Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 3, Autumn 2020 (513-522)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.262180.1479

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۹ (ص ۵۲۲-۵۱۳)

تکثیر درون‌شیشه‌ای و عاری‌سازی ژنوتیپ‌های برتر محلب (*Prunus mahaleb*) از ویروس‌های بذرزاد از طریق گرمادرمانی و کشت مریستم

ملیحه جمشیدی‌ها[۱]، منصوره کشاورزی[۲*]، مسعود نادرپور[۳]، ناصر بوذری[۲] و علی محمد شکیب[٤]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تولیدات گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار
۲. دانشیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، کرج
۳. دانشیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج
٤. دانشیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۸)

چکیده

محلب (*Prunus mahaleb*) از مهم‌ترین منابع تولید پایه بذری و کلونال و رایج‌ترین پایه بذری گیلاس و آلبالو در ایران است. هدف از این تحقیق دست‌یابی به پایه‌های انتخابی محلب NB5176، NBVP1 و NBVP2 عاری از ویروس‌های بذرزاد آبله آلو (*Plum pox virus*, PPV)، کوتولگی آلو (*Prune dwarf virus*, PDV)، لکه حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) بود. برای این منظور، ابتدا آلودگی درختان مادری توسط آزمون سرولوژیک الیزا (ELISA) بررسی شد. مریستم‌های انتهایی این ژنوتیپ‌ها درمحیط MS مستقر و شش هفته بعد به محیط‌های پرآوری MS (حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر پکتین) و DKW (حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP) و WPM (حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر پکتین) منتقل شدند. پس از مرحله تکثیر اولیه، گیاهچه‌ها درون شیشه گرمادرمانی شدند و سلامت گیاهان بازیابی شده از گرمادرمانی از سه ویروس فوق توسط RT-PCR بررسی و گیاهچه‌های سالم، تکثیر، ریشه‌دار و به گلدان منتقل شدند. بر اساس نتایج آزمون الیزا، برخی درختان مادری به ویروس‌های PDV و PNRSV آلوده بودند. بیشترین درصد استقرار مریستم ٤۲/۵٪ مربوط به ژنوتیپ NBVP1 بود. در مرحله پرآوری، هیچ ژنوتیپی در محیط‌های MS و WPM رشد نیافت و تنها محیط DKW مناسب بود. از نظر ریشه‌زایی، محیط‌های 1/2DKW و QL تغییریافته حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مناسب بودند. ژنوتیپ NBVP1 در کلیه محیط‌های ریشه‌زایی بهتر از دو ژنوتیپ دیگر ریشه‌دار شد. ٤۰-۲۵ درصد از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به شرایط گرمادرمانی تحمل داشته و براساس نتایج RT-PCR، عاری از PDV، PNRSV، PPV بودند. نهال‌های گلدانی به‌دست‌آمده می‌توانند به باغ ایزوله منتقل شده و برای تولید بذر سالم محلب به کار روند.

واژه‌های کلیدی: آبله آلو، الیزا، پایه، تکثیر، ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران، RT-PCR.

Obtaining seed-borne virus free mahaleb (*Prunus mahaleb*) genotypes through meristem tip culture and *in vitro* thermotherapy

Malihe Gamshidiha[1], Mansureh Keshavarzi[2*], Masoud Naderpour[3], Naser Bouzari[2] and Ali Mohammad Shakib[4]
1. Former M.Sc. Student, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
2. Associate Professor, Agricultural Research, Extension and Education Organisation (AREEO), Horticultural Research Institute, Temperate Fruit Research Center, Karaj, Iran
3. Associate Professor, AREEO, Seed and Plant Registration Organization, Karaj, Iran
4. Associate Professor, AREEO, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran
(Received: Aug. 5, 2018 - Accepted: Nov. 9, 2018)

ABSTRACT

Mahaleb (*Prunus mahaleb*) plant is one of the most important sources of cherry clonal and seed base rootstock production in Iran. Obtaining seed-borne viruse-free (*Prune dwarf virus*, *Plum pox virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*) sources for selected mahaleb rootstocks (NB5176, NBVP1, NBVP2), For this purpose, the viral infection status of genotypes was initially studied in orchard using ELISA serological method. Then the meristem tips were cultured *in vitro* and 6 months later, transferred to MS medium containing 0.5mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA, DKW contacting 0.5 mg/l BAP and WMP contacting 0.3 mg/l pectin. After the initial proliferation stage, the plantlets were heat-treated and then health status of the remained plantlets was studied using RT-PCR. Then the healthy plants were rooted and transferred to pots. Based on ELISA result, some genotypes were probably infected to PNRSV and PDV. The highest shoot tip establishment was recorded as 42.5% by NBPV1. No genotype was proliferated in MS and WPM, so only DKW was apropriate for proliferation. For plantlet rooting, 1/2DKW and modified QL containing 1.5 mg/l IBA were appropriate. NBVP2 was the best in all rooting media. Most of plantlets from three genotypes tolerated*in-vitro* thermotherapy condition and were free of PNRSV, PDV, PPV based on RT-PCR result. The healthy plants were transferred to pots and could be cultured in an isolated orchard to obtain healthy mahaleb seeds.

Keywords: ELISA, PNRSV, PPV, proliferation, RT-PCR, rootstock.

