). نمونه‌های ۴۵ روزه در محیط کشت اولیه و یا در محیط کشت فاقد هورمون کشت شدند و القای تولید ریشه در هر دو حالت افزایش یافت(جدول ۲).

در مرحله کشت، جوانه‌زائی مشاهده نشد، اما در کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و Kin (۲میلی‌گرم‌برلیتر) (و یا محیط دارای D-4,2 (۴میلی‌گرم‌برلیتر) و Kin (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) یک ماه پس از واکشت نمونه‌ها در محیط کشت MS فاقد هورمون جوانه و برگ تولید شد (به ترتیب ۵/۸۸٪ و۵/۲۶٪). با انتقال نمونه‌های مذکور به

جدول۲- درصد ریشه زایی در قطعات برگ دانه رست‌های سترون در ترکیب هورمونی D-۲,٤و Kin در مرحله کشت و واکشت اول (گروه بندی بر اساس آزمون دانکن p≤ ۰/۰۵)

Kin mgL^{-1}	D-۲،٤ mgL^{-1}	ریشه زایی (٪) مرحله کشت	ریشه زایی (٪) مرحله واکشت در محیط اولیه	ریشه زایی (٪) مرحله واکشت در محیط فاقد هورمون
۰/۵	۰/۵	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۱	۰/۵	۱۰۰(a)	۱۰۰(a)	۱۰۰(a)
۲	۰/۵	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)
۰/۵	۱	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۲۹/۴۱(b)
۱	۱	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۵۰/۰۰(ab)
۲	۱	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)	۰/۰۰(c)
۰/۵	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۴۰/۰۰(ab)
۱	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۲	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۰/۵	۴	۰/۰۰(c)	۱۳/۰۴(b)	۲۱/۷۳(b)
۱	۴	۱۶/۶۶(b)	۳۳/۳۳(ab)	۰/۰۰(c)
۲	۴	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)	۴۷/۳۶(ab)

*** حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن و حروف مشترک نشان دهنده معنی دار نبودن تفاوت در میانگین‌ها است.**



شکل ۲- (A) تولید ریشه (R) و برگ (L)در کالوس حاصل از تیمار با D-4,2 (٤میلی‌گرم‌برلیتر) و Kin (۲میلی‌گرم‌برلیتر) پس از انتقال به محیط کشت فاقد هورمون، (B و C) رشد جوانه‌ها (نمونهA) پس از انتقال به محیط کشت دارای BAP (۲/۵میلی‌گرم‌برلیتر)

محیط غنی از BAP بخش‌های هوایی توسعه یافتند(شکل ۲).

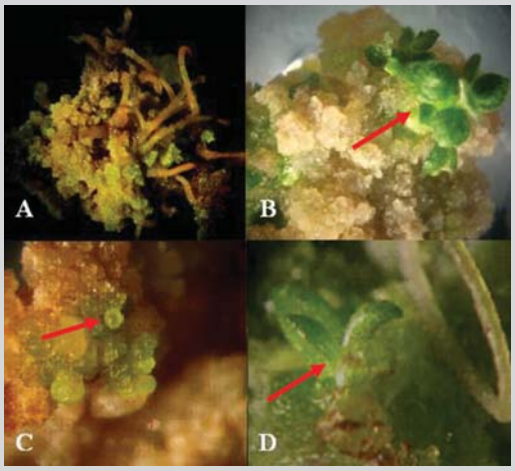
تاثیر هورمون‌های 2,4-D و BAP

بیشترین رشد کالوس و ریشه‌زایی در تیمار D-4,2 (۴میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۲میلی‌گرم‌برلیتر) (به دست آمد (جدول۳). به طوری که این تیمار بیشترین درصد ریشه زایی(۴۳/۷۵٪) را نسبت به سایر تیمارها نشان داد (شکل۳). درمحیط کشت دارای D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP(۱میلی‌گرم‌برلیتر) (علاوه بر ریشه زائی، و برگ زایی نیز انجام شد(شکل۳).

