دومین همایش ملی مهندسی و مدیریت کشاورزی
محیط زیست و منابع طبیعی پایدار
تهران مرکز همایش های بین المللی دانشگاه شهید بهشتی
۲۰ اسفند ۱۳۹۳

ارزیابی نحوه ضدعفونی و ریزنمونه مناسب جهت استقرار شاخساره‌های زغال‌اخته به روش درون‌شیشه‌ای

زهرا هادی[۱]، علیرضا قنبری[۲*]، اورنگ خادمی[۳]، یاور شرفی

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد. پست الکترنیکی: hadibarzandigh@gmail.com
[۲]استادیار،دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد و دانشگاه محقق اردبیلی. پست الکترنیکی: ghanbari66@yahoo.com
[۳]استادیار،دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد. پست الکترنیکی: o.khademi@shahed.ac.ir
[۴]استادیار،دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد. پست الکترنیکی: y.sharafi@shahed.ac.ir

چکیده

جهت ریزازدیادی زغال‌اخته (*Cornus mas* L.) به روش درون‌شیشه‌ای نیاز به استقرار ریزنمونه‌های مناسب با کمترین آلودگی و بیشترین نمونه‌های سالم می‌باشد. در این تحقیق اثر فصل نمونه‌گیری شامل تابستان، پاییز و زمستان، قطعات مختلف شاخساره شامل گره‌های یک تا سه، چهار تا پنج و گره‌های شاخه‌های جانبی و مدت زمان‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه تیمار ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم بر میزان موفقیت حذف آلودگی سطحی ریزنمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ضدعفونی ریزنمونه‌ها نشان داد جوانه‌های شاخساره-های تابستانه و گره‌های یک تا سه با کمترین میزان آلودگی، مناسبترین ریزنمونه جهت تهیه نمونه اولیه استقرار در محیط کشت بودند. در بین تیمارهای زمانی ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم برای شاخساره‌های زمستانه، مدت زمان ۲۵ دقیقه از دیگر زمان‌های ضدعفونی، بیشتر، آلودگی را کنترل کرد ولی درصد نمونه‌های سوخته بیشتری برجای گذاشت.

۱- **واژه‌های کلیدی:** کشت درون‌شیشه‌ای، ضدعفونی سطحی، جوانه، هیپوکلریت سدیم، *Cornus mas* L.

۲- مقدمه

زغال‌اخته (*Cornus mas* L.) متعلق به خانواده Cornaceae بوده و بومی اروپای شرقی تا آسیای غربی می‌باشد (Mamedov و Craker، ۲۰۰۴: ۸۳-۸۶). به دلیل ارزش اقتصادی، خواص درمانی میوه و همچنین، ارزش تجاری پوست و چوب و کاربرد این درخت در فضای سبز، لازم است که اهمیت بیشتری به این درختچه داده شود (سمیعی‌راد، ۱۳۹۰: ۴). منطقه قزوین و رودبار، بویژه حاشیه البرز، بیشترین تولید و صادرات زغال‌اخته کشور را به خود اختصاص می‌دهد؛ در این مناطق ۹۹ درصد محصول زغال‌اخته تولیدی، از دانهال-های حاصل از گرده‌افشانی آزاد با منشاء ژنوتیپ‌های وحشی می‌باشد (Hassanpour و همکاران، ۲۰۱۱: ۴۵۹-۴۶۳) و محصول یکنواختی تولید نمی‌کنند؛ به همین دلیل ضروری است در این گیاه برای رسیدن به محصول یکنواخت مثل اکثر درختان میوه، از روش غیرجنسی برای تکثیر استفاده شود. بررسی‌های اولیه نشان داده که ازدیاد رویشی این گیاه چندان آسان نمی‌باشد، برای مثال تحقیقات نشان داده است که ازدیاد واریته Macrocarpa توسط پیوند جوانه‌های تابستانه روی پایه‌های دانهالی بذری دوساله قابل اجراست ولی این روش ازدیاد نیز با محدودیت‌هایی از جمله وابستگی فصلی، ضریب ازدیاد پایین، نیاز به چینه سرمایی و غیره مواجه است. ازدیاد به روش خوابانیدن نیز قابل انجام است؛ ولی در سطح تجاری ممکن نیست. برای یافتن بهترین شیوه ازدیاد این گیاه هریک از روش‌ها باید مورد آزمایش و ارزیابی بیشتر قرار گیرد. در این بین تکنیک ریزازدیادی یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی می‌تواند به تولید انبوه ژنوتیپ‌های برتر یا واریته‌های گزینش شده جنس *Cronus* کمک کند (Ďurkovič ۲۰۰۸: ۵۹۷-۵۶۰).

