عوامل مؤثر در ریزازدیادی بادام‌کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.)

سمیه اعزازی[۱]، حسین میرزایی ندوشن[۲*]، میترا امام[۲] و سپیده کلاته جاری[۱]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تحصیلات تکمیلی

[۲] ایران، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۳

چکیده

بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.)، که توزیع گسترده‌ای در مناطق وسیعی از کشور دارد، از ارزش‌های زیست‌محیطی و دارویی برخوردار است که به دلایل مختلف در معرض فرسایش ژنتیکی قرار گرفته و باید احیا شود. تکثیر رویشی پایه‌های برتر از این گونه مستلزم بهینه‌کردن روش‌های مختلف از جمله ریزازدیادی است. در این پژوهش اثر ژنوتیپ‌های مختلف، هورمون‌پاشی قبل از برداشت نمونه از درخت و محیط کشت بر ویژگی‌های مورد نظر در ریزازدیادی، (تعداد جوانه، تعداد شاخساره، طول شاخساره و شادابی نمونه‌ها) مطالعه شدند. بر اساس نتایج حاصل، تاریخ نمونه‌گیری بعد از هورمون‌پاشی و ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر همه صفات مطالعه‌شده اثر معنی‌داری داشتند. بهترین تاریخ نمونه‌گیری برای ریزازدیادی این گونه از نظر تعداد جوانه‌های جانبی تولیدی ده روز بعد از هورمون پاشی بود. ژنوتیپ‌های سه‌گانه از نظر تولید تعداد جوانه متفاوت بودند و واکنش‌های متفاوتی به‌شرایط عمومی ریزازدیادی نشان دادند. از نظر تعداد شاخه تولیدی، برداشت‌های ده روز بعد از هورمون‌پاشی بیشترین تعداد شاخه را تولید کردند. به‌طور کلی می‌توان گفت که پایه‌های مختلف بادام واکنش‌های متفاوتی به ریزازدیادی نشان دادند و ارائه محیط کشت واحدی که برای ژنوتیپ‌های مختلف آثار یکسانی داشته باشد نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد. هورمون‌پاشی قبل از نمونه‌برداری بر روی درختان هدف و در تاریخ مناسب به نوعی می‌تواند این اثر را تعدیل کند. با این حال ژنوتیپ شماره ۱ از نظر تعداد جوانه و طول شاخه نتیجه بهتری داشت و محیط کشت DKW هم از برتری‌های نسبی برخوردار بود.

واژه های کلیدی: بادام کوهی، تکثیر غیر جنسی، تنوع ژنتیکی، ریزازدیادی، تنظیم‌کننده رشد گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۲۸۶ ، پست الکترونیکی: nodoushan2003@yahoo.com

مقدمه

بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.) یا بادامک (از خانواده گل سرخیان، *Rosaceae*) یکی از گونه‌های مهم و فراگیر عرصه‌های طبیعی کشور ماست که در مناطق وسیعی از دامنه‌های کوهستانی و ارتفاعات کشور از جمله در بخش کوهستانی منطقه ایران و تورانی در مرکز، شرق و غرب کشور پراکنش دارد (۲۳). بادام کوهی علاوه بر ارزش زیست‌محیطی، در صنایع دارویی، غذایی و عطرسازی اهمیت دارد. مغز این گونه از بادام به‌دلیل داشتن اسیدهای چرب غیر اشباعی چون اسیداولئیک (حدود ۶۳٪) و اسیدلینولئیک (حدود ۲۴٪) که ارزش غذائی و پایداری اکسایشی مناسبی دارد نیز اهمیت زیادی یافته است (۹). علاوه بر این، از این گونه بدلیل داشتن گل‌های فراوان و خوش‌رنگ می‌توان بعنوان یک گیاه زینتی در منظرسازی هم استفاده کرد (۱۶ و ۳۲). از طرفی، بدلیل ویژگی‌هایی نظیر مقاومت به خشکی، طول عمر بالا و نیز مقاومت فیزیکی بالای چوب و قابلیت رشد در اراضی فقیر، آنها را بعنوان پایه ارقام تجاری بادام معمولی هم توصیه می‌کنند (۱۲ و ۳۲). این گونه در بیش از ۸۰٪ از

مناطق رویشی خشک و نیمه خشک کشور ما قابلیت رویش دارد (۱).

