

## تأثیر قارچ کش بنومیل و سیتوکینین بر میزان آلودگی و رشد ریزنمونه‌های گره‌ای *Vaccinium arctostaphylos* L. در شرایط درون شیشه‌ای

مهران نوروزپور<sup>۱\*</sup>، ناصر زارع<sup>۲</sup>، رسول اصغری ذکریا<sup>۳</sup> و پریسا شیخ‌زاده مصدق<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

پست الکترونیک: m.noruzpuor@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰

### چکیده

آلودگی میکروبی یکی از چالش‌های اصلی و از عوامل تأثیرگذار در پاسخ ریزنمونه‌ها در کشت‌های درون شیشه‌ای است، به‌ویژه در گیاهان چوبی که ریزنمونه‌ها از رویشگاه طبیعی تهیه می‌گردد. در تحقیق حاضر، جهت بررسی تأثیر بنومیل بر میزان آلودگی و رشد ریزنمونه‌های گره قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.)، از محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف بنومیل (۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. همچنین، جهت بررسی برهمکنش بنومیل، محیط کشت پایه و ترکیب هورمونی بر پاسخ رشدی ریزنمونه‌ها، محیط کشت‌های پایه مختلف (MS، AN و WPM) حاوی IBA (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر)، سیتوکینین (زآتین، BAP و TDZ در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و بنومیل (صفر و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شدند. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف بنومیل در محیط کشت پایه MS تأثیر معنی‌داری بر میزان آلودگی ریزنمونه‌ها نداشت، ولی استفاده از بنومیل در غلظت‌های پایین‌تر (۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یا کمتر)، شرایط رشدی مناسبی را فراهم کرد. اثر متقابل تیمارها تأثیر معنی‌داری بر درصد زنده‌مانی و برگ‌دهی ریزنمونه‌ها داشت. در محیط MS، درصد زنده‌مانی و برگ‌دهی در حضور بنومیل بیشتر از محیط فاقد بنومیل بوده، ولی در محیط‌های AN و WPM درصد زنده‌مانی و برگ‌دهی به‌طور معنی‌داری در حضور بنومیل کاهش پیدا کرد. علاوه‌براین، در محیط‌های AN و WPM حاوی سیتوکینین، حضور بنومیل باعث کاهش معنی‌دار درصد برگ‌دهی شد، ولی در محیط MS بسته به نوع و غلظت سیتوکینین تأثیر بنومیل متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: بنومیل، زآتین، کشت بافت گیاهی، BAP، TDZ.

## مقدمه

گیاه قره قاط (بلوبری قفقازی، *Caucasian whortleberry*) با نام علمی *Vaccinium arctostaphylos* L. از خانواده اریکاسه (*Ericaceae*) است. برگ، ریشه و میوه این گیاه دارای اثرهای دارویی می باشد (Akhondzadeh, 2000). به دلیل افزایش تقاضا، مطالعات وسیعی در زمینه به نژادی، افزایش کمی و کیفی محصول و سیستم های کاشت آغاز شده است. از جمله روش هایی که برای تکثیر گونه *V. arctostaphylos* می تواند مورد استفاده قرار گیرد، ریزازدیادی یا تکثیر از طریق کشت درون شیشه ای است که روش کارآمد و مؤثری را برای ازدیاد سریع گیاهان به ویژه تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری زای قارچی، باکتریایی و ویروسی فراهم می کند (Noruzpour et al., 2019a).

عوامل متعددی در پاسخ کشت بافت گیاهان و موفقیت در کشت و تکثیر درون شیشه ای گیاهان مؤثر است، از جمله مهمترین آنها می توان به نوع محیط کشت پایه، تنظیم کننده های رشد گیاهی، ویژگی های اپی ژنتیکی ریزنمونه و شرایط رشدی گیاه مادری اشاره کرد (Noruzpour et al., 2019b; Darroudi et al., 2016). محیط کشت های مختلفی برای کشت بافت گیاهان مختلف جنس *Vaccinium* برای استقرار، اندام زایی، پرآوری و ریشه زایی پیشنهاد شده است، از جمله آنها می توان به محیط کشت اندرسون (AN) (Anderson, 1980)، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (Murashige & Skoog, 1977)، محیط کشت گیاهان چوبی (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) اشاره نمود.

تنظیم کننده های رشد گیاهی که در غلظت های بسیار کم استفاده می شوند، بر روی توزیع مواد داخل گیاه، تقسیم سلولی، رشد سلولی و غیره تأثیر می گذارند. تنظیم کننده های رشد گیاهی، به ویژه اکسین ها و سیتوکینین ها، در کنترل رشد و نمو سلول ها هم در گیاه کامل و هم در ریزنمونه های کشت شده در شرایط درون

شیشه ای نقش بسیار مهمی دارند (Kazeroonian et al., 2017; Zare et al., 2014). در مطالعه مربوط به تأثیر نوع محیط کشت پایه و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر استقرار درون شیشه ای گیاه قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.)، مشخص شد که بین محیط کشت های MS، AN و WPM در ترکیب با غلظت های مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) زآتین، BAP و یا TDZ به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA و یا NAA محیط کشت MS در بالاترین غلظت زآتین به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA مناسب ترین سطح رشد ریزنمونه های گره ای این گونه را فراهم کرد (Noruzpour et al., 2019a). Ostrolucka و همکاران (۲۰۰۴) در گزارشی بیان کردند که محیط کشت AN حاوی غلظت های مختلفی از زآتین، 2ip و TDZ محیط کشت مناسبی برای گونه های *V. corymbosum* و *V. idaea* است. علاوه بر این، تغییرات اپی ژنتیک گیاهان در طی فصول مختلف سال ناشی از شرایط محیطی، یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار در پاسخ ریزنمونه ها بر کشت درون شیشه ای است. این موضوع به ویژه در گیاهان جنگلی که ریزنمونه ها از رویشگاه طبیعی تهیه می گردد از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Daryani et al., 2016; Firoozi et al., 2019). بنابراین، ریزنمونه ها باید در فصل رشدی مناسب و از گیاهان (درختان) با شرایط مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مناسب و عاری از بیماری تهیه شوند.

بروز آلودگی های میکروبی چالش اصلی برای انجام پروژه های کشت بافتی و تکثیر گیاهان به ویژه گیاهان چوبی با استفاده از کشت بافت و اندام می باشد. زمانی که از ریزنمونه های رشد یافته در شرایط طبیعی برای کشت درون شیشه ای استفاده شود کنترل آلودگی آن به ویژه آلودگی های درونی اهمیت بسیاری پیدا می کند. به طوری که اگر برای مقابله با این بیماری ها راهکارهای مناسبی استفاده نشود، به صورت آلودگی های قارچی و باکتریایی بروز پیدا کرده و کل ریزنمونه ها را از بین می برد (Reed

۵۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ با pH=۱۰ و حاوی Tween20 ۰/۱٪ به مدت ۱۲ دقیقه تیمار شده و پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل و حذف آب اضافی، روی محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی به همراه سطوح مختلف بنومیل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر کاشته شدند.

در آزمایش دوم، برای ارزیابی تأثیر بنومیل بر میزان رشد ریزنمونه ها در شرایط درون شیشه ای و همچنین بررسی برهم کنش آن با ترکیب های محیط کشت پایه و سیتوکینین ها، ریزنمونه ها پس از ضد عفونی سطحی روی محیط های کشت پایه مختلف (MS، AN و WPM) به همراه غلظت های مختلف (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) از تنظیم کننده های رشد گیاهی BAP یا زآتین و یا TDZ به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA و همچنین غلظت صفر و یا ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر بنومیل کشت شدند.

