

Production of *Malus domestica* L. virus free via meristem culture and the effects of pectin and phloroglucinol on its proliferation

Parissa Jonoubi 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: jonoubi@khu.ac.ir

Zohreh Shirkhani 

Assistant Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: z.shirkhani@khu.ac.ir

Maedeh Nosoochian 

MSc graduate, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: nosoochianmaedeh@gmail.com

Abstract

Objective

Meristem culture is a method used to produce virus-free plants. This study aimed to eliminate common viruses affecting *Malus domestica* L. Additionally, the investigation focused on the effects of two compounds, pectin and phloroglucinol, on improving branching and rooting.

Materials and methods

Lateral and apical bud explants were collected at three different time points in July, August, and September. The establishment of meristems was assessed using various concentrations of BA hormones. Explants derived from meristem growth were then transferred to an MS propagation medium supplemented with BA and GA3 hormones. After identifying the most suitable culture medium for propagation, the explants were moved to an optimal medium containing pectin and phloroglucinol to examine their effects on shoot length, shoot number, and leaf development. Rooting of elongated stems from the propagation stage was performed in MS $\frac{1}{2}$ medium with NAA and IBA hormones. Additionally, an experiment was conducted to evaluate the influence of phloroglucinol on rooting percentage. To confirm their virus-free status, regenerated plants from meristems were tested using RT-PCR.

Results

The results indicated that explants collected in the latter half of July in MS medium with a concentration of 1 mg L⁻¹ BA showed the highest establishment percentage (26.66%). The optimal medium for promoting stem elongation contained 1 BA and 1 mg L⁻¹ GA3. The highest leaf development was observed in MS medium with 1 mg L⁻¹ BA and without GA3. The

interaction between BA and GA₃ significantly affected the number of secondary branches, whereas no significant effect was observed on the number of primary branches. Adding pectin in the proliferation stage increased the stem length (45%) and the branch number (82.6%). Incorporation of phloroglucinol into the medium led to a 24% increase in stem length but a 39.13% decrease in branch quantity. The highest rooting percentage (34%) was observed in ½ MS medium treated with 1 IBA plus 0.5 mg L⁻¹ NAA. Phloroglucinol treatment diminished the rooting percentage while increasing the average number of roots per explant. RT-PCR analysis of the plant samples derived from meristem culture did not reveal any bands indicative of viral infection.

Conclusions

This research demonstrated that meristem culture is an effective technique for generating virus-free red-fleshed apple plants. Additionally, the RT-PCR method proved to be sufficiently precise for virus detection. Taking all factors into account, the application of pectin and phloroglucinol can serve as two dependable compounds to enhance branching during meristem culture.

Keywords: hormone, lateral bud, regeneration, root induction

Paper Type: Research Paper.

Citation: Jonoubi, P., Shirkhani, Z., & Nossohian, M. (2026). Production of *Malus domestica* L. virus free via meristem culture and the effects of pectin and phloroglucinol on its proliferation. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(3), 27-54.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(3), 27-54.

DOI: 10.22103/jab.2026.25499.1725

Received: March 10, 2026.

Received in revised form: May 04, 2026.

Accepted: May 05, 2026.

Published online: June 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Red-fleshed apple (*Malus domestica* L.), belonging to the Rosaceae family and the Maloideae subfamily, is extensively cultivated across the globe, predominantly in temperate regions, and has significant economic importance. Iran is recognized as a center of genetic diversity for apples, particularly for the Red-fleshed apple varieties prevalent in Central Asia. However, only small populations of wild Red-fleshed apple trees persist in northern, northeastern, and northwestern regions of Iran, and this variety is critically endangered. In commercial apple cultivars, viral pathogens such as ACLSV, ASGV, and ASPV are the most common viruses and severely reduce the growth and productivity of infected trees. Currently, conventional methods for controlling viral infections in plants are lacking. Consequently, the selection and propagation of healthy, virus-free mother plants are imperative to mitigate productivity losses and maintain fruit quality. Producing virus-free planting material is thus a vital strategy to prevent economic

damage caused by viral diseases. The meristem culture technique offers an effective approach for eliminating viruses and producing pathogen-free plant material. This method is widely employed in horticultural plants for virus eradication. The rapid cell division and growth in meristematic tissues, coupled with the limited vascular connection between the meristem and underlying tissues, facilitate the formation of virus-free zones in the apical meristem regions. The structural features of the meristem restrict viral movement, enhancing the likelihood of obtaining virus-free plants. The plant cell wall is a dynamic and complex structure that plays an important role in regulating growth and development, intercellular communication and defense, as well as in determining cell shape and fate. Growth and differentiation require remodeling of the wall polysaccharide networks during development and in response to external signals. Studies have provided ample evidence for the critical role of cell wall components such as pectins during embryogenesis in plants. This study aims to develop an optimal protocol for eliminating economically detrimental viruses from the endangered native Red-fleshed apple population and to produce virus-free clones via micropropagation, thus making healthy planting material accessible to local horticulturists. Additionally, the use of plant growth and structural stimulants in tissue culture was evaluated.

Materials and methods

To determine the optimal developmental stage and meristem size for preparing meristem explants, branch tips were collected at three different times (July, August, and September). These samples were fixed in FAA70 fixative for 24 hours. Following fixation, the samples were rinsed and stored in 70% ethanol. Conventional histological methods were employed for tissue sectioning. Pre-sterilization and sterilization procedures for explants containing lateral or apical buds involved treatments with 3% Tween 20, dishwashing liquid, 70% ethanol, and 5% sodium hypochlorite for varying durations. Based on microscopic examination of microtome sections, the most suitable developmental stage and meristem size were identified. Meristems, approximately 0.2 to 0.6 mm in size, were carefully dissected from apical and lateral buds under a stereomicroscope using a scalpel and a graticule, and then transferred to the bud establishment medium. To assess factors influencing establishment success, all explants were cultured on MS medium. The sampling time was considered as the first factor, and the second factor was the concentration of BA hormone (0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg L⁻¹). Meristems that developed were transferred to MS medium containing BA (1, 1.5, and 2 mg L⁻¹) along with GA₃ (0, 0.5, and 1 mg L⁻¹). At this stage, measurements of shoot length, number of shoots, and leaf development were recorded. After identifying the most effective propagation medium, explants were moved to an optimal medium supplemented with pectin and phloroglucinol, each at 0.2 mg L⁻¹, to examine their effects on shoot length, shoot number, and leaf development. Rooting was induced in elongated stems using MS^{1/2} medium containing NAA (0.5 mg L⁻¹) and IBA at different concentrations (1, 1.5, and 2 mg L⁻¹). After two months, rooting success was assessed. In a subsequent experiment, the best rooting medium was compared with a control medium containing 162 mg L⁻¹ phloroglucinol, and rooting percentages were evaluated. Finally, rooted plants

underwent acclimatization and were transplanted into pots. To confirm their virus-free status, regenerated plants from meristems were tested using RT-PCR. All experiments included at least three replicates, and statistical analyses were performed using SPSS software with Duncan's multiple range test as a factorial experiment in a completely randomized design.

Results

The initial findings from meristem sterilization indicated that treating the explants with 5% sodium hypochlorite for 15 minutes, combined with increasing exposure times in 70% ethanol from 10 s to 30 s, eliminated contamination. This sterilization protocol was subsequently used for all remaining stages of bud culture. Results also identified that the optimal time for meristem establishment occurred in late July, with a benzyladenine (BA) concentration of 1.5 mg L^{-1} achieving the highest success rate of 26.66%. After four weeks, meristem-derived samples were transferred to an MS medium supplemented with various combinations of BA and GA₃. It was observed that increasing GA₃ concentration in media with BA led to longer stems. The combination of 1 mg L^{-1} BA and 1 mg L^{-1} GA₃ produced the greatest stem length of 2.7 cm. Conversely, media with 1.5 mg L^{-1} BA without GA₃ yielded the shortest stems at 0.8 cm. The addition of GA₃ at BA concentrations of 1.5 and 2 mg L^{-1} tended to reduce leaf development. The interaction between BA and GA₃ significantly affected the number of secondary branches, whereas no significant effect was observed on the number of primary branches. Incorporating 0.2 mg L^{-1} of pectin into the culture medium increased stem length by 45% and boosted branch number by 82.6%. Similarly, adding 0.2 mg L^{-1} of phloroglucinol resulted in a 24% increase in stem length and a 39.13% rise in branch number. Regarding rooting, the effects of IBA and NAA were significant. Higher IBA levels led to decreased rooting percentages. The highest rooting rate of 100% was achieved in MS_{1/2} medium containing 0.5 mg L^{-1} NAA and 1 mg L^{-1} IBA. Increasing IBA concentration from 1 to 2 mg L^{-1} significantly reduced rooting success to 11.06%. The addition of phloroglucinol slightly decreased the rooting percentage from 100% to 73.77%, but this difference was not statistically significant. Notably, phloroglucinol increased the average number of roots per explant fourfold compared to media without it. RT-PCR analysis revealed that none of the meristem-derived plant samples showed bands corresponding to common apple viruses (ASGV, ApMV, ACLSV, and ASPV), indicating they were virus-free. In contrast, the original orchard mother plants tested positive for these viruses.

Conclusions

The meristem tissue prevents the spread of virus due to its lack of vascular bundle differentiation and elevated auxin levels. Therefore, in this study, a meristem culture technique was employed to produce virus-free plants. Initial testing of the mother plants using molecular RT-PCR revealed that all samples were infected with ACLSV, ASGV, ApMV, and ASPV viruses. In contrast, none of the plants derived from meristem culture showed viral contamination, demonstrating that RT-PCR is sufficiently accurate for virus detection. Additionally, the

application of pectin and phloroglucinol proved to be effective and reliable agents for enhancing branching in meristem cultures.

