باززایی از کالوس تولید شده از قسمت‌های مختلف گیاهک انجیر معابد (*Ficus religiosa* L.) با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

محمدحسین دانشور [۱*] و محسن حسامی [۲]

۱ و۲- دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین- دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین

*نویسنده مسئول: mhdaneshvar2004@yahoo.com

چکیده

انجیر معابد با نام علمی *Ficus religiosa* L. درختی بزرگ، همیشه سبز، زینتی، دارویی و با عمر طولانی بوده که بومی کشور هند است و به طور گسترده‌ای در سراسر هند، پاکستان، بنگلادش، سیلان، چین، برمه و تایلند کشت می‌گردد. در این پژوهش از قسمت‌های مختلف گیاهک انجیر معابد تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. بیشترین وزن کالوس (۲/۹ گرم) از ریز نمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. بیشترین درصد باززایی با میانگین ۱۰۰ درصد مربوط به تیمار کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و گره در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA. همچنین کالوس حاصل از ریزنمونه گره در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین ۹۵/۰۰ درصد در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۵۰ میلی گرم پوتریسین مشاهده گردید. بیشترین درصد زنده‌مانی در آزمایش سازگاری با میانگین ۸۵/۰ درصد مربوط به بستر کشت پرلایت همراه با کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) بود.

کلمات کلیدی: القاء کالوس، انجیر معابد، اندام‌زایی غیرمستقیم، ریشه‌زایی، سازگاری

۱- مقدمه

انجیر معابد با نام علمی *Ficus religiosa* L. از تیره Moraceae و از مشهورترین گونه‌های جنس *Ficus* می‌باشد. جنس *Ficus* دارای ۸۰۰ گونه است. این گیاه بومی هند و بنگلادش است و به طور گسترده‌ای در سراسر جهان کشت می‌شود (مک فارلند[۱]، ۱۹۴۴و گالیل[۲]، ۱۹۸۴). انجیر معابد گیاهی است که گفته می شود بودا در زیر آن متولد شده است. همچنین در کشور هاوائی، این گیاه در نزدیکی معابد کاشته می‌شود. این گیاه تنومند و پر شاخه و برگ به علت شکل و فرم زیبای آن می‌تواند به عنوان یک گیاه نمونه در فضای سبز استفاده شود.

ازدیاد جنسی انجیر معابد در کشور هاوایی، به علت عدم حضور زنبور[۳] گرده افشان، امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین مناسب‌ترین روش تکثیر انجیر معابد در این جزیره از طریق قلمه و یا کشت بافت است ولی در کشور فلسطین اشغالی، گرده افشانی این گیاه بوسیله زنبور گرده افشان *Blastophaga quadraticeps* با موفقیت صورت گرفته است (گالیل و ایسیکوویچ[۴]، ۱۹۶۸).

[1] McFarland
[2] Galil
[3] Wasp
[4] Galil and Eisikowitch

انجیر معابد گیاهی چند ساله است که در آب و هوای موسمی با شاخه های گسترده، نیمه برگ‌ریز یا به طور کامل برگ‌ریز می‌باشد. برگ‌های این گیاه پهن و تخم مرغی شکل، براق و چرم مانند و به رنگ سبز تیره می‌باشد. طول آن‌ها ۱۸-۱۲ سانتی متر و نوک آن دم مانند است. میوه‌های انجیر معابد گرد، سبز رنگ و عرض آن ۱/۵سانتی متر است که هنگام رسیدن، به رنگ بنفش با نقطه های قرمز مشاهده می‌شود (بریکل و زوک[1]، ۱۹۹۷).

بسیاری از مردم کشور هند از عصاره انجیر معابد به عنوان تقویت کننده مغز، استفاده می کنند. این گیاه در طب سنتی هند برای بیماری ها مختلفی استفاده می شود (چاندراسکار و همکاران[2]، ۲۰۱۰). میوه های انجیر معابد دارای بسیاری از خواص دارویی از جمله خواص ضد دیابت، ضد سرطان، ضد تشنج، ضد ویروس و دارای ترکیبات ثانویه است (پاراشارامی و همکاران[3]، ۲۰۱۴). عصاره پوست این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی، قابض و ملین است و به عنوان ضد اسپاسم استفاده می‌شود. همچنین در اسهال، اسهال خونی، سوزاک، گال و زخم نیز کاربرد دارد. عصاره آبی پوست آن نیز فعالیـــت ضد باکتـری در مقابل باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* نشان می دهد. برگ ها و شاخه های جوان انجیر معابد ملین و در درمان بیماری های پوستی استفاده می‌شود (غنی[4] ۲۰۰۳). پژوهش‌های فیتوشیمیایی بر روی *Ficus religiosa* L. به شناسایی فیتوسترولها، اسیدهای آمینه، فورانوکومارین ها، ترکیبات فنولی، هیدروکربن ها، الکل های آلیفاتیک، ترکیبات فرار و چندین ترکیب دیگر از متابولیتهای ثانویه از بخش های مختلف آن منجر شده است (تاسکین و همکاران[5]، ۲۰۰۹).

امروزه برای تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت[6]، روش ریز ازدیادی استفاده می شود. روش کشت بافت فواید زیادی دارد. در کشت بافت میزان تکثیر به طور چشم گیری افزایش می‌یابد. همچنین امکان تولید مواد عاری از پاتوژن را فراهم می سازد، روش های کشت بافت امکان تولید گیاهان بدون تنوع ژنتیکی و تولید گیاه در حد انبوه را فراهم می سازد (تریپتی و تریپتی[7]، ۲۰۰۳).

