تأثير البنزل أدينين BA في نشوء أفرع أصلي الكمثرى *Pyrus communis* L. والتفاح *Malus domestica* Borkh خارج الجسم الحي.

محمد احمد كريم * زينب عبد الجبار حسين تغريد عبد الجبار نورا صاحب

هيفاء محسن بندر

وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البحوث الزراعية

* Zainab.goldy@yahoo.com

بغداد– العراق

الخلاصة

درس تأثير إضافة تراكيز مختلفة من البنزل أدنين BA (0.0 ، 0.25 ، 0.5 ، 1.0) ملغم / لتر إلى الوسطين الغذائيين (MS_1 وMS_2) المحددان باضافه 0.25 mg/L من الـ IBA و IAA على التوالي في نشوء وتكشف الأفرع المأخوذة من النموات الحديثة للأشجار البالغة بعمر 8 سنوات من الأصلين الكمثرى *Pyrus communis* L. والتفاح *Malus domestica* Borkh اصلMM106 حضنت المزروعات في درجة حرارة 25±2مº و إضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة/يوم. اخذت البيانات عن عدد وطول الافرع وعدد الاوراق بعد 8 اسابيع من الزراعه. أظهرت النتائج إن إضافة الـ BA المضاف إلى الوسطين الغذائيين قد اثر معنويا في كل الصفات المدروسة حيث تفوق التركيز 1.0 ملغم/لتر المضاف الى الوسط الغذائي (MS1) في إعطاء أعلى متوسط عدد الأفرع بلغت 1.8فرع /نبات في حين تفوق التركيز 0.5 ملغم /لتر في متوسط طول الافرع وعدد الاوراق بلغت 2.44 سم /نبات ، 8.0 ورقة /نبات على التوالي، وتفوق الأصل الكمثرى على أصل التفاح معنويا في متوسط عدد الأفرع وأطوالها وعدد الأوراق ولكلا الوسطين.

الكلمات المفتاحية : الكمثرى والتفاح، مرحله النشوء، IBA ، IAA ، زراعة الأنسجة.

Effect of Benzyl adenine (BA) on *In vitro* Initiation of Pear *Pyrus communis* L and Apple *Malus domestica* Borkh Rootstocks

Mohammed Ahmed Kareem Zainab Abduljabar Hussain

Tagreed Abduljabar Nora Sahib hyfa muhssen Bander

Ministry of Science and technology/ Agriculture Research Directorate

Baghdad-Iraq

Abstract

The effect of different concentrations of Benzyl adenine (BA) (0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/l) was studiedon two types of media (MS_1, MS_2), which determined with 0.25 mg/L IBA and 0.25 mg/L IAA, respectively. These were culturedon initiation and growth stageafter existed from trees of Pear *Pyruscommuis* L. and Apple *Malus domestica* Borkh(MM106) rootstocks which incubated at 25± 2 ˚C and 16 hr photo period with light intensity of 1000 Lux. Data of shoots number, length, leaf number were taken after 8 weeks. Results showed that adding of BA on two types of media caused significant effect in all characters, which BA at 1.0 mg/L superior to give highest rate of shoot number reached 1.8 shoot/ plant while, BA at 0.5 mg/L gave highest rate in shoot length and number of branch reached 2.44 cm/plant and 8.0 shoot/plant, respectively. The rootstock *Pyruscommuins*L. was proved to be the best than *Malus domestica* Borkh(MM106) rootstock in all characters at two types of medium.

Key words: Pear and apple, initiation stage, IBA, IAA, *in vitro.*

المقدمة

تكثر أشجار التفاحBorkh *Malus domestica* والكمثرى *Pyrus communis* L عادة بالتطعيم على أصول منتخبة وذات مواصفات زراعية وإنتاجية مرغوبة(سلمان ،1988) حيثكان الاتجاه إلى استيراد أعداد كبيرة من الأصول على هيئة شتلات أو بذور خلال السنوات السابقة ولازالت مستمرة ليومنا هذا ،حيث قامت الشركة العامة للبستنه والغابات باستيراد أصول التفاح MM106 وهو أصل من أصول مجموعة مولنج مرتن Malling Mirtin التي أنتجت في انكلترا وهو من الأصول المقاومة لحشرة المن القطني والمتوسطة الارتفاع.أما أصل الكمثرى *Pyrus Communis*فهو من الأصول النشطة ويمكنه تحمل الأرض الثقيلة ذات المستوى المائي العالي وتعتبر من الأمهات لإنتاج البذور منه وبالتالي أنتاج شتلات الأصول للتطعيم عليها.