Author Contributions

The following statements should be used: Conceptualization, PJ and ZSh.; methodology, PJ, ZSh and MN; validation, PJ; formal analysis, PJ, ZSh and MN; investigation, PJ, ZSh and MN; data curation, PJ and MN; writing—original draft preparation, PJ and ZSh; writing—review and editing, PJ; visualization, PJ.; supervision, PJ; project administration, PJ; funding acquisition, PJ and MN. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Not applicable.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Vice President for Research and Technology of Kharazmi University for providing laboratory equipment.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This research did not receive any grants from funding agencies in the public, commercial, or nonprofit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

تولید گیاهان عاری از ویروس سیب توسرخ از طریق کشت مریستم و بررسی اثرات پکتین و فلوروگلوکوسینول بر ازدیاد آن

 **پریسا جنوبی**

*نویسنده مسئول. استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: jonoubi@khu.ac.ir

 **زهره شیرخانی**

استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: z.shirkhani@khu.ac.ir

 **مائده نصوحیان**

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: nosoohianmaedeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۱۵

چکیده

هدف: کشت مریستم یکی از روش‌هایی است که برای تولید گیاهان عاری از ویروس به کار می‌رود. مطالعه حاضر با هدف حذف ویروس‌های شایع گیاه سیب توسرخ انجام شد. همچنین به منظور بهبود شاخه‌زایی و ریشه‌زایی، تأثیر دو ترکیب پکتین و فلوروگلوکوسینول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی در سه بازه زمانی در تیر، مرداد و شهریور برداشت شدند. استقرار مریستم در غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌های حاصل از رشد مریستم به محیط پرآوری MS دارای هورمون BA و GA₃ منتقل شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط بهینه حاوی پکتین و فلوروگلوکوسینول به منظور بررسی اثر این دو تیمار بر طول شاخساره‌ها، تعداد شاخساره و توسعه برگی انتقال یافتند. ریشه‌زایی از ساقه‌های تولید شده در مرحله پرآوری در محیط 1/2MS دارای NAA و IBA انجام شد. برای تأیید وضعیت عاری بودن از ویروس، گیاهان باززایی شده از مریستم‌ها با استفاده از RT-PCR آزمایش شدند.

نتایج: نتایج نشان داد ریزنمونه‌های برداشت شده در نیمه دوم تیرماه در محیط کشت MS با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بیشترین درصد استقرار (۶۶/۲۶ درصد) را نشان دادند. محیط MS با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر GA₃ بهترین محیط برای افزایش طول ساقه بود. بیشترین توسعه برگی در محیط MS با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون GA₃ مشاهده شد. اثر متقابل BA و GA₃ بر تعداد شاخه‌های فرعی معنی‌دار بود. اضافه کردن پکتین در مرحله پرآوری باعث افزایش طول ساقه (۴۵ درصد) و افزایش تعداد شاخه (۸۲/۶ درصد) شد. با اضافه کردن فلوروگلوکوسینول به محیط، طول ساقه (۲۴ درصد)

افزایش یافت و تعداد شاخه (۳۹/۱۳ درصد) کاهش یافت. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۳۴ درصد) در محیط کشت $1/2MS$ با تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر IBA به علاوه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. حضور تیمار فلوروگلوسینول باعث کاهش درصد ریشه‌زایی در کل گیاهان و بالا رفتن میانگین تعداد ریشه در هر گیاه شد. در بررسی‌های مولکولی با RT-PCR، هیچ باندی دال بر آلوده بودن گیاهان حاصل از کشت مریستم وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که کشت مریستم ابزاری کارآمد برای تولید گیاهان عاری از ویروس در گیاه سیب توسرخ است. روش RT-PCR از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار بود. با در نظر گرفتن تمام جوانب، استفاده از پکتین و فلوروگلوسینول را می‌توان به عنوان دو ترکیب قابل اعتماد در بهبود شاخه‌زایی در کشت مریستم مورد استفاده قرار داد.

کلیدواژه‌ها: القای ریشه، باززایی، جوانه جانبی، هورمون

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: جنوبی پریسا، شیرخانی زهره، نصوحیان مائده (۱۴۰۵) تولید گیاهان عاری از ویروس سیب توسرخ از طریق کشت مریستم و بررسی اثرات پکتین و فلوروگلوسینول بر ازدیاد آن. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۳)، ۲۷-۵۴.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

سیب (*Malus domestica* L.) در تیره Rosaceae و زیرتیره Maloideae قرار دارد. درختان سیب به طور گسترده در سطح جهان به ویژه در مناطق معتدل کشت شده و اهمیت اقتصادی قابل توجهی دارند (Phipps et al., 1991). آسیای مرکزی، چین، قفقاز و آسیای صغیر منابع اصلی تنوع زیستی سیب هستند. ایران مرکز تنوع ژنتیکی سیب به ویژه برای گونه‌های سیب توسرخ در آسیای مرکزی است (Faramarzi et al., 2014; Wang et al., 2018). متأسفانه در حال حاضر تنها چند جمعیت کوچک سیب توسرخ وحشی در مناطق شمال، شمال شرق و شمال غرب ایران باقی مانده که این رقم به شدت در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Abedi et al., 2019). در ارقام تجاری سیب، ویروس لکه برگ‌ی کلروتیک سیب (ACLSV)، ویروس ساقه شیاری سیب (ASGV) و ویروس ساقه گودکی سیب (ASPV) شایع‌ترین ویروس‌ها هستند و رشد و بهره‌وری درختان آلوده را به شدت کاهش می‌دهند (Desvignes & BoyÃ, 1988). هیچ روش متعارفی برای حفاظت از گیاهان در برابر ویروس‌ها وجود ندارد (Szabó et al., 2024). بنابراین به منظور جلوگیری از کاهش بهره‌وری و کیفیت درختان میوه در اثر بیماری‌های ویروسی، انتخاب و کشت نهال‌های مادری سالم بسیار اهمیت پیدا می‌کند، از این رو تولید گیاهان عاری از ویروس کمک شایانی به جلوگیری از خسارات حاصل از بیماری‌های ویروسی می‌نماید. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای ریشه‌کشی ویروس‌ها در درختان میوه به کار گرفته می‌شود: از جمله گرمادرمانی (Hu et al., 2015; Vivek & Modgil, 2018; Wang et al., 2018)، کشت مریستم رأس ساقه (Wang et al., 2016)، تلفیق گرمادرمانی و کشت مریستم (Hu et al., 2017)، شیمی درمانی (Paprštein et al., 2013; Hu et al., 2015)، سرمادرمانی (Li et al., 2016; Romadanova et al., 2016; Bettoni et al., 2018) و ترکیب گرمادرمانی با سرمادرمانی (Zhao et al., 2018). تکنیک کشت مریستم، حذف ویروس‌های گیاهی و تکثیر مواد گیاهی

عاری از ویروس را ممکن می‌سازد. کشت مریستم روشی پرکاربرد برای ریشه‌کشی ویروس‌ها از گیاهان باغی است (Vivek & Modgil, 2018). تقسیم سلولی و رشد سریع‌تر گیاه نسبت به ویروس می‌تواند نقاطی عاری از ویروس به‌ویژه در قسمت‌های رأسی گیاه مانند نواحی مریستمی به‌وجود آورد. در نتیجه این احتمال وجود دارد که تکثیر ویروس در بافت‌ها محدود شود. از طرفی عدم وجود ارتباط آوندی کامل بین مریستم و بافت‌های زیرین باعث ایجاد نقاط عاری از ویروس در نواحی مریستمی شود (Retheesh & Bhat, 2010; Hadidi & Barba, 2011). تلاش‌های بسیار کمی برای رشد مریستم ساقه با حداقل اندازه بحرانی برای از بین بردن ویروس‌ها در سیب انجام شده است. Wang et al., 2016 تلاش کردند ویروس‌های ASPV و ASGV را با کشت نوک سرشاخه‌های مشتق شده از جوانه‌های جانبی حذف نمایند در این مطالعه، قطعات برگ ۰/۲۴ سانتی‌مترمربعی از برگ‌های جوان انتهایی شاخه‌های یک ماهه سیب "گالا" آلوده به ویروس جدا شد و برای القای جوانه‌های نابجا استفاده شد. نوک سرشاخه (به طول ۰/۴ میلی‌متر) با چهار پریموردیوم برگ از جوانه‌های نابجا ۴ هفته‌ای جدا شد و برای باززایی شاخه کشت شد. فلوروگلوپسینول ترکیب فنولی است که ساختار پایه برای مولکول‌های فعال زیستی متعددی است (Singh et al., 2010). از آنجایی که فلوروگلوپسینول یک فنول پایه است، فرض شده است که در دیواره سلولی نقش دارد و بنابراین در کشت بافت نیز نقش بالقوه‌ای دارد. در تعدادی از مطالعات، نشان داده شده است که فلوروگلوپسینول در ارتباط با سایر هورمون‌ها باعث القا و افزایش طول ریشه می‌شود (Daud et al., 2013; Pérez et al., 2016). استفاده از فلوروگلوپسینول در کشت بافت خورشیدستاره (*Ornithogalum dubium*) باعث کالوس‌زایی و باززایی گیاه شد و خواصی شبیه اکسین/سیتوکینین را نشان داد. مطالعات نشان داد که فلوروگلوپسینول می‌تواند به‌عنوان شبه‌هورمون عمل کند و رویان‌زایی مستقیم را القا کند (Petti, 2020). با این حال، نقش (های) فلوروگلوپسینول در کشت بافت گیاهی هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. در حال حاضر فرض بر این است که فلوروگلوپسینول با اکسین اثر هم‌افزایی دارد (Teixeira da Silva et al., 2013) که با نقش غالب مشاهده شده در تحریک ریشه‌زایی و تاحدی القای شاخساره مطابقت دارد (Sarkar & Naik, 2000; Siwach & Gill, 2011). همچنین مطالعات نشان داده است که فلوروگلوپسینول در غلظت ۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند موجب افزایش تولید شاخساره در پایه‌های P2 و B9 (Webster & Jones, 1991) و M9 (Miri et al., 2003a) می‌شود. دیواره سلول گیاهی ساختاری پویا و پیچیده‌ای است که نقش مهمی در تنظیم رشدونمو، ارتباطات بین سلولی و دفاع و همچنین در تعیین شکل و سرنوشت سلول ایفا می‌کند (Somerville et al., 2004). رشد و تمایز مستلزم بازسازی شبکه‌های پلی‌ساکاریدی دیواره در طول تکوین و در پاسخ به سیگنال‌های خارجی است (Barnes & Anderson, 2018). مطالعات شواهد متعددی از نقش حیاتی اجزای دیواره سلولی مانند پکتین‌ها در طول رویان‌زایی در گیاهان نشان داده است (El-Tantawy et al., 2013; Rodríguez-Sanz et al., 2014). در کشت بافت بادام استفاده از پکتین در محیط کشت MS سبب شد تا حدودی مشکل شیشه‌ای شدن نوساقه‌ها برطرف شود (Rugini and Verema, 1982). پژوهش‌ها نشان داد که پکتین در رویان‌زایی سوماتیک بلوط نقش دارد (Pérez-Pérez et al., 2019). پژوهش‌ها نشان داد که محیط QL غنی‌شده با پکتین، تکثیر گلابی را بهبود می‌بخشد و بقای شاخه‌های انتهایی را افزایش می‌دهد و به‌طور رضایت‌بخشی گسترش برگ ارقام مختلف گلابی را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می‌کند (Abdollahi et al., 2005). نتایج استفاده از پکتین در محیط کشت صنوبر نشان داد که این ترکیب در بنیانگذاری پریموردیوم‌های جوانه، تقسیم، رشد و تمایز سلولی نقش دارد (García-Angulo et al., 2018). هدف از این پژوهش، یافتن دستورالعمل مناسب برای حذف ویروس‌های زیان‌بار اقتصادی از گیاه سیب توسرخ بومی در حال انقراض و تولید کلون‌های عاری از ویروس به روش ریزازدیادی

است، به گونه‌ای که بتواند در اختیار باغداران کشور قرار گیرد. همچنین، ارزیابی اثرات ترکیبات محرک رشد و ترکیبات ساختاری گیاه در فرآیند کشت بافت، از دیگر اهداف این مطالعه محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها

به منظور کشت مریستم، شاخسارهای سیب توسرخ (*Malus domestica* L.) به طول ۱۵-۱۰ سانتی‌متری از مرکز تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد.

