DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijfpr.2014.4735

فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۱ شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۵۹۳-۵۸۱، (۱۳۹۲)

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

عباس قمری زارع[۱]، منصوره صداقتی[۲*]، میترا امام[۳]، محمدحسن عصاره[٤] و خدیجه کیارستمی[٥]

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

۲*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران. پست‌الکترونیک: sedaghati2012@gmail.com

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

٤- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

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

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۸

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 Kin (kinetin)، BAP (Benzylamino purine)، 2ip (2-Isopentyladenine)، IBA (Indole-3-acetic acid)، NAA (Naphtalen Acetic Acid) و TDZ (Tidiazorun) با غلظت‌های متفاوت در شرایط استریل درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از یک ماه شاخص‌های رشد ازجمله تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد جوانه و سبزینگی ثبت گردید و بهترین تیمار هورمونی شاخه‌زایی، تیمار mgl^{-1} ۰/۵ 2iP، mgl^{-1} ۰/۳ BAP، mgl^{-1} ۰/۰۱ IBA که در تعداد شاخه (با میانگین ٤/٦۳)، طول شاخه (با میانگین ۲/۷۳ سانتی‌متر) و میزان سبزینگی (با میانگین۳/۷۵) مشاهده شد. مرحله ریشه‌زایی بعد از دو ماه و شاخص‌های مورد نظر ازجمله تعداد ریشه و طول ریشه ثبت گردید و تیمار تلفیقی mgl^{-1} ۰/۵ IBA و mgl^{-1} ۰/۵ NAA 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

جنس اکالیپتوس (*Eucalyptus*) متعلق به خانواده‌ی Myrtaceae بوده و مرکز گسترش آن استرالیاست (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 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 فرّار، عسل، تولید مواد

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 اندام‌زایی استفاده کردند. همچنین باززایی گیاه از درختان بالغ برای گونه‌های *E. nitens* و *E. grandis* (Furze & Cresswell, 1985)، *E. citriodora* (Manders *et al.*, 1994)، *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 اتانول۷۰٪ 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 ۰/۱٪ در زمان‌های مختلف استفاده شد. در زمان‌های مختلف نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر ۲ بار تقطیر شستشو داده شدند (جدول۱- شکل۱). 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

ریزنمونه‌ها در زیر هود با شرایط استریل به محیط کشت‌هایی با تیمارهای مختلف هورمونی منتقل شده (جدول۲)، سپس در اتاق رشد (۱۶ ساعت نور با شدت ۵۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ سانتی‌گراد روز- ۱۹ سانتی‌گراد شب) به مدت یک ماه نگهداری شدند. در هر تیمار ٤ تکرار و هر تکرار ٤ نمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار داده شد. سپس شاخص‌های رشد ازجمله: تعداد شاخه، تعداد جوانه، رشد طولی شاخه و میزان سبزینگی برگ‌ها ثبت گردید. میزان سبزینگی بین ٤-۰ کدگذاری شده که صفر نشانگر خشکی و نکروزگی کامل برگ‌ها و ٤ نمایانگر رنگ سبز و شادابی برگ‌ها بود. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS به روش ANOVA آنالیز و میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند.

شاخه‌های تولید شده در مرحله پرآوری به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر به‌منظور ارزیابی ریشه‌زایی به محیط القاء ریشه انتقال یافتند. تیمارهای به کار رفته در جدول۳ ارائه شده است. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در سه تیمار با ۹ تکرار که هر تکرار دارای ٤ 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 ازجمله 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.

جدول۱- فصول و مدت زمان‌های سترون‌سازی نمونه‌های پایه بالغ در محلول کلرید جیوه

فصل	زمان (دقیقه)
بهار	۵-۳-۱
تابستان	۷-۵-۳
پاییز	۱۰-۸-٦-٤
زمستان	۱۰-۸-٤

شکل۱- ریزنمونه‌های سترون‌شده پایه بالغ مورد استفاده در ریزازدیادی

جدول۲- تیمارهای مختلف شاخه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه بالغ

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

+: وجود هورمون، −: فقدان هورمون

جدول۳- تیمارهای مختلف ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه بالغ

