

ریزادیادی *Eucalyptus maculata* از پایه بالغ به روش کشت درون‌شیشه‌ایعباس قمری زارع^۱، منصوره صداقتی^{۲*}، میترا امام^۳، محمدحسن عصاره^۴ و خدیجه کیارستمی^۵

۱- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۲- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران. پست الکترونیک:

sedaghati2012@gmail.com

۳- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۴- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۵- استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸

چکیده

توانایی رشد سریع اکالیپتوس‌ها سبب شده تا این جنس در جنگل‌کاری، مصارف صنعتی و دارویی اهمیت فوق‌العاده‌ای پیدا کند. گونه درختی *E. maculata* Hook از نظر تولید برخی ترکیبات شیمیایی و مصارف دارویی نسبت به سایر اکالیپتوس‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی به دلیل مشکلات تکثیر جنسی و غیرجنسی این گونه، در این تحقیق امکان تکثیر این گیاه به روش کشت درون‌شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های پایه بالغ مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ پس از استقرار بر روی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skooge) با غلظت یک دوم نیترات و تیمارهای هورمونی مختلف (Kinectin) Kin، (Benzylamino purine) BAP، (2-Isopentyladenine) 2ip، (Indole-3-acetic acid) IBA، (Naphtalen Acetic Acid) NAA و (Tidiazoron) TDZ با غلظت‌های متفاوت در شرایط استریل درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از یک ماه شاخص‌های رشد از جمله تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد جوانه و سبزیگی ثبت گردید و بهترین تیمار هورمونی شاخه‌زایی، تیمار $2ip\ 0/5\ mg\ l^{-1}$ ، $BAP\ 0/3\ mg\ l^{-1}$ ، $IBA\ 0/01\ mg\ l^{-1}$ که در تعداد شاخه (با میانگین ۴/۳)، طول شاخه (با میانگین ۲/۷۳ سانتی‌متر) و میزان سبزیگی (با میانگین ۳/۷۵) مشاهده شد. مرحله ریشه‌زایی بعد از دو ماه و شاخص‌های مورد نظر از جمله تعداد ریشه و طول ریشه ثبت گردید و تیمار تلفیقی $IBA\ 0/5\ mg\ l^{-1}$ و $NAA\ 0/5\ mg\ l^{-1}$ از نظر طول ریشه (با میانگین ۰/۲ سانتی متر) بهترین بود. در نهایت نهال‌های حاصل به گلخانه منتقل شده و مراحل سازگاری را طی نمودند.

واژه‌های کلیدی: محیط کشت، اکالیپتوس، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، کشت بافت، تکثیر غیر جنسی.

مقدمه

زیاد، قابلیت کشت در اراضی فقیر، ارزش زینتی، بی‌نیازی از هرس مصنوعی، پایا بودن برگ‌ها، خشک کردن باتلاق‌ها به منظور اهمیت بهداشتی، مقاومت در مقابل خاک‌های شور، تنوع گونه‌ها، مقاومت در مقابل آتش‌سوزی و تولید چوب برای سوخت رو به افزایش است (Javanshir & Mosadegh, 1972). همچنین در مصارف دارویی، تولید روغن‌های فرار، عسل، تولید مواد

جنس اکالیپتوس (*Eucalyptus*) متعلق به خانواده‌ی Myrtaceae بوده و مرکز گسترش آن استرالیا است (Turnbull & Boland, 1984). در حال حاضر توسعه کشت بافت گونه‌های مختلف اکالیپتوس، به منظور جنگلداری و بهره‌برداری در صنایع چوب و کاغذ (Assareh, 2000)، سریع بودن رشد، نرمش اکولوژیکی

اندام‌زایی استفاده کردند. همچنین باززایی گیاه از درختان بالغ برای گونه‌های *E. nitens* و *E. grandis* (Furze & Manders et al., 1985)، *E. citriodora* (Cresswell, 1985)، *E. tereticornis* (Jambhale & Patil, 1996)، *E. tereticornis* × *grandis* (Joshi et al., 2003) گزارش شده است. از آنجا که گونه مورد بررسی در این پژوهش (*E. maculata*) تنها یک پایه در ایران دارد و فاقد بذر نیز می‌باشد، به بررسی ریزازدیادی جوانه‌های پایه بالغ آن پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های مورد نیاز از تنها پایه بالغ *E. maculata* (۳۶-۳۹ ساله) از باغ گیاه‌شناسی صفی‌آباد در دزفول تهیه گردید. شاخه‌ها در اندازه‌های ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری از درخت مزبور در فصول مختلف جدا شده و وارد مرحله پیش‌سترون‌سازی شامل شستشو با آب جاری، برس‌کشی آب و مایع ظرفشویی و برس‌کشی با اتانول ۷۰٪ شدند. سپس نمونه‌ها به قطعات کوچکتر تقسیم شده و در ظروف تمیزی برای مرحله سترون‌سازی به زیر هود منتقل شدند. برای سترون‌سازی با توجه به اندازه نمونه‌ها و درجه مقاومت آنها نسبت به نفوذ مایع سترون‌کننده و شدت آلودگی نمونه‌ها که خود تابعی از فصل و محل برداشت آنها است، از تیمارهای مختلف استفاده می‌شود. در این تحقیق از کلرید جیوه ۱٪ در زمان‌های مختلف استفاده شد. در زمان‌های مختلف نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر ۲ بار تقطیر شستشو داده شدند (جدول ۱- شکل ۱). فصول نیز از نظر آماری مقایسه شدند، داده‌های ثبت شده (برحسب درصد) برای آنالیز آماری ابتدا به arcsin تبدیل شده و بعد به روش ANOVA آنالیز گردیده و میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ مقایسه شدند.