ارزیابی ساختار تشریحی مریستم رأس شاخه برای کشت مریستم: به منظور شناسایی بهترین مرحله نمو و اندازه مریستم برای تهیه ریزنمونه مریستم، سرشاخه‌ها جمع‌آوری شده در سه زمان ۲۰ تا ۲۵ تیر، ۲۰ تا ۲۵ مرداد و ۲۰ تا ۲۵ شهریور به مدت ۱۲-۱۰ ساعت در تثبیت‌کننده FAA70 (فرمالدئید، اتانول ۷۰٪ و استیک اسید) تثبیت گردید. پس از شست‌وشو نمونه‌ها با آب جاری، آن‌ها به اتانول ۷۰ درصد منتقل شده و تا زمان برش‌گیری در همین محلول نگهداری شدند (Chehregani et al., 2007). به منظور برش‌گیری، از روش‌های معمول سلول بافت‌شناختی استفاده شد. نمونه‌ها به ترتیب در سری‌های افزایشی الکل (۸۰، ۹۰، ۹۶ و ۱۰۰ درصد) آبیگری، در سری‌های افزایشی تولوئن شفاف‌سازی (دو حجم الکل + یک حجم تولوئن، حجم‌های مساوی الکل و تولوئن، یک حجم الکل + دو حجم تولوئن و تولوئن خالص) و در پارافین قالب‌گیری شدند و در نهایت از آنها با میکروتوم با ضخامت ۶-۷ میکرومتر برش تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی با تولوئن و آب‌دهی نمونه‌ها با سری‌های کاهشی الکل (۱۰۰، ۹۵، ۷۰ و ۵۰ درصد) با استفاده از هماتوکسیلین-اُتوزین رنگ‌آمیزی شدند (Sanderson, 2020). اسلایدهای تهیه شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی دقیق و عکس‌برداری قرار گرفتند.

کشت مریستم رأس شاخه: پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی ریزنمونه‌ها حاوی جوانه جانبی یا جوانه رأسی با تئوین ۲۰ (۳ درصد)، مایع ظرفشویی، اتانول ۷۰ درصد (۱۰ و ۳۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) صورت گرفت (Boudabous et al., 2010). مریستم‌ها پس از تشخیص بهترین مرحله نمو و اندازه که از بررسی برش‌های میکروتومی حاصل شد، در زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از گراتیکول مدرج بوسیله تیغ اسکالپل در اندازه‌های حدود ۰/۲ تا ۰/۶ میلی‌متر از جوانه‌های رأسی و جانبی جدا شده و به محیط استقرار جوانه منتقل شدند. به منظور بررسی عوامل مؤثر بر میزان موفقیت مرحله استقرار همه ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت شدند. زمان نمونه‌گیری به‌عنوان فاکتور اول (نیمه دوم تیر، مرداد و شهریور) و فاکتور دوم هورمون BA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها در اتاقک رشد در دمای 25 ± 1 درجه سانتیگراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و پس از گذشت یک ماه درصد استقرار مورد بررسی قرار گرفت.

پرآوری شاخه‌ها و ریشه‌زایی: ریزنمونه‌های حاصل از رشد مریستم بعد از گذشت چهار هفته به محیط پرآوری MS دارای هورمون BA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و GA₃ (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. یک ماه پس از انتقال به محیط پرآوری طول شاخساره‌ها، تعداد شاخساره و توسعه برگی مورد بررسی قرار گرفت. توسعه برگی مطابق فرمول ۱ به‌دست آمد: فرمول ۱:

$$۲ / ((\text{عرض کوچکترین برگ} \times \text{طول بزرگترین برگ}) + (\text{عرض بزرگترین برگ} \times \text{طول بزرگترین برگ})) = \text{توسعه برگی}$$

بعد از انتخاب بهترین محیط کشت جهت پرآوری، ریزنمونه‌ها به محیط بهینه حاوی پکتین و فلوروگلوکسینول هر کدام به صورت جداگانه به میزان ۰/۲ میلی گرم بر لیتر با ۹ تکرار انتقال یافتند. بعد از یک ماه به منظور بررسی اثر این دو تیمار بر طول شاخساره‌ها، تعداد شاخساره و توسعه برگی نمونه‌گیری صورت گرفت. ریشه‌زایی در ساقه‌های طویل شده از مرحله پرآوری در محیط $1/2MS$ دارای هورمون NAA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و IBA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) انجام شد. بعد از گذشت ۲ ماه درصد ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش دیگر بهترین محیط بهینه به عنوان شاهد با محیط حاوی فلوروگلوکسینول به میزان ۱۶۲ میلی گرم بر لیتر مقایسه و درصد ریشه‌زایی بررسی شد. در نهایت گیاهان ریشه‌دار به داخل گلدانهایی حاوی مخلوط کوکوپیت، ورمی‌کولیت و پرلیت با نسبت ۲: ۱: ۱ استریل شده منتقل شدند به مدت ۴ تا ۵ روز در رطوبت نسبی بالا قرار گرفتند سپس سطح رطوبت نسبی به تدریج کاهش داده شد. ضمن کاهش رطوبت، گیاه با محیط سازگار گردید. ضمن کاهش رطوبت، گیاه با محیط سازگار گردید. بعد از گذشت ۴ هفته از انتقال گیاه به خاک با اطمینان از سالم بودن، گیاه به گلدان‌های بزرگتر و به گلخانه با شرایط مناسب منتقل شدند.

ارزیابی گیاهان باززایی شده عاری از ویروس با استفاده از تکنیک RT-PCR: گیاهان باززایی شده از مریستم

به منظور تأیید عاری از ویروس بودن با استفاده از تکنیک RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور استخراج RNA از گیاه درون شیشه‌ای سیب توسرخ حاصل از کشت مریستم و گیاه باغی با استفاده از مینی کیت گیاهی از شرکت TOPAZ GENE (Cat. No: TGK2004) انجام شد. بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت پارس توس صورت پذیرفت و واکنش PCR به منظور تکثیر cDNA بر اساس آغازگرهای ویژه مربوط به ویروس‌های رایج سیب (ASGV، ApMV، ACLSV و ASPV) (جدول ۱) و بصورت Multiplex-PCR انجام شد. محصول واکنش نیز روی ژل آگارز الکتروفورز شد. در این بررسی برای انجام الکتروفورز از بافر TAE 1X استفاده گردید برای اجرای واکنش دمایی، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، و به دنبال آن ۳۵ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد نیاز

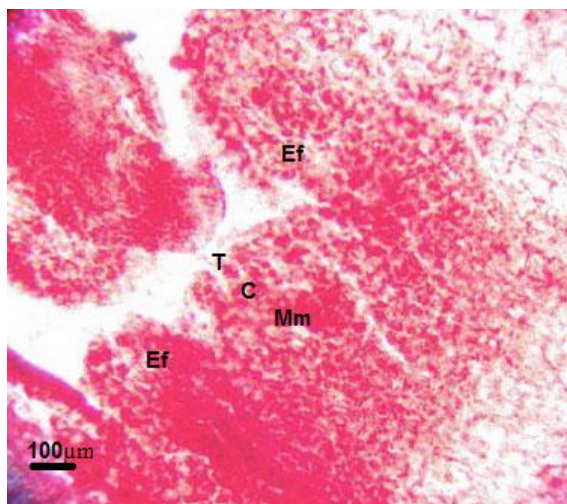
Table 1. Sequence of required primers

نام آغازگر	توالی آغازگر	TM (°C)	%GC
Primer name	Primer sequence		
ASGV –F	5' GAAGACGTGCTTCAACTAGC 3'	56	50
ASGV –R	5' TTTTAGACCAGTGGCAAAGT 3'	55	40
ApMV –F	5' AGGGTCCTGAGCAGTCGAGA 3'	62.14	60
ApMV-R	5' GTTTGGAGGGGCTTCCCACT 3'	62.08	60
ACLSV-F	5' TTCATGGAAGACGGGGCAA 3'	59.85	47.62
ACLSV-R	5' AAGTCTACAGGCTATTTATTA 3'	56.64	26.67
ASPV-F	5' ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA 3'	58.22	55
ASPV-R	5' TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA 3'	63.53	60
nads-F	5' GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT 3'	61.63	47.83
nads-R	5' CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA 3'	61.53	45.83

بررسی‌های آماری: در این مطالعه، تمام محاسبات آماری با حداقل ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن صورت گرفت.

نتایج

بررسی ساختار تشریحی مریستم رأس ساقه: برش طولی مریستم رأس ساقه‌ها در هر سه تاریخ نمونه برداری مشابه بودند و بخش‌های زیر در آنها مشاهده گردیدند: تونیکا در سطح بیرونی و کورپوس در بخش میانی قرار داشته و ناحیه تونیکا تقریباً به شکل مسطح دیده شد. سلول‌های لایه تونیکا سلول‌های کوچک با دیواره نازک هستند که به صورت عمود بر سطح اندام تقسیم می‌شوند. سلول‌های کورپوس در جهات مختلف تقسیم می‌شوند و بافت‌های داخلی را می‌سازند. ناحیه مریستم مغز که در مرکز رأس ساقه قرار دارد سلول‌های بزرگتر با رنگ‌پذیری کمتری داشت. اطراف مریستم رأسی به وسیله طرح‌های اولیه برگ‌ها احاطه شده است. مطالعه بافت‌شناسی روی نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌ها در اندازه‌هایی در حدود ۵۰۰ میکرون فاقد آوند هستند و می‌توان از آن‌ها به عنوان بخش مریستمی جهت کشت بافت استفاده کرد (شکل ۱). در نمونه‌های با اندازه بزرگتر تمایز یابی عناصر آوندی انجام شده بود.



