مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۰، شماره ۴، ۱۳۸۸ (۹-۱)

ریزازدیادی انجیر رقم جامی کن با استفاده از کشت مریستم

امیر صحرارو[۱]، مصباح بابالار[۲]*، علی عبادی[۳] و مینا کوهی حبیبی[٤]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۳۰- تاریخ تصویب: ۸۷/۸/۱۵)

چکیده

در این تحقیق، ریزازدیادی گیاه انجیر رقم جامی کن از مریستم انتهایی گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. برای مرحله استقرار اندازه ریزنمونه مریستمی در دو سطح (۰/۴-۰/۲ و ۰/۷-۰/۵ میلیمتر)، نوع محیط کشت در دو سطح (MS و B_5) و غلظت هورمون بنزیل آدنین (BA) در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مطالعه قرار گرفتند و پس از یک ماه، درصد بقای ریزنمونه‌های مریستمی اندازه‌گیری شد. سپس مریستم‌های خوب رشد یافته برای مرحله باززایی استفاده گردیدند. برای مرحله پرآوری فاکتورهای غلظت هورمون BA در سه سطح (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با سه غلظت هورمون نفتالین استیک اسید (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. محیط کشت بکار رفته برای این مرحله محیط کشت پایه MS بود و برداشت داده‌ها (تعداد و طول شاخه‌های تولیدی) پس از ۶ هفته انجام شد. در مرحله ریشه‌زایی، غلظت هورمون ایندول بوتریک اسید در ۴ سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمون گردید. محیط کشت مورد استفاده نیز MS نیمه غلظت بود و پس از ۵ هفته، درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، تعداد و طول ریشه‌های تولیدی، داده‌برداری شدند. طبق نتایج بدست آمده، بیشترین درصد بقای ریزنمونه مریستمی در مرحله استقرار در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA دیده شد و بیشترین میزان زنده‌مانی نیز مربوط به ریزنمونه‌های با اندازه بزرگ‌تر بود. در مرحله پرآوری، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به سایر غلظت‌ها، بیشترین تعداد شاخه را حاصل نمود و این در حالی بود که کوتاهترین طول شاخه نیز در این سطح BA بدست آمد. همچنین بیشترین طول شاخه در غلظت ۱ میلی‌گرم BA دیده شد. در مرحله ریشه‌زایی، حداکثر تعداد گیاهک‌های ریشه‌دار شده در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل گردید، همچنین بیشترین تعداد ریشه برای هر گیاهچه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد.

واژه‌های کلیدی: انجیر (*Ficus carica* L.)، مریستم، بنزیل آدنین (BA)، ایندول بوتریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA).

مقدمه

استفاده از ریزازدیادی در تکثیر و تولید گیاهان سالهاست که مورد توجه محققان قرار گرفته و این شاید بدان علت است که کاربرد شیوه‌های سنتی در تکثیر گیاهان خصوصاً گیاهان کلونی علاوه بر اینکه فرایندی طولانی است (Bagheri, 2002; Harris & Stevenson,

* نویسنده مسئول: مصباح بابالار تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۸۷۲۱ E-mail: m.babalar@ut.ac.ir

(1979، احتمال گسترش بیماری‌ها نیز وجود دارد. بنابراین برای تولید گیاهان سالم، یکدست و یکنواخت در مدت زمان کم، استفاده از روش‌های کشت بافت لازم است (Bagheri, 2002; Blazina et al., 1991). در بین روش‌های کشت بافت، کشت مریستم از جمله روش‌هایی است که به دلیل تولید گیاهان سالم و شبیه به اصل[1] مورد توجه خاص محققان بوده و هست. در این بین کشت مریستم گیاهان باغی نیز مد نظر قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به کشت مریستم انتهایی کاج سفید (Goldfarb et al., 1996)، کشت مریستم درختان گلابی (Postman & Hadidi, 1995) و کشت مریستم انتهایی هلو (Manganaris et al., 2003) اشاره نمود. درمورد انجیر محققین متعددی در زمینه کشت بافت آن تلاش کرده‌اند.

انجیر با نام علمی *Ficus carica* L. از جمله درختان نیمه گرمسیری است که در ایران نیز کشت و کار می‌شود. سطح زیر کشت جهانی آن طبق آمار فائو در سال ۲۰۰۶، ۴۲۶۲۴۴ هکتار بوده و تولید سالانه‌ای حدود ۱۰۷۰۶۷۶ میلیون تن را به خود اختصاص داده است (FAOSTAT, 2006). در ایران نیز در برخی استان‌های کشور مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. کل سطح زیر کشت آن ۵۱۲۵۴ گزارش شده است که تولید سالانه‌ای حدود ۸۷۵۲۱ تن را فراهم می‌کند (Agricultural Staistics, 2005). در سطح جهانی نیز در کشورهایی از قبیل ترکیه، مصر، یونان و الجزایر کشت و کار می‌گردد (FAOSTAT, 2006). در بین کشورهای تولیدکننده انجیر، بیشترین تولید انجیر خشکباری مربوط به ایران است و دیگر کشورها اغلب تولید میوه تازه‌خوری را به خود اختصاص داده‌اند. متوسط تولید ایران نیز در سال ۱۳۸۴، حدود ۸۷۵۲۱ تن و سطح زیر کشت آن ۵۱۲۵۴ هزار هکتار می‌باشد. استان‌های فارس، کرمانشاه و لرستان به ترتیب بیشترین سطح زیر کشت را دارند که استان فارس با تولید سالانه ۴۰۳۰۷ تن، مهم‌ترین تولیدکننده انجیر خشک در کشور می‌باشد (Agricultural Staistics, 2005).

