Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۹۷-۸۶ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.116721.1285
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.88.53.1.32.97

ریزازدیادی اکالیپتوس گونه *Eucalyptus citriodora* H.

زهرا آبروش[1*]، محمد حسن عصاره[2] و میترا امام[3]

۱- نویسنده و مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد پژوهشی، گروه زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، پست الکترونیک: abravesh@rifr-ac.ir

۲- استادپژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۳- استادیارپژوهشی، گروه تحقیقات زیست‌فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۹

چکیده

در بین گونه‌های درختان جنگلی سخت چوب، *Eucalyptus citriodora* درخت سریع‌الرشدی است که به‌دلیل دارا بودن اسانس معطر در عطرسازی، داروسازی و داشتن چوب نرم و سبک در صنایع کاغذسازی و مبل‌سازی کشت می‌شود. در این تحقیق، ریزازدیادی *E. citriodora* به روش کشت جوانه جانبی در محیط کشت‌های MS و WPM بررسی شد. سترون‌سازی با دو محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی اعمال گردید. شاخه‌زایی با هورمون‌های سیتوکینین (BAP، Kin)، اکسین (IBA) و جیبرلین (GA3) در دو سطح محیط کشت در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. ریشه‌زایی نیز با هورمون‌های اکسین IBA، NAA و IAA در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. آماربرداری از تعداد شاخه‌ها و جوانه‌ها، طول شاخه، سبزینگی، تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و تعداد کل ریشه انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین تیمار سترون‌سازی محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی به مدت ۱۸ دقیقه بود. تکثیر مطلوب و رشد طولی شاخه در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) و هورمون‌های سیتوکینین BAP، Kin، GA_3 و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های (۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۱) و (۰/۳، صفر، ۰/۱ و ۰/۰۱) میلی‌گرم در لیتر، به‌همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP بود. ریشه‌زایی مطلوب در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات)، با تیمار هورمونی NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر و تیمار تلفیقی IBA + IAA ۰/۵میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در نهایت، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط گلخانه سازگار شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کشت بافت روش مناسبی برای تکثیر این گونه ارزشمند در زمانی کوتاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت درون شیشه‌ای، محیط کشت، MS و WPM و *E. citriodora*

مقدمه

توان محدود تولید چوب در جنگل‌های کشور، لزوم دستیابی به منابع غنی چوب را ضروری کرده است. گونه‌های مختلف اکالیپتوس ازجمله *Eucalyptus citriodora* (Lemon-scented Gum) از گونه‌های مهم و سریع‌الرشد برای جنگل‌کاری و بهره‌برداری در صنایع چوب، کاغذ، روغن‌های اسانسی و سایر کاربردها هستند (Assareh, 2000; Jawanshir and Mossadegh, 1973). گونه‌های مختلف اکالیپتوس منابع مهمی برای مصارف دارویی، صنعتی، فضای سبز، زراعت چوب و سوخت

www.SID.ir

Archive of SID

هستند. اکالیپتوس‌ها تولیدکننـدگان مهمـی از سـنگین‌تـرین، بادوام‌ترین چوب‌ها و مولد فیبر برای ساخت کاغذ سـفید بـا کیفیت عالی می‌باشند، به‌طوری‌که می‌توان این جنس را یکی از با ارزش‌ترین منابع چوب در بین پهن‌برگان محسوب کـرد (Javanchir & Mossadegh, 1973). از اکـالیپتوس عـلاوه بر موارد فوق برای جلوگیری از فرسایش خاک در برابر آب و باد (Jawanshir & Mossadegh, 1973)، کاهش آلودگی هوا و پاکسازی خاک از آلاینده‌های شیمیایی (Keneshloo & Eghtesadi, 2011)، تولید آفت‌کش‌هایی با منشأ گیـاهی و طبیعـی (Fallahi *et al*., 2013) بـه‌منظـور پایـداری محیط‌زیست و جذب آلاینده‌های موجـود در خـاک و هـوا (گیاه پالایی) (Kamalpour, *et al*, 2014; Hosseinzadeh, *et al* 2017) استفاده می‌شود.

کاشت گونه‌های اکالیپتوس می‌تواند راه‌حل مناسبی برای از بین بردن آلودگی خاک مزارع باشد. با توجه به نیاز روزافزون به فراورده‌های حاصل از آن (چوب، اسانس و ...) و ناکافی بودن تولید داخلی، اهمیت زراعی آن در زمینه‌های مختلف فوق بیش از پیش نمایان می‌شود. هر چند کاشت اکالیپتوس در نواحی گرم و خشک دربردارنده نکات منفی مانند دریافت آب زیاد از اعماق زمین، تخلیه آب‌های زیرزمینی (Rad *et al*, 2010) و بروز پدیده آللوپاتی برای سایر گیاهان (Najafi Ashtiani *et al*, 2008; Souza *et al*, 2003) می‌باشد ولی حتی در این نقاط هم به‌صورت زراعت چوب (۶ تا ۸ سال) و برداشت‌های کوتاه‌مدت و بهبود ساختمان و تخلخل سطحی خاک (Sardabi *et a.*, 2010) ایجاد فضای سبز به‌ویژه در جاهایی که شرایط پوشش گیاهی نامناسب است (Karami, *et al*, 2007)، توصیه می‌شود.

