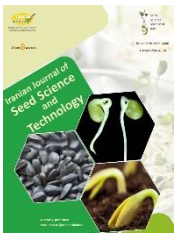
2024, 13 (3), 87-104 https://doi.org/10.22092/ijsst.2023.360061.1454

Seed Science Society of Iran

Seed and Plant Certification and Registration Institute

Iranian Journal of
Seed Science and Technology



ISSN: 2588-4638

Research Article

The optimizing of micro propagation in some almond's genotypes (*Prunus dulcis* L.) (The evaluation of shoot proliferation response to the explant type and sterilization method)

Farzaneh Razavi[1*], Masoumeh Asadi Aghbolaghi[2]

1. Assistant Professor, ChaharMahal O Bakhtiari's Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Shahrekord, Iran.
2. PhD Graduate in Seed Science and Technology, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Univercity of Tehran, Karaj, Iran.

Article Information

Received: 18 Sept. 2023
Revised: 14 Oct. 2023
Accepted: 14 Nov. 2023

Keywords:
Almond (Prunus dulcis (Mill)),
In vitro culture,
Proliferation,
MS medium,
Sterilization

Corresponding Author:
farzanehrazavi2003@yahoo.com

Abstract

This study focused to optimize micropropagation in 11 different almond (*Prunus dulcis)*'s genotypes/cultivars. Main effort was to determine best explant and disinfection's method in each genotype/cultivar. Almond's cultivars, Mamaei (M), Shekoufeh (SH) and Fragnies (F) as well as bred almond lines; A1, A2, A3, A4, A5, A7, A8 and A9 were evaluated. The effect of explant; disinfection's methods and genotype/cultivar were analyzed using factorial experiment on completely randomized design with 3 replications for each treatment. Results indicated 3 studied factors along with their interactions can greatly affect almond's proliferation. The explant (woody/ herbaceous shoot) showed different effects on proliferation in different almond's genotypes/cultivars. In genotype A1, herbaceous shoot showed not suitable proliferation (30.12) compared to woody one (40.20), while in genotype A7, herbaceous shoot resulted better (40.13) than woody shoot (36.20). Interestingly, in most studied genotypes/cultivars such as A1, A3, A8, A9, SH, M, and F, woody mature shoot exposed better proliferation. Likewise, sterilization's method had different effects on proliferation in different genotypes/cultivars. For instance, sodium hypochlorite 25 % /15 (conc. (%)/min.) showed higher proliferation in A7, A8, A9 and F, whereas, in other genotypes/cultivars, using 50 %/10 (conc. (%)/min.) was superior. Results verified almond's genotype/cultivar and its interaction with explant and disinfection's method, can significantly affect on proliferation as a genetic related trait. Results indicated almomd's genotype/cultivar, method of disinfection, type of explant (herbaceous or woody shoot) and their interaction can affect significantly on almond's proliferation, growth's performance and rate.

How to cite this paper: Razavi, F., & Asadi, M. (2024). The optimizing of micro propagation in some almond's genotypes (*Prunus dulcis* L.) (The evaluation of shoot proliferation response to the explant type and sterilization method). *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, *13* (3), 87-104. https://doi.org/10.22092/ijsst.2023.360061.1454

© Authors, Published by Iranian Journal of Seed Science and Technology. This is an open-access article distributed under the CC BY (license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

The almond (*Prunus dulcis* (Mill.) from *Rosaceae* family, is one of the most important nut crops worldwide and based on FAO report in 2020, after USA, Spain and Australia, Iran has major production. The micro propagation has many advantages for fruit trees clonal propagation and is especially important for clonal propagation of fruit rootstocks and for disease free orchard development. Generally, in fruit trees, *in vitro* culture of shoot tips are relatively easier to propagate compared to other types of explants, because of the presence of meristems and there are reports on shoot tip culture of various *Prunus* species. In the case of almond, explants from various tissues, including shoot tips, have already been used for micro propagation, but the technique has not been as successful as for different almond genotypes/ cultivars. This study mainly focused to optimize micro propagation in 11 different almond (*Prunus dulcis)*'s genotypes/cultivars, and finally reported the methods for successful shoot propagation of these genotypes/cultivars.

Materials and Methods

To determine the best explant and disinfection method in different almond genotype/cultivars, cultivars comprised Mamaei (M), Shekoufeh (SH) and Fragnies (F) as well as some bred almond lines included A1, A2, A3, A4, A5, A7, A8 and A9 were evaluated. The basic MS (Murashige & Skoog) basal medium was supplied for *in vitro* almond explant settlement and shoot propagation. Besides, the standard practical protocols for *in vitro* propagation of fruit trees were applied to propagate plant material. The effect of explant (woody/ herbaceous shoot); the method of disinfection (sodium hypochlorite 25 %/15 (conc. (%)/min.)/50 %/10 (conc. (%)/min.)) and the genotype/cultivar (11 different almond (*Prunus dulcis)*'s genotypes/cultivars) and their interaction were analyzed using a factorial experiment on completely randomized design with 3 replications for each treatment.

Results and Discussion

Results indicated 3 studied factors with their interactions can greatly affect almond's *in vitro* proliferation. The explant (woody/ herbaceous shoot) showed different effects on proliferation in different almond's genotypes/cultivars. In genotype A1, herbaceous shoot showed not suitable proliferation (30.12) compared to woody one (40.20), while in genotype A7, herbaceous shoot resulted better (40.13) than woody shoot (36.20). Interestingly, in most studied genotypes/cultivars such as A1, A3, A8, A9, SH, M, and F, woody mature shoot exposed better proliferation. Likewise, the sterilization method showed different effects on shoot proliferation in different genotypes/cultivars. For example, sodium hypochlorite 25 % /15 (conc. (%)/min.) showed higher proliferation in A7, A8, A9 and F, whereas, in other genotypes/cultivars, using 50 %/10 (conc. (%)/min.) was superior. Results verified almond's genotype/cultivar and its interaction with explant and disinfection method, can significantly effect on proliferation as a genetic related trait. Therefore, disinfection method, type of explant (herbaceous or woody shoot) and their interaction with almond genotype/cultivar can significantly affect on *in vitro* shoot proliferation, growth performance and growth rate in different almond genotype/cultivar.

Conclusion

In spite of the importance as main nut crop in Iran, almond (*Prunus dulcis* (Mill.) production stands lots of limitations and bottlenecks during its different growth seasons. These barriers are mainly based on the disease and pests' outbreak and environmental challenges such as cold and drought stresses as well. Therefore, main limitations are initiated by occurrence of fruit disease and pests as well as the climatic barriers. The clonal micro propagation in fruit trees such as almond, is one of the key solution which prepares many opportunities and benefits for healthy orchard improvement by development of superior disease free or stress tolerant almond rootstocks and scions in different genotypes/cultivars. In this report, the effect of explant; disinfection method and genotype/cultivar as well as interaction between all of them were analyzed. Results indicated these all factors and their interactions can greatly affect shoot proliferation in each genotype/cultivar. Finally, micro shoot proliferation in almond (*Prunus dulcis)* was optimized by selection of best explant and disinfection method in each almond genotypes/cultivars involved Mamaei (M), Shekoufeh (SH) and Fragnies (F) and some bred almond lines such as A1, A2, A3, A4, A5, A7, A8 and A9. All together, this study reported methods for successful micro propagation in almond, specifically *in vitro* shoot multiplication, with engaged on sterilization methods and selection of best explants in different almond genotypes/ cultivars.

دوره ۱۳، شماره ۳، صفحات ۱۰۴-۸۷
https://doi.org/10.22092/ijsst.2023.360061.1454

نشریه علوم و فناوری بذر ایران

ISSN: 2588-4638

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای با بررسی نوع ریزنمونه و شیوه ضدعفونی بر درصد شاخه‌زایی برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام (*Prunus dulcis* Mill)

فرزانه رضوی[1*]، معصومه اسدی آقبلاغی[2]

۱. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران.

۲. دانش‌آموخته دکتری علوم و تکنولوژی بذر، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

چکیده

استفاده از فن‌آوری کشت بافت برای تکثیر رویشی یا ریزازدیادی درختان میوه یکی از مهم‌ترین کاربردهای تجاری این شیوه در حوزه کشاورزی و باغبانی می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف تعیین بهترین نوع ریز نمونه و شیوه ضدعفونی برای ریز ازدیادی ۱۱ رقم و ژنوتیپ بادام (*Prunus sunurd siclud* lliM) در سال‌های ۸۹۳۱ تا ۰۰۴۱ اجرا گردید. آزمایش بصورت فاکتوریل سه عاملی شامل ریز نمونه (خشبی یا علفی)، شیوه ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم (غلظت ۵۲٪، ۵۱ دقیقه یا غلظت ۰۵٪، ۰۱ دقیقه) و ژنوتیپ/ رقم (ارقام مامایی (M)، شکوفه (HS) و فرانیس (F) و هشت ژنوتیپ حاصل از بهنژادی) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار اجراء شد. شیوه ضدعفونی، ریز نمونه، ژنوتیپ /رقم و اثرات متقابل این سه عامل، تأثیر معنی‌داری بر شاخه‌زایی درون شیشه‌ای بادام داشتند. در ژنوتیپ‌های 1A، 3A، 8A، 9A (نام در برنامه به‌نژادی) و ارقام شکوفه، مامایی و فرانیس، ریزنمونه خشبی درصد شاخه‌زایی بالاتری نسبت به ریز نمونه علفی داشت. در ژنوتیپ 1A، ریز نمونه خشبی دارای درصد شاخه‌زایی بالاتری (۰۴/۰۲) نسبت به ریزنمونه علفی (۰۳/۲۱) بوده، در ژنوتیپ 7A، ریزنمونه علفی منجر به شاخه‌زایی بالاتری (۰۴/۳۱) نسبت به ریزنمونه خشبی (۶۳/۰۲) شد. در ژنوتیپ‌های 1A، 2A، 3A، 4A و رقم شکوفه، هیپوکلرید سدیم با غلظت ۵۲٪ برای ۵۱ دقیقه باعث کاهش شاخه‌زایی نسبت به غلظت ۰۵ درصد برای ۰۱ دقیقه شده است. اثر متقابل سه عامل ژنوتیپ/رقم، شیوه ضد عفونی و نوع ریز نمونه دارای تاثیر معنی‌دار بر میزان شاخه‌زایی بادام بود. سایر ترکیبات ضدعفونی کننده، ریز نمونه‌ها و محیط کشت‌های مختلف در ریزازدیادی بادام درآینده بررسی خواهند شد.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