امروزه، در شرایطی که مدیریت و ارائه روش‌های مناسب بمنظور احیای عرصه‌های تخریب شده جنگلی در کانون توجه دستگاه‌های تحقیقاتی و اجرایی قرار گرفته است، استفاده از گونه‌های مقاوم به‌شرایط سخت محیطی، بویژه گونه‌های درختی و درختچه‌ای بومی، مناسب‌ترین گزینه‌ها در تأمین این هدف هستند. در بسیاری از عرصه‌های رویشی جنگلی بدلیل شکل و شدت تخریب اکوسیستم، امکان استفاده از گونه‌های درختی فراهم نیست و استفاده از گونه‌های درختچه‌ای، نظیر گونه‌های مختلف بادام، می‌تواند نقش پیش‌آهنگ را در این عرصه‌ها ایفا کند. بادام کوهی دگرگشن بوده و به‌همین دلیل از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. برغم اهمیت این گونهٔ درختچه‌ای، بدلایل مختلف در برخی از مناطق کشور ما با خطر فرسایش ژنتیکی مواجه شده است. خشکی و خشکسالی یکی از عوامل عمده خشکیدگی تعداد زیادی از پایه‌های بادام کوهی است. بعبارت دیگر بنظر می‌رسد مهمترین عامل در صدماتی که در برخی از عرصه‌های رویشگاهی این گونه به آن وارد شده است به‌سبب کمبود رطوبت و خشکسالی باشد که باید هرچه زودتر برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه تدابیری اندیشیده شود. تکثیر این گونه بطور عمده از طریق بذر است که حاصل آن تفرق و تنوع ژنتیکی بیشتر است. اگرچه در مواردی از تکثیر غیرجنسی و با استفاده از قلمه و پیوندک هم در تکثیر گونه‌های بادام بویژه گونه اهلی آن استفاده می‌شود. گستردگی توزیع طبیعی گونه‌های بادام وحشی بویژه گونه اسکوپاریا در مناطق مختلف با شرایط متفاوت اقلیمی حاکی از آن است که این گونه قابلیت استفاده بعنوان منبع مقاومت به انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی را دارد و می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بادام اهلی بکار گرفته شود (۱۱). تکثیر پایه‌های برتر و ژنوتیپ‌هایی که در شرایط نامناسب مقاومت مناسبی از خود نشان داده‌اند و پایه‌هایی که با سایر معیارها بعنوان پایه‌های برتر بادام کوهی قلمداد می‌شوند و نیز تکثیر رویشی پایه‌هایی که جهت تشکیل باغ بذر انتخاب شده‌اند مستلزم بهینه‌کردن روش‌های مختلف تکثیر رویشی از جمله ریزازدیادی است. ریزازدیادی بادام در گذشته نیز با اهدافی نظیر تثبیت ژنوتیپ در پایه‌های وحشی بادام، مورد توجه برخی از محققین قرار گرفته است (۲). در تکثیر رویشی از طریق ریزازدیادی پایه‌های تلخ و شیرین با استفاده از کشت جوانه و جنین در فصل بهار، امام و همکاران (۱۳۹۲)، محیط کشت DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) به همراه هورمون‌های BA، (Benzyladenine)، TDZ (Thidiazuron) و IBA (Indole-3-Butyric Acid) در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را برای ریزازدیادی تعیین کردند (۲). در تکثیر ژنوتیپ GF677، که بعنوان پایه در بادام اهلی استفاده می‌شود، Kamali و همکاران (۲۰۰۱) بهترین شاخه‌زایی را از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان و در حال رشد درختان بالغ در فصول مختلف در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BA و IBA بترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند (۱۷). در تکثیر رقم Nonpareil از بادام خوراکی محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۷ گرم در لیتر آگار موجب تولید تعداد مناسبی شاخه قابل استفاده به ازای هر جنین کشت شده طی ۲۸ روز پس از کاشت شد. بهترین محیط کشت برای تکثیر شاخه‌ها محیط MS و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و بهترین محیط ریشه‌زایی نیز محیط 1/2MS به همراه ۸ میلی‌گرم در لیتر IAA بود (۱۶).

در یک گونه درختی یا درختچه‌ای ممکن است ژنوتیپ‌های متفاوت واکنش‌های مختلفی به ریزازدیادی نشان دهند. بعبارت دیگر نمی‌توان یک روش ریزازدیادی برای همه ژنوتیپ‌های آن گونه ارائه کرد. دلیل آن هم می‌تواند اثرات متقابلی باشد که بین ژنوتیپ و محیط در

گیاهان وجود دارد و در ریزازدیادی سایر گونه‌های درختی و غیر درختی هم تاکنون گزارش شده است (۱۸ و ۳۰).

با توجه به اینکه تشکیل باغ بذر و ذخیره‌گاه‌های ژنتیکی پایه‌های برتر بادام کوهی جهت تکثیر و نگهداری و در نهایت تولید نهال در دستور کار مسئولین و متولیان امر قرار گرفته است، شناسایی پایه‌های برتر و تکثیر غیر جنسی جهت تثبیت ژنوتیپ آنها اهمیت دارد. به‌همین منظور در این پژوهش، ضمن بررسی امکان ریزازدیادی بادام کوهی، اثر ژنوتیپ، هورمون‌پاشی، محیط کشت و اثرات متقابل بین این عوامل بر فرایند ریزازدیادی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

سه پایه سالم بادام کوهی از باغ گیاهشناسی ملی ایران واقع در عرض جغرافیایی۳۵ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه شرقی در ارتفاع ۱۳۲۰ متری از سطح دریا، در اواخر اسفندماه بعنوان شاهد نمونه‌برداری شد. بلافاصله پس از برداشت نمونه شاهد، درختان مورد نظر با استفاده از محلول ۰/۱ درصد از هورمون IBA هورمون‌پاشی شدند بنحوی که هورمون بصورت کامل شاخه‌های درختان را آغشته کرد. نمونه‌گیری از درختچه‌ها در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ بعد از تیمار هورمون انجام شد. پس از زدودن آلودگی‌های سطحی سرشاخه‌ها با استفاده از مایع ظرفشوئی، برس‌کشی و شستشو با آب معمولی، نمونه‌ها در دوره‌های زمانی مختلف (۵ و ۸ دقیقه) در معرض هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (۱٪ کلر فعال) قرار گرفتند و سپس سه بار با آب‌مقطر سترون شستشو شدند. برای کشت اولیه و استقرار ریزنمونه‌ها، که قطعاتی از شاخه‌های گیاه به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر و دارای دست کم یک جوانه جانبی بود، از محیط کشت DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۶۸ درصد آگار و ترکیب هورمونی IBA، BA و TDZ با مقادیر بترتیب ۰/۰۱، ۰/۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد(جدول ۱) (۸). ریزنمونه‌های سترون شده از هر تیمار در سه تکرار و در هر تکرار در ۴ ویال حاوی محیط کشت سترون کاشته شدند. نمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سی روز بعد از کشت ریزنمونه‌ها، شاخساره‌های مناسب ظاهر شدند که در کشت‌های بعدی جهت پرآوری مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمون پرآوری، از دو محیط کشت DKW و MS (Murashige and Skooge, 1962) به صورت جامد (۱۹) با ترکیب‌های هورمونی متفاوت استفاده شد (۲۹). در ساخت محیط کشت MS همه منابع نیتراتی نصف شدند و محیط کشت‌ها بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در داخل اتوکلاو سترون شدند. با انتقال نمونه‌ها از محیط استقرار به محیط پرآوری، پس از ۶۰ روز تعداد شاخه تولیدی، تعداد جوانه‌های جانبی بر روی شاخه‌ها، میانگین طول شاخه‌ها و شادابی مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس نمونه‌ها به‌محیط ریشه‌زایی منتقل شدند.

