اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر پرآوری درون شیشه‌ای استویا (*Stevia rebaudiana*)

یوسف فرخ‌زاد۱،داریوش رمضان*۲، افشین مرادی۳

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

drhorticul@uoz.ac.ir*

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر نیترات نقره به‌عنوان یک عامل ضد اتیلن و تنظیم‌کننده‌ی ر شد، بر شاخص‌های مرتبط با شاخه زایی در گیاه استویا انجام شد. در این مطالعه، این فرضیه که کاربرد نیترات نقره منجر به کاهش اثرات فیزیولوژیکی انباشت اتیلن درون شیشه‌ای می‌شود مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیانگر سودمندی کاربرد ۵ و ۱۰ میکرومولار نیترات نقره بر القاء شاخ‌ساره و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در ا ستویا بود. تعداد برگ و وزن تر گیاهان باززایی شده در تیمارهای ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار نیترات نقره بدون تفاوت معنی‌دار ثبت شد بااین‌حال از نظر وزن خشک کاربرد ۵ و ۱۰ میکرومولار نیترات نقره مؤثرترین بود. بیشترین طول شاخه (بلندترین نوساقه) در تیمار ۱۰ و ۲۰ میکرومولار مشاهده شد. با توجه به اکثر شاخص‌های موردمطالعه استفاده از ۵ تا ۱۰ میکرومولار نیترات نقره برای مرحله شاخه زایی ا ستویا از ریزنمونه‌های نوک شاخ ساره قابل تو صیه است.

کلمات کلیدی: باززایی شاخه، ریزازدیادی، مهارکننده‌ی اتیلن، نیترات نقره

مقدمه

ا ستویا[۱] دهه‌ها ا ست که به‌عنوان یک شیرین‌کننده طبیعی در طیف و سیعی از مح صولات در صنایع غذایی و نو شیدنی ا ستفاده می شود، زیرا برگ‌های آن حاوی ا ستویوزید و ربادیوزاید ا ست [۱] و ک شت آن در سال‌های

[۱] *Stevia rebaudiana Bertoni*

اخیر به دلیل استفاده روزافزون از آن در صنایع غذایی [۲] گسترش‌یافته است. استویا را می‌توان از طریق بذر یا قلمه تکثیر کرد. بااین‌حال، کشت بافت یکی از مؤثرترین روش‌ها برای تولید گیاهان بدون بیماری و یکنواخت برای کشت در مقیاس بزرگ است [۳]. حدود ۲۵ درصد از توده خشک برگ‌های استویا حاوی دی ترپن گلیکوزیدهای شیرین یا گلیکوزیدهای استویول۲ است [۳].

نکروز نوک ساقه یک اختلال فیزیولوژیکی است که معمولاً در طی کشت‌های درون شیشه‌ای دیده می‌شود. علائم این پدیده عبارت ه ستند از قهوه‌ای شدن و در نهایت مرگ نوک ساقه [۴] و همچنین زرد شدن نوک برگ‌ها [۵]. اثر ترکیبات حاوی نقره در کاهش علائم این پدیده توسط [۶] گزارش‌شده است. ترکیبات حاوی نقره، به‌عنوان بازدارنده سیگنال دهی و عمل اتیلن، می‌توانند باززایی و اندام‌زایی در شرایط درون شی شه‌ای را بهبود بخشند [۷]. اثر مفید ترکیبات حاوی نقره (نانو ذرات نقره، نیترات نقره و غیره) در پروتکل‌های ریز ازدیادی در چندین گیاه ازجمله [۸] (Orchidaceae) *Epidendrum denticulatum*، *Alternanthera sessilis.* [۹]، *Anthurium Landraeanum* [۱۰]، *Swertia chirata* [۱۱] و *Cosmos bipinnatus* [۱۲] نشان داده‌شده است. علاوه بر این، همچنین گزارش‌شده است که ترکیبات حاوی نقره طول عمر ریزنمونه و پرآوری شاخه *Tecomella undulata* را در شرایط درون شیشه‌ای افزایش می‌دهد [۱۳]. علیرغم اثرات مثبت این ترکیبات در طی کشت‌های درون شیشه‌ای، اثرات منفی نیز در ارتباط با آن‌ها گزارش‌شده است. کاهش رشد *Spirodela polyrhiza* [۱۴] و مهار رشد نخودفرنگی [۱۵] ازجمله این اثرات منفی است.

