

اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر اندام‌زایی گونه زالزالک ایروانی (*Crataegus pseudoheterophylla* Pojark.) در کشت درون شیشه‌ای

فاطمه احمدلو^۱، مسعود طبری کوچکسرای^{۲*}، پژمان آزادی^۳
آیدین حمیدی^۴ و ابراهیم بیرامی‌زاده^۵

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۷)

چکیده

زالزالک از تیره گل سرخ (*Rosaceae*) و از جمله درختانی است که دارای مصارف دارویی، زینتی و ارزش صادراتی است. ارزیابی مرحله شاخه‌زایی گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. با استفاده از غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره حاوی جوانه جانبی مورد بررسی قرار گرفت. سرشاخه‌های رشد یافته از جوانه‌های گره‌ای، در ۳۰ تیمار مختلف از هورمون‌های BAP، KIN، 2iP، Zt در ترکیب با NAA هریک در سه تکرار کشت شدند که هر تکرار حاوی ۵ ریزنمونه بود. داده‌ها پس از سه واکشت تجزیه و تحلیل گردید. برای آزمایش ریشه‌زایی، قسمت انتهایی ساقه در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در زمان‌های مختلف شامل ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه قرار داده و سپس در محیط کشت ۱/۲ VS بدون هورمون IBA کشت شدند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان شاخه‌زایی (۳۹/۳۳ عدد) در تیمار ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، بزرگ‌ترین طول شاخه (۴/۶۷ سانتی‌متر) در تیمار ۷ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین میزان اندازه برگ (۳/۷۳ سانتی‌متر) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر Zt در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۳۳/۳۳ درصد) و تعداد ریشه (۴ عدد) در ۴۰ دقیقه غوطه‌وری در هورمون IBA مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آمینوپورین، سایتوکینین، شاخساره، کشت تک گره ساقه، نفتالین استیک اسید

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه جنگل‌داری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۴. استادیار مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج

۵. مربی پژوهشی ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtabari@modares.ac.ir

مقدمه

جنس زالزالک (*Crataegus* L.) از طایفه *Crataegeae*، زیر تیره *Maloideae* متعلق به تیره رز (*Rosaceae*) است. در ایران حدود ۲۲ گونه و ۵ هیبرید از این جنس وجود دارد که از این تعداد ۴ گونه بوم‌زاد، ۵ گونه نادر و ۴ گونه در حال انقراض است (۱۶). زالزالک‌ها دارای ویژگی سازگاری بالا نسبت به خشکی و سرما، بهترین پایه برای پیوند به، گلابی و سیب، خواص دارویی و ارزش صادراتی و کاربرد در فضای سبز شهری می‌باشند. این گیاهان به دلیل دارا بودن میوه پارتوکارپیک (تشکیل و رشد میوه بدون تلقیح تخمک‌ها) و یا گسترش آندوکارپ بدون لقاح بذر واقعی، جوانه‌زنی بذر آنها با مشکلاتی همراه است (۸). بذرهای دارای خواب فیزیکی (مقاومت مکانیکی پوسته) و خواب جنین می‌باشند و جوانه‌زنی آنها ممکن است ۲ تا ۳ سال طول بکشد (۱۳). در این راستا روش کشت درون شیشه‌ای امکان رشد سریع و تولید با کیفیت بالای گیاهان را می‌دهد و ابزاری مناسب برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی دستیابی به آنها دشوار است و برای حفاظت ژرم پلاسما و بهبود ژنتیکی گونه‌ها نیز مفید می‌باشند (۲۶). در این رابطه کشت جوانه حاصل از سرشاخه به دلیل همسانی گیاه حاصل از کشت به والد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مرحله شاخه‌زایی از مهم‌ترین مراحل تجاری سازی در کشت بافت محسوب می‌شود و در بین ترکیبات محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد به ویژه سایتوکینین‌ها نقشی بسیار تعیین کننده در میزان شاخه‌زایی و رشد سلول‌های گیاهی دارند.

چندین مطالعه در رابطه با کشت بافت خانواده *Rosaceae* انجام گرفته است. لاپیچینو و آيرو (۱۴) روی *Crataegus monogyna* میانگین تعداد ۶/۳ شاخه را با طول ۳/۵ سانتی‌متر در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) و بیشترین درصد ریشه‌زایی را در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نتیجه گرفتند. نس و همکاران (۲۶) روی *C. aronia* L. میانگین تعداد ۵/۸

شاخه را در غلظت ۰/۳۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند. ماهاریک و همکاران (۱۹) روی *C. sinaica* Boiss. تعداد ۷/۶۷ شاخه با طول ۲/۵ سانتی‌متر را در محیط کشت MS (۲۴) شامل ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و بیشترین میزان ریشه‌زایی (۹ درصد) را در محیط MS ۱/۲ همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آوردند. دومیری (۱۰) در بررسی تکثیر *C. azarolus* L. در محیط کشت MS، تعداد ۴ شاخه با طول ۲/۶۹ سانتی‌متر را در غلظت ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA و ۴۵ درصد ریشه‌زایی را در ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA نتیجه گرفت. مطالعات در خصوص ریشه‌زایی جنس زالزالک مبین ریشه‌زایی مشکل آن است. در غلظت‌هایی از ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، IAA و NAA در محیط کشت QL، آل-ماناسراه (۲) موفق به ریشه‌زایی *C. aronia* نشد. در پژوهش رونالد متیویر (۲۹) روی *Crataegus* spp. با قرار دادن نو ساقه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ شامل ۰، ۰/۱۷۵، ۱/۷۵ و ۱۷/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۶ درصد) و بیشترین میانگین تعداد ریشه (۴/۱۳ عدد) در ۱۷/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA پس از ۶ روز غوطه‌وری به‌دست آمد.