برای داشتن یک فرآیند کشت بافت موفق نیز عوامل کنترل شده‌ی زیادی از جمله، مقدار محیط کشت، سن ریزنمونه، وضعیت رشد گیاهان مادری و غیره مورد نیاز است. هرچند گزارش شده که حتی با کنترل همه این عوامل، آلودگی باکتریایی از بین پاتوژن‌های داخلی یا خارجی باعث ایجاد اشکال در مراحل کشت بافت می‌شود. آلودگی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها از مهم‌ترین عوامل از بین رفتن گیاهان کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای محسوب می‌شوند، از جمله این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، کپک‌ها و ... هستند. این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی، سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه دهی و به طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل، از کشت می‌گردند (گوران و همکاران ۱۳۹۲: ۱-۴). اگرچه برای حذف آلودگی ریزنمونه‌ها، بسیاری از ترکیبات مانند اتانول، هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک استفاده شده است ولی با وجود این به علت ایجاد مقاومت در عوامل بیماری‌زا، آلودگی بعد از مدتی دوباره ظاهر می‌شود (Smart و همکاران، ۱۹۹۵: ۵۳۳-۵۴۰). در برخی موارد همچون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب اثراتی مانند کاهش نرخ رشد یا موتاسیون‌های اپی‌ژنتیکی و اثرات مضر بر ریزنمونه‌ها می‌شود (Pankhurst، ۱۹۷۷: ۱۰۲۶-۱۰۳۳). پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت‌های گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می‌شود. (گوران و همکاران ۱۳۹۲: ۱-۴).ضدعفونی سطحی یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها، طی مراحل کشت بافت است، در کل موفقیت‌های پروتکل‌های کشت بافت گیاهی وابسته به ضدعفونی ریزنمونه است (گوران و همکاران، ۱۳۹۲: ۱-۴). در طول انجام مراحل ضدعفونی، ماده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست بدهد و تنها باید آلودگی سطحی آن‌ها برطرف شود، بنابراین در یک دوره و غلظت مناسب باید ضدعفونی شوند و در میان نمک‌های هیپوکلریت که در از بین بردن باکتری‌ها بسیار موثر هستند، هیپوکلریت سدیم

به عنوان شوینده‌های تجاری، بیشتر و راحت‌تر در دسترس قرار دارد (Oyebanji و همکاران، ۲۰۰۹: ۵۳۹۹-۵۳۹۵). هدف اولیه مرحله استقرار در ریزازدیادی به روش درون‌شیشه‌ای، دستیابی به درصد زیادی از ریزنمونه‌هایی است که از عوامل بیماری‌زای سطحی، عاری شده‌اند، دراین پژوهش یافتن بهترین نمونه‌ها جهت استقرار با استفاده از کمترین تیمارهای ضدعفونی، تاثیر فصل تهیه ریزنمونه، گره‌های مختلف شاخساره و زمان ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم بر میزان آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور کاهش استفاده از ترکیبات ضدعفونی و اثرات سوء این ترکیبات بر بافت‌های گیاهی و محافظت از ثبات ژنتیکی گیاه در مراحل بعدی ریزازدیادی، یافتن ریزنمونه‌هایی که آلودگی کمتری دارند می‌تواند کمک موثرتری در مرحله استقرار ریزنمونه‌ها داشته باشد.