از آن جا که استفاده گسترده از گیاهان دارویی موجود در رویشگاه های طبیعی موجب نابودی آن ها می‌شود، حفظ ذخایر ژرم پلاسم گیاهان دارویی در معرض انقراض امری ضروری است، تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت، یکی از روش های حفاظتی موثر برای جلوگیری از نابودی آن ها است (سیواچ و همکاران[8]، ۱۳۹۱).

توسعه یک روش ریزازدیادی کارآمد برای انجیر معابد در کشور عزیزمان ایران مهم می‌باشد. در سال‌های اخیر چندین روش ریزازدیادی انجیر معابد با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف در مقالات خارجی ارائه شده است. با این حال، در ایران، هیچ گزارشی از ایجاد یک پروتکل ریزازدیادی برای انجیر معابد وجود ندارد. بنابراین این پژوهش به منظور ارائه یک پروتکل برای تکثیر انبوه این گیاه مهم دارویی و زینتی از طریق کشت در شرایط درون شیشه‌ای صورت پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ بر روی گیاه انجیر معابد در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گردید. میوه‌های انجیر معابد از درخت ۵۰ ساله در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان در خرداد ماه جمع‌آوری شدند و سپس در سردخانه آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی در دمای ۱±۴+ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰٪ نگهداری شدند.

[1] Brickell and Zuk
[2] Chandrasekar *et al.*
[3] Parasharami *et al.*
[4] Ghani
[5] Taskeen *et al.*
[6] Tissue culture
[7] Tripthi and Tripthi
[8] Siwach *et al.*

بذرها پس از ۳۰ دقیقه شست و شو با آب جاری، به مدت ۱۰ ثانیه درالکل اتیلیک ۷۰٪ و ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ضد عفونی شدند. پس از ۳ بار شست و شو با آب مقطر استریل به محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) ۰/۱ غلظت و pH برابر ۵/۸ ، ساکارز ۳٪ و آگار ۰/۶٪ منتقل شدند. کلیه مواد، ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. بذرها برای جوانه‌زنی در محیط کشت MS ۰/۱ غلظت منتقل شدند و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

۲-۲- القاء کالوس

در این آزمایش از ریز نمونه‌های برگ، گره، میانگره و ریشه از دانهال تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید. آزمایش القاء کالوس به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ عامل نوع محیط کشت تولید کالوس و نوع ریزنمونه (برگ، گره، میانگره و ریشه از گیاهک‌های ۳۰ روزه) با ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ ریزنمونه) انجام گردید.

برای القاء و رشد کالوس، ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت القاء کالوس در شرایط تاریکی قرار داده شدند. برای فراهم نمودن شرایط تاریکی، از پلاستیک‌های غیر قابل نفوذ به نور استفاده شد. شرایط دمایی ۲±۲۵+ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. پس از ۴ هفته کالوس‌های تولید شده در شرایط کاملاً استریل با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شدند و برای اندام‌زایی، کالوس‌ها در محیط کشت باززایی قرار داده شدند.

۲-۳- اندام‌زایی غیرمستقیم

آزمایش اندام‌زایی غیرمستقیم به صورت فاکتوریل در ۳ عامل شامل نوع کالوس (کالوس حاصل از برگ، گره، میانگره و ریشه)، محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و محیط‌های کشت اندام‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ کالوس) انجام گردید. شیشه‌های کشت در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد در اتاق رشد منتقل گردیدند. برای کنترل فنول در این آزمایش از ۲ گرم در لیتر (۰/۲ w/v٪) ذغال فعال در محیط کشت استفاده شد. به محض مشاهده فنول در محیط کشت، کالوس‌ها زیر کشت شدند.

۲-۴- ریشه‌زایی

هر شاخساره بدست آمده از باززایی (به طول ۳-۲ سانتی‌متر) به طور جداگانه به محیط کشت جامد MS حاوی غلظت‌های مختلف از انواع تنظیم کننده رشد گیاهی منتقل شدند. سپس بعد از ۲ هفته هر یک از نمونه‌ها در محیط کشت پایه MS قرار داده شدند.

در این پژوهش آزمایش ریشه‌زایی به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار (۱۰ نمونه) بر روی شاخص‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۵- سازگاری

آزمایشی به منظور سازگاری گیاهک‌های ریشه‌دار شده با استفاده از ۳ بستر کشت پرلایت، پرلایت + کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) و کوکوپیت به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵ گیاهک) انجام گردید و داده‌های بدست آمده تجزیه و تحلیل آماری گردید.

پس از اتوکلاو شدن گلدان‌های آلومینیومی در هر گلدان یک گیاهک کشت گردید و درون کیسه‌های پلاستیکی که با سیم‌های مخصوص درب کیسه‌ها بسته شده بود قرار داده شدند و به اتاق رشد منتقل گردیدند. پس از ۴ روز گره پلاستیک‌ها بازتر گردید و بعد از روز دهم گره‌ها به طور کامل باز شد و گلدان‌ها با محلول هوگلند آبیاری شدند. پس از ۴ هفته شاخص درصد

زنده‌مانی گیاهک‌ها اندازه گیری شد و سپس گیاهک‌ها به گلخانه منتقل شدند و در گلدان‌های پلاستیکی محتوی خاک، ماسه و کود به نسبت ۱:۱:۱ کشت گردیدند.