ازدیاد طبیعی و معمول انجیر از طریق رویشی است که این امر مشکلات عدیده‌ای همچون انتقال عوامل بیماری‌زا را ایجاد خواهد کرد. کشت درون شیشه انجیر هر چند کم، توسط برخی محققان انجام گرفته است. ریزازدیادی انجیر از طریق کشت مریستم توسط Nober et al. (1998) و Gella et al. (1998) بررسی گردید. Demiralay et al. (1998) غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA را برای کشت مریستم انجیر بکار بردند. از طرفی تلاش‌هایی نیز در سال‌های اخیر برای بهینه کردن محیط کشت درون شیشه برخی ارقام انجیر توسط Hepaksoy & Aksoy (2006) انجام گرفت. آنها بیشترین میزان پرآوری را در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آوردند. این تحقیق نیز با هدف بررسی قابلیت کشت مریستم و همچنین بهینه‌سازی ریزازدیادی یکی از مهمترین ارقام انجیر تازه‌خوری ایران ترتیب داده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت و گلخانه گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران صورت گرفت. نوک شاخساره‌ها به طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر، پس از جداسازی از نهال‌های رشد یافته در گلخانه، بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافته، ابتدا با آب جاری و سپس با آب و چند قطره مایع ظرفشویی شسته شدند. پس از آن، ۳ بار با آب مقطر آبکشی گردیدند. ضدعفونی، جداسازی و کشت مریستم در زیر لامینارفلوی استریل انجام گرفت. برای این منظور، ریزنمونه‌ها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد و به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی گردیدند. در مرحله بعدی آنها با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بلافاصله پس از این مرحله، آنها در محلول کلرور جیوه ۰/۱ درصد حاوی ۰/۱ درصد محلول توئین ۲۰[2] به مدت ۴-۳ دقیقه نگهداری شده و سپس با آب مقطر استریل، سه مرتبه و با فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه آبکشی گردیدند. پس از جداسازی مریستم‌ها بوسیله سرنگ انسولین و در زیر استریومیکروسکوپ، هر ۴ مریستم در یک پتری دیش

1. true to type

2. Tween 20

(۸۰×۱۵mm) کشت شدند. در مرحله آخر، پتری‌دیش‌ها با پارافیلم کاملاً بسته شدند. به منظور کاهش خسارت مواد فنولی در مرحله استقرار، پتری‌دیش‌های حاوی مریستم به مدت ۱۰ روز بوسیله فویل آلومینیوم پوشانیده شدند و پس از ۱۰ روز فویل‌ها جدا گردید.

تهیه محیط‌های کشت

محیط‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط Murashig & Skoog (1962) (MS) و محیط کشت B5، (Gamborg et al., 1968; Murashig & Skoog, 1962) بود. به هرکدام از این دو محیط ۳۰ گرم ساکارز، ۷/۵ گرم آگار و تنظیم‌کننده‌های رشد متناسب با هر مرحله اضافه گردید. همچنین برای مرحله ریشه‌زایی، محیط کشت MS نیمه غلظت با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار بکار رفت. شایان ذکر است برای مرحله استقرار از زغال فعال به میزان ۲ گرم در لیتر و برای مراحل بعدی ریزازدیادی ۰/۰۵٪ پلی‌ونیل پیرولیدون[1] قبل از تنظیم pH به محیط کشت اضافه شد. pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم شد و در نهایت محیط حاصل داخل اتوکلاو (دمای ۱۲۱ $^{\circ}$C و فشار ۱ اتمسفر به مدت۳۰ دقیقه) استریل گردید. برای هر پتری‌دیش، ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. در مراحل پرآوری و ریشه‌زایی، برای شیشه‌های کشت (شیشه‌های مربایی)، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد.

نگهداری در اتاقک رشد

هر یک از پتری‌دیش‌ها و شیشه‌های کشت، در اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای شب ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. فتوپریود روی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم گردید. منبع نور مورد استفاده، لامپ‌های فلورسنت با نور سفید بود که شدت نور ۴۰ میکرواینشتین بر مترمربع در ثانیه ($\mu E.\ m^{-2}.\ sec^{-1}$) را در سطح هر یک از نمونه‌ها تأمین می‌کرد.

