دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

اثر انواع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر ریز ازدیادی گیاه حبه آبی

نگارنده: **کلثوم محمدنیا**

اساتید راهنما

دکتر مهدیه پارسائیان

دکتر بتول حسین پور

شهریور ۱۳۹۷

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده

شماره: ۴۰ آرک

تاریخ: ۱۳۹۷/۸/۲۰

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای کلثوم محمدنیا با شماره دانشجویی ۹۴۱۵۹۶۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی تحت عنوان اثر انواع محیط کشت و تنظیم کننده های رشد بر ریز ازدیادی گیاه حبه آبی که در تاریخ ۱۳۹۷/۰۶/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: ...عالی...) ☒ مردود ☐

نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☒

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر مهدیه پارساییان	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم	دکتر بتول حسین پور	استادیار	غایب
۳- استاد مشاور	-		
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر حسن مکاریان	دانشیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

۹۷/۸/۱۹

۳

تقدیم به

پدر و مادر عزیز

و همسر مهربانم

تعهدنامه

اینجانب کلثوم محمدنیا دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه" اثر انواع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر ریز ازدیادی گیاه حبه آبی" تحت راهنمائی خانم ها دکتر مهدیه پارسائیان و دکتر بتول حسین پور

متعهد می‌شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه‌های رایانه‌ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

بلوبری (*Vaccinium corymbosum* L.) یک تتراپلوئید چند ساله است که متعلق به خانواده Ericaceae و جنس *Vaccinium* است که بومی آمریکای شمالی می‌باشد. در سالیان اخیر تقاضا برای بلوبری به خاطر خواص آنها در سلامت انسان به‌دلیل داشتن مولفه‌های آنتی‌اکسیدانی ازجمله فلاونوئید، آنتوسیانین و اسیدهای فنولیکی، افزایش چشم‌گیری داشته است. به‌منظور برآورده شدن افزایش تقاضا برای بلوبری، کشت بافت می‌تواند مناسب‌ترین روش باشد. اگرچه بلوبری در ایران در مقیاس وسیع کشت نشده است، اما این گیاه شرایطی برای رشد نیاز دارد که در ایران این شرایط مهیا است و پتانسیل تولید تجاری آن وجود دارد. در این تحقیق، ریز نمونه‌های درون شیشه‌ای مربوط به سه واریته‌ی مختلف بلوبری شامل بلوکراپ، چندلر و رکا تهیه شده و در محیط کشت WPM غنی شده با هورمون زآتین و ماده دی ک گولاگ کشت شد و پس از گذشت دو ماه، طول و تعداد شاخه-های جانبی اندازه‌گیری شد. همچنین پتانسیل ریشه‌زایی در محیط کشت WPM غنی شده با IBA و شکر با یا بدون ذغال فعال شده بررسی شد. بیشترین طول شاخه‌های جانبی با استفاده از ترکیب هورمونی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی ک گولاک در واریته چندلر و همچنین ترکیب ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی ک گولاک در واریته بلوکراپ به‌دست آمد. به‌علاوه، کمترین مقدار طول شاخه‌های جانبی از ترکیب هورمونی ۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی ک گولاک در واریته چندلر به‌دست آمد. بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی با استفاده از ترکیب هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر زآتین با ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی ک گولاک و کمترین تعداد در ترکیبات ۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین با ۰، ۵ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی ک گولاک مشاهده شد. به علاوه، القای ریشه در تیمارهای بدون ذغال فعال شده صورت نگرفت، اما در تیمارهای غنی شده با ذغال فعال شده ریشه‌زایی صورت گرفت. به‌طورکلی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هورمون زآتین دارای اثرات موثری روی تکثیر و رشد واریته‌های بلوبری دارد. از طرف دیگر، ماده دی ک گولاگ اثرات موثر و قابل ملاحظه‌ای روی تکثیر و رشد واریته‌های بلوبری نداشت. همچنین استفاده از ذغال فعال شده برای ریشه‌زایی واریته‌های بلوبری حیاتی و بسیار ضروری بود، به‌طوری‌که در شرایط عدم استفاده از ذغال فعال شده ریشه‌زایی صورت نگرفت.

کلید واژه‌ها: بلوبری، ریزازدیادی، محیط کشت تنظیم کننده رشد

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

۱- محمد نیا، ک.، پارسائیان، م.، چوخاچی زاده مقدم، م. و حسین پور، ب.، (**۱۳۹۷**) "اثر غلظت‌های مختلف زآتین و دی ک گولاک بر ریز ازدیادی گیاه بلوبری " سومین کنگره بین المللی و پانزدهمین کنگره ملی زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۵ ص.

۲- محمد نیا، ک.، پارسائیان، م.، چوخاچی زاده مقدم، م. و حسین پور، ب.، (**۱۳۹۷**) "بررسی اثر زغال فعال و ساکارز بر روی درصد ریشه‌زایی درون شیشه گیاه حبه آبی (*Vaccinium corymbosum*)" هفتمین کنگره ملی گیاهان دارویی ۲۲ الی ۲۴ اردیبهشت، شیراز، ۵ ص.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل ۱ ..... **۱**

۱-۱ مقدمه و هدف **۲**

۱-۲ کلیات **۵**

۱-۲-۱ جنس *Vaccinium* ۵

۱-۲-۲ بلوبری ۷

۱-۲-۲-۱ خواص بلوبری ۱۰

۱-۲-۲-۲ تکثیر بلوبری و شرایط خاک آن ۱۲

۱-۲-۳ کشت بافت ۱۴

۱-۲-۴ محیط کشت ۱۷

۱-۲-۵ تنظیم کنندههای رشد ۱۸

۱-۲-۶ روش بهینهسازی محیط کشت ۲۳

۱-۲-۶-۱ انتخاب فاکتور، سطح فاکتور و پاسخ ۲۵

۱-۲-۶-۲ ماتریس طرح ۲۵

۱-۲-۶-۳ آزمون تصادفی و تکرار ۲۶

۱-۲-۶-۴ تجزیهوتحلیل آماری نتایج ۲۷

۱-۲-۶-۵ ارائه گرافیکی نتایج ۲۷

فصل ۲ ..... **۲۹**

فصل ۳ ..... **۳۵**

۳-۱ مواد گیاهی **۳۶**

۳-۲ ضدعفونی ریزنمونه ها **۳۶**

۳-۳محیط کشت و آمادهسازی آن **۳۶**

۳-۴ آزمایش ها ۳۷
۳-۴-۱ آزمایش اول ۳۷
۳-۴-۲ آزمایش دوم ۳۸
۳-۴-۳ آزمایش سوم ۳۸
۳-۵ اندازه گیری ها ۳۹
۳-۶ غربالگری فاکتورهای مؤثر بر تعداد و کیفیت شاخه ۳۹
۳-۷ تجزیه‌وتحلیل داده ها ۴۳
فصل ۴ ..... ۴۵
۴-۱ آزمایش اول ۴۶
۴-۲ آزمایش دوم ۵۰
۴-۳ آزمایش سوم ۵۴
۴-۴ غربالگری فاکتورهای مؤثر بر تعداد و کیفیت شاخه ۶۱
فصل ۵ ..... ۶۵
۵-۱ نتیجه گیری ۶۶
۵-۲ پیشنهادها ۶۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: تصویری از گیاه بلوبری ۹
شکل ۴-۱: ریشه‌زایی در واریته بلوکراپ در محیط کشت غنی شده با هورمون IBA و ساکارز بدون زغال فعال ۵۹
شکل ۴-۲: ریشه‌زایی در واریته بلوکراپ در محیط کشت غنی شده با هورمون IBA و ساکارز به همراه زغال فعال .. ۶۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: ترکیبات غذایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه بلوبری ۱۲
جدول ۱-۲: محیط بازیابی برای ارقام مختلف بلوبری ۲۲
جدول ۱-۳: طرح پلاکت برمن با ۱۲ اجرا و ۱۱ فاکتور ۲۶
جدول ۳-۱: مقدار عناصر کم مصرف، پرمصرف، ویتامین‌ها و ساکارز (میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت WPM مورد استفاده برای ریزازدیادی بلوبری ۳۷
جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در طرح پلاکت برمن ۴۰
جدول ۴-۱: تجزیه واریانس طول شاخه‌های جانبی دو رقم بلوبری در سطوح مختلف زئاتین و دی ک گولاک ۴۶
جدول ۴-۲: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هورمون زآتین و دی ک گولاک بر طول شاخه‌های جانبی تولید شده در دو رقم مختلف بلوبری بر اساس آزمون دانکن. ۴۸
جدول ۴-۳: نتایج تجزیه واریانس دوطرفه تعداد شاخه‌های جانبی دو رقم بلوبری در سطوح مختلف زئاتین و دی ک گولاک ۴۹
جدول ۴-۴: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هورمون زئاتین و دی ک گولاک بر تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده در دو رقم بلوبری. ۵۰
جدول ۴-۵: تجزیه واریانس طول شاخه‌های جانبی سه رقم بلوبری در سطوح مختلف هورمون زئاتین ۵۰
جدول ۴-۶: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هورمون زئاتین بر طول شاخه‌های جانبی تولید شده در سه رقم مختلف بلوبری. ۵۱
جدول ۴-۷: تجزیه واریانس دوطرفه تعداد شاخه‌های جانبی سه رقم بلوبری در سطوح مختلف هورمون زئاتین ۵۲
جدول ۴-۸: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هورمون زئاتین بر تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده در سه رقم مختلف بلوبری. ۵۳
جدول ۴-۹: تجزیه واریانس دوطرفه درصد ریشه‌زایی سه رقم بلوبری در سطوح مختلف هورمون IBA و تیمار زغال فعال ۵۴
جدول ۴-۱۰: مقایسه میانگین ریشه‌زایی ارقام بلوبری تحت تأثیر مصرف و عدم مصرف تیمار زغال فعال. ۵۵
جدول ۴-۱۱: تجزیه واریانس دوطرفه ریشه‌زایی دو رقم بلوبری تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار ساکارز ۵۵
جدول ۴-۱۲: نتایج آماری میزان تاثیرگذاری عوامل مختلف بر کیفیت شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم بلوکراپ بلوبری با روش پلاکت-برمن. ۶۱
جدول ۴-۱۳: نتایج آماری میزان تأثیر گذاری عوامل مختلف بر تعداد شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم بلوکراپ بلوبری به روش پلاکت-برمن. ۶۲

جدول ۴-۱۴: نتایج آماری میزان تاثیرگذاری عوامل مختلف بر کیفیت شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم چندلر بلوبری به روش پلاکت-برمن. ۶۲
جدول ۴-۱۵: نتایج آماری میزان تأثیر گذاری عوامل مختلف بر تعداد شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم چندلر بلوبری به روش پلاکت-برمن. ۶۳

فصل ۱

مقدمه و هدف

۱-۱ مقدمه و هدف

گیاه بلوبری با نام علمی *Vaccinium corymbosum* L. متعلق به خانواده Ericaceae، جنس *Vaccinium* و زیرجنس *Cyanococcus* است (Ratnaparkhe, 2007). این گیاه در مساحتی معادل ۴۸/۳ تا ۷۴ هزار هکتار به‌ویژه در کشورهای ایالات متحده آمریکا و کانادا کشت می‌شود و از تولید جهانی ۲۱۴ تا ۳۳۱ هزار تن برخوردار است (Litwinczuk, 2012). گونه‌های مختلفی از این جنس مانند قره قاط در ایران رشد می‌کند، بااین‌حال این گیاه، هنوز در ایران تولید تجاری نشده است. گونه-ای از جنس *Vaccinium* در نقاطی از شمال کشور در جنگل‌های گیلان، منطقه اسالم وجود دارد و به شکل محلی با نام سیاه‌گیله شناخته می‌شود (مظفریان، ۱۳۸۸). جنس *Vaccinium* شامل چندین گونه که میوه آن‌ها ارزش خوراکی داشته و همچنین چندین گونه زینتی است که شامل: highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)، Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) و lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) می‌باشد (Litwinczuk, 2012).

Highbush blueberry که هیبرید سه گونه *Vaccinium australe* Small، *V. corymbosum* L. و *V. angustifolium* Ait. می‌باشد در مقایسه با دیگر گونه‌های میوه دهنده نسبتا جدید است و اولین ارقام تجاری آن در سال ۱۹۵۰ معرفی شدند (Butkus and Pliszka, 1993).

اهمیت رژیم غذایی در سلامت انسان باعث افزایش علاقمندی مصرف کنندگان در استفاده از مواد غذایی مغذی به‌ویژه میوه‌ها و سبزیجات شده است. بری‌ها منابع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل: تانن‌ها، اسیدهای فنولیکی، فلاونوئیدها و استیلبن‌ها[1] می‌باشند (Paredes-López *et al.*, 2010). میوه خوراکی این گیاه علاوه بر این‌که حاوی فیبرهای محلول و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (نظیر ویتامین ث، بتاکاروتن، فولیک اسید و آنتوسیانین) می‌باشد، با برخورداری از ترکیباتی مانند آنتوسیانوسید و گالیک اسید، دارای آثار ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد (Litwinczuk, 2012). استفاده از بلوبری به‌عنوان غذا و دارو سابقه‌ای طولانی در اروپا و آمریکای شمالی دارد (Song and

[1]: Stilbenes

Sink, 2007). میوه بلوبری‌ها یا مصرف تازه‌خوری داشته و یا به‌عنوان محصولات فرآوری شده شامل کنسروها، کنسانتره‌ها، در تهیه انواع آب نبات، ژله، بستنی، آبمیوه، شربت، شیرینی و همچنن تولید انواع مکمل‌های غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Litwinczuk, 2012).

در دهه‌های گذشته، نظر به افزایش تقاضا برای این گیاه قیمت آن نیز افزایش یافته و درنتیجه سطح کشت آن در سراسر جهان به‌سرعت گسترش یافته است (Ruzic et al., 2012). به‌منظور تامین افزایش سطح کشت بلوبری، کشت بافت می‌تواند روشی مناسب برای تکثیر سریع کلون‌ها و ارقام جدید این گیاه باشد. ایالات متحده آمریکا بزرگ‌ترین تولید کننده و کانادا در جایگاه دوم تولید بلوبری قرار گرفته است. باید توجه داشت که هنوز هم برخی مجادله‌ها در رابطه با کشت بافت گیاهان خانواده Ericaceae وجود دارد (Serres *et al*., 1997; Litwińczuk *et al*., 2005) و تاکنون ناشناخته باقی مانده است. این موارد شامل رشد بیش از حد شاخه‌های جانبی، تاخیر در برداشت میوه و یا میوه‌های ریزتر است. اولین مقالات در رابطه با ریز ازدیادی بلوبری در سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ به چاپ رسیدند و از آن زمان تاکنون مطالعات مختلفی در رابطه با کشت آزمایشگاهی بلوبری انجام شد و نتایج آن گزارش گردید. ازجمله این‌که بلوبری و قره قاط هر دو با روش کشت بافت ساقه در محیط غنی شده با ایندول استیک اسید (IAA, 0–4 mg/L) و ۶، γ، γ، دی متیل آلیل آمینو پورین (2iP, 5–10 mg/L) تکثیر می‌شوند. بااین‌حال، تفاوت‌های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای بسیاری در پاسخ به نوع و غلظت سیتوکینین، اکسین و نمک‌های آهن‌دار وجود دارد (Litwinczuk, 2012).

در برخی از ارقام ارزشمند و مطلوب بلوبری روش‌های تولید صنعتی به‌اندازه کافی وجود ندارد؛ بنابراین بهینه‌سازی محیط‌های کشت برای هر ژنوتیپ به‌طور جداگانه توصیه می‌شود.

Sedlak و Paprstein (۲۰۰۹) گزارش نمودند که برای تکثیر Highbush blueberry می‌توان از روش‌های کاشت دانه، قلمه‌گیری و کشت بافت استفاده کرد، با این وجود، تکثیر بلوبری با استفاده از بذر نرخ بالایی از هتروزیگوتی را نشان می‌دهد. برای حفظ یکنواختی و ساختار ژنتیکی، تکثیر رویشی بلوبری به‌وسیله قلمه‌های گرهی مرسوم است، با این‌حال این روش، پرهزینه و وقت‌گیر است و دارای

مشکلاتی در زمینه ریشه‌زایی می‌باشد (Zhao *et al*., 2011)؛ بنابراین، با توجه به اینکه تکثیر از طریق قلمه بازدهی پائینی دارد، تکثیر گیاه بلوبری معمولا به روش کشت بافت انجام می‌شود (Hartmann *et al*,1999). در این روش تکثیر ژنوتیپ‌های برتر که ظرفیت ریشه‌زایی بالایی داشته به‌سرعت با یکنواختی بالا تولید می‌شوند (Meiners *et al*., 2007)، از این رو، کشت بافت بلوبری در طی ۳۰ سال گذشته توسعه یافته است (Fukui *et al*., 1991; Isutsa *et al*., 1994; Gonzalez *et al*., 2000). علاوه‌براین، در مقایسه با گیاهان پرورش یافته به روش‌های دیگر، گیاهان بلوبری کشت بافت شده میوه بیشتری تولید می نمایند (El-Shiekh *et al*., 1996).

اگرچه بلوبری در ایران در مقیاس وسیع کشت نشده است، اما این گیاه شرایطی برای رشد نیاز دارد که در ایران این شرایط مهیا است و پتانسیل تولید تجاری آن وجود دارد. این گیاه کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف دارد و کشت آن در دنیا گسترش پیدا کرده است، اما در ایران مورد توجه قرار نگرفته است و با توجه به مشکل بودن و ناشناخته بودن روش‌های تولید و تکثیر آن در ایران، مطالعات کشت بافتی این گیاه در راستای افزایش تکثیر و بهره‌وری اقتصادی با استفاده از ژنوتیپ‌های برتر و روش‌های بهینه‌تر اهمیت ویژه‌ای می‌تواند داشته باشد.

بلوبری مورد مطالعه در این تحقیق با نام علمی *V. corimbosum* و با نام انگلیسی Highbush blueberry دارای طیف گسترده‌ای در ایالات متحده امریکا است و جزء گیاهان مطرح USDA یا انجمن گیاهان سرسخت وزارت کشاورزی ایالات متحده است.

در این تحقیق تأثیر نوع محیط‌کشت و انواع تنظیم کننده‌های رشد بر تکثیر و ریشه‌زائی این گیاه بررسی شد. اکثر پروتکل‌های تکثیر از طریق کشت بافت محرمانه بوده که دست‌یابی به این پروتکل‌ها برای کشور مورد نیاز است؛ بنابراین در این تحقیق سه واریته مختلف از گیاه بلوبری (Highbush blueberry) انتخاب و ریزازدیادی با هدف افزایش بازدهی تولید نهال در آن‌ها با مراحل زیر بررسی شد:

۱- انتخاب سه واریته از *Vaccinium corymbosum* یا (Highbush blueberry).