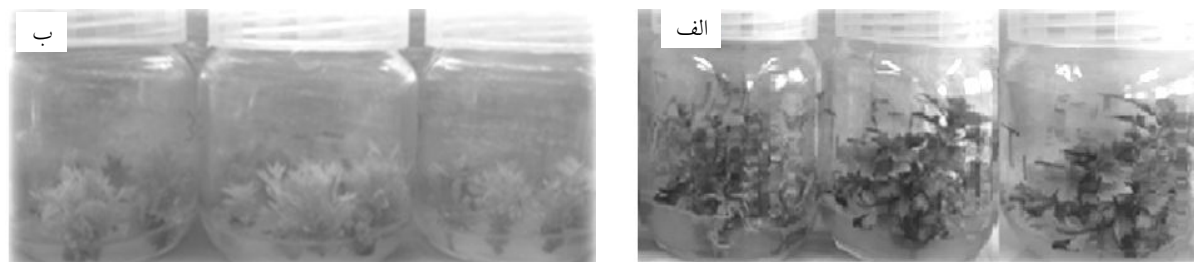
تاکنون در داخل کشور مطالعه‌ای روی تکثیر جنس زالزالک از طریق کشت درون شیشه‌ای انجام نگرفته است. از طرفی گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. به دلیل پراکنش اکولوژیکی محدود در آسیای غربی (ایران، افغانستان و ترکیه) و قفقاز، تجدید حیات طبیعی ضعیف و مشکلات تکثیر نهال، در معرض انقراض است (۱۵). به همین دلیل تکثیر این گونه جزو اولویت طرح‌های تحقیقاتی اداره کل منابع طبیعی استان مرکزی می‌باشد. هدف این پژوهش رسیدن به دستورالعمل مناسب جهت تکثیر این گونه، با بررسی مرحله شاخه‌زایی آن در شرایط کشت درون شیشه‌ای با استفاده از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام پژوهش حاضر از سر شاخه‌های جوان پایه‌های مادری گونه *Crataegus pseudoheterophylla* با ویژگی‌های یکسان از نظر قطر، ارتفاع و مورفولوژی که فاقد عیب و آثار تنش‌های محیطی بودند و از قسمت فوقانی تاج و رو به نور استفاده گردید. این سرشاخه‌ها در اواخر بهار از منطقه مورد مطالعه در روستای دو خواهران در شهرستان شازند استان مرکزی با عرض جغرافیایی $33^{\circ}51'56''$ شمالی و طول جغرافیایی $49^{\circ}24'12''$ و متوسط ارتفاع منطقه ۲۲۰۰ متر، متوسط بارندگی ۵۶۸/۵۴ میلی‌متر و اقلیم منطقه نیمه مرطوب سرد و کوهستانی (۱) برداشت و در بسته بندی‌های تمیز و به‌وسیله فلاسک یخ به آزمایشگاه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات منتقل شدند. تک گره‌های حاوی جوانه‌های جانبی به اندازه ۱ سانتی‌متری از شاخه‌ها جدا شد. ابتدا تمامی نمونه‌ها با آب و مایع ظرفشویی به مدت ۳۰ دقیقه ضد عفونی سطحی و سپس با محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس دو بار با آب دی یونیزه شستشو شد. آنگاه ریز نمونه‌ها در محلول سفید کننده تجاری هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت زمان ۱۵ دقیقه و ۵ قطره توئین ۲۰ (به‌منظور افزایش نفوذ پذیری محلول) و سه بار شستشو با آب دی یونیزه شده در زیر لامینار فلو غوطه‌ور شد. پس از ضد عفونی، نمونه‌ها در آب مقطر سترون حاوی اسید اسکوربیک (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. انتهای قهوه‌ای قاعده جوانه‌ها قطع و زوائد جانبی شاخه حذف و سپس کشت در محیط MS حاوی سایتوکینین BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) صورت گرفت (۲۶). تیمارها ابتدا به مدت یک هفته در تاریکی و سپس در روشنایی قرار گرفت. کشت‌ها در شرایط خاص اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در زیر نور سفید به شدت سه هزار لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک ماه بعد از استقرار، نمونه‌هایی که رشد کافی داشتند (حدود ۱/۵ سانتی‌متر) به محیط کشت شاخه‌زایی با غلظت‌های

مختلفی از NAA (۰، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، BAP (۶، ۷ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، KIN (۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، 2iP (۵/۲، ۵/۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، Zt (۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند. در این مرحله از روش تقسیم شاخه‌ها و محیط کشت MS و ۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید استفاده شد. پس از سه بار واکشت به فواصل ۳۰ روز، صفات تعداد شاخه‌ها، تعداد برگ نکرده شده، ارتفاع گیاهچه و اندازه برگ یادداشت‌برداری شد. آزمایش شاخه‌زایی شامل ۳۰ تیمار و ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ ریز نمونه و در مجموع ۹۰ شیشه و ۴۵۰ ریز نمونه برای کل تیمارها بود. جهت ریشه‌زایی واکشت شاخه‌های با طول ۲ - ۱/۵ سانتی‌متری در محیط کشت MS بدون هورمون برای یک ماه انجام شد. سپس زخم‌زنی قسمت انتهایی ساقه به طول ۱ میلی‌متر توسط اسکالپل انجام و در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در زمان‌های مختلف شامل ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه قرار داده و به محیط کشت VS ۱/۲ (۳۴) بدون هورمون IBA منتقل شدند. گیاهچه‌ها در محیط کشت VS ۱/۲ حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG (فلوروگلوسینول) با ۱/۵ درصد ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به مدت ۱ هفته در تاریکی در اتاق رشد نگهداری شدند و سپس در معرض فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در زیر نور سفید به شدت ۲ هزار لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. واکشت شاخه‌ها هر ماه یک‌بار و یادداشت‌برداری پس از ۵ واکشت ماهیانه بر اساس درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه، تعداد برگ نکرده و طول ریشه انجام گرفت. آزمایش ریشه‌زایی شامل ۸ تیمار و ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۳ ریزنمونه و در مجموع ۲۴ شیشه و ۷۲ ریزنمونه برای کل تیمارها بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (17) صورت گرفت. ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با



