فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۵۸-۱٤۲ (۱۳۸٦)

ریزازدیادی *Eucalyptus gongylocarpa* Blakely

مریم اکبری‌خباز[۱]، عباس قمری‌زارع[۲]، مه‌لقا قربانلی[۳]، محمدحسن عصاره[۲] و میترا امام[۲]

۱- دانشگاه پیام نور، مرکز تهران، گروه زیست‌شناسی- علوم گیاهی

۲- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ص. پ. ۱۱٦- ۱۳۱۸۵ E-mail: ghamari-zare@rifr-ac.ir

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

چکیده

ریزازدیادی *E. gongylocarpa* Blakely به‌وسیله کشت جوانه بررسی شد. تیمارهای مختلف سترون‌سازی، استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی اعمال گردید. بهترین روش سترون‌سازی بذر، در محلول بنومیل ۰/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه، شستشو با مایع ظرف‌شویی، شستشو زیر آب جاری به مدت ۲ ساعت، ۲۰ ثانیه غوطه‌وری در الکل اتیلیک ۷۰٪ و ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲٪ بود. از ۲۲ تیمار محیط کشت، محیط MS محتوی نصف غلظت نیترات، BAP ۰/۱، Kin ۰/۲، IBA ۰/۱ و GA_3 ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، به همراه PVP ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای استقرار و تکثیر شاخه‌ها انتخاب شد. بهترین ریشه‌زایی در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌همراه ۲/۵ گرم بر لیتر زغال فعال انجام شد. گیاهچه‌های ریزازدیاد شده در گلدانهای کوچکی حاوی ترکیبی از خاک و ماسه، خاکبرگ و پرلیت به نسبت‌های ۳: ۳: ۱ استریل شده کشت شدند و مراحل سازگاری را در گلخانه یعنی در شرایط نوری مطابق با شب و روز طبیعی با موفقیت طی کردند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، هورمون و *Eucalyptus gongylocarpa* Blakely

مقدمه

گونه‌های مختلف اکالیپتوس از جمله *Eucalyptus gongylocarpa* Blakely از گونه‌های مهم و سریع‌الرشد برای جنگل‌کاری و بهره‌برداری در صنایع چوب و کاغذ و سایر کاربردها هستند (عصاره، ۱۳۷۹؛ جوانشیر و مصدق، ۱۳۵۱). در سال ۱۳۷۹ توسط عصاره و همکاران ٤۰ گونه اکالیپتوس که احتمال سازگاری آنها با شرایط اکولوژیکی مناطق ایران می‌رفت با تطبیق شرایط رویشگاهی موطن اصلی آنها در جنوب‌غربی استرالیا (ایالت Perth که با شرایط جنوب ایران مطابقت دارد) وارد ایران شد و پس از ۱۲ سال آزمایش سازگاری، تعداد محدودی از این گونه‌ها سازگاری برجسته‌ای را نشان دادند که یکی از آن گونه‌های بسیار موفق *E. gongylocarpa* Blakely است. به‌رغم اهمیت این گونه، متأسفانه در تکثیر این گونه مشکلاتی وجود دارد؛ اکالیپتوس به‌طور طبیعی بوسیله بذر تکثیر می‌شود که منجر به ایجاد تنوع می‌شود. ناسازگاری و رد پیوند نیز از مشکلات تکثیر غیرجنسی اکالیپتوسها است (Lakshmi Sita & Sukanya, 1987).

کلون کردن بوسیله تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای، به‌ویژه برای تکثیر ژنوتیپهای هتروزنز، نرعقیم و یا دارای

ناسازگاری جنسی ارزشمند است. این امر می‌تواند بوسیله تکنیک‌های کشت بافت بدست آید. یکی از روشهای تکثیر غیرجنسی بوسیله ریزازدیادی از طریق افزایش شاخه‌زایی جانبی است. تکثیر شاخه توسط افزایش مریستم جانبی و انتهایی از دانه‌رستها نظیر مواد گیاهی بالغ عمومی‌ترین تکنیک برجسته و موفق در گونه‌های اکالیپتوس است. کشت جوانه برخلاف کشت کالوس، قدرت باززایی کنندگی خود را تا مدتهای بسیار طولانی حفظ می‌کند. بنابراین، کشت جوانه به‌عنوان ذخایر ازدیاد کلون، به‌طور ویژه‌ای مناسب است (Lakshmi Sita & Sukanya, 1987).