۲- تهیه ریز نمونه‌های جوانه‌های جانبی و کشت آن‌ها

۳- بهینه‌سازی محیط‌کشت و غلظت هورمون‌ها جهت افزایش راندمان تکثیر درون شیشه‌ای و مقایسه بازدهی سه واریته با هم

۴- ریشه‌زایی درون شیشه و ریشه‌زایی مستقیم

۱-۲ کلیات

۱-۲-۱ جنس Vaccinium

جنس *Vaccinium* متعلق به خانواده Ericaceae بوده که حدود ۴۵۰ گونه از این جنس در ایالات متحده و در سراسر جهان وجود دارد (Debnath, 2006). جنس *Vaccinium* شامل بلوبری‌ها، کران‌بری‌ها و لینگون‌بری‌ها و بسیاری از گونه‌های مرتبط وحشی هستند (Ratnaparkhe, 2007). بیشتر گونه های این جنس در ارتفاعات بالای مناطق گرمسیری هستند، اما همچنین در مناطق معتدله و بوره‌آل (مناطق سرد نیم‌کره شمالی) نیز وجود دارند (Ratnaparkhe, 2007). جنس *Vaccinium* پراکندگی جغرافیایی بالایی دارد و دارای سطح بالایی از تنوع مورفولوژیکی نیز می‌باشد. *V. angustifolium* Ait. یا (*Lowbush blueberry*) و *V. corymbosum* L. یا (*Highbush blueberry*) و *V. virgatum* Ait. یا (Syn.*V. ashei* Reade) رایج‌ترین گونه‌های بومی شمال آمریکا هستند. یک یا چند گونه از این جنس در همه قاره‌ها به‌جز استرالیا و قطب جنوب مشاهده شده است (Ballington, 2001). گیاهان جنس *Vaccinium* ممکن است به‌صورت بوته‌ای یا درختی باشند و به‌طورکلی روی خاک‌های اسیدی، شنی، متخلخل یا ارگانیک مشاهده می‌شوند. بری‌های تولید شده توسط این جنس خوراکی بوده و خاصیت دارویی دارند و طعم آن‌ها از بی‌مزه تا ترش و شیرین متغیر است. گونه‌های *Vaccinium* برای تولید ارقام بلوبری که میوه آن‌ها مصرف خوراکی دارد، استفاده می‌شوند (Ratnaparkhe, 2007). گونه‌های این جنس عمدتا درختچه هایی مانند بلوبری هستند، با این وجود فرم‌های متنوعی از اپی‌فیت تا درخت وجود دارد. بلوبری، کران‌بری و لینگون‌بری سه گونه میوه-

دار تجاری از جنس *Vaccinium* بوده که دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند. میوه‌های آن‌ها حاوی مقدار نسبتا بالایی ویتامین ث، سلولز و پکتین بوده و تولید کننده آنتوسیانین می‌باشند (Sapers and Hargrave, 1987). همچنین خواص درمانی مهمی نظیر، خاصیت ضد توموری (Koide *et al*., 1996)، ضد زخم معده‌ای (Cristoni and Magistretti, 1987) آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضد التهابی (Wang *et al*., 1999) را نیز دارا می‌باشند. پروانتوسیانیدین (تانن‌های متراکم) تولید شده به وسیله کران‌بری موجب جلوگیری از عفونت‌های ادراری از طریق کاهش چسبندگی اوروپاتوژنیک اشریشیاکلی[1] می‌شوند (Leahy *et al*., 2002; Howell *et al*., 2005). میوه‌ها و برگ‌های لینگنون‌بری در پزشکی برای کاهش سطح کلسترول، درمان اختلالات معده و بیماری‌های روماتیسمی و همچنین عاملی برای درمان عفونت‌های مثانه و کلیه استفاده می‌شوند (Novelli, 2003). درحالی‌که کشورهای پیشرو در تولید کران‌بری ایالات متحده، کانادا، لیتوانی و لهستان هستند، کشت آن در کشورهای اتریش، آلمان و روسیه نیز در حال انجام است. ایالات متحده و کانادا از بیشترین سطح کشت این گیاه برخوردار می‌باشند (Galletta and Ballington, 1996). تولید تجاری لینگون‌بری عمدتا شامل برداشت بری‌ها از جمعیت‌های وحشی در شمال اروپا، آسیا و آمریکای شمالی است (Ballington, 2001). گونه‌های *Vaccinium* به‌طور ژنتیکی هتروزیگوت هستند، یعنی پایه‌های بذری که شبیه والدین هستند تولید نمی‌کنند؛ بنابراین روش معمول تکثیر این گیاه روش غیر جنسی است. در این روش خصوصیات ژنتیکی حفظ می‌شود. امروزه کشت بافت از روش‌های مطرح در تکثیر سریع کلون‌ها و ارقام جدید این گیاه می‌باشد که علاوه بر تکثیر کلونی از یک کلونی خاص و تولید پایه‌های مادری برای تولید بذور هیبرید، حفظ ژرم‌پلاسم‌های عاری از بیماری به‌منظور استفاده در تولید سالانه این گیاه را به همراه دارد.

[1]: Uropathogenic *Escherichia coli*

۱-۲-۲ بلوبری

بلوبری‌ها یک گروه متنوع از درختچه‌های چوبی چندساله هستند که عمدتا خزان‌کننده می-باشند و میوه‌ها به‌صورت خوشه‌ای می‌رسند که گیاه بومی شمال آمریکاست این گیاه دارویی معمولاً به‌صورت ایستاده بوده و گاهی به‌صورت درختچه‌های خمیده با طول متغیر از ۱ تا ۴ متر می‌باشد که دارای گل‌های استکانی شکل بوده و به رنگ‌های سفید، صورتی رنگ‌پریده یا قرمز یا حتی گاهی سبز دیده می‌شود. این گل‌ها در اوایل اردیبهشت ماه ظاهر شده و سپس میوه‌هایی حبه‌ای شکل کوچک آبی رنگ و سفتی تولید می‌شوند که طعم مطبوعی دارند و شیرین هستند (شکل ۱-۱). برگ‌های این گیاهان با توجه به شرایط آب و هوایی می‌توانند خزان کننده و یا همیشه سبز باشند. برگ‌ها ۱ تا ۸ سانتی‌متر طول و ۰/۵ تا ۳/۵ سانتی‌متر عرض دارند. میوه‌ها که قسمت اصلی این گیاه بوده در حدود ۵ تا ۱۵ میلی‌متر قطر داشته و در ابتدا سبز رنگ می‌باشند و بعد از آن قرمز ارغوانی و در نهایت آبی تیره می‌شوند. بر روی یک خوشه میوه ممکن است مراحل مختلف رسیدن میوه مشاهده شود. به همین دلیل گاهی نمی‌توان تمامی میوه‌های یک خوشه را همزمان با هم چید و باید صبر شود تا میوه‌ها رسیده و سپس آن‌ها را از خوشه میوه جدا کرد. معمولا هر ۵ تا ۱۰ روز یکبار نوبت برداشت میوه‌های بالغ فرا خواهد رسید. روی سطح میوه‌ها پوششی پودری مانند و محافظ وجود دارد که با دست کشیدن و یا شستن از بین خواهد رفت. قسمت مورد استفاده این گیاه میوه آن بوده و پس از برداشت، می‌توانند هم به‌صورت مستقیم وارد بازار مصرف شوند و به‌حالت تازه‌خوری مصرف شوند و هم وارد کارخانه‌های صنعتی شده و انواع کمپوت‌ها و مرباها و آبمیوه‌ها از آن‌ها ساخته شود. از این حبه‌ها در تزئین و ساخت انواع کیک‌ها، شیرینی، بستنی‌ها و دسرها و همچنین تهیه انواع ژله‌ها استفاده می‌شود. بلوبری Highbush (*Vaccinium corymbosum* L.) گیاهی پلی‌پلوئیدی (تتراپلوئید) می‌باشد و از مهم‌ترین گونه‌های این جنس به لحاظ تجاری بوده و به‌شدت هتروزیگوت می‌باشد (Song and Hancock, 2011).

این گیاه می‌تواند روی خاک‌های شنی خشک که برای تولیدات کشاورزی بی‌ارزش بوده، رشد کنند (Ratnaparkhe, 2007). آمریکای شمالی بزرگ‌ترین تولید کننده بلوبری می‌باشد. سطح کلی زیر کشت برای تولید تجاری بلوبری در آمریکای شمالی حدود ۷۴۰۰۰ هکتار می باشد. تولید تجاری بلوبری در ۱۶ کشور در جهان در حال انجام است. کشورهای اصلی تولید کننده بلوری آمریکا و کانادا می‌باشند. علاوه بر این، دیگر کشورها ازجمله: لهستان، مکریک، ایتالیا، هلند، فرانسه، لیتوانی و نیوزلند تولید کننده بلوبری هستند.

درحال‌حاضر پنج گروه عمده از بلوبری‌ها به صورت تجاری رشد می‌کنند که شامل:

۱- lowbush (*V. angustifolium* Ait., *V. myrtilloides* Michx., *V. boreale* Hall and Aald.)؛

۲- highbush (*V. corymbosum* L.)؛

۳- half-high که هیبرید highbush-lowbush می‌باشد؛

۴- Southern highbush که از هیبریداسیون *V. corymbosum* با یک یا چند گونه (عمدتا *V. darrowi* Camp and *V. ashei* Reade) تولید شده است؛ و

۵- Rabbiteye (*V. ashei*).

می‌باشند.

شکل ۱-۱: تصویری از گیاه بلوبری

۱-۲-۲-۱ خواص بلوبری

برخی از مهم‌ترین خواص درمانی بلوبری عبارتند از:

- میوه بلوبری سرشار از مواد آنتی‌اکسیدان است، لذا پیش‌گیری از بروز سرطان از مهم‌ترین و اصلی‌ترین خواص بلوبری برای سلامتی می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بلوبری عمدتا مرتبط با اسید کلوروژنیک، میریستین، اسید سیرینجیک و ریوتین می‌باشد (Contreras *et al.*, 2015).

برخی پلی‌ساکاریدهای موجود در بلوبری دارای فعالیت ضد توموری می‌باشند (Sun *et al.*, 2015).

- بلوبری خاصیت ضد التهابی داشته و ضد زخم معده می‌باشد (Cristoni and Magistretti, 1987; Prior *et al.*, 1998).
- مواد آنتی‌اکسیدان و ویتامین‌های موجود در آن، بلوبری را به میوه‌ای بسیار مفید برای سلامت پوست تبدیل کرده است. مصرف این میوه باعث افزایش شادابی و نرمی پوست شده، تهیه ماسک بلوبری همراه با آبلیمو باعث لایه‌برداری پوست و روشن شدن پوست می‌شود.
- کمک به عملکردهای شناختی مغز، پیشگیری از زوال حافظه در سالمندی و پیشگیری از آلزایمر از دیگر خواص بلوبری است (Krikorian *et al.*, 2010; Xianjun *and Na,* 2010).
- مصرف بلوبری برای کاهش وزن و لاغری مفید بوده و همچنین برای از بین بردن چربی‌های دور شکم مفید است.
- در میان تمامی ترکیبات مفیدی که در بلوبری یافت می‌شود، گالیک اسید بسیار برجسته و با اهمیت است. دلایل زیادی برای این موضوع وجود دارد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد گالیک اسید یک عامل ضد قارچی و ضد ویروسی قدرتمند است و می‌تواند به‌عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل کند. این موضوع باعث می‌شود مواد غذایی سرشار از گالیک اسید یک داروی طبیعی قدرتمند برای بدن باشد. مطالعات بالینی نشان داده است که بر خلاف

استراتژی های تابش و شیمی درمانی، غذاهای غنی از گالیک اسید همچون بلوبری می‌تواند سرطان را بدون آسیب وارد کردن به سلول‌های سالم از بین ببرد (Yi *et al*., 2005; Paredes-López *et al*., 2010).

- بلوبری همچنین منبع غنی ویتامین ث می‌باشد (Matzner, 1967).
- بلوبری دارای خواص مهارکننده باکتری بوده که به جلوگیری از چسبیدن باکتری به دیوار مثانه کمک می‌کند که این امر به نوبه خود به دفع عفونت‌های دستگاه ادراری کمک می‌کند.
- مصرف میوه بلوبری برای مبتلایان به دیابت مفید بوده، به کنترل سطح قند خون کمک می‌کند و موجب کاهش خطر بیماری‌های قلبی- عروقی در مردان و زنان چاق مبتلا به سندروم متابولیکی می‌شود (Basu *et al*., 2010).
- در برخی از کشورها، زنان از دمنوش بلوبری برای کاهش درد زایمان استفاده می‌کنند.
- بلوبری سرشار از ترکیباتی به نام آنتوساینوساید است که به کاهش کم بینایی و خستگی چشم کمک کرده و باعث سلامت شبکیه چشم می‌شود. در حقیقت مصرف بلوبری برای تقویت بینایی، پیش‌گیری از آب مروارید و سایر بیماری‌های چشم مفید است.
- بلوبری نه تنها سرشار از آنتی‌اکسیدان است بلکه غنی از پروآنتوسیانیدین‌هایی است که خاصیت ضدپیری دارند (Krikorian *et al*., 2010).
- ازآنجایی‌که بلوبری منبع طبیعی از فیبرهای محلول و نامحلول است، یکی از خواص بلوبری کمک به تنظیم سیستم گوارشی بدن است. مصرف این میوه، رشد باکتری‌های خوب در روده را تسریع کرده و به سیستم گوارش کمک می‌کند (Paredes-López *et al*., 2010).
- بلوبری دارای مواد مغذی از جمله ویتامین‌های آ، ب کمپلکس، ث، ای و همچنین عناصر معدنی سلنیوم، روی، پتاسیم، مس و غیره می‌باشد.
- میوه‌های بلوبری همچنین می‌توانند موجب کاهش کلسترول بدن شوند (Liang *et al*., 2013).

مهم‌ترین مواد غذایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه بلوبری در جدول ۱-۲ آمده است (Basu *et al.*, 2010).

جدول ۱-۱: ترکیبات غذایی و فعالیت آنتی اکسیدانی میوه بلوبری

مواد غذایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی	واحد در ۵۰ گرم
انرژی (کیلو کالری)	۱۷۴
پروتئین (گرم)	۱/۷
کربوهیدرات‌ها (گرم)	۴۲/۳
قندهای کل (گرم)	۳۰
فیبرهای رژیمی (گرم)	۹/۳
ویتامین ث (میلی‌گرم)	۸۶
کلسیم (میلی‌گرم)	۱۵
آهن (میلی‌گرم)	۰/۵
پتاسیم (میلی‌گرم)	۲۰۴
سدیم (میلی‌گرم)	۸
مولفه‌های فنولیکی (میلی‌گرم)	۱۶۲۴
آنتوسیانین (میلی‌گرم)	۷۴۲
پتانسیل جذب رادیکال اکسیژن (میلی‌مول TE)	۱۷/۸

۱-۲-۲-۲ تکثیر بلوبری و شرایط خاک آن

به‌طور سنتی، از قلمه‌های چوب نرم یا چوب نیمه سخت یا سخت برای تکثیر بلوبری استفاده می شده است، اگرچه موثرترین و مطمئن‌ترین روش برای ازدیاد بلوبری ریزازدیادی می‌باشد (Morrison *et al.*, 2000). مشکل اصلی در ریزازدیادی گیاه بلوبری، تشکیل کالوس‌های نابجا در محل یقه گیاه و وقوع شاخه‌های نابجای ناخواسته است (Litwiñczuk and Szczerba, 1998).

کشت بلوبری می‌تواند از بخش‌های راسی یا گره ساقه آغاز شود. ریز نمونه‌های تهیه شده از گیاهان جوان نسبت به گیاهان مسن مناسب‌تر می‌باشند (Lyrene, 1980). قلمه‌های چوبی سخت، از بلوبری‌های بالغ زمستان گرفته می‌شوند و استریل سطحی شده و در دمای پایین نگه‌داری می‌شوند. شکستن خواب جوانه‌ها روی قلمه به‌وسیله قرار دادن آن‌ها در آب با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با

دوره نوری ۱۶ ساعته به مدت ۱۵ روز صورت می‌گیرد (Gonzalez *et al*., 2000). سپس شاخه‌های جانبی به‌عنوان منابع کشت بافت استفاده می‌شوند. در بهار از پایه‌های مادری قلمه‌های چوبی نرم گرفته می‌شوند (Gonzalez *et al*., 2000). قطعات ریزوم (Barker and Collins, 1963) و سایر اندام های نهال نیز به‌منظور ریزازدیادی بلوبری استفاده می‌شوند (Debnath, 2006).

تحقیقات مختلف نشان داده است که بلوبری شرایط خاکی خاصی را نیاز دارد و پیدا کردن جایی که خاک به‌طور طبیعی دارای این خواص باشد همیشه امکان‌پذیر نیست (Smolarz, 2009; Xie and Wu, 2009). تعدیل خواص خاک و آماده‌سازی رویشگاه فعالیت‌هایی هستند که قبل از کاشت بلوبری باید صورت گیرد (Apse and Karklins, 2013). این گیاه به خاکی نسبتا سبک با زهکشی خوب نیاز دارد و به‌همین دلیل گاهی آنان را به شکل جوی و پشته و بر روی بلندی پشته‌ها می‌کارند تا آب اضافی در اطراف ریشه‌های این گیاه باقی نماند و همچنین به خاکی اسیدی نیاز داشته و خاک‌هایی با اسیدیته ۴/۵ تا ۵ برای این گیاهان مناسب بوده و این یکی از موارد محدود کننده پرورش آنان خواهد بود، زیرا در مناطقی باید آن‌ها را کاشت که خاک چنین خصوصیتی را دارا باشد. درواقع، اسیدیته خاک یک عامل بسیار مهم برای رشد و توسعه گیاه بلوبری عنوان شده است، به‌طوری‌که در pH بیشتر از ۶ رشد بلوبری کاهش یافته و برگ‌ها کلروزه می‌شوند (Xie and Wu, 2009). برای سبک بودن و اسیدی بودن خاک در کاشت گلدانی می‌توان از مخلوط پیت موس و شن استفاده نمود و اگر قرار است در خاک باغ و باغچه کاشته شوند اضافه کردن ۴۰۰ تا ۶۵۰ گرم پیت موس به هر گودال کاشت را باید انجام داد. اضافه کردن پیت به خاک گیاه بلوبری باعث افزایش محتوای مواد آلی، کاهش pH، بهبود تخلخل خاک و افزایش ظرفیت نگه‌داری آب و مواد غذایی می‌شود (Xie and Wu, 2009). استفاده از پیت موس اسفگنوم به‌عنوان یک اصلاح کننده خواص خاک، موجب کاهش موثر واکنش‌های خاک در ناحیه ریشه شده و به‌علاوه، یک شرایط زیستی بهینه را برای گیاه بلوبری تضمین می‌کند (Apse and Karklins, 2013).

اگر اسیدیته خاک برای گیاهی همانند بلوبری زیاد باشد و باید آنرا کم کرد و می‌توان برای این کار از ماده‌ای همانند گوگرد استفاده و برای هر ۱۰-۹ متر مربع در خاک‌های شنی (خاک با بافت سبک) در حدود ۳۴۰ گرم گوگرد استفاده گردد تا اسیدیته یک واحد کاهش یافته و اگر روند کاهش اسیدیته کند شود و حداقل درحدود ۶ ماه قبل از کاشت گیاهان بلوبری باید نسبت به کاربرد گوگرد اقدام شود. وجود مواد ارگانیک همانند خاک برگ نیز برای این گیاهان لازم بوده و با وجود این مواد رشد بهتری صورت می‌گیرد. بهتر است که از خاک برگ‌هایی استفاده نمود که اسیدی می‌باشند، از جمله این خاک برگ‌ها می‌توان به نمونه‌های به‌دست آمده از برگ درختان بلوط و برگ و یا پوسته چوب درختان کاج اشاره نمود.

۱-۲-۳ کشت بافت

تقریبا دو سوم داروهای ضد سرطان و ضد عفونی موجود در بازار از گیاهان به‌دست می‌آیند (Kolewe *et al*., 2008). با توجه به تقاضای بی‌وقفه بازار برای محصولات مشتق شده از گیاهان، نگرانی‌های زیست محیطی نسبت به کاهش جمعیت گیاهان، تنوع ژنتیکی، تخریب زیستگاه و حتی انقراض گونه-های گیاهی افزایش یافته است (Roberto and Francesca, 2011). به‌علاوه، افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را در دهه‌های اخیر به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط‌زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند (شاه پیری و همکاران، ۱۳۸۳). یکی از این روش‌های مدرن، استفاده از فناوری کشت سلول و بافت-های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود. علاوه‌بر این، کشت‌بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا درحال انقراض طبیعت به‌عنوان منابع با ارزش ژرم‌پلاسم محسوب شود. همچنین فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی طی سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه

یافته که هم اکنون در سطح گسترده برای انتقال ژن‌های مطلوب به‌ویژه ژن‌های ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست، درحالی‌که فناوری جدید کشت سلول و بافت گیاهی، این راه را به‌خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد (Newcomb and Wetherell, 1970).

به کشت سلول‌ها، بافت‌ها، اندام‌های استریل گیاه، تحت شرایط مطلوب فیزیکی و شیمیایی آزمایشگاه "کشت بافت گیاهی" اطلاق می‌شود (سید طباطبایی، ۱۳۹۰). به‌عبارتی کشت بافت شامل رشد مواد گیاهی عاری از میکروب در یک محیط گندزدایی شده مانند محیط کشت غذایی ضد عفونی شده در یک لوله آزمایش می‌باشد. این سیستم تولید کنترل شده موجب افزایش یکنواخی و استاندارد سازی عصاره‌ها شده و همچنین باعث حفظ مشخصه‌های ژنتیکی کلون‌های دارای توان تولیدی بالا می‌شود (Chaturvedi *et al*., 2007). در سال‌های اخیر روش‌های کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قدرتمند برای تکثیر و به نژادی بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است (سید طباطبایی، ۱۳۹۰). کشت بافت بر مبنای سه توانایی اصلی (قدرت باز زایی، عدم تمایز و شایستگی گیاه) استوار شده است. به‌طورکلی در شرایط کشت درون شیشه‌ای این امکان وجود دارد که عملیات تکثیر را در تمام طول سال و به‌طور دائم انجام داد (Hartmann and Kester, 1990). کشت بافت و سلول گیاهی نقش کلیدی در دومین انقلاب سبز را دارد که در آن تغییر ژن و بیوتکنولوژی در جهت اصلاح و بهبود کیفیت محصولات زراعی بکار می‌رود. عمده‌ترین موارد استفاده از فن‌آوری کشت بافت‌های گیاهی در کشاورزی شامل: بهینه سازی و کنترل شرایط تولید، ایجاد گیاه دورگه، ازدیاد غیر جنسی گیاهان به روش رویشی، انتخاب بهترین کلونی به‌وسیله مهندسی ژنتیک، تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا، ایجاد بانک ژن از گیاهان دارویی، کنترل محصول نهایی، تولید ترکیبات خالص، تولید ترکیبات شیمیایی جدید و تولید گیاهان غیر وابسته به شرایط اقلیمی و جغرافیایی می‌باشد (Chattopadhyay *et al*., 2002). در حال حاضر با استفاده از کشت تعلیقی، امکان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که از

نظر صنعتی مورد توجه می‌باشند، مثل آنتی بیوتیک‌ها، ترکیب‌های آلکالوییدی ضد سرطان، ویتامین-ها، آنزیم‌ها، ادویه‌جات و حشره‌کش‌ها نیز میسر گردیده است (Fang *et al*., 1999). روش‌های کشت بافت یا ریزازدیادی برای تکثیر غیر جنسی، بهبود ژرم‌پلاسم و دخیره ژنی سه رقم تجاری از گونه‌های جنس *Vaccinium* از جمله بلوبری‌ها، کران‌بری‌ها[1] و لینگونبری‌ها[2] بسیار مهم است (Debnath, 2006).