واژه‌های کلیدی:
بادام،
ریزازدیادی،
کشت بافت پرآوری،
محیط کشت MS،
ضدعفونی

نویسنده مسئول:
farzanehrazavi2003@yahoo.com

نحوه استناد به این مقاله:
Razavi, F., & Asadi, M. (2024). The optimizing of micro propagation in some almond's genotypes (*Prunus dulcis* L.) (The evaluation of shoot proliferation response to the explant type and sterilization method). *Iranian Journal of Seed Science and Technology, 13* (3), 87-104. https://doi.org/10.22092/ijsst.2023.360061.1454

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis Mill*) از تیره گل سرخیان (*Rosaceae*) و از جنس *Prunus* به عنوان محصولی خشکباری از اهمیت ویژه‌ای در دنیا و ایران برخوردار است (Kester et al., 1991; 2002; Tehranifar et al., 2002). طبق گزارش فائو در سال ۲۰۲۰، ایران رتبه چهارم تولید بادام را بعد از آمریکا، اسپانیا و استرالیا به خود اختصاص داده است (FAO, 2020). مهم‌ترین مراکز پرورش بادام از نظر سطح زیر کشت و تولید محصول، استان‌های خراسان، فارس، آذربایجان شرقی، چهارمحال و بختیاری، یزد، کرمان، اصفهان و آذربایجان غربی می‌باشند(Chaichi et al., 2002; Darvishian, 2000; Ghasemi et al., 2010; Shahnavazi, 2012; Vazvai, 1999). استفاده از فن‌آوری کشت بافت برای تکثیر رویشی یا ریزازدیادی درختان میوه یکی از مهم‌ترین کاربردهای تجاری این شیوه در حوزه کشاورزی و باغبانی می‌باشد. باتوجه به نقش پایه در میزان رشد رویشی، زودرسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفات در درختان میوه، انتخاب و تکثیر پایه مناسب نقش به سزایی در موفقیت تولیدات باغی دارد. به طور کلی پایه‌های درخت میوه به دو روش جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شوند، ولی با توجه به اینکه در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل شده و نهال‌های حاصله از نظر خصوصیات ژنتیکی تغییر می‌یابند، سعی بر این است تا از روش تکثیر غیرجنسی، به‌ویژه روش‌های کشت بافت برای تولید انبوه پایه‌های سالم و توسعه باغات میوه استفاده شود (Hartman et al.,1990). همچنین ریزازدیادی به عنوان شیوه ای مناسب جهت حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم‌های باارزش بومی و گونه‌های وحشی درختان میوه در حال انقراض به کار می‌رود. شیوه ریزازدیادی درختان میوه برتری بسیار زیادی نسبت به شیوه‌های ازدیادی سنتی دارد، از جمله این مزایا، می‌توان به تولید پایه‌ها و ارقام درختان میوه عاری از بیماری‌ها، کوتاه کردن چرخه زایشی، امکان تکثیر در تمام طول سال، استفاده در برنامه‌های بهنژادی و تولید گیاهان هیبرید اشاره نمود (Channuuntapipat et al., 2003b).

در مطالعه‌ای ریزازدیادی پایه‌های مختلف رویشی سیب در محیط درون شیشه‌ای، شیوه‌های مختلف ضدعفونی ریز نمونه و نوع تیمار هورمونی بررسی شد. طبق نتایج پایه رویشی M106 از نظر طول ساقه، کالوس زایی و تعداد برگ نسبت به سایر پایه‌های رویشی سیب برتری داشت و بهترین شاخه‌زایی از تیمار هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد (Mohamadzadeh Moghadam & Hamidi, 2017).

ریزازدیادی پایه‌ها و گونه‌های مختلف درختان میوه از جمله جنس *Prunus* در ابعاد گوناگون مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است (Fotopoulos & Sotiropoulos, 2005). طبق گزارش برخی تحقیقات نیز شیوه ریز ازدیادی توانسته است نتایج رضایت‌بخشی را از نظر تکثیر ارقام بادام و سازگار شدن با شرایط گلخانه و مزرعه ارائه دهد (Kamali et al., 2001; Nazari et al., 2010).

در مطالعه‌ای به منظور بهبود روش ریزازدیادی پایه رویشی بادام GF۶۷۷، غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین و سیتوکنین بررسی شدند. طبق نتایج، محیط کشت MS، همراه با یک میلی‌گرم در لیتر BA و نیم میلی‌گرم در لیترIBA با تولید بیش‌ترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیش‌ترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان‌گره، تعداد برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی‌شده به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت انتخاب شد. همچنین بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA و نیم میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (Gerdakaneh et al., 2020). ریزازدیادی درختان میوه نیز دارای محدودیت‌هایی نظیر اختصاصی‌بودن دستورالعمل کشت درون شیشه‌ای شامل نوع ریز نمونه، نوع ترکیب محیط کشت و بالانس مواد غذایی و هورمون‌ها، نحوه سازگاری گیاهان این‌ویترو با محیط مزرعه، همچنین لنواع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی می‌باشد (Hasanokht & Ebrahimi, 2006; Hasanokht & Kahrizi, 2003). همچنین کلون‌شدن گیاهان چوبی در شرایط درون شیشه‌ای به آسانی گونه‌های علفی نمی‌باشد که منجر به بروز نتایج متفاوت در تکثیر درون شیشه‌ای درختان میوه شده است (Pirick et al., 1987; 1973).

در مطالعه‌ای بررسی شیوه تکثیر انبوه پایه GF۶۷۷ در بیوراکتور تناوبی نشان داد که ریزازدیادی این پایه در بیوراکتور گیاهی می‌تواند از حیث تعداد شاخه، ارتفاع شاخه، وزن تر و وزن

خشک در مقایسه با سیستم کشت رایج برتری داشته و دارای توجیه اقتصادی باشد (Bagheri et al., 2013).

مطالعه‌ای دیگر ریزازدیادی پایه‌های رویشی هیبرید هلو × بادام توسط کمالی و همکاران (Kamali et al., 2001) بررسی شد. طبق نتایج استفاده از محیط کشت Knop تغییریافته بر سایر محیط‌های آزمایش شده مانند MS و $MS_{1/2}$ در مرحله شاخه‌زایی برتری داشته ولی در مرحله ریشه‌زایی محیط کشت LS نتایج بهتری نشان داد. نتایج پژوهش دژم پور و همکاران (Dejmpour et al., 2010) در جنس *Prunus* نشان داد که ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه با غلظت‌های ۸/۵، ۵/۵ و یک گرم در لیتر کم‌ترین آلودگی را در محیط کشت ایجاد نمودند. همچنین در بادام نژادگان‌های HS314 و HS302 بیش‌ترین توانایی استقرار و شاخه‌زایی را داشته و نژادگان‌های HS721 و HS408 کم‌ترین میزان رشد شاخه‌زایی را داشتند (Shkafandeh & Ghasemi, 2008).