کشت ها در اتاقک رشد با دمای  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. حدود ۴ هفته پس از کشت، درصد آلودگی، درصد قهوه ای شدگی و درصد ریزنمونه های رشد کرده برای بررسی تأثیر بنومیل در رفع آلودگی و همچنین صفات درصد زنده مانده ریزنمونه ها، درصد برگ دهی و میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه برای بررسی تأثیر بنومیل بر رشد ریزنمونه ها ثبت شد. میزان رشد ساقه نیز به صورت بصری از صفر تا ۳ ستاره (صفر بیانگر عدم رشد ریزنمونه و ۳ بیانگر ریزنمونه های حاوی بیشترین مقدار رشد با بیشترین تعداد ساقه با بیشترین طول) رتبه بندی گردید. در همه موارد محیط کشت ها از طریق اتوکلاو در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شد. بنومیل و سایر ترکیب های مقاوم در برابر حرارت قبل از اتوکلاو به محیط اضافه شدند و ترکیب های ناپایدار در دماهای بالا

(Abdelnour-Esquivel, 1991). استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها و آنتی میکروب ها برای جلوگیری از بیماری نیز ممکن است منجر به کاهش رشد گیاه و تقویت اندام های سخت درون گیاهی شود (Mitchell et al., 1995).

بنومیل یک قارچ کش سیستماتیک بوده که در بیشتر مواقع برای مبارزه علیه قارچ های گونه های فوزاریوم مورد استفاده قرار می گیرد که برای اولین بار در سال ۱۹۶۸ به عنوان یک قارچ کش گزارش شده و در سال ۱۹۷۱ توسط شرکت Du Pont به بازار عرضه شد (Leifert et al., 1989). با توجه به تأثیر قارچ کش بنومیل بر رشد و نمو قارچ ها و همچنین بالا بودن میزان بروز بیماری قارچی در استفاده از ریزنمونه های رشد یافته در شرایط طبیعی و به ویژه ریزنمونه های جنگلی در کشت های درون شیشه ای، این تحقیق برای بررسی تأثیر غلظت های مختلف بنومیل درون محیط کشت برای جلوگیری از بروز آلودگی میکروبی (به ویژه آلودگی قارچی) و همچنین تأثیر بنومیل درون انواع محیط کشت های پایه به همراه ترکیبات هورمونی مختلف بر رشد ریزنمونه های گره گیاه قره قاط انجام شد.

## مواد و روش ها

سرشاخه های یک ساله و حاوی جوانه های سالم (از لحاظ فنوتیپی) قره قاط از مناطق جنگلی روستای سوها ( $N^{\circ}:38/25$  و  $E^{\circ}:48/64$  و ۱۶۷۰ متر) از توابع شهرستان اردبیل تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. ریزنمونه های تک گره یا دو گره قره قاط ابتدا با محلول ظرف شویی به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شده و زیر آب جاری به مدت یک ساعت آبکشی شدند. سپس، ریزنمونه ها درون محلول  $\text{H}_2\text{O}_2$  (۵٪) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و با آب استریل به مدت ۵ دقیقه آبکشی گردیدند. در نهایت ریزنمونه ها با اتانول ۷۰٪ به مدت

## نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف بنومیل درون محیط کشت بر میزان آلودگی و رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ در مرحله استقرار

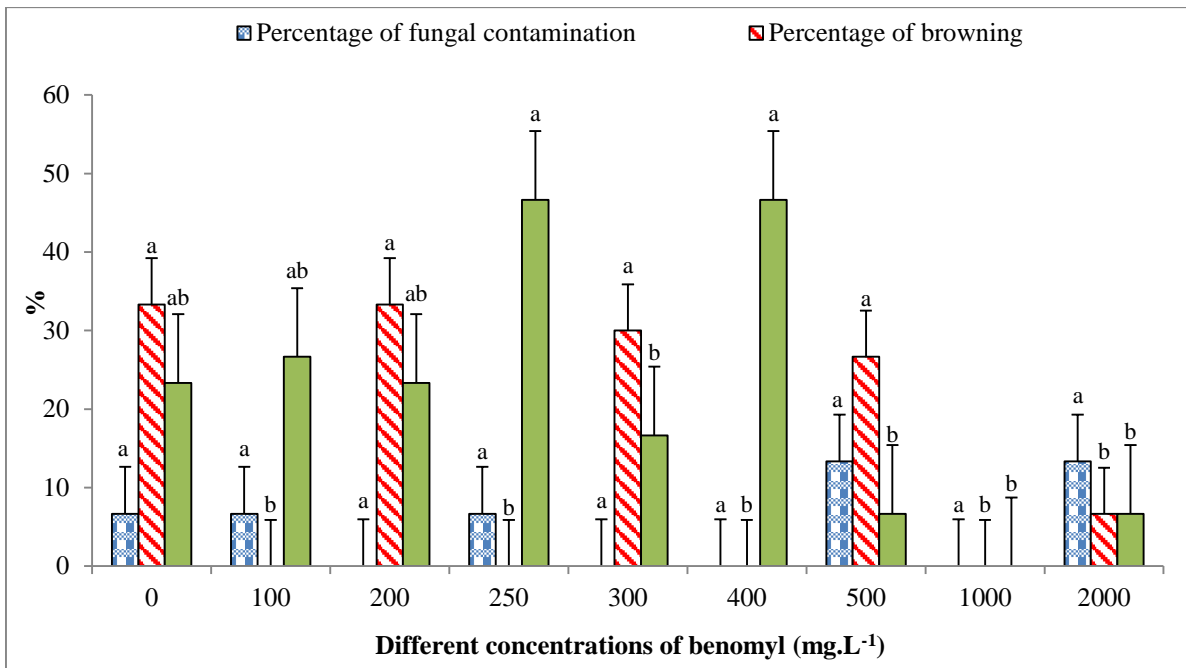
نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف بنومیل از نظر درصد قهوه‌ای‌شدگی و درصد ریزنمونه‌های رشد کرده قره‌قاپ اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۱٪ وجود دارد، اما از نظر درصد آلودگی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف بنومیل درون محیط کشت MS نشان داد که کمترین درصد قهوه‌ای‌شدگی و بیشترین درصد ریزنمونه‌های رشد کرده مربوط به تیمار بنومیل ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با درصد آلودگی و درصد قهوه‌ای‌شدگی صفر درصد و درصد رشدی ۴۶/۶۶٪ بود (شکل ۱، شکل ۲ - c)؛ این در حالیست که با تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل اختلاف معنی‌داری نداشت. همان‌طوری که در شکل ۱ نشان داده شده است با افزایش غلظت بنومیل در ترکیب محیط کشت تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار نگرفته است. ولی با افزایش غلظت آن به ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر باعث کاهش معنی‌دار و قابل توجه درصد ریزنمونه‌های رشد کرده شده است. به‌طوری که افزودن ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل به محیط کشت، درصد رشد ریزنمونه‌ها را به شدت تحت تأثیر قرار داده و به کمترین مقدار (صفر) کاهش داده است که بیانگر اثر منفی بنومیل (به‌ویژه در غلظت بالا) بر رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای است (شکل ۲ - d).

از قبیل زآتین و TDZ از طریق فیلتر سر سرنگی با منافذ ۰/۲ میکرومتر استریل شده و پس از اتوکلاو شدن محیط کشت و در دماهای پایین‌تر و زیر هود به آن اضافه شد.

