مقاله پژوهشی

تأثیر محیط‌های کشت پایه و مواد تنظیم‌کننده رشد در پرآوری و پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قاط (*Vaccinum arctostaphylos* L.)

بهناز رضازاده[۱]، علیرضا قنبری[۲]*، یونس پوربیرامی‌هیر[۳]، موسی ترابی‌گیگلو[۴]، موسی زارعی[۵] و حسن قربانی‌قوژدی[۶]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۵- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۲۰)

چکیده

قره‌قاط (*Vaccinum arctostaphylos* L.)، تنها گونه درختچه‌ای جنس وکسینیوم در ایران است که در جنگل‌های شمال رشد می‌کند. این تحقیق برای بررسی تأثیر محیط‌های کشت پایه مختلف و مواد تنظیم‌کننده رشد، دراستقرار، پرآوری و پینه‌زایی ریزشاخساره‌های قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. در پرآوری ریزشاخساره‌ها، از سه نوع محیط کشت پایه AN، QL و ۱/۲ MS و چهار غلظت زآتین صفر (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر به همراه غلظت ثابت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول‌استیک (IAA) در هر محیط کشت پایه در همه تکرارها استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. برای پینه‌زایی ریزشاخساره‌ها، از محیط کشت پایه ۱/۲QL با دو غلظت (۱۰ و ۲۰ میکرومولار) از زآتین، TDZ و BAP به همراه NAA با سه غلظت (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بصورت طرح آزمایشی کاملا تصادفی با پنج تکرار استفاده شد. در آزمایش‌ها، شاخص‌های طول و تعداد شاخساره، تعداد گره و برگ‌های تشکیل شده، درصد و تعداد روز تا پینه‌زایی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تعداد شاخساره ریزنمونه‌های رشد کرده در محیط کشت پایه با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند اما طول شاخساره در ریزنمونه، در محیط کشت پایه AN بیشتر از سایر محیط‌های کشت پایه بود. این در حالی است که نوع محیط کشت پایه روی تعداد برگ، اثرات معنی‌داری نشان داد، طوری‌که محیط کشت پایه AN دارای بیش‌ترین تعداد برگ بود و از لحاظ تعداد گره، محیط‌های کشت پایه ۱/۲MS و AN عملکردی بهتر از QL داشتند. غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین در محیط کشت پایه ۱/۲MS در طول شاخساره و غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین در محیط کشت پایه AN بهترین عملکرد را در تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره تشکیل شده داشت. در القای پینه‌زایی، زآتین بهترین عملکرد را داشته و BAP زود بازده‌ترین تنظیم‌کننده رشد از لحاظ زمان پینه‌زایی بود.

کلمات کلیدی: پرآوری، پینه‌زایی، قره قاط، محیط پایه

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۵- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران.
۶- مربی گروه کشاورزی، دانشکده علوم، مجتمع آموزش عالی گناباد، ایران.
* پست الکترونیک: ghanbari66@uma.ac.ir

مقدمه

قره‌قاط درختچه‌ای بدون خار و به طول یک الی سه متر بوده که غالباً در اثر انشعابات ساقه از پایین، منظره‌ای انبوه و متراکم دارند. گل‌آذین خوشه‌ای و گل‌ها به‌صورت دو جنسی و دگرگشن است. میوه‌ها سته گرد، برگ‌ها متناوب، بدون دمبرگ یا دمبرگ کوتاه، بیضی شکل یا تخم‌مرغی شکل کشیده است. از ویژگی‌های متمایز گیاه قره‌قاط برگ‌های آن است که در طی مراحل مختلف رویشی متغیر بوده و به همین دلیل چشم‌انداز زیبایی در رویشگاه‌های خود به وجود می‌آورد (صداقت‌حور[1] و همکاران، ۲۰۰۶). اکثر گونه‌های *Vaccinum* در دامنه‌ها و ارتفاعات رشد می‌کنند، رویشگاه‌های طبیعی این گیاهان ارتفاعات ۱۹۰۰-۱۱۰۰ متری از سطح دریا و در اقلیم معتدل جنگلی مایل به سرد قرار می‌گیرد (گونزالز[2] و همکاران، ۲۰۰۰). میوه قره‌قاط حاوی مواد آنتوسیانین است که در میوه‌های تازه از ۰/۱ تا ۰/۲۵ درصد در نوسان بوده ولی در عصاره غلیظ شده این میوه، ۲۵ درصد می‌باشد (کیان‌بخت[3]، ۲۰۰۸). گیاه قره‌قاط یک گیاه دارویی با خواص ضداسهال، جمع-کننده رادیکال‌های آزاد، محافظ سلول در برابر آسیب‌های شیمیایی شامل سموم محیطی، کاهش دادن پراکسیداسیون اسیدی و محافظت‌کننده در برابر انواع استرس‌ها می‌باشد که علت اصلی آن سطح بالای مواد آنتی اکسیدانی در این گیاه می‌باشد (میلباری[4] و همکاران، ۲۰۰۷). به دلیل افزایش تقاضا، مطالعات وسیعی در زمینه به‌نژادی، افزایش کمی و کیفی محصول و سیستم‌های کاشت گیاه قره‌قاط آغاز شده است. اهمیت دارویی و اقتصادی این گیاه ایجاب می‌کند که تحقیقات متعددی در زمینه‌های بررسی شرایط ازدیاد، جوانه‌زنی بذر، ترکیبات ضدسرطان و درمان بیماری‌هایی نظیر فشار خون، دیابت و حمله قلبی انجام شود (دبناث و مک‌رای[5]، ۲۰۰۲). از جمله روش‌هایی که برای تکثیر گونه *V.arctostaphylos* L. می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد، ریزازدیادی یا تکثیر از طریق کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشد که روشی کارآمد و مؤثر را برای ازدیاد سریع گیاهان به ویژه تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی فراهم می‌کند (دبناث و مک‌رای، ۲۰۰۲). ریزازدیادی در مقایسه با سایر روش‌های سنتی تکثیر، از کارآیی و سرعت تکثیر بالایی برخوردار است. همچنین، به کمک روش کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای می‌توان برای حفاظت ژرم‌پلاسم گیاهی اقدام نمود، لذا مطالعه و تحقیق ریزازدیادی *V.arctostaphylos* L. به روش کشت درون شیشه‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است (مارکوتریگیانو[6] و همکاران، ۱۹۹۶). سرعت شاخه‌زایی کم، طولانی بودن زمان رشد ساقه و میزان بالای آلودگی میکروبی، از عوامل اصلی محدود کننده موفقیت در ریزازدیادی درختان چوبی می‌باشد. بنابراین، اغلب به منظور به حداقل رساندن این مشکلات، از بافت جوان (قاعده جوانه) درختان بالغ استفاده می‌شود (دیازسالا[7]، ۱۹۹۰). برای احداث باغ‌های مدرن درختان میوه در سطح تجاری، دست‌یابی به روشی مطمئن برای تولید گیاهان شبیه به اصل از ژنوتیپ‌های برتر ضروری می‌باشد (دارکوویچ[8]، ۲۰۰۸). تکنیک کشت بافت روشی مطمئن برای تکثیر ژنوتیپ‌ها و ارقام برتر درختان میوه و تولید گیاهان شبیه به اصل می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (آکدمیر[9] و همکاران، ۲۰۱۴). باززایی گیاه کامل بر دو اصل پرآوری شاخساره‌های جانبی و ریشه‌زایی نابجا در شاخساره‌های طویل شده استوار است (کاوریاپا[10] و همکاران، ۱۹۹۷). به طور کلی از محیط‌های کشت پایه آندرسون (AN)، لوید و مک‌کرون (WPM) و موراشیگ و اسکوگ (MS) همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد زآتین، ۲- ایزوپنتیل‌آدنین (2ip)، تیدیازرون (TDZ)، ایندول‌بوتیریک اسید (IBA)، ایندول‌استیک اسید (IAA) و نفتالین‌استیک اسید (NAA) در ریزازدیادی انواع گونه‌های *Vaccinum* استفاده شده است (جوجی و سوکمن[11]، ۲۰۱۷). در پرآوری و ریشه‌زایی از سایتوکنین‌هایی مانند زآتین، TDZ و 2ip و اکسین‌هایی مانند IBA و IAA استفاده شده است (جوجی[12] و همکاران، ۲۰۱۳). زآتین در غلظت‌های کم (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) باعث رشد و تکثیر بهینه ارقام وکسینیوم شده و محیط کشت پایه AN حاوی غلظت‌های مختلف زآتین برای تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه *V.arctostaphylos* مناسب‌تر بوده است

