Archive of SID

Plant Prod., 43(2) (2020) 309-322
DOI: 10.22055/ppd.2019.27232.1655

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

Effect of Medium, Iron-Chelating Agent and Plant Growth Regulator on Micropropagation of Pomegranate (*Punica granatum* L.)

Tayyabeh Eshaghi Sanayi[1], Mohammad Zare Mehrjerdi[2]* and Ahmad Sharifi[3]

1- M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran
2- ***Corresponding Author:** Assistant Professors, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran (mzarem1381@yahoo.com)
3- Assistant Professors, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research, Razavi Khorasan Province, Mashhad, Iran

Received: 4 October, 2018 Accepted: 6 March, 2019

Abstract

Background and Objectives

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit tree that originated from Iran and has been cultivated since ancient times. Classical propagation methods of pomegranate like stem cutting and air-layering have seasonal timing and a higher risk of pathogens contamination. Micropropagation by tissue culture could be considered a method for production of steady and pathogen free plants in this species. However, factors such as lack of rooting and browning due to the oxidation of phenolic components under *in vitro* culture can limit its micropropagation efficiency. To overcome these problems, the effects of various factors, including media, iron-chelating agent, and plant growth regulators, were examined on the pomegranate propagation through *in vitro* conditions.

Materials and Methods

To obtain sterile explants, stem cuttings of the pomegranate cultivar Shishe Cap Ferdos were treated with different disinfection treatments**.** Then, the effect of DKW, MS and WPM basal media and two types of iron chelating agents (EDDHA and EDTA) were evaluated to decrease the secretion of phenolic compound from explant and subsequent browning. In the next step, the effect of plant growth regulators treatments, including 1-2 mg/l of BA in combination with 0.2 mg/l of various auxins (IAA, NAA or IBA) on shoot development and proliferation was studied. After that, rooting of regenerated plantlets was explored at WPM medium supplemented with 0.5 or 1 mg/l IAA, IBA or NAA. Finally, pomegranate plantlets were transferred to different soil mixtures, including eat moss and perlite (2:1), cocopeat and perlite (2:1), peat moss and vermiculite (2:1) and cocopeat and vermiculite (2: 1) for acclimation.

Results

The results indicated that sterilization with 2% sodium hypochlorite for 15 minutes followed by washing with 1g/l carbendazim for 10 minutes, and finally culturing the explants in the medium containing 1 g/l carbendazim had the best effect on reducing explant contamination. Among different basal media and iron chelating agents, WPM resulted in the lowest explant browning. Also, EDDHA was more efficient compared to the EDTA so that explant browning in WPM media containing Fe-EDDHA reduced by 55.8% compared to DKW containing Fe-EDTA. In

www.SID.ir

Archive of SID

addition, WPM basal medium supplemented with 2 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA induced higher shoot proliferation in node explant of pomegranate. For rooting treatments, after 45 days, WPM supplemented with 1 mg/l IAA induced higher rooting percentage, root length and number in pomegranate shoots. Among different acclimatizing treatments, plantlets that grew on peat moss and perlite (2: 1) had the highest leaf number and stem height.

Discussion

Our results suggested that the medium composition and chelating agent affected pomegranate explants browning. EDDHA appears to have a positive effect on reducing browning by chelating copper, which is a phenol oxidase cofactor. Also, EDDHA was more efficient compared to the EDTA.

Keywords: *In vitro* culture, Proliferation, Rooting, Shoot induction

www.SID.ir

Archive of SID

اثر نوع محیط کشت، کلات‌کننده آهن و ترکیب هورمونی بر ریزازدیادی انار (*Punica granatum* L.)

طیبه اسحاقی ثانی[۱]، محمد زارع مهرجردی[۲]* و احمد شریفی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان، شیروان، ایران
۲-***نویسنده مسئول:** استادیار،گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان، شیروان، ایران
(mzarem1381@yahoo.com)
۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵

چکیده

ریزازدیادی انار از طریق کشت بافت به‌عنوان یک راهکار برای تولید نهال‌های یکنواخت و عاری از بیماری مطرح است. با این حال برخی عوامل از قبیل عدم ریشه‌زایی و قهوه‌ای شدن می‌تواند ریزازدیادی این گیاه را با مشکل مواجه کند. لذا تأثیر عوامل مختلف بر روی ریزازدیادی انار رقم شیشه کپ فردوس در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه جهاد دانشگاهی خراسان رضوی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در دو آزمایش جداگانه برای کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گره اثر محیط‌های کشت DKW، MS و WPM و دو نوع کلات‌کننده آهن شامل EDTA و EDDHA و برای حداکثر پرآوری شاخه مقادیر ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر از اکسین‌های IBA، NAA و IAA مورد بررسی قرار گرفت. برای ریشه‌زایی شاخه‌ها اثر اکسین‌های IBA، NAA و IAA در محیط کشت WPM در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها جهت سازگاری به بسترهای مختلف منتقل شدند. نتایج نشان داد که استفاده از محیط کشت WPM و کلات‌کننده آهن EDDHA قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را نسبت به محیط کشت DKW به میزان ۵۵/۸ درصدکاهش داد. بهترین تیمار جهت شاخساره‌زایی، محیط کشت WPM با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بود. برای ریشه‌زایی، محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA از نظر درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه تولیدشده پاسخ بهتری نشان داد. درنهایت برای سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی انار ترکیب پیت ماس و پرلیت (۲:۱) مناسب‌تر بود.

