مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۴ شماره ۲ صفحه‌های ۲۸۷ تا ۳۰۲ (۱۴۰۲)
مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی باززایی درون شیشه‌ای انجیر رقم سبز با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره و نوک شاخساره

Optimizing *in vitro* Propagation of Fig Tree Cultivar Sabz Using Shoot Tip and Single Node Explants

محبوبه هداوندخانی [۱]، عباس یداللهی [۱*]، مسلم جعفری [۳]
۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. ایستگاه تحقیقات انجیر استهبان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۹
*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (yadollah@modares.ac.ir)

چکیده

هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی مراحل کشت درون شیشه‌ای انجیر رقم سبز بود. ابتدا برای مشخص نمودن مناسب‌ترین تیمار برای گندزدایی ریزنمونه‌ها از آلودگی باکتریایی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که در آن از غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفوتاکسیم استفاده شد. سپس در مرحله استقرار، اثرات دو محیط کشت MS, WPM و سطوح مختلف BA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی بررسی شد و پس از ۴ هفته شاخص‌های درصد بقاء، تعداد برگ و طول ساقه ریزنمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای مرحله پرآوری شاخساره از محیط پایه MS با غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با IBA (۰، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. نتایج آزمایش گندزدایی نشان داد که باکتری‌های درونزا با استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم با موفقیت حذف شدند. هم‌چنین نتایج آزمایش باززایی نشان داد که بالاترین درصد استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS و در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA مشاهده شد (۱۰۰ ٪) که به طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت WPM (۷۶/۴۹ ٪) بود. در مرحله پرآوری، بیش‌ترین تعداد شاخساره و بیش‌ترین تعداد برگ در تیمارهای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و هم‌چنین تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد (به‌ترتیب با ۲/۹۰ و ۲/۴۱ شاخساره و ۷/۷۷ و ۶/۷۸ برگ در هر ریزنمونه). هم‌چنین بیش‌ترین طول شاخساره در تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA، تیمار شاهد و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد (به‌ترتیب با ۱/۹۶، ۱/۴۸ و ۱/۵۱ سانتی متر طول شاخساره).

واژه‌های کلیدی: انجیر، مرحله استقرار، سفوتاکسیم، مرحله پرآوری، درصد زنده‌مانی.

مقدمه

انجیر از غرب آسیا منشأ گرفته و توسط بشر به نواحی مدیترانه‌ای گسترش یافته است. منشأ انجیر خوراکی، منطقه‌ای در جنوب عربستان گزارش شده و به عنوان یک محصول مهم در تمدن‌های اولیه‌ی مدیترانه‌ای هم ردیف انگور، خرما و زیتون شناخته شده است. انجیر خوراکی با نام علمی *Ficus carica* L. گونه‌ای دیپلوئید (2n=2x=26) خزان‌دار و نیمه گرمسیری، متعلق به تیره توت‌سانان[۱] می‌باشد (Mars, M. 2001). در این تیره ۶۰ جنس و بیش از ۲۰۰۰ گونه گرمسیری و نیمه‌گرمسیری خزان کننده و همیشه سبز، درختی، درختچه‌ای بالارونده و علفی وجود دارد. پراکندگی انجیر در جهان نشان دهنده سازگاری این گیاه با شرایط مختلف آب و هوایی است. بررسی‌ها نشان داده که برخی از ارقام انجیر قادرند پتانسیل آب بیش از ۴- مگا پاسکال را تحمل کنند. بنابراین این درخت در مناطق خشک بسیار مورد توجه است و تحمل به خشکی سبب گسترش کشت

۱- Moraceae

این گیاه در شرایط دیم شده است. به طور کلی توسعه کشت دیم محصولات در کشور می‌تواند یکی از ابزارهای مهم در دستیابی به خودکفایی و ایجاد درآمد و اشتغال برای کشور و کاهش وابستگی به اقتصاد نفتی باشد (Yadollahi *et al*., 2016). افزایش سریع جمعیت و کمبود مواد غذایی سبب شده که پژوهشگران در جست و جوی روش‌های جدید و مؤثری به منظور افزایش بازدهی تولید مواد غذایی برآیند. افزایش کمی و کیفی محصولات کشاورزی در سال‌های اخیر مرهون تلاش‌های مداوم متخصصان این علم در تهیه رقم‌های مرغوب بوده است. یکی از ارزشمندترین این تلاش‌ها، تکنیک کشت بافت و سلول گیاهی است (Seyed – Tabatabai *et al*., 2015). انجیر به علت داشتن کلسیم و فسفر فراوان سبب رشد استخوان‌ها و رشد کودکان می‌گردد. میوه آن دارای بیش‌ترین مقدار کلسیم در بین میوه‌هاست و سبب قلیایی شدن خون می‌شود. ارزش غذایی انجیر خشک بیش‌تر از انجیر تازه است زیرا مقدار زیادی آب را که فاقد ارزش غذایی است از دست داده و با کم شدن نسبت مواد غیر مؤثر، ارزش غذایی آن بالا رفته است (Yadollahi *et al*., 2016). غلظت پلی‌آمین‌ها در میوه انجیر خشک از بسیاری از میوه‌ها بیش‌تر می‌باشد. میوه‌های انجیر حداقل ۱۷ اسید آمینه دارند که بیش‌تر آن‌ها را اسید آسپارتیک و گلوتامین تشکیل می‌دهند. با توجه به شرایط خاص حاکم بر بسیاری از مناطق ایران، مثل تنش خشکی، شوری و گرما که مانع گسترش کشت و کار بسیاری از گیاهان شده است، توجه به کشت انجیر به‌عنوان یک محصول مهم اقتصادی، که جایگاه ویژه‌ای را در میان محصولات کشاورزی به‌خود اختصاص داده اهمیت ویژه‌ای دارد و می‌تواند سهم بزرگی در اقتصاد کشاورزی کشور ایفا کند. به‌طوری که در شهرستان استهبان درآمد بسیاری از خانواده‌ها به تولید انجیر وابسته است و از این طریق امرار معاش می‌کنند. اهمیت اجتماعی و اقتصادی انجیر در کشورهای در حال توسعه از ابعاد گوناگون حائز اهمیت است. از آن جمله می‌توان به نقش‌های عمده‌ای نظیر تأمین بخشی از مواد غذایی مورد نیاز، تأمین ارز، گسترش صنایع تبدیلی کشاورزی، ایجاد اشتغال و جلوگیری از مهاجرت روستاییان به شهرها اشاره کرد (Yadollahi *et al*.,2016). دستیابی به موفقیت در ریزازدیادی گیاهان به عواملی زیادی از جمله ژنوتیپ، وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه، شرایط محیطی و ترکیب محیط کشت به‌خصوص تنظیم کننده‌های رشد بستگی دارد. با توجه به نقش بسیار مهمی که تکنیک‌های ریزازدیادی در تجاری‌سازی گیاهان دارند، فراهم کردن یک روش مناسب و هم‌چنین کارآمد برای باززایی کامل، سریع و هم‌چنین تولید انبوه گیاه در شرایط درون شیشه‌ای یکی از اهداف بسیار مهم بررسی‌های کشت بافت می‌باشد که می‌تواند یک بستر بسیار مناسب را برای انجام دیگر پژوهش‌ها، مانند مهندسی ژنتیک فراهم آورد. در خصوص کشت درون شیشه‌ای ارقام و پایه‌های مختلف انجیر تاکنون تحقیقات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است. نوع و غلظت این ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت گیاهی بر درصد استقرار ریزنمونه‌ها و هم‌چنین میزان پرآوری ریزنمونه و نوساقه‌های انجیر تأثیر می‌گذارد به‌طوری که نوع محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد و سایر ترکیبات به شدت بر روی کمیت و کیفیت گیاهچه‌ها اثرگذار هستند. در این رابطه گزارش‌های زیادی روی ریزازدیادی انجیر با استفاده از ریزنمونه های مختلف همچون کشت مریستم (Sahraroo *et al*., 2019 ; Demiralay *et al*., 1997)، قطعات گره (Hepaksoy and Aksoy. 2006، Pasqual and Ferreira. 2007)، نوک شاخساره (Shatnawi *et al*., 2013; Taha *et al*., 2013) ارائه شده است. هم‌چنین ریزازدیادی گیاه *Ficus religiosa* با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره و نوک شاخساره نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بالاترین راندمان را نشان داده است (Hassan, *et al*.,2009). پژوهشگران بسیاری از آنتی بیوتیک‌هایی شامل کربنیسیلین، پلی‌میکسین، سفالوتین، جنتامایسین، ریفامپیسن، استرپتومایسین، تیمنتین، سفتریاکسون، تتراسایکلین و سفوتاکسیم در محیط‌های کشت بافت گیاهی استفاده کرده‌اند (Shahcheraghi and Shekafande. 2014). تاکنون تحقیقات زیادی در رابطه با کشت درون شیشه‌ای انجیر رقم سبز صورت گرفته است. هدف از این پژوهش باززایی درون شیشه‌ای انجیر رقم سبز با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره و نوک شاخساره می‌باشد.