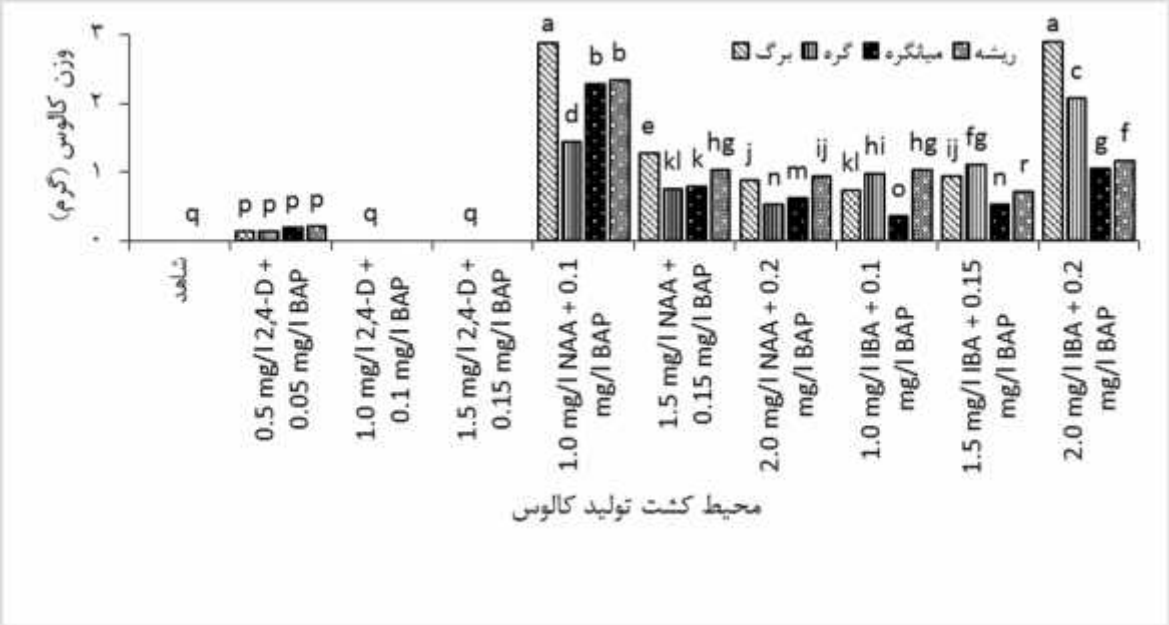
۶-۲- محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS(۹/۳) تجزیه و تحلیل شد و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۱۳) رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- آزمایش القاء کالوس

نتایج اثر برهمکنش محیط‌های مختلف تولید کالوس و نوع ریزنمونه بر وزن کالوس پس از ۴ هفته نشان داد، تیمار ریزنمونه برگ در محیط کشت تولید کالوس ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین وزن ۲/۹ گرم بهترین تیمار در آزمایش القاء کالوس مشاهده گردید که از لحاظ آماری با همه تیمارها به جز تیمار ریزنمونه برگ در محیط کشت تولید کالوس ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین وزن کالوس با میانگین وزن ۰/۰۰ گرم در هر چهار ریزنمونه در محیط کشت‌های شاهد، ۲ و ۳ مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس بر وزن کالوس

* بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ ستون‌هایی که حروف متفاوت دارند از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشند و ستون‌های دارای حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

به طور کلی مهم‌ترین عوامل برای تولید کالوس با کیفیت بالا، به ترکیب هورمونی محیط کشت با مقدار غلظت آن، نسبت آن‌ها و نوع ریزنمونه بستگی دارد. در این زمینه اکسین‌ها و غلظت‌های مختلف آن بیشترین نقش را دارند (پیریک، ۱۹۸۷). همچنین طبق گزارش‌های دانشور (۱۹۹۲) و پیری (۱۳۸۵) برای القاء کالوس از ریزنمونه‌های مختلف، افزودن تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (نوع، غلظت و نسبت اکسین به سیتوکینین) تا حد زیادی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های موجود در محیط کشت بستگی دارد.

سیواچ و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر فصل، ریزنمونه‌های گره، میانگره و جوانه انتهایی، تنظیم کننده‌های رشد و میزان قند را در کالوس‌زایی انجیر معابد و نگهداری طولانی مدت آن بررسی کردند. آن‌ها گزارش دادند که حداکثر کالوس‌زایی از بخش گره و در محیط کشت MS همراه با ۲/۲۶ میکرو مولار توفوردی (2,4-D) و ۳٪ ساکارز بدست آمد. پاراشارامی و همکاران (۲۰۱۴) در

آزمایشی به منظور بررسی فعالیت لکتین در میوه انجیر معابد از میوه انجیر معابد کالوس تولید کردند. آن‌ها برای القای کالوس از محیط کشت MS همراه با غلظت‌های مختلف 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با BAP استفاده کردند. آن‌ها گزارش دادند که محیط کشت MS همراه با ۴/۴۴ میکرومولار BAP و ۱۰/۹۵ میکرومولار 2,4-D بیشترین درصد القاء کالوس (۷۶/۶۷٪) را داشت.