* Corresponding author E-mail: kmansureh@gmail.com

مقدمه

گیاه محلب یا آلبالو تلخ (*Prunus mahaleb* L.) به تیره گلسرخیان تعلق داشته و از گیاهان گلدار و نهاندانه است (Webster & Looney, 1996). این گیاه در ترکیه، روسیه، آمریکا، عراق، پاکستان، ترکمنستان و قفقاز پراکنده است و در ایران، از مناطق شمال غرب و غرب، جنگل‌های ارسباران، لرستان، چهارمحال و بختیاری، همدان و دره کرج گزارش شده‌است (Mozafarrian, 2004). بذر یا کلون‌های گزینش شده این گیاه از مهم‌ترین منابع پایه برای پیوند گیلاس و آلبالو هستند (Sansavini & Lougi, 1996; Perry, 1987). پایه محلب به pH بالا، کمبود روی، کلروز ناشی از کمبود آهن و خشکی متحمل است، قابلیت رشد مناسب درخاک‌های سبک را دارد، به خاک‌های سنگین و مرطوب با زه‌کشی ضعیف حساس بوده و ریشه آن به زمستان سرد سازگاری دارد (Albertini & DeSalvador, 1991; Giorgio & Standardi, 1993; Bright & Marte, 2004). برخی پایه‌های انتخابی کلونال محلب که به طریق رویشی تکثیر می‌شوند، موجب پاکوتاهی شده، پاجوش‌دهی ندارند و احداث باغات متراکم را ممکن می‌کنند (Hrotkó *et al*., 2009).

گیاه محلب همانند سایر درختان هسته‌دار می‌تواند به انواع ویروس‌ها آلوده شود. در میان درختان میوه، درختان میوه هسته‌دار بالاترین درصد آلودگی‌های ویروسی را نشان می‌دهند و می‌توانند میزبان بیش از ۲۵ ویروس مختلف باشند (Myrta *et al*., 2003). از میان آن‌ها، ویروس‌های آبله آلو[1] (PPV)، کوتولگی آلو[2] (PDV) و لکه حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار[3] (PNRSV) از اهمیت خاصی برخوردارند زیرا با دانه گرده و بذر قابل انتقال هستند. در ایران، ویروس PNRSV برای اولین بار از اردبیل و دشت مغان گزارش شد (Moini & Izadpanah, 2000). سپس در تهران از درختچه‌های رز (Rakhshanderoo *et al*., 2006) و در استان گلستان در درختان آلو، هلو و شلیل (Fallah *et al*., 2008) و اخیراً از علف‌های هرز استان‌های تهران، خوزستان، البرز و لرستان گزارش شد (Sabaghian, 2014). ویروس آبله آلو از درختان میوه هسته‌دار استان‌های مازندران و خراسان رضوی گزارش شد (Jafarpour & Khayat, 2013; Mohammadi *et al*., 2012).

روش‌های متنوعی مانند کشت مریستم، گرمادرمانی، الکتروتراپی، ریزپیوندی، شیمی‌درمانی و کاربرد مواد محرک رشد برای عاری‌سازی مواد گیاهی از ویروس‌ها به‌کار برده می‌شوند که کشت مریستم و گرمادرمانی از عمومی‌ترین آن‌ها هستند. ویروس‌هایPDV، PNRSV و PPV و برگ حلقوی گیلاس[4] (ChLRV) با روش کشت مریستم از مواد گیاهی حذف شده‌اند (Houang & Millikan, 1980; Barba, 1992). گرمادرمانی به روش‌های درون‌شیشه‌ای و برون شیشه‌ای نیز قادر به کاهش غلظت یا حذف کامل ویروس بوده‌است (Saponari *et al*., 1999). با توجه به نبود هسته‌های عاری از ویروس محلب به‌عنوان پایه کلونال گیلاس در کشور، هدف از این تحقیق دست‌یابی به ژنوتیپ‌های برتر محلب عاری از ویروس‌های بذرزاد به‌عنوان منبع تامین بذر سالم برای پایه بذری گیلاس/ آلبالو است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، تعداد سه ژنوتیپ انتخابی پاکوتاه و نیمه پاکوتاه بومی محلب شامل NB5176 و NBVP1 و NBVP2 مورد استفاده قرار گرفتند. تک درختان مادری ۶-۴ ساله این ژنوتیپ‌ها در نهالستان و ایستگاه مشکین‌شهر مؤسسهٔ تحقیقات علوم باغبانی واقع در کرج کشت شده بودند. پایه NB5176 پاکوتاه و بومی استان تهران بود، NBVP1 بسیار پاکوتاه از شیخ عطار استان کردستان و NBVP2 نیمه پاکوتاه لواسان استان تهران بود (Bouzari, 2011).

آلودگی درختان مادری به ویروس‌های PDV و PPV با روش الیزای مستقیم و براساس دستورالعمل شرکت Agdia بررسی شد. نتیجه آزمون توسط دستگاه ELISA-Reader (مدل Awareness) براساس تغییررنگ چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر، با

1. *Plum pox virus*
2. *Prune dwarf virus*
3. *Prunus necrtptic ringspot virus*
4. *Cherry leafroll virus*

احتساب حداقل سه برابر جذب شاهد منفی به‌عنوان پاسخ مثبت، ارزیابی شد. همزمان با تهیه نمونه‌های برگی از سرشاخه‌های جوان برای الیزا در اواخر بهار تا اوایل تابستان، مریستم هر سه ژنوتیپ نیز کشت داده شد. سرشاخه‌ها به قطعات کوچک تقسیم و پس از شست‌وشوی اولیه، به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵۰٪ ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند (Goudarzi *et al*., 1997). سپس با استفاده از بینوکلر (Nikon) فلس‌های جوانه‌ها حذف و مریستم‌های ۰/۵ میلی‌متری در محیط MS (Murashinge & Skoog, 1962) کشت شده، شش هفته بعد، به محیط‌های پرآوری MS، DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) و WPM (Lioyd & McCown, 1981) منتقل و در اتاق رشد (دمای ۲۵-۲۳ °C، تناوب نوری ۱۶/۸، روشنایی ۴۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) نگهداری شدند. محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر پکتین، محیط DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و WPM حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر پکتین بود (Tatari & Mousavi, 2013). ارزیابی موفقیت پرآوری بر پایه صفات کمی (تعداد و طول شاخه، تعداد برگ، طول میانگره) و کیفی (توسعه برگی، فشرده برگی، کالوس‌زایی، ضخامت شاخه و بافت مردگی انتهایی) انجام شد. طول میانگره با تقسیم طول گیاه بر تعداد برگ‌ها محاسبه شد. اندازه‌گیری میزان توسعه برگی با استفاده از مقیاس ۵ تایی شامل ۱: برگ‌های کوچک و زرد (بدترین وضعیت)، ۲: برگ‌های کوچک و سبز، ۳: برگ‌های متوسط، ۴: برگ‌های پهن، ۵: برگ‌های بسیار پهن و سبز (بهترین وضعیت) انجام شد. میزان کالوس‌زایی با استفاده از مقیاس سه تایی شامل ۱: ضعیف یا نداشتن کالوس، ۲: متوسط و ۳: زیاد اندازه‌گیری شد.

