مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

اثر محیط‌های کشت پایه مختلف بر ریزازدیای گیلاس (*Prunus avium* L.)، کشت مریستم و ریزپیوندی پیوندک‌های عاری از ویروس

پریسا جنوبی[1*]، ناصر بوذری[2]، زهره شیرخانی[1]، مریم ملکی[1]

[1] ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[2] ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

چکیده

سیستم تکثیر سنتی علاوه‌بر طولانی بودن می‌تواند موجب گسترش بیماری‌های گیاهی، به ویژه آلودگی ویروسی شدید شود. ریزازدیادی و کشت مریستم راهکارهای نوینی برای حل این مشکلات هستند. پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت درون شیشه مریستم گیلاس، ژنوتیپ امیدبخش OSH انجام شد. به منظور تعیین مناسب ترین محیط کشت استقرار جوانه های جانبی از۵ محیط‌کشت (MS، DKW، WPM، mQL و QL) و برای کشت مریستم، از ۳ محیط‌کشت (MS، B5 و QL) با اسیداسکوربیک (صفر و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) در قالب آزمایش‌های فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. در محیط کشت WPM با غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشترین درصد استقرار جوانه های جانبی (۲۸ درصد) مشاهده شد. محیط کشت QL حاوی۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۱ میلی‌گرم بر لیترBA بیشترین درصد استقرار مریستم (۲/۶ درصد) را نشان داد. بیشترین درصد (۱۴/۶ درصد) شاخه‌زایی در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA دیده شد. ریشه زایی در محیط کشت ½MS با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بعلاوه‌ی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین درصد (۳۴ درصد) ریشه‌زایی را نشان داد. نتایج حاصل از بررسی RT-PCR به‌منظور بررسی حضور دو ویروس شایع گیلاس(PNRSV و PDV) نشان داد در هیچکدام از نمونه‌های گیاهی حاصل از کشت مریستم (۰/۶ میلی‌متری) باندی دال بر آلوده بودن گیاهان حاصل از کشت بافت وجود نداشت. گیرایی پیوند، در پیوندک‌هایی با اندازه ۱ تا ۲ سانتی‌متر بر روی پایه رویشی Maxma 14 موفقیت‌آمیزتر بود. این مطالعه نشان داد که کشت مریستم ابزاری کارآمد برای از بین بردن ویروس از گیاهان آلوده گیلاس است که امکان تولید مواد عاری از بیماری برای تامین پیوندک‌های سالم را فراهم می‌کند.

واژه های کلیدی: اسید آسکوربیک، MS، DKW، WPM، mQL، QL

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۳۲۹۲۲۰ ، پست الکترونیکی: jonoubi@khu.ac.ir

مقدمه

ویروس‌های آلوده‌کننده میوه‌های هسته‌دار باعث ایجاد مشکلات جدی در کشت و تولید میوه می‌شوند. تنش‌های زیستی ناشی از ویروس‌ها و ویروئیدها می‌تواند علائمی را بر روی برگ‌ها و میوه‌های جنس *Prunus* ایجاد کند که اغلب بر ارزش اقتصادی میوه تأثیر می‌گذارد، عملکرد را کاهش می‌دهد، سلامت درختان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در نهایت منجر به زوال درخت می‌شود[۳۱]. علائم و شدت عفونت به گونه گیاه میزبان و خود ویروس بستگی دارد. هیچ روش متعارف حفاظت از گیاهان در برابر ویروس‌ها وجود ندارد. بنابراین استفاده از پایه‌های سالم و حفاظت گیاه در برابر ناقلین ضروری است [۳۷]. برای تولید

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

گیاهان عاری از ویروس می‌توان از چندین روش استفاده کرد. کشت بافت یکی از روش‌هایی است که به‌طور گسترده در ریشه‌کنی پاتوژن‌های گیاهی استفاده می‌شود. رویان‌های سوماتیک را می‌توان با استفاده از القا بافت‌های غیرآوندی تولید کرد. از آنجایی‌که انتقال ویروس‌ها به بافت‌های آوندی وابسته می‌باشد، تولید گیاهان عاری از ویروس با رویان‌زایی سوماتیک امکان‌پذیر است، اما مکانیسم آن مشخص نیست و به نظر می‌رسد وابسته به ژنوتیپ باشد [۱۰، ۲۳ و۲۵]. نقطه ضعف این روش افزایش خطر بی‌ثباتی ژنتیکی و تنوع سوماکلونال است [۸]. این روش با موفقیت برای از بین بردن ویروس‌ها و ویروئیدهای مختلف برای انگور و بادام مورد استفاده قرار گرفت [۷ و۳۸].

از جمله ویروس‌های مهم که باعث بیماری در درختان گیلاس می‌شود، PDV (Prune Dwarf Virus) است، در برگ درختان گیلاس آلوده شده علائمی نظیر لکه های نکروزی، کلروزی و همچنین لکه های قرمز در میوه‌های رسیده گزارش شده است [۱۸]. ویروس مهم دیگر PNRSV (Prunus Necrotic Ring Spot Virus) است، درختان آلوده شده به‌وسیله‌ی این ویروس با کاهش جوانه‌زنی، کاهش رشد میوه، تأخیر در رسیدن میوه، کلروز، نکروز، تغییر شکل برگ و با کوتاه شدن طول برگ همراه است [۲۴]. در گونه‌های *Prunus*، رایج‌ترین روش‌های حذف ویروس بر اساس کشت‌های اندام هوایی در شرایط آزمایشگاهی است [۳۶]. کاربرد کشت مریستم بر این مفهوم استوار است که غلظت ویروس‌ها در ناحیه نوک ساقه بسیار کم یا حتی عاری از ویروس است زیرا اکثر ویروس‌ها نمی‌توانند وارد مریستم شوند. بنابراین جداسازی مریستم و باززایی گیاه در شرایط آزمایشگاهی ممکن است باعث ایجاد گیاهان عاری از ویروس شود [۱۹].

گیلاس با نام علمی (*Prunus avium* L.) متعلق به تیره‌ی Rosaceae درختی خزان‌کننده با رشد سریع است [۴۱]. تکثیر اکثر گونه‌های *Prunus* با روش‌های مرسوم مانند نهال و قلمه زدن، گیاهان سالم و عاری از بیماری را تضمین نمی‌کند و انرژی‌بر و وقت‌گیر هستند. در همین راستا به منظور غلبه بر مشکلات در تکثیر رویشی ارقام گیلاس، روش‌های ریزازدیادی توسعه یافته اند [۳۷].

در گذشته مطالعات ریزازدیادی با موفقیت در مورد گونه‌های *Prunus* مانند گیلاس انجام شده است. اثر سیتوکنین‌های مختلف بر تکثیر گیلاس رقم Lapins در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج نشان داد که BA بهترین اثر را داشته است [۳۲]. ریزنمونه‌های گرفته شده از درختان بالغ گیلاس از نظر ظرفیت اندام‌زایی تحت تیمارهای هورمونی گیاهی مختلف مورد سنجش قرار گرفتند. بیشترین میزان تکثیر شاخساره‌ها در ترکیب هورمونی ۶- بنزیل آمینو پورین و تیدیازارون به‌دست آمد [۶]. در مطالعه‌ی دیگر اثر سه نوع سیتوکین (BA، Kin و 2iP) و اکسین (IBA، NAA و IAA) برای بهینه‌سازی کشت گیلاس مورد آزمایش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل اثر هر ۳ سیتوکینین بر فاز تکثیر گیلاس نشان داد که BA بهترین نتایج را داد. همچنین ثابت شد که IBA از نظر درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه در هر ریزنمونه ریشه‌دار و طول ریشه در مقایسه با IAA و NAA، هورمون ریشه‌زایی بهتری برای گیلاس بود [۱۶]. در گزارش نداف و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که درصد زنده‌مانی و نرخ تکثیر و همچنین رشد طولی شاخه تولیدی ریزنمونه‌های مریستم در ارقام مختلف گیلاس تقریباً مشابه بود ولی در بین تیمارهای کشت تفاوت زیادی مشاهده شد، به‌طوری‌که محیط کشت MS کامل با یک میلی‌گرم در لیتر BA در همه شاخص‌ها دارای بالاترین میزان بود [۲۱].

