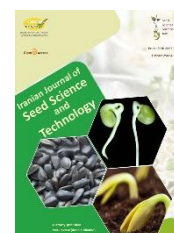




## Iranian Journal of Seed Science and Technology



ISSN: 2588-4638

### Research Article

# Optimization of micropropagation in some almond genotypes (*Prunus dulcis* L.): evaluation of shoot proliferation response to explant type and sterilization method

Farzaneh Razavi<sup>1\*</sup>, Masoumeh Asadi Aghbolaghi<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, ChaharMahal O Bakhtiari's Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran.

2. Ph.D. Graduate in Seed Science and Technology, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University 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](mailto: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 almond'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). Optimization of micropropagation in some almond genotypes (*Prunus dulcis* L.): evaluation of shoot proliferation response to explant type and sterilization method. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 13 (3), 87-104. <https://doi.org/10.22092/ijssst.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

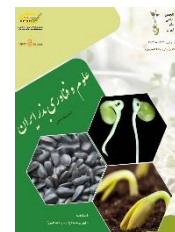
shoot resulted better (40.13) than woody shoot (36.20). Interestingly, in most studied genotypes/cultivars such as A1, A3, A8, A9, SH, M, and F, woody mature shoot exposed better proliferation. Likewise, the sterilization method showed different effects on shoot proliferation in different genotypes/cultivars. 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.



## 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<sup>۱\*</sup>، معصومه اسدی آقباغی<sup>۲</sup>

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، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

## چکیده

## 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](mailto:farzanehrazavi2003@yahoo.com)

استفاده از فن آوری 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 dulcis* Mill) در سال‌های ۸۹۳۱ تا ۱۴۰۱ 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 کاملاً 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 ۱A، 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 (۰۳/۰۲) 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 تأثیر معنی‌دار بر میزان شاخه‌زایی بادام بود. سایر ترکیبات ضدعفونی کننده، ریز نمونه‌ها و محیط کشت‌های مختلف در ریزازدیادی بادام درآینده بررسی خواهند شد.

## نحوه استناد به این مقاله:

Razavi, F., & Asadi, M. (2024). Optimization of micropropagation in some almond genotypes (*Prunus dulcis* L.): evaluation of shoot proliferation response to explant type and sterilization method. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 13 (3), 87-104. <https://doi.org/10.22092/ijssst.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; Tehranifar et al., 2002; 2002; سال ۲۰۲۰، ایران رتبه چهارم تولید بادام را بعد از آمریکا، اسپانیا و استرالیا به خود اختصاص داده است (FAO, 2020). مهم ترین 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, 1999; Vazvai, 2012; Shahnavaizi, 2010; et al., 2010). استفاده از فن آوری کشت بافت برای تکثیر رویشی یا ریزازدیادی درختان میوه یکی از مهم ترین 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، به ویژه 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 ژرم پلاسماهای 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 سیتوکینین بررسی شدند. طبق نتایج، محیط کشت MS، همراه با یک میلی گرم در لیتر BA و نیم میلی گرم در لیتر IBA با تولید بیش ترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیش ترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان گره، تعداد برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی شده به عنوان مناسب ترین محیط کشت انتخاب شد. همچنین بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر IBA و نیم میلی گرم در لیتر BA حاصل شد (Gerdakaneh et al., 2020). ریزازدیادی درختان میوه نیز دارای محدودیت‌هایی نظیر اختصاصی بودن دستورالعمل کشت درون شیشه‌ای شامل نوع ریز نمونه، نوع ترکیب محیط کشت و بالانس مواد غذایی و هورمون‌ها، نحوه سازگاری گیاهان این ویترو با محیط مزرعه، همچنین انواع 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 ریح 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 تغییر یافته بر سایر محیط‌های آزمایش شده مانند MS و MS<sub>1/2</sub> در مرحله شاخه‌زایی برتری داشته ولی در مرحله ریشه‌زایی محیط کشت LS نتایج بهتری نشان داد. نتایج پژوهش دژم پور و همکاران (Dejimpour et al., 2010) در جنس *Prunus* نشان داد که ضد عفونی 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 ضد عفونی ریزنمونه‌ها به ترتیب با استفاده از کلرید جیوه (۲۰۰ میلی گرم 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 ضد عفونی 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 ضد عفونی 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 ضد عفونی در محیط کشت برای هر رقم یا ژنوتیپ انجام گردید. لازم به ذکر است که ژنوتیپ‌های اصلاحی A1 ..... A9، حاصل برنامه تحقیقات بهنژادی بادام در کلکسیون 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 سرمزدگی 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 خصوصاً در برخی هیبریدهای هلو و بادام انجام گرفت (Alizadeh & Grigorian, 2001; Athenaashari & Zakai Khosroshahi, 2013; Seyed Tabatabaei & Omid, 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 ضد عفونی (۱- الکل ۷۰٪ (۶-۷ ثانیه)، ۲- هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه)، ۲- الکل ۷۰ درصد (۶-۷ ثانیه)، - هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۵ دقیقه) در بین ژنوتیپ‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