بر اساس نتایج این پژوهش، بهترین شیوه ضدعفونی ریزنمونه‌ها به ترتیب با استفاده از کلرید جیوه (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، الکل (۷۰ درصد) و نهایتاً هیپوکلرید سدیم (۱۰ درصد) و شستشوی آن سه بار با آب مقطر سترون اعلام شد . امام و همکاران (Imam et al., 2013) نیز در بررسی ریز ازدیادی بادام کوهی *(Amygdalus scoparia)* جهت ضدعفونی نمونه‌ها از الکل ۷۰ درصد، جهت کاهش آلودگی سطحی و برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول کلرید جیوه (۰/۱ درصد) استفاده نمودند. بهینه سازی روش‌های ریز ازدیادی موثر و انتخاب ریزنمونه مناسب هر ژنوتیپ بادام، زمینه مناسب برای مطالعات آتی روی گیاه بادام را در کشت درون شیشه‌ای در برنامه‌های بهنژادی و تکثیری فراهم می‌نماید. تحقیق حاضر با هدف تعیین بهترین نوع ریز نمونه و نیز کارآمدترین شیوه ضدعفونی ریز نمونه در تکثیر درون شیشه‌ای در ۱۱ ژنوتیپ مختلف بادام منتخب انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد رویشی و گیاهی

در این مطالعه، ریز ازدیادی سه رقم تجاری بادام شامل رقم مامایی (M) (رقم زودگل تجاری متداول استان چهارمحال و بختیاری)، رقم شکوفه (SH) (رقم دیرگل تجاری ایرانی و مقاوم به سرما) و رقم فرانیس (F) (رقم تجاری دیرگل خارجی) و نیز ۸ ژنوتیپ اصلاحی بادام به نام‌های A1, A2, A3, A4, A5, A7، A8 و A9، در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفته، بهینه سازی کشت و استقرار گیاهچه شامل انتخاب نوع ریزنمونه و شیوه ضدعفونی در محیط کشت برای هر رقم یا ژنوتیپ انجام گردید. لازم به ذکر است که ژنوتیپ‌های اصلاحی A1 ..... A9، حاصل برنامه تحقیقات بهنژادی بادام درکلکسیون تحقیقاتی پژوهشکده میوه‌های معتدله در منطقه کرج بوده و اسامی این ژنوتیپ‌ها بر اساس کدگذاری آنها در برنامه بهنژادی می‌باشد. به طور کلی انتخاب این ارقام و ژنوتیپ‌ها بر اساس تنوع ژنتیکی آن‌ها در میزان مقاومت به تنش سرمازدگی و نیز زمان گلدهی آنها بوده است. ارقام انتخاب شده برای این پژوهش در نهالستان مذکور دارای برچسب سلامت و اصالت ژنتیکی تایید شده توسط موسسه ثبت و گواهی بذر و نهال بوده و ژنوتیپ‌های اصلاحی نیز دارای گواهی سلامت از نهالستان تحقیقاتی ایستگاه تحقیقات باغبانی کرج بودند.

بهینه‌سازی کشت بافت بادام در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

شیوه ریزازدیادی بادام در این مطالعه بر اساس اصول کشت بافت گیاهی و مطالعات انجام شده بر ریز ازدیادی در خانواده رزاسه و خصوصا در برخی هیبریدهای هلو و بادام انجام گرفت(Alizadeh & Grigorian, 2001; Athenaashari & Zakai Khosroshahi, 2013; Seyed Tabatabaei & Omidi, 2011; Sharifi et al., 2010; Hasandokht & Ebrahimi, 2006; Jalili Marandi & Hakimi Rezaei, 2003). با توجه به پتانسیل ژنتیکی متفاوت هر کدام از ژنوتیپ‌های بادام نسبت به رشد و نمو در شرایط کشت درون شیشه‌ای، بهینه‌سازی نحوه کشت بافت در هر کدام از ژنوتیپ‌های مورد بررسی بادام در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. نوع ریزنمونه (۱- علفی، ۲- خشبی) و شیوه ضدعفونی (۱- الکل ۷۰٪ (۶-۷ ثانیه)، ۲ هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه)، ۲- الکل ۷۰ درصد (۶-۷ ثانیه)،- هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) در بین ژنوتیپ‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

شیوه تهیه ریز نمونه

جهت ازدیاد درون شیشه‌ای از هر ژنوتیپ در بهار و اوایل تابستان ریزنمونه‌های مختلف از دو نوع شاخه سبز و جوان و شاخه خشبی‌تر از شاخه‌های جوان، سالم و در حال رشد فعال در نهالستان به طول ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر تهیه گردید (Azazi et al., 2018; Bagheri et al., 2013; Zolfaghari Nasab et al., 2004). سپس نمونه‌های گیاهی داخل نایلون و جعبه یخ گذاشته و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. نمونه‌ها جهت کشت در محیط سترون آماده و با حفظ جوانه‌های جانبی برگ‌های آن‌ها جدا شدند. اندازه نهایی ریزنمونه‌ها بسته به نوع ژنوتیپ متفاوت خواهد بود. برای هر ژنوتیپ سایز نهایی ریزنمونه‌ها بین ۱/۵ تا سه سانتی‌متر با حفظ یک تا سه جوانه جانبی در نظر گرفته شد.

مراحل ضدعفونی ریزنمونه‌ها

باتوجه به آلودگی قطعی ریزنمونه‌ها ضدعفونی ریزنمونه‌ها قبل از کشت ضروری می‌باشد (Bagheri & Azadi, 2002; Darab et al., 2010; Hasandokht & Ebrahimi, 2006).

در ابتدا برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها و آلودگی‌های سطحی موجود، ریزنمونه‌ها با مایع ظرفشویی و آب شهری شست و شو و سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت آب جاری قرار داده شدند و پس از مراحل آماده‌سازی ریزنمونه، شیوه‌های مختلف ضدعفونی نمونه‌ها برای هر ژنوتیپ و هر ریزنمونه تهیه شده، مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های مختلف مربوط به هر ژنوتیپ به طور مجزا ابتدا توسط اتانول ۷۰٪ در مدت زمان(۱۰ثانیه) تیمار شدند و سپس دو تا سه بار شست و شو با آب مقطر سترون زیر هود لامینار انجام گرفت. پس از این مرحله ریزنمونه‌ها در دو درصد متفاوت (۲۵ و ۵۰ درصد) از هیپوکلرید سدیم به ترتیب در مدت زمان‌های ۱۵ و ۰۱ دقیقه غوطه‌ور شده و در نهایت شست و شوی مجدد با آب مقطر سترون، دو تا سه بار انجام شد. ریز نمونه‌ها پس از ضدعفونی روی محیط کشت MS قرار داده شدند.

تهیه محیط کشت MS و کشت ریز نمونه

محیط کشت موراشیگ و اسکوگ جامد (آگار ۰/۰۷٪) (MS, Murashige & Skoog medium)، حاوی ترکیبات متفاوتی با غلظت‌های مختلف (pH ۵/۱±۷) برای ریزازدیادی ژنوتیپ‌های بادام مورد استفاده قرار گرفت (Azazi et al., 2018; Bagheri et al., 2013; Zolfaghari Nasab et al., 2004) (جدول ۱). محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ کیلو پاسکال در اتوکلاو سترون شدند. هورمون‌های فیلتر سترون شده به محیط کشت اتوکلاو شده اضافه شدند. پس از ضدعفونی، ریزنمونه‌ها زیر هود لومینار بر روی محیط کشت قرار داده شدند.

شرایط محیطی اتاقک رشد

به منظور استقرار و پرآوری ریزنمونه‌های کشت شده، ظروف کشت در اتاقک رشد در شرایط ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی که توسط لامپ‌های فلورسنت فراهم می‌شد، به مدت ۲۰ الی ۳۰ روز، بسته به نوع ژنوتیپ، نگهداری شدند (Azazi et al., 2018; Bagheri et al., 2013; Zolfaghari Nasab et al., 2004). در این مدت پرآوری جوانه‌ها آغاز گردید. واکشت نمونه‌ها پس از گذشت ۲۰ الی ۳۰ روز از کشت، جهت جوان سازی و تازه کردن تبادلات گازی و غذایی گیاهچه‌های جوان انجام شد. مدت زمان مورد نیاز برای استقرار کامل ریزنمونه‌ها در محیط کشت و برخی فاکتورهای رشد رویشی شامل سرعت رشد جوانه‌ها، تراکم و عادات رشدی شاخه‌های تولید شده (رشد افقی و عمودی)، خصوصیات مورفولوژیکی برگ و شاخه‌های تولید شده (اندازه، رنگ، بافت) بر اساس اندازه‌گیری‌های کمی با استفاده از کولیس، خط کش و نیز مقایسه با جدول توصیفی کمی- کیفی (دیسکریپتور) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بادام (تهیه شده توسط رضوی (۹۹۳۱))، در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در طی هر دوره قبل از واکشت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی شاخه‌زایی (پرآوری)

ارزیابی میزان پرآوری به عنوان متغیر مورد مطالعه با شمارش تعداد شاخه‌های گیاهچه‌های جوان در هر شیشه (ویال) انجام شد، لازم به ذکر است که برای هر ژنوتیپ در هر تیمار، سه تکرار (سه ویال یا شیشه) در نظر گرفته شد (شکل ۱).

جدول ۱- ترکیب محیط کشت MS بادام درون شیشه‌ای

Table 1- The composition of MS medium for almond's invitro culture

عناصر پر مصرف Macro element	میلی‌گرم/لیتر (mg/L)
کلرید کلسیم Calcium chloride ($CaCl_2$)	332.02
فسفات پتاسیم Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	170
نیترات پتاسیم Potassium nitrate (KNO_3)	1900
سولفات منیزیوم Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	180
نیترات آمونیوم Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1650
عناصر کم مصرف Micro elements	
کلرید کبالت Cobalt Chloride ($CoC_{l2}.6H_2O$)	0.025
سولفات مس Cuprum Sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.025
اسید بوریک Boric Acid (H_3BO_3)	6.2
یدید پتاسیم Potassium Iodide (KI)	0.83
سولفات منگنز Manganese Sulfate ($MnSO_4.4H_2O$)	16.9
مولیبدات سدیم Sodium Molybdate ($Na2MoO_4.2H_2O$)	0.25
سولفات روی Zinc Sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	8.6
ویتامین‌ها Vitamins	
گلایسیس Glycine ($C_2H_5NO_2$)	2
نیکوتینیک اسید Nicotinic Acid ($C_6H_5NO_2$)	0.5
پیرودوکسین Pyridoxine (C_8H11NO_3)	0.5
تیامین Thiamine ($C_{12}H_{17}CIN_{4O5}$)	0.1
آهن Iron	
دی سدیم اتیلن دیامین تترا استیک اسید Disodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na_2EDTA)	37.25
سولفات آهن Ferrous Sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)	27.85
ساکاروز Sucrose	30000
گلوتامین L-glutamine	500
آگار Agar	7000