به طور کلی، عمومی‌ترین دلایل کاربرد روش‌های درون شیشه‌ای برای تولید گیاه عبارتند از:

۱- تکثیر کلنی یا ازدیاد سریع و در حجم وسیع گیاهان یکسان ژنتیکی حاصل از یک گیاه پایه برتر.

۲- حذف عوامل بیماری. این امر انتقال مواد گیاهی از مرزهای بین المللی را تسهیل می‌نماید.

۳- ایجاد گیاهان عاری از بیماری با کشت درون شیشه‌ای.

۴- ذخیره ژرم‌پلاسم و نگهداری دراز مدت گیاهان پایه.

۵- انتخاب جهش یافته‌ها از جهش‌های خود به خودی یا القائی.

۶- تولید ریز قلمه‌های ریشه‌دار در گونه‌های زینتی چوبی سخت ریشه‌زا.

۷- باز تولید هیبریدها از گونه‌های ناسازگار از طریق کشت جنین یا تخمک.

۸- تولید گیاهان هاپلوئید، از طریق کشت بساک.

ولی درقرن حاضر مهم‌ترین کاربرد آن اصلاح گیاهان زراعی با استفاده از فن‌آوری انتقال ژن بوده است (سید طباطبایی، ۱۳۹۰).

تکثیر رویشی در کشت بافت از سه طریق انجام می‌گیرد:

۱- کشت جوانه انتهایی و جانبی که به میزان زیادی ریخته ارثی گیاه حفظ می‌شود.

۲- تولید جوانه‌های نابجا به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم.

---

[1]: Cranberries
[2]: Lingonberries

۳- جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم یا غیرمستقیم که پتانسیل تولید بیشترین تعداد گیاه را دارد ولی در تعداد کمی از گونه‌های گیاهی قابل اجرا است.

اگر چه کشت‌بافت گیاهی اصولا روشی برای کلون کردن ژنوتیپ‌های خاص می‌باشد و همیشه این فرض مورد قبول بوده است که گیاهان حاصل از کشت‌بافت، شبیه والدین می‌باشند، ولی گاهی تنوعات فنوتیپی در بین گیاهان باززاشده مشاهده می‌شود که به این تنوعات ایجاد شده، تنوعات سوماکلونال گفته می‌شود (Choi *et al*., 2000). تنوع سوماکلونال، در اصل تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به‌دنبال دارد. این تنوع در گیاهان به‌طور عمده در سیستم‌های باززایی که در آن گیاه مرحله کالوس را طی می‌کند، دیده می‌شود (شاه پیری و همکاران، ۱۳۸۳).

۱-۲-۴ محیط کشت

ترکیب محیط کشت نقش مهمی در موفقیت ریزازدیادی دارد. مطالعات نشان داده که استفاده از ترکیب مواد معدنی و آلی در نسبت مشابه با ترکیب معدنی و آلی دانه می‌تواند برای کشت بافت و ریزازدیادی در بیشتر گیاهان مطلوب باشد. اگر چه تاکنون بیش از ۵۰ فرمول برای محیط کشت ارائه شده است، ولی عموما از محیط کشت MS[1] برای اکثر گونه‌ها استفاده می‌شود و با اعمال تغییرات لازم و جزیی در این محیط کشت توانسته‌اند آن را برای دستیابی به اهداف ریزازدیادی سایر گیاهان به کار ببرند. از طرف دیگر، از آنجا که Wolfe و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که بین هفت محیط کشت آزمایش شده برای کشت‌بافت بلوبری، محیط کشت WPM[2] بهترین رشد شاخه را داشت، ازاین‌رو محققان در بیشتر آزمایش‌ها از محیط کشت WPM به‌عنوان یک محیط کشت پایه برای ریزازدیادی بلوبری استفاده کرده‌اند (Chandler and Draper, 1986; Wolfe *et al*., 1986; Reed and Abdelnour-Esquivel, 1991). Ruzic و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که محیط کشت mAN

---
[1]: Murashige and Skoog
[2]: Woody plant medium

برای ریزازدیادی ارقام بلوبری نسبت به محیط MS مناسب‌تر هستند. نرخ رشد و شاخه‌زایی بلوبری روی محیط کشت MS پایین بود. Debnath (۲۰۰۹) نیز اثبات کرد که محیط‌هایی با غلظت یونی کمتر برای کشت بلوبری مناسب‌ترند. محیط کشت‌هایی که بیشتر برای بلوبری استفاده شده‌اند شامل محیط کشت AN [1] (Ostrolucka *et al*., 2002; Gajdosova *et al*., 2006; Ostrolucka *et al*., 2007) و WPM (Gonzalez *et al*., 2000; Zhang *et al*., 2006) می‌باشند. محیط کشت WPM محیطی است که فاقد نیترات پتاسیم است و میزان آمونیم آن کم‌تر از محیط کشت MS می‌باشد و در کل میزان نمک‌های ماکرو آن کم‌تر است و بیش‌تر به‌همین دلیل در کشت بافت گیاهان چوبی از آن استفاده می‌کنند و می‌تواند یکی از عوامل تحریک ریشه‌زایی باشد. محیط کشت MS نسبت به WPM تقریبا چهار برابر نیتروژن بیشتری دارد و در کشت بافت گیاهی به‌طور گسترده استفاده شده است، اما در زمینه ریزازدیادی بلوبری این محیط کشت نسبت به WPM کارایی کمتری داشته است (Wolfe *et al*., 1983).

۱-۲-۵ تنظیم کننده‌های رشد

سلول گیاهی علاوه بر آب و مواد معدنی جذب شده از خاک و کربوهیدرات‌های تولید شده در فتوسنتز، برای رشد مطلوب به مواد شیمیایی معین دیگری نیاز دارد. ازجمله این مواد، ترکیبات آلی به نام هورمون است. هورمون‌ها فقط به مقدار بسیار جزئی مورد نیازاند و در اغلب موارد توسط خود گیاه به قدر کافی ساخته می‌شوند. هورمون ماده‌ای است که در یک بخش از موجود زنده به مقادیر کم تولید می‌شود و پس از انتقال به بخش دیگر آثار خاصی بر جای می‌گذارد. فاصله‌ای که هورمون انتقال می‌یابد ممکن است زیاد باشد، مثلا از یک برگ به یک جوانه، یا کمتر مثلا از مریستم انتهائی به سلول‌های زیر آن و یا حتی ناچیزتر باشد، مثلا از یک اندامک به اندامک دیگری در درون سلول. چند

[1]: Anderson (1980) culture medium

گروه عمده هورمون‌های تنظیم کننده رشد در گیاهان وجود دارد که عبارتند از: اکسین، جیبرلین، سیتوکینین، اسید آبسیزیک و اتیلن.

هورمون‌ها و مواد مصنوعی مترادف آن‌ها در کشاورزی به‌عنوان مواد کنترل کننده گل‌دهی، میوه‌دهی، رسیدن میوه، خواب و ریزش در گیاهان و به‌عنوان مواد رونق بخش توسعه ریشه و علف کش‌های انتخابی موارد مصرف زیادی دارند.

در باززایی گیاه از طریق کشت بافت، تغییر غلظت هر یک از اجزای محیط کشت یا افزودن تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر روی پاسخ (اندام‌زایی، بافت‌زایی و ...) قطعه‌های جداکشت مطالعه شده کاملا تأثیرگذار است و ممکن است کمیّت ترکیبات شیمیایی بافت‌های نوپدید را نیز تغییر دهد. دقت در انتخاب نوع تنظیم کننده‌های رشد و غلظت آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد، زیرا غلظت کلی هورمون-ها تعیین کننده نوع اندام‌های نوپدید حاصل از کشت بافت است. بنابراین، لازم است هورمون‌های به کار برده شده در محیط‌های کشت در گستره‌ای از غلظت‌ها به‌تنهایی و یا به‌صورت همراه استفاده شوند (صبورا و شکری، ۱۳۹۲).

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی که در غلظت بسیار کم در گیاه تولید می‌شوند، یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در تنظیم تقسیم، رشد و تمایزیابی سلول گیاهی هستند. اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها به‌تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر، پرکاربردترین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در کشت سلول، بافت و اندام گیاهی بوده و نقش بسیار مهمی در استقرار و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌ها دارند (Machakova *et al*., 2008). به‌طورکلی، اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها برای افزایش نرخ شاخه‌زایی و باز زایی و ریشه‌زایی در کشت بافت گیاهی ضروری هستند (Jiang *et al*., 2009; Cuce *et al*., 2013). اکسین‌ها (ازجمله اسید ایندول استیک، ایندول بوتریک اسید، نفتالین استیک اسید) و سیتوکینین‌ها (ازجمله زئاتین، ۲-ایزوپنتیل آدنین، کینیتین، بنزیل آمینو پورین) نقش اساسی را در مراحل مختلف بر عهده دارند و از ترکیبات مختلف این دو هورمون برای اعمال تغییرات مورد نظر در محیط کشت استفاده می‌گردد (Bajaj *et al*., 1998). بارزترین ویژگی اکسین اثری است که بر روی رشد طولی سلول‌های ساقه دارد.

از آثار بسیار مهم دیگر اکسین‌ها نقش آن‌ها در تقسیم سلول، تولید ریشه، ایجاد لایه سواگر (لایه‌ایی که باعث جدایی دمبرگ و دمگل میوه از محل اتصال می‌شود)، گل انگیزی، تولید و رشد و رسیدن میوه و سرانجام ایجاد چیرگی جوانه انتهایی می‌باشد. عامل مهمی که در تأثیر اکسین‌ها موثر است غلظت این مواد در بافت گیاهی است. به‌طورکلی حساسیت بافت‌های مختلف گیاهی نسبت به غلظت اکسین‌ها با یکدیگر متفاوت است، برای مثال بافت‌های ساقه، نسبت به اکسین، بیشتر از بقیه بافت‌ها تحمل دارند، درحالی‌که بافت‌های ریشه از همه حساس‌ترند. تولید سیتوکینین در نقاطی از گیاه انجام می‌شود که تقسیم سلولی به‌طور فعال در حال انجام است. این نقاط شامل جوانه‌ها، برگ‌های جوان و میوه‌های در حال رشد است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که سیتوکینین‌ها درون ریشه‌ها و به احتمال زیاد در نوک ریشه‌ها ساخته می‌شوند و از طریق آوندهای چوبی به سایر نقاط گیاه انتقال می‌یابند و فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن‌ها را کنترل می‌کنند. مهم‌ترین اثر آن کنترل تقسیم سلولی است، این عمل از طریق تحریک تولید اسیدهای هسته‌ای انجام می‌گیرد. سیتوکینین‌ها به‌خاطر تاثیری که در ساخته شدن اسیدهای هسته‌ای و پروتئین‌ها دارند قادرند پیری را در برگ‌ها و سایر اندام‌های گیاه به تاخیر بیاندازند. در برخی از گیاهان سیتوکینین‌ها بر روی جوانه زدن بذرها تأثیر می‌گذارند. از آثار مهم دیگر سیتوکینین‌ها تحرک بخشی مواد غذایی و جلب این مواد به عضوی مثل میوه‌ها، برگ‌ها و غده‌های جوانی است که یا خودشان سازنده سیتوکینین هستند و یا مصنوعا به سیتوکینین‌های خارجی آغشته شده‌اند. زئاتین و بنزیل آدنین مهم‌ترین سیتوکینین‌های مورد استفاده برای تکثیر تجاری گیاهان می‌باشد (Cappelletti and Mezzetti, 2017).

ترکیبات و تنظیم کننده‌های رشد برای محیط کشت بهینه بر اساس ژنوتیپ در گیاه بلوبری متغیر است. بسیاری از گیاهان تجاری با کشت در محیط کشت دارای اکسین و سیتوکینین تکثیر می‌شوند (Preil, 2003; Rout and Jain, 2004). اگرچه وجود سیتوکینین اغلب همیشه لازم بوده، اما میزان مطلوب شاخساره‌زایی با ترکیب اکسین و سیتوکینین صورت می‌گیرد (George, 1993). اکسین به‌عنوان القا کننده ریشه‌زایی و استفاده اکسین‌هایی ازجمله IBA باعث افزایش بیوسنتز ایندول استیک

اسید می‌شود (Dixon and Gonzales, 1993). IBA از جمله تنظیم کننده‌های محرک رشد و تکثیر شاخه با قدرت ماندگاری بالا بوده و در غلظت‌های نسبتا بالای این هورمون، رشد شاخه‌های جانبی گیاهان به‌دست می‌آید که به‌دلیل ذخیره شدن این هورمون در جوانه‌های جانبی گیاه است (Everse, 1988). در همین زمینه، Bonga و Aderkas (۱۹۹۲) نتیجه گرفتند که تیمار سیتوکینین به‌همراه غلظت‌های پایین اکسین بر ایجاد شاخه‌های نابجا به‌خصوص در آغاز شاخه‌زایی موثر بوده است. اضافه کردن سیتوکینین‌ها به محیط کشت یکی از عوامل مهم در توسعه و گسترش جوانه‌های جانبی در کل بازدانگان می‌باشد (Kunz *et al*., 1993).

Zimmerman و Broome (۱۹۸۰) در تحقیقی مشاهده کردند که شرایط اپتیمم برای ریزازدیادی شاخه‌های جانبی بلوبری ترکیب ۸/۲۲ میکرومول هورمون IAA به اضافه ۸/۷۳ میکرومول هورمون 2iP[1] است. در آزمایشی دیگر، وقتی‌که غلظت هورمون 2iP از صفر تا ۱۴۷/۶ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، ارقام بلوبری Lowbush شاخه‌های بیشتری را تولید کردند. از طرف دیگر، سه رقم بلوبری Highbush در غلظت ۱۴۷/۶ میلی‌گرم بر لیتر 2iP نسبت به غلظت‌های پایین‌تر شاخه‌های کمتری را تولید کردند (Chandler and Draper, 1986). برخی محققین برای شروع رشد جدید اندام‌های گیاهی هورمون 2iP را در شرایط دمای پایین ۴ درجه سانتی‌گراد و در اتاق تاریک استفاده می‌کنند (Orlikowska, 1986). بااین‌وجود، در غلظت‌های بالای هورمون 2iP، تولید فیتوتوکسین اتفاق می‌افتد که باعث قهوه‌ای شدن گیاه و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود. استفاده از ترکیب هورمونی 2iP و زئاتین نسبت به 2iP مواد سمی کمتری داشته و نرخ شاخه‌زایی اولیه بیشتری دارد. زئاتین برای شروع شاخه‌زایی و تکثیر شاخه‌های گونه‌های مختلف جنس *Vaccinium* موثر است (Eccher and Noè, 1989; Gonzalez et al., 2000; Debnath, 2004).

[1]: 2-isopentenyl adenine

دی‌ک‌گولاک[1] یک تنظیم کننده رشد گیاهی است که بر رشد گیاه، تعادل هورمون‌های درونی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد. یکپارچگی غشا به‌شدت تحت تأثیر کاربرد دی ک‌گولاک است (Choudhury and Gupta, 1999). دی‌ک‌گولاک موجب کاهش توسعه راسی و تحریک توسعه جانبی شاخه‌ها و همچنین القای جوانه‌های گلدهی در برخی گیاهان می‌شود (Gyres and Mira, 2008).

محیط باز زایی[2] که قابلیت آن باز زایی کارامد شاخساره از ریزنمونه‌های برگ است، کلید دگرگونی موفقیت آمیز بلوبری می‌باشد. محیط باز زایی بهینه برای باز زایی بلوبری وابسته به ژنوتیپ است. جدول ۱-۳ محیط باز زایی را برای ارقام مختلف بلوبری که در مطالعات گذشته بررسی شده است را نشان می‌دهد (Song, 2015).

جدول ۱-۲: محیط باز زایی برای ارقام مختلف بلوبری

ارقام	محیط باز زایی	
Aurora, Brigitta, Elliott, Legacy, Duke, Bluecrop	محیط پایه:	10 mL 100× MWPM salts, 1 mL 1,000× MS vitamins, 20 g/L sucrose, 6 g/L Bacto™ agar, pH 5.2 (herein MWPM, Lloyd and McCown, 1980)
	تنظیم کننده رشد:	1 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA
Bluecrop, Elliott, Legacy	محیط پایه:	MWPM
	تنظیم کننده رشد:	5.0 mg/L 2ip and 2.0 mg/L zeatin
Brigitta, Aurora, Duke, Legacy	محیط پایه:	MWPM
	تنظیم کننده رشد:	4.0 mg/L and 0.5 mg/L NAA
Duke	محیط پایه:	MWPM
	تنظیم کننده رشد:	0.22 mg/L TDZ
Jewel, Jubilee, Aurora, Legacy	محیط پایه:	2.3 g/L WPM salts, 1 mL 1,000× MS vitamins, 556 mg/L $Ca(NO_3)\ 2\cdot 4H_2O$, 20 g/L sucrose, 6 g/L Bacto™ agar, pH 5.2 (herein WPMC, Reed Abdelnour-Esquivel, 1991)
	تنظیم کننده رشد:	1 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA
Biloxi, Emerald	محیط پایه:	WPMC
	تنظیم کننده رشد:	4 mg/L zeatin riboside

[1]: Dikegulac
[2]: Regeneration medium

۱-۲-۶ روش بهینه‌سازی محیط کشت

کاربرد آمار بسیار گسترده است و یکی از آن‌ها طراحی آزمایش است. با استفاده از طراحی آزمایشات، حداکثر اطلاعات با کمترین تعداد تجزیه و تحلیل به‌دست می‌آید (Jacquez, 1998). در واقع، طراحی آزمایشات ابزاری برای جمع‌آوری داده‌های آزمایش است.

در بیشتر روش‌های طراحی آزمایش چندین مرحله رایج وجود دارد. نخستین مرحله تعریف مسئله است. دومین مرحله لیست عواملی است که ممکن است فرایند کار را تحت تأثیر قرار دهند. گام سوم آزمایش‌های هدایت شده برای مطالعه فاکتورها در ترکیبات مختلف است. گام چهارم انتخاب ترکیبی است که بهترین بازدهی را دارد.

طرح غربال‌گری یک طرح آزمایشی است که با استفاده از آن تعداد زیادی فاکتور احتمالی تاثیرگذار روی پاسخ مورد نظر، به‌منظور شناسایی مهم‌ترین آن‌ها آزمایش می‌شود. در واقع تعداد فاکتورها را برای بررسی در آزمایش بعدی کاهش می‌دهد. به بیان دیگر، غربال‌گری به‌منظور حذف عوامل بی-اهمیت قبل از بررسی آزمایش است. طرح غربال‌گری دارای ویژگی‌های ارزشمندی ازجمله: کمک به بهبود فرآیند کنترل کیفی به‌وسیله تعیین بالاترین و پایین‌ترین محدودیت کنترل یک متغیر مشخص می‌باشد. تصحیح فرآیند به‌وسیله شناسایی فاکتورهای تاثیرگذار با یک روش کم‌هزینه (Murphy, 2003). از دیگر ویژگی‌های ارزشمند آن تولید اطلاعات حداکثر با به حداقل رساندن تعداد آزمایش‌ها است. ویژگی دیگر آن کیفیت تولید است که می‌تواند از طریق یک رویکرد ساختاری بهبود یابد که ایده‌ها و اطلاعات را در یک فرمت قابل فهم حفظ می‌کند (Trocine and Malone, 2000).

استراتژی در همه آزمایش‌های غربال‌گری شامل موارد زیر است:

۱- شناسایی عوامل مورد نیاز برای اجرای طرح غربال‌گری

۲- تعیین عملی بودن تعداد اجراها

۳- همه متغیرها مورد توجه قرار گیرند.