### شیوه تهیه ریز نمونه

متفاوتی با غلظت‌های مختلف ( $5/1 \pm pH$ ) برای ریزازدیادی ژنوتیپ‌های بادام مورد استفاده قرار گرفت (Azazi et al., 2018; Bagheri et al., 2013; Zolfaghari Nasab et al., 2004). محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد 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  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد، 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).

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 سانتی متر 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 ساین نهایی ریزنمونه‌ها بین ۱/۵ تا سه سانتی متر 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 (۱۰ ثانیه) 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

جدول ۱- ترکیب محیط کشت MS بادام درون شیشه‌ای

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

| عناصر پر مصرف<br>Macro element                                                                           | میلی گرم/لیتر<br>(mg/L) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| کلرید کلسیم<br>Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> )                                                     | 332.02                  |
| فسفات پتاسیم<br>Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                        | 170                     |
| نترات پتاسیم<br>Potassium nitrate (KNO <sub>3</sub> )                                                    | 1900                    |
| سولفات منیزیم<br>Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )                                                  | 180                     |
| نترات آمونیوم<br>Ammonium nitrate (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )                                     | 1650                    |
| عناصر کم مصرف<br>Micro elements                                                                          |                         |
| کلرید کبالت<br>Cobalt Chloride (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)                                    | 0.025                   |
| سولفات مس<br>Cuprum Sulfate (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)                                       | 0.025                   |
| اسید بوریک<br>Boric Acid (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )                                               | 6.2                     |
| یدید پتاسیم<br>Potassium Iodide (KI)                                                                     | 0.83                    |
| سولفات منگنز<br>Manganese Sulfate (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)                                 | 16.9                    |
| مولبیدات سدیم<br>Sodium Molybdate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)                  | 0.25                    |
| سولفات روی<br>Zinc Sulfate (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)                                        | 8.6                     |
| ویتامین‌ها<br>Vitamins                                                                                   |                         |
| گلیسین<br>Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )                                       | 2                       |
| نیکوتینیک اسید<br>Nicotinic Acid (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )                        | 0.5                     |
| پیرودوکسین<br>Pyridoxine (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )                               | 0.5                     |
| تیامین<br>Thiamine (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> )                    | 0.1                     |
| آهن<br>Iron                                                                                              |                         |
| دی سدیم اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید<br>Disodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na <sub>2</sub> EDTA) | 37.25                   |
| سولفات آهن<br>Ferrous Sulfate (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)                                     | 27.85                   |
| ساکاروز<br>Sucrose                                                                                       | 30000                   |
| گلو تامین<br>L-glutamine                                                                                 | 500                     |
| آگار<br>Agar                                                                                             | 7000                    |



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

Figure 1- Almond seedlings in tubes (vial)

### تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش بصورت فاکتوریل سه عاملی که فاکتور اول شامل نوع ریزنمونه با دو سطح (علفی و خشبی) و فاکتور دوم شامل دو سطح 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 آنوای یک طرفه و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح معنی داری پنج درصد