تیمار گرمادرمانی پس از پرآوری انجام شد. برای این منظور، گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای به انکوباتور منتقل شده و دمای انکوباتور در طی یک هفته از ۲۶°C به ۳۶°C رسانیده و به‌مدت چهار هفته در این دما ابقا شد. گیاهچه‌هایی که زنده ماندند به محیط MS منتقل و پس از پرآوری مجدد، آلودگی ویروسی آن‌ها با استفاده از روش RT-PCR بررسی و گیاهچه‌های سالم وارد مرحله ریشه‌زایی شدند. چهار محیط ریشه‌زایی شامل QL تغییریافته (Leblay *et al*., 1991)، MS، DKW و 1/2DKW (کلیه ماکروالمنت‌ها به نصف تقلیل یافت) حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA (Duchefa) بررسی شدند. به محیط MS، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA (Duchefa) نیز افزوده شد. ۳۰ روز پس از نگهداری در اتاق رشد، صفات کمی (تعداد و طول ریشه‌های نابه‌جای اولیه و ثانویه، ضخامت ریشه نابه‌جای اولیه و درصد ریشه‌زایی) و کیفی (کیفیت ساقه و ریشه، درصد بافت مردگی و کالوس‌زایی) اندازه‌گیری شد. پرآوری در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ۱۵ تکرار و چهار مشاهده و ریشه‌زایی به‌صورت فاکتوریل، فاکتور محیط کشت در ۴ سطح QL تغییر یافته، MS، 1/2DKW و DKW و غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA در دو سطح ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تکرار (ریزنمونه) انجام شد. داده‌های کمی با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SAS9.1 به‌صورت طرح نامتعادل آنالیز شدند. مقایسه صفات کیفی توسط آزمون کروسکال والیس[1] انجام شد.

استخراج RNA براساس دستورالعمل RNA extraction kit (QIAGEN) و ساخت cDNA مطابق دستورالعمل cDNA synthesis kit (BioRad) انجام شد. کیفیت RNA با الکتروفورز و اسپکتروفتومتری بررسی شد. مخلوط PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میلی‌مولارکلریدمنیزیم، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، یک میکرومولار پرایمرهای رفت و برگشت (سیناژن) (جدول۱)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، یک واحد آنزیم پلیمراز و یک میکرولیتر cDNA بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه، ۴۰ چرخه تکثیر و یک مرحله بسط نهایی بود (جدول۲). نمونه‌های شاهد مثبت ویروس‌های PNRSV و PDV به‌ترتیب از درختان هسته‌دار آذربایجان‌غربی و سیب خراسان شمالی و ویروس PPV از شرکت AC-Diagnostic تهیه شد.

1. Kruscal-Wallis

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی به‌منظور ارزیابی آلودگی ژنوتیپ‌های محلب به ویروس‌های بذرزاد
Table 1. Characteristics of the primers used in this study for evaluation of infection of mahaleb genotypes to seed-born viruses

Virus/ gene	(5'-3')' Sequence	Genome loci	Fragment size (bp)	Reference
PNRSV	F: GCCGAATTTGCAATCATACCC R: ACTTCGGTCTTGAATTCGAT	*MP+CP*	599	*Naderpour and Shahbazi, 2015* *Naderpour and Sadeghi, 2015*
PPV	F: CAATAAAGCCATTGTTGGATC R: CTCTGTGTCCTCTTCTTGTG	*NIb*	310	Naderpour and Shahbazi, 2015; Naderpour and Sadeghi, 2015
PDV	F: CAATAAAGCCATTGTTGGATC R: CTCTGTGTCCTCTTCTTGTG	*NIb*	504	Naderpour and Shahbazi, 2015; Naderpour and Sadeghi, 2015
Nad5	F: GATGCTTCTTGG GGCTTCTTGTT R: CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	*Exones I and II*	189	Menzel*et al.*, 2002

جدول ۲. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز در RT-PCR برای آزمون ویروس‌های PDV، PPV و PNRSV در ژنوتیپ‌های مختلف محلب
Table 2.Used PCR program for detection PPV, PDV, PNRSV viruses in mahaleb genotypes

Virus/ gene	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
PNRSV	95 ºC/5 min	94 ºC/30 sec	54 ºC/45 sec	72 ºC/1 min	72 ºC/7 min
PPV	94 ºC/5 min	94 ºC/30 sec	60 ºC/30 sec	72 ºC/50 sec	72 ºC/5 min
Nad 5	94 ºC/5 min	94 ºC/30 sec	60 ºC/30 sec	72 ºC/50 sec	72 ºC/5 min
PDV	95 ºC/5 min	94 ºC/30 sec	51 ºC/40 sec	72 ºC/1 min	72 ºC/10 min

نتایج و بحث

بر اساس نتایج آزمون الیزا، هیچ‌یک از درختان مادری به ویروس PPV آلوده نبودند اما درختان مادری ژنوتیپ NBVP1 به ویروس‌های PNRSV و PDV و ژنوتیپ NBVP2 به ویروس PNRSV آلوده بودند (جدول۳). آلودگی ارقام گیلاس پیوندی روی پایه‌های کلونال و بذری محلب به ویروس‌های PNRSV، PDV و PPV قبلاً نیز گزارش شده‌است (Boari *et al*., 1998; Saponari *et al*., 1999; Sipahioglu *et al*., 2005; Usta *et al*., 2005; Milusheva *et al*., 2008). نتایج آزمایش کشت مریستم نشان داد که مریستم کلیه ژنوتیپ‌ها مستقر شده و تولید گیاهچه کردند. بیشترین و کم‌ترین درصد استقرار مریستم به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های NBVP2 و NBVP1 بود (جدول۳).

هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها در محیط‌های پرآوری MS و WPM رشد نداشته یا پس از رشدی جزیی، زرد شده و از بین رفتند، اما توانستند در محیط DKW رشد کنند، لذا آزمایشات فقط در محیط DKW ادامه یافت. قبلاً نیز مطالعه پرآوری محلب (سنت لوسی۶۴) در محیط‌های DKW، MS و QL تغییر یافته نشان داد که DKW حاوی ۱-۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بهترین محیط پرآوری بود (Moldavian *et al*., 2010; Saponari *et al*., 1999). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌ها از نظر کلیه صفات کمی پرآوری، تفاوت معنی‌داری داشتند. ژنوتیپ NB5176 کم‌ترین طول و تعداد شاخه را داشته و احتمالاً پاکوتاه‌کننده‌ترین ژنوتیپ بود (جدول۴). تفاوت در صفات مرحله پرآوری در برخی ژنوتیپ‌های دیگر محلب توسط Ganji Moghadam *et al*. (2008) نیز گزارش شده‌است. در مجموع، هر سه ژنوتیپ را می‌توان به‌صورت کشت بافتی تکثیر کرد. نمونه‌ای از گیاهچه‌های کشت بافتی در شکل A-۱ آمده است.

جدول۳. تعداد مریستم کشت‌شده، تعداد مریستم استقراریافته و درصد استقرار مریستم ژنوتیپ‌های مختلف محلب
Table 3. Number of meristems, established meristems and meristem establishment percentage in different mahaleb genotypes

Genotype	Number of Cultured meristems	Number of established meristems	Establishment (%)
NBVP1	130	32	24.6ab
NBVP2	40	17	42.5a
NB5176	55	17	30.1b

جدول ۴. مقایسه میانگین صفات کمی پرآوری (تعداد و طول شاخه، تعداد برگ و طول میانگره) در ژنوتیپ‌های مختلف محلب
Table 4. Mean comparison of shoot length and numbers, leaf numbers and internode distance in different mahaleb genotypes

Genotype	Shoot numbers	Shoot length (cm)	Leaf numbers	Internode distance (cm)
NBVP1	3.10a	2.85a	9.15b	0.56a
NBVP2	4.12a	2.60a	13.40a	0.43c
NB5176	0.61b	2.25b	10.08b	0.49b

شکل ۱. شاخه‌زایی و ریشه‌زایی نمونه‌های کشت‌شده ژنوتیپ‌های مختلف محلب در شرایط درون‌شیشه. A) شاخه‌زایی در محیط DKW+0.5mg/l BAP، B) زردشدن برخی از گیاهچه‌ها پس از گرمادرمانی درون‌شیشه‌ای، C) ریشه‌زایی ژنوتیپ NBVP1 در 1/2DKW+1.5mg/l IBA.

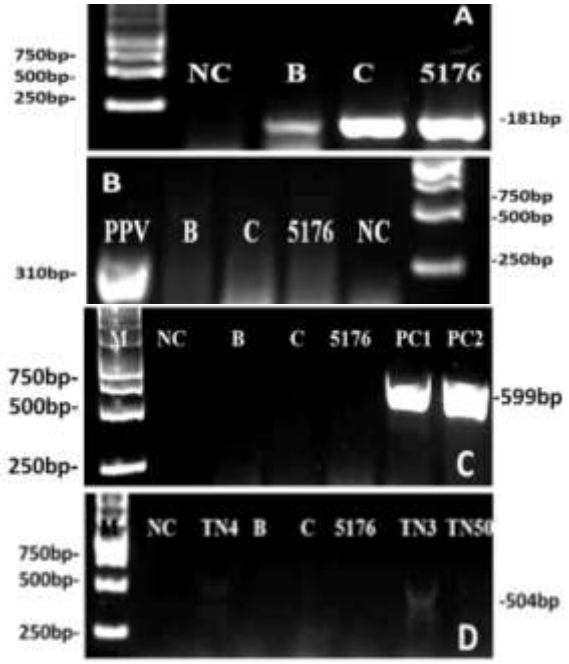
Figure 1. Branching and Rooting of Cultivated Specimens of Different Mahlab Genotypes in In vitro Condition. A) Branching in DKW + 0.5mg / l BAP medium; B) Some seedlings turn yellow after in vitro heat treatment; C) Rooting of NBVP1 Genotype in I / 2DKW + 1.5mg / l IBA