کلیدواژه‌ها: پرآوری، ریشه‌زایی، شاخه‌زایی، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

ایران زادگاه انار است و با توجه به شرایط مناسب برای تولید گونه‌ی خوراکی انار در ایران، امکان گسترش آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک میسر می‌باشد. ایران با تولید سالیانه حدود ۷۰۰۰۰۰ تن انار، بزرگ‌ترین تولیدکننده و صادرکننده این محصول در جهان می‌باشد (Tehranifar et al., 2010). لذا انجام تحقیقات منسجم روی جنبه‌های مختلف این گیاه ضروری است تا بتوانیم در بازارهای رقابتی دنیا جایگاه خود را حفظ نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر انار به وسیله پاجوش، ریشه دارکردن قلمه ساقه، کاشت بذر و پیوندزدن انجام می‌شود. رایج‌ترین روش ازدیاد انار، قلمه چوب سخت و چوب نرم است که از سال‌ها پیش مرسوم بوده است، ولی این روش به دلیل محدودیت فصلی، زمانبر بودن فرایند تکثیر و احتمال آلوده شدن گیاهان تکثیرشده با محدودیت‌هایی مواجه است (Behzadi Shahrbabaki, 1998). بنابراین، توسعه یک روش کارآمد تکثیر در شرایط درون شیشه ای که در برگیرنده آلودگی‌زدایی مبتنی بر کشت مریستم و تیمارهای جانبی و فراهم کردن شرایط بهینه برای حداکثر سرعت تکثیر می‌باشد در این درخت میوه ضروری است. در طی سال‌های گذشته، تکنیک کشت بافت به‌طور گسترده برای تکثیر تعداد زیادی از درختان میوه مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری استفاده شده است (Skiada et al., 2010; Perez-Tornero et al., 2010). قبلاً تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار گزارش شده است (Murkute et al., 2004; Naik and Chand, 2011). در ایران نیز گزارش‌هایی در مورد تکثیر چند رقم بومی وجود دارد، به‌طوری‌که Valizadeh Kaji et al. (2013) تکثیر دو رقم انار ایرانی ملس ساوه و یوسف‌خانی را در دو محیط کشت WPM (Woody Plant Medium) و MS (Murashige and Skoog) بررسی کردند. با توجه به نتایج آن‌ها، مشخص شد که محیط کشت WPM به دلیل غلظت کمتر نمک‌ها نسبت به MS از لحاظ تولید گیاهچه‌های قویتر با طول شاخساره‌های بلندترکارآمدتر بوده است. علاوه براین مشخص شد که برای ریشه‌زایی، محیط کشت WPM ½ با تیمارهورمونی مناسب به دلیل تحریک تقسیم سلولی و القای ریشه نسبت به MS ½ مؤثرتر می‌باشد. با این وجود برخی مطالعات نشان داده که تکثیر در محیط کشت MS و MS ½ با تیمار هورمونی مناسب برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی نیز می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد (Naik et al., 1999; Naik et al., 2000; Murkute and Mayakumari, 2003; Chauhan and Kanwar, 2012; Singh et al., 2012).

یکی از نمک‌های محیط کشت آهن است که معمولاً با کلات‌کننده EDTA (Ethylene Diaminete Traacetic Acid) در محیط کشت استفاده می‌شود. برخی محققان گزارش کردند که در درختان میوه جایگزینی Fe-EDTA با Fe-EDDHA (Etyhylenediamine-di (o-hydroxyphenyl) acetic acid) باعث رشد و ریشه‌زایی بهتر گیاهچه‌ها در شرایط کشت بافت می‌شود (Garrison et al., 2013; Ciccotti et al., 2008; Haghgou Tabalvandani et al., 2014). همچنین Silvestri (2015) گزارش کرد که در شرایط کشت بافت Fe-EDDHA نسبت به Fe-EDTA پایدارتر است و Wojtania and Matysiak (2018) گزارش کردند که Fe-EDDHA اثرات مثبتی روی رشد و فعالیت فتوسنتزی رز در شرایط درون شیشه‌ای دارد.

در کشت بافت انار استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد اهمیت اساسی دارد و مطالعاتی به منظور شناسایی ترکیب مطلوبی از تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی انار صورت گرفته است (Terakami et al., 2007; Kanwar et al., 2010). به‌طورکلی مشخص‌شده که اضافه کردن سیتوکینین به محیط کشت برای پرآوری شاخساره ضروری است. بنزیل آدنین (Benzyl Adenine)، کاینتین (Kinetin)، زآتین ریبوزاید (Zeatin riboside) و تیدیازورون (Thidiazuron) معمول‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی هستند که به تنهایی یا همراه با غلظت کمی از اکسین برای پرآوری شاخساره استفاده شده‌اند (Naik and Chand, 2011). با توجه به این‌که ریشه‌زایی شاخساره‌های به وجود آمده از کشت‌های درون شیشه‌ای یک پیش شرط اساسی برای استقرار آن‌ها در خاک است لذا نوع اکسین و میزان نمک‌های محیط کشت، ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها را شدیداً تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Heloir et al., 1997; Kantharajah et al., 1998). در ریشه‌زایی انار استفاده از معمول‌ترین اکسین‌ها از قبیل نفتالین استیک اسید (Naphthalene Acetic Acid) و

www.SID.ir

Archive of SID

ایندول بوتیریک اسید (Indole Butyric Acid) مرسوم می‌باشد (Drazeta, 1997; Fougat et al., 1997). در این ارتباط محیط کشت ½WPM با تیمار هورمونی مناسب و استفاده از زغال فعال به مقدار یک گرم بر لیتر با درصد بالای ساکارز در محیط کشت انار جهت ریشه‌زایی بکار گرفته شده است (Singh and Khawale, 2006; Valizadeh Kaji et al., 2013).