Burger (۱۹۸۷) از جوانه‌های درخت بالغ و پاجوش برای تکثیر درون‌شیشه‌ای شاخه‌ها و تشکیل ریشه‌های نابجا در گونه *E. sideroxylon* استفاده نمود. Barker و همکاران (۱۹۷۷) تشکیل گیاهان منفردی را از بخشهای گرهی دانه‌رست، بوته و درختان جوان *E. grandis* گزارش کردند. ولی هیچ مؤفقیتی از ریزنمونه‌های درختان بالغ بدست نیامد. Lakshmi Sita و همکاران (۱۹۸۲، ۱۹۸۵ و ۱۹۸٦) تولید متراکم شاخه‌های جانبی از مریستم‌های دانه‌رست *E. grandis* را همانند جوانه‌های درختان پنج ساله گزارش کردند. Hartney (۱۹۸۰) و Hartney و Barker (۱۹۸۰) نیز تکثیر شاخه و ریشه‌دهی از جوانه *E. grandis* را گزارش نمودند. تولید شاخه‌های چندگانه و سپس ریشه‌دهی بوسیله Lakshmi Sita و Vaidyanathan (۱۹۷۹) از مریستم شاخه‌ی دانه‌رستهای ۵ روزه در حال جوانه‌زنی *E. citriodora* گزارش شد. Grewal و همکاران (۱۹۸۰) تکثیر شاخه را از دانه‌رستهای ضدعفونی شده *E. citriodora* و Gupta و همکاران (۱۹۸۰) برای اولین بار تکثیر شاخه را از جوانه‌های درختان برگزیده ۲۰ ساله *E. citriodora* گزارش کردند. تشکیل موفقیت‌آمیز شاخه چندگانه می‌تواند از جوانه‌های انتهایی گیاهان بالغ درختی ۲۰-۱۰ ساله شروع شود، از جمله گزارش Mascarenhas و همکاران (۱۹۸۲) از *E. citriodora* و Hartney (۱۹۸۱)، Hartney و Barker (۱۹۸۰) و Diallo و Duhox (۱۹۸٤)، ریزازدیای *E. camaldulensis* را از جوانه‌های دانه‌رست می‌توان نام برد. Gupta و همکاران (۱۹۸۳) تشکیل شاخه‌های چندتایی را از جوانه‌های درختان ۲۰ ساله *E. camaldulensis* و Hartney (۱۹۸۱) تولید گیاهچه را از جوانه‌های دانه‌رست *E. globulus* گزارش کردند. Mascarenhas و همکاران (۱۹۸۲) و Gupta و Mascarenhas (۱۹۸۷) استقرار موفقیت‌آمیز گیاهچه‌ها را از جوانه‌های جانبی درختان بالغ *E. camaldulensis* با مؤفقیت انجام دادند.

با توجه به اهمیت اکالیپتوس و مشکلاتی که در تکثیر آن به روشهای معمول وجود دارد، تکثیر آن از طریق کشت بافت امری ضروری به‌نظر می‌آید. در تحقیق حاضر امکان پرورش و تولید انبوه گونه درختی *E. gongylocarpa* Blakely با استفاده از کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت. از اهداف مهم این تحقیق دستیابی به یک روش کاربردی برای تکثیر انبوه به صورت غیرجنسی در این گونه درختی و نیز بهینه کردن شرایط محیط کشت در شیوه ریزازدیادی می‌باشد.

مواد و روشها

با توجه به میزان بالای آلودگی در محیط کشت‌های حاوی نمونه‌های بالغ و نیز برای صرفه‌جویی در وقت و

هزینه تیمارهای استریل و هورمونی ابتدا بر روی دانه‌رستها انجام شد و سپس بهترین تیمارها بر روی ریزنمونه‌های حاصل از نهال‌ها و درختان بالغ اعمال گردید. به همین جهت، برای ریزازدیادی از دانه‌رستها و جوانه‌های گونه *Eucalyptus gongylocarpa* موجود در عرصه استفاده شد. مواد گیاهی شامل، سه پایه ۱۲ ساله موجود در باغ گیاه‌شناسی منطقه گرمسیری دزفول (عرض جغرافیایی '۱٦ °۳۲، طول جغرافیایی '۲۵ °٤۸، میانگین رطوبت سالانه ۲۵۰mm، میانگین حداقل و حداکثر دما به ترتیب C °۲- و C°۵۲ و میانگین دمای روزانه C°۲۷ و نوع خاک شنی لومی) و نهالهای چند ساله موجود در باغ ملی گیاه‌شناسی ایران واقع در کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج بودند. بذرهای جمع‌آوری‌شده، بعد از بوجاری، به ترتیب با ۱۵ دقیقه غوطه‌وری در محلول بنومیل ۰/۵٪ همراه با تکان دادن توسط همزن الکتریکی، شستشو با مایع ظرف‌شویی، ۲ ساعت قرار گرفتن در زیر آب جاری و ۲۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ پیش سترون شدند. آنگاه برای سترون کردن نهایی از غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۲۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر در زیر هود لامینارفلو استفاده شد. پس از پایان عمل ضدعفونی، بذرها در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) فاقد قند و هورمون کشت شدند.

برای تهیه جداکشت از نمونه‌های موجود در عرصه، از جستهای تازه درختان که در بخشهای بالایی بودند استفاده گردید. بدین ترتیب که قسمتهای بالایی شاخه‌های جوان از گیاه مادر جدا شده و درون کیسه‌های نایلونی قرار گرفته و پس از جای‌گیری در یخدان به آزمایشگاه کشت بافت گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور منتقل شدند.

در آزمایشگاه شاخه‌هایی به طول ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر جدا شده و تمامی برگهای ساقه با قیچی باغبانی چیده شد. جوانه‌های انتهایی و جانبی نهالها و پایه‌های بالغ پس از شستشو با آب و مایع ظرف‌شویی و غوطه‌وری در محلول ۲/۵ گرم در لیتر اسیداسکوربیک، پیش استریل گردیدند. سترون‌سازی با الکل اتیلیک ۷۰٪ و کلرورمرکوریک ۰/۱٪ در زمانهای متفاوت بسته به محل و نوع جوانه‌ها (۱، ۲ و ۳ دقیقه برای جوانه‌های انتهایی ٤، ٦ و ۸ دقیقه برای جوانه‌های جانبی) صورت گرفت.

برای بدست آوردن محیط بهینه شاخه‌زایی، سه آزمایش با تیمارهای هورمونی مختلف در محیط‌های MS نصف غلظت نیترات انجام گرفت (جدول ۱). pH همه محیط‌ها بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. از هر تیمار هورمونی ۵ تکرار و در هر تکرار ۷ ریزنمونه به طول ۱- ۱/۵ سانتیمتر در یک شیشه به قطر ۷ cm و ارتفاع ۹ cm و حاوی ۵۰cc محیط کشت استفاده شد. شیشه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱٦ ساعته روشنایی منتقل شدند.