برای کشت از ریزنمونه‌هایی به طول ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر دارای جوانه جانبی استفاده شد. در این مرحله

تجاری مهم مانند تانن (Tannin) و کینو (Kino)، مقاومت در مقابل آفات و امراض و سایر موارد در سرتاسر جهان کاربرد دارد (Javanshir & Mosadegh, 1972) و (Assareh et al., 2007). اکالیپتوس در حدود اوایل قرن بیستم وارد ایران شده و به صورت چند پایه در شمال و جنوب کشور کاشته شد (Assareh & Sardabi, 2007). همچنین اسانس اکالیپتوس در درمان برخی بیماری‌ها کاربرد دارد (Bina et al., 1997).

تکثیر اکالیپتوس می‌تواند از طریق بذر، قلمه و پیوند انجام شود، اما هر کدام از این شیوه‌ها مشکلاتی دارند. تولید بذر اکالیپتوس با توجه به شرایط محیطی سال به سال تغییر می‌کند. معمولاً پس از سال‌هایی که باروری آنها زیاد است دوران رکود که ممکن است ۷ سال طول بکشد شروع می‌شود (Assareh & Sardabi, 2007). همچنین تکثیر این گیاه از طریق بذر به دلیل تفرق وسیع ژنتیکی با گیاهان مادری مناسب نیست (Assareh, 2002). ازدیاد از طریق قلمه‌زنی به علت پایین بودن میزان ریشه‌زایی مشکل است، ناسازگاری و رد پیوند نیز مشکل اصلی تکثیر اکالیپتوس‌ها بشمار می‌رود (Lakshmi-Sita, 1993).

کشت بافت روش جایگزین ارزشمندی برای تکثیر رویشی گونه‌های اکالیپتوس با قلمه ساقه است. تنها مزیت کشت بافت، تکثیر سریع درختان نیست، بلکه جوان‌سازی درختان بالغ مهمترین مزیت کشت بافت است (Jenq-Chuan, 1995). ریزازدیادی در مقایسه با روش‌های معمول تکثیر مانند قلمه‌زنی مزایای زیادی دارد و کاربرد آن در باغبانی، کشاورزی و جنگلداری به طور متداول در جهان، در حال گسترش است (Assareh & Sardabi, 2007). در این زمینه پژوهشگران بر روی ریزازدیادی گونه‌های مختلف اکالیپتوس بررسی‌های بسیاری انجام داده‌اند. Nugent et al. (2001) از لپه و هیپوکوتیل دانه‌رست‌های *E. globulus* Labill کالوس و اندام‌زایی نمودند. (Rahim et al., 2003) از قطعات گره‌ای

E. camaldulensis Dehn برای بدست آوردن کالوس و

چنددانه‌های دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند. شاخه‌های تولید شده در مرحله پرآوری به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر به منظور ارزیابی ریشه‌زایی به محیط القاء ریشه انتقال یافتند. تیمارهای به کار رفته در جدول ۳ ارائه شده است. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در سه تیمار با ۹ تکرار که هر تکرار دارای ۴ نمونه بود، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سپس به اتاق رشد با شرایط ذکر شده منتقل گردید. بعد از دو ماه پارامترهای ریشه‌زایی از جمله تعداد و طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌های فرعی و وجود تارکشنده (وجود تارکشنده=۱ و فقدان تارکشنده=۰) ثبت و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS به روش ANOVA آنالیز و میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه گردیدند.

ریزنمونه‌ها در زیر هود با شرایط استریل به محیط کشت‌هایی با تیمارهای مختلف هورمونی منتقل شده (جدول ۲)، سپس در اتاق رشد (۱۶ ساعت نور با شدت ۳۰۰۰-۵۰۰۰ لوکس روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ سانتی‌گراد روز-۱۹ سانتی‌گراد شب) به مدت یک ماه نگهداری شدند. در هر تیمار ۴ تکرار و هر تکرار ۴ نمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار داده شد. سپس شاخص‌های رشد از جمله: تعداد شاخه، تعداد جوانه، رشد طولی شاخه و میزان سبزیگی برگ‌ها ثبت گردید. میزان سبزیگی بین ۰-۴ کدگذاری شده که صفر نشانگر خشکی و نکرورگی کامل برگ‌ها و ۴ نمایانگر رنگ سبز و شادابی برگ‌ها بود. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS به روش ANOVA آنالیز و میانگین‌ها به روش آزمون

جدول ۱- فصول و مدت زمان‌های سترون‌سازی نمونه‌های پایه بالغ در محلول کلرید جیوه

فصل	زمان (دقیقه)
بهار	۱-۳-۵
تابستان	۳-۵-۷
پاییز	۴-۶-۸-۱۰
زمستان	۴-۸-۱۰



شکل ۱- ریزنمونه‌های سترون‌شده پایه بالغ مورد استفاده در ریزازدیادی

جدول ۲- تیمارهای مختلف شاخه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه بالغ

سیتوکینین (mg l^{-1})				اکسین (mg l^{-1})			هورمون‌ها
2ip	Kin	TDZ		BAP		IBA	تیمارها
۰/۵	۰/۲	۰/۰۱	۰/۵	۰/۳	۰/۱	۰/۰۱	
+	-	-	-	+	-	+	T11
-	+	-	-	-	+	+	T12
+	-	-	+	-	-	+	T13
-	-	-	+	-	-	+	T14

