بررسی رخداد و بهبود عارضه شیشه‌ای شدن اندامها در کشت بافت گیاهی

محمدحسن عصاره[1] و مایکل هنرتی[2]

چکیده

شیشه‌ای شدن بافتها عارضه‌ای فیزیولوژیکی بوده که به عنوان یک مشکل جدی به ویژه در کشت بافت گیاهان چوبی ظاهر می‌شود. شاخه‌ها و بافتهای شیشه‌ای شده به شکل غیرطبیعی سبز کم‌رنگ، بسیار شفاف، ضخیم با آبگیری زیاد بوده که به راحتی شکسته می‌شوند. در مطالعات قبلی برای دستیابی به تکنیک کشت بافت در گونه‌های متعدد اکالیپتوس، این عارضه اغلب در گونه‌ای به نام *E. camaldulensis* و *E. viminalis* به عنوان عاملی محدودکننده ظهور و بروز می‌کرد. با تکیه بر منابع و گزارشهای پیشین، نوع و غلظت ژل، نوع و اندازه ظرفهای کشت و نیز استفاده از ترکیبهای شیمیایی برای کنترل پدیده ضد شیشه‌ای شدن مورد بررسی قرار گرفت. درصد محتویات آبی با بهره‌گیری از فیتوژل به‌طور معنی‌داری بیشتر از آگار بود. به علاوه شاخه‌های اکالیپتوس کامالدولنسیس در محیط جامد شده به وسیله باکتوآگار سطح کمتری از آلودگی را نشان می‌داد. استفاده توام از باکتوآگار و ماده ضد شیشه‌ای شدن بافتها موسوم به EM2 این پدیده نامطلوب را در گونه کامالدولنسیس به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نتایج همچنین نشان دادند که تفاوت معنی‌داری در بکارگیری غلظت مختلف باکتوآگار در کاهش عارضه در گونه ویمینالیس وجود ندارد، اما استفاده از EM2 در غلظت ۵ گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری این عارضه را کاهش داده و بهبود می‌بخشد. اگرچه میزان پرآوری در تکثیر گونه ویمینالیس پس از استفاده از EM2 مختصری کاهش یافته، ولی کیفیت

۱- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

۲- دانشگاه یو. سی. دی. ایرلند.

گیاهکهای تولیدی مطلوب و عاری از آثار بافتهای شیشه‌ای در گونه اکالیپتوس ویمینالیس بود.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، شیشه‌ای شدن، EM2، اکالیپتوس

مقدمه

شیشه‌ای شدن بافتهای گیاهی یکی از عوامل محدودکننده در کشت بافت بوده که نه تنها بازده تولید شاخه‌زایی را کاهش داده، بلکه بازکاشت در طول دوره پرآوری با محدودیت روبه رو می‌شود. این موضوع که گاهی به عنوان تجمع آب در بافتها یا با انتقال آب بیش از حد در اندامها انجام می‌شود پدیده‌ای است که شاخه‌ها حالت شیشه‌ای، ضخیم با قابلیت انتقال نور یا شفافیت زیاد همراه بوده، به‌طوری‌که برگها حالتی شکننده و پرآب را نشان می‌دهند (George و Sherrington، ۱۹۸۴). Boulay (۱۹۸۳) نشان داد که وقتی پدیده شیشه‌ای شدن در مرحله شاخه‌زایی اتفاق می‌افتد تعداد کمی از جوانه‌ها به این مشکل مبتلا می‌شوند و در این صورت با انتقال آنها به محیط کشت که ۱۵ گرم بر لیتر زغال فعال داشته باشد این جوانه‌ها به حالت طبیعی برگشته و بهبود نسبی حاصل می‌کنند. اگرچه توصیه دیگر نامبرده حاکی از این است که تنها راه چاره در مورد جوانه‌های آلوده جداسازی و حذف آنها از سیستم تولید است. Boulay (۱۹۸۵) نیز در گزارشی یادآوری نمود که شاخه‌های شیشه‌ای شده برای بازکاشت و تکثیر مجدد مفید نبوده و حتی در صورت شاخه‌دهی، ریشه‌دار نمودن آنها غیر ممکن است. Durand-Cresswell و همکاران (۱۹۸۲) راه مقابله با این مشکل را کاهش سایتوکنین‌ها توصیه نمودند. این پدیده میزان تکثیر شاخه‌ها را به شدت تحت تاثیر قرار داده وکاهش می‌دهد، تعادل فیزیولوژیکی مختل و جذب آب توسط بافتها افزایش می‌یابد. مطالعات اندکی برای جلوگیری و کنترل این پدیده نامطلوب در کشت