تعد تقنية زراعة الأنسجة النباتية من أهم الطرائق الحديثة في الإكثار الخضري السريع للنباتات وعلى هذا الأساس فقد وظفت هذه التقنية في إنتاجأعداد كبيرة من أصول التفاح والكمثرى (Zimmerman ,1981 ;Skirvin واخرون ،; 1986George ،; 1996غزال ، 1997;الحسيني، 2001 Freire ; واخرون ، Kaddota 2002; و Nimi، 2003 ; عبد الحسين ، 2004 ; Zhu واخرون 2005 Takure; و Kanwar ، 2008) حيث وجد إن قابلية النمو والتكشف خارج الجسم الحي تعتمد على نوع وتركيز السايتوكاينينات والاوكسينات المضافة الى الوسط الغذائي في مرحلة إنشاء المزروعات والتي تعد من أهم مراحل النمو والتطور للجزء النباتي المأخوذ والذي لاتقل أهميتها عن باقي المراحل الأخرى حيث تتضمن اختيار الجزء النباتي المستعمل في الإكثار وتعقيمه بهدف الحصول على زروعات خالية من الإصابة بالمسببات المرضية حيث يتم إكثارها خضرياً بأعداد كبيرة خلال مدة زمنية قصيرة ويكون ذلك أما بتشجيع تكوين البراعم العرضية التي تنشأ من غير أماكنها الاعتيادية أو من خلال القضاء على السيادة القمية وتحفيز التفرعات الجانبية.

وأجرت(الحسيني، 2001) دراسة حول استجابة أجزاء نباتية مختلفة مثلا القمم النامية والعقد المفردة والمستأصلة من النموات الخضرية لأصول الكمثرى والسفرجل في مرحلة إنشاء الزروعات لغرض إجراء التطعيم الدقيق عليها إذ وجدت إن إضافة الـ BA بتركيز (1) مايكرو مول ادى الى زيادة نسبة الاستجابة للقمم النامية بطول (0.5–0.7) ملم لكل من الأصول والطعوم . وتشير الدراسة التي اجراها (Mahdia , Sabah ، 2012) إن أفضل وسط في تحفيز المزروعات على النمو هو الوسط المضاف له BA 2.0 ملغم/لتر و NAA 0.05 ملغم/لتر مع نسبة بقاء للنمو بلغت 90% للقطع الساقية لأصل الكمثرى *Pyrus betulaefolia* .

لذا تبرز أهمية هذه الدراسة إلى إيجاد أفضل توليفة من الاوكسينات والسايتوكاينينات لتحفيز البراعم الجانبية المأخوذة من الأفرع الماخوذه من الساق لأصلي الكمثرى والتفاحMM106 على النمو والتكشف .

المواد وطرائق العمل

اجري هذا البحث في مختبرات زراعه الانسجه النباتيه دائرة البحوث الزراعية في وزارة العلوم والتكولوجيا 2010–2011 و ذلك باختيار الاصلين الكمثرى *Pyrus communis* L. والتفاح أصل MM106حيث اخذت عقل ساقية بطول (10–12)سم ماخوذة في شهر نيسان من أشجار بالغة خالية من الإصابة الحشرية والمرضية،قطعت الى اطراف فروع بطول 1.5سم واستأصل البرعم الطرفيبعد تعقيمها بكلوريد الزئبق تركيز 0.1% لمدة (5–7) دقائق ثم زرعت البراعم في الوسطالغذائي(Murashige و skoog،1962). خلطت مكونات الوسط الغذائي في دورق و أكمل حجم المحلول إلى لتر و عدل الاس الهيدروجيني (PH) إلى 5.7 باستخدام NaOH أو HCl واحد عياري. أضيف الاجار بمقدار 7غم/لتر إلى الوسط الغذائي و سخن حتى الغليان باستخدام جهاز التسخين الهزاز. ثم وزع في انابيب الزراعة (25×150 ملم) و بواقع 15مل/ أنبوبة و أغلقتالأنابيبأغطية خاصة مقاومة للحرارة و عقمت بجهاز التعقيم البخاري (Autoclave) بدرجة حرارة 121مº و ضغط 1.04 كغم/سم2 لمدة 20 دقيقة. درس تأثير إضافة تراكيزمختلفة من البنزل أدنين (0.0,0.25, 0.5, 1.0) ملغم/لتر للوسطين الغذائيين

