Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 4, Winter 2022 (977-989)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.277562.1614

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۰ (ص ۹۸۹-۹۷۷)

نشریه پژوهشی:

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف آگار و کربوهیدرات در ریزازدیادی PHL-C، پایه پاکوتاه گیلاس

تکتم شیدایی[۱]، ابراهیم گنجی مقدم[۲*]، شادی عطار[۳] و مرتضی عظیم زاده[٤]

۱ و ٤. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه کشاورزی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

۲. دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۳. دانش‌آموخته دکتری باغبانی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/٤/۱)

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف آگار و کربوهیدرات بر میزان پرآوری پایه پاکوتاه گیلاس (PHL-C) در شرایط درون شیشه‌ای در سال ۱۳۹٦ انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار و هر تکرار شامل سه ریزنمونه انجام شد. فاکتور اول آگار در سه سطح (۰/۵، ۰/٦، ۰/۷ درصد) و فاکتور دوم کربوهیدارت در شش سطح (ساکارز و شکر هر کدام در سه سطح ۲۰، ۳۰، ٤۰ گرم در لیتر) بود که طی مراحل شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری مورد ارزیابی قرار گرفت. از تک جوانه جهت تکثیر استفاده شد. نتایج نشان داد بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر ضریب تکثیر، درصد ریشه‌زایی، کیفیت گیاهچه، وزن تر گیاهچه و درصد بقا تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، ولی در سایر صفات اندازه‌گیری شده آگار با غلظت ۰/۷ بهترین نتیجه را داشت. به جز در صفات طول گیاهچه، تعداد برگ و وزن تر گیاهچه که ساکارز نقش پر رنگ‌تری داشت، در سایر صفات تفاوت معنی‌داری بین شکر و ساکارز دیده نشد. با توجه به اینکه در صفات مهم و اساسی تکثیر درون شیشه‌ای پایه PHL-C شکر دارای تاثیر بهتری بود، پیشنهاد می‌شود جهت کاهش هزینه تولید محیط کشت، خصوصاً در تولید تجاری، از شکر معمولی و یا ترکیب شکر و ساکارز استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، ساکارز، سازگاری.

Evaluation the effect of different concentrations of agar and carbohydrate on the micro-propagation of PHL-C, a dwarf cherry rootstock

Toktam Sheidayie[1], Ebrahim Ganji Moghadam[2*], Shadi Attar[3] and Morteza Azimzadeh[4]
1, 4. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Shirvan Branch, Islamic Azad University North Khorasan, Bojnourd, Iran
2. Associate Professor, Department of Crop and Horticulture Science Research, Khorasan Razavi, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center AREEO, Mashhad, Iran
3. Former Ph.D. Student, Khorasan Razavi, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center AREEO, Mashhad, Iran
(Received: Mar. 11, 2019- Accepted: June. 22, 2019)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of different concentrations of agar and carbohydrate on micro-propagation of dwarf cherry rootstock (PHL-C) under *in-vitro* conditions in 2017 year. This experiment was conducted as factorial in a completely randomized design with six replications and three plantlets in each replication. The first factor was agar in three levels (0.5, 0.6, 0.7%) and the second factor was carbohydrate in six levels (sucrose and sugar each in 3 levels of 20, 30, 40 g / l) and evaluated in proliferation, rooting and adaptation steps. The single node was used for propagation The results showed that there was no significant difference between different agar concentrations in terms of proliferation index, rooting percentage, plantlet quality, plantlet fresh weight and survival percentage, but in other measured traits, agar with concentration of 0.7 % had the best results. Except in the traits plantlet height, leaf number and plantlet fresh weight which the sucrose had a more positive effect, in other traits there was no significant difference between sugar and sucrose. Due to the fact that in the essential traits of *in vitro* propagation of PHL-C, sugar has a better effect, it is suggested to use table sugar or a combination of sugar and sucrose to reduce the cost of producing the culture medium, especially in commercial production.

Keywords: Proliferation index, rooting, sucrose, survival.

* Corresponding author E-mail: e.ganji@areeo.ac.ir; eganji@hotmail.com

مقدمه

گیلاس (*Prunus.avium*) یکی از محصولات باغی مهم مناطق معتدله است که از خانواده Rosaceae، زیر خانواده Prunoideae، زیر جنس Cerasus و جنس *Prunus* است (Ganji moghaddam & Bouzari, 2010). مطابق آمار تولید سازمان جهانی خواروبار در سال ۲۰۱۸، ترکیه، آمریکا و ایران، به ترتیب، سه کشور اول تولید کننده گیلاس هستند (FAO, 2018). امروزه، با توجه به افزایش جمعیت، نیاز به شناسایی ارقام و پایه‌هایی که زودبارده بوده و تولید منظم و با کیفیت داشته باشند، ضروری است. در این میان، PHL-C پایه بسیار مهمی است که برای گیلاس و آلبالو استفاده می‌شود. از ویژگی‌های این پایه می‌توان به استقرار خوب در مراحل رشد، زودباردهی، عملکرد بالا و کیفیت بالای میوه اشاره کرد (Ganji moghaddam & Abdollahzadeh, 2017). PHL-C یکی از پایه‌های پاکوتاه گیلاس بوده که هیبرید بین *P.avium* L. × *P.cerasus* L. است و برای کشت و کار در باغ‌های تجاری با تراکم بالا توصیه می‌شود؛ این پایه با انواع گیلاس سازگار است و به کاهش رشد تا ۸۰٪، در مقایسه با دانهال، منجر می‌شود. PHL-C متحمل به غرقابی، خاک‌های آهکی، *Pseudomonas syringae* و *Agrobacterium tumefaciens* است (Lisek, 2006).

یکی از راه‌های اصلی تکثیر پایه های گیلاس از جمله گیزلا، ماکسما(Ganji moghaddam *et al.*, 2021) و PHL-C کشت درون‌شیشه‌ای است. با بررسی محیط کشت‌های متفاوت و هورمون‌های مختلف در هر مرحله رشد، محققین اذعان داشتند که جهت پرآوری این پایه، محیط ام اس (Murashige & Skoog) حاوی بنزیل آمینو پورین و جهت ریشه‌زایی آن محیط ام اس حاوی اسید ایندول بوتریک توصیه می‌شود (Hoshyar *et al.,* 2016; Mahdavian *et al.*, 2011; Sedlak *et al.*, 2008, Dziedzic & Malodobry, 2006; Erbenova *et al.*, 2001).

لازم به ذکر است، گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای به علت فقدان کلروفیل و حتی در صورت داشتن کلروفیل به علت شرایط نامساعد محیطی (تاریکی و عدم وجود دی‌اکسیدکربن کافی) به صورت هتروتروف رشد می‌کنند و قادر نیستند که فتوسنتز کرده و مقدار کربن مورد نیاز خود را تامین کنند؛ لذا، یک منبع کربن (معمولاً ساکارز) باید به محیط کشت اضافه گردد (Hasandokht & Ebrahimi, 2007; Taji *et al.*, 2004) علاوه بر نقش متابولیکی، ساکارز به عنوان یک اسمولیت نیز عمل می‌کند و همراه با عناصر غذایی معدنی به تعادل پتانسیل اسمزی محیط کشت کمک می‌کند (Khosroshahi & Behnamian, 2007).