( $P \leq 0.05$ ) و student F-test و T-test در قالب طرح پایه کاملاً

تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار 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 معنی داری بر میزان پرآوری نهال‌های بادام در کشت درون شیشه‌ای داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر روش‌های ضدعفونی، 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                                        | درجه آزادی | میانگین مربعات شاخه‌زایی               |
|----------------------------------------------------|------------|----------------------------------------|
| Sources of variation                               | Df         | Mean Square of branching/proliferation |
| ژنوتیپ / کولتیوار                                  | 10         | 25.20 **                               |
| Genotype/cultivar                                  |            |                                        |
| روش ضدعفونی                                        | 1          | 44.63**                                |
| sterilization method                               |            |                                        |
| نوع ریزنمونه                                       | 1          | 11.18**                                |
| type of explants                                   |            |                                        |
| ژنوتیپ/کولتیوار × روش ضدعفونی                      | 10         | 12.88**                                |
| Genotype/cultivar × sterilization method           |            |                                        |
| ژنوتیپ/کولتیوار × نوع ریزنمونه                     | 10         | 20.24**                                |
| Genotype/cultivar × type of explants               |            |                                        |
| ژنوتیپ × روش ضدعفونی × نوع ریزنمونه                | 10         | 22.12 **                               |
| Genotype × sterilization method × type of explants |            |                                        |
| خطای آزمایشی                                       | 88         | 0.77                                   |
| Experimental error                                 |            |                                        |
| ضریب تغییرات (درصد)                                |            | 18.17                                  |
| Coefficient of variation (percentage)              |            |                                        |

\*\*significantly different, P=0.01

\*\* معنی دار در سطح ۱ درصد

### 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 & Omid, 2011). هیپوکلرید سدیم و کلرید جیوه به طور گسترده‌ای برای

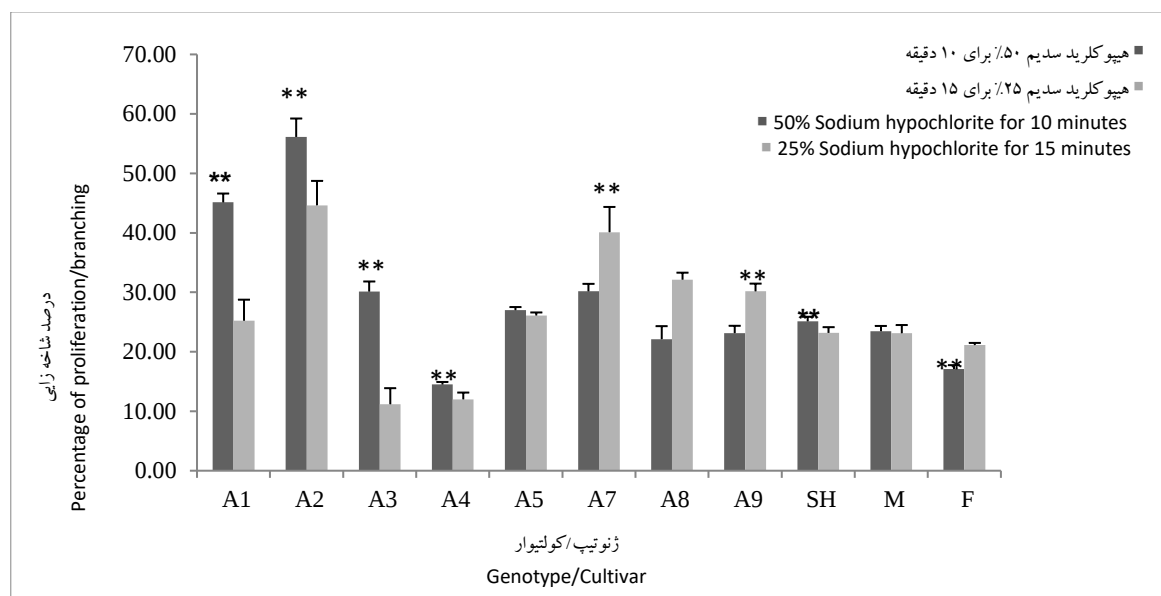
کنترل آلودگی آزمایشگاهی گیاهان چوبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیریک و همکاران (Pirik et al., 1973) عنوان داشتند که برای نابودی میکروارگانیسم‌ها نمی‌توان تنها از الکل استفاده نمود، زیرا اتانول به تنهایی بر باکتری‌ها و قارچ‌های سپوردار اثر نمی‌گذارد. بنابراین استفاده از هیپوکلرید سدیم الزامی است. از 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 (Webster et al., 2003) (شکل ۲).