(MS1و MS2) (جدول1) في نشوء الأفرع الخضرية حيث استخدمت 10 مكررات لكل تركيز من BA ولكل من الأصلين. حضنت الزروعات في ظروف مسيطر عليها بدرجة حرارة 25 ± 2مº وشدة إضاءة 1000 لوكس لمدة 16ساعة/يوم. أخذت الملاحظات عن عدد التفرعات وأطوالها وعدد الأوراق بعد 8 أسابيع من الزراعة ،

نفذت التجارب كتجربه عامليه باستخدام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) وحللت النتائج إحصائيا" بموجب اختيار اقل فرق معنوي L.S.D و على مستوى احتمال 5 % (الساهوكي ووهيب 1990)

جدول(1) الوسطين الغذائيين المستخدمين في إنشاءالزر وعات

ت	MS1	MS2
	المادة / تركيزها(ملغم /لتر)	المادة / تركيزها (ملغم/لتر)
1	أملاح MS / قوة كاملة	أملاح MS / قوة كاملة
2	0.4/Thiamine-Hcl	0.4/Thiamine-Hcl
3	100 /Inositol	100 /Inositol
4	30000 /Sucrose	30000 /Sucrose
5	0.25 /IBA	0.25 /IAA
6	1.0 ، 0.5 ، 0.25 ، 0.0 /BA	1.0 ، 0.5 ، 0.25 ، 0.0 /BA
7	7000 / Agar	7000 / Agar
Agar = 7 g/L PH= 5.7		

النتائج و المناقشة:

تأثيرالـ BA في عدد الأفرع وأطوالها للوسط الغذائي (MS1).

يوضح الجدول (2) بان هناك فروق معنوية بين الأصلين المدروسين في متوسط عدد الأفرع واطوالها اذ تفوق اصل الكمثرى وأعطى اعلى متوسط عدد أفرع وطول بلغا 1.7 فرع /نبات و2.25 سم / فرع على التوالي مقارنة بالأصل التفاح MM106 والذي اعطى بدوره 1.1 فرع/نبات و 1.29 سم/فرع على التوالي.وتشير نتائج الجدول نفسه بان تراكيز BAاثرت معنويا في متوسط عدد الافرع واطوالها حيث كان اعلى متوسط عدد افرع عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من الـ BA وبلغ 1.8 فرع/نبات والذي لم يختلف عن التركيز 0.5 ملغم /لتر BA واختلف معنوياً عن معاملتي المقارنة والتركيز 0.25 ملغم /لتر اما اعلى متوسط طول افرع بلغت 2.44 سم /فرع عند التركيز 0.5 ملغم/لتر والذي تفوق

معنويا على باقي التراكيز عدا التركيز 1.0 ملغم /لتر BA الذي بلغ 2.01 سم /فرع .

اما التداخل بين الأصول والتراكيز فقد اثرت معنويا في متوسطي عدد الافرع وأطوالها حيث أعطى التركيز 1.0 ملغم /لنر المزروع فيه أصل الكمثرى أعلى متوسط عدد أفرع بلغ 2.6 فرع/نبات والذي اختلف معنويا عن باقي التداخلات عدا التركيز 0.5 ملغم /لتر لاصل الكمثرى أما على متوسط طول أفرع بلغ 3.28 سم /نبات متفوقا عن باقي التداخلات عدا التركيز 1.0 ملغم /لتر والذي بلغ 2.81 سم /نبات .

