دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۲۰۲-۱۹۲ (۱۳۹۴)

بررسی تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گونه *Eucalyptus occidentalis*

زهرا آبروش*[۱]، محمد حسن عصاره[۲]، میترا امام[۳] و عبدالرحمن مرید[۴]

۱* - نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

پست الکترونیک: z.abravesh@gmail.com

۲- استاد و عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۳- استادیار و عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۴- کارشناس باغ گیاه‌شناسی گرمسیری و نیمه گرمسیری دزفول

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۹

چکیده

گونه *Eucalyptus occidentalis* درختی سریع‌الرشد که به‌خاطر نوش و گرده‌اش برای تولید عسل، اسانس در صنعت داروسازی، تانن در صنعت چرم‌سازی و فیبرهای چوبی در صنعت کاغذسازی کشت می‌شود. در این تحقیق، ریزازدیادی گونه *E. occidentalis* به‌طریق کشت جوانه در محیط کشت MS و GD در آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. بهترین روش سترون‌سازی بذر، شستشو زیر آب جاری به‌مدت ۲ ساعت و سپس ۱۸ دقیقه در محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم بود. تکثیر مطلوب و رشد طولی شاخه این گونه در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های سیتوکینین BAP، GA_3 و اکسین IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، به‌همراه P.V.P در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. بهترین ریشه‌زایی در محیط MS محتوی نصف غلظت نیترات و IBA حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند. این بررسی نشان داد که با استفاده از تیمارهای مناسب در سیستم کشت بافت، می‌توان این گونه ارزشمند را در زمان کوتاهی تکثیر کرد.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس، ریزازدیادی، محیط‌کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد.

مقدمه

درختان اکالیپتوس بومی اقیانوسیه، به‌ویژه استرالیا هستند و در حدود ۲۰۰ سال است که در سایر مناطق دنیا نیز کشت می‌شوند. گونه‌های مختلف اکالیپتوس از جمله *Eucalyptus occidentalis* از گونه‌های مهم و سریع‌الرشد در احداث جنگل است که در مدت کوتاهی به‌میزان قابل توجهی چوب و سایر محصولات فرعی تولید می‌کند. از آن در جهت بهره‌برداری در صنایع چرم‌سازی، کاغذسازی و همچنین تولید نوش و گرده استفاده می‌کنند که ثروت عظیم و پر ارزشی در تولید عسل محسوب می‌شود. تکثیر غیرجنسی این گیاه با استفاده از روش‌های معمول پیوند و قلمه مشکلات بسیاری دارد (Assareh & Sardabi, 2008). تکثیر گیاه از طریق کشت بافت علاوه بر حفظ یکسری ویژگی‌های خاص، منجر به دستیابی به‌تعداد زیادی گیاه در

مدت زمانی کوتاه می‌شود. با توجه بـه اهمیـت تکثیـر غیـر جنسی از نقطـه نظـر مسـائل ژنتیکـی و بیوتکنولـوژیکی و همچنین به‌منظور غلبه بر نیاز روزافزون به چوب، سوخت و سایر اهداف صنعتی، ریزازدیادی آن از طریـق کشـت بافـت مورد توجه قرار گرفته اسـت کـه روش مناسـبی در جهـت تکثیر پایه‌های یکدست و یکنواخت این گونه می‌باشد.