شکل ۱- گیاهچه بادام درون شیشه (ویال) در شرایط سترون

Figure 1- Almond seedlings in tubes (vial)

تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش بصورت فاکنوریل سه عاملی که فاکتور اول شامل نوع ریزنمونه با دو سطح (علفی و خشبی) و فاکتور دوم شامل دوسطح از شیوه ضدعفونی (۱- الکل ۷۰٪ (۶-۷ ثانیه)، ۲ هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه)، ۲- الکل ۷۰ درصد (۶-۷ ثانیه)،- هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) و فاکتور سوم: در ۱۱ سطح از ژنوتیپ/رقم (سه رقم و ۸ ژنوتیپ) انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها به روش آنووای یک طرفه و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد ($P \leq 0.05$) و student F–test و T- test) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس تجزیه نتایج آماری، هر سه فاکتور نوع رقم/ژنوتیپ، شیوه ضدعفونی و نوع ریزنمونه و نیز اثر متقابل این سه عامل تاثیر معنی‌داری بر میزان پرآوری نهال‌های بادام در کشت درون شیشه‌ای داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر روش‌های ضدغفونی، نوع ریزنمونه، ژنوتیپ/رقم و تاثیرات متقابل این سه عامل بر شاخه‌زایی درون شیشه‌ای بادام

Table 2 – The mean square's analysis of variance of the effect the explant, sterilization's method, genotype/cultivar and their interaction on almond's *in vitro* proliferation rate

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات شاخه‌زایی Mean Square of branching/proliferation
ژنوتیپ / کولتیوار Genotype/cultivar	10	25.20 **
روش ضدعفونی sterilization method	1	44.63**
نوع ریزنمونه type of explants	1	11.18**
ژنوتیپ/کولتیوار × روش ضدعفونی Genotype/cultivar× sterilization method	10	12.88**
ژنوتیپ/کولتیوار × نوع ریزنمونه Genotype/cultivar× type of explants	10	20.24**
ژنوتیپ × روش ضدعفونی × نوع ریزنمونه Genotype× sterilization method×type of explants	10	22.12 **
خطای آزمایشی Experimental error	88	0.77
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (percentage)		18.17

** معنی دار در سطح ۱ درصد

**significantly different, P=0.01

برهمکنش شیوه ضدعفونی و ژنوتیپ/رقم بر پرآوری و شاخه‌زایی بادام

استفاده از الکل ۷۰٪ به همراه هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) در مقایسه با استفاده الکل ۷۰٪ به همراه هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه) در ژنوتیپ‌های A1، A2، A3، A4 و رقم SH باعث کاهش درصد شاخه‌زایی گیاهچه درون شیشه‌ای بادام شده است، در صورتی که استفاده از این روش ضدعفونی (الکل ۷۰٪ به همراه هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) در ژنوتیپ‌های A7، A8، A9 و رقم F افزایش درصد شاخه‌زایی در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بادام را به همراه داشته است (شکل ۲ و جدول ۳). طبق نتایج، انتخاب روش ضدعفونی مناسب برای کشت درون شیشه‌ای گیاه بادام، بسته به ژنوتیپ و رقم‌های مختلف، متفاوت خواهد بود.

یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده، به ویژه در کشت درون شیشه‌ای گیاهان چوبی، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی هستند(Alt et al., 2004; Ruth et al., 2006; Sarmast et al., 2011; Yang et al., 2001) که اغلب حالت نهفته دارند و پس از کشت ریزنمونه نمایان می‌شوند (Seyed Tabatabai & Omidi, 2011). هیپوکلرید سدیم و کلرید جیوه به طور گسترده‌ای برای کنترل آلودگی آزمایشگاهی گیاهان چوبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیریک و همکاران (Pirik et al., 1973) عنوان داشتند که برای نابودی میکروارگانیسم‌ها نمی‌توان تنها از الکل استفاده نمود، زیرا اتانول به تنهایی بر باکتری‌ها و قارچ‌های سپوردار اثر نمی‌گذارد. بنابراین استفاده از هیپو کلرید سدیم الزامی است.

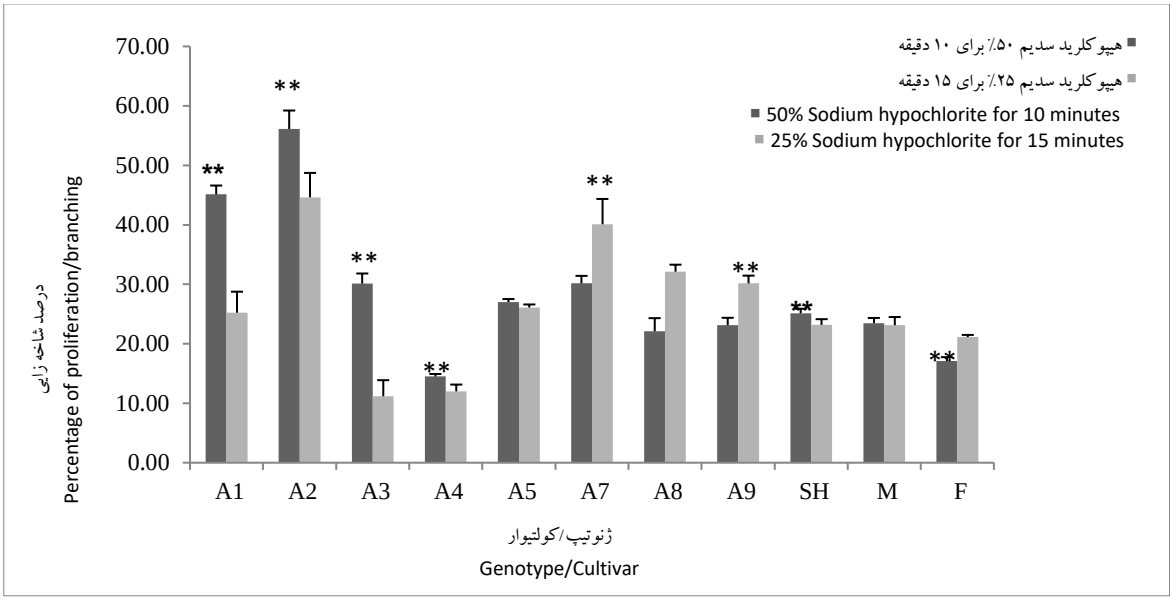
از طرفی تعیین غلظت و مدت زمان مناسب ضدعفونی ریزنمونه‌ها برای هر ژنوتیپ الزامی است. استفاده از غلظت‌های پایین، اثربخشی اندکی بر میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه صرف وقت و هزینه به همراه خواهد داشت، در حالی که غلظت‌های بالای مواد ضدعفونی کننده، علاوه بر صرف هزینه باعث آلودگی محیط زیست شده و مقاومت میکروارگانیسم‌ها به این مواد بالا می‌رود (Darab et al., 2010). با اعمال تغییرات در مراحل ضدعفونی و ارزیابی تاثیر آن‌ها بر عملکرد شاخه‌زایی بادام، روش‌های ضدعفونی بهینه مخصوص هر ژنوتیپ هدف به دست آمده، که با نتایج تحقیق دیگری که نشان دهنده تاثیر مستقیم روش ضدعفونی بر میزان بروز آلودگی و در نهایت کارایی رشد و نمو نمونه‌ها است، مطابقت دارد (شکل ۲) (Webster et al., 2003).

جدول ۳- برهمکنش شیوه ضدعفونی ریز نمونه با ژنوتیپ/رقم بر درصد شاخه‌زایی بادام

(تاثیر شیوه ضدعفونی ریزنمونه بر درصد شاخه‌زایی بادام در هر ژنوتیپ/رقم)

Table 3- Intraction of explant's sterilization method and genotype/cultivar on almond's *in vitro* proliferation

میزان شاخه‌زایی (میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده) mean number of branches produced (proliferation)		
اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 25% (15 minutes)	اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه) Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 50% (10 minutes)	ژنوتیپ/کولتیوار Genotype/Cultivars
25.220 ± 3.54^{e}	45.12 ± 1.49^{b}	A1
44.63± 4.10^{b}	56.12 ± 3.10^{a}	A2
11.18± 2.70^{h}	30.12 ± 1.70^{d}	A3
12 ±1.14^{h}	14.5 ± 0.42^{g}	A4
26.10 ± 0.51^{e}	27 ± 0.52^{e}	A5
40.11 ± 4.24^{c}	30.17 ± 1.25^{d}	A7
32.12 ± 1.18^{d}	22.12 ± 2.19^{e}	A8
30.17 ± 1.29^{d}	23.14 ± 1.23^{e}	A9
23.17 ± 0.97^{e}	25.12 ± 0.77^{e}	SH
23.12±1.38^{e}	23.46 ± 0.88^{e}	M
21.13 ± 0.36^{e}	17.10 ± 0.65^{f}	F



شکل ۲- برهمکنش شیوه ضدعفونی ریز نمونه با ژنوتیپ/رقم بر درصد شاخه‌زایی بادام (تاثیر شیوه ضدعفونی ریزنمونه بر درصد شاخه‌زایی بادام در هر ژنوتیپ/رقم)

Figure 2– Intraction of explant's sterilization method and genotype/cultivar on almond's *in vitro* proliferation

نتایج مطالعه ایزدپناه (Izadpanah, 2001) در کشت آزمایشگاهی *Prunus avium* L. نشان داد که استفاده از هیپوکلرید سدیم ۱/۲۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه در ضدعفونی ریزنمونه‌های تهیه شده بهترین نتیجه را ارائه کرده است. ناظری و همکاران (Nazari et al., 2010) نتایج قابل قبول از ضدعفونی ریزنمونه‌های تهیه شده از جوانه‌های جانبی و انتهایی شاخه‌های پایه هیبرید GF677، با الکل ۹۶ درصد به مدت ۳ تا ۴ ثانیه و هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه به دست آوردند. نتایج پژوهش دژم پور و همکاران (Dezhampor et al., 2010) در جنس *Prunus* نشان داد ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه با غلظت‌های ۸/۵، ۵/۵ و یک گرم در لیتر کم‌ترین آلودگی را در محیط کشت ایجاد نمودند.