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

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

Table 3- Interaction 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)   |                                                                     |                                                                     |
| ژنوتیپ/کولتور                                      | اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۵۰٪ (۱۰ دقیقه)           | اتانول ۷۰٪ (۶ تا ۷ ثانیه) + هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه)           |
| Genotype/Cultivars                                 | Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 50% (10 minutes) | Ethanol 70% (6 to 7 seconds) + Sodium hypochloride 25% (15 minutes) |
| A1                                                 | 45.12 ± 1.49 <sup>b</sup>                                           | 25.220 ± 3.54 <sup>e</sup>                                          |
| A2                                                 | 56.12 ± 3.10 <sup>a</sup>                                           | 44.63 ± 4.10 <sup>b</sup>                                           |
| A3                                                 | 30.12 ± 1.70 <sup>d</sup>                                           | 11.18 ± 2.70 <sup>h</sup>                                           |
| A4                                                 | 14.5 ± 0.42 <sup>g</sup>                                            | 12 ± 1.14 <sup>h</sup>                                              |
| A5                                                 | 27 ± 0.52 <sup>e</sup>                                              | 26.10 ± 0.51 <sup>e</sup>                                           |
| A7                                                 | 30.17 ± 1.25 <sup>d</sup>                                           | 40.11 ± 4.24 <sup>c</sup>                                           |
| A8                                                 | 22.12 ± 2.19 <sup>e</sup>                                           | 32.12 ± 1.18 <sup>d</sup>                                           |
| A9                                                 | 23.14 ± 1.23 <sup>e</sup>                                           | 30.17 ± 1.29 <sup>d</sup>                                           |
| SH                                                 | 25.12 ± 0.77 <sup>e</sup>                                           | 23.17 ± 0.97 <sup>e</sup>                                           |
| M                                                  | 23.46 ± 0.88 <sup>e</sup>                                           | 23.12 ± 1.38 <sup>e</sup>                                           |
| F                                                  | 17.10 ± 0.65 <sup>f</sup>                                           | 21.13 ± 0.36 <sup>e</sup>                                           |



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

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 کولتوارهای SH، M و F، ریزنمونه خشبی از درصد شاخه‌زایی بیشتری نسبت به ریزنمونه علفی برخوردار بوده است. با توجه به این نتایج، انتخاب ریزنمونه 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 شده از منشاء بالغ، غلظت‌های بالاتر هورمون TDZ برای القاء شاخساره نیاز است. باززایی برگ‌های با

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 ریزنمونه 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 ریزنمونه علفی، از

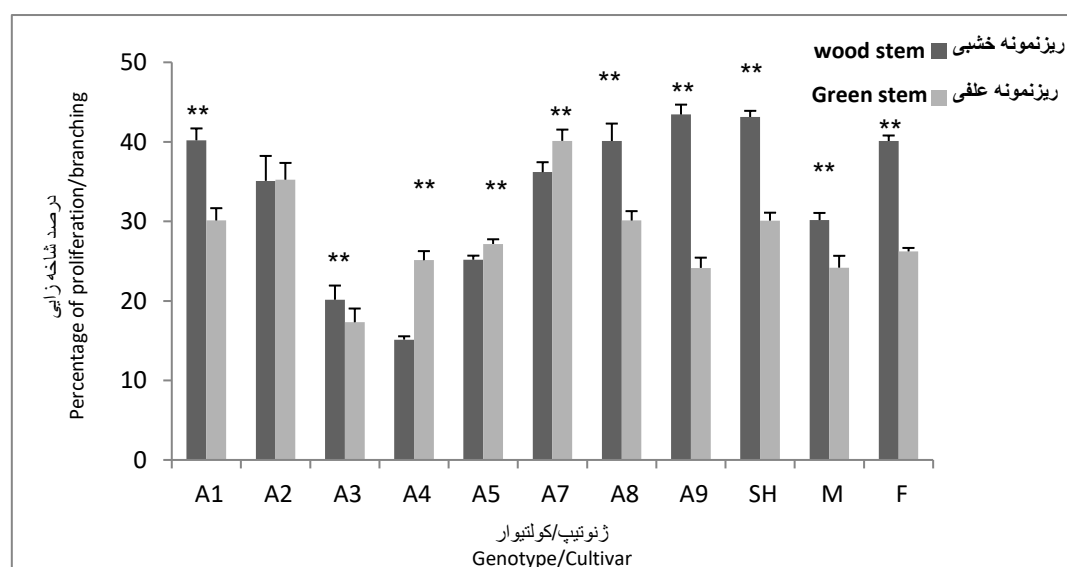
از هورمون مورد نیاز خواهد بود (Sujatha & Mukta, 1996). در بررسی استفاده از ریزنمونه‌های ریشه، کوتیلدون و هیپوکوتیل در کشت درون شیشه‌ای بادام نشان داده شد که ریزنمونه‌های کوتیلدون باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل داشته و ریزنمونه‌های ریشه برای باززایی مناسب نبودند و خشبی یا علفی بودن ریزنمونه‌ها در نتایج حاصل موثر (Nas et al., 2010).

