بسم الله الرحمن الرحیم

دستورالعمل فنی

تکثیر بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) از طریق کشت بافت

نگارش:

سیده معصومه زمانی، میترا امام و عباس قمری‌زارع
اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۱۴۰۱

عنوان پروژه منتج به دستورالعمل فنی	شماره پروژه
ارزیابی تأثیر قارچهای میکوریز در افزایش رشد و پایداری گیاهچه‌های کشت بافتی بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) و بررسی حضور احتمالی این قارچهای همزیست در رویشگاه‌های جنگلی بلوط کشور	۲-۰۹-۰۹-۹۱۰۳۰

عنوان نشریه: تکثیر بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) از طریق کشت بافت

نویسندگان:

سیده معصومه زمانی – استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

میترا امام – استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

عباس قمری زارع – دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور/ اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات حفاظت و حمایت

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستاران علمی: لیلا میرجانی و منصوره صداقتی

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۱

این نشریه به شماره ۶۳۱۸۸ در تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۱۸ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

9789644735097

فهرست مطالب

چکیده ۱

مقدمه ۲

دستورالعمل ۵

۱) جمع‌آوری نمونه‌ها ۵

۲) جداسازی ریزنمونه‌ها، ضدعفونی و کشت آنها ۵

۳) پرآوری و باززایی شاخه‌ها ۷

۴) رشد طولی شاخه‌ها ۸

۵) ریشه‌زایی شاخه‌ها ۸

۶) سازگار کردن گیاهچه‌ها ۹

منابع ۱۱

دامنه:

مخاطبان این دستورالعمل فنی کارشناسان، مروجان، دانشگاهیان، شرکت های خصوصی و مراکز تحقیقاتی می باشند.

مسئولیت:

این دستورالعمل به منظور کنترل و نظارت بر مراحل تولید نهال بلوط از طریق کشت بافت مورد استفاده قرار می گیرد.

اهداف آموزشی:

هدف از ارائه این دستورالعمل شناخت و توسعه تکنیک کشت بافت گیاهان بلوط در زمینه‌های آموزشی، پژوهشی و تجاری می‌باشد.

چکیده

تولید انبوه گونه‌های درختی سخت‌چوبِ اقتصادی مانند گونه بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) به دلیل فراهم کردن ذخایر گیاهی سالم و اصلاح شده، جزء جدایی‌ناپذیر برنامه‌های جنگل‌کاری تجاری و نیز اصلاح جنگل‌های آسیب‌دیده محسوب می‌شود. بنابراین به کارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی کشت بافت و ریزازدیادی، گامی مهم برای تولید انبوه ژنوتیپ‌های برگزیده و ژنوتیپ‌های اصلاح شده ژنتیکی (مانند ژنوتیپ‌های مقاوم شده به آفات یا بیماری‌ها) خواهد بود. در این دستورالعمل مراحل ریزازدیادی بلوط بلندمازو (گونه‌ای مهم و با پراکنش زیاد در شمال کشور) با استفاده از بخش‌های گره‌دار و جوانه‌دار سرشاخه‌های این گیاه توصیف شده است. به طور خلاصه این مراحل شامل موارد ذیل است: ابتدا سرشاخه‌ها از منابع گیاهی سالم و شاداب (شامل درختان بالغ و یا نهال‌ها) جداسازی شوند، پس از ضدعفونی شیمیایی با استفاده از کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه، ریزنمونه‌های حاوی گره یا جوانه در شرایط استریل تهیه و درون محیط‌های کشت MS (با نصف غلظت از عناصر پرمصرف) یا WPM، به همراه BAP ۰/۳ mgl^{-1} و IBA ۰/۰۱ mgl^{-1} استقرار گردند. برای ریزازدیادی سرشاخه‌های رشد کرده، بهترین محیط کشت WPM به همراه BAP (۰/۳ mgl^{-1}) است و بالاترین رشد ریشه روی محیط کشت WPM ۱/۲ به همراه اکسین IBA (۰/۳ mgl^{-1}) و NAA (۰/۱ mgl^{-1}) می‌باشد. مرحله سازگارسازی تدریجی گیاهان در گلخانه شش هفته به‌طول می‌انجامد.