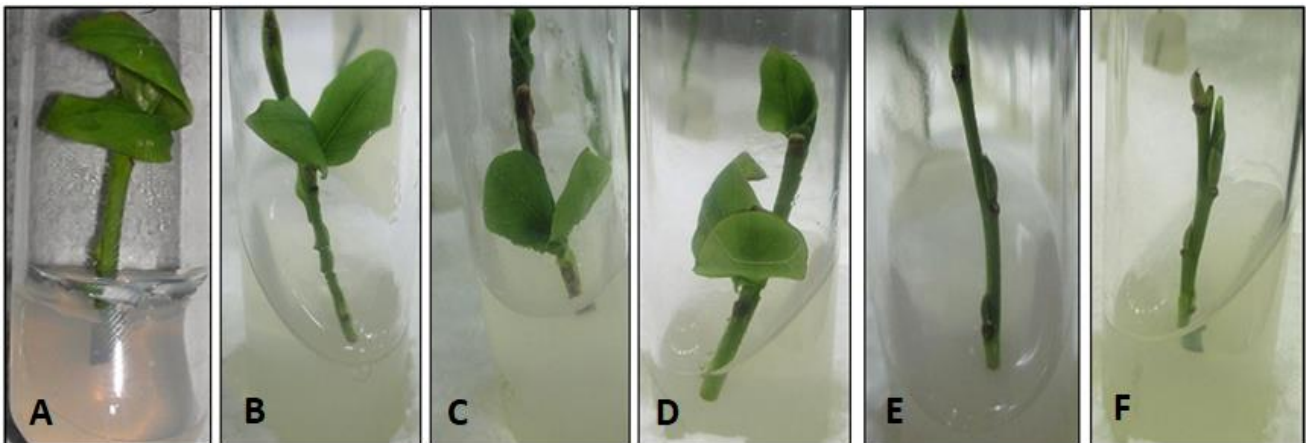
## طرح آزمایشی و تجزیه آماری

آزمایش بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بنومیل درون محیط کشت MS برای بررسی میزان رفع آلودگی ریزنمونه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. آزمایش مربوط به بررسی تأثیر بنومیل (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) درون محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های قره‌قاپ به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. در این آزمایش نوع محیط کشت پایه با سه سطح (MS، AN و WPM) به‌عنوان عامل اول و بنومیل درون محیط کشت‌ها با غلظت صفر و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان عامل دوم و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی (شامل ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه زآتین یا TDZ یا BAP با غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان عامل سوم در نظر گرفته شد. قبل از انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمایش نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ای کولوگروف-اسمیرنوف انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS24 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2017 انجام شد.



شکل ۱- تأثیر بنومیل درون محیط کشت MS بر درصد آلودگی قارچی، قهوه‌ای شدگی و ریزنمونه‌های رشد کرده قره‌قاپ در شرایط درون شیشه‌ای

**Figure 1. Effects of benomyl in MS culture medium on percentage of fungal contamination, browning, and grown *Vaccinium arctostaphylos* L. explants under *in vitro* conditions**



شکل ۲- تأثیر بنومیل درون محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ؛

**Figure 2. Effects of benomyl in MS culture medium without plant growth regulators on the growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. explants;**

A, B, C, D, and E: MS without benomyl (control) and MS containing 200, 300, 400, 1000, and 2000 mg.L<sup>-1</sup> benomyl, respectively

محیط کشت پایه AN فاقد بنومیل درصد برگ‌دهی (۵۹/۳۹٪) و در محیط‌های کشت AN و WPM فاقد بنومیل درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (۷۶/۲۴٪ و ۸۱٪ به ترتیب) به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. همان‌طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بین محیط کشت AN (حاوی بنومیل و بدون بنومیل) و همچنین محیط کشت WPM (حاوی بنومیل و بدون بنومیل) از نظر درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد. اما از نظر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین بین محیط‌های کشت دارای بنومیل نیز محیط کشت MS از نظر درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری با محیط‌های کشت AN و WPM دارد.

بین محیط کشت‌های پایه MS، AN و WPM حاوی بنومیل و بدون بنومیل با توجه به نوع و غلظت سیتوکینین مورد استفاده اختلاف معنی‌داری از نظر درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین درصد برگ‌دهی (۱۰۰٪) مربوط به محیط کشت WPM فاقد بنومیل و حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر زآتین بود (شکل ۳- A) (شکل ۴- A، B و C).

تأثیر قارچ‌کش بنومیل در محیط کشت‌های مختلف به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر استقرار و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های قره‌قاپ  
برای ارزیابی برهم‌کنش احتمالی بین سیتوکینین‌ها و نوع محیط کشت پایه با بنومیل در استقرار و رشد ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاپ، از سطوح صفر (شاهد) و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر این قارچ‌کش استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که درصد زنده‌مانی و درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌های قره‌قاپ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع محیط کشت پایه، غلظت بنومیل درون محیط کشت، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و همچنین اثرهای متقابل دو جانبه و سه جانبه بین آنها قرار گرفت.

طبق نتایج بدست آمده، در آزمایش اول استفاده از غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل درون محیط کشت موجب کاهش رشد ریزنمونه‌ها شد، ولی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمتر از آن رشد ریزنمونه‌ها تحت تأثیر قرار نگرفت. بنابراین، به جای استفاده از غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل درون محیط کشت در آزمایش دوم از غلظت پایین‌تر یعنی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شده است. نتایج نشان داد که در

جدول ۱- تأثیر نوع محیط کشت پایه و بنومیل بر تعداد برگ، درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاپ (*Vaccinium arctostaphylos* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

Table 1. Effects of basal medium and benomyl on number of leaves and percentage of foliation and *Vaccinium arctostaphylos* L. explants survival under *in vitro* conditions