برهمکنش نوع ریز نمونه و رقم / ژنوتیپ بادام بر پرآوری و شاخه‌زایی بادام

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، نوع ریزنمونه مورد استفاده تاثیر معنی‌داری بر میزان پرآوری نهال‌های بادام نشان داد (جدول ۲). نوع ریزنمونه برای هر ژنوتیپ بادام در کشت درون شیشه‌ای، تاثیر متفاوتی خواهد داشت (جدول ۴ و شکل ۳). به عنوان مثال ریزنمونه خشبی در ژنوتیپ A1 در مقایسه با ریز نمونه علفی، از درصد شاخه‌زایی بهتری برخوردار بوده، در حالی که استفاده از ریزنمونه علفی در ژنوتیپ‌های A4، A5 و A7 درصد شاخه‌زایی بیش‌تری را به همراه داشته است (جدول ۴ و شکل ۳). البته در اکثر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل A1، A3، A8، A9 و کولتیوارهای SH، M و F، ریزنمونه خشبی از درصد شاخه‌زایی بیشتری نسبت به ریز نمونه علفی برخوردار بوده است. با توجه به این نتایج، انتخاب ریز نمونه مناسب برای کشت درون شیشه‌ای گیاه بادام، بسته به ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت بوده و برای هر ژنوتیپ بایستی تعیین گردد.

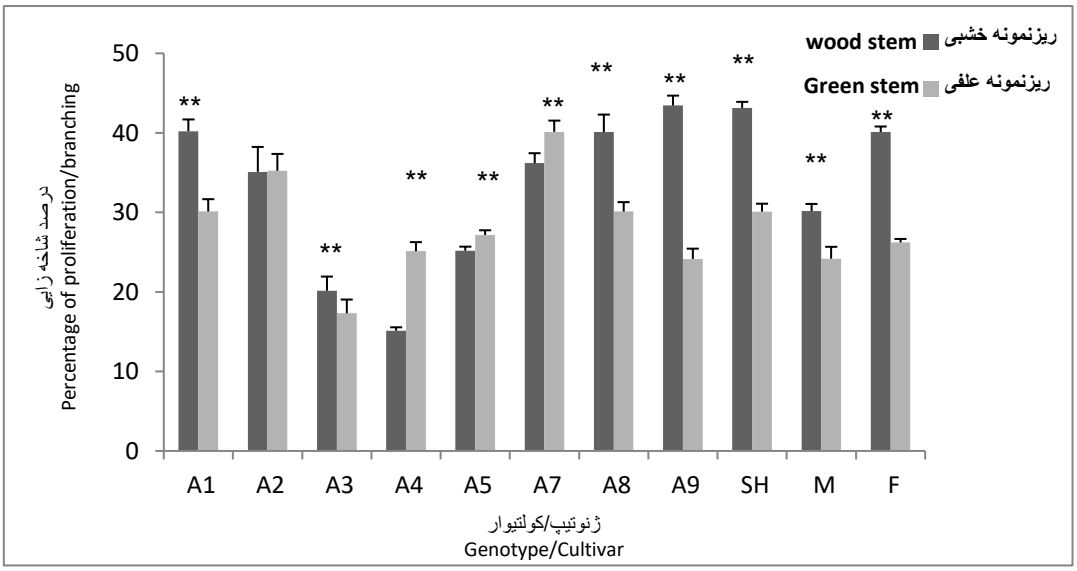
Yildorma et al. (2010) در کشت آزمایشگاهی دو رقم فرانیس (Ferragnes) و فرادوئل (Ferraduel) بادام نشان دادند که استفاده از ریزنمونه‌های مختلف بذر (جنین‌های جدا شده، نیمه هسته به همراه جنین و هسته‌های دست نخورده) تفاوت‌هایی را در شاخه‌زایی و رشد نمونه‌های کشت شده به همراه دارد. در مطالعه دیگری از برگ‌های جوان و بالغ گیاه بادام برای کشت آزمایشگاهی استفاده شد (Miguel et al., 1996). نتایج این مطالعه نشان داد که برگ‌های تهیه شده از بخش‌های جوان گیاه از بالاترین میزان باززایی (۳۸/۲ تا ۴۰ ٪) برخوردار بودند و در مقایسه با برگ‌های تهیه شد از منشاء بالغ، غلظت‌های بالاتر هورمون TDZ برای القاء شاخساره نیاز است. باززایی برگ‌های با

منشـاء بالغ، ۱۵٪ بود که با کشـت در محیط تغییر یافته و واکشـت نمونه‌ها در غلظت کم‌تر هورمون BA، به ۳۵/۳٪ افزایش یافت. در مطالعه کشـت بافت گیاه جاتروفا (*Jatropha curcas* L.)، از ریزنمونـه‌هـای مختلف از جملـه هیپوکوتیـل، دمبرگ و برگ استفاده شد. نتایج نشان داد عادت‌های رشدی بسته به ریزنمونه‌های مختلف متفاوت است و برای توسعه رشد و نمو ترکیبات متفاوتی از هورمون مورد نیاز خواهد بود (Sujatha & Mukta, 1996). در بررسـی اسـتفاده از ریزنمونه‌های ریشـه، کوتیلدون و هیپوکوتیل در کشـت درون شـیشـه‌ای بادام نشـان داده شـد که ریز نمونه‌های کوتیلدون باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل داشته و ریز نمونه‌های ریشه برای باززایی مناسب نبودند و خشبی یا علفی بودن ریزنمونه‌ها در نتایج حاصل موثر(Nas et al., 2010).

جدول ۴- برهمکنش نوع ریز نمونه و رقم/ژنوتیپ بر درصد شاخه‌زایی بادام (تاثیر نوع ریز نمونه بر درصد شاخه‌زایی بادام در هر ژنوتیپ/رقم)

Table 4- Intraction of explant and genotype/cultivar on almond's *in vitro* proliferation

میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده (تکثیر) Mean number of branches produced (proliferation)		
ژنوتیپ/کولتیوار Genotype/Cultivar	شاخه‌های چوبی Wood stem	شاخه‌های علفی Green stem
genotype A1	40.20 ± 1.49 [a]	30.12 ± 1.54 [c]
genotype A2	35.10 ± 3.13 [b]	35.24± 2.11 [b]
genotype A3	20.15 ± 1.78 [f]	17.32 ± 1.72 [g]
genotype A4	15.13 ±0.42 [g]	25.12 ± 1.14 [e]
genotype A5	25.18±0.51 [e]	27.16 ± 0.59 [cd]
genotype A7	36.2 ± 1.24 [b]	40.13 ± 1.41[a]
genotype A8	40.11 ± 2.19 [a]	30.11 ± 1.18 [c]
genotype A9	43.44 ± 1.24 [a]	24.15 ± 1.29[e]
cultivar SH	43.13 ± 0.77 [a]	30.10 ± 0.99 [c]
cultivar M	30.17 ± 0.89 [c]	24.18 ± 1.49 [e]
cultivar F	40.11 ± 0.69[a]	26.23± 0.43 [de]



شکل ۳- تاثیر نوع ریز نمونه بر درصد شاخه‌زایی بادام در هر ژنوتیپ/رقم

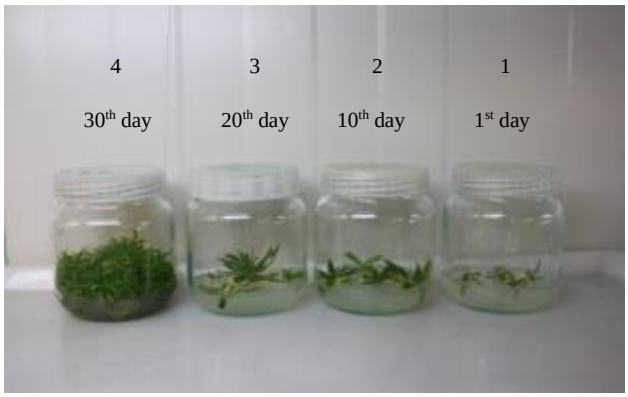
Figure 3 - Intraction of explant and genotype/cultivar on almond's *in vitro* proliferation

تاثیر نوع ژنوتیپ بر میزان پرآوری نهال بادام و عادات رشد رویشی آن در محیط کشت درون شیشه‌ای

