

بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای انجیر (*Ficus carica* L.) رقم سبز از ریزنمونه‌های

جوانه انتهایی و جانبی

Optimization of Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) cv. Sabz Using Shoot Tip and Single Node Explants

محبوبه هداوندخانی^۱، عباس یداللهی^{۱*}، مسلم جعفری^۲

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. ایستگاه تحقیقات انجیر استهبان، ایران

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (yadollah@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۴

چکیده

امروزه ریزازدیادی گیاهان به‌عنوان روش اصلی تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گونه‌های گیاهی چوبی و مقاوم مانند درخت انجیر در نظر گرفته می‌شود. با این وجود، ریزازدیادی هنوز هم با محدودیت‌هایی از قبیل آلودگی‌های اندوفیت، ترشح ترکیبات فنولی و عدم وجود یک پروتکل ریزافزایی قابل‌اعتماد برای شماری گونه‌ها همراه است. هدف اصلی این مطالعه، دستیابی به یک پروتکل ریزافزایی قابل‌اعتماد و کارآمد از ریزنمونه جوانه انتهایی و جانبی برای انجیر، رقم سبز به‌عنوان با ارزش‌ترین رقم انجیر در ایران بود. در آزمایش اولیه غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفتریاکسون (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای حذف آلودگی اندوفیت باکتریایی ریزنمونه‌ها بررسی شد. برای مرحله استقرار، اثر دو محیط کشت پایه نمک (MS، WPM) و ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی شامل BA در غلظت صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA در غلظت صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله پرآوری محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) ارزیابی شد. برای مرحله ریشه‌زایی از محیط کشت 1/2MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد و پس از چهار هفته (پایان مرحله ریشه‌زایی) شاخص‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه‌ها و طول ریشه محاسبه شدند. نتایج نشان داد که باکتری‌های اندوفیت با کاربرد ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفتریاکسون با موفقیت حذف شدند. محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به تنهایی و یا همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط کشت مرحله استقرار بود. علاوه بر این، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به عنوان بهترین محیط تکثیر با میانگین ۳/۲ شاخه شناسایی شد که به طور قابل توجهی متفاوت از سایر تیمارهای مورد استفاده بود. محیط کشت 1/2MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IBA بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۸/۲۶ درصد)، طول ریشه (۶/۱۵ سانتی‌متر) و تعداد ریشه به ازاء قلمه (۸/۴۶) را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انجیر، باکتری‌های اندوفیت، بهینه‌سازی محیط، ترکیبات فنلی، ریزازدیادی.

مقدمه

انجیر با نام علمی *Ficus carica* L. متعلق به خانواده توت‌سانان^۱ می‌باشد. در این تیره ۶۰ جنس و بیش از ۲۰۰۰ گونه گرمسیری و نیمه گرمسیری خزان‌کننده و همیشه سبز، درختی، درختچه‌ای، بالارونده و علفی وجود دارد. انجیر از زمان‌های

طولانی به منظور تولید میوه در سراسر جهان کشت می شده است و یکی از قدیمی ترین درختان میوه شناخته شده در جهان محسوب می شود. آثار درخت انجیر در اواخر دوران دوم دیده شده و در دوران چهارم در اطراف مدیترانه کشت شده است. این گونه، درختی بسیار قدیمی است به طوری که کشت و کار آن ۴۰۰۰ سال پیش از میلاد در مصر مرسوم بوده است. امروزه میوه این درخت، یک محصول مهم در بسیاری از مناطق جهان بوده و تحقیقات زیادی روی این محصول انجام شده و در حال انجام است. نزدیک به ۱۰۰۰ رقم انجیر در جهان شناخته شده و در سیزده کشور جهان بیش از ۱۵ کلکسیون انجیر وجود دارد. حدود ۹۰ درصد تولید انجیر در جهان از نوع انجیر خشک می باشد. میوه انجیر دارای ارزش غذایی نسبتاً بالایی است و منبع مناسبی از ویتامین ها و مواد معدنی می باشد. عناصر موجود در میوه انجیر باعث تعادل اعمال حیاتی بدن می شود. میوه انجیر مقدار پتاسیم بالایی دارد، بنابراین برای کنترل فشار خون به کار می رود. گزارش شده که میوه انجیر ملین و ضد یبوست می باشد. از میوه انجیر شربتی به نام فی جین تهیه که در رفع یبوست مصرف می شود (Mahdavian et al., 2008). با توجه به شرایط ویژه بسیاری از مناطق ایران، مثل تنش خشکی، شوری و گرما، که مانع گسترش کشت و کار بسیاری از گیاهان می شود، بنابراین توجه به کشت انجیر به عنوان یک محصول بسیار مهم اقتصادی، که جایگاه بسیار ویژه ای را در میان محصولات کشاورزی به خود اختصاص داده است، اهمیت بسیار ویژه ای دارد و می تواند سهم بسیار بزرگی را در اقتصاد کشاورزی کشور ایفا کند. انجیر رقم سبز، که یکی از مهم ترین ارقام انجیر ایران است مهم ترین رقم تجاری است و قابلیت خشکباری دارد. استان فارس یکی از مناطق مهم کشت و پرورش انجیر دیم در کشور بوده و بالغ بر ۹۰ درصد تولید انجیر خشک کشور را به خود اختصاص داده است در استان فارس ۴۴ هزار هکتار انجیر دیم وجود دارد که شهرستان استهبان با بیش از ۲۳ هزار هکتار بیشترین سطح کشت انجیر را به خود اختصاص داده و قطب تولید انجیر در ایران است و محصول آن از کیفیت و مرغوبیت خاصی برخوردار است عمده انجیرهای تولیدی در ایران گونه سبز از گروه از میر است. گیاهی است با رشد و باردهی نسبتاً زیاد، تاج مدور، رشد عمودی، دارای شاخه و برگ متراکم، معمولاً دارای ۳-۴ تنه می باشد میوه آن به صورت خشک مصرف می شود میزان قند ۲۳ درصد است، شکاف خوردن میوه که صفت مطلوب تلقی می شود. این رقم به صورت دیم کشت می شود و نزدیک به ۹۸ درصد از انجیر استهبان از این رقم می باشد که به صورت ارگانیک تولید می شود. محصول این انجیر شیرین، دیررس و به صورت خشک مصرف می شود. انجیر دارای خصوصیات مهم دارویی می باشد. کشت درون شیشه ای روشی برای تکثیر سریع گیاهان چوبی می باشد. نظر به این که تکنیک های درون شیشه ای در اصلاح نباتات با استفاده از ژنتیک سلول های سوماتیکی، هر روز از اهمیت بیشتری برخوردار می گردند، بنابراین محصولاتی که شرایط درون شیشه ای تولید می شوند، باید در همان شرایط نیز حفاظت شوند. سیستم درون شیشه ای برای ذخیره مواد گیاهی بسیار مناسب است، زیرا که مواد با مقادیر اندک در محیط عاری از پاتوژن و تحت شرایط محدود کننده رشد ذخیره می شوند ذخیره ژرم پلاسما در شرایط درون شیشه ای برای توسعه و امنیت کشاورزی در آینده بسیار ضروری است (Chawla, 2003). در تکثیر و تولید گیاهان استفاده از روش ریزازدیادی سال های متمادی زیادی است که مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته و این شاید به این دلیل می باشد که استفاده از روش های سنتی در تکثیر و تولید گیاهان کلونی علاوه بر این که یک فرآیند طولانی مدت است، احتمال این که بیماری ها گسترش پیدا کنند نیز وجود دارد. لذا برای تولید و تکثیر گیاهان سالم، یکنواخت و یک دست در یک مدت زمان بسیار کوتاه، استفاده از تکنیک های کشت بافت مناسب است. پژوهش های بسیار زیادی نیز در ارتباط با کشت بافت انجیر و همچنین بررسی عوامل مختلف از قبیل میزان و نوع مواد ضد عفونی کننده، تنظیم کننده های رشد گیاهی، و میزان کربوهیدرات برای رفع موانع احتمالی و بهینه نمودن بازدهی پرآوری، همچنین کاهش هزینه ها توسط تعدادی از پژوهشگران انجام شده است. گزارش شده که در ریزازدیادی انجیر رقم جامی کن^۱ و رقم سبز از مریستم انتهایی، از دو نوع محیط کشت B5^۲ و MS^۳ در غلظت های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر) و NAA (صفر، ۰/۱ میلی گرم بر لیتر) و اندازه های مختلف ریزنمونه مریستمی بکار گرفته شده بود، بیشترین درصد بقاء ریزنمونه ها در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و با مریستم های با اندازه بزرگ تر گزارش شدند. بیشترین تعداد شاخه و کوتاه ترین طول شاخه را در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر BA گزارش کردند. بهترین ریشه زایی شاخه ها در غلظت

۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه نیز در هر گیاهچه درغلظت ۲ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد (Sahraroo *et al.*, 2019)، پژوهشی در رابطه با باززایی چهار رقم انجیر (Deanna, Poona, Conadria and Brown Turkey) با استفاده از ریزنمونه های برگ به دست آمده از شاخساره های استقرار یافته در شرایط درون شیشه ای مورد بررسی و آزمون قرار گرفت، آن ها بهترین پینه دهی را روی محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر TDZ^۱ و ۴ میلی گرم در لیتر 2ip^۲ به دست آوردند در بین ارقام، رقم برون ترکی بیشترین پاسخ را به پینه دهی داشت و روی همان محیط شاخساره زایی را نشان داد. زودترین القاء پینه روی محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر TDZ و ۲ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد. شاخساره زایی از پینه انتقال یافته روی محیط کشت MS تکمیل شده با ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۷ میلی گرم در لیتر TDZ القاء شد. شاخساره ها بر روی محیط کشت نیم غلظت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال ریشه دار شدند (Dhage *et al.*, 2012). در باززایی شاخساره از قطعات برگ انجیر رقم Seungjung Dauphine، گزارش کردند که PG به میزان ۰/۵ میلی مول قهوه ای شدن برگ ها را کاهش داده بود. ریزنمونه های برگ زخمی شده بر روی محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۵ یا ۱ میلی گرم در لیتر TDZ به ترتیب به ۸/۱ یا ۱۰/۸ شاخساره از هر ریزنمونه منجر شد. TDZ در ترکیب با IBA بالاترین تعداد شاخساره در مقایسه با دیگر ترکیب اکسین و سیتوکینین را داشتند، شاخساره های باززایی شده در محیط کشت پایه MS ریشه زایی بهتری داشتند (Kim *et al.*, 2007). از مشکلات عمده کشت بافت گیاهی، آلودگی های باکتریایی است و معمولاً کنترل این آلودگی ها بویژه از نوع داخلی مشکل است و هفته ها بعد از کشت ظاهر می شوند آنتی بیوتیک ها برای کنترل آلودگی های داخلی و خارجی موثر هستند. پژوهشگران بسیاری از آنتی بیوتیک هایی شامل کرینیسیلین، پلی میکسین، سفالوتین، جنتامایسین، ریفامپیسین، استرپتومایسین، تیمنتین، تتراسایکلین در محیط های کشت بافت گیاهی استفاده کرده اند (Reed *et al.*, 1995). القاء ریشه زایی در ریزنمونه ها در شرایط کشت بافت یکی از مراحل سخت در فرآیند ریزازدیادی می باشد توانایی بافت گیاهی در تشکیل ریشه بستگی به بسیاری از عوامل درونی و بیرونی از جمله هورمون ها دارد. لذا هدف از این پژوهش بهینه سازی کشت درون شیشه ای انجیر رقم سبز می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در این پژوهش بهینه سازی کشت درون شیشه ای انجیر رقم سبز مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش در سال ۹۷-۹۹ در آزمایشگاه ریزازدیادی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. در این پژوهش قلمه انجیر رقم سبز از درختان موجود در ایستگاه تحقیقات انجیر استهبان تهیه و به گلخانه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند این قلمه ها در گلدان های با مخلوط خاکی (به نسبت حجمی ۱ : ۱ : ۱) ماسه و خاکبرگ و خاک مزرعه ریشه دار شدند. قلمه ها در شرایط گلخانه در دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد نگهداری شدند و بعد از گذشت یک ماه ریشه دار شدند. جهت تسریع در رشد رویشی گلدان ها هر دو هفته یکبار کود کامل (۲۰:۲۰:۲۰) و هر ۱۰ روز یکبار از محلول (GA₃)^۲ و کود آمونیاک استفاده شد. گیاهان به صورت هفته ای سه بار آبیاری شدند. همچنین به منظور کاهش آلودگی ها گیاهان مادری یک هفته قبل از نمونه برداری با استفاده از قارچ کش بنومیل ۲ در ۱۰۰۰ ضد عفونی شدند.

مراحل مختلف این پژوهش

مرحله ضد عفونی، مرحله استقرار، مرحله پرآوری شاخساره، مرحله ریشه زایی شاخساره ها بودند.

مراحل تهیه نمونه گیاهی

تهیه جوانه جانبی و انتهایی از گیاه مادری موجود در گلخانه و انتقال آن ها به آزمایشگاه، ضد عفونی سطحی مواد گیاهی، کشت جوانه های جانبی و انتهایی در محیط کشت های مختلف، مرحله پرآوری جوانه های جانبی و انتهایی کشت شده پس از استقرار، مرحله ریشه زایی نوساقه های کشت شده از مرحله پرآوری.

برای تهیه ریزنمونه (جوانه انتهایی و جوانه جانبی)، از شاخه های جوان حاصل از رشد جدید (سال جاری) به طول ۳۰

سانتی‌متر از گیاهان مادری جدا شدند 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 و ریزنمونه‌ها برای ضدعفونی به قطعات ۵ سانتی‌متر تقسیم شدند، لذا بعد از آماده سازی ریزنمونه‌های (جوانه‌های جانبی و انتهایی)، برای برطرف کردن تمامی آلودگی‌های سطحی ابتدا تمامی ریزنمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش در مدت زمان یک ساعت در زیر آب جاری غوطه‌ور شدند، بعد از گذشت یک ساعت ریزنمونه‌ها در مدت زمان ۲۰ دقیقه در مخلوط آب و چند قطره مایع ظرف‌شویی قرار گرفتند، بعد از سپری شدن این مدت زمان ریزنمونه‌ها چند بار شسته شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در محلول ۲ در هزار قارچ‌کش کاپتان قرار گرفتند. سپس ۳ تا ۴ بار با فاصله زمانی مختلف توسط آب مقطر دو بار استریل شده شسته شدند و برای ادامه مراحل ضدعفونی به زیر هود لامینار منتقل شدند، سپس در زیر هود لامینار نیز به قطعات ۲-۳ سانتی‌متر برای کشت تقسیم شدند. محیط‌های کشت استفاده شده در این تحقیق شامل محیط (MS, 1/2MS) و محیط کشت ^۱ Lloyd and McCown's (WPM) بودند (جدول ۱). سپس قبل از این‌که آگار به محیط‌های کشت اضافه شود، pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و مدت زمان ۲۰ دقیقه و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شدند. نمونه‌های گیاهی بعد از کشت بر روی محیط غذایی زیر نور ۲۵۰۰ لوکس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند، دما در تمام ساعت شبانه روز حدود 25 ± 2 درجه سلسیوس تنظیم شد.

کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی

ریزنمونه‌های گیاهی بعد از شستشوی اولیه به زیر هود لامینار انتقال داده شدند. در ریز هود لامینار نیز ضدعفونی ریزنمونه‌ها به این صورت انجام شد ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس سه بار با آب مقطر دو بار استریل شده در فاصله زمانی متفاوت شستشو شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل محلول کلراکس ۵/۲۵ درصد غوطه‌ور شدند و بعد از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه سه بار با آب مقطر دو بار استریل شده در فاصله زمانی متفاوت شستشو شدند. سپس ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت‌های حاوی مقادیر مختلف آنتی بیوتیک (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) سفتریاکسون کشت شدند این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار با چهار ریزنمونه شامل (جوانه انتهایی و جوانه جانبی) در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت (هر تکرار شامل یک شیشه بود). پس از کنترل آلودگی سطحی و گذشت حدود چهار روز از کشت آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌ها شروع شد و گسترش یافت. داده‌برداری بعد از گذشت ۴ هفته از کشت صورت گرفت.

مرحله استقرار

روش استقرار نمونه‌های گیاهی در محیط کشت

بعد از این‌که نمونه‌های گیاهی ضدعفونی شدند جوانه‌های (انتهایی و جانبی) گیاهی به طول (۲ تا ۳ سانتی‌متر) به محیط کشت منتقل شدند. اثر چهار سطح مختلف BA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و دو سطح مختلف NAA (صفر، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) در دو نوع محیط کشت MS و WPM بررسی شد. در این آزمایش دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفت که، فاکتور اول نوع محیط کشت‌ها (اثر محیط کشت‌های MS و WPM) و فاکتور دوم نوع تنظیم کننده رشد (اثر دو نوع تنظیم کننده رشد BA در چهار سطح و NAA در دو سطح) بود. در تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی در مرحله استقرار، شاخص‌های، درصد استقرار، طول شاخساره، تعداد برگ، مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار با سه ریزنمونه انجام شد. داده‌برداری بعد از گذشت چهار هفته از کشت صورت گرفت.

مرحله پرآوری شاخساره

در این مرحله ابتدا تمامی شاخساره‌های حاصل از مرحله استقرار به قطعات ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بدون برگ جدا شدند و به

محیط کشت تهیه شده برای شاخساره‌زایی منتقل شدند. در این آزمایش از محیط کشت MS استفاده شد. اثر چهار غلظت مختلف BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت MS در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و هر تکرار با چهار ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت. داده‌برداری بعد از گذشت یک ماه از کشت صورت گرفت. در تعیین بهترین ترکیب هورمونی در مرحله پرآوری، شاخص‌هایی مانند تعداد برگ، تعداد شاخساره و طول شاخساره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله پرآوری دوبار واکشت صورت گرفت. به این علت که برای تیمارهای ریشه‌زایی ریزنمونه کافی وجود داشته باشد

مرحله ریشه‌زایی

برای ریشه‌زایی از شاخساره‌های حاصل از مرحله پرآوری به طول حداقل ۱ سانتی‌متر و همچنین دارای چند برگ استفاده شد. اثر چهار سطح IBA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت MS 1/2 در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار با چهار ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت. داده‌برداری بعد از گذشت یک ماه از کشت صورت گرفت. در تعیین بهترین ترکیب هورمونی در مرحله ریشه‌زایی شاخص‌هایی مانند درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.0 و مقایسه میانگین نیز بر اساس آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. همچنین از نرم‌افزار Excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد

جدول ۱- ترکیبات مختلف محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش (میلی گرم در لیتر).

Table 1. Different combination of culture media used in this study (mg/l).