یکی از مشکلات اصلی در کشت درون شیشه‌ای درختان قهوه ای یا سیاه شدن ریزنمونه و محیط کشت به دلیل ترشح ترکیبات فنولی و درنتیجه نکروز شدن ریزنمونه است (Delijam et al., 2016; Valizadeh Kaji et al., 2013; Vatandoost Jartoodeh et al., 2013). از روش‌های مختلفی برای کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت استفاده شده است از جمله تغییر نوع محیط کشت، قراردادن نمونه‌های در شرایط تاریکی به مدت چند روز، استفاده از زغال فعال یا ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نظیر اسید آسکوربیک و اسید سیتریک در محیط کشت می‌باشد (Kiani Feriz et al., 2005; Dalal et al., 2006; Feng-jie et al., 2007; Singh et al., 2007; Ahmed and Ali, 2012; Feyissa et al., 2005).

در استقرار کشت‌های درون شیشه‌ای انار وجود ترکیبات فنولی زیاد، در ریزنمونه‌ها باعث قهوه‌ای شدن محیط کشت و ریزنمونه و از بین رفتن آن‌ها می‌گردد (Murkute and Mayakumari, 2003). لذا این تحقیق، با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی انار با بررسی اثر محیط‌های کشت مختلف و کلات‌کننده آهن بر رشد و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها روی رقم شیشه کپ فردوس در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفت. از نتایج این آزمایشات در مراحل تکمیلی بهینه کردن فرایند تکثیر با تمرکز بر استفاده از روش‌های متنوع حذف آلودگی مبتنی بر کشت درون شیشه‌ای جهت تولید گیاهان یکنواخت و عاری از بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی ریزنمونه برای کشت

به منظور اجرای این پژوهش شاخه‌های یک ساله رقم شیشه کپ فردوس انار پس از جداسازی مورد ضدعفونی قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع شوینده شستشوشده و تحت تیمارهای مختلف ضدعفونی قرار گرفتند (جدول ۱). در تمام تیمارهای ضدعفونی، آبشویی پایانی ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل انجام شد و در تیمار سه و چهار علاوه بر آبشویی در انتها با محلول کاربندازیم یک گرم در لیتر شستشو انجام شد (شکل ۱). این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۴ مشاهده در هر تکرار انجام شد.

بررسی اثر محیط کشت و EDDHA بر میزان قهوه‌ای شدن ریزقلمه‌ها

به منظور بررسی اثر نوع محیط کشت و نوع کلات‌کننده آهن بر قهوه‌ای شدن، ریزنمونه‌های گره انار در سه محیط کشت MS، DKW و WPM در ترکیب با دو نوع کلات‌کننده آهن EDDHA یا EDTA که دارای ترکیب هورمونی یکسان یک میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA (Indoleacetic acid) بود، کشت شدند. روش استفاده از کلات‌کننده‌ها بدین صورت بود که کلات‌کننده EDTA به همراه آهن ($FeSO_4$) بر اساس دستورالعمل تهیه محیط کشت MS تهیه و به محیط کشت اضافه گردید درحالی‌که در محیط کشت حاوی کلات‌کننده EDDHA به جای استفاده از Fe-EDTA محیط کشت MS از ترکیب تجاری Fe-EDDHA شرکت Duchefa حاوی ۵/۸ درصد آهن به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت اضافه شد. این آزمایش به‌صورت آرایش فاکتوریل (۲ ×۳) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ نوع کلات‌کننده آهن و ۳ نوع محیط کشت با ۳ تکرار و ۳ مشاهده در هر تکرار انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

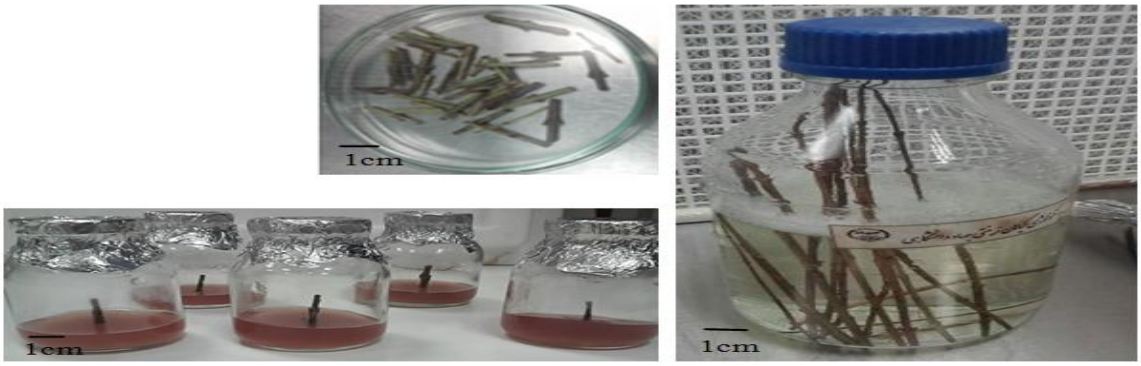

Figure 1. Sterilization of pomegranate stems cuttings

Table 1. **Disinfection treatments of nodal explants in Pomegranate**

ID	Disinfection protocol
T_1	70%Etanol (1min), 1.5% Sodium Hypochlorite (15 min)
T_2	70%Etanol (1min), 2% Sodium Hypochlorite (15 min)
T_3	2% Sodium Hypochlorite (15 min), 1g/l Carbendazim (10 min)
T_4	2% Sodium Hypochlorite (15 min), 1g/l Carbendazim (10 min), Media contains of 1 g/l Carbendazim