+ : وجود هورمون، - : فقدان هورمون

جدول ۳- تیمارهای مختلف ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه بالغ

اکسین (mg l^{-1})						هورمون‌ها
NAA			IBA			تیمارها
۱	۰/۵	۰/۱	۱	۰/۵	۰/۱	
-	-	-	+	-	-	T21
-	-	-	-	-	-	T22
-	+	-	-	+	-	T23

+ : وجود هورمون، - : فقدان هورمون

نتایج

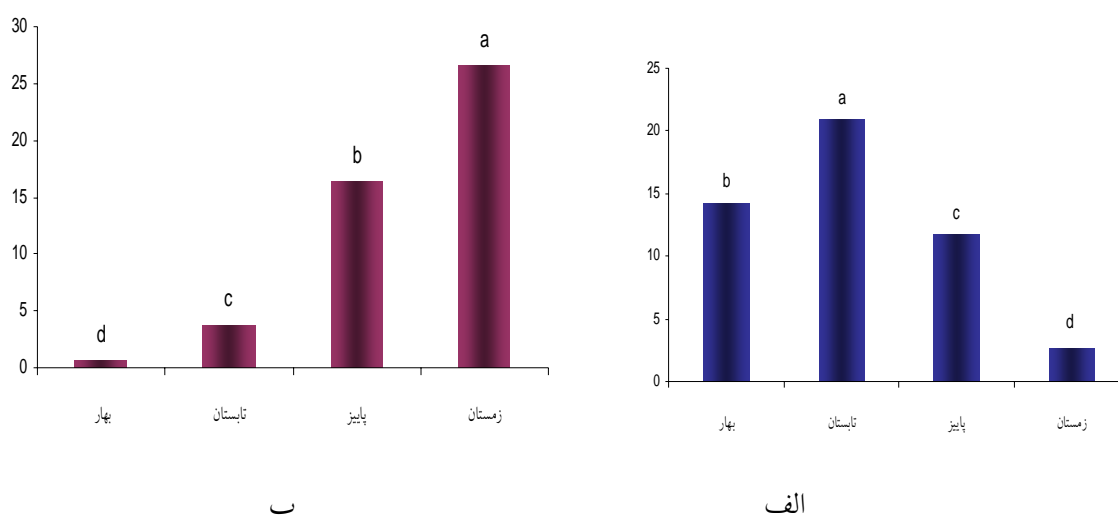
(۶۲/۰٪)، بهترین فصول برای ریزازدیادی شناسایی گردید که با سایر فصول اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۲). سترون‌سازی محلول ۰/۱٪ HgCl_2 به مدت یک دقیقه با سه بار شستشوی آب مقطر سترون، به لحاظ کم بودن میزان آلودگی بعد از سترون‌سازی و نیز درصد بقاء بیشتر، بهترین تیمار سترون‌سازی در نظر گرفته شد. در هر فصل نیز بهترین تیمار تعیین و در جدول ۴ ارائه شده است.

فصل مناسب برای سترون‌سازی ریزنمونه‌های پایه بالغ پس از استفاده از تیمارهای زمانی مختلف تعیین گردید و بیشترین درصد زنده‌مانی (سبز ماندن ریزنمونه و جوانه زدن) و آلودگی نیز به دست آمد. در بین فصل‌های مختلف سال، نمونه‌های برداشت شده در فصل تابستان با بالاترین درصد زنده‌مانی (۲۰/۸۵٪) و بهار با کمترین میزان آلودگی

جدول ۴- میانگین درصد زنده‌مانی و آلودگی تیمارهای زمانی سترون‌سازی ریزنمونه‌های پایه بالغ با محلول $HgCl_2$ (۰/۱٪)

فصول سال	مدت زمان (دقیقه)	میزان زنده‌مانی (%)	میزان آلودگی (%)
بهار	*۱	۵۶/۴	۱/۸۲
	۳	۲۵/۹	۳/۴۵
	۵	۳۴/۶	۳/۸۵
تابستان	۳	۲۰	۲/۵
	*۵	۲۱/۴۳	۰
	۷	۲۱/۱	۲/۶
پاییز	۴	۱۱/۷	۱۵
	۶	۱۱/۷	۱۸/۳
	*۸	۱۵	۱۱/۷
	۱۰	۶/۲۵	۱۵/۶
زمستان	*۴	۱۰	۲۳/۳
	۸	۰	۳۰
	۱۰	۳/۸	۰
	۱۲	۲/۲	۱۳/۳
	۱۵	۰	۵/۹

*: تیمار بهتر در هر فصل



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر فصول بر سترون‌سازی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ: الف) درصد زنده‌مانی ب) درصد آلودگی (بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