محیط کشت Culture medium			
WPM mg L ⁻¹	MS (mg L ⁻¹)	1/2 MS (mg L ⁻¹)	عناصر پر مصرف
400	1650	825	NH ₄ (NO) ₃
-	1900	950	KNO ₃
370	370	185	MgSO ₄ .7H ₂ O
170	170	85	KH ₂ PO ₄
556			Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O
96	440	220	CaCl ₂ .2H ₂ O
990	-	-	K ₂ SO ₄
-	-	-	MgCl ₂ .6H ₂ O
عناصر کم مصرف			
22.3	22.3	11.1	MnSO ₄ .7H ₂ O
8.6	8.6	4.3	ZnSO ₄ .7H ₂ O
6.2	6.2	3.1	H ₃ BO ₃
-	0.83	0.41	KI
0.25	0.25	0.12	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
0.25	0.025	0.012	CuSO ₄ .5H ₂ O
-	0.025	0.012	CoCl ₂ .6H ₂ O
آهن			
27.8	27.8	13.9	Na ₂ EDTA

37.3	37.3	18.6	FeSO ₄ .7H ₂ O
			ویتامین‌ها
0.1	0.1	0.1	Thiamine, HCL
0.5	0.5	0.5	Nicotinic acid
0.5	0.5	0.5	Pyridoxine, HCL
2	2	2	Glycine
100	100	100	Myo-inositol
20000	30000	30000	Sucrose
7000	7000	7000	Agar

نتایج

نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفتریاکسون در کنترل آلودگی باکتریایی

نتایج نشان داد (جدول ۲) که با افزایش میزان غلظت آنتی بیوتیک در محیط کشت، آلودگی باکتریایی کنترل شد. به طوری که بیش‌ترین میزان آلودگی (۹۵/۵۷٪) در تیمار شاهد مشاهده شد و در محیط کشت حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفتریاکسون آلودگی باکتریایی به طور کامل رفع شد.

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک سفتریاکسون در کنترل آلودگی باکتریایی و درصد زنده‌مانی.

Table 2. The effect of different ceftriaxone treatment on percentage of bacterial contamination and survival rate parameters

Concentration ceftriaxone of antibiotic (mg L ⁻¹)	Survival percentage	Bacterial contamination (%)
0	0.00±0.00 ^f	95.57±2.65 ^a
50 mg L ⁻¹	10.75±0.48 ^e	42.21±2.48 ^b
100 mg L ⁻¹	25.75±1.80 ^d	17.42±2.68 ^c
150 mg L ⁻¹	42.50±1.76 ^c	6.19±2.18 ^d
200 mg L ⁻¹	58.50±2.33 ^b	1.42±0.82 ^{de}
250 mg L ⁻¹	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^e

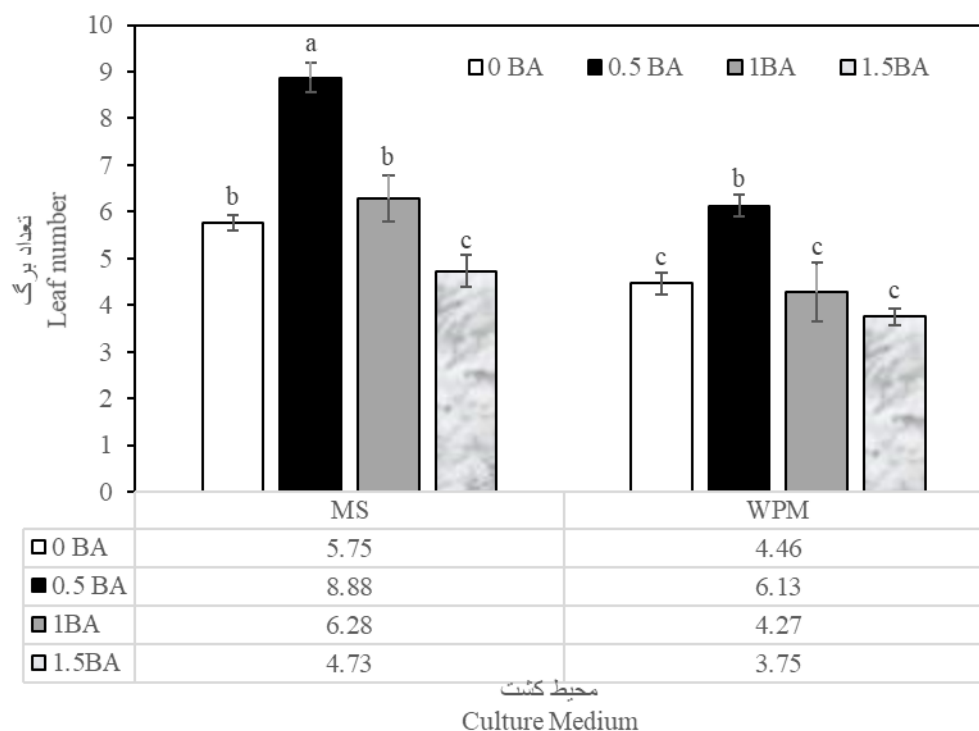
† Means in each column with the same letters are not significantly different at p<0.05

† میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشند

نتایج مرحله استقرار

تعداد برگ در مرحله استقرار

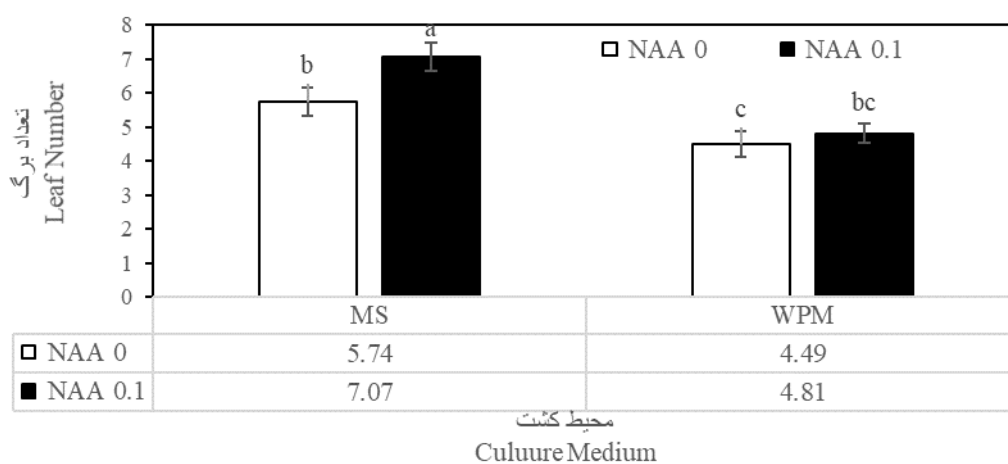
نتایج شکل ۱- نشان داد که بیش‌ترین تعداد برگ (۸/۸۸ عدد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد. کم‌ترین تعداد برگ (۳/۷۵، ۴/۲۷، ۴/۴۶ و ۴/۷۳ عدد) به ترتیب در محیط کشت WPM حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA، محیط کشت WPM بدون حضور BA و محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد.



شکل ۱- برهمکنش بین نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA بر تعداد برگ.

Fig. 1. The two-way interaction between type of culture medium and different levels of BA concentrations on leaf number parameter.

نتایج شکل ۲- نشان داد که بیش‌ترین میزان برگ (۷/۰۷ عدد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA مشاهده و کم‌ترین میزان برگ (۴/۴۹ عدد) در محیط کشت WPM بدون حضور NAA مشاهده شد.

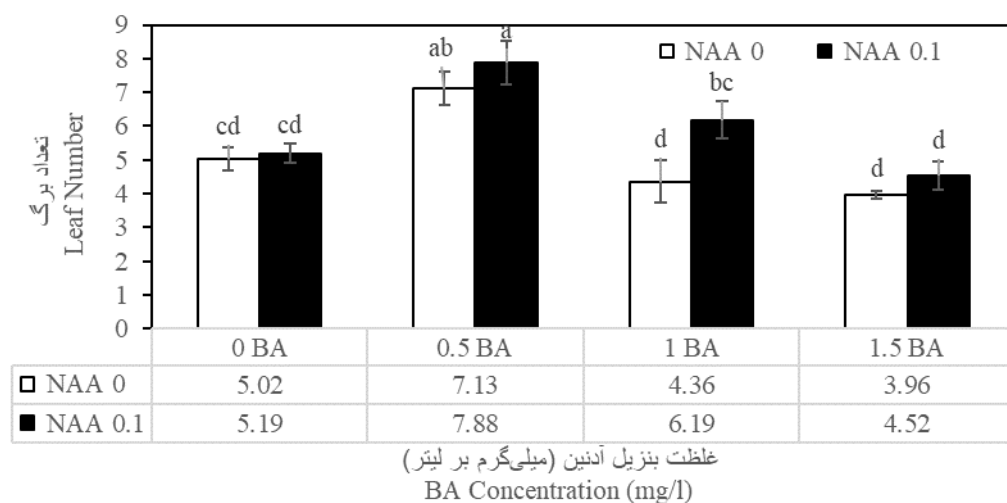


شکل ۲- برهمکنش بین نوع محیط کشت و سطوح مختلف NAA بر تعداد برگ.

Fig. 2. The two-way interaction between type of culture medium and different levels of NAA concentrations on leaf number parameter.

با توجه به شکل ۳ نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان تعداد برگ (۷/۸۸ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. کم‌ترین میزان برگ (۳/۹۶، ۴/۳۶ و ۴/۵۲ عدد) به‌ترتیب در تیمارهای ۱/۵

میلی گرم بر لیتر BA بدون حضور NAA، ۱ میلی گرم بر لیتر BA بدون حضور NAA و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA مشاهده شده بود.