شکل ۱. شمایی از گیاهچه‌های تیمار ۸ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر NAA (الف) تیمار ۴ میلی گرم در لیتر Zt در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA (ب)

طول برگ در ۸ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده می‌شود. ترکیبی از غلظت هورمون‌های BAP و NAA نشان می‌دهد که هر اندازه غلظت BAP کمتر باشد شاخه‌زایی کمتر و تعداد برگ نکروزه بیشتر و هر اندازه نسبت BAP به NAA بیشتر باشد میزان شاخه‌زایی بیشتری انجام گرفته است. به‌طور کلی با افزایش غلظت هورمون اندازه برگ کوچک‌تر شده است. با افزایش غلظت هورمون KIN میزان شاخه‌زایی و طول شاخه، با افزایش غلظت هورمون Zt میزان شاخه‌زایی و اندازه برگ و با افزایش غلظت هورمون Zt میزان شاخه‌زایی افزایش یافته است (جدول ۱). شمایی از پرآوری گیاهچه‌ها در شکل ۱ آورده شده است.

ریشه‌زایی نوساقه

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار آماری تمامی مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در تیمارهای مدت زمان غوطه‌وری را در هورمون ۳۰۰ میلی گرم در لیتر IBA نشان می‌دهد (جدول ۲). بیشترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در تیمار ۶ (۴۰ دقیقه غوطه‌وری در هورمون IBA) وجود دارد. بیشترین تعداد برگ نکروزه در تیمار ۲ (۵ دقیقه غوطه‌وری در هورمون IBA) مشاهده می‌شود (جدول ۲). شمایی از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در تیمار ۶ (۴۰ دقیقه غوطه‌وری در هورمون IBA) آورده شده است (شکل ۲).

بحث

تکثیر درختان از طریق کشت بافت در آینده می‌تواند با سرعتی

آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و همگنی واریانس داده‌ها به وسیله آزمون لون (Levene) تست گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تعیین اثر تیمارها از تجزیه واریانس یک طرفه استفاده گردید و میانگین‌ها با آزمون دانکن تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

شاخه‌زایی نوساقه

تمامی مشخصه‌های اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای هورمونی قرار گرفتند و اختلاف معنی‌دار آماری را در تجزیه واریانس نشان دادند (جدول ۱). بیشترین میزان شاخه‌زایی (۳۹/۳۳ عدد شاخه) و کمترین میزان تعداد برگ نکروزه شده (۰/۳۳ عدد برگ) در تیمار ۸ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر NAA، بزرگ‌ترین طول شاخه (۴/۶۷ سانتی‌متر) در تیمار ۷ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده می‌شود. بیشترین میزان اندازه برگ (۳/۷۳، ۳/۴۳ و ۳/۴ سانتی‌متر) به ترتیب در تیمارهای ۲ میلی گرم در لیتر Zt در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۳ میلی گرم در لیتر Zt در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۱۰ میلی گرم در لیتر Zt در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA وجود دارد (جدول ۱). شاخه‌زایی در محیط کشت بدون هورمون و محیط‌هایی که شامل غلظت‌های مختلفی از NAA بود انجام نگرفت. بیشترین تعداد برگ نکروزه شده در محیط کشت بدون هورمون و کمترین طول شاخه در ۷ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۸ میلی گرم در لیتر NAA و کمترین

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده گونه *C. pseudohetrophylla* تحت تیمار غلظت هورمونی