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با سه تکرار انجام شد و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نگارش نهم از نرم‌افزار SAS صورت گرفت. میانگین‌های صفات در ژنوتیپ‌ها و محیط‌های کشت با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد دسته‌بندی شدند. از نرم‌افزار Excel جهت رسم نمودارها استفاده شد. برای ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده از محیط کشت DKW به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تاریخ نمونه‌گیری و ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر همه صفات مطالعه شده (تعداد جوانه، تعداد شاخساره تولید شده، طول شاخساره و شادابی نمونه‌ها) اثر معنی‌داری داشتند. اثر محیط کشت نیز بر طول شاخه‌های حاصل از ریزازدیادی در سطح ۵٪

معنی‌دار بود. اثرات متقابل برای تمام صفات مورد مطالعه در سطوح پنج و یک‌درصد معنی‌دار شدند. نتایج بررسی تأثیر تاریخ نمونه‌گیری بر تعداد جوانه‌های جانبی ایجاد شده حاکی از معنی‌دار بودن مدت زمان تیمار هورمونی بر تعداد جوانه‌های ایجاد شده بود (دامنه میانگین‌ها بین ۱/۳۲ تا ۳/۲۲ عدد متغیر بود) به‌طوری که از نظر تعداد جوانه تولیدی، ده روز بعد از هورمون‌پاشی بهترین تاریخ نمونه‌گیری برای ریزازدیادی این گونه تعیین شد. برداشت‌های بعد از هورمون‌پاشی به‌طور معنی‌داری تعداد شاخه بیشتری نسبت به شاهد تولید کردند. در بررسی طول شاخه‌های حاصل مشخص شد که نمونه‌گیری پس از ده روز تیمار با هورمون، بیشترین طول شاخه را موجب شد که البته تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. هورمون‌پاشی تاثیری بر روی شادابی نمونه‌ها نداشت (جدول ۲).

جدول ۱- تیمارهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله پرآوری

هورمون / محیط کشت	BAP (mg.l^{-1})		2iP (mg.l^{-1})		IBA (mg.l^{-1})	TDZ (mg.l^{-1})
	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۱	۰/۰۵
DKW – ۱	–	+	–	–	+	+
DKW – ۲	–	–	–	+	+	+
DKW – ۳	+	–	+	–	+	+
MS – ۴ (با نصف غلظت نیترات)	–	+	–	–	+	+
MS - ۵ (با نصف غلظت نیترات)	–	–	–	+	+	+
MS - ۶ (با نصف غلظت نیترات)	+	–	+	–	+	+

علامت + نشان‌دهنده حضور و – نشان‌دهنده عدم حضور هورمون مورد نظر در محیط کشت است. همه منابع نیتراتی (آمونیم و پتاسیم) در محیط MS نصف شدند.

جدول ۲ – میانگین صفات تعداد جوانه، تعداد شاخه، طول شاخه‌ها و شادابی نمونه‌ها در تاریخ‌های مختلف نمونه‌برداری پس از هورمون‌پاشی در همه سطوح ژنوتیپ‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده در ریزازدیادی بادام کوهی.

تاریخ نمونه‌برداری	تعداد جوانه		تعداد شاخه		طول شاخه (cm)		شادابی برگ (درجات ۱ تا ۴)	
قبل از هورمون‌پاشی (شاهد)	۱/۳۲ d	±۰/۴	۲/۶۴ b	±۱/۰	۱/۸۶ a	±۰/۶	۱/۷۱ a	±۰/۴
۵ روز بعد از هورمون‌پاشی	۲/۵۱ b	±۱/۱	۳/۹۷ a	±۱/۳	۱/۳۹ b	±۰/۶	۱/۸۲ a	±۰/۷
۱۰ روز بعد از هورمون‌پاشی	۳/۲۲ a	±۱/۰	۴/۳۶ a	±۱/۱	۱/۹۶ a	±۱/۲	۱/۸۹ a	±۰/۹
۱۵ روز بعد از هورمون‌پاشی	۱/۹۸ c	±۱/۱	۳/۹۴ a	±۱/۲	۱/۵۸ b	±۰/۶	۱/۸۷ a	±۰/۸

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵٪ است. داده‌های موجود در جدول به طور متوسط میانگین داده‌های حاصل از ۳۸ واحد آزمایشی است و مقادیر انحراف‌معیار با علامت ± نشان داده شده است.

نتایج بررسی اثر ژنوتیپ بر تعداد جوانه‌های جانبی نشان داد که ژنوتیپ‌ها قابلیت متفاوتی در تولید جوانه داشتند. به‌طوری که ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ به مقدار معنی‌داری بیش از ژنوتیپ سوم جوانه جانبی تولید کردند (دامنه تغییرات بین ۱/۷۹ تا ۲/۶۵ قرار داشت). با این حال ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بیش از ژنوتیپ ۱ شاخه تولید کردند (جدول ۳). در مقابل ژنوتیپ ۱ از نظر طول شاخه برتر از دو ژنوتیپ دیگر بود و از نظر شادابی، همراه با ژنوتیپ ۲، در شرایط بهتری از ژنوتیپ ۳ قرار داشتند. میانگین طول شاخه در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها روند منطقی نشان نداد که می‌تواند ناشی عوامل متعددی باشد. از جمله اینکه قسمت‌های مختلف شاخه اولیه مورد نمونه‌گیری، که ممکن است ضخامت متفاوتی هم داشته‌باشند، می‌توانند واکنش متفاوتی به ریزازدیادی از خود نشان دهند و سبب روند غیر منطقی در میانگین‌های صفات در سطوح یک عامل (در اینجا تاریخ نمونه‌گیری) شوند.

اختلاف مشاهده شده در تعداد جوانه‌ها، تعداد شاخه و شادابی برگ در نمونه‌های کشت شده در محیط کشت‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود. ولی طول شاخه در محیط‌های کشت DKW میانگین‌های بالاتری داشت (تا بیشترین مقدار ۱/۹۴ سانتی‌متر) و در محیط‌های کشت MS میانگین‌ها کاهش یافت (تا کمترین مقدار ۱/۴۵ سانتی‌متر) که به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (جدول ۴).

جدول ۳ – میانگین صفات تعداد جوانه، تعداد شاخه، طول شاخه‌ها و شادابی نمونه‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف در همه سطوح تاریخ نمونه‌گیری و محیط کشت‌های مورد استفاده در ریزازدیادی بادام کوهی.