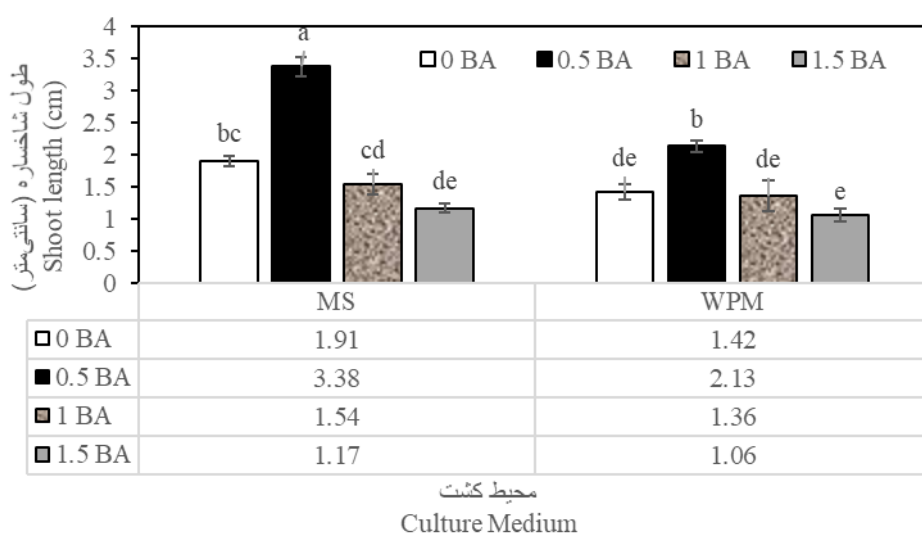


شکل ۳- برهمکنش بین سطوح مختلف غلظت BA و NAA بر تعداد برگ.

Fig. 3. The two-way interaction between different levels of BA concentrations and NAA on leaf number parameter

طول شاخساره در مرحله استقرار

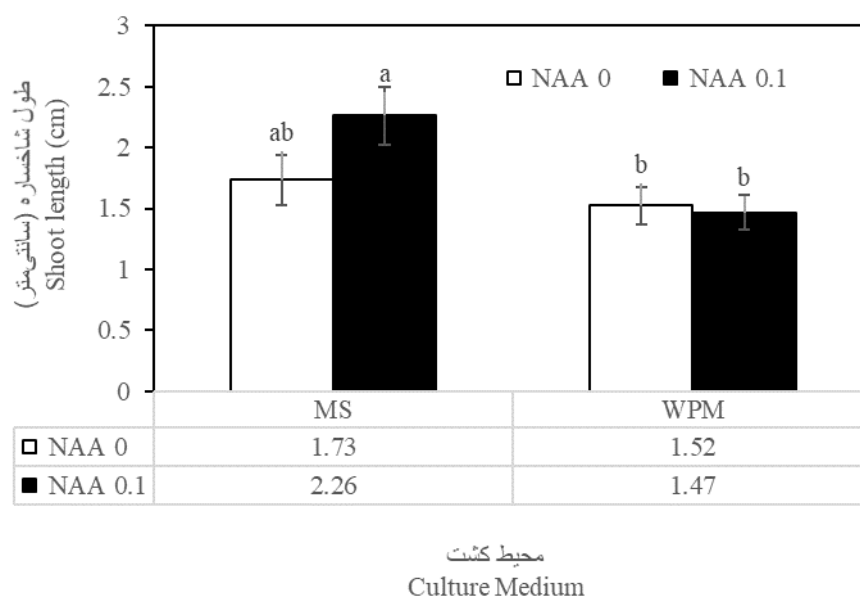
در شکل ۴ نتایج نشان داد که بیشترین میزان طول شاخساره (۳/۳۸ سانتی متر) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA مشاهده شد کمترین میزان طول شاخساره (۱/۰۶ سانتی متر) در محیط کشت WPM حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BA مشاهده شد.



شکل ۴- برهمکنش بین نوع محیط کشت و سطوح مختلف غلظت BA بر طول شاخساره (سانتی متر).

Fig. 4. The two-way interaction between type of culture medium and different levels of BA concentrations on shoot length (cm) parameter.

با توجه به شکل ۵ نتایج نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۲/۲۶ سانتی‌متر) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمده بود. کمترین میزان طول شاخساره (۱/۴۷ و ۱/۵۲ سانتی‌متر) به‌ترتیب در محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط کشت WPM بدون حضور NAA مشاهده شده بود.

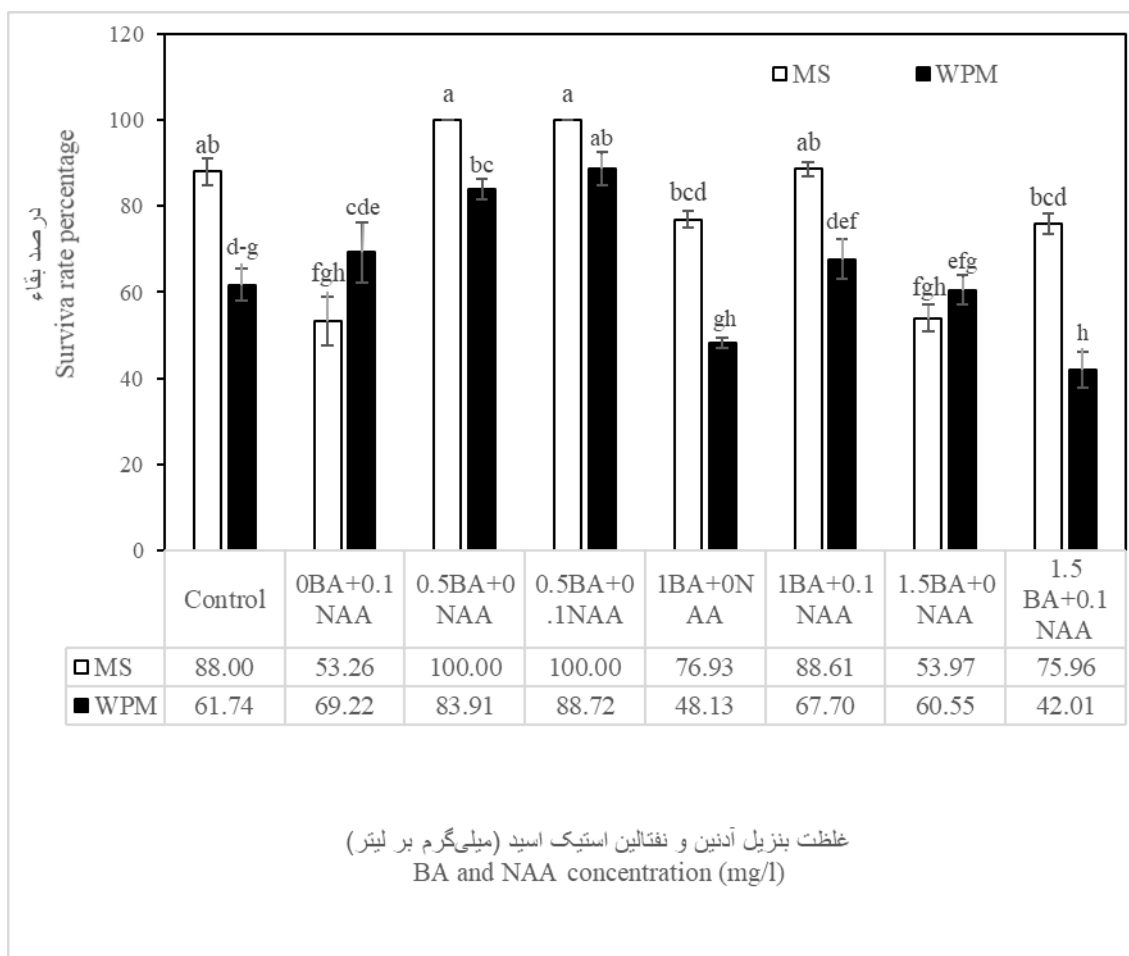


شکل ۵- برهمکنش نوع محیط و سطوح مختلف غلظت NAA بر طول شاخساره (سانتی‌متر).

Fig. 5. The two-way interaction between type of culture medium and different levels of NAA concentrations on shoot length (cm) parameter.

درصد بقاء (زنده‌مانی) در مرحله استقرار

نتایج شکل ۶ نشان داد که بیشترین درصد بقاء (۱۰۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدون حضور NAA و محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شده بود. کمترین میزان درصد بقاء (۴۲/۰۱ درصد) نیز در محیط کشت WPM حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمده بود.



شکل ۶- برهمکنش بین نوع محیط کشت و سطوح مختلف غلظت BA و NAA بر درصد بقا.
Fig. 6. The three-way interaction between type of culture medium and different levels of BA and NAA concentrations on Survival rate percentage parameter.



شکل ۷- محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA.
Fig 7. MS culture medium enriched with 0.5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA.

نتایج مرحله پرآوری

در این آزمایش اثر سطوح BA بر میزان پرآوری معنی دار بود و نتایج نشان داد که، غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر بیشترین میزان پرآوری را داشت (جدول ۳). بیشترین تعداد شاخساره (۳/۲۰ عدد) و بیشترین تعداد برگ (۶/۹۴ عدد) در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA به دست آمده بود. طولیترین طول شاخساره (۲/۴۶ سانتی متر) نیز در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA مشاهده شد. کمترین طول شاخساره (۱/۰۲ سانتی متر) نیز مربوط به تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA بود.

جدول ۳- اثر غلظت های مختلف BA بر تعداد برگ، تعداد شاخساره و طول شاخساره (سانتی متر) در مرحله پرآوری.

Table 3. The Effect of different concentrations of BA of leaf number, shoot number and shoot length (cm) parameter at the proliferation stage.