شکل ۱. برش طولی مریستم رأسی ساقه. T: تونیکا، C: کورپوس، Mm: مریستم مغز، Ef: طرح اولیه برگ
Figure 1. Longitudinal section of the shoot apical meristem. T: Tunica, C: Corpus, Mm: Medullary meristem, Ef: Leaf primordium

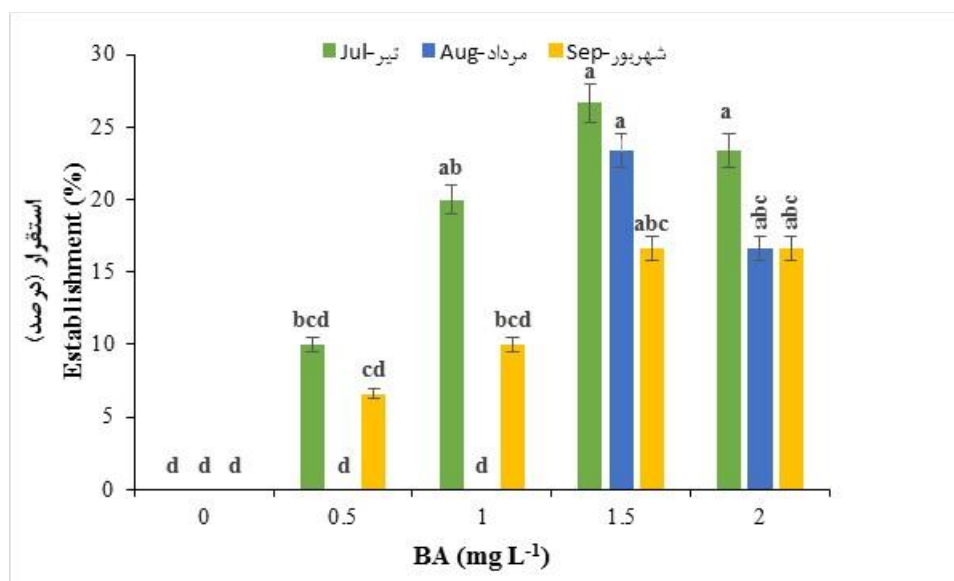
نتایج حاصل از سترون‌سازی مریستم‌ها: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر زمان سترون‌سازی با هیپوکلریت سدیم و الکل ۷۰ درصد بر میزان آلودگی مریستم‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج اولیه حاصل از سترون‌سازی مریستم‌ها نشان داد که درصد آلودگی در نمونه‌های قرار گرفته در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه با روند افزایشی زمان قرارگیری در اتانول ۷۰ درصد از ۱۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه کاهش یافت و در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه با روند افزایشی زمان قرارگیری در اتانول ۷۰ درصد از ۱۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه میزان آلودگی به صفر رسید و درصد زنده مانده نمونه‌ها ۱۰۰٪ شد که در بقیه مراحل کشت جوانه از این نسبت برای سترون‌سازی ریزنمونه‌ها استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲. درصد آلودگی مریستم‌های سیب تو سرخ در تیمارهای متفاوت سترون‌سازی

Table 2. Percentage of infection of *M. domestica* meristems in different sterilization treatments. Different letters indicate groups with statistically significant differences

آلودگی (درصد) Infection (%)	تیمار Treatment
	هیپوکلریت سدیم ۵ درصد Sodium hypochlorite (5 %)
30 ^a	5 min
20 ^b	5 min
16.6 ^b	10 min
16.6 ^b	10 min
6.6 ^c	15 min
0 ^d	15 min
	الکل ۷۰ درصد Ethanol (70%)
	10 s
	30 s
	10 s
	30 s
	10 s
	30 s

تأثیر زمان نمونه‌برداری و هورمون BA بر استقرار مریستم: نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف زمان نمونه‌برداری و هورمون BA، ۴ هفته بعد از کشت نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت BA بر استقرار مریستم‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (شکل ۲). نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که در نیمه دوم تیرماه و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، بیشترین درصد استقرار مریستم‌ها مشاهده شد (۲۶/۶۶ درصد، شکل ۲).



شکل ۲. درصد استقرار مریستم در تیمارهای مختلف زمان نمونه‌برداری (نیمه دوم تیر، مرداد و شهریور) و هورمون BA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر). طبق آزمون مقایسه‌ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($P < 0.05$). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار $\pm$ خطای استاندارد است

Figure 2. Percentage of meristem establishment in different treatments of sampling time (July, August and September) and BA hormone (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.01$). (means $\pm$ SE, n = 3)

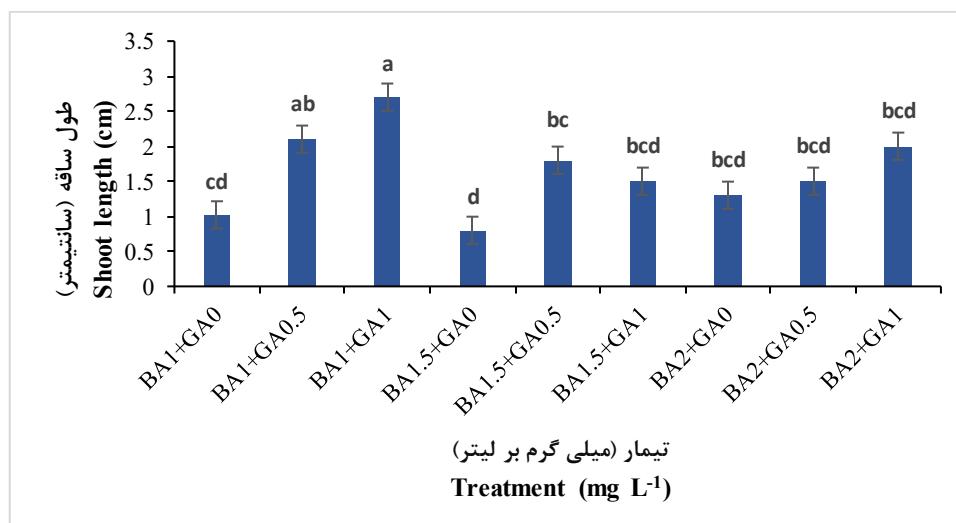
اثر تیمارهای مختلف BA و GA₃ بر پرآوری: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل BA و GA₃ بر طول ساقه، توسعه برگ و تعداد شاخه‌های فرعی معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). دو هورمون BA و GA₃ بر تعداد شاخه‌های اصلی اثر معنی‌داری نداشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در حضور BA افزایش غلظت هورمون GA₃ سبب افزایش میانگین طول ساقه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر GA₃ بیشترین طول ساقه (۲/۷ سانتی‌متر) را نشان داد. در محیط MS حاوی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و عدم حضور GA₃ کمترین طول ساقه (۰/۸ سانتی‌متر) مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج نشان داد اضافه کردن هورمون GA₃ به محیط کشت دارای BA با غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش توسعه برگ شد (شکل ۵).



شکل ۳. مرحله ازدیاد نمونه‌ها

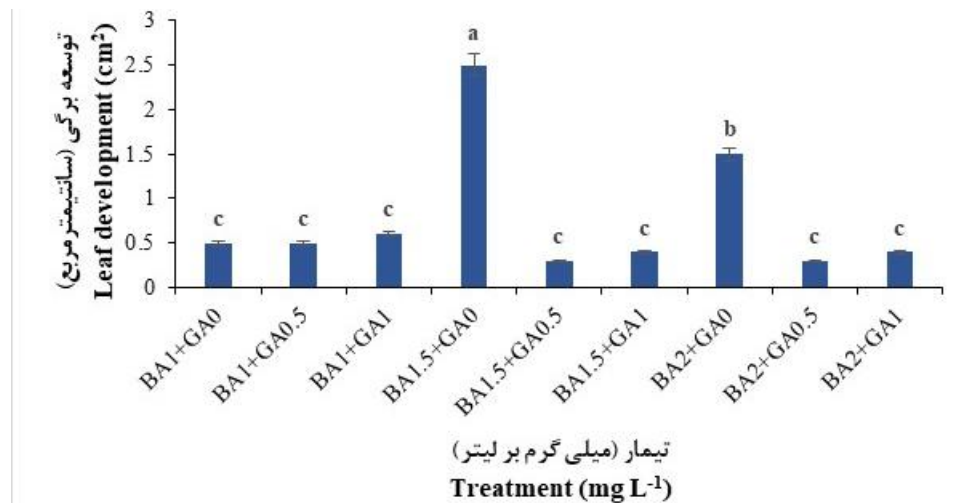
Figure 4. Proliferation stage of samples

افزودن هورمون GA₃ به محیط کشت دارای BA سبب افزایش تعداد شاخه‌های اصلی شد اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۶). اثر متقابل BA و GA₃ بر تعداد شاخه‌های فرعی معنی‌دار بود. بیشترین و کمترین تعداد شاخه‌های فرعی به ترتیب در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون GA₃ مشاهده شد (شکل ۷).