طبق نتایج کمی و بر اساس شمارش شاخه چه‌ها، بیش‌ترین وکم‌ترین پرآوری گیاه در زمان‌های مختلف بعد از کشت (روز اول، دهم، بیستم و سی ام پس از کشت) ارائه شده است (شکل ۴-الف). همانطور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان، گیاهان از نظر تعداد و اندازه برگ افزایش چشم‌گیری را نشان می‌دهند و بیش‌ترین پرآوری نهال بادام بعد از ۳۰ روز مشاهده شد (شکل ۴-ب). در تحقیق حاضر ژنوتیپ‌های مختلف بادام عادت‌های رشدی متفاوتی داشته، تفاوت‌های رشدی معنی‌داری داشته‌اند. نتایج جدول تجزیه واریانس بیانگر تاثیر معنی‌دار نوع ژنوتیپ بر میزان پرآوری در محیط درون شیشه بود (جدول ۲). همچنین عادت‌های رشد رویشی ژنوتیپ‌های مختلف بادام در محیط درون شیشه‌ای کاملاً متنوع بود (جدول ۵، شکل ۴-۷) که این نتایج منطبق با نتایج Ainsley et al. (2000) در کشت بافت ژنوتیپ‌های مختلف بادام در محیط پایه MS بوده، نتایج آن‌ها نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف بادام عادات رشدی درون شیشه‌ای متفاوتی با یکدیگر دارند. در بررسی ریزازدیادی بادام‌کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.) نشان داده شد که ژنوتیپ‌های مختلف از نظر تولید تعداد جوانه متفاوت بوده و واکنش‌های متنوعی به شرایط عمومی ریزازدیادی نشان دادند (Azazi et al., 2018). به طور کلی می‌توان گفت ارائه یک محیط کشت واحد که برای ژنوتیپ‌های مختلف آثار یکسانی داشته باشد نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد. در مطالعاتی که بر چندین ژنوتیپ رز (*Rosa rugosa*) انجام شد، تفاوت‌های معنی‌داری از نظر ضریب تکثیر، ارتفاع شاخه‌های تولیدی و شاخص رشد بین ژنوتیپ‌های مختلف از این گونه در واکنش به ریزازدیادی مشاهده گردید (Jing et al., 2010). همچنین در پژوهش انجام شده توسط Ruttle & Douglas (1988) بر روی ۱۲ کلون تجاری صنوبر مشخص شد که ژنوتیپ‌های مختلف در تشکیل و توسعه ساقه‌ها و استقرار گیاهچه‌ها نسبت به محیط کشت نقش بیش‌تری داشتند. تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به تکثیر از طریق ریزازدیادی در گونه‌ای از پالونیا (*Paulownia fortunei*) نیز گزارش شده است (Ashtrava et al., 2014). نتایج حاصل از مطالعه‌ای روی اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر اندام‌زایی درون شیشه‌ای آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) نشان داد که اثرات این عوامل بر روی صفات مورد اندازه‌گیری معنی‌دار بود (Mirzaei et al., 2016). در پژوهش دیگری داگوستا و همکاران (Dagusto et al., 2008)، باززایی در پنج ژنوتیپ از هفت ژنوتیپ آفتابگردان را با فراوانی ۲۸/۶-۲/۸ درصد گزارش کردند. در مطالعه حاضر نیز تاثیر معنی‌دار نوع ژنوتیپ بر میزان پرآوری در محیط کشت درون شیشه‌ای و همچنین عادت‌های رشد رویشی متنوع مشاهده شد.

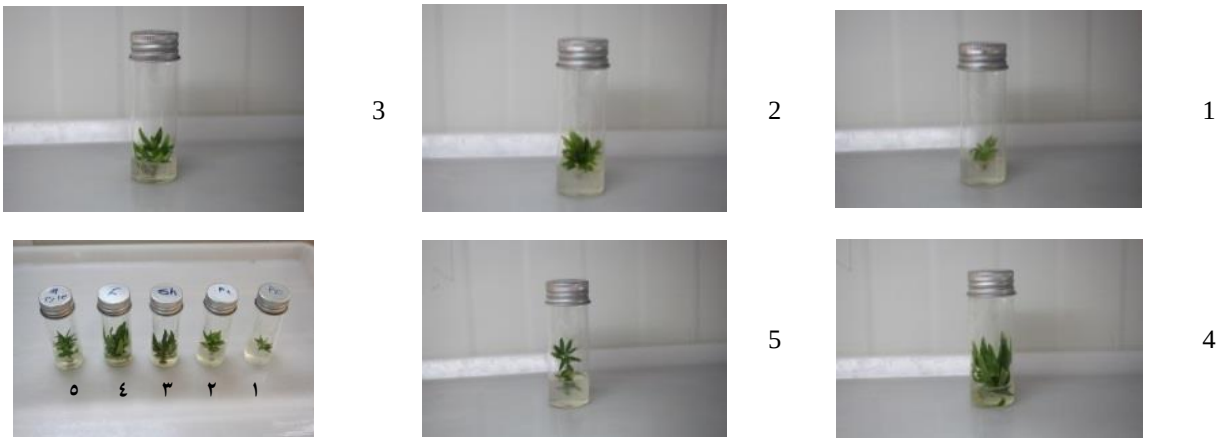
شکل b۴- گیاهچه ریزازدیادی بادام ۳۰ روز پس از کشت

Figure 4b- Almond's micropropagated plantlet, 30 days after explant's settlement (M, (Mamai) cultivar)



شکل a۴- ریزازدیادی بادام مراحل مختلف پس از کشت

Figure 4a- Different growth stages in almond's micropropagation after explant's settlement (M, ("Mamaei") cultivar)



شکل ۵- عادات رشدی متفاوت ژنوتیپ‌های مختلف بادام در شرایط درون شیشه‌ای (این ویترو) (*In vitro*)
(۱: ژنوتیپ A5، ۲: ژنوتیپ A2، ۳: کولتیوار Sh، ۴:کولتیوار F،۵: کولتیوار M)

Figure 5 – The variation of *in vitro* growth habits in different almond's genotypes
(1: genotype A5, 2: genotype A2, 3: cultivar Sh, 4: cultivar F, 5: cultivar M)

شکل ۶- ریشه دهی برخی از ژنوتیپ‌های بادام (۱: ژنوتیپ A1، ۲: ژنوتیپ A2، ۳: ژنوتیپ A3)

Figure 6- *In vitro* rooting of some almond's genotypes
(1: genotype A1, 2: genotype A2, 3: genotype A3)

شکل ۷- تفاوت ریشه دهی در دو ژنوتیپ مختلف بادام در محیط کشت MS حاوی IBA

Figure 7- The rooting differences of two different almond's genotypes in MS medium contain IBA & auxin

جدول ۵- تفاوت مشاهده شده در عادات رشدی ژنوتیپ‌های مختلف بادام

Table 5 – *In vitro* observed differences in growth habits of different almond's genotypes

ژنوتیپ/کولتیوار Genotype /cultivar	معماری شاخه‌ها/عادت رشدی Shoot's architecture /growth habit	قدرت رشدی گیاهچه Plant's vigor	شاخه‌زایی درون شیشه‌ای Proliferation rate	ارتفاع گیاهچه Plant's height	فواصل میانگره‌ای Internode's distance	کالوس (سایز/رنگ) Callus (size /color)	طول گیاهچه به عرض گیاهچه Plant's length/ Width	شکل برگ Leaf's shape (height/width)	پتانسیل ریشه زایی Plant's rooting potential
M	عمودی upward	قویstrong	متوسط middle	متوسط middle	کم low	متوسط/قهوه‌ای middle / brown	بلند/متوسط tall/ middle	بلند/پهن tall / wide	منفی negative
F	نرمال normal	بسیار قوی very strong	خیلی کم very low	متوسط تا کوتاه middle to short	کم low	بزرگ/ سبز large / green	خیلی بلند/ خیلی پهن very tall/ very wide	بسیار بلند/خیلی پهن very tall / very wide	منفی negative
SH	نرمال normal	متوسط middle	متوسط middle	بلند tall	کم low	بزرگ/سبز large /green	بلند تا متوسط /بلند تا متوسط tall to middle/ tall to middle	بلند/متوسط tall/ middle	مثبت positive
A1	نرمال normal	متوسط middle	کم low	بلند tall	زیاد high	کوچک/سبز small / green	متوسط/متوسط middle/ middle	بلند/باریک tall / narrow	مثبت positive
A2	عمودی upward	متوسط middle	کم low	کوتاه و پهن short & wide	خیلی کم very low	کوچک /سبز small / green	بلند/متوسط tall/ middle	بلند/متوسط tall / middle	مثبت positive
A3	نرمال normal	قوی strong	کم low	بلند tall	متوسط middle	کوچک/سبز small / green	بلند متوسط/ عمودی متوسط middle tall/ middle upward	بلند/پهن tall / wide	منفی negative
A4	نرمال normal	متوسط تا ضعیف middle to weak	کم low	کوتاه و باریک short & narrow	زیاد high	کوچک/سبز small / green	کوتاه/کوچک short / low	کوتاه/باریک short / narrow	مثبت positive
A5	نرمال normal	متوسط تا ضعیف middle to weak	کم low	خیلی کوتاه و خیلی باریک very short & very narrow	متوسط middle	all situations	خیلی کوتاه/ خیلی کوچک too short / too little	کوتاه/باریک short/ narrow	منفی negative
A7	عمودی upward	متوسط middle	متوسط middle	بلند tall	متوسط middle	بزرگ/سبز large / green	متوسط/ کوچک متوسط middl/ middle low	متوسط/ باریک middle/ narrow	منفی negative
A8	عمودی upward	متوسط middle	متوسط middle	متوسط و پهن middle & wide	کم low	کوچک/قهوه‌ای مایل به سبز small/ green to brown	کوتاه/کوچک short / low	کوتاه/باریک short / narrow	منفی negative
A9	نرمال normal	متوسط middle	زیاد high	متوسط middle	کم low	متوسط/ سبز middle / green	متوسط/کوچک middle/ low	متوسط /باریک middle / narrow	مثبت positive