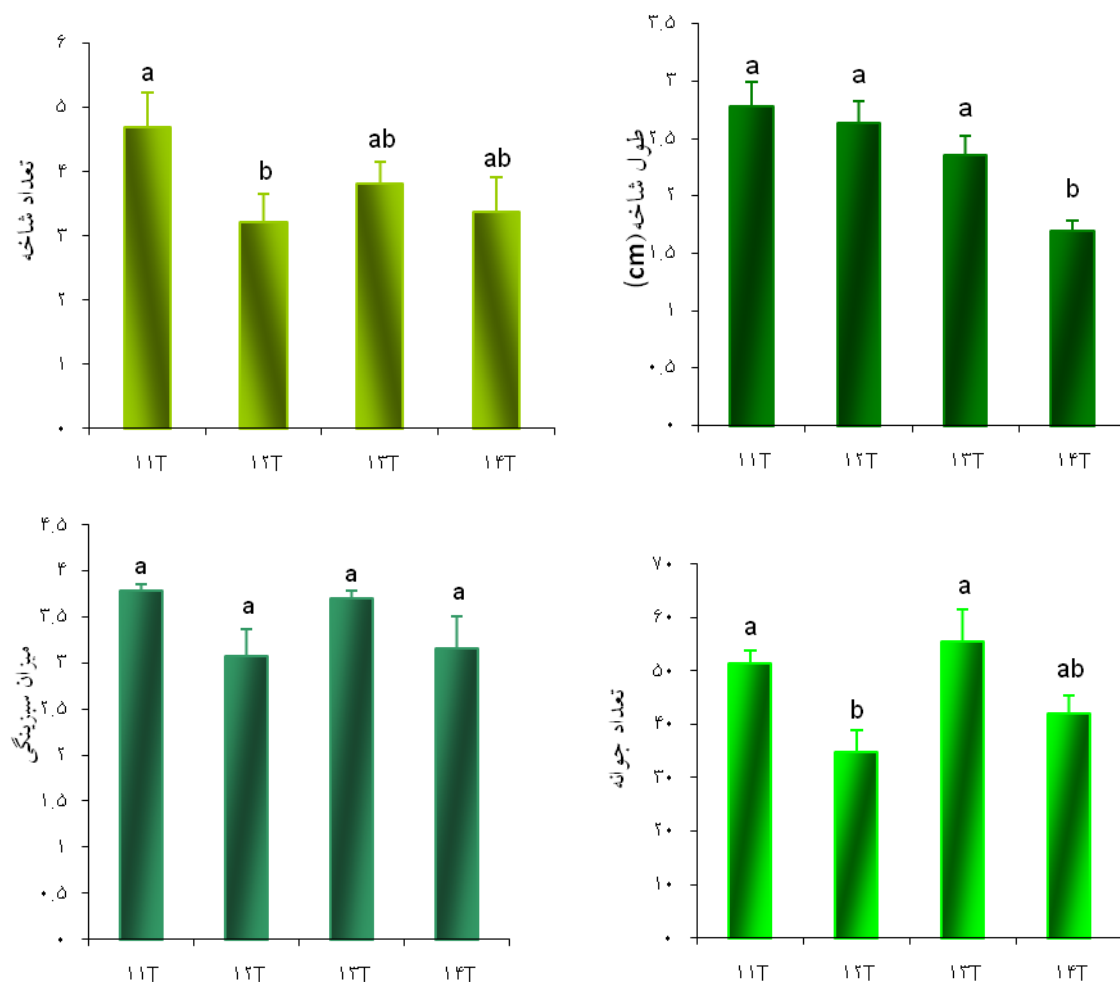
0.2^1 kin، 0.1 mg l^{-1} IBA (T12) تفاوت آماری داشت. وجود 2ip در کنار BAP پاسخ مناسبی ارائه داد، ولی استفاده از BAP به تنهایی مناسب نبود (جدول ۵، شکل ۳ و ۵-الف، ب و د).

شاخه‌های حاصل از مرحله پرآوری پایه بالغ به سه تیمار ریشه‌زایی مذکور منتقل شد. نتایج نشان داد که تیمار تلفیقی 0.5 mg l^{-1} IBA و 0.5 mg l^{-1} NAA در تعداد ریشه (با میانگین 0.622) با سایر تیمارها تفاوت آماری داشته ولی در طول ریشه (با میانگین 0.193 سانتی‌متر) با تیمار T22 تفاوت آماری داشته است (جدول ۶، شکل ۵-ج). سپس نمونه‌های ریشه‌دار شده به گلخانه منتقل گردیدند و مراحل سازگاری را طی کردند (شکل ۶).

به‌منظور ریزازدیادی ریزنمونه‌های (جوانه‌های جانبی) پایه بالغ، تیمار 0.5 mg l^{-1} BAP، 0.1 mg l^{-1} IBA (T14) با کمترین طول شاخه (با میانگین $1/7$ سانتی‌متر) با سایر تیمارها تفاوت آماری داشت. تیمار 0.3 mg l^{-1} BAP، 0.1 mg l^{-1} IBA (T11) در تعداد شاخه (با میانگین $4/69$) با T12، طول شاخه (با میانگین $2/78$ سانتی‌متر) با T14، تعداد جوانه (با میانگین $34/7$) با T12 اختلاف آماری داشت. البته از نظر میزان سبزی‌نگی بین تیمارها اختلاف آماری مشاهده نشد. در کل به نظر تیمار T11 در شاخص‌های رشد بهتر عمل نمود ولی در تعداد جوانه تیمار 0.5 mg l^{-1} BAP، 0.2 mg l^{-1} kin، 0.1 mg l^{-1} IBA (T13) بهتر بود و با تیمار 0.1 mg l^{-1} BAP، 0.1 mg l^{-1} IBA

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر سیتوکینین‌های مختلف در ریزازدیادی نمونه‌های حاصل از پایه بالغ *E. maculata* بر شاخص‌های رشد

Pr>F	F Value	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تعییرات
۰/۴۸۹	۰/۸۸	۱/۴	۳	اثر هورمون بر تعداد شاخه
۰/۰۲	۵/۵۱	۰/۸۴	۳	اثر هورمون بر طول شاخه
۰/۰۸۲	۳/۰۹	۳۸۰	۳	اثر هورمون بر تعداد جوانه
۰/۴۸۲۴	۰/۸۹	۰/۲۲۳	۳	اثر هورمون بر میزان سبزی‌نگی
-	-	۱۴/۱	۹	خطای آزمایش تعداد شاخه
-	-	۰/۱۵۲	۹	خطای آزمایش طول شاخه
-	-	۱۲۳	۹	خطای آزمایش تعداد جوانه
-	-	۲/۲۴	۹	خطای آزمایش میزان سبزی‌نگی