تولید غیرجنسی این گیاه با استفاده از روش‌های معمول پیوند و قلمه مشکلات بسیاری دارد، بنابراین به‌منظور به‌دست آوردن تعداد زیادی گیاهچه که از نظر ژنتیکی یکسان و از نظر رشد طبیعی بوده و ترجیحاً قابلیت بالایی از نظر فتوسنتز داشته باشد، ضروریست. گونه *E. citriodora* به این دلیل اهمیت دارد که گونه‌ای سریع‌الرشد و مقاوم به گرما می‌باشد. همچنین به‌منظور کیفیت چوب، دوام چوب، تولید الیاف سلولزی، توسعه جنگل‌کاری، تولید عسل و تولید اسانس معطر (لیمویی) مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت اقتصادی این گونه از نظر کیفیت چوب (چوب نرم) و اسانس معطر موجود در برگ (Javanshir & Mossadegh, 1973)، برای بهره‌برداران نیاز به تکثیر انبوه با صفات ژنتیکی برتر می‌باشد. تکثیر از طریق ریزازدیادی می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر گونه‌های این جنس باشد. تحقیقات فراوانی در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف اکالیپتوس در ایران و جهان انجام شده است. مطالعات اولیه کشت بافت روی اکالیپتوس به‌طور وسیع روی کشت کالوس از بافت‌های دانه‌رست (Jacquiot, 1964) و بافت‌های کامبیومی انجام شد (De Bergh, 1983). کاربرد گره‌ها به‌عنوان ریزنمونه و امکان ایجاد ریشه از آنها موجب شد که توجه محققان به سمت تکثیر درون شیشه‌ای (*in vitro*) از این طریق معطوف شود.

برای اولین بار تکثیر شاخه از بخش‌های گرهی درختان برگزیده ۲۰ ساله *E. citriodora* گزارش شد (Gupta *et al*, 1981). تولید گیاهچه از بخش‌های دانه‌رستی *E. globulus* (Hartney, 1981)، شاخه چندگانه از جوانه‌های انتهایی درختان ۲۰-۱۰ ساله *E. citriodora* (Mascarenhas *et al*, 1982) و تولید شاخه‌های چندگانه از مریستم شاخه دانه‌رست‌های ۵ روزه در حال جوانه‌زنی *E. citriodora* (Lakshmi Sita & Vaidyanathan , 1979) گزارش شد. همچنین تکثیر شاخه را از دانه‌رست‌های ضدعفونی شده *E. citriodora* (Grewal *et al*, 1980)، تشکیل شاخه‌های چندتایی از بخش‌های گرهی سریع‌الرشد *E. camaldulensis* (Gupta *et al*, 1983) و استقرار موفقیت‌آمیز گیاهچه‌ها از بخش‌های گرهی درختان بالغ *E. camaldulensis* گزارش کردند (Mascarenhas *et al.* 1982; Mascarenhas&Gupta,1987). تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار از ریزازدیادی کشت جوانه گونه *E. gongylocarpa* (Akbari *et al*, 2007)، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گونه *E. melliodora* (Assareh & Sardabi, 2008) و شاخه‌زایی و

www.SID.ir

Archive of SID

ریشه‌زایی دو گونه *E. globulus* و *E. grandis* را با موفقیت در شرایط گلخانه‌ای و سازگاری در عرصه (Emam *et al*, 2007) و ریشه‌زایی و ایجاد گیاهچه از درختان چهار ساله *E. citriodora* در بازکشت‌های چهارم و پنجم (Gupta *et al*, 1981) را گزارش کردند.

با توجه به اهمیت صنعتی و ارزش اقتصادی گونه *E. citriodora* تکثیر آن از طریق کشت بافت امری ضروری به‌نظر می‌آید. در این تحقیق امکان تولید گونه درختی *E. citriodora* با استفاده از کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت. از اهداف مهم این تحقیق دستیابی به یک روش کاربردی برای تکثیر به‌صورت غیرجنسی در این گونه درختی و نیز بهینه کردن شرایط محیط کشت در شیوه ریزازدیادی و امکان توصیه کشت و بهره‌برداری صنعتی گونه سازگار فوق پس از موفقیت در ریزازدیادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذر گونه *E. citriodora* (Lemon-scented Gum) استفاده گردید که در ایران پایه کاشته شده‌ای نداشت، بذر این گونه از شرکت Kim seed استرالیا تهیه شد. بذرها پس از بوجاری، به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی، به‌مدت دو ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. آنگاه در شرایط سترون به زیر هود لامینارفلو منتقل شده و به‌طور جداگانه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت پنج دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی با ۱ درصد کلر فعال (دترژنت) به‌مدت ۱۸ دقیقه غوطه‌ور شدند و بعد سه مرتبه عمل شستشو با آب‌مقطر سترون انجام شد.

پس از پایان عمل ضدعفونی، بذرها درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) کامل فاقد قند و هورمون کشت شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، محور بالای دو برگ لپه‌ای رشد کرده و دارای ۲ تا ۳ میانگره شدند. سپس به قطعات حاوی جوانه تقسیم شده و به محیط‌های کشت MS (۱/۲ غلظت نیترات) و WPM (Driver & Kuniyuki. 1984) به‌منظور یافتن بهترین محیط شاخه‌زایی انتقال داده شدند (جدول ۱). در هر دو محیط کشت از هورمون‌های BAP، Kin، IBA، GA_3 و P.V.P (Poly Vinyl Pyrolidone) (ماده بازدارنده ترشحات فنلی) استفاده شد. در مجموع هشت تیمار و هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار با پنج شیشه و هر شیشه با شش ریزنمونه انجام گردید. این عملیات طی سه بازکشت و با تناوب زمانی چهار هفته انجام شد (جدول ۲). در پایان هر مرحله از تعداد شاخه و جوانه‌ها (ضریب ازدیادی)، طول شاخه و میزان سبزینگی شاخه بین یک تا چهار کدگذاری شد که کد۱ (نشانگر خشکی و نکروزگی کامل پهنک) و کد ۴ (نشانگر رنگ سبز تیره پهنک بود). pH محیط‌ها بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. ریزنمونه‌های ساقه‌ای به‌طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر در ظروف کشت به قطر ۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۹ سانتی‌متر و حاوی ۵۰cc محیط کشت قرار گرفتند و به اتاق رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند.