بررسی اثر نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی بر شاخه‌زایی

ریزنمونه‌های گره به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری که در هر کدام حاوی دو جوانه جانبی بود، پس از ضدعفونی در تیمارهای مختلف شامل سه سطح محیط کشت MS، DKW و WPM و دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین در ترکیب با سه سطح اکسین IBA، NAA و IAA هر یک به مقدار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با pH=۵/۷ کشت شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۷ تکرار و ۱ مشاهده در هر تکرار انجام شد. محیط کشت‌ها در شیشه‌های کشت ۱۰۰ میلی‌لیتری به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو شد. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۴۵ روز عکس‌العمل ریزنمونه‌ها با ارزیابی تعداد و طول شاخه‌های باززایی‌شده و درصد قهوه‌ای شدن صورت گرفت.

بررسی نوع و غلظت هورمون اکسین بر میزان ریشه‌زایی شاخه‌های القاشده

به منظور بررسی اثر نوع و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی، شاخه‌های باززاشده در مرحله قبل به محیط کشت جامد WPM حاوی ترکیب‌های هورمونی IBA، NAA و IAA در دو سطح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر، ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار با pH = ۵/۷ منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۳ مشاهده در هر تکرار انجام شد. نحوه‌ی تهیه محیط کشت‌ها و شرایط نگهداری کشت‌ها مشابه آزمایش قبل بود. در این آزمایش اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی با بررسی صفات تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده و درصد کالوس‌زایی ریشه و درصد ریشه‌زایی یک‌ماه پس از انتقال گیاهچه‌ها به محیط ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

سازگاری با شرایط برون شیشه‌ای

برای این منظور گیاهچه‌های تولیدشده انارکه دارای طولی برابر با ۳ تا ۴ سانتی‌متر بودند، پس از ریشه‌دار شدن به لیوان‌های یکبار مصرف حاوی بسترهای مختلف شامل کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۲، پیت ماس و پرلیت به نسبت ۱:۲، کوکوپیت و ورمی‌کولیت به نسبت ۱:۲ و پیت ماس و ورمی کولیت به نسبت ۱:۲ منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. لازم به ذکر است که قبل از انتقال گیاهچه‌ها به خارج از ظروف کشت، درب آن‌ها به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

۲ تا ۳ ساعت به حالت نیمه‌باز قرار گرفت تا رطوبت موجود در ظروف کشت کاهش یابد و تنش حاصل از خروج گیاهچه‌ها از این ظروف به حداقل برسد. گیاهچه‌ها پس از شستشوی ریشه‌ها به بسترها منتقل شدند. به منظور تأمین رطوبت لازم جهت حفظ و نگهداری گیاهچه‌ها از لیوان‌های یکبار مصرف شفاف به‌عنوان درپوش استفاده شد. سپس در اتاقک رشد در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتیگراد در شب و در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. به منظور سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها، پس از دو هفته سوراخ‌هایی در انتها و لبه خارجی لیوان‌های شفاف ایجاد شد و پس از حدود یک‌ماه لیوان‌های شفاف پلاستیکی به‌طور کامل برداشته شدند. گیاهان پس از ۴۵ روز به گلدان‌های کوچک انتقال داده شدند و در دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت روز در میان صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم شدند. تبدیل داده‌های درصدی (درصد قهوه‌ای شدن و درصد کالوس‌زایی، درصد ریشه‌زایی و درصد آلودگی) با استفاده از روش آرک سینوس با کاربرد فرمول [(ArcSin Sqrt (X/100] صورت گرفت.

نتایج و بحث

ضدعفونی ریزنمونه انار

نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد ضدعفونی ریزنمونه‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ضدعفونی وجود دارد. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها بیانگر آن است که کاربرد کاربندازیم به‌عنوان مکمل در مرحله ضدعفونی اثر قابل توجهی در کاهش آلودگی داشت. به‌طوری‌که استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۵ و ۲ درصد به‌ترتیب باعث ۹۱/۶۷ و ۷۵ درصد آلودگی شد این درحالی‌که با شستشوی ریزنمونه‌ها با کاربندازیم و استفاده از آن در محیط کشت آلودگی کشت را به ۸/۳۳ درصد کاهش داد. استفاده از هیپوکلریت سدیم به عنوان ماده ضدعفونی‌کننده ریزنمونه‌های انار با نتایج Bonyanpour and Khosh-Khui (2013) و Al-(1983) Obeid مطابقت دارد. با این تفاوت که ضدعفونی با غلظت بالاتر از غلظت این پژوهش توسط آن‌ها، انجام گرفته است و قارچ‌کش نیز استفاده نکردند. دلیل این‌که در این پژوهش غلظت کمتر هیپوکلریت سدیم مورد استفاده قرار گرفت این است که غلظت بالای این ماده‌ی ضدعفونی‌کننده باعث افزایش آسیب سطح ریزنمونه‌ها می‌گردد و باعث تسریع پدیده‌ی قهوه‌ای شدن می‌شود. با توجه به جدول(۲) استفاده از کاربندازیم، در شستشوی ریزنمونه و حضور آن در محیط کشت، میزان آلودگی را به میزان زیادی کاهش داد.