كما اوضح الجدول (2) بان هناك فروق معنوية بين الأصلين المدروسين في متوسط عدد الأوراق حيث تفوق أصل الكمثرى معنويا وأعطى عدد أوراق بلغ 8.43 ورقة /نبات مقارنة بالأصل التفاح الذي أعطى متوسطا بلغ 3.80 ورقة /نبات. وأثرت التراكيز المستخدمة معنويا في متوسط هذه الصفة حيث بلغ أعلى متوسط عدد أوراق 8.00 ورقة /نبات عند التركيز 0.5 ملغم /لتر BA في حين بلغ اقل متوسط عدد أوراق عند معاملة المقارنة وبلغ 3.90 ورقة /نبات .وأثرت التداخلات بين الأصول والتراكيز معنويا في متوسط عدد الأوراق حيث بلغ أعلى متوسط عدد أوراق 12.00 ورقة /نبات لأفرع اصل الكمثرى المزروع في الوسط الغذائي المضاف إلية 0.5 ملغم BA اما اقل متوسط عدد اوراق بلغ 3.20 ورقة / نبات لافرع اصل التفاح المزروعة عند التركيز 0.25 ملغم /لتر .

جدول (2) تأثير تراكيز الـ BA المضاف الى الوسط الغذائي (MS1) في متوسط عدد وطول (سم) الفروع وعدد الاوراق لأصلي الكمثرى والتفاح بعد 8 أسابيع من الزراعة.

تركيز الـ BA ملغم/لتر	متوسط عدد الفروع		المتوسط	متوسط طول الفرع (سم)		المتوسط	متوسط عدد الاوراق		المتوسط
	الكمثرى	التفاح		الكمثرى	التفاح		الكمثرى	التفاح	
0.00	1.0	1.0	1.0	0.7	1.25	0.98	3.40	4.40	3.90
0.25	1.0	1.0	1.0	2.2	1.1	1.65	8.40	3.20	5.80
0.50	2.2	1.0	1.6	3.28	1.6	2.44	12.00	4.00	8.00
1.00	2.6	1.0	1.8	2.81	1.2	2.01	9.90	3.60	6.75
المتوسط	1.7	1.0		2.25	1.29		8.43	3.80	
أ.ف.م عند مستوى 5% الصنف = 0.38 التركيز = 0.54 الصنف × التركيز =0.76.				أ.ف.م عند مستوى 5% الصنف =0.38 التركيز =0.53 الصنف × التركيز = 0.75			أ.ف.معند مستوى 5% الصنف = 1.27 التركيز = 2.44 الصنف × التركيز = 3.45		

تأثير الـ BA في عدد الأفرع وأطوالها وعدد الاوراق للوسط الغذائي (MS2).

يوضح الجدول (3) إن الأصول قد اختلفت معنويا فيما بينها في متوسط صفة عدد واطوال الأفرع حيث تفوق الأصل الكمثرى وأعطى عدد أفرع وطول بلغا(1.45) فرع /نبات و2.08 سم على

التوالي مقارنة بالأصل التفاح MM106 والذي اعطى1.0 فرع /نبات و1.19 سم ، وأثرت تراكيز BAمعنويا في متوسط عدد الأفرع وأطوالها حيث كان أعلى متوسط عدد أفرع عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من الـ BA وبلغ 1.5 فرع/نبات والذي لم يختلف عن التركيز 0.5 ملغم /لتر BA واختلف معنوياً عن معاملتي المقارنة والتركيز 0.25 ملغم /لتر أما أعلى متوسط طول أفرع بلغت 2.14 سم /فرع عند التركيز 0.5 ملغم/لتر والذي تفوق معنويا على باقي التراكيز عدا التركيز 1.0 ملغم /لتر BA الذي بلغ 1.87 سم /فرع .