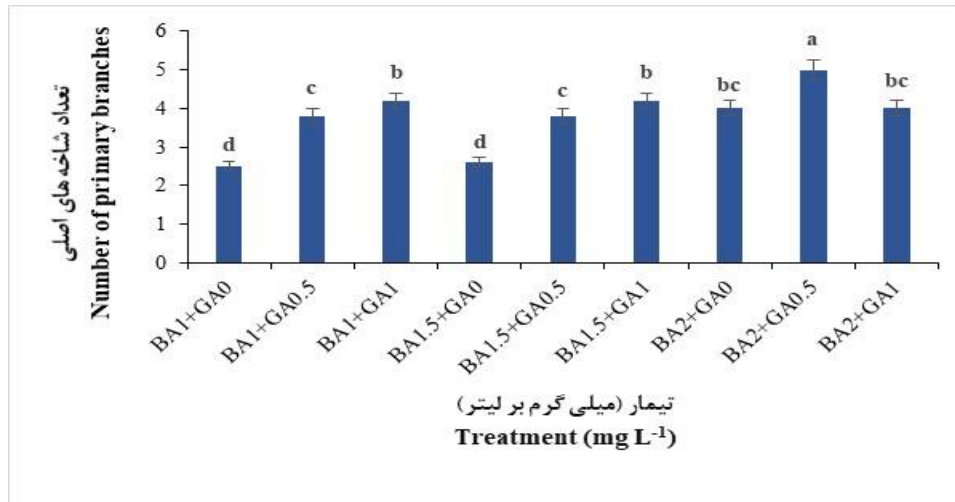
شکل ۴. طول ساقه در محیط پرآوری MS حاوی هورمون BA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) و GA₃ (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر). طبق آزمون مقایسه‌ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است (P < ۰/۰۱). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد است

Figure 4. Stem length in MS medium containing BA (1, 1.5, and 2 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 0.5, and 1 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups (P ≤ 0.01). (means ± SE, n = 3)



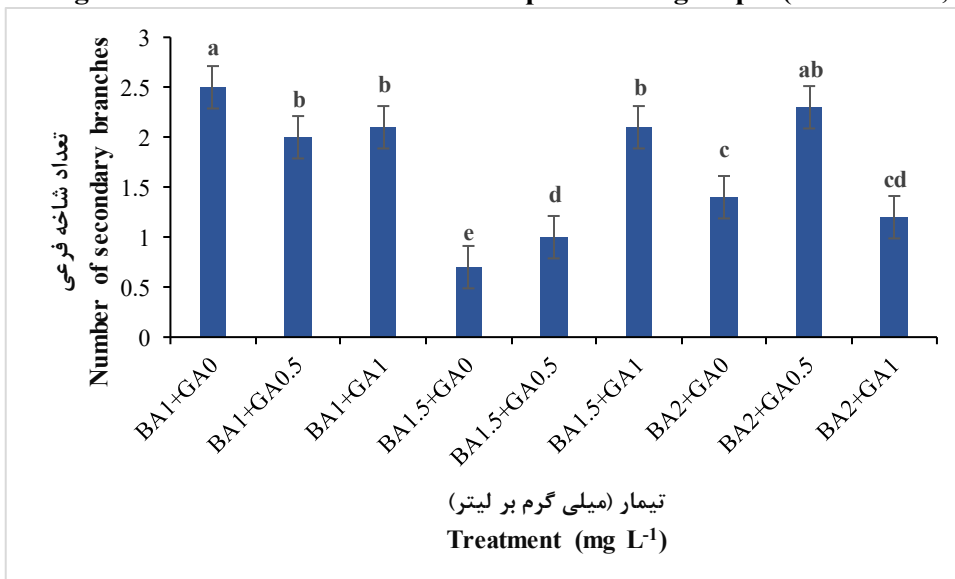
شکل ۵. توسعه برگ در محیط پرآوری MS حاوی هورمون BA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) و GA₃ (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر). طبق آزمون مقایسه‌ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است (P < ۰/۰۱). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد است

Figure 5. Leaf development in MS medium containing BA (1, 1.5, and 2 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 0.5, and 1 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups (P ≤ 0.01). (means ± SE, n = 3)



شکل ۶. تعداد شاخه های اصلی در محیط پرآوری MS حاوی هورمون BA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) و GA₃ (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر). طبق آزمون مقایسه ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار $\pm$ خطای استاندارد است

Figure 6. Number of primary branches in MS medium containing BA hormone (1, 1.5 and 2 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 0.5 and 1 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups. (means $\pm$ SE, n = 3)



شکل ۷. تعداد شاخه های فرعی در محیط پرآوری MS حاوی هورمون BA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) و GA₃ (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر). اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد. طبق آزمون مقایسه ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است ($P < 0.01$). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار $\pm$ خطای استاندارد است

Figure 7. Number of secondary branches in MS medium containing BA hormone (1, 1.5 and 2 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 0.5 and 1 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.01$). (means $\pm$ SE, n = 3)

اثر پکتین و فلوروگلوکوسینول بر پرآوری: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار پکتین بر طول ساقه ($P < 0.05$) و تعداد شاخه ($P < 0.01$) معنی‌دار بود و بر توسعه برگ‌گی معنی‌دار نبود (جدول ۳). نتایج نشان داد که اضافه کردن پکتین به میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت باعث افزایش طول ساقه به میزان ۴۵ درصد و افزایش تعداد شاخه به میزان ۸۲/۶ درصد شد و طبق نتایج به دست آمده محیط حاوی پکتین برای پرآوری مناسب‌تر از محیط بدون پکتین بود. همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار فلوروگلوکوسینول بر طول ساقه و تعداد شاخه ($P < 0.01$) معنی‌دار بود و بر توسعه برگ‌گی معنی‌دار نبود (جدول ۴). نتایج نشان داد با اضافه کردن میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوکوسینول به محیط، طول ساقه به میزان ۲۴ درصد افزایش یافت و تعداد شاخه ۳۹/۱۳ درصد کاهش یافت.

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر پکتین بر پرآوری

Table 3. Variance analysis of pectin effects on proliferation

F-Value	میانگین مربعات Mean Squares	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی Degrees of Freedom	منبع تغییرات Source of Variation	صفت Trait
4.8	4.014*	4.014	1	بین گروهی Between groups	طول ساقه Shoot Length
	0.83	13.37	16	درون گروهی Within group	
		17.38	17	مجموع Total	
0.05	0.005 ^{ns}	0.005	1	بین گروهی Between group	توسعه برگ‌گی Leaf Development
	0.09	1.441	16	درون گروهی Within group	
		1.441	17	مجموع Total	
10.05	64.22**	64.22	1	بین گروهی Between group	تعداد شاخه Number of Branches
	6.38	102.22	16	درون گروهی Within group	
		166.44	17	مجموع Total	

* اختلاف معنی‌دار معنی‌دار با گروه شاهد در سطح پنج درصد ($P \leq 0.05$), ** اختلاف معنی‌دار معنی‌دار با گروه شاهد در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$), ^{ns} عدم اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد

* Significant differences with the control group ($P \leq 0.05$), ** Significant differences with the control group ($P \leq 0.01$), ^{ns} no significant differences with the control group

نتایج حاصل از ریشه‌زایی: ساقه‌های طویل شده برای ریشه‌زایی به محیط 1/2MS دارای هورمون NAA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل این دو هورمون بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزایش سطح هورمون IBA موجب

کاهش درصد ریشه‌زایی شد به‌طوری‌که میزان ریشه‌زایی در محیط کشت $1/2MS$ دارای $0/5$ میلی‌گرم بر لیتر NAA و 1 میلی‌گرم بر لیتر IBA 100 درصد بود اما با افزایش غلظت IBA از 1 میلی‌گرم بر لیتر به 2 میلی‌گرم بر لیتر میزان ریشه‌زایی به‌طور معنی‌داری به $11/06$ درصد کاهش یافت (شکل ۸).

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر فلوروگلوسینول بر پرآوری

Table 4. Variance analysis of phloroglucinol effects on proliferation

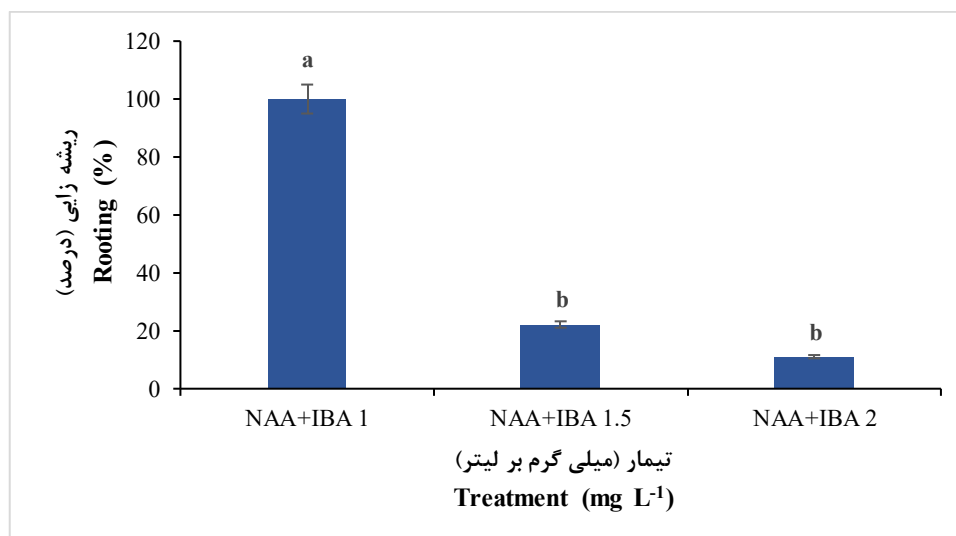
F-Value	میانگین مربعات Mean Squares	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی Degrees of Freedom	منبع تغییرات Source of Variation	صفت Trait
6.998	1.681**	1.681	1	بین گروهی Between groups	طول ساقه Shoot Length
	0.24	3.842	16	درون گروهی Within group	
		5.523	17	مجموع Total	
0.063	0.006 ^{ns}	0.06	1	بین گروهی Between group	توسعه برگ Leaf Development
	0.09	1.441	16	درون گروهی Within group	
		1.447	17	مجموع Total	
6.919	14.22**	14.22	1	بین گروهی Between group	تعداد شاخه Number of Branches
	2.05	32.88	16	درون گروهی Within group	
		47.11	17	مجموع Total	

** اختلاف معنی‌دار معنی‌دار با گروه شاهد در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$), ^{ns} عدم اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد

** Significant differences with the control group ($P \leq 0.01$), ^{ns} no significant differences with the control group

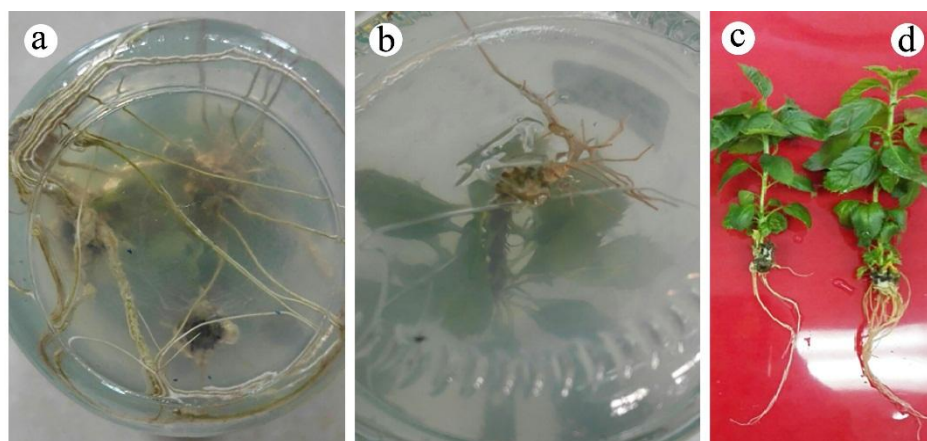
اثر فلوروگلوسینول بر ریشه‌زایی: جهت بررسی اثر فلوروگلوسینول بر ریشه‌زایی، ساقه‌های طویل شده به محیط

بهینه‌سازی شده طبق پژوهش انجام شده (1 میلی‌گرم بر لیتر IBA بعلاوه $0/5$ میلی‌گرم بر لیتر NAA) بعلاوه 162 میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوسینول منتقل شدند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر فلوروگلوسینول بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار نبود اما بر میانگین تعداد ریشه به ازای هر ریزنمونه معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول ۵). نتایج نشان داد که حضور فلوروگلوسینول باعث کاهش درصد ریشه‌زایی از 100 درصد به $77/73$ درصد شد. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. حضور تیمار فلوروگلوسینول باعث بالا رفتن میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه شد به‌طوری‌که میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه در مقایسه با محیط فاقد فلوروگلوسینول 4 برابر افزایش یافت (شکل ۹).