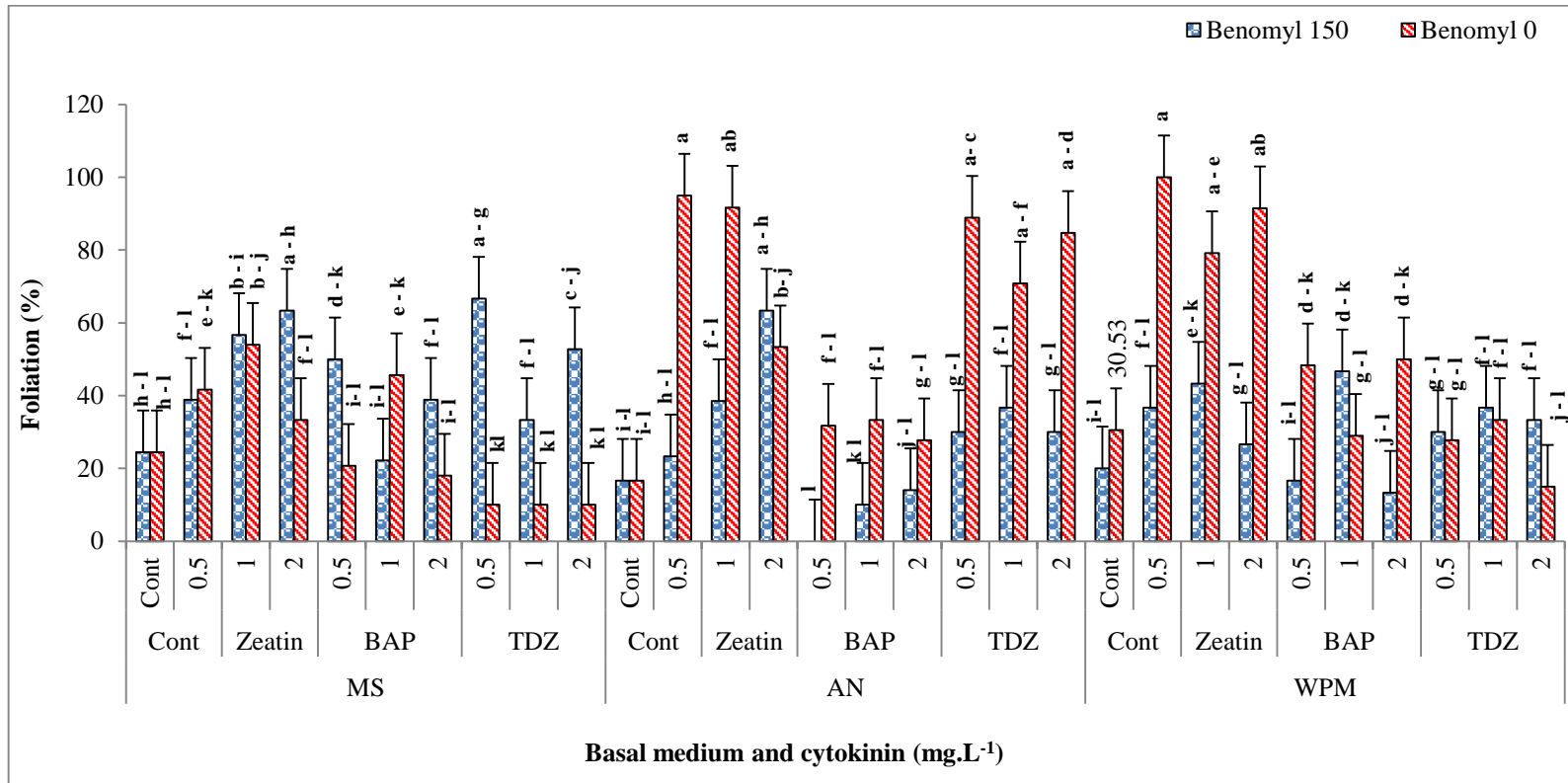
Basal medium	Benomyl (mg.L <sup>-1</sup> )	Average number of leaves	Foliation (%)	Survival (%)
MS	150	2.54 a*	44.70 b	61.79 b
AN	150	2.07 ab	26.25 c	34.09 d
WPM	150	2.66 a	30.33 c	55 bc
MS	0	2.58 a	26.79 c	48.37 c
AN	0	1.55 b	59.39 a	76.24 a
WPM	0	2.31 ab	50.46 ab	81 a

\*Different letters in each column shows a statistically significant difference in 1% probability level of Duncan Multi-Range Test (DMRT).

بنومیل و بدون بنومیل وجود داشت (شکل ۳- B)، به طوری که، در محیط‌های کشت AN و WPM فاقد بنومیل درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بیشتر از محیط‌های کشت دارای بنومیل بود. برای نمونه، بیشترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰٪) مربوط به محیط کشت WPM حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و محیط کشت AN حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین (شکل ۴- E, D, F) و همچنین محیط کشت AN حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و فاقد بنومیل بدست آمد، در حالی که در محیط کشت AN دارای بنومیل و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به حدود صفر (کمترین مقدار در بین تیمارها) کاهش یافت (شکل ۳- B).

در این تحقیق رشد طولی ساقه‌های حاصل از کشت گره‌ای گیاه قره‌قاپ (*V. arctostaphylos*) به صورت رتبه‌دهی مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، به طور کلی بین محیط کشت‌های پایه فاقد بنومیل، از نظر رشد طولی ساقه محیط کشت پایه MS بیشتر از محیط‌های کشت WPM و AN بوده است. همچنین در محیط کشت MS (فاقد بنومیل) و حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و BAP و محیط کشت AN (فاقد بنومیل) و حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین، رشد طولی ساقه بیشتر از سایر تیمارها و همچنین بیشتر از محیط کشت پایه WPM حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بود (جدول ۲). افزودن بنومیل به ترکیب محیط کشت‌های پایه MS و AN برخلاف درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی، منجر به کاهش میزان رشد ساقه شده است (جدول ۲ و شکل ۴- K). این در حالیست که وجود بنومیل درون محیط کشت پایه WPM به مراتب میزان رشد ساقه‌ها را بیشتر و بهتر کرده است.

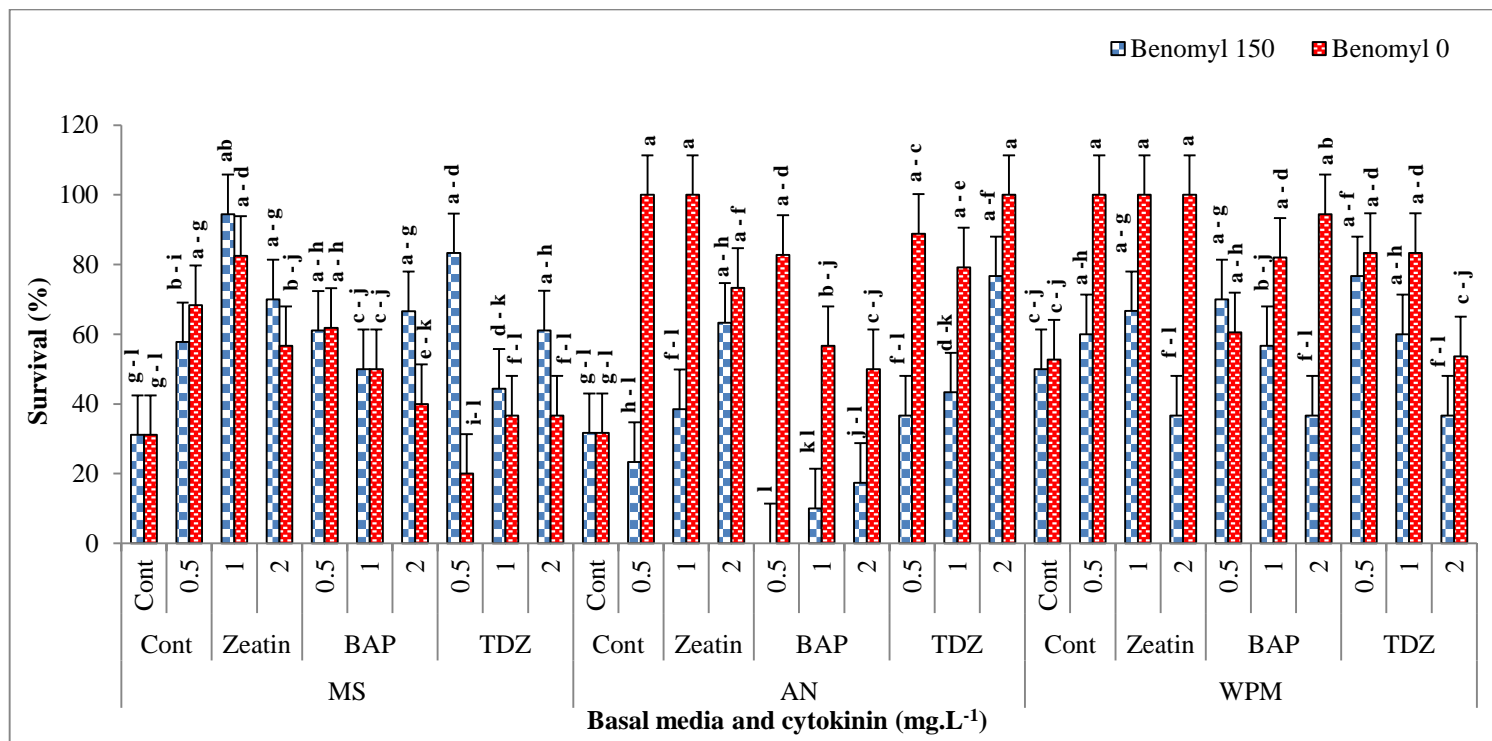
علاوه‌براین، همان طوری که در شکل ۳- A مشاهده می‌شود در محیط کشت پایه MS، درصد ریزنمونه‌های برگ داده در محیط حاوی بنومیل بیشتر از محیط فاقد بنومیل بوده، ولی در محیط کشت‌های AN و WPM درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها تحت تأثیر بنومیل درون محیط کشت به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (شکل ۴- G, H, I). به طوری که، در محیط‌های کشت AN و WPM در حضور هر سه سیتوکینین (BAP، زآتین و TDZ) استفاده از بنومیل در ترکیب محیط کشت باعث کاهش معنی‌دار درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها شده است، ولی در محیط کشت MS با توجه به نوع سیتوکینین تأثیر بنومیل متفاوت بود. برای نمونه، در محیط کشت MS حاوی تمام غلظت‌های TDZ درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها در حضور بنومیل در مقایسه با محیط کشت فاقد آن به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در حالی که در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP استفاده از بنومیل باعث کاهش ولی در غلظت‌های ۰/۵ و دو میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها شده است. البته، بین محیط کشت‌های پایه MS، AN و WPM حاوی بنومیل و محیط کشت‌های بدون بنومیل با توجه به نوع و غلظت سیتوکینین مورد استفاده از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به طور کلی در محیط کشت MS، استفاده از بنومیل درون محیط کشت درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را نه تنها کاهش نداده بلکه در تیمار TDZ باعث بهبود زنده‌مانی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاپ شد (شکل ۳- B). طبق نتایج بدست آمده در بیشتر موارد افزودن بنومیل به محیط‌های کشت AN و WPM درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد. علاوه‌براین، در محیط کشت‌های AN و WPM در بیشتر سطوح سیتوکینین مورد استفاده از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری بین محیط‌کشت‌های حاوی