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

+ : وجود هورمون، − : فقدان هورمون

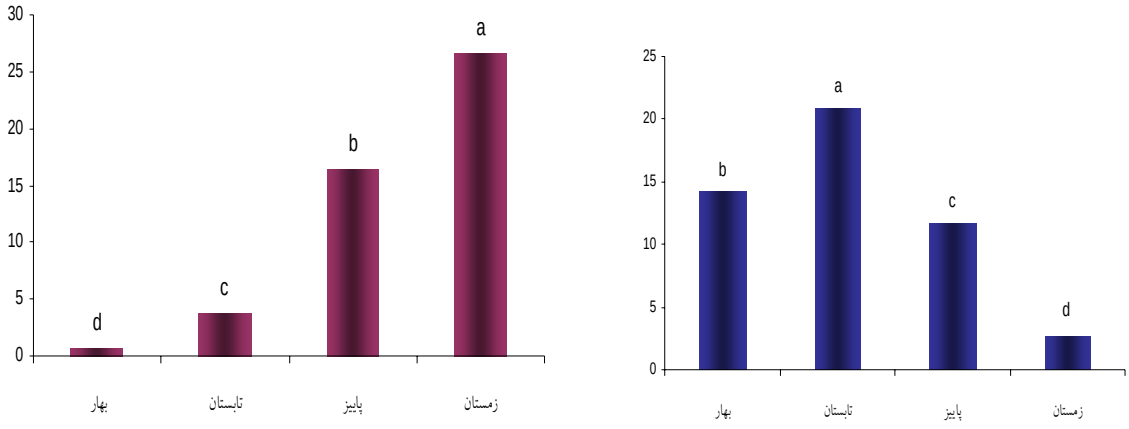
نتایج

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 به‌دست آمد. در بین فصل‌های مختلف سال، نمونه‌های برداشت شده در فصل تابستان با بالاترین درصد زنده‌مانی (۲۰/۸۵٪) و بهار با کمترین میزان آلودگی (۰/٦۲٪)، بهترین فصول برای ریزازدیادی شناسایی گردید که با سایر فصول اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل۲). 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 جدول٤ ارائه شده است.

جدول٤- 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*	٥٦/٤	۱/۸۲
	۳	۲٥/۹	۳/٤٥
	٥	۳٤/٦	۳/۸٥
تابستان	۳	۲۰	۲/٥
	٥*	۲۱/٤۳	۰
	۷	۲۱/۱	۲/٦
پاییز	٤	۱۱/۷	۱٥
	٦	۱۱/۷	۱۸/۳
	۸*	۱٥	۱۱/۷
	۱۰	٦/۲٥	۱٥/٦
زمستان	٤*	۱۰	۲۳/۳
	۸	۰	۳۰
	۱۰	۳/۸	۰
	۱۲	۲/۲	۱۳/۳
	۱٥	۰	٥/۹