صفات	شاخه‌زایی (تعداد)	برگ نکروده شده (تعداد)	طول شاخه (سانتی‌متر)	اندازه طول برگ (سانتی‌متر)
تیمارها	میانگین مربعات F	میانگین مربعات F	میانگین مربعات F	میانگین مربعات F
	۲۹۹/۸۵	۲۰۶/۰۰۴**	۱۲۱/۲۸	۲۴/۰۷۳**
	۷/۶۵۲**	۱/۲۲۶	۲/۹۴**	۱/۸۶۴
تیمار ۱ (شاهد)	بدون هورمون	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۲۲/۶۷±۲/۰۲ ^a	۱/۸۳±۰/۲ ^{d-h}
تیمار ۲	۱ mg/l NAA	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۲۲±۲/۵۲ ^a	۱/۸۷±۰/۲ ^{c-h}
تیمار ۳	۲ mg/l NAA	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۱۶±۲/۴ ^b	۲/۰۳±۰/۰۷ ^{c-h}
تیمار ۴	۳ mg/l NAA	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۱۴±۱/۹ ^{bc}	۲/۱۳±۰/۲ ^{c-g}
تیمار ۵	۱ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۱۱/۶۷±۱/۷۳ ^{cd}	۲/۲±۰/۲۲ ^{c-f}
تیمار ۶	۲ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۰/۶۷±۰/۰۵ ^{hi}	۹±۱/۴ ^{de}	۲/۲۳±۰/۲۲ ^{c-f}
تیمار ۷	۳ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۰/۰۰۰±۰/۰۰ ⁱ	۱۴/۶۷±۱/۸ ^{bc}	۱/۸±۰/۲ ^{d-h}
تیمار ۸	۴ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۱/۳۳±۰/۰۸ ^{hi}	۱±۰/۰۷ ^{gh}	۲/۳۷±۰/۲۲ ^{c-e}
تیمار ۹	۵ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۲±۰/۲ ^{hi}	۱±۰/۰۷ ^{gh}	۲/۶۷±۰/۲۵ ^{bc}
تیمار ۱۰	۶ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۴/۳۳±۰/۳۵ ^{fg}	۰/۶۷±۰/۱ ^{gh}	۱/۸±۰/۲ ^{d-h}
تیمار ۱۱	۶ mg/l BAP + ۲ mg/l NAA	۴/۶۷±۰/۳۷ ^{fg}	۱±۰/۰۷ ^{gh}	۱/۸۳±۰/۲ ^{d-h}
تیمار ۱۲	۶ mg/l BAP + ۳ mg/l NAA	۱/۳۳±۰/۲ ^{hi}	۷±۰/۸ ^{ef}	۲/۱۳±۰/۱۳ ^{c-f}
تیمار ۱۳	۷ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۳۸/۶۷±۵/۱ ^a	۱±۰/۰۵ ^{gh}	۲/۱±۰/۲ ^{c-g}
تیمار ۱۴	۷ mg/l BAP + ۲ mg/l NAA	۱۴/۳۳±۲/۴ ^c	۱±۰/۰۷ ^{gh}	۱/۴۳±۰/۱۸ ^{f-h}
تیمار ۱۵	۷ mg/l BAP + ۳ mg/l NAA	۴/۶۷±۰/۳۵ ^{fg}	۲/۳۳±۰/۲ ^{gh}	۱/۴۷±۰/۰۸ ^{f-h}
تیمار ۱۶	۸ mg/l BAP + ۱ mg/l NAA	۱۷±۳/۴ ^b	۱±۰/۰۵ ^{gh}	۱/۲±۰/۱۷ ^h
تیمار ۱۷	۸ mg/l BAP + ۲ mg/l NAA	۳۹/۳۳±۳/۳۵ ^a	۰/۳۳±۰/۰۰ ^h	۱/۶±۰/۱۹ ^{e-h}
تیمار ۱۸	۸ mg/l BAP + ۳ mg/l NAA	۹/۶۷±۲/۱ ^{de}	۲/۶±۰/۰۸ ^{gh}	۱/۳±۰/۰۷ ^{gh}
تیمار ۱۹	۶ mg/l KIN + ۱ mg/l NAA	۰/۳۳±۰/۰۰ ^{hi}	۴/۳۳±۰/۳۵ ^{f-h}	۲/۶±۰/۲۵ ^{cd}
تیمار ۲۰	۷ mg/l KIN + ۱ mg/l NAA	۱±۰/۰۵ ^{hi}	۲/۶۷±۰/۰۸ ^{gh}	۲/۶۷±۰/۲۵ ^{bc}
تیمار ۲۱	۸ mg/l KIN + ۱ mg/l NAA	۱/۳۳±۰/۰۷ ^{hi}	۲/۳۳±۰/۰۹ ^{gh}	۱/۸±۰/۱۹ ^{d-h}
تیمار ۲۲	۹ mg/l KIN + ۱ mg/l NAA	۱/۳۳±۰/۰۷ ^{hi}	۳/۳۳±۰/۳ ^{f-h}	۱/۹۳±۰/۲ ^{c-h}
تیمار ۲۳	۱۰ mg/l KIN + ۱ mg/l NAA	۲/۳۳±۰/۲ ^{g-i}	۲±۰/۰۸ ^{gh}	۲/۰۳±۰/۲ ^{c-g}
تیمار ۲۴	۲/۵ mg/l 2iP + ۱ mg/l NAA	۱±۰/۰۰ ^{hi}	۵±۰/۲۵ ^{fg}	۲/۰۷±۰/۲ ^{c-g}
تیمار ۲۵	۵ mg/l 2iP + ۱ mg/l NAA	۲/۳۳±۰/۰۶ ^{g-i}	۳/۳۳±۰/۲ ^{f-h}	۲/۳۳±۰/۰/۲۵ ^{c-e}
تیمار ۲۶	۷/۵ mg/l 2iP + ۱ mg/l NAA	۲/۶۷±۰/۱۲ ^{gh}	۲±۰/۱ ^{gh}	۲/۶۷±۰/۲۷ ^{bc}
تیمار ۲۷	۱۰ mg/l 2iP + ۱ mg/l NAA	۴/۳۳±۰/۳ ^{fg}	۲/۶۷±۰/۳ ^{gh}	۳/۴±۰/۳ ^a
تیمار ۲۸	۲ mg/l Zt + ۱ mg/l NAA	۵/۳۳±۰/۵۶ ^f	۲/۶۷±۰/۱۳ ^{gh}	۳/۷۳±۰/۳۳ ^a
تیمار ۲۹	۳ mg/l Zt + ۱ mg/l NAA	۸/۶۷±۱ ^e	۲±۰/۱ ^{gh}	۳/۴۳±۰/۳۳ ^a
تیمار ۳۰	۴ mg/l Zt + ۱ mg/l NAA	۱۱/۶۷±۱/۸ ^d	۱/۶۷±۰/۱ ^{gh}	۳/۳۷±۰/۳۳ ^{ab}

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱، اعداد پس از ± اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون مبین معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.