با توجه به ارزش بالای اقتصادی و خواص درمانی این محصول و نیز تقاضای روز افزون باغداران برای نهال انجیر تولید نهال سالم، یکنواخت امری ضروری به نظر می‌رسد. نیاز کشور به تولید ارقام و پایه‌های عاری از بیماری، هسته‌های اولیه و باغات مادری، ضرورت این پژوهش را بیش از پیش می‌کند. لذا در این پژوهش در راستای رسیدن به این هدف، استفاده از روش تکثیر درون شیشه‌ای جهت تکثیر انجیر رقم سبز مورد بررسی و آزمون قرار خواهد گرفت. لذا در پژوهش حاضر، هدف بهبود میزان درصد استقرار (کاهش میزان آلودگی قارچی و باکتریایی، افزایش ضریب باززایی ریزنمونه‌ها) و افزایش نرخ پرآوری (ضریب پرآوری – بهبود کیفی گیاهچه‌ها) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال ۹۹-۹۷ در آزمایشگاه ریزازدیادی شماره سه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در این پژوهش از درختان بالغ انجیر رقم سبز از شهرستان استهبان استان فارس، قلمه گرفته شده و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کشت شد. نمونه‌گیری در فصل بهار انجام شد برای تهیه ریزنمونه‌های مورد استفاده، شاخه‌های حاصل از رشد جدید گیاهان (سال جاری) به طول ۱۵سانتی‌متر از گیاهان مادری جدا و به آزمایشگاه ریزازدیادی شماره سه منتقل شدند. پس از این مرحله تمامی برگ‌های شاخساره‌ها حذف شدند و جهت جلوگیری از انتقال عوامل آلوده کننده، قیچی باغبانی و اسکالپل مورد استفاده بعد از چند بار برش با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی گردید.

ضدعفونی مواد گیاهی

پس از آماده‌سازی ریزنمونه‌ها آن‌ها در دو مرحله ابتدا با آب و بعد با آب و مایع ظرف‌شویی به دقت شستشو داده شدند. ابتدا تمامی ریزنمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول آب حاوی ۱۰ قطره مایع ظرف‌شویی پریل غوطه‌ور شدند، و بعد از آن ۳ تا ۴ بار به دقت با آب جاری شسته شدند. به منظور بر طرف کردن آلودگی‌های سطحی به مدت ۴۵ دقیقه در محلول ۲ در هزار کاپتان قرار گرفتند، سپس ۳ تا ۴ بار توسط آب مقطر استریل شده و با رعایت فاصله زمانی شستشو شدند. در نهایت ریزنمونه‌ها برای ادامه فرآیند ضدعفونی به زیر لامینار ایر فلو انتقال یافتند. بقیه مراحل ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها بدین شرح صورت گرفت:

ابتدا ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده و سپس با آب مقطر دو بار استریل شده سه دفعه شستشو داده شد. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلراکس ۵/۲۵ درصد قرار داده و مجدداً با آب مقطر دو بار استریل شده سه تا چهار بار با فاصله زمانی متفاوت با دقت شستشو داده شد و پس از خشک شدن ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت حاوی آنتی بیوتیک انتقال داده شدند، محیط کشت بدون آنتی بیوتیک (شاهد)، محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار شامل یک عدد شیشه مربایی) و در هر تکرار چهار ریزنمونه صورت گرفت.

مرحله استقرار

در این مرحله اثر چهار سطح مختلف BA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و نوع محیط کشت در دو سطح (MS و WPM) به صورت بر همکنش بررسی شد در این آزمایش دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفت، که فاکتور اول سطوح مختلف BA و فاکتور دوم نوع محیط کشت‌ها MS و WPM بود.

در آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت. داده‌برداری نیز بعد از گذشت چهار هفته از کشت انجام شد.

مرحله پرآوری

در این مرحله نمونه‌هایی که رشد کافی داشتند به محیط کشت پرآوری و شاخه‌زایی منتقل شدند. اثر چهار سطح مختلف (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) BAP و دو سطح (۰، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) IBA بررسی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه انجام شد. داده‌برداری بعد از گذشت یک ماه از کشت صورت گرفت. شرایط محیطی اتاق کشت شامل حدود ۲±۲۵ درجه سلسیوس، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس بود.

شکل ۱- گیاهان مادری.

Fig. 1. Mother plants.

شاخص‌هایی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت

درصد آلودگی باکتریایی، درصد نمونه‌های سالم حاصل از آزمایش ضدعفونی باکتریایی، تعداد برگ حاصل از رشد نمونه‌ها در مرحله استقرار، طول شاخساره‌ها (سانتی‌متر) حاصل از مرحله استقرار، درصد استقرار (بقاء) ریزنمونه‌ها در مرحله استقرار، تعداد برگ‌های حاصل از شاخساره‌های پرآوری شده، تعداد شاخساره‌های حاصل از مرحله پرآوری، . طول شاخساره پرآوری شده (سانتی‌متر) بود.

واکاوی آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌های صفات مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.0 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال $P<0.05$ صورت گرفت.. از نرم افزار Excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

مرحله گندزدایی

ضدعفونی اولیه ریزنمونه‌ها با استفاده از محلول الکل اتیلیک ۷۰ ٪ و محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه آلودگی قارچی را به‌طور کامل برطرف کرد. ولی آلودگی باکتریایی برطرف نشد. همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) مشاهده شد، نتایج نشان داد که استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم درصد آلودگی باکتریایی را کاهش می‌دهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم آلودگی باکتریایی را به‌طور کامل مرتفع کرد.

نتایج شکل ۲ نشان داد که اثر آنتی بیوتیک در درصد آلودگی باکتریایی اثر معنی‌دار داشت با افزایش میزان آنتی بیوتیک میزان آلودگی باکتریایی کاهش یافت. به طوری‌که بیش‌ترین میزان آلودگی در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان آلودگی در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک مشاهده شد.

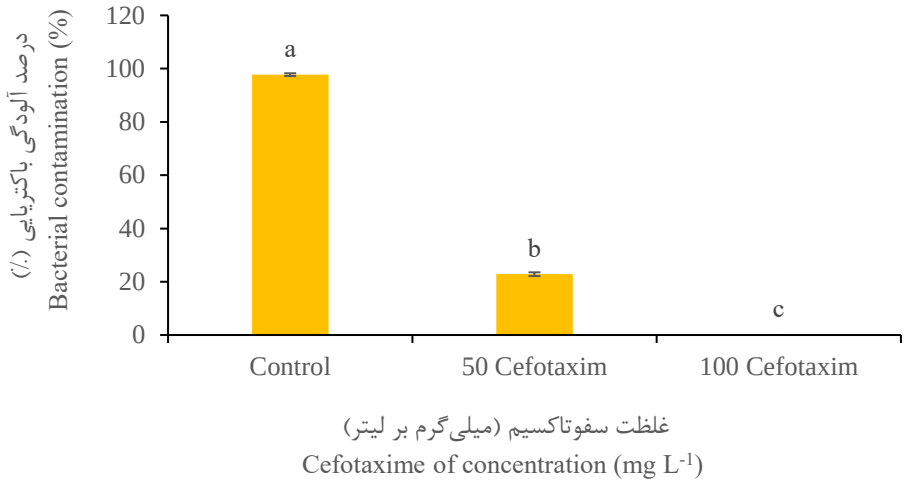
جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در کنترل آلودگی باکتریایی و درصد زنده‌مانی.