زی و هانگ[1] (۲۰۰۱) گزارش دادند که تعادل هورمون‌های داخلی[2] ریزنمونه در پاسخ به تنظیم کننده رشد گیاهی استفاده شده[3] در کشت بافت در القاء کالوس نقش بسیار مهمی دارد. با توجه به این‌که در پژوهش حاضر ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی 2,4- D کالوس تشکیل ندادند، می‌توان نتیجه گرفت که تعادل داخلی هورمون ریزنمونه استفاده شده در این پژوهش با تعادل هورمونی ریزنمونه‌های استفاده شده توسط سیواچ و همکاران (۲۰۱۱) و پاراشارامی و همکاران (۲۰۱۴) متفاوت بوده است.

۲-۳- اندام‌زایی غیرمستقیم

در آزمایش اندام‌زایی غیرمستقیم، نتایج اثر برهمکنش نوع کالوس و محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس و اندام‌زایی بر درصد باززایی پس از ۱۰ هفته نشان داد، بیشترین درصد باززایی با میانگین ۱۰۰ درصد مربوط به تیمارهای کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و گره در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، کالوس حاصل از ریزنمونه گره در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (جدول ۱). لازم به ذکر است مکانیسم فعالیت تنظیم کننده رشد TDZ هنوز به طور دقیق شناخته نشده است، اما این فرضیه وجود دارد که این تنظیم کننده رشد به طور مستقیم با تحریک بافت، موجب افزایش شاخه‌زایی در گیاهان می‌گردد. همچنین TDZ با تحریک سیتوکینین‌های درون زا گیاه سبب تحریک و افزایش شاخه‌زایی در گیاه می‌گردد (هوتمن و پریس، ۱۹۹۳). محققین دیگر نیز اثر مثبت کاربرد سیتوکینین‌ها بر شاخه‌زایی گیاهان مختلف گزارش دادند (دانشور، ۱۹۹۲ و لاکشمی‌سیت[4]، ۱۹۹۳). باززایی گیاهان توسط فاکتورهای زیادی از قبیل ژنوتیپ، محیط کشت، تنظیم کننده رشد گیاهی، آگار، نوع ریزنمونه و شرایط نوری تحت تاثیر قرار می‌گیرد. سن فیزیولوژیکی و کرونولوژیکی[5] ریزنمونه‌ها و مدت زمان کشت درون شیشه‌ای تشکیل اندام را تحت تاثیر قرار می‌دهد. (ماگیار تابوری و همکاران[6]، ۲۰۱۰).

1. Xie and Hong
2. Endogenous hormones
3. Exogenous hormones
4. Lakshmi-Sit
5. Chronological age
6. Magyar-Tabori *et al.*

جدول ۱- اثر برهمکنش نوع کالوس و محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس و اندام‌زایی بر درصد باززایی در اندام‌زایی غیرمستقیم

محیط کشت تولید کالوس	محیط کشت اندام‌زایی	نوع کالوس			
		برگ	گره	میانگره	ریشه
1.0 mg/l NAA + 0.1 mg/l BAP	شاهد	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r
	0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l IBA	۸۳/۳۳ def	۷۶/۶۶fgh	۷۳/۳۳ ghi	۰/۰۰ r
	0.75 mg/l TDZ + 0.075 mg/l IBA	۹۰/۰۰ bcd	۸۶/۶۶ cde	۷۶/۶۶ fgh	۰/۰۰ r
	1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	۷۳/۳۳ ghi	۶۳/۳۳ jk	۶۳/۳۳ jk	۰/۰۰ r
	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	۹۳/۳۳ abc	۹۶/۶۶ ab	۹۳/۳۳ abc	۰/۰۰ r
	1.5 mg/l BAP + 0.15 mg/l IBA	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۹۶/۶۶ ab	۰/۰۰ r
	2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IBA	۹۶/۶۶ ab	۹۳/۳۳ abc	۸۶/۶۶ cde	۰/۰۰ r
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 50 mg/l PUT	۷۶/۶۶ fgh	۷۳/۳۳ ghi	۶۶/۶۶ ij	۰/۰۰ r
	0.5 mg/l BAP + 100 mg/l PUT	۹۳/۳۳ abc	۹۶/۶۶ ab	۸۶/۶۶ cde	۵۳/۳۳ lm
	0.2 mg/l TDZ + 100 mg/l PUT	۷۶/۶۶ fgh	۶۶/۶۶ ij	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l KIN.	۶۶/۶۶ ij	۷۰/۰۰ hij	۶۶/۶۶ ij	۰/۰۰ r
	300 mg/l PUT	۱۳/۳۳ q	۱۰/۰۰ q	۱۳/۳۳ q	۰/۰۰ r
	500 mg/l PUT	۳۳/۳۳ no	۵۳/۳۳ lm	۵۰/۰۰ lm	۰/۰۰ r
2.0 mg/l IBA + 0.2 mg/l BAP	شاهد	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r	۰/۰۰ r
	0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l IBA	۹۳/۳۳ abc	۹۶/۶۶ ab	۸۳/۳۳ def	۰/۰۰ r
	0.75 mg/l TDZ + 0.075 mg/l IBA	۸۳/۳۳ def	۱۰۰ a	۹۰/۰۰ bcd	۰/۰۰ r
	1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	۷۶/۶۶ fgh	۸۶/۶۶ cde	۷۳/۳۳ ghi	۰/۰۰ r
	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	۹۶/۶۶ ab	۹۳/۳۳ abc	۸۶/۶۶ cde	۰/۰۰ r
	1.5 mg/l BAP + 0.15 mg/l IBA	۱۰۰ a	۹۶/۶۶ ab	۸۳/۳۳ def	۰/۰۰ r
	2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IBA	۹۳/۳۳ abc	۷۳/۳۳ ghi	۶۶/۶۶ ij	۰/۰۰ r
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 50 mg/l PUT	۷۶/۶۶ fgh	۷۶/۶۶ fgh	۵۶/۶۶ kl	۰/۰۰ r
	0.5 mg/l BAP + 100 mg/l PUT	۸۶/۶۶ cde	۷۶/۶۶ fgh	۴۶/۶۶ m	۲۶/۶۶ op
	0.2 mg/l TDZ + 100 mg/l PUT	۵۳/۳۳ lm	۴۶/۶۶ m	۵۶/۶۶ kl	۰/۰۰ r
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l KIN.	۷۶/۶۶ fgh	۸۰/۰۰ efg	۵۶/۶۶ kl	۰/۰۰ r
	300 mg/l PUT	۲۳/۳۳ p	۳۰/۰ nop	۲۶/۶۶ op	۰/۰۰ r
	500 mg/l PUT	۳۰/۰۰ nop	۲۶/۶۶ op	۳۶/۶۶ n	۰/۰۰ r

بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ عددهایی که حروف متفاوت دارند از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشند و عددهای داری حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

همچنین بیشترین تعداد واکشت با میانگین ۷/۳۳ واکشت مربوط به تیمار کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و انتقال به محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (جدول ۲).

جدول۲- اثر برهمکنش نوع کالوس و محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس و اندام‌زایی بر تعداد واکشت در اندام‌زایی غیرمستقیم

محیط کشت تولید کالوس	محیط کشت اندام‌زایی	نوع کالوس			
		برگ	گره	میانگره	ریشه
1.0 mg/l NAA + 0.1 mg/l BAP	شاهد	۳/۶۶ f-i	۲/۶۶ ijk	۲/۳۳ jk	۲/۳۳ jk
	0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l IBA	۴/۶۶ def	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۳/۳۳ g-j
	0.75 mg/l TDZ + 0.075 mg/l IBA	۶/۰۰ bc	۵/۳۳ cde	۴/۶۶ def	۴/۰۰ fgh
	1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	۷/۳۳ a	۶/۶۶ ab	۶/۳۳ bc	۴/۳۳ efg
	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	۵/۶۶ bcd	۵/۳۳ cde	۵/۳۳ cde	۳/۶۶ f-i
	1.5 mg/l BAP + 0.15 mg/l IBA	۶/۳۳ bc	۵/۶۶ bcd	۵/۳۳ cde	۳/۶۶ f-i
	2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IBA	۶/۶۶ ab	۶/۳۳ bc	۵/۶۶ bcd	۴/۳۳ efg
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 50 mg/l PUT	۵/۳۳ cde	۴/۶۶ def	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg
	0.5 mg/l BAP + 100 mg/l PUT	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۳/۰۰ h-k
	0.2 mg/l TDZ + 100 mg/l PUT	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۴/۰۰ fgh	۳/۶۶ f-i
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l KIN.	۵/۶۶ bcd	۵/۳۳ cde	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg
	300 mg/l PUT	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۳/۰۰ h-k
	500 mg/l PUT	۴/۳۳ efg	۳/۶۶ f-i	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j
2.0 mg/l IBA + 0.2 mg/l BAP	شاهد	۳/۰۰ h-k	۲/۰۰ k	۲/۰۰ k	۲/۰۰ k
	0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l IBA	۴/۳۳ efg	۳/۶۶ f-i	۳/۶۶ f-i	۳/۰۰ h-k
	0.75 mg/l TDZ + 0.075 mg/l IBA	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۳/۶۶ f-i	۳/۰۰ h-k
	1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA	۵/۳۳ cde	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۴/۰۰ fgh
	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۲/۶۶ ijk
	1.5 mg/l BAP + 0.15 mg/l IBA	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۴/۳۳ efg	۳/۳۳ g-j
	2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IBA	۴/۶۶ def	۴/۳۳ efg	۴/۳۳ efg	۳/۰۰ h-k
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 50 mg/l PUT	۶/۶۶ ab	۵/۶۶ bcd	۵/۳۳ cde	۴/۳۳ efg
	0.5 mg/l BAP + 100 mg/l PUT	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۳/۰۰ h-k
	0.2 mg/l TDZ + 100 mg/l PUT	۴/۳۳ efg	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j
	0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l KIN.	۴/۳۳ efg	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۰۰ h-k
	300 mg/l PUT	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j	۳/۰۰ h-k
	500 mg/l PUT	۳/۶۶ f-i	۳/۶۶ f-i	۳/۳۳ g-j	۳/۳۳ g-j

بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ عددهایی که حروف متفاوت دارند از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشند و عددهای داری حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