نخستین کشـت‌هـای کالوسـی اکـالیپتوس درون شیشـه‌ای (*In vitro*) از بافت‌های دانه‌رست به‌دست آمده است (Heidari *et al*., 1996). در این زمینه Sussex (1965) توانسـت تولیـد کـالوس از کشـت سوسپانسـیون سـلولی را در مـورد *E. camaldulensis* انجـام. همینطـور Mortazavi (1989) تشکیل گیاهچه از طریق کشت بافت نوعی اکالیپتوس را مـورد بررسـی قـرار داد. در تحقیـق دیگـری Emam و همکـاران (۲۰۰۷) از کشـت جوانـه دو گونـه اکـالیپتوس *E. grandis* و *E. globulus* توانستند گیاهچه‌هایی به‌دست آوردند. همینطـور Nugent و همکاران (۲۰۰۱) از لپه و هیپوکوتیل دانه‌رست‌های *E. globulus* Labill و Rahim و همکاران (۲۰۰۳) از قطعات گرهی *E. camaldulensis* Dehn برای به‌دست آوردن کـالوس و اندام‌زایی استفاده کردند. ضمن اینکـه Assareh (2000) نیـز جنـین‌زایـی بـدنی روی دو گونـه *E. camaldulensis* و *E. sargentii* را مورد مطالعه قرار داده و توانست گیاهچه‌هایی را به‌دست آورد. گونه‌های الواری مهمی از ایـن جـنس، نظیـر *E. grandis*، *E. gunni*، *E. globulus*, *E. darlymplenea*, *E. nitens*, و *E. viminalis* نیز به‌علت اهمیت‌شـان در ایجـاد خمیر کاغذ ریزازدیادی شدند (Le Roux, 1991). بهینـه‌کـردن شرایط محیط کشت و سازگاری گیاهک‌ها و ارائـه یـک مـدل تولیدی با تأکید بر جنبـه‌هـای اقتصـادی بـه‌روش‌هـای نـوین ریزازدیادی از ویژگی‌های این پروژه بود.

مواد و روش‌ها

بذور اکالیپتوس از شرکت Kembell seed ایالت Perth در جنوب غربی استرالیا در سال ۱۳۸۴ تهیه شد. بذرها پس از بوجاری، جهت حذف آلودگی‌های سطحی و پیش‌سترون‌سازی، به‌مدت ۲ ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. آنگاه در شرایط سترون به زیر هود لامینارفلو منتقل شده و به‌طور جداگانه در محلول کلرور جیوه ۰/۱٪ به‌مدت ۵ دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به‌مدت ۱۸ دقیقه غوطه‌ور و سپس سه مرتبه آبشویی با آب مقطر سترون انجام شد. پس از پایان عمل گندزدایی، بذرها درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) فاقد قند و هورمون کشت شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، محور بالای دو برگ لپه‌ای رشد یافته و دارای ۲ تا ۳ میانگره شد. سپس به قطعات حاوی جوانه تقسیم شده و به محیط‌های کشت MS و GD (1974 Gresshoff & Dov,) به‌منظور یافتن بهترین محیط شاخه‌زایی انتقال داده شدند (Mehra-Palta, 1982). از محیط کشت MS و تیمارهای هورمونی مختلف شامل سیتوکینین BAP و 2iP در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور جداگانه و تلفیقی، اکسین IBA در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، جیبرلین GA_3 در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و P.V.P (Poly Vinyl Pyrolidone) (ماده بازدارنده ترشحات فنلی) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ضمن اینکه pH محیط‌ها بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. ریزنمونه‌های ساقه‌ای به‌طول ۱/۵- ۱ سانتی‌متر در ظروف کشت به‌قطر ۷ cm و ارتفاع ۹ cm و حاوی ۵۰cc محیط کشت قرار گرفتند. شیشه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در پایان هر مرحله از تعداد شاخه و جوانه‌ها (ضریب ازدیاد)، طول شاخه و سبزینگی شاخه (میزان سبزینگی بین یک تا چهار کدگذاری شد که یک نشانگر خشکی و نکروزگی کامل پهنک برگ و ۴ نمایانگر رنگ سبز تیره پهنک برگ بود) یادداشت‌برداری شد.

شاخه‌های به‌طول ۳-۲ سانتی‌متر به‌دست آمده از مرحله تکثیر، ابتدا به‌محیط پایه بدون هورمون برای دو هفته منتقل شدند تا گیاه‌چه‌ها بتوانند سطح تولید هورمون‌های طبیعی خود را به‌دست آورند و سپس در محیط ریشه‌زایی یعنی محیط MS با نصف غلظت نیترات به‌همراه BAP ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، حاوی تیمارهای هورمونی اکسین شامل NAA، IBA در

غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، کشت شدند. آزمایش‌ها در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی برای محیط کشت شاخه‌زایی و برای ریشه‌زایی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در شش تیمار هورمون اکسین و در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری در سیستم نرم‌افزاری SAS و میانگین‌ها به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ و ۵ درصد مقایسه شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گونه *E. occidentalis* در گلدان‌های حاوی مخلوط پیت، ورمیکولیت و پرلیت به‌نسبت ۱: ۱: ۱ استریل شده، کشت شدند. برای حفظ رطوبت بیشتر، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شد و به گلخانه منتقل شدند. سرپوش‌ها به‌تدریج دارای منافذی شدند، تا اینکه به‌طور کامل برداشته و گیاهان به شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.