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه	تعداد جوانه		تعداد شاخه		طول شاخه (cm)		شادابی برگ (درجات ۱ تا ۴)	
ژنوتیپ شماره ۱	۲/۶۵ a	±۱/۲	۳/۲۶ b	±۱/۱	۲/۰۷ a	±۱/۰	۱/۹۹ a	±۰/۷
ژنوتیپ شماره ۲	۲/۴۹ a	±۱/۱	۴/۰۲ a	±۱/۰	۱/۴۶ b	±۰/۶	۱/۹۹ a	±۰/۷
ژنوتیپ شماره ۳	۱/۷۹ b	±۱/۰	۴/۰۷ a	±۱/۲	۱/۵۶ b	±۰/۶	۱/۵۹ b	±۰/۶

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵٪ است. داده‌های موجود در جدول به‌طور متوسط میانگین داده‌های حاصل از ۵۰ واحد آزمایشی است و مقادیر انحراف‌معیار با علامت ± نشان داده شده است.

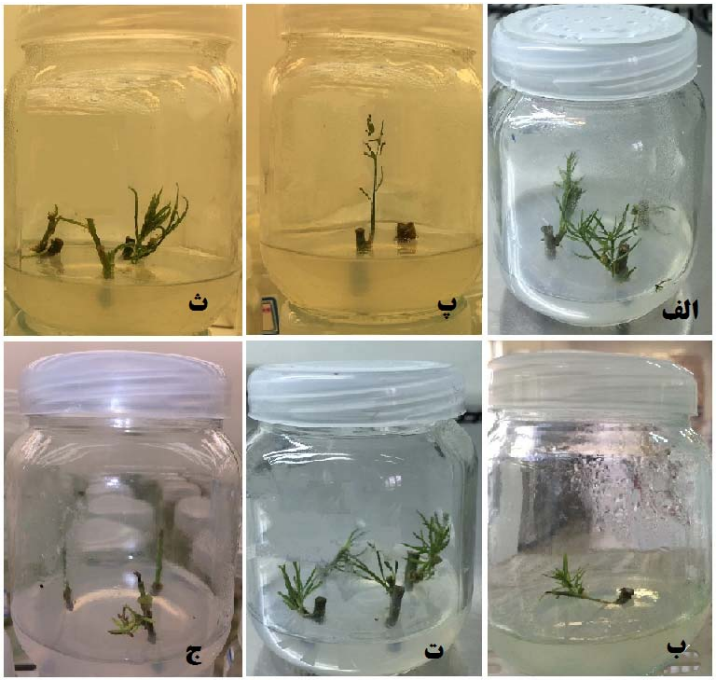
جدول ۴ – میانگین صفات تعداد جوانه، تعداد شاخه‌ها، طول شاخه‌ها و شادابی نمونه‌ها در محیط‌های کشت مورد استفاده در همه سطوح تاریخ نمونه‌گیری و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ریزازدیادی بادام کوهی.

محیط‌های کشت	تعداد جوانه		تعداد شاخه		طول شاخه (cm)		شادابی برگ (درجات ۱ تا ۴)	
DKW	۲/۴۸ a	±۱/۳	۴/۰۶ a	±۱/۲	۱/۹۴ a	±۱/۱	۱/۷۹ a	±۰/۸
DKW	۲/۰۳ a	±۱/۰	۳/۴۲ a	±۰/۹	۱/۷۱ ab	±۰/۷	۱/۶۰ a	±۰/۶
DKW	۲/۱۳ a	±۱/۱	۳/۶۷ a	±۱/۱	۱/۴۹ b	±۰/۵	۱/۷۰ a	±۰/۷
MS (با نصف غلظت نیترات)	۲/۶۰ a	±۱/۲	۳/۹۶ a	±۱/۴	۱/۷۸ ab	±۰/۸	۲/۰۸ a	±۰/۷
MS (با نصف غلظت نیترات)	۲/۰۹ a	±۱/۱	۴/۱۳ a	±۱/۲	۱/۵۶ b	±۰/۸	۲/۰۰ a	±۰/۸
MS (با نصف غلظت نیترات)	۲/۳۶ a	±۱/۳	۳/۵۴ a	±۱/۰	۱/۴۵ b	±۰/۶	۲/۰۹ a	±۰/۹

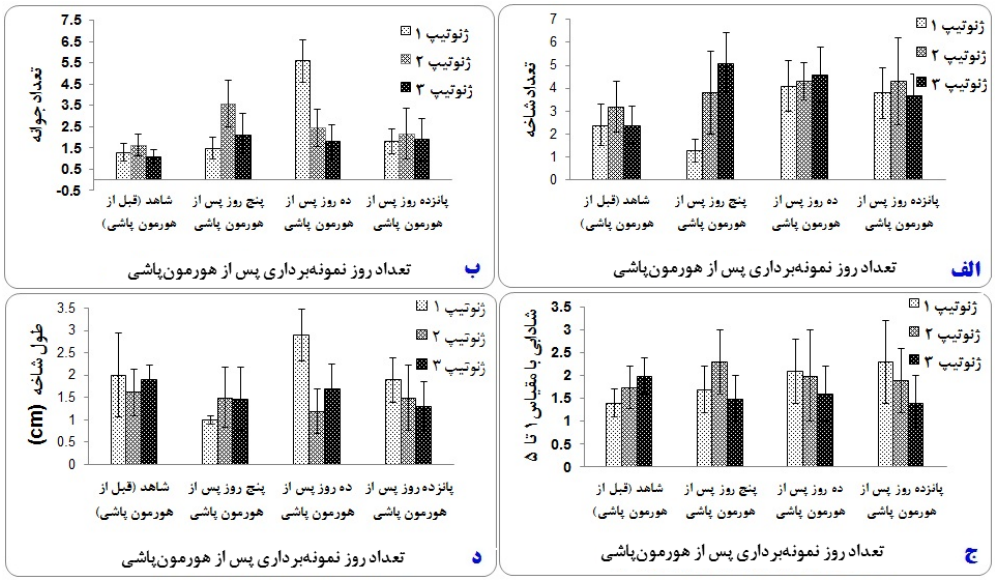
حروف الفبای متفاوت در ستونها حاکی از اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵٪ است. داده‌های موجود در جدول به‌طور متوسط میانگین داده‌های حاصل از ۲۵ واحد آزمایشی است و مقادیر انحراف‌معیار با علامت ± نشان داده شده است.