سرشاخه‌های نهالها و درختان بالغ پس از سترون‌سازی در بهترین تیمار بدست آمده از دانه‌رستها، یعنی تیمار ۱ (BAP۰/۱، Kin ۰/۲، GA_3 ۰/۲۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA)، مستقر گردیدند.

جدول ۱- هورمون‌های مورد استفاده در هر یک از تیمارهای آزمون شاخه‌زایی

	IBA	GA_3	2ip	Kin	BAP	کد تیمارها
آزمون اول	۰/۰۱	۰	۰	۰/۲	۰/۱	۱
	۰/۰۱	۰	۰	۰/۲	۰/۳	۲
	۰/۰۱	۰	۰	۰/۲	۰/۵	۳
	۰/۰۱	۰	۰	۰/۲	۱	٤
	۰/۰۱	۰	۰	۰/۵	۰/۵	۵
	۰/۰۱	۰	۰	۰/۵	۰/۳	٦
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰	۰/۵	۷
آزمون دوم	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۰/۱	۱
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۰/۳	۲
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۰/۵	۳
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۱	٤
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۵	۰/۵	۵
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۵	۰/۳	٦
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰	۰/۵	۷
آزمون سوم	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۰/۱	۱
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰	۰/۲	۰/۳	۲
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰/۲	۰	۳
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰	۰/۳	٤
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۵	۰	۰/۱	۵
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰	۰/۱	٦
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳	۰/۲	۰/۱	۷
	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۵	۰	۰/۳	۸

در آزمون اول در طی دو مرحله بازکشت ماهیانه و در آزمون دوم و سوم در طی سه مرحله بازکشت ماهیانه، میانگینی از اعداد مربوط به طول و تعداد نوساقه برداشت شد. این داده‌ها در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی تجزیه و میانگین‌ها با روش دانکن در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ مقایسه شدند.

شاخه‌های به طول ۳-۲/۵ سانتیمتر بدست آمده از مرحله تکثیر، به محیط ریشه‌زایی یعنی محیط MS حاوی ۲/۵ گرم بر لیتر ذغال فعال، در سه تیمار فاقد هورمون، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA انتقال داده شدند. با پیدایش ریشه از قاعده شاخه‌ها، گیاهچه‌ها در گلدانهای کوچک (به قطر ۹/۲cm و ارتفاع ۸/۷cm) که در آنها ترکیبی از خاک و ماسه، خاک برگ و پرلیت به نسبت‌های ۳: ۳: ۱ استریل شده، ریخته شده بود قرار داده شدند. سپس برای حفظ بیشترین رطوبت، روی گلدانها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شده و گلدانها به گلخانه یعنی در شرایط نوری مطابق با شب و روز طبیعی منتقل شدند. گلدانها یک روز در میان آبیاری شدند و سرپوش پلاستیکی آنها زیر و رو می‌گشت تا از آلودگی در اثر رطوبت جمع شده در زیر سرپوشها جلوگیری شود. جهت انجام سازگاری تدریجی گیاهان، سرپوش به تدریج دارای منافذی شد، تا اینکه به طور کامل برداشته شد و گیاهان با محیط بیرون سازگار شدند.

نتایج

بهترین روش سترون‌سازی بذر، قرار گرفتن بذرها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بنومیل ۰/۵٪، شستشو با مایع ظرف‌شویی، ۲ ساعت قرارگرفتن در زیر آب جاری، ۲۰ ثانیه الکل اتیلیک ۷۰٪ و ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲٪ بود. بهترین تیمار سترون‌سازی برای جوانه‌های انتهایی و جانبی نهالها به ترتیب ۱ دقیقه و ٦ دقیقه در محلول کلرورمرکوریک ۰/۱٪ و برای جوانه‌های انتهایی و جانبی درختان بالغ به ترتیب ۲ و ۸ دقیقه در محلول کلرورمرکوریک ۰/۱٪ بود (جدولهای ۲، ۳ و ٤ و شکلهای ۱ و ۲).

جدول ۲- استریل بذرهای *E. gongylocarpa* و اثر آن بر استقرار و آلودگی ریزنمونه‌ها

ریزنمونه	تیمار استریل	درصد استقرار	درصدآلودگی‌باکتریایی	درصدآلودگی‌قارچی	زمان کشت
بذر	(b)۱۵´+m+(a)۲h+(e)۲۰˝+(H)۲۰´	۸۵/۷۱	–	۱٤/۲۹	اسفند

H: هیپوکلریت سدیم ۲٪، e: اتانول ۷۰٪ ، a: آب جاری، m: مایع ظرفشویی، b: بنومیل۰/۵٪، (´) :دقیقه، (˝): ثانیه، (h): ساعت

جدول ۳- تیمارهای استریل ریزنمونه‌های پایه‌های بالغ *E. gongylocarpa* و اثر آنها بر استقرار و آلودگی ریزنمونه‌ها