آگار نیز معمول‌ترین ماده ژل‌زا است که در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gopal *et al.*, 2008) و تغییر در غلظت آن به علت پتانسیل‌های گوناگون آبی که ایجاد می‌کند، باعث تغییر در رشد گیاهچه‌ها می‌شود؛ غلظت خیلی بالای آن منجر به تنش آب در بافت شده و کشت ریزنمونه روی محیط کشت مایع نیز، می‌تواند باعث شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها شود (Ghashghaie *et al.*, 1992).

به دلیل افزایش قیمت سرسام‌آور مواد اولیه تهیه محیط کشت، خصوصاً آگار و ساکارز، محققین به دنبال مواد یا راهکارهایی برای جایگزینی آن‌ها هستند، به طوری که اختلالی در رشد، تکثیر و ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها نیز صورت نگیرد. جهت جایگزینی ساکارز بهترین گزینه، شکر معمولی است که قیمت آن حدود ۵ درصد قیمت ساکارز است (Asadi *et al.*, 2007). جهت بررسی تاثیر نوع و غلظت کربوهیدرات و همچنین ماده ژل‌زا محیط کشت، مطالعاتی صورت گرفته است به عنوان مثال:

جهت ریزازدیادی پایه گزیلا ۶ (Gisela 6)، بهترین منبع کربن، شکر معمولی یا ساکارز گزارش شد (Zarei *et al.*, 2014). همچنین اشاره شده که سطوح مختلف ساکارز، آگار و اسیدیته بر تکثیر درون‌شیشه‌ای بادام کاملاً وابسته به سن ریزنمونه و مرحله تکثیر است (Gurel & Gulsen, 1998). در پژوهشی دیگر اثر شکر، ساکارز و مانیتول بر رشد گیاهچه‌های موز تحت شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی شد که مانیتول منبع مناسبی نبود و شکر و ساکارز تفاوت معنی‌داری بر اکثر صفات مورد مطالعه نشان ندادند (Placid *et al.*, 2012). در ریزازدیادی گیاهان

آبزی از غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد ساکارز استفاده شد، نتایج نشان داد که غلظت ۱/۵، ۳ ساکارز تفاوت معنی‌داری ندارند، بنابراین جهت کاهش هزینه‌های تهیه محیط کشت می‌توان از غلظت‌های پایین‌تر ساکارز استفاده نمود (Nabipour *et al.*, 2016).

به منظور شناسایی بهترین منبع کربن محیط کشت برای پرآوری و ریشه‌زایی گیاه *Nauclea diderrichii* (یک گونه از خانواده روناسیان)، از قندهای ساکارز، گلوگز، فروکتوز، مانیتول، گالاکتوز، مانوز، مالتوز، لاکتوز، سوربوز و سوربیتول به غلظت ۳ درصد استفاده شد؛ نتایج نشان داد بهترین منبع کربن، ساکارز است که تفاوت معنی‌داری با شکر معمولی ندارد (Rassimwaï *et al.*, 2015). برای تشخیص بهترین نوع و غلظت کربوهیدرات محیط کشت در تکثیر پایه رویشی آلو سنت جولین از گلوگز و ساکارز به صورت جداگانه و ترکیبی استفاده شد، در نهایت بهترین تیمار، ترکیب گلوکز و ساکارز به نسبت ۵۰:۵۰ بود (Ostadsharif *et al.*, 2015). برای تعیین بهترین نوع آگار و کربوهیدرات، جهت ریزازدیادی زیتون، پس از بررسی مواد مختلف در غلظت‌های متفاوت در نهایت فیتاژل و ساکارز، انتخاب شدند (Saeedi *et al.*, 2016). جهت بررسی نوع کربوهیدرات و عامل ژلی بر ریزازدیادی سیب‌زمینی، ساکارز، شکر سفید و شکر قهوه‌ای به غلظت ۳۰ گرم در لیتر و آگار و فیتاژل به ترتیب در غلظت‌های ۷ و ۳/۵ گرم در لیتر در محیط کشت تکثیر سیب‌زمینی به کار رفت، نتایج نشان داد تفاوتی بین منابع کربن به کار رفته وجود ندارد، اما شکر قهوه‌ای به دلیل وجود مواد مفیدی که در فرآیند تولید شکر سفید حذف می‌شود، در بسیاری از صفات بهتر بود؛ ماده ژل‌زا مناسب نیز آگار تشخیص داده شد (Movahedi & moeini, 2018). در پژوهشی مشابه، جهت کاهش هزینه‌های تهیه محیط کشت، اقدام به جایگزینی شکر قهوه‌ای و شکر سفید به جای ساکارز و نشاسته گندم و ذرت به جای آگار شده است؛ نتایج نشان داد، شکر معمولی جایگزین مناسبی برای ساکارز بوده و هزینه تولید محیط کشت را تا ۸۷ درصد پایین می‌آورد، اما کاربرد نشاسته به جای آگار رضایت‌بخش نبود (Asadi *et al.*, 2007). به منظور ارزیابی محیط مناسب تکثیر توت سفید از غلظت‌های مختلف آگار، ساکارز و فروکتوز استفاده شد که در نهایت، غلظت ۰/۶ درصد آگار و ۳ درصد فروکتوز بهترین تیمار بود (Vaez Livari & Dejam, 2001). برای تعیین بهترین غلظت آگار محیط کشت در ریزازدیادی پایه جی اف ۶۷۷ (GF. 677)، از غلظت‌های صفر تا ۱۴ گرم بر لیتر آگار استفاده شد که غلظت ۵ گرم در لیتر آن جهت پرآوری و شاخص‌های رشد، بهترین تیمار بود (Mashayekhi *et al.*, 2016). بهترین غلظت آگار برای محیط پرآوری اکثر پایه‌های درختان میوه ۷ گرم در لیتر گزارش شده است (Hassan & Zayed, 2018).

با توجه به اینکه اکثر مطالعات برای رشد ریزنمونه‌ها در شرایط کشت بافت گیاهی، بر پایه ترکیب محیط کشت، نوع تنظیم کننده‌های رشد و نسبت آن‌ها بوده است، پژوهش حاضر که هدف از آن تعیین غلظت بحرانی آگار برای جذب بهینه عناصر و شناسایی نوع و غلظت منبع کربوهیدرات محیط کشت بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه PHL-C در شرایط درون‌شیشه‌ای و امکان جایگزینی شکر با ساکارز به دلیل کاهش هزینه‌های تولید است، کاملاً لازم و ضروری است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش جوانه‌های رویشی پایه PHL-C از درختان موجود در خزانه مادری پایه‌های رویشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد. این پایه، اولین بار توسط موسسه تحقیقات علوم باغبانی از کشور ایتالیا و در سال ۱۳۸۳ وارد کشور شده و بلافاصله مطالعات سازگاری روی آن انجام شد و در حال حاضر به عنوان یک پایه تجاری برای گیلاس و آلبالو کشت و کار می‌شود.

مرحله ضدعفونی و استقرار

پس از نمونه‌گیری، ریز نمونه‌ها که تک جوانه (Single node) است به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفته و در ادامه برای مراحل استریلیزاسیون به هود لامینار منتقل شده، سپس

یک دقیقه با الکل طبی ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شدند. لازم به ذکر است پس از هر مرحله جهت حذف بقایای ماده ضدعفونی کننده، جوانه‌ها ۳ بار با آب مقطر اتوکلاو شده، شستشو شدند، پس از آن، جهت فعال‌سازی در محیط کشت ام اس (Murashige and Skoog) بدون هورمون، قرارگرفتند. پس از گذشت حدود ۴ هفته در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد، میزان نور ۲۵۰۰-۲۰۰۰ لوکوس و فتوپریود ۱۶ ساعت نمونه‌ها فعال شده و آماده انتقال به محیط پرآوری شدند.