یک روش مطلوب برای طرح غربال‌گری، طرح پلاکت-برمن است که توسط Plackett و Burman در سال ۱۹۴۶ طراحی و ارائه شد. در تحقیق حاضر نیز به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت از روش آماری پلاکت- برمن استفاده شد. این طرح، از روش‌های معروف غربال‌سازی است که روشی کارا برای غربال-گری تعداد زیادی از متغیرها است و مهم‌ترین آن‌ها را شناسایی می‌کند. این طرح در پژوهش‌های زیست‌فناوری، کاربردهای متعددی دارد. طراحی پلاکت - برمن برای بررسی اثر متغیرهای فرآیندهای تخمیری و بهینه‌سازی محیط‌های کشت و نیازهای تغذیه‌ای مخصوصاً درزمینه تحقیقات بیوتکنولوژی به‌وفور استفاده می‌شود (Chauhan *et al*., 2007).

این طرح برای بهبود فرایند کنترل کیفیت طراحی شده که می‌تواند برای مطالعه آثار پارامترهای طرح روی وضعیت سیستم استفاده شود، به‌طوری‌که بتوان تصمیمات هوشمندانه‌ای گرفت. این طرح آزمایش برای شناسایی مهم‌ترین فاکتور در مرحله اولیه آزمایش وقتی‌که دانش کاملی درباره سیستم در دسترس نیست، استفاده می‌شود. یک ویژگی طرح پلاکت-برمن این است که به آزمایش کننده اجازه می‌دهد با اجرای یک طرح اولیه آثار اصلی و آثار متقابل را جداسازی کند (Yannis, 2001).

مراحل مختلف طرح غربال‌گری شامل موارد زیر است:

- انتخاب فاکتور
- تعریف سطوح برای فاکتورها
- انتخاب پاسخ‌ها برای اندازه‌گیری
- تولید یک ماتریس طرح از طرح پلاکت-برمن
- آزمون تصادفی و اجرای آزمایش‌ها در یک فاز آزمایشی
- تکرار طراحی
- توسعه یک مدل
- آنالیز آماری آثار
- تفسیر و نتیجه‌گیری تحلیل آماری

- توصیه‌های احتمالی برای بهبود
- ساخت محصولات مورد تأیید

۱-۲-۶-۱ انتخاب فاکتور، سطح فاکتور و پاسخ

اولین گام در یک طرح غربال‌گری انتخاب فاکتور، تعریف سطح و پاسخ‌هایی است که باید اندازه‌گیری شوند. انتخاب فاکتور بر اساس تجربه محقق است که یک یا چند پاسخ را انتخاب می‌کند. دانش مناسب ویژگی‌های فیزیکی فاکتورها و درک کامل طرح آزمایش اطلاعات به‌دست آمده از آزمایش را افزایش می‌دهد. سطح فاکتور باید در ترکیب با همدیگر قابل دستیابی باشد و قابلیت تنظیم و تجدیدنظر بین طرح‌های مختلف آزمایش را داشته باشد. اگر دامنه فاکتور خیلی کوچک باشد، تغییرات پاسخ خیلی کوچک است و تأثیر خطای آزمایش روی پاسخ بیشتر است، از طرف دیگر اگر دامنه خیلی بزرگ باشد، مدل درجه اول استفاده شده برای تفسیر نتایج طرح آزمایش معتبر نخواهد بود؛ بنابراین، در یک طرح غربال‌گری پلاکت-برمن دامنه بین سطح بالا و پایین هر فاکتور در مقایسه با دامنه‌های استفاده شده در طول مرحله بهینه‌سازی معمولاً کوچک است.

در هر آزمایش، تعداد پاسخ‌ها می‌تواند بسته به نیاز آزمایش کننده و سطح تحقیق تعیین شود.

۱-۲-۶-۲ ماتریس طرح

بعد از انتخاب فاکتورها و سطوح آن، یک ماتریس طرح تولید می‌شود. یک مثال از طرح پلاکت برمن با ۱۲ اجرا و ۱۱ فاکتور در جدول ۱ نشان داده شده است. عناصر ستون‌ها با استفاده از سطوح مصرف (۱+) و عدم مصرف (۱-) برای فاکتورها تنظیم می‌شوند. سطرها در ماتریس شامل دفعات آزمایش است. هر متغیری که روی متغیر دیگر تأثیر دارد استفاده می‌شود. پیش‌بینی تغییرات در حضور متغیرهای بیشتر دقیق‌تر است. با استفاده از ماتریس یک فرمول ریاضی به‌دست می‌آید که آثار تغییر در متغیر را روی مدل کلی نشان می‌دهد.

جدول ۱-۳: طرح پلاکت برمن با ۱۲ اجرا و ۱۱ فاکتور

آزمایش	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
۱	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
۲	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
۳	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
۴	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
۵	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
۶	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
۷	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
۸	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
۹	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
۱۰	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
۱۱	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
۱۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

۱-۲-۶-۳ آزمون تصادفی و تکرار

طرح آزمایش یا یک طرح غربال‌گری به‌طور معمول در یک دنباله تصادفی انجام می‌گیرد. به دلایل عملی آزمایش‌ها به‌وسیله یک یا چند فاکتور دسته‌بندی می‌شوند. آزمون تصادفی سازی اجرای قسمت‌های آزمون به‌صورت تصادفی است. این امر متضاد اجرای آزمون به‌صورت سیستماتیک است. اجرای آزمون به‌صورت تصادفی از به‌هم‌ریختگی آثار که می‌تواند در شرایط استاندارد اتفاق بیفتد، جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر، تکرار به معنی اجرای یک یا چند بخش آزمون تحت شرایط یکسان است. معمولاً هر ترکیبی از سطوح فاکتور در طرح بیش از یک‌بار اجرا می‌شود. بررسی تکراری بخش‌های آزمون موجب افزایش اطمینان نتایج آزمون شده و ما را قادر می‌سازد خطای خالص و معنی‌داری آماری نتایج آزمون را محاسبه کنیم. تغییرپذیری اندازه‌گیری‌ها می‌تواند در هر ترکیب منحصربه‌فرد از سطوح فاکتور محاسبه شود. این تغییرپذیری نشانه‌ای از خطای تصادفی در اندازه‌گیری‌ها (به‌عنوان‌مثال عوامل کنترل نشده، عدم صحت ابزار اندازه‌گیری و ...) می‌باشد، زیرا مشاهدات تکرار شده تحت شرایط یکسان انجام می‌گیرند.

هنگامی‌که ماتریس طرح غربال‌گری پلاکت برمن به‌دست آمد، محقق اجرای آزمایش را کامل کرده و پاسخ‌ها ثبت شده‌اند، گام بعدی تجزیه‌وتحلیل نتایج است که یک بخش حیاتی در فهم سطح پاسخ تخمین زده است.

۱-۲-۶-۴ تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج

پس از انجام همه اجراها و محاسبه پاسخ‌ها، محاسبات ضرایب رگرسیون آغاز می‌شود. در طرح غربال‌گری پلاکت برمن نتایج با استفاده از مدل چندجمله‌ای درجه اول تفسیر می‌شوند:

$$y= a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \ldots\ldots\ldots + a_{11}x_{11}$$

که در این مدل y پاسخ پیش‌بینی شده، x_1-x_{11} فاکتورها، a_1-a_{11} ضرایب مربوطه و a_0 ثابت مدل است. ازآنجا طرح پلاکت برمن یک طرح اشباع شده است، تخمین‌های اثر اصلی خطای معیار را نشان نمی‌دهد و همه درجه‌های آزادی برای برآورد آثار اصلی فاکتور استفاده می‌شوند. بعد از تخمین ضرایب رگرسیون فاکتور، فاکتورهای معنی‌داری که روی متغیرهای وابسته موردنظر تأثیرگذارند، به‌وسیله تجزیه‌وتحلیل واریانس تعیین می‌شوند.

۱-۲-۶-۵ ارائه گرافیکی نتایج

- **بررسی نرمال بودن باقیمانده‌ها**

قبل از پذیرش مدل نهایی، بایستی توزیع مقادیر باقیمانده مورد بررسی قرار گیرد. باقیمانده‌ها از اختلاف مقادیر پیش‌بینی شده و مشاهده شده حاصل می‌شود.

- **نمودار پارتو آثار**

نمودار پارتو آثار ابزاری کارآمد برای برقراری ارتباط بین نتایج آزمایش است. در این نمودار، قدر مطلق برآوردهای اثر تجزیه‌وتحلیل واریانس آثار به‌صورت نزولی از مقادیر بزرگ به کوچک مرتب می‌شوند. اندازه هر اثر به‌صورت ستونی نشان داده می‌شوند و معمولاً یک خط این ستون‌ها را قطع می‌کند که نشان دهنده میزان معنی‌داری آماری هر اثر است.

- **تشخیص منابع معنی‌داری**

نمودار مفید دیگر، نمودار احتمال نرمال بودن برآوردهاست. ازآنجایی‌که تعداد درجه آزادی خطا برای طرح اشباع شده کوچک است، توانایی تجزیه‌وتحلیل واریانس به روش‌های کلاسیک بسیار پایین است. به همین دلیل ابزاری گرافیکی به نام نمودار نیمه نرمال می‌تواند در تشخیص آثار معنی‌دار احتمالی و تخمین انحراف معیار آثار استفاده شود. آثار معنی‌دار در نمودار نیمه نرمال از طریق بررسی چشمی تشخیص داده می‌شود. نمودار نیمه نرمال به‌وسیله نرم‌افزار Design Expert V. 6.0.5 به‌دست می‌آید.

- **نمودار آثار متقابل**

یک نمودار رایج برای نشان دادن میانگین‌ها نمودار آثار متقابل معیار است که میانگین‌ها به‌وسیله نقاط به‌هم‌پیوسته نشان داده می‌شود. این نمودار به‌ویژه زمانی‌که آثار متقابل معنی‌دار باشد، مفید می‌باشد.

فصل ۲

سوابق تحقیق

تکثیر درون شیشه‌ای گونه‌های جنس *Vaccinium* در ابتدا توسط Lyrene (۱۹۷۸) صورت گرفت، اگرچه پیش از آن Barker و Collins (۱۹۶۳) قطعات ریزوم بلوبری را روی محیط کشت سفید، بدون تنظیم‌کننده‌های رشد کشت دادند. پس‌ازآن تکنیک کشت بافت برای تولید شاخه‌های جانبی در گیاه Lowbush (Frett and Smagula, 1983; Brissette et al., 1990; Debnath, 2004)، Highbush (Cohen, 1980; Eccher and Noè, 1989; Noè and Eccher, 1994; Gonzalez et al., 2000) و rabbiteye (Lyrene, 1980) انجام شد.

تکثیر ساقه و ریشه‌زایی چهار رقم از جنس *Vaccinium* بر روی محیط کشت‌های MS، WPM و ترکیب MS با WPM توسط Tetsumura و همکاران (۲۰۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. در طی مرحله تکثیر، رشد شاخه‌ها روی محیط کشت WPM نسبت به سایر محیط‌ها بهتر بود. محیط کشت MW بهترین رشد ساقه را داشت. شاخه‌ها بر روی محیط کشت MS به‌خوبی رشد کردند، اما در مرحله تکثیر تمایل به هایپرهیدریسیتی[1] داشتند. بهترین میزان ریشه‌زایی شاخه‌ها روی محیط کشت MS و بدترین میزان ریشه‌زایی روی محیط کشت WPM مشاهده شد.

مؤثرترین روش ریزازدیادی ارقام مختلف گیاه بلوبری توسط Sedlak و Paprstein (۲۰۰۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. در آن تحقیق، جوانه‌های رأسی سه ژنوتیپ Spartan، Bluecrop و Berkeley انتخاب شدند و با استفاده از محلول کلراید جیوه در غلظت ۰/۱۵ درصد استریل گردیدند و با موفقیت در محیط کشت قرار گرفتند. سه محیط کشت AN، MS و WPM حاوی سیتوکینین زئاتین با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب شدند. میزان تکثیر بسته به محیط کشت و غلظت زئاتین متغیر بود. بیشترین میزان تکثیر شاخه برای ژنوتیپ Berkeley روی محیط کشت WPM با زئاتین ۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. از بین سه محیط کشت مورد آزمایش، محیط کشت WPM نسبت به دو محیط کشت دیگر، برای تکثیر شاخه‌های بلوبری کارایی بیشتری نشان داد. همچنین در محیط کشت WPM ریشه‌زایی نیز مشاهده شد.

---

[1]: Hyperhydricity

در سال ۲۰۱۰ پژوهش دیگری باهدف تأثیر دی‌ک‌گولاک روی ریزازدیادی بلوبری توسط Litwińczuk و Prokop انجام شد. در آزمایش اول آن پژوهش، ماده دی‌ک‌گولاک در غلظت ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با 2iP (۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. در آزمایش دوم، دی‌ک-گولاک ۱ تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر بدون 2iP و همراه با 2iP ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. دی‌ک-گولاک در حضور 2iP به‌تدریج موجب کاهش طول شاخه‌های جانبی شد. در محیط‌های بدون 2iP، نرخ رشد به‌تدریج کاهش یافت.

کارایی دو محیط کشت Murashige and Skoog (MS) و modified Anderson's Rhododendron (mAN) به‌منظور تکثیر شاخه‌های سه ژنوتیپ بلوبری (شامل Berkeley، Bluecrop و Goldtraube به روش ریزازدیادی) توسط Ruzic و همکاران (۲۰۱۲) مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. همه محیط کشت‌ها حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر زئاتین به‌تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بودند. ریشه‌زایی درون شیشه‌ای به‌وسیله محیط کشت mAN غنی شده با ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۴ گرم بر لیتر زغال فعال تحریک شد. همچنین نتایج به‌دست آمده نشان داد که محیط کشت mAN نسبت به MS برای تکثیر بلوبری از طریق ریزازدیادی مناسب‌تر است و غلظت پایین IBA (کمتر از ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شده به زئاتین در محیط کشت mAN به‌طور مؤثرتری تکثیر شاخه‌های بلوبری را افزایش می‌دهد و می‌تواند برای تکثیر گیاهان با کیفیت در مقیاس بزرگ پیشنهاد شود. از طرف دیگر، محیط کشت MS موجب نکروزه شدن نسبی یا کامل ساقه و برگ شد که در این وضعیت در محیط کشت MS حاوی زئاتین ترکیب شده با غلظت بالای IBA از شدت بیشتری برخوردار بود. پتانسیل ریشه‌زایی شاخه‌ها به‌طور عمده بین ژنوتیپ‌های مختلف متغیر بود. بیشترین نرخ ریشه‌زایی و سازگاری در ژنوتیپ Goldtraube بود (به‌ترتیب ۸۲/۸ و ۹۱/۸ درصد) و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ Berkeley (به‌ترتیب ۱۰ و ۶۶/۷ درصد) مشاهده شد.

تأثیر شرایط رشد و محیط کشت روی افزایش تکثیر بلوبری توسط Scalzo و همکاران (۲۰۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. آثار ترکیب پنج ژنوتیپ مختلف از جنس *Vaccinium*، دو شرایط رشد و

چهار محیط کشت بر رشد و ریزازدیادی گیاهان بررسی شدند. برای طول شاخساره و تعداد آن، فاکتور محیط کشت بیشترین واریانس را داشت. برای اندازه کالوس، عامل ژنوتیپ بیشترین واریانس را داشت. محیط کشت ½MS0.3Z سبب تحریک بیشترین طول شاخساره شد، درحالی‌که محیط کشت ½MS2Z بیشترین تعداد گره و شاخساره را تولید کرد. ژنوتیپ‌های Blue Bayou و Centra Blue بیشترین اندازه کالوس را تولید کردند. ژنوتیپ Blue Bayou در محیط کشت WPM2Z با شرایط نوری بالا بعد از گذشت ۹۰ روز بیشترین وزن تازه گیاه را نشان داد.

Cappelletti و Mezzetti (۲۰۱۶) تأثیر کاربرد زئاتین، 2iP و تیدیازورون (TDZ) را در تکثیر درون شیشه‌ای *Vaccinium corymbosum* L. مورد آزمایش قرار دادند. در این مطالعه، در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر زئاتین بیشترین تکثیر جوانه‌های جانبی بلوبری مشاهده شد، درحالی‌که در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده، کاهش میزان تکثیر مشاهده شد. تیدیازورون به‌تنهایی و یا در ترکیب با 2iP باعث تکثیر بیشتر شاخه شد و همچنین تشکیل کالوس را القا نمود. آن‌ها نتیجه گرفتند که تیادیزورون می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای زئاتین در تکثیر بلوبری باشد.

مطالعه‌ای باهدف دستیابی به روشی برای کشت درون شیشه‌ای بذر و ریز قلمه‌های *Vaccinium myrtillus* و شناسایی آثار زغال فعال روی محیط کشت MB-MA-G (بدون تنظیم‌کننده‌های رشد) به‌منظور بهینه‌سازی ریشه‌دهی و فرایند کالوس‌زایی توسط Melania و Adriana (۲۰۱۶) صورت گرفت. شروع کشت درون شیشه‌ای از بذر و ریز قلمه *Vaccinium myrtillus* روی محیط کشت MB-MA-G به اضافه ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA موفقیت‌آمیز بود. زغال فعال با میزان ۲ درصد به محیط کشت اضافه شد و موجب تحریک تشکیل کالوس شد، اما نرخ زنده‌مانی نهال‌ها را کاهش داد که دلیل آن افزایش pH بود. در مرحله تکثیر کالوس، زغال فعال موجب کاهش نرخ نکروزه شدن و تغییر pH گردید.

Cüce و Sökmen (۲۰۱۷) رویکرد جدیدی را باهدف افزایش پتانسیل تولید *Vaccinium uliginosum* L. از طریق اندام‌زایی مستقیم در پیش گرفتند، به‌طوری‌که جوانه‌های جانبی دارای یک

یا دو برگ در محیط‌های WPM، Anderson's rhododendronو MS غنی شده با زئاتین در ترکیب با IBA و نیز زئاتین به همراه NAA کشت شدند. محیط کشت WPM غنی شده با زئاتین در ترکیب با IBA مؤثرترین محیط کشت معرفی شد. در این پژوهش، تنظیم‌کننده‌های رشد مختلفی نیز بررسی شدند و زئاتین به‌عنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد معرفی شد. بالاترین طول شاخساره و تعداد شاخساره نیز در محیط‌های غنی شده با ترکیب ۲ میلی‌گرم زئاتین، ۰/۱ میلی‌گرم IBA و ۰/۲ میلی-گرم ژیبرلیک اسید مشاهده گردید. پتانسیل ریشه‌زایی در محیط کشت WPM غنی شده با IBA، ایندول تری استیک اسید و NAA با یا بدون زغال فعال بررسی شد. بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم IBA و ۱ میلی‌گرم ایندول استیک اسید مشاهده شد.

در پژوهشی توسط Fan و همکاران (۲۰۱۷)، ارزیابی سیستماتیک آثار محیط کشت، سیتوکینین و اکسین روی القای شاخه‌های جانبی و همچنین تأثیر اکسین و محیط کشت روی ریشه-زایی درون و برون شیشه‌ای یک رقم بلوبری Bluejay (*Vaccinium corymbosum* L.) و یک رقم Pink Lemonade (*V. ashei*) صورت گرفت و درنتیجه آن پروتکل بهینه کشت شاخه درون شیشه‌ای برای دو رقم بلوبری حاصل شد. دو قطعه از اندام‌های ساقه گرفته شده از شاخه‌های جانبی روی محیط کشت Anderson غنی شده با ۱۳/۶۸ میکرومول 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino) پورن (ZT) و ۰/۲۷ میکرومول نفتالین استیک اسید (NAA) برای تحریک شاخه‌های جانبی Bluejay و ۹/۱۲ میکرومول ZT و ۰/۰۵ میکرومول NAA برای تکثیر شاخه‌های Pink Lemonade کشت شد. ریز قلمه‌های گرفته شده از شاخه‌های جانبی روی محیط half-strength Anderson غنی شده با ۰/۴۹ میکرومول indole-3-butyric acid (IBA) به‌منظور دستیابی به ریشه‌زایی درون شیشه‌ای کشت داده شدند. درصد ریشه‌زایی برای Bluejay و Pink Lemonade به‌ترتیب ۷۵ و ۶۵ درصد در طی دو ماه به‌دست آمد. با این‌حال، با فرو بردن قلمه‌های ریز در غلظت ۴/۹۲ میکرومول IBA برای ۱۰ ثانیه و ریشه‌زایی بیرون شیشه‌ای روی محیط حاوی ۹۰ درصد پیت و ۱۰ درصد پرتیل، درصد ریشه‌زایی تا میزان ۸۹ درصد برای Bluejay و ۹۷ درصد برای Pink Lemonade افزایش یافت.