1. Sedaghathoor
2. Gonzalez
3. Kian bakht
4. Milbury
5. Debnath and MacRe
6. Marcotrigiano
7. Diaz- Sala
8. Durkovic
9. Akdemir
10. Kureiappa
11. Cuce and Sokeman
12. Cuce

(گاجدوسووا[1] و همکاران، ۲۰۰۶). تحقیق بر روی کشت ریز نمونه‌های قره‌قاط *V.arctostaphylos* در شرایط درون-شیشه‌ای و بررسی کیفیت ساقه‌های به دست آمده نشان داد که محیط کشت پایه AN حاوی غلظت‌های بالاتر زآتین (۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه IBA بهترین عملکرد را در تعداد و اندازه ساقه داشتند (مینرس[2] و همکاران، ۲۰۰۷). طی مطالعاتی که روی ارقام بلوبری (Blueberry) انجام گرفت اعلام گردید که محیط کشت پایه آندرسون تغییر یافته (mAN) نسبت به MS عملکرد بهتری در رابطه با شاخه‌زایی داشت، به طوری‌که محیط کشت پایه MS باعث ایجاد نکروز در برگ و ساقه‌ها گردید (روزیچ[3] و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از یک تا پنج میکرومولار (µM) TDZ یا یک تا ۲۰ میکرومولار زآتین باززایی نوساقه از ریزنمونه‌های برگ را در پنج رقم از Blueberry بهبود بخشید (کو و هامیرسچلاگ[4]، ۲۰۰۰؛ کاو[5] و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین ۱۰ میکرومولار TDZ و یک میکرومولار NAA مناسب‌ترین ترکیب در باززایی نوساقه در کرن‌بری می‌باشد (مارکوتریگیانو و همکاران، ۱۹۹۶). این پژوهش با هدف بررسی ارزیابی استقرار و پرآوری و پینه‌زایی ریز شاخساره‌های گیاه قره‌قاط تحت شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سرشاخه‌های یک‌ساله با جوانه‌های سالم قره‌قاط گونه *V.arctostaphylos* L. در فصول بهار، تابستان و پاییز از مناطق جنگلی از روستای سوها (N^0:۳۸/۲۵ و ۴۸/۶۴ :E^0 و ۱۶۷۰متر) از توابع شهرستان اردبیل تهیه و در ابعاد نسبتاً کوچک‌تر در بسته‌بندی مناسب به آزمایشگاه کشت بافت منتقل شدند. از شاخه‌های جمع‌آوری شده، ریزنمونه‌های حاوی یک تا دو جوانه شامل جوانه‌های جانبی و انتهایی تهیه و به مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرار گرفته و سپس ریزنمونه‌ها تحت تیمار ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی به مدت ۱۵ دقیقه و کلریدجیوه ۰/۲ درصد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. pH محیط کشت پایه روی ۵/۵ تنظیم و به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ضدعفونی گردید. ریزنمونه‌ها در شیشه‌های کشت قابل اتوکلاو حاوی ۲۵ سی‌سی محیط کشت‌های پایه (WPM, QL, AN, MS, 1/2MS) تهیه شده، کشت گردیدند، به طوری‌که در هر شیشه آزمایش چهار ریزنمونه قرار داده شد. ریزنمونه‌ها بعد از کشت در محیط کشت‌های پایه در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای ۲۵±۲°c و ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی با لامپ‌های سرد-سفید ($Molm^{-1}S^{-}$ ۶۵/۵^{1}µ) نگهداری شدند.

تأثیر محیط‌های کشت پایه و سطوح مختلف سایتوکینین و اکسین در پرآوری ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط

به منظور به‌دست آوردن ترکیب محیط کشت پایه مناسب برای پرآوری ریزنمونه‌های قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه-ای، از محیط‌های کشت پایه مختلف در ترکیب با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی استفاده شد. ریزنمونه‌های قره‌قاط تحت تیمارهای مختلف با سه نوع محیط کشت پایه آندرسون (AN)، کیورین و لیپور(QL) و ۱/۲MS در ترکیب با چهار سطح (T0=۰ ،T1=۱، T2=۲ وT3=۳ میلی‌گرم بر لیتر) تنظیم‌کننده رشد زآتین به همراه یک سطح از IAA (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد در این آزمایش از چهار تکرار و در هر تکرار از چهار ریزنمونه استفاده شد. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت پایه برای پرآوری، طول شاخساره‌های جدید، تعداد شاخساره، تعداد گره و تعداد برگ‌های تشکیل شده در هر ریزنمونه پس از ۵۰ روز ثبت گردید.