مرحله پرآوری (شاخه‌زایی)

در مرحله پرآوری، گیاهچه‌ها در محیط کشت پایه MS (حاوی یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین) با غلظت‌های مختلف کربوهیدرات در ۶ سطح (ساکارز و شکر خالص خوراکی هر کدام در سه سطح ۲۰، ۳۰، ۴۰ گرم در لیتر) و غلظت آگار در سه سطح (۰/۵ ، ۰/۶ ، ۰/۷ درصد) کشت (۳ عدد در هر شیشه) شدند. از آنجایی که غلظت ایده‌آل آگار برای اکثر گیاهان و محیط‌های کشت، ۶ گرم در لیتر گزارش شده است و اینکه غلظت‌های بیشتر یا کمتر از آن موجب سفت شدن محیط که موجب عدم جذب مواد غذایی و یا شل شدن محیط کشت که باعث شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌شود، لذا غلظت ۰/۵ تا ۰/۷ درصد آگار انتخاب شد. در این مرحله، گیاهچه‌ها سه بار واکشت شده و پس از پایان هر دوره (۳ تا ۴ هفته در اتاق رشد با شرایط ذکرشده در بالا) صفات طول گیاهچه، تعداد برگ و ضریب تکثیر (تعداد شاخه تقسیم بر تعداد ریز نمونه) مورد ارزیابی قرار گرفت(Assareh *et al.*, 2007). ضریب تکثیر صفت مهم و کلیدی در ارزیابی سرعت تکثیر یک گیاه در طول زمان است و به این معنا هست که در هر دوره (حدوداً یک ماهه) از یک ریزنمونه چند ریزنمونه جدید به وجود می‌آید (Assareh *et al.*, 2007).

مرحله ریشه‌زایی

پس از مرحله شاخه‌زایی، گیاهچه‌ها جهت ریشه‌زایی به محیط کشت با ترکیبات ذکر شده در مرحله پرآوری، همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید منتقل (۳ عدد در هر شیشه) شدند. پس از طی چهار هفته در اتاقک رشد، گیاهچه‌ها ریشه‌دار شده و صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، تعداد ریشه و کیفیت گیاهچه (به صورت کیفی و در سه سطح، عالی، متوسط و ضعیف، (Ghamari zare *et al.*, 2007)) محاسبه شد. کیفیت گیاهچه به صورت توصیفی ارزیابی می‌شود که در صورت ایده‌ال بودن گیاهچه و اینکه کاملاً سبز باشد و رشد مناسبی داشته باشد درجه عالی خواهد گرفت، اگر درصدی علائم زردی داشته باشد، متوسط و درصورتی که گیاهچه قابل استفاده نبوده و کاملاً زرد باشد، درجه ضعیف خواهد بود. پس از آن ارزیابی‌ها کد گذاری شده و آنالیز می‌شوند.

صفات وزن تر گیاهچه و وزن خشک گیاهچه نیز به منظور بررسی میزان رویشی در هر تیمار و همچنین میزان آب بافت و ماده خشک گیاهچه توسط ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ برای ۱۰ ریز نمونه از هر تکرار اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است وزن تر در روز تخلیه نمونه‌ها از شیشه و وزن خشک پس از قراردادن در آون ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت محاسبه شد.

مرحله سازگاری

جهت سازگاری و بررسی درصد بقای گیاهچه‌های ریشه‌دار، آن‌ها را به دقت از محیط کشت جدا کرده، مورد شستشو قرار داده و در بستر حاوی کوکوپیت و پرلیت (۵۰:۵۰) که از قبل اتوکلاو شده است، کشت شدند. دمای اتاق سازگاری بین ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد، رطوبت در روزهای اول کشت حدود ۱۰۰ درصد و آهسته آهسته رطوبت به ۶۰ درصد رسانده شد و منبع نوری اتاق سازگاری لامپ‌های مهتابی بودند. در این مرحله، پس از یک ماه درصد بقای گیاهچه‌ها (تعداد گیاهچه‌های سازگار شده، تقسیم بر تعداد کل گیاه‌ها، ضربدر ۱۰۰) مورد بررسی قرار گرفت (Darroudi *et al.*, 2016).

به طور کلی، در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل با دو عامل، به صورت طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار و هر تکرار شامل ۵ نمونه استفاده شد. فاکتور

اول غلظت آگار در سه سطح (۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ درصد) و فاکتور دوم غلظت کربوهیدارت شامل ۶ سطح (ساکارز و شکر هر کدام در سه سطح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر) بود. داده‌های به دست آمده از آزمایشات فوق با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها و جداول با استفاده از نرم‌افزار EXCEL رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل نوع و غلظت کربوهیدرات و درصد آگار برای تمامی صفات، در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد معنی‌دار شده است، لذا تنها نمودارهای اثر متقابل گزارش شده است (جدول ۱ و ۲).

ضریب تکثیر

بر اساس جدول ۱، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت ضریب تکثیر در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شده است. بررسی اثر ساده نشان داد، بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر ضریب تکثیر تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. Gurel & Gulsen (1998) نیز در بررسی اثر غلظت آگار و کربوهیدرات بر ریزازدیادی بادام، بیان کردند غلظت‌های ۰/۵ تا ۰/۸ درصد آگار باعث افزایش ضریب تکثیر شده و به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند. در مقایسه نوع کربوهیدرات، تاثیر شکر بر ضریب تکثیر بیشتر از ساکارز بوده به طوری‌که، غلظت ۴۰ گرم شکر بیشترین تعداد گیاهچه را داشت؛ گزارش شده است با افزایش غلظت شکر، ضریب تکثیر افزایش می‌یابد (Cuenca & Vieitez, 2000). اثر متقابل آگار و کربوهیدارت حاکی از آن است که غلظت ۰/۷ درصد آگار و ۳۰ گرم شکر، بیشترین ضریب تکثیر (۴/۸۵ شاخه) و کمترین (۱/۴۲ شاخه) مربوط به ترکیب آگار ۰/۵ درصد و ساکارز ۲۰ گرم بود (شکل ۱). نتایج بدست آمده در این آزمایش با Zarei *et al.* (2014) مطابقت داشت که بیشترین ضریب تکثیر را در پایه گزیلا ۶ در محیط حاوی ۴۰ گرم در لیتر شکر معمولی (۳/۸۰ شاخه) گزارش دادند. در مطالعه دیگری اثر سطوح مختلف ساکارز و آگار بر تکثیر درون‌شیشه‌ای بادام در سه مرحله آغاز، انتقال و تکثیر بررسی شد؛ در طول مرحله تکثیر، بالاترین میزان تولید شاخه با ۳ و ۴ درصد ساکارز یا شکر و ۰/۷ درصد آگار به دست آمد که کاملاً با نتایج تحقیق حاضر منطبق است (Gurel & Gulsen, 1998).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر آگار و کربوهیدرات بر وزن تر و خشک، تعداد برگ، طول گیاهچه و ضریب تکثیر گیاهچه PHL-C

Table 1. Results of variance analysis effect of agar and carbohydrate on the fresh and dry weight, leaf number, plantlet length and proliferation index of PHL-C.