واژه‌های کلیدی: سرشاخه، گره، جوانه، ریزازدیادی و بلوط *Quercus castaneifolia*.

مقدمه

درختان بلوط از مهمترین و فراوان‌ترین گونه‌های چوبی پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی، ازجمله جنگلهای ایران هستند که از دیدگاه زیست‌محیطی و نیز اقتصادی از اهمیت و ارزش بسیار بالایی برخوردارند. بسیاری از گونه‌های این جنس به دلیل تولید چوب تجاری با کیفیت بالا دارای ارزش صنعتی زیادی بوده و در زمره مهمترین گونه‌های تجاری در دنیا به‌شمار می‌آیند. علاوه‌براین، بلوط‌ها دارای مزایای دیگری نیز هستند که ارزش اقتصادی آنها را بیشتر می‌کند. برای نمونه، بذرها و گال‌های متنوع بلوط‌ها و پوست آنها در صنایع غذایی، دارویی و رنگ‌سازی کاربردهای فراوانی داشته که هم به صورت سنتی و هم صنعتی در نقاط مختلف دنیا بهره‌برداری و استفاده می‌شوند (Johnson *et al.* 2002; Merkle & Narin 2005). گونه‌های مختلف این جنس، سطوح وسیعی را در نواحی شمالی البرز و در رشته کوه زاگرس در غرب ایران به خود اختصاص داده‌اند (فتاحی، ۱۳۷۳).

مهمترین روش زادآوری بلوط استفاده از بذر است که روشی مناسب برای فراهم کردن تنوع ژنتیکی این گونه‌ها در اکوسیستم‌های جنگلی به‌شمار می‌رود (Ostrolucka *et al.* 2007). اما امکان تکثیر جنسی بلوط به دلایل متعددی با محدودیت‌هایی مواجه است، ازجمله این دلایل می‌توان به طولانی بودن مدت زمان لازم برای رسیدن بذرها به بلوغ فیزیولوژیکی، نامنظم بودن الگوی ظهور آن‌ها در سال‌های مختلف، متفاوت بودن کمیت و کیفیت این بذرها در سال‌های مختلف، پایین بودن قوه نامیه بذرهای تولید شده و مشکل بودن ذخیره‌سازی آن‌ها اشاره کرد (Ostrolucka *et al.* 2007; Pijut *et al.* 2011). به‌علاوه اینکه بذرهای گونه‌های *Quercus* درجات متفاوتی از جوانه‌زنی را از خود نشان می‌دهند و نیز به دلیل حساسیت بالای آنها به خشک شدن و از دست دادن آب، تنها برای مدت کوتاهی قابل ذخیره شدن هستند (Chalupa 1995). از سوی دیگر، روش تکثیر غیرجنسی درختان بالغ بلوط از طریق قلمه‌زنی

گاهی به دلیل مشکل بودن ریشه‌زایی قلمه‌های آن چندان میسر و موفقیت‌آمیز نیست (Bhardwaj *et al.* 1996). مشکلات یاد شده در تکثیر درختان بالغ یا جوان بلوط را می‌توان با بکارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی (در شرایط درون شیشه‌ای) برطرف کرد (Ostrolucka *et al.* 2007; Pijut *et al.* 2011). برای نمونه، تکثیر آزمایشگاهی بلوط از طریق جمع‌آوری و به‌کارگیری جوانه‌های انتهایی یا جانبی آن دارای کاربردهای مهم ازجمله جنگل‌کاری‌ها تجاری است که این مهم از طریق تکثیر انبوه ژنوتیپ‌های خاص و برگزیده که دارای چوب با کیفیت بالا هستند و یا ژنوتیپ‌های مقاوم یا متحمل به بیماری¬ها، آفات و یا آلودگی‌های زیست‌محیطی، میسر است (Ostrolucka *et al.* 2007; Ostrolucka & Bezo 1994). همچنین جمع‌آوری ریزنمونه‌های اولیه از درختان بلوط با ژنوتیپ‌های متفاوت و وارد کردن آنها به یک سیستم کشت بافت پایدار در شرایط درون شیشه‌ای، امکان ایجاد تنوع ژنتیکی را که جزء جدایی‌ناپذیر اکوسیستم‌های جنگلی است، فراهم می‌کند (Pijut *et al.* 2011).