شکل ۲. شمایی از گیاهچه‌های *C. pseudoheterophylla* در تیمار ۶ (چهل دقیقه غوطه‌وری در هورمون IBA)

متناسب با سرعت تخریب برای کشت و تجدید حیات دوباره جنگل‌ها مورد استفاده قرار گیرد. آنچه موجب برتری این روش نسبت به سایر روش‌ها می‌گردد، سرعت تکثیر و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ مسن است. جوانه بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را دارد و به همین دلیل از ثبات ژنتیکی کافی برخوردار بوده و کمترین مقدار تغییرات ژنتیکی در تکثیر به این روش دیده می‌شود (۷).

شاخه‌زایی نوساقه

مرحله شاخه‌زایی نوساقه در پژوهش حاضر تحت تأثیر غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد بود. در پژوهش حاضر پس از ۳ زیر کشت، مقادیر بالای BAP (۸ میلی گرم در لیتر) و NAA (۲ میلی گرم در لیتر) سبب شاخه‌زایی به تعداد ۳۹/۳۳ عدد در گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. گردید. ماهاریک و همکاران (۱۹) نیز با استفاده از ترکیب ۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۲ میلی گرم در لیتر NAA موفق به میزان بالایی از شاخه‌زایی (۲۲ عدد) بدون تشکیل کالوس در گونه *C. sinaica* شدند. گوکبونار (۱۲) نیز پس از کشت *Crataegus* sp. در محیط شامل ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA نتیجه گرفت که تعداد شاخه‌ها در محیط کشت حاوی سطوح بالای BAP نسبت به سطوح کم آن به‌طور معنی‌داری بیشتر است. تشکیل شاخه نشان دهنده تشکیل پریموردیوم‌های جدید شاخه تحت تأثیر هورمون‌های محیط کشت است. در حضور BAP شاخه‌زایی در پای شاخساره‌ها انجام می‌شود ولی این شاخساره‌های جانبی از نوع محوری بوده

و به‌ندرت از شاخساره‌های نابجا هستند (۲۳). نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید است، بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخه‌زایی بیشتری تولید می‌شود (۱۴) که دلیلی بر نتایج پژوهش حاضر است. در پژوهش حاضر در محیط کشت MS، ترکیب BAP به همراه NAA، سطح متعادل هورمونی را برای تکثیر سریع شاخه زالزالک در کشت ایجاد کرد. علت این رخداد، می‌تواند ترکیبات فلاونوئیدی در محیط کشت حاوی BAP باشد. زیرا این هورمون فعالیت آنزیم‌های پرکسیداز را که موجب تجزیه ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود، تشدید می‌کند (۹) و از طرفی با افزایش تولید سایتوکینین داخلی، در افزایش شاخه‌زایی مؤثر است (۶).

نسبت مناسب ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین در محیط کشت برای رسیدن به گیاه کامل مؤثر می‌باشد، به‌طوری‌که سبب القاء تقسیم سلولی و تمایز سلولی و موجب اندام‌زایی می‌گردد. همچنین افزایش غلظت هورمون NAA تا مقدار معینی سبب حذف ترکیبات فنولی می‌شود و این اثر ممکن است به‌دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنولی توسط آنزیم اکسین اکسیداز باشد که فعال کننده این آنزیم، غلظت‌های بالای NAA می‌باشد (۵) در پژوهش حاضر از هورمون‌های KIN، 2iP و Zt نیز با غلظت‌های متفاوت استفاده گردید ولیکن شاخه‌زایی در آنها همانند BAP مطلوب نبود. در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت هورمون‌های KIN، 2iP و Zt میزان شاخه‌زایی روند صعودی داشته است. در همین راستا، پاتی و همکاران (۲۸) در ارقام مختلف رز تیمار شده با هورمون‌های

جدول ۲. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات در محیط کشت VS ۱/۲ و غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر IBA در مدت زمان‌های مختلف

تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	F
تعداد شاخه‌زایی	۰/۰۰۰±۰/۰۰۰ ^f	۰/۰۰±۰/۰۰۰ ^f	۴/۳۳±۰/۵ ^{de}	۱۰/۶۷±۰/۶۶ ^c	۲۰/۶۷±۳/۴۸ ^b	۳۳/۳۳±۴/۲ ^a	۲۱/۶۷±۱/۲ ^b	۸/۳۳±۰/۸۸ ^{cd}	۵۱/۹۳ ^{**}
تعداد میوه	۰/۰۰±۰/۰۰۰ ^e	۰/۰۰±۰/۰۰۰ ^e	۰/۶۶±۰/۰۳ ^{de}	۱±۰/۰۵ ^{cd}	۲/۳۳±۰/۳۳ ^b	۴±۰/۸ ^a	۱/۶۷±۰/۳۳ ^{bc}	۱±۰/۰۶ ^{cd}	۲۱/۳۳ ^{**}
تعداد برگ	۲/۶۷±۰/۳۳ ^b	۴/۳۳±۰/۸۸ ^a	۱/۶۷±۰/۱۸ ^{bc}	۲/۳۳±۰/۳۳ ^{bc}	۱/۳۳±۰/۳۳ ^{bc}	۰/۶۷±۰/۰۸ ^c	۱±۰/۲ ^{bc}	۲/۳۳±۰/۳۳ ^{bc}	۴/۴۰۹ ^{**}
تعداد میوه (تیمار)	۰/۰۰±۰/۰۰۰ ^d	۰/۰۰±۰/۰۰۰ ^d	۰/۸±۰/۰۲ ^{cd}	۲/۸±۰/۶۵ ^b	۴/۵۷±۰/۳۲ ^a	۴/۹۷±۰/۴۱ ^a	۳/۹۳±۰/۲۲ ^a	۱/۵±۰/۲۳ ^c	۲۹/۳۱ ^{**}