Source of variation	df	Mean of squares				
		Plantlet dry weight	Plantlet fresh weight	Leaf number	Plantlet length	Proliferation index
Agar	2	0.012*	0.426^{ns}	0.850*	0.344*	2.264^{ns}
Carbohydrae	5	0.008*	0.424*	0.833*	0.288*	5.934**
Agar × carbohydrate	10	0.021*	0.325*	0.402**	0.076*	0.946**
Error	36	0.005	0.257	0.289	0.130	1.202
C.V.		22.8	12.85	28.33	28.23	18.7

** ، * و ns : به ترتیب، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

**, *, ns: Significantly difference at 1 and 5% of probability level, and non-significantly differenc, respectively.

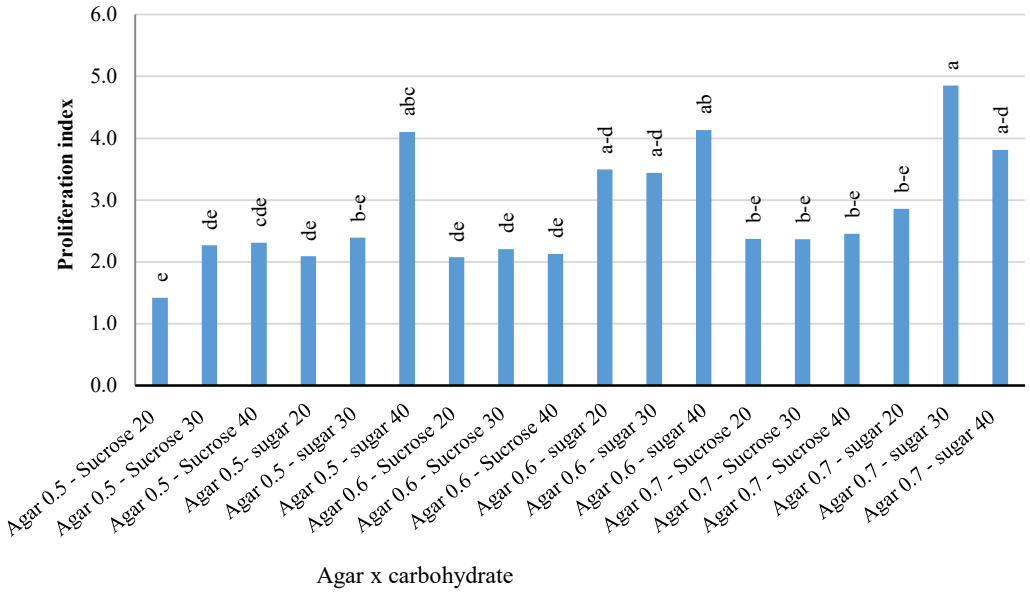
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر آگار و کربوهیدرات بر تعداد و طول ریشه، درصد ریشه زایی، سازگاری و کیفیت، گیاهچه PHL-C.

Table 1. Results of variance analysis effect of agar and carbohydrate on the number and length root, rooting, survival and plantlet quality of PHL-C.

Source of variation	df	Mean of squares				
		Survival	Plantlet quality	Root length	Roots number	Rooting
Agar	2	72.2^{ns}	0.722^{ns}	6.755*	188.74*	169.9^{ns}
Carbohydrae	5	67.3*	1.367*	0.596^{ns}	40.50^{ns}	179.6*
Agar × carbohydate	10	92.2*	0.922*	3.466**	103.49**	100.3*
Error	36	0.634	0.537	1.24	40.13	67.16
C.V.		18.07	28.07	17.36	14.36	29.35

** ، * و ns : به ترتیب، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار

**, *, ns: Significantly difference at 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر ضریب تکثیر گیاهچه PHL-C .

Figure 1. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on proliferation index of plantlet PHL-C.

طول گیاهچه

بر اساس جدول ۱، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت طول گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. با بررسی اثر ساده، بیشترین طول گیاهچه در غلظت ۰/۵ درصد آگار به دست آمد که با غلظت ۰/۶ درصد تفاوت معنی‌داری ندارد. در این صفت، عملکرد ساکارز بهتر از شکر بود. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف آگار و کربوهیدرات نشان داد بیشترین طول گیاهچه (۱/۷۲ سانتی‌متر) مربوط به تیمار آگار ۰/۵ درصد و ساکارز ۲۰ گرم است و کمترین طول گیاهچه مربوط به تیمار آگار ۰/۶ درصد و شکر ۲۰ گرم (۰/۸۸ سانتی‌متر) بود (شکل ۲)؛ که می‌توان این مورد را با تاثیری که ساکارز در راندمان فتوسنتزی دارد و باعث افزایش طول گیاهچه می‌شود، توجیه کرد. گزارش شده است که در صفت طول گیاهچه، ساکارز بهتر از شکر عمل می‌کند که این مورد با یافته‌های این پژوهش تطابق دارد (Zarei *et al.*, 2014). همچنین محققین اذعان داشتند در مرحله تکثیر، غلظت‌های کمتر آگار (تا حدود ۰/۵ درصد)، بیشترین اثر را در افزایش طول شاخه‌ها دارد (Gurel & Gulsen, 1998).

تعداد برگ

بر اساس جدول ۱، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت تعداد برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج نشان داد، بیشترین تعداد برگ در غلظت ۰/۷ درصد آگار به دست آمد. غلظت‌های مختلف ساکارز بیشترین تاثیر را در افزایش تعداد برگ نسبت به شکر داشتند. با بررسی اثر متقابل آگار و کربوهیدرات، بیشترین تعداد برگ در غلظت ۰/۷ درصد آگار و ۳۰ گرم ساکارز (۲/۷۷ عدد) و کمترین آن در غلظت ۰/۵ درصد آگار و ۳۰ گرم شکر (۱/۴ عدد) مشاهده شد (شکل ۳). Santana *et al.* (2011) نیز نقش ساکارز را در افزایش تعداد برگ گیاهچه‌های سیب مرداب موثرتر دانسته‌اند.

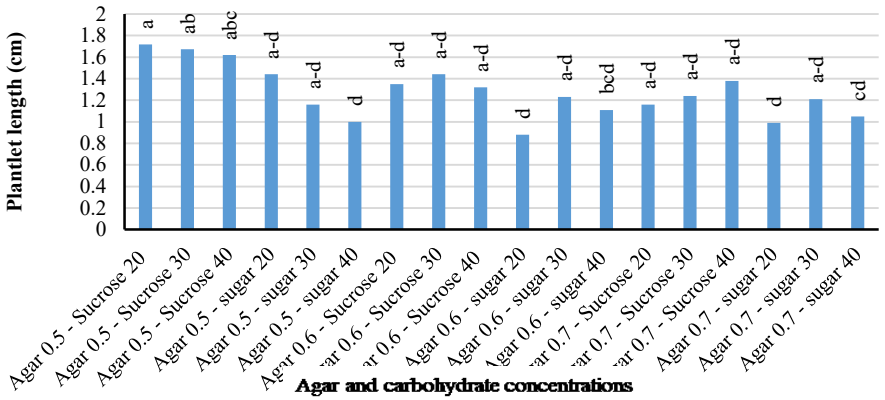
کیفیت گیاهچه ریشه‌دار

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت کیفیت گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. نتایج به دست آمده، حاکی از آن است که بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر کیفیت گیاهچه ریشه‌دار تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در غلظت‌های مختلف کربوهیدارت به جز غلظت ۲۰ گرم ساکارز و ۴۰ گرم شکر که کیفیت ریشه پایینی

داشتند، بقیه تیمارها دارای کیفیت ریشه عالی بوده و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت (شکل ۱۱). همچنین اثر متقابل آگار و کربوهیدرات نشان داد به جز تعداد اندکی، بقیه تیمارها کیفیت ریشه یکسانی داشتند (جدول ۲ و شکل ۴). در پژوهشی، اثر ساکارز و شکر معمولی بر کیفیت گیاه‌های موز مورد ارزیابی قرار گرفت و گزارش شد که تفاوت معنی‌داری بین شکر و ساکارز بر کیفیت گیاهچه وجود ندارد و جهت کاهش هزینه‌ها می‌توان از شکر معمولی استفاده نمود که از این حیث کاملاً منطبق بر یافته‌های پژوهش حاضر است (Placid *et al.*, 2012).