تأثیر محیط‌های کشت پایه و تیمارهای مختلف اکسین و سایتوکنین در پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره قاط

برای پینه‌زایی، ریزنمونه‌های برگی از گیاهچه‌های رشد کرده قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای تهیه شدند. برگ‌ها پس از جدا شدن از جوانه‌های باز شده سرشاخه‌ها با ایجاد زخم در نزدیکی رگبرگ‌ها، به محیط کشت پایه ۱/۲QL با pH= ۵/۵ حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۶ درصد آگار منتقل شدند. شیشه‌های کشت در اتاقک رشد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با

1. Gajdosova
2. Meiners
3. Ruzic
4. Cao and Hammerschlag
5. Cao

پنج تکرار و در هر تکرار پنج ریزنمونه یا قطعه برگ جدا شده از جوانه به‌کار برده شد. در این آزمایش از ۱۴ تیمار مختلف از مواد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی که شامل ترکیبی از یک سایتوکنین و یک اکسین بود استفاده شد (جدول ۱).

داده‌برداری از ریزنمونه‌ها با توجه به اولین ریزنمونه‌هایی که پینه در آنها تشکیل شده بود شروع و به ترتیب در هر تیمار با توجه به درصد پینه‌های تشکیل شده در ریزنمونه‌ها تا روز بیست و یکم از کشت انجام گرفت. در هر تیمار درصد پینه‌های تشکیل شده و تعداد روز تا تشکیل پینه مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول۱- تیمارهای پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قاط

Medium	PGR combinations(µ M)	Name
1/2QL	10 (µM) ZT +10 (µM) NAA	T1
1/2QL	20 (µM) ZT +1 (µM) NAA	T2
1/2QL	10 (µM) TDZ +1 (µM) NAA	T3
1/2QL	10 (µM) TDZ + 5 (µM) NAA	T4
1/2QL	10 (µM) TDZ +10 (µM) NAA	T5
1/2QL	20 (µM) TDZ +1 (µM) NAA	T6
1/2QL	20 (µM) TDZ +5 (µM) NAA	T7
1/2QL	20 (µM) TDZ + 10 (µM) NAA	T8
1/2QL	10 (µM) BAP + 1 (µM) NAA	T9
1/2QL	10 (µM) BAP + 5 (µM) NAA	T10
1/2QL	10 (µM) BAP + 10 (µM) NAA	T11
1/2QL	20 (µM) BAP + 1 (µM) NAA	T12
1/2QL	20 (µM) BAP + 5 (µM) NAA	T13
1/2QL	20 (µM) BAP + 10 (µM) NAA	T14

جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم افزارهای SAS و SPSS 16 استفاده گردید. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL2013 انجام گرفت.

نتایج و بحث

پرآوری ریزشاخساره‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به تأثیر تیمارهای پرآوری در گیاه قره‌قاط، در محیط‌های کشت پایه ۱/۲MS، AN و QL حاوی غلظت‌های مختلف زآتین (۰، ۱، ۲ و۳ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه IAA در یک غلظت (۰/۲ میلی گرم بر لیتر) نشان داد که تعداد شاخساره پرآوری شده تحت تأثیر محیط کشت پایه قرار نگرفت اما طول شاخساره پرآوری شده ($p<0.05$)، تعداد برگ و تعداد گره‌ها ($p<0.01$) تحت تأثیر محیط کشت پایه قرار گرفتند. همچنین نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های قره‌قاط به‌طور معنی‌داری ($p<0.01$) تحت تأثیر ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد برای صفات طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره قرار داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- صفات مورد بررسی در پرآوری ریزشاخساره‌های قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول شاخه	تعداد شاخه	تعداد برگ	تعداد جوانه
محیط‌کشت	۲	۰/۰۵۶۴۵*	۰/۰ ۵۵۶۰ ns	۳۹/۰۶۲۶**	۱/۵۹۸**
تیمار	۳	۰/۹۰۳۸**	۲/۲۰۲۳**	۸۳/۷۸۱**	۶/۵۲۹**
محیط×تیمار	۶	۰/۲۹۲۸**	۱/۴۸۰۱**	۴۴/۳۵۱**	۱/۷۱۸**
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۰۱۸۸	۰/۱۳۸۷	۰/۶۳۹۰	۶/۷۰۷۲

*، **، ns معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد، ۱درصد و غیرمعنی‌دار

با توجه به نتایج به‌دست آمده مطابق (شکل ۱) طول شاخساره (۰/۸۹۳ سانتی‌متر در هر ریزنمونه) در محیط کشت پایه AN از سایر محیط‌های کشت پایه بیشتر بود. علاوه بر این تعداد شاخساره در ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت پایه باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند، این درحالی است که محیط‌کشت پایه در تعداد برگ ریزنمونه‌ها، دارای اختلاف

معنی‌داری بوده به‌طوری که محیط کشت پایه AN دارای بیش‌ترین تعداد برگ (۷/۳۱ برگ در هر ریزنمونه) بود و از لحاظ تعداد گره (۲/۰۴ گره در هر ریزنمونه) محیط‌های کشت پایه ۱/۲MS و AN عملکردی بهتر از محیط کشت پایه QL داشتند. با این حال گزارشی مبنی بر استفاده از محیط کشت پایه QL و برتری یا ضعف آن نسبت به محیط-های کشت پایه دیگر در گیاه *V.arctostaphylos* L. گزارش نشده است. با وجود این استفاده از محیط کشت پایه QL در این آزمایش نشان داد که این محیط کشت پایه نسبت به محیط کشت پایه WPM که در مرحله استقرار ریزنمونه-ها مورد مقایسه قرار گرفتند دارای برتری نسبی بوده، بنابراین در مرحله پرآوری ریزنمونه ها جایگزین محیط کشت پایه WPM شد که در اکثر گونه‌های وکسینیوم مورد استفاده گرفته بود. همچنین این محیط کشت پایه در اغلب صفات اندازه‌گیری شده در این تحقیق در مقایسه با محیط‌های کشت پایه ۱/۲MS و AN در مرحله پرآوری ریزنمونه‌های قره‌قاط اثرات مشابه داشت که این نتایج برای اولین بار گزارش می‌گردد. همچنین نتایج نشان داد که ریز نمونه‌های قره‌قاط ($p<0.01$) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای صفات طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره قرار داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین بیشترین طول شاخساره (۱/۰۱ سانتی‌متر) در محیط کشت‌های پایه AN و QL حاصل شد. در صفت طول شاخساره، غلظت یک و سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. محیط کشت پایه ۱/۲MS همراه با غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین بیشترین طول شاخساره (۱/۴ سانتی‌متر) و محیط کشت پایه AN همراه با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین بهترین عملکرد را در تعداد شاخه (۲/۸ شاخه در هر ریزنمونه)، تعداد برگ (۱۵ برگ در هر ریزنمونه) و تعداد گره (۳/۹۹ گره در هر ریزنمونه) تشکیل شده داشت (شکل ۲).