از سوی دیگر، علاوه بر آنکه تکنولوژی کشت بافت گیاهی موجب افزایش میزان و سرعت تولید گیاهان مهم و برگزیده مورد نظر ما شده است و نیز می‌تواند بستر مناسبی برای حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادر و یا در حال انقراض طبیعت به‌عنوان منابع با ارزش ژرم‌پلاسم محسوب شود؛ این تکنولوژی در سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته که هم‌اکنون از این روش برای انتقال ژن‌های مطلوب، به‌ویژه ژن‌های ایجادکنندهٔ مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، در سطح گسترده استفاده می‌شود. همچنین بدیهی است که اقدامات آزمایشگاهی برای ایجاد موتاسیون و بعد انتخاب موتانت‌های گیاهی مناسب ابزار قدرتمندی برای تکمیل روش‌های اصلاح نبات سنتی است (Williams & Maheswaran 1996)، زیرا اصلاح گیاهان به روش‌های سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست، در حالی که تکنولوژی جدید کشت بافت گیاهی این راه را به خوبی

هموار کرده و به پیش می‌برد (حسندخت و همکاران، ۱۳۸۵). گونه‌های *Quercus* برای کراس دادن و اصلاح به طریق سنتی نیاز به زمان طولانی دارند، در نتیجه تکنولوژی کشت بافت می‌تواند گامی مؤثر برای کوتاه کردن زمان زادآوری آنها باشد.

اگرچه بهینه‌سازی تکنیک ریزازدیادی گونه‌های مختلف بلوط ازجمله گونه‌های *Q. acutissima* (Kim 2000)، *Q. robur* (Sánchez *et al.* 1996)، *Q. rubra* (Vengadesan & Pijut 2007; Vieitez *et al.* 2009)، *Q. suber* (Romano *et al.* 1992)، *Q. petraea* (Chalupa 1993)، *Q. alba* (Vieitez *et al.* 2009) و *Q. bicolor* (Vieitez *et al.* 2009) در سایر کشورها انجام شده است؛ اما در ایران این تکنیک تاکنون برای تکثیر بلوط بهینه‌سازی نشده است. بلندمازو (*Q. castaneifolia*) از مهمترین گونه‌های صنعتی بومی شمال ایران و قفقاز است (ثابتی، ۱۳۵۵). پوست تنه درخت بلندمازو و حتی برگ آن دارای مقدار زیادی تانن است که می‌توان از آن استخراج و در چرم‌سازی استفاده کرد. چوب بلندمازو سخت، محکم و غیر قابل نفوذ است و در صنعت چوب و تخته‌سازی کاربرد فراوان دارد. در این تحقیق شیوه‌نامه‌ای برای کشت بافت این گونه با ارزش از طریق جوانه‌های جانبی، انتهایی و نیز میانگره‌های آن یافت و توصیف شده است.