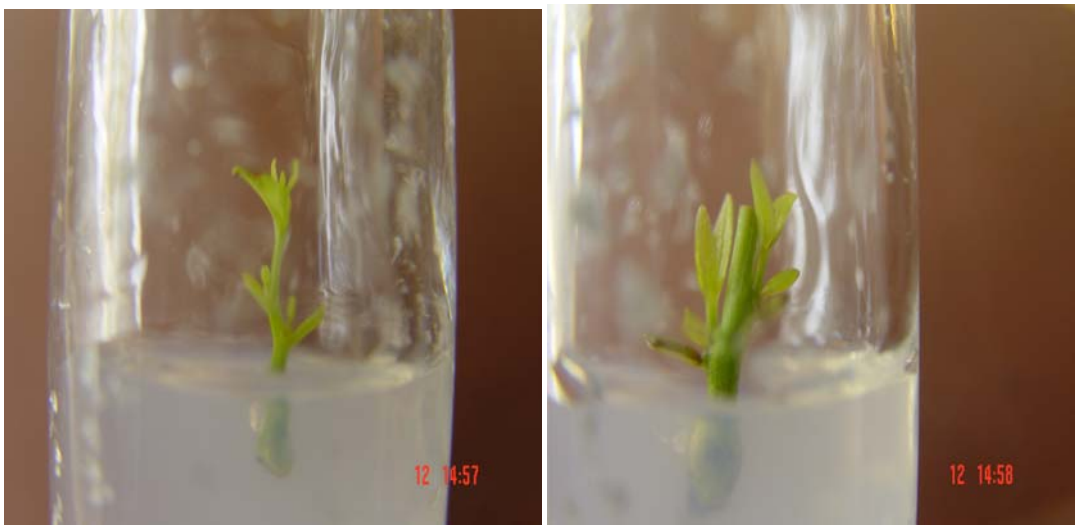
ریزنمونه	تیمار استریل	درصد استقرار	درصدآلودگی‌باکتریایی	درصدآلودگی‌قارچی	درصد نکروزه‌شدن	زمان کشت
جوانه‌های انتهایی	m+As+(e) ۳۰˝+M۱´	٦٦/٦٦	۱٦/٦٦	۳/۳۳	۲۰	فروردین
	m+ As+(e) ۳۰˝+M ۲´	۷۰	۵	۲۵	۱۰	فروردین
	m+ As+(e) ۳۰˝+M۳´	٦۵	۵	۱۵	۵	فروردین
جوانه‌های انتهایی	m+ As+(e) ۳۰˝+M۱´	٦۳/۱٦	۲/٦۳	۱۳/۱٦	۲۱/۰۵	خرداد
	m+ As+(e) ۳۰˝+M۳´	٦۵/۷۹	–	۱۳/۱٦	۲۱/۰۵	خرداد
جوانه‌های جانبی	m+ As+(e) ۱´+M٤´	۳۰	۲۵	–	۷۰	فروردین
	m+ As+(e) ۱´+M٦´	۳۲	۱۲	٤	٦۸	فروردین
	m+ As+(e) ۱´+M۸´	۲۸	–	۱٦	٦٤	فروردین
جوانه‌های جانبی	m+ As+(e) ۱´+M٦´	٦۵/۷۹	۱۳/۳۳	۳/۳۳	۳/۳۳	خرداد
	m+ As+(e) ۱´+M۸´	۷٦/٦٦	٦/٦٦	۱۰	٦/٦٦	خرداد

M: کلرورمرکوریک ۰/۱٪، M´: کلرورمرکوریک ۰/۵٪، e: اتانول ۷۰٪، b: بنومیل ۰/۵٪، b´: بنومیل ۱٪، m: مایع ظرفشویی، As: اسید آسکوربیک، (´): دقیقه، (˝): ثانیه، (h): ساعت

جدول ٤- تیمارهای استریل ریزنمونه نهالهای *E. gongylocarpa* و اثرات آنها بر استقرار و آلودگی ریزنمونه‌ها

ریزنمونه	تیمار استریل	درصد استقرار	درصد آلودگی باکتریایی	درصد آلودگی قارچی	درصد نکروزه شدن	زمان کشت
جوانه‌های انتهایی	m+ As+M ۳۰˝	۷۷/۲۷	۰	٤/۵۵	۱۸/۱۸	تیر
	m+As+M۱´	۱۰۰	۰	۰	۰	تیر
جوانه‌های جانبی	m+As+M۲´	۸۷/۵	۰	٦/۲۵	٦/۲۵	تیر
	m+As+M٤´	۸٦/٦۸	۰	٦/٦٦	٦/٦٦	تیر
	m+As+M٦´	۹۰/۹۱	۰	۰	۹/۰۹	تیر

M: کلرورمرکوریک ۰/۱٪، M´: کلرورمرکوریک ۰/۵٪، e: اتانول ۷۰٪، b: بنومیل ۰/۵٪، b´: بنومیل ۱٪، m: مایع ظرفشویی، As: اسید آسکوربیک، (´): دقیقه، (˝): ثانیه، (h): ساعت



شکل ۱- جوانه‌های انتهایی (سمت چپ) و جانبی (سمت راست) نهال‌های *E. gongylocarpa* ده روز پس از کشت

شکل ۲- جوانه‌های انتهایی (سمت چپ) و جانبی (سمت راست) درخت بالغ *E. gongylocarpa*

نتایج آزمایشهای بررسی تیمارهای هورمونی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر تعداد و طول شاخه متفاوت بود. در آزمون اول، تیمار ۷ با غلظت‌های هورمونی BAP ۰/۵، *2ip* ۰/۳، GA_3 ۰/۲۵ و به همراه IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به بقیه تیمارها، شاخه‌های طبیعی‌تر داشت. تیمارهای هورمونی دیگر به علت فقدان هورمون GA_3 در ترکیب محیط کشت، شاخه‌های روزتی تولید کردند (جدول ۵ و شکل ٤).