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نوع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گیلاس و همچنین ارزیابی پتانسیل کشت مریستم در حذف ویروس‌ها از گیاهان آلوده گیلاس و استفاده از ریزپیوندک‌های سالم در تولید نهال‌های عاری از ویروس می‌باشد.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

مواد و روشها

استقرار ریزنمونه های جوانه جانبی: به منظور ریزازدیادی و کشت مریستم نمونه‌های گیاهی از شاخساره‌های نهال گیلاس (*Prunus avium* L.) ژنوتیپ امید بخش OSH متعلق به موسسه تحقیقات علوم باغبانی کرج تهیه شد. به منظور تعیین مناسب ترین محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد جهت استقرارگیلاس، پس از پیش سترون‌سازی و سترون‌سازی با تریتون ۲۰، الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ریزنمونه‌های جوانه جانبی به ۵ محیط‌کشت پایه MS [۲۰]، DKW [۵] ، WPM [۱۴] ، mQL (modified QL) [۱۳] و QL [۲۹] با هورمون BA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، GA_3 (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین هورمون IBA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند.

ارزیابی ساختار تشریحی مریستم راس شاخه برای کشت مریستم: به منظور شناسایی بهترین مرحله نموی و اندازه مریستم برای تهیه ریزنمونه مریستم، سرشاخه‌ها در ابتدای صبح جمع‌آوری شده و به مدت ۲۴ ساعت در FAA70 (فرمالدئید، اتانول ٪۷۰ و استیک اسید) تثبیت گردید. پس از شست‌وشو، نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد ذخیره شد. به منظور برش‌گیری، از روشهای معمول سلول- بافت شاختی استفاده شد [۳۴]. نمونه‌ها به ترتیب در سری‌های افزایشی الکل آبگیری، در سری‌های افزایشی تولوئن شفاف‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شدند و در نهایت از آنها با میکروتوم با ضخامت ۷-۶ میکرومتر برش تهیه شد. نمونه‌ها با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند [۳]. اسلایدهای تهیه شده با میکروسکوپ نوری (E200, Nikon, Tokyo, Japan) مورد بررسی دقیق و عکس‌برداری قرار گرفتند.

کشت مریستم راس شاخه: پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی ریزنمونه‌ها حاوی جوانه جانبی یا یک جوانه راسی با توئین ۲۰، اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ ٪ صورت گرفت. مریستم‌ها پس از تشخیص بهترین مرحله نموی و اندازه که از بررسی برشهای میکروتومی حاصل شد، در زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از گراتیکول مدرج بوسیله تیغ اسکالپل در اندازه‌های حدود ۶۰۰ میکرو متری از جوانه‌های راسی و جانبی جدا شده در پتری‌دیش کشت شدند. به منظور بررسی عوامل موثر بر میزان موفقیت مرحله استقرار، ریزنمونه‌های مریستمی در محیط‌کشت‌های پایهQL، MS و B_5 دارای اسید آسکوربیک (صفر و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و هورمون BA (۱ میلی‌گرم بر لیتر) مستقر شدند. نمونه‌ها به اتاقک رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت ۲ ماه درصد استقرار مورد بررسی قرار گرفت.

پرآوری شاخه‌ها و ریشه‌زایی: شاخه های استقرار یافته به‌منظور تکثیر به محیط پرآوری MS و DKW با غلظت هورمونی BA (۰/۸، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و هورمون IBA (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. در این مرحله تعداد شاخه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. ریشه زایی در ساقه‌های طویل شده از مرحله پرآوری در محیط ½MS دارای هورمون NAA (۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد. بعد از گذشت ۲ ماه درصد ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی گیاهان باززایی شده عاری از ویروس با استفاده از تکنیک RT-PCR: گیاهان باززایی شده از مریستم به منظور تایید عاری از ویروس بودن با استفاده از تکنیک RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور استخراج RNA از گیاه درون شیشه‌ای گیلاس حاصل از کشت مریستم با استفاده از مینی کیت گیاهی TOPAZ GENE (Cat. No: TGK2004)، بررسی

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

کیفیت RNA استخراج شده، سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت پارس توس، واکنش PCR به منظور تکثیر cDNA بر اساس آغازگرهای ویژه مربوط به دو ویروس رایج گیلاس (PDV و PNRSV) (جدول ۱) و الکتروفورز انجام شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال	%GC
PNRSV-F	5' GAGCCTGAGTCGATGATCCA 3'	۵۸/۹۶	۵۵
PNRSV-R	5' CACCAGTCCATTTAGCCTGC 3'	۵۸/۹۰	
PDV-F	5' TTGATTCGGTGCGTTTCTGG 3'	۵۹/۱۳	۵۰
PDV-R	5' ACAACTTAGCTGGGTTCGGT 3'	۵۹/۲۴	

ریزپیوندی پیوندک‌های عاری از ویروس بر روی پایه های رویشی: به منظور انجام ریزپیوندی پیوندکهای عاری از ویروس، از گیلاس رقم MAXMA 14 به عنوانه پایه پیوند استفاده شد. سرشاخه های این پایه رویشی از گلخانه موسسه تحقیقات علوم باغبانی کرج تهیه شدند. ریز نمونه های شاخه ای حاوی جوانه جانبی پایه رویشی MAXMA 14 بعد از سترون‌سازی درون محیط کشت پایه DKW حاوی غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA کشت داده شدند. شاخه های رشد یافته بعد از شش هفته آماده دریافت پیوند بودند. برای تهیه ریزپیوندک، از ریز شاخه‌های حاصل از رشد مریستم گیلاس ژنوتیپ امیدبخش OSH ، که دارای رشد مطلوب‌تری بوده و اندازه ای حدود ۱ تا ۲ سانتی متر داشته و حاوی جوانه انتهایی و چند برگ کوچک بود، استفاده شد. پیوند اسکنه ای در شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام گرفت. گیاهان پیوند زده شده در محیط کشت پایه DKWحاوی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA کشت داده شدند. گیاهان پیوندی در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و میانگین دمای ۲۵ **C** قرار گرفتند. سه هفته بعد از پیوند به تدریج علائم رشد در پیوندک دیده شد. گیاهان رشد یافته پس از ۲ ماه به محیط ریشه زایی شامل نمکهای MS ½ حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بعلاوه‌ی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA منتقل شدند و تشکیل ریشه دادند.

بررسی‌های آماری: در این مطالعه، تمام محاسبات آماری با ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS توسط آزمون مقایسه‌ای دانکن به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