ریشه‌زایی: انتقال شاخه‌های با طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر به‌دست آمده از مرحله شاخه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی منتقل شدند تا گیاهچه‌ها بتوانند سطح تولید هورمون‌های طبیعی خود را به‌دست آورند. ریشه‌زایی در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) به همراه BAP در نه تیمار مختلف هورمونی اکسین شامل IAA، NAA و IBA و تیمارهای تلفیقی NAA+IAA NAA+IBA و IBA+IAA کشت شدند. هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار با پنج شیشه و در هر شیشه شش ریزنمونه بود (جدول ۳)، پس از شش هفته میانگین تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و تعداد ریشه‌ها در تیمارهای کشت به‌دست آمد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها در برنامه آماری (version 9) SAS در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در دو سطح محیط کشت و دو سطح سیتوکینین برای شاخه‌زایی و طرح کاملاً تصادفی برای ریشه‌زایی انجام شد. میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از شستشو با آب در گلدان‌های حاوی مخلوط پیت، ورمیکولیت و پرلیت به نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

۱:۱:۱ سترون شده، کشت شدند. برای حفظ بیشترین رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شد و گلدان‌ها به گلخانه در شرایط نوری و دمایی طبیعی منتقل شدند. به‌منظور انجام سازگاری تدریجی گیاهان، سرپوش به‌تدریج دارای منافذی شد تا اینکه به‌طور کامل برداشته شد و گیاهان با شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.

جدول ۱- مقایسه غلظت یونی نمک‌های موجود در محیط‌های کشت

یون	MS(۱/۲N)	WPM
NH_4(mM)	۱۰/۳۰۵	۴/۹۴
K^+	۱۰/۵۲	۱۲/۶۱
Mg^{++}	۱/۵	۱/۵
Ca^{++}	۲/۹۹	۳
Na^+	۰/۲۲۴	۰/۲۲۴
NO_3^-	۱۹/۷	۹/۶۴
PO_4^-	۱/۲۵	۱/۲۵
SO_4^{--}	۱/۷۶	۷/۴۴
Cl^-	۶	۱/۳۱
I^- (µM)	۵	–
Mn^{++}	۱۳۲	۱۳۲
Zn^{++}	۲۹	۲۰
B^{+++}	۱۰۰	۱۰۰
Mo^{+++}	۱/۰۳	۱/۰۳
Co^{++}	۰/۱۰۵	–
Cu^{++}	۰/۱	۱/۰۳
Ni^{++}	–	–
Fe^{++}	۱۰۰	۱۰۰
N(mM)	۳۰/۰۰۵	۱۴/۵۸
NH_4NO_3(mM)	۰/۵۲	۰/۵۱
قدرت یونی کل (mM)	۵۴/۹۲	۴۲/۳۹

در محیط MS (1/2N) مقادیر NH_4NO_3 و KNO_3 به ۱/۲ مقدار اصلی تقلیل یافته است.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به‌منظور بررسی جوانه‌های *E. citriodora* در محیط کشت درون شیشه‌ای

شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)	شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)
۱	MS (۱/۲N) + ۰/۳BAP +۰ Kin	۵	WPM + ۰/۳ BAP +۰Kin
۲	MS (۱/۲N) + ۰/۳ BAP +۲Kin	۶	WPM + ۰/۳BAP +۲Kin
۳	MS (۱/۲N) + ۰/۵BAP +۰Kin	۷	WPM + ۰/۵ BAP +۰Kin
۴	MS (۱/۲N) + ۰/۵ BAP +۲Kin	۸	WPM + ۰/۵ BAP +۲Kin

میزان غلظت هورمون‌های جیبرلین (GA_3=۰/۱ mg/l) و اکسین (IBA=۰/۰۱ mg/l) در جدول ۲ ثابت است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به‌منظور بررسی ریشه‌زایی شاخساره‌های ***E. citriodora*** در محیط کشت درون شیشه‌ای

شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)
۱	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IBA
۲	MS (۱/۲ N) +۰/۵ IAA
۳	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ NAA
۴	MS (۱/۲ N) + ۱ IBA
۵	MS (۱/۲ N) + ۱ IAA
۶	MS (۱/۲ N) + ۱ NAA
۷	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IBA +۰/۵ NAA
۸	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IAA +۰/۵ NAA
۹	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IAA +۰/۵ IBA

نتایج

به‌منظور کاهش آلودگی‌های سطحی و ترشحات فنلی و بهینه‌سازی روش سترون‌سازی، از آب جاری و دو محلول هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه استفاده شد. نتایج سترون‌سازی بذرها در دو محلول هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۱۸ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه نشان داد که درصد جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌های تولید شده از بذرها به‌ترتیب ۹۸/۳۳ درصد و ۷/۱۴ درصد بود (شکل ۱). در هر دو تیمار آلودگی باکتریایی و قارچی مشاهده نشد، در نمونه‌های سترون شده با محلول کلرید جیوه تندش جوانه‌زنی در بذرها انجام شده ولی در تعدادی از آنها بذرها پس از جوانه‌زنی کالوسی شده و رشد نکردند.