اثرات متقابل بین تاریخ نمونه‌برداری و محیط کشت‌های مورد استفاده در صفات تعداد جوانه، طول شاخه و شادابی برگ‌ها در سطح یک‌درصد معنی‌دار شدند. اثر متقابل بین ژنوتیپ و محیط کشت هم در تعداد جوانه در سطح یک‌درصد و در بقیه صفات مورد مطالعه در سطح پنج‌درصد معنی‌دار شدند. اثر متقابل ژنوتیپ و تاریخ نمونه‌برداری از درختان، که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، در همه صفات در سطح یک‌درصد معنی‌دار شد. بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و تاریخ نمونه‌برداری نشان داد که بیشترین تعداد شاخه توسط ژنوتیپ شماره ۳ در نمونه‌برداری پنج روز پس از هورمون‌پاشی تولید شد (۵/۱ عدد) در حالی‌که همین ژنوتیپ در نمونه‌برداری در ۱۵ روز پس از هورمون‌پاشی کمترین تعداد شاخه (۳/۷) را در آن سطح هورمون‌پاشی ایجاد کرد (شکل ۲ الف). بهترین تاریخ نمونه‌برداری از نظر تعداد شاخه تولیدی برای ژنوتیپ‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۵ روز پس از هورمون‌پاشی بود. ژنوتیپ ۱ در نمونه‌برداری ۱۰ روز پس از هورمون‌پاشی، بیشترین تعداد جوانه را ایجاد کرد (۵/۶ عدد) که نسبت به سایر تاریخ‌ها و ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌دار داشت. برداشت نمونه از این ژنوتیپ قبل از

هورمون‌پاشی و ۵ روز پس از هورمون‌پاشی، کمترین تعداد جوانه (به ترتیب ۱/۳ و ۱/۵ عدد) را ایجاد کرد (شکل ۲ب). ژنوتیپ‌های ۱ و ۲، از نظر تعداد جوانه، میانگین عمومی بیش از ژنوتیپ ۳ داشتند (جدول ۳).



شکل ۱ – کشت سرشاخه‌های سه ژنوتیپ متفاوت بادام کوهی در محیط کشت DKW پس از ۶۰ روز؛ ژنوتیپ ۱ : الف و ب، ژنوتیپ ۲: پ و ت، ژنوتیپ ۳: ث و ج.



شکل ۲– اثرات متقابل موجود بین تاریخ نمونه‌گیری و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس صفات تعداد شاخه (الف)، تعداد جوانه (ب)، شادابی نمونه‌ها (ج) و طول شاخه‌ها (د) در ریزازدیادی بادام کوهی.

بعبارت دیگر تغییرات میانگین تعداد جوانه‌های حاصل از ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تاریخ‌های مختلف نمونه‌برداری روند ثابتی نداشت. بهترین تیمار هورمونی برای ریزازدیادی این گونه از نظر تولید جوانه جانبی در ژنوتیپ ۱، ۲ و ۳ به ترتیب محیط‌های کشت شماره ۵، ۱ و ۴ بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). از نظر شادابی هم، ژنوتیپ شماره ۱ در نمونه‌برداری ۱۵ روز بعد از هورمون‌پاشی بیشترین شادابی را در نمونه‌های ریزازدیادی شده نشان داد (۲/۳). در حالی‌که در نمونه‌برداری ۵ روز پس از هورمون‌پاشی ژنوتیپ ۲ بیشترین شادابی (۲/۳) را از خود نشان داد (شکل ۲ ج). علاوه بر این، در نمونه‌های برداشت شده ۱۰ و ۱۵ روز پس از هورمون‌پاشی، ژنوتیپ ۱ طول شاخه بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشت. این حالت در نمونه‌برداری ۵ روز پس از هورمون‌پاشی مشاهده نشد (شکل ۲د).

با وجود اثرات متقابل بین عوامل مورد مطالعه در ویژگی‌های بررسی شده، همبستگی مثبت بین ویژگی‌های مذکور مشاهده شد (جدول ۵). بعبارت دیگر، به‌غیر از همبستگی تعداد شاخه با طول شاخه که معنی‌دار نبود، سایر همبستگی‌ها در سطوح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار بودند. همه همبستگی‌های دوگانه مشاهده شده مثبت بود به این مفهوم که افزایش یکی موجب افزایش دیگری شد. بعبارت دیگر اگر نمونه‌ای تعداد جوانه بیشتری تولید کرد، همان نمونه ظرفیت تعداد شاخه، طول شاخه و شادابی بیشتری از خود نشان داد. شکل ۱ ژنوتیپ‌های سه گانه مورد مطالعه بادام را در مرحله پرآوری نشان می‌دهد.

جدول ۵- همبستگی‌های دوگانه بین صفات مورد مطالعه در نمونه‌های ریزازدیادی شده از سه ژنوتیپ مختلف از بادام کوهی.

صفات مورد مطالعه	تعداد جوانه	طول شاخه	شادابی برگ	تعداد شاخه
تعداد جوانه	۱			
طول شاخه	۰/۴۴**	۱		
شادابی برگ	۰/۳۵**	۰/۱۹*	۱	
تعداد شاخه	۰/۲۸**	۰/۰۵ns	۰/۲۰**	۱