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های آزمایش اثر تیمارهای هورمونی بر شاخه‌زایی دانه‌رستهای *E. gongylocarpa* در آزمون اول بر شاخصهای رشد (طول شاخه و تعداد شاخه) به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار تنظیم کننده‌های رشد	میانگین تعداد شاخه	
	در سطح ۰/۰۵	در سطح ۰/۰۱
۷	۱/۸۷ a	۱/۸۷ a
۱	۱/۷۱ ab	۱/۷۱ ab
٦	۱/٦٦ ab	۱/٦٦ ab
۵	۱/٦۰ abc	۱/٦۰ ab
۲	۱/۵۱ bc	۱/۵۱ ab
۳	۱/٤۹ bc	۱/٤۹ b
٤	۱/۳۷ c	۱/۳۷ b
تیمار تنظیم کننده‌های رشد	**میانگین طول شاخه**	
	در سطح ۰/۰۵	**در سطح ۰/۰۱**
۷	٦/۷۳ a	٦/۷۳ a
۱	٦/٦٦ a	٦/٦٦ a
۵	٦/۰۷ ab	٦/۰۷ a
۲	٦/۰٦ ab	٦/۰٦ a
٤	۵/٦٦ ab	۵/٦٦ a
۳	۵/۵۰b	۵/۵۰ a
٦	۵/٤۳b	۵/٤۳ a

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطوح مورد نظر می‌باشد (۱: BAP۰/۱ + Kin ۰/۲، ۲: BAP ۰/۵ + Kin ۰/۲، ۳: BAP ۰/۵ + ۰/۲ Kin، ٤: BAP ۱ + Kin ۰/۲، ۵: BAP۰/۵ + Kin ۰/۵، ٦: BAP ۰/۳ + Kin ۰/۵ و ۷: BAP ۰/۵ + ۰/۳ *2ip*، به‌همراه GA_3 ۰/۲۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در تمامی تیمارها).

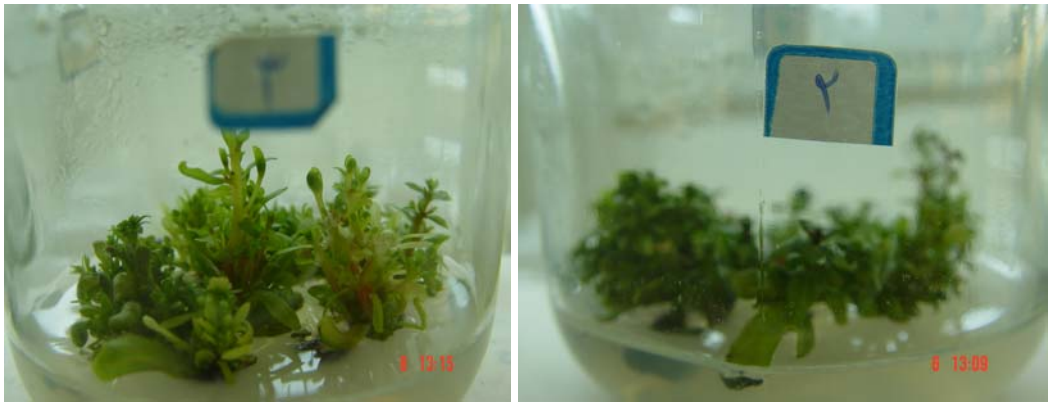
شکل ۳- اندازه شاخه‌های بازکشت شده *E. gongylocarpa* در تیمارهای شاخه‌زایی

شکل ٤- شاخه‌های طبیعی‌تر *E. gongylocarpa* در تیمار ۷ آزمون اول

جدول ٦- مقایسه میانگین‌های آزمایش اثر تیمارهای هورمونی بر شاخه‌زایی دانه‌رستهای *E. gongylocarpa* در آزمون دوم بر شاخصهای رشد (طول شاخه و تعداد شاخه) به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار تنظیم کننده‌های رشد	میانگین تعداد شاخه	
	در سطح ۰/۰۵	در سطح ۰/۰۱
۳	۵/۳۱ a	۵/۳۱ a
۲	٤/۵۱ ab	٤/۵۱ ab
٤	٤/۱۰ bc	٤/۱۰ Abc
۷	۳/۹٤ bcd	۳/۹٤ bc
۱	۳/۷٦ bcd	۳/۷٦ bc
٦	۳/۳۱ cd	۳/۳۱ bc
۵	۳/۰۲ d	۳/۰۲ c
تیمار تنظیم کننده‌های رشد	**میانگین طول شاخه**	
	در سطح ۰/۰۵	**در سطح ۰/۰۱**
۲	۹/۱۷ a	۹/۱۷ a
٦	۹/۰۰ a	۹/۰۰ ab
۱	۸/۹۷ a	۸/۹۷ ab
۳	۸/۹۷ a	۸/۹۷ ab
٤	۸/٦۹ a	۸/٦۹ ab
۷	۸/۱۸ ab	۸/۱۸ ab
۵	۷/ ۲٤b	۷/۲٤b