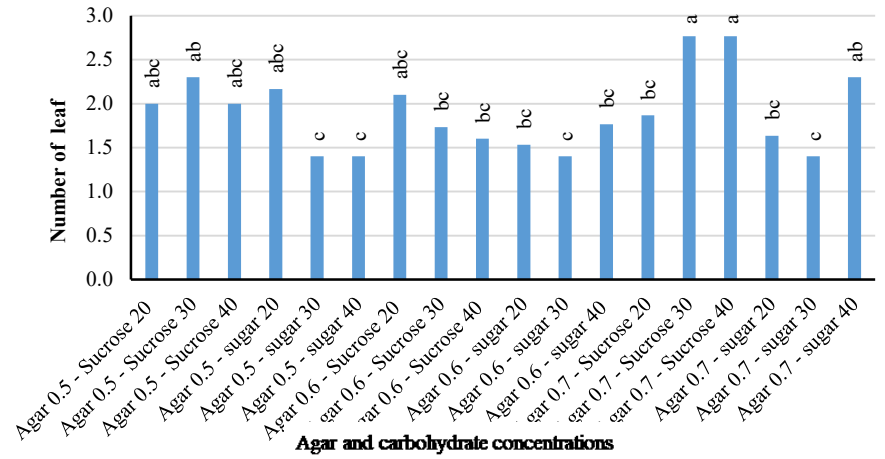
درصد ریشه‌زایی

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. با توجه به نتایج بین غلظت‌های مختلف آگار تفاوتی از نظر درصد ریشه‌زایی مشاهده نشده است. غلظت‌های مختلف ساکارز و شکر تقریبا نتایج مشابهی داشتند، به جز غلظت ۲۰ گرم ساکارز که کمترین درصد ریشه‌زایی را دارا بود. اثر متقابل آگار و کربوهیدرات، نشان داد که کمترین درصد ریشه‌زایی مربوط به آگار ۰/۶ درصد و ساکارز ۲۰ گرم (۳۳/۳۳ درصد) بوده و به جز ترکیب آگار ۰/۵ درصد و ساکارز ۲۰، شکر ۲۰ و شکر ۳۰ گرم همچنین ترکیب آگار ۰/۶ درصد و شکر ۴۰ گرم بقیه تیمارها دارای درصد ریشه‌زایی ۱۰۰ بودند (شکل ۵). محققین با بررسی اثر منابع مختلف کربن بر روی درصد ریشه‌زایی گیاه‌های کاج چتری اذعان داشتند که بین منابع مختلف هیدرات کربن محیط کشت تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Zavattieri *et al.*, 2012).



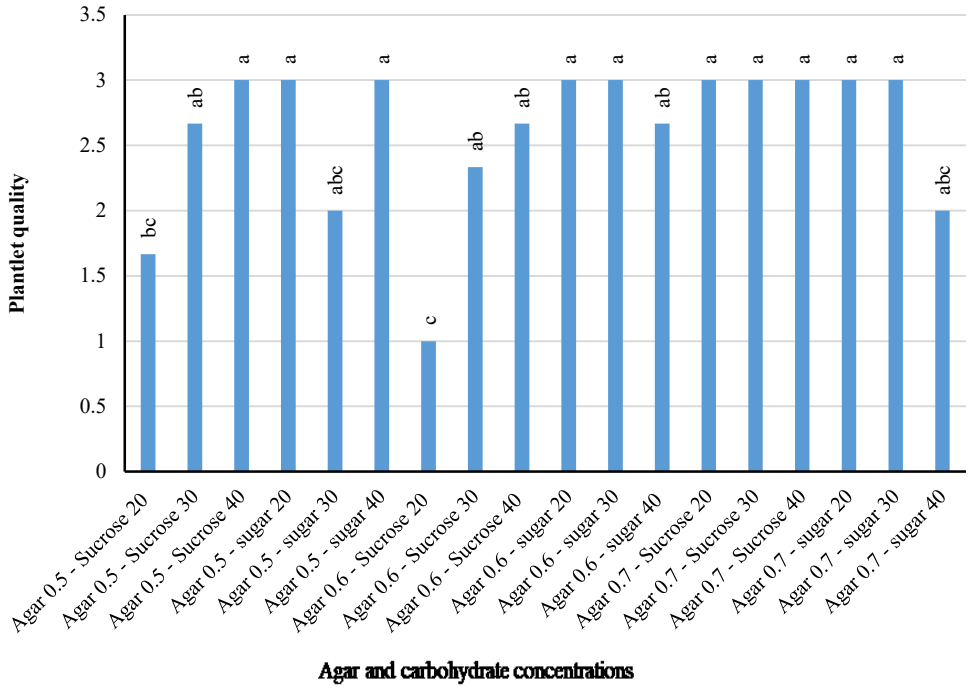
شکل ۲. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر طول گیاهچه PHL-C.

Figure 2. Mean comparison effect agar and carbohydrates on plantlet length of PHL-C.



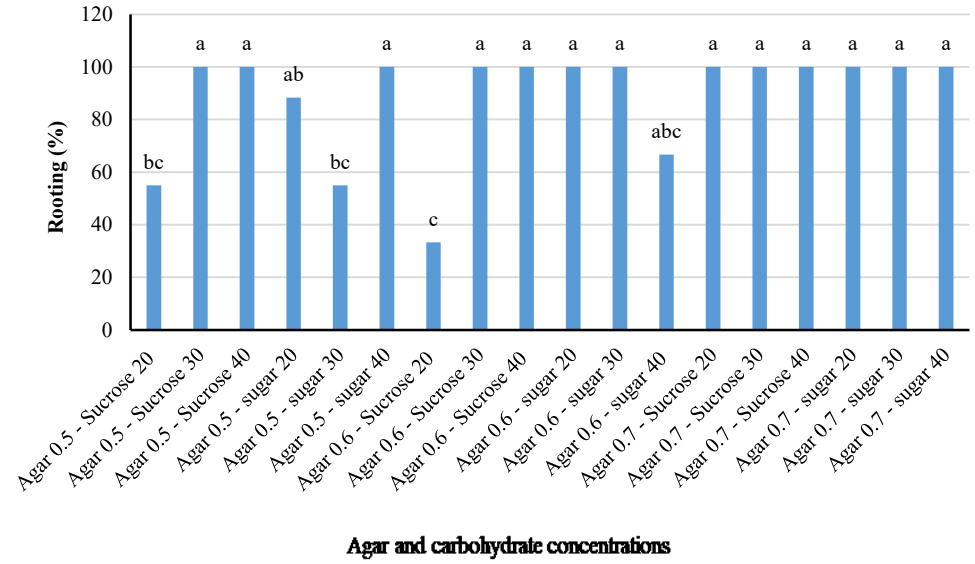
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر تعداد برگ گیاهچه PHL-C.