شکل ۱- جوانه‌زنی گونه ***E. citriodora***

نتایج تجزیه واریانس بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات رشدی شاخه نشان داد که عامل محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات ضریب ازدیادی (شاخه و جوانه) و رشد طولی شاخه گونه *E. citriodora* در دو محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) و WPM پاسخ متفاوتی دادند و اثر اصلی عامل محیط کشت و تیمارهای هورمونی و اثر متقابل آنها بر شاخص‌های مورد مطالعه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

مقایسه میانگین گیاهچه‌های کشت شده در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) ضریب ازدیادی و طول شاخه بیشتری نسبت به محیط کشت WPM داشتند. بنابراین می‌توان محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) را به‌عنوان محیط کشت بهینه برای شاخه‌زایی این گونه توصیه نمود (جدول ۵) (شکل ۲).

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیادی، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست ***E. citriodora*** در دو محیط کشت **MS** و **WPM**

منبع تغییرات	درجه آزادی	ضریب ازدیادی	طول شاخه (cm)	سبزینگی (درجه ۱ تا ۴)
محیط کشت	۱	۰/۲۱۹**	۰/۱۵**	۰/۰۰۰۵^{ns}
تیمار هورمونی	۳	۰/۰۲۷**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۳۷^{ns}
اثر متقابل محیط در تیمار هورمونی	۳	۰/۰۴۶**	۰/۰۲۵**	۰/۰۰۲^{ns}
خطا	۱۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات		۳/۲۰	۱/۴۶	۴/۶۱

ns: اختلاف معنی‌دار وجود ندارد و **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- شاخه‌زایی گونه *E. citriodora* در کشت درون شیشه‌ای

بررسی اثر هورمون BAP در دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر روی صفات ضریب ازدیادی، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست نشان داد که هورمون BAP در دو غلظت مختلف تأثیر یکسان و مشابهی داشت. اثر هورمون Kin بر روی ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه در غلظت‌های مختلف تأثیر یکسانی نداشت. بنابراین حضور Kin بر روی صفات ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه تأثیرگذار بود. بیشترین ضریب ازدیاد شاخه مربوط به تیمار توأم دو سیتوکینین BAP و Kin است و نبود هورمون Kin با هورمون BAP سبب کاهش ضریب ازدیاد شاخه و افزایش رشد طولی شاخه گردید.

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت در تیمارهای هورمونی بر شاخص‌های رشدی در جدول ۵ نشان می‌دهد که بیشترین رشد طولی شاخه در تیمار هورمونی BAP با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و تکثیر شاخه و جوانه (ضریب ازدیادی) در تیمار هورمونی BAP با غلظت۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و Kin با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. البته میانگین‌های شاخص رشدی در تیمار T_2 نسبت به سایر تیمارهای به‌کار رفته به‌طور معنی‌داری بالاتر بود.

در مقایسه بین دو محیط کشت، نتایج نشان‌دهنده برتری محیط‌کشت MS (۱/۲ نیترات) بر محیط کشت WPM بود (جدول ۵). این برتری را می‌توان در معنی‌دار بودن تفاوت بین آنها برای ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه مشاهده نمود. از لحاظ سبزینگی تفاوت معنی‌درای بین دو محیط کشت مشاهده نشد و در یک گروه قرار گرفتند. علاوه بر این نتایج نشان داد که محیط کشت WPM با تیمارهای مختلف سیتوکینین BAP و Kin در غلظت‌های متفاوت، به‌طور مشابه عمل نموده و تفاوت تیمارها و غلظت‌ها تأثیری در سبزینگی نداشت. اگرچه سبزینگی در محیط کشت WPM به‌طور طبیعی بود، اما در بعضی از نمونه‌ها به سمت قهوه‌ای شدن رفت. برتری محیط‌کشت MS (۱/۲ نیترات) بر محیط کشت WPM را می‌توان ناشی از بالاتر بودن قدرت یونی محیط کشت MS نسبت به WPM دانست (جدول ۱).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت در تیمارهای هورمونی بر شاخص‌های رشد طولی، ضریب ازدیادی و سبزینگی شاخه دانه‌رست *E. citriodora*

کد	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)	ضریب ازدیادی	طول شاخه	سبزینگی (درجه ۱ تا ۴)
T_1	MS (1/2N) +۰/۳ BA + ۰ kin +۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۱۰/۱۱±۰/۰۵۶bc	۲/۹۱±۰/۰۱ a	۳/۳۷±۰/۰۴۶ a
T_2	MS (1/2N) +۰/۳ BA + ۰/۲ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۱۳/۸۱±۰/۰۳۷a	۲/۰۶±۰/۰۳۲ c	۳/۳۰±۰/۰۳۶ a
T_3	MS (1/2N) +۰/۵ BA + ۰ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۱۰/۷۸±۰/۰۴ bc	۲/۴۶±۰/۰۱۳ b	۲/۹۴±۰/۰۵۸ a
T_4	MS (1/2N) +۰/۵ BA + ۰/۲ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۱۱/۴۲±۰/۰۸۴ab	۱/۹۵± ۰/۰۱۲c	۳/۰۶±۰/۰۷۷ a
T_5	WPM+ ۰/۳ BA + ۰ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۵/۷۶±۰/۰۹۷ c	۱/۴۱±۰/۰۳ d	۳/۳۸±۰/۰۶۳ a
T_6	WPM+ ۰/۳ BA + ۰/۲ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۸/۸۹±۰/۰۲۲ c	۱/۳۰±۰/۰۲۶ d	۳/۰۲±۰/۰۲۲ a
T_7	WPM +۰/۵ BA + ۰ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۶/۵۵±۰/۰۳d	۱/۳۴±۰/۰۰۵ d	۲/۷۵±۰/۰۷۷ a
T_8	WPM +۰/۵ BA + ۰/۲ kin+۰/۱ GA_3 + ۰/۰۱ IBA	۸/۷۲±۰/۰۲۵c	۱/۳۲±۰/۰۰۷ d	۳/۴۶± ۰/۰۸۲a