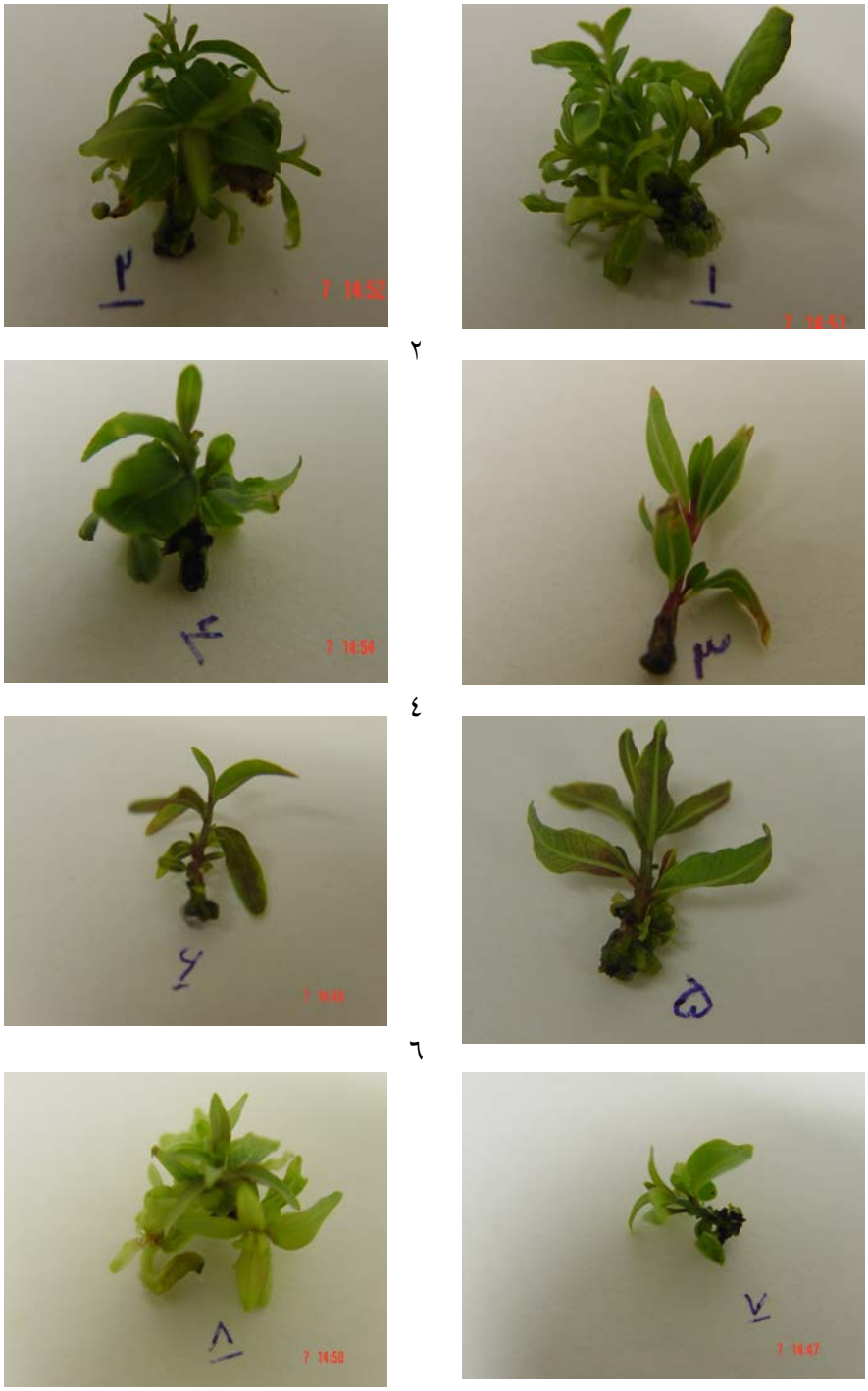
حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطوح مورد نظر می‌باشد (۱: BAP۰/۱ + Kin ۰/۲، ۲: BAP۰/۵ + Kin ۰/۲، ۳: BAP۰/۵ + Kin ۰/۲، ٤: BAP ۱ + Kin ۰/۲، ۵: BAP۰ /۵ + Kin ۰/۵، ٦: BAP ۰/۳ + Kin ۰/۵ و ۷: BAP۰ /۵ + *2ip* ۰/۳، به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در تمامی تیمارها).



شکل ۵– شاخه‌های برتر از نظر طول (تیمار ۲) و تعداد (تیمار ۳) در آزمون دوم

در تکمیل این آزمایشها، آزمون دیگری با ۸ تیمار انجام گرفت که در نهایت تیمار ۱ یعنی، محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات همراه هورمونهای BAP، Kin، IBA و GA_3 در غلظت‌های به ترتیب ۰/۱، ۰/۲، ۰/۰۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، هم از نظر طول شاخه و هم از نظر تعداد شاخه به عنوان محیط کشت بهینه انتخاب گردید (جدول ۷ و شکل ٦).

در مرحله ریشه‌زایی هر چند کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA مؤثرتر بود (۸٤٪)، ولی به دلیل میزان بالای هورمون و نداشتن اختلاف زیاد با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (۷٦٪)، IBA ۱ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان بهترین محیط ریشه‌زایی بکار رفت (شکل ۷) و شاخه‌های طبیعی بدست آمده از نهالها و درختان بالغ برای ریشه‌دهی در IBA ۱ میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفتند (شکلهای ۸ و ۹). درصد ریشه‌زایی در نهالها پس از چهار هفته ۳۲٪ و پس از شش هفته ٤۰٪ بود. درصد ریشه‌زایی در درختان بالغ ۱۰٪ بود.



شکل ٦– مقایسه هشت تیمار شاخه‌زایی *E. gongylocarpa* در آزمون سوم از نظر تعداد و طول شاخه

(۱: BAP۰/۱ + Kin ۰/۲، ۲: BAP ۰/۳ + Kin ۰/۲، ۳: *2ip* ۰/۳ + Kin ۰/۲، ٤: *2ip* ۰/۳ + BAP ۰/۳، ٥: *2ip* ۰/٥ + BAP۰/۱، ٦: *2ip* ۰/۳ + BAP۰/۱، ۷: *2ip* ۰/۳ + Kin ۰/۲ + BAP۰/۱ و ۸: 2ip۰/٥ + BAP۰/۳ به همراه ۰/۲٥ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در تمامی تیمارها).