Figure 3. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on plantlet leaf number of PHL-C.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر کیفیت گیاهچه PHL-C.

Figure 4. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on plantlet quality of PHL-C.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر درصد ریشه زایی گیاهچه PHL-C.

Figure 5. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on rooting percentage of PHL-C.

تعداد ریشه

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت تعداد ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج نشان داد بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۰/۷ درصد آگار مشاهده شده است ولی بین غلظت‌های مختلف کربوهیدرات تفاوتی در تعداد ریشه وجود نداشت. به منظور شناسایی بهترین منبع کربن محیط کشت برای پرآوری و ریشه‌زایی گیاه *Nauclea diderrichii* (یک گونه از خانواده روناسیان)، از قندهای ساکارز، گلوگز، فروکتوز و ... به غلظت ۳

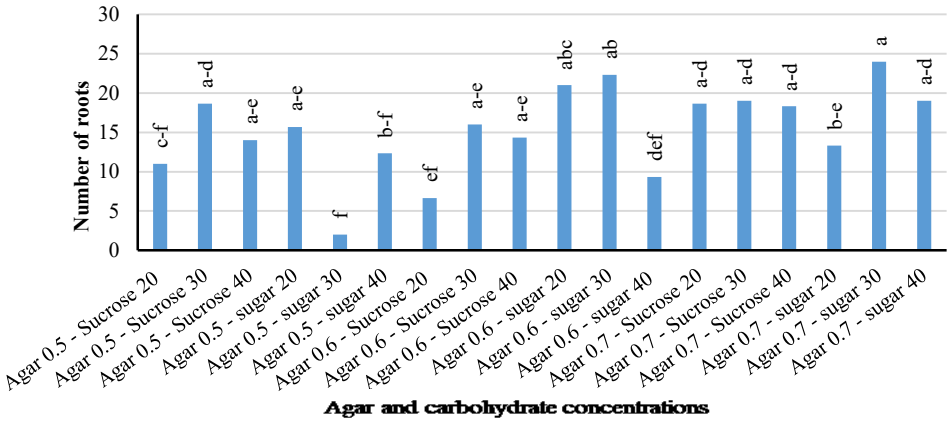
درصد استفاده شد که نتایج نشان داد به لحاظ تعداد ریشه بین منابع مختلف کربوهیدرات مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Rassimwaï *et al.*, 2015). در اثر متقابل آگار و نوع و غلظت کربوهیدرات، بیشترین تعداد ریشه در آگار با غلظت ۰/۷ درصد و شکر با غلظت ۳۰ گرم (۲۴ عدد) مشاهده شد (شکل ۶).

طول ریشه

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج نشان داد بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر طول ریشه، تفاوت وجود دارد؛ بیشترین طول ریشه مربوط به غلظت ۰/۷ درصد آگار بوده ولی بین غلظت‌های مختلف کربوهیدرات از نظر طول ریشه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در اثر متقابل غلظت‌های مختلف آگار و ساکارز بیشترین اندازه طول ریشه در غلظت ۰/۷ درصد آگار و ۲۰ گرم ساکارز (۴ سانتی‌متر) و کمترین (۰/۳۳ سانتی‌متر) در محیط حاوی آگار ۰/۵ درصد و شکر ۳۰ گرم حاصل شد.

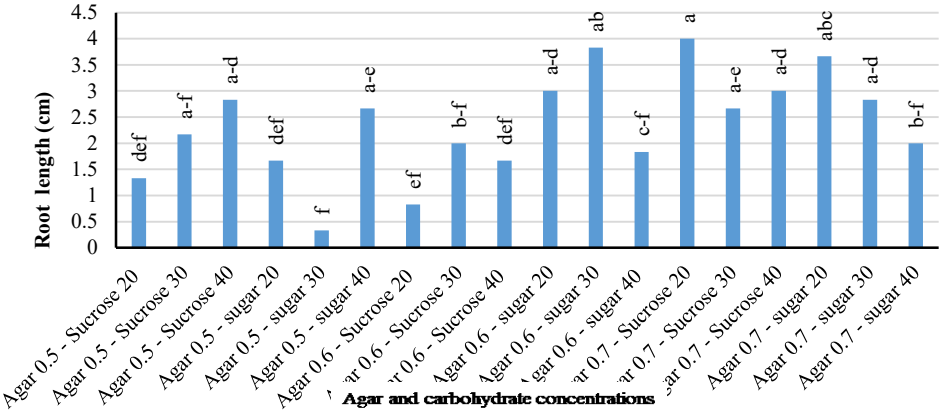
وزن تر گیاهچه

بر اساس جدول ۱، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت وزن تر گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. با توجه به نتایج، بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر وزن تر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف آگار بر تکثیر درون‌شیشه‌ای پایه رویشی GF.677 مشاهده شده که بین غلظت آگار ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ درصد برای اکثر صفات، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Mashayekhi *et al.*, 2016).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر تعداد ریشه گیاهچه PHL-C.

Figure 6. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on root number of PHL-C.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر طول ریشه گیاهچه PHL-C.

Figure 7. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on root length of PHL-C.

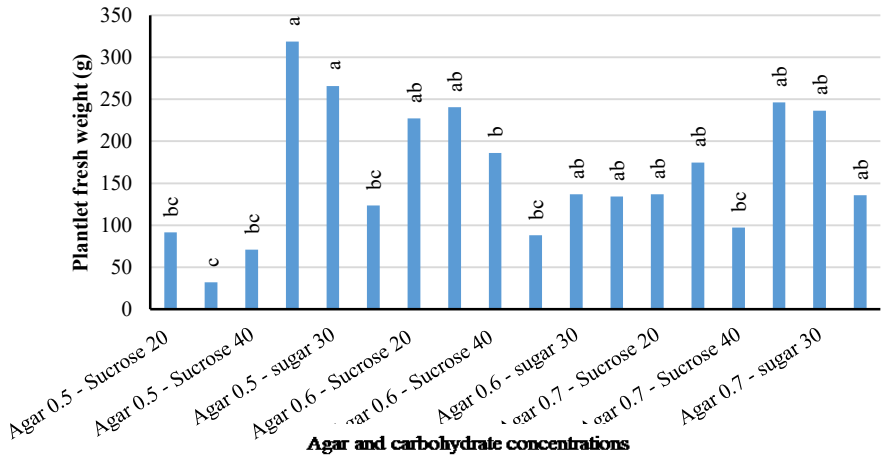
در غلظت‌های مختلف کربوهیدارت، ساکارز دارای وزن تر بیشتری نسبت به شکر بود. اثر متقابل آگار و کربوهیدرات نشان داد، کمترین وزن تر (۳۱/۹ گرم) مربوط به ترکیب آگار ۰/۵ درصد و ساکارز ۳۰ گرم و بیشترین وزن تر (۳۱۸/۸ گرم) مربوط به آگار ۰/۵ درصد و شکر ۲۰ گرم است (شکل ۸). ساکارز نسبت به شکر و مانیتول تاثیر مثبت بیشتری بر وزن تر گیاهچه داشته که می‌توان آن را به حلالیت بالای آن در آب، خنثی بودن آن به لحاظ بار الکتریکی و فقدان اثر بازدارندگی بر فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاهان، مرتبط دانست (Placid *et al.*, 2012).