شکل ۸. درصد ریشه‌زایی در محیط $MS \frac{1}{2}$ دارای هورمون NAA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و IBA (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر). طبق آزمون مقایسه‌ای دانکن، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است ($P < 0.01$). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار $\pm$ خطای استاندارد است

Figure 8. Rooting percentage in $MS \frac{1}{2}$ medium containing NAA (0.5 mg L⁻¹) and IBA (1, 1.5, and 2 mg L⁻¹). According to the Duncan test, different letters indicate a significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.01$). (means $\pm$ SE, n = 3)



شکل ۹. ریشه‌زایی در محیط؛ (a و d) دارای ترکیب فلوروگلوکوسینول؛ و (b و c) فاقد ترکیب فلوروگلوکوسینول

Figure 9. Rooting in medium; a and d) containing phloroglucinol and; b and c) lacking phloroglucinol

انتقال گیاهان به خاک: گیاهان ریشه‌دار شده بعد از سه هفته به گلدان‌های حاوی کوکوپیت، ورمی‌کولیت و پرلیت منتقل شدند. و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفتند و بعد از سازگار شدن با محیط، گیاهان به گلخانه با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۳۰٪ منقل شدند (شکل ۱۰).

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر فلوروگلوکوسینول بر ریشه‌زایی

Table 5. Variance analysis of phloroglucinol effects on rooting

F-Value	میانگین مربعات Mean Squares	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی Degrees of Freedom	منبع تغییرات Source of Variation	صفت Trait
12.98	352.667**	352.667	1	بین گروهی Between group	تعداد ریشه Number of Roots
	27.167	108.667	4	درون گروهی Within group	
		461.33	5	مجموع Total	
4	743.77 ^{ns}	743.707	1	بین گروهی Between group	درصد ریشه‌زایی Rooting Percentage
	185.927	743.707	4	درون گروهی Within group	
		1487.413	5	مجموع Total	

** اختلاف معنی‌دار معنی‌دار با گروه شاهد در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$), ^{ns} عدم اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد

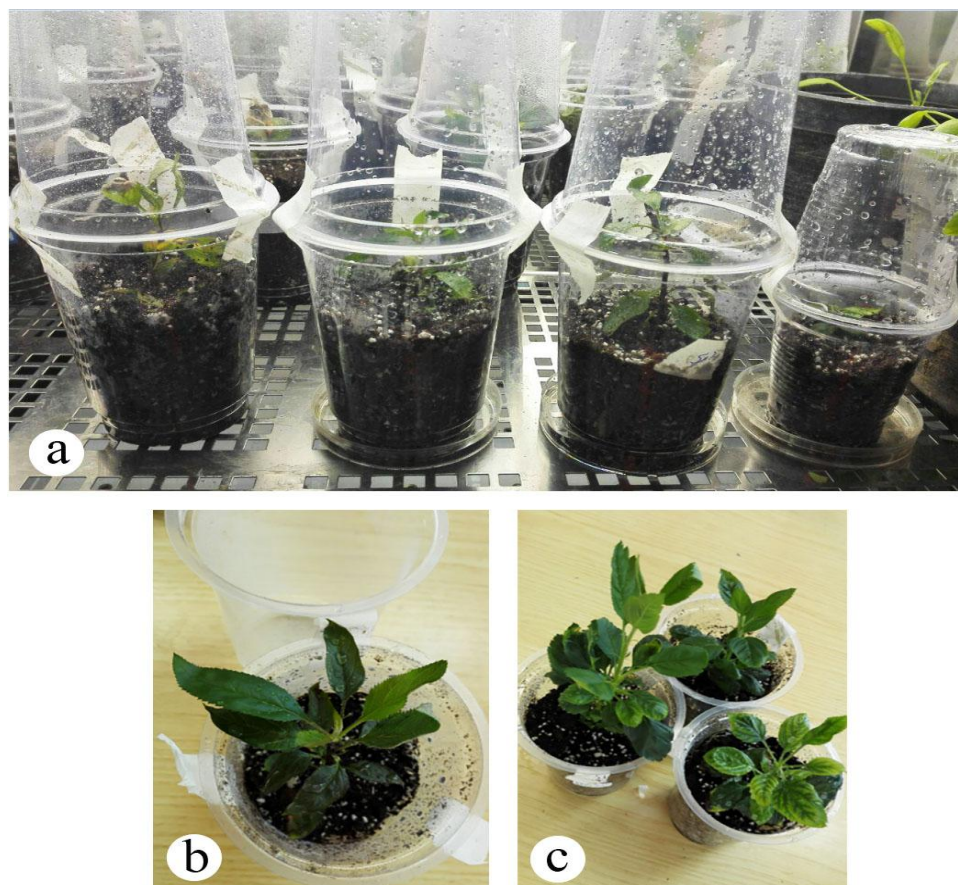
** Significant differences with the control group ($P \leq 0.01$), ^{ns} no significant differences with the control group

ارزیابی گیاهان باززایی شده عاری از ویروس با استفاده از تکنیک RT-PCR: نتایج حاصل از بررسی RT-

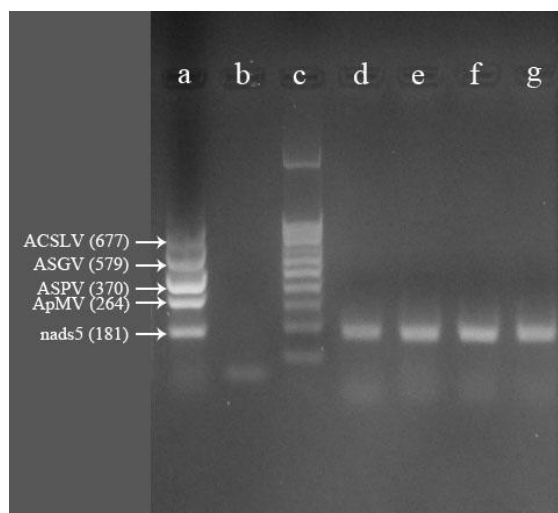
PCR نشان داد در هیچکدام از نمونه‌های گیاهی حاصل از کشت مریستم باندی وجود نداشت که دال بر آلوده بودن گیاهان حاصل از کشت بافت به ویروس‌های شایع سیب (ASGV، ApMV، ACLSV و ASPV) باشد (شکل ۱۱). درحالی‌که این باندها در گیاهان مادری در باغ حضورداشتند.

بحث

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 داشته، همچنین می‌توان با کشت درشیشه گیاهان سالم تولید کرد (Zarghami & Ahmadi, 2023). در این پژوهش تیمارهای متفاوتی برای سترون‌سازی ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج کاربرد الکل و هیپوکلریت سدیم در زمان‌های غوطه‌وری متفاوت نشان داد که میزان آلودگی ریزنمونه‌ها به مدت زمان خیساندن در ماده ضدعفونی‌کننده بستگی دارد. چندین ماده شیمیایی از جمله الکل، اتر نفت، هیپوکلریت کلسیم، هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، استون در غلظت‌ها و زمان‌های غوطه‌وری متفاوت بر اساس نوع گونه جهت سترون‌سازی مواد گیاهی استفاده می‌شود (Boudabous et al., 2010). کمترین درصد آلودگی در این مطالعه مربوط به نمونه‌هایی بود که بعد از ۳۰ ثانیه غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت ۵٪ شستشو داده شده بودند که با نتایج مطالعات بر روی هلو مطابقت داشت (Felek et al., 2015).



شکل ۱۰. a) نمونه‌های در حال سازگاری؛ b) گیاه در حال هوادهی؛ c) گیاهان سازگار شده با محیط بیرون
Figure 10. a) Acclimating specimens; b) Aeration plant; c) Plants adapted to the outdoor environment



شکل ۱۱. الکتروفورز مربوط به RT-PCR. a) کنترل مثبت؛ b) کنترل منفی فاقد cDNA؛ c) Ladder 100 bp؛ d-g) گیاهان حاصل از کشت مریستم عاری از ویروس
Figure 11. Electrophoresis of RT-PCR. a) Positive control; b) Negative control without cDNA ; c) Ladder 100 bp; d-g) Virus-free samples from meristem culture