ارزیابی اثر فصل نمونه‌گیری و نحوه ضدعفونی جوانه درخت گردو توسط امام (۱۳۸۳) در بررسی تکثیر غیر جنسی گردوی ایرانی مورد آزمایش قرار گرفت. به جز زمستان نمونه‌گیری در بقیه فصول سال انجام گرفت و گزارش شد جوانه‌های فصل پاییز نسبت به ضدعفونی سطحی پاسخ بهتر و استقرار مناسب‌تری نشان دادند و دلیل آن وضعیت فیزیولوژیکی خاص حاکم بر بافت‌ها و حالت فلس‌های پوششی دور جوانه‌ها ذکر شد.

۳- روش کار

به منظور دستیابی به ریزنمونه مناسب کشت درون‌شیشه‌ای با کمترین درصد آلودگی و کمترین آسیب بافت ناشی از اثر ترکیبات ضدعفونی کننده سه آزمایش مختلف انجام شد. در تمامی آزمایش‌ها شاخساره‌های سالم در بسته‌بندی تمیز و درون یخدان به آزمایشگاه انتقال یافتند. شاخساره‌ها به قطعات تک گره‌ای تقسیم شدند و شستشوی اولیه ریزنمونه‌ها جهت برطرف کردن آلودگی‌های اولیه با آب و مایع ظرفشویی صورت گرفت. بقیه مراحل ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها در هر آزمایش بدین شرح انجام گرفت:

۳-۱- آزمایش اول: گره‌های یک تا سه، سه تا پنج و گره‌های شاخه‌های فرعی به صورت مجزا تحت تیمار ضدعفونی مشابه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بنومیل ۰/۲ درصد تیمار و شستشو شدند. ادامه مراحل ضدعفونی در زیر لامینار با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس از شستشو با هریک ازمواد ضدعفونی کننده، ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر دو بار استریل شستشو داده شدند. به منظور افزایش اثربخشی ترکیبات ضدعفونی کننده از چند قطره توین ۲۰ به عنوان سورفاکتانت همراه با محلول‌های ضدعفونی کننده (Oyebanji، ۲۰۰۹: ۵۳۹۵-۵۳۹۹)، و در هر سه آزمایش استفاده شد.

۲-۲- آزمایش دوم: شاخساره‌های مشابه در فصول مختلف تابستان، پاییز و زمستان نمونه‌گیری شدند پس از تقسیم به قطعات تک گره‌ای و شستشو با آب و صابون مایع، ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بنومیل ۰/۲ درصد تیمار و شستشو شدند و برای ادامه مراحل ضدعفونی سطحی، مشابه آزمایش قبل، از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در انتهای هر یک از تیمارهای ضدعفونی، سه بار آبشویی با آب مقطر استریل به مدت چند دقیقه استفاده شد. به دلیل جلوگیری از سوختگی نمونه‌های تابستانه استفاده از تیمار بنومیل حذف شد. مدت زمان استفاده از اتانول به ۵۰ ثانیه و غلظت هیپوکلریت سدیم به ۱/۶ درصد کاهش یافت.

۳-۳- آزمایش سوم: مراحل ضدعفونی سطحی مشابه آزمایش اول صورت گرفت و تنها مدت تیمار با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد در زمان‌های مختلف ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه ارزیابی شد.

پس از اتمام تیمارهای ضدعفونی سطحی در هر سه آزمایش، ابتدا و انتهای ریزنمونه‌ها قطع شد و قطعات ۱/۵ سانتی‌متری در محیط کشت جامد WPM در ۴ تکرار و هر تکرار شامل چهار ریزنمونه کشت شدند. نمونه‌های آلوده به عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی، کل نمونه‌های آلوده و نمونه‌های سوخته با نرم‌افزار اکسل به صورت درصد محاسبه و داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد.