Table 1. Effect of different cefotaxime concentrations on controlling of bacterial contaminations and survival rate parameters.

غلظت سفوتاکسیم (میلی‌گرم بر لیتر) Concentration of Cefotaxime (mg L^{-1})	آلودگی باکتریایی Bacterial Contamination (%)	درصد بقاء Survival rate percentage
Cefotaxime 0	97.75±0.51[a]†	1.31±0.63[c]
Cefotaxime 50	22.84±0.70[b]	24.52±0.62[b]
Cefotaxime100	0.00±0.00[c]	100±0.00[a]

† Means in each column with the same letters are not significantly different at p<0.05, according to LSD test. Each value represents SE (±)

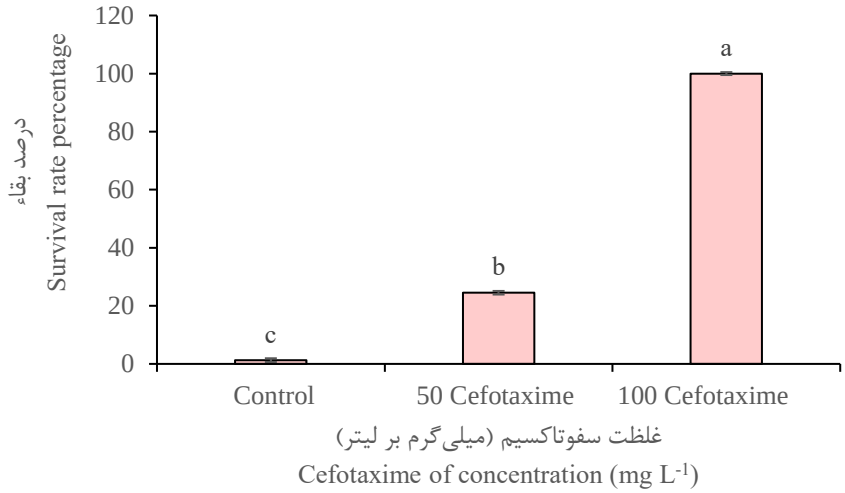
† مقایسه میانگین بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشند



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفوتاکسیم بر درصد آلودگی باکتریایی.

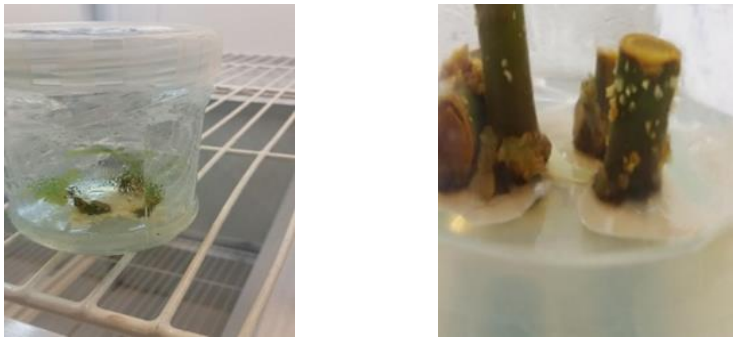
Fig. 2. The effect of different cefotaxime concentrations of bacterial contamination parameter.

نتایج شکل ۳ نشان می‌دهد که اثر آنتی بیوتیک در درصد بقاء ریزنمونه‌ها اثر معنی‌داری داشت. با افزایش میزان آنتی بیوتیک درصد بقاء افزایش یافت. به طوری‌که کم‌ترین درصد بقاء در تیمار شاهد و بیش‌ترین میزان زنده‌مانی (بقاء) در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد.



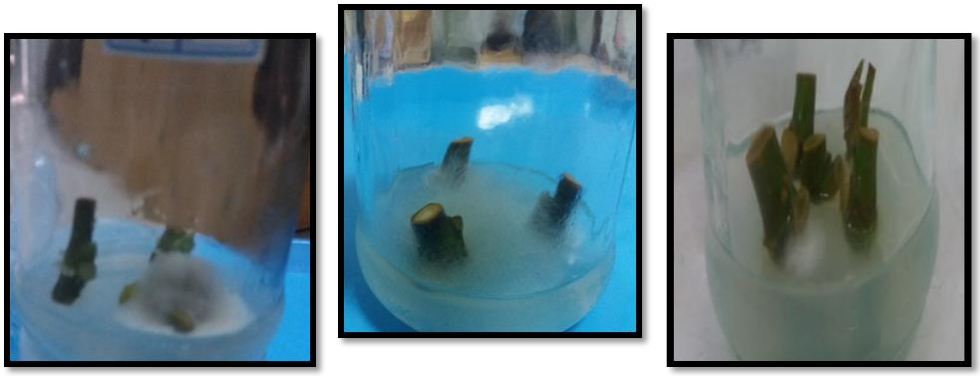
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفوتاکسیم بر درصد زنده‌مانی.

Fig. 3. The effect of different cefotaxime concentrations on Survival rate percentage parameter.



شکل ۴- آلودگی باکتریایی.

Fig. 4. Bacterial Contamination.



شکل ۵- آلودگی قارچی.

Fig. 5. Fungal infection.

مرحله استقرار

نتایج جدول ۲ مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین تعداد برگ (۷/۴۰ عدد) در محیط کشت MS در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد کم‌ترین تعداد برگ (۲/۷۹ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد که با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری داشتند و سایر تیمارها نیز با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. بیش‌ترین طول شاخساره (۳/۴۱ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد کم‌ترین طول شاخساره (۱/۲۹ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند و سایر تیمارها نیز با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. بیش‌ترین درصد بقاء (۱۰۰ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد کم‌ترین درصد بقاء (۴۹/۱۳ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در محیط کشت WPM نیز بیش‌ترین تعداد برگ (۵/۳۸ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد کم‌ترین تعداد برگ (۲/۰۸ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیش‌ترین طول شاخساره در این محیط کشت (۲/۰۸ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و کم‌ترین طول شاخساره (۰/۷۹ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند بین سایر تیمارها با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیش‌ترین درصد بقاء (۷۶/۴۹ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و کم‌ترین درصد بقاء (۲۶/۵۳ درصد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند سایر تیمارها با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند.

تعداد برگ

شکل ۶ نشان داد که اثر اصلی BA و اثر اصلی محیط کشت در این صفت معنی‌دار بود ولی اثر متقابل محیط کشت و BA معنی‌دار نبود. بهترین ترکیب هورمونی در هر دو محیط کشت، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بود با افزایش BA تعداد برگ

کاهش یافت، بیش‌ترین تعداد برگ (۷/۴۰ عدد) در محیط کشت MS در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد کم‌ترین تعداد برگ (۲/۷۹ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد که با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری داشتند و سایر تیمارها نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. در محیط کشت WPM نیز بیش‌ترین تعداد برگ (۵/۳۸ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد کم‌ترین تعداد برگ (۲/۰۸ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

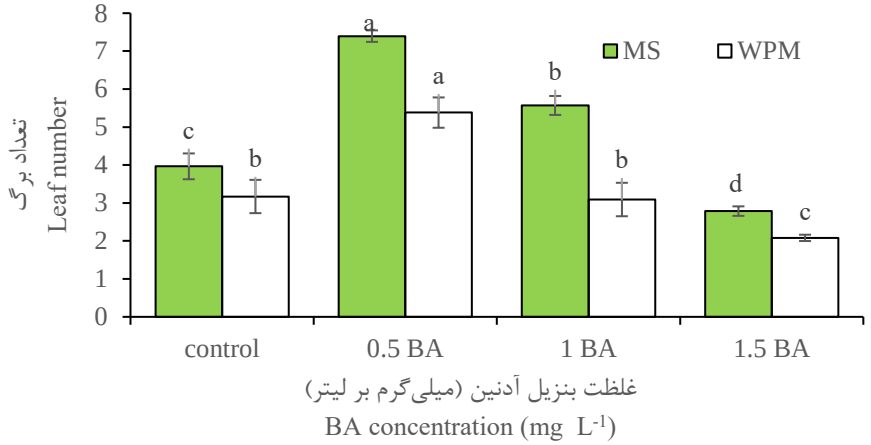
جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع محیط کشت بر صفات تعداد برگ، طول شاخساره (سانتی‌متر) و درصد بقاء.