نتایج آنالیز کروسکال والیس صفات کیفی پرآوری نشان داد که تنها دو صفت توسعه برگی و ضخامت شاخه در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بودند. از نظر توسعه برگی، در ژنوتیپ NB5176 بیشتر برگ‌ها (۵۰٪) توسعه‌یافتگی متوسط و در ژنوتیپ‌های NBVP2و NBVP1 بیشتر برگ‌ها (به‌ترتیب ۴۷/۹٪ و ۴۶/۷٪) توسعه‌یافتگی کم بود. در ژنوتیپ‌های NB5176 و NBVP2 بیشتر شاخه‌ها (به‌ترتیب ۷۰/۸٪ و ۶۸/۸٪) کیفیت خوبی داشتند ولی در ژنوتیپ NBVP1 کیفیت بیشتر شاخه‌ها (۴۶/۷٪) متوسط بود. اکثر شاخه‌های هر سه ژنوتیپ بافت‌مردگی انتهایی، فشرده‌برگی و کالوس‌زایی نداشتند. Ganji Moghadam *et al.* (2008) نشان دادند که شدت بافت‌مردگی در محلب برحسب محیط کشت و ژنوتیپ بین ۳۰-۰ درصد متغیر است. در ژنوتیپ‌های NB5176، NBVP1 و NBVP2، به‌ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۵/۸٪ شاخه‌ها بدون فشرده‌برگی رشد کرده بودند، همه ژنوتیپ‌ها در گروه با کالوس کم قرار گرفتند، به‌طوری‌که در ژنوتیپ‌های NBVP2، NB5176 و NBVP1 به‌ترتیب ۷۰/۸٪، ۵۸/۳٪ و ۵۸/۳٪ ریز نمونه‌ها کالوس کم و فقط ۲/۱٪، ۸/۳٪ و ۵٪ ژنوتیپ‌ها کالوس زیاد داشتند.

پس از گرمادرمانی، ۴۰-۲۵ درصد گیاهچه‌های هر سه ژنوتیپ زنده ماندند (شکل B-۱). تحمل به گرمادرمانی علاوه بر نحوه تیمار (دما، طول دوره) به گونه و رقم گیاه نیز بستگی دارد. اصولاً هسته‌داران تحمل کم‌تری از دانه‌داران دارند و گیلاس به گرما حساس بوده، گرمادرمانی آن دشوار است (Lenz *et al.*, 1983; Snir & Stein, 1985; Deogratias *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1991; Gella & Errea, 1998; Manganaris *et al.*, 2003). تحمل به گرمادرمانی درون شیشه‌ای در ارقام و کلون‌های مختلف گیلاس و محلب متفاوت بوده و به ۰ تا ۱۰۰ درصد مرگ و میر منجر شده است (Deogratias *et al.*, 1989; Gella & Errea, 1998; Cieślińska, 2007).

شش ماه بعد از گرمادرمانی، نتایج RT-PCR گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای نشان داد که هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها آلودگی نداشتند. در کلیه ژنوتیپ‌ها، قطعه ۱۸۱ جفت بازی مربوط به ژن *nad5* تکثیر شد که بیانگر موفقیت استخراج RNA و درست بودن سنتز دی‌ان‌ای مکمل بود (شکل A-۲). قطعات۳۱۰ جفت بازی مربوط به بخشی از ژن NIb ویروس PPV، ۵۹۹ جفت بازی مربوط به ژن *MP+CP* ویروس PNRSV و ۵۰۴ جفت بازی مربوط به ژن *RNA3* ویروسPDV، در نمونه‌های شاهد مثبت تکثیر شدند اما در هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها مشاهده نشدند (شکل ۲). بر اساس این نتایج، تلفیق گرمادرمانی درون‌شیشه‌ای و کشت مریستم موجب حذف ویروس‌های بذرزاد از ژنوتیپ‌های محلب بوده است.

تلفیق این دو روش برای سالم‌سازی محلب توسط Cieślińska (2007) نیز نتیجه بخش گزارش شده است. کشت مریستم بکرات برای سالم‌سازی درختان میوه مورد استفاده قرار گرفته‌است (Boxus 1984). گرمادرمانی درون‌شیشه‌ای در حذف ویروس‌های PNRSV، PDV و PPV و ویروس لکه زرد برگی سیب (ACLSV) از چندین گونه درختان میوه هسته‌دار موفق بوده است، به‌عنوان مثال، با گرمادرمانی درون‌شیشه‌ای موفق به حذف PDV, PNRSV از برخی ارقام گیلاس (Snir & Stein,1985; Deogratias *et al*., 1989) و PNRSV، ACLSV از آلو شدند، هرچند این روش برای عاری‌سازی برخی ارقام گیلاس دیگر از PDV موفق نبود (Cieślińska, 2007).



شکل ۲. نتایج الکتروفورز ویروس‌هایPDV، PPV، PNRSV و ژن *nad5*. A) قطعه ۱۸۱ جفت بازی مربوط به ژن *nad5* به‌عنوان ژن مرجع در ژنوتیپ‌ها (B, C, 5176) و نبود آن در شاهد منفی (NC)، B) قطعه ۳۱۰جفت بازی مربوط به شاهد مثبت PPV و نبود آن در ژنوتیپ‌ها، C) قطعه ۵۹۹ جفت بازی مربوط به شاهد مثبت PNRSV (PC1, PC2) و نبود آن در ژنوتیپ‌ها، D) باند ۵۰۴ جفت بازی مربوط به شاهدهای مثبت PDV (TN3, TN4) و نبود آن در ژنوتیپ‌ها. NC) شاهد منفی (آب مقطر استریل)، B, C, 5176) ژنوتیپ‌های مختلف محلب، M) نشانگر وزن ملکولی ۱ کیلو باز (فرمنتاس)

Figure 2. Gel electrophoresis result of *Nad5* gene, PDV, PPV and PNRSV. A) 181 bp fragment corresponds to *nad5* reference gene in mahaleb genotypes (5176, B,C) and its absence in negative control (NC); B) 310 bp fragment corresponds to positive control of PPV and its absence in the genotypes; C) 599 bp fragment corresponds to positive control of PNRSV (PC1and PC2) and its absence in genotypes; D) 504 bp fragment corresponds to positive control of PDV (TN3 and TN4) and its absence in different mahaleb genotypes; NC) negative control (ddH_2O); B, C, 5176) mahaleb genotypes; M) 1 kb molecular weight marker (Fermentas)

1. *Apple chlorotic leafspot virus*

گیاهچه‌هایی که براساس نتایج RT-PCR سالم تشخیص داده شدند، تکثیر و ریشه‌دار شدند. در این مرحله، فاکتورهای ژنوتیپ، محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر سهل‌ریشه‌زایی مؤثر بودند وNBVP1 سهل‌ریشه‌زاترین ژنوتیپ تشخیص داده شد (جدول۵). در گزارش‌های متفاوت، تنوع درصد ریشه‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف محلب ۴۱/۵-۱۰ و ۸۸-۰ درصد آمده است (Dardi *et al*., 1996; Ganji Moghadam *et al*., 2008). بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط MS به‌دست آمد اما تولید ریشه ثانویه در آن ضعیف بود. محیط 1/2DKW از نظر میانگین تعداد و طول ریشه‌های نابه‌جا بهترین محیط تشخیص داده شد (جدول۶). غلظت IBA فقط بر طول ریشه نابه‌جا تأثیر داشت. میانگین طول ریشه نابه‌جا در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌ترتیب ۳/۹۳ و ۵/۱۸ سانتی‌متر بود ($P\leq ۰/۰۱$).