۴-نتایج و بحث

در آزمایش اول مبنی بر ارزیابی اثر استفاده از قطعات مختلف ریزنمونه بر میزان موفقیت ضدعفونی سطحی، در بین قطعات مختلف شاخساره(جدول ۱) درصد کل آلودگی، درصد آلودگی قارچی و درصد ریزنمونه‌های سوخته، تفاوت معنی‌دار نشان دادند. بین گره‌های مختلف، ریزنمونه‌های مربوط به گره‌های یک تا سه از نوک شاخساره و گره‌های شاخه‌های فرعی، کمترین آلودگی را داشتند، با وجود این درصد عارضه سوختگی جوانه‌ها بر اثر تیمار ضدعفونی سطحی در ریزنمونه‌های شاخه فرعی نسبت به ریزنمونه‌های گره یک تا سه شاخساره به طور معنی‌داری بیشتر بود. ریزنمونه‌های حاصل از گره‌های چهار تا پنج شاخساره‌ها نیز به طور معنی‌داری آلودگی بیشتری در بین قطعات مورد آزمایش نشان دادند.

در آزمایش دوم بین فصول مختلف نمونه‌گیری (جدول ۲) از لحاظ درصد کل آلودگی، درصد آلودگی قارچی، درصد آلودگی باکتریایی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. بین شاخساره‌های پاییزه، زمستانه و تابستانه کمترین آلودگی به میزان صفر درصد مربوط به شاخساره‌های تابستانه بود اما بین میزان سوختگی (شکل ۱-c) ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. درصد آلودگی قارچی ریزنمونه‌های فصل زمستان (۷۵ درصد) به طور معنی‌داری از آلودگی قارچی ریزنمونه‌های سایر فصول بیشتر بود.

نتایج آزمایش سوم نشان داد با افزایش مدت زمان تیمار با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد ، درصدآلودگی کل، درصد آلودگی قارچی و باکتریایی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، اما بین مدت زمان‌های ۲۰ و ۲۵ دقیقه با افزایش زمان، برای درصد آلودگی باکتریایی کاهش معنی‌داری مشاهده نشد. درصد ریزنمونه‌هایی که دچار عارضه سوختگی جوانه شدند نیز با افزایش مدت زمان و تنها بین تیمارهای ۱۵ و ۲۵ دقیقه به طور معنی داری افزایش یافت.

آلودگی بیشتر در ریزنمونه‌های گره‌های چهار تا پنج می‌تواند به دلیل داشتن سن بیشتر نسبت به گره‌های ابتدایی و اینکه بیشتر در معرض آلودگی قرار داشتند باشد. هرچند شاخه‌های فرعی به لحاظ درصد آلودگی با گره یک تا سه تفاوت معنی‌داری نداشت اما به دلیل قطر کمتر آن‌ها نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها، درصد ریزنمونه‌های سوخته در آن به طور معنی‌داری بیشتر بود که نشان دهنده آسیب‌پذیری این نمونه‌ها نسبت به غلظت بیشتر و زمان زیاد این تیمار ضدعفونی است.