اعتقاد بر این است که قهوه‌ای شدن ریزنمونه به دلیل تجمع و اکسیداسیون ترکیبات فنلی است [۱۶]، که منجر به مهار ر شد و کاهش قابلیت باززایی ریزنمونه‌ها می شود [۱۷]. ترکیبات فنلی معمولاً در بافت‌های سالم گیاهی وجود دارند و می‌توانند در انواع سلول‌های تخ ص صی تجمع پیدا کنند. بااین‌حال، آن‌ها بعد از یک تنش به‌عنوان یک پاسخ دفاعی، به‌ویژه پس از زخم یا استرس بافتی ایجاد می‌شوند [۱۸]. آنزیم‌های اکسیدکننده فنل می‌توانند تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گیرند. مشخص‌شده است که وجود نور و دمای بالا سرعت قهوه‌ای شدن را با افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداسیون افزایش می‌دهد [۱۹]. ما قبلاً متوجه افزایش کالوس‌دهی ریز نمونه‌های ا ستویا، کاهش میزان پرآوری شاخ ساره‌های باریک و کاهش سبزینگی بافت ریزنمونه و نو ساقه‌ها به‌عنوان یک مشکل عمده در طول ریزافزایی درون شیشه‌ای بودیم. فرض ما این بود که یکی از دلایل این ناهنجاری‌ها ممکن است سطوح بالای اتیلن باشد. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر ترکیبات حاوی نقره بر بهبود کیفیت ریز شاخه‌های استویا در طی کشت درون شیشه‌ای انجام شد. این اهداف بر اساس این فرضیه بود که نیترات نقره در می‌توانند القای شاخه و رشد بعدی را تسهیل کنند.