نتایج

بهترین روش سترون‌سازی بذرها قرار گرفتن زیر آب جاری به‌مدت ۲ ساعت و سپس غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ به‌مدت ۱۸ دقیقه بود. درصد جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌های تولید شده از بذرهای سترون شده با تیمار هیپوکلریت سدیم در پتری‌دیش واجد محیط‌کشت MS بدون قند و هورمون ۹۶/۴۲٪ بود (شکل ۱). درصد جوانه‌زنی از بذرهای با تیمار سترون‌سازی کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به‌میزان ۵/۷۱ ٪ بود و در تعدادی از آنها نیز پس از جوانه‌زنی، بذرها کالوسی شده و رشد نگرفتند.

نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده از کشت بذرها در جدول ۱ بیان می‌کند که اثر عامل محیط کشت بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود و دو محیط‌کشت MS و GD بر صفات طول شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخه اثر یکسانی نداشتند. گیاهچه‌های کشت شده در محیط کشت MS، تعداد شاخه و طول شاخه بیشتری نسبت به‌محیط کشت GD داشتند. بنابراین می‌توان این محیط را به‌عنوان محیط کشت بهینه جهت شاخه‌زایی توصیه کرد (جدول ۲).

جدول ۱ – تجزیه واریانس میانگین صفات ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر محیط‌های کشت

منبع تغییرات	درجه آزادی	ضریب ازدیاد	طول شاخه	سبزینگی
محیط کشت	۱	۱۶/۱۲*	۱/۰۸*	۸/۳۳**
تیمار هورمونی	۱	۰/۹۹ns	۰/۳۶ns	۰/۰۸ns
اثر متقابل محیط و تیمار هورمونی	۱	۰/۳۳ns	۰/۱۴ns	۱/۰۰ns
خطا	۸	۱/۷۸	۰/۱۰	۰/۳۷

ns,*,** به‌ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

جدول ۲ – مقایسه میانگین شاخه‌زایی صفات ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر محیط‌های کشت

تیمارمحیط‌کشت	ضریب ازدیاد	طول شاخه (cm)	سبزینگی (درجه ۱ تا ۴)
GD	۳/۸۶b	۰/۶۳b	۲/۰۸b
MS	۶/۱۸a	۱/۲۳a	۳/۷۵a

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخه‌زایی صفات ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر سیتوکینین‌های مختلف

تیمارسیتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	ضریب ازدیاد	طول شاخه (سانتی‌متر)	سبزینگی (درجه ۱ تا ۴)
(BAP +2iP): (۰/۵+۰/۵) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۵/۳۱a	۱/۱۰a	۳/۰۰a
(BAP +2iP): (۱+۱) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۴/۷۴a	۰/۷۵a	۲/۸۳a

جدول ۳ بیان می‌کند که میانگین صفات ضریب ازدیاد شاخه، طول شاخه و سبزینگی در تیمارهای تلفیقی سیتوکینین‌های BAP و 2iP در دو غلظت متفاوت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در یک گروه قرار داشتند، لیکن اثر تیمار تلفیقی BAP و 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر بیشتری نسبت به این تیمار در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بر روی صفات مزبور داشت. بنابراین می‌توان غلظت کم تیمارهای تلفیقی سیتوکینین BAP و 2iP را جهت شاخه‌زایی در محیط کشت MS توصیه کرد.

جدول ۴- مقایسه غلظت یونی نمک‌های موجود در محیط‌های کشت

یون	MS	GD
NH_4 (mM)	۲۰/۶۱	۱۲/۵
K^+	۱۰/۵۲	۱۲/۹
Mg^{++}	۱/۵	۰/۱۴
Ca^{++}	۲/۹۹	۱/۵۵
Na^+	۰/۲۲۴	–
NO_3^-	۳۹/۴	۲۳/۹۵
PO_4^-	۱/۲۵	۲/۲
SO_4^{--}	۱/۷۶	۲/۶۷
Cl^-	۶	۰/۸۷
I^- (µM)	۵	۴/۸
Mn^{++}	۱۳۲	۵۹
Zn^{++}	۲۹	۱۰
B^{+++}	۱۰۰	۴۹
Mo^{+++}	۱/۰۳	۱
Co^{++}	۰/۱۰۵	۱
Cu^{++}	۰/۱	۱
Ni^{++}	–	–
Fe^{++}	۱۰۰	۱۰۰
N (mM)	۳۰/۰۰۵	۳۶/۴۵
NH_4/NO_3 (mM)	۰/۵۲	۰/۵۲
قدرت یونی کل (mM)	۹۴/۲۵	۵۷/۰۵

ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه در دو محیط کشت MS و GD در جدول ۲ تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. علت این تفاوت در قدرت یونی نمک‌های موجود در دو محیط کشت MS و GD می‌باشد و نشان می‌دهد که ترکیب مواد موجود در محیط کشت MS برای رشد گونه *E. occidentalis* مناسب‌تر است. جدول ۴ تفاوت قدرت یونی نمک‌های موجود در دو محیط کشت MS و GD را بیان می‌کند.

به‌منظور یافتن بهترین تیمار هورمونی شاخه‌زایی، گیاهچه‌های *E. occidentalis* به محیط کشت MS حاوی تیمارهای هورمونی سیتوکینین 2iP و BAP انتقال داده شدند. نتایج تجزیه واریانس شاخه‌زایی در جدول ۵ بیان می‌کند که سیتوکینین‌های 2iP و BAP در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور مجزا و تلفیقی بر روی صفات رشد طولی شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخه معنی‌دار بود.

تیمار حاوی سیتوکینین BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی در شاخه شد بنابراین می‌تواند به‌عنوان تیمار هورمونی بهینه جهت شاخه‌زایی توصیه شود (جدول ۶ و شکل ۲).

جدول۵ – تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر سیتوکینین

منابع تغییر	درجه آزادی	ضریب ازدیاد	طول شاخه	سبزینگی
تیمار	۵	۷۰/۱۲**	۰/۰۶۲*	۰/۶۰*
خطا	۱۲	۷/۵۳	۰/۰۱۲	۰/۱۸

جدول ۶– مقایسه میانگین صفات ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر سیتوکینین

تیمار سایتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	ضریب ازدیاد	طول شاخه (cm)	سبزینگی (درجه ۱ تا ۴)
BAP:۰/۵ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۲۳/۶a	۰/۸۶a	۳/۷۲a
2iP:۰/۵ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۹/۹۰d	۰/۴۳c	۲/۸۹ab
(BAP +2iP): (۰/۵+۰/۵) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۹ab	۰/۶۹ab	۳/۴۶a
(BAP +2iP): (۰/۵+۱) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۷/۴bc	۰/۵۹bc	۳/۱۱ab
(BAP +2iP): (۱+۰/۵) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۷/۱۱bc	۰/۵۵bc	۲/۹۸ab
(BAP +2iP): (۱+۱) + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۲/۶۶cd	۰/۵۷bc	۲/۴۴b

به‌دلیل آن که در بعضی از تیمارها ریشه تشکیل نشد، جهت تجزیه و تحلیل آماری صفات بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MINITAB انجام شد. نتایج تجزیه واریانس در جدول ۷ بیان می‌کند که اثر تیمارهای مختلف هورمون اکسین بر صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه اثر مشابهی نداشت و عامل تیمار هورمونی بر صفات مورد آزمون معنی‌دار و از تیماری به‌تیمار دیگر متفاوت بود.

جدول ۷- تجزیه واریانس صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد جداکشت ریشه‌دار	تعداد ریشه	طول ریشه
تیمار	۵	۲۷/۳۰**	۱۹۰/۸۱**	۹/۱۴**
خطا	۲۴	۰/۷۸	۷/۸۸	۰/۵۲

ns,*,** به‌ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

در مقایسه میانگین‌های تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و رشد طولی ریشه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* عامل تیمار هورمونی IBA در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نسبت به هورمون NAA مؤثرتر بود. بنابراین، می‌توان تیمار هورمونی IBA را در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان تیمار هورمونی بهینه جهت ریشه‌زایی توصیه کرد (جدول ۸ و شکل ۳).