Table 2. The effect of different concentrations of BA and type of medium on survival rate percentage, leaf number and shoot length (cm).

محیط کشت Medium culture	غلظت بنزیل آدنین (میلی‌گرم بر لیتر) BA (mg L^{-1})	تعداد برگ Leaf number	طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	درصد بقاء Survival rate percentage
MS	0	3.97± 0.37^{c}†	1.57±0.06^{c}	49.13±1.41^{d}
MS	0.5	7.40± 0.32^{a}	3.41±0.09^{a}	100±0.00^{a}
MS	1	5.57±0.34^{b}	2.20±0.11^{b}	84.22±2.49^{b}
MS	1.5	2.79±0.33^{d}	1.29±0.13^{d}	64.66±2.58^{c}
WPM	0	3.17±0.42^{b}	1.46±0.20^{b}	42.45±1.49^{b}
WPM	0.5	5.38±0.36^{a}	2.08±0.20^{a}	76.49±4.91^{a}
WPM	1	3.09±0.32^{b}	1.53±0.10^{b}	52.66±8.77^{b}
WPM	1.5	2.08±0.33^{c}	0.79±0.08^{c}	26.53±0.40^{c}

† Means in each column with the same letters are not significantly different at $p<0.05$, according to LSD test. Each value represents SE (±)

† مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ می‌باشند.

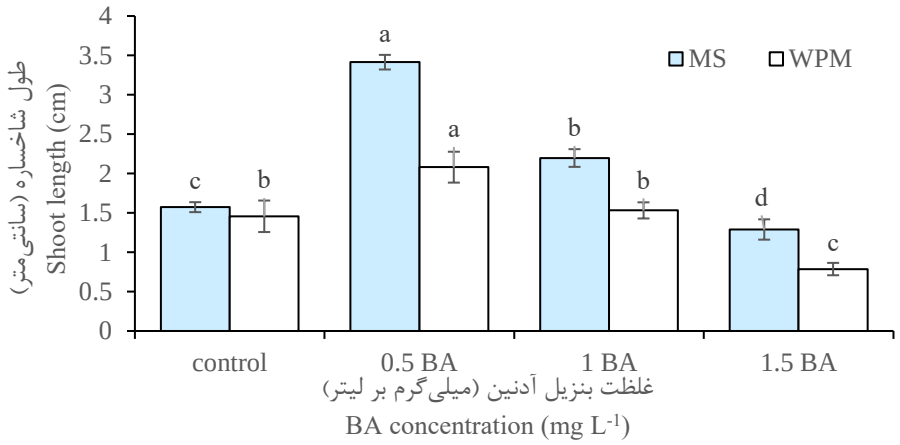


شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع محیط کشت بر روی تعداد برگ.

Fig. 6. The effect of different BA concentration and type of culture medium on leaf number parameter.

طول شاخساره

شکل ۷ نشان داد که اثر محیط کشت و اثر BA و برهمکنش محیط کشت و BA معنی‌دار بود به‌طوری‌که بیش‌ترین طول شاخه (۳/۴۱ سانتی‌متر) در محیط کشت MS در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد کم‌ترین طول (۱/۲۹ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد. در محیط کشت WPM بیش‌ترین طول شاخساره (۲/۰۸ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و کم‌ترین (۰/۷۹ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد و بین تیمار شاهد و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

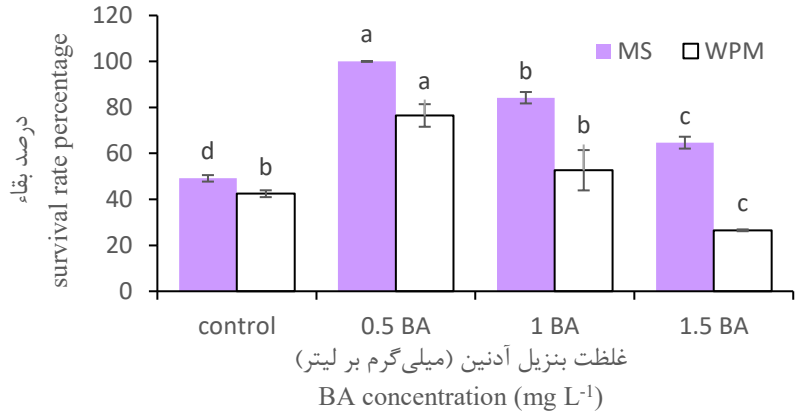


شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع محیط کشت بر طول شاخساره (سانتی‌متر).

Fig. 7. The effect of different BA concentration and type of culture medium on shoot length (cm) parameter.

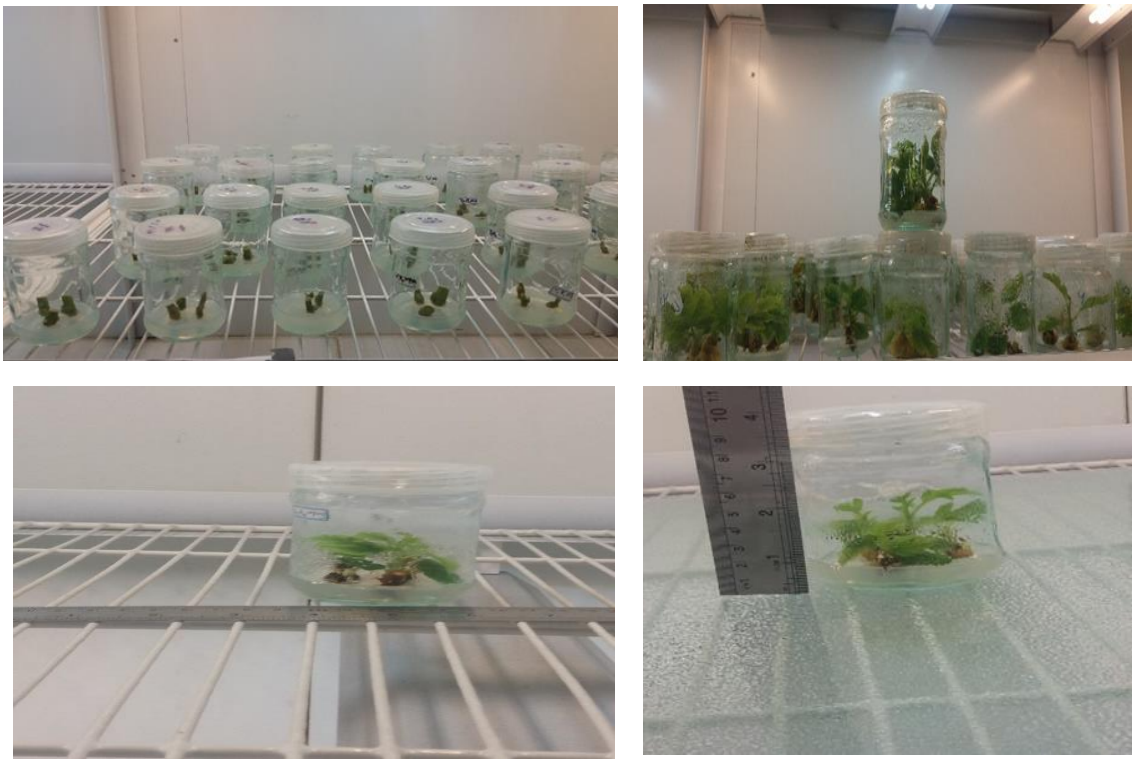
درصد بقاء

شکل ۸ نشان داد که اثر اصلی محیط کشت و اثر اصلی BA و هم‌چنین اثر متقابل محیط کشت و BA معنی‌دار بود به طوری‌که در محیط کشت MS در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بیش‌ترین درصد بقاء ریزنمونه‌ها مشاهده شد. کم‌ترین درصد (۴۹/۱۳ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد. در محیط کشت WPM بیش‌ترین درصد بقاء (۷۶/۴۹ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد. کم‌ترین درصد (۲۶/۵۳ درصد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد. نتایج نشان داد که با افزایش BA در هر دو محیط کشت درصد بقاء کاهش یافت.