شکل ۳- تأثیر محیط کشت، بنومیل و تنظیم کننده رشدی بر A: درصد برگ دهی و B: درصد زنده ماننی ریزنمونه های گره قره قاط در شرایط درون شیشه ای

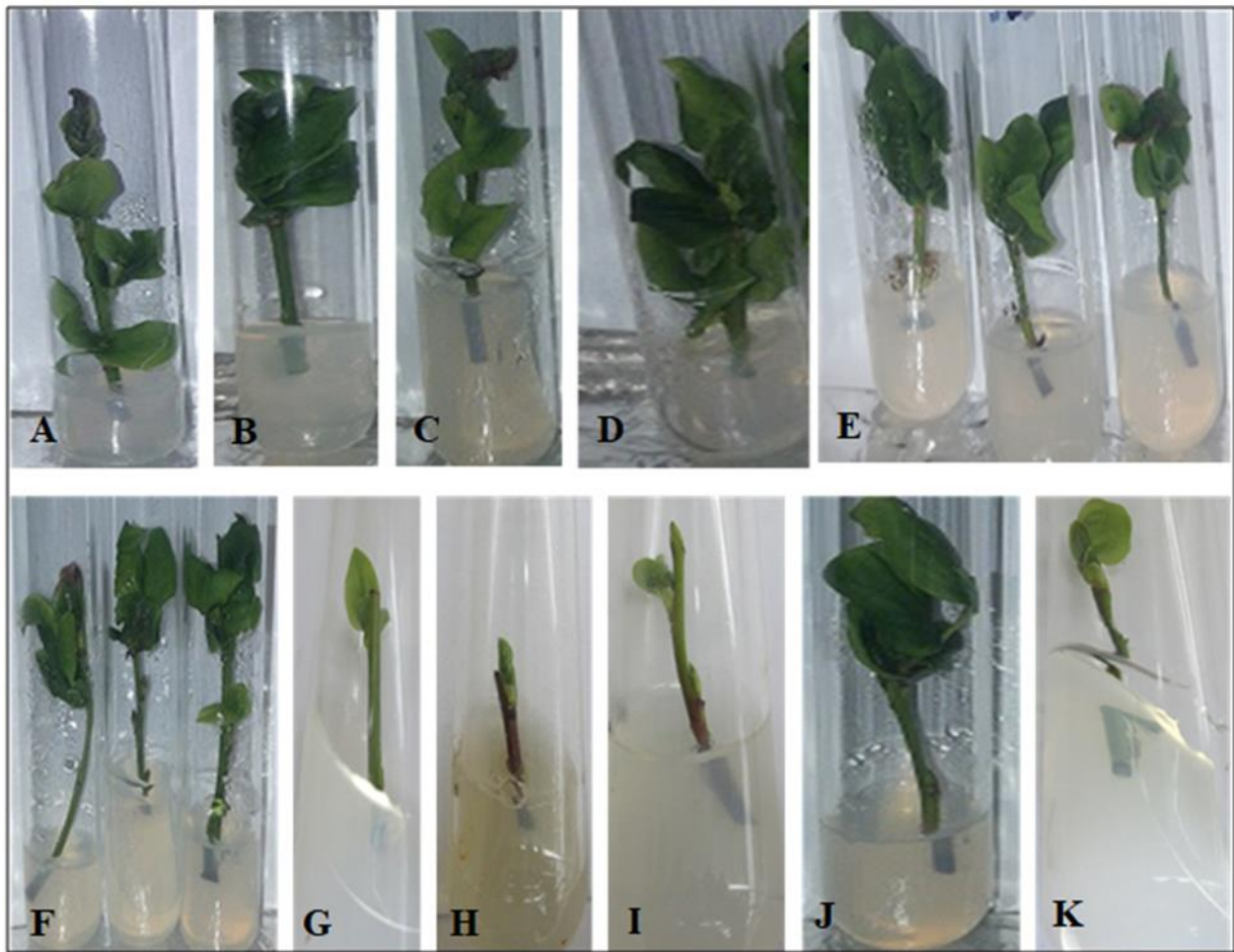
Figure 2. Effects of culture medium, benomyl, and plant growth regulator on percentage of A: Foliation and B: Survival of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants under *in vitro* conditions





ادامه شکل ۳- تأثیر محیط کشت، بنومیل و تنظیم کننده رشدی بر A: درصد برگ دهی و B: درصد زندهمانی ریزنمونه های گره قره قاط در شرایط درون شیشه ای

**Figure 2. Effects of culture medium, benomyl, and plant growth regulator on percentage of A: Foliation and B: Survival of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants under *in vitro* conditions**



شکل ۴- استقرار و رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاط در محیط کشت‌های مختلف

**Figure 4. Establishment and growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants in different culture media**

A, B, and C: WPM medium containing zeatin 0.5, 1, and 2 mg.L<sup>-1</sup>, respectively and IBA 0.1 mg.L<sup>-1</sup>; D, E, and F: AN medium containing zeatin 0.5, 1, and 2 mg.L<sup>-1</sup>, respectively and IBA 0.1 mg.L<sup>-1</sup>; G, H, and I: AN medium containing zeatin 0.5, 1, and 2 mg.L<sup>-1</sup>, respectively and IBA 0.1 mg.L<sup>-1</sup> and benomyl 150 mg.L<sup>-1</sup>; J and K (Stem production): MS medium containing zeatin 2 mg.L<sup>-1</sup> and IBA 0.1 mg.L<sup>-1</sup>, lacking benomyl and containing benomyl 150 mg.L<sup>-1</sup>, respectively

## بحث

ریزنمونه‌ها و جلوگیری از رشد عوامل میکروبی در کشت‌های درون شیشه‌ای ضروریست. در این تحقیق، ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف بنومیل درون محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر بروز آلودگی‌های میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس برهم‌کنش بین سیتوکینین‌های مختلف و بنومیل از نظر رشد ریزنمونه‌های گره در گیاه قره‌قاط مطالعه شد. نتایج نشان داد تأثیر بنومیل در ترکیب محیط کشت بر بروز آلودگی قارچی و همچنین رشد و نمو ریزنمونه‌های گره‌ای گیاه قره‌قاط با توجه به غلظت بنومیل متفاوت است.