منشاء بالغ، ۱۵٪ بود که با کشت در محیط تغییر یافته و واکشت نمونه‌ها در غلظت کم‌تر هورمون BA، به ۳/۳۵٪ افزایش یافت. در مطالعه کشت بافت گیاه جاتروفا (*Jatropha curcas* L.)، از ریزنمونه‌های مختلف از جمله هیپوکوتیل، دمبرگ و برگ استفاده شد. نتایج نشان داد عادت‌های رشدی بسته به ریزنمونه‌های مختلف متفاوت است و برای توسعه رشد و نمو ترکیبات متفاوتی

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

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

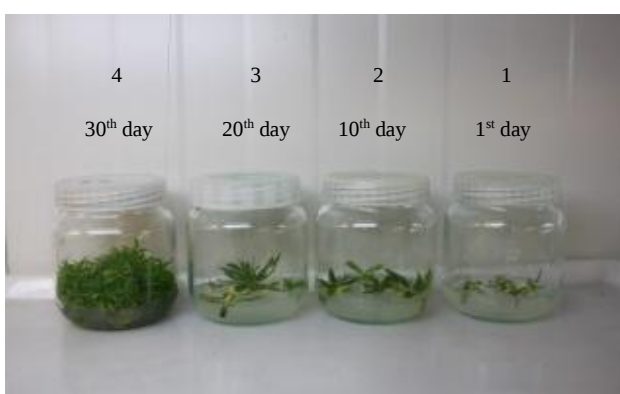
| میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده (تکثیر)         |                           |                            |
|--------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Mean number of branches produced (proliferation) |                           |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



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

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

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 تنظیم‌کننده‌های 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 ۴ا- ریزازدیادی بادام مراحل مختلف پس از کشت  
Figure 4a- Different growth stages in almond's micropropagation after explant's settlement (M, ("Mamaei") cultivar)

## 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 شاخه‌ها، بیش‌ترین و کم‌ترین پرآوری گیاه در زمان‌های مختلف بعد از کشت (روز اول، دهم، بیستم و سی‌ام 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 عادت‌های رشدی درون شیشه‌ای متفاوتی با یکدیگر دارند. در بررسی ریزازدیادی بادام کوهی (*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



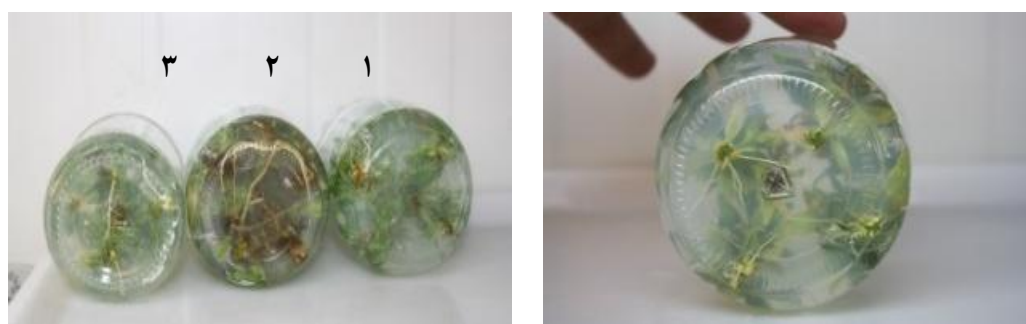
شکل ۴ب- گیاهچه ریزازدیادی بادام ۳۰ روز پس از کشت  
Figure 4b- Almond's micropropagated plantlet, 30 days after explant's settlement (M, Mamaei cultivar)