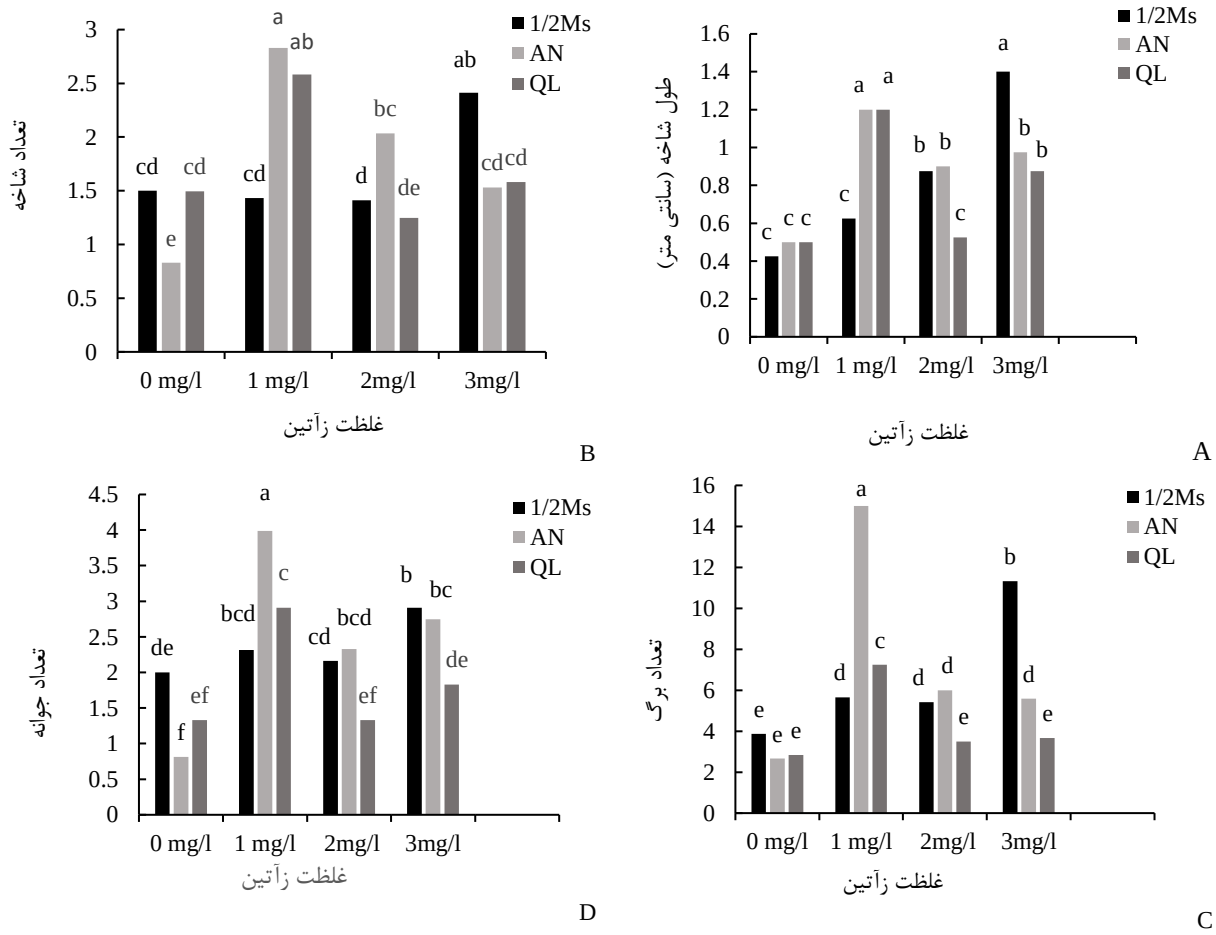
پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳) مربوط به تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، در پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگی قره‌قاط در محیط کشت پایه ۱/۲QL نشان داد که تمام تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد ($p<0.01$) معنی‌دار بودند. با این‌حال مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار T1(10μM ZT+ 10μMNAA)، T2 (20 μM ZT +1μM NAA) و تیمار T5 (10 TDZ μM +10 NAA μM)، ۱۰۰ درصد پینه‌زایی داشتند و از نظر زمان پینه‌زایی تیمار T13 (20 μM BAP + 5μM NAA)، T12(20 μM BAP + 1 μM NAA) و T10(10 μM BAP + 5 μM NAA) زودترین بازده زمانی از نظر تعداد روز (به طور میانگین ۱۱ روز) تا تشکیل پینه را داشتند (شکل ۳و۴). هر چند گزارشات متعددی در مورد پینه‌زایی گیاهان جنس وکسینوم وجود دارد ولی این تحقیق اولین گزارش درباره پینه‌زایی در گونه *V.arctostaphylos* L. می‌باشد.