محیط کشت مورد استفاده در کشت سلول و بافت گیاهی به دلیل داشتن مواد معدنی و آلی به‌ویژه هیدروکربن‌ها، مستعد رشد میکروب‌ها و بروز آلودگی است. زمانی که ریزنمونه‌ها از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی و رویشگاه طبیعی تهیه می‌شود، به‌علت بالا بودن آلودگی باکتریایی و قارچی بافت‌ها و اندام‌های گیاهی، احتمال بروز آلودگی در کشت‌های درون شیشه‌ای نیز زیاد خواهد بود. بنابراین، برای کنترل مؤثر آلودگی‌های میکروبی و تأمین شرایط مناسب برای رشد و نمو ریزنمونه‌ها، استفاده از روش مناسب برای ضدعفونی مؤثر

جدول ۲- تأثیر محیط کشت پایه، بنومیل و تنظیم کننده رشدی بر رشد ساقه در ریزنمونه‌های گره قره‌قاپ

**Table 2. Effects of culture medium, benomyl, and plant growth regulator on stem growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants**

Basal medium + cytokinin	Benomyl 0 mg.L <sup>-1</sup>	Benomyl 150 mg.L <sup>-1</sup>
MS + 0.5 ZT	**	**
MS + 1 ZT	***	-
MS + 2 ZT	***	-
MS + 0.5 BAP	***	*
MS + 1 BAP	***	**
MS + 2 BAP	***	-
MS + 0.5 TDZ	-	-
MS + 1 TDZ	**	-
MS + 2 TDZ	*	*
MS (Without hormone)	-	-
AN + 0.5 ZT	***	-
AN + 1 ZT	***	-
AN + 2 ZT	***	-
AN + 0.5 BAP	*	-
AN + 1 BAP	-	*
AN + 2 BAP	*	-
AN + 0.5 TDZ	-	-
AN + 1 TDZ	**	-
AN + 2 TDZ	**	**
AN (Without hormone)	-	-
WPM + 0.5 ZT	**	**
WPM + 1 ZT	*	**
WPM + 2 ZT	-	**
WPM + 0.5 BAP	*	**
WPM + 1 BAP	*	*
WPM + 2 BAP	**	**
WPM + 0.5 TDZ	*	*
WPM + 1 TDZ	-	-
WPM + 2 TDZ	-	**
WPM (Without hormone)	-	-

\*\*\*: Shoots with length of 3-4 cm, \*\*: Shoots with length of 2-3 cm, \*: Shoots with length of 0.5-1 cm, -: Without stem growth

غلظت‌های بالاتر درون محیط کشت باعث کاهش درصد رشد ریزنمونه‌ها می‌شود. همان‌طوری که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در تیمار شاهد نیز درصد آلودگی قارچی بسیار پایین بوده، در نتیجه اختلاف آماری بین تیمار شاهد و تیمارهای حاوی قارچ کش بنومیل مشاهده نشده است. یکی از علت‌های این نتیجه، ممکن است کارآیی بالای تیمار ضدعفونی مورد استفاده (کاربرد تلفیقی  $H_2O_2$  و هیپوکلریت سدیم) برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها قبل از کشت و در نتیجه حذف حداکثری آلودگی‌های احتمالی موجود باشد.  $H_2O_2$  یک مولکول خنثی و کوچکی است که می‌تواند به سرعت به غشای میکروارگانیسم‌ها نفوذ کرده و باعث تولید رادیکال‌های هیدروکسیل آزاد شود و در نتیجه موجب اکسیداسیون DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی میکروارگانیسم‌ها شده بدون آنکه محصولات جانبی سمی تولید کند (Linley et al., 2012). با توجه به بهره‌وری بالا از نظر ضدعفونی ریزنمونه‌ها و سمیت کم برای گیاه، از  $H_2O_2$  برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های گیاهی، از جمله گل کلم، یاس و انار استفاده شده است (Curvetto et al., 2006; Bhawana et al., 2015). غلظت و مدت زمان استفاده از  $H_2O_2$  برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها متفاوت است و به نوع و گونه گیاهی بستگی دارد (Duan et al., 2016).

نتایج این تحقیق نشان داد که در کشت‌های درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های گره قره‌قاط از نظر درصد ریزنمونه‌های برگ‌داده و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اثر متقابل معنی‌داری بین نوع محیط کشت پایه، بنومیل، نوع و غلظت سیتوکینین وجود دارد. در محیط کشت پایه MS، درصد ریزنمونه‌های برگ‌داده در محیط حاوی بنومیل بیشتر از محیط فاقد بنومیل بوده، به‌طور کلی در محیط کشت MS استفاده از بنومیل (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) درون محیط کشت رشد ریزنمونه‌های گره قره‌قاط (درصد زنده‌مانی و برگ‌دهی ریزنمونه‌ها) با توجه به نوع و غلظت سیتوکینین متفاوت بوده و به‌ویژه در محیط حاوی TDZ باعث بهبود رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط در شرایط درون شیشه‌ای شده است.

به‌طوری که افزودن بنومیل (در غلظت‌های پایین‌تر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به ترکیب محیط کشت MS (فاقد ترکیب هورمونی) نسبت به محیط کشت بدون بنومیل (تیمار شاهد) موجب افزایش رشد ریزنمونه‌ها و کاهش میزان قهوه‌ای‌شدگی آنها می‌شود. به‌طوری که بیشترین میزان رشد ریزنمونه بافت گره‌ای گیاه قره‌قاط (۴۶٪/۶۶) مربوط به محیط کشت حاوی ۴۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل بود. Santos و همکاران (۲۰۱۶) با افزودن بنومیل به محیط کشت MS برای کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های *Azadirachta indica* گزارش کردند که اثر قارچ‌کش بنومیل درون محیط کشت مشابه سیتوکینین است. به‌نحوی که طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، وجود بنومیل در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، تأثیری همانند سیتوکینین داشته و در مقایسه با محیط کشت فاقد بنومیل (نمونه شاهد) رشد ریزنمونه‌ها را افزایش داده است. Haldeman و همکاران (۱۹۸۷) تأثیر بنومیل را بر کنترل آلودگی داخلی ریزنمونه‌های *Camellia sinensis* مورد بررسی قرار داده و بهترین نتایج (۱۰۰٪ رفع آلودگی قارچی) را زمانی بدست آوردند که ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل کشت شدند. همچنین گزارش شده است که افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل درون محیط کشت MS، ۹۳/۳۳ تا ۱۰۰٪ آلودگی قارچی ریزنمونه‌های *Citrus limonia osbeck* کنترل می‌شود (Eed et al., 2010) که با نتایج حاصل در این تحقیق همسو می‌باشد. علاوه بر این، Paul و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که استفاده از بنومیل درون محیط کشت برای رفع آلودگی ریزنمونه‌های *Anacardium huvia* مؤثر نبوده است. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که افزودن بنومیل و کاربندازیم به‌عنوان قارچ‌کش به محیط کشت MS حاوی BAP و IBA موجب کاهش آلودگی و همچنین کاهش میزان رشد ریزنمونه‌های خرما (*Date palm*) می‌شود (Sherif et al., 2018). Altan و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی کشت درون شیشه‌ای *Lilium candidum* L. بیان کردند که افزودن بنومیل در