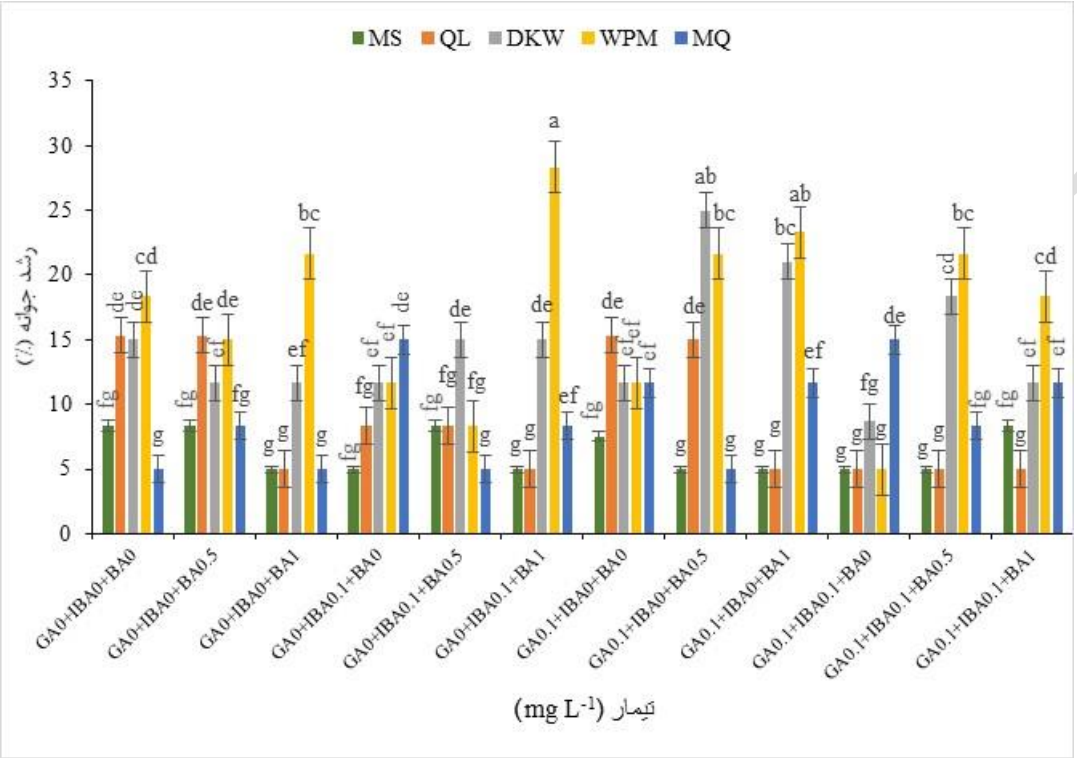
نتایج

بهینه‌سازی کشت بافت: جهت بهینه‌سازی محیط کشت برای استقرار جوانه‌ها، پنج نوع محیط کشت پایهMS، DKW، WPM، QLو mQL همچنین سه هورمون BA، IBA و GA_3 در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر متقابل محیط کشت، BA، IBA و GA3 بر استقرار جوانه‌ها در سطح P<۰/۰۱ معنی‌دار بود. در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در محیط کشت WPM بیشترین درصد استقرار به میزان

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

۲۸٪ مشاهده شد (شکل ۱). در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA بعلاوه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر GA3 دو محیط WPM و DKW با سه محیط MS، MQ و QL اختلاف معنی‌دار داشتند. در این تیمار بالاترین درصد رشد جوانه در محیط WPM به میزان ۲۱ درصد مشاهده شد (شکل ۱).



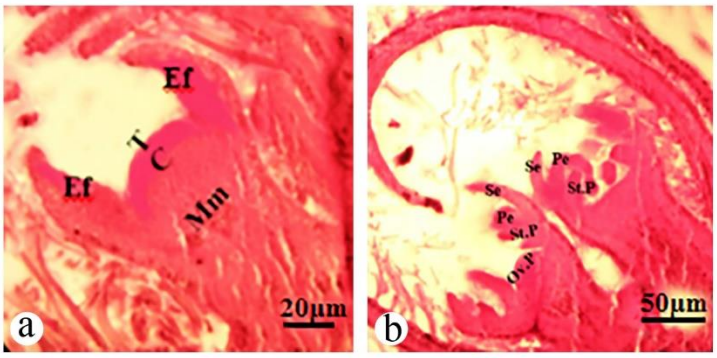
شکل ۱. میانگین درصد استقرار جوانه‌ها در محیط‌کشت پایه MS، DKW، WPM، mQL و QL تحت تیمارهای هورمونی BA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، GA3 (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر). حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.

بررسی ساختار تشریحی مریستم رأس ساقه: در برش طولی مریستم راس ساقه توسط میکروتوم مشاهده شد که مریستم انتهایی ساقه از نوع مریستم‌های برجسته یا گنبدی شکل است. پس از رسیدن گیاه به مرحله بلوغ، مریستم رویشی با تحولاتی که می گذراند به مریستم زایشی تبدیل می‌شود. برش‌هایی که از مریستم راسی ساقه تا اوایل خرداد ماه گرفته شد در فاز رویشی قرار داشتند (شکل ۲a) و برش‌هایی که از خرداد ماه به بعد گرفته شد نشان داد که مریستم وارد مرحله‌ی زایشی شده است (شکل ۲b) و در نتیجه زمان نمونه برداری در کشت بافت بسیار اهمیت دارد. مطالعه بافت شناسی روی نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌ها در اندازه‌هایی در حدود ۰/۶ میلی‌متر فاقد آوند هستند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان بخش مریستمی جهت کشت بافت استفاده کرد (شکل ۳).

تاثیر محیط‌کشت‌های پایه و اسید آسکوربیک بر استقرار مریستم: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل محیط کشت و اسید آسکوربیک بر درصد استقرار مریستم معنی‌دار بوده است ($P\leq0.05$). نتایج نشان داد که بیشترین درصد استقرار مریستم در محیط کشت QL حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و یک میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد (شکل

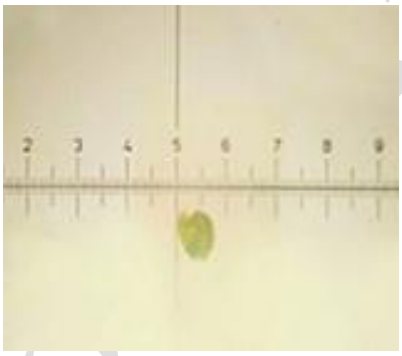
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

۴ و۵) هرچند در محیط B5 و MS اختلاف معنی‌داری در درصد استقرار مریستم‌ها در حضور و عدم حضور اسید آسکوربیک در محیط کشت وجود داشت.

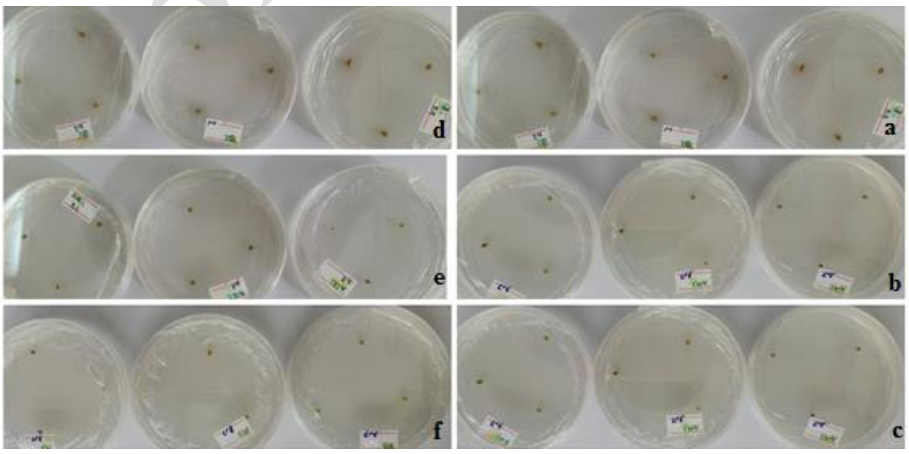


شکل ۲. برش طولی مریستم راسی ساقه. a) مریستم رویشی b) مریستم زایشی.

T: تونیکا، C: کورپوس، Mm: مریستم مغز، Ef: طرح اولیه برگی(Ebauche foliar) ، Se: کاسبرگ، Pe: گلبرگ، St.P: پریموردیوم پرچم، Ov.P: پریموردیوم تخمدان

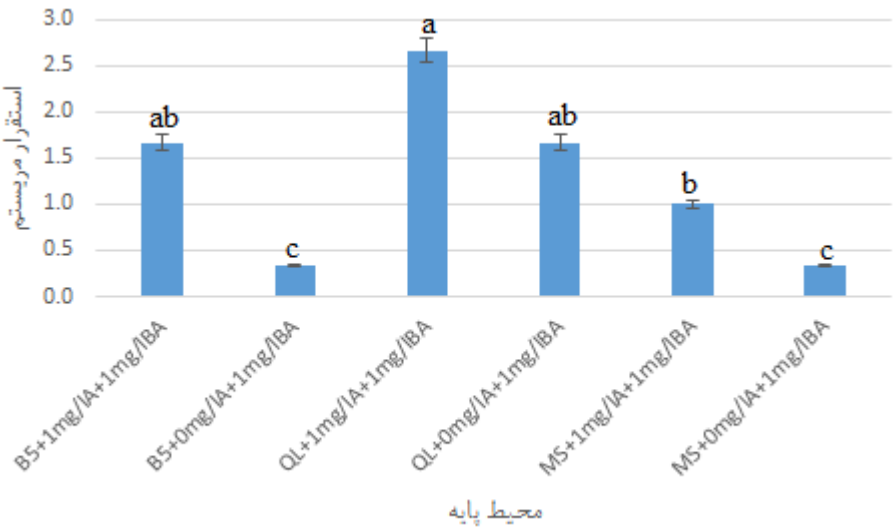


شکل ۳. جداسازی مریستم در اندازه‌ی ۰/۶ میلی‌متر با گراتیکول مدرج



شکل ۴. a) مریستم‌های ۱ روزه استقرار یافته در محیط QL؛ b) مریستم‌های ۱ روزه در محیط QL + آسکوربیک اسید؛ c) مریستم‌های ۱ روزه در محیط MS+ آسکوربیک اسید؛ d) مریستم‌های ۱ روزه در محیط B_5+ آسکوربیک اسید؛ e) مریستم‌های ۱ روزه در محیط MS؛ f)مریستم‌های ۱ روزه در محیط B_5