---

۲ SVglys

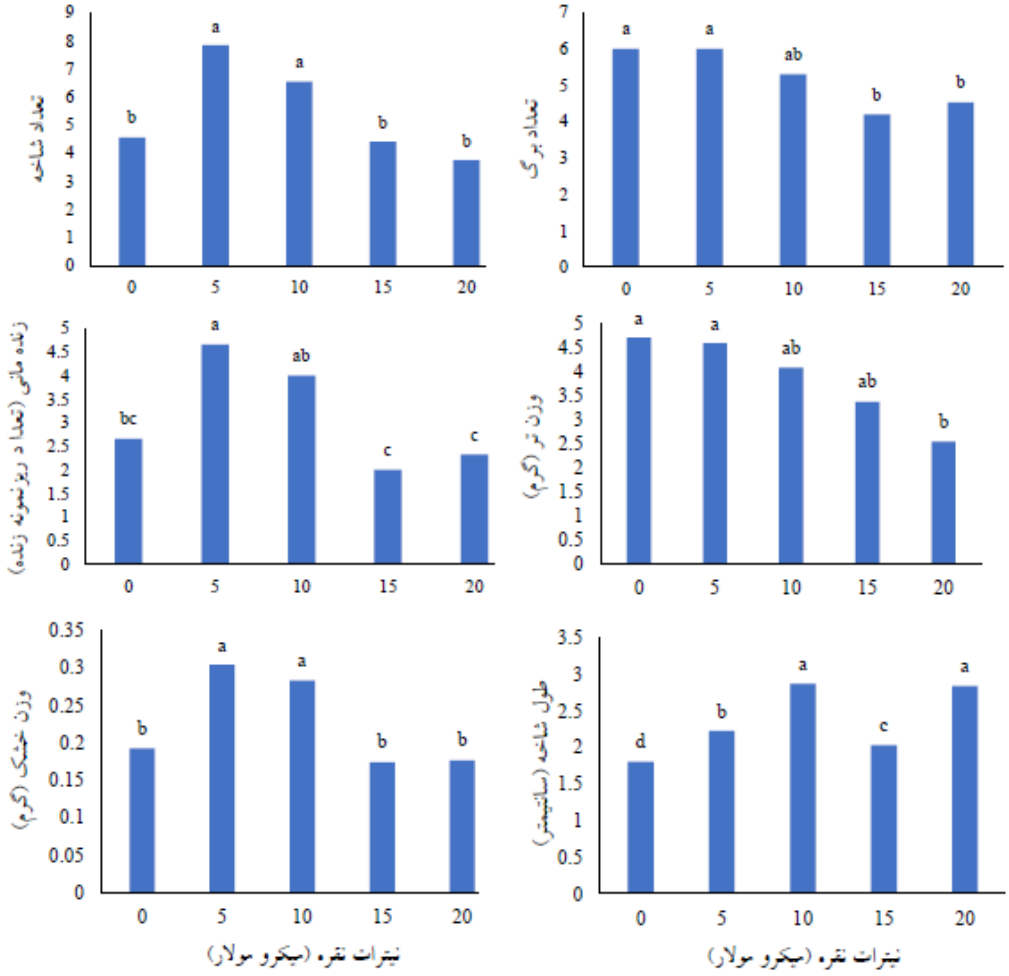
مواد و روش ها

نوک شاخساره گیاه *Stevia rebaudiana* از یک گلخانه تجاری در کرج برداشت شد و سپس با جریان آهسته آب شستشو شد. پس از شستشو، نمونه‌ها در محلول قارچ‌کش کاربندازیم ۰/۲٪ (w/v) به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده‌شده و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس با محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها زیر هود لامینار سه بار با آب مقطر اتوکلاو شده شسته شدند و بلافاصله پس از تیمار با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، با آب مقطر سه بار شستشو شدند. دو مرحله آخر شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده انجام شد. از محیط کشت موراشیک و اسکوک (۱۹۶۲) در نصف قدرت، همراه با میلی‌گرم در لیتر ۲ بنزیل آمینو پورین، ۰/۸ درصد آگار، ۳ درصد ساکارز (w/v) برای استقرار نوک شاخساره استفاده شد. پس از ۴ واکشت متوالی ریزنمونه‌های استویا و به دست آوردن مواد گیاهی کافی و عاری از بیماری، غلظت‌های مختلف نیترات نقره (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار) به همان محیط اضافه شد و سپس ظروف کشت در دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل رشد ۲۰ روز پس از کاشت نوک شاخساره انجام شد. تعداد شاخه و برگ جدید در هر ریزنمونه به ترتیب به‌عنوان تعداد شاخساره و تعداد برگ ثبت شد. پس از حذف بقایای محیط کشت، وزن گیاهچه‌های باززایی شده به‌عنوان وزن تر در نظر گرفته شد. سپس شاخه‌های باززایی شده در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند وزن خشک محاسبه گردید. طول ساقه‌های بیشتر از ۰/۵ سانتی‌متر نیز با خط‌کش تعیین شد.

نتایج و بحث

نتایج این آزمایش نشان داد که ریز نمونه‌های کشت شده روی محیط‌های کشت تکمیل‌شده با ۵ و ۱۰ میکرومولار نیترات نقره به ترتیب بیشتر از سایر تیمارها شاخه زایی داشتند با افزایش غلظت نیترات نقره از ۱۰ به ۲۰ میکرومولار شاخه زایی کاهش یافت (شکل ۲). این روند برای زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نیز مشابه بود. بیشترین تعداد برگ از محیط کشت شاهد (عدم کاربرد)، ۵ و ۱۰ میکرو مولار نیترات نقره به دست آمد و تعداد برگ با افزایش غلظت نیترات نقره کاهش یافت که روندی مشابه وزن تر را نشان داد. در مطالعه‌ی حاضر، وزن خشک نمونه‌ها نیز مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۲). نتایج نشان داد که غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار منجر به افزایش وزن خشک گیاهان نسبت به تیمار شاهد می شود ولی با افزایش غلظت نیترات نقره وزن خشک کاهش می‌یابد. از نظر طول نوساقه‌های باززایی شده کاربرد۱۰ و ۲۰ میکرومولار نیترات نقره منجر به افزایش طول شاخه شد (شکل ۲). به‌طور کلی و با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان تکمیل محیط کشت را با ۵ و ۱۰ میکرومولار در مرحله‌ی پرآوری استویا توصیه کرد (شکل ۲). این نتایج در راستای نتایج [۱۰] در گیاه آنتوریوم و [۲۰] در گیاه فالائنوپسیس است.