تأثیر مثبتی بر رشد ریزنمونه‌های *Azadirachta indica* داشته است که با نتایج این تحقیق در گیاه قره‌قاط همسوست. نتایج حاصل (شکل ۳- A و B)، بیانگر تأثیر منفی وجود بنومیل درون بیشتر محیط کشت‌های پایه به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روی درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گره‌ای گیاه قره‌قاط کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. این در حالیست که وجود بنومیل در محیط کشت پایه MS حاوی TDZ در غلظت‌های مختلف بر خلاف سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، تأثیر مثبتی بر رشد ریزنمونه‌ها داشته است. همچنین وجود تأثیر مثبت بنومیل در غلظت‌های پایین‌تر بر رشد ریزنمونه‌ها در نارنگی، آناناس، گل داوودی و مارچوبه نیز به‌ویژه در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند BAP، 2ip و ZATین گزارش شده است. George و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی تأثیر بنومیل و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر رشد ریزنمونه‌های گیلاس در شرایط درون شیشه‌ای بیان کردند که افزودن بنومیل در غلظت‌های پایین‌تر (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه IBA، 2ip و BAP (در غلظت‌های کمتر) به محیط کشت MS، تأثیر مناسبی بر رشد ریزنمونه‌ها دارد.

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی به‌ویژه در مراحل انتقال سلول گیاهی از G1 به S و G2 به M نقش بسیار مهمی دارند. علاوه‌براین، این تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارای وظایف مشخص و مهمی در رشد و نمو گیاه هستند و از آنجا که هر دو هورمون به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی، قابلیت سنتز در بیشتر قسمت‌های گیاه و داشتن وظیفه انتقال پیام در فرایند نمو دارند، بنابراین از این جهت برهم‌کنش اکسین و سیتوکینین در فرایندهای توسعه و نمو بسیار مورد اهمیت است (Zhao et al., 2010).

در این تحقیق، سیتوکینین زآتین در مقایسه با BAP و TDZ برای استقرار و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های قره‌قاط به‌ویژه در محیط فاقد بنومیل مناسب‌تر بود. Cuce و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تأثیر محیط کشت پایه و غلظت‌های مختلف زآتین، BAP و 2ip بر رشد

این در حالیست که در محیط کشت‌های AN و WPM استفاده از بنومیل در ترکیب محیط کشت، رشد (درصد زنده‌مانی و برگ‌دهی) ریزنمونه‌های گره قره‌قاط را بدون توجه به نوع سیتوکینین، به‌طور معنی‌داری کاهش داد. این نتایج مؤید اثر متقابل بین محیط کشت پایه، بنومیل و نوع و غلظت سیتوکینین مورد استفاده است. علاوه‌براین، به نظر می‌رسد این اثر متقابل بنومیل و نوع و غلظت سیتوکینین بیشتر در محیط کشت MS اتفاق افتاده است. با توجه به اینکه محیط کشت MS غنی از ترکیب‌های نمکی به‌ویژه  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  است، اثر متقابل بین غلظت این ترکیبات و بنومیل که می‌تواند به‌عنوان یک مکمل سیتوکینین عمل کند (Santos et al., 2016) احتمالاً باعث افزایش رشد ریزنمونه‌های گره قره‌قاط در این محیط می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده اهمیت و تأثیر اثر متقابل بین نوع محیط کشت پایه و بنومیل در پاسخ کشت بافتی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط است. البته، نیاز سلول‌ها و بافت‌های گیاهی برای پاسخ رشدی بهینه در شرایط درون شیشه‌ای با توجه به گونه گیاهی و همچنین نوع ریزنمونه متفاوت است. بر همین اساس، فرمولاسیون‌های متعددی براساس نوع و غلظت مواد معدنی و همچنین مواد آلی مورد استفاده در ترکیب محیط کشت ارائه شده است (George et al., 2008). همچنین تأثیرات بنومیل درون محیط کشت پایه به نوع ریزنمونه، گونه گیاهی و شرایط رشدی گیاه پایه مادری بستگی دارد (Paul et al., 2001). در این تحقیق نیز پاسخ رشدی ریزنمونه‌های گره قره‌قاط در محیط‌کشت‌های AN، MS و WPM متفاوت بود.

Brown و همکاران (۱۹۸۲) با بررسی تأثیر انواع قارچ‌کش و ترکیب‌های ضد باکتریایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه ارکید، بیان کردند در استفاده از بنومیل درون محیط کشت احتیاط لازم را باید رعایت کرد، زیرا بنومیل یک ممانعت‌کننده رشد ریزنمونه‌های ارکید قایقی (*Cymbidium*) در شرایط درون شیشه‌ای است. در حالی که، Santos و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که با اضافه کردن غلظت‌های پایین‌تر بنومیل درون محیط کشت MS،

## References

- Akhondzadeh, Sh., 2000. Encyclopedia of Medicinal Plants Iran. Arjmandi Publishing, 222p.
- Altan, F., Bürtün, B. and Shahin, N., 2010. Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. African Journal of Biotechnology, 9(7): 991-995.
- Anderson, W.C., 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. Acta Horticulturae, 112: 124-132.
- Bhawana, J.M., Stubblefield, A.L. and Newsome, A.B., 2015. Surface decontamination of plant tissue explants with chlorine dioxide gas. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 51: 214-219.
- Brown, D.M., Groom, C.I., Cvitanik, M., Brown, B., Cooper, J. and Arditti, J., 1982. Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1: 165-180.
- Cuce, M., Bektas, E. and Sokmen, A., 2013. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. Via Lateral-bud culture. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37: 40-44.
- Curvetto, N., Marinangeli, P. and Mockel, G., 2006. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology. Biocell, 30(3): 497-500.
- Daryani, P., Zare, N., Chamani, E., Sheikhzadeh-Mossadeg, P. and Javadi-Mojaddad, D., 2016. Evaluation of the effects of different basal medium and plant growth regulators on *in vitro* growth of hazelnut. Journal of Horticultural Science, 30: 417-422.
- Darroudi, M., Vaezi Kakhki, M.R. and Safipour Afshar, A., 2016. Effect of type of hormone and base concentration on germination and infusion of *Rosa Sanaz* (*Rosa chinensis* var. Elvis). Iranian Journal of Plant Production Research, 23: 59-74.
- Duan, Y., Zhao, F., Li, H., Zhou, Y., Zhu, X., Li, F., Chen, W. and Xue, J., 2016. Evaluation of aqueous chlorine dioxide for disinfecting plant explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 52: 38-44.
- Eed, A.M., Reddy, S.A., Reddy, K.M., da Silva, J.A.T., Reddy, P.V., Beghum, H. and Venkatsubbaiah, P.Y., 2010. Effect of antibiotics and fungicides on the *in vitro* production *Citrus limonia* osbeck nodal segment and shoot tip explants. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 4(1): 66-70.
- Firoozi, B., Nasser, Z., Sofalian, O. and Sheikhzadeh-Mosadegh, P., 2019. *In vitro* indirect somatic embryogenesis and secondary metabolites production in the saffron: Emphasis on ultrasound and plant