وزن خشک گیاهچه

بر اساس جدول ۱، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. با توجه به نتایج اثر ساده، آگار با غلظت ۰/۷ درصد و ساکارز با غلظت ۲۰ گرم، میزان وزن خشک بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند. با بررسی اثر غلظت‌های مختلف آگار بر پرآوری سیب‌زمینی مشخص شد که با افزایش غلظت آگار، وزن خشک گیاهچه‌ها نیز افزایش می‌یابد (Gopal *et al.*, 2008). اثر متقابل آگار و کربوهیدرات نشان داد کمترین وزن خشک (۵/۱ گرم) در ترکیب آگار ۰/۵ درصد و ساکارز ۴۰ گرم و بیشترین وزن خشک (۲۰/۳ گرم) در آگار ۰/۵ درصد و شکر ۲۰ گرم است (شکل ۹). با توجه به اینکه رشد در محیط رقیق‌تر باعث افزایش جذب آب و آماس گیاه شده و در نتیجه اندازه گیاه افزایش می‌یابد، ولی وزن خشک آن تغییر کمتری می‌یابد، در عوض رشد در محیط غلیظ‌تر، باعث جذب میزان آب کمتر و ماده خشک بیشتری است.

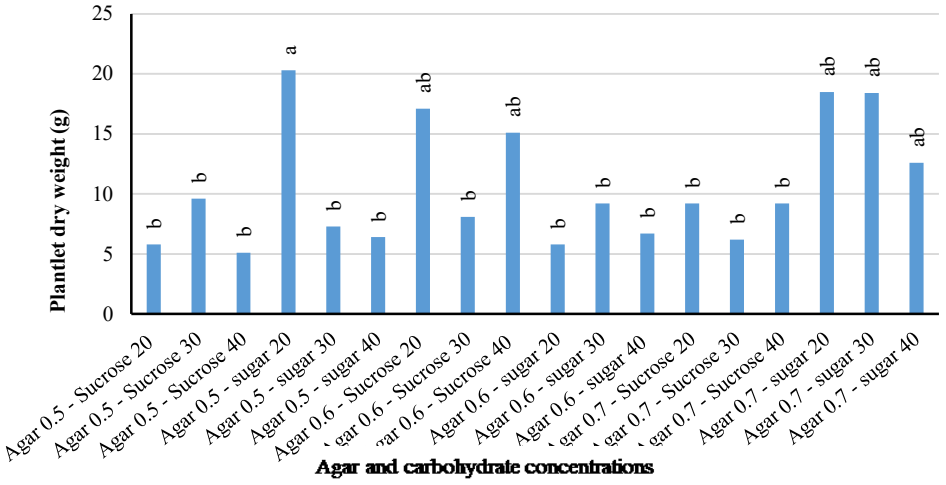
درصد بقا

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل آگار و کربوهیدرات برای صفت درصد بقا در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. با توجه به نتایج، بین غلظت‌های مختلف آگار از نظر درصد بقاء تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در غلظت‌های مختلف کربوهیدارت به جز غلظت ۲۰ گرم ساکارز و ۴۰ گرم شکر که درصد بقای پایینی داشتند، بقیه موارد دارای درصد بقای مشابهی بودند. همچنین اثر متقابل آگار و کربوهیدرات نشان داد به جز تعداد اندکی بقیه تیمارها درصد بقای یکسانی داشتند. اثر متقابل آگار ۰/۶ درصد و ساکارز ۲۰ گرم کمترین درصد بقا را دارا بود (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). در اینجا باید بیان نمود که شرایط گیاهچه داخل شیشه بر روی درصد بقای گیاهچه‌ها بسیار موثر است، مثلاً تیمارهای آگار ۰/۵ و ساکارز ۲۰، آگار ۰/۶ و ساکارز ۲۰ که کیفیت گیاهچه پایین (شکل۴) و درصد ریشه‌زایی پایین (شکل ۵) داشتند، درصد بقای پایینی نیز دارند.



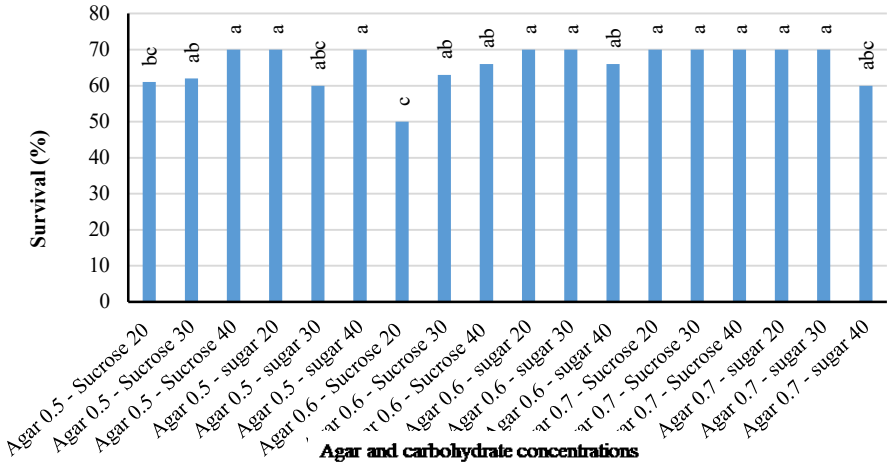
شکل ۸. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر وزن تر گیاهچه PHL-C.

Figure 8. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on plantlet fresh weight of PHL-C.



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر وزن خشک گیاهچه PHL-C .

Figure 9. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on plantlet dry weight of PHL-C.



شکل ۱۰. مقایسه میانگین اثر آگار و کربوهیدرات بر درصد بقای گیاهچه PHL-C .

Figure 10. Mean comparison effect of agar and carbohydrates on plantlet survival of PHL-C.

شکل ۱۱. گیاهچه ریشه‌دار PHL-C ۳۰ روز بعد از کشت در محیط ریشه‌زایی (سمت چپ) و گیاهچه سازگار شده، ۳ ماه بعد (سمت راست).

Figure 11. PHL-C rooted plantlet 30 days after culture in rooting medium (left) adapteted plantlet after 3 month (right).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، آگار با غلظت ۰/۷ درصد بهترین نتیجه را دارا بود که در بیشتر صفات با غلظت ۰/۵ و ۰/۶ درصد تفاوت معنی‌داری نداشت، لذا جهت کاهش هزینه‌ها می‌توان از غلظت‌های پایین‌تر آگار استفاده نمود. از طرف دیگر، با بررسی اثر نوع و غلظت منبع کربوهیدرات محیط کشت مشخص شد که در اکثر صفات تفاوت معنی‌داری بین شکر و ساکارز دیده نشد. همچنین در صفت ضریب تکثیر که در تولید تجاری درون‌شیشه‌ای، صفت مهم و کلیدی به شمار می‌آید، کاربرد شکر عملکرد کاملاً مثبتی را نشان داد. بنابراین با توجه به اینکه در صفات مهم و اساسی تکثیر درون‌شیشه‌ای پایه PHL-C شکر دارای تاثیر بهتری بوده، پیشنهاد می‌شود جهت کاهش هزینه تولید محیط کشت خصوصاً در تولید تجاری، از شکر معمولی و یا ترکیب شکر و ساکارز استفاده شود. می‌توان عنوان نمود، علت تاثیر مثبت شکر نسبت به ساکارز احتمالاً به دلیل ترکیباتی است که در شکر معمولی وجود دارد و در جریان خالص‌سازی آن حذف می‌شود.