دستورالعمل

۱) جمع‌آوری نمونه‌ها

سرشاخه‌های درختان بالغ یا نهال‌های *Q. castaneifolia* همراه با جوانه‌های جانبی، انتهایی و نیز میانگره‌ها به‌عنوان منبع ریزنمونه در اواخر اسفندماه (این زمان بهتر است) از جهات و ارتفاعات مختلف پایه مادری (درختانی که از نظر ظاهری عاری از بیماری و شاداب بنظر می‌رسند) جدا شده و برای انجام مراحل بعدی به آزمایشگاه منتقل شوند. یادآوری می‌شود که استفاده از ریزنمونه‌های به‌دست آمده از نهال‌ها برای ریزازدیادی به‌طورکلی روش مناسب‌تری نسبت به بکارگیری ریزنمونه‌های به‌دست آمده از درختان بالغ است؛ زیرا درختان بالغ بیشتر همراه با آلودگی‌های درونی بوده و گاهی قابلیت خود را برای باززایی از دست داده‌اند.

۲) جداسازی ریزن‌مونه‌ها، ضدعفونی و کشت آنها

در آزمایشگاه سرشاخه‌های دارای جوانه و میانگره به قطعات حدود ده سانتی‌متری تقسیم و تحت جریان آب معمولی به مدت یک ساعت قرار داده شوند، سپس به‌خوبی به همراه مایع ظرفشویی برس‌کشی شده تا کلیه آلودگی‌های سطحی پاک گردد. پس از مرحله پیش‌سترون‌سازی، سرشاخه‌ها به قطعات تقریبی ۳ تا ۴ سانتی‌متری که حاوی جوانه یا گره هستند بریده شوند. این قطعات درون آب مقطر به هود لامینار منتقل شده تا بقیه مراحل تحت شرایط استریل انجام شود. در هود لامینار، نمونه‌ها در محلول سترون‌کننده کلرور جیوه (۱ /۰ درصد) به مدت ۲ دقیقه تیمار شوند تا ضدعفونی انجام گردد (یادآوری می‌شود اگرچه استفاده از محلول کلرور جیوه تیمار مناسبی برای حذف آلودگی‌های سطحی است اما از آنجا که ترکیبی بسیار سمی است با طولانی‌تر شدن زمان سترون‌سازی، درصد سوختگی

ریزنمونه‌ها افزایش خواهد یافت). پس از این مرحله از ضدعفونی، نمونه‌ها درون آب مقطر استریل سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شوند. از این قطعات، ریزنمونه‌های حاوی یک جوانه و یا یک میانگره توسط اسکالپل استریل به صورت افقی برش داده شده و توسط پنس استریل درون لوله‌های کشت حاوی ۱۵ میلی‌لیتر از محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) با نصف غلظت از ماکرومولکول‌های WPM: Woody Plant Medium (Lloyd & Mc Cown, 1980) منتقل شوند. به این محیط‌ها تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP (6-Benzylaminopurine) به میزان ۰/۳ mgl^{-1} و IBA (3-Indolebutyric acid) به میزان ۰/۰۱ mgl^{-1} اضافه شود؛ همچنین برای ممانعت از تولید ترکیبات فنلی، Polyvinylpyrrolidone (PVP) به میزان ۰/۲ mgl^{-1} در محیط‌ها استفاده شود. در تمام آزمایش‌های pH محیط با استفاده از HCl و KOH روی ۵/۷ -۵/۸ تنظیم و بعد محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شوند. کشت‌ها در اتاقک‌های رشد در دمای ۲۵ -۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ -۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شوند. نگهداری کشت‌ها در شرایط مذکور تا زمان ایجاد و رشد جوانه‌ای از ریزنمونه‌ها انجام شده، سپس کشت‌ها به‌طور مداوم هر ۴ تا ۵ هفته به محیط جدید (WPM به همراه ۰/۳ mgl^{-1} از BAP و ۰/۰۱ mgl^{-1} از IBA) منتقل شوند (شکل ۱).