اثر متقابل یا برهمکنش نوع ریز نمونه، شیوه ضد عفونی و نوع ژنوتیپ/رقم در میزان پرآوری بادام

نتایج نشان داد که در مراحل ضدعفونی بعد از استفاده از الکل، شیوه استفاده از هیپوکلرید سدیم (غلظت و زمان) بسته به نوع ژنوتیپ/رقم بادام و نوع ریز نمونه (خشبی یا علفی) تاثیر کاملا متفاوتی بر میزان پرآوری بادام دارد، بسته به نوع ژنوتیپ / رقم و نوع ریز نمونه به کار برده شده در هر کدام، غلظت هیپوکلرید سدیم بکار برده شده و زمان استفاده از ان می‌تواند تاثیر متفاوت و قابل توجهی بر میزان عملکرد رشد و نمو گیاهچه تولیدی درون شیشه‌ای داشته باشد (جداول ۲ و ۶). به عنوان مثال در رقم شکوفه (SH)، در صورتی که از غلظت ۵۰٪ هیپوکلرید سدیم برای ۱۰ دقیقه در ضدعفونی استفاده شود، تفاوت چشمگیری در میزان پرآوری گیاهچه‌های بادام در بین ریز نمونه علفی یا خشبی وجود ندارد، در حالی‌که در همین رقم، در تیمار ضدعفونی با غلظت پایین تر هیپوکلرید سدیم یعنی ۲۵٪ در زمان ۱۵ دقیقه، ریزنمونه خشبی پرآوری بیشتری نسبت به ریزنمونه علفی نشان داده است (جدول ۶). اطلاعات در مورد برهمکنش و تاثیر متقابل بین ژنوتیپ/رقم، شیوه ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم و نوع ریز نمونه در سایر ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در جدول ۶ ارائه شده است.

جدول ۶- تاثیرمتقابل ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و شیوه ضد عفونی بر درصد شاخه‌زایی بادام

Table 6- The effect of interaction between genotype, explant and sterilization's method on almond's *in vitro* proliferation

ژنوتیپ/کولتیوار Genotype/Cultivars	میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده (تکثیر٪) Mean number of branches produced (proliferation %)			
	اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه) Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 50% (10 minutes)		اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 25% (15 minutes)	
	شاخه علفی Green Branch	شاخه چوبی Wooden Branch	شاخه علفی Green Branch	شاخه چوبی Wooden Branch
A1	43.10 ± 1.53 b	46.12 ± 2.84e	35.13 ± 1.52 c	38.35 ± 1.48 a
A2	53.12 ± 3.12a	57.63± 3.90 b	35.24± 2.11 b	38.10 ± 3.14 b
A3	37.12 ± 2.50d	42.30± 2.70 h	35.32 ± 1.72 g	37.62 ± 1.78 f
A4	24.05 ± 0.42 g	28.21 ±1.14 h	30.12 ± 1.14 e	35.13 ±0.42 g
A5	29.12 ± 0.52 e	30 ± 0.51 e	28.16 ± 0.59 cd	25.80±0.51 e
A7	35.55 ± 1.25d	38.11 ± 4.24c	41.14 ± 1.41a	37.29 ± 1.24 b
A8	27.12 ± 2.19 e	34.12 ± 1.18 d	35.12 ± 1.18 c	40.15 ± 2.19 a
A9	21.14 ± 1.23e	28.89 ± 1.29d	26.15 ± 1.29e	42.88 ± 1.24 a
SH	24.12 ± 0.77 e	23.17 ± 0.97 e	30.10 ± 0.99 c	43.13 ± 0.77 a
M	24.46 ± 0.88 d	28.12±1.35 c	25.17 ± 1.49 e	31.15 ± 0.89 c
F	20.15 ± 0.65 e	18.13 ± 0.36 f	35.23± 0.43 cd	40.15 ± 0.69a

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، تاثیر نوع ژنوتیپ یا رقم بادام بر میزان پرآوری در محیط درون شیشه‌ای و همچنین عادت‌های رشد رویشی بادام به طور چشمگیری متنوع بود. بین ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد مطالعه در این پژوهش، تنوع چشمگیری در عکس العمل به میزان غلظت هیپوکلرید سدیم مشاهده شد، به طوری‌که عکس العمل هر ژنوتیپ یا رقم به غلظت و زمان استفاده از هیپوکلرید سدیم منحصر به فرد بود که با اعمال تغییرات در مراحل ضدعفونی و ارزیابی تاثیر آن‌ها بر عملکرد، روش‌های ضدعفونی بهینه مخصوص هر ژنوتیپ یا رقم مشخص شد. همچنین استفاده از ریزنمونه شاخه‌های مختلف خشبی یا علفی در ژنوتیپ‌های متفاوت بادام، عادت‌های رشدی متنوعی به همراه داشت به طوری که یک ریزنمونه مشخص بسته به ژنوتیپ، می توانست باعث کاهش یا افزایش شاخه‌زایی در نهال‌های بادام شود. در اکثر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق ریزنمونه خشبی از درصد شاخه‌زایی بیش‌تری نسبت به ریزنمونه علفی برخوردار بود. از طرفی برهمکنش سه عامل رقم/ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و نوع

ضـدعفونی (غلظت و زمان تیمار با هیپوکلرید سـدیم) به صـورت معناداری نتایج پرآوری در بادام را تحت تاثیر قرار داده، برای هر رقم/ژنوتیپ بسته به نوع ریزنمونه که علفی باشد یا خشبی، غلظت و زمان تیمار با هیپوکلرید سـدیم تاثیر متفاوتی بر پرآوری درون شیشه‌ای داشت. بر این اساس، مقایسه کامل بین همه فاکتورهای مورد مطالعه موثر بر درصـد پرآوری و اثرات متقابل آنها در هر زنوتیپ یا رقم در جدول ۷ نمایش داده شده است و بهترین شیوه ضدعفونی و بهترین نوع ریز نمونه در هر کدام پیشنهاد شده است (جدول ۷). به طور کلی نتایج این مطالعه نشـان می‌دهد که در هر ژنوتیپ/ رقم بر اسـاس نوع ریزنمونه علفی یا خشـبی، اسـتفاده از غلظت نامناسـب هیپوکلرید سدیم یا مدت زمان نامناسب برای ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم باعث ایجاد آلودگی یا آسیب جدی به بافت و نتایج نامطلوب کشت درون شیشه‌ای در بادام می‌شود.

جدول ۷- مقایسه کامل فاکتورهای موثر و تاثیرات متقابل آنها بر پرآوری درون شیشه‌ای بادام و ارائه بهترین نوع ریزنمونه و شیوه ضدعفونی در هر ژنوتیپ یا رقم بادام

Table 7- The comparision between different effective factors and their interaction on almond's invitro proliferation to propose the best strilization's method and explant's type for each almond's genotype or cultivar

ژنوتیپ/کولتیوار Genotype/Cultivar	اثر متقابل روش ضدعفونی و ژنوتیپ/کولتیوار Interaction: sterilization's method & genotype/cultivar	اثر متقابل ریزنمونه و ژنوتیپ/کولتیوار Interaction: explant & genotype/cultivar	اثر متقابل روش ضدعفونی و ریزنمونه و ژنوتیپ/کولتیوار Interaction: sterilization's method & explant & genotype/cultivar	بهترین ریزنمونه و روش ضدعفونی best explant & sterilization' s method
	هیپوکلرید سدیم (۲۵٪ برای ۱۵ دقیقه) (a) در مقایسه با هیپوکلرید سدیم (۵۰٪ برای ۱۰ دقیقه) (b) sodium hypochloride (25% for 15 min) (a) vs sodium hypochloride (50% for 10 min) (b)	شاخه چوبی (c) در مقایسه با شاخه علفی (d) wooden branch (c) vs green branch (d)	نوع ضدعفونی در مقایسه با نوع ریزنمونه type of Sterile vs type of explant	
A1	a<b	c>d	(a: c>d) (b: c>d)	bc
A2	a<b	N	(a: c=d=N) (b: c>d)	bc
A3	a<b	c>d	(a: c>d) (b: c>d)	bc
A4	a<b	c<d	(a: c>d) (b: c>d)	ac
A5	N	c<d	(a: c<d) (b: c=d=N)	ac
A7	a>b	c<d	(a: c<d) (b: c>d)	ad
A8	a>b	c>d	(a: c>d) (b: c>d)	ac
A9	a>b	c>d	(a: c>d) (b: c>d)	ac
SH	a<b	c>d	(a: c>d) (b: c=d=N)	ac
F	a>b	c>d	(a: c<d) (b: c<d)	ad
M	N	c>d	(a: c>d) (b: c>d)	ac

N: neutral OR equal (N:خنثی یا مساوی)

به نظر می‌رسـد بررسـی بیش‌تر در زمینه تاثیر ترکیباتی دیگر مانند نیترات نقره و کلرید جیوه جهت ضـدعفونی ریزنمونه‌های گونه‌های وحشی بادام، نوع ریزنمونه شامل برگ، دمبرگ، جوانه، مریسـتم و پروتوپلاسـت در کشـت درون شـیشـه‌ای بادام در ژنوتیپ‌های مختلف، اسـتفاده از محیط کشـت‌های مختلف مانند WPM، DKW، Knop و MS½ در کشت درون شیشه‌ای بادام و بررسـی نتـایج هر کـدام بر میزان پرآوری و ریشـه‌زایی در ژنوتیپ‌های مختلف بادام و ارزیابی عکس‌العمل دیگر ژنوتیپ‌ها و ارقام تجاری بادام در محیط کشـت درون شـیشـه و غیره در مطالعات تکمیلی ضروری است.