مراحل ریز ازدیادی

مرحله اول (استقرار)

در خصوص مطالعه مرحله استقرار کشت مریستم رقم جامی‌کن، تیمارهای اندازه مریستم، نوع محیط کشت و غلظت هورمون BA اعمال گردید. مریستم‌ها در دو اندازه ۰/۴-۰/۲ میلی‌متر و ۰/۷-۰/۵ میلی‌متر در زیر لامینارفلو و با استفاده از استریومیکروسکوپ و توسط سرنگ استریل جدا شده و هر ۴ مریستم در یک پتری‌دیش حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفتند. در این مرحله اندازه مریستم در دو سطح نامبرده، نوع محیط کشت در دو سطح (B5 و MS) و غلظت هورمون BA در ۳ سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شد. همچنین NAA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در تمامی موارد بکار رفت. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار پیاده شد. پس از ۵ هفته تعداد مریستم‌های رشدیافته برای ارزیابی درصد بقای مریستم‌ها در این مرحله مورد شمارش قرار گرفتند. پس از این مرحله، مریستم‌های زنده مانده در محیط کشت تازه MS که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بود واکشت شدند و این عمل هر ۳ هفته یکبار تکرار گردید. پس از گذشت ۱۰ هفته، مریستم‌های باقی مانده و رشد کرده برای مراحل بعدی آماده شدند (شکل ۱ A, B, C, D).

مرحله دوم (پرآوری)

مریستم‌های رشدکرده بطور جداگانه به قطعات حاوی دو جوانه (دوگره) تقسیم شده و در محیط‌های پرآوری قرار گرفتند. در این مرحله محیط کشت پایه MS با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار به همراه غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد بکار رفت. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی پیاده شد. تعداد تکرار ۱۰ عدد بود و هر شیشه به عنوان یک تکرار اعمال شد که در هر شیشه دو ریزنمونه قرار گرفت. تیمارهای اعمال شده شامل تیمار هورمونی BA در سه سطح (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و هورمون NAA در سه سطح (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه و تازه انتقال یافته و قسمت‌های قهوه‌ای و سیاه ناشی از مواد فنولیکی جدا گردید. ارزیابی مرحله پرآوری پس از ۶ هفته انجام گرفت. در این قسمت، تعداد شاخه‌های ایجادشده از هر ریزنمونه و همچنین طول شاخه‌های ایجادشده مورد ارزیابی قرار گرفت و

1. Polyvinyl pyrolidon (PVP)

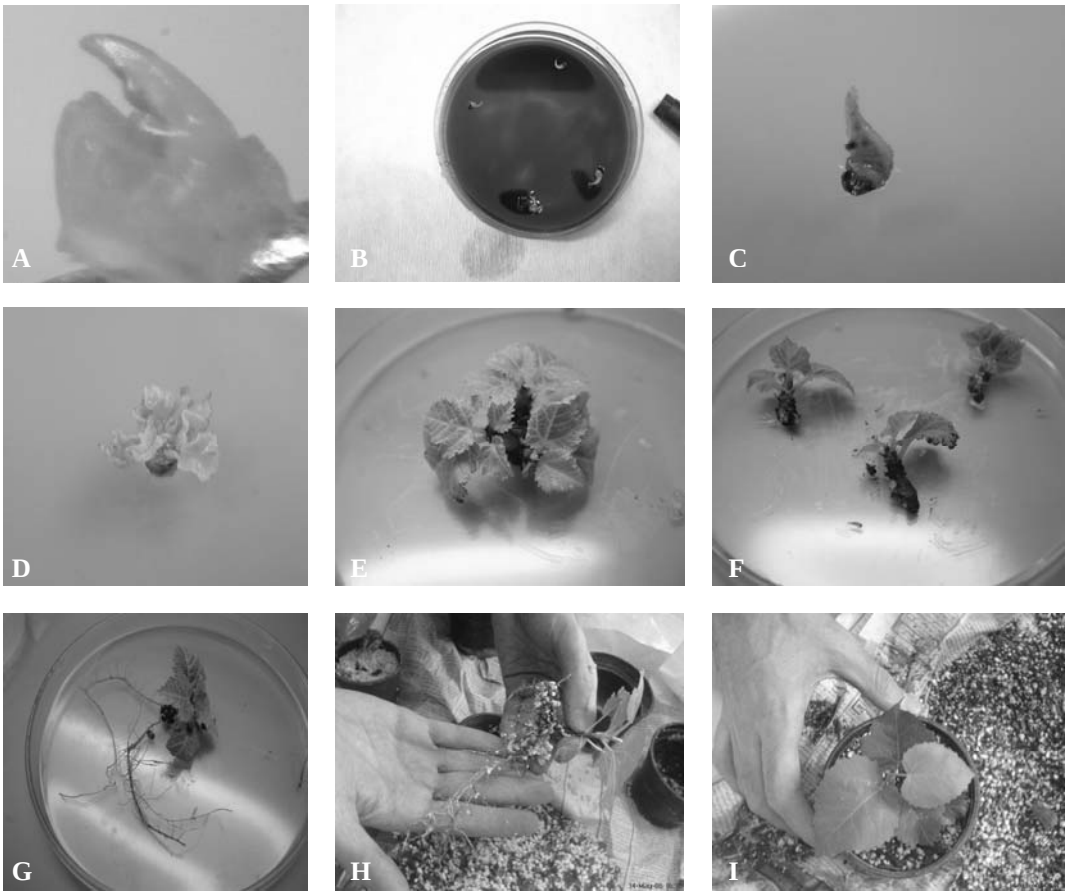
ریزنمونه‌های بطول بیش از ۱/۵-۱ سانتی‌متر برای مرحله ریشه‌زایی بکار رفتند (شکل ۱-E, F).