در مطالعه‌ای LiFang و همکاران (۲۰۱۷) آثار شرایط مختلف کشت را روی تکثیر بلوبری Coville بررسی کردند. آثار گرادیان‌های pH، غلظت‌های ساکارز و سه نوع سیتوکینین روی تکثیر بلوبری مطالعه شد. وزن تر کل و ضریب تکثیر در pH=6 بالاترین مقدار بود. در غلظت ۲۵ گرم بر لیتر ساکارز، وزن تر کل به بیشترین مقدار رسید و با افزایش غلظت ساکارز این مقدار بیشتر نشد. ضریب تکثیر، وزن تر و ارتفاع نهال‌ها در حضور ترانس زئاتین ریبوساید نسبت به زئاتین و ترانس زئاتین بیشتر بود؛ بنابراین محیط کشت بهینه برای تکثیر بلوبری Coville شامل محیط حاوی ساکارز ۲۵ گرم بر لیتر، pH=6 و ترانس زئاتین ریبوساید به میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود.

تکثیر گیاه *Vaccinium floribundum* Kunth از طریق کشت جوانه جانبی توسط Cobo و همکاران (۲۰۱۸) مورد مطالعه قرار گرفت. جوانه‌های جانبی روی محیط کشت WPM غنی شده با 2iP به میزان ۳ میلی‌گرم بر لیتر و یا 2iP به میزان ۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA کشت داده شدند. بهترین نتایج تکثیر در محیط کشت WPM غنی شده با ترکیب 2iP و NAA حاصل شد، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه‌ها مشاهده گردید. گیاهان ریشه‌دار به‌طور موفقیت‌آمیزی در یک بستر پیت و ورمی‌کولیت سازگار شدند، درحالی‌که گیاهان بدون ریشه بعد از فرو بردن در محلول IBA یا پتاسیم IBA رشد نمودند.

فصل ۳

مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد گیاهی

ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل دو تا سه جوانه جانبی از سه واریته‌ی مختلف بلوبری شامل بلوکراپ، چندلر و رکا بودند که از محل پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

۳-۲ ضدعفونی ریزنمونه‌ها

پس از انتقال ریزنمونه‌ها به آزمایشگاه، فلس‌های در برگیرنده جوانه با دقت جدا شده و پس از چند مرتبه شستشوی جوانه‌ها توسط آب، با استفاده از محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۵ دقیقه به همراه یک قطره توییین ضدعفونی گردیدند و سپس دو مرتبه هر یک به مدت پانزده دقیقه در زیر هود لامینار شستشو شدند. جوانه در محیط کشت استقرار کشت شده و به مدت دو ماه در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از دو ماه، شاخه-های جدید رشد یافته و ریزازدیادی صورت گرفت. شاخساره حاصل از ریزازدیادی در آزمایش‌ها ریشه-زایی استفاده شدند.

۳-۳ محیط کشت و آماده‌سازی آن

در این آزمایش از محیط کشت WPM تغییریافته استفاده شد. محیط کشت WPM از روی محیط کشت MS ساخته شد و بعدازآن با موفقیت برای بسیاری از گیاهان چوبی مورد استفاده قرار گرفت. نیترات پتاسیم در این محیط کشت، حذف شده و سولفات پتاسیم افزوده شده است. آمونیوم به یک‌چهارم مقدار موجود در محیط کشت MS کاهش پیدا کرده و نیتروژن نیز از طریق کلسیم با ترکیب نیترات کلسیم به محیط کشت افزوده می‌شود. مقدار عناصر کم‌مصرف، پرمصرف، ویتامین‌ها و ساکارز در محیط کشت مورد مطالعه در جدول ۳-۱ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱: مقدار عناصر کم‌مصرف، پرمصرف، ویتامین‌ها و ساکارز (میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت WPM مورد استفاده برای ریزازدیادی بلوبری

ترکیبات	میلی‌گرم در لیتر
NH_4NO_3	۴۰۰
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	۵۵۶
$CaCl_2.2H_2O$	۹۶
K_2SO_4	۹۹۰
$MgSO_4.7H_2O$	۳۷۰
KH_2PO_4	۱۷۰
$MnSO_4.4H_2O$	۲۲/۳
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵
$ZnSO_4.7H_2O$	۸/۶
H_3BO_3	۶/۲
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۲۵
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸
$Na_2EDTA.2H_2O$	۳۷/۳
Myo-Inositol	۱۰۰
Thiamin-HCL	۱
Nicotinic Acid	۰/۵
Pyridoxine-HCL	۰/۵
Glycine	۲
Glutamine	۲
Sucrose	۳۰۰۰۰

۳-۴ آزمایش‌ها

۳-۴-۱ آزمایش اول

اثر ۴ سطح هورمون زئاتین (با ۰، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با چهار سطح ماده دی‌ک‌گولاک (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر) روی دو رقم بلوکراپ و چندلر ارزیابی شد. ریز نمونه‌ها شامل سه جوانه‌ی جانبی بودند که در شیشه‌های ویال کشت حاوی محیط کشت WPM تغییریافته با تیمارهای هورمونی کشت شدند. سپس نمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی-

گراد و با تنظیم ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۲×۴×۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار (هر تکرار ۴ ریزنمونه) انجام گرفت.

۳-۴-۲ آزمایش دوم

اثر ۵ سطح هورمون زئاتین (با ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) روی سه رقم بلوکراپ، چندلر و رکا ارزیابی شد. ریزنمونه‌ها شامل سه جوانه‌ی جانبی در شیشه‌های ویال کشت حاوی محیط کشت WPM تغییریافته با تیمارهای هورمونی مذکور کشت شدند. سپس نمونه‌ها به اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۵ در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار (هر تکرار ۴ ریزنمونه) انجام گرفت.

۳-۴-۳ آزمایش سوم

در این آزمایش، پتانسیل ریشه‌زایی گیاهان تولید شده در محیط کشت WPM غنی شده با IBA و ساکارز (به میزان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم بر لیتر) در شرایط حضور یا عدم حضور زغال فعال در دو بخش بررسی شد. ابتدا اثر مقادیر مختلف IBA (۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت همراه با کاربرد پنج درصد زغال فعال یا بدون کاربرد زغال فعال روی درصد ریشه‌زایی سه رقم بلوکراپ، چندلر و رکا ارزیابی شد.

سپس در بخش دیگر، اثر کاهش مقدار ساکارز (۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر) روی درصد ریشه-زایی دو رقم بلوکراپ و چندلر مورد بررسی قرار گرفت. سه مقدار مختلف ساکارز ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر در محیط کشت WPM غنی شده حاوی پنج درصد زغال فعال و بدون کاربرد IBA در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۳ بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید.

۳-۵ اندازه‌گیری‌ها

در آزمایش اول و دوم، پس از گذشت دو ماه در هر یک از تیمارها، طول و تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده اندازه‌گیری شد.

در آزمایش سوم، پس از دو ماه تعداد گیاهان ریشه‌دار شده شمارش و درصد ریشه‌زایی تعیین گردید.

۳-۶ غربال‌گری فاکتورهای مؤثر بر تعداد و کیفیت شاخه

به‌منظور غربال‌گری فاکتورهای مؤثر بر تعداد و کیفیت شاخه روی دو رقم بلوبری طرح پلاکت-برمن مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام آزمایش پلاکت-برمن تعداد ۱۹ ماده در محیط کشت و سه مقدار برای هر ماده در نظر گرفته شد. مدل، ۲۳ بلوک آزمایشی پیشنهاد داد که این ۲۳ بلوک ساخته شدند. آزمایش بر روی دو رقم بلوکراپ و چندلر انجام گرفت و چندین صفت ازجمله تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد ریشه‌های نابجا، طول شاخه‌های اصلی، طول شاخه‌های جانبی، طول ریشه‌های نابجا، کالوس و کیفیت اندازه‌گیری شدند. مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در جدول ۳-۲ نشان داده شده است.

جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در طرح پلاکت برمن

ردیف	مواد	اجرای ۱	اجرای ۲	اجرای ۳	اجرای ۴	اجرای ۵	اجرای ۶
۱	KH_2PO_4	۸۵	۳۴۰	۳۴۰	۸۵	۸۵	۲۱۲/۵
۲	$Ca(NO_3)_2$	۱	۰	۰	۰	۰	۰/۵
۳	KNO_3	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۳۳	۰	۰/۳۳	۰/۱۶۵
۴	NH_4NO_3	۶۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۶۰۰	۶۰۰	۴۰۰
۵	$CaCl_3$	۶	۶	۱	۶	۶	۳/۵
۶	$MgSO_4$	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۲	۱/۲۵
۷	pH	۵/۲	۴/۲	۴/۲	۵/۲	۴/۲	۴/۷
۸	Zeatin	۰/۷	۰/۷	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۸
۹	Sucrose	۲۵	۱۵	۲۵	۱۵	۱۵	۲۰
۱۰	H_3BO_3	۱	۱۲/۴	۱	۱	۱۲/۴	۶/۷
۱۱	Kl	۰/۱	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۱	۰/۴۶۵
۱۲	$MnSO_4$	۰/۱۷	۰/۱۷	۱	۱	۰/۱۷	۰/۵۸۵
۱۳	$ZNSO_4$	۰/۲۵	۲	۰/۲۵	۲	۰/۲۵	۱/۱۲۵
۱۴	$COCL_2$	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰	۰/۱۲۵	۰	۰/۰۶۲۵
۱۵	Fe	۲	۱	۲	۱	۲	۱/۵
۱۶	Thiamine	۰/۱	۰/۱	۱۰	۱۰	۱۰	۵/۵
۱۷	Pyridoxine	۱۰	۱۰	۱۰	۰/۱	۰/۱	۵/۰۵
۱۸	Nicotinic Acid	۵	۵	۵	۵	۵	۲/۵۵
۱۹	Myoinositol	۵	۱۰۰	۵	۵	۱۰۰	۵۲/۵

ادامه جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در طرح پلاکت برمن

ردیف	مواد	اجرای ۷	اجرای ۸	اجرای ۹	اجرای ۱۰	اجرای ۱۱	اجرای ۱۲
۱	KH_2PO_4	۳۴۰	۳۴۰	۸۵	۸۵	۸۵	۳۴۰
۲	$Ca(NO_3)_2$	۱	۱	۱	۰	۰	۱
۳	KNO_3	۰/۳۳	۰	۰/۳۳	۰	۰	۰
۴	NH_4NO_3	۶۰۰	۶۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۵	$CaCl_3$	۱	۶	۶	۶	۱	۶
۶	$MgSO_4$	۲	۰/۵	۲	۲	۰/۵	۲
۷	pH	۴/۲	۴/۲	۴/۲	۴/۲	۴/۲	۵/۲
۸	Zeatin	۰/۹	۰/۹	۰/۷	۰/۹	۰/۷	۰/۹
۹	Sucrose	۱۵	۲۵	۲۵	۲۵	۱۵	۱۵
۱۰	H_3BO_3	۱	۱۲/۴	۱۲/۴	۱	۱	۱۲/۴
۱۱	Kl	۰/۱	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۱	۰/۱	۰/۱
۱۲	$MnSO_4$	۰/۱۷	۰/۱۷	۱	۱	۰/۱۷	۱
۱۳	$ZNSO_4$	۲	۲	۰/۲۵	۲	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۴	$COCL_2$	۰/۱۲۵	۰	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰	۰
۱۵	Fe	۱	۲	۱	۲	۱	۱
۱۶	Thiamine	۱۰	۰/۱	۱۰	۰/۱	۰/۱	۰/۱
۱۷	Pyridoxine	۱۰	۰/۱	۰/۱	۱۰	۰/۱	۱۰
۱۸	Nicotinic Acid	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۵
۱۹	Myoinositol	۵	۵	۵	۱۰۰	۵	۵

ادامه جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در طرح پلاکت برمن

ردیف	مواد	اجرای ۱۳	اجرای ۱۴	اجرای ۱۵	اجرای ۱۶	اجرای ۱۷	اجرای ۱۸
۱	KH_2PO_4	۳۴۰	۸۵	۳۴۰	۸۵	۲۱۲/۵	۲۱۲/۵
۲	$Ca(NO_3)_2$	۰	۱	۰	۰	۰/۵	۰/۵
۳	KNO_3	۰/۳۳	۰	۰	۰/۳۳	۰/۱۶۵	۰/۱۶۵
۴	NH_4NO_3	۶۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۶۰۰	۴۰۰	۴۰۰
۵	$CaCl_3$	۱	۱	۱	۱	۳/۵	۳/۵
۶	$MgSO_4$	۰/۵	۰/۵	۲	۲	۱/۲۵	۱/۲۵
۷	pH	۵/۲	۵/۲	۵/۲	۵/۲	۴/۷	۴/۷
۸	Zeatin	۰/۹	۰/۹	۰/۷	۰/۷	۰/۸	۰/۸
۹	Sucrose	۲۵	۱۵	۲۵	۱۵	۲۰	۲۰
۱۰	H_3BO_3	۱۲/۴	۱۲/۴	۱۲/۴	۱۲/۴	۶/۷	۶/۷
۱۱	Kl	۰/۱	۰/۸۳	۰/۱	۰/۸۳	۰/۴۶۵	۰/۴۶۵
۱۲	$MnSO_4$	۱	۰/۱۷	۰/۱۷	۱	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵
۱۳	$ZNSO_4$	۰/۲۵	۰/۲۵	۲	۲	۱/۱۲۵	۱/۱۲۵
۱۴	$COCL_2$	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۰۶۲۵
۱۵	Fe	۱	۲	۲	۲	۱/۵	۱/۵
۱۶	Thiamine	۰/۱	۱۰	۱۰	۰/۱	۵/۰۵	۵/۰۵
۱۷	Pyridoxine	۰/۱	۱۰	۰/۱	۱۰	۵/۰۵	۵/۰۵
۱۸	Nicotinic Acid	۰/۱	۰/۱	۵	۰/۱	۲/۵۵	۲/۵۵
۱۹	Myoinositol	۱۰۰	۱۰۰	۵	۵	۵۲/۵	۵۲/۵

ادامه جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده و بلوک‌های آزمایشی در طرح پلاکت برمن

ردیف	مواد	اجرای ۱۹	اجرای ۲۰	اجرای ۲۱	اجرای ۲۲	اجرای ۲۳
۱	KH_2PO_4	۳۴۰	۳۴۰	۸۵	۳۴۰	۸۵
۲	$Ca(NO_3)_2$	۰	۱	۱	۱	۱
۳	KNO_3	۰	۰/۳۳	۰/۳۳	۰	۰
۴	NH_4NO_3	۶۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۶۰۰	۶۰۰
۵	$CaCl_3$	۶	۶	۱	۱	۱
۶	$MgSO_4$	۲	۰/۵	۲	۲	۰/۵
۷	pH	۵/۲	۵/۲	۵/۲	۴/۲	۴/۲
۸	Zeatin	۰/۷	۰/۷	۰/۹	۰/۷	۰/۷
۹	Sucrose	۲۵	۱۵	۲۵	۱۵	۲۵
۱۰	H_3BO_3	۱	۱	۱	۱	۱۲/۴
۱۱	Kl	۰/۸۳	۰/۱	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۱
۱۲	$MnSO_4$	۰/۱۷	۱	۰/۱۷	۱	۱
۱۳	$ZNSO_4$	۰/۲۵	۲	۲	۰/۲۵	۲
۱۴	$COCL_2$	۰	۰	۰	۰/۱۲۵	۰
۱۵	Fe	۱	۲	۱	۲	۱
۱۶	Thiamine	۱۰	۱۰	۰/۱	۰/۱	۱۰
۱۷	Pyridoxine	۱۰	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱۰
۱۸	Nicotinic Acid	۰/۱	۰/۱	۵	۵	۵
۱۹	Myoinositol	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

۳-۷ تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

به‌منظور بررسی نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌های کمی به‌ترتیب از آزمون‌های شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk's) و لون (Levene's test) استفاده شد. آثار تیمارها و ترکیب آن‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس دوطرفه (two-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح معنی- داری $P \leq 0.05$ آنالیز شد. همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. طرح پلاکت برمن با استفاده از نرم‌افزار JMP 7.0 طراحی و آنالیز شد.

فصل ۴

نتایج و بحث

۴-۱ آزمایش اول

ازآنجاکه Wolfe و همکاران (۱۹۸۳) گزارش کردند که محیط کشت WPM بالاترین رشد شاخه را تولید می‌کند و همچنین WPM به‌عنوان بهترین محیط کشت معرفی گردید و در مطالعات مختلفی توسط محققان دیگر (Fukui et al., 1991; Isutsa et al., 1994; Gonzalez et al., 2000) برای ریزازدیادی ارقام بلوبری مورد ارزیابی قرار گرفته بود، بنابراین در این تحقیق از این محیط کشت استفاده گردید. در آزمایش اول، دو واریته بلوکراپ و چندلر در محیط کشت WPM غنی شده با هورمون زئاتین (۰، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) و ماده دی‌ک‌گولاک (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که طول شاخه‌های جانبی به‌طور معنی-داری تحت تأثیر تیمارهای مختلف ازجمله واریته، هورمون زئاتین و ماده دی‌ک‌گولاک و آثار متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱: تجزیه واریانس طول شاخه‌های جانبی دو رقم بلوبری (بلوکراپ و چندلر) در سطوح مختلف زئاتین و دی‌ک‌گولاک

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۱	۱/۰۶۵**	۱۰/۹۳	۰/ ۰۰۱۶
زئاتین	۳	۲۱/۴۹۳**	۲۲۰/۵۱	<۰/۰۰۰۱
دی‌ک‌گولاک	۳	۰/۶۷۲**	۶/۹۰	<۰/۰۰۰۴
واریته × زئاتین	۳	۲/۱۵۵**	۲۲/۱۱	<۰/۰۰۰۱
زئاتین × دی‌ک‌گولاگ	۹	۱/۰۴۷**	۱۰/۷۴	<۰/۰۰۰۱
واریته × دی‌ک‌گولاگ	۳	۰/۳۷۷*	۳/۸۷	۰/۰۱۳۱
واریته × زئاتین × دی‌ک‌گولاگ	۹	۱/۷۳۶**	۱۷/۸۱	<۰/۰۰۰۱

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ را نشان می‌دهد

نتایج مقایسه میانگین ترکیب تیماری سه‌جانبه زئاتین × دی‌ک‌گولاک × واریته، نشان داد که بیشترین طول شاخه‌های جانبی با استفاده از ترکیب هورمونی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر زئاتین و عدم مصرف ماده دی‌ک‌گولاک در واریته چندلر و همچنین ترکیب ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر زئاتین و عدم

مصرف ماده دی‌ک‌گولاک در واریته بلوکراپ به‌دست آمد که درواقع، بهترین ترکیب هورمونی برای افزایش طول شاخه‌های جانبی در واریته چندلر و بلوکراپ بود (جدول ۴-۲). به‌علاوه، کمترین مقدار طول شاخه‌های جانبی در شرایط عدم مصرف زئاتین و عدم مصرف دی‌ک‌گولاک در واریته چندلر به‌دست آمد که بدترین ترکیب هورمونی برای افزایش طول شاخه‌های جانبی بود (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف زئاتین و دی‌ک‌گولاک بر طول شاخه‌های جانبی تولید شده در دو رقم مختلف بلوبری بر اساس آزمون دانکن.