جدول ۸ –مقایسه میانگین ریشه‌زایی صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه دانه‌رست گونه *E. occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای اکسین

تیمار اکسین (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد جداکشت ریشه‌دار	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)
IBA:۰/۵	۰/۱۹c	۰/۱۹c	۰/۱۹b
IBA:۱	۳/۱b	۴/۴۴b	۲/۷۰a
IBA:۲	۶/۰۱a	۱۵/۸۲a	۳/۳۷a
NAA:۰/۵	۰/۴۹c	۰/۴۹c	۰/۷۳b
NAA:۱	۰/۱۹c	۰/۱۹c	۰/۱۹b
NAA:۲	۰/۷۸c	۰/۷۹bc	۰/۹۱b

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گونه *E. occidentalis* در شرایط گلخانه‌ای قرار گرفته و سازگار شدند (شکل ۴).

شکل-۱ جوانه‌زنی گونه *E. occidentalis*

شکل-۲ تیمارهای هورمونی شاخه‌زایی در سیتوکینین‌های BAP و 2iP

شکل-۳ تیمارهای هورمونی ریشه‌زایی در گونه *E. occidentalis*

شکل-۴ سازگاری گونه *E. occidentalis* به‌ترتیب از راست به‌چپ در گلخانه و گلدان

بحث و نتیجه‌گیری

کاربرد آب جاری علاوه بر کاهش آلودگی‌های سطحی، باعث کاهش ترشحات فنلی در نمونه‌های بذری گونه *E. occidentalis* شد. نتایج مشابهی در گونه *E. gongylocarpa* توسط Akbari و همکاران (۲۰۰۷) به‌دست آمد. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد طولی شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخساره‌های گونه *E. occidentalis* بیان می‌کند که هر یک از این صفات به تنظیم‌کننده‌های رشد پاسخ متفاوتی دادند. بررسی اثر سیتوکینین‌های مختلف بر روی رشد طولی شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخساره‌های حاصل از دانه‌رست گونه *E. occidentalis* نشان داد که تیمار سیتوکینین BAP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه GA_3 در غلظت ۰/۱۵ و IBA در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان رشد طولی و شاخه‌زایی را داشتند که نشان‌دهنده اثر مثبت کاربرد سیتوکنین به‌کار رفته در افزایش رشد طولی شاخه است. بنابراین تیمار BAP به‌تنهایی و بدون حضور 2iP سبب افزایش رشد طولی شاخه، افزایش تعداد شاخه و

جوانه و میزان بالای سبزینگی شد. نتیجه آن که BAP نسبت به سیتوکنین‌های دیگری مانند 2ip اثر بیشتری بر شاخه‌زایی نشان می‌دهد. نتایج مشابهی نیز توسط Ndoye و همکاران (۲۰۰۳) به‌دست آمد.

افزایش تدریجی تیمار تلفیقی 2iP و BAP از غلظت ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر با افزایش غلظت 2iP سبب کاهش تدریجی در ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخساره‌های حاصل از دانه‌رست گونه *E. occidentalis* شد. نتایج مشابهی از سایر پژوهشگران گزارش شده است که در گونه *E. melliodora* از نظر کیفی شاخه‌زایی در غلظت‌های بالای BAP و غلظت‌های کم 2iP، بهتر از غلظت‌های دیگر بود، به‌طوری که تیمار هورمونی BAP در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر و 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین پاسخ را از نظر رشد و شاخه‌زایی نشان داد (Assareh & Sardabi, 2008). بالاترین میزان تشکیل جوانه‌های نوپدید و نیز بهترین شاخص وزن تر در محیط کشت MS همراه BAP با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. برخی مقالات منتشر شده گزارش کردند که BAP نسبت به کینتین یا زآتین در افزایش تشکیل شاخه مؤثرتر است، به‌طوری که موجب افزایش تولید سیتوکنین داخلی می‌شود (Bennett *et al.*, 1994؛ Niccol *et al.*, 1991؛ Vankova *et al.*, 2003؛ Trindad *et al.*).