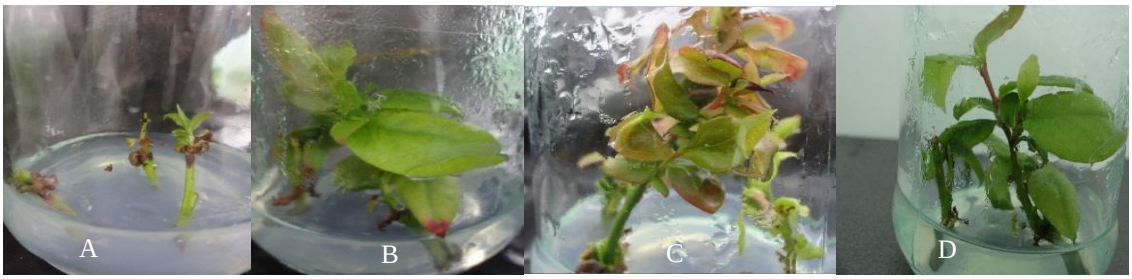
هدف این تحقیق بررسی تأثیر محیط‌های کشت پایه مختلف و انواع تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در استقرار، پرآوری و میزان پینه‌زایی ریزنمونه‌های گیاه قره‌قاط بود. نتایج بدست آمده مشخص کرد که از بین سه محیط کشت پایه ۱/۲MS، AN وQL، محیط کشت ۱/۲MS به‌همرا غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بهترین عملکرد در طول شاخساره و محیط کشت پایه AN در تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره‌های تشکیل شده در ترکیب با یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بهترین عملکرد را داشت (جوجی و همکاران، ۲۰۱۳). با بررسی تأثیر محیط کشت پایه و غلظت‌های مختلف زآتین، BAP و 2ip بر رشد ریزنمونه‌های *V.arctostaphylos* L. نتیجه گرفتند که محیط کشت پایه AN حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA عملکرد بهتری را نشان دادند. در تحقیق دیگری که روی *Vaccinium myrtillus* L. انجام گرفت اعلام شد که غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA باعث افزایش تعداد نوساقه گردید (جوجه و سوکمن[1]، ۲۰۱۵). استرولوکا[2] و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که از میان سه محیط کشت پایه MS، AN و WPM محیط کشت پایه AN حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بهترین عملکرد را در رشد ریزنمونه‌های گونه‌های *V. corymbosum, V.vitis– idea* در تولید شاخساره‌ها، رشد برگ‌ها و اندازه آنها دارد. استرولوکا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخساره‌های درون شیشه‌ای در رقم Berkely با استفاده از

1. Cuce and Sokmen

2. Ostrolucká



شکل ۱- اثر متقابل نوع محیط کشت و سطوح مختلف زآتین در طول شاخساره (A)، تعداد شاخساره (B)، تعداد برگ (C) و تعداد جوانه (D) نمونه‌های پرآوری شده ریزنمونه‌های قره‌قاط. حروف مشترک معرف عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

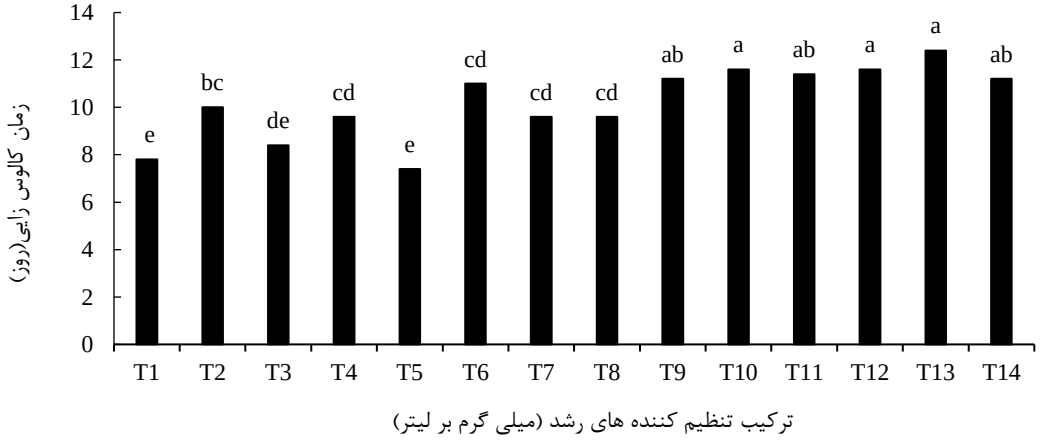


شکل ۲- رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط در محیط کشت‌های مختلف A) شاهد B) محیط کشت ۱/۲MS C)محیط کشت AN D) محیط کشت QL

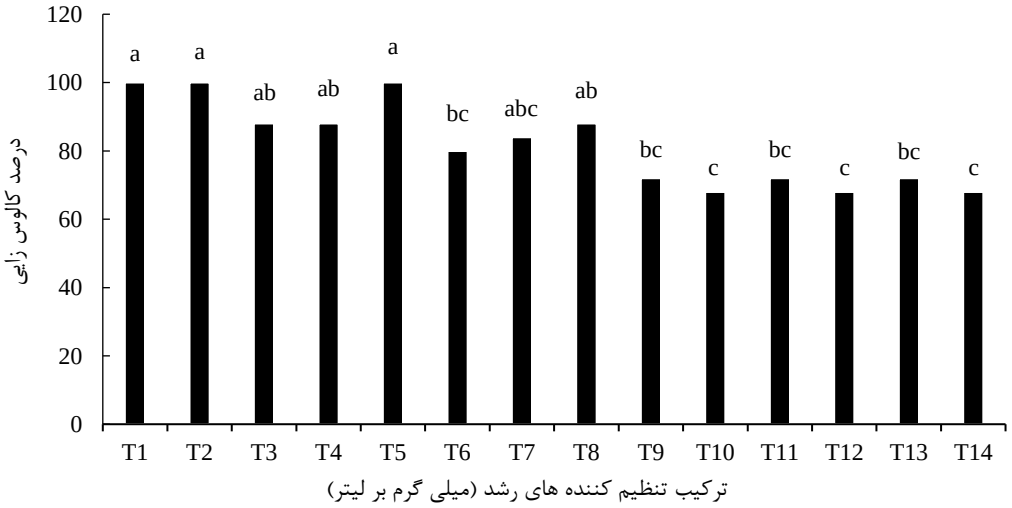
جدول ۳- تأثیر محیط‌های کشت و ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قاط

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	زمان پینه زایی
تیمار	۱۳	۷۶۰**	۱۱/۷۷۵**
خطای آزمایشی	۵۶	۸۲/۸۵	۰/۶۱۴
ضریب تغییرات(٪)		۱۱/۱۰۰	۷/۷۷۱۰

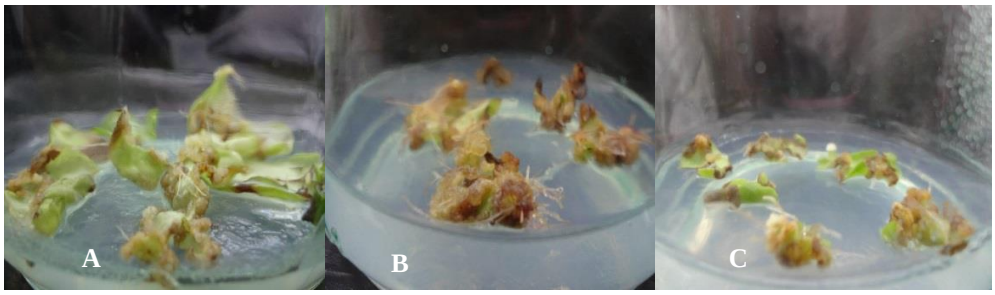
**، معنی دار در سطح احتمال، ۱ درصد



شکل۳- تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد بر زمان (روز) پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قاط. حروف مشترک معرف عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل۴- تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قاط. حروف مشترک معرف عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۵- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگی قره قاط در محیط کشت۱/۲ QL
BAP (C TDZ (B Zeatin (A