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357



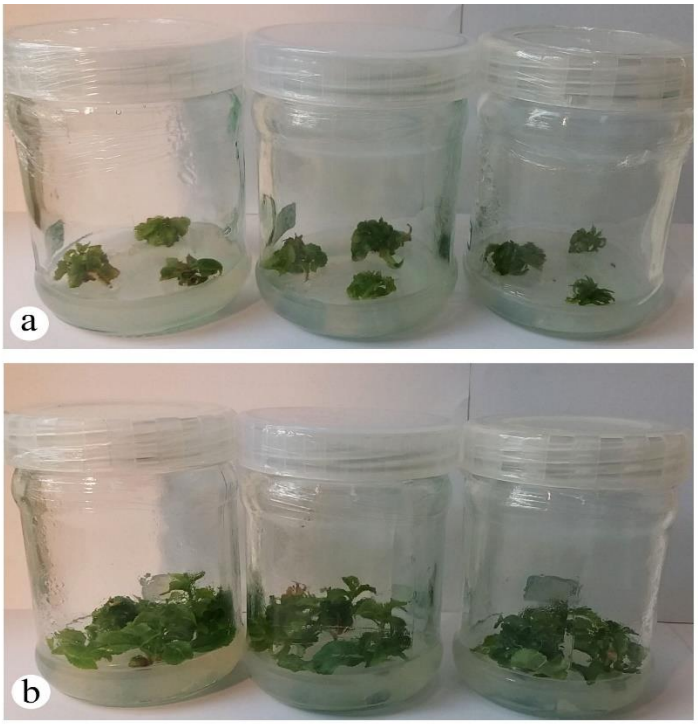
شکل ۵. میانگین درصد استقرار مریستم‌ها در محیط‌کشت‌های پایه QL، MS و B_5 دارای اسید آسکوربیک (صفر و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و هورمون BA (۱ میلی‌گرم بر لیتر). حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.

تکثیر گیاهان در محیط پرآوری: نمونه‌های حاصل از کشت مریستم بعد از گذشت سی روز به محیط پرآوری MS و DKW حاوی تیمارهای هورمونی مختلف BA و IBA منتقل شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر درصد شاخه‌زایی معنی‌دار بود ($P\leq0.01$). ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IBA بیشترین درصد شاخه‌زایی (۱۴/۶درصد) را نشان داد. در محیط MS حاوی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IBA کمترین درصد شاخه‌زایی (۳ درصد) مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷).

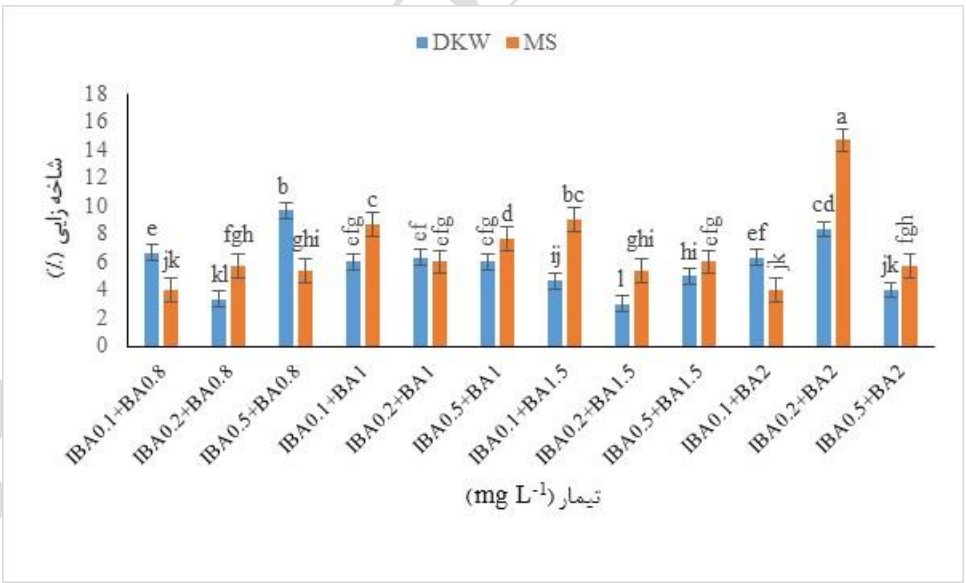
نتایج حاصل از ریشه‌زایی: ساقه‌های طویل شده، برای ریشه‌زایی به محیط ½ MS حاوی غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم برلیتر IBA و غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA منتقل شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل این دو هورمون بر درصد ریشه‌زایی به ازای هر ریزنمونه معنی‌دار بود ($P\leq0.01$). در تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بعلاوه‌ی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA میزان ریشه‌زایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین درصد ریشه‌زایی (۳۴ درصد) را نشان داد و تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و صفر NAA کمترین درصد ریشه‌زایی (۰/۶۶درصد) را به خود اختصاص داد (شکل ۸ و ۹).

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

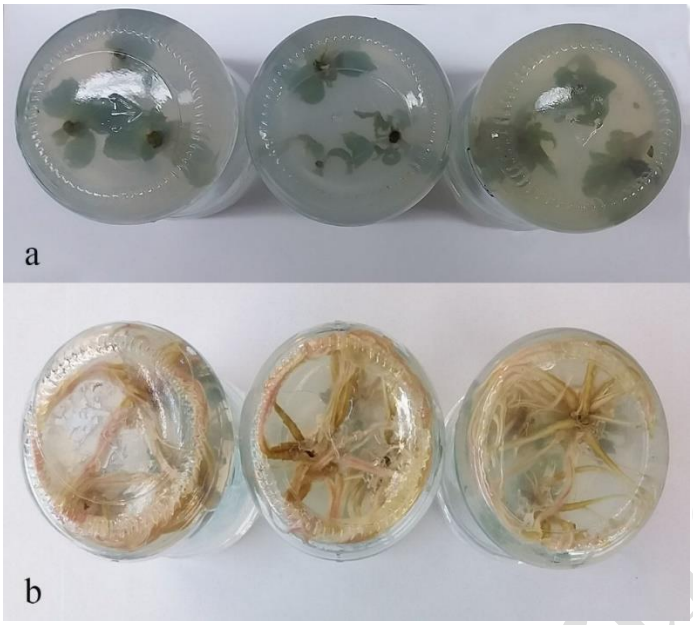


شکل ۶. مقایسه محیط کشت پایه و غلظتهای مختلف هورمونی در مرحله پرآوری: a) کمترین تعداد شاخه درمحیط کشتDKW حاوی غلظت۱/۵ و ۰/۲میلی‌گرم بر لیتر BA و IBA؛ b) بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS حاوی غلظت۲ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و IBA