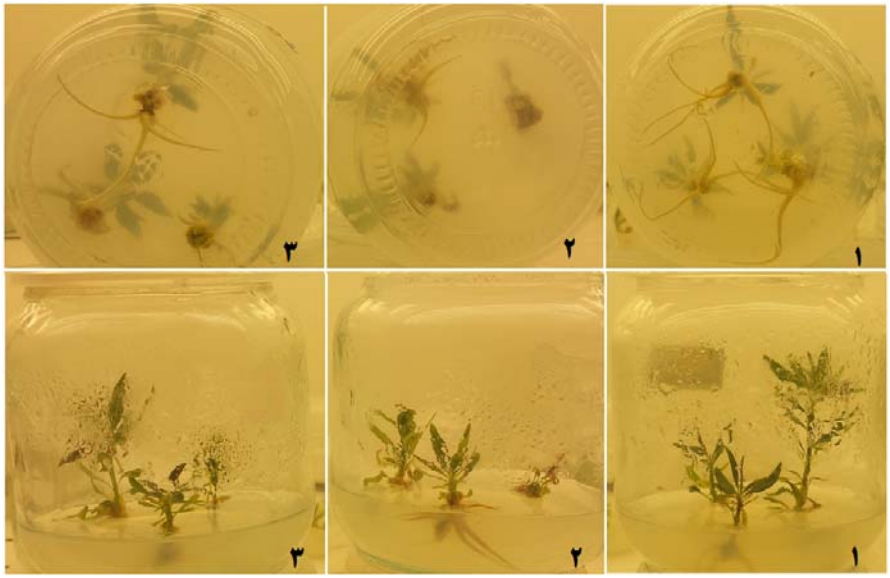
** و * : همبستگی معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد، ns: همبستگی غیر معنی‌دار

در آزمایش ریشه‌زایی اگرچه بر اساس تجربیات دیگران (۲) از یک محیط کشت استفاده شد ولی در این محیط کشت ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت آشکاری در ریشه‌زایی از خود نشان دادند. به طوریکه متوسط طول ریشه‌های تولید شده در ژنوتیپ شماره یک ۲/۵ سانتی‌متر بود در حالی‌که این عدد در ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۳ به ترتیب ۱/۲۵ و ۱/۶ سانتی‌متر محاسبه شد. این تفاوت در استقرار ژنوتیپ‌ها در محیط کشت و در شرایط گلخانه نیز قابل مشاهده بود (شکل های۳ و ۴).

بحث

استفاده از ریزازدیادی در تکثیر رویشی گونه‌های جنگلی و استفاده از ژنوتیپ‌های مناسب از یک گونه برای تولید تعداد زیادی نهال، مورد توجه فراوان قرار گرفته است تا هم ژنوتیپ مطلوب تثبیت شود و هم اهدافی چون تشکیل باغ بذر با استفاده از ژنوتیپ‌های منتخب محقق گردد. بیشتر تجربیات در این زمینه مبتنی بر بهینه‌کردن محیط کشت برای تکثیر یک ژنوتیپ یا رقم خاص از یک گونه جنگلی است و بیشترین تأکید هم بر تنظیم املاح معدنی، هورمونها و ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت بوده است. در کنار این عوامل، عوامل دیگری نظیر هورمون‌های درونی که بشدت تحت تأثیر عوامل بیرونی نظیر نور و دمای محیط هستند در ریزازدیادی تأثیر دارند (۳، ۶، ۱۴، ۲۶ و ۲۷). نور و هورمون‌های درونی در گیاهان نقش مهمی را در رشد و نمو (۲۸) و تقسیم سلولی در مریستم

انتهایی (۲۹) گیاهان ایفا می‌کنند. در هر فصلی از سال، سطح هورمون‌های درونی گیاهان متفاوت است و به‌همین دلیل نمونه‌هایی که در فصل‌های متفاوت از درختان جنگلی گرفته می‌شوند واکنش متفاوتی به ریزازدیادی نشان می‌دهند (۲۵). ولی اینکه با استفاده از هورمون‌پاشی بر روی گیاه بتوان سطح هورمون‌های درونی گیاه را در هر فصلی از سال به‌نحوی تنظیم‌کرد که پاسخ دلخواه را به ریزازدیادی بدهد موضوعی است که تا کنون کمتر به آن پرداخته شده است.



شکل ۳–تفاوت بین ژنوتیپ‌های مختلف بادام کوهی از نظر تعداد و طول ریشه تولید شده. شماره‌های درج شده در شکل نشان‌دهنده شماره ژنوتیپ‌ها هستند

شکل ۴- مرحله استقرار نمونه‌ها در گلدان و در شرایط گلخانه (ژنوتیپ شماره ۱).

تنوع ژنتیکی در گونه‌های جنگلی به‌وفور وجود دارد و انتظار می‌رود که به‌نژادگران از این تنوع استفاده بهینه کنند. برای استفاده از بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach) بعنوان پایه در توسعه بادام اهلی، ضمن شناسایی بهترین پایه‌های ممکن، بهترین روش تکثیر و محیط کشت نیز باید مورد استفاده قرار گیرد. این پژوهش، اثر هورمون‌پاشی قبل از نمونه‌گیری از درختان بالغ، تفاوت موجود بین سه پایه انتخابی از این گونه را در پاسخ به دو نوع محیط کشت DKW و MS با چند ترکیب هورمونی متفاوت جهت ریزازدیادی بادام کوهی آشکار کرد. در ضمن با توجه به این‌که در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در گونه‌های گیاهی ثابت شده است که هورمون‌هایی چون BA و TDZ سبب افزایش تعداد شاخه و رشد طول آن می‌شوند (۴) از این دو هورمون به‌صورت ثابت در شش ترکیب هورمونی محیط کشت استفاده شد.

لازم بذکر است که در تکثیر رویشی گونه‌های جنگلی از طریق ریزازدیادی همیشه این نگرانی وجود داشته است که تنوع ژنتیکی گونه‌ای که تکثیر می‌شود کاهش یابد و

ریزازدیادی سبب یکنواختی درون جمعیت‌ها و کلنی‌های تولیدی شود (۵ و ۳۱). از این رو در صورتیکه از این روش تکثیر در تولید نهال هم استفاده می‌شود باید تعداد زیادی ژنوتیپ تکثیر شوند تا تنوع ژنتیکی در حد مطلوبی باقی بماند. در باغ بذر گونه‌های جنگلی، تعداد زیادی ژنوتیپ مطلوب انتخاب شده و با ریزازدیادی یا روش‌های رویشی دیگر نظیر قلمه و پیوند، به باغ بذر منتقل می‌شوند. از این رو در تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب، باید از روشی استفاده شود که خاص یک ژنوتیپ نبوده و بتواند در تکثیر تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های همان گونه مورد استفاده قرار گیرد.