جدول۲- درصد ریشه زایی در قطعات برگ دانه رست‌های سترون در ترکیب هورمونی ۲,٤-Dو Kin در مرحله کشت و واکشت اول (گروه بندی بر اساس آزمون دانکن ۰/۰۵ ≥p)

Kin mgL^{-1}	۲،٤-D mgL^{-1}	ریشه زایی (٪) مرحله کشت	ریشه زایی (٪) مرحله واکشت در محیط اولیه	ریشه زایی (٪) مرحله واکشت در محیط فاقد هورمون
۰/۵	۰/۵	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۱	۰/۵	۱۰۰(a)	۱۰۰(a)	۱۰۰(a)
۲	۰/۵	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)
۰/۵	۱	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۲۹/۴۱(b)
۱	۱	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۵۰/۰۰(ab)
۲	۱	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)	۰/۰۰(c)
۰/۵	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۴۰/۰۰(ab)
۱	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۲	۲	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(c)
۰/۵	۴	۰/۰۰(c)	۱۳/۰۴(b)	۲۱/۷۳(b)
۱	۴	۱۶/۶۶(b)	۳۳/۳۳(ab)	۰/۰۰(c)
۲	۴	۰/۰۰(c)	۴۲/۱۰(ab)	۴۷/۳۶(ab)

* حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن و حروف مشترک نشان دهنده معنی دار نبودن تفاوت در میانگین‌ها است.



شکل۳- (A) ریشه زایی در محیط کشت دارای D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر) ساقه زایی در محیط کشت دارای D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر)، (C) ظهور اشکال گویچه‌ای در کالوس رشد یافته در محیط کشت دارای D-4,2 (۱میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۲میلی‌گرم‌برلیتر)، (D)جوانه‌زنی نمونه C دو هفته پس از انتقال‌به‌محیط کشت MS فاقد هورمون

اشکال پروتوبرانچ (proto branch) یا گویچه‌ای در تیمارهای D-4,2 (۱و۲میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۲میلی‌گرم‌برلیتر) و تیمار D-4,2 (۲میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۲میلی‌گرم‌برلیتر) (ظاهر گشت که پس از واکشت نمونه‌ها در محیط MS فاقد هورمون جوانه زایی آغاز می‌شود (شکل۳).

بحث

در ترکیب هورمونی BAP و IBA در محیط کشت پایه MSکال‌زایی به ویژه در ناحیه دمبرگ‌ها چشم‌گیر است که علت آن را می توان به وجود مقداری اکسین و سیتوکینین درون زا در خود دمبرگ نسبت داد. از سویی اکسین در گیاه در یک مدل قطبی به صورت بازپیتال (رو به پائین) انتقال می یابد (۱۴و ۱۱). در همین آزمایش نتایج مشخص نمود افزایش IBA منجر به افزایش تولید ریشه‌های نابجا می شود. این مسئله طرح غالبیت اثر اکسین نسبت به سیتوکینین را در ریشه زائی نشان می دهد.

جوانه‌زایی از بافت کالوس در نمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر) وIBA (۱میلی‌گرم‌برلیتر) رویت شد. معمولا زمانی که نسبت سیتوکینین بیشتر از اکسین جوانه زائی صورت می گیرد. اما برهم کنش هورمون‌های درون زا و برون زا تمایز بافت در شیشه را رقم می زند (۱۵).

استفاده از ترکیب هورمونی D-4,2 وKin نشان داد با افزایش تراکم Kin و D-4,2 تا حد(۱میلی‌گرم بر لیتر) تولید کالوس افزایش می‌یابد. این مطالعه با تحقیقات Shinoyama و همکاران درمطالعه گیاه داوودی (۲۰۰۴) با غلظت D-4,2 (۱-۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و(۲-۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) در کال‌زایی هم‌سویی دارد(۸).

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد در مرحله کشت تنها در دو غلظت هورمونی ریشه زائی صورت گرفت، اما ادامه آزمایش در واکشت بعدی منجر به افزایش ریشه زائی شد. هم‌چنین جوانه زائی تنها در زمانی انجام شد که محیط واکشت عاری از هورمون بود که نشان می دهد حضور هورمون D-4,2 همراه با Kin مانع جوانه‌زائی است.