اثر نوع محیط کشت و کلات‌کننده آهن بر عارضه قهوه‌ای شدن ریزنمونه انار

قهوه‌ای شدن یکی از مشکلات عمده در ریزازدیادی و کشت بافت گیاهان چوبی است. علت قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، اکسید شدن مواد پلی فنولی تراوش‌شده در اثر آسیب و ایجاد بی‌نظمی در سلول‌ها است و چون در ریزنمونه‌های ساقه دو برش در دو طرف ریزنمونه وارد می‌شود، این امر باعث ایجاد جراحت و تشدید پدیده‌ی قهوه‌ای شدن می‌گردد (Lee and Whitaker, 1995). در ریز نمونه‌های کشت‌شده انار نیز در محلی از ریز نمونه که به درون محیط کشت فروبرده شده بود علائم قهوه‌ای شدن و متعاقب آن تخریب ریزنمونه مشاهده شد (شکل ۲).

Table 2. The effect of disinfection treatments on contamination of cultured explants in pomegranate

	Treatment ID			
	T_1	T_2	T_3	T_4
Contamination (%)	91.67[a]	75[ab]	50[b]	8.33[c]

Means within a column followed by the same letters are not significantly different at α = 0.05.

www.SID.ir

Archive of SID

Figure 2. (A) Browning in pomegranate node explants cultured. The effect of BA concentration on shoots produced, (B) 2mg/L BA and 0/2 mg/L IAA and (C) 1mg/L BA and 0/2 mg/L NAA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع محیط کشت در میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های انار اثر معنی‌دار داشت. به‌طوری‌که بیشترین درصد قهوه‌ای شدن در محیط کشت DKW با ۷۲/۵ درصد و کم‌ترین درصد قهوه‌ای شدن در محیط کشت WPM با ۴۶/۲۵ درصد به‌دست‌آمد. به نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت WPM که محیط کشتی رقیق از نظر عناصر غذایی می‌باشد می‌تواند تأثیر بهتری در جلوگیری از پدیده قهوه‌ای شدن داشته *باشد*. Kiani Feriz et al. (2005) نیز گزارش کردند که با کاهش غلظت عناصر غذایی در محیط کشت، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های زیتون کاهش می‌یابد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که علاوه بر نوع محیط کشت، نوع کلات‌کننده آهن نیز تأثیر معنی‌داری بر درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت. به نحوی که استفاده از کلات‌کننده EDDHA به جای کلات‌کننده EDTA، که به‌طور مرسوم در محیط کشت برای کلات کردن آهن مورد استفاده قرار می‌گیرد، اثر معنی‌داری بر کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۳). مشخص‌شده که کلات‌کننده‌ها نظیر EDTA با جذب مس که کوفاکتور آنزیم پلی فنول اکسیداز است، می‌توانند از اکسید شدن ترکیبات فنولی و متعاقب آن قهوه‌ای شدن ریزنمونه جلوگیری کنند (Tabatabai and Omidi, 2010). با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که احتمالاً کلات‌کننده EDDHA نسبت به EDTA توانایی بیشتری برای جذب مس از محیط کشت داشته باشد.

اثر نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی بر شاخه‌زایی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع محیط کشت، غلظت BA و نوع اکسین بر تمام صفات ارزیابی‌شده معنی‌دار و تنها اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت BA بر طول شاخه معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسات میانگین‌ها، محیط کشت‌های مختلف از نظر تعداد شاخساره تولیدشده اختلاف معنی‌داری داشتند. به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه تولیدشده بعد از ۴۵ روز در محیط کشت WPM با میانگین ۱/۴۸و کمترین تعداد شاخه در محیط کشت DKW با میانگین ۱/۱ مشاهده شد. همچنین بیشترین تعداد شاخه تولیدشده در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم برلیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و کمترین تعداد شاخه در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و IBA به‌دست‌آمد (جدول۴ و شکل ۲). بیشترین طول شاخه برای انار، در محیط کشت WPM حاوی BA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA با میانگین ۵/۷۱ سانتی‌متر و کم‌ترین طول شاخه در محیط کشت DKW و MS با تیمار هورمونی۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA مشاهده شد (جدول ۴).

www.SID.ir

Archive of SID

Table 3. The effect of media and Fe chelating agents on browning of pomegranate explants

Medium	Browning percentage		Mean
	EDTA	EDDHA	
WPM	55^{bc***}	37.5^{c}	46.25^{C*}
DKW	85^{a}	60^{bc}	72.5^{A}
MS	70^{b}	50^{bc}	60^{B}
Mean	70^{A**}	49.17^{B}	

*, ** Main Effects; *** Interaction Effects; each effects is compared independently. Means followed by the same letters are not significantly different at $\alpha = 0.05$.