وكان للتداخل بين الأصول والتراكيز تأثير معنوي في متوسطي عدد الأفرع وأطوالها حيث أعطى التركيز 1.0 ملغم /لنر BA المزروع فيه أصل الكمثرى أعلى متوسط عدد أفرع بلغ 2.0 فرع/نبات والذي اختلف معنويا عن باقي التداخلات عدا التركيز 0.5 ملغم /لتر لأصل الكمثرى إما على متوسط طول أفرع بلغ 3.08 سم /نبات متفوقا على باقي التداخلات عدا التركيز 1.0 ملغم /لتر BA المزروع فيه أصل الكمثرى الذي بلغ 2.53 سم /نبات كما يبين الجدول ذاته (3) بان هناك فروق معنوية بين الاصلين المدروسين في متوسط عدد الأوراق حيث تفوق اصل الكمثرى واعطى متوسط عدد اوراق بلغ 7.70 ورقة /نبات مقارنة بالاصل التفاح الذي اعطى متوسطا بلغ 3.40 ورقة /نبات. وأثرت التراكيز المستخدمة معنويا في متوسط هذه الصفة حيث بلغ أعلى متوسط عدد أوراق 7.60 ورقة /نبات عند التركيز 0.5 ملغم /لتر BA والذي اختلف معنويا عن باقي التراكيز في حين بلغ اقل متوسط عدد أوراق عند معاملة المقارنة وبلغ 3.90 ورقة /نبات .وأثرت التداخلات بين الأصول والتراكيز معنويا في متوسط عدد الأوراق حيث بلغ أعلى متوسط عدد أوراق 12.00 ورقة /نبات لأفرع أصل الكمثرى المزروع في الوسط الغذائي المضاف إلية 0.5 ملغم/ لتر A والذي لم يختلف عن باقي التداخلات عدا التركيز 1.0 ملغم /لتر BA المزروع فيه أفرع أصل الكمثرى، أما اقل متوسط عدد أوراق بلغ 3.20 ورقة / نبات لأفرع أصل التفاح المزروعة عند التركيزين 0.25 و 0.5 ملغم /لتر .

جدول (3) تأثير تراكيز الـ BA المضاف الى الوسط الغذائي (MS_2) في متوسط عدد وطول (سم) الفروع وعدد الأوراق لأصلي الكمثرى والتفاح بعد 8 أسابيع من الزراعة.

تركيز الـ BA ملغم/لتر	متوسط عدد الفروع		المتوسط	متوسط طول الفرع (سم)		المتوسط	متوسط عدد الاوراق		المتوسط
	الكمثرى	التفاح		الكمثرى	التفاح		الكمثرى	التفاح	
0.00	1.00	1.0	1.0	0.70	1.25	0.98	3.40	4.40	3.90
0.25	1.00	1.0	1.0	2.00	1.10	1.55	7.00	3.20	5.10
0.50	1.80	1.0	1.4	3.08	1.20	2.14	12.00	3.20	7.60
1.00	2.00	1.0	1.5	2.53	1.20	1.87	8.40	2.80	5.60
المتوسط	1.45	1.0		2.08	1.19		7.70	3.40	
أ.ف.م عند مستوى 5% الصنف = 0.19 التركيز = 0.27				الصنف =0.41 التركيز =0.58 الصنف × التركيز = 0.83			الصنف = 1.38 التركيز = 1.95 الصنف × التركيز = 2.75		

الصنف × التركيز =0.38.		

أظهرت نتائج البحث كفاءة اصل الكمثرى مقارنة بأصل التفاح MM106 في متوسط عدد الافرع والذي يرجع سببه الى الاختلافات الوراثية بين الاصلين قيد الدراسة وما يرافقه من اختلافات في المحتوى الغذائي والهرموني للإجزاء النباتية المزروعة (Hartmann واخرون ، 1997) إما الاختلاف في اطوال الافرع فقد يعود إلى اختلاف التعبير الجيني للخلايا باختلاف التركيب الوراثي للأصناف وانعكاس ذلك على مجمل العمليات الحيوية داخل الأنسجة وعمليات النمو والتطور(ليفيت ، 1985)، كذلك أظهرت النتائج إلى كفاءة استخدام الـ BA بالتراكيز (1.0 ملغم /لتر في إعطاء أعلى متوسط عدد وطول الافرع وقد يعود ذلك الى ان للسايتوكاينين تأثير مثبط ومباشر على انتاج انزيم (IAA-oxidase) وان اضافة السايتوكاينين ربما يثبط صور متعددة معينة في انزيم (IAA-oxidase) اضافة الى تثبيط تحلل الـ IAA كما ان للسايتوكاينين دور في الية جذب وتجميع المواد الايضية عند مواضع البراعم الجانبية محفزاً انتقال المغذيات ومواد النمو الأخرى و العناصر المعدنية الضرورية لبدء نمو البراعم ونمو المجموع الخضري والتحفيز المباشر لبناء الـ RNA و البروتين و الكلوروفيل والتفسير اضافه الى ان لـه دور السايتوكانين في تحفيز الانقسام الخلوي واتساع واستطالة الخلايا ودورها في بناء السكريات المختزلة، كما ان التراكيز المثالية من السايتوكاينينات في الافرع النشطة فسيولوجياً تعمل على تنظيم سريان المغذيات إلى القمم النامية في حين ارتفاع تراكيز السايتوكاينين عن الحد المثالي فانه يؤدي إلى تثبيط النمو (Devlin و Witham ، 1983) . تتفق هذه النتائج مع (الحسيني واخرون، Hossain 2004; واخرون ،2003) في اكثارهم للكمثرى والسفرجل و الجوجوبا.