*: تیمار بهتر در هر فصل



ب الف

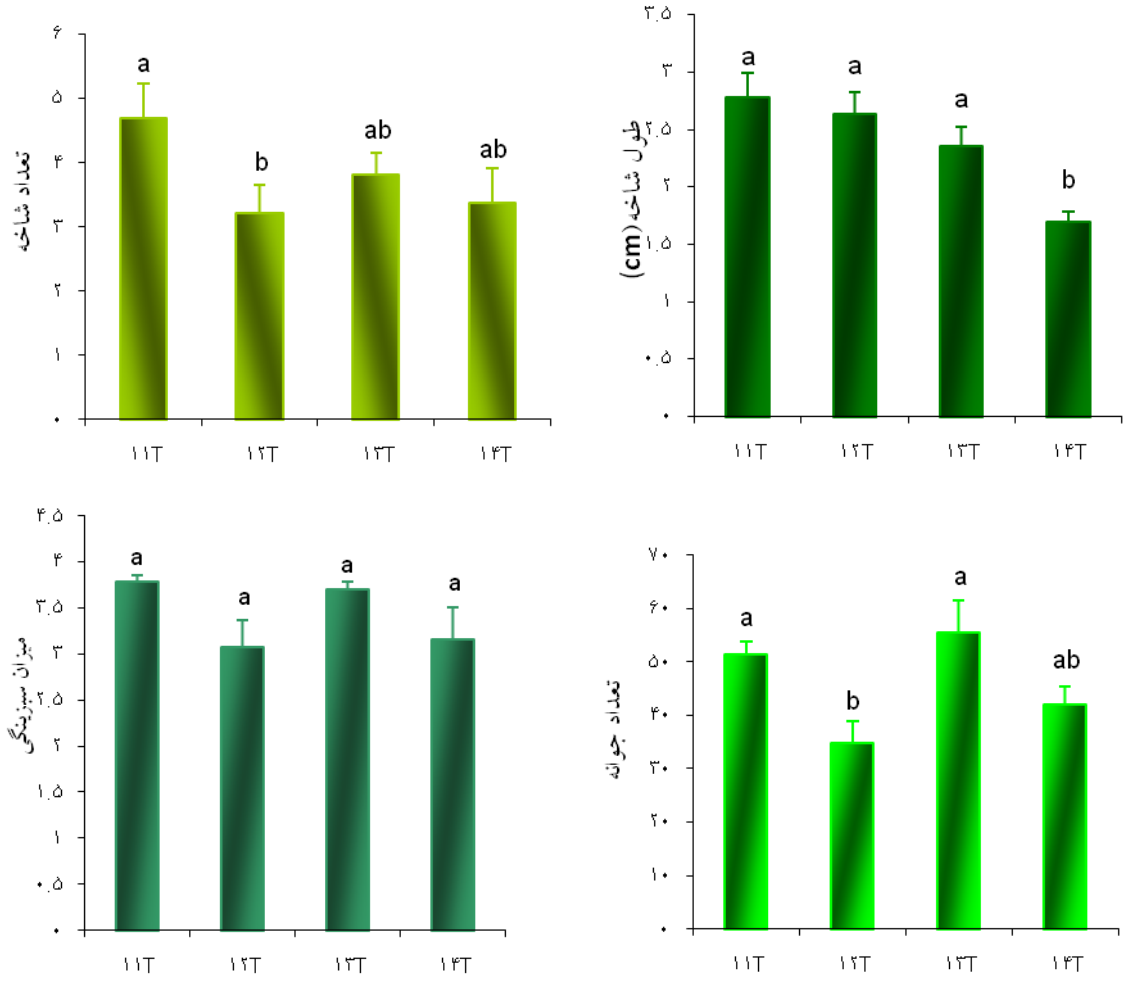
شکل۲- مقایسه میانگین اثر فصول بر سترون‌سازی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ: الف) درصد زنده‌مانی ب) درصد آلودگی (بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

به‌منظور ریزازدیادی ریزنمونه‌های (جوانه‌های جانبی) پایه بالغ، تیمار mgl^{-1} BAP۰/۵، mgl^{-1} ۰/۰۱ IBA (T14) با کمترین طول شاخه (با میانگین ۱/۷ سانتی‌متر) با سایر تیمارها تفاوت آماری داشت. تیمار mgl^{-1} ۰/۳BAP، mgl^{-1} ۰/۵2ip، mgl^{-1} ۰/۰۱IBA (T11) در تعداد شاخه (با میانگین ٤/٦۹) با T12، طول شاخه (با میانگین ۲/۷۸ سانتی‌متر) با T14، تعداد جوانه (با میانگین ۳٤/۷) 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 mgl^{-1} ۰/۵BAP، mgl^{-1} ۰/۲kin، mgl^{-1} ۰/۰۱IBA (T13) بهتر بود و با تیمار mgl^{-1} ۰/۱BAP، mgl^{-1} ۰/۲kin، mgl^{-1} ۰/۰۱IBA (T12) تفاوت آماری داشت. وجود 2ip در کنار BAP پاسخ مناسبی ارائه داد، ولی استفاده از BAP به تنهایی مناسب نبود (جدول۵، شکل۳ 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 mgl^{-1} ۰/۵IBA و mgl^{-1} ۰/۵ NAA در تعداد ریشه (با میانگین ۰/٦۲۲) با سایر تیمارها تفاوت آماری داشته ولی در طول ریشه (با میانگین ۰/۱۹۳ سانتی‌متر) با تیمار T22 تفاوت آماری داشته است (جدول٦، شکل۵-ج). سپس نمونه‌های ریشه‌دار شده به گلخانه منتقل گردیدند و مراحل سازگاری را طی کردند (شکل٦).