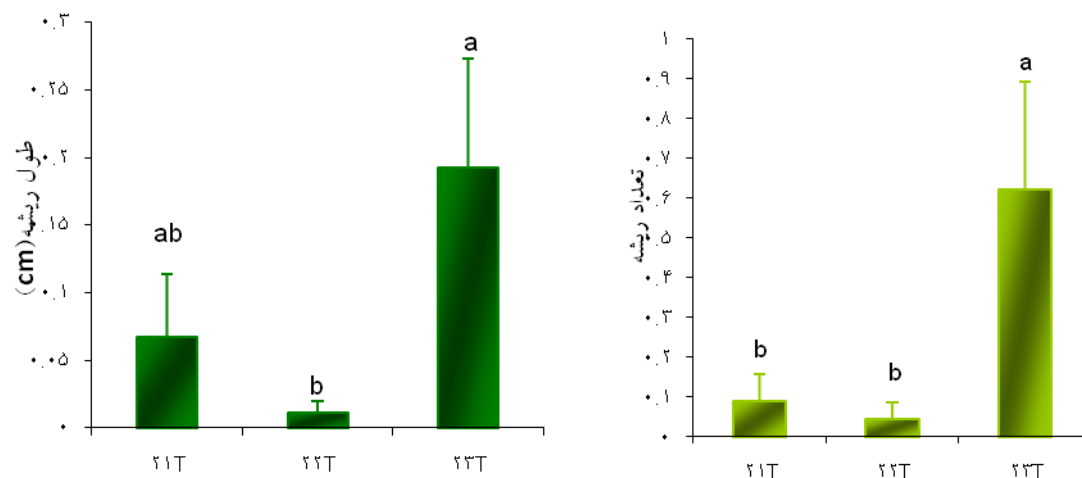


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر سیتوکینین‌های مختلف بر شاخه‌ایی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ بر شاخص‌های رشد (بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

{T11: BAP(۰/۳ mgl⁻¹), 2ip (۰/۵mg⁻¹), JBA(۰/۰/۰۱mg⁻¹), T12: BAP(۰/۱ mgl⁻¹), kin (۰/۲mg⁻¹), JBA(۰/۰/۰۱ mgl⁻¹), T13: BAP (۰/۵mg⁻¹), 2ip (۰/۵mg⁻¹), JBA(۰/۰/۰۱ mgl⁻¹), T14: BAP (۰/۵ mgl⁻¹), JBA(۰/۰/۰۱ mgl⁻¹), IBA(۰/۰/۰۱ mgl⁻¹).

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر اکسین‌های مختلف در ریزازدیادی نمونه‌های حاصل از پایه بالغ *E. maculata* بر شاخص‌های رشد

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	Pr>F
هورمون بر تعداد ریشه اصلی	۲	۰/۹۳	۳/۸۲	۰/۰۴۴۱
هورمون بر طول ریشه اصلی	۲	۰/۰۷۹	۲/۶	۰/۱۰۵۶
خطای آزمایش تعداد ریشه اصلی	۱۶	۰/۲۴	-	-
خطای آزمایش طول ریشه اصلی	۱۶	۰/۰۳	-	-



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سیتوکینین‌های مختلف بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ بر شاخص‌های رشد (بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

{T21: IBA (۱mg^l-۱), T22: بدون هورمون, T23: IBA(۰/۵mg^l-۱), NAA (۰/۵ mg^l-۱)}.



ب) گیاهان کشت بافتی به روش مرسوم بعد از سازگاری



شکل ۶- الف) گیاهان قبل از سازگاری،

بحث

قرار گرفته است، از جمله Lakshmi-Sita (1993) که با تلفیق 0.1 mg l^{-1} BAP و 0.5 mg l^{-1} Kin در محیط MS در *E. tereticornis* افزایش رشد طولی و ازدیاد شاخه را مشاهده کرد. (Bunn (2005) نیز در آزمایشی در *Eucalyptus spp.* بیان داشت که ترکیب BAP و Kin بر تکثیر شاخه نسبت به وجود هر یک از آنها به تنهایی اثر بهتری داشته است. همچنین بهترین تیمار شاخه‌زایی با کیفیت مناسب، ترکیب 0.538 mg l^{-1} Kin و 0.563 mg l^{-1} BAP بر روی *E. impensa* مشاهده شد (Bunn, 2005).

Cortezzi & Mendes (1989) در *E. globulus* بهترین تکثیر شاخه را در 0.5 mg l^{-1} BAP و 0.1 mg l^{-1} IBA مشاهده نمودند. (Koriesh et al. (2002) نیز بهترین شاخه‌زایی روی *E. citriodora* را در محیط کشت MS حاوی 0.5 mg l^{-1} BAP به دست آوردند. Assareh et al. (2006) بهترین تیمار شاخه‌زایی در *E. camadulensis* و *E. microcarpa* را 0.1 mg l^{-1} TDZ و 0.5 mg l^{-1} NAA و تیمار 0.5 mg l^{-1} 2iP، 0.1 mg l^{-1} BAP و 0.1 mg l^{-1} IBA را در *E. melliodora* معرفی نمودند. Assareh et al. (2007) نیز تیمار 0.2 mg l^{-1} Kin، 0.1 mg l^{-1} BAP و 0.25 mg l^{-1} GA₃ را بهترین تیمار شاخه‌زایی در *E. gongylocarpa* Blakely اعلام نمودند.