اثر متقابل محیط کشت- ژنوتیپ بر کلیه صفات کمی ریشه معنی‌دار بود. ژنوتیپ NBVP1 در تمامی محیط‌ها ریشه‌زایی بسیار مطلوبی داشت. بیشترین تعداد ریشه نابه‌جا مربوط به ژنوتیپ NBVP1 در محیط MS بود و این ژنوتیپ در سایر محیط‌ها نیز بیشترین تعداد ریشه نابه‌جا را تولید کرد (جدول ۷). ژنوتیپ NBVP2 در هیچ محیطی تعداد زیادی ریشه نابه‌جا تولید نکرد. بیشترین تعداد و طول ریشه ثانویه و طول و ضخامت ریشه نابه‌جا مربوط به ژنوتیپ NBVP1 در محیط 1/2DKW بود و این ژنوتیپ در سایر محیط‌ها نیز بیشترین طول ریشه نابه‌جا را تولید کرد. محیط 1/2DKW در سایر تحقیقات نیز برای ریشه‌زایی مناسب معرفی شده‌است (Saponari *et al*., 1999).

جدول ۵. مقایسه میانگین صفات کمی ریشه‌زایی در ژنوتیپ‌های مختلف محلب

Table 5. Mean comparison of rooting quantitative characteristics in different mahaleb genotypes

Genotype	Rooting (%)	Adventitious root numbers	Secondary root numbers	Adventitious root length (cm)	Secondary root length (cm)	Adventitious root thickness (mm)
NBVP1	98.44a	5.28a	12.66a	5.64a	1.93a	1.41a
NB5176	37.61b	2.37b	1.02b	1.82b	0.81b	0.68b
NBVP2	45.31b	0.97c	0.02b	2.34c	0.46b	0.37c

میانگین‌ها با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed with different letters are significantly different at 1% probability level.

جدول ۶. مقایسه میانگین صفات کمی ریشه‌زایی در محیط کشت‌های مختلف

Table 6. Mean comparison of rooting quantitative characteristics in different culture media

Medium	Rooting (%)	Adventitious root length (cm)	Adventitious root numbers	Secondary root numbers
1/2DKW	61.1bc	5.95a	3.14ab	13.36a
MS	80.56a	3.43c	4.02a	1.75c
Modified QL	75.02ab	4.26bc	2.61b	1.17c
DKW	55.58c	5.04ab	2.42c	6.7b

میانگین‌ها با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed with different letters are significantly different at 1% probability level.

جدول ۷. مقایسه میانگین صفات کمی ریشه‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف محلب در محیط کشت‌های گوناگون

Table 7. Mean comparison of rooting quantitative characteristics of different mahaleb genotypes in different culture media

Culture medium	Genotype	Rooting (%)	Adventitious root length (cm)	Secondary root length (cm)	Secondary root numbers	Adventitious root numbers	Adventitious root thickness (mm)
1/2DKW	NBVP1	100a	8.46a	2.06a	30.06a	5.12ab	1.9a
MS	″	100a	3.69cd	0.91ab	2.94c	6.81a	1.02bcd
Modified QL	″	100a	4.52bc	1.25ab	2.56c	4.37bc	1.27bc
DKW	″	93.75a	6.40b	2.06a	15.06b	4.81ab	1.44b
1/2DKW	NBVP2	18.75c	0l57fg	0.0b	0.0c	0.44c	0.20fg
MS	″	62.51ab	2.83cde	0.0b	0.77c	1.56c	0.50ef
Modified QL	″	68.75a	4.22c	0.031b	0.063c	1.50c	0.55def
DKW	″	31.25bc	0l38fg	0.0b	0.0c	0.37c	0.23fg
1/2DKW	NB5176	75.00a	1.99defg	0.0b	0.0c	6.00a	0.82cde
MS	″	75.00a	2.46cdef	0.77ab	4.0c	2.50c	0.96cde
Modified QL	″	0.0c	0.0g	0.0b	0.0c	0.0c	0.0g
DKW	″	0.25c	1.26efg	0.0b	0,0c	1.01c	0.94cde

میانگین‌ها با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed with different letters are significantly different at 1% probability level.

اثر متقابل ژنوتیپ- تنظیم‌کننده رشد بر هیچ‌یک از صفات کمی مرحله ریشه‌زایی تأثیر نداشت و اثر متقابل محیط کشت- تنظیم‌کننده رشد تنها بر طول ریشه ثانویه تأثیر داشت. در ژنوتیپ‌های NBVP1 و BVP2، طول ریشه نابه‌جا در ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیش از ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود (به‌ترتیب ۵/۱۸ و ۳/۹۳ سانتی‌متر). طول ریشه ثانویه در محیط‌های 1/2DKW و QL تغییریافته با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد افزایش اما در DKW و MS، کاهش یافت. بیشترین طول ریشه ثانویه در محیط‌های 1/2DKW و DKW حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (جدول۸). نتایج گزارشات موجود نشان می‌دهد که ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد (Saponari *et al*., 1999; Hosseini *et al*., 2011) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد اما با نتایج Ganji Moghadam *et al*. (2008) مبنی بر این‌که بهترین غلظت IBA برای ریشه‌زایی محلب ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر بود، مغایرت دارد. این اختلاف ممکن است ناشی از واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها به غلظت اکسین یا کاهش غلظت نمک‌های معدنی در محیط 1/2DKW باشد که در نتیجه آن، افزایش غلظت IBA تأثیر بیشتری بر ریشه‌زایی داشته است (Fotopoulos *et al*., 2005). غلظت اکسین توانایی ریزنمونه‌ها در تولید ریشه را افزایش می‌دهد (George, 1996).