Table 4. The effect of media, type of auxin and BA concentration on the number and the length of activated shoots in Pomegranate

Character	Medium	BA (mg/l)	Type of Auxin (0.2 mg/l)			Mean
			NAA	IBA	IAA	
The number of shoots	WPM	1	1.00^{e***}	1.14^{c-e}	1.36^{b-d}	1.16^{C*}
		2	1.29^{b-e}	1.43^{a-c}	1.71^{a}	1.48^{A}
	DKW	1	1.00^{e}	1.07^{de}	1.21^{c-e}	1.10^{C}
		2	1.14^{c-e}	1.21^{c-e}	1.29^{b-e}	1.21^{BC}
	MS	1	1.00^{e}	1.14^{c-e}	1.29^{b-e}	1.14^{C}
		2	1.21^{c-e}	1.36^{b-d}	1.57^{ab}	1.38^{AB}
	Mean		1.11^{B**}	1.23^{B}	1.40^{A}	
The length of shoots (cm)	WPM	1	5.71^{a***}	5.00^{b}	4.36^{c}	5.02^{A*}
		2	4.29^{cd}	3.93^{d-g}	3.71^{f-i}	3.98^{B}
	DKW	1	4.21^{c-e}	3.93^{d-g}	3.57^{g-i}	3.90^{B}
		2	3.79^{f-i}	3.36^{i}	2.64^{j}	3.26^{C}
	MS	1	4.29^{cd}	4.00^{c-f}	3.71^{f-i}	4.00^{B}
		2	3.86^{e-g}	3.43^{hi}	2.79^{j}	3.36^{C}
	Mean		4.36^{A**}	3.94^{B}	3.46^{C}	

*, ** Main Effects; *** Interaction Effects; each effects is compared independently. Means followed by the same letters are not significantly different at $\alpha = 0.05$.

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از NAA برای رشد طولی شاخه نسبت به دو هورمون اکسین دیگر مؤثرتر است. همچنین غلظت زیاد BA باعث ایجاد حالت پرتراکم در گیاهچه‌های باززایی‌شده می‌شود. Valizadeh Kaji et al. (2013) در مطالعه خود روی انار، تأثیر محیط کشت WPM در بهبود شاخه‌زایی را گزارش کردند. این در حالی است که در بسیاری از پژوهش‌ها استفاده از محیط کشت MS برای ریزازدیادی انار موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Naik et al., 2000; Murkute and Mayakumari, 2003; Chauhan and Kanwar, 2012). در مطالعه دیگری نیز استفاده از تنظیم‌کننده رشدی BA نسبت به سایر سیتوکینین‌ها در شاخه‌زایی انار، نتایج بهتری نشان داد (Murkute and Mayakumari, 2003). با این حال Mohamadi Nejad et al. (2014) در ریزازدیادی گرو محیط کشت DKW را محیط کشت بهتری نسبت به WPM گزارش کردند.

بررسی اثر نوع و غلظت هورمون اکسین بر میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تکثیرشده انار

شاخه‌های ایجادشده در مرحله‌ی شاخساره‌زایی، بریده‌شده و به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شدند. شاخه‌هایی که به محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر سه نوع اکسین منتقل شدند، هیچ گونه ریشه‌ای تولید نکردند، لذا از داده‌های آزمایش حذف شدند و آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار نوع اکسین با سطح یک میلی‌گرم در لیترو سه تکرار آنالیز شد. نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع اکسین بر تمام صفات ارزیابی‌شده معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌دهی در محیط کشت WPM حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IAA با میانگین ۸۸/۸۹ درصد و کم‌ترین درصد

www.SID.ir

Archive of SID

ریشه‌دهی در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و IBA به‌ترتیب با ۴۴/۴۴ و ۲۷/۷۸ درصد به‌دست‌آمد. این نتایج نشان می‌دهد که عکس‌العمل ریشه‌زایی انار نسبت به نوع اکسین متفاوت می‌باشد. علاوه بر این، تعداد ریشه نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع تنظیم‌کننده رشدی قرار گرفته است. به‌طوری‌که بیشترین طول و تعداد ریشه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد (جدول ۵ و شکل ۳). استفاده از محیط کشت MS همراه با هورمون اکسین IBA یا NAA جهت ریشه‌زایی ارقام انار گزارش شده است (Drazeta, 1997; Fougat et al., 1997). این در صورتی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد که محیط‌کشت WPM، دارای تنظیم‌کننده رشد IAA، محیط‌کشت مناسبی جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌های انار رقم شیشه کپ فردوس می‌باشد. این اختلاف احتمالاً به تفاوت موجود بین ژنوتیپ‌های مختلف انار ارتباط دارد. بنابر پژوهش Naik and Chand (2011) ارقام انار توانایی باززایی مختلفی دارند که دلیل آن نیازهای متفاوت هر رقم برای تنظیم‌کننده‌های رشدی است. Kantharajah (1998) et al. گزارش کردند که بالاترین درصد ریشه‌زایی انار در محیط کشتی به‌دست می‌آید که سطح نمک پایینی دارد. Kharrazi et al. (2018) برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های ژربرا اکسین‌های مختلف را بررسی و گزارش کردند که یک میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی بهتر بود.