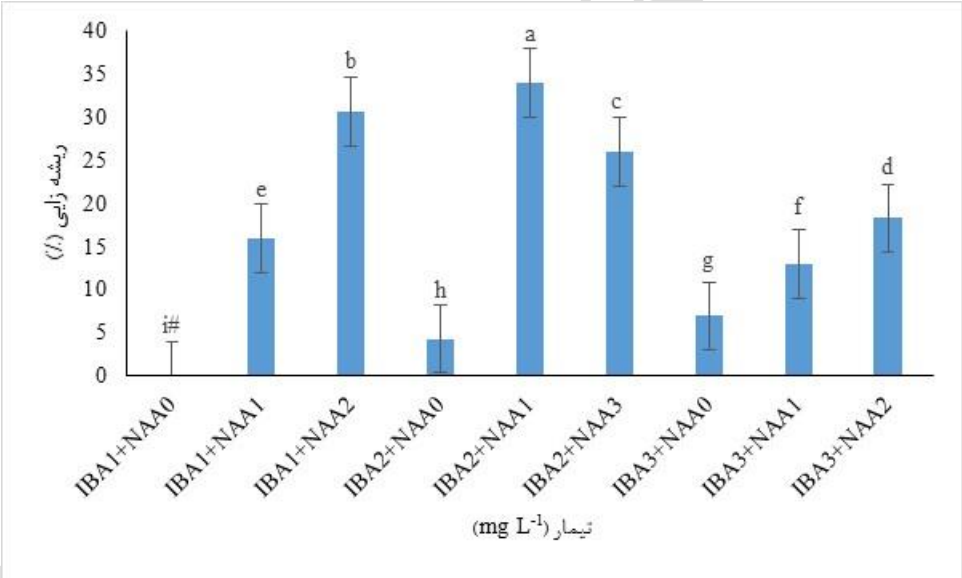


شکل ۷. درصد شاخه زایی در محیط پرآوری MS و DKW با غلظت هورمونی BA (۰/۸، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و هورمون IBA (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر). حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357



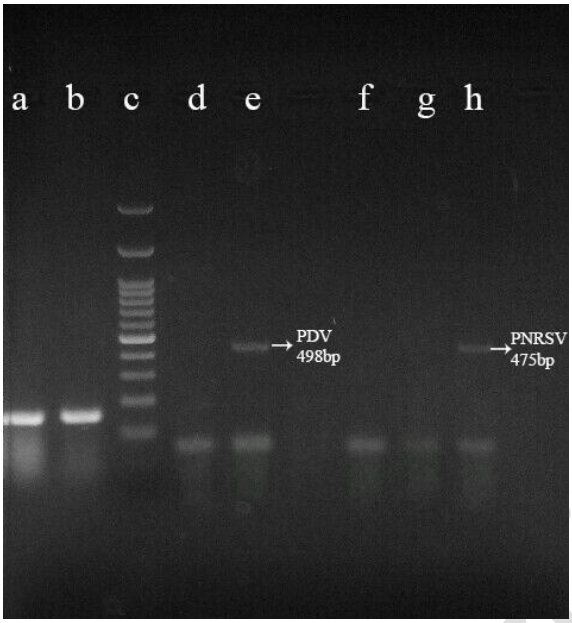
شکل ۸. مرحله ریشه‌زایی. a) کمترین تعداد ریشه درمحیط کشت حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیترIBA؛ b) بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA



شکل ۹. درصد ریشه‌زایی در محیط MS ۱/۲ دارای هورمون NAA (صفر، ۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) IBA (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر). حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است. # نشان‌دهنده‌ی مقادیر کمتر از ۱ درصد است.

ارزیابی گیاهان باززایی شده عاری از ویروس با استفاده از تکنیک RT-PCR: نتایج حاصل از بررسی RT-PCR نشان داد در هیچکدام از نمونه‌های گیاهی حاصل از کشت مریستم باندی وجود نداشت که دال بر آلوده بودن گیاهان حاصل از کشت بافت به دو ویروس شایع گیلاس(PNRSV و PDV) باشد (شکل ۱۰). در حالیکه این باندها در گیاهان مادری در باغ حضورداشتند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357



شکل ۱۰. تأیید عدم حضور ویروس با RT-PCR در گیاهان حاصل از کشت مریستم. چاهک‌های a,b: محصول PCR از ژن اکتین برای گیاه باغی و عاری از ویروس، چاهک c: Ladder 100 bp، چاهک d : گیاه باززایی شده عاری از ویروس، چاهک e : محصول PCR از ژن PDV گیاه باغی، چاهک f: کنترل منفی، g: گیاه باززایی شده عاری از ویروس، چاهک h : محصول PCR از ژن PNRSV گیاه باغی

ریزپیوندی پیوندک‌های عاری از ویروس: درصد گیرایی پیوند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از جمله نوع پیوند، اندازه‌ی پیوندک و نوع پایه می باشد. در بررسی‌های انجام شده از ریز شاخه‌های حاصل از کشت مریستم رقم OSH در اندازه‌های ۱-۰/۵ و ۲-۱ سانتی متر به عنوان پیوندک استفاده شد و بروی پایه رویشی MAXMA14 پیوند زده شد که بعد از گذشت ۴ هفته و تشکیل کالوس در محل پیوند و موفقیت‌آمیز شدن پیوند، پیوندک و پایه با هم رشد نمودند و می‌توان ریزپیوندی را به‌عنوان روشی برای ایجاد گیاه کامل با ویژگی‌های مطلوب به کار گرفت (شکل ۱۱).

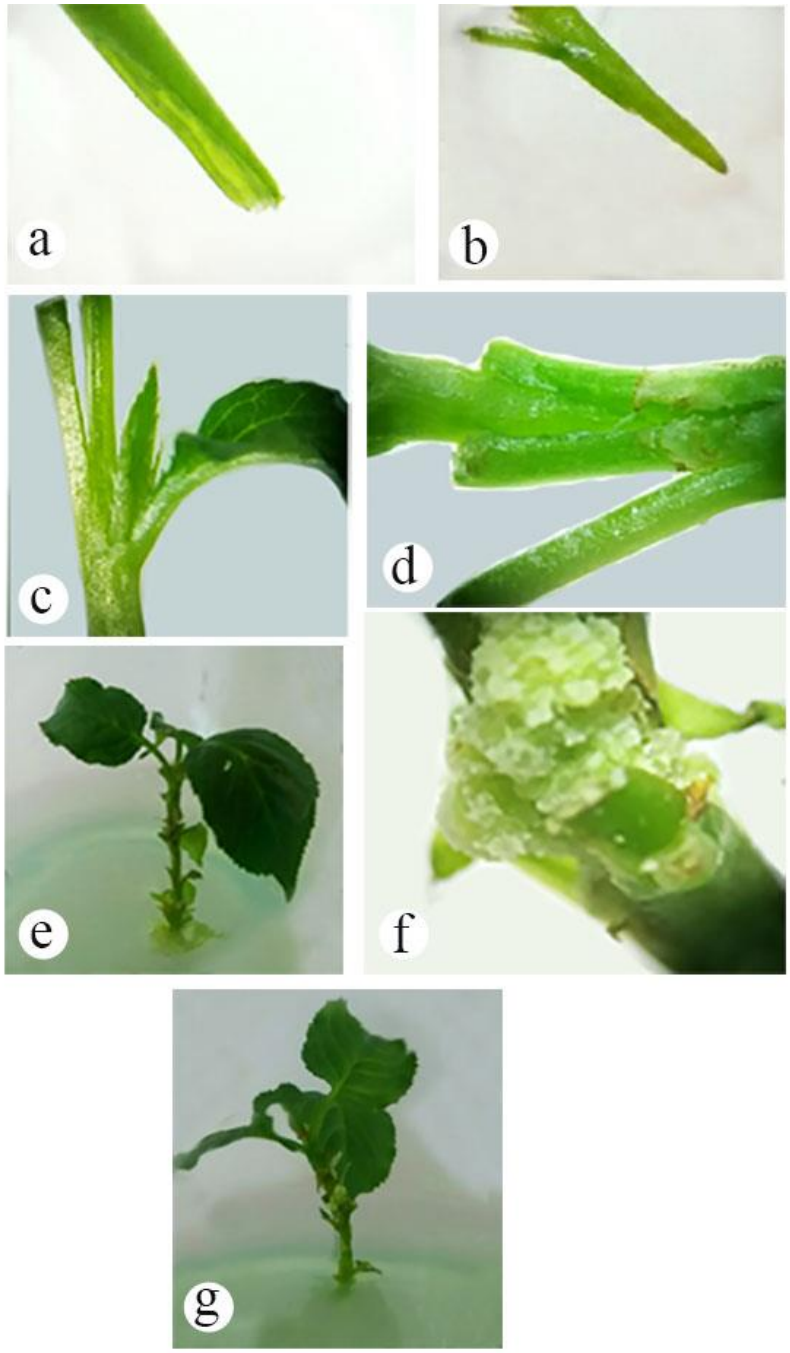
بحث و نتیجه گیری

تکثیر گیاهان چوبی با روش‌های سنتی با مشکلاتی همراه است. تکنیک کشت بافت می‌تواند این مشکلات را برطرف کند. مطالعات نشان داده است که گیاهان حاصل از این تکنیک قابلیت ریشه‌زایی بالاتری دارند، همچنین می‌توان با کشت درشیشه گیاهان سالم تولید کرد [۳۹ و ۴۲-۴۳].