در پژوهش حاضر تلفیق BAP و 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و در محیط MS برای گونه *E. occidentalis* در مقایسه با غلظت‌های بالاتر این تیمار رشد طولی شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی بهتری داشت. آنچه از نتایج این تحقیق به‌دست آمد این است که اثر سیتوکینین BAP در رشد طولی شاخه و تکثیر شاخه بستگی به‌میزان غلظت به‌کار رفته داشت. محیط‌کشت MS نسبت به محیط کشت GD تاثیر معنی‌داری در افزایش شاخص‌های ضریب ازدیاد، رشد طولی شاخه و سبزینگی داشت. به‌نظر می‌رسد میزان یون نیترات، منیزیم، منگنز، روی و بُر در محیط کشت MS بیشتر از GD بود. این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه نقش حیاتی دارند و سبب ازدیاد و طویل‌شدن شاخه‌ها، افزایش میانگره‌ها، افزایش تقسیم سلولی و بافت‌های مریستمی و تشکیل جوانه می‌شوند.

بررسی اثر تلفیقی سیتوکینین‌های BAP و 2iP بیان می‌کند که میانگین شاخص‌های رشد در یک گروه قرار دارند، لیکن شواهد موجود نشان می‌دهد که غلظت کم هر دو سیتوکینین در مقایسه با غلظت بالای آن برای شاخه‌زایی جداکشت‌ها مناسبتر است. این نتیجه با کاهش هزینه مصرف از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است. در تحقیقی Sedaghati و همکاران (۲۰۰۸) در نتایج خود گزارش کردند که استفاده از تیمار 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، BAP در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم درلیتر، IBA در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS و همچنین تلفیق BAP و Kin برای شاخه‌زایی دانه‌رست و پایه مادری تکثیر گونه *E. maculata* نسبت به سایر تیمارهای به‌کار رفته مناسب‌تر بود، که در راستای نتایج این تحقیق می‌باشد. در ریزازدیادی گونه *E. occidentalis* شاخه‌زایی بسیار کند انجام شد و شاخه‌ها بیشتر به‌حالت رزتی بودند که پس از افزودن هورمون GA_3 این مشکل برطرف شد. ساقه‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای گونه *E. impensa* نیز رشد بطئی داشتند و یا رشد آنها متوقف شد (Bunn, 2005)، این پاسخ‌های مورفولوژیکی در کشت درون شیشه‌ای سایر گونه‌های اکالیپتوس نیز گزارش شده است (Bennet & McComb, 1992; McComb *et al.*, 1996). رشد کند و بطئی در گونه *E. occidentalis* با نتایج محققین مذکور همسویی دارد.

نتایج ریشه‌زایی در محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات شامل IBA و NAA نشان داد که بهترین تیمار از نظر ایجاد ریشه‌های طبیعی، تحریک ریشه‌زایی، افزایش تعداد ریشه و افزایش طول ریشه تیمار هورمونی IBA در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج مشابهی در گونه *E. tereticornis* توسط سایر محققین گزارش شد (Das & Mitra, 1990). در تحقیق دیگری بهترین ریشه‌زایی در گونه *E. tereticornis* Smith در محیط کشت دارای ۱/۲ غلظت

از املاح MS و IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود (Sharma & Ramamurthy, 2000). بررسی‌ها نشان داد که ریشه‌زایی گونه‌های مختلف اکالیپتوس بیشتر در هورمون IBA صورت گرفته است. در پژوهش حاضر نیز گونه *E. occidentalis* بیشتر با هورمون IBA به ریشه‌زایی پاسخ داد. در تمامی محیط‌های کشت به‌منظور کاهش ترشحات فنلی از پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت استفاده شد. در تحقیق انجام شده توسط Subbaiah و Minocha (1990) نیز برای کاهش ترشحات فنلی در *E .tereticornis* از PVP استفاده شد.

نتیجه‌گیری کلی

محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP، GA_3 و اکسین IBA جهت رشد طولی شاخه و محیط کشت MS محتوی نصف غلظت نیترات و IBA حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر جهت ریشه‌زایی گونه *E. occidentalis* مناسب بود.