بافت انجام شده است و برخی مواد و ترکیبهای ضد شیشه‌ای شدن بافتها نیز معرفی شده‌اند. (Hdider و Desjardins، ۱۹۹۳). در مطالعه حاضر برای ریزازدیادی گونه‌های اکالیپتوس به کرات مشاهده گردید که پدیده شیشه‌ای شدن به ویژه در گونه *E. viminalis* و *E. camaldulensis* رخ می‌دهد. برای مقابله با این عارضه با توجه به عوامل متعددی که در منابع به عنوان علل رخداد این پدیده ذکر نموده‌اند تحقیق حاضر انجام شد. از جمله عوامل ذکر شده می‌توان به نوع و غلظت ژل یا آگار اشاره نمود که در صورت عدم بهره‌گیری بهینه به افزایش جذب آب و ذخیره غیرعادی آن در واکوئل سلولهای گیاهی منجر می‌شود. علاوه بر آن، نوع ظرف، حجم و نحوه تبادل گازی از جمله تجمع اتیلن و عدم تخلیه آن به ایجاد شرایط مناسبی برای ایجاد شاخه‌های شیشه‌ای می‌شود. بنابراین، برای مقابله با این پدیده با توجه به عوامل ذکر شده آزمایشهایی برای تعیین دقیق نوع و غلظت ژل، بررسی در مورد متعدد و استفاده از مواد ضد شیشه‌ای انجام گرفت.

مواد و روشها

در اولین آزمایش از دو نوع آگار به نام Difco-Bacto و PhytaGel (Gelrite) و همچنین از ۴ نوع ظرف با مختصات زیر استفاده شد:

ظرف استوانه‌ای کوچک شیشه‌ای با شعاع ۵/۴ و ارتفاع ۷/۲ سانتیمتر با در از جنس پروپیلن و ظرفیت آن برابر با ۱۳۰ میلی‌لیتر (SBFJ[1])

۱- ظرف استوانه‌ای بزرگ شیشه‌ای با شعاع ۵/۴ ارتفاع ۹/۴ سانتیمتر با در از جنس پروپیلن و ظرفیت آن برابر ۱۷۰ میلی‌لیتر (LBFJ[2])

[1] - Small Baby Food Jar

[2] - Large Baby Food Jar

۲- استفاده از ظرفهای یک بار مصرف پلاستیکی استریل با شعاع ۴ سانتیمتر، ارتفاع ۷/۵ سانتیمتر با در فلزی و ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر (DPJ[1])

۳- استفاده از جعبه‌های مکعب مستطیل پلی‌کربنی معروف به GA7 کمپانی Sigma با ۵/۸ سانتیمتر طول یا عرض ۹/۶ سانتیمتر ارتفاع و دارای در استاندارد پلی‌پروپیلن.

محیط کشت MS2 که در تحقیقات قبلی نگارنده (Assareh، ۱۹۹۸) مخصوص کشت برخی گونه‌های اکالیپتوس بود تهیه گردید و برای تمام آزمایشها مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت با ۷ گرم در لیتر Difco-Bacto آگار و یا ۲ گرم در لیتر فیتوژل جامد گردید. شاخه‌های گیاهکهای سالم و پاک از ذخیره گیاهی (Stock) به صورت استریل از کشتهای قبلی در شرایط *In vitro* برداشت و در ظرفهای فوق به صورت تصادفی کشت گردیدند.

در هر ظرف به جز ظرفهای ردیف سوم تعداد ۴ ریزنمونه کشت گردید (در ظرفهای ردیف سوم به دلیل محدودیت گنجایش ۲ ریزنمونه کشت شد). تمام ظرفها در شرایط ۲±۲۲ و ۱۶ ساعت روشنایی معادل ۵۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ و به مدت ۵ هفته نگهداری گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل با ۴ تکرار و در قالب طرح کاملاًتصادفی انجام گرفت. پس از مدت مذکور وزن تر و خشک توده‌های گیاهی رشد یافته اندازه‌گیری و میزان محتوی آبی بافتها به صورت درصد محاسبه گردید. اعداد بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به دلیل عدم دستیابی به نتیجه‌ای قانع کننده برای حذف کامل یا تقلیل معنی‌دار شاخه‌های شیشه‌ای، در آزمایش دیگر از ماده ضد شیشه‌ای شدن[2] موسوم به EM2 استفاده شد. در این

1 - Disposable Sterlin Jar

2- Antivitrification

آزمایش آگار دیفکوباکتو به دلیل