ژنوتیپ‌های مطالعه شده، در همه صفات مورد بررسی (تعداد جوانه، تعداد شاخه، طول شاخه و شادابی) پاسخ متفاوتی نشان دادند. تفاوت بین ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به ریزازدیادی در سایر گونه‌های درختی و درختچه‌ای نیز گزارش شده است (۷ و ۲۲). بعنوان نمونه در مطالعاتی که Xing و همکاران (۲۰۱۰) بر روی چندین ژنوتیپ گونه‌ای از رز (*Rosa rugosa*) انجام دادند تفاوت‌های معنی‌داری از نظر ضریب تکثیر، ارتفاع شاخه‌های تولیدی و شاخص رشد بین ژنوتیپ‌های مختلف از این گونه در واکنش به ریزازدیادی مشاهده شد (۳۰). همینطور در پژوهش انجام شده توسط Rutledge و Douglas (۱۹۸۸)، 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 (۲۱). تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به تکثیر از طریق ریزازدیادی در گونه‌ای از پالونیا (*Paulownia fortunei*) که یک گونهٔ درختی سریع‌الرشد جنگلی است هم گزارش شده است (۲۴).

اثر سن نمونه گیاهی مورد استفاده نیز ژنوتیپ به‌ژنوتیپ متفاوت است. با توجه به اینکه عوامل محیطی از جمله دما و شدت تابش نور خورشید بر گیاه بالغ در طول روز می‌توانند در تعیین سطح هورمون‌های درونی گیاه تاثیر بگذارند، در انتخاب پایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش بسیاری از عوامل محیطی ثابت گرفته شد تا اثر عوامل محیطی تا جای ممکن حذف شوند. از این رو درختان مورد مطالعه، هم‌سن و در یک شیب یکسان عرصه با جهت ثابت انتخاب شدند تا تنها اثر ژنوتیپ‌های مختلف در بروز عوامل درونی مؤثر بر ریزازدیادی تعیین‌کننده باشند. از این‌رو اثر ژنوتیپ بر ویژگی‌های مورد مطالعه بصورت بارز قابل مشاهده بود. ثابت شده است که توفیق در تکثیر از طریق روش‌هایی چون ریزازدیادی به کنترل ریخت‌زایی بستگی دارد که خود تحت تأثیر چندین عامل از جمله عقبه ژنتیکی نمونه، نوع بافت مورد استفاده، ترکیب مواد غذایی محیط کشت، هورمون‌های تنظیم کننده رشد و شرایط محیطی می‌باشد (۱۰، ۲۰ و ۲۴). از این رو با وجود عوامل متعددی که در رشد و توسعه این گونه گیاهی مؤثرند شاید ارائه یک روش واحد جهت تکثیر این گونه ممکن نباشد. از طرفی این گونه از انعطاف‌پذیری خوبی برخوردار است بطوری که با توجه به‌شرایط رویشگاهی خود را تطبیق می‌دهد. بعنوان مثال این گونه در شیب‌های شمالی و دره‌ها و مناطقی که از نور کمتری برخوردارند با گسترش تاج خود سعی در جذب نور بیشتری دارد (۱۳). در مناطقی که میزان نور و رطوبت کمتری وجود دارد و یا وزش بادهای شدید وجود دارد و کم عمق بودن خاک و نظایر آن محیط را نامساعد می‌کند با کاهش تعداد درخت در واحد سطح خود را تطبیق می‌دهد (۱۵). این انعطاف‌پذیری می‌تواند در ویژگی‌های مورد مطالعه در ریزازدیادی نیز مشاهده شود. به همین دلیل تنوع در پاسخ به ریزازدیادی و اثرات متقابل مشاهده شده مورد انتظار بود. اگرچه در این پژوهش محیط‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف مورد آزمون قرار گرفتند ولی توصیه می‌شود جهت رفع آلودگی‌های درون‌زاد که در برخی از نمونه‌ها در این پژوهش آشکار شدند نیز مطالعات تکمیلی صورت گیرد.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان تاکید کرد که ژنوتیپ‌های مختلف بادام کوهی واکنش‌های متفاوتی به محیط کشت مورد استفاده در ریزازدیادی از خود نشان می‌دهند. از این رو توصیه می‌شود اگر ژنوتیپی از بادام کوهی به عنوان پایه برای بادام اهلی انتخاب شد، در صورت نیاز به ریزازدیادی، از یک محیط کشت اختصاصی که بهترین نتیجه را داشته باشد برای تکثیر آن ژنوتیپ استفاده شود. در ضمن هورمون‌پاشی قبل از نمونه‌برداری برای ریزازدیادی نیز سبب افزایش تعداد جوانه و تعداد شاخساره‌های حاصل از ریزازدیادی می‌شود و به‌دلیل وجود اثرات متقابل، بهترین تاریخ نمونه‌برداری بعد از هورمون‌پاشی هم بسته به ژنوتیپ متفاوت است.

تشکر و سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که امکانات انجام این پژوهش را در اختیار گذاشتند کمال تشکر را داریم. همینطور از رئیس و همکاران محترم گروه زیست‌فن‌آوری این مؤسسه، بویژه از سرکار خانم مهندس میرجانی و سرکار خانم مهرآبادی، که از هیچ کمکی دریغ نکردند بسیار سپاسگزاریم.

منابع

۱. الوانی‌نژاد، س.، ۱۳۷۸. بررسی عوامل مؤثر بر پراکنش گونه بادام کوهی(*Amygdalus scoparia*) در دو منطقه مختلف استان فارس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

۲. امام، م.، قمری زارع، ع.، اسدی‌کرم، ف.، و لوکی انارکی، ک.، ۱۳۹۲. ریزازدیادی بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۱: ۷۷-۸۶.

۳. امام، م.، قمری زارع، ع.، میرجانی، ل.، و شریعت، آ.، ۱۳۹۴. بررسی مقایسه‌ای ریزازدیادی به شیوه شبه فتواتوتروفیک و فتواتوتروفیک گیاه تیس (*Sorbus aucopa* L.). مجله پژوهشهای گیاهی، ۲۸: ۲۳۵-۲۴۲.