محیط کشت پایه AN به‌همراه زآتین حاصل شد که با نتایج این پژوهش مطابقت و همخوانی دارد. در محیط کشت پایه AN نسبت به محیط‌های کشت پایه QL و ۱/۲MS آدنین سولفات (Ad.SO4) در ترکیب مواد آلی آن وجود دارد، اثر آدنین‌سولفات در کشت بافت در بسیاری از گونه‌های گیاهی و انواع بافت‌های گیاهی شناخته شده است و عملکرد بهتر

آن در ترکیب با غلظت‌های متعادل از اکسین و سایتوکنین می‌باشد (زاپارتان[1]، ۲۰۰۱). آدنین‌سولفات در محیط کشت پایه همراه با سایتوکنین باعث تولید تعداد بیش‌تری گیاهچه در *Trifolium repens* L. شد (گابریلا[2]، ۲۰۱۱). استرولوکا و همکاران (۲۰۰۴) عنوان کردند که ریزنمونه‌های *V.corymbusum* L. و *V.arctostaphylos* L. در محیط کشت پایه MS و۱/۲MS به همراه IBA بهترین عملکرد را دارد که در این تحقیق از محیط کشت پایه ۱/۲MS به جای محیط کشت پایه MS استفاده گردید که با توجه به پاسخ رشدی ریزنمونه‌ها در مرحله استقرار در مقایسه این دو محیط کشت پایه صورت گرفت. زیرا ثابت شده است که محیط‌های کشت پایه با غلظت یونی کم برای کشت Vaccininum مناسب هستند (دبناث، ۲۰۰۹b). در پرآوری ریزشاخساره‌های Berkeley، Spartan و Bluecrop نکروز نسبی یا کامل برگ‌ها یا ساقه‌ها در محیط کشت پایه MS گزارش شده است که احتمالا به دلیل غلظت بالای یون‌های آمونیوم در این محیط کشت پایه می‌باشد (تتسومورا[3] و همکاران، ۲۰۰۸). ایلژک و جاکیگراد[4] (۲۰۱۶) در بررسی پرآوری *C.alba* گزارش دادند که از بین محیط‌های کشت پایه WPM، MS، QL، AN بهترین پرآوری شاخه در محیط کشت پایه WPM حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA و یک میلی‌گرم بر لیتر IAA به‌دست آمد. با این حال برتری محیط کشت پایه QL نسبت به محیط کشت پایه WPM در مرحله استقرار ریزنمونه‌ها و مشابهت آن در اغلب صفات اندازه‌گیری شده در مقایسه با محیط کشت پایه AN و MS ۱/۲ در مرحله پرآوری ریز نمونه‌های قره‌قاط در این تحقیق بدست آمد. بین محیط‌های کشت پایه QL و WPM تفاوت‌هایی از نظر میزان برخی از عناصر مغذی وجو دارد و اختلاف در عملکرد درون شیشه‌ای گیاه در این محیط‌های کشت پایه ممکن است به‌علت همین اختلافات عناصر باشد. در محیط کشت پایه QL نسبت به محیط کشت پایه WPM سولفات‌پتاسیم حذف و نیترات‌پتاسیم جایگزین آن شده است که باعث می‌شود تا مقدار نیترات در محیط کشت پایه QL بیشتر از محیط کشت پایه WPM باشد که در نتیجه نیتروژن کل در محیط کشت پایه QL نسبت به WPM بیش‌تر می‌باشد. نیتروژن مهم ترین عنصر مؤثر در اندام‌زایی و پرآوری جوانه جانبی در کشت بافت می‌باشد و افزایش غلظت آن تا حد مشخصی می‌تواند سبب افزایش رشد و نمو گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای شود (پروین[5] و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین در محیط کشت پایه QL عنصر کلر حذف شده است و به نظر می‌رسد که عملکرد بهتر گیاه در محیط کشت پایه QL علاوه بر بیشتر بودن میزان نیترات به حذف عنصر کلر در این محیط کشت پایه نیز مربوط باشد که اثر منفی یون کلر بر ریزازدیادی گیاهان چوبی به خصوص از طریق کاهش میزان کلروفیل و نهایتا کاهش رشد گیاهچه در برخی گونه‌های گیاهی گزارش شده است (کارکونن[6] و همکاران، ۱۹۹۹). شاخساره گیاهان چوبی در جذب پتاسیم بسیار کارآمد می‌باشند و از این رو مقادیر پایین این یون برای رشد و پرآوری شاخساره‌ها کافی می باشد و مقادیر بالای آن ممکن است سبب بروز اثرات منفی در ریزنمونه‌ها گردد (ایلژک و جاکیگراد، ۲۰۱۶). همچنین محیط کشت پایه QL میزان یون کلسیم بیشتری نسبت به محیط کشت پایه WPM دارد. یون کلسیم برای سنتز دیواره سلولی، عملکرد غشاء و انتقال پیام در سلول‌ها ضروری بوده و از این رو نقش مهمی در پرآوری و اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای دارد (مات و جهله[7]، ۲۰۰۵). برتری محیط کشت پایه QL نسبت به سایر محیط‌های کشت پایه رایج برای ریزازدیادی گیاهان چوبی در برخی گونه‌ها مانند *V.corymbusum* L. (فان[8] و همکاران، ۲۰۱۷) اوکالیپتوس (گلوکی[9] و همکاران، ۲۰۰۶) و گیلاس (مات و جهیل، ۲۰۰۵؛ پینتو[10] و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش شده است که با نتایج به دست آمده در این پژوهش در ارتباط با مقایسه دو محیط کشت پایه WPM و QL منطبق است.