حروف مشابه به معنی عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج ریشه‌زایی: قبل از تجزیه واریانس صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از جذر ریشه دوم انجام شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۶) بیان می‌کند که اثر تیمارهای مختلف اکسین بر صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

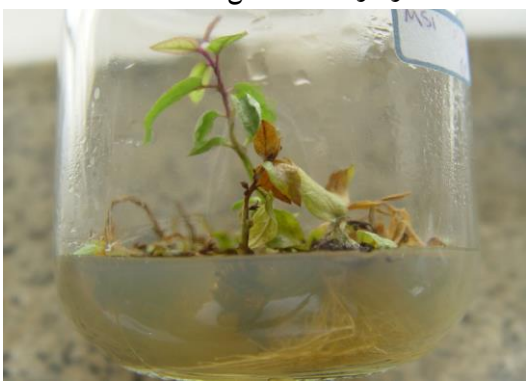
جدول ۶- تجزیه واریانس صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه گونه *E. citriodora* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS	
		تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار	تعداد ریشه
تیمار	۸	۰/۰۸۴**	۰/۱۹**
خطا	۱۸	۰/۰۰۹	۰/۰۲
ضریب تغییرات		۸/۹	۱۱/۷۳

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

در مقایسه میانگین‌های تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه عامل تیمار تلفیقی هورمون IBA+IAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار هورمونی NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر ترکیب‌های هورمونی مؤثرتر بودند. از نظر تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه تشکیل شده، تیمار NAA و تیمار تلفیقی هورمون اکسین IBA+IAA را می‌توان به‌عنوان تیمار هورمونی بهینه برای ریشه‌زایی توصیه نمود. در مقایسه بین تیمارها برای صفت طول ریشه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و از آوردن آن در جدول صرف‌نظر گردید (جدول ۷) (شکل ۳).

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گونه *E. citriodora* در شرایط گلخانه سازگار شدند (شکل ۴).



شکل ۳- ریشه‌زایی گونه *E. citriodora*

جدول ۷- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ریشه‌زایی بر شاخص‌های تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه گونه *E. citriodora* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

تیمار اکسین (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار	تعداد ریشه
IBA:۰/۵	۰/۱۳ ±۱/۹۳ ab	۲/۸ ±۰/۴ bc
IAA:۰/۵	۱/۰۶ ±۰/۰۶۳ bc	۲/۴۶ ±۰/۲۹ c
NAA:۰/۵	۲/۰۶ ±۰/۲۹ab	۷/۱۱ ±۰/۹۹ a
IBA:۱	۲/۰۰ ±۰ab	۶/۱۱ ±۱/۱۱ ab
IAA:۱	۱/۶۶ ±۰/۳۳ab	۴/۰۰ ±۱/۰۰۱ abc
NAA:۱	۲/۳۷ ±۰/۶۲a	۷/۶۶ ±۱/۵۳۹ a
NAA+ IBA:۰/۵+۰/۵	۰/۶۷ ±۰/۲۶ cd	۲/۳۳ ±۱/۳۳ cd
NAA+ IAA:۰/۵+۰/۵	۰/۳۳ ±۰/۶۶ d	۰/۸ ±۰/۲۰۰۲ d
IBA+ IAA:۰/۵ +۰/۵	۲/۲۶ ±۰/۶۷ a	۸/۷۳ ±۳/۱۳۷ a

حروف مشابه به معنی عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۴- سازگاری گونه *E. citriodora* در گلخانه

بحث

استفاده از آب جاری در کاهش آلودگی سطحی و ترشحات فنلی بذرهای *E. citriodora* تأثیر مثبتی داشت. نتایج مشابهی در مورد بذرهای اکالیپتوس (Hartney and Barker, 1980) و جوانه‌های پایه بالغ درخت تا *Celtis caucasica* (Dadvar, *et al*, 2013) گزارش گردید. کاربرد محلول هیپوکلریت سدیم تأثیری قوی بر حذف آلودگی‌ها دارد ولی در غلظت‌های زیاد باعث از بین رفتن و سوختگی ریزنمونه‌ها شده و به‌نظر می‌رسد استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم در مدت زمان طولانی برای بذرهای ریز اکالیپتوس که دارای پوسته‌ای نسبتاً سخت می‌باشند، مناسب‌تر است. نتایج این پژوهش با نتایج سایر پژوهشگران در بکارگیری محلول هیپوکلریت سدیم به‌منظور سترون‌سازی بذرهای گل‌محمدی (Abravesh *et al*, 2012) و بذرهای اکالیپتوس (Akbari *et al*, 2007) همسویی دارد. براساس نتایج این پژوهش مشخص شد که بین محیط‌های کشت MS و WPM از نظر شاخص‌های رشدی میانگین ضریب ازدیاد و رشد طولی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در تحقیقات انجام شده توسط Bonga & Aderkas (1992) و Naraghi (2003) یکی از عوامل تعیین‌کننده کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن می‌باشد. مقدار یون نیتروژن، کلر و روی در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت WPM است. این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه نقش مهمی دارند و سبب کنترل pH و تحریک اندام‌زایی (Kirby *et al*, 1987 و Naraghi, 2003)، شادابی و ضریب ازدیاد شاخه‌ها می‌شوند، در فتوسنتز و حفظ فشار تورژسانس در هنگام خروج پتاسیم از سلول‌ها و بیوسنتز کلروفیل و افزایش رشد میانگره‌ها نقش دارند. بنابراین به‌نظر می‌رسد غلظت مواد در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) به مقدار بهینه مورد نیاز برای گونه *E. citriodora* نزدیکتر باشد، این مسئله می‌تواند دلیل برتری محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM در این تحقیق باشد. در مورد شاخه‌های کیکم Emam (2007) و در مورد *E. occidentalis* Abravesh (2013) به نتایج مشابهی دست یافتند. اثرهای تغییر محیط کشت MS بر روی تکثیر شاخه گونه *E. citriodora* مورد بررسی قرار گرفت (Grewal *et al*, 1980). هنگامی که غلظت املاح نیترات آمونیم و نیترات پتاسیم به نصف تقلیل یافت، ضریب تکثیر دو برابر افزایش یافت. ولی افزایش دو برابری این نمک‌ها اثرهای مثبتی بر ضریب تکثیر نداشت. شاخه‌های گونه نوعی رز *R. multiflora* در محیط WPM رشد می‌کند ولی نسبت به محیط کشت MS از نمو کمتری برخوردار است (Van der Salm, 1994). نتایج گزارش شده توسط Emam (2007) و Grewal و همکاران (1980) دلالت بر این دارد که رشد سریع شاخه‌ها وابسته به غلظت نیترات است.