مقایسه سطوح صفات مختلف کیفی ریشه‌زایی بین ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که میانگین میزان بافت مردگی و کالوس‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. در ژنوتیپ‌های NB5176 و NBVP1 بیشتر ریزنمونه‌ها بدون بافت‌مردگی بودند (به‌ترتیب ۷۵٪ و ۷۰/۳٪) ولی در ژنوتیپ NBVP2 بیشتر ریزنمونه‌ها (۵۱/۶٪) بافت‌مردگی داشتند. عمده (۹۵/۳٪) ریزنمونه‌های ژنوتیپ NBVP2 و درصد بالایی از ریزنمونه‌های ژنوتیپ‌های NB5176 و NBVP1 (به‌ترتیب ۶۲/۵٪ و ۵۱/۶٪) کالوس نداشتند. اختلاف معنی‌داری در درصد بافت‌مردگی، کالوس‌زایی، کیفیت شاخه/ ریشه بین محیط‌های مختلف و غلظت‌های مختلف IBA مشاهده نشد.

جدول ۸. مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ-غلظت تنظیم‌کننده رشد بر طول ریشه ثانویه در ژنوتیپ‌های محلب NBVP1 و NBVP2

Table 8. Mean comparison of reciprocal effects of genotype-regulator on secondary root length in NBPV1 and NBPV2 mahaleb genotypes

Medium	IBA conc. (mg/l)	Secondary root length (mm)
1/2DKW	1.5	2.21a
DKW	1.5	2.01a
1/2DKW	1	1.78ab
MS	1	1.09bc
QL	1.5	1.01bc
MS	1.5	0.47cd
QL	1	0.036cd
DKW	1	0.0d

میانگین‌ها با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed with different letters are significantly different at 1% probability level.

نتیجه گیری کلی

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که مریستم‌های هر سه ژنوتیپ انتخابی محلب به‌راحتی قابل استقرار و تکثیر درون‌شیشه‌ای بودند. محیط DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای پرآوری و محیط‌های 1/2DKW و MS برای ریشه‌زایی توصیه شدند. از بین سه ژنوتیپ بررسی‌شده، NB5176 کم‌رشدترین و احتمالاً پاکوتاه‌کننده‌ترین و ژنوتیپ NBVP1 سهل ریشه‌زاترین ژنوتیپ بودند. گرچه براساس نتایج غربالگری سرولوژیک برخی ژنوتیپ‌ها آلوده بودند، اما پس از کشت مریستم و گرمادرمانی، نتایج RT-PCR موید عاری بودن آن‌ها از سه ویروس بذرزاد بود، لذا ترکیب این دو روش برای سالم‌سازی ژنوتیپ‌های محلب روش مناسبی ارزیابی می‌شود.

REFERENCES

1. Albertini, A. & De Salvador, F.R. (1991). Giligio L Informatore Agrario. *Supplemento Portinnesti Frutticoli*, XLVII36, 13-18.
2. Barba, M. (1992). Comparison of different method to produce virus free stone fruits, *Acta Horticulturae*, 309, 385-392.
3. Boari, A., Boscia, B., Di Terlizzi, B. & Savino, V. (1998). Study on seed transmission of *prune dwarf virus* (PDV) in *Prunus mahaleb* L.. *Advances in Horticultural Sciences*, 12, 89-92.