در این پژوهش تأثیر پنج محیط کشت MS، DKW، QL،WPM و mQL بر روی رشد و میزان استقرار جوانه های جانبی گیلاس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد رشد جوانه‌های جانبی در محیط‌کشت‌های پایه و تیمارهای هورمونی دارای اختلاف معنی‌داری است. بیشترین درصد رشد جوانه در محیط کشت WPM با تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بعلاوه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و صفر میلی‌گرم GA_3 به‌دست آمد. محیط کشت MS پایین‌ترین درصد رشد شاخه را داشت. محیط کشت WPM در مقایسه با محیط MS سولفات پتاسیم جایگزین نیترات پتاسیم شده، ضمن اینکه مقدار یون سولفات در محیط WPM ۴ برابر بیشتر از مقدار آن در محیط MS است.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357



شکل ۱۱. مراحل مختلف ریزپیوندی. a) برش مورب یک طرف پیوندک؛ b) برش مورب دو طرف پیوندک؛ c) ایجاد شکاف در پایه؛ d) برقراری اتصال محکم بین پیوندک و پایه؛ e) گیاه در هفته اول بعد از پیوند زدن؛ f) تشکیل کالوس در محل پیوند؛ g) گیاه در هفته چهارم بعد از پیوند

به‌نظر می‌رسد محیط کشت MS به دلیل بالا بودن غلظت نمک‌های آن موجب کلروز و توقف رشد شده بنابراین در مرحله استقرار توصیه نمی‌شود. در این پژوهش استفاده از هورمون GA_3 تأثیر منفی بر کیفیت جوانه‌ها نشان داد، به‌طوری که بعضی از برگ‌ها علائم کلروزی را نشان دادند. رحمان و همکاران (۲۰۱۴) برای استقرار گلابی از محیط کشت MS و WPM استفاده کردند و گزارش کردند که بیشترین درصد استقرار مربوط به محیط کشت WPM بود [۳۰]. در کشت بافت زردآلو بیشترین درصد رشد جوانه در محیط WPM مشاهده شد [۲۶] که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

جدا کردن مریستم و کشت آن در اندازه کوچک که هم عاری از ویروس باشد و هم توانایی تولید گیاه سالم را داشته باشد کار بسیار دشواری است [۴۰]. مرحله‌ی استقرار در کشت مریستم از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا انتقال آن‌ها به مرحله پرآوری به استقرار اولیه مریستم‌ها بستگی دارد. ریزنمونه‌های استقرار یافته با طول شاخه ضعیف و کوچک تر، در مرحله پرآوری ضعیف‌تر از ریزنمونه‌های قوی عمل می‌کنند و پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به شرایط محیط کشت به همراه خواهند داشت [۳۳ و۴۳] تعادل مناسب بین نوع و غلظت هورمون‌ها در محیط کشت نه تنها می‌تواند درصد بقاء مریستم را بهبود بخشد، بلکه منجر به رشد بهتر و طویل شدن شاخساره‌ها می‌شود [۲۶].

طبق آزمایشات انجام شده در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد اثر متقابل نوع محیط کشت و اسید آسکوربیک بر استقرار مریستم‌ها تاثیر معنی‌داری داشته است. به‌نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت MS به علت داشتن میزان بالاتری از عناصر پرمصرف، تأثیر منفی در استقرار اولیه ریزنمونه‌ها داشته است. در مطالعه قبلی برای کشت درون شیشه‌ای گیلاس، بهترین نتایج را در محیط کشت QL گزارش کردند [۱] که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. سطح کلسیم در محیط پایه QL نسبت به محیط پایه MS بیشتر و همچنین سطح آمونیوم در محیط پایه QL نسبت به MS کمتر است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که بخشی از برتری محیط QL نسبت به محیط MS با افزایش محتوای کلسیم آن ارتباط دارد. بر اساس شرایط بهینه شده در این تحقیق محیط کشت QL با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک می‌تواند به‌عنوان بهترین محیط کشت برای استقرار مریستم‌های گیلاس بکار رود. همچنین محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بعلاوه‌ی اسید آسکوربیک کمترین درصد استقرار را نشان داد. یکی از مشکلات اساسی در کشت مریستم گیلاس نکروزه شدن آن است که در نتیجه با توقف رشد و از بین رفتن نمونه‌ها همراه است. نوع محیط کشت و ترکیبات اضافه شده به آن از فاکتورهای مهمی است که روی پاسخ نمونه‌ها به استقرار در محیط کشت اثر می‌گذارد. مقایسه حضور یا عدم حضور اسید آسکوربیک نشان داد که بیشترین درصد استقرار در حضور اسید آسکوربیک صورت گرفته که بیان‌گر تاثیر معنی‌دار اسید آسکوربیک بر استقرار مریستم‌ها است که با نتایج دلال و همکاران (۲۰۰۴) هم‌خوانی دارد [۴]. اسید آسکوربیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از روند اکسیداسیون جلوگیری می‌کند. علاوه‌بر نقش آنتی-اکسیدانی، در تقسیم و طویل شدن سلول‌ها نیز نقش دارد. اضافه کردن۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک به محیط کشت MS به‌عنوان یکی از بهترین روش‌ها جهت کنترل نکروزه شدن ریزنمونه های گلابی گزارش شده است [۲۷].

در این پژوهش با استقرار دادن گیاهان در محیط کشت‌های پایه و تحت تیمارهای هورمونی مختلف متناسب با نوع گونه گیاه نسبت به افزایش تعداد شاخه اقدام گردید. در ارتباط با نقش هورمون‌ها برای تکثیر گیاهان جنس *Prunus* گزارش‌های زیادی منتشر شده است. در این پژوهش از غلظت‌های مختلف هورمون BA و IBA استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بعلاوه ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA حاصل شد. اثر هم‌افزایی سیوکینین و اکسین برای گونه‌های مختلف تیره گل‌سرخیان گزارش شده است. غلظت‌های پایین اکسین مانع از ریخت‌زایی سلول می‌شود و تولید کالوس به دلیل تکثیر سلولی در نقش مصرف‌کننده ظاهر می‌شود که در این صورت می‌تواند اثر کاهنده در رشد ریزنمونه‌ها و تولید شاخه داشته باشد [۳۶].

محمود و همکاران (۲۰۰۸) در تکثیر هلو رقم Red June در شرایط درون شیشه‌ای بیشترین تعداد شاخه، ارتفاع شاخه و تعداد برگ در هر ریزنمونه رادر محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر BA گزارش کردند [۱۵]. بین محیط کشت‌های MS و DKW تفاوت‌هایی از نظر مقدار بعضی ترکیبات کم مصرف و پرمصرف وجود دارد و تفاوت در پاسخ به عملکرد کشت درون شیشه‌ای گیلاس مورد مطالعه در این پژوهش ناشی از همین تفاوت‌هاست که یکی از این موارد میزان

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

بیشتر نیترات در محیط کشت MS نسبت به محیط DKW است که با نتایج پژوهش حاضر به جهت رشد بهتر و افزایش تعداد شاخه‌ها همسویی دارد. نیترات و آمونیم منبع اصلی نیتروژن در محیط کشت است ولی نیترات بدلیل سهولت در جذب و غیر سمی بودن نسبت به آمونیم منبع بهتری از نیتروژن می‌باشد [۳۵].