از بین تیمارهای شاخه‌زایی اعمال شده در محیط کشت MS دارای سیتوکینین (BAP در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ترکیب هورمونی IBA، GA_3 و kin در BAP در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، صفر و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب بهترین تیمار هورمونی برای شاخص ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه بودند. بسیاری از پژوهشگران از سیتوکینین BAP، به‌عنوان بهترین تیمار هورمونی برای ضریب ازدیاد شاخساره استفاده کرده‌اند. به‌عنوان مثال Assareh و همکاران (2007) تیمار تلفیقی BAP (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و kin (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) را بهترین تیمار شاخه‌زایی برای *E. gongylocarpa* Blakely اعلام نمودند. Bennet (1992) بیان کرد که طول شاخه در *E.*

www.SID.ir

Archive of SID

globulus Labill در محیط دارای کینتین طویل‌تر بوده و برگ‌ها شاداب‌تر بر روی ساقه باقی ماندند، اما تکثیر شاخه آن به نسبت کم بوده است. بنابراین اثر سیتوکینین BAP به‌طور جداگانه و به‌صورت تلفیقی در رشد طولی شاخه و تکثیر شاخه با توجه به غلظت به‌کاررفته، متفاوت است. کاربرد تلفیقی هورمون‌ها در ازدیاد شاخه‌ها توسط محققان دیگر در مورد *E. gongylocarpa* (Akbari *et al*, 2007) و در مورد *E. tereticornis* (Lakshmi- Sita, 1993) گزارش شده است. شاخه‌های *E. globulus* کشت شده در محیط کشت تکثیر حاوی ترکیب تلفیقی BAP و Kin رشد بهتری را نسبت به شاخه‌های کشت شده در دو محیط کشت حاوی BAP و محیط کشت حاوی Kin به‌طور جداگانه نشان داده‌اند (Assareh & Sardabi, 2008). در این تحقیق، شاخه‌ها در محیط کشت BAP دارای برگ‌های قرمزی بودند که روی ساقه پایدار نبودند. جوانه‌های جدید از شاخه‌ها خارج شدند اما رشد آنها به آرامی انجام شد، در حالی که شاخه‌های محیط کشت حاوی Kin طویل‌تر و رنگ برگ‌های آنها سبز بود و در روی شاخه باقی ماندند، اما ضریب تکثیر شاخه‌ها در مقایسه با محیط کشت حاوی BAP کمتر بود. محیط کشت حاوی BAP و Kin از نظر تکثیر شاخه‌زایی بهتر از محیط کشت حاوی BAP بدون Kin بود. در محیط کشت حاوی BAP و Kin برگ‌های پایینی آن از حد طبیعی بزرگتر شده و رنگ آنها متمایل به قرمز بود که با نتایج Assareh & Sardabi (2008) همسویی دارد (شکل ۲).

ریشه عامل مهمی در جذب آب و مواد غذایی است که در رشد بعدی گیاهک اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش به‌منظور ریشه‌دار نمودن گیاهچه‌های گونه *E. citriodora* آزمایش‌های متعددی انجام شد. درصد ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف، از صفر تا ۳۰ درصد متفاوت بود. در برخی از تیمارها و محیط‌های کشت مشاهده شد که با ریشه‌دار شدن گیاهچه نوک جوانه انتهایی قهوه‌ای شد و اندام هوایی به‌تدریج شروع به نکروزگی نموده و از بین رفت. در برخی تیمارها ریشه‌ها به‌صورت کوتاه و منشعب بودند. از سویی با انتقال این گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک سترون و در زیر سرپوش پلاستیکی گیاهچه‌ها زنده‌مانی نداشته و از بین رفتند. بررسی شاخه‌های انتقال یافته از محیط فاقد هورمون به محیط‌های ریشه‌زایی نشان می‌دهد که تیمار هورمونی NAA و تیمار هورمونی تلفیقی IBA + IAA سبب افزایش و تیمار هورمونی تلفیقی NAA +IAA سبب کاهش تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار گردید. از سویی تیمار هورمونی تلفیقی IBA+IAA سبب افزایش تعداد ریشه شد. بنابراین اکسین‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت اثر یکسانی روی تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه نداشتند، در حالی که بر روی رشد طولی ریشه تأثیر یکسانی داشتند. بنابراین نوع و غلظت تیمارهای اکسینی در رشد طولی ریشه تأثیری نداشت.