واریته	زئاتین	ماده دی‌ک‌گولاگ	طول شاخه‌های جانبی (سانتی‌متر)
چندلر	۰/۶	۰	۵/۰۶۶^{a}
بلوکراپ	۰/۴	۰	۴/۷۹۵^{a}
چندلر	۰/۸	۰	۴/۲۳۳^{b}
چندلر	۰/۴	۰	۴/۱۶۶^{c}
چندلر	۰/۴	۵	۴/۱۰۰^{cd}
بلوکراپ	۰/۴	۱۰	۳/۹۵۰^{cd}
چندلر	۰/۶	۵	۳/۸۸۷^{cd}
بلوکراپ	۰/۸	۵	۳/۸۸۶^{cd}
بلوکراپ	۰/۸	۱۵	۳/۸۰۰^{cd}
چندلر	۰/۸	۱۰	۳/۶۸۱^{cd}
بلوکراپ	۰/۸	۰	۳/۶۵۶^{d}
بلوکراپ	۰/۴	۱۵	۳/۶۰۰^{d}
چندلر	۰/۴	۱۵	۳/۵۷۳^{d}
چندلر	۰/۴	۱۰	۳/۵۶۰^{d}
چندلر	۰/۸	۱۵	۳/۴۵۳^{d}
بلوکراپ	۰/۶	۱۵	۳/۳۴۳^{de}
بلوکراپ	۰/۴	۵	۳/۲۸۶^{def}
چندلر	۰/۶	۱۰	۳/۰۲۹^{ef}
چندلر	۰/۶	۱۵	۲/۹۳۸^{ef}
بلوکراپ	۰/۸	۱۰	۲/۸۸۳^{ef}
چندلر	۰/۸	۵	۲/۸۴۵^{ef}
بلوکراپ	۰/۶	۱۰	۲/۸۰۰^{f}
چندلر	۰	۱۰	۲/۵۳۳^{fg}
بلوکراپ	۰	۵	۲/۳۳۳^{fg}
بلوکراپ	۰	۱۰	۲/۲۲۹^{g}
بلوکراپ	۰/۶	۰	۲/۱۸۶^{g}
بلوکراپ	۰/۶	۵	۲/۱۸۶^{g}
بلوکراپ	۰	۰	۱/۶۰۰^{h}
چندلر	۰	۱۵	۱/۵۸۳^{h}
چندلر	۰	۵	۱/۵۶۶^{h}
بلوکراپ	۰	۱۵	۱/۱۶۶^{h}
چندلر	۰	۰	۰/۸۵۶^{i}

حروف آماری مشترک نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج جدول تجزیه واریانس، حاکی از تأثیرپذیری معنی‌دار صفت تعداد شاخه‌های جانبی در سطوح مختلف تیمارهای زئاتین و ماده دی‌ک‌گولاک و آثار متقابل دوجانبه تیمارها بود. این درحالی است که اثر واریته و برهم‌کنش سه‌جانبه تیمارها (واریته× زئاتین× دی‌ک‌گولاک) تفاوت معنی‌داری را در تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده نشان ندادند (جدول ۴-۳).

جدول ۴-۳: نتایج تجزیه واریانس دوطرفه تعداد شاخه‌های جانبی دو رقم بلوبری (بلوکراپ و چندلر) در سطوح مختلف زئاتین و دی‌ک‌گولاک

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۱	۰/۲۱۵^{ns}	۳/۵۴	۰/۰۶۴۳
زئاتین	۳	۲۵/۸۰۳**	۴۲۴/۱۷	<۰/۰۰۰۱
دی‌ک‌گولاک	۳	۰/۳۷۹**	۶/۲۴	<۰/۰۰۰۹
واریته × زئاتین	۳	۰/۵۰۹**	۸/۳۷	<۰/۰۰۰۱
زئاتین × دی‌ک‌گولاگ	۹	۰/۲۶۴**	۴/۳۵	۰/۰۰۰۲
واریته × دی‌ک‌گولاگ	۳	۰/۴۱۹**	۶/۸۹	۰/۰۰۰۴
واریته × زئاتین × دی‌ک‌گولاگ	۹	۰/۰۵۸^{ns}	۰/۹۶	۰/۴۸۳

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی با استفاده از ترکیب هورمونی ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر زئاتین با۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی‌ک‌گولاک و کمترین میزان این صفت در ترکیبات عدم مصرف زئاتین به همراه کاربرد ۰، ۵ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر ماده دی‌ک‌گولاک مشاهده شد (جدول ۴-۴). درمجموع عدم مصرف زئاتین نسبت به سطوح مختلف مصرف آن، تعداد شاخه‌های جانبی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد، به‌طوری‌که کمترین تعداد شاخه‌های جانبی مشاهده شد (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف زئاتین و دی‌ک‌گولاک بر تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده در دو رقم بلوبری (بلوکراپ و چندلر).

زئاتین	ماده دی‌ک‌گولاگ	تعداد شاخه‌های جانبی
۰/۸	۱۵	۳/۵۰۰ a
۰/۶	۱۵	۳/۴۵۸ ab
۰/۶	۰	۳/۳۳۳ ab
۰/۸	۰	۳/۲۵۰ ab
۰/۸	۵	۳/۱۶۶ b
۰/۸	۱۰	۳/۱۶۶ b
۰/۶	۵	۳/۰۸۳ b
۰/۶	۱۰	۲/۶۶۶ c
۰/۴	۰	۲/۰۸۳ d
۰/۴	۱۵	۲/۰۰۰ d
۰/۴	۱۰	۱/۸۳۳ e
۰/۴	۵	۱/۷۵۰ f
۰	۱۰	۱/۳۳۳ fg
۰	۱۵	۱/۰۵۰ g
۰	۰	۱/۰۰۰ g
۰	۵	۱/۰۰۰ g

حروف آماری مشترک نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

۴-۲ آزمایش دوم

مطابق با نتایج آزمون تجزیه واریانس دوطرفه، طول شاخه‌های جانبی سه واریته بلوبری به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر آثار اصلی واریته و زئاتین و آثار متقابل واریته × زئاتین قرار گرفت (جدول ۴-۵).

جدول ۴-۵: تجزیه واریانس طول شاخه‌های جانبی سه رقم بلوبری (بلوکراپ، رکا و چندلر) در سطوح مختلف زئاتین

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۲	۱۹/۱۲**	۱۷۰/۱۹	<۰/۰۰۰۱
زئاتین	۴	۴/۱۰**	۳۶/۴۸	<۰/۰۰۰۱
واریته × زئاتین	۸	۲/۴۵**	۲۱/۸۱	<۰/۰۰۰۱

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل واریته × زئاتین نشان داد که بیشترین طول شاخه‌های جانبی در واریته چندلر تحت تأثیر زئاتین به میزان ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و کمترین مقدار آن در واریته رکا، تحت تأثیر عدم مصرف زئاتین و کاربرد ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر زئاتین به‌دست آمد (جدول ۴-۶).

جدول ۴-۶: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف زئاتین بر طول شاخه‌های جانبی تولید شده در سه رقم مختلف بلوبری.

واریته	زئاتین	طول شاخه‌های جانبی (سانتی‌متر)
چندلر	۰/۸	۶/۷۶۶^{a}
چندلر	۰	۵/۶۰۰^{b}
چندلر	۰/۴	۵/۵۶۶^{b}
رکا	۰/۶	۵/۲۶۶^{b}
بلوکراپ	۰/۶	۵/۰۶۶^{bc}
چندلر	۰/۶	۴/۹۴۶^{bc}
بلوکراپ	۰	۴/۵۳۳^{c}
چندلر	۰/۲	۴/۴۵۰^{c}
بلوکراپ	۰/۴	۳/۲۶۶^{d}
رکا	۰/۸	۳/۲۰۰^{de}
رکا	۰/۴	۳/۱۶۶^{de}
بلوکراپ	۰/۸	۳/۰۶۶^{de}
بلوکراپ	۰/۲	۲/۹۸۳^{e}
رکا	۰	۲/۷۳۳^{ef}
رکا	۰/۲	۲/۲۳۳^{f}

حروف آماری مشترک نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

بر اساس نتایج آزمون تجزیه واریانس، تعداد شاخه‌های جانبی در سه واریته بلوبری اختلاف معنی‌داری را در اثر سطوح مختلف زئاتین و اثر متقابل واریته × زئاتین نشان داد (جدول ۴-۷).

جدول ۴-۷: تجزیه واریانس دوطرفه تعداد شاخه‌های جانبی سه رقم بلوبری (بلوکراپ، رکا و چندلر) در سطوح مختلف زئاتین

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۲	۱/۳۷**	۱۴/۴۱	<۰/۰۰۰۱
زئاتین	۴	۶/۷۱**	۷۰/۶۶	<۰/۰۰۰۱
زئاتین × واریته	۸	۱/۵۶**	۱۶/۴۸	<۰/۰۰۰۱

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

با توجه به نتایج مقایسه میانگین، واریته رکا تحت تأثیر زئاتین با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی را تولید نمود، درحالی‌که واریته بلوکراپ در شرایط عدم مصرف زئاتین، از کمترین تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده برخوردار بود (جدول ۴-۸).

جدول ۴-۸: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف زئاتین بر تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده در سه رقم مختلف بلوبری.

واریته	زئاتین	تعداد شاخه‌های جانبی
رکا	۰/۶	۵/۵۸۳^{a}
چندلر	۰/۸	۴/۲۵۰^{b}
بلوکراپ	۰/۸	۳/۶۶۶^{c}
رکا	۰/۸	۳/۵۸۳^{c}
چندلر	۰/۶	۳/۵۰۰^{cd}
چندلر	۰/۴	۳/۲۵۰^{cd}
بلوکراپ	۰/۴	۳/۱۶۷^{cd}
چندلر	۰/۲	۳/۰۸۳^{d}
بلوکراپ	۰/۲	۳/۰۸۳^{d}
بلوکراپ	۰/۶	۳/۰۰۰^{d}
رکا	۰/۴	۲/۷۵۰^{d}
رکا	۰/۲	۲/۶۶۶^{de}
چندلر	۰	۲/۳۳۳^{de}
رکا	۰	۲/۱۶۶^{e}
بلوکراپ	۰	۱/۱۰۰^{f}

حروف آماری مشترک نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد غلظت بالای زئاتین برای غنی‌سازی محیط کشت واریته‌های بلوبری مؤثرتر بود. این نتایج با گزارش‌های دیگر محققان مطابقت دارد که نشان دادند هورمون زئاتین یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی بسیار مهم برای تکثیر و کشت بافت واریته‌های بلوبری بوده (Jiang *et al*., 2009; Ruzic *et al*., 2012) و برای افزایش طول شاخه‌های جانبی، القای تکثیر شاخه‌های جانبی و توسعه تشکیل کالوس مناسب است (Reed and Abdelnour-Esquivel, 1991; Gajdošová *et al*., 2006; Ostrolucká *et al*., 2012). به‌علاوه، در مطالعه Yavorska و همکاران (۲۰۱۶) زئاتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور جزئی موجب تحریک توسعه جوانه‌ها شد و افزایش غلظت این هورمون تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش شدت کالوس‌زایی بلوبری شد. غلظت بالاتر زئاتین (با میزان ۲-۵ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش نرخ کالوس‌زایی و افزایش طول و تعداد شاخه‌ها را در گیاه بلوبری به همراه داشت (Reed and Abdelnour, 1991; Debnath, 2008). از طرف دیگر، Scalzo و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که محیط کشت حاوی مقادیر پایین زئاتین در مقایسه با محیط کشت حاوی غلظت‌های بالای این ماده، افزایش طول گیاه بلوبری را بیشتر تحریک کرده بود. Cappelletti و Mezzetti (۲۰۱۶) نیز زئاتین را به‌عنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد برای تکثیر ارقام بلوبری معرفی کردند. به‌علاوه، زئاتین به‌عنوان مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد در تکثیر شاخه‌ها در lowbush blueberry (Kaldmae et al., 2006)، lingonberry (Debnath and McRae, 2001) و highbush blueberry (Eccher and Noe, 1989; Tetsumura et al., 2008) معرفی شد.

دی‌ک‌گولاک موجب به تأخیر افتادن رشد گیاه می‌شود. به‌خوبی مشخص شده است که مهارکننده‌های رشد موجب افزایش گلدهی گیاهان و افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های زیست‌محیطی می‌شوند (Litwińczuk and Prokop, 2010)، بنابراین فرض شد که کاربرد دی‌ک‌گولاک در تکثیر بلوبری ممکن است مؤثر باشد. در این تحقیق، عدم حضور ماده دی‌ک‌گولاک یا غلظت پایین آن نیز نتایج بهتری را نشان داد. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، Litwińczuk و Prokop (۲۰۱۰) گزارش کردند که دی‌ک‌گولاک موجب کاهش طول شاخه و القای شاخه‌دهی در بلوبری می‌شود. از طرف

دیگر، در تضاد با نتایج این تحقیق، کاربرد ماده دی‌ک‌گولاک با غلظت ۶۶/۷ میکرومولار در حضور زئاتین (۱ میلی‌گرم در لیتر)، موجب افزایش تکثیر شاخه در سه رقم زیتون شد، اگرچه دی‌ک‌گولاک در غلظت بالا (۱۳۳/۴ میکرومولار) تأثیری بر افزایش تعداد و طول شاخه‌های زیتون نداشت (Mendoza et al., 2008). Banko و Stefani (۱۹۹۵) گزارش نمودند که دی‌ک‌گولاک موجب کاهش طول شاخه در چندین گونه گیاهی گردیده است، درحالی‌که هم‌زمان افزایش تحریک تولید شاخه‌های اضافی را نیز موجب شد. از طرف دیگر، Nowak و Grzesik (۱۹۹۷) مشاهده کردند که در گیاه آزالیا ماده دی‌ک‌گولاک موجب تولید شاخه‌های بیشتری در مقایسه با شاهد شد. Moradnezhad و همکاران (۲۰۱۷) بیان داشتند که دی‌ک‌گولاک در غلظت پایین موجب افزایش کارایی زئاتین می‌شود، درحالی‌که در غلظت بالای این ماده منجر به متوقف شدن آثار زئاتین می‌گردد.

۴-۳ آزمایش سوم

نتایج آزمون تجزیه واریانس دوطرفه نشان داد که تنها استفاده از زغال فعال اثر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی ارقام مختلف بلوبری داشت (جدول ۴-۹). اثر واریته یا مقادیر مختلف هورمون ریشه-زایی بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار نبودند.

جدول ۴-۹: تجزیه واریانس دوطرفه درصد ریشه‌زایی سه رقم بلوبری در سطوح مختلف هورمون IBA و تیمار زغال فعال

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۲	۰/۰۱۲^{ns}	۰/۶۵	۰/ ۵۲۶
زغال فعال	۱	۱۴/۱۷۴**	۷۳۵/۰۰	<۰/۰۰۰۱
واریته × زغال فعال	۲	۰/۰۱۸^{ns}	۰/۹۷	۰/۳۸۵
هورمون IBA	۲	۰/۰۰۴^{ns}	۰/۲۵	۰/۷۷۹
واریته × هورمون IBA	۴	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۱۲	۰/۹۷۳
زغال فعال × هورمون IBA	۲	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۳۰	۰/۷۳۹
واریته × زغال فعال × هورمون IBA	۴	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۱۶	۰/۹۵۹

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

طبق نتایج مقایسه میانگین، کاربرد زغال فعال نسبت به عدم کاربرد آن به‌طور متوسط ۷۵/۸۲ درصد راندمان ریشه‌زایی را در ارقام مختلف بلوبری بهبود بخشید (جدول ۴-۱۰).

جدول ۴-۱۰: مقایسه میانگین ریشه‌زایی ارقام مختلف بلوبری (بلوکراپ، رکا و چندلر) تحت تأثیر مصرف و عدم مصرف تیمار زغال فعال.

زغال فعال	میانگین ریشه‌زایی
مصرف	۱/۱۸۳[a]
عدم مصرف	۰/۲۸۶[b]

حروف آماری مشترک نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد

نتایج جدول تجزیه واریانس دوطرفه صفت درصد ریشه‌زایی نشان داد که مقادیر مختلف ساکارز تأثیر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی ارقام بلوکراپ و چندلر نداشتند (جدول ۴-۱۱). همچنین ارقام مختلف روند ریشه‌زایی مختلفی را در هر یک از سطوح مصرف ساکارز نشان ندادند (اثر متقابل واریته × ساکارز غیر معنی‌دار بود).

جدول ۴-۱۱: تجزیه واریانس دوطرفه ریشه‌زایی دو رقم بلوبری (بلوکراپ و چندلر) تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار ساکارز

ترکیب تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F* Value	Pr > F
واریته	۱	۰/۰۶۸[ns]	۳/۷۳	۰/ ۰۷۱
ساکارز	۲	۰/۰۳۸[ns]	۲/۰۹	۰/۱۵۶
واریته × ساکارز	۲	۰/۰۳۷[ns]	۲/۰۵	۰/۱۶۱

ns: عدم معنی‌داری

ریشه‌زایی و سازگاری از مراحل اصلی تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان می‌باشند. ریشه‌زایی و تولید ریشه‌های نابجا یک ابزار ضروری در تولید واریته‌های سوماکلونال[1] و تحولات ژنتیکی می‌باشد

[1]: Somaclonal variants

(Marcotrigiano *et al*., 1996). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال در ریشه‌زایی مؤثرند. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر رقم، هورمون IBA و ساکارز بر روی ریشه‌زایی بلوبری معنی‌دار نبود و تنها در حضور زغال فعال، ریشه‌زایی به میزان صد درصد در ارقام مختلف صورت گرفت. در گزارش-های قبلی نیز وجود زغال فعال برای ریشه‌زایی بلوبری ضروری بوده است. مطابق با نتایج این تحقیق، استفاده از زغال فعال با غلظت ۱ گرم بر لیتر موجب افزایش درصد و طول ریشه‌زایی گیاه *Vaccinium uliginosum* شد (Cüce and Sökmen, 2017). از زغال فعال برای ریشه‌زایی *V. corymbosum* و *V. vitis-idaea* استفاده شده است (Ostrolucka *et al*., 2009). مقدار ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال باعث ۶۰ درصد ریشه‌زایی در *V. myrtillus* شده است (Cuce and Sokmen, 2015) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در مطالعه ما، پنج درصد زغال فعال بدون هورمون ریشه زایی باعث صددرصد ریشه‌زایی گیاه بلوبری در شرایط کشت بافت شده است. زغال فعال عاملی است که موجب تعدیل میزان pH محیط کشت شده و همچنین مشاهده شده است که موجب افزایش نرخ کالوس‌زایی و کاهش نرخ نکروزه شدن برگ می‌شود (Melania and Adriana, 2016). تنظیم pH محیط کشت در حضور زغال فعال می‌تواند موجب افزایش قابلیت گیاه برای ذخیره انرژی و درنتیجه رشد و نمو بهتر گردد (Thorpe *et al*., 2008). زغال فعال باعث ایجاد تاریکی نسبی در محیط می‌شود و ریشه‌زایی را القا می‌کند. این درحالی است که نور باعث تجزیه اکسین هم در محیط مایع و هم در محیط جامد می‌شود.

تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی ازجمله IBA در تقسیم سلولی اثر داشته و برای باززایی و ریشه‌زایی لازم‌اند (Cuce *et al*., 2013). در این آزمایش، غلظت‌های مختلف IBA در تحریک ریشه زایی مؤثر نبود. در مقابل استفاده از مقادیر بالاتر زغال فعال نسبت به گزارش‌های قبلی باعث افزایش صددرصدی ریشه‌زایی شد. احتمالاً تاریکی برای القای ریشه‌زایی در بلوبری کافی است و خود گیاه مقادیر مناسب هورمون ریشه‌زایی را در تاریکی تولید می‌کند.

به‌طور مشابه در تحقیق Litwinczuk و Wadas (۲۰۰۸) هورمون IBA تأثیری روی ریشه‌زایی *Vaccinium × covilleanum* نشان نداد. از طرف دیگر، Cüce و Sökmen (۲۰۱۷) گزارش کردند که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA موجب افزایش درصد و طول ریشه‌زایی *Vaccinium uliginosum* شده است. Ostrolucka و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۸ گرم بر لیتر زغال فعال را برای حصول بیشترین درصد ریشه‌زایی در *V. corymbosum* و *V. vitis-idaea* مؤثر دانستند. همچنین در بلوبری Northland دو میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ درصد زغال فعال باعث ۹۴ درصد ریشه‌زایی شد (Zhao *et al*., 2011).