جدول ۷- مقایسه میانگین‌های آزمایش اثر تیمارهای هورمونی بر شاخه‌زایی دانه‌رستهای *E. gongylocarpa* در آزمون سوم بر روی شاخصهای رشد (طول و تعداد شاخه) به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار تنظیم کننده‌های رشد	میانگین تعداد شاخه	
	در سطح ۰/۰۵	در سطح ۰/۰۱
۱	٤/۳۳ a	٤/۳۳ a
٤	٤/۲٤ a	٤/۲٤ a
۸	۳/۹۷ ab	۳/۹۷ a
۲	۳/۹۱ ab	۳/۹۱ a
٦	۳/۸٦ ab	۳/۸٦ a
٥	۳/٦۲ b	۳/٦۲ a
۷	۲/۸۲ c	۲/۸۲ b
۳	۲/۱۸ d	۲/۱۸ b
تیمار تنظیم کننده‌های رشد	**میانگین طول شاخه**	
	در سطح ۰/۰۵	**در سطح ۰/۰۱**
۱	۱۰/۷٥ a	۱۰/۷٥ a
۸	۹/٤۳ b	۹/٤۳ b
٥	۹/۲۱ bc	۹/۲۱ bc
٦	۹/۱۰ bc	۹/۱۰ bc
۳	۸/٦۹ bcd	۸/٦۹ bc
٤	۸/٥٤ cd	۸/٥٤ bc
۲	۸/٤۲ cd	۸/٤۲ bc
۷	۸/۱۲ d	۸/۱۲ c

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطوح مورد نظر می‌باشد (۱: BAP۰/۱ + Kin ۰/۲، ۲: BAP ۰/۳ + Kin ۰/۲، ۳: *2ip* ۰/۳ + Kin ۰/۲، ٤: BAP ۰/۳ + *2ip* ۰/۳، ٥: BAP۰/۱ + *2ip* ۰/٥، ٦: BAP۰/۱ + *2ip* ۰/۳، ۷: BAP۰/۱ + Kin ۰/۲ + *2ip* ۰/۳ و ۸: BAP۰/۳ + 2ip۰/٥ به همراه ۰/۲٥ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در تمامی تیمارها).

شکل ۷- ریشه‌های دانه‌رستی *E. gongylocarpa* در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA

شکل ۸- ریشه‌های نهالهای *E. gongylocarpa* در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA

شکل ۹- ریشه‌های درختان بالغ *E. gongylocarpa* در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA

گیاهچه‌های حاصل پس از انتقال به گلدان در شرایط گلخانه‌ای مراحل سازگاری را با موفقیت طی کردند (شکل ۱۰).

شکل ۱۰– سازگاری گیاهچه‌های *E. gongylocarpa* در شرایط گلخانه

بحث

در رابطه با تیمار سترون‌سازی، استفاده از محلول الکل اتیلیک ۷۰ درصد باعث می‌شود که لایه مومی سطح کوتیکول حذف شده و محلول ضدعفونی کننده اصلی قدرت نفوذ و تأثیر بهتری را بر بافت نمونه‌ها بیابد. درضمن، اتانول به دلیل خاصیت میکروب‌کشی و مسموم‌کنندگی بر گیاهان، بایستی در مدت زمان کوتاهی استفاده شود (امام و شهرزاد، ۱۳۸۰). همچنین استفاده از الکل و یا یک ماده شوینده قبل از بکار بردن هیپوکلریت سدیم، موجب افزایش رطوبت سطح بافت می‌گردد (آروین، ۱۳۸۱). محلول کلرورمرکوریک 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. امام و شهرزاد (۱۳۸۰) نتیجه مشابهی را با $HgCl_2$ ۰/۱٪ بر روی *Populus caspica* در مورد روش سترون‌سازی نمونه‌ها بدست آوردند. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد طولی و تعداد شاخه‌ها و ریشه‌زایی شاخه‌های *E. gongylocarpa* نشان داد که هر یک از این عوامل به یک نوع تنظیم کننده رشد پاسخ بهتری نشان می‌دهند. بررسی اثر سیتوکینین‌ها بر رشد طولی شاخه‌های ایجاد شده از جوانه‌های دانه‌رستها نشان داد که شاخه‌های بدست آمده از محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3، بیشترین میزان رشد طولی و شاخه‌زایی را داشتند که نشان دهنده اثر مثبت کاربرد توأم سیتوکینین‌ها در افزایش رشد طولی شاخه است. کاربرد تلفیقی هورمونها در افزایش و ازدیاد شاخه‌ها توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. Lakshmi-Sita (۱۹۹۳) با تلفیق ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin در محیط MS نشان داد که تلفیق توأم سیتوکینین‌ها رشد طولی و ازدیاد شاخه *E. tereticornis* را به میزان زیادی افزایش می‌دهد.

بررسی رشد طولی شاخه‌های حاصل از تیمارهای هورمونی BAP (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 نشان داد که با کاهش غلظت BAP رشد طولی افزایش یافت.

در نمونه‌های کشت شده *E. gongylocarpa* بیشترین میزان تشکیل جوانه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدست آمد. در نتیجه BAP نسبت به سیتوکینین‌های دیگر (مانند *2ip*) شاخه‌زایی بیشتری را نشان داد. محققان دیگر (Ndoye *et al.*, 2003, Bennett *et al.*, 1994, Sharma & Ramamurthy, 2000) نیز چنین نتایجی را بدست آوردند.