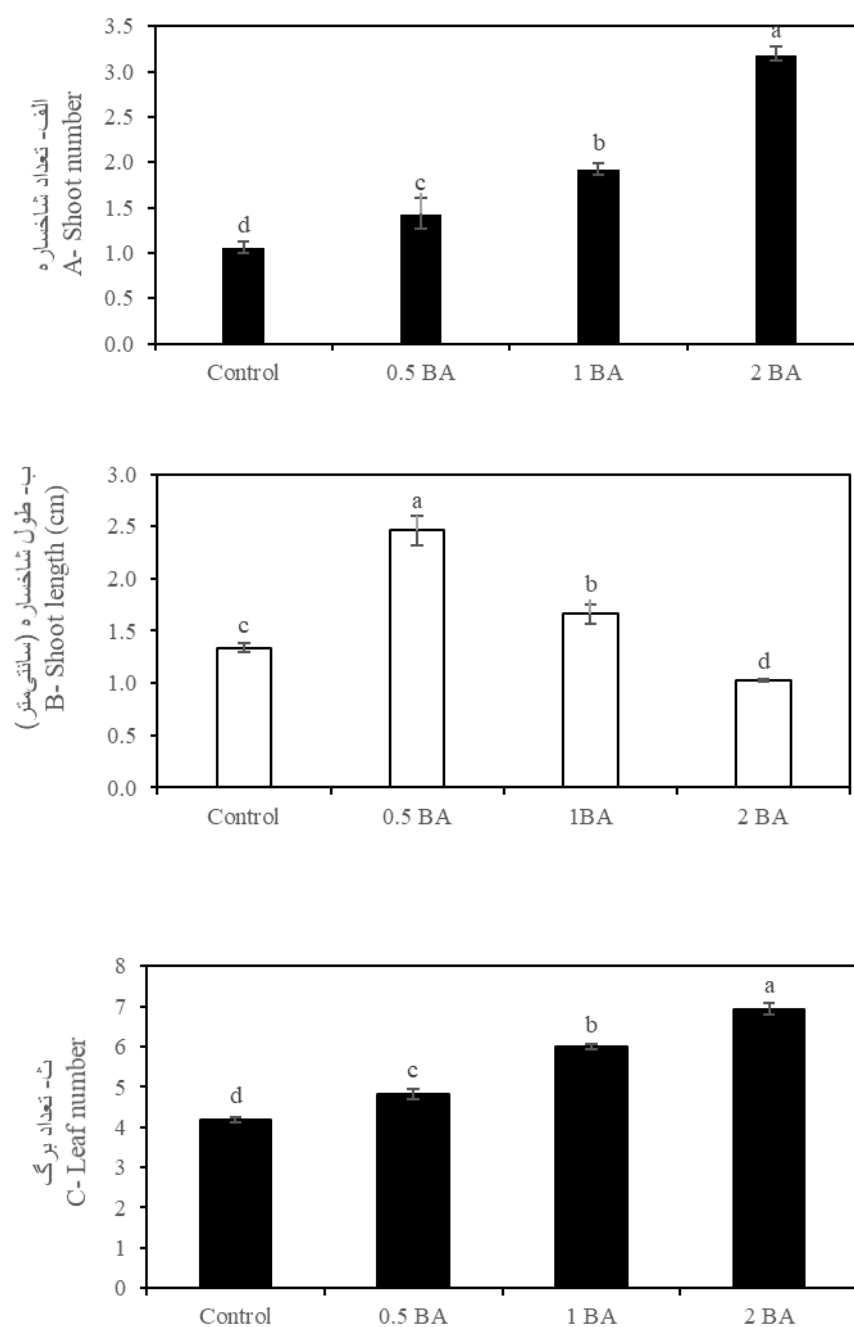
تیمارها Treatments	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره (سانتی متر) Shoot length (cm)	تعداد برگ Leaf number
غلظت های مختلف بنزیل آدنین (میلی گرم بر لیتر) Concentration different BA (mg/l)			
0	1.06±0.07 ^{d†}	1.34±0.04 ^c	4.18±0.08 ^d
0.5	1.44±0.17 ^c	2.46±0.14 ^a	4.81±0.12 ^c
1	1.93±0.07 ^b	1.66±0.09 ^b	6.01±0.06 ^b
2	3.20±0.08 ^a	1.02±0.01 ^d	6.94±0.14 ^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 ($\pm$)

† مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. میانگین های دارای حروف مختلف در هر ستون بیان گر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشند.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۸-الف)، بیشترین تعداد شاخساره در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر و کمترین تعداد شاخساره نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان BA تعداد شاخساره افزایش یافت. در (شکل ۸-ب)، کمترین طول شاخساره در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و بیشترین طول شاخساره در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد. نتایج نشان داد که بین تعداد شاخساره و طول شاخساره یک رابطه عکسی وجود دارد با افزایش تعداد شاخساره، طول شاخساره کاهش یافت. در (شکل ۸-ث)، نشان داد که بیشترین تعداد برگ در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر و کمترین تعداد برگ در تیمار شاهد مشاهده شد. لذا براساس نتایج حاصله با افزایش میزان BA تعداد برگ افزایش یافت.



شکل ۸- اثر بنزیل آدنین بر تعداد شاخساره در هر ریزنمونه الف)، طول شاخساره (ب) و تعداد برگ (ث).

Fig. 8. The effect of different benzyl adenine (BA) concentrations on Shoot number per explant (a), Shoot length (b) and Leaf number (c)



شکل ۹- تأثیر BA بر تعداد شاخساره.

Fig. 9. Effect of BA on shoot number.

نتایج مرحله ریشه‌زایی

بیش‌ترین میزان درصد ریشه‌زایی (۸۸/۲۶ درصد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمده بود و کم‌ترین درصد ریشه‌زایی (۱۱/۶۹ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد. بیش‌ترین طول ریشه (۶/۱۵ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و کم‌ترین طول ریشه (۰/۹۲ سانتی‌متر) در تیمار شاهد به‌دست آمده بود. بیش‌ترین تعداد ریشه (۸/۴۶ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و کم‌ترین تعداد ریشه (۱/۲۰ عدد) در تیمار شاهد به‌دست آمده بود (جدول ۴).

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف IBA بر صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه (سانتی‌متر) و تعداد ریشه.

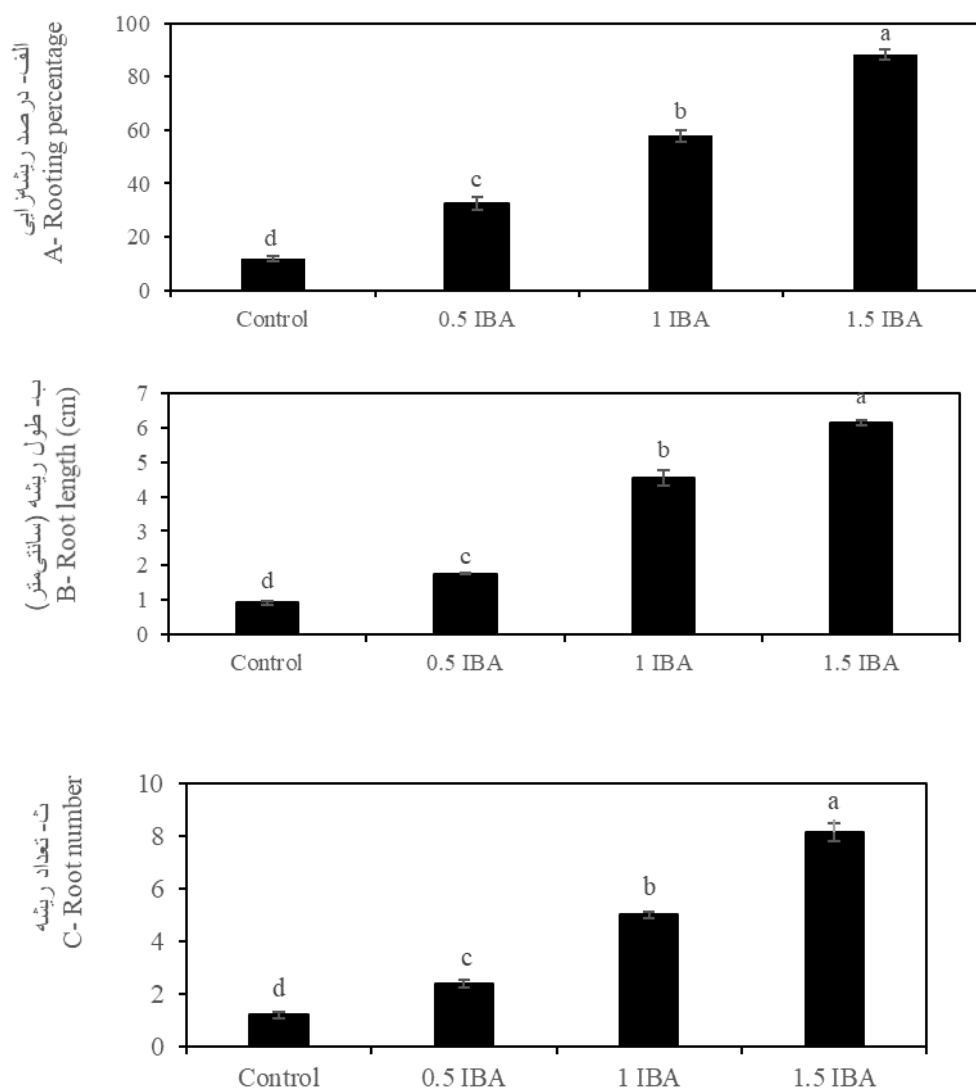
Table 4. The effect of different concentrations of IBA on traits root number, root length (cm) and rooting percentage

تیمارها Treatments	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد ریشه Root number
غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتریک (میلی‌گرم بر لیتر) Concentration different IBA (mg/l)			
0	11.69±1.02 ^{d†}	0.92±0.05 ^d	1.20±0.13 ^d
0.5	32.30±2.46 ^c	1.76±0.02 ^c	2.38±0.14 ^c
1	57.82±2.26 ^b	4.55±0.22 ^b	5.00±0.14 ^b
1.5	88.26±1.83 ^a	6.15±0.08 ^a	8.46±0.21 ^a