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱، اعداد پس از $\pm$ اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون مبین معنی دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

تیمار ۱: بدون هورمون، تیمار ۲: پنج دقیقه، تیمار ۳: ده دقیقه، تیمار ۴: بیست دقیقه، تیمار ۵: سی دقیقه، تیمار ۶: چهل دقیقه، تیمار ۷: پنجاه دقیقه و تیمار ۸: شصت دقیقه

در پژوهش حاضر در محیط‌های حاوی NAA اما فاقد BAP هیچ شاخساره‌ای تشکیل نشد. لیبیلای و همکاران (۱۸) در *Pyrus communis* L. و میگوئل و همکاران (۲۱) در *Prunus dulcis* M. و گوکونار (۱۲) نیز در *Crataegus* sp. مشاهده کردند که هیچ مورد شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی NAA و بدون سایتوکینین صورت نگرفت بنابراین سایتوکینین برای تشکیل شاخساره لازم است. استفاده از BAP و NAA به ترتیب منجر به افزایش تعداد جوانه‌های جانبی و طول جوانه‌های جانبی می‌شود. پس از واكشت نمونه‌ها و انتقال به محیط جدید بیشترین تعداد برگ‌های نکروده شده در محیط کشت بدون هورمون و بدون سایتوکینین مشاهده گردید. سایتوکینین‌ها علاوه بر آنکه سرعت تقسیم را تنظیم می‌کنند، رشد جوانه‌های جانبی را نیز تحریک می‌نمایند (۳). همانند یافته‌های لاپیچینو و آیرو (۱۴) در پژوهش حاضر نیز در محیط بدون هورمون تا زمانی که ذخایر مواد کربوهیدراتی و هورمون درون‌زا در ریز نمونه‌ها وجود داشته باشند، برگ‌ها سالم و سپس به دلیل فقدان

مرحله شاخه‌زایی، (هر کدام در سطوح ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹ و ۱/۲ میلی گرم در لیتر) گزارش کردند که BAP در سطح ۱/۲ میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد مؤثرتری در تحریک شاخه‌زایی ساقه می‌باشد و اثر بیشتری نسبت به هورمون‌های KIN، TDZ، 2iP و meta-topolin (mT) دارد. هم‌چنین در بررسی اثر چهار نوع سایتوکینین BAP، KIN، 2iP و TDZ در ریز ازدیادی گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.)، رقم *Lapins* بهترین نوع سایتوکینین برای فاز تکثیر و شاخه‌زایی BAP بود (۳۰). تأثیر سایتوکینین KIN در تولید شاخساره‌های قوی و برگ‌های توسعه یافته، با شاخه‌زایی کم همراه بوده است. Zt منجر به قوی‌تر شدن ساقه و توسعه اندازه برگ در گیاه شده، درحالی که 2iP باعث توسعه اندازه برگ در غلظت بالا گردید (۳۰). بر اساس نتایج مپس و زایر (۲۰)، BAP از دیگر سایتوکینین‌ها از جمله KIN، 2iP و Zt فعال‌تر است، لذا استفاده از آن برای ریز ازدیادی تجارتي که سهولت و ارزش اقتصادی اهمیت دارد مقرون به صرفه‌تر است.

مواد تنظیم کننده رشد و عدم تقسیم سلولی و فعالیت آنزیم های رشد، برگ ها نکروزه شده و گیاهچه ها از بین می روند.

در آزمایش حاضر بلندترین میانگین طول شاخساره (۴/۶۷ سانتی متر) در تیمار ۷ میلی گرم در لیتر BAP و ۲ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد و با افزودن BAP به محیط کشت تا غلظت ۸ میلی گرم در لیتر طول شاخساره ها به میزان جزئی کاهش نشان داد. احتمال دارد که کاهش طول شاخساره ها به دلیل تأثیر BAP بر افزایش تعداد جوانه های نابه جا روی ریز نمونه و افزایش رقابت بین جوانه ها باشد (۱۷). درحالی که در محیط کشت های با غلظت کم از BAP شاخساره ها به صورت تکی و یا با تعداد کمی شاخساره جانبی شروع به رشد نمودند و رقابت کمتری بین شاخساره ها مشاهده گردید. افزایش غلظت NAA در محیط کشت های بدون سایتوکینین، متوسط رشد طولی شاخساره ها را افزایش داد. هم چنین با افزایش غلظت هورمون KIN میزان طول شاخه روند صعودی داشت. بارالدی (۴) در بررسی اثر BAP روی *Prunus irsitta* نتیجه گرفت که BAP رشد طولی شاخه ها را کاهش می دهد که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت دارد که افزایش تعداد شاخه زایی روی میزان رشد طولی ساقه تأثیری نداشت. هرچند هر دو جنس *Prunus* و *Crataegus* از خانواده رزاسه هستند و این تفاوت می تواند به فیزیولوژی و مکانیسم جذب گیاه مربوط باشد. تفاوت گونه ها در پاسخ به عناصر غذایی و غلظت تنظیم کننده های رشد در محیط کشت سبب ایجاد شرایط متفاوت برای تقسیم سلولی و توسعه آن می شود (۲۸).