سپاسگزاری

این تحقیق در گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد که بدین‌وسیله از همکاری گروه و حمایتهای مالی و معنوی مؤسسه یاد شده سپاسگزاری و قدردانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- آروین، م.ج.، (بونگا، ج.م. و آدرکاس، پ.ون) ۱۳۸۱، کشت بافت درختان چوبی، انتشارات دانشگاه شهید باهنر کرمان ص: ۱۸-۱۷.

- امام، م. و شهرزاد، ش.، ۱۳۸۰. ریزازدیادی سفیدپلت (*Populus caspica*). پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، ص۸۹-۸٤.
- جوانشیر، ک. و مصدق، ا.، ۱۳۵۱. اکالیپتوس. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ٤۳٤ صفحه.
- عصاره، م.ح.، ۱۳۷۹. بررسی جنین‌زایی بدنی در برخی گونه‌های اکالیپتوس. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، جلد ۳، ص ۳۲-۱۱.
- Barker, P.K., Fossard De, R.A., and Bourne, R.A., 1977. Progress toward clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Int Plant Propagators Soc Comb Proc, 27: 546-556.
- Bennett, .I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and David, D.A.J. Mc., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates in vitro shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Annals of Botany, 74: 53-58.
- Burger, D., 1987. In vitro micropropagation of *Eucalyptus sideroxylon*. J. Hort. Science, 22(3):496-497.
- Diallo, H. and Duhoux, E., 1984. Organogenesis at multiplication in vitro *Eucalyptus camaldulensis*. J. Plant Physiol, 115: 177-182.
- Grewal, S. Ahuja, A. and Atal, C.K., 1980. Clonal multiplication of medicinal plants by tissue culture. 5. in vitro proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora.* Hook. Indian J Exp Biol, 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 Sci. Lett., 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 Rep, 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. MartinusNijhoff, Dordrecht/ Boston/ Lancaster, pp.385-399.
- Hartney, V.J., 1980. Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. Aust. For Res., 10: 191-211.
- Hartney, V.J. and Barker, P.K., 1980. The vegetative propagation of the *Eucalyptus* by tissue culture. In: Fast Growing Trees IUFRO Congress, Sao Paulo, Brazil. Pp.1-7.
- 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, AFOCEL. Pp. 175-180.
- Lakshmi Sita, G. and Vaidyanathan, C.S., 1979. Rapid multiplication of *Eucalyptus* by multiple shoot production. Curr. Sci., 48: 350-352.
- Lakshmi Sita, G., 1982. Tissue Culture of *Eucalyptus*. In: Rao AN (Ed.). Tissue Culture of Economically important plants. Singapore COSTED/ ANBS, PP. 180-184.
- Lakshmi Sita, G. and Shobharani, B., 1985. In Vitro propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. Plant Cell Rep, 4: 63-65.
- Lakshmi Sita, G., Shobharani, B. and Rao, K.S., 1986. Propagation of *Eucalyptus grandis* by Ttissue Culture. In: Eucalyptus in India: Past Present and Future, Pp. 318-321.
- Lakshmi Sita, G., 1986. Progress towards clonal propagation of *Eucalyptus grandis*. In: Withers, L.A. and Alderson, P.G. (Eds.). Plant Tissue Culture and its Agricultural applications. Butterworths, Pp. 159-166.
- Lakshmi Sita, G. and Sukanya, C., 1987. Improvement of forest trees by tissue culture. In: Reddy, G.M. (Ed.). Plant Cell and Tissue Culture of economically important plants. Proc of the National Symposium, pp. 195-198.
- Lakshmi-sita, G., 1993. Micropropagation of *Eucalyptus.* Kluwer Academeic Publisher, Netherlands, 263-280.

- 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 Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
- Ndoye, M., Diallo, I. and Gassama Dia، Y.K., 2003. In vitro multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiacal* del. African Journal of Biotechnology, 2 (11): 421-424.
- Sharma, S.K. and Ramamurthy, V., 2000. Micropropagation of 4-year–old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. Plant Cell Reports, 19:511-518.

Micropropagation of *Eucalyptus gongylocarpa* Blakely

M. Akbari Khabbaz [1], A. Ghamari Zare[2], M. Ghorbanli[3], M.H. Asareh[2] and M. Emam[2]

1- Payame Noor, Biology of Plant Sciences.
2- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran. E-mail:ghamari-zare@rifr-ac.ir
3- Gorgan Azad Islamic University, Gorgan, Iran.

Abstract

Micropropagation of *E. gongylocarpa* Blakely through bud culture was investigated. Different treatments of sterilization, establishment, shooting and rooting were studied. The best sterilization treatment for seeds was 0.5% Benomyl solution for 15 min, washing with detergent and then under running water for two hours, 70% ethanol for 20 seconds and 2% NaOCl for 20 min. MS medium containing half strength of nitrate, 0.1 mgl^{-1} BAP, 0.2 mgl^{-1} Kin, 0.01 mgl^{-1} IBA and 0.25 mgl^{-1} GA_3 with 100 mgl^{-1} PVP were selected for shoot establishment and multiplication. The best rooting, observed in MS medium including 1 mgl^{-1} IBA with 2.5 gl^{-1} activated charcoal. The micropropagated plantlets established in the greenhouse successfully.

Key words: Micropropagation, shooting, rooting, growth regulators and *Eucalyptus gongylocarps*