شکل ۵- عادات رشدی متفاوت ژنوتیپ‌های مختلف بادام در شرایط درون شیشه‌ای (این ویترو) (*In vitro*)

(۱: ژنوتیپ A5، ۲: ژنوتیپ A2، ۳: کولتوار Sh، ۴: کولتوار F، ۵: کولتوار 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 /cultivar<br>Genotype | معماری شاخه‌ها/عادت رشدی<br>Shoot's architecture<br>/growth habit | قدرت رشدی گیاهچه<br>Plant's vigor | شاخه‌زایی درون شیشه‌ای<br>Proliferation rate | ارتفاع گیاهچه<br>Plant's height                     | فاصله میانگره‌های<br>Internode's distance | کالوس (سایز/رنگ)<br>Callus (size/color)            | طول گیاهچه به عرض گیاهچه<br>Plant's length/ Width                | شکل برگ<br>Leaf's shape<br>(height/width)    | پتانسیل ریشه زایی<br>Plant's rooting potential |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| M                            | عمودی<br>upward                                                   | قوی<br>strong                     | متوسط<br>middle                              | متوسط<br>middle                                     | کم<br>low                                 | متوسط/قهوه‌ای<br>middle / brown                    | بلند/متوسط<br>tall/ middle                                       | بلند/پهن<br>tall / wide                      | منفی<br>negative                               |
| F                            | نرمال<br>normal                                                   | بسیار قوی<br>very strong          | خیلی کم<br>very low                          | متوسط تا کوتاه<br>middle to short                   | کم<br>low                                 | بزرگ / سبز<br>large / green                        | خیلی بلند/ خیلی پهن<br>very tall/ very wide                      | بسیار بلند/خیلی پهن<br>very tall / very wide | منفی<br>negative                               |
| SH                           | نرمال<br>normal                                                   | متوسط<br>middle                   | متوسط<br>middle                              | بلند<br>tall                                        | کم<br>low                                 | بزرگ /سبز<br>large /green                          | بلند تا متوسط<br>بلند تا متوسط<br>tall to middle/ tall to middle | بلند/متوسط<br>tall/ middle                   | مثبت<br>positive                               |
| A1                           | نرمال<br>normal                                                   | متوسط<br>middle                   | کم<br>low                                    | بلند<br>tall                                        | زیاد<br>high                              | کوچک /سبز<br>small / green                         | متوسط /متوسط<br>middle/ middle                                   | بلند/باریک<br>tall / narrow                  | مثبت<br>positive                               |
| A2                           | عمودی<br>upward                                                   | متوسط<br>middle                   | کم<br>low                                    | کوتاه و پهن<br>short & wide                         | خیلی کم<br>very low                       | کوچک /سبز<br>small / green                         | بلند/متوسط<br>tall/ middle                                       | بلند/متوسط<br>tall / middle                  | مثبت<br>positive                               |
| A3                           | نرمال<br>normal                                                   | قوی<br>strong                     | کم<br>low                                    | بلند<br>tall                                        | متوسط<br>middle                           | کوچک /سبز<br>small / green                         | بلند متوسط /<br>عمودی متوسط<br>middle tall/ middle upward        | بلند/پهن<br>tall / wide                      | منفی<br>negative                               |
| A4                           | نرمال<br>normal                                                   | متوسط تا ضعیف<br>middle to weak   | کم<br>low                                    | کوتاه و باریک<br>short & narrow                     | زیاد<br>high                              | کوچک /سبز<br>small / green                         | کوتاه /کوچک<br>short / low                                       | کوتاه/باریک<br>short / narrow                | مثبت<br>positive                               |
| A5                           | نرمال<br>normal                                                   | متوسط تا ضعیف<br>middle to weak   | کم<br>low                                    | خیلی کوتاه و خیلی باریک<br>very short & very narrow | متوسط<br>middle                           | all situations                                     | خیلی کوتاه /خیلی کوچک<br>too short / too little                  | کوتاه/باریک<br>short/ narrow                 | منفی<br>negative                               |
| A7                           | عمودی<br>upward                                                   | متوسط<br>middle                   | متوسط<br>middle                              | بلند<br>tall                                        | متوسط<br>middle                           | بزرگ /سبز<br>large / green                         | متوسط /کوچک<br>متوسط<br>middl/ middle low                        | متوسط / باریک<br>middle/ narrow              | منفی<br>negative                               |
| A8                           | عمودی<br>upward                                                   | متوسط<br>middle                   | متوسط<br>middle                              | متوسط و پهن<br>middle & wide                        | کم<br>low                                 | کوچک /قهوه‌ای مایل به سبز<br>small/ green to brown | کوتاه/کوچک<br>short / low                                        | کوتاه/باریک<br>short / narrow                | منفی<br>negative                               |
| A9                           | نرمال<br>normal                                                   | متوسط<br>middle                   | زیاد<br>high                                 | متوسط<br>middle                                     | کم<br>low                                 | متوسط / سبز<br>middle / green                      | متوسط /کوچک<br>middle/ low                                       | متوسط /باریک<br>middle / narrow              | مثبت<br>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 ضد عفونی 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 کاملاً 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 آن می تواند تاثیر متفاوت و قابل توجهی بر میزان عملکرد رشد و نمو گیاهچه تولیدی درون شیشه ای داشته باشد (جدول ۲ و ۶). به عنوان مثال در رقم شکوفه (SH)، در