بررسی درختان سیب نشان داده است که ویروس‌های ASPV، ApMV، ASGV، ACSLV و ویروس‌هایی متداولی هستند که در این گیاه دیده می‌شوند (Vivek & Modgil, 2018). (Vivek & Modgil, 2018) نشان دادند که بیشتر مریستم‌های سیب در اندازه ۰/۲-۰/۴ میلی‌متری به دلیل خشک شدن نتوانستند زنده بمانند، درحالی که حداکثر زندمانی ریزنمونه‌ها در محدوده اندازه ۰/۵-۰/۷ میلی متر مشاهده شد که با پژوهش حاضر تطابق دارد. در پژوهشی نشان داده شد که در تمامی ارقام سیب، بیشترین درصد بقا در ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده در بهار می‌باشد (Masoudi et al., 2020). از نظر زمان تهیه، ریزنمونه دو گونه از اکالیپتوس شامل *Eucalyptus gunni* و *E. viminalis* مورد مطالعه قرار گرفتند که بهترین نتیجه مربوط به ریزنمونه‌هایی بود که در فروردین ماه تهیه شده بودند و بالاترین درصد استقرار و کمترین میزان قهوه‌ای شدن را نشان دادند (Asare & Zandi, 2008). در گردو بالاترین میزان استقرار مربوط به ریزنمونه‌های تهیه شده در اردیبهشت ماه بود و ریزنمونه‌های مرداد ماه کمترین میزان استقرار را داشتند که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نمونه‌های تهیه شده در شروع فصل به دلیل فعال بودن بیشتر سلول‌ها و بالا بودن سطح هورمون‌های درون‌زا در بافت‌ها بهترین پاسخ را به تیمارهای اعمال شده داده‌اند (Yari et al., 2011). در پژوهش حاضر نیز نمونه‌های تهیه شده در تیرماه بیشترین درصد استقرار را نشان دادند. به نظر می‌رسد بافت‌های گیاهی که در زمان‌های مختلف فصل رشد برداشت می‌شوند به دلیل خصوصیات فیزیولوژیکی متفاوت، معمولاً نسبت به کشت درون‌شیشه‌ای پاسخ یکسانی نشان نمی‌دهند. مطالعات نشان داده است ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs) ترکیب محیط کشت و شرایط کشت بر استقرار ریزنمونه‌ها موثر هستند (Dobránszki & da Silva, 2010; Magyar-Tábori et al., 2010; Zahedzadeh et al., 2014). در مرحله پرآوری اثر متقابل BA و GA₃ بر طول ساقه و توسعه برگی معنی‌دار بود و بر تعداد شاخه‌های اصلی و فرعی اثر معنی‌داری نداشت. این نتایج با نتایج گزارش شده برای مریستم‌های سیب متفاوت بود (Ochatt & Caso, 1982)، در این گزارش زمانی که غلظت BA و GA₃ هر دو در محیط تکثیر کاهش یافت، تعداد شاخه‌ها در هر ریزنمونه افزایش یافت. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر همسو با نتایج (Vivek & Modgil, 2018) بود. استفاده از پکتین در مرحله‌ی پرآوری سبب افزایش طول ساقه و تعداد شاخه سیب توسرخت شد. شواهد روزافزون نشان می‌دهد که رشد و تمایز نیازمند بازسازی کنترل شده شبکه‌های پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی است که منجر به تغییراتی در خواص مکانیکی آنها می‌شود تا تقسیم و گسترش سلولی به‌طور عادی انجام شود (Barnes & Anderson, 2018). اجزای دیواره سلولی مانند پکتین‌ها در طول اندام‌زایی و همچنین در رویان‌زایی سوماتیکی و زیگوتی نقش مهمی دارند (Geshi et al., 2013; Smertenko & Bozhkov, 2014). در پژوهشی استفاده از پکتین در محیط کشت سبب افزایش سرعت و کیفیت رشد طبیعی نوساقه‌های پایه‌های هیبرید رویشی GF677 شد (Nezami et al., 2010). استفاده از فلوروگلوکوسینول در این مطالعه سبب افزایش طول ساقه و تعداد شاخه سیب توسرخت شد. در مطالعات قبلی افزودن فلوروگلوکوسینول به محیط کشت سبب افزایش تولید شاخساره در پایه‌های P2 و B9 (Webster & Jones, 1991)، ریزنمونه‌های MM106 (Webster & Jones, 1989) و پایه M106 و M9 (Miri et al., 2003b) شد. تأثیر فلوروگلوکوسینول بر پرآوری سیب پایه گمی الماسی با کاهش شیشه‌ای شدن شاخه‌ها در نمونه‌های مورد آزمایش همراه بود (Mohseniazar et al., 2012). کاهش شیشه‌ای شدن به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود. افزودن یک میلی‌مولار فلوروگلوکوسینول درصد ریشه‌زایی را افزایش داده و تشکیل کالوس را در پایه سیب M9 کاهش داده است (Kim et al., 2020). همچنین گزارش شده است که فلوروگلوکوسینول رشد ریشه‌ها را تحریک کرده، طولی شدن ریشه را افزایش داده و ریشه‌های جدید را در پایا (Pérez et al., 2016) و موز (Londe

(et al., 2017) القا کرده است. پیش از این گزارش شده بود که فلوروگلوکوسینول باعث بهبود پاسخ ریشه‌زایی در برخی از ارقام سیب می‌شود، اما برای سایر ارقام مضر است یا هیچ تأثیری ندارد (Zimmerman, 1984). در این پژوهش ساقه‌های طویل شده به محیط کشت $1/2MS$ با غلظت‌های مختلف IBA و 0.5 میلی‌گرم بر لیتر NAA منتقل شدند. با افزایش غلظت هورمون IBA درصد ریشه‌زایی کاهش یافت در مطالعاتی که بر روی ریشه‌زایی ارقام متعدد سیب انجام شده تأثیرگذاری IBA بر روی ریشه‌زایی به روشنی نشان داده شده است. درصد ریشه‌زایی در سیب در محیط MS با افزایش غلظت IBA تا 1 میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت (Avestan et al., 2018) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. ریشه‌زایی شامل یک مرحله کوتاه القای ریشه (حداکثر یک هفته) و به دنبال آن یک مرحله طولانی‌تر طویل شدن ریشه (چند هفته) است. IBA اغلب در مرحله القای ریشه استفاده می‌شود، درحالی‌که NAA یا یک محیط بدون اکسین در فاز افزایش طول ریشه استفاده می‌شود (Dobránszki & da Silva, 2010). فلوروگلوکوسینول ماده‌ای است با فرمول $C_6H_6O_3$ جزء ترکیبات فنلی از مشتقات فلوریدزین می‌باشد. ترکیبات فنلی می‌توانند به‌عنوان یک سوپسترای جایگزین برای آنزیم ایندول استیک اسید اکسیداز و یا ایندول استیک اسید پراکسیداز باشد و این مورد منجر به افزایش درونی هورمون ایندول استیک اسید و در نتیجه افزایش ریشه‌زایی شود (Kishore et al., 2006). فلوروگلوکوسینول نمو ریشه، طویل شدن ریشه و القای ریشه‌های جدید را در پایا (Pérez et al., 2016) و موز (Londe et al., 2017) تحریک می‌کند. کاربرد فلوروگلوکوسینول در محیط ریشه‌زایی باعث کاهش درصد ریشه‌زایی سیب توسرخ از 100 درصد به $77/73$ درصد شد. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. حضور تیمار فلوروگلوکوسینول باعث بالا رفتن میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه شد. در پژوهشی که بر روی زیتون انجام گرفت تیمار اکسین بعلاوه فلوروگلوکوسینول 250 میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش درصد ریشه‌زایی شد (Alizadeh et al., 2018). در مطالعه‌ی دیگر تأثیر فلوروگلوکوسینول بر هشت رقم سیب مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان داد این ترکیب تنها بر یک رقم اثر تحریک‌کنندگی داشته و بر بقیه ارقام یا موثر نبوده و یا خاصیت بازدارندگی داشت (Kishore et al., 2006). نتایج مولکولی حاصل از RT-PCR نشان داد که گیاهان حاصل از کشت مریستم به هیچ‌کدام از ویروس‌های شایع گیاه سیب مبتلا نبودند و طی سنجش مولکولی هیچ بانندی که نشان‌دهنده‌ی آلودگی باشد مشاهده نشد. سنجش به کمک RT-PCR نیز به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص ویروس‌های سیب و دیگر درختان میوه مورد استفاده قرار گرفته است (Menzel et al., 2002). مطالعات استفاده از مریستم‌های چند میلی‌متری را برای حذف ویروس‌ها نشان داده‌اند (Wang et al., 2016; Vivek & Modgil, 2018; Kazemi et al., 2019). نتایج حاصل از این مطالعات با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری: مریستم به دلیل تمایز نیافتن دستجات آوندی و غلظت بالای اکسین اجازه تکثیر ویروس را نمی‌دهد از این‌رو در این مطالعه از روش کشت مریستم به‌منظور دستیابی به گیاهان عاری از ویروس استفاده شد. بررسی اولیه گیاهان مادری با روش مولکولی RT-PCR نشان داد تمام نمونه‌های مادری مورد بررسی به ویروس‌های ASGV، ACSLV، ApMV و ASPV آلوده بودند درحالی‌که در هیچ‌کدام از نمونه‌های گیاهی حاصل از کشت مریستم آلودگی ویروسی وجود نداشت و روش RT-PCR از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار بود. با در نظر گرفتن نتایج، می‌توان پکتین و فلوروگلوکوسینول را دو ترکیب مؤثر در بهبود شاخه‌زایی در کشت مریستم سیب در نظر گرفت. اگرچه فلوروگلوکوسینول موجب افزایش تعداد ریشه در هر ساقه شد، اما درصد ریشه‌زایی را کاهش داد؛ بنابراین نقش آن در ریشه‌زایی به صورت دوگانه بوده و اثر مثبت آن عمدتاً در شاخه‌زایی قابل مشاهده است.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه خوارزمی به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر

سپاسگزاری می‌شود.

References

- Abedi, B., Parvaneh, T., & Ardakani, E. (2019). Evaluation of physical properties of fruit, secondary metabolites, and browning index of *Bekran red* flesh apple genotype and some spring apple cultivars. *Journal of Horticulture Science*, 33(4), 609-622. <https://doi.org/https://doi.org/10.22067/jhorts4.v33i4.72902>
- Abdollahi, H., Muleo, R., & Rugini, E. (2005). Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Seed & Plant*, 21(3), 373-384. <https://doi.org/10.22092/spij.2017.110616>
- Alizadeh, M., Yonesabadi, T., Seifi, E., & Sadeghi, M. (2018). Evaluation of joint application of auxin and some chemical compounds to induce root in olive cuttings. *Journal of Plant Production Research*, 25(3), 41-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.22069/jopp.2018.13841.2243>
- Asare, M., & Zandi, E. (2008). Investigation of effective factors on exudation of phenols in tissue culture of *Eucalyptus gunnii* and *E. Viminalis*. *Pajouhesh & Sazandegi*, 7, 184-190. In Persian
- Avestan, S., Naseri, L., & Najafzadeh, R. (2018). Improvement of in vitro proliferation of apple (*Malus domestica* Borkh.) by enriched nano chelated iron fertilizer. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 5(1), 43-51. <https://doi.org/https://doi.org/10.22059/ijhst.2018.251673.216>
- Barnes, W. J., & Anderson, C. T. (2018). Release, recycle, rebuild: cell-wall remodeling, autodegradation, and sugar salvage for new wall biosynthesis during plant development. *Molecular plant*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.011>
- Bettoni, J. C., Dalla Costa, M., Souza, J. A., Volk, G. M., Nickel, O., da Silva, F. N., & Kretschmar, A. A. (2018). Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for in vitro eradication of latent viruses from 'Marubakaido' apple rootstock. *Journal of Biotechnology*, 269, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.014>
- Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., & Ferchichi, A. (2010). Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 513-524. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/12538078.2010.10516227>
- Chehregani, A., Malayeri, B., & Yousefi, N. (2009). Developmental stages of ovule and megagametophyte in *Chenopodium botrys* L.(Chenopodiaceae). *Turkish Journal of Botany*, 33(2), 75-81
- Daud, N., Faizal, A., & Geelen, D. (2013). Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 183-190. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9486-4>