مرحله سوم (ریشه‌زایی)

در این مرحله اثر سطوح مختلف هورمون IBA بر ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای گیاهک‌های رشدیافته در مرحله پرآوری رقم جامی‌کن بررسی گردید. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله، MS نیمه غلظت با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار بود. سطوح هورمونی IBA شامل سطوح ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر اعمال گردید. آزمایش بصورت طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت که هر تکرار شامل ۵ شیشه بود و در هر شیشه تعداد ۲ گیاهک قرار داده شد. پس از ۵ هفته ارزیابی این مرحله برای صفاتی از قبیل درصد ریشه‌دارشدن، تعداد ریشه در هر گیاهک و طول ریشه صورت گرفت (شکل ۱-G).

سازگار کردن گیاهچه‌های ریشه‌دارشده

گیاهچه‌های دارای شاخساره و برگ‌های مطلوب و ریشه‌های قوی، از ظروف کشت بیرون آورده شدند و ریشه‌ها با دقت با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا بقایای محیط کشت جدا شود. پس از این، به منظور ممانعت از شیوع بیماری‌های قارچی، ریشه‌ها برای مدت زمان ۳۰ ثانیه در قارچ‌کش تیرام ۱/۵ در هزار قرار گرفتند. سرانجام، هر یک از گیاهان به داخل گلدان‌های کوچک حاوی پرلیت منتقل گردیدند. در طول ۲۰ روز اول، همه گلدان‌ها توسط مه افشان آبدهی شدند. پس از گذشت ۲۰ روز اول، گیاهان به مخلوط پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ انتقال یافتند. پس از استقرار بیشتر گیاهان، آنها به مخلوط خاک و پرلیت به نسبت ۱:۱ منتقل شدند. تغذیه گیاهان پس از این مرحله با محلول غذایی کوئیک نصف غلظت صورت گرفت (شکل ۱-H, I).



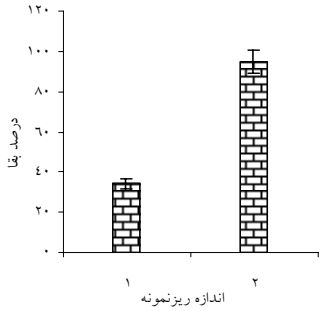
شکل ۱- مراحل ریز ازدیادی انجیر رقم جامی کن از طریق کشت مریستم

A- ریزنمونه مریستم جدا شده توسط سرنگ انسولین زیر استریومیکروسکوپ
B- ریزنمونه‌های مریستمی پنج هفته پس از کشت
C- ریزنمونه‌های مریستمی یک هفته پس از انتقال
D- ریزنمونه‌های رشد یافته در پایان هفته دهم
E- پرآوری ریزنمونه‌ها شش هفته پس از انتقال به محیط باززایی
F- جداسازی و آماده کردن شاخه‌های تولیدی برای مرحله ریشه‌زایی
G- گیاهک ریشه‌دار شده در شرایط کشت بافت
H- انتقال گیاهک ها به مخلوط پیت و پرلیت
I- گیاه کامل برای انتقال به شرایط گلخانه

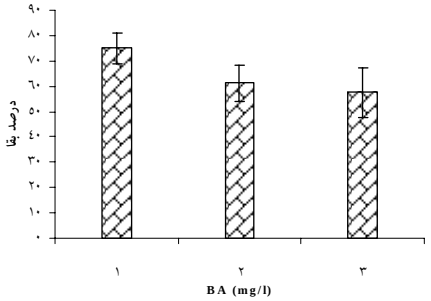
نتایج

مرحله استقرار

همبستگی مثبت بین اندازه مریستم و درصد بقای آن بدست آمد. اکثر مریستم‌های با اندازه بزرگ‌تر (۰/۵-۰/۷ mm) درصد بقای بالایی در هر دو محیط کشت از خود نشان دادند این در حالی بود که میزان تلفات مریستم‌های با اندازه کوچک‌تر در هر دو محیط کشت زیاد بود (شکل۲). امّا اختلاف معنی‌داری بین نوع محیط کشت و درصد بقای مریستم مشاهده نشد. کاربرد غلظت‌های متفاوت BA نیز اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در این خصوص محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد بقا را بخود اختصاص دادند و پس از آن غلظت‌های ۱و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند (شکل۳). اکثر ریزنمونه‌های کشت شده در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (شاهد) از بین رفتند. در این مرحله اثر متقابل اندازه ریزنمونه و محیط کشت، غلظت‌های BA و نوع محیط کشت، اندازه ریزنمونه و غلظت BA معنی‌دار نشدند. ریزنمونه‌های زنده مانده پس از این مرحله، هر سه هفته یکبار واکشت شدند که در طی این مدت نیز تعدادی از آنها از بین رفتند.