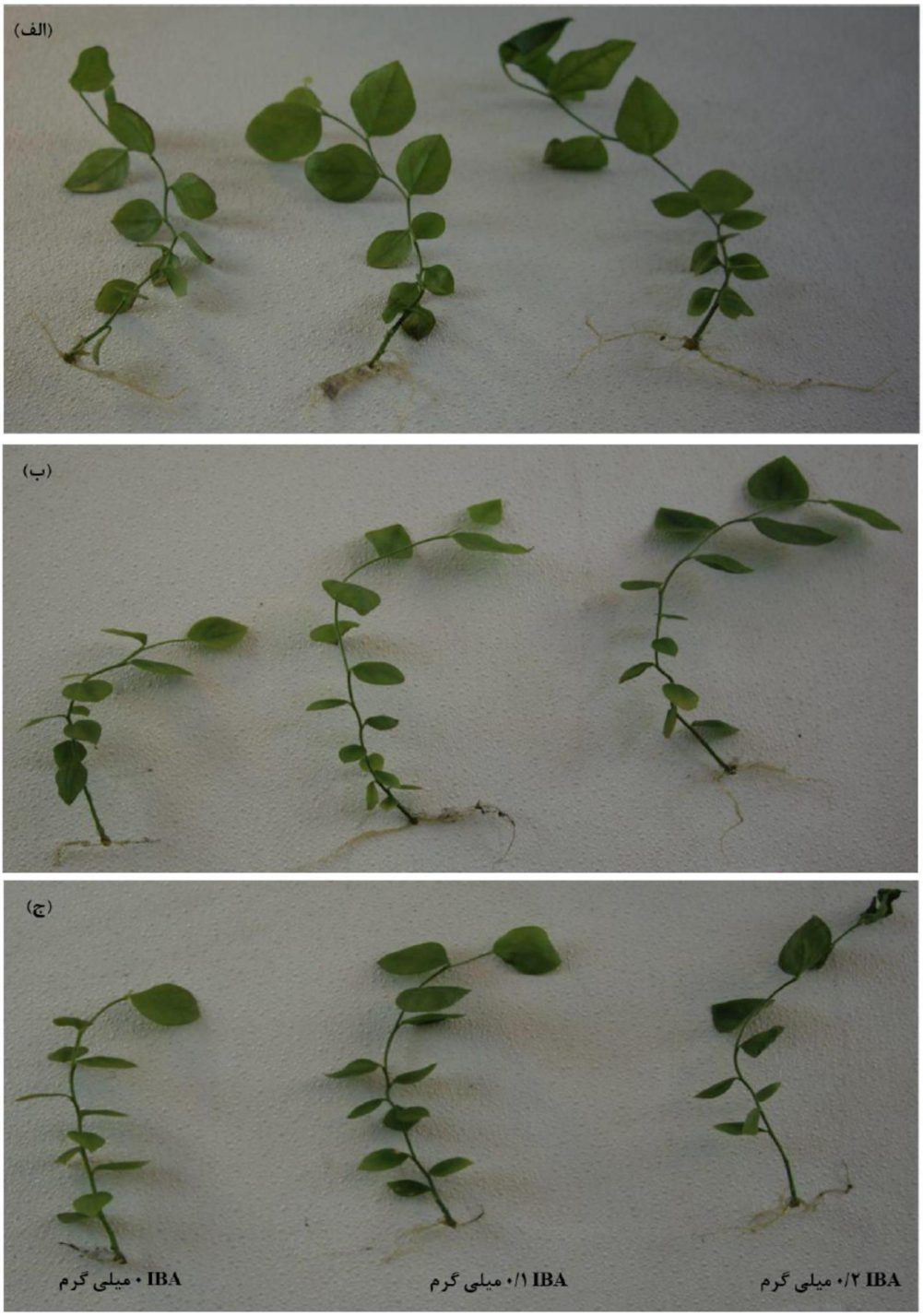
کشت بافت درون شیشه‌ای گیاهان به منبع کربن نیاز دارد، ازآنجاکه آن‌ها هنوز به‌طور کامل اتوتروفیکی نیستند (Garcia *et al*., 2002). ساکارز به‌عنوان کربوهیدراتی است که در این آزمایش انتخاب شد، شاید به این دلیل که ساکارز قند اصلی مورد انتقال در بسیاری از گیاهان است. همچنین ساکارز اغلب به‌عنوان منبع کربن و انرژی در آزمایش‌های ریزازدیای ارقام مختلف بلوبری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Liu *et al*., 2010; Debnath, 2011). علاوه‌براین، ساکارز برای حفظ رشد ضروری بوده و به‌عنوان اسمولیت عمل می‌کند (Cao *et al*., 2003). مطالعات قبلی نشان داده است که مقدار بهینه ساکارز برای ریزازدیادی شاخه‌های گونه *Vaccinium corymbosum* واریته بلوکراپ در دامنه‌ای از ۱۵ mM تا ۸۸ mM متغیر است (Wolfe *et al*., 1983; Cao *et al*., 1998).

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش مقدار ساکارز نیز در محیط اثری بر روی درصد ریشه‌زایی درون شیشه‌ای واریته‌های بلوبری ندارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که گیاهان درون شیشه به اندازه بهینه و مناسب ذخیره ساکارز برای فعالیت‌های خود دارند، به‌طوری‌که با کاهش آن درصد ریشه‌زایی باز به میزان صد در صد اتفاق افتاده است. برخلاف نتایج این تحقیق، Cao و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که با افزایش غلظت ساکارز از ۱۵ mM به ۵۸ mM تکثیر شاخه‌های ارقام بلوبری تا دو برابر افزایش یافت. همچنین ساکارز باعث تنظیم تشکیل شاخه‌های جانبی در گونه *Solanum tuberosum* L. شد (Vinterhalter *et al*., 1997). مقدار بهینه ساکارز برای ریزازدیادی بلوبری تا ۱۵ mM می

باشد (Cao *et al*., 1998, 2002; Cao and Hammerschlag, 2000)، به‌طوری‌که در غلظت بالای ساکارز کلروزه شدن برگ اتفاق می‌افتد. بااین‌وجود، مقدار بهینه ساکارز بسته به ژنوتیپ متغیر است، به‌عنوان‌مثال این مقدار برای رقم بلوکراپ، ۱۵ mM و برای رقم Georgiagem تقریباً ۴ برابر این مقدار است (Cao *et al*., 2003).

با توجه به مشاهدات انجام شده القای ریشه در شرایط عدم کاربرد زغال فعال صورت نگرفت، بااین‌حال، در تیمارهای غنی شده با زغال فعال ریشه‌زایی صورت گرفت (شکل ۴-۱، ۴-۲).

شکل ۴-۱: ریشه‌زایی در واریته بلوکراپ در محیط کشت غنی شده با هورمون IBA و شکر (الف: ۱۰ گرم در لیتر، ب: ۱۵ گرم در لیتر و ج: ۲۰ گرم در لیتر) بدون تیمار زغال فعال



شکل ۴-۲: ریشه‌زایی در واریته بلوکراپ در محیط کشت غنی شده با هورمون IBA و شکر (الف: ۱۰ گرم در لیتر، ب: ۱۵ گرم در لیتر و ج: ۲۰ گرم در لیتر) در شرایط کاربرد تیمار زغال فعال

۴-۴ غربال‌گری فاکتورهای مؤثر بر تعداد و کیفیت شاخه

در این تحقیق از طراحی پلاکت-برمن جهت غربال‌گری آثار عوامل مختلف بر کیفیت و تعداد شاخه دو رقم بلوبری استفاده شد. اثر عوامل مختلف بر تعداد و کیفیت شاخه با استفاده از طرح پلاکت برمن مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۱۹ ماده مورد استفاده در آزمایش پلاکت-برمن، هفت ماده (KH_2PO_4، NH_4NO_3، $MgSO_4$، pH، Zeatin، H_3BO_3 و Pyridoxine) دارای تأثیر معنی‌داری بر کیفیت شاخه رقم بلوکراپ بلوبری بودند (جدول ۴-۱۲).

جدول ۴-۱۲: نتایج آماری میزان تأثیرگذاری عوامل مختلف بر کیفیت شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم بلوکراپ بلوبری با روش پلاکت-برمن

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F*-value	*P*-value
KH_2PO_4	۱	۰/۴۲۶**	۱۰/۱۱	۰/۰۰۶
NH_4NO_3	۱	۰/۳۵۹*	۸/۵۲	۰/۰۱۰
$MgSO_4$	۱	۰/۵۹۱**	۱۴/۰۴	۰/۰۰۱
pH	۱	۰/۲۹۲*	۶/۹۵	۰/۰۱۸
Zeatin	۱	۰/۷۰۶**	۱۶/۷۷	۰/۰۰۱
H_3BO_3	۱	۰/۳۲۷*	۷/۷۷	۰/۰۱۳
Pyridoxine	۱	۰/۲۵۵*	۶/۰۶	۰/۰۲۶

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ و *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

نتایج آزمایش پلاکت-برمن نشان داد که از بین ۱۹ ماده ارزیابی شده در این پژوهش، عوامل NH_4NO_3، Sucrose، KI، Pyridoxine و Myoinositol از اهمیت بیشتری و معنی‌داری بر صفت تعداد شاخه‌های جانبی تولید شده در رقم بلوکراپ نسبت به سایر عوامل مورد بررسی برخوردار بودند (جدول ۴-۱۳).

جدول ۴-۱۳: نتایج آماری میزان تأثیرگذاری عوامل مختلف بر تعداد شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم بلوکراپ بلوبری به روش پلاکت-برمن

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F*-value	*P*-value
$Ca(NO_3)_2$	۱	۰/۸۲۰^{ns}	۴/۲۹	۰/۰۶۰
NH_4NO_3	۱	۱/۴۵۰*	۷/۶۰	۰/۰۱۸
Sucrose	۱	۱/۷۸*	۹/۳۳	۰/۰۱۱
KI	۱	۱/۹۲۰**	۱۰/۰۳	۰/۰۰۹
$MnSO_4$	۱	۰/۸۸۶^{ns}	۴/۶۴	۰/۰۵۴
Fe	۱	۰/۸۵۲^{ns}	۴/۴۶	۰/۰۵۸
Thiamine	۱	۰/۸۶۱^{ns}	۴/۵۱	۰/۰۵۷
Pyridoxine	۱	۰/۹۸۱*	۵/۱۴	۰/۰۴۴
Nicotinic Acid	۱	۰/۹۲۰^{ns}	۴/۸۲	۰/۰۵۰
Myoinositol	۱	۱/۰۴*	۵/۴۷	۰/۰۳۹

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

با توجه به نتایج آزمایش پلاکت-برمن، از ۱۹ ماده مورد استفاده در این پژوهش تنها ماده NH_4NO_3 دارای تأثیر معنی‌داری بر کیفیت شاخه‌های تولید شده در رقم چندلر در شرایط کشت بافت بود (جدول ۴-۱۴).

جدول ۴-۱۴: نتایج آماری میزان تأثیرگذاری عوامل مختلف بر کیفیت شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم چندلر بلوبری به روش پلاکت-برمن

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F*-value	*P*-value
NH_4NO_3	۱	۱/۰۸*	۴/۴۶	۰/۰۵۰
pH	۱	۰/۵۹^{ns}	۲/۴۶	۰/۱۳۶
Sucrose	۱	۰/۹۰^{ns}	۳/۷۳	۰/۰۷۱
H_3BO_3	۱	۰/۵۴^{ns}	۲/۲۳	۰/۱۵۴
$ZNSO_4$	۱	۰/۵۲^{ns}	۲/۱۸	۰/۱۵۹
Thiamine	۱	۰/۳۶^{ns}	۱/۵۲	۰/۲۳۶

*: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

نتایج آزمون پلاکت-برمن نشان داد که از بین ۱۹ ماده مورد استفاده در آزمایش پلاکت-برمن، مواد KH_2PO_4، KNO_3، $MgSO_4$ و Pyridoxine دارای اهمیت بیشتر و اثر معنی‌دار بر تعداد شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم چندلر بلوبری بودند (جدول ۴-۱۵).

جدول ۴-۱۵: نتایج آماری میزان تأثیرگذاری عوامل مختلف بر تعداد شاخه تولید شده در شرایط کشت بافت در رقم چندلر بلوبری به روش پلاکت-برمن

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	*F*-value	*P*-value
KH_2PO_4	۱	۱/۶۱*	۸/۰۶	۰/۰۱۱
KNO_3	۱	۱/۸۹**	۹/۴۸	۰/۰۰۷
$MgSO_4$	۱	۱/۴۶*	۷/۳۴	۰/۰۱۵
H_3BO_3	۱	۰/۸۴ns	۴/۲۳	۰/۰۵۶
Pyridoxine	۱	۱/۳۳*	۶/۶۵	۰/۰۲۰
Myoinositol	۱	۰/۶۳ns	۳/۱۹	۰/۰۹۲

**: معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

دامنه وسیعی از محیط‌های کشت پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌ها در تحقیقات مختلف بر ریزازدیادی گونه‌های جنس *Vaccinium* استفاده شده است. غلظت بالای سیتوکینین‌ها ازجمله زئاتین در تکثیر شاخه مؤثرتر بوده است (Eccher and Noe, 1989) و غلظت‌های پایین اکسین ازجمله IBA برای ریشه‌زایی گونه‌های مختلف جنس *Vaccinium* مؤثرتر بود (Ostrolucka *et al*., 2004). استفاده از ماکروالمنت‌ها ازجمله KH_2PO_4، NH_4NO_3 و $MgSO_4$ و میکروالمنت‌ها ازجمله H_3BO_3 و ویتامین‌ها مانند Pyridoxine و Nicotinic Acid و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد مانند زئاتین و IBA روی محیط کشت WPM برای ریزازدیادی بلوبری در مطالعات قبلی گزارش شده است (Debnath and McRae, 2001; Cüce and Sökmen, 2015). محیط کشت حاوی زئاتین برای القای شاخه و تکثیر آن مؤثرتر بود (Cüce and Sökmen, 2015). بیشتر گونه‌های جنس *Vaccinium* شرایطی را برای رشد بهینه نیازمند هستند که شامل pH پایین، آهن بالا و نیتروژن (عمدتاً به شکل آمونیوم) است (Ostroluckᡠ*et al*., 2010). نیتروژن در پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، کلروفیل، ویتامین‌ها، اسیدهای نوکلئوتید، فسفولیپیدها و مؤلفه‌های آلکالوئیدی وجود دارد. وقتی‌که محیط کشت فاقد نیتروژن باشد، بافت‌های گیاهی زردتر می‌شوند. فسفر موجود در محیط کشت با تأثیر بر افزایش جذب نیتروژن در فراهمی مواد غذایی و انرژی نقش دارد (Shen, 2005)؛ بنابراین، نکروزه شدن و زرد شدن گیاه نشان دهنده کمبود نیتروژن و فسفر است. در این تحقیق مواد KNO_3، KH_2PO_4 و NH_4NO_3 به‌عنوان منابع نیتروژن و فسفر در رشد و تکثیر بلوبری

اهمیت بالایی داشتند. مطابق با نتایج این تحقیق، در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۰۶)، در محیط کشت WPM اصلاح شده از طریق افزایش دو برابری مقدار KH_2PO_4، نرخ رویش بهتر بود.یکی از عوامل محدودکننده ریزازدیادی گیاهان در محیط کشت مقدار pH می‌باشد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که pH محیط کشت می‌تواند تشکیل ریشه و شاخه گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد (Finn *et al*., 1991; George, 1993). مقدار pH کارایی استفاده از ترکیبات ماکرو و میکروالمنت‌ها و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد را در محیط کشت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ostrolucká *et al*., 2010). مقدار pH محیط کشت نه‌تنها جذب عناصر را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه بر واکنش‌های شیمیایی، به‌ویژه آن‌هایی که توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند، تأثیرگذار است (Thorpe *et al*., 2008). به‌خوبی مشخص شده است که برخی گیاهان می‌توانند به دامنه وسیعی از pH مقاوم باشند، درحالی‌که در گونه‌های دیگر مقاومت به pH محدود است. غلظت بالای pH می‌تواند موجب کاهش جذب عناصر و درنتیجه محدودیت رشد گونه‌های گیاهی شود. فعالیت آنزیم‌ها که جذب برخی عناصر را تحت تأثیر قرار می دهند، وابسته به میزان pH است (Poonnachit and Darnell, 2004)؛ بنابراین، تعیین سطح بهینه pH بسیار ضروری است. به‌طورکلی، محدوده pH ۵/۵ تا ۵/۸ برای کشت درون شیشه‌ای اکثر گیاهان پیشنهاد می‌شود (George, 1993). گونه‌های بلوبری اسیددوست هستند. مقدار pH در طول اتوکلاو و کشت تغییر می‌کند، اما تنظیم اولیه آن می‌تواند مقدار بهینه pH برای جذب مواد موجود در محیط کشت و درنتیجه افزایش قابلیت گیاه را برای ذخیره انرژی به‌منظور رشد و نمو بهتر تضمین کند (Thorpe *et al*., 2008). در این تحقیق، در طرح غربال‌گری پلاکت-برمن pH دارای اهمیت بالایی بود و تأثیر آن روی شاخه‌زایی بلوبری معنی‌دار بود. در تحقیق Ostrolucká و همکاران (۲۰۰۴)، بیشترین مقدار رشد برای بلوبری در شرایط pH=5 مشاهده شد و کمترین مقدار رشد در شرایط pH =3 به‌دست آمد. همچنین مقدار بهینه pH برای دو رقم *Vaccinium vitis-idaea* L. شامل Koralle و Red Pearl به‌ترتیب ۵-۵/۵ و ۴ بود (Ostrolucká *et al*., 2010).

فصل ۵

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۵-۱ نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هورمون زئاتین دارای آثار قابل‌توجهی روی تکثیر و رشد واریته‌های بلوبری بود. از طرف دیگر، ماده دی‌ک‌گولاگ آثار قابل‌ملاحظه‌ای روی رشد واریته‌های بلوبری نداشت، به‌طوری‌که در تیمارهایی با غلظت پایین یا عدم حضور آن، میزان رشد بیشتر بود. این آزمایش اطلاعات کافی در رابطه با انتخاب شرایط اپتیمم رشد برای ریزازدیادی درون شیشه‌ای سه واریته بلوبری به ما می‌دهد. برای واریته چندلر، محیط کشت بهینه برای افزایش طول شاخه‌ها شامل زئاتین با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر و عدم مصرف دی‌ک‌گولاک بود. برای واریته بلوکراپ، محیط کشت بهینه برای افزایش طول شاخه‌ها شامل هورمون زئاتین با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط عدم کاربرد دی‌ک‌گولاک بود. برای افزایش تعداد شاخه‌ها، بهترین محیط کشت ترکیب زئاتین ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر و دی‌ک‌گولاک ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. استفاده از زغال فعال برای القای ریشه-زایی واریته‌های بلوبری حیاتی و بسیار ضروری بود، به‌طوری‌که در شرایط عدم استفاده از زغال فعال ریشه‌زایی صورت نگرفت. به‌علاوه استفاده از ساکارز و هورمون IBA تأثیری روی نرخ ریشه‌زایی واریته‌های بلوبری نداشتند. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که بهینه بودن محیط کشت هم در زمان پرآوری و تولید شاخساره‌های سالم و باکیفیت اثر مهمی بر مرحله ریشه‌زایی درون شیشه می‌تواند داشته باشد، به‌طوری‌که گیاه فقط در حضور مواد معدنی و آلی لازم بدون نیاز به هورمون IBA و در تاریکی مناسب ریشه‌زایی را آغاز می‌کند.

۵-۲ پیشنهادها

۱- استفاده از محیط کشت‌های مختلف برای انتخاب مناسب‌ترین محیط کشت به‌منظور تکثیر بلوبری در ایران

۲- کاربرد انواع دیگر هورمون‌های مؤثر در رشد یا باز زایی، به‌منظور غنی‌سازی محیط کشت بلوبری

۳- آزمایش ریزازدیادی روی دیگر ارقام مختلف بلوبری

مراجع

سید طباطبایی، ب.ا.، (**۱۳۹۰**) "کشت بافت و سلول گیاهی" **انتشارات دانشگاه تهران**، شماره ۲۹۷۵، ۳۶۸ ص.

شاه پیری، آ.، امیدی، م.، احمدیان تهرانی، پ. و داودی، د.، (**۱۳۸۳**) "بررسی کشت بافت و تنوع سوماکلون در سیب زمینی" **مجله علوم کشاورزی ایران**، جلد ۳، شماره ۲: ۳۳۵-۳۲۳.

صبورا، ع. و شکری، م.، (**۱۳۹۲**) "بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جوانه‌زنی و ریزازدیادی گیاه دارویی برازمبل (*Perovskia abrotanoides*) در شرایط *in vitro*" **زیست‌شناسی گیاهی ایران**، سال پنجم، شماره هجدهم، صفحه ۱۱۴-۹۵.

مظفریان، و.، (**۱۳۸۸**) "درختان و درختچه‌های ایران" **انتشارات فرهنگ معاصر**، چاپ دوم، ۹۳۴ ص.

Apse, J. and Karklins, A. (**2013**) "Modification of Soil Properties for Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Cultivation" **Proc. Latv. Univ. Agric**. 30: 1–10.

Bajaj, Y., Furmanowa, P.S. and Olszowska, O. (**1998**) "Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS, editor Biotechnology in Agriculture and Forestry" **New York: Springer Verlag**,4: pp. 60–103.

Ballington, J.R. (**2001**) "Collection, utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*" **HortScience**, 36: 213-220.

Banko, T.J. and Stefani, M.A. (**1995**) "Cutless and Atrimmec for controlling growth of woody landscape plants in containers" **J. Environ.Hortic.** 13 (1): 22-26.

Barker, W.G. and Collins, W.B. (**1963**) "The blueberry rhizome: In vitro culture" **Can. J Bot**. 41:1325-1329.

Basu, A., Du, M., Leyva, M.J., Sanchez, K., Betts, N.M., Wu, M., Aston, C.E. and Lyons, T.J. (**2010**) "Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome" **J. Nutr**. 140: 1582–1587.

Bonga, J.M. and Von Aderkas, P., (**1992**) "*In vitro* culture of trees" In: Forestry Science Book, Vol. 38, **Kluwer Academic Punlishers**, London, 236p.