BAP به‌عنوان سیتوکینین بسیار فعال بر تکثیر شاخه نشان داده شده است (Roux & Van Staden, 1991)، (McComb et al., 1996) با توجه به این مسئله، در این مطالعه نیز از BAP در غلظت‌های مختلف استفاده شد که غلظت 0.3 mg l^{-1} آن در کنار 0.5 mg l^{-1} 2ip در شاخص‌های رشد پاسخ بهتری داده است (شکل ۴ تیمار T11).

کیتین در القا تکثیر شاخه با BAP هم مولار خود در بیشتر گونه‌های چوبی (درختی)، اثر کمی دارد (George & Sherrington, 1993). در این مطالعه وجود 2ip به جای kin پاسخ بهتری در شاخه‌زایی نشان داد. ترکیب

بهترین فصل برای ریزازدیادی، فصل بهار از نظر کمترین آلودگی و فصل تابستان از نظر بیشترین زنده‌مانی بود که با سایر فصول اختلاف معنی‌دار داشت و فصل زمستان بیشترین آلودگی را نشان داد. نتایج حاصل از تیمارهای سترون‌سازی ریزنمونه‌های پایه بالغ (شامل جوانه‌های انتهایی و جانبی درختان بالغ) نشان داد که تیمار سترون‌سازی محلول $0.1\% \text{ HgCl}_2$ به مدت ۱ دقیقه به لحاظ کم بودن میزان آلودگی بعد از سترون‌سازی و نیز درصد بقاء بیشتر بهترین تیمار سترون‌سازی بود. در مرحله پیش‌سترون‌سازی، برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی و اتانل، در حذف کرک‌ها و ترشحات صمغی سطح جوانه‌ها مؤثر بوده و امکان وجود آلودگی‌های سطحی را به حداقل خود می‌رساند (Emam & Shahrzad, 2002). محلول کلرور مرکوریک 0.1% از سمی‌ترین محلول‌های سترون‌سازی است که باید در غلظت پایین با زمان کوتاه بر نمونه‌ها اثر بگذارد تا از انهدام بافت‌ها توسط آن جلوگیری شود. مطابق با گزارش‌های ارائه شده، مناسب‌ترین زمان سترون‌سازی با محلول کلرور مرکوریک 0.1% در گیاهان مختلف متفاوت بوده، به‌طوری‌که در *Populus caspica* در مدت شش دقیقه بهترین تیمار سترون‌سازی در فصل پاییز بوده (Emam & Shahrzad, 2002) و در *E. gongylocarpa* نیز ۲ و ۸ دقیقه اعلام شده است (Assareh et al., 2007). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد طولی، تعداد شاخه‌ها و ریشه‌زایی *E. maculata* نشان داد که هر یک از این صفات به یک نوع تنظیم‌کننده رشد پاسخ بهتری می‌دهند. بررسی اثر سیتوکینین‌ها بر تعداد شاخه نشان داد که بهترین تیمار ضریب ازدیاد شاخه در پایه بالغ، تیمار 0.5 mg l^{-1} 2iP، 0.3 mg l^{-1} BAP، 0.1 mg l^{-1} IBA بود. همچنین اثر مثبت کاربرد توأم سیتوکینین‌ها در افزایش رشد طولی شاخه توسط محققان دیگر نیز مورد بررسی

ریزازدیادی *Eucalyptus maculata* از پایه بالغ به روش کشت درون‌شیشه‌ای

هورمونی $1/0.16 \text{ mg l}^{-1}$ IBA را بهترین تیمار ریشه‌زایی اعلام نمودند که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مغایرت داشت. احتمالاً نوع گونه، غلظت هورمون‌ها و ... علت مغایرت باشد. البته (1982) Ahuja نیز در صنوبرهای بالغ Aspen در حضور NAA و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های 0.1 و 0.5 میلی‌گرم بر لیتر ریشه‌زایی مناسبی داشت که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

لازم به ذکر است که در بعضی گونه‌های اکالیپتوس، مانند *E. marginata* و *E. intens*، القا ریشه به سختی و در بعضی مانند *E. camadulensis* Dehnh نسبتاً ساده انجام می‌گیرد (McComb & Bennet, 1986). گونه *E. globulus* به آسانی تکثیر می‌یابد، اما در شرایط درون‌شیشه‌ای ریشه‌زایی حتی زمانی که نمونه‌ها از دانه‌رست گرفته شده باشند، نیز به سختی امکان می‌پذیرد (Hartney, 1983). ریشه‌زایی *E. maculata* نیز در این پژوهش همین مطلب را تأیید می‌نماید. چندین گزارش درباره بازدارنده‌های ریشه‌زایی ویژه در اکالیپتوس وجود دارد. برای مثال سه بازدارنده G (بازدارنده ریشه‌زایی) از *E. grandis* بالغ جدا و از نظر شیمیایی شناسایی شده است. یک بازدارنده از عصاره پایه‌های بالغ *E. deglupta* به‌دست آمد و اخیراً ترکیب Grandinol از برگ‌های بالغ *E. grandis* به‌دست آمده است. بررسی‌ها نشان داده که ریشه‌زایی قلمه‌های درختانی با بیش از یک سال سن به آسانی صورت گرفته، اما قلمه‌های درختان پنج ساله ریشه تولید نمی‌کنند، احتمالاً به این دلیل که غلظت بازدارنده‌های ریشه‌زایی در برگ‌های مسن افزایش می‌یابد و افزایش آن منجر به کاهش توان ریشه‌زایی قلمه‌ها می‌گردد. همچنین وجود تراوشات فنلی نیز مانع ریشه‌زایی می‌شود (Assareh & Sardabi, 2007).