شکل ۱- جداسازی ریزنمونه‌های بلندمازو، ضدعفونی و کشت آن‌ها در آزمایشگاه

۳) پرآوری و باززایی شاخه‌ها

محیط کشت مناسب برای واکشت جوانه‌های مستقر شده به‌منظور شاخه‌زایی و تکثیر، محیط کشت WPM است، به‌طوری‌که نسبت به سایر محیط‌های کشت موجب افزایش تولید شاخه‌ها و سبزینگی بالاتر در آنها می‌گردد. لازم است در این مرحله به این محیط‌کشت ترکیبات هورمونی ۰/۳ mgl^{-1} از BAP، ۰/۰۱ mgl^{-1} از IBA و ۰/۲ از PVP اضافه شود تا گیاهچه بیشترین تعداد شاخه را تولید کرده و میانگین ضریب ازدیاد جوانه و رشد طولی آن در محیط کشت افزایش یابد (شکل ۲).

شکل ۲- بازکشت شاخه‌های بلندمازو

۴) رشد طولی شاخه‌ها

برای بهینه‌سازی رشد طولی شاخه، تأثیر اضافه کردن جیبرلیک اسید (GA_3: Gibberellic acid) به محیط‌های شاخه‌زایی در قالب دو تیمار جیبرلینی (اضافه کردن ۰/۱ mgl^{-1} از GA یا اضافه نکردن آن) بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که اضافه کردن هورمون جیبرلین به میزان ۰/۱ mgl^{-1} به محیط WPM، به تنهایی تأثیر بیشتری نسبت به BAP و تلفیق این دو هورمون بر افزایش تولید شاخه و رشد طولی آن دارد. در واقع محیط مناسب برای طویل شدن شاخه‌های بلوط با محیط پرآوری شاخه‌ها (شاخه‌زایی) متفاوت است و این تفاوت به غلظت BAP در محیط بازمی‌گردد؛ به‌نحوی‌که در محیط طویل شدن شاخه باید به کلی BAP را حذف و از محیط بدون هورمون استفاده کرد، یا اگر خواهان وقوع همزمان شاخه‌زایی و طویل شدن شاخه هستیم از غلظت‌های پایین BAP (حداکثر mgl^{-1} ۰/۲) استفاده شود.

۵) ریشه‌زایی شاخه‌ها

در این مرحله لازم است شاخه‌های با طول تقریبی ۲- ۳ سانتی‌متر وارد مرحله ریشه‌زایی شوند، بدین ترتیب که ابتدا کلیه شاخه‌ها به شیشه‌های کشت (۴۰۰ میلی‌لیتری) حاوی ۵۰-۴۰ میلی‌لیتر محیط پایه WPM فاقد هورمون (برای حذف تأثیرات هورمونی مرحله شاخه‌زایی) به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی منتقل گردند. پس از یک ماه، نمونه‌ها به محیط کشت WPM با نیم غلظت از ماکرومولکول‌ها، نیم غلظت از املاح نیترات، مقدار کامل میکرومولکول‌ها و ۳ gl^{-1} زغال فعال (activated charcoal) منتقل شوند. بهترین قابلیت ریشه‌دهی با کشت شاخه‌ها در محیط حاوی زغال فعال انجام می‌شود. برای تمام گونه‌های بلوط مورد بررسی، گزارش شده است که افزودن زغال فعال هم روی کیفیت شاخه‌زایی و هم

روی توسعه سیستم ریشه‌ای تأثیر مثبتی داشته است؛ به‌طوری‌که تشکیل ریشه‌های اصلی و فرعی در حضور این ترکیب به سرعت افزایش می‌یابد. همچنین در این مرحله استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی (IBA به میزان mgl^{-1} ۰/۳ و NAA: Naphthalene Acetic Acid به میزان mgl^{-1} ۰/۱) بالاترین تأثیر را روی افزایش رشد ریشه‌های اصلی و فرعی بلندمازو بهمراه دارد (شکل ۳).