مالی و بورخس (۲۰۰۳) گزارش دادند که بیشترین میزان فنول گیاه انجیر معابد در برگ‌های آن انباشته شده است. که در این پژوهش نیز بیشترین تعداد واکشت مربوط به ریزنمونه برگ بود. هنگامی‌که ریزنمونه مواد سمی خارج می‌کند و هاله‌ای قهوه‌ای رنگ در آگار ظاهر می‌شود بلافاصله ریزنمونه‌ها باید واکشت شوند (پیریک، ۱۹۷۶). در این آزمایش شاخساره‌ها از کالوس‌های بدست آمده از ریزنمونه‌های مختلف پس از ۱۰ هفته ایجاد شدند و طی این مدت چندین مرتبه زیر کشت گردیدند. در زیر کشت اول ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی با یک دوم غلظت تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت اول انتقال داده شدند و در زیر کشت دوم ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی با یک چهارم غلظت تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت اول و در زیرکشت‌های بعدی به محیط کشت MS پایه بدون استفاده از تنظیم کننده‌های رشد زیر کشت گردیدند. قهوه‌ای شدن[1] ریز نمونه‌ها و مرگ احتمالی بافت گیاهی در طول مرحله اول کشت بافت گیاهی یک مشکل همیشگی است. این از طریق فعالیت پلی فنول اکسیداز (PPO) و پراکسیداز بوسیله تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد (پان و وان استدن[2]، ۱۹۹۸). پلی فنل اکسیداز واکنش بین ترکیبات فنولی مختلف و اکسیژن مولکولی تولیدی کوئینون‌ها که پروتئین‌های بسیار واکنش‌پذیر و غیراختصاصی هستند را کاتالیز می‌کند و تولید رنگدانه تیره ملانین می‌کند (اونای و جفری[3]، ۲۰۰۰ و لنگ و همکاران[4]، ۲۰۰۹). همانطور که قبلا برای گونه‌های چوبی دیگر گزارش گردیده است، محیط کشت حاوی ذغال فعال در مرحله استقرار به طور موثری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها توسط جذب ترکیبات فنولی، ایجاد محیط تاریک و غیر فعال سازی فعالیت آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز و پراکسیدازجلوگیری کرده است و در نتیجه زنده‌مانی و اندام‌زایی ریزنمونه‌ها را افزایش می‌دهد (توماس[5]، ۲۰۰۸).

۳-۳- آزمایش ریشه‌زایی

نتایج اثر محیط‌های کشت مختلف ریشه‌زایی نشان داد، بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین ۹۵/۰۰ درصد در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۵۰ میلی گرم پوتریسین مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر محیط‌های کشت تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین درصد ریشه‌زایی با میانگین ۰/۰۰ درصد مربوط به محیط کشت شاهد بود. بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۵/۵۳ عدد در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۵۰ میلی گرم پوتریسین مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر محیط‌های کشت تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۰/۰۰ عدد مربوط به محیط کشت شاهد بود. بیشترین طول ریشه با میانگین ۴/۷۸ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۵۰ میلی گرم پوتریسین مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر محیط‌های کشت تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین طول ریشه با میانگین ۰/۰۰ سانتی‌متر مربوط به محیط کشت شاهد بود (جدول ۳).

پس از مرحله اندام‌زایی، شاخساره‌های ایجاد شده که از لحاظ طول، مناسب برای انتقال به مرحله ریشه‌زایی می‌باشند، گزینش می‌گردند و به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال داده می‌شوند. پس از تولید ریشه و سازگاری به خاک منتقل می‌گردند (پیریک، ۱۹۸۷). در آزمایشی حسن و همکاران (۲۰۰۹) به منظور ریشه‌دار کردن شاخساره‌های تولید شده از ریز نمونه گره گیاه انجیر معابد از غلظت‌های مختلف IBA و NAA استفاده کردند. آن‌ها گزارش دادند که محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA موجب بیشترین درصد القاء ریشه (۸۰٪) شد. پلی‌آمین‌ها یک گروه جدید از تنظیم کننده‌های رشد

[1] Browning
[2] Pan and van Staden
[3] Onay and Jeffree
[4] Leng *et al.*
[5] Thomas

گیاهی هستند که باعث تحریک رشد از طریق افزایش بیوسنتز آن‌ها در بافت‌های گیاهی می‌گردند (آریاس و همکاران[1]، ۲۰۰۵). پلی آمین‌ها در تشکیل ریشه و افزایش طولی ریشه‌ها نقش دارند (سود و ناجار[2]، ۲۰۰۸).

جدول ۳- جدول مقایسه میانگین برای شاخص‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه

محیط کشت	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)
محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد	۰/۰۰ j	۰/۰۰ g	۰/۰۰ h
1.0 mg/l IBA	۵۳/۳۳ e	۳/۵۵ d	۱/۸۰ fg
1.5 mg/l IBA	۶۵/۰۰ d	۳/۶۸ d	۲/۲۵ de
2.0 mg/l IBA	۷۸/۳۳ c	۴/۰۱ c	۲/۶۵ c
0.5 mg/l NAA	۲۶/۶۶ h	۲/۴۱ e	۱/۶۱ g
1.0 mg/l NAA	۳۳/۳۳ g	۲/۷۰ e	۱/۶۰ g
1.5 mg/l NAA	۴۵/۰۰ f	۲/۴۵ e	۱/۵۰ g
300 mg/l PUT	۸/۳۳ i	۱/۲۸ f	۲/۱۰ ef
500 mg/l PUT	۴۶/۶۶ f	۲/۴۸ e	۲/۸۳ c
0.25 mg/l NAA + 0.75 mg/l IBA	۶۸/۳۳ d	۲/۴۱ e	۲/۵۱ cd
0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l IBA	۶۶/۶۶ d	۲/۵۱ e	۲/۶۳ c
1.5 mg/l NAA + 50 mg/l PUT	۸۵/۰۰ b	۴/۴۱ b	۴/۳۰ b
2.0 mg/l IBA + 50 mg/l PUT	۹۵/۰۰ a	۵/۵۳ a	۴/۷۸ a