از طرفی (1981) Gupta et al. بیان داشتند که درصد ریشه‌زایی با طولانی‌تر شدن زمان کشت در *E. rudis*، *E. citriodora* و *E. marginata* بیشتر شد و شاخه‌های کشت شده *E. citriodora* بعد از چهار بازکشت ریشه‌دار

BAP و Kin نیز برای شاخه‌زایی پایه بالغ این گونه ترکیب مناسبی است. ولی استفاده از 0.5 mg l^{-1} 2iP و 0.3 mg l^{-1} BAP از همه بهتر بود.

در ریزازدیادی *E. maculata*، شاخه‌زایی بسیار آهسته انجام شد. (2005) Bunn نیز اظهار داشت که ساقه‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای *E. impensa* نیز رشد بطئی داشتند و یا رشد آنها متوقف شده بود، این پاسخ‌های مورفولوژیکی در کشت درون شیشه‌ای سایر گونه‌های اکالیپتوس نیز گزارش شده است (Bennet & McComb, 1982)، (McComb et al., 1996). Bennet (1992) بیان داشت که طول شاخه در *E. globulus* Labill در محیط دارای کیتین طولیتر بوده و برگ‌ها شاداب‌تر بر روی ساقه باقی ماندند، اما تکثیر شاخه آن به نسبت کم بوده است.

در ریزازدیادی با توجه به اینکه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی از آنجایی که هدف، تکثیر شاخه با سبزی‌نگی و شادابی بهتر است، تیمار 0.5 mg l^{-1} 2iP، 0.3 mg l^{-1} BAP و 0.1 mg l^{-1} IBA برای تکثیر گونه *E. maculata* بهتر به نظر می‌رسد.

برای برطرف کردن پدیده شیشه‌ای شدن در محیط MS از نصف غلظت نیترات در محیط کشت استفاده شد که (1989) Mclaughtin & Karnoskey نیز این پدیده را به همین طریق برطرف نمودند.

بهترین تیمار ریشه‌زایی، تیمار تلفیقی 0.5 mg l^{-1} IBA و 0.5 mg l^{-1} NAA بود. البته در تحقیقات بسیاری استفاده از IBA به تنهایی پاسخ بهتری داده که بهترین تیمار ریشه‌زایی در گونه *E. gongylocarpa* Blakely (Assareh et al., 2007) *E. citriodora* (Koriesh et al., 2002) و *E. dunni* (Cortezzi & Mendes, 1989) تیمار 1 mg l^{-1} IBA بوده است.

(2005) Bunn نیز در *E. impensa*، با استفاده از تیمار تلفیقی IBA و NAA، بهترین تیمار ریشه‌زایی را 1 mg l^{-1} IBA و 0.931 mg l^{-1} NAA معرفی کرد و در گونه *E. phylacis* L. Jhson and K. Hill. تیمار

- Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 73: 150-156.
- Bennet, I.J. and McComb, J.A., 1982. Propagation of Jarrah (*E. marginata*) by organ and tissue culture. Australian forest Research, 12: 121-127.
 - Bennet, I.J., McComb, J.A., Tonkin, CM. and McDavid, D.A.J., 1992. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of *Eucalyptus globulus* and other *Eucalyptus* species. In: *Proceedings of conference on mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species*, France. AFOCEL: 195-201.
 - Bina, S., Siddiqui, F., Sabira, B. and Salimuzzaman, S., 1997. Isolation and structural Elucidation of acylated pentacyclic triterpenoides from the leaves of *E. camaldulensis* var. *Obtusa*. Journal of Planta Medica, 63(1): 47-50.
 - Bunn, E., 2005. Development of *In vitro* methods for ex site conservation of *E. impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 97-102.
 - Cortezzi, M.E. and Mendes, S., 1989. Micropropagation of *Eucalyptus dunni* Maid. Annals of Forest Science, 46: 140-144.
 - Emam, M. and Shahrzad, SH., 2002. Micropropagation of *Populus caspica*. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 53: 84-89.
 - Furze, M.J. and Cresswell, C.F., 1985. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *E. nitens*, using tissue culture techniques. South African Forestry Journal, 135: 20-30.
 - George, E.F. and Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture (part I: The technology). Exegetics LTD, UK, 709p.
 - Gupta, P.K., Maskarenhas, A.F. and Jagannathan, V., 1981. Tissue culture of forest trees clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. Plant Science Lett Letters, 20: 195-201.
 - Hartney, V.J., Barker, P.K., 1983. The vegetative propagation of eucalyptus by tissue culture. Silviculturæ, 8: 791-792.
 - Jambhale, N.D. and Patil, S.C., 1996. Micropropagation of elite *Eucalyptus* types through shoot tip culture. Indian Forester, 122: 61-64.
 - Javanshir, K. and Mosadegh, A., 1972. *Eucalyptus*, University of Tehran Press. 434p.
 - Jenq-Chuan, Y., 1995. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and comparison of growth between micropropagation plantlets and rooted cuttings. Plant Cell Reports, 15: 170-173.
 - Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V.K. and Uniyal, D., 2003. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F₁ hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM x *E. grandis* Hill ex Maiden). Silvae Genetica, 52: 110-113.
 - Koriesh, E.M., Abd El-Fattah, Y.M., El-Dayem, M.A. and El-Etriby, M.A., 2002. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus citriodora*. Acta Horticulture, 625: 283-288.
 - Lakshmi-sita, G., 1993. Micropropagation of *Eucalyptus*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 263-280.