ریزمنونه‌های *V. arctostaphylos* نتیجه گرفتند که محیط کشت AN حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA عملکرد بهتری را نشان دادند. در کشت درون شیشه‌ای گونه *V. arctostaphylos* تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA در محیط کشت WPM در استقرار گیاه مؤثرتر بود (Meiners *et al.*, 2007). البته، نتایج مشابهی مبنی بر افزایش درصد موفقیت کشت ریزمنونه‌های *V. arctostaphylos* در مرحله استقرار در حضور غلظت‌های پایین زآتین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) گزارش شده است (Gajdosova *et al.*, 2006). تأثیر زآتین در کشت درون شیشه‌ای و در مرحله استقرار ریزمنونه‌های گره‌ای گونه *V. corymbosum* نیز بسیار کارآمدتر از TDZ و 2ip نشان داده شده است (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

بنابراین، به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در این تحقیق استفاده از غلظت‌های بالاتر (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بنومیل در محیط کشت پایه MS علاوه بر عدم تأثیر بر میزان کنترل آلودگی ریزمنونه‌های گره‌ای قره‌قاپ کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای، میزان رشد ریزمنونه‌های کشت شده را تحت تأثیر قرار داده، در نتیجه موجب از بین رفتن آنها می‌شود. این در حالیست که استفاده از غلظت‌های پایین‌تر علاوه بر کنترل مناسب آلودگی‌های ناشی از ریزمنونه، تأثیر منفی بر رشد ریزمنونه‌ها ندارد. همچنین طبق نتایج بدست آمده از آزمایش مربوط به استفاده از بنومیل در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با محیط‌های کشت پایه (MS، AN و WPM) به همراه انواع مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، وجود بنومیل درون محیط‌های کشت پایه AN و WPM تأثیر معنی‌دار و منفی بر میزان درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزمنونه‌ها داشت. این در حالیست که افزودن بنومیل به محیط کشت پایه MS میزان درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزمنونه‌ها را افزایش داد. همچنین افزودن بنومیل به محیط کشت حاوی TDZ در غلظت‌های مختلف بر خلاف سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (زآتین و BAP)، تأثیر منفی بر رشد ریزمنونه‌ها نداشت.

- cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Noruzpour, M., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Sheikhzade-Mosadegh, P., 2019a. Effect of culture media and plant growth regulators on *in vitro* growth and production of secondary metabolites in *Vaccinium arctostaphylos* L. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50: 451-464.
  - Noruzpour, M., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Sheikhzade-Mosadegh, P., 2019b. The effect of auxin and signaling compounds on growth and production of secondary metabolites in *in vitro* cultures of Whortleberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27: 45-58.
  - Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruskova, E. and Gajdosova, A., 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis*, 607: 207-212.
  - Paul, A.L., Ferl, R.J., Semer, C. and Kucharek, T., 2001. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic *arabidopsis* plants for a Space Shuttle flight experiment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 480-485.
  - Reed, B.M. and Abdelnour-Esquivel, A., 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *Horticultural Science*, 26: 1320-1322.
  - Santos, E.P., de Souza, R.A., Medeiros, M., Alves, G.D. and Houllou, L.M., 2016. Effects of the bendazol fungicide on *in vitro* development of the neem (*Azadirachta indica* A. JUSS). *Research in Biotechnology*, 7: 79-85.
  - Sherif, F., El-Sharabasy, Z. and Zayed, E., 2018. Silver nanoparticles, antibiotics and fungicide to control microbial activity during establishment of date palm explants *in vitro*. *Scientia Agriculturae*, 21(2): 57-63.
  - Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M., 2014. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research*, 28: 711-717.
  - Zhao, Z., Andersen, S., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. and Lohmann, J.U., 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, 465: 1089-1092.
  - growth regulators. *Journal of Agricultural Sciences*, 25(1): 1-10.
  - George, E.F., Micheal, A.H. and Greet-Jan, D.K., 2008. The components of plant tissue culture media I, macro and micro nutrients: 65-113. In: George, E.F., Micheal, A.H. and Greet-Jan, D.K., (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture (Vol. 1) The Background*. Springer, Dordrecht, 504p.
  - Gajdosova, A., Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruskova, E. and Simala, D., 2006. Microconal propagation of *Vaccinium* sp and *Rubus* sp and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *Juornal Fruit Ornam Plant Research*, 14: 103-119.
  - Haldeman, J.H., Thomas, R.L. and McKamy, D.L., 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. *HortScience*, 22: 306-307.
  - Kazeroonian, R., Kalatejari, S., Mousavi, A. and Tohidfar, M., 2017. Reaction of various explants of a *Chrysanthemum morifolium* cultivar to plant growth regulators *in vitro*. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(3): 527-534.
  - Leifert, C., Waites, W.M. and Nicholas, J.R., 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Juornal of Applied Microbiology*, 67: 353-361.
  - Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. and Maillard, J.Y., 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide, new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 1589-1596.
  - Lloyd, G. and McCown, B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings. Society USA, International Plant Propagators*, 30: 421-427.
  - Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I., 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium species*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89: 169-176.
  - Mitchell, S.A., Asemota, H.N. and Ahmad, M.H., 1995. Effects of explant source, culture medium strength, and growth regulators on the *in vitro* propagation of three Jamaican yams (*Dioscorea cayenensis*, *D. trifida* and *D. rotundata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(2): 173-180.
  - Murashige, T. and Skoog, F., 1977. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

## Effects of benomyl and cytokinin on *in vitro* contamination and growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants

M. Noruzpour<sup>1\*</sup>, N. Zare<sup>2</sup>, R. Asghari-Zakaria<sup>2</sup> and P. Sheikhzade-Mosadegh<sup>2</sup>

1\*- Corresponding author, Ph.D. student, of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, E-mail: m.noruzpuor@gmail.com

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: October 2021

Revised: January 2022

Accepted: February 2022

### Abstract

Microbial contamination is one of the main challenges and influential factors in the response of explants under *in vitro* cultures, especially in woody plants where the explants are prepared from natural habitats. In the present study, to investigate the effects of benomyl on microbial contamination and growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants, MS containing different concentrations of benomyl (0-2000 mg.L<sup>-1</sup>) was used. Furthermore, to investigate the interaction of benomyl, basal medium, and hormonal composition on the growth response of explants, different basal media (MS, AN, and WPM) containing IBA (0.1 mg.L<sup>-1</sup>), cytokinin (Zeatin, BAP, and TDZ, each at concentrations of 0, 0.5, 1, and 2 mg.L<sup>-1</sup>), and benomyl (0 and 150 mg.L<sup>-1</sup>) were studied. The results showed that benomyl in MS medium had no significant effect on the explants contamination, but use of lower benomyl concentrations (400 mg.L<sup>-1</sup> or less) could provide better growth conditions. Interaction of treatments significantly affected the percentage of survival and explants foliation. MS contained benomyl showed higher percentage of survival and foliation than MS without benomyl, but in AN and WPM media, the percentage of survival and foliation were significantly decreased in the presence of benomyl. Furthermore, in AN and WPM media contained cytokinin, the presence of benomyl significantly reduced the foliation percentage, while in MS medium, the effect of benomyl was different depending on the concentration and cytokinin type.

**Keywords:** Benomyl, zeatin, plant tissue culture, BAP, TDZ.