شکل ۲- اثر اندازه ریزنمونه بر درصد بقای مریستم نمودار



شکل ۳- اثر سطوح BA بر درصد بقای مریستم

مرحله پرآوری

نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های هورمونی BA در رابطه با میانگین تعداد شاخه ایجاد شده در هر ریزنمونه نشان داد. در مقایسه میانگین، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین میانگین تعداد شاخه را به خود اختصاص داد و پس از آن به ترتیب غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند (جدول ۱). میانگین تعداد شاخه‌های تولیدی در هر ریزنمونه غلظت‌های مختلف NAA اثر معنی‌داری نشان نداد. اثر غلظت‌های متفاوت NAA بر میانگین طول شاخه‌های تولیدی معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA طویل‌ترین طول شاخه را ایجاد کرد و پس ازآن تیمارهای ۰/۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند (جدول۱)، همچنین میزان‌های متفاوت BA بر طول ساقه‌های ایجاد شده اثر معنی‌داری داشتند در این بین بالاترین غلظت BA، کوتاه‌ترین شاخه را ایجاد کرد (جدول۱). علاوه بر این، اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و غلظت‌های متفاوت NAA اثر معنی‌داری از خود نشان دادند طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA طویل‌ترین و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و بدون NAA کمترین طول را به خود اختصاص دادند.

جدول ۱- اثر سطوح بنزیل آدنین BA و نفتالین استیک اسید (NAA) بر پرآوری (تعداد شاخه در هر ریزنمونه) و طول شاخه

	تیمار					
	بنزیل آدنین (mg/l)			نفتالین استیک اسید (mg/l)		
	۱	۱/۵	۲	۰	۰/۱	۰/۵
طول شاخه	۲/۳۸a	۱/۷۱b	۱/۲۱c	۱/۷b	۱/۷۶ab	۱/۸۳a
پرآوری	۱/۳۶c	۱/۸b	۲/۱a	.....	.....	.....

مرحله ریشه‌زایی

در این مرحله، ریشه‌زایی گیاهچه‌های بدست آمده در مرحله قبلی بررسی گردید. در این راستا اثر سطوح مختلف IBA بر درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده معنی‌دار شد. در مقایسه میانگین‌ها، بالاترین درصد (۸۶٪) مربوط به سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود و کمترین درصد نیز متعلق به IBA در سطح ۰/۵

میلی‌گرم است (جدول ۲). اثر سطوح IBA نیز بر طول ریشه‌ها معنی‌دار بود و طویل‌ترین ریشه‌ها در غلظت‌های ۲ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. کمترین طول نیز مربوط به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (جدول ۲). همچنین اثر IBA بر میانگین تعداد ریشه در هر گیاهچه معنی‌دار شد. IBA در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر بالاترین میانگین را به خود اختصاص داد وغلظت ۰/۵ میلی‌گرم در ۱ لیتر در مکان پایین‌ترین قرار گرفت (جدول ۲).

جدول۲- اثر سطوح ایندول بوتریک اسید (IBA) بر درصد ریشه‌زایی، میانگین طول‌ریشه (cm) و تعدادریشه در هر گیاهک

	ایندول بوتریک اسید(mg/l)				
	۲	۱/۵	۱	۰/۵	شاهد
درصد ریشه‌زایی	۸۰a	۸۶a	۶۳b	۵۰b	۱۵c
طول ریشه (cm)	۵/۸۳a	۵/۹۶a	۴/۳۶b	۱/۷۳c	۰/۶۷d
تعداد ریشه در هر گیاهک	۱۳/۶a	۱۱/۲b	۶/۳c	۲/۶d	۱/۱d