در مرحله‌ی ریشه‌زایی بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA در محیط کشت MS ½ به‌دست آمد. در غلظت‌های بالاتر هورمونی درصدریشه‌زایی کاهش یافت. محققان دیگر نیز از محیط کشتMS ½ برای ریشه‌دهی ارقام گیلاس استفاده کردند [۹و ۳۲] و تاکید کردند که درصد ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد. این افزایش احتمالا به علت کاهش نیتروژن در محیط است. القای ریشه‌زایی توسط هورمون IBA وNAA در گونه‌های *Prunus* [۲۸] و زردآلوی مجارستانی [۲] گزارش شده است. مطالعات نشان داده با افزایش غلظت IBA تا حدود ۲/۵-۲ میلی‌گرم بر لیتر، رشد ریشه ادامه یافته و در غلظت‌های پایین و بالاتر از این رشد آن محدود گردیده [۱۱] که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

نتایج RT-PCR نشان داد که گیاه حاصل از کشت مریستم به هیچ‌کدام از ویروس‌های PDV و PNRSV آلوده نبود نتایج حاصل با نتایج سایر مطالعات که سنجش مولکولی RT-PCR را بر روی نمونه‌های گیلاس آلوده به ویروس Prunus PNRSV) (Necrotic Ring Spot Virus و PDV (Prune Dwarf Virus) انجام دادند همسویی دارد [۱۶ و ۴۴].

ریزپیوندی به فاکتورهای مهمی از جمله روش پیوند زدن و اندازه‌ی پیوندک در ریزپیوندی بستگی دارد. Amiri (۲۰۰۶) نیز به نوع پیوند و اندازه پیوندک اشاره و پیشنهاد کرده است که پیوندک‌های به دست آمده از مریستم‌های گیلاس رقم سیاه مشهد که به مدت ۶-۵ هفته در محیط کشت در شرایط درن شیشه‌ای رشد داده شدند بالاترین موفقیت در گیرایی پیوند را نشان دادند [۱]. در این پژوهش نیز مریستم‌ها ابتدا در محیط کشت مناسب رشد داده شدند پس از آن‌که به اندازه مناسب رسیدند از آن‌ها به عنوان پیوندک بروی پایه رویشی استفاده شد و پیوند موفق اسکنه انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که اندازه‌های بزرگ‌تر پیوندک (در حدود ۲-۱سانتی‌متر) موفقیت بیشتری در گیرایی پیوند دارند. پیوندک‌هایی که اندازه‌ی بزرگتری دارند به آسانی با حلقه‌ی کامبیومی پایه ارتباط برقرار می‌کنند و جذب آب و عناصر غذایی راحت‌تر صورت می‌گیرد [۲۲]. در ریزپیوندی، از پایه‌ی رویشی MAXMA 14 استفاده شد چرا که این پایه پر رشد بوده و توانایی بیشتری برای سازگاری و انتقال آب و عناصر غذایی دارد. درصد بالای ریزازدیادی گیلاس، تولید گیاهان عاری از ویروس و موفقیت در ریز پیوندی گیلاس رویکرد مناسبی برای تکثیر ارقام تجاری ارزشمند و سالم درختان میوه بویژه گیلاس ارائه می نماید.

نتیجه‌گیری کلی: پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر نوع محیط‌کشت و تنظیم‌کننده های رشد بر کشت در شیشه مریستم گیلاس ژنوتیپ امیدبخش OSH انجام شد. از ۵ محیط‌کشت پایه (MS، DKW، WPM، mQL وQL) محیط کشت WPM بیشترین درصد استقرار جوانه های جانبی گیلاس را نشان داد. نکروز شدن ریزنمونه های درختی به دلیل آزاد سازی فنل از ترکیبات دیواره‌ای یکی از مشکلات ریزازدیادی این گیاهان می باشد. بکارگیری اسید اسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، قهوه‌ای شدن نمونه‌ها را در برخی محیط‌ها به‌شدت کاهش داد. محیط‌کشت QL غنی شده با اسیداسکوربیک بیشترین درصد استقرار مریستم را به دنبال داشت. در محیط پرآوری بیشترین درصد شاخه‌زایی از محیط‌کشت MS بدست آمد. ریشه‌زایی در محیط کشت ½MS با تیمار هورمون‌های اکسینی حاصل شد.

مریستم به دلیل تمایز نیافتن دستجات آوندی و غلظت بالای اکسین اجازه تکثیر ویروس را نمی‌دهد از این‌رو از روش کشت مریستم به‌منظور دستیابی به گیاهان عاری از ویروس استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی RT-PCR به‌منظور بررسی حضور دو

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

ویروس شایع گیلاس (PNRSV و PDV) نشان داد در هیچکدام از نمونه‌های گیاهی حاصل از کشت مریستم آلودگی ویروسی وجود نداشت. از این گیاهان عاری از ویروس به‌عنوان پیوندک بر روی پایه رویشی MAXMA 14 استفاده شد. نتایج نشان داد که کشت مریستم ابزاری کارآمد برای تولید گیاهان عاری از ویروس به منظور تامین پیوندک‌های سالم در گیلاس است.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه خوارزمی و موسسه تحقیقات علوم باغبانی پژوهشکده میوه های معتدله برای فراهم آوردن امکانات کشت بافت و ریزپیوندی تشکر می نمایند

منابع

1-Amiri ME (2006). In vitro techniques to study the shoot-tip grafting of *Prunus avium* L. (cherry) var. Seeyahe Mashad. J Food Agric Environ. 4(1): 151-154.

2- Balla I. Vertesy J (2000). In vitro culture of Hungarian apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Acta Horticulturae 560: IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. 560: 395-398. http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.75

3- Chehregani A. Malayeri B. Yousefi N (2009). Developmental stages of ovule and megagametophyte in *Chenopodium botrys* L. (Chenopodiaceae). Turk J Bot. 33(2): 75-81.

4- Dalal MA. Biswajit Das BD. Rather MA. Sheikh Bilal SB (2004). Effect of media additives, incubation culture conditions and subculturing on control of oxidative browning in in-vitro culture of apple (Malus domestica). Indian J Agric Sci. 74(11):600-603.

5- Driver J.A. Kuniyuki A.H (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience. 19(4): 507-509. https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507

6- Ďurkovič J (2006). Rapid micropropagation of mature wild cherry. Biol Plant. 50: 733-736. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10535-006-0118-x

7- Ebrahimi M. Habashi AA. Emadpour M. Kazemi N (2022). Recovery of virus-free Almond (*Prunus dulcis*) cultivars by somatic embryogenesis from meristem undergone thermotherapy. Sci rep. 12(1): 14948. https://doi.org/https:doi.org/10.1038/s41598-022-19269-3

8- Etienne H. Guyot R. Beulé T. Breitler JC. Jaligot E (2016). Plant fidelity in somatic embryogenesis-regenerated plants. In Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications (pp. 121-150). Springer, Cham. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_8

9- Fotopoulos S. Sotiropoulos T (2005). In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. Agron Res. 3(1): 3-8. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00040950

10- Gambino G. Bondaz J. Gribaudo I (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. Eur J Plant Pathol. 114: 397-404. https://doi.org/10.1007/s10658-006-0004-6

11- Hutchinson JF. Zimmerman RH (1987). Tissue culture of temperate fruit and nut trees (Vol. 9). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/9781118060827.ch8

12- Kumar V. Sharma A. Narasimha Prasad BC. Gururaj HB. Giridhar P. Ravishankar GA (2007). Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. Acta Physiol Plant. 29: 11-18. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11738-006-0002-5

13- Leblay C. Chevreau E. Raboin L (1991). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, tiss organ cult. 25: 99-105. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00042180

14- Lloyd G. McCown B (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel,

Preprint of Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Int Plant Prop Soc. 30: 421-427.