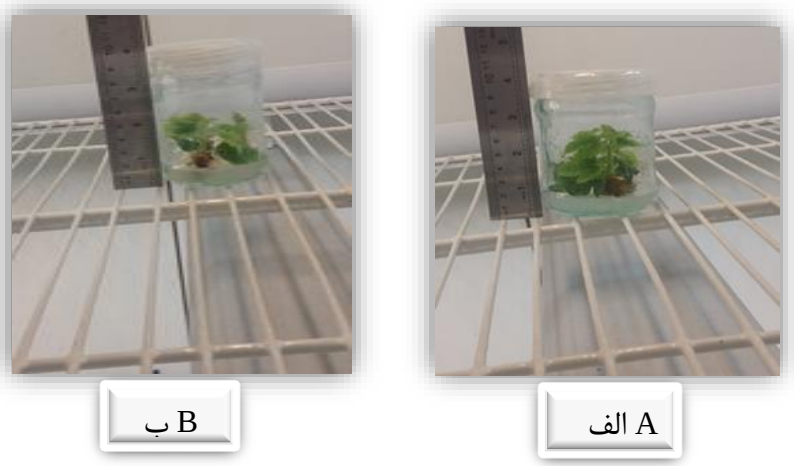
شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع محیط کشت بر روی درصد بقاء.

Fig. 8. The effect of different BA concentration and type of culture medium on survival rate percentage parameter.



شکل ۹- ریزنمونه‌های استقرار یافته در محیط کشت گیاهی.

Fig. 9. Established explants in the culture medium.



شکل ۱۰- الف: محیط کشت MS، ب: محیط کشت WPM

Fig. 10. A: MS Culture medium, B: WPM Culture medium.

مرحله پرآوری

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد برگ

نتایج جدول ۳ مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین تعداد برگ (۶/۷۸ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم BAP به تنهایی و کم‌ترین تعداد برگ (۳/۹۰ عدد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی مشاهده شد که با تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری داشت و بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (تیمار شاهد و تیمار ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP). هم‌چنین بیش‌ترین تعداد برگ (۷/۷۷ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد و در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدون حضور BAP (۲/۸۶ عدد) کم‌ترین تعداد برگ به‌دست آمد. که با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و دو تیمار ۱ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با حضور ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند.

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر تعداد برگ در مرحله پرآوری.

Table 3. The Effect of different concentrations of BAP and IBA of leaf number parameter at the proliferation stage.

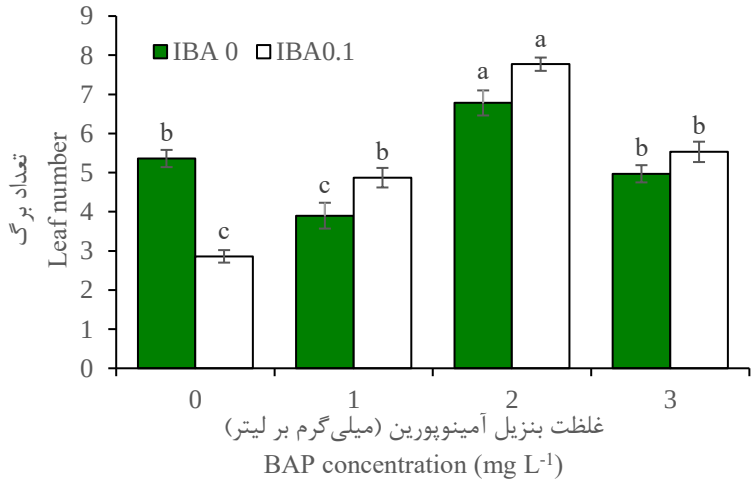
ایندول بوتریک اسید IBA (mg L^{-1})	بنزیل آمینوپورین BAP (mg L^{-1}) 0	1	2	3
0	5.36±0.23^{b}†	3.90±0.33^{c}	6.78±0.32^{a}	4.97±0.22^{b}
0.1	2.86±0.16^{c}	4.87±0.25^{b}	7.77±0.17^{a}	5.53±0.26^{b}

† Means with the same letters are not significantly different at p<0.05, according to LSD test. Each value represents SE (±)

† مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد. میانگین‌های دارای حروف مشابه بیان‌گر نداشتن اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ ٪ می‌باشند.

تعداد برگ

نتایج شکل ۱۱ نشان داد که بین دو تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌تنهایی و تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA تفاوت معنی‌داری وجود داشت. هم‌چنین با حضور IBA در صفت تعداد برگ اثر معنی‌داری نداشت. ولی حضور BAP اثر معنی‌داری بر صفت تعداد برگ داشت. با افزایش BAP تعداد برگ افزایش یافت.



شکل ۱۱- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر تعداد برگ.

Fig. 11. The effect of different BAP and IBA concentrations on leaf number parameter.

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد شاخساره

همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین جدول ۴ مشاهده شد، که بیش‌ترین تعداد شاخساره (۲/۴۱ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد و بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. هم‌چنین بیش‌ترین تعداد شاخساره (۲/۹۰ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و همراه با حضور ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد که بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت کم‌ترین تعداد شاخساره (۱/۰۸ عدد) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و بدون حضور BAP به‌دست آمد و بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش BAP تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر تعداد شاخساره افزایش می‌یابد و در غلظت‌های بالاتر سیتوکینین پرآوری کم‌تری را نشان دادند.

جدول ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر تعداد شاخساره در مرحله پرآوری.

Table 4. The effect of different concentrations of BAP and IBA on shoot number parameter at the proliferation stage.

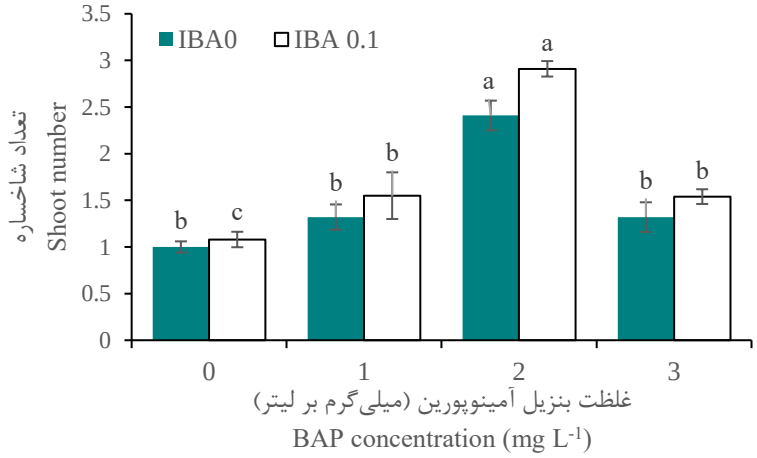
ایندول بوتریک اسید IBA (mg L^{-1})	بنزیل آمینوپورین BAP (mg L^{-1}) 0	1	2	3
0	1.00±0.06^{b}†	1.32±0.14^{b}	2.41±0.16^{a}	1.32±0.16^{b}
0.1	1.08±0.08^{c}	1.55±0.25^{b}	2.90±0.08^{a}	1.54±0.08^{b}

† Means with the same letters are not significantly different at $p<0.05$, according to the LSD test. Each value represents SE (±)

† مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد. میانگین‌های با حروف مشابه بیان‌گر نداشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ می‌باشند.