بحث

در این تحقیق نتیجه اثر اندازه مریستم بر درصد بقای ریزنمونه‌ها معنی‌دار شد و این با نتایج Salami et al. (2005) که در خصوص مریستم‌های انگور انجام شده بود، مطابقت داشت. Manganaris et al. (2003) نشان دادند در کشت مریستم هلو، اکثر ریزنمونه‌های جدا شده با اندازه کوچک (۱/۳-۰/۸ میلی‌متر) از بین رفتند و تنها ۵-۱/۷ درصد زنده ماندند، این در حالی بود که ریزنمونه‌های با اندازه بزرگ‌تر (۲-۱/۳ میلی‌متر)، ۳۷٪ زنده ماندند. آنچه که مسلم است اندازه اولیه ریزنمونه عاملی موثر در استقرار آنها در کشت‌های درون شیشه است. کشت و نگهداری ریزنمونه‌های کوچک معمولاً مشکل‌تر است و این در حالی است که ریزنمونه‌های بزرگ‌تر، علاوه بر کشت آسان‌تر، به علت دارا بودن مواد غذایی و مواد تنظم‌کننده رشدی بیشتر، استقرار و نگهداری مناسب‌تری خواهند داشت (Wang & Hu, 1980)، از طرف دیگر حضور آغازه برگی نیز در ریزنمونه مریستمی، بر قابلیت آن در رشد اثر خواهد گذاشت (Wang & Hu, 1980). در این تحقیق مریستم‌های بزرگ‌تر که آغازه برگی بیشتری را دارا بودند، نسبت به مریستم‌های دارای آغازه برگی کمتر، رشد و استقرار بهتری از خود نشان دادند. طبق نتایج حاصل از این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف BA بر درصد بقای مریستم‌ها در مرحله استقرار معنی‌دار شد، بطوریکه غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین نتیجه را داشت. Demiralay et al. (1998) غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را برای استقرار مریستم‌های انجیر رقم بورسای سیاه بکار برده و نتایج رضایت‌بخشی کسب نمودند. این در حالی بود که Gunver et al. (1998) برای اولین مرحله ریزازدیادی انجیر رقم بورسای سیاه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده نمودند. اگر چه آزمایش آنان در خصوص اثر زمان نمونه‌برداری بر درصد بقای مریستم‌های جدا شده بود اما در هر سه زمان بکار رفته درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های مریستم کمتر از ۵۰ ٪ نشان داد و این با آزمایش ما مبنی بر نیاز به حضور تنظیم‌کننده‌های رشد بخصوص سیتوکنین در مرحله استقرار مطابقت داشت. اما این نتایج با نتایج بدست آمده از آزمایش Nobre et al. (1998) مطابقت نداشت. آنها برای مرحله استقرار مریستم‌های دو رقم انجیر (بربا و لامپا برانکا) هیچگونه تنظیم‌کننده‌ای بکار نبردند. حضور سیتوکنین‌ها اکثراً برای تحریک رشد مریستم ضروری است این در حالی است که غلظت‌های بالای سیتوکنین محدودکننده رشد بوده و شاخساره‌های کوتاه تولید می‌کنند (Wang & Hu, 1980).

اثر نوع محیط کشت بر درصد بقای مریستم‌ها معنی‌دار نبود. Kumar et al. (1998) محیط کشت‌های MS، B_5 و SH را در ریزازدیادی نوک شاخساره‌های انجیر رقم گولار بکار بردند و اظهار داشتند بهترین محیط کشت MS بوده است. این با نتایج بدست آمده در این آزمایش که تفاوتی بین دو محیط کشت MS و BS مشاهده نگردید، مطابقت نداشت. Prehn et al. (2003) گزارش کردند درکشت مریستم کاج، دو هفته اول پس از جدا نمودن مریستم، ریزنمونه در حال بازسازی خود است.

در مرحله پرآوری اثر سطوح BA به میزان پرآوری معنی‌دار نشان داد و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین پرآوری را حاصل نمود. Nobre et al. (1998)

غلظت‌های مختلف BA را برای پرآوری ریزنمونه‌های انجیر بکار بردند. آزمایش آنها نشان داد با افزایش میزان BA در محیط بر تعداد ریزشاخه‌های بدست آمده از هر ریزنمونه افزوده شد و بیشترین پرآوری در محیط حاوی ۲/۲ میکرومولار (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. Demiralay et al. (1998) در خصوص مرحله دوم ریزازدیادی انجیر رقم بورسای سیاه ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را امتحان نمودند و اعلام کردند، بیشترین تشکیل شاخه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. Fraguas et al. (2004) دو نوع سیتوکنین (BA و کینتین) در غلظت‌های مختلف را برای پرآوری رقم راکس دی والینهو بکار بردند. در آزمایش ایشان غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه را تولید کرد. Hepaskoy & Aksoy (2006) سه ترکیب هورمونی متفاوت را برای مرحله دوم ریزازدیادی اعمال نمودند. بیشترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و GA_3 بدست آمد. نتایج این محققان با نتایج این تحقیق مغایرت داشت. Kumar et al. (1998) پرآوری انجیر رقم گولار را بررسی کردند. در آزمایش آنها با افزایش غلظت BAP تا ۲ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد شاخه‌های بدست آمده افزوده شد و غلظت‌های بالاتر سیتوکنین پرآوری کمتری نشان دادند. یکی از دلایل محتمل برای اختلافات موجود در غلظت مناسب BA برای بیشترین پرآوری در بین ارقام انجیر، حساسیت متفاوت ارقام به میزان متفاوت BA می‌تواند باشد، از طرف دیگر، علاوه بر ژنوتیپ، شرایط محیطی حاکم بر کشت بافت و نیز وضعیت گیاه مادری هم می‌تواند اثر بالقوه‌ای بر جواب‌دهی ریزنمونه بگذارد. سطوح NAA در این تحقیق بر میزان پرآوری اثر معنی‌دار نشان نداد و این با تحقیقات Kebeli et al. (1989) که برروی انگور انجام شده بود مطابقت داشت. همچنین Nobre et al. (1998) دریافتند، افزایش غلظت NAA از صفر به ۰/۱ بر میزان پرآوری انجیر ارقام بربا و لامپا برانکا اثر معنی‌دار نداشت. برهمکنش اکسین و سیتوکنین برروی میزان پرآوری در مرحله دوم ریزازدیادی، در برخی گونه‌های گیاهی موثر است و غلظت موثر از آنها نیز بسته به نوع گیاه، شرایط کشت و ترکیبات مورد استفاده متفاوت خواهد بود. میزان لازم از تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای باززایی، اغلب با اندازه و نوع ریزنمونه گرفته شده از یک گیاه تغییر پیدا می‌کند (George et al., 2008).