برخی از مواد شیمیایی حاوی یون نقره می‌توانند گیرنده‌های اتیلن را مسدود کنند و برای اهداف مختلف در کشاورزی ازجمله افزایش ماندگاری گل‌های شاخه بریده، کاهش زاد و ولد میکروارگانیسم‌ها در محلول‌ها و همچنین برای بهبود رشد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای استفاده می‌شوند. یون‌های نقره می‌توانند روی گیاهان در حال رشد در درون شیشه‌ای تأثیر بگذارند و می‌توانند باززایی گیاه، تشکیل ریشه، محتوای کلروفیل، پرآوری شاخه بهبود بخشند و از تشکیل بیش‌ازحد کالوس جلوگیری کنند و سایر علائم ناشی از اتیلن را کاهش دهند. کاربرد ترکیبات حاوی نقره مقدار شاخه‌های باریک و برگ‌های توسعه‌نیافته را کاهش می‌دهد [۱۰]. رشد ضعیف و انبساط کند برگ‌ها منجر به تأخیر در ریزازدیادی و کاهش کیفیت ساقه می‌شود. ترکیبات حاوی نقره با مهار اتصال اتیلن به گیرنده‌های سلول‌های گیاهی و جلوگیری از شناسایی و فعالیت گاز اتیلن، توانایی مهار عمل گاز اتیلن را دارند [۲۱]. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده‌شده است. کاربرد نیترات نقره کیفیت ریز شاخه‌ها را در آنتوریوم بهبود می‌بخشد [۱۰]. علاوه بر این، استفاده از ترکیبات حاوی یون نقره برای بهبود پرآوری و کیفیت شاخساره‌های باززایی شده در Rosa x hybrida گزارش‌شده است [۱۰, ۲۲]. نقش مثبت ۱ یا ۲ میلی‌گرم نیترات نقره را در بازیابی شاخه‌های باکیفیت *Anthodium andraeanum* گزارش کرد که مطابق با نتایج ما است. تنش‌های غیر زیستی و زیستی مانند سیل، آسیب‌های مکانیکی، آسیب پاتوژن، کمبود آب یا خشکسالی، سمیت مواد معدنی و شوری باعث افزایش سطح اتیلن درون‌زا شده که ممکن است اثرات تنش را تشدید کند [۲۳]. آسیب زخم در ریزنمونه‌ها و قرار گرفتن در معرض تنش‌های درون شیشه‌ای نظیر سمیت مواد معدنی، رطوبت بالا و سایر تنش‌ها ممکن است غلظت اتیلن را افزایش دهد [۲۴]. افزایش سطح اتیلن در ظروف کشت مهر و موم شده منجر به القاء پاسخ فیزیولوژیکی در گیاهان درون شیشه‌ای می‌شود [۲۵] که می‌تواند با تکمیل محیط کشت با ترکیبات بازدارنده اتیلن برای کاهش قهوه‌ای شدن کاهش یابد [۲۶] و افزایش کارآیی شاخه زایی [۲۷] را در پی داشته باشد. نشان داده شده است که نیترات نقره در بهبود جنین زایی سوماتیک و باززایی گیاهی در تعدادی از گونه های زراعی از جمله *Brassica spp* موثر است. [۲۸] ؛ [۲۹] ؛ [۳۰] ؛ [۳۱]، [۳۲]، ذرت(Ya) muskmelon[۳۳ ؛ ۳۴] [۳۵ ؛ ۳۶]، خیار [۳۷]؛ [۳۸]، لوبیا چشم بلبلی [۳۹]، بادام زمینی [۴۰]، گندم [۴۱]، برنج [۴۲] و جو [۴۳]. از آنجایی که یون‌های نیترات نقره می‌توانند از طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی ناشی از اتیلن، از جمله مهار رشد و پیری جلوگیری کنند، فرض بر این است که این اثر از طریق مهار عمل فیزیولوژیکی اتیلن، یک بازدارنده بالقوه اتیلن، انجام می‌شود [۴۴]. بسیاری از سیستم های باززایی گیاهی[۴۶; ۳۴;۴۵] در مورد اثر نیترات نقره بر اندام زایی شاخساره کاساوا از لپه های سوماتیکی انجام شده و نشان می‌دهد که نیترات نقره می‌تواند برای بهبود فرکانس‌های باززایی در شرایط آزمایشگاهی کاساوا بدون تأثیر منفی بر کارایی نشانگرهای انتخابی مورد نیاز برای انتخاب گیاهان تراریخته استفاده شود.