15- Mahmood AM. Duhoky MS. Salman A (2008). In vitro Propagation of Peach (*Prunus persica* L.) cv." red june". J Duhok Univ. 12(11): 67-73. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21608/hjsc.2018.59116

16- Manganaris GA. Economou AS. Boubourakas I. Katis NI (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. Plant Cell Rep. 22: 195-200. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00299-003-0681-y

17- Mansseri-Lamrioui A. Louerguioui A. Bonaly J. Yakoub-Bougdal S. Allili N. Gana-Kebbouche S (2011). Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. Afr J Biotechnol. 10(43): 8613-8624. https://doi.org/https://doi.org/10.5897/AJB11.450

18-Massart S. Brostaux Y. Barbarossa L. César V. Cieslinska M. Dutrecq O. Fonseca F. Guillem R. Laviña A. Olmos A. Steyer S. Wetzel T. Kummert J. Jijakli MH (2008). Interlaboratory evaluation of a duplex RT-PCR method using crude extracts for the simultaneous detection of Prune dwarf virus and Prunus necrotic ringspot virus. Eur J Plant Pathol. 122: 539-547. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9322-1

19- Mochizuki T. Ohki ST (2015). Detection of plant virus in meristem by immunohistochemistry and in situ hybridization. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/https:/doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_20

20- Murashige T. Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol plant. 15(3). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

21- Naddaf ME. Rabiei GR. Moghadam EG. Mohammadkhani A (2019). Effect of culture medium and growth regulator in meristem culture of sweet cherry. IJHS. 50(3). https://doi.org/https://doi.org/10.22059/ijhs.2018.249980.1378

22- Navarro L. Llácer G. Cambra M. Arregui J. Juárez J (1982). Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* batsch). Acta Horticulturae 130: XII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. 130: 185-192. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1983.130.32

23- Olah R. Turcsan M. Olah K. Farkas E. Deak T. Jahnke G. Sardy DAN (2022). Somatic embryogenesis: a tool for fast and reliable virus and viroid elimination for grapevine and other plant species. Horticulturae. 8(6): 508. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/horticulturae8060508

24- Oliver JE. Freer J. Andersen RL. Cox KD. Robinson TL. Fuchs M (2009). Genetic diversity *of Prunus necrotic* ringspot virus isolates within a cherry orchard in New York. Plant Disease 93: 599-606. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0599

25- Panattoni A. Luvisi A. Triolo E (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. SJAR. 11(1): 173-188. https://doi.org/http:/dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201

26- Perez-Tornero O. Lopez J. Egea J. Burgos L (2000). Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. J Hortic Sci Biotech. 75(3): 283-286. https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511238

27- Poudyal BK. Du G. Zhang Y. Liu J. Shi Q (2008). Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for in vitro culture. Frontiers of Agriculture in China. 2: 321-330. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11703-008-0035-1

28- Pruski KW. Lewis T. Astatkie T. Nowak J (2000). Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. Plant Cell Tiss Organ Cult. 63: 93-100. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1006461423373

29- Quoirin M. Lepoivre P (1977). Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. Acta hortic. 1977. 78: 437-442 https://doi.org/https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.54

30- Rehman HU. Gill MIS. Dhillon WS. Bedi S (2014). Micropropagation of Patharnakh (*Pyrus pyrifolia* (burm f.) Nakai) pear using explants obtained from forced cuttings. IJASVM. 2(2): 54-65. https://doi.org/https://doi.org/10.15835/nbha361108

31- Rubio M. Martínez-Gómez P. Marais A. Sánchez-Navarro JA. Pallás V. Candresse T (2017). Recent advances and prospects in *Prunus* virology. Ann Appl Biol. 171(2): 125-138.

In-proof Article

https://doi.org/https://doi.org/10.1111/aab.12371

32- Ružić Đ. Vujović T (2008). The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). Hortic Sci. 35(1): 12-21. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17221/646-HORTSCI

33- Sahraroo A. Zarei A. Babalar M (2019). In vitro regeneration of the isolated shoot apical meristem of two commercial fig cultivars 'Sabz'and 'Jaami-e-Kan'. Biocatal Agric Biotechnol. 17: 743-749. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.024

34- Sanderson J (2020). Biological microtechnique. Garland Science.

35- Shanjani PS (2003). Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. Int J Agric Biol. 5(4): 419-422 .

36- Szabó LK. Desiderio F. Kirilla Z. Hegedűs A. Várallyay É. Preininger É (2024a). Elimination of cherry virus A from *Prunus domestica* 'Besztercei Bt. 2'using in vitro techniques. Plant Cell Tiss Organ Cult (PCTOC). 157(2): 45. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02770-0

37- Szabó LK. Desiderio F. Kirilla Z. Hegedűs A. Várallyay É. Preininger É (2024b). A mini-review on in vitro methods for virus elimination from *Prunus* sp. fruit trees. Plant Cell Tiss Organ Cult (PCTOC). 156(2): 42. https://doi.org/https:/doi.org/10.1007/s11240-023-02670-9

38- Turcsan M. Demian E. Varga T. Jaksa-Czotter N. Szegedi E. Olah R. Varallyay E (2020). Hts-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine. Plants. 9(12): 1782. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants9121782

39- Vesaltalab Z. and Gholami M (2022). The effect of plant growth regulators on induction and callus growth in four grape cultivars with the aim of resveratrol extraction. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 35(1): 158-173. InPersian. https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

40- Walkey D (1981). Production of virus-free plants by tissue culture. Blackwell Scientific Publications.

41- Welk E. De Rigo D. Caudullo G (2016). Prunus avium in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European atlas of forest tree species. Publ. Off. EU, Luxembourg. pp. *e01491d*.

42- Zarei M. Alizadeh M.. Khorasaninejad S. Khoshal Sarmast M (2023). Application of activated charcoal and carbon nanotubes on phenol exclusion from tissue culture media in Grapevine and Paulownia. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 36: 46-61. In Persian https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5

43- Zarghami R. Ahmadi B (2023). Production of plum pox virus-free and *Prunus* necrotic ringspot virus-free regenerants using thermotherapy and meristem-tip culture in *Prunus persica* L. Erwerbs-Obstbau. 65(4): 719-727. https://doi.org/10.1007/s10341-022-00731-5

44- Zong XiaoJuan ZX. Wang WenWen WW. Wei HaiRong WH. Wang JiaWei WJ. Chen Xin CX. Xu Li XL. Zhu DongZi ZD. Tan Yue TY. Liu QingZhong LQ (2014). A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses from sweet cherry. Sci Hortic. 180: 118-122. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.017

Proof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۲۷-۲۱۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.8461.3357

The effect of different basic culture media on cherry (*Prunus avium* L.) micropropagation, meristem cultivation and micrografting of virus-free scions

Parisa Jonoubi[1], Naser Bouzari[2], Zohreh Shirkhani[1], Maryam Maleki[1]

[1]Deptartment of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran;

[2]Temperate and Cold Fruits Research Institute (TCFRI), Horticulture Science Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Traditional plant propagation, aside from being slow, can also lead to the spread of plant diseases, with viral infections being particularly concerning. To address these issues, the cultivation of meristems through in vitro culture and the development of micropropagation protocols are crucial tools. This study aimed to investigate the impact of different growth media and regulators on meristem cultivation in cherry cv. OSH using a factorial experiment design. Five culture mediums (MS, DKW, WPM, mQL, and QL) with various hormones (BA, GA_3, and IBA) were tested to determine the most effective combination for establishment percentage. The results showed that the WPM culture medium with a hormone concentration of 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} IBA had the highest establishment percentage (28%). Three culture media (MS, B5, and QL) with ascorbic acid (0 and 1 mg L^{-1}) were tested to determine the most effective combination for establishment of cherry meristem. The QL culture medium containing 1 mg L^{-1} of ascorbic acid and 1 mg L^{-1} of BA exhibited the highest meristem establishment percentage (2.6%). The MS medium with a hormone concentration of 2 mg L^{-1} BA and 0.2 mg L^{-1} IBA showed the highest shoot proliferation percentage (14.6%). Additionally, the ½MS culture medium with a hormonal treatment of 2 mg L^{-1} IBA plus 1 mg L^{-1} NAA significantly increased rooting rates, resulting in the highest rooting percentage (34%). Furthermore, the results of RT-PCR analysis indicated that none of the plant samples obtained from the meristem culture were infected with common cherry viruses (PNRSV and PDV). Successful grafting was achieved using scions of 1-2 cm in size on Maxma 14 rootstock. Overall, this study highlights the effectiveness of meristem culture in eliminating viruses from infected cherry plants, offering the potential to produce disease-free propagation material.

Key words: Ascorbic acid, MS, DKW, WPM, mQL, QL

Proof Article