در پژوهش حاضر بیشترین طول برگ در تیمار ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر Zt و ۱۰ میلی گرم در لیتر 2iP و کمترین آن در بالاترین غلظت هورمونی BAP مشاهده گردید. خدایی چگنی و همکاران (۱۷) در تکثیر درون شیشه ای *Pyrus communis* نیز نشان دادند که طول برگ در غلظت ۵/۰ میلی گرم در لیتر 2iP نسبت به همان غلظت در BAP بیشتر است. در غلظت های بالای BAP برگ ها فرصت رشد و تکامل پیدا نکردند زیرا مواد غذایی جذب شده صرف تولید شاخه ها شده و تکافوی توسعه

سطح برگ ها را نداشتند، اما در محیط کشت بدون هورمون که میزان پرآوری شاخه کم بود، برگ ها رشد خوبی داشتند.

ریشه زایی نوساقه

در پژوهش حاضر قبل از تیمار ریشه زایی، گیاهچه ها به مدت یک ماه در محیط کشت بدون هورمون کشت شدند. اعمال تیمار قبل از کشت به دلیل استفاده از سایتوکینین ها در غلظت های زیاد می باشد (۲۶). بیشترین درصد ریشه زایی و تعداد ریشه در پژوهش حاضر در محیط کشت VS ۱/۲ همراه با زخم زنی انتهای پایه ساقه و ۴۰ دقیقه غوطه وری در IBA با یک هفته قرار گرفتن در تاریکی به دست آمد. در محیط کشت VS به جای آهن معدنی (FeEDTA) از آهن آلی (FeEDDHA) که فرم پایدارتری نسبت به سایر فرم های آهن دارد، به عنوان منبع آهن استفاده شده است. اثر آهن آلی بر تکثیر، جلوگیری از زرد شدن، نکروزه شدن، درصد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه *Prunus amygdalus* × *Prunus persica* به دلیل تأثیر بر فعالیت پراکسیداز و الگوی ایزوآنزیمی گزارش شده است (۲۲). در پژوهش حاضر در محیط کشت VS ۱/۲ غلظت مواد به ۱/۲ کاهش یافته است که در شرایط کاهش پتانسیل اسمزی، جذب املاح و مواد معدنی توسط گیاه، مستلزم ایجاد ریشه و تارهای کشنده است و همین امر بر موفقیت ریشه زایی تأثیر می گذارد. زخم زنی انتهای پایه ساقه در پژوهش حاضر انجام گردید. زخم کردن قسمت تحتانی گیاهچه منجر به افزایش تقسیم سلولی در پارانشیم های کناره لایه زاینده، افزایش اکسین، کربوهیدرات، تنفس سلولی، تجمع مواد فنلی و تحریک تولید اتیلن می شود. زخم زنی هم چنین می تواند سبب تنش، تغییرات در روابط آبی گیاه، افزایش اسید آسزیک و آنزیم پراکسیداز شود که بر القاء ریشه زایی و توسعه ریشه ها تأثیر می گذارد.

در پژوهش حاضر مرحله جداگانه انگیزش ریشه در حضور اکسین با غلظت زیاد برای مدت زمان کوتاه و سپس انتقال شاخساره ها به محیط کشت بدون هورمون برای توسعه ریشه انجام گرفت. میانگین ۳۰ درصد ریشه زایی و تعداد ۴ ریشه در

می‌تواند میزان ریشه‌زایی و طول آن را تحت تأثیر قرار دهد. کشت در شیشه به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر فاکتورهای مختلف ژنوتیپی، سن، اندازه، گیاه مادری، جدا کشت، شرایط رشد، ترکیب محیط و دیگر فاکتورهای فیزیولوژیکی و یا حتی کیفیت متفاوت مواد مورد استفاده می‌باشد. تحقیق حاضر با دستیابی به شیوه استقرار و میزان بالای شاخه‌زایی (تا ۴۰ شاخه بر ریز نمونه در ۸ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر NAA) گونه *Crataegus pseudohetrophylla* Pojark. امکان انجام سایر طرح‌های تحقیقاتی برای تجاری سازی این شیوه را فراهم می‌نماید. به‌منظور تکثیر تجاری و به‌دست آوردن دستورالعمل ریشه‌زایی گونه گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر، ضروری است تیمارهایی با غلظت‌های مختلف اکسین و محیط‌های کشت در مطالعات بعدی سایر پژوهشگران انجام گیرد.

غوطه‌وری گیاهچه در ۳۰ دقیقه محلول ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر هورمون IBA به‌دست آمد (۲۵). مدت زمان کوتاه در غلظت زیادی از IBA ممکن است ژن‌های مسئول برای تولید پروتئین‌های مورد نیاز برای تشکیل ریشه جانبی را فعال نماید در صورتی که حضور طولانی مدت اکسین در محیط به‌دلیل رقابت در اتصال روی محل‌های گیرنده، بازدارنده رشد هستند (۳۱). در بررسی حاضر احتمالاً مدت زمان ۵ دقیقه غوطه‌وری در IBA کافی نبوده است و بیشترین تعداد برگ نکروزه شده نیز در تیمار کم اکسین مشاهده شده است و کاهش عناصر تغذیه‌ای در محیط کشت و عدم توانایی گیاه در ایجاد ریشه سبب نکروزه شدن برگ شده است. در تیمار مدت زمان بیشتر از ۴۰ دقیقه غوطه‌وری در IBA، به‌دلیل مدت زمان زیاد تیمار اکسین، تأثیر منفی روی ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه گذاشته است. اکسین از طریق القاء و تحریک تقسیم سلولی و تمایز ریشه‌ها سبب ریشه‌زایی می‌گردد ولیکن مدت زمان تیمار