غلظت‌های متفاوت NAA بر میانگین طول شاخه‌های تولیدی اثر معنی‌دار نشان دادند. Salami et al. (2005) گزارش نمودند با افزایش غلظت NAA در محیط کشت به همراه BA، طول شاخه‌های انگور افزایش یافت. اکسین‌ها غالبیت انتهایی را سبب می‌شوند. حضور آنها در محیط کشت باعث رشد مریستم انتهایی و تولید شاخه‌های طویل‌تر می‌شود. همچنین در غلظت‌های مساوی از BA با افزایش غلظت NAA طول شاخه افزایش پیدا کرد.

از طرف دیگر با افزایش میزان BA، طول شاخساره‌ها سیر نزولی داشت. با افزایش مقدار سیتوکنین در محیط کشت، تعداد شاخه‌ها افزایش ولی اندازه آنها کاهش یافت. Salami et al. (2005) و Hartmann et al. (1997) وجود رابطه معکوس بین میزان پرآوری و طول شاخه‌های تولیدی در ریزازدیادی انگور را تایید کرده بودند. Fraguas et al. (2004) اذعان کردند غلظت‌های پایین‌تر BA، شاخه‌هایی طویل‌تر ایجاد کرده و با افزایش غلظت سیتوکنین، طول شاخه‌های بدست آمده کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز این نکته را تایید می‌کند که سیتوکنین‌ها به علت کم کردن غالبیت انتهایی باعث ایجاد شاخه‌های کوتاه می‌شوند. Kumar et al. (1998) در خصوص میانگین طول شاخه‌های ایجاد شده انجیر رقم گولار، نشان دادند طویل‌ترین شاخه‌ها در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA ایجاد شد، این در حالی بود که در آزمایش ما، طویل‌ترین طول شاخه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در غلظت‌های پایین BA، تعداد جوانه‌های کمی تولید می‌گردد که مدت زمان لازم برای طویل شدن این جوانه‌ها از مدت لازم برای طویل شدن در غلظت‌های بالاتر سیتوکنین، کمتر است.

در مرحله ریشه‌زایی، اثر سطوح IBA بر درصد گیاهان ریشه‌دار شده معنی‌دار بود و بیشترین درصدریشه‌زایی در ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست

آمد و این با نتایج Brum (2001) و Fraguas et al. (2004)، که حضور IBA را برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای گیاهان انجیر رقم راکس دی والنهو ضروری ندانستند، مغایرت داشت. از طرف دیگر Hepaksoy & Aksoy (2006) برای ریشه‌زایی درون شیشه انجیر رقم ساری لوپ غلظت‌های متفاوتی از NAA و IBA بکار بردند و نشان دادند از بین غلظت‌های ۰، ۱/۲، ۲/۵ و ۵ میکرومولار، غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA از بقیه موثرتر است. همچنین برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر رقم گولار میزان متفاوتی از هورمون‌های IBA، NAA و IAA توسط Kumar et al. (1998) بکار رفت. در بین این سه غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده را به خود اختصاص داد. Nobre et al. (1998) نیز برای مرحله ریشه‌زایی درون شیشه‌ای انجیر ارقام بربا و لامپا برانکا هورمون‌های IBA و NAA را در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۲، ۲/۵ و ۵ میکرومولار بکار بردند و اظهار داشتند بیشترین درصد ریشه‌زایی را IBA در غلظت ۲/۵ میکرومولار داشته است. اکسین‌ها اکثراً ریشه‌زایی را تحریک کرده ولی از رشد ریشه جلوگیری می‌کنند. البته این موضوع بسته به رقم متفاوت خواهد بود. طویل‌ترین طول ریشه در غلظت ۲ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که به نظر می‌رسد این غلظت‌ها هنوز به حدی نرسیده‌اند که بتوانند از رشد ریشه جلوگیری کنند. نتایج Nobre et al. (1998) نشان داد طویل‌ترین طول ریشه در محیط حاوی ۲/۵ میکرومولار IBA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست می‌آید و غلظت‌های بیشتر و یا پایین‌تر، میانگین طول ریشه کمتری ایجاد می‌کنند، که با نتایج حاصله از این تحقیق همخوانی نداشت چرا که در اینجا بیشترین طول ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. از طرف دیگر، Kumar et al. (1998) اظهار داشتند با افزایش غلظت IBA تا حد ۲/۵- ۲ میلی‌گرم در لیتر، رشد ریشه ادامه یافته و در غلظت‌های پایین و بالاتر از این، رشد آن محدود گردید، که با نتایج ما مطابقت می‌کند.