جدول۵- تجزیه واریانس اثر سیتوکینین‌های مختلف در ریزازدیادی نمونه‌های حاصل از پایه بالغ *E. maculata* بر شاخص‌های رشد

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	Pr>F
اثر هورمون بر تعداد شاخه	۳	۱/٤	۰/۸۸	۰/٤۸۹
اثر هورمون بر طول شاخه	۳	۰/۸٤	۵/۵۱	۰/۰۲
اثر هورمون بر تعداد جوانه	۳	۳۸۰	۳/۰۹	۰/۰۸۲
اثر هورمون بر میزان سبزینگی	۳	۰/۲۲۳	۰/۸۹	۰/٤۸۲٤
خطای آزمایش تعداد شاخه	۹	۱٤/۱	-	-
خطای آزمایش طول شاخه	۹	۰/۱۵۲	-	-
خطای آزمایش تعداد جوانه	۹	۱۲۳	-	-
خطای آزمایش میزان سبزینگی	۹	۲/۲٤	-	-

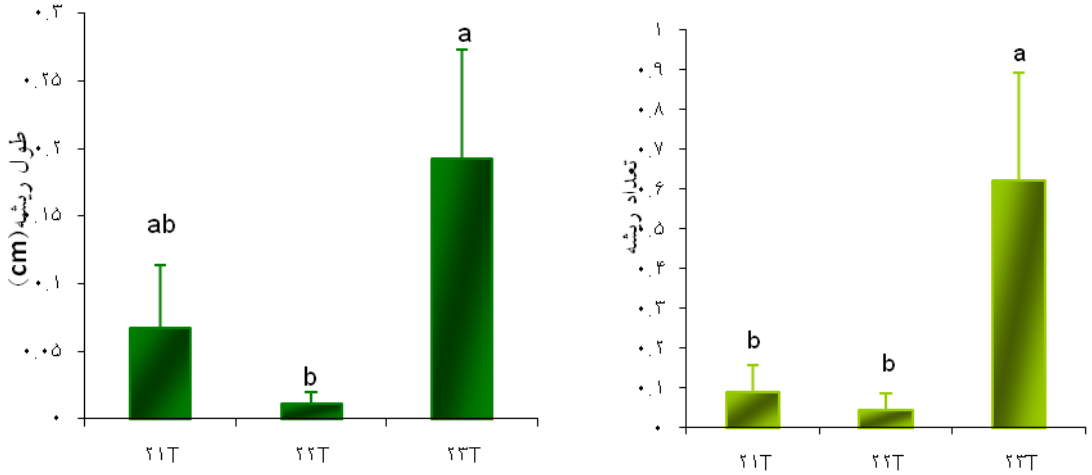


شکل۳- مقایسه میانگین اثر سیتوکینین‌های مختلف بر شاخه‌ایی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ بـر شـاخص‌هـای رشـد (بـر اسـاس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

{T11: (BAP(۰/۳ mgl^{-1})، 2ip (۰/۵mgl^{-1})، IBA(۰/۰۱mgl^{-1})، T12: BAP(۰/۱ mgl^{-1})، kin (۰/۲mgl^{-1})، IBA(۰/۰۱ mgl^{-1}) T13: BAP (۰/۵mgl^{-1})، 2ip (۰/۵mgl^{-1})، IBA(۰/۰۱mgl^{1}) T14: BAP (۰/۵ mgl^{-1})، IBA(۰/۰۱mgl^{1})}.

جدول٦- 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	۰/۰٤٤۱
هورمون بر طول ریشه اصلی	۲	۰/۰۷۹	۲/٦	۰/۱۰٥٦
خطای آزمایش تعداد ریشه اصلی	۱٦	۰/۲٤	-	-
خطای آزمایش طول ریشه اصلی	۱٦	۰/۰۳	-	-



شکل٤- مقایسه میانگین اثر سیتوکینین‌های مختلف بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از پایه بالغ بر شاخص‌های رشد (بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن).

{T21: (۱mgl^{-1}) IBA، T22: بدون هورمون، T23: (۰/٥mgl^{-1})IBA،(۰/٥ mgl^{-1}) NAA}.