۴. پیوندی، م.، کاظمی، ل.، و مجد، ا.، ۱۳۹۴. تأثیر سیتوکنین‌های مختلف بر ریزازدیادی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula vera*). مجله پژوهشهای گیاهی، ۲۸: ۲۵۷-۲۶۳.

5. Bengtsson, B.O., 2003. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. Journal of Evolutionary Biology, 16: 189-199.

6. Carnes, M.G. and Wright, M.S., 1988. Endogenous hormone levels of immature corn kernels of A188, Missouri-17 and Dekalb XL-12. Plant Science, 57: 195-203.

7. Douglas, G.B., McIvor, I.R. and Lioyd-West, C.M., 2016. Early root development of field-grown poplar: effects of planting material and genotype. New Zealand Journal of Forestry Science, 46: 1-14.

8. Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut *Juglans hindsii* x *Juglans regia* rootstock. HortScience, 19: 507-509.

9. Farhoosh, R. and Tavakoli, J., 2008. Physicochemical properties of kernel oil from *Amygdalus scoparia* growing wild in Iran. Journal of Food Lipids, 15:433-443.

10. Giri, C.C., Shyamkumar, B. and Anjaneyulu, C., 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees, 18: 115–135.

11. Gradziel, T.M., Martinez-Gómez, P., Dicenta, F. and Kester, D.E., 2001. The utilization of *Prunus* species for almond variety improvement. Journal of American Pomology Society, 55:100-108.

12. Grasselly, C., 1990. Almond production and industry in Europe, North Africa and the Middle East. In: Nut Production and Industry in Europe, Near East and North Africa. FAO, REUR Technical Series, 13: 95-105.

13. Hardtle, W., Oheimb, G.V. and Westphal, Ch., 2003. The effects of light and soil conditions on the species richness of the ground vegetation of deciduous forests in northern Germany (Schleswig- Holstein). Forest Ecology and Management, 182: 327-338.

14. Hess, J.R. and Carman, J.G., 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: Genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Science, 38: 249-253.

15. Hokkanen, P.J., 2006. Environmental patterns and gradients in the vascular plants and bryophytes of eastern Fennoscandian herb rich forests. Forest Ecology and Management, 229:73 - 87.

16. Isikalan, C., Adyaman Akbas, F., Naml, S., Tilkat, E. and Basaran, D., 2008. *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). African Journal of Biotechnology, 7: 1875-1880.

17. Kamali, K., Majidi, E. and Zarghami, R., 2001. Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of GF677 (Hybrid of almond x peach) rootstocks. Journal of Seed and Seedling, 17: 234-243.

18. Mohebodini, M., Jalali Javaran, M., Mahboudi, F. and Alizadeh, H., 2011. Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Australian Journal of Crop Science, 5: 92-95.

19. Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.

20. Ozaslan, M., Can, C. and Aytekin, T., 2005. Effect of explant source on *in vitro* propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 19: 20–26.

21. Rutledge, C.B. and Douglas, G.C., 1988. Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar *In vitro*. Physiologia Plantarum, 72: 367-373.

22. Schwaegerle, K.E., 2005. Quantitative genetic analysis of plant growth: biases arising from vegetative propagation. Evolution, 6: 1259-67.

23. Sedaghat, N. and Pazhouhanmehr, S., 2014. The evaluation of the quality properties of kernel oil from *Amygdalus scoparia* growing wild in Iran under different storage conditions and packaging. Journal of Food Science and Technology, 43: 11-23.

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

25. Sulusoglu, M., 2012. Development of a rooted cutting propagation method for selected *Arbutus unedo* L. types and seasonal variation in rooting capacity. Journal of Agricultural Science, 4: 216-225.

26. Suzuki, R.M. and Kerbauy, G.B., 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Brazilian Journal of Plant Physiology, 18: 359-365.

27. Suzuki, R.M., Kerbauy, G.B. and Zaffari, G.R., 2004. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. Journal of Plant Physiology, 161:929-935.

28. Symons, G.M. and Reid, J.B., 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. Planta, 216:422-431.

29. Von Arnim, A. and Deng, X.W., 1996. Light control of seedling development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47:215-243.

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

31. Yildirim, H., Akdemir, H., Suzerer, V., Ozden, Y. and Onay, A., 2013. *In vitro* micrografting of the almond cultivars texas, Ferrastar and Nonpareil. Biotechnology and Biotechnology, 27: 3493-3501.

32. Yucedag, C. and Gultekin, H.C., 2011. Effects of cold stratification and sowing time on germination of almond (*Amygdalus communis* L.) and wild almond (*Amygdalus orientalis* L.) seeds. African Journal of Agricultural Research, 6: 3522-3525.

Effective factors on micropropagation of wild almond (*Amygdalus scoparia* Spach)

Ezazi S.[1], Mirzaie-Nodoushan H.[2], Emam M.[2] and Kalatehjari S.[1]

[1] Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran

[2] Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R. Iran

Abstract

Wild almond (*Amygdalus scoparia* Spach.), with a wide distribution in Iran, is a medicinally and ecologically important plant species. The species is exposure to genetic erosion, so it should be considered for reclamation. Vegetative propagation of selected trees depends on optimization of various methods such as micropropagation. In this study, effects of different genotypes, culture medium and application of plant growth regulators on micropropagation characteristics (number of buds and shoots, shoot length and leaf freshness) of *A. scoparia* were investigated. Results showed that sampling date and different genotypes had significant effects on all characteristics studied. The best sampling date for the highest shoot and lateral axillary bud production was 10 days after application of the plant growth regulator. Different genotypes significantly varied in axillary bud production. As an overall conclusion, different stands of wild almond responded differently to micropropagation. Therefore, presenting a unique culturing medium with similar effects on different genotypes needs more investigation. Application of plant growth regulators on target plants before sampling could alleviates the problem. However, genotype number one was relatively better based on number of buds and shoot length. DKW culturing medium was better than MS medium for propagation of wild almond.

Key words: *Amygdalus scoparia*, Asexual propagation, Genetic variation, Micropropagation, Plant growth regulator.