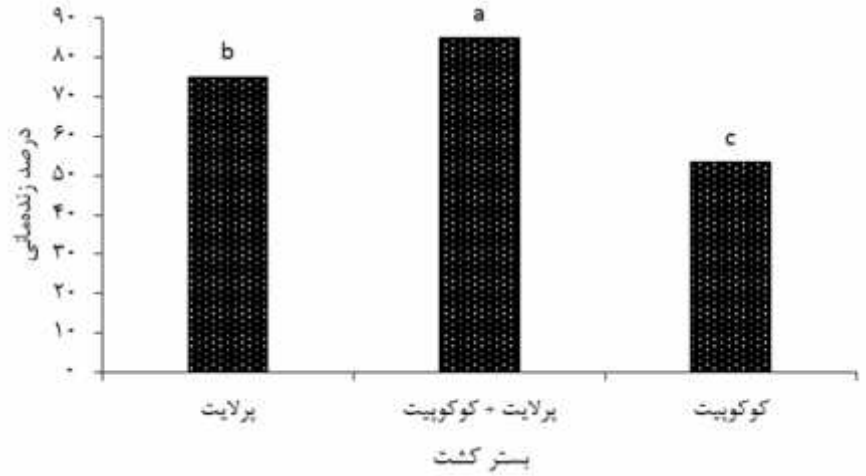
بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف متفاوت هستند از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشند و میانگین‌های داری حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

۴-۳- آزمایش سازگاری

نتایج اثر بسترهای کشت مختلف بر درصد زنده‌مانی نشان داد، بیشترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۸۵/۰ درصد مربوط به بستر کشت پرلایت + کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) بود که با سایر بسترهای کشت در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۵۳/۳۳ درصد در بستر کشت کوکوپیت مشاهده گردید (شکل ۲).

در آخرین مرحله ریزازدیادی، گیاهک‌های ریشه دار شده طی چند مرحله سازگاری به خاک انتقال داده می‌شوند. انتقال و سازگاری اندام‌های ریشه‌دار شده از داخل شیشه‌های کشت به بسترهای کشت در گلخانه که از نظر دما، رطوبت، نور و مواد غذایی متفاوت می‌باشند، صورت می‌گیرد (دانشور، ۱۹۹۲). حسن و همکاران (۲۰۰۹)، برای سازگاری گیاهک‌های ریشه‌دار شده گیاه انجیر معابد از مخلوط خاک، شن و ورمیکولیت با نسبت ۳:۱:۱ استفاده کردند. آن‌ها پس از استریل مخلوط مذکور، گیاهک‌های ریشه‌دار شده را در شرایط استریل در گلدان‌های استریل شده کشت کردند و به مدت ۲۵ روز گلدان‌های حاوی گیاهک‌ها در پلاستیک‌های استریل را در اتاقک رشد نگهداری کردند. آن‌ها گزارش دادند که بیش از ۸۵٪ گیاهک‌ها پس از انتقال به گلخانه زنده ماندند.

[1] Arias *et al*.
[2] Sood and Nagar



شکل ۲- اثر بسترهای کشت مختلف بر درصد زنده‌مانی در آزمایش سازگاری

* بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ ستون‌هایی که حروف متفاوت دارند از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشند و ستون‌های دارای حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

منابع

۱. پیری، خ. و نظریان فیروز آبادی، ف. ۱۳۸۵. راهنمای کشت بافت گیاهان. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، ۲۱۴ ص.

۲. پیریک، آر. ال. ام. ۱۹۷۶. مبانی کشت بافت‌های گیاهی، (مترجمین: باقری، ع. ر. و صفاری، م. ۱۳۸۴)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۰۶ ص.

3. Arias, M., Carbonell, J. and Agusti, M. 2005. Endogenous free polyamines and their role in fruit set of low and high parthenocarpic ability citrus cultivars. Journal of Plant Physiology, 126(8):845-853.
4. Brickell, C. and Zuk, J. D. 1997. Encyclopedia of Garden Plants. The American Horticultural Society. DK Publishing, Inc., NY. 354 Pp.
5. Chandrasekar, S. B., Bhanumathy, M., Pawar, A. T. and Somasundaram, T. 2010. Phytopharmocology of *Ficus religiosa*. Phcog. Rev., 4:195–199.
6. Daneshvar, M. H. 1992. Callus induction and organogenesis in cultivar of peach (*Prunus persica*). Department of Agriculture and Horticulture Faculty of Agricultural and Food Science University of Nottingham Sutton Bonington, UK. 329 Pp.
7. Galil, J. 1984. *Ficus religiosa* L. – the tree-splitter. Botanical Journal of the Linnean Society, 88: 185–203.
8. Galil, J. and D. Eisikowitch. 1968. On the pollination ecology of *Ficus religiosa* in Israel. Phytomorphology, 18: 356-363.
9. Ghani, A. 2003. Medicinal Plants of Bangladesh with Chemical Constituents and Uses, Asiatic Society of Bangladesh. 2nd ed., pp. 236.
10. Hassan, A. K. M. S., Afroz, F., Jahan, M. A. A. and Khatun, R. 2009. *In vitro* regeneration through apical and axillary shoot proliferation of *Ficus religiosa* L.—A multipurpose woody medicinal plant. Plant Tiss. Cult. Biotechnol., 19(1):71–78.
11. Huetteman, A. and Preece, J. 1993. Thidiazuron a potent cytokinin for wood plant tissue culture. Plant cell, tissue and organ culture, 37:105-119.
12. Lakshmi-Sit, G. 1993. Micropropagation of Ecualyptus. Kluwer Academic, Publisher, Netherlands, 263-280 Pp.
13. Leng, P., Su, S., Wei, F., Yu, F. and Duan, Y. 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. Acta Horticulture, 106: 337-343.
14. Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J. A. T., Bulley, S. M. and Hudák, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 251-267.
15. McFarland, G. B. 1944. Thai-English Dictionary. Stanford University press, Stanford, California, pp. 601.
16. Mali, S. and Borges, R. M. 2003. Phenolics, fibre, alkaloids, saponins, and cyanogenic glycosides in a seasonal cloud forest in India. Biochemical Systematics and Ecology, 31: 1221–1246.

17. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiological Plant, 15: 473- 497.
18. Onay, A. and Jeffree, C. 2000. Somatic Embryogenesis in Pistachio (*Pistacia vera* L.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Springer: 361-390.
19. Pan, M. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture–A review. Plant growth regulation, 26: 155-163.
20. Parasharami, V., Yadav, P. and Mandkulkar, S. 2014. *Ficus religiosa* L.: Callus, suspension culture and lectin activity in fruits and *in vitro* regenerated tissues. British Biotechnology Journal, 4(2): 215-227.
21. Siwach, P., Gill, A. R. and Kumari, K. 2011. Effect of season explants growth regulators and sugar level on induction and long term maintenance of callus cultures of *Ficus religiosa* L. Afr. J. Biotechnol., 10(24):4879–4886.
22. Sood, S., Nagar, P.K. 2008. Post-harvest alteration in polyamins and ethylene in two diverse rose species, Acta physiology plant, 30:243-248.
23. Taskeen, A., I. Naeem, H. Mubeen and T. Mehmood. 2009. Reverse phase high performance liquid chromatographic analysis of flavonoids in two Ficus species. New York Science Journal, 2: 32–35.
24. Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26(6): 618–631.
25. Tripthi, L. and J. N. Tripthi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Jornal of Pharmaceutical Reserch. 2(2): 243-25.
26. Xie, D. and Hong, Y. 2001. *In vitro* regeneration of Acacia mangium via organogenesis. Plant Cell Tissue Org. Cult., 66: 167-173.

Regeneration from callus which is produced from diffrent parts of plantlet of Ficus religiosa L. by using of plant growth regulators

M. H. Daneshvar[1 *], M. hessami[2]

1 & 2-Ramin university of agriculture- Ramin university of agriculture
* Corresponding aurhor: mhdaneshvar2004@yahoo.com

Abstract

Bodhi tree (Ficus religiosa L.) is a long_lived valuable multipurpose forest tree. This tree is mostly used as ornamental, medicinal and also in place of worship in india and may be other countries. The rate of propagation of this evergreen tree is low in nature. In order to do mass production of this tree, an experiment was carried out with a factorial plot in a complete randomized design in 3 replications in 8 different experiments including of sterilization, seed germination, callus formation, direct and indirect organogenesis, shoot proliferation, root formation and acclimatization. This experiment was conducted at tissue culture laboratory, Department of Horticulture, Ramin university of Agriculture and Natural resources, during the year of 2014 to 2015. In sterilization experiment, the least rate of contamination frequency(3.33%) was observed on ethanol 70% for 10 sec. followed by germination percentage(83.33%) of Ficus religiosa seed observed in light and 1/10 strength of MS medium. In callus formation experiment, the highest callus weight (2.9g) was observed in treatment of leaf explant in MS medium supplemented with 2.0 mg/l IBA along with 0.2 mg/l BAP after 4 weeks. In indirect organogenesis experiment, the maximum number of multiple shoots (5.16) was observed on callus wich obtained of leaf explants on callus formation medium with 2.0 mg/l IBA along with 0.2 mg/l BAP and organogenesis medium which was supplemented with 1.0 mg/l BAP along with 0.1 mg/l IBA after 8 weeks. Also, callus formation was occurred on MS medium which was supplemented with 0.5 mg/l BAP along with 100 mg/l putrescine. In direct organogenesis experiment, the highest number of shoots(10.13) were observed from node explants on MS medium supplemented wth 0.2 mg/l TDZ along with 0.5 mg/l BAP and 1.0 mg/l kinetin. In shoot proliferation experiment, the highest regeneration frequency(96.66%) was observed from apical bud on MS medium which was supplemented with 0.2 mg/l TDZ along with 0.5 mg/l BAP

with 1.0 mg/l kinetin. In root formation experiment , the highest rooting frequency(95%) was observed on MS medium supplemented with 2.0 mg/l BAP along with 50 mg/l putrescine. In acclimatization experiment, perlite and cocopeat substrate for acclimatization of Ficus religiosa.

Key words: Ficus religiosa L, organogenesis, callus formation, proliferation, rooting, acclimatization