References

Ainsley, P. J., Collins, G. G., & Sedgley, M. (2000). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, *36*(6), 470-474. https://doi.org/10.1007/s11627-000-0084-5

Athenaashari, M., & Zakai Khosroshahi, M. R. (2013). Comprehensive guide to plant tissue culture. Bu Ali Sina University Press. [In Persian]

Azazi, S., Mirzaei Nodooshan, H., Imam, M., & Kalateh Jari, S. (2018). Factors affecting the micropropagation of almond (*Amygdalus scoparia* Spach.). *Journal of Plant Research*, *31*(3), 818-828. [In Persian]

Bagheri, H., & Azadi, P. (2002). *Plant tissue culture (techniques and experiments)*. Mashhad University Jihad Publications. [In Persian]

Bagheri, S., Amiri, M. A., Davoodi, D., & Entesari, M. (2013). Investigation and comparison of conventional culture containers and periodic bioreactors for mass propagation of GF677 hybrid base (peach × almond). *Horticultural Sciences (Agricultural Sciences and Industries)*, *27*(1), 36-43. [In Persian]

Chaichi, S., Hassanzadeh, N., Jafarloo, M., & Bai Bordi, A. (2002). *Guide to cultivate almonds (planting, holding, harvesting)*. Publication of Agricultural Education. [In Persian]

Channuuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S. A., Battle, I., Arús, P., Sedgley, M., & Collins, G. (2003). Identification of incompatibility in genotypes of almond (*Prunus dulcis*) using specific primers based on the introns of the s-alleles. *Plant Breeding*, *122*(2), 164-168.

Dagustu, N., Fraser, P., Enfissi, E., & Bramley, P. (2008). Screening for high callus induction and Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *22*, 933-937.

Darab, H., Soleimanpour, R., & Zolfi, A. (2010). *Educational set of disinfectants and disinfectants*. West Azerbaijan University of Medical Sciences and Health Services. [In Persian]

Darvishian, M. (2000). *Cultivation and production of almonds*.Technical Publishing. [In Persian]

Dejmpour, J., Grigorian, A., Majidi, A., & Ansroudi, F. (2010). Evaluation of rooting ability of several interspecific hybrids of *Prunus* genus in vitro culture. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *11*(1), 1-10. [In Persian]

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2020). *Food and agricultural commodities production*. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

Fotopoulos, S., & Sotiropoulos, T. E. (2005). In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research*, *3*(1), 3–8.

Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M., & Arji, A. (2020). Effect of different media and growth regulators on micropropagation of GF677. *The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture)*, *43*(2), 241-254. https://doi.org/10.22055/PPD.2019.27439.1667

Ghasemi, A., Izadi, H., & Masoumifar, H. (2010). *Almond cultivation (planting, holding, harvesting)*. Agricultural Education and Extension Publications. [In Persian]

Hartmann, H. T., Kester, D. E., & Davies, F. T. (1990). *Plant propagation and practice*. Prentice-Hall.

Hasandokht, M., & Ebrahimi, R. (2006). *Basics of plant tissue culture*. Marz Danesh Publications. [In Persian]

Izadpanah, M. (2001). Micropropagation of wild cherry (*Prunus avium*). *Pajouhesh-va-sazandegi*, *14*(3), 6-74.

Jalili Marandi, R., & Hakimi Rezaei, J. (2003). *Investigating the factors affecting micropropagation of golmohammadi* (Rose). *Master thesis, Horticulture, Shiraz University.* [In Persian]

Kamali, K., Majidi, H. A., & Zarghami, R. (2001). Determining the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of GF677 (peach × almond hybrid). *Journal of Seedlings and Seeds*, *17*(3), 234-243. [In Persian]

Kester, D. E., Gradiziel, T. M., & Grassely, C. (1991). *Almond (Prunus)*. *Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*, *290*, 701-760.

Mam, M., Ghamari Zare, A., Asadi Karam, F., & Loki Anaraki, K. (2013). *Micropropagation of almond (Amygdalus scoparia) through bud and embryo culture*. *Journal of Genetic Research and Breeding of Range and Forest Plants of Iran*, *1*, 77-86. [In Persian]

Miguel, C. M., Druart, F., & Oliveira, M. (1996). *Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (Prunus dulcis Mill.) explants*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *2*, 148-153.

Mirzaei, F., Durrani, A., & Bandeh Hagh, A. (2017). *Effect of genotype, explant and plant growth regulators on intracellular vitiligo (Helianthus annuus L.)*. *Journal of Cellular and Molecular Research*, *29*(4), 432-424. [In Persian]

Moeini, A., & Kahrizi, D. (2003). *Plant tissue culture*. Tehran: Student Basij Organization Publications. [In Persian]

Mohamadzadeh Moghadam, N., & Hamidi, H. (2017). *Investigating the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (Mallus domestica Borkh.) rootstocks*. *The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture)*, *40*(1), 41-45. [In Persian]

Nazari, A., Grossi, Q., Haddad, R., & Babaei, M. (2010). *Study of the effect of pectin, type of culture medium and plant growth regulators on GF677 hybrid base propagation in vitro*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, *2*(1), 126-113. [In Persian]

Nas, M. N., Bolek, Y., & Sevgin, N. (2010). *The effects of explant and cytokinin type on regeneration of Prunus microcarpa*. *Scientia Horticulturae*, *126*(2), 88-94. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.06.012

Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers.

Pierik, R. L. M., Steegmans, H. H. M., & Marelis, J. J. (1973). *Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explants*. *Scientia Horticulturae*, *1*, 107-119.

Razavi, F. (2022). *The study of physiological and molecular responses to the cold stress in almond (Prunus dulcis Mill.), and cold tolerance degree in different almond genotypes*. Final project report, No. 55537, published by AREEO (Agricultural Research, Education & Extension Organization). [In Persian]

Rahimi, M. K. (2005). *Intensive medical microbiology*. Tehran: Ayizh Publications. [In Persian]

Rutledge, C. B., & Douglas, G. C. (1988). *Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar in vitro*. *Physiologia Plantarum*, *72*, 367-373.

Seyed Tabatabai, B. A., & Omidi, M. (2011). *Plant tissue and cell culture*. University of Tehran. [In Persian]

Shahnavazi, A. (2012). *Evaluating the economic benefits of Iranian almond research using the economic surplus model*. *Agricultural Economics Research*, *1*, 142-121. [In Persian]

Shakafandeh, A., & Ghasemi, M. (2008). *Investigation of the effects of BA and TDZ on bud growth and body embryogenesis of immature almond cobs (Prunus dulcis L.) late flowering cultivar '7 Shahroud'*. *Journal of Horticultural Sciences (Agricultural Sciences and Industries)*, *2*, 147-154. [In Persian]

Sharifi, A., Moshtaghi, N., & Bagheri, A. (2010). *Cultivation of applied plant tissue of some agricultural, horticultural and ornamental products*. Mashhad University Jihad. [In Persian]

Shtereva, L., Vassilevska-Ivanova, R., Karceva, T., & Kraptchev, B. (2014). *Micropropagation of six Paulownia genotypes through tissue culture*. *Journal of Central European Agriculture*, *15*, 147-156.

Sujatha, M., & Mukta, N. (1996). *Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *44*, 135-141.

Tehranifar, A., Kafi, M., & Adli, M. (2002). *Almond cultivation*. Tehran: Botany of basic selection and transplantation of agricultural operations of pests and diseases, processing and grading: Mashhad Agricultural Jihad Publications. [In Persian]

Wazwai, A. (1999). *Investigating the trend of working almonds in Iran and comparing it with several countries in Australia and the United States*. Scientific speech, Faculty of Agriculture, Karaj University. [In Persian]

Webster, S., Mitchell, S. A., & Ahmad, M. H. (2003). *A novel surface sterilization method for reducing microbial contamination of field-grown medicinal explants intended for in vitro culture*. *Biotechnology Centre of West Indies University 17th SRC Conference on Science and Technology for Economic Development: Technology Driven Agriculture and Agro-Processing*, Biotechnology Centre, Mona, Kingston, Jamaica.

Xing, W., Bao, M., Qin, H., & Ning, G. (2010). *Micropropagation of Rosa rugosa through axillary shoot proliferation*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *52*, 69-75.

Yıldırım, H., Onay, A., Süzerer, V., Tilkat, E., Özden-Tokatlı, Y., & Akdemir, H. (2010). Micrografting of almond (Prunus dulcis Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel". *Scientia Horticulturae*, *125*, 361–367.

Zolfaghari Nasab, R., Khosroshahi, M., Grigorian, V., & Motalebi Azar, A. (2004). Investigation of the increase in natural hybrids of apricot × tomato. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *2*, 81–92. [In Persian]