مطابق (شکل۱) زآتین در غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر در طول شاخساره و در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بهترین عملکرد را در شاخص‌های تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره اندازه‌گیری شده دارد. هر چند در صفت طول شاخساره، غلظت یک و سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند و محیط کشت پایه ۱/۲MS در ترکیب با غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر زآتین بیشترین طول

1. Zapartan
2. Gabriela
3. Tetsumura
4. Ilczuk and Jacygrad
5. Perveen
6. Karkonen
7. Matt and Jehle
8. Fan
9. Glocke
10. Pinto

شاخساره و محیط کشت پایه AN در ترکیب با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین بهترین عملکرد را در تعداد شاخساره ، تعداد برگ و تعداد گره تشکیل شده داشت. تیمار زآتین در چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و IAA (در غلظت یکسان ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) در تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده شامل طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ و تعداد گره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. در تحقیقی که روی *V.myrtillus* L. انجام گرفت اعلام شد که غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA باعث افزایش تعداد شاخساره‌های جدید گردید (جوجه و سوکمن، ۲۰۱۵). طی مطالعه‌ای دیگر روی همین گیاه مشخص گردید که بیشترین درصد استقرار سرشاخه و پرآوری با دو میلی‌گرم بر لیتر زآتین، بیشترین تعداد برگ با یک میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و بیشترین درصد ریشه زایی در ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد (جوجه و سوکمن، ۲۰۱۳). زآتین در ترکیب با IBA در غلظت کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین تأثیر را در پرآوری *V.corymbosum* L. داشت (روزیچ و همکاران، ۲۰۱۲). غلظت زآتین (۱ میلی‌گرم بر لیتر) در این پژوهش دارای برتری نسبت به سایر غلظت‌های مورد بررسی بود. رید و عبدالنور[1] (۱۹۹۱) گزارش کردند که زآتین برای آغاز رشد و تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونهٔ جوانهٔ جانبی *V.arctostaphylos L.* موثرتر از 2ip می‌باشد. سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌های گیاهی توانایی قابل توجهی برای باززایی اندام‌های جدید دارند (پالیان‌ماکال[2] و همکاران، ۲۰۱۴؛ پاتی و توتیجا[3]، ۲۰۱۳؛ بل[4] و همکاران، ۲۰۱۲) که در مورد انواع گیاهان بری (berry) نیز صادق است. موفقیت برگ برای باززایی بیش‌تر از سایر قسمت‌های گیاهی شناخته شده است (کاپیلتی[5] و همکاران، ۲۰۱۵). برای توسعه باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای، نقش انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به طور گسترده‌ای به‌عنوان مهمترین عامل شناخته شده‌اند (آزاد[6] و همکاران، ۲۰۰۴؛ سوبوتیک[7] و همکاران، ۲۰۰۹).

در ریزازدیادی و باززایی انواع بلوبری‌ها (Blueberry) زآتین توسط (روزیچ و همکاران، ۲۰۱۲)، BA توسط (ترونی[8] و همکاران، ۲۰۱۱) و TDZ توسط (کاپلتی و همکاران، ۲۰۱۶) پیشنهاد شده است. در این آزمایش نیز تأثیر تیمار ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در پینه‌زایی ریز نمونه‌های گیاه قره‌قاط در محیط کشت پایه ۱/۲QL مورد بررسی قرار گرفت که زآتین دارای بهترین عملکرد از نظر درصد پینه‌زایی و BAP بهترین عملکرد از نظر تعداد روز در القای پینه را دارا بودند. در پژوهش کوتاز[9] و همکاران، ۲۰۱۷) در *V.corymbusum* L. و *V.vitis-idaea* L. ، واریته Red pearl در *V.vitis-idaea* L. بیشترین باززایی را در محیط کشت پایه AN در ترکیب با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip ، واریته Elizabeth در *V.corymbusum* L. کمترین باززایی را در محیط کشت پایه WPM و واریته Ammerland در *V.vitis-idaea* L. کمترین باززایی را در محیط کشت پایه AN در ترکیب با غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip داشتند. تحقیق حاضر با هدف دست‌یابی به نتایجی جدید در رابطه با تأثیر تیمار ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و محیط کشت پایه متفاوت در پینه‌زایی ریزنمونه‌های گیاه قره‌قاط در گونه (*V.arctostaphylos* L.) پرداخت. هر چند از TDZ در بسیاری از گیاهان برای باززایی نوساقه استفاده شده است با این حال اولین گزارش در استفاده از TDZ درباززایی *Vaccinium* توسط (دبناث و مک‌رای، ۲۰۰۲) در گیاه *V.vitis-idaea* L. می‌باشد. بهترین باززایی برای رقم Calypso توت‌فرنگی در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ همراه با 2/4/D و بهترین باززایی برای رقم Sevea در محیط کشت پایه WPM حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بدست آمد. همچنین در بلوبری رقم Duke TDZ به تنهایی یا همراه با 2ip برای باززایی گزارش شد (کاپلتی و همکاران، ۲۰۱۵). در این پژوهش نیز تیمار T5 (10 TDZ µm +10 NAA µm) ۱۰۰ درصد پینه‌زایی شده بود. به گزارش (مینرس و همکاران، ۲۰۰۷) زآتین در باززایی نو ساقه از ریزنمونه‌های برگ در رقم Red pearl و Ozarkblue عملکرد بهتری از TDZ

1. Reed and Abdelnour- Esquivel
2. Palian mackal
3. Pathi and Tuteja
4. Beel
5. Cappelletti
6. Azad
7. Subotic
8. Tirone
9. Kutas

داشت. در مورد highbush blueberry، (روولند و اوقدن[1]، ۱۹۹۲) گزارش کردند که زآتین در بین سایر سایتوکنین‌ها بیش‌ترین تأثیر را دارد. در تحقیق حاضر نیز زآتین بهترین عملکرد را در بین تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی داشت. با این حال استفاده از دو نوع سایتوکنین TDZ و زآتین برای القای پینه در Lowbush blueberry توسط (دبناث، ۲۰۰۹a؛ سانک و سینک[2]، ۲۰۰۴) گزارش شده است.

منابع

Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y. and Çiftçi, Y.O. 2014. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 117(1): 65-76.

Azad, M.A.K., Yokota, S., Yahara, S. and Yoshizawa, N. 2004. Effects of explant type andgrowth regulators on organogenesis in a medicinal tree, phellodendronamurense rupr. Asian Journal of Plant Sciences (Pakistan), 3: 522–552.

Bell, R.L., Scorza, R. and Lomberk, D. 2012. Adventitious shoot regeneration of pear (*Pyrus* spp.) genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(2): 229-236.

Cao, X., Hammerschlag, F.A. and Douglass, L. 2002. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. HortScience, 37(5): 819-821.