اتانول یک عامل ضدعفونی کننده قوی است که در عین حال می‌تواند اثرات سمی برای گیاه داشته باشد برای همین ریزنمونه‌ها تنها به مدت چند ثانیه تا دقیقه درمعرض آن قرارمی‌گیرند (Oyebanji و همکاران، ۲۰۰۹: ۵۳۹۹-۵۳۹۵) و محلول‌های ضدعفونی‌کننده مختلف دیگر مانند هیپوکلریت سدیم در غلظت‌های زیاد و زمان‌های طولانی می‌توانند موجب قهوه‌ای شدن و مرگ بافت جوانه‌ها شوند (امام ۱۳۸۳: ۱۰-۱۵). در ارزیابی تاثیر فصل نمونه‌گیری ازآنجایی‌که تیمار ضدعفونی مورد استفاده برای ریزنمونه‌های زمستانه و پاییزه منجر به آسیب و تخریب شدید بافت ریزنمونه‌های تابستانه شد برای همین از غلظت و مدت زمان ضدعفونی ریزنمونه‌های تابستانه کاسته شد، با این وجود بین شاخساره‌های پاییزه، زمستانه و تابستانه کمترین آلودگی به میزان صفر درصد مربوط به شاخساره‌های تابستانه بود اما بین میزان سوختگی (شکل ۱-c) ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. حذف آلودگی سطحی از ریزنمونه‌های تابستانه بسیار با موفقیت انجام شد که می‌تواند به دلایل زیر باشد: ۱) تازگی و عمرکوتاه شاخساره‌ها محدود به این فصل ۲) در طول رشد شاخساره‌ها، شرایط جوی (مانند بارندگی، وزش باد) مناسب نفوذ و رشد آلودگی به درون جوانه‌ها نبوده است ولی نتایج تحقیقات امام (۱۳۸۳) در ارزیابی استقرار جوانه‌های گردوی ایرانی نشان داد پاییز مناسب‌ترین فصل برای استقرار ریزنمونه ها، تشخیص داده شد، زیرا جوانه‌ها به دلیل وضعیت فیزیولوژیکی خاص حاکم بر بافت‌ها و حالت فلس‌های پوششی دور جوانه‌ها در این فصل، به تیمارهای سترون سازی، پاسخ مساعدتری می‌دهند، در حالی‌که در بهار و تابستان به دلیل رشد فعال جوانه‌ها و عدم وجود پوسته‌های محافظ در اطراف آنها سرعت نفوذ محلول‌های ضدعفونی کننده در بافت، زیاد بوده و غلظت‌های زیاد محلول، به پوسیدگی و مرگ بافت‌ها منجر شده و غلظت‌های کم آن، تأثیری برحذف آلودگی‌های نمونه ندارد (امام ۱۳۸۲: ۱۵-۱۰) این تفاوت در نتیجه می‌تواند به دلیل تفاوت موجود در جوانه و تعداد فلس پوشش‌دهنده جوانه‌های این دو درخت که از دو خانواده‌ی گیاهی متفاوت هستند باشد.

بالا بودن درصد آلودگی قارچی ریزنمونه‌های فصل زمستان (۷۵ درصد) نسبت به سایر فصول به نظر می‌رسد می‌تواند به دلیل نفوذ آلودگی قارچی به فلس جوانه‌های ریزنمونه‌ها (شکل ۱-a) و رشد میسیلیوم‌های قارچی باشد که با گذشت زمان و شرایط آب و هوایی نیمه مرطوب منطقه رشد کرده و موجب می‌شود حذف آلودگی قارچی ریزنمونه‌های تهیه شده در فصل زمستان موفقیت‌آمیز نباشد، چرا که رشد میسیلیوم و ظهور آلودگی قارچی برخی نمونه‌ها پس ازگذشت مدتی از استقرار و رشد جوانه‌ها اتفاق افتاد (شکل ۱-

b) که می‌تواند نشان دهنده نفوذ آلودگی به درون فلس‌های جوانه‌ها باشد در ضدعفونی سطحی جوانه‌های گردو نیز جوانه‌های کوچک فلس گرفته، بهترین پاسخ را به تیمارهای سترون‌سازی از خود نشان دادند و حذف فلس‌ها موجب کاهش تراکم آلودگی‌های احتمالی در فواصل پوسته‌ها شد (امام ۱۳۸۲ ۱۰-۱۵) . ضدعفونی همراه با حذف فلس جوانه‌ها در مورد درخت زغال‌اخته به دلیل کوچک و حساس بودن جوانه اصلی که تنها یک لایه فلس از آن محافظت می‌کند، ممکن است موجب ازبین رفتن آن شود ولی انجام حذف فلس جوانه، پس از ضدعفونی سطحی می‌تواند به عنوان راه‌کاری مناسب برای استفاده از نمونه‌های فصل زمستان مورد بررسی قرار گیرد.