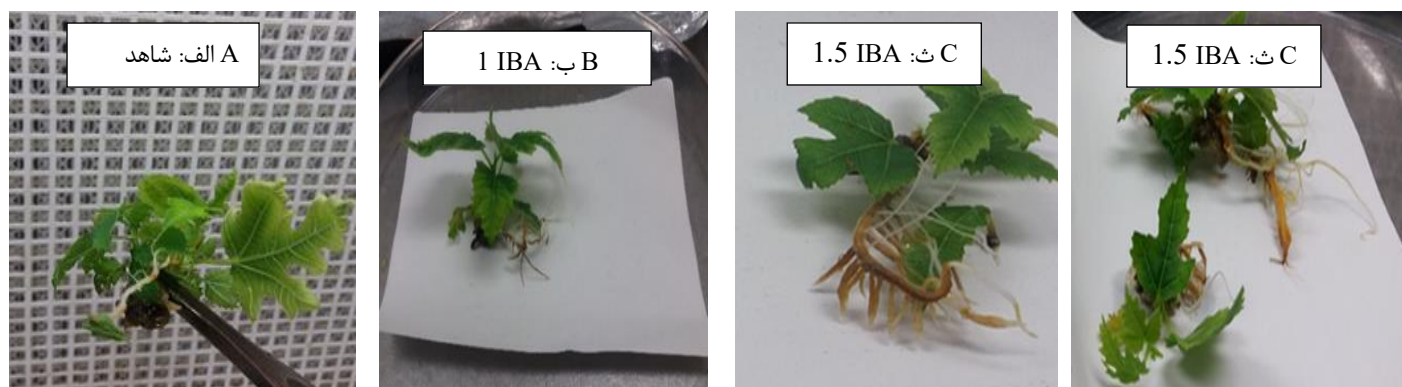
† Means in each column with the same letters are not significantly different at $p < 0.05$, according to LSD test. Each value represents SE ($\pm$)

† 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

در (شکل ۱۰- الف) نتایج نشان داد که اثر IBA بر درصد ریشه‌زایی موثر بود به طوری‌که بیش‌ترین میزان درصد ریشه‌زایی در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و کم‌ترین میزان درصد ریشه‌زایی نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. لذا با افزایش غلظت IBA درصد ریشه‌زایی افزایش یافت. نتایج در (شکل ۱۰- ب) نشان داد که اثر IBA بر طول ریشه نیز معنی‌دار بود به طوری‌که بیش‌ترین طول ریشه در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد در حالی‌که کم‌ترین طول ریشه در تیمار شاهد مشاهده شد. لذا بر اساس نتایج افزایش غلظت IBA باعث افزایش طول ریشه شد. در (شکل ۱۰- ث) نتایج نشان داد که اثر IBA بر تعداد ریشه معنی‌دار بود به طوری‌که بیش‌ترین تعداد ریشه در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین تعداد ریشه نیز در تیمار شاهد به‌دست آمده بود. نتایج نشان داد که با افزایش میزان IBA تعداد ریشه‌ها افزایش پیدا کرد.



شکل ۱۰- اثر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتریک بر درصد ریشه‌زایی (الف)، طول ریشه (سانتی‌متر) (ب)، تعداد ریشه (ث).
 Fig. 10. The effect of different IBA concentrations on Rooting percentage (a), Root length (cm) (b) and rooting length (c).



شکل ۱۱- تأثیر IBA در ریشه‌زایی، شاهد (الف)، ۱ میلی گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک (ب)، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک (ث).

Fig. 11. Effects of IBA on rooting of shoots *in vitro* condition, A= Control, B= 1 mg L⁻¹ IBA, C= 1.5 mg L⁻¹.

بحث

گیاهان آلوده به باکتری ممکن است که از خود هیچ گونه علامت ظاهری نشان ندهند ولی ایجاد آلودگی‌های باکتریایی در گیاهان ممکن است به دلیل روش‌های ضعیف ضدعفونی، عدم استفاده از آنتی باکتریال مناسب و همچنین استفاده از ابزارهای آلوده به باکتری حین مراحل ضدعفونی باشد، که این آلودگی‌های سطحی با بهبود در به کارگیری تجهیزات استریل شده مرتفع می‌شوند. در کل برای داشتن یک فرآیند کشت بافت موفق نیز عوامل کنترل شده زیادی شامل، مقدار محیط کشت، وضعیت رشد گیاه مادری، سن ریزنمونه و ... مورد نیاز است. ولی با وجود کنترل همه این عوامل، آلودگی‌های باکتریایی باعث ایجاد مشکلاتی در طی مراحل کشت بافت می‌شوند. لذا یکی از مراحل بسیار مهم در کنترل شیوع آلودگی باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها، طی مراحل کشت بافت گیاهی، ضدعفونی سطحی است. در ضدعفونی اولیه ریزنمونه‌ها با استفاده از محلول الکل اتیلیک ۷۰٪ و محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه آلودگی قارچی را به طور کامل برطرف کرد. ولی آلودگی باکتریایی برطرف نشد. نتایج نشان داد که در تیمار شاهد آلودگی بسیار بالایی وجود داشت ولی با افزایش میزان غلظت آنتی بیوتیک سفتریاکسون در محیط کشت آلودگی باکتریایی کنترل شد. در ریزافزایی دو نژادگان در حال انقراض انجیر برگ چناری و دهدز گزارش شد که آلودگی باکتریایی با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سفتریاکسون به طور کامل برطرف شد (Shahcheraghi *et al.*, 2015). که در این تحقیق حاضر در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفتریاکسون آلودگی باکتریایی به طور کامل بر طرف شد که این نتایج با یکدیگر مغایرت داشتند که علت این تفاوت می‌تواند بستگی به نوع ریزنمونه، نوع باکتری‌های درونی، قطر ریزنمونه، نوع رقم و ژنوتیپ باشد، گیاهان با یکدیگر متفاوت هستند و نوع باکتری‌های درونی موجود در آن‌ها نیز با یکدیگر متفاوت می‌باشد. این نوع از آنتی بیوتیک طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت را از بین می‌برند. از عوامل مؤثر در آلودگی ریزنمونه‌ها منشأ ریزنمونه، روش جمع‌آوری ریزنمونه‌ها، نوع بافت و مورفولوژی ریزنمونه‌ها می‌باشد. گزارش شده که در ضدعفونی ریزنمونه‌های ریزوم و نوک شاخساره گیاه موز برای کشت درون شیشه‌ای توسط آنتی بیوتیک جنتاماسین، آلودگی باکتریایی درونی را حذف کرد (Habiba *et al.*, 2002). گزارش شده که کنترل آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌های زیتون با استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به میزان ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میسر گردید (Kiani Feriz *et al.*, 2005). گزارش شده که از آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، ریفامپیسین، پنی سیلین و سفوتاکسیم به تنهایی یا به صورت ترکیبی در محیط کشت برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی دارای منشأ داخلی در کشت درون شیشه‌ای استفاده شده است (Reed *et al.*, 1995)، همچنین از این آنتی بیوتیک‌ها در فرایند ضدعفونی به صورت قبل و یا بعد از ضدعفونی سطحی برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی استفاده شده است (Pedraz Santos *et al.*, 2006). صالحی و خوشخوی در رز مینیاتوری برای کنترل آلودگی باکتریایی از محلول جنتامایسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بعد از ضدعفونی سطحی استفاده کردند (Salehi & Khosh-Khui, 1997).

هدف اصلی در مرحله استقرار دستیابی به درصد بالای زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و همچنین تحریک تولید شاخه‌زایی می‌باشد. نوع عکس‌العمل یک بافت گیاهی به محیط‌های کشت مختلف، نوع و غلظت سیتوکینین بکار گرفته شده به عواملی از جمله: شرایط فیزیولوژیکی گیاهان مادری در زمان نمونه‌برداری، میزان کربوهیدرات و غلظت هورمون‌های داخلی وابسته می‌باشد که انتخاب یک محیط کشت و غلظت هورمونی مناسب را، در مراحل مختلف ریزازدیادی کاری سخت و دشوار می‌کند. گزارش شده بود که در خصوص اولین مرحله ریزازدیادی، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای استقرار مریستم‌های انجیر رقم بورسای سیاه^۱، نتایج رضایت بخشی را حاصل شد (Demiralay *et al.*, 1997). این در حالی بود که برای اولین مرحله ریزازدیادی انجیر رقم بورسای سیاه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز استفاده شده بود (Günver & Ertan, 1997). اگرچه هدف از آزمایش آن‌ها بررسی تأثیر زمان نمونه‌برداری بر درصد بقاء مریستم‌های جدا شده بود اما در هر سه زمان به کار رفته زنده‌مانی مریستم‌های کم‌تر از ۵۰٪ بود. نتایج پژوهش حاضر با نتایج آن‌ها مبنی بر نیاز حضور تنظیم کننده‌های رشد به خصوص سیتوکینین در مرحله استقرار مطابقت داشت. نتایج این آزمایش با نتایج (Sahraroo *et al.*, 2019) که از غلظت‌های متفاوت BA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) برای استقرار مریستم‌های دو رقم انجیر جامی‌کن و رقم سبز استفاده کرده بودند و نتایج رضایت بخشی کسب کرده بودند و حضور تنظیم کننده‌های رشد به خصوص سیتوکینین را در مرحله استقرار لازم دانستند مطابقت داشت. همچنین نتایج آزمایش حاضر با نتایج به دست آمده توسط (Nobre *et al.*, 1997) مطابقت نداشت به این علت که آن‌ها برای مرحله استقرار مریستم‌های دو رقم انجیر (بربا^۲ و لامپا^۳ برانکا) هیچ‌گونه تنظیم کننده‌ی رشدی به کار نبردند. حضور سیتوکینین‌ها برای تحریک رشد ضروری است، این در حالی است که غلظت‌های بالای سیتوکینین محدود کننده رشد بوده و شاخساره‌های کوتاه تولید می‌کنند. همچنین گزارش شده که پس از استفاده از سه محیط کشت MS، SH، B₅ در ریزازدیادی نوک شاخساره‌های انجیر رقم گولار بهترین محیط کشت انتخاب شده، محیط کشت MS بود (Kumar *et al.*, 1998)، که نتایج این محققان با پژوهش حاضر که بین دو محیط کشت MS و WPM مورد استفاده، محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM برتری داشت، مطابقت دارد. به‌طوری‌که در بررسی خصوصیات مهم رشدی، این محیط دارای عملکرد بهتری بود، علت رشد بهتر در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM به دلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن به ویژه نیترات موجود در محیط کشت MS است که مقدار آن تقریباً چهار برابر محیط کشت WPM است (Zarei *et al.*, 2013). بنابراین از آن جا که محیط کشت‌های مختلف با یکدیگر از نظر نوع و غلظت برخی از املاح و ترکیبات با یکدیگر متفاوت می‌باشند به همین دلیل رشد و نمو ریزنمونه‌های مستقر شده روی این محیط‌ها متفاوت بوده که با شناخت این تفاوت‌هاست که می‌توان یک محیط مطلوب برای هدف مورد نظر را شناسایی کرد. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط (Saha *et al.*, 2016)، بر روی واریته S-1 توت سفید *Morus alba* L. Variety-S-1 با نتایج (Gogoi *et al.*, 2017) بر روی توت هندی *Morus indica*، با نتایج (Aroonpong & Chang, 2015) بر روی توت مجنون *M. alba* var *shidareguwa*، که در اولین مرحله ریزازدیادی (مرحله استقرار) بهترین محیط کشت را محیط کشت MS، گزارش کرده‌اند مطابقت داشت.

یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در افزایش درون شیشه‌ای گیاهان، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند و نقش BA به عنوان یک سیتوکینین تأثیرگذار در پرآوری شاخساره در بسیاری از گیاهان گزارش شده است. موفقیت و کارایی پروتکل‌های تجاری ریزازدیادی به‌طور گسترده‌ای به میزان پرآوری شاخساره بستگی دارد. کارایی تکثیر شاخساره به وسیله فاکتورهای متعددی از جمله گونه گیاهی، ترکیبات محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده رشد و برخی عوامل درون شیشه‌ای دیگر بستگی دارد در پژوهش حاضر اثر سطوح BA بر میزان پرآوری معنی‌دار بود و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین میزان پرآوری را داشت سیتوکینین‌های مصنوعی مانند BA، فعالیت بیولوژیکی بسیار بالایی را دارند و گران نمی‌باشند، لذا کاربرد بسیار وسیعی در کشت بافت دارند. سیتوکینین‌ها باعث تحریک نمو جوانه‌های جانبی نابجا، تورم بافت‌ها و همچنین تحریک تقسیم سلولی می‌شوند. نقش سیتوکینین‌ها در کشت بافت گیاهی، در تحریک نمو جوانه‌های جانبی از طریق کاهش غالبیت انتهایی بسیار حائز اهمیت است. از میان سیتوکینین‌ها BA فعال‌ترین، ارزان‌ترین و تنها نوعی می‌باشد که می‌توان آن را اتوکلاو کرد. بنابراین

بیشترین کاربرد را دارا است. به خصوص در کارهای ریزازدیادی تجاری که هزینه و همچنین سادگی کار مورد توجه می باشد. نتایج تحقیق حاضر با یافته های حاصل از تحقیق (Sahraroo *et al.*, 2019) که بیشترین تعداد شاخساره را در انجیر رقم جامی کن و انجیر رقم سبز با کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر BA به دست آمد مطابقت داشت. نتایج نشان داد که با افزایش میزان BA از ۰ تا ۲ میلی گرم بر لیتر، طول شاخساره ها کاهش یافت که با نتایج محققانی که گزارش کرده اند با افزایش میزان BA طول شاخساره ها کاهش می یابد، مطابقت داشت (Shahcheraghi & Shekafandeh, 2015; Sahraroo *et al.*, 2019) همچنین استفاده از غلظت های متفاوت BA برای پرآوری ریزنمونه های انجیر توسط (Nobre *et al.*, 1997) نشان داده بود که با افزایش میزان BA در محیط کشت بر تعداد شاخساره های به دست آمده از هر ریزنمونه افزوده شده است، بیشترین میزان پرآوری در محیط کشت حاوی ۲/۲ میکرومولار (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) BA به دست آمد، که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت داشت. از طرفی دیگر با افزایش میزان BA، طول شاخساره ها سیر نزولی داشت. با افزایش میزان BA در محیط کشت تعداد پرآوری شاخساره ها زیاد شد ولی طول آن ها کاهش یافت، که غلظت های پایین BA شاخه های طویل تری را تولید کرده، و با افزایش غلظت سیتوکینین طول شاخساره ها کاهش یافت. همچنین بیان شده که غلظت بالای BA تعادل هورمونی داخل ریزنمونه ها را می تواند به هم زند و به علت کم کردن چیرگی انتهایی باعث ایجاد شاخه های کوتاه می شود، که نتایج پژوهش این محققان با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Naik *et al.*, 1999). نتایج به دست آمده در این تحقیق این نکته را تأیید می کند که سیتوکینین ها به دلیل کم کردن غالبیت انتهایی باعث تولید شاخساره های کوتاه می شوند. در پژوهش دیگری نیز دو نوع سیتوکینین (Kin, BA) در غلظت های مختلف برای پرآوری انجیر رقم رکسو دی والینوس^۱ بررسی شد و نتایج رضایت بخشی به همراه داشت (Fráguas *et al.*, 2004). در پژوهشی سه ترکیب هورمونی متفاوت برای مرحله دوم ریزازدیادی به کار برده شد و بیشترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در محیط حاوی ۵ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی گرم در لیتر IBA و GA₃ به دست آمد (Hepaksoy & Aksoy, 2006) که نتایج آن ها با نتایج این تحقیق مغایرت داشت. علت این تفاوت می تواند به این دلیل باشد که گونه های مختلف، ارقام، اندام های مختلف یک گیاه به کشت بافت گیاهی پاسخ یکسانی را نشان نمی دهند و همچنین وجود زمینه های ژنتیکی متفاوت نیز می تواند باعث بروز پاسخ های متفاوت شود. همچنین می تواند بستگی به محل رویش آن رقم، تغذیه و بنیه آن رقم داشته باشد. ارقام مختلف انجیر در غلظت های متفاوت هورمونی از خود پاسخ های متفاوتی را نشان می دهند یکی از دلایل به دست آمدن نتایج متفاوت در سیتوکینین می تواند به علت تفاوت در جذب سیتوکینین ها در سلول های گیاهی، شناسایی آن ها در سلول ها و مکانیسم عمل آن ها باشد. میزان استفاده از تنظیم کننده رشد BA بستگی به زمان گرفتن ریزنمونه در فصل های مختلف سال، سن گیاه مورد نظر، ژنوتیپ، رقم و مقدار هورمون های درونی ریزنمونه در گیاهان مختلف دارد. استفاده از سیتوکینین ها در غلظت های بیشتر موجب افزایش تعداد شاخه ها می شود که می تواند از چیرگی انتهایی ایجاد شده توسط اکسین جلوگیری کند اما باید به این نکته نیز توجه داشت که غلظت های بالای سیتوکینین موجب ناهنجاری های ژنتیکی و شیشه ای شدن گیاهچه ها نشود اگر در فاز تکثیر درون شیشه ای از غلظت های بالای سیتوکینین استفاده شود گیاهچه های تولید شده بیش از حد متورم شده و برگ ها در بعضی از ارقام حالت غیرطبیعی به خود می گیرند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مرحله ریشه زایی شاخساره های تولید شده از مرحله پرآوری در شرایط درون شیشه ای ریشه دار شدند. برای دستیابی به یک ریشه زایی مطلوب، اندازه شاخساره های متناسب لازم می باشد. لذا در ریشه زایی از شاخساره هایی به طول ۳-۴ سانتی متر استفاده شد که نتایج خوبی به همراه داشت. القاء ریشه زایی در ریزنمونه ها در شرایط کشت بافت یکی از مراحل بسیار سخت در فرآیند ریزازدیادی می باشد. ریشه زایی یکی از مراحل بسیار مهم در ریزازدیادی است که توسط شماری از عامل های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی تنظیم شده است. لذا توانایی بافت گیاه برای تشکیل ریشه های نابجا به برهمکنش بسیاری از عامل های داخلی و خارجی مانند هورمون ها، عنصرهای محیط کشت و نوع محیط کشت بستگی دارد. در این تحقیق اثر سطوح مختلف IBA در ریشه زایی معنی دار بود. بیشترین درصد ریشه زایی (۸۸/۲۶ درصد) در تیمار ۱/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به دست آمد. کمترین درصد ریشه زایی (۱۱/۶۹ درصد) در تیمار شاهد به دست

آمد. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط (Shahcheraghi & Shekafandeh, 2015; Sahraroo *et al.*, 2019) مطابقت داشت و با نتایج برخی محققان دیگر که حضور IBA را برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر رقم رکسو دی والینهوس ضروری ندانستند، مغایرت داشت (Fráguas *et al.*, 2004). اکسین‌ها اکثراً ریشه‌زایی را تحریک کرده در حالی که از رشد ریشه جلوگیری می‌کنند، که البته این موضوع می‌تواند بسته به نوع رقم متفاوت باشد.