4. Bouzari, N. (2011). *Collection and evaluation of local Cerasus germplasm to obtain rootstock and variety*. Final Repot, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. (in Farsi)
5. Boxus, Ph. (1984). Assainissement des arbres fruitiers et du fraisier par culture de meristemes. *Parasitica*, 40, 139-155.
6. Bright, J. & Marte, S. (2004). *Cherry growing in NSW*. Agfact H5.1.2. Second edition.
7. Cieślińska, M. (2007). Applicaton of thermo- and *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Plant Research*, 55, 117-124.
8. Dardi, G., Vito, G. & Standardi, A. (1996). *in vitro* mass propagation of eleven *Prunus mahaleb* ecotypes. *Acta Horticulturae*, 410, 477-483.
9. Deogratias, J.M., Dosba, F. & Lutz, A. (1989). Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemtherapy, thermotherapy and *in vitro* culture. Canadian Journal of Plant pathology, 11, 337-342
10. Driver, J.A. & Kuniyuki, A.M. (1984). *in vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *Journal ofHorticultural Sciences*, 19, 507-509.
11. Fallah, T., Nasrolah-Neghad, S., Shahsavand, M. & Ebadi, A. (2008). *Detection of PNRSV in Golestan stone fruits using DAS-ELISA and RT-PCR*. (Page 517), Proceedings of *18th Iranian Plant Protection Congress* (in Farsi).
12. Fotopoulos, S. & Sotiropoulos, T.E. (2005). *in vitro* rooting of PR204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P.amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research*, 3, 3-8. (in Farsi)
13. Ganji Moghadam, A., Bolandi, A.R. & Anahid, S. (2008). Proliferation of 4 dwarfing *mahaleb* genotypes. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 79, 55-61. (in Farsi)
14. Gella, R. & Errea, P. (1998). Application of *in vitro* therapy for Ilarvirus elimination in tress *Prunus* species. *Phytopathology*, 146, 445-449.
15. George, E.F. (1996). Plant Propagation by Tissue Culture: in Practice, Part II. 2nd edition. Exegetics Limited Press, London.
16. Giorgio, V. & Standardi, A. (1993). Growth and production of two sweet cherry cultivars grafted on 60 ecotypes of *Prunus mahaleb*. *Acta Horticulturae*, 410, 471-476.
17. Goudarzi, R., Majidi, I., Talaee, A. & Mostafavi , M. (1997). Micropropagation of cherry rootstock (*Prunus avium* CV F12/1) by shoot tip culture. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 28, 133-143
18. Hosseini, A.R.D., Moghadam, E.G., Khorasani, S.K. &, Bihamta, M.R. (2011). Effects of growth regulators on micropropagation of some mahaleb dwarf genotypes. *Archives of Applied Science Research*, 3, 118-125.
19. Houang, S.C. & Millikan, D.F. (1980). *in vitro* micrografting of apple shoot-tips. *Hortsciences*, 15, 741-743.
20. Hrotkó, K., Sebok, I., Magyar, L. & Gyeviki, M. (2009). Selection and evaluation of *Prunus mahaleb* L. clonal rootstocks. *Kertgazdasag Horticulture*, 41, 57-65.
21. Jafarpour, B. & Khayat, M. (2013). Detection PPV in Khorasan Razavi stone fruits. *Plant Protection*, 27, 132-135.
22. Leblay, C., Chevreau, E. & Robin, L.M. (1991). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 99-105
23. Lenz, F., Baumann, G. & Kornkamhaeng, P. (1983). High temptrature treatment of *Prunus avium* L. 'F12-1' for virus elimination. *Phytopathol. Z.*, 106, 373-375.
24. Lioyd, G., Mc Cown, B. (1981). Commercially feasible micro propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 30, 421-427.
25. Mahdavian, M., Bouzari, N. & Abdollahi, H. (2010). Effect of culture medium and growth regulators on proliferation and rooting of mahaleb genotypes. *Seed and Plant Journal*, 26, 15-26. (in Farsi)
26. Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I. & Katis, N. (2003). Production of virus-free plant propagation material from infected nectarine trees. *Acta Horticulturae*, 616, 501-505
27. 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, 81-2.
28. Milusheva, S., Gercheva, P., Bozhkova, V &, Kamenova, I. (2008). Experiments on transmission of *plum pox virus* through prunus seeds. *Journal of Plant Pathology* 90, S1.23
29. Mohammadi, A., Goharzad, F. & Zaghi, A. (2012). Contribution of PPV with plum fall in Mazandaran province. *Pest and Disease* 80, 97-9. (in Farsdi)
30. Moini, A. & Izadpanah, K.M. (2000). Serological identification of PNRSV and PPV in Dasht-e-Moghan. In: Proceedings of the *14th Plant Protection Congress of Iran*, Isfahan, Iran. (Page 338). (in Frasi)
31. Mozaffarian, V. (2004). *Trees and shrubs of Iran*. PP1003, Farhang-e-Moaser Publ. (in Farsi)

32. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 437-497.
33. Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. & Martelli, G.P. (2003). Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V.(eds.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Mediterranne, Series B: Studies and Research*, 45, 15-23.
34. Naderpour, M. & Sadeghi, L. (2015). *Investigation of stone fruit orchards in Western Azarbaijan and Khorasan Razavi provinces to introduce healthier orchards for stone fruit propagation industries*. Final Report 47168, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, AREEO, Ministry of Agriculture, Iran. (in Farsi)
35. Naderpour, M. & Shahbazi, R. (2015). *Investigation of pome fruit orchards in Western Azarbijan and Khorasan Razavi provinces to introduce healthier orchards for stone fruit propagation industries.* Final Report 47282, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, AREEO, Ministry of Agriculture, Iran. (in Farsi)
36. Perry, R.L. (1987). Cherry Rootstocks. In: Rom RC, Carlson RF (eds.) *Rootstocks for Fruit Crops*. (pages 217-264), John Wiley and Sons, New York.
37. Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H.R., Modarresi, A. & Hajmansoor, S. (2006). Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on rose in Iran. *Plant Disease*, 90, 975-981. (in Farsi)
38. Sabaghian, S. (2014). Investigation on PNRSV in weeds of rose plantings. In: Proceedings of *21st Iranian Plant Protection Congress*. (Page 212).
39. Sansavini, S. & Lougi, S. (1996). Performance of the sweet cherry cultivar Van on new clonal rootstocks. *Acta Horticulturae*, 410, 363-372.
40. Saponari, M., Bottalico, G. & Savino, V. (1999). *in vitro* propagation of *Prunus mahaleb* and its sanitation from prune dwarf virus. *Advances in Horticultural Sciences* 13, 56-60.
41. Sipahioglu, H.M., Usta, M., Polat, B. & Ocak, M. (2005). Distribution of *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV) and *Apple chlorotic leaf spot viruses* (ACLSV) in prunus leaves. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 11, 86-90.
42. Snir, I. & Stein, A. (1985). *in vitro* selection and elimination of prunus necrotic ring spot virus in sweet cherry (*Prunus avium*). *Riv Ortiflorofruit It*, 69, 191-194.
43. Stein, A., Spiegel, S., Faingersh, G. & Levy, S. (1991). Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for elimination of Prunus necrotic ring spot virus. *Annals of Applied Biology*, 104, 267-276.
44. Tatari, M. & Mousavi, A. (2013). Optimization of *in vitro* culture of Tetra, Nemaguard and GF677 rootstocks. Iranian *Journal of Agricultural Breeding*, 15, 103-115. (in Farsi)
45. Usta, M., Sipagolou, H.M. & Polat, B. (2005). Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV*). Journal of Agricultural Sciences*, 15, 153-158.
46. Webester, A.D. & Looney, N.E. (1996). *Cherries: Crop Physiology, Production and Uses*. 513 pages, CABI Publ.