تعداد شاخساره

در شکل ۱۲ نتایج نشان داد که بیش‌ترین تعداد شاخساره در دو تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون و یا همراه با حضور ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد و بین بقیه تیمارها تفاوتی مشاهده نشد حضور ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در این صفت با توجه به نتایج معنی‌دار بوده ولی با توجه به نتایج مشاهده شد که اثر متقابل بین دو هورمون BAP و IBA معنی‌دار نبود.



شکل ۱۲- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر تعداد شاخساره.

Fig. 12. The effect of different BAP and IBA concentrations on shoot number parameter.

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر طول شاخساره (سانتی‌متر)

بر طبق جدول مقایسه میانگین جدول ۵ نتایج نشان داد که کم‌ترین طول شاخساره (۰/۹۶ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و بدون حضور IBA به‌دست آمد. هم‌چنین کم‌ترین طول شاخساره (۱/۰۴ سانتی‌متر) نیز مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. بیش‌ترین طول شاخساره در تیمار شاهد (۱/۴۸ سانتی‌متر) و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۱/۵۱ سانتی‌متر) مشاهده شد بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین بیش‌ترین طول شاخساره (۱/۹۶ سانتی‌متر) در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. حضور ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر روی طول شاخساره تأثیر معنی‌داری داشت. که این می‌تواند به این علت باشد که اکسین‌ها غالبیت انتهایی را سبب می‌شوند و حضور آن‌ها در محیط کشت باعث رشد مریستم انتهایی و افزایش طول شاخساره‌ها می‌شوند. با افزایش غلظت BAP طول نوساقه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که چنین امری با توجه به رابطه معکوس بین تعداد نوساقه و طول آن‌ها طبیعی به‌نظر می‌رسد.

جدول ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر روی طول شاخساره (سانتی‌متر).

Table 5. The effect of different concentrations of BAP and IBA on shoot length (cm) parameter at the proliferation stage.

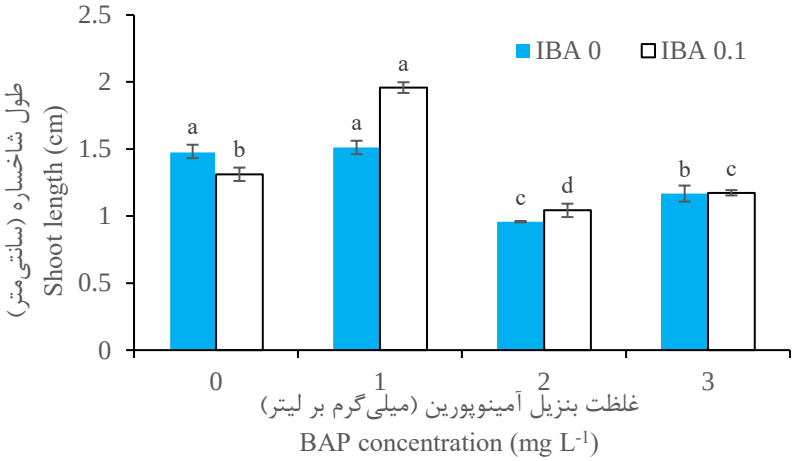
ایندول بوتریک اسید IBA (mg L^{-1})	بنزیل آمینوپورین BAP (mg L^{-1}) 0	1	2	3
0	1.48±0.05^{a}†	1.51±0.05^{a}	0.96±0.01^{c}	1.14±0.06^{b}
0.1	1.31±0.05^{b}	1.96±0.04^{a}	1.04±0.05^{d}	1.17±0.02^{c}

† Means with the same letters are not significantly different at $p<0.05$, according to LSD test. Each value represents SE (±).

†مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد. میانگین‌های با حروف مشابه بیان‌گر نداشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ می‌باشند.

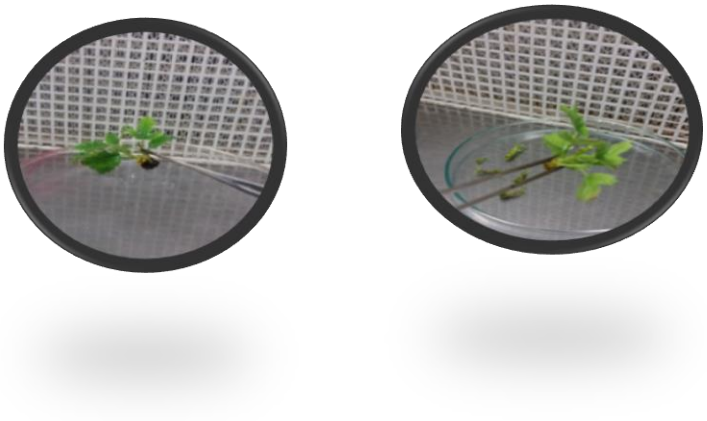
طول شاخساره (سانتی‌متر)

در شکل ۱۳ نتایج نشان داد که بیش‌ترین طول شاخساره (به ترتیب ۱/۵۱ سانتی متر+ ۱/۴۸ سانتی‌متر) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA و تیمار شاهد مشاهده شد که بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد کم‌ترین طول شاخساره در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌تنهایی و یا همراه با حضور ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. نتایج نشان داد که حضور اکسین و اثر متقابل بین BAP و IBA معنی‌دار بودند.



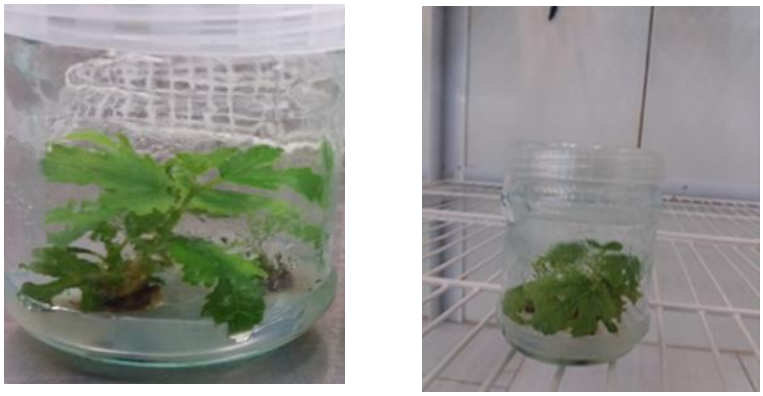
شکل ۱۳- غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر طول شاخساره (سانتی‌متر).

Fig. 13. The effect of different BAP and IBA concentrations on shoot length (cm) parameters.



شکل ۱۴- نوشاخه‌زایی و زیر کشت مجدد نوشاخه‌های تولید شده به محیط کشت جدید.

Fig. 14. Shoot regeneration and subculturing of them in a new medium.



شکل ۱۵- اثر BAP همراه با IBA بر شاخه‌زایی.

Fig. 15. Effects of BAP and IBA on shoot regeneration.