جدول (۱) اثر استفاده از قطعات مختلف شاخساره بر میزان حذف آلودگی

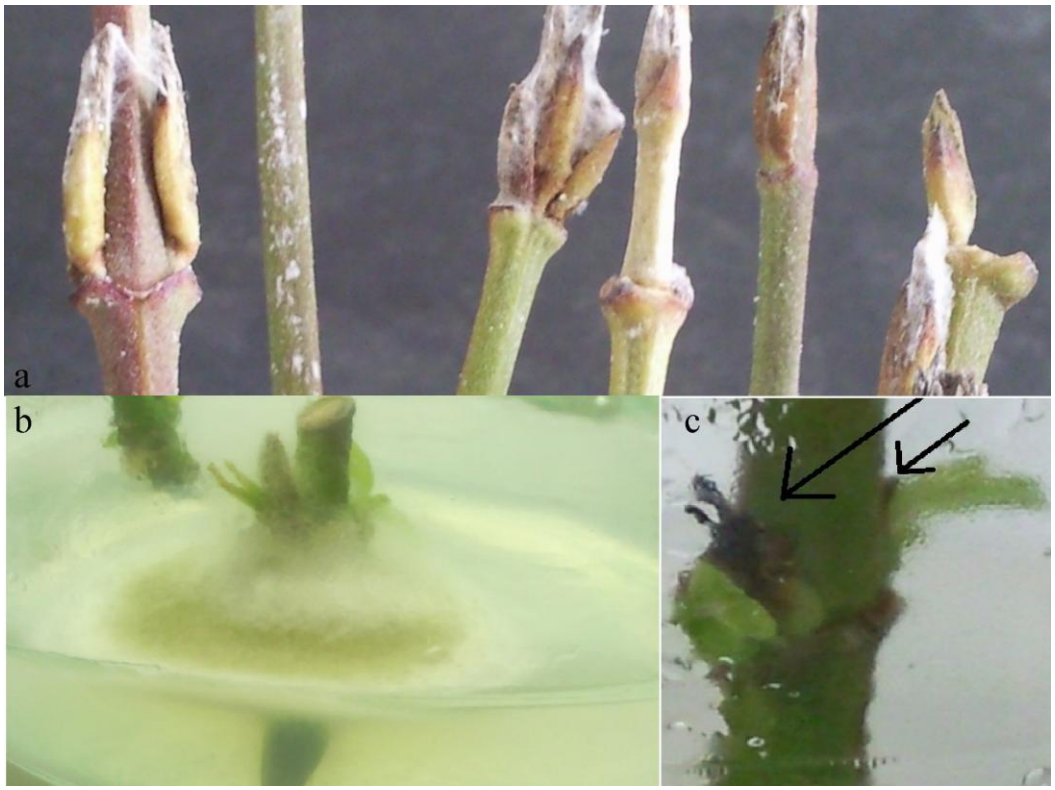
		درصد نمونه سوخته	درصدآلودگی باکتریایی	درصد آلودگی قارچی	درصد کل آلودگی
قطعات شاخساره	گره یک تا سه	۱۶/۷۵b	۱۱/۷۵b	۲۱/۷۵b	۲۸b
	گره چهار تا پنج	۱۱/۷۵b	۱۸b	۶۵/۵a	۷۰/۵a
	شاخه جانبی	۳۹/ ۲۵a	۱۱/۷۵b	۱۰/۳۹b	۱۸b