در تحقیقی مشابه Assareh و همکاران (2007) بهترین تیمار ریشه‌زایی گونه *E. gongylocarpa* را هورمون IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اعلام کردند. سایر پژوهشگران بهترین ریشه‌زایی را برای گونه *E. citriodora* در محیط کشت تغییر یافته MS (۰/۲ غلظت) حاوی IBA ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند (Koriesh *et al*, 2002). در مورد*Eucalyptus phylacis* بهترین تیمار ریشه‌زایی را هورمون IBA با غلظت ۵µM (Bunn, 2005a) و در تحقیق دیگری IBA و NAA به‌ترتیب با غلظت ۵µM و۰/۵ µM را بهترین تیمار ریشه‌زایی (Bunn, 2005b) اعلام نمودند. استفاده از سیتوکینین BAP یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باززایی مورینگا (MS کامل) و بعد استفاده از NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منجر به بهبود ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از کالوس شد (Asadi-Corom *et al*, 2013).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش نشان داد که محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) در مقایسه با محیط کشت WPM محیط مناسبتری بود. همچنین به‌کارگیری هورمون سیتوکینین BAP با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

برای شاخه‌زایی و تیمارهای هورمونی اکسین IAA+IBA به‌طور تلفیقی و NAA به‌صورت جداگانه به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی مناسب‌ترین تیمارها برای گونه *E. citriodora* می‌باشند.

منابع مورد استفاده

- Abravesh, z., Assareh, M.H., Tabaei-Aghdaei, S. R., 2012. Effect of Thermal Period on Seed Dormancy of *Rosa damascena* Mill. Journal of Medicinal Plants and By-products 1: 55-59.
- Akbari Khabbaz, M., Ghamari Zare, A., Emam, M., Assareh, M.H., Ghorbanli, M., 2007. Micropropagation of *Eucalyptus gongylocarpa*, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 142-158 (In Persian).
- Asadi-Corom, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Emam, M., Bakhshi-Khaniki, G.R., 2013. Responding populations of *Moringa peregrina* (Forssk). Fiori to different culture media in callus and regeneration production, Forest and Wood Products, Journal of Natural Resources of Iran, 66 (2): 167-176 (In Persian).
- Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus* spp. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 3: 11-32 (In Persian).
- Assareh, M.H., Ghorbanli, M. Akbari, M., Ghamari Zare, A. and Emam, M., 2007. Micropropagation, organogenesis and using new method of semiphotoautotrophic in *Eucalyptus gongylocarpa*, Pajouhesh- va- Sazandegi in Natural Resources, 75: 134-145 (In Persian).
- Assareh, M.H & Sardabi., 2008. *Eucalyptus* (Description, Illustration & Propagation by Advanced Techniques), Volume 1, Publication of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran 672 P. (In Persian).
- Bennet, I.J., McComb, J.A., Tonkin, CM. and McDavid, D.A.J., 1992. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of Eucalyptus globules and other Eucalyptus species. In: Proceedings of conference on mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species, France. Association FOrêt-CELlulose (AFOCEL). PP. 195-201.
- Bonga, J.M. & Aderkas, P.V. 1992. In vitro Culture of trees. Kluwer Academic Publishers, 236 pp.
- Bunn E., Senaratna, T., Sivastihamparam, K. and Dixon, K., 2005a. In vitro propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Jhnson and K. Hill., A critically endangered relict from Western Australia. In vitro Cellular and Development Biology-Plant, 41: 812-815.
- Bunn E., 2005b. 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.
- Dadvar, F., Rostami, Shahraji, T., Assareh, M. H., Emam, M. and Shirvany, A., 2013. Effects of different concentrations of plantsregulators on *In vitro* micropropagation of *Celtis caucasica* Willd Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21; 13-23 (In Persian).
- De Bergh, PC., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiology plant, 59: 270- 276.
- Driver, J., and Kuniyuki, A.1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509.
- Emam, M., Assareh, M.H., Shahrzad, Sh., Khojir, k., 2007. Asexual regeneration of two species of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* by tissue culture, Final report, Research Institute of Forests and rangelands, Tehran, Iran 45p (In Persian).
- Fallahi, M., Heidari, A., Moharamipour, S., Imani, S., Maroof, A., 2013. Fumigation hexane extract three Eucalyptus species (*Eucalyptus microtheca*, *E. globules* and *E. camaldulensis*) on Saw Toothed *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) Journal of Plant Protection, 5 (1): 45-55.
- Grewal, S. Ahuja, A. and Atal, C.K., 1980. Clonal multiplication of medicinal plants by tissue culture. *in vitro* proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora*. Hook. Indian Journal of Experimental Biology, 18:775-776.
- Gupta, P.K., Mascarenhas, 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 Letters 20: 195-201.
- Gupta, P.K., Mehta, U.J., and Mascarenhas, A.F., 1983. A tissue culture method for rapid propagation of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. torreliana* from mature trees. Plant Cell Reports, 2: 296-299.
- Gupta, P.K. and Mascarenhas, A.F., 1987. *Eucalyptus*. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (Eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3. Martinus Nijhoff, Dordrecht/ Boston/ Lancaster, 416p.
- Hartney, V.J., and Barker, P.K., 1980. Vegetative propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. IUFRO Symposium and Workshop on Genetic Improvement