سازگاری با شرایط برون شیشه‌ای

گیاهچه‌های تولیدشده انار که دارای طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر بودند، پس از ریشه‌دار شدن به لیوان‌های یکبار مصرف حاوی بسترهای مختلف منتقل شدند. به منظور تأمین رطوبت لازم جهت حفظ و نگهداری گیاهچه‌ها از لیوان‌های یکبار مصرف شفاف به‌عنوان درپوش استفاده شد و پس از گذشت یک هفته، با سوراخ نمودن ته لیوان‌های پلاستیکی (که به‌طور معکوس بر روی گیاهچه‌ها قرار داشتند) گرما و رطوبت هوای اطراف گیاهچه‌ها به‌طور غیرمستقیم از قسمت انتهایی لیوان خارج‌شده و درنهایت دما و رطوبت اطراف گیاهچه به تدریج کاهش‌یافته که با ادامه این عمل گیاهچه‌های انتقال‌یافته از شرایط درون شیشه‌ای به تدریج به دما و رطوبت محیط مقاوم شدند و پس از حدود یک ماه لیوان‌های شفاف پلاستیکی به‌طور کامل برداشته شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد، بین نوع بستر کشت و رشد طولی و افزایش میزان برگ گیاه وجود داشت. به‌طوری‌که بیشترین طول شاخه و تعداد برگ برای انار بعد از یک ماه به‌ترتیب در بستر پیت ماس و پرلیت به نسبت ۱:۲ با میانگین ۱۰/۲ سانتی‌متر و ۱۳/۶ عدد برگ به‌دست‌آمد (جدول ۶). گیاهان شاداب پس از ۴۵ روز به گلدان‌های کوچک انتقال داده شدند و در دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس نگهداری شدند (شکل ۴).

Table 5. The effect of auxin type (1 mg/l) in rooting of pomegranate explants

Type of auxin	Root induction (%)	Callus induction (%)	The number of roots	The length of roots (cm)
NAA	44.4[b]	55.6[a]	2.14[ab]	0.95[b]
IBA	27.7[c]	77.2[a]	1.00[b]	0.46[c]
IAA	88.8[a]	11.1[b]	3.14[a]	1.36[a]

Means within a column followed by the same letters are not significantly different at α = 0.05.

Figure 3. Rooting of pomegranate, (A) rooting with 1 mg/l IAA, (B) rooting with 1 mg/l NAA and callus induction and (C) rooting with 1 mg/l IBA and also callus induction

www.SID.ir

Archive of SID

Table 6. The effect of different soil mixtures on the growth of plantlets

Soil mixture	The number leaf	The shoot length (cm)
Peat moss and perlite (2: 1)	13.6[a]	10.2[a]
CocoPeat and perlite (2: 1)	10.8[bc]	4.1[c]
Peat moss and vermiculite (2: 1)	12.0[ab]	8.4[ab]
CocoPeat and vermiculite (2: 1)	9.6[c]	4.9[bc]

Means within a column followed by the same letters are not significantly different at α = 0.05.

Figure 4. Hardening stage in the pomegranate plantlets: Pomegranate plantlet transferd from the culture medium to pot under plastic glass (A), one month (B) and 45 days after plantlet transfering (C)

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که بهترین تیمار جهت ضدعفونی ریزنمونه‌های انار استفاده از هیپوکلریت سدیم دو درصد و شستشو با کاربندازیم استریل و استفاده از این ترکیب در محیط کشت به میزان یک گرم بر لیتر می‌باشد. مناسب‌ترین تیمار جهت کنترل قهوه‌ای شدن استفاده از محیط کشت WPM به همراه کلات‌کننده EDDHA است. برای ایجاد شاخساره‌های مناسب جهت استفاده در مرحله ریشه‌زایی، محیط کشت WPM، با تیمار هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA توصیه می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از ریشه‌زایی، محیط کشت WPM با تیمار هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر IAA بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه را تولید کرد و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از اکسین‌های NAA، IBA، IAA منجر به ریشه‌زایی در انار نشد. بهترین بستر برای سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده بستر پیت ماس و پرلیت به نسبت ۱:۲ است.

سپاس‌گزاری

از همکاری گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی سازمان جهاددانشگاهی خراسان رضوی جهت در اختیار قرار دادن فضای آزمایشگاهی و گلخانه‌ای جهت انجام این آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Ahmed, A. R. and Ali, R. S. (2012). *In vitro* microporpagation of olive (*Aea europaea* L.) Mission by nodal segments. *Journal of Biological& Environmental Sciences*, 6(17), 155-159.

Al-Obeid, R. (1983). *Propagation of pomegranate (Punica granatum* L.*) through tissue culture method*. M.Sc. Thesis of Plant Production, King Saud University, Saudi Arabia.

Behzadi Shahrbabaki, H. (1998). *Distribution and variety of pomegranate cultivars in Iran*. Nashr Amoozesh Keshavarzi, Agricultural Research, Training and Promotion Organization, Karaj. [In Farsi]

Bonyanpour, A. and Khosh-Khui, M. (2013). Callus induction and plant regeneration in *Punica granatum*

www.SID.ir

Archive of SID

L. ‘Nana’ from leaf explants. *Journal of Central European Agriculture*, 14(3), 75-83.

Chauhan, R. P. and Kanwar, K. (2012). Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 48, 579-594

Ciccotti, A. M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens M. and Jarausch, W. (2008). Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6(2), 445-458.

Dalal, M. A., Das, B., Sharma, A. K. M. A. and Sounduri, A. S. (2006). *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M9 rootstock. *Indian Journal of Biotechnology*, 5(4), 543-550.

Delijam, M. A., Garoosi, Gh. A., Nezami-Alanagh, E. and Hosseini, R. (2016). Improving *Pistacia vera* micropropagation: With emphasis on the efficiency of minerals, vitamins and PGRs. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 4(1), 43-54.

Drazeta, L. (1997). Pomegranate (*Punica granatum* L.) propagation by *in vitro* method of tissue culture. *Review of Research Work at the Faculty of Agriculture, Belgrade*, 42, 49-59.

Feng-jie, T., Zhi-yi, Z., Jun, Z., Na, Y. and Dong-mei, W. (2007). Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *Forestry Studies in China*, 9, 279-282.