جدول (۲) اثر زمان نمونه برداری بر میزان حذف آلودگی

		درصد نمونه سوخته	درصدآلودگی باکتریایی	درصد آلودگی قارچی	درصد کل آلودگی
زمان نمونه‌برداری	تابستان	۳۰a	۰/۰۰ b	۰/۰۰ c	۰/۰۰ c
	پاییز	۲۵a	۳۷/۵۰a	۳۱/۲۵b	۴۳/۷۵b
	زمستان	۲۵a	۵۰a	۷۵a	۸۷/۵۰a

جدول (۳) اثر زمان تیمار هیپوکلریت سدیم بر میزان حذف آلودگی

		درصد نمونه سوخته	درصدآلودگی باکتریایی	درصد آلودگی قارچی	درصد کل آلودگی
مدت زمان تیمار هیپوکلریت سدیم	۱۵ دقیقه	۱۱/۲۵b	۴۲/۵۰a	۶۳/۷۵a	۶۸/۷۵a
	۲۰ دقیقه	۲۶/۲۵ab	۲۱/۲۵b	۴۲/۵۰b	۴۲/۵۰b
	۲۵ دقیقه	۳۷/۵۰a	۱۶/۲۵b	۱۶/۲۵c	۲۱/۲۵c



شکل (۱) a- رشد میسیلیوم قارچی درون جوانه‌های ضدعفونی نشده. b- رشد آلودگی قارچی جوانه‌ها پس از استقرار. c- سوختگی جوانه‌های اصلی ناشی از تیمارهای ضدعفونی

۵- نتیجه گیری

نتایج نشان داد به منظور موفقیت درحذف آلودگی و به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از مواد ضدعفونی‌کننده برای تیمار ضـدعفونی سطحی ریزنمونه‌های زغال‌اخته، استفاده از گره‌های یک تا سه و نمونه‌گیری از شاخساره‌ها در اواخر فصل تابستان، بهترین نتایج را دربر خواهد داشت.

۶-منابع

امام، میترا (۱۳۸۳). بررسی تکثیر غیرجنسی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia*) با کشت سرشاخه های انتهایی. *فصلنامه پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی*، ۶۳(۲)، ۱۰-۱۵.

سمیعی راد، زهره (۱۳۹۰). زغال‌اخته (کاشت، داشت و برداشت)، تهران، آییژ.

گوران، علی و همکاران (۱۳۹۲). بررسی اثر نانوذرات نقره روی ضدعفونی سطحی ریزنمونه انگور *vitis vinifera* L. در شرایط درون شیشه ای. *هشتمین کنگره علوم باغبانی ایران*، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، ۱-۴.

Ďurkovič, J. (2008). Micropropagation of mature Cronus mas 'Macrocarpa'. *Trees*, *22*(4), 597-602.

Fakhrfeshani, M., Bagheri, A., & Sharifi, A. (2012). Disinfecting Effects of Nano Silver Fluids in Gerbera (Gerbera jamesonii) Capitulum Tissue Culture. *J. BIOL.*

Hassanpour, H., Yousef, H., Jafar, H., & Mohammad, A. (2011). Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (Cornus mas L.) genotypes in Iran. *Scientia Horticulturae*, *129*(3), 459-463.

Mamedov, N., & Craker, L. E. (2002, August). Cornelian cherry: a prospective source for phytomedicine. In *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants 629* (pp. 83-86).

Oyebanji, O. B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N. B., Idris, M. S., Nnodi, U. N., ... & Ogbadu, G. H. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, *8*(20).

Prasad, R. N., & Chaturvedi, H. C. (1988). Effect of season of collection of explants on micropropagation of Chrysanthemum morifolium. *Biologia plantarum*, *30*(1), 20-24.

Smart, D. R., Ferro, A., Ritchie, K., & Bugbee, B. G. (1995). On the use of antibiotics to reduce rhizoplane microbial populations in root physiology and ecology investigations. *Physiologia plantarum*, *95*(4), 533-540.

Pankhurst, C. E. (1977). Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast-and slow-growing strains of Rhizobium nodulating Lotus species. *Canadian journal of microbiology*, *23*(8), 1026-1033.