شدند. برای *E. rudis* یک دوره چهار ماهه مورد نیاز بود و *E. marginata* ریشه‌زایی بعد از دوازده ماه انجام شد (Assareh & Sardabi, 2007). در این تحقیق نیز *E. maculata* بعد از دو ماه ریشه‌زایی انجام شد. در پایان پیشنهاد می‌شود که بهینه‌سازی محیط کشت نمونه‌های پایه بالغ و همچنین بهره‌گیری از اسانس این نمونه‌های کشت بافتی و مقایسه با پایه بالغ می‌تواند مکمل تحقیق حاضر باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه کلیه همکاران مؤسسه مذکور، به‌ویژه گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی و به‌خصوص سرکار خانم مهندس شکوفه شهرزاد و طیبه سهیلا نراقی و همچنین از حمایت‌های بی‌دریغ دانشگاه الزهرا (س) سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

- Ahuja, M.R., 1982. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. Silvae Genetica, 32: 131-135.
- Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus* sp. Iranian Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 236: 11-32
- Assareh, M.H., 2002. Mass production of *Eucalyptus camaldulensis* plantlet under photoautotrophic conditions. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 53: 79-83.
- Assareh, M.H., Ghorbanli, M., GhamariZare, A., and Akbari Khabaz, M., 2007. Micropropagation, organogenesis and using new method of semi-photoautotrophic conditions in *Eucalyptus gongilocarpa*. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 75: 134-145.
- Assareh, M.H. and Sardabi, H., 2007. *Eucalyptus* (Description, Illustration and propagation by advanced techniques). Research Institute of Forests and Rangelands, 672 p.
- Assareh, M.H., Vatanpour, Z., Kiarostami, KH. and GhamariZare, A., 2006. Semiphototrophic micropropagation on three *Eucalyptus* species.

- forestry 1: Trees I. Berlin: Springer Verlag, 340-362.
- McLaughlin, J. and Karnoskey, D.F., 1989. Controlling vitrification in *Larix deciduas* via culture media manipulation. Canadian Journal of Forest Research, 19: 1334-1337.
 - Nugent, G., Chandler, S.F., Whiteman, P. and Stevenson, T.W., 2001. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37:388-391.
 - Rahim, F., Jabeen, M. and Ilahi, I., 2003. Masspropagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Asian Journal of Plant Science, 2(2):184-187.
 - Turnbull, J.W. and Boland, D.J., 1984. *Eucalyptus*. Biologist, 31: 49-56.
 - Le Roux, J.J. and Van Staden, J., 1991. Micropropagation and Tissue culture of *Eucalyptus*- a review. Tree physiology, Heron publishing- Victoria, Canada, 9: 435-477.
 - Manders, G., Otoni, W.C., Dutra, W.C., Blackhall, F.B., Vaz, N.W., Power, J.B. and Davey, M.R., 1994. Transformation of Passionfruit (*Passiflora edulis*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 13: 697-702.
 - McComb, J.A., Bennet, I.J. and Tonkin, C., 1996. *In vitro* propagation of *Eucalyptus* species. In: Taji A.M. and Williams, R.P. (eds) Tissue culture of Australian plants. University of New England, Armidale: 112-156.
 - McComb JA., Bennet I.J., 1986. *Eucalyptus* spp. In: Bajaj YPS, ed. Biotechnology in agriculture and

Micropropagation of *Eucalyptus maculata* from Mature Stock by tissue culture

A. Ghamari Zare¹, M. Sedaghati^{2*}, M. Emam³, M. H. Assareh⁴ and KH. Kiarostami⁵

1- Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.

2*- Corresponding Author, MSc, Al-Zahra University, Tehran, I.R. Iran. Email: sedaghati@rifr-ac.ir

3- Senior Expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.

4- Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.

5- Assistant Professor, Al-Zahra University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 09.10.2012

Accepted: 07.05.2013

Abstract

Due to *Eucalyptus* potential as a fast growing species, its utilization for afforestation and industrial and medical purposes is very important. *E. maculata* Hook. is an important species among the other eucalypts in respect to some chemical components production and medical utilization. Sexual and asexual propagation of this species is difficult, for this reason the trial was conducted to investigate its propagation by tissue culture, using micro mature stocks.

The produced explants from the mature stocks, were placed on MS medium (Murashige and Skooge) treated by ½ nitrate and various growth regulators such as Kin (Kinetin), BAP (Benzylamino purine), IBA (Indole-3-acetic acid), 2ip (2-Isopentyladenine), TDZ (Tidiazorun) and NAA (Naphtalen Acetic Acid) at different levels of concentration. After two months, growth indexes, including shoot number, shoot height, root number, root length, bud number and greenness rate were measured and recorded. Results showed that the best shooting treatment was IBA (0.01 mg l⁻¹), BAP (0.3 mg l⁻¹) and 2ip (0.5 mg l⁻¹), in which average shoot number, shoot height and greenness rate were 4.63, 2.73 cm and 3.75, respectively, whereas the best rooting treatment was NAA (0.5 mg l⁻¹) plus IBA (0.5 mg l⁻¹), in which root length was 0.2 cm. Finally, the micropropagated plantlets were transferred to greenhouse to pass their adaptation process.

Keywords: *Eucalyptus*, asexual propagation, shooting, rooting, tissue culture, media culture