Archive of SID

در
منابع طبیعی شماره ۷۳، زمستان ۱۳۸۵
پژوهش و سازندگی

ریزازدیادی شبه فتواتوتروفیک درسه گونه اوکالیپتوس

• **محمدحسن عصاره**، عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
• **زهرا وطن‌پور**، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا
• **خدیجه کیارستمی**، عضو هیأت علمی دانشگاه الزهراء
• **عباس قمری زارع**، اعضاء هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۴

Email:zahravatanpour@yahoo.com

چکیده

اکالیپتوس جز درختان سریع‌الرشد بوده و تعدادی از گونه‌های آن برای کاشت در شرایط آب و هوایی گرم و خشک سازگاری بالایی دارند. لذا تولید نهال این گونه‌ها به منظور توسعه جنگل‌کاری در ایران حائز اهمیت می‌باشد. ریزازدیادی در تولید نهال‌های مناسب از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. در روش ریزازدیادی مرسوم، هزینه‌های تولید نهال در سطح انبوه به علت درصد بالای آلودگی‌ها، تلفات ناشی از انتقال گیاه به خاک و استفاده از هورمون‌های بیوشیمیایی بالا می‌باشد. لذا در این پژوهش از سیستم نوین شبه فتواتوتروفیک در ریزازدیادی استفاده گردید. در این روش حذف ساکارز، حذف یا استفاده اندک از تنظیم کننده‌های برونزا و نیز شاخه‌زایی و ریشه‌زایی توام گیاهک‌ها موجب کاهش کلی در هزینه‌های تولید گیاهک‌های درون شیشه‌ای می‌گردد. اثر ظروف مختلف G7و B.F.J با درپوش‌های فیلتردار و بدون فیلتر بر روی فاکتورهای رشد شامل وزن تر ریشه، وزن تر اندام هوایی، سطح برگ‌ها، تعداد برگ‌ها، طول ریشه، طول ساقه و تعداد شاخه در گونه‌های *E. microcarpa, E.melliodora ,E. camaldulensis*, در شرایط شبه فتواتوتروفیک بررسی شد. ظرف G7 فیلتردار در تمامی فاکتورهای رشدی مورد مطالعه برتر از ظروف دیگر بود. درصد زنده‌مانی بعد از انتقال به خاک در گونه‌های *E. microcarpa* و *E. melliodora* ۱۰۰٪ و در گونه *E. camaldulensis* ۶۵٪ بود. در روش شبه فتواتوتوفیک گذشته از اینکه هزینه‌های ریز ازدیادی به حداقل می‌رسد تمامی شاخص‌های رشدی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابند لیکن در این روش نیز مشکلات آلودگی‌های درونی و سطحی ریزنمونه‌ها و آزادسازی ترکیبات فنلی و غیره وجود دارد که می‌بایست در تحقیقات مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اکالیپتوس، G7 با درپوش فیلتردار و بدون فیلتر وB.F.J با درپوش فیلتردار و بدون فیلتر، شبه فتواتوتروفیک و سازگاری

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No:73 pp: 150-156

Semiphotoautotrophic micropropagation on three Eucalyptus species

By: M.H. Assareh,Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, Iran, Z. Vatanpour,Al-Zahra University, Tehran, Iran.

Kh. Kiarostami,Al-Zahra University, Tehran, Iran. A. Ghamari Zare,Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, Iran.

Eucalyptus trees are fast-growing trees and some of species are tolerance to un-favorite conditions. Seedling production is a pre-condition for agroforestry in suitable regions of Iran. Micropropagation is a useful tool for asexaul production. Conventional micropropagation is an expensive method, because of high rate contamination and death of plantlets during transferring to soil and using high amount of biochemical plant growth regulaturs. Semiphotoautotrophic system is used because of omitting sucrose in the media, using exogenesis growth regulators in low amount or not using at all, and better rooting and shooting of plantlets. So this system decrease the expenses of *in vitro* plantlets production. This work, was studied the effects of G7 and B.F.J with and without filtered cap. Growth indicators,i.e. root fresh yield, root dry yield, shoot fresh yield, shoot dry yield, leaf surface, leaf number, root length, shoot length, and shoot number, of three difference species *Eucalyptus camaldulensis*, *E. melliodora* and *E. micrpcarpa* were survayed in semiphotoautotrophic conditions.The G7 filtered cap vessels were better than the other for growth indicators which were studied. The range of survival for transferring seedling to soil was 100% for *E. melliodora* and *E. micrpcarpa* species and 65% for *E. camaldulensis*. Semiphotautotrophic not only reduce the micropropagation costs, but also improve the growth indicators. However, its problems, i.e. surface and internal contamination of explants, phenolic components release and etc. should be considered in semephotoautotrophic micropropagation system.