در پژوهشی گزارش شده که برای ریشه‌زایی انجیر رقم ساری لوپ^۱ غلظت‌های متفاوتی از دو نوع اکسین IBA و NAA به کار برده شد و نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که از بین غلظت‌های (۰، ۱/۲، ۲/۵ و ۵ میکرومولار)، غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA مؤثرتر بود (Hepaksoy & Aksoy, 2006). برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر رقم گولار غلظت‌های متفاوتی از سه نوع اکسین IBA، NAA، IAA به کار برده شد، در بین این سه نوع اکسین، غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر IBA بیش‌ترین درصد گیاهان ریشه‌دار شده را به خود اختصاص داد (Kumar *et al.*, 1998). برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای ارقام برپا و لامپا برانکا که در یک تحقیقی مورد بررسی قرار گرفت آن‌ها غلظت‌های متفاوتی از دو نوع اکسین NAA و IBA را به کار برده‌اند، همچنین اذعان داشتند که بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی را IBA در غلظت ۲/۵ میکرومولار داشته است (Nobre & Romano, 1997). همچنین نتایج تحقیق (Dhage *et al.*, 2012) نشان داد که در مرحله ریشه‌زایی در محیط کشت MS 1/2، ریشه‌زایی درون شیشه‌ای گیاهچه‌های تولید شده در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر IBA به دست آمد. در پژوهش دیگری گزارش شده که محیط کشت MS نسبت به محیط کشت MS 1/2 در ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده انجیر رقم Seungjung Dauphine برتری داشت (Kim *et al.*, 2007). در خصوص مرحله ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر رقم Masui Dauphine گزارش شده که، گیاهان هم در محیط کشت MS بدون هورمون و هم در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IBA ریشه‌دار شده‌اند (Yakushiji *et al.*, 2003). گزارش شده که در خصوص مرحله ریشه‌زایی درون شیشه‌ای دو رقم انجیر رقم جامی کن و رقم سبز از چهار غلظت متفاوت IBA استفاده کردند و اظهار داشتند که بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۸۸/۳ درصد) در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد و در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر IBA (۷۸/۵ درصد) ریشه‌زایی داشت. در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر IBA بیش‌ترین تعداد ریشه را به خود اختصاص داد. بیش‌ترین طول ریشه در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. کم‌ترین طول ریشه در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد (Sahraroo *et al.*, 2019). طول‌ترین طول ریشه در این تحقیق در تیمار ۱/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به دست آمد، که با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین که بیش‌ترین طول ریشه را در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA به دست آورده بودند مطابقت داشت (Shahcheraghi & Shekafandeh, 2015; Sahraroo *et al.*, 2019). این در حالی بود که براساس نتایج تحقیق دیگری که توسط (Danial *et al.*, 2014) صورت گرفته بود، گزارش شده بود که طول‌ترین ریشه‌ها در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد که با نتایج این تحقیق مغایرت داشت. در مجموع نتایج این آزمایش با نتایج محققان دیگری که حضور IBA را برای القاء ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر ضروری می‌دانستند، مطابقت داشت (Hepaksoy & Aksoy, 2006; Shahcheraghi & Shekafandeh, 2016; Sahraroo *et al.*, 2019). در یک پژوهش دیگری گزارش کردند که در مرحله ریشه‌زایی از دو محیط کشت MS و MS/2 و غلظت‌های مختلف IBA استفاده شد و نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در هر ریزنمونه در محیط کشت نیم غلظت MS و در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد (Shahcheraghi & Shekafandeh, 2016). هورمون‌های اکسین در محیط کشت در اکثر گونه‌های گیاهی ریشه‌زایی را تحریک می‌کنند بنابراین روابط متقابل زیادی بین ژنوتیپ، نوع هورمون و غلظت آن وجود دارد. به طور کلی، شروع ریشه‌زایی طی ۱۲ تا ۱۸ روز پس از انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی حاصل می‌شود.

نتیجه‌گیری

از آن‌جا که ضدعفونی سطحی یکی از مراحل بسیار مهم در پیش‌گیری از گسترش آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها طی انجام مرحله‌های کشت بافت می‌باشد. به همین دلیل بهینه‌سازی روش‌های ضدعفونی ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد. لذا بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق استفاده از ۲۵۰ میلی گرم در

لیتر سفتریاکسون، به منظور ضدعفونی ریزنمونه‌های انجیر پیشنهاد می‌شود. در مرحله استقرار بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی، محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA به تنهایی و یا همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مرحله ریشه‌زایی اثر سطوح BA بر میزان پرآوری معنی‌دار بود و تیمار ۱/۵ میلی گرم بر لیتر IBA بهترین نتایج را برای تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی به همراه داشت. لذا بهترین محیط‌های ذکر شده در هر مرحله این پژوهش می‌تواند برای انجام مطالعات آتی مشابه در انجیر پیشنهاد گردد.

References

منابع

- 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.
- Chawla, H. S. (2003). Principles of plant biotechnology, (2003). Translators. Farsi, M., & zulali J, Printing turn 4. Publisher Ferdowsi Mashhad University press, 495, (In Persian).
- Danial, G. H., Ibrahim, D. A., Brkat, S. A., Khalil, B. M. (2014). Multiple Shoots Production from Shoot Tips of Fig Tree (*Ficus carica* L.) and Callus Induction from Leaf Segments. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(1), 117-124.
- Demiralay, A., Yalçın-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.
- Dhage, S. S., Pawar, B. D., Chimote, V. P., Jadhav, A. S., Kale, A. A. (2012). *In vitro* callus induction and plantlet regeneration in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 12, 3395-3400.
- Fráguas, C. B., M. Pasqual, M., Dutra, L. F., & Cazetta, J. O. (2004). Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' Plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 471-474.
- Gogoi, G., Borua, P. K., Al-Khayri, J. M. (2017). Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 249-256.
- 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.
- Habiba, U., Reza, S., Saha, M. L., Khan, M. R., Hadiuzzaman, S. (2002). Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: identification and prevention. *Plant Tissue Cult*, 12(2), 117-124.
- Hepaksoy, S. E. R. R. A., Aksoy, U. (2006). Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 50(3), 433-436.
- Kim, K. M., Kim, M. Y., Yun, P. Y., Chandrasekhar, T., Lee, H. Y., Song, P. S. (2007). Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.). *Journal of Plant Biology*, 50, 440-446.
- 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).
- Kumar, V., Radha, A., Kumar Chitta, S. (1998). *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) using apical buds from mature trees. *Plant Cell Reports*, 17, 717-720.
- Mahdavian, M., Lessani, H., Ebadi, A., Fatah, R., Habibi Kuhi, M. (2008). Morphological study of genetic variation among Iranian figs (*Ficus carica* L.) cultivars. *Pajouhesh and Sazandegi*, 80, 144 –158. (In Persian).
- Naik, S.K., Pattnaik, S., Chand, P. K. (1999). *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Scientia Horticulturae*, 79(3-4), 175-183.
- Nobre, J., & Romano, A. (1997). *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. In *I International Symposium on Fig*, 480, 161-164.
- Pedraza Santos M.E., López-Peralta, M. C., González-Hernández, V. A., Engleman-Clark, E. M., Sánchez-García, P. (2006). *In vitro* regeneration of *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' by direct organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 189-198.
- Reed, B. M., Buckley, P. M., & Dewilde, T. N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 31, 53-57.
- 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.
- Salehi H., Khosh-Khui, M. (1997). A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature' rose explants. *Scientia Horticulturae*, 68(1-4), 145-148.

- Shahcheraghi, S. T., Shekafandeh, A. (2015). Clonal Propagation of Two Endangered Genotypes of Fig. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 16(1), 55-66. (In Persian).
- Shahcheraghi, S. T., Shekafandeh, A. (2016). Micropropagation of three endemic and endangered fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *Advances in Horticultural Science*, 30(3), 129-134.
- Yakushiji, H., Mase, N., & Sato, Y. (2003). Adventitious bud formation and plantlet regeneration from leaves of fig (*Ficus carica* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(6), 874-878.
- 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 & Tissue*, 4(2), 169-185. (In Persian).

Optimization of Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) cv. Sabz Using Shoot Tip and Single Node Explants

Mahboube hadavand khani¹, Abbas yadollahi^{1*}, Moslem jafari²

1. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, 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)

Nowadays, plant micropropagation is considered the main propagation method for numerous plant species, especially recalcitrant woody species, including the fig tree. However, micropropagation is still associated with some limitations, such as endophyte contaminations, phenolic compound secretion, and the lack of a reliable micropropagation protocol for many species. Thus, the main purpose of this study was to establish a reliable and efficient micropropagation protocol for *F. carica* cv. Sabz, as the most precious fig cultivar in Iran. For the elimination of endophytic bacteria contaminations, an initial experiment including different concentrations of ceftriaxone antibiotic (0, 50, 100, 150, 200 and 250 mg L⁻¹) was carried out. In the establishment stage, the effect of two basal media (MS and WPM) and PGRs combinations, including the interactions of BA (0, 0.5, 1, and 1.5 mg L⁻¹) × NAA (0 and 0.1 mg L⁻¹) were investigated. In the shoot proliferation stage, the MS medium and the effect of different concentrations of BA (0, 0.5, 1, and 2 mg L⁻¹) were evaluated. In the rooting stage, the effect of different concentrations of IBA (0, 0.5, 1, and 1.5 mg L⁻¹) and half-MS medium were evaluated. After four weeks (the end of the rooting stage), parameters of rooting percentage, root numbers, and root length were calculated. The results demonstrated that the endophytic bacteria were successfully eliminated by using 250 mg L⁻¹ of ceftriaxone in the culture medium. MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BA with or without 0.1 mg L⁻¹ NAA was found as the best establishment medium (100 %). Besides, MS medium enriched with 2 mg L⁻¹ BA was identified as the best proliferation medium with a mean of 3.2 shoots/explant which displayed a significantly different from other proliferation treatments. ½ MS medium containing 1.5 mg L⁻¹ IBA resulted in the highest rooting percentages (88.26%), root length (6.15 cm), and root numbers (8.46).

Keyword: *Ficus carica*, endophytic bacteria, medium optimizing, micropropagation, phenolic compounds.