سپاسگزاری

از همکاران عزیز در گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که در طی انجام این تحقیق با ما همکاری کردند کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

– 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.
– Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus spp*. Iranian Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 3: 11-32.
– Assareh, M.H., and Sardabi, H., 2008. *Eucalyptus* (Description, Illustration & Propagation by Advanced Techniques), Volume 1, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 672.
– 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.
– Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and Mc David, D.A.J., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *In vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Annals of Botany, 74: 53-58.
– 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.
– Das, T., Mitra, G.C., 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22: 95-103.
– Emam, M., Assareh, M.H., Shahrzad, Sh. and Khojir, K., 2007. Asexual regeneration of two species of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* by tissue culture, project final report, Research Institute of Forestry and Rangelands, Tehran.
– Heidari, R., Majd, A. and Ghorbanli, M., 1996. Plant tissue and organ culture *Eucalyptus camaldulensis* of Myrtaceae. M.Sc. Thesis, Tarbiat Moalem University, Tehran, 208 p.
– Gresshoff, P.M. and Dov, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicom esculentum*. Planta, 107: 167-170
– Le Roux, J.J. and Van Staden, J., 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*. Tree Physiology, 9: 435-477.
– 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, P: 112-156.
– Mehra-Palta, A., 1982. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. Plant Scinece Lett., 26: 1-11.
– Mortazavi Jahromi, S. M., 1989. Adaption study different *Eucalyptus* species in east zone Fars Province. M.Sc. Thesis, School of Natural Resources, Tehran University.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497
– Niccol, R.J., Regan, P.A. and De Filippis, L.F., 1994. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. Australian Forestry, 57: 143-147.
– Ndoye, M., Diallo, I. and Gassama/Dia. Y.K. 2003. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree,

– Subbaiah, M.M. and Minocha, S.C., 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Reports, 9: 370-373.
– Sussex, I.M., 1965. The origin and morphogensis of *Eucalyptus* call poplulation. In Proceeding International Conference on Plant Tissue Culture. Eds. White, P.R. and Grove, A.R., McCutchan Berkeley. PP. 383-391.
– Trindad, H.M. and Pais, S., 2003. Meristematic nodule culture: a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. Trees, 17: 308-315.
– Vankova, R., Hsiao, K.C., Bornmam, C.H. and Gaudinova, A., 1991. Effects of synthetic cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. Journal of Plant Growth Regulation, 10: 197-199.
Balanites aegyptiacal del. African Journal of Biotechnology, 2: 421-424.
– Nugent, G., Chandler, S.F., Whiteman P. and Stevenson, T.W., 2001. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. J. *in vitro* Cell Dev.Bio.Plant, 37: 388-391.
– Rahim, F., Jabeen M. and Ilahi, I., 2003. Masspropagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Asian J. Plant Sience,2: 184-187.
– Sharma, S., and Ramamurthy, V., 2000. Micropropagation of 4-year- old elite *Eucalyptus tertecornis* trees. Plant Cell Reports, 19: 511-518.
– Sedaghati, M., Kiarostami, K. and Assareh, M.H., 2008. Study on *Eucalyptus maculata* tissue culture by conventional and photoautotrophic methods and comparison of essential oils in *in vitro* and *ex vitro* conditions, M.Sc. Thesis, College of Science, Al-Zahra University, Tehran.

Effects of culture medium and growth regulators on micropropagation of *Eucalyptus occidentalis*

Z. Abravesh,*[1] M.H. Assareh[2], M. Emam[3] and A. Morid[4]

1*-Corresponding author, M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
E.mail: z.abravesh@gmail.com
2– Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
3- Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
4- M.Sc., Tropical and Subtropical Botanical Garden of Dezful, I.R.Iran

Received:15.09.2013 Accepted:10.08.2014

Abstract

Eucalyptus occidentalis is cultivated for its nectar and pollen in honey production, also due to its essential oils for medicinal aspects, tanin in leather industries and wood fibers in cosmetics and paper industries. Micropropagation of the species was evaluated by auxiliary bud culture in MS and GD culture medium using a factorial experimental model based on a completely randomized design. Seeds were immersed in water for 2 hours and 1% sodium hypoclorite solution for 18 minutes as the best treatment for surface sterilization. A modified MS medium containing cytokinines BAP, GA_3 and IBA in 0.5, 0.15, 0.01 mgl^{-1}, respectively and 200 mgl^{-1} PVP was used. The best rooting treatment was a modified MS medium (1/2N) containing auxine, IBA in 2mgl^{-1}. Plantlets were transferred to soil and kept in greenhouse conditions. The study showed that using an appropriate treatment in tissue culturing method, the valuable species could be propagated in a short time.

Keywords*:* *Eucalyptus occidentalis*, micropropagation, culture medium, growth regulations.