شکل٦- الف) گیاهان قبل از سازگاری،

ب) گیاهان کشت بافتی به روش مرسوم بعد از سازگاری

بحث

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 ۰/۱٪ HgCl2 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 ۰/۱٪ 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 ۰/۱٪ 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 ۲iP ۰/۵ mgl^{-1}، BAP ۰/۳ mgl^{-1}، IBA ۰/۰۱ mgl^{-1} بود. همچنین اثر مثبت کاربرد توأم سیتوکینین‌ها در افزایش رشد طولی شاخه توسط محققان دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته است، ازجمله Lakshmi-Sita (1993) که با تلفیق BAP ۰/۱ mgl^{-1} و Kin ۰/۵ mgl^{-1} 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 Kin ۰/۵۳۸ mgl^{-1} و BAP ۰/۰۵۶۳ mgl^{-1} بر روی *E. impensa* مشاهده شد (Bunn, 2005).

Cortezzi & Mendes (1989) در *E. globulus* بهترین تکثیر شاخه را در BAP ۰/۵ mgl^{-1} و IBA ۰/۰۱ mgl^{-1} مشاهده نمودند. Koriesh *et al.* (2002) نیز بهترین شاخه‌زایی روی *E. citriodora* را در محیط کشت MS حاوی BAP ۰/۵ mgl^{-1} به‌دست آوردند. Assareh *et al.* (2006) بهترین تیمار شاخه‌زایی در *E. camadulensis* و *E. microcarpa* را TDZ ۰/۰۱ mgl^{-1} و NAA ۰/۵ mgl^{-1} و تیمار 2iP ۰/۵mgl^{-1}، BAP۰/۱mgl^{-1} و IBA ۰/۰۱mgl^{-1} را در *E. melliodora* معرفی نمودند. Assareh *et al.* (2007) نیز تیمار Kin ۰/۲ mgl^{-1}، BAP ۰/۱ mgl^{-1} و GA_3 ۰/۲۵mgl^{-1} 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 ۰/۳ mgl^{-1} آن در کنار 2ip ۰/۵ mgl^{-1} در شاخص‌های رشد پاسخ بهتری داده است (شکل٤ تیمار T11).

کینتین 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

BAP و Kin نیز برای شاخه‌زایی پایه بالغ این گونه ترکیب مناسبی است. ولی استفاده از ۲iP ۰/۵mgl^{-1} و BAP ۰/۳mgl^{-1} از همه بهتر بود.

در ریزازدیادی *E. maculata*، شاخه‌زایی بسیار آهسته انجام شد.Bunn (2005) 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 درLabill *E. globulus* در محیط دارای کینتین طویلتر 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 آنجایی‌که هدف، تکثیر شاخه با سبزینگی و شادابی بهتر است، تیمار ۰/۵ mgl^{-1} 2iP، BAP۰/۳ mgl^{-1} و IBA۰/۰۱ mgl^{-1} برای تکثیر گونه *E. maculata* بهتر به نظر می‌رسد.

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

بهترین تیمار ریشه‌زایی، تیمار تلفیقی IBA ۰/۵mgl^{-1} و NAA ۰/۵ mgl^{-1} 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 IBA ۱ mgl^{-1} بوده است.

Bunn (2005) نیز در *E. impensa*، با استفاده از تیمار تلفیقیIBA و NAA، بهترین تیمار ریشه‌زایی راmgl^{-1} ۱/۰۱۶ IBA و ۰/۰۹۳۱ mgl^{-1} NAA معرفی کرد و در گونه *E. phylacis* L. Jhnson and K. Hill. تیمار هورمونی IBA ۱/۰۱۶ mgl^{-1} 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 Ahuja (1982) نیز در صنوبرهای بالغ Aspen در حضور NAA و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ 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 درون‌شیشه، ریشه‌زایی حتی زمانی‌که 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* بدست 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 Gupta *et al.* (1981) 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

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 زیست فناوری 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 camadulensis* 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. Semiphotoautotrophic micropropagation on three *Eucalyptus species*. 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. Silviculturae, 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, Is: Horticulturae, 393: 170-173.

Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V.K. and Uniyal, D., 2003. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F_1 hybrid (*Eucalyptus tereticornisSM* 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.

- 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 *Agrobacterum 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 forestry 1: Trees I. Berlin: Springer Verlag, 340-362.
- McLaughtin, 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.

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

A. Ghamari Zare[1], M. Sedaghati[2]*, M. Emam[3], M. H. Assareh[4] and KH. Kiarostami[5]

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 mgl^{-1}), BAP (0.3 mgl^{-1}) and 2ip (0.5 mgl^{-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 mgl^{-1}) plus IBA (0.5 mgl^{-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