Butkus, V. and Pliszka, K. (**1993**) "The highbush blueberry-a new cultivated species" **Acta Hortic** 346: 81–85.

Cao, X., Liu, Q., Rowland, L.J. and Hammerschlag, F.A. (**1998**) "GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing Agrobacterium-mediated gene transfer efficiency" **Plant Cell Rep**. 18: 266–270.

Cao, X. and Hammerschlag, F.A. (**2000**) "Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry" **HortScience,** 35: 945–947

Cao, X., Fordham, I., Douglass, L. and Hammerschlag, F. (**2003**) "Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots" **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75: 255–259.

Cappelletti, R. and Mezzetti, B. (**2016**) "TDZ, 2iP and zeatin in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. 'Duke') *in vitro* proliferation and organogenesis" **Acta Hortic**, 1117: 321-324.

Contreras, R.A., Köhler, H., Pizarro, M. and Zúñiga, G.E. (**2015**) "*In Vitro* Cultivars of *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) are a Source of Antioxidant Phenolics" **Antioxidants**, 4: 281-292.

Chandler, C.K. and Draper, A.D. (**1986**) "Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones *in vitro*" **HortScience**, 21: 1065–1066.

Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. and Bisaria, V.S. (**2002**) "Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cellsuspension cultures" **Biotechnol. Bioprocess Eng,** 7: 138–149.

Chaturvedi, H.C., Jain, M. and Kidwai, N.R. **(2007)** "Cloning of medicinal plants throughtissue culture—a review" **Indian J. Exp. Biol.** 45: 937–948.

Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K.C. (**2007**) "Statistical screening of medium components by Plackett‐Burman design for lactic acid production by Lactobacillus sp. KCP01 using date juice" **Bioresour. Technol**, 98: 98‐103.

Choi, H.W., Lemaux, P.G. and Cho, M.J. (**2000**) "Increased chromosomal variation in transgenic barley (*Hordeum vulgar*) plants" **In Vitro Cell. Dev. Biol**, 37: 217-222.

Choudhury, S. and Gupta, K. (**1999**) "Effect of dikegulac on biomass and alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L) G. Don under *in vitro* condition" **Indian J Exp Biol.** 37: 594-59.

Cobo, M.M., Gutiérrez, B. and de Lourdes, M. (**2018**) "Torres Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture" **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant,** 54:112–116.

Cristoni, A. and Magistretti, M.J. (**1987**) "Antiulcer and healing activities of *Vaccinium mytrillus* anthiocyanosides" **Farmaco [Pratica]** 42:29-43.

Cüce, M. and Sökmen, A. (**2015**) "Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberry) naturally growing in the Turkish flora" **Turkish Journal of Biology**, 39: 233-240.

Cüce, M. and Sökmen, A. (**2017**) "*In vitro* production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora" **Turkish J. Agric. For**. 41: 294–304.

Debnath, S.C. and McRae, K.B. (**2001**) "*In vitro* culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): the influence of cytokinins and media types on propagation" **Small Fruits Rev,** 1: 3–19.

Debnath, S.C. (**2004**) "*In vitro* culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.)" **Small Fruits Rev**. 3:393-408.

Debnath, SC. (**2006**) "Propagation of *Vaccinium* in Vitro: A Review" **International Journal of Fruit Science**, Vol. 6(2): 47-71.

Debnath, S.C. (**2008**) "Zeatin-induced one-step *in vitro* cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) micropropagules over stem cuttings" **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 93: 231–240.

Dixon, R.A. and Gonzales, R.A. (**1993**) "Plant Cell Culture. A practical approach. 2nd Edn. Plant Biology division. The Samuel Roberts Noble Foundation. Ardmore, Oklahoma 73402" **USA (At Oxford University Press. Oxford, New York Tokyo)**.

Eccher, T. and Noè, N. (**1989**) "Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)" **Acta Hort**. 441: 185-190.

El-Shiekh, A., Wildung, D.K., Luby, J.J., Sargent, K.L. and Read, P.E. (**1996**) "Long-term effects of propagation by tissue culture or softwood single-node cuttings on growth habit, yield, and berry weight of 'Northblue' blueberry" **J. Am. Soc Hortic. Sci**. 121: 339–342.

Evers, P.W., Donkers, J., Prat, A. and Vermeer, E., (**1988**) "Micropropagation of forest trees through tissue culture" 98-102. In: Bonga, J.M. and Aderkas. P., (Eds). *In Vitro* Culture of Trees. **Centre for Agricultural Publishing and Documentation** (Pudoc): 236 P.

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" **Sci. Hortic. (Amsterdam)**. 226: 277–284.

Fang, Y., Smith, M.A.L. and Pepin, M.F. (**1999**) "Effect of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyjanin producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahlae*)" **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 35:106–113.

Finn, C.E., Luby, J.J., Rosen, C.J. and Ascher, P.D. (**1991**) "Evaluation *in vitro* of blueberry germplasm for higher pH tolerance" **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 116: 312–316.

Fukui, H., Murakami, Y., Harada, T. and Tamura, T. (**1991**) "Response of highbush blueberry axillary leaf bud apices to growth regulators and its seasonal changes Mem" **Faculty Agric., Hokkaido Univ**. 15: 1–6.

Gajdošová, A., Ostrolúcka, M.G., Libiaková, G., Ondrušková, E. and Šimala, 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: 103–118.

Galletta, G.J. and Ballington, J.R. (**1996**) "Blueberries, cranberries and lingonberries, pp. 1-107. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.)" **Fruit breeding**. Vol. II, Vine and small fruit crops. Prentice Hall, New York.

Garcia-Ferriz, L.R., Ghorbel, M., Ybarra, A. and Belaj, I. (**2002**) "Micropropagation from adult olive trees" **Acta Horticulturae**, 586: 879-882.

George, E.F. (**1993**) "Plant propagation by tissue culture" Part. Exegetics ltd., **endigton, Wilts.** BAI34QG, England.

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" **Ann. Appl Biol.** 137, 73–78.

Gyres, E. and Maria, F. (**2008**) "Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europea* L.) by using dikegulac" **Plant Cell, Tissue and Organ Cult**. 92: 233-238.

Hartmann, H.T. and Kester, D.E. (**1990**) "Plant propagation, principles and practices fifth Ed. prentice-Hill" **INC Englewood Cliffs**, New Jersy, USA.

Howell, A.B., Reed, J.D., Krueger, C.G., Winterbottom, R., Cunningham, D.G. and Leahy, M. (**2005**) "A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity" **Phytochem**. 66: 2281-2291.

Isutsa, D.K., Pritts, M.P., Mudge, K.W. (**1994**) "Rapid propagation of blueberry plants using *ex vitro* rooting and controlled acclimatization of micropropagules" **HortScience**, 29: 1124–1126.

Jacquez, J.A. (**1998**) "Design of Experiments" **Pergamon** 3358(2): 259–279.

Jiang, Y., Yu, H., Zhang, D., He, S. and Wang, Ch. (**2009**) "Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries *in vitro*" **Acta Horticulturae**, 810: 581–586.

Kaldmäe, H., Starast, M., Karp, K. and Paal, T. (**2006**) "Effect of donor plant physiological condition on *in vitro* establishment of *Vaccinium angustifolium* shoot explants" **Acta Hortic**, 715: 433–438.

Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M. (**1996**) "Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice" **Cancer Biother. Radiopharm**. 11: 273-277.

Kolewe, M.E., Gaurav, V. and Roberts, S.C. **(2008)** "Pharmaceutically active naturalproduct synthesis and supply via plant cell culture technology" **Mol. Pharm.** 5: 243–256.

Kotte, W. (**1922**) "Kulturversuch isolierten Wurzelespitzen" **Beitr. Allg. Bot**. 2: 413–434.

Krikorian, R., Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B. and Joseph, J.A. (**2010**) "Blueberry supplementation improves memory in older adults" **J. Agric. Food Chem.** 58: 3996–4000.

Kunze, L., Grafe, R.and Schiemann, J. (**1993**) "Continuous in vitro multiplication of shoot buds of Norway spruce (*Picea abies* L.) by intermittent application of growth regulators" **Bio Plant**. 35:11-15.

Leahy, M., Speroni, J. and Starr, M. (**2002**) "Latest development in cranberry health research" **Pharm. Biol**. 40: 50-54.

Liang, Y., Chen, J., Zuo, Y., Ma, K.Y., Jiang, Y., Huang, Y. and Chen, Z.Y. (**2013**) "Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1% lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet" **Eur. J. Nutr**. 52: 869–875.

LiFang, Y., ZeBin, C., TiYuan, X., Song, J., YuChuan, L., Zhen, R., YuYu, Z. and JingWen, L. (**2017**) "Effect of different culture conditions on blueberry shoot propagation" **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, 30 (7): 1642-1646.

Litwiñczuk, W. and Szczerba. J. (**1998**) "The growth and development of highbush blueberry cultures (*Vaccinium corymbosum* L. Cv. Bluecrop) under different light sources" **Acta Physiol. Plant.** (suppl.) 20:24.

Litwińczuk, W., Szczerba, G. and Wrona, D. (**2005**) "Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium x corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture" **Sci Hortic,** 106(2):162–169.

Litwińczuk, W. (**2012**) "Micropropagation of *Vaccinium* sp. by In Vitro Axillary Shoot Proliferation. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important" **Horticultural Plants** pp 63-76.

Lloyd, G. and McCown, B. (**1980**) "Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture" **Proc Int Plant Prop Soc**. 30: 421–427

Lyrene, P.M. (**1978**) "Blueberry callus and shoot-tip culture" **Proc. Florida State Hort. Soc.** 91: 171-172.

Lyrene, P.M. (**1980**) "Micropropagation of rabbiteye blueberries" **Hort. Science.** 15: 80-81.

Machakova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. (**2008**) "Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors" p. 175-204. In E.F. George,

A.H. Micheal, D.K. Greet-Jan (eds.) **Plant propagation by tissue culture**. V.1, The background, 3rd ed., Springer.

Marcotrigiano, M., McGlew, S.P., Hackett, G. and Chawla, B. (**1996**) "Shoot regeneration from tissuecultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)" **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 44: 195–199.

Matzner, F. (**1967**) "The contents of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in blueberries. In: ISHS Working Group (ed) Blueberry Culture Europe Symposium" **Venlo, The Netherlands**, pp 174–177.

Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I. (**2007**) "Efficient *in vitro* regeneration systemsfor Vaccinium species" **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 89: 169–176.

Melania, N.A. and Adriana, P. V. (**2016**) "*In vitro* propagation of *Vaccinium myrtillus* L." "**Nat. Resour. Sustain. Dev**. 8: 122–129.

Mendoza de Gyves, E., Mira, F.R., Ruiu, F. and Rugini, E. (**2008**) "Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac" **Plant Cell** Tiss. Org. Cult, 92: 233-238.

Moradnezhad, M., Hosseini, R., Zarrabi, M.M. and Golmohammadi, F.G. (**2017**) "A New Approach for Olive (Arbequina cv.) Micropropagation: Effect of Dikegulac, Light and Carbon Source" **International Journal of Horticultural Science and Technology**, 4: 79-87.

Morrison, S., Smagula, J.M. and Litten, W. (**2000**) "Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets" **Hort. Science.** 35: 738-741.

Murphy, R.J. (**2003**) "Screening design. In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics" **Taylor and Francis** 920.

Newcomb, W. and Wetherell, D.F. (**1970**) "The effect of 2, 4, 6-thrichlorophenoxyaceic acid on embryogenesis in wild carrot tissue culture" **Bot.Gaz**, 131: 242-245.

Noè N. and T. Eccher. (**1994**) "Influence of irradiance on *in vitro* growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo' **Physiol. Plant**. 91:273-275.

Novelli, S. (**2003**) "Developments in berry production and use" Bi-weekly Bulletin, **Agriculture and Agri-Food Canada**, Vol. 16, No. 21.

Nowak, J. and Grzesik, M. (**1997**) "Regulatory roślinne w uprawie roślin ozdobnych. In: Jankiewicz L.S. (ed.), Regulatory wzrostu i rozwoju roślin" **PWN Warszawa**, 2: 111-136.

Orlikowska, T. (**1986**) "Micropropagation of highbush blueberry" **Fruit Sci. Rep**. 13:105–115.

Ostrolucka, M.G., Gajdosova, A. and Libiakova, G. (**2002**) "Influence of zeatin on microclonal propagation of *Vaccinium corymbosum* L." **Propag Ornam Plants,** 2: 14–18.

Ostrolucká, M.G., Libiaková G., Ondrušková. E. and Gajdošová, A. (**2004**) "*In vitro* propagation of *Vaccinium* species" **Acta Univ Latv Biology**, 676: 207–212.

Ostrolucká, M.G., Gajdošová, A., Ondrušková, E., Libiaková, G. (**2009**) "*In vitro* propagation of several *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars" **Latv J Agron,** 12: 75-80.

Ostrolucká, M.G., Gajdošová, A., Ondrušková, E., Lateèková, M. and Libiaková, G. (**2010**) "Effect of medium pH on axillary shoot proliferation of selected *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars" **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, 52/2: 92–96.

Ostrolucká, G.M., Libiaková, G., Ondrußková, E. and Gajdoßová, A. (**2012**) "*In vitro* propagation of *Vaccinium* species". **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, 676: 207-212.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M. and Hernández-Pérez, T. (**2010**) "Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life-a review" **Plant foods Hum. Nutr**. 65: 299–308.

Poonnachit, U. and Darnell, R. (**2004**) "Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in *Vaccinium* species" **Annals of Botany,** 93: 399–405.

Preil, W. (**2003**) "Micropropagation of ornamental plants. In: Laimer M, Rucker W, editors. Plant tissue culture 100 years since Gottlieb Haberlandt" **New York: Springer-Verlag**. pp. 115-133.

Prior, R.L., Cao, G. and Martin, A. (**1998**) "Antioxidant capacity is infl uenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *vaccinium* species" **J Agric Food Chem**. 46:2686–2693.

Ratnaparkhe, M.B. (**2007**) "Blueberry" **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants,** 4: 217-227.

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

Roberto, T. and Francesca, M. **(2011)** "Sustainable sourcing of natural food ingredientsby plant cell cultures" **Agro Food Ind. Hi Tech,** 22: 26–28.

Rout, G.R. and Jain, S.M. (**2004**) "Micropropagation of ornamental plants cut flowers" **Propagation of Ornamental Plants**, 4: 3-28.

Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R. and Gajdošova, A. (**2012**) "Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)" **J. Berry Res.** 2: 97–103.

Scalzo, J., Donno, D., Miller, S., Ghezzi, M., Mellano, M.G., Cerutti, A.K. and Beccaro, G.L. (**2016**) "Effect of genotype, medium and light on in vitro plant proliferation of *Vaccinium* spp." **New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.** 44: 231–246.

Sapers, G. and D. Hargrave. (**1987**) "Proportions of individual anthocyanins in fruits of cranberry cultivars" **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 112:100-104.

Sedlak, J. and Paprstein, F. (**2009**) "Micropropagation of highbush blueberry cultivars" **Latv. J. Agron. Vestis**. 108-113.

Serres, R.A., Zeldin, E.L., McCown, B.H., Yarborough, D.E. and Smagula, J.M. (**1997**) "Applying biotechnological approaches to *Vaccinium* improvement: a review" **Acta Hortic**. 446:221–226.

Shen, H.L. (2005) "Plant tissue culture" Beijing, **China Forestry Publishing House**. pp. 35-36.

Smolarz, K. (**2009**) "Short information about the history of the commercial cultivation highbush blueberry in Poland" **Agronomijas Vēstis**, 12: 119–122.

Song, G.Q. and Sink, K.C. (**2007**) "Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)" **Agrobacterium Protocols**, 2: 263-272.

Song, G.Q. and Hancock, J.F. (**2011**) "*Vaccinium*. In: Kole C (ed) Wealth of wild crop relatives: genetic, genomic & breeding resource" **Springer, Berlin**, pp 197–222.

Song, G. Q. (**2015**) "Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)" **Agrobacterium Protoc**. 2: 121–131.

Sun, X., Liu, N., Wu, Z., Feng, Y. and Meng, X. (**2015**) "Anti-tumor activity of a polysaccharide from blueberry" **Molecules**, 20: 3841–3853.

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

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., Klerk, G.J, Roberts, A. and George, E.F. (**2008**) "The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: George EF et al. [eds.], Plant Propagation by Tissue Culture" 3rd edition, vol. 1, The Background, **Springer, Dordrecht**. 115–175.

Trocine, L. and Malone, C.L. (**2000**) "Finding important independent variables through screening designs: A comparison of methods" **Proceedings of the Winter Simulation Conference Joines JA**, Barton RR Kang K, Fishwick PA, Eds 749–754.

Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. and Calovic´, M, (**1997**) "The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. Desiree shoot cultures" **Acta Hort**. 462: 319–322.

Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I. and DeWitt, D.L. (**1999**) "Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries" **J. Nat. Prod**. 62: 294-296.

Wolfe, D.E., Eck, P. and Chin, C.K. (**1983**) "Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry" **HortScience**, 18: 703–705.

Wolfe, D., Chin, C.K. and Eck, P. (**1986**) "Relationship of the pH of medium to growth of 'Bluecrop' highbush blueberry *in vitro*" **HortScience**, 21: 296–298.

Yannis, L.L. (2001) "A Plackett-Burnam screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes" **J Pharm Biomed Anal,** 26: 255–263.

Yavorska, N.Y., Lobachevska, O.V., Khorkavtsiv, Ya.D. and Kyyak, N.Ya. (**2016**) "Microclonal propagation of the varieties of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L." **Biotechnologia Acta**, 9(5): 30-37.

Yi, W., Fischer, J., Krewer, G. and Akoh, C.C. (**2005**) "Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis" **J. Agric. Food Chem**. 53: 7320–7329.

Xianjun, L.Y.M.C.M. and Na, Y. (**2010**) "Antioxidation of Anthocyanins from Blueberry Fruits [J]" **J. Chinese Cereal. Oils Assoc**. 2, 1-22.

Xie, Z.S. and Wu, X.C. (**2009**) "Studies on substrates for blueberry cultivation" **Acta Horticulturae**, 810: 513–520.

Zhang, Z., Liu, H., Wu, L. and Li, Y. (**2006**) "Technical System of Blueberry Micropropagation in China" **Acta Hort**. 715: 421-425.

Zhao, X., Zhan, L. and Zou, X. (**2011**) "*In vitro* high-frequency regeneration ofhalf-highbush 'Northland' blueberry. N. Z. J" **Crop Horticult. Sci**. 39: 51–59.

Zimmerman, R.H. and Broome, O.C. (**1980**) "Blueberry micropropagation" **In: Proc. Conf. on Nursery Prod. of Fruit Plants Through Tiss. Cult. - Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE**-11. pp. 44-47

Zimmerman, R.H. (**1991**) "Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops" **Micropropagation**, 231-246.

Abstract

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a perennial tetraploid plant. It is belongs to Ericaceae family and the genus Vaccinium. This plant is native to North America. Due to its benefits on human health and its antioxidant components, including flavonoids, anthocyanins and phenolic acids, recent demand for blubberry has been increased. In this regard, tissue culture can be the most appropriate method to respond to this increased demand and reproduction of this plant. The aim of this research was to optimize the micro proliferation of this plant. For this purpose, In vitro micro-samples of three different blubbery varieties including Bluecrap, Chandler and Reca were prepared and cultured in a WPM culture medium along with different concentrations of zeatin and dikegulac hormones and after two months, the length and number of lateral branches were measured. In addition, rooting potential was investigated in sugar and IBA-enriched WPM culture media, with or without active charcoal. Results were analyzed in a completely randomized factorial design. The tallest lateral branches were obtained using the concentrations of 0.6 and 0.4 mg / L of zeatin and no use of dikegulac in the Chandler and Bluecrap varieties, respectively. While, the shortest lateral branches were obtained in the absence of zeatin and dikegulac in the Chandler variety. The highest numbers of lateral branches were observed using the hormonal combination of 0.8 mg / L zeatin with 15 mg / L dikegulac and the lowest numbers of ones were achieved in no use of zeatin and different levels of dikegulac. Application of sucrose and IBA hormone had no significant effect on rooting of different varieties. In addition, rooting induction of cultivars without activated charcoal treatment was not performed, but it was done in the presence of charcoal activated. Totally, the results of this study showed that zeatin hormone had positive effects on proliferation and growth of blubbery varieties While, dikegulac did not significantly effect on the growth of blueberry varieties. Also, it was found that the use of activated charcoal was essential for Stimulation of rooting in blubbery varieties.

Keywords: Blueberry, dikegulac, lateral shoot, micropropagation, zeatin

Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

The effects of various culture media and growth regulators on micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

By:

Koulsom Mohammadnya

Supervisors:

Dr. Mahdyeh Parsaeian and

Dr. Batool Hossenpour

September 2018