Cao, X.I.A.O.L.I.N.G. and Hammerschlag, F.A. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. HortScience, 35(5): 945-947.

Cappelletti, R., Sabbadini, S. and Mezzetti, B. 2015. Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). In: Wang, K. (Ed.), Agrobacterium Protocols, 3rd edn. Springer. New York, pp. 217–227.

Cappelletti, R., Sabbadini, S. and Mezzetti, B. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. Scientia horticulturae, 207: 117-124.

Cuce, M. and Sokmen, A. 2015. Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L.(Bilberry) naturally growingin the Turkish flora. Turkish Journal of Biology, 39(2): 233-240.

Cuce, M. and Sokmen, A. 2017. *In vitro* production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 41(4): 294-304.

Cüce, M., Bektas, E. and Sokmen, A. 2013. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37(1): 40-44.

Debnath, S.C. 2009a. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 45(2): 122-128.

Debnath, S.C. 2009b. Propagation and cultivation of *Vaccinium* species and less known small fruits. Latvian Journal of Agronomy, 12: 22-29.

Debnath, S.C. and Mcrae, K.B. 2002. An efficient adventitious shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77(6): 744-752.

Diaz-Sala, C., Rey, M. and Rodriguez, R. 1990. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). Plant cell, tissue and organ culture, 23(3): 151-157.

Ďurkovič, J. 2008. Micropropagation of mature *Cornus mas* 'Macrocarpa'. Trees, 22(4): 597-602.

Fan, S., Jian, D., Wei, X., Chen, J., Beeson, R.C., Zhou, Z. and Wang, X, 2017. Micropropagation of blueberry 'Bluejay'and 'Pink Lemonade'through *in vitro* shoot culture. Scientia horticulturae, 226: 277-284.

Gabriela, V. 2011. Effect of adenine sulfate (adso4) on the *in vitro* evolution of white clover variety (*Trifolium repens* L.). Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Protectia Mediului, 17: 203-210.

Gajdosova, A., Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruskova, E. and Simala, D. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14: 103-119.

1. Rowland and Ogden

2. Song and Sink

Glocke, P., Delaporte, K., Collins, G. and Sedgley, M. 2006. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema*× *Eucalyptus stricklandii* cv. 'urrbrae gem'. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 42(2): 139-143.

Gonzalez, M.V., Lopez, M., Valdes, A.E. and Ordas, R.J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. Annals of Applied Biology, 137(1): 73-78.

Ilczuk, A. and Jacygrad, E. 2016. *In vitro* propagation and assessment of genetic stability of acclimated plantlets of *Cornus alba* L. using RAPD and ISSR markers. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 52(4): 379-390.

Kärkönen, A., Simola, L.K. and Koponen, T. 1999. Micropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes. In Annales Botanici Fennici (pp. 21-31). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.

Kaveriappa, K.M., Phillips, L.M. and Trigiano, R.N. 1997. Micropropagation of flowering dogwood (*Cornus florida*) from seedlings. Plant Cell Reports, 16(7): 485-489.

Kianbakht, S. 2008. A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents. Journal of Medicinal Plants, 7(28): 1-27.

Kutas, E., Veyevnik, A., Titok, V. and Ogorodnyk, L. 2017. The influence of hormone additions on regenerative potential of *Rhododendron luteum* Sweet, introduced varieties of *acciniumcorymbosum* L., *Vaccinium Vitis-idaea* L. in sterile culture, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 4(1): 157-162.

Marcotrigiano, M., McGlew, S.P., Hackett, G. and Chawla, B. 1996. Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Plant cell, tissue and organ culture, 44(3): 195-199.

Matt, A. and Jehle, J.A. 2005. *In vitro* plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Plant Cell Reports, 24(8): 468-476.

Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for Vaccinium species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 89(2): 169-176.

Milbury, P.E., Graf, B., Curran-Celentano, J.M. and Blumberg, J.B. 2007. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. Investigative ophthalmology and visual science, 48(5): 2343-2349.

Ostrolucká, M.G., Gajdošová, A. and Libiaková, G., 2002. Influence of zeatin on microclonal propagation of *Vaccinium corymbosum* L. Propag. Ornam. Plants, 2(2): 14-18.

Ostrolucká, M.G., Libiaková, G., Ondrußková, E. and Gajdoßová, A. 2004. *In vitro* propagation of *in vitro* Vaccinium species Vaccinium. Acta Universitatis Latviensis, 676: 207-676.

Pathi, K.M. and Tuteja, N. 2013. High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Narashima) by using embryo apex. Plant Signaling and Behavior, 8(1): 22763.

Perveen, S., Varshney, A., Anis, M. and Aref, I.M. 2011. Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbeck*. Journal of Forestry Research, 22(1): 47-52.

Pinto, G., Silva, S., Park, Y.S., Neves, L., Araújo, C. and Santos, C. 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95(1): 79-88.

Pulianmackal, A.J., Kareem, A.V., Durgaprasad, K., Trivedi, Z.B. and Prasad, K. 2014. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. Frontiers in Plant Science, 5: 142.

Reed, B.M. and Abdelnour-Esquivel, A. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of Vaccinium species and cultivars. HortScience, 26(10): 1320-1322.

Rowland, L.J. and Ogden, E.L. 1992. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry. HortScience, 27(10): 1127-1129.

Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R. and Gajdošova, A. 2012. Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of berry research, 2(2): 97-103.

Sedaghathoor, S., Kashi, A.K., Talaei, A.R. and Khalighi, A. 2006. Essential oils of qare-qat (*Vaccinium arctostaphylos*) shoots and chemical composition of berries. International Journal of Agriculture Biology, 8: 45-46.

Song, G.Q. and Sink, K.C. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Plant Cell Reports, 23(7): 475-484.

Subotić, A., Jevremović, S. and Grubišić, D. 2009. Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurium erythraea*-valuable medicinal plant. Scientia horticulturae, 120(3): 386-390.

Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y. and Kunitake, H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. Scientia Horticulturae, 119(1): 72-74.

Tirone, S., Forni, C., Lucioli, S., Meneghini, M., Nota, P., De Salvador, F.R., Giorgioni, M., Catenaro, E., Frattarelli, A., Ceccarelli, D. and Caboni, E. 2011. Colture *in vitro* e produzione di composti fenolici in *Vaccinium corymbosum* L. Acta Italus Hortus, 6: 211-214.

Zapartan, M. 2001. Conservarea florei spontane prin inmultire in vitro, Ed. ALC Media Group, Cluj–Napoca, pp.119-122.