منابع مورد استفاده

1. Aghakhani, S. and A. Metaji. 2010. The study of ecological and seriate structure of Markazi province jungles (case study: Shazand city oak jungles). *Journal of Plant Ecophysiology (Arsanjan Branch of Islamic-Azad University)* 1(3): 54-62. (In Farsi)
2. Al- Manasrah, W. S. 2012. *In vitro* propagation of *Crataegus aronia* L. and secondary metabolites detection. MSc. Thesis, Palestine Polytechnic University, Hebron, Palestine.
3. Bagheri, A., M. Ziaratnia and M. Hosseini. 2005. *In Vitro* Culture of Trees. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. (In Farsi)
4. Baraldi, R. 1988. *In vitro* shoot development of *Prunus* GF-655-2: Interaction between light and benzyladenine. *Physiologia Plantarum* 74: 440-443.
5. Bassi, G. and F. Cossio. 1991. *In vitro* shoot regeneration on 'Bluefre' and 'Susina di Dro' prune cultivars (*Prunus domestica* L.). *Acta Horticulturae* 289: 81-82.
6. Bennett, I. J., J. A. McComb, C. M. Tonkin and D. A. J. McDavid. 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Globulus labill*. *Annals of Botany* 74: 8-53.
7. Bonga, J. M. and P. V. Aderkas. 1992. *In Vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
8. Bujarska-Borkowska, B. 2002. Breaking of seed dormancy, germination and seedling emergence of the common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.). *Dendrobiology* 47: 61-70.
9. Curir, P., V. Sumerekt and A. Termini. 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology* 92: 1148-1153.
10. Dumireih, J. 2009. *In vitro* propagation and molecular characterization of hawthorn species (*Crataegus azarolus* L.) in rural Damascus. MSc. Thesis, Tishreen University, Damascus, Syria.
11. Emam, M., A. Ghamarizare, K. Espahbodi, T. S. Naraghi and S. H. Shahrzad. 2012. Micropropagation of forest tree of *Sorbus aucuparia* L. by bud culture of mature plants. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 19 (2): 263-273. (In Farsi)
12. Gökbunar, L. 2007. *In vitro* micropropagation of hawthorn (*Crataegus* sp.), MSc. Thesis, Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey.
13. Gosling, P. 2007. Practice Guide Raising Trees and Shrubs from Seed. Forestry Commission: Edinburgh. Norwich,

- England.
14. Iapichino, G. and M. Airò. 2009. Multiplication of *Crataegus monogyna* by *in vitro* culture of nodal segments, ISHS Acta Horticulturae 812. In: Proceeding of III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Bávaro, Punta Cana (Dominican Republic), pp. 135-140.
 15. Jalili, A. and Z. Jamzad. 1999. Red Data Book of Iran: A Preliminary of Endemic, Rare and Endangered Plant Species in Iran. Research Institute of Forest and Range Land, Tehran.
 16. Khatamsaz, M. 1992. Flora of Iran: Rosaceae. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran.
 17. Khodaei Chegini, F., H. Abdollahi, A. Ershadi and M. Asna Ashari. 2012. Determination of micro-propagation protocol for OH × F333 and OH × F69 pear clonal rootstocks. *Seed and Plant production Journal* 2-27(3): 297-312. (In Farsi).
 18. Leblay, C., E. Chevreau and L. M. Raboin. 1990. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 25: 99-105.
 19. Maharik, N., S. Elgengaihi and H. Taha. 2009. *In vitro* mass propagation of the endangered sinai hawthorn *Crataegus sinaica* Boiss. *International Journal of Academic Research* 1 (1): 24-29.
 20. Mapes, Mo. and J. B. Zaerr. 1982. Multiplication *in vitro* du Douglas. Par induction precoce dun bourgeonnement adventif et exillaire in: colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, iufro section. AFOCEL Fontainebleau Publication. France. pp. 109-114.
 21. Miguel, C. M., P. Druart and M. M. Oliveira. 1996. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 32: 148-153.
 22. Molassiotis, A. N., K. Dimassi, I. Therios and G. Diamantidis. 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) explants *in vitro*. *Biologia Plantarum* 47: 141-144.
 23. Muna, A., A. Ahmad, K. Mahmoud and K. Abdul-Rahman. 1999. *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 203-208.
 24. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473 -597.
 25. Namli, S., Ç. Isikalan, F. Akbas and B. BaŞaran. 2011. Improved *in vitro* rooting of almond *Amygdalus communis* (cultivar "nonparell"). *Journal of Plant Molecular Biology & Omics* 4(1):14-18.
 26. Nas, M. N., L. Gokbunar, N. Sevgin, M. Aydemir, M. Dagli and Z. Susluoglu. 2012. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., A medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit. *The Journal of Plant Growth Regulation* 67 (1): 57-63.
 27. Ning, G. G., S. P. Bai, M. Z. Bao and L. Liu. 2007. Factors affecting plantlet regeneration from *in vitro* cultured immature embryos and cotyledons of *Prunus mume* "Xue mei". *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 43: 95-100.
 28. Pati, P. K., M. S. Rath, A. Sood and P. S. Ahuja. 2005. *In vitro* propagation of rose—a review. *Biotechnology Advances* 95-111.
 29. Ronald Metivier, P. S. 2000. *In Vitro* Studies of Adventitious Root Formation in Four Woody Species, Calgary University, Alberta.
 30. Ruzic, Dj, V. and T. I. Vujovic. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *HortScience* 3: 12-21.
 31. Zarei, M., Gh. Garoosi, E. Nezami, R. Hosseini and J. Ahmadi. 2013. The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of gisela 6 root stock. *Journal of Cell and Tissue* 4(2): 169-185. (In Farsi).