المصادر

سلمان ، محمد عباس .1988.إكثار النباتات البستنية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة بغداد. العراق.

الحسيني ، زينب عبد الجبار حسين .(2001). الإكثار و التطعيم لاشجار الكمثرى خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير – كلية الزراعه.جامعه بغداد.العراق.

الحسيني، زينب عبد الجبار، الجبوري، عبد الجاسم، الجلبي، سامي كريم محمد. 2004. الاكثار الخضري الدقيق لطعوم واصول اشجار الكمثرى. المجلة العراقية للعلوم والتكنلوجيا. المجلد 1 العدد 1: 43-51 .

الساهوكي، مدحت و وهيب، كريمة محمد (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد– العراق.

غزال، محمد عبد النبي. (1997). إكثار بعض اصول التفاح خضريا باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية. اطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد– العراق.

ليفيت، يعقوب. 1985. مقدمة فسلجة النبات. ترجمة الدكتور عاصم محمود حسين. جامعة الموصل. العراق.

مسلم عبد علي عبد الحسين.(2004) . توظيف تقنيه التطفير في خارج الجسم الحي في تحسين تحمل أصلي التفاح MM106 وعماره Omara لملح كلوريد الصوديوم . اطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد– العراق.

Devlin, R. M. and Witham, F. H. 1983. Plant Physiology.4th ed. Wadsworth Publishing Company, BelmontCalifornia.

Freire , I.C.G., C.P.S Coelho and M.T.F. Barros . 2002 . Improved culture media for the in vitro establishment of pear from nodal cuttings .ActaHorticulture , 2: 457-461.

George, E. 1996.Problems in initiating and maintaining cultures. In: Plant Propagation by Tissue Culture in Practice. 2nd ed. Cambridge University Press.

Hartmann , H.J. ; Kester , D.E. and Davies , F.T. 1997 . Plant propagation and practices .microproduction of apple cultivars . Plant Sci . 28(3-6): 61 – 65.

Hossain, S. N., Munshi, M. K., Islam, M. R., Hakim, L. and Hossain, M. 2003. In vitro Propagation of Plum (*Zizyphus jujuba* lam) Plant Tissue Cult. 13 (1): 81-84.

Kadota,M.andY.Nimi, 2003 . Effect of cytokine types and their concentration on shoot proliferation and hyperdricity in vitro pear cultivar shoots . Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 73-77.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Sabah. A. Hassannen and Mahdia .F. Gabr. 2012. INvitro Propagation of pear *Pyrus betulaefolia* Rootstock .Ammerican –Eurrasian .J.Agric.& Environ. Sci., 12(4): 484-489.

Skirvin ,R.M., Kouider, M., Jourge ,H.&Korbau ,S.S. (1986) .Apple (*Malus domestica*Burklo) In : Bajaj .Y.P.S.(ed) Biotechnology in Agriculture and Foresty , Vol .1, Trees , Springer , Berline , Ny .183-198.

Thakure ,A.and J.S. Kanwar, 2008 .Micropropagation of wild *Pyrus pyrifolia* (BurmF.) Nakai .I. Explant establishment and shoot multiplication . Not .Bot.Hort.Agrobot. Gluj,36(1): 103-108.

Thakure, A., R.P.S. Dalal and Najot, 2008 Microprpahation of pear (*Pyrus spp*) . A.review. Agric.Rew., 29(4) : 260-270.

ZhuLH,Li.XY., and M.Welander, (2005). Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81: 313-318.

Zimmerman, R.H. and Broome, O.C. 1981 Phloroglucion and in vitro rooting of apple cultivar cuttings. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 106: 648-652.