REFERENCES

1. Asadi, S.S., Omidi, M., & Davoodi, D. (2007). In vitro micro-tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) using low-cost media substitutes. *Research and Construction Journal*, 71, 94-101. (In Farsi).
2. Assareh, M.H., Ghorbanali, M., Allahverdi Mamaghani, B., Ghamari Zare, A., & Shahrzad, Sh. (2007). Effects of culture media and plant growth regulators on in vitro shoot proliferation of Damask rose (*Rosa damascene* Mill.). *Research and Construction Journal*, 72, 45-57. (In Farsi).
3. Cuenca, B., and Vieitez, A.M. (2000). Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in vitro beech cultures. *Plant Growth Regulation,* 32(1), 1-12.
4. Darroudi, H., Safarnejad, A., Akbarnia, M., Hosseini, S.M., & Hajian Shahri, M. (2016). Effects of mycorrhizal fungi and pseudomonas fluorescens bacteria on the growth and survival of *Ribes Khorasanicum* Saghafi and Assadi tissue culture planlets. *Iranian Journal of Forest and Popular Research*, 25(1), 116-127. (In Farsi).
5. Dziedzic, E., & Malodobry, M. (2006). Vegetative cherry rootstocks in tissue culture. *Lithuanian Institute of Horticulture*, 25(3), 77-84.
6. Erbenova, M., Paprestein, F., & Sedlak, J. (2001). *In vitro* propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry. *Acta Horticulture*, 560(560), 477-480.
7. Food and Agriculture Organization. (2017). *Production statistics.* Retrieved January 12, 2019, from http://www.fao.org/faostat.
8. Ganji moghadam, E., & Abdollahzadeh, A. (2017). *The handbook of fruit trees rootstocks* (2th ed). Agricultural Extension and Education publication. (In Farsi).
9. Ganji moghaddam, E., & Bouzari, N. (2017) *The handbook of sweet cherry*. (3th ed) Agricultural Extension and Education Publication. (In Farsi).
10. Ganji moghaddam, E., Amuzgar, T., Asgharzadeh, A. & Zamanipour, M. (2021). Study of factors affecting on the micropropagation of the MA×MA60 sweet cherry semi-dwarf rootstock. *Iranian Journal of Horticulture Science*, 52(3), 767-777.
11. Ghamari zare, A., Assareh, M.H., Ghorbanali, M., Shahrzad, Sh., & Allahverdi Mamaghani, B. (2007). In vitro culture of two Damask rose genotypes from East and west Azarbayjan province. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14(3), 155-162. (In Farsi).
12. Ghashghaie, J., Brenckmann, F., & Saugier, B. (1992). Water relations and growth of rose plants cultured in vitro under various relative humidity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* 30(1), 51-57.
13. Gopal, J., Iwama, K., & Jitsuyama, Y. (2008). Effect of water stress mediated through agar on in vitro growth of potato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology,* 44(3), 221-228.
14. Gurel, S., & Gulsen, Y. (1998). The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* Shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany,* 22(6), 363-373.
15. Hassandokht, M., & Ebrahimi, R. (2007). *The basics of plant tissue culture*. Marz Danesh Publication. (In Farsi).
16. Hassan, S.A.M., & Zayed, N.S. (2018). Factor controlling micro propagation of fruit trees: A Review. *Science International,* 6(1), 1-10.
17. Hoshyar, Z. (2016). *Effect of medium type, growth regulator concentration on proliferation and rooting under in vitro condition and effect of three species of mycorrhizal fungi acclimatization of PHL-C dwarf cherry rootstock*. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad. Iran .(In Farsi).

18. Khosroshahi, A., & Behnamian, M. (2007) *Plant cell culture*. Tabriz University Publication. (In Farsi).
19. Lisek, A., Korbin, M., & Rozpara, E. (2006). Simple identification of sweet cherry rootstocks PHL using RAPD markers. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*, 25(3), 316-321.
20. Mahdavian, M., Bouzari, N., & Abdollahi, H. (2011). Effects of media and plant growth regulators on micro-propagation of dwarfing cherry rootstock (PHL-A). *Biharean Biologist*, 5(2), 86-90.
21. Mashayekhi, M., Amiri, M.A., & Habibi, F. (2016). Investigating the growth and mineral absorption of GF677 rootstock in response to water potential at different concentrations of agar in plant tissue culture media. *Journal of Plant Production Research*, 22(4), 1-16. (In Farsi).
22. Movahedi, Z., & Moieni, A. (2018). Investigation of the gelling agent, carbohydrate source and culture container on potato micro-propagation (*Solanum tuberosum* L.). *Crop Producrion Journal*, 10(3), 1-15. (In Farsi).
23. Nabipour, M., Farsi, M., & Sharifi, A. (2016). Effect of culture media and different concentrations of sucrose on in vitro culture of aquatic plants, *Cryptocorynr sp*. *In proceeding of First National Congress of Iranian Flowers and Ornamental Plants*. 23-25 Aug. Ferdowsi university of Mashhad. Mashhad. Iran. PP. 250-254. (In Farsi).
24. Ostadsharif, O., Garoosi, G., Haddad, R., & Nezami, E. (2015). Effect of medium, sugar and plant growth regulators on micro-propagation of Saint Julian A (*Prunus domestica* spp. Insititia) rootstock. *Agricultural Biotechnology Journal*, 13(1), 9-18. (in Farsi).
25. Placide, R., Clement, U., Fracoise, U., & Vedaste, A. (2012). Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under in vitro conditions. *Rwanda Journal*, 76(28), 76-83.
26. Rassimwai, P., Vincent, A., & Kouami, K. (2015). Influence of various carbohydrates on the in vitro micro-propagation of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill, an endangered forest species in Togo. *African Journal of Biotechnology*, 14(15), 1283-1289.
27. Saeedi, I., Saadat, Y., & Khaniki, Gh. (2016). The effects of ifferent concentrations of BA, nutrient media, carbohydrate sources and gelling agents on shoot multiplication of olive (*Olea europaea* L. cv Dezful). *Biotechnology in Agriculture*, 14(1), 73-80. (In Farsi).
28. Santana, J., Paiva, R., Souza, A., & Oliveira, L. (2011). Effect of different culture tube caps and concentrations of activated charcoal and sucrose on in vitro growth and budding induction of *Annona Glabra* L. *Science and Agrotechnology*, 35(5), 916-923.
29. Sedlak, J., Paprestein, F., & Erbenova, M. (2008). *In vitro* propagation of the PHL dwarfing sweet cherry rootstocks. *Acta Horticulture*, 795(795), 395-400.
30. Taji, A., Moeini, A., & Kahrizi, D. (2004). Plant tissue culture. Student Basij Organization. (In Farsi).
31. Vaez Livari, B., & Dejam, M. (2001). Effect of agar, carbohydrate and cytokinin concentrations on in vitro culture of Mulberry winter buds Atosobamidori cultivar. *Agriculture Science Journal*, 6(1), 19-28. (In Farsi).
32. Zarei, M., Grosi, GH., Nezami, A., Hosseini, R., & Ahmadi, J. (2014). Effect of culture media, carbon source and light spectrum on proliferation and auxin treatments in rooting on Gisela vegetative rootstock. *Journal of Cell and Tissue*, 4(2), 169-185.
33. Zavattieri, A., Lima, M., Sobral, V., Oliveira, P., & Costa, A. (2012). Effects of carbon source, carbon concentration and culture conditions on *in vitro* rooting of *Pinus pinea* L. Microshoots. *Institute of Agrarian and Environmental Sciences*, 812(19), 173-180.