شکل ۱: اثر نیترات نقره بر باززایی شاخه گیاه استویا در شرایط درون شیشه‌ای

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان تکمیل محیط کشت را با ۵ و ۱۰ میکرومولار را جهت بهبود پرآوری استویا توصیه کرد.

قدردانی

نویسندگان از مجموعه‌ی کشت بافت جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی جهت اجرای این آزمایش، نهایت سپاس و قدردانی را دارند.

مراجع

۱. *Prakash I, Chaturvedula VSP. Steviol glycosides: natural non-caloric sweeteners. Sweeteners Cham, Switzerland: Springer. 2016:101-28.*

۲. *Kovačević DB, Maras M, Barba FJ, Granato D, Roohinejad S, Mallikarjunan K, et al. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia rebaudiana Bertoni leaves: A review. Food chemistry. 2018;268:513-21.*

۳. *Yücesan B, Mohammed A, Büyükgöçmen R, Altuğ C, Kavas Ö, Gürel S, et al. In vitro and ex vitro propagation of Stevia rebaudiana Bertoni with high Rebaudioside-A content—A commercial scale application. Scientia Horticulturae. 2016;203:20-8.*

۴. *Surakshitha N, Soorianathasundaram K, Ganga M, Raveendran M. Alleviating shoot tip necrosis during in vitro propagation of grape cv. Red Globe. Scientia Horticulturae. 2019;248:118-25.*

۵. *Park JS, Naing AH, Kim CK. Effects of ethylene on shoot initiation, leaf yellowing, and shoot tip necrosis in roses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2016;127(2):425-31.*

۶. *Martin K. Rapid propagation of Holostemma ada-kodien Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. Plant Cell Reports. 2002;21(2):112-7.*

۷. *Mahmoud LM, Grosser JW, Dutt M. Silver compounds regulate leaf drop and improve in vitro regeneration from mature tissues of Australian finger lime (Citrus australasica). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2020;141(3):455-64.*

۸. *Juras MCR, Purgatto E, de Melo Ferreira W, Suzuki RM. Direct organogenesis and ethylene regulators in the cloning of Epidendrum denticulatum (Orchidaceae). South African Journal of Botany. 2020;131:374-9.*

۹. *Sowmya M, Jinu U, Sarathikannan D, Geetha N, Girija S, Venkatachalam P. Effect of silver nitrate and growth regulators on direct shoot organogenesis and in vitro flowering from internodal segment explants of Alternanthera sessilis L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;30:101855.*

۱۰. *Cardoso JC. Silver nitrate enhances in vitro development and quality of shoots of Anthurium andraeanum. Scientia Horticulturae. 2019;253:358-63.*

۱۱. *Saha N, Dutta Gupta S. Promotion of shoot regeneration of Swertia chirata by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2018;134(2):289-300.*

۱۲. *Jaberi M, Azadi P, Gharehyazi B, Khosrowchahli M, Sharafi A, Aboofazeli N, et al. Silver nitrate and adenine sulphate induced high regeneration frequency in the recalcitrant plant Cosmos bipinnatus using cotyledon explants. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2018;93(2):204-8.*

۱۳. *Sarmast M, Niazi A, Salehi H, Abolimoghadam A. Silver nanoparticles affect ACS expression in Tecomella undulata in vitro culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2015;121(1):227-36.*

۱۴. *Xu Q, Jiang Y, Chu W, Su C, Hu D, Lu Q, et al. Response of Spirodela polyrhiza to cerium: subcellular distribution, growth and biochemical changes. Ecotoxicology and environmental safety. 2017;139:56-64.*

۱۵. *Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, et al. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in Pisum sativum seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 2017;110:167-77.*

۱۶. *Jones AMP, Saxena PK. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in Artemisia annua L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. PloS one. 2013;8(10):e76802.*

۱۷. *Mondal T, Aditya S, Banerjee N. In vitro Axillary Shoot Regeneration and Direct Protocorm-like Body Induction from Axenic Shoot Tips of Doritis pulcherrima Lindl. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 2013;23(2):251-61.*

۱۸. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiological and molecular plant pathology. 2000;57(3):101-10.

۱۹. Dobránszki J, da Silva JAT. Micropropagation of apple—a review. Biotechnology Advances. 2010;28(4):462-88.

۲۰. Farrokhzad Y, Babaei A, Yadollahi A, Kashkooli AB, Mokhtassi-Bidgoli A, Hessami S. Informative title: Development of lighting intensity approach for shoot proliferation in Phalaenopsis amabilis through combination with silver nanoparticles. Scientia Horticulturae. 2022;292:110582.