- Desvignes, J., & BoyÃ, R. (1988). *Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees* XIV International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases
- Dobránszki, J., & da Silva, J. A. T. (2010). Micropropagation of apple—a review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.008>
- El-Tantawy, A.-A., Solís, M.-T., Da Costa, M. L., Coimbra, S., Risue o, M.-C., & Testillano, P. S. (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reproduction*, 26, 231-243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00497-013-0217-8>
- Faramarzi, S., Yadollahi, A., & Soltani, B. (2014). Preliminary evaluation of genetic diversity among Iranian red fleshed apples using microsatellite markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 373-384 .
- Felek, W., Mekibib, F., & Admassu, B. (2015). Optimization of explants surface sterilization condition for field grown peach (*Prunus persica* L. Batsch. Cv. Garnem) intended for in vitro culture. *African journal of biotechnology*, 14(8), 657-660. <https://doi.org/https://doi.org/10.5897/AJB2014.14266>
- García-Angulo, P., Villar, I., Giner-Robles, L., & Centeno, M. L. (2018). In vitro regeneration of two Populus hybrid clones. The role of pectin domains in cell processes underlying shoot organogenesis induction. *Biologia plantarum*, 62(4), 763-774. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0819-y>
- Geshi, N., Johansen, J. N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Kaneko, S & ,Tryfona, T. (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 76(1), 128-137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12281>
- Hadidi, A., & Barba, M .(2011). Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. Am Phytopath Society. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/9780890545010.001>
- Hu, G.-J., Zhang, Z.-P., Dong, Y.-F., Fan, X.-D., Ren, F., & Zhu, H.-J. (2015). Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australasian Plant Pathology*, 44(2), 167-173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13313-014-0334-3>
- Hu, G. j., Dong, Y. f., Zhang, Z. p., Fan ,X. d., Ren, F., & Li, Z. n. (2017). Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with in vivo shoot-tip grafting and in vitro meristem culture. *Journal of Phytopathology*, 165(10), 701-706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jph.12610>
- Kazemi, N., Habashi, A., & Asadi, W. (2019). Culture Efficiency on Virus Elimination from in vitro Shootlets of Red Flesh Apple (*Malus pumila* Mill.). *Journal of Horticultural Science*, 33(3), 409-599. <https://doi.org/https://doi.org/10.22067/jhorts.v33i3.77252>
- Kim, J. H., Kwon, B. M., Ho, T. T., & Park, S. Y. (2020). Phloroglucinol improves direct rooting of in vitro cultured apple rootstocks M9 and M26. *Agronomy*, 10(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081079>

- Kishore, K., Sharma, S. K., & Pramanick, K. K. (2006). *Temperate horticulture: current scenario*. New India Publishing Agency. 570 pages.
- Li, B. Q., Feng, C. H., Hu, L. Y., Wang, M. R., & Wang, Q. C. (2016). Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26'. *Annals of Applied Biology*, 168(1), 142-150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/aab.12250>
- Londe, L. C. N., Vendrame, W. A., de Oliveira, A. B., & Costa, A. M. (2017). Phloroglucinol is effective for in vitro growth and multiplication of banana shoots and roots. *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, 13(2), 34-40. <http://dx.doi.org/10.9734/JABB/2017/33718>
- Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., Teixeira da Silva, J. A., Bulley, S. M., & Hudák, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101, 251-267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6>
- Masoudi, S., Kermani, M. J., Soleimani, A., Hajnajari, H., Alidadi, A., & Hosseini, Z. S. (2020). Optimizing micropropagation of apple (*Malus × Domestica* Borkh) and in vitro root Induction by *Piriformospora indica*. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)*, 66(4), 137-147. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2478/agri-2020-0013>
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99(1-2), 81-92. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00381-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00381-0)
- Miri, S. M., Livari, B. V., Khalighi, A., & Maghami, S. A. G. (2003 a). Effect of carbohydrate, gibberellic acid, indolebutyric acid, phloroglucinol, explant orientation and culture vessels volume on optimizing in vitro propagation of M. 9 apple rootstock. *Pojouhesh & Sazandegi*, 59, 31-37. In Persian
- Miri, S., VAEZ, L. B., Khalighi, A., & Ghaem, M. S. (2003 b). Phenolic oxidation reduction and in vitro proliferation of shoots of apple clones M9 and M26. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 4(3-4), 145-154. In Persian
- Mohseniazar, M., Nazeri, S., Ghadimzadeh, M., & Malboobi, M.-A. (2012). Effect of medium type and some biochemical components on in vitro proliferation of dwarf rootstock of apple (*Malus domestica* Borkh cv Gami Almasi). *Plant Production Technology*, 9(2), 33-41 In Persian .
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nezami, A., Garoosi, G., Haddad, R., & Babaei, M. (2010). Study the effects of pectin, medium type and plant growth regulators (PGRs) on micropropagation of gf677 under in vitro condition. *Agricultural Biotechnology Journal*, 24(1), 113-126. <https://doi.org/10.22103/jab.2011.365>

- Ochatt, S. J., & Caso, O. H. (1982). In vitro meristem culture of M. 4 apple (*Malus pumila* Mill.). I. Optimal nutrient medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2, 39-48. <https://doi.org/10.1007/BF0003551>
- Pérez, L. P., Montesinos, Y. P., Olmedo, J. G., Rodriguez, R. B., Sánchez, R. R., Montenegro, O. N., ... & Gómez-Kosky, R. (2016). Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 196-203. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9733-6>
- Pérez-Pérez, Y., Carneros, E., Berenguer, E., Solís, M. T., Bárány, I., Pintos, B., ... & Testillano, P. S. (2019). Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Frontiers in plant science*, 9, 1915. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01915>
- Petti, C. (2020). Phloroglucinol mediated plant regeneration of *ornithogalum dubium* as the sole “hormone-like supplement” in plant tissue culture long-term experiments. *Plants*, 9(8), 929. <https://doi.org/10.3390/plants9080929>
- Paprštein, F., Sedlák, J., Svobodová, L., Polák, J., & Gadiou, S. (2013). Results of in vitro chemotherapy of apple cv Fragrance. *Horticultural Science (HORTSCI)* 40(4), 186-190. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17221/37/2013-HORTSCI>
- Phipps, J. B., Robertson, K. R., Rohrer, J. R., & Smith, P. G. (1991). Origins and evolution of subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic botany*, 303-332. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2419283>
- Retheesh, S., & Bhat, A. (2010). Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. *Crop Protection*, 29(10), 1214-1217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.017>
- Rodríguez-Sanz, H., Manzanera, J.-A., Solís, M.-T., Gómez-Garay, A., Pintos, B., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2014). Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. *BMC Plant Biology*, 14, 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12870-014-0224-4>
- Romadanova, N. V., Mishustina, S. A., Gritsenko, D. A., Omasheva, M. Y., Galiakparov, N. N., Reed, B. M., & Kushnarenko, S. V. (2016). Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.). *CryoLetters*, 37(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.093>
- Rugini, E., & Verma, D. C. (1982). Micropropagation of Ferranges almond (*Prunus amygdalus*) IPC technical paper series. Number 122.
- Sarkar, D., & Naik, P. S. (2000). Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures in vitro. *Plant cell, tissue and organ culture*, 60, 139-149. <https://doi.org/10.1023/A:1006419805980>
- Singh, I. P., Sidana, J., Bharate, S. B., & Foley, W. J. (2010). Phloroglucinol compounds of natural origin: Synthetic aspects. *Natural product reports*, 27(3), 393-416. <https://doi.org/10.1039/b914364p>

- Siwach, P., & Gill, A. R. (2011). Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, 271-280. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0074-6>
- Sanderson, J. (2020). *Biological microtechnique*. Garland Science .
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Smertenko, A., & Bozhkov, P. V. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1343-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jxb/eru005>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., & Raab, T. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Szabó, L. K., Desiderio, F., Kirilla, Z., Hegedűs, A., Várallyay, É., & Preiner, É. (2024). A mini-review on in vitro methods for virus elimination from *Prunus* sp. fruit trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-023-02670-9>
- Teixeira da Silva, J. A., Dobránszki, J., & Ross, S. (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9491-2>
- Vivek, M., & Modgil, M. (2018). Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. *Virus Disease*, 29, 75-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13337-018-0437-5>
- Wang, M.-R., Cui, Z.-H., Li, J.-W., Hao, X.-Y., Zhao, L., & Wang, Q.-C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant methods*, 14(87) <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, M.-R., Li, B.-Q., Feng, C.-H., & Wang, Q.-C. (2016). Culture of shoot tips from adventitious shoots can eradicate *Apple stem pitting virus* but fails in *Apple stem grooving virus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125, 283-291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-016-0948-y>
- Wang, N., Jiang, S., Zhang, Z., Fang, H., Xu, H., Wang, Y., & Chen, X. (2018). *Malus sieversii*: the origin, flavonoid synthesis mechanism, and breeding of red-skinned and red-fleshed apples. *Horticulture research*, 5, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41438-018-0084-4>
- Webster, C. A., & Jones, O. P. (1991). Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. *Journal of horticultural science*, 66(1), 1-6. <https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516118>
- Yari, M. B., Gholami, M., & AsnaAshari, M. (2011). Effect of sampling time, explant type, culture orientation and antioxidant type on in-vitro explant establishment and growth of

- persian walnut. *Iranian Journal of Horticultural Science (IJHS)*, 42(2), 141-149 . In Persian. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.2008482.1390.42.2.4.7>
- Zahed Zadeh, F., Mahna, N., Kakavand, F., Zare Nahandi, F., & Panahande, J. (2014). Effect of concentration and source of carbohydrate on in vitro production of anthocyanin in apple. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(4), 37-48. <https://doi.org/10.22103/jab.2014.1220>
- 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/https://doi.org/10.1007/s10341-022-00731-5>
- Zimmerman, R. H. (1984). Rooting apple cultivars in vitro: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3(4), 301-311. <https://doi.org/10.1007/BF00043081>
- Zhao, L., Wang, M.-R., Cui, Z.-H., Chen, L., Volk, G. M., & Wang, Q.-C. (2018). Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of *Apple stem grooving virus* from infected in-vitro-cultured apple shoots. *Plant Disease*, 102(8), 1574-1580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1753-RE>