بحث

مرحله گندزدایی

زمانی‌که هدف از کشت درون شیشه‌ای تکثیر و تولید تجاری گیاهان باشد، لذا آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های بسیار جبران ناپذیری را به آن وارد کند. کنترل این نوع از آلودگی‌ها بویژه از نوع داخلی که هفته‌ها بعد از کشت بر روی محیط کشت ظاهر می‌شوند بسیار مشکل است. لذا مرحله ضدعفونی سطحی یکی از مراحل مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بر روی ریزنمونه‌ها، طی مراحل کشت بافت می‌باشد. در این تحقیق آلودگی‌های سطحی بسیار شدیدی در ریز نمونه‌ها مشاهده شد، ولی کاربرد هم‌زمان محلول هیپوکلریت سدیم و الکل اتیلیک ۷۰ ٪ آلودگی‌های قارچی را به‌طور کامل از بین بردند. با گذشت حدوداً چهار روز از کشت گیاهان، آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌ها مشاهده شد و گسترش یافتند. بنابراین به احتمال بسیار زیادی، آلودگی باکتریایی، در این گیاهان از نوع آلودگی اندوفیت بوده است. این نوع از آلودگی با استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور کامل بر طرف شد و نتایج این آزمایش با نتایج به‌دست آمده بر روی استقرار درون شیشه‌ای زیتون مطابقت داشت (Kiani Feriz *et al*., 2005).

مرحله استقرار

مرحله استقرار مهم‌ترین مرحله در کشت درون شیشه‌ای می‌باشد و هدف اصلی آن دستیابی به درصد بالای زنده‌مانی ریزنمونه‌ها می‌باشد. در این پژوهش در مرحله استقرار محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM برتری داشت و بیش‌ترین طول شاخساره، درصد بقاء و بیش‌ترین تعداد برگ در این محیط کشت مشاهده شد. هم‌چنین بهترین ترکیب هورمونی در هر

دو محیط کشت، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بود. حضور سیتوکینین‌ها برای تحریک رشد بسیار ضروری هستند، این در حالی می‌باشد که غلظت‌های بالای سیتوکینین‌ها محدود کننده رشد بوده و شاخساره‌های کوتاهی تولید می‌کنند (Wang & Hu, 2005). علت رشد بهتر در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM به‌دلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن به‌ویژه نیترات موجود در محیط کشت MS است، که مقدار آن تقریباً چهار برابر محیط کشت WPM است (Zarei *et al*., 2013). در همین رابطه، گزارش شده است که استقرار و پرآوری *Prunus virginiana* در محیط کشت MS بهتر از محیط کشت WPM بوده است، که نتایج این پژوهشگران با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت (Zhang *et al*., 2000). نتایج به دست آمده توسط (Saha *et al*. 2016) بر روی واریته S-1 توت سفید (*Morus alba* L. Variety-S-1)، پتنایک و همکاران (۱۹۹۶) بر روی توت استرالیایی (*Morus australis*)، نتایج ارون پانگ و چانگ (۲۰۱۵) بر روی توت مجنون (*Morus. alba* var *shidareguwa*) که در اولین مرحله ریزازدیادی (مرحله استقرار) بهترین محیط کشت را محیط کشت MS، گزارش کرده‌اند، مطابقت داشت. بهترین شرایط استقرار و پرآوری در محیط کشت MS گزارش شده است. هم‌چنین در دو رقم انجیر Conadria, Black Mission از محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده کردند، که نتایج این محققان با نتایج این مطالعه حاضر مبنی بر نیاز به حضور تنظیم کننده‌های رشد به‌خصوص سیتوکینین در مرحله استقرار مطابقت داشت (Taha *et al*., 2013)، این در حالی بود که Günver و همکاران در مرحله استقرار انجیر رقم بورسای سیاه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده نمودند، اگرچه آزمایش آنان در رابطه با اثر زمان نمونه‌برداری بر درصد بقاء مریستم‌های جدا شده بود اما در هر سه زمان به‌کار رفته زنده‌مانی مریستم‌های کم‌تر از ۵۰ ٪ بود، این با آزمایش ما مبنی بر نیاز حضور تنظیم کننده‌های رشد به‌خصوص سیتوکینین در مرحله استقرار مطابقت داشت (Günver and Ertan. 1997). بنابراین با توجه به این‌که محیط‌های کشت مختلف از نظر نوع و غلظت برخی از املاح و ترکیبات با یک‌دیگر متفاوت می‌باشند، لذا رشد و نمو ریزنمونه‌های مستقر شده بر روی این نوع محیط‌های کشت با یک‌دیگر متفاوت بوده و لذا با شناخت این نوع از تفاوت‌هاست که می‌توان محیط کشت مطلوب برای هدف مورد نظر را شناسایی کرد.

مرحله پرآوری

در مرحله پرآوری برای دستیابی به بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی از دو نوع تنظیم کننده رشد BAP و IBA استفاده شد. هم‌چنین گزارش کرده‌اند که برای دستیابی به موفقیت در ریزازدیادی استفاده از ریزنمونه‌های جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی به‌دلیل توسعه آسان شاخساره‌ها، هم‌چنین کاهش تنوع سوماکلونال، و هم‌چنین دستیابی به گیاهان یکنواخت در یک مقیاس بسیار وسیع برای حفظ گیاهان کلون می‌باشد (Ning *et al*., 2007، Shahcheraghi and Shekafande. 2014). سیتوکینین‌ها در غلظت‌های بالاتر باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شوند که می‌توانند از چیرگی انتهایی که توسط اکسین ایجاد شده است جلوگیری کنند بنابراین باید به این نکته بسیار مهم توجه داشت که غلظت‌های بسیار بالای سیتوکینین‌ها باعث ایجاد ناهنجاری‌های ژنتیکی و شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها نشوند. Kumar و همکاران گزارش کردند که در پرآوری انجیر رقم گولار بیش‌ترین میزان پرآوری در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمده نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که با افزایش غلظت BAP میزان پرآوری کاهش یافت، که نتایج این پژوهشگران با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. هم‌چنین Brum و همکاران نیز گزارش کردند که در خصوص دومین مرحله ریزازدیادی بیش‌ترین تعداد شاخساره را در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (Brum *et al*., 2002). دانشور حسینی و همکاران گزارش کرده‌اند که در خصوص دومین مرحله ریزادیادی پایه محلب بهترین نتیجه را در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد، که نتایج این پژوهشگران با نتایج این مطالعه حاضر مطابقت داشت (Hossini *et al*., 2010). هم‌چنین در این رابطه گزارش شده است که در پرآوری پایه میروبالان C ۲۹ با افزایش غلظت BAP تعداد شاخساره‌های تولید شده از هر ریزنمونه در محیط کشت MS افزایش یافت، به‌طوری که بالاترین میانگین تعداد شاخساره در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS به‌دست آمد و نتایج این پژوهشگران با نتایج این مطالعه حاضر مطابقت داشت (Shabani *et al*., 2019). Demiralay و همکاران گزارش کردند که در خصوص مرحله دوم ریزازدیادی انجیر رقم بورسای سیاه غلظت ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را به‌کار بردند و اظهار داشتند که بیش‌ترین تشکیل شاخساره در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. نتایج این محققان با نتایج این مطالعه حاضر مغایرت داشت (Demiralay *et al*., 1997). اکسین‌ها غالبیت انتهایی را سبب می‌شوند و حضور آن‌ها در محیط

کشت باعث رشد مریستم انتهایی و افزایش طول شاخساره‌ها می‌شوند. با افزایش غلظت BAP طول نوساقه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که چنین امری با توجه به رابطه معکوس بین تعداد نوساقه و طول آن‌ها طبیعی به‌نظر می‌رسد. تعادل بین اکسین و سیتوکینین یک عامل مورفوژنیک مهم به‌شمار می‌آید و رشد اولیه نوساقه و هم‌چنین فرآیند تمایزیابی توسط غلظت نسبی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت تنظیم می‌شود (Murashige, 1980). اضافه کردن BAP می‌تواند غالبیت انتهایی را به سمت جوانه جانبی هدایت کند، که این پدیده منجر به تقسیم یاخته‌های مریستمی در جوانه و افزایش شمار شاخه شده و سرعت تقسیم سلولی در جوانه جانبی را افزایش دهد (Gomez-Leyva *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری

به منظور بهینه‌سازی افزایش درون شیشه‌ای انجیر رقم سبز، آزمایش‌های مختلفی برای حذف باکتری‌های درونی، بهینه‌سازی استقرار اولیه ریزنمونه‌ها و بهینه‌سازی مرحله پرآوری انجام شد. نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در حذف عوامل باکتریایی درونی بسیار موثر بوده است. هم‌چنین محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM به طور معنی‌داری استقرار و پرآوری گیاه انجیر را افزایش داد. بهترین شرایط استقرار ریزنمونه ها (۱۰۰ ٪) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدست آمد. هم‌چنین در مرحله پرآوری، تیمارهای ۲ میلی گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و هم‌چنین تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BAP بالاترین میزان پرآوری را نشان دادند. با این وجود، بیشترین طول ساقه ریزنمونه‌ها در تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، تیمار شاهد و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد.