بیشترین تعداد ریشه در هر گیاهچه در غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA توسط Nobre et al. (1998) به اثبات رسید، و این در حالی است که حداکثر تعداد ریشه (۱۵ ریشه) در هر گیاهچه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA توسط Kumar et al. (1998) اعلام گردید. در این تحقیق نیز بیشترین تعداد ریشه در هر گیاهچه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. آنچه که برخی محققان معتقدند آن است که متاسفانه، رفتار بافت گیاهی در شرایط کشت بافت (از قبیل کالوس‌زایی، رشد و باززایی) به نظر می‌رسد بیشتر تحت تاثیر ژنتیک هستند و دیگر فاکتورها در رتبه‌های پایین‌تر قرار دارند. این مورد بیشتر در رابطه با گیاهان علفی همچون گندم و یونجه بررسی شده است. ژنوتیپ‌های گندم در محیط‌های کشت متفاوت، رفتارهای متفاوتی داشتند (George et al., 2008).

نتیجه‌گیری کلی

اگر چه کشت درون شیشه‌ای گیاهان اغلب قادر به تولید انبوه کلون‌های گیاهی و شبیه به اصل است اما استفاده از کشت مریستم علاوه بر تکثیر انبوه، در افزونش گیاهان سالم و عاری از بیماری نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. لذا با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و همچنین اهمیت درخت انجیر از نظر پتانسیل تولید در اکثر نقاط کشور و گسترش سطح زیر کشت آن بخصوص در مناطق غرب کشور و لزوم ایجاد باغ‌های یکدست، ریز ازدیادی و تولید نهال‌های سالم ارقام مهم کشور توصیه می‌گردد.

REFERENCES

1. Agricultural Statistics. (2005). *Bureau of Statistics & Information Technology*, Deputy of Planning & Economic Affairs, Ministry of Jahad-e-Agriculture. (In Farsi).
2. Bagheri, A. (2002). *Tissue Culture Techniques*. Ferdowsi University of Mashhad, Inc. Iran. (In Farsi).
3. Blazina, I., Korosec-Koruza, Z., Ravinkar, M. & Gogala, N. (1991). Regeneration and micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L.' Zelen ') from shoot tip meristem. *Acta Horticulturae*, 300, 123-126.
4. Brum, G. R. (2001). *Micropropagação da figueira* (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. p. 41.
5. Demiralay, A., Yalcin-Mendi, Y., Aka-Kacar, Y., Cetiner, S., Aksoy, U., Ferguson, L. & Hepaksoy, S. (1998). *In vitro* propagation of *Ficus carica* L. var. Bursa Siyahi through meristem culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen 480, 165–167.

6. Food and Agricultural Organization. (2006). FAOSTAT. Retrived April 2006 from http://www.faostat.org.
7. Fráguas, C. B., Pasqual, M., Dutra, L. F. & Cazzeta, O. (2004). Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 471–474.
8. Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151 -158.
9. Gella, R., Lopez Corrales, M., Toribio, F. & Marin, J. A. (1998). Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. *Acta Horticulturae*, 480, 173-178.
10. George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. (3rd ed.) 529 p.
11. Goldfarb, B., Howe, G. M., Hackett, W. & Monteuuis, O. (1996). Survival and growth of eastern white pine shoot apical meristem *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46, 171-178.
12. Gunver, G., Ertan, E., Aksoy, U., Ferguson, L. & Hepaksoy, S. (1998). A study on the propagation of figs by the tissue culture techniques. *Acta Horticulturae*, 480, 169-172.
13. Harris, R. E. & Stevenson, J. H. (1979). Virus elimination and rapid propagation of grapes *in vitro*. In: Proceedings of *International Plant Propagation Society*, 29, 95-106.
14. Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davis, F. T. & Genere, R. L. (1997). *Plant Propagation: Principles and Practices*. (6th ed.). Prentice Hall, Inc. USA. PP: 540-611.
15. Hepaksoy, S. & Aksoy, U. (2006). Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 50, 433–436.
16. Kebeli N., Boz, Y. & Gursoy, Y. Z. (1989). *The research on the propagation with meristem culture of elite vine material from clonal selection studies*. Viticulture Research Institute.
17. Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., Giridhar, P. & Ravishankar, G. A. (2007). Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(1), 11-18.
18. Manganaris, G. A., Economou, A. S., Boubourakas, I. N. & Katis, N. I. (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*, 22, 195-200.
19. Murashige, J. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
20. Nobre, J., Romano, A., Aksoy, U., Ferguson, L. & Hepaksoy, S. (1998). *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. *Acta Horticulturae*, 480, 161–164.
21. Postman, J. D. & Hadidi, A. (1995). Elimination of apple scar skin viroid from pears by *in vitro* thrmotherapy and apical meristem culture. *Acta Horticulturae*, 386, 536-543.
22. Prehn, D., Serrano, C., Mercado, A., Stange, C., Barrales, L. & Johnson, P. A. (2003). Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 91-94.
23. Salami, A. R., Ebadi, A., Zamani, Z. & Ghasemi, M. (2005). Improvement in apex culture in an Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Bidaneh Sefid') through fragmented shoot apices. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(3), 333-336.
24. Wang, P. J. & Hu, C. Y. (1980). Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 18, 61-99.