۲۱. Razavizadeh R, Rostami F. Risks and benefits assessments of silver nanoparticles in tomato plants under in vitro culture. Eng Res J. 2015;3(7):51-5.

۲۲. Matos AVCdSd, Oliveira BSd, Oliveira MEBSd, Cardoso JC. AgNO 3 improved micropropagation and stimulate in vitro flowering of rose (Rosa x hybrida) cv. Sena. Ornamental Horticulture. 2020;27:33-40.

۲۳. Siddikee M, Chauhan PS, Sa T. Regulation of ethylene biosynthesis under salt stress in red pepper (Capsicum annuum L.) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-producing halotolerant bacteria. Journal of Plant Growth Regulation. 2012;31(2):265-72.

۲۴. Bidabadi SS, Jain SM. Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. Plants. 2020;9(6):702.

۲۵. Matthys D, Gielis J, Debergh P. Ethylene. Automation and environmental control in plant tissue culture: Springer; 1995. p. 473-91.

۲۶. Ozudogru EA, Ozden-Tokatli Y, Akcin A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 2005;41(2):151-6.

۲۷. Kaur A, Reddy MS, Kumar A. Efficient, one step and cultivar independent shoot organogenesis of potato. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2017;23(2):461-9.

۲۸.Palmer CE (1992) Enhanced shoot regeneration from Brassica campestris by silver nitrate. Plant Cell Rep. 11: 541–545

۲۹.Zhang P & Ling DH (1995) Enhancement of plant regeneration rate of Brassica parachinensis cultured in vitro. Acta Bot. Sinica 37: 902–908

۳۰. Zhang P & Ling DH (1996) Histological studies of plant regeneration modes of Brassica parachinensis by affecting AgNO3 and ABA. J. Trop. Subtrop. Bot. 4(1): 71–76

۳۱.Eapen S & George L (1997) Plant regeneration from peduncle segments of oil seed Brassica species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51: 229–232

۳۲.Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva A & Pehu E (1999) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of greenhousegrown Brassica rapa ssp. oleifera. Plant Cell Rep. 18: 773–777

۳۳.Vain P, Flament P & Soudain P (1989a) Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in Zea mays L. J. Plant Physiol. 135: 537–540

۳۴. Vain P, Yean H & Flament P (1989b) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in Zea mays L. by silver nitrate. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 18: 143–152

۳۵.Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W & Paiva E (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Rep. 17: 73– 76

۳۶.Yadav RC, Saleh Mohamed T & Grumet R (1996) High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45: 207–214

۳۷. *Roustan Jean P, Latche A & Fallot J (1992) Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of Cucumis melo by silver nitrate, an inhibitor of ethylene action. J. Plant Physiol. 140: 485–488*

۳۸. *Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah Zaliha C & Napis S (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51: 75–78*

۳۹. *Brar MS, Moore MJ, Al Khayri JM, Morelock TE & Anderson EJ (1999) Ethylene inhibitors promote in vitro regeneration of cowpea (Vigna unguiculata L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 35: 222–225*

٤٠. *Pestana MC, Lacorte C, de Freitas VG, de Oliveira DE & Mansur E (1999) In vitro regeneration of peanut (Arachis hypogaea L.) through organogenesis: effect of culture temperature and silver nitrate. In Vitro Cell. Dev. Biol. 35: 214–216*

٤١. *Lashermes P (1992) Improved anther culture method for obtaining direct regeneration in wheat (Triticum aestivum L). J. Genet. Breed. 46: 99–102*

٤٢. *Lentini Z, Reyes P, Martinez CP & Roca WM (1995) Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. Plant Sci. 110: 127–138*

٤٣. *Castillo AM, Egana B, Sanz JM & Cistue L (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep. 17: 902–906*

٤٤. *Burneet L, Arnoldo M & Yarrow S (1994) Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of Brassica rapa ssp. oleifera through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 253–258*

٤٥. *Chraibi BKM, Latche A, Roustan JP & Fallot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of Helianthus annuus by ethylene inhibitors, silver and cobalt. Plant Cell Rep. 10: 204– 207*

٤٦. *Kong L & Yeung EC (1994) Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. Plant Sci. 104: 71–80*