Feyissa, T., Welander, M. and Negash, L. (2005). Micropropagation of *Hagenia abyssinica*: A multipurpose tree. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 80, 119-127.

Fougat, R. S., Pandya, S. B., Ahmad, T. and Godhani, P. R. (1997). *In vitro* studies in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 3(1), 23-29.

Garrison, W., Dale, A. and Saxena, P. K. (2013). Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA). *Canadian Journal of Plant Science*, 93(3), 511-521.

Haghgou Tabalvandani, M., Yadollahi, A., Atashkar, D., Kalatejari, S. and Eftekhari, M. (2014). Optimized root production during micropropagation of new Iranian apple hybrid rootstock (AZ X M9): Effects of Fe-EDDHA and Thiamine. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(10), 2659-2662.

Heloir, M. C., Fournioux, J. C., Oziol, L. and Bessis, R. (1997). An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine *Vitis vinifera* (cv. Pinot noir) using axillary bud cuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 95-108.

Kantharajah, A. S., Dewitz, I. and Jabbari, S. (1998). The effect of media, plant growth regulators and source of explants on *in vitro* culture of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Erwerbs-Obstbau*, 40(2), 54-58.

Kanwar, K., Joseph, J. and Deepika, R. (2010). Comparison of *in vitro* regeneration pathways in *Punica granatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 199-207.

Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykha Akhar, F., Bagheri, A. and Moradian, M. (2018). Effect of hormonal compositions on micropropagation of fifteen cultivars of gerbera (*Gerbera Jamesonii* Bolus ex Hooker f.). Journal of *Plant Productions*, 40(4), 91-102. [In Farsi]

Kiani Feriz, M., Zamani, Z. and Ebadi, A. (2005). *In vitro* establishment of three olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 12(4), 29-37. [In Farsi]

Lee, C. Y. and Whitaker, R. J. (1995). *Enzymatic browning and its prevention (ACS Symposium Series)*. Washington: American Chemical Society.

www.SID.ir

Archive of SID

Mohamadi Nejad, Sh., Gholami, M. and Esna Ashari, M. (2014). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype 305. Journal of *Plant Productions*, 37(3), 83-92. [In Farsi]

Murkute, A. A. and Mayakumari, S. P. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*, 23(1), 28-31.

Murkute, A. A., Patil, S. and Singh, S. K. (2004). *In vitro* regeneration in pomegranate cv. Ganesh from mature trees. *Indian Journal of Horticulture*, 61(3), 206-208.

Naik, S. K. and Chand, P. K. (2011). Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: A review. *Plant Cell Reports*, 30, 707-721.

Naik, S. K., Pattnaik, S. and Chand, P. K. (1999). *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of a mature tree. *Scientia Horticulturae*, 79(3-4), 175-183.

Naik, S. K., Pattnaik, S. and Chand, P. K. (2000). High frequency axillary shoot proliferation and plant regeneration from cotyledonary nodes of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Scientia Horticultura*, 85(4), 261-270.

Perez-Tornero, O., Tallon, C. I. and Porras, I. (2010). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 263-271.

Silvestri, C. (2015). *Hazelnut (Corylus avellana* L.*) genetic resources and nursery industry improvement by biotechnological approaches*. Ph.D. Thesis in Plant Biotechnology, University of Tuscia, Italy.

Singh, N. V., Singh, S. K. and Patel, V. B. (2007). *In-vitro* axillary shoot proliferation and clonal propagation of 'G 137' pomegranate (*Punica granatum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 77(8), 505-508.

Singh, N., Singh, S. and Meshram, D. (2012). *Pomegranate: In Vitro Propagation and biohardening*. Saarbrucken, Germany: Lambert Academic Publishing.

Singh, S. K. and Khawale, R. N. (2006). Plantlet regeneration from the nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. Jyoti. In: A. Kumar, S. Roy, S. K. Sopory (Eds.), *Plant biotechnology and its applications in tissue culture* (pp. 105-113). New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.

Skiada F. G., Grigoriadou, K. and Eleftheriou, E. P. (2010). Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Malagouzia' and 'Xinomavro'. *Central European Journal of Biology*, 5(6), 839-852.

Tabatabai, B. A. and Omidi, M. (2010). *Tissue and cell culture*. Tehran: Tehran University Press. [In Farsi]

Tehranifar, A., Zarei, M., Nematia, Z., Esfandiyaria, B. and Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 180-185.

Terakami, S., Matsuta, N., Yamamoto, T., Sugaya, S., Gemma, H. and Soejima, J. (2007). Agrobacterium-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). *Plant Cell Reports*, 26, 1243-1251.

Valizadeh Kaji, B., Ershadi, A. and Tohidfar, M. (2013). *In Vitro* propagation of two Iranian commercial pomegranates (*Punica granatum* L.) cvs.:'Malas Saveh' and 'Yusef Khani. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(4), 597-603.

Vatandoost Jartoodeh, S., Davarynejad, Gh. H., Tehranifar, A., Kaveh, H. and Akbari Bisheh, H. (2013). Reducing browning problem in micropropagation of three pear cultivars; Sebri, Shekari and Natanz. *Current Opinion in Agriculture*, 2(1), 25-27.

www.SID.ir

Archive of SID

Wojtania, A. and Matysiak, B. (2018). *In vitro* propagation of *Rosa* 'Konstancin' (*R. rugosa* × *R. beggeriana*), a plant with high nutritional and pro-health value. *Folia Horticulturae*, 30(2), 259-267.

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

www.SID.ir