شکل ۳- ریشه‌زایی شاخه‌های بلندمازو

۶) سازگار کردن گیاهچه‌ها

پس از شستشوی ریشه از باقیماندهٔ محیط کشت با آب ولرم، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های ده سانتیمتری پلاستیکی که محتوای مخلوط خاک سترون شده پیت، پرلیت و ورمیکولیت با نسبت‌های۰/۵، ۲ و ۲ هستند منتقل و در گلخانه قرار داده شوند تا مراحل سازگارسازی را طی کنند (شکل ۴). بدین ترتیب که گیاهچه‌ها به همراه گلدان‌های مربوط در داخل کیسه‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت نگهداری شده و با کش لبهٔ بیرونی گلدان‌ها محکم شود. بعد از گذشت ده روز از انتقال، سازگاری با هوادهی روزانه به تدریج شروع شود، به‌طوری‌که با تعبیهٔ چند سوراخ به گیاه اجازهٔ مبادلهٔ هوا با محیط داده و ظرف شش هفته کیسهٔپلاستیکی به کلی برداشته شود.

شکل ۴- مرحله سخت‌وارسازی گیاهچه‌های ریشه‌دار بلندمازو

این دستورالعمل قابل استفاده برای بکارگیری تکنیک کشت بافت در تولید انبوه بلوط *Q. castaneifolia* برای جنگل‌کاری‌ها و نیز تولید آزمایشگاهی این گیـاهچه‌ها برای آزمون‌های ژنتیکی (ازجمله ایجاد موتاسیون، انتقال ژن و غیره) است.

منابع

ثابتی ح. ۱۳۵۵. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی. ۸۷۶ صفحه.

حسندخت م.، راهله الف. و ابراهیمی ن. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش، ۳۲۸ صفحه.

فتاحی م. ۱۳۷۳. بررسی جنگلهای بلوط زاگرس و مهم‌ترین عوامل تخریب آن. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، نشریه شماره ۱۰۱، ۶۱ ص.

Bhardwaj D.R., Mishra V.K. & Shamet G.S. 1996. Rooting response of *Quercus leucotrichophora* Linn. cuttings to chemical treatments and physio-chemical status. Journal of Tree Sciences 15 (1): 49–51.

Chalupa V. 1993. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. Annals of Forest Science 50 (Supplement): 295-307.

Chalupa V. 1995. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.): 67–87. In: Jain S., Gupta P. & Newton R., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol 2- Angiosperms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Johnson P.S., Shifley S.R. & Rogers R. 2002. The ecology and silviculture of oaks. CABI Publishing, New York, NY, 503 p.

Kim Y.W. 2000. Somatic embryogenesis in *Quercus acutissima*: 671-685. In: Jain S.M., Gupta P.K. & Newton R.J., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Lloyd G. & McCown B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of International Plant Propagators Society, 30, 421-427.

Merkle S.A. & Nairn C.J. 2005. Hardwood tree biotechnology. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 41: 602–619.

Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco tissue culture. Physiology of Plants 15:437-442.

Ostrolucka M.G. & Bezo M. 1994. Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* spp.). Genetic Polonica 35: 161–169.

Ostrolucka M.G., Gajdosova A. & Libiakova G. 2007. Protocol for micropropagation of *Quercus* spp. In: Jain S.M. & Haggman H. (Eds.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht. pp.85–91.

Pijut P.M., Lawson S.S. & Michler C.H. 2011. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 47:123-147.

Romano A., Noronha C. & Martins-Louçao M.A. 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. Annals of Botany 70:531-536.

Sánchez M.C., San-José M.C., Ballester A. & Vieitez A.M. 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. Tree Physiology 16:673-680.

Vengadesan G. & Pijut P.M. 2007. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 45:474-482.

Vieitez A.M., Corredoira E., Ballester A., Muñoz F., Durán J. & Ibarra M. 2009. *In vitro* regeneration of important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. Plant Cell Tissue Organ Culture 98:135-145.

Williams E.G. & Maheswaran G. 1996. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462.