صورتی که از غلظت ۵۰٪ هیپوکلرید سدیم برای ۱۰ دقیقه در ضد عفونی استفاده شود، تفاوت چشمگیری در میزان پرآوری گیاهچه های بادام در بین ریز نمونه علفی یا خشبی وجود ندارد، در حالی که در همین رقم، در تیمار ضد عفونی با غلظت پایین تر هیپوکلرید سدیم یعنی ۲۵٪ در زمان ۱۵ دقیقه، ریز نمونه خشبی پرآوری بیشتری نسبت به ریز نمونه علفی نشان داده است (جدول ۶). اطلاعات در مورد برهمکنش و تاثیر متقابل بین ژنوتیپ/رقم، شیوه ضد عفونی با هیپوکلرید سدیم و نوع ریز نمونه در سایر ارقام و ژنوتیپ های مورد مطالعه، در جدول ۶ ارائه شده است.

جدول ۶- تاثیر متقابل ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و شیوه ضد عفونی بر درصد شاخه زایی بادام

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

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

### نتیجه گیری کلی

به طور کلی، تاثیر نوع ژنوتیپ یا رقم بادام بر میزان پرآوری در محیط درون شیشه ای و همچنین عادت های رشد رویشی بادام به طور چشمگیری متنوع بود. بین ژنوتیپ ها و ارقام مورد مطالعه در این پژوهش، تنوع چشمگیری در عکس العمل به میزان غلظت هیپوکلرید سدیم مشاهده شد، به طوری که عکس العمل هر ژنوتیپ یا رقم به غلظت و زمان استفاده از هیپوکلرید سدیم منحصر به فرد بود که با اعمال تغییرات در مراحل ضد عفونی و ارزیابی تاثیر آن ها بر عملکرد،

روش های ضد عفونی بهینه مخصوص هر ژنوتیپ یا رقم مشخص شد. همچنین استفاده از ریز نمونه شاخه های مختلف خشبی یا علفی در ژنوتیپ های متفاوت بادام، عادت های رشدی متنوعی به همراه داشت به طوری که یک ریز نمونه مشخص بسته به ژنوتیپ، می توانست باعث کاهش یا افزایش شاخه زایی در نهال های بادام شود. در اکثر ژنوتیپ های مورد مطالعه در این تحقیق ریز نمونه خشبی از درصد شاخه زایی بیش تری نسبت به ریز نمونه علفی برخوردار بود. از طرفی برهمکنش سه عامل رقم/ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و نوع

بهترین نوع ریز نمونه در هر کدام پیشنهاد شده است (جدول ۷). به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که در هر ژنوتیپ/ رقم بر اساس نوع ریزنمونه علفی یا خشبی، استفاده از غلظت نامناسب هیپوکلرید سدیم یا مدت زمان نامناسب برای ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم باعث ایجاد آلودگی یا آسیب جدی به بافت و نتایج نامطلوب کشت درون شیشه ای در بادام می شود.