در بررسی ترکیب هورمونیD-4,2 و BAP حداکثر کالوس زایی و ریشه زایی در ترکیب هورمونی D-4,2 (۴میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۲میلی‌گرم بر لیتر)مشاهده شد. در محیط کشت دارای D-4,2 (۰/۵میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر) ریشه زائی و جوانه‌زائی صورت گرفت. نمونه به دست آمده به محیط کشت حاوی BAP جهت ایجاد بخش هوایی انتقال یافت. Rout و همکارانش(۲۰۰۶) نشان دادند که غلظت‌های کم سیتوکینین می‌تواند در جوانه‌زنی برگ گیاهان گلدانی تزئینی مانند داوودی موثر باشد (۱۵).

در این تحقیق در تیمارهای حاوی D-4,2 (۲-۱میلی‌گرم‌برلیتر) و BAP (۱میلی‌گرم‌برلیتر)، اشکال گویچه‌ای، به صورت بر آمدگی‌هایی کوچک ظاهر شد. این اشکال گویچه‌ای پس از انتقال به محیط MS فاقد هورمون به صورت جوانه‌هایی ظاهر شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد حذف اکسین از محیط کشت، پیش نیاز خاموش شدن چند ژن و یا سنتز محصولات جدید ژنی می‌باشد که برای نمو رویان لازم می‌باشد(۸).

منابع

1.Blinstrubiene A, Sliesaravicius A, Burbulis, N(2004). Factors affecting morphogenesis in tissue culture of linseed flax*(Linum usitatissimum L.)* Acta Universitatis Latviensis, Biology.676: 49–152.

2.Xue JP, Zhanq AM, Zhao FL.(2002) Study on stem-tip tissue culture of the traditional Chinese medicine *Chrysanthemum morifolium.* Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 27(5):350- 360.

3.Battacharya, P, Dey. B, Das N, Bhacttacharya BC(1990). Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants Plant Cell Reports 9: 439-442.

4.Earle ED, Langhans WR.(1973) Propagation of *chrysanthemum* in vitro.1. Multiple plantlets from shoot tips and yhe establishedment of tissue culture J. Hort. Sci 99: 128-132.

5.Khan MA, Ara DKA, Hossein AKMA (1994) In vitro plant regeneration in *Chrysanthemum morifolium*(Ramat). Plant Tissue Cult4:53-57.

6.Karim MZ, Amin MN, Azad MAK, Begum F, Rahman MM, Islam MM,(2003). Effects of different plant growth regulator on in vitro shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. Journal of Biological Sciences. 3 (6): 553-560.

7.Trifunović M, Jevremović S, Nikolić M, Subotić, A, Radojević LJ(2006) Micropropagation of *chrysanthemum* cultivars-effect of cold storage on plant regeneration in vitro. Acta Horticulturae 764.

8.Shinoyama H, Nomura Y, Tsuchiya T, Kazuma T. (2004) A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Chrysanthemum* (dendranthema × grandiflorum (Ramat.) Kitamura). Plant Bio-Technology 21(1): 25-33.

9.Bhaskaran S, Smith RH. (1990) Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci 30: 1329–1336.

10. Bjowani SS, Razdan MK(1990) Plant tissue culture: theory and practice. Developments in Crop Science 25–32.

11. Lomax TL, Muday GK, Ruberty PH,(1995) Auxin transport. In plant hormones: physiology, biochemistry and molecular in plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology (Davies, P.J., ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 509–530.

12. Jame A, Teixeira da S. (2003) *Chrysanthemum:* advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. Biotechnology Advances 21(8): 715-766.

13. Murashige T, Skoog A(1962) revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures Plant Physiol 15:473-97.

14. Swarup R, Bennett M. (2003) Auxin transport: the fountain of life in plants; Dev. Cell 5;: 824–826.

15. Rout G, Mohapatra A, Mohan S(2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects Biotechnology Advances. 24:531-560.