منابع References

Aroonpong, P., & Chang, J. C. (2015). Micropropagation of a difficult-to-root weeping mulberry (*Morus alba* var. shidareguwa): a popular variety for ornamental purposes. *Scientia Horticulturae*, *194*, 320-326.

Brum, G. R., Silva, A. B., & Posqual, M. (2002). Effect of different concentrations of BAP and NAA in the fig (*Ficus carica* L.*) in vitro* propagation. *Cienc. Agrotec* .Ed. *Espec, Lavras, Brazil*, 1403-1409.

Demiralay, A., Yalçin-Mendi, Y., Aka-Kaçar, Y. I. L. D. I. Z., & Cetiner, S. (1997). *In vitro* propagation of Ficus carica L. var. Bursa Siyahi through meristem culture. In *I International Symposium on Fig*, *480*, 165-168.

Gomez-Leyva, J. F., Acosta, L. M., Muraira, I. L., Espino, H. S., Ramirez-Cervantes, F., & Andrade-Gonzalez, I. (2008). Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, *4*(3), 326-330.

Günver, G., & Ertan, E. (1997). A study on the propagation of figs by the tissue culture techniques. In *I International Symposium on Fig*, *480*, 169-172.

Hassan, A. S., Afroz, F., Jahan, M. A. A., & Khatun, R. (2009). *In vitro* regeneration through apical and axillary shoot proliferation of *Ficus religiosa* l.-a multi-purpose woody medicinal plant. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *19*(1), 71-78.

Hepaksoy, S. E. R. R. A., & Aksoy, U. (2006). Propagation of Ficus carica L. clones by *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, *50*, 433-436.

Hossini, A. D., Moghadam, E. G., & Anahid, S. (2010). Effects of media cultures and plant growth regulators in micro propagation of Gisela 6 rootstock. *Annals of Biological Research*, *1*(2), 135-141. (In Persian).

Kiani, F.M., Zamani, Z., & Ebadi, A. (2005). *In vitro* establishment of three olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, *12*(4), 29-37. (In Persian).

Mars, M. (2001). Fig *(Ficus carica* L.) genetic resources and breeding. In *II International Symposium on Fig 605*, 19-27.

Murashige, T. (1980). Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In *Plant Growth Substances 1979: Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances, Madison, Wisconsin, July 22–26, 1979* (pp. 426-434). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Ning, G.G., Fan, X.L., Huang, W.J., Bao, M.Z., & Zhang, J.B. (2007). Micropropagation of six Prunus mume cultivars through axillary shoot proliferation, and ISSR analysis of cloned plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *49*(1), 25-31.

Pasqual, M., & Ferreira, E.A. (2007). Micropropagation of fig tree (*Ficus carica* sp). In *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 409-416). Dordrecht: Springer Netherlands.

Pattnaik, S.K., Sahoo, Y., & Chand, P.K. (1996). Micropropagation of a fruit tree, Morus australis Poir. syn. M. acidosa Griff. *Plant Cell Reports*, *15*, 841-845.

Saha, S., Adhikari, S., Dey, T., & Ghosh, P. (2016). RAPD and ISSR based evaluation of genetic stability of micropropagated plantlets of *Morus alba* L. variety S-1. *Meta Gene*, *7*, 7-15.

Sahraroo, A., Zarei, A., & Babalar, M. (2019). *In vitro* regeneration of the isolated shoot apical meristem of two commercial fig cultivars 'Sabz'and 'Jaami-e-Kan'. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*, 743-749.

Seyed - Tabatabai, B.E., Omidi, M., & Torkan, S.H. (2015). Plant cell and tissue culture, 4th eddition, Tehran University Press. 368. (In Persian).

Shabani, Z., Abedi, B., Ganji Moghadam, E., & Tehranifar, A. (2019). *In vitro* mass propagation of 'Myrobalan 29c' (*prunus cerasifera* L.): a vegetative Rootstock for stone fruits. *Journal of Plant Production Research*, *26*(3), 167-177. (In Persian).

Shahcheraghi, S. T., & Shekafande, A. (2014). Micropropagation of endangered fig genotypes in order to preserve genetic resources. Thesis in Horticultural Science (pomology), as a part of Master of Science, Shiraz University, 83. (In Persian).

Shatnawi, M. A., Shibli, R. A., Shahrour, W. G., Al-Qudah, T. S., & Abu-Zahra, T. (2019). Micropropagation and conservation of Fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Advances Agriculture*, *10*, 1669-1679.

Taha, R. A., Mustafa, N. S., & Hassan, S. A. (2013). Protocol for micropropagation of two Ficus carica cultivars. *World Journal of Agricultural Sciences*, *9*(5), 383-388.

Wang, P. J., & Hu, C. Y. (2005). Regeneration of virus-free plants through in vitro culture. In *Advances in Biomedical Engineering, Volume 18* (pp. 61-99). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Yadollahi, A., Ghasemi, M., & Ghasemi, S.H. (2016). Rainfed figs, planting and harvesting. Hormozgan University. Press, 144. (In Persian).

Zarei, M., Garoosi, G., Nezami, E., Hosseini, R., & Ahmadi, J. (2013). The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of gisela 6 root stock. *Journal of Cell and Tissue*. *4*(2), 169-185. (In Persian).

Zhang, Z., Dai, W., Cheng, Z. M., & Walla, J. A. (2000). A shoot-tip culture micropropagation system for chokecherry. *Journal of Environmental Horticulture*, *18*(4), 234-237.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 24 (2): 287-302 (2023)
Research article

Optimizing *in vitro* Propagation of Fig Tree Cultivar Sabz Using Shoot Tip and Single Node Explants

Mahboube Hadavand Khani[1], Abbas Yadollahi[1*], Moslem Jafari[2]

1. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Estahban Fig Research Station, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Estahban, I. R. Iran
*Corresponding Author, Email: (yadollah@modares.ac.ir)

This study was carried out to optimize *in vitro* micropropagation of fig tree cultivar Sabz. Initially, a completely randomized design (CRD) experiment consisting of different concentrations of cefotaxime was performed to identify the best antibiotic treatment to control internal bacterial infections. In the establishment stage, a CRD-factorial experiment included two culture media (MS and WPM), and different concentrations of BA (0, 0.5, 1, and 1.5 mg L^{-1}) were performed to select the best establishment treatment. After four weeks, survival rate percentage, leaf number, and stem length indices were evaluated. In the shoot proliferation stage, MS salt medium enriched with different concentrations of BAP (0, 1, 2, and 3 mg L^{-1}) in combination with IBA (0, and 0.1 mg L^{-1}) were used. The results revealed that internal bacterial infections were successfully eliminated using 100 mg L^{-1} cefotaxime. In addition, the highest established explant rate (100%) was observed in the MS medium containing 0.5 mg L^{-1} BAP, which was significantly higher than the WPM medium (76.49%). Also, the results showed that the most significant number of proliferated shoots and leaf numbers were observed in treatments of 2 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} IBA and 2 mg L^{-1} BAP (2.90 and 2.41 shoots, and 7.77 and 6.78 leaves, respectively). In addition, the highest shoot length was seen in treatments of 1 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} IBA, control and 1 mg L^{-1} BAP (1.96, 1.48, and 1.51, respectively).

Keyword: Fig, Establishment stage. Cefotaxime, Proliferation stage, Survival rate percentage