ضدعفونی (غلظت و زمان تیمار با هیپوکلرید سدیم) به صورت 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 سدیم تاثیر متفاوتی بر پرآوری درون شیشه ای داشت. بر این اساس، مقایسه کامل بین همه فاکتورهای مورد مطالعه موثر بر درصد پرآوری و اثرات متقابل آنها در هر ژنوتیپ یا رقم در جدول ۷ نمایش داده شده است و بهترین شیوه ضدعفونی و

جدول ۷- مقایسه کامل فاکتورهای موثر و تاثیرات متقابل آنها بر پرآوری درون شیشه ای بادام و ارائه بهترین نوع ریزنمونه و شیوه ضدعفونی

در هر ژنوتیپ یا رقم بادام

Table 7- The comparison 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<br>Genotype/Cultivar | اثر متقابل روش ضدعفونی و ژنوتیپ/کولتیوار<br>Interaction: sterilization's method & genotype/cultivar                                                                                      |                                                                                         | اثر متقابل روش ضدعفونی و ریزنمونه و ژنوتیپ/کولتیوار<br>Interaction: sterilization's method & explant & genotype/cultivar |  | بهترین ریزنمونه و روش ضدعفونی<br>best explant & sterilization's method |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------|
|                                      |                                                                                                                                                                                          |                                                                                         |                                                                                                                          |  |                                                                        |
|                                      | هیپوکلرید سدیم (۲۵٪ برای ۱۵ دقیقه) (a)<br>در مقایسه با هیپوکلرید سدیم (۵۰٪ برای ۱۰ دقیقه) (b)<br>sodium hypochloride (25% for 15 min) (a) vs<br>sodium hypochloride (50% for 10 min) (b) | شاخه چوبی (c)<br>در مقایسه با شاخه علفی (d)<br>wooden branch (c) vs<br>green branch (d) | نوع ضدعفونی<br>در مقایسه با نوع ریزنمونه<br>type of Sterile vs<br>type of explant                                        |  |                                                                        |
| A1                                   | a<b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | bc                                                                     |
| A2                                   | a<b                                                                                                                                                                                      | N                                                                                       | (a: c=d=N)<br>(b: c>d)                                                                                                   |  | bc                                                                     |
| A3                                   | a<b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | bc                                                                     |
| A4                                   | a<b                                                                                                                                                                                      | c<d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | ac                                                                     |
| A5                                   | N                                                                                                                                                                                        | c<d                                                                                     | (a: c<d )<br>(b: c=d=N )                                                                                                 |  | ac                                                                     |
| A7                                   | a>b                                                                                                                                                                                      | c<d                                                                                     | (a: c<d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | ad                                                                     |
| A8                                   | a>b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | ac                                                                     |
| A9                                   | a>b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | ac                                                                     |
| SH                                   | a<b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c=d=N )                                                                                                 |  | ac                                                                     |
| F                                    | a>b                                                                                                                                                                                      | c>d                                                                                     | (a: c<d )<br>(b: c<d )                                                                                                   |  | ad                                                                     |
| M                                    | N                                                                                                                                                                                        | c>d                                                                                     | (a: c>d )<br>(b: c>d )                                                                                                   |  | ac                                                                     |

N: neutral OR equal (N: خنثی یا مساوی)

به نظر می رسد بررسی بیش تر در زمینه تاثیر ترکیباتی دیگر مانند نیترا ت نقره و کلرید جیوه جهت ضدعفونی ریزنمونه های گونه های وحشی بادام، نوع ریزنمونه شامل برگ، دمبرگ، جوانه، مریستم و پروتوپلاست در کشت درون شیشه ای بادام در ژنوتیپ های مختلف، استفاده از محیط کشت های مختلف مانند

به نظر می رسد بررسی بیش تر در زمینه تاثیر ترکیباتی دیگر مانند نیترا ت نقره و کلرید جیوه جهت ضدعفونی ریزنمونه های گونه های وحشی بادام، نوع ریزنمونه شامل برگ، دمبرگ، جوانه، مریستم و پروتوپلاست در کشت درون شیشه ای بادام در ژنوتیپ های مختلف، استفاده از محیط کشت های مختلف مانند

## 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., & Omid, 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 Shahrud'. *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., Süzer, V., Tilkat, E., Özden-Tokath, 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]