www.SID.ir

Archive of SID

Rapid multiplication of *Eucalyptus* by multiple shoot production. Curr. Sci., 48: 350-352.
– Mascarenhas, A.F. Hazara, S., Potdar, U., Kulkarni, D.K. and Gupta, P.K., 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In: Fujiwara, A. (Ed.). Plant Tissue Culture, 1982.Proc 5th Int. Cong Plant Tissue Cell Cult, Tokyo, Japan, PP. 719-720.
– Murashige, T. and F. Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
– Najafi Ashtiani.A, Assareh. M.H, Baghestani. M.A and Angaji S.J., 2008. The Effects of methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh on Growth and germination rates of Chenopodium album L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 24: 293-303 (In Persian).
– Naraghi. T. S., 2003. *In vitro* propagation of *Taxus baccata* through shoot tip cultures, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research., 11: 309-325 (In Persian).
– Rad, M.H, Assareh, M.H., Meshkat, M.A., Dashtegian, K., and Soltani, M., 2010. Water requirement and production function of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) in arid environment. Iranian Journal of Forest, 2(1): 61-71 (In Persian).
– Sardabi, H., Rahmani, A., Hamze, B., Assareh, M.H. and Ghorany, M., 2010, Impact of different Eucalypt species on forest soil properties in Guilan provinc, Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 18: 116-131 (In Persian).
– Souza, L.S., E.D. Velini, R.C.S. Maiomoni-Rodella., 2003. Allelopathic effect of weeds and concentrations of *Brachiaria decumbens* on the initial development of eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). Journal of Applied Sciences. 21: 525-902.
– Van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., and Hanisch ten Cate C. H., 1994. Importannce of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L 'Moneyway. Plant Cell Tissue and Organ Culture., 37: 73-77.
and Production of Fast Growing Tree Species. Sao Paulo. Brazil. PP 791-793.
– Hartney, V.J., 1981. Vegetative propagation of the Eucalyptus in vitro. In: Proc IUFRO Sects., 2015. Int. Workshop, In Vitro, Cultivation For Tree Species, Fontainebleau, France, Association FOrêt-CELlulose (AFOCEL). PP. 175-180.
– Hosseinzadeh, J., Sardabi, H., Zarin-kaviani. 2017. Comparison of the growth of industrial Eucalyptus species and cultivars in tropical region of Mehran, Forest and Wood Products, 70 (1) :83-9.
– Jawanshir, K., Mossadegh, A., 1973. Eucalyptus, Tehran University Press, 434 p, (In Persian).
– Jacquiot, C., 1964. Application de la technique de culture des tissue vegetaux a Letude de quelques problemes de physiology de Labre. Ann. Sci. for. 21: 310-473.
– Kamalpour, S., Motesharezadeh, B., Alikhani, H.A. and Zarei, M. 2014. Effects of some biotic factors in lead phytoremediation and phosphorous uptake by Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*). Iranian Journal of Forest, 5(4): 457- 470.
– Karami, O, Jafarzadeh, A.K., Calbi, S, and Jalilvand, H., 2007. Study Eucalyptus cultivation and Its role in preventing the destruction of forests, The 2nd Regional Conference on Natural Resources and the Environment, Islamic Azad University of Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran (In Persian).
– Keneshloo. H., Eghtesadi. A., 2011. The effect of afforestation in reduction oil pollution (heavy metals), Journal of Natural Environment, Iranian Journal of Natural Resources, 64: 185-197 (In Persian).
– Kirby, E, G., T, Leustek. And M. S. Lee., 1987. Nitrogen nutrition. In: Bonga, J. M. and D. J. Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 1, General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. PP. 67-88.
– Koriesh, E.M., Abd El-Fattah, Y.M., El-Dayem, M.A., El-Etriby, M.A., 2002. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus citriodora*, Acta Horticulture, 625:283–288
– Lakshmi Sita, G. and Vaidyanathan, C.S., 1979.

www.SID.ir

Archive of SID

Micropropagation of *Eucalyptus citriodora* H.

Z. Abravesh[1], M.H. Assareh[2],M. Emam[3]

1 MSc, Expert of Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. *Corresponding author: E-mail: abravesh@rifr-ac.ir
2- Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran
3- Assistant professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

Received: 30.12.2017 Accepted: 10.09.2018

Abstract

Among species of hardwood forest trees, *Eucalyptus citriodora* is a fast growing plant that is cultivated for aromatic essential oils in perfumes, pharmaceuticals, and its soft and light wood in the paper and furniture industry. The micropropagation of *E. citriodora* Lemon-scented Gum was carried out in two medium culture of MS (1/2N) and WPM through bud culture. Sterilization was done using solutions of mercuric chloride 0.1% and sodium hypochlorite 20%. Shoot multiplication was done with cytokinin (BAP, Kin), auxin (IBA) and gibberellin (GA_3) hormones and rooting with auxin hormones IBA, NAA and IAA in only MS (1/2N) medium. The shoot multiplication was assessed in two medium using factorial experiment based on the completely randomized design (CRD) and rooting multiplication in one medium using CRD. Propagation coefficient, shoot length, greenity, total root and rooted seedlings were measured. The best sterilization was immersion seeds in 20 % sodium hypoclorite solution in 18 min. The best propagation and shoot elongation was obtained in MS (1/2N) medium coupled with BAP, Kin, GA_3 cytokinin hormones and auxin hormones IBA in 0.3, 0.2, 0.1, 0.01 mgl^{-1} and 0.3, 0, 0.1, 0.01 mgl^{-1}concentrations respectively by 200 mgl^{-1} P.V.P. The best rooting treatments were a modified MS (1/2N) medium, auxin hormone NAA and IBA+IAA in 1 mgl^{-1}, 0.5mgl^{-1}. These plantlets transferred to soil and were kept in the greenhouse conditions. The results of this study show that tissue culture is a suitable method for the propagation of this valuable species in a short time.

Key words*:* *In vitro*, Culture medium, *Eucalyptus citriodora*, MS and WPM.

www.SID.ir