Key words: Eucalyptus, Filtered and no filtered cap G7, Filtereted and no filtereted cap B.F.J ,Semiphotoautotrophic, Acclimatisation

مقدمه

در میان گونه‌های درختان جنگلی، جنس Eucalyptus از خانواده Myrtaceae جزء درختان سریع‌الرشد با چرخه کوتاه دوره زندگی است (۵). به همین دلیل در جهان سرمایه گذاری‌های عظیمی برای پرورش اکالیپتوس به منظور تولید چوب و خمیر کاغذ از اکالیپتوس صورت می‌گیرد. نظر به این که سطح وسیعی از کشور ایران جزء مناطق خشک می‌باشد و این گونه‌ها سازش‌پذیری خوبی نسبت به شرایط مختلف آب و هوایی دارند. لذا جنگل‌کاری با این درختان در ایران از اهمیت بالایی برخوردار است.

به خاطر دگرگشن بودن گونه‌های مختلف اکالیپتوس، حفظ ویژگی‌های برتر پایه های مختلف اکالیپتوس از روش تکثیر جنسی مشکل است لذا در این پژوهش از تکثیر غیرجنسی به منظور تکثیر این گونه‌ها استفاده شده است. علی‌رغم اهمیت توسعه کشت گونه‌های فوق در ایران مشکلاتی در تکثیر غیرجنسی به روش‌های سنتی (از قبیل مشکل بودن تکثیر ریشه‌های نابجا در قلمه زنی، خوابانیدن و پیوند) این گونه‌ها وجود دارد. بنابراین گونه‌های *E.camaldulensis* و *E.microcarpa* و *E. melliodora* به علت دارا بودن خواص برگزیده ازجمله مقاوم بودن چوب آنها به موریانه و خواص داروئی مهمشان جهت توسعه جنگل‌های مصنوعی و زراعت چوب نیاز به تکثیر سریع دارند. ریزازدیادی درون شیشه‌ای یکی از روش‌های تکثیر گیاهان در مقیاس وسیع می‌باشد. گونه‌های بسیار زیادی در ایران وجهان از طریق ریزازدیادی مرسوم تکثیر یافته‌اند(۱۸). این روش به میزان وسیعی برای اهداف تولیدات گیاهی از جمله نهال برای توسعه جنگل‌داری هم از طریق اندام‌زایی و هم رویان‌زایی بدنی به‌کار می‌رود. اما این روش با محدودیت‌هایی از جمله انباشتگی اتیلن و عدم تبادل گازی مناسب، وقوع جهش‌های متوالی، آلودگی‌های بیرونی و درونی، شیشه‌ای شدن، تراوش ترکیبات فنلی و سازگاری بعد از انتقال به خاک همراه است(۱۱). بنابراین در موارد متعددی از روش‌های جدید کشت بافت برای تکثیر گیاهان در مقیاس وسیع استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها، روش شبه فتواتوتروفیک را می‌توان نام برد(۸،۳). شرایط شبه فتواتوتروفیک عبارت است از کشت ریزنمونه‌های گیاهان سریع‌الرشد در شرایط محیط کشت مایع بدون ساکارز و استفاده از درپوش‌های فیلتردار به منظور استفاده از CO_2 محیط که در بالای ظروف کشت تجمع یافته است در روش شبه فتواتوتروفیک بر خلاف روش اتوتروفیک از CO_2 موجود دراتمسفر استفاده شده است. Hew و همکاران (۶) سیستم ریزازدیادی فتواتوتروفیک را روش ریزازدیادی درون شیشه‌ای تعریف نمودند که در آن گیاهان تحت یک محیط غنی از CO_2 با شدت نور زیاد در محیط کشت غذایی بدون قند و هورمون‌های

www.SID.ir

Archive of SID

بیوشـیمیایی پرورش داده می‌شود. روش فتواتوتروفیک برای کشت میخک (Carnation)(۱۰)، *Dianthus caryophyllus* L(۱۰)و سیب زمینی شیرین (Sweet Potato)(۴) به‌کار رفته است.

در این پژوهش ریزازدیادی گونه‌های *E.camaldulensis* , *E. microcarpa* و *E. melliodora* بـه‌روش شـبه فتواتوتروفیک و اثر نوع و اندازه ظروف کشـت بافت و درپوش‌های مختلف مورد بررسی قرار خواهند گرفتند.

مواد و روش‌ها

بذرهای سـه گونه اکالیپتـوس *E.camaldulensis* . *E. microcarpa* و *E. melliodora* از پایه‌های چهارده سـاله واقع در شمال خوزستان (عرض جغرافیایی ´ ۱۶ °۳۲ شـمالی و طول جغرافیایی ´ ۲۵ °۴۸ شرقی، میانگین رطوبت سـالانه ۲۵۰ میلی‌لیتر میانگین حداقل وحداکثر دما به ترتیب ۲ و ۲۵ درجه سانتیگراد و میانگین دمای روزانه۲۷درجه سانتیگراد و نوع خاک شنی لومی) جمع‌آوری و بوجاری شدند. بذرها پس از شستشو با آب جاری به مدت یک سـاعت با هیپوکلریت سـدیم ۱/۵٪ سترون شـدند. سپس به محیـط MS بـدون هورمون حـاوی سـاکارز (۳٪)، آگار (۶/۸gr/l) با pH= ۵/۸ الـی ۷/۵ قبل از اتـوکلاو انتقال یافتند. بعد از مدت چهـار هفته دانه رسـت‌های رشد یافته جدا و جهت مراحل بعدی ریزازدیادی به قطعات یک سـانتی‌متری حاوی یک گره با دو برگ تقسیم شد و به محیط کشت مورد نظر انتقال یافتند.

در ایـن روش از ۲ نوع ظرف Magenta box(Sigma)(G7) و Baby Food Jar (B.F.J) و ۲ نـوع درپـوش فیلتـردار و بـدون فیلتـر، جمعاً ۴ تیمار اسـتفاده شـد (شـکل ۱). اندازه منافذ فیلترهـای درب ظروف فیلتـردار ۰/۲۲m µ و قطر فیلترهـا ۰/۲۰ mµ بود. و از ورمیکولایت به عنوان بسـتر درون ظروف استفاده شد. از محیط کشت MS نیمه قدرت مایع حاوی عناصر پر مصرف (یک دوم غلظت)، عناصر کم مصرف (غلظت کامل) و ویتامین‌ها (غلظت کامل)، کازئین هیدرولیز شـده (۴۰۰ mg/l) و هورمون اکسـین NAA(۰/۱ mg/l)اسـتفاده گردید(۱).

ایـن آزمایش در قالـب آزمون فاکتوریل ۲۲ در قالـب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و اثرات متقابل ظرف و درپوش بررسـی شد. هر تیمار شامل ۵ تکرار و هر تکرار شـامل یک شیشـه که حاوی ۵ ریـز نمونه (Explant) بود. ظروف کشـت حاوی ریزنمونه به دمای حداکثر ۲۵درجه سانتیگراد در روز و حداقل۱۵درجه سـانتیگراد در شب با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی لامپ‌های خورشیدی با انرژی ۲۸- ۲۴ هزار لوکس(Lux) و تهویه مناسـب اتاق کشـت منتقل شـدند. غلظت CO_2 اتاق رشد، همان غلظت معمولی CO_2 در هوا بود. از بین تکرارهای موجود، سه تکرار به طور تصادفی پس از۶ هفته جهت آنالیز رشـد برداشـت شدند. نمونه‌های کشت شده در شـرایط فوق پس از برداشت برای سنجش سطح برگ، تعداد گره، طول شـاخه، طول ریشه و تعداد برگ مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دو تکرار دیگر ریشه‌دار شده پس از مدت ۶ هفته جهت سازگاری در خاک مورد بررسی قرار گرفتند. خاک استفاده شده پیت، پرلیت و ماسه به نسبت مساوی بود و نمونه‌ها به منظور سازگاری تدریجی با شرایط رطوبتی محیط با پوشش پلاستیکی محافظت شد که به تدریج این پوشش حذف گردید.

داده‌هـا با نرم افزارSAS تجزیـه و میانگین، به روش دانکن مقایسـه گردیدند. نمودارها نیز با نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

بررسـی نتایج حاصل از جدول ۱ نشـان داد که از بین منابع تغییرات سـه گانه (ظرف، درپوش و اثر متقابل ظرف × درپوش) بررسـی شـده در تمامی شـاخص‌های رشـدی، فقط بین اثر متقابل ظرف × درپوش اختلاف معنی‌داری مشـاهده نشد (جدول ۱). مقایسـه بین ظروف فیلتردار و بدون فیلتر نشـان داد که در مجمـوع ظروف فیلتـردار (G7 و B.F.J) تقریباً در تمامی شـاخص‌های رشدی بررسی شـده بهتر از ظروف بدون فیلتر بودند

جدول۱- اثر ظرف، درپوش و اثر متقابل ظرف × درپوش بر شاخه‌زایی دانه رست *E. camaldulensis* بر شاخص‌های رشد در شرایط شبه فتواتوتروفیک

			شاخص های رشد				
منبع تغییرات	وزن تر ریشه (gr)	وزن تر اندام هوای(gr)	سطح برگ ها (cm)	تعداد برگ ها	طول ریشه (cm)	طول شاخه (cm)	تعداد شاخه
ظرف (vessel)	۰/۰۵۱*	۰/۰۰۹**	۰/۰۳۷*	۰/۰۳۱*	۰/۰۰۳*	۰/۰۳۱*	۰/۰۲۸*
درپوش (Top)	۰/۰۲*	۰/۰۵۲*	۰/۳۲ns	۰/۰۵۱*	۰/۰۴۳*	۰/۰۳۲*	۰/۰۳۸*
ظرف * درپوش	۰/۰۶ns	۰/۰۵۳ns	۰/۰۵۲ns	۰/۰۴۱ns	۰/۲۸۴ns	۰/۰۵۸ns	۰/۲۳ns

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اثر نوع ظرف و درپوش در ریزازدیادی شبه فتواتوتروفیک *E. camaldulensis* بر شاخص‌های ۴۲ روز پس از کشت.

پارامترهای رشد / نوع ظرف	وزن تر ریشه (gr)	وزن تراندام هوایی (gr)	سطح برگ ها (cm^2)	تعداد برگ ها	طول ریشه (cm^2)	طول ساقه (cm^2)	تعداد شاخه
G7 فیلتردار	۰/۰۸a	۰/۱۹a	۸۰/۵۷a	۱۶/۱۸a	۳/۲۸a	۵/۲۳a	۱/۴۵a
G7 بدون فیلتر	۰/۰۳a	۰/۱۴ab	۴۷/۷۳ab	۱۲/۵۰a	۱/۸۸b	۳/۱۰b	۱/۴۰a
B.F.J فیلتر دار	۰/۱۴a	۰/۷b	۳۵/۸۳b	۱۴/۴۴ab	۱/۳۲b	۲/۹۵b	۱/۵۵a
B.F.J بدون فیلتر	۰/۱۳a	۰/۱۰b	۲۷/۱۲b	۱۱/۴۰b	۱/۸۰ab	۲/۹۶b	۱/۱۰a

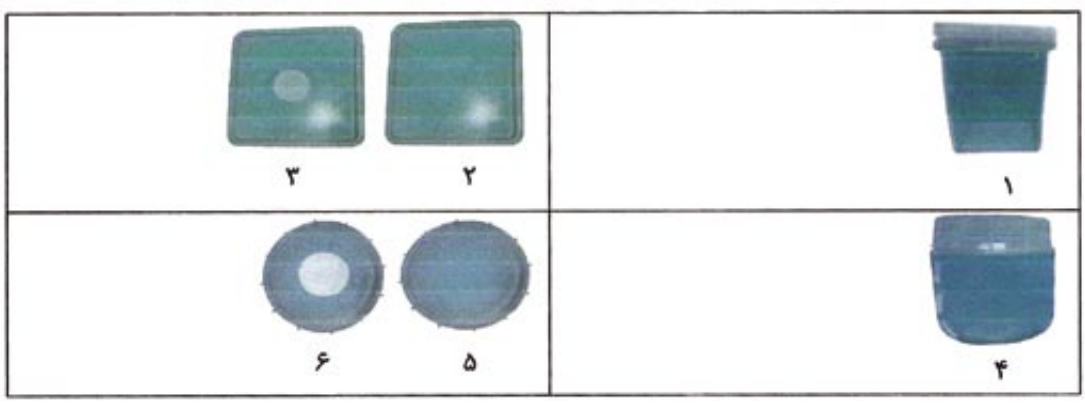
(جدول ۲ و شکل ۳). ظروف G7 فیلتردار تقریباً در تمامی شاخص‌های رشدی ذکر شده با ظروف B.F.J فیلتردار اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در مجموع ظرف G7 فیلتردار در مقایسه با ظروف دیگر برای ریزازدیادی فتواتوتروفیک در گونه *E. camaldulensis* عملکرد بهتری داشت (جدول ۲)، بنابراین ریزازدیادی گونه‌های *E. melliodora* و *E. microcarpa* نیز در ظروف G7 انجام گرفت. سه ژنوتیپ اکالیپتوس تقریباً در تمامی شاخص‌های رشدی ذکر شده اختلاف معنی‌داری نداشتند (نمودارهای ۱ تا ۷). لذا با بررسی نتایج حاصل از نمودارهای ۱ تا ۷ مشخص گردید که روش شبه فتواتوتروفیک روش مناسبی برای تکثیر هر سه گونه می‌باشد.

زنده‌مانی گیاهک‌های ریشه‌دار شده فاکتور مهمی برای رشد می‌باشد. ریزنمونه‌ها در این روش در فاصله زمانی دو هفته ریشه‌دار شدند و بلافاصله بعد از تولید ریشه سرعت رشد و سبزینگی افزایش یافته و در مدت زمان کوتاهی شاخ و برگ ریزنمونه‌ها تمام فضای ظرف G7 را اشغال کردند (شکل ۲).

بعد از مدت ۴۰ روز گیاهچه‌های حاصل از شرایط شبه فتواتوتروفیک به محیط گل‌خانه انتقال یافتند. اما به منظور مقاوم سازی (Hardening off) ابتدا به مدت یک هفته با پوشش پلاستیکی، رطوبت در حد شرایط آزمایشگاهی حفظ شد. بعد از یک هفته به تدریج گیاهان به شرایط گل‌خانه (*Ex vitro*) سازگار شدند. پس از مقاوم سازی درصد زنده‌مانی در گونه‌های *E. melliodora E. microcarpa*، ۱۰۰٪ و در گونه *E. camaldulensis* ۶۵٪ بود.

بحث

در مجموع ظروف فیلتردار (G7 و B.F.J) در تمام شاخص‌های رشدی بررسی شده بهتر از ظروف بدون فیلتر بودند. رشد کم گیاهک‌های بدون فیلتر را می‌توان به خاطر کاهش غلظت CO_2 درون ظرف در طول فتوپریود

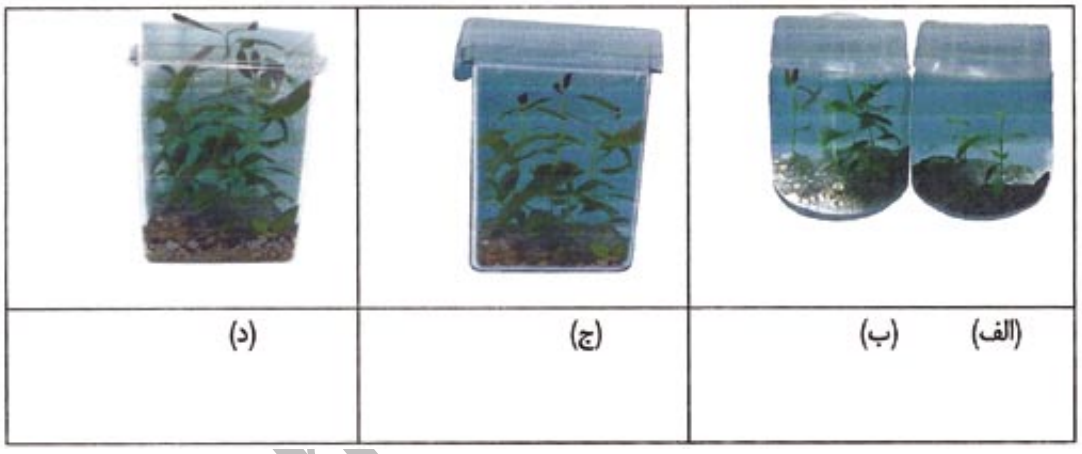


شکل ۱- اشکال مختلف ظروف و درپوش: ۱. ظرف G7، ۲. درپوش G7 بدون فیلتر
۳. درپوش G7 فیلتردار، ۴. ظرف B.F.J، ۵ درپوش B.F.J بدون فیلتر و ۶. درپوش B.F.J فیلتردار

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- گیاهچه‌های پرورش یافته *E. camaldulensis*
تحت شرایط شبه فتواتوتروفیک ۴۲ روز پس از کشت



شکل ۳- مقایسه رشد گیاهک‌ها در ظروف مختلف
الف: ظرف B.F.J بدون فیلتر، ب: ظرف B.F.J فیلتردار، ج: ظرف G7 بدون فیلتر و د: G7 فیلتردار

نسبت داد که در نتیجه آن توان فتوسنتزی ریز نمونه‌ها کاهش می‌یابد Kubota و Kozai(۱۲) نتیجه مشابهی را بر روی گونه *Solanum tuberosum* بدست آوردند، همچنین Purski و همکاران (۱۴) نشان دادند که در ظروف فیلتردار غلظت بالای CO_2 به گیاهان اجازه می دهد که به طور فتواتوتروف یا فتومیکسوتروف رشد کرده و با گیاهانی که در ظروف بدون فیلتر رشد می‌کنند اختلاف معنی‌داری را نشان دهند.

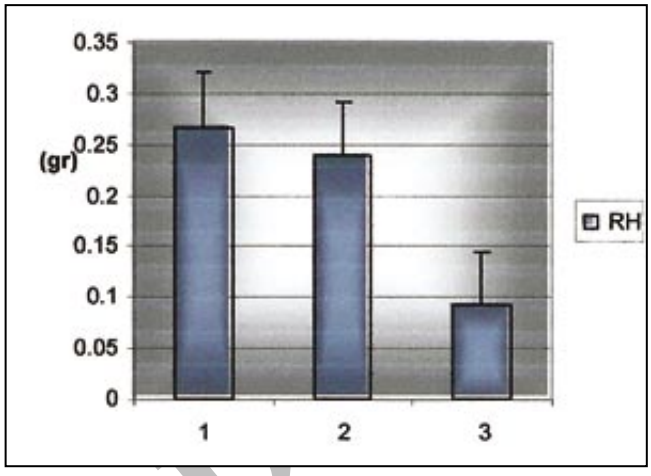
در این پژوهش شاخص‌های رشد در ظرف G7 فیلتردار که از نظر اندازه بزرگتر هستند، عملکرد بهتری را نسبت به ظرف B.F.J فیلتردار داشتند. Muraia و همکارانش (۱۱) نشان داده‌اند که در ظروف با حجم کوچک غلظت یون‌های محلول سریع‌تر در قیاس با ظروف بزرگتر به خاطر استفاده ریزنمونه و نیز تبخیر کاهش یافته و در نتیجه ریز نمونه موجود در ظرف بزرگتر به علت در دسترس بودن مواد غذایی به رشد خود ادامه داده و در قیاس با ریزنمونه‌های موجود در ظروف کوچک‌تر رشد بیشتری را داشتند. وزن خشک، در تمامی ظروف اعم از ظروف فیلتردار و بدون فیلتر اختلافات معنی‌داری را نشان ندادند. زیرا وزن خشک با نسبت تبادل هوا به طور معنی‌داری متاثر نمی‌گردد.Kirdamane و همکارانش (۹) نتایج مشابهی را با Cymbidium بدست آوردند.

در مورد مرحله سازگاری گیاهان در شرایط طبیعی در صورت عدم اعمال شرایط مقاوم سازی، درصد زنده‌مانی ظروف بدون فیلتر به میزان بالایی کاهش می‌یابد. این امر را می‌توان به رطوبت نسبتاً بالای درون شیشه‌ای نسبت داد که سبب کاهش فعالیت روزنه‌ای در گیاه می‌گردد و در ظروف فیلتردار رطوبت نسبی درون ظروف بسیار پایین تر از ظروف بدون فیلتر است. Sharma و Ramamurthy (۱۶) روی گونه *E. tereticorine* نتایج مشابهی را بدست آوردند.

به طور کلی در روش شبه فتواتوتوفیک، گذشته از اینکه هزینه‌ها به حداقل می‌رسد تمامی شاخص‌های رشدی به طور معنیداری افزایش

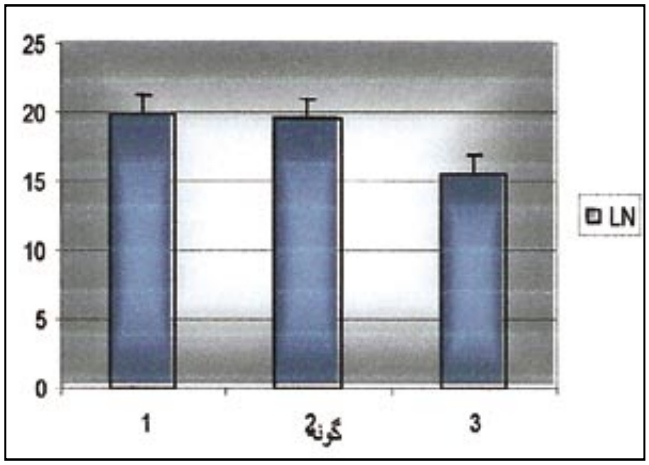
www.SID.ir

Archive of SID



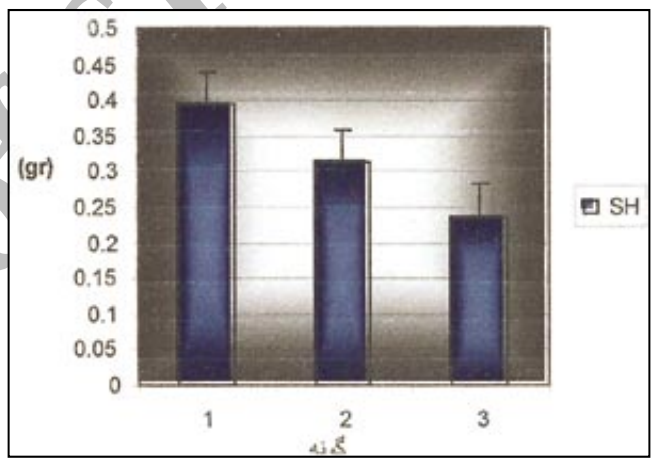
نمودار۱- مقایسه وزن تر ریشه(RH) در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک



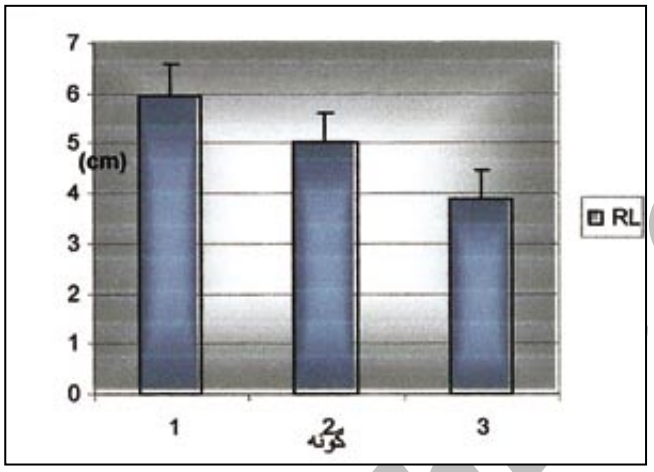
نمودار ۴- مقایسه تعداد برگ(LN) در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک



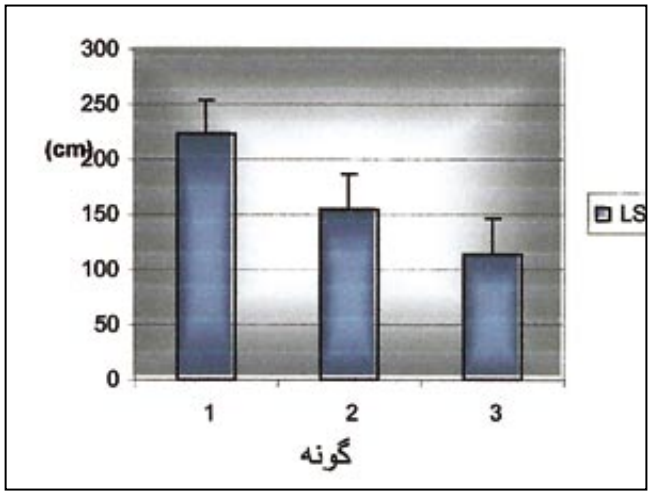
نمودار۲- مقایسه وزن تر اندام هوایی(SH) در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک



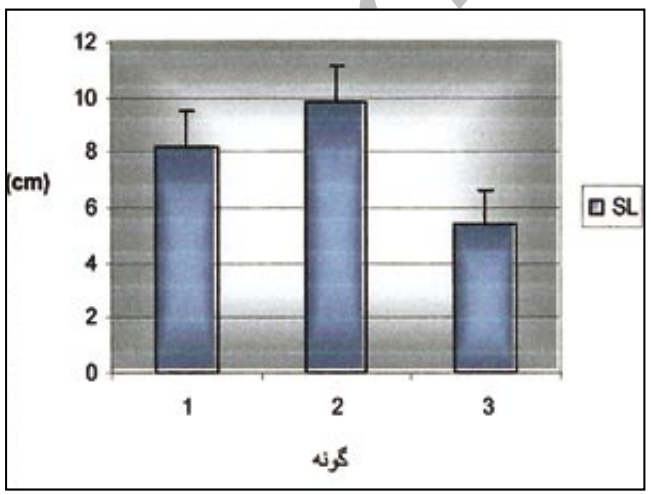
نمودار ۵- مقایسه طول ریشه(RL) در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک



نمودار۳- مقایسه سطح برگ(LS) در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک

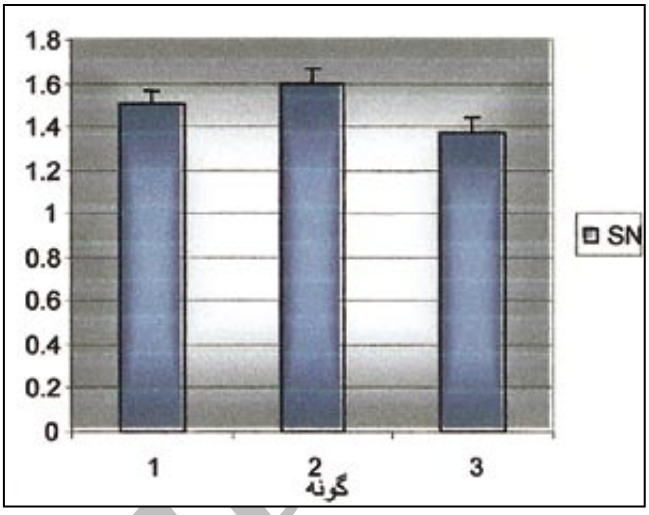


نمودار ۶- مقایسه طول شاخه(SL)در سه گونه:

۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۷- مقایسه تعداد شاخه (SN)در سه گونه:
۱- *E. melliodora* ۲- *E. camaldulensis* و ۳- *E. microcarpa* در شرایط شبه فتواتوتروفیک

می‌یابنـد. همچنین با توجه بـه اینکه تکثیر ریز نمونه حاصـل از پایه‌های والدینـی به علـت آلودگی‌های درونی و سـطحی ریزنمونه‌ها و آزادسـازی ترکیبـات فنلی و غیره مشـکل اسـت، اسـتفاده از ایـن روش در مـورد ریزنمونه‌های حاصل از پایه‌های والدینی در مورد گونه‌های کار شده در این پژوهش و سـایر گونه‌های جنگلی می‌توانـد تحقیقات تکمیلی این پژوهش باشد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با مساعدت موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی انجام شد. لازم می‌دانیم از کلیه همکاران به خصوص سرکار خانم مهندس شکوفه شهرزاد و نیز آقای دکتر علی اشرف جعفری و آقای نیکجو که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند قدردانی نمائیم.

منابع مورد استفاده

۱- عصاره، محمد حسـن. ۱۳۸۰؛ تولید انبوه گیاهک‌های اکالیپتوس تحت شرایط شبه فتواتوتروفیک. پژوهش و سازندگی. شماره ۵۳: ص ۱-۵

۲- عصاره، محمد حسن و صباغ زاده، فرزاد. ۱۳۸۲؛ رشد گیاه اکالیپتوس در شرایط فتو و شـبه فتواتوتروف با و بدون CO_2 غنی شـده. پژوهش و سـازندگی. شماره ۵۹: ص ۸۸-۸۰

3-Afreen, F.S.M., A. Zobayed and T. Kozai. 2002; Photoautotrophic culture of coffee arbusta somatic emberyos: Development of a bioreactor for long-scale plantlet conservation from cotyledonary embryos. Annals of Botany, 90:21-29.

4-Afreen-Zobayed, F., S.M.A. Zobayed and C. Kubota and T. Kozai. 2000a; A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. Plant Science, 157:225-231.

5-Afreen-Zobayed, F., C. Kubota and T. Kozai. 2000b; Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic codition. Annals of Botany, 85:587-592.

6-Herve, Ph., J. Alain, M. Paques, J.N. Marien, A.M. Boudet and Ch. Teulieres. 2001; A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone. Comprative Histology Plant Science, 161:645–653.

7-Hew, C.S., S.E. Hin, J.W.H. Yong, S.S. Gouk and M. Tanaka 1995; *In vitro* enrichment of CAM orchid plantlets. Journal of Horticultural Sience, 70:721- 730.

8-Kirdamanee, C., j. Kubota and T. Kozai. 1994; CO_2 enrichment and vermiculite mediume enhanced photoautotrophic growth of Eucalyptus platlets *in vitro*. Plant Tissue and Cell Culture.

9-Kirdmanee, C., C. Kubota, B. Jeong and T. Kozai. 1992; Photoautotrophic multiplication of cymbidium protocorm–like bodies. Horticulture, p319.

10-Kozai,.To. and Y. Iwanami. 1988; Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan Soc.Sci., 57(2):279-288.

11-Kozai, T. 1991; Photoautotrophic micropropagation *in vitro*. Cell Dev. biol., 27:47-51.

12-Kubota, C. and T. Kozai. 1992; Growth and net photosynthetic rate of *Solanume tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. Hortsience, 27(12):1312-1314.

13-Murai .a , Y., C. Kubota and T. Kozai. 1992; Culture medium volum as a factor affecting changes with time in concentrations of medium components and groth of plantlets *in vitro*. Intl. Symp. Transplant Production Systems, p.139.

14-Pruski, K., T. Astatkic, M. Mirza and J. Nowaka. 2002; Photoautotrophic micropropagation of russet burbank potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69:197-200.

15-Righetti, B. 1996; Cholorophyll, ethylene and biomass determination in *Prunus avium* cv. Victoria cultivated *in vitro* under different atomospheric conditions. Journal of Horticultural Science, 71(2):249-255.

16-Sharma, S.K. and V. Ramamurthy. 2000; Micropropagation of 4-year–old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. Plant Cell Reports, 19:511-518.

17-Takazawa, Ak and T. Kozai. 1992; Effects of types of culture vessels with supporting materials on the groth of carnation plantlets in vitro. Environ. control in Boil., vol. 30, No.2.

18-Trindade, H. M. and S. Pais. 2003; Meristematic nodule culture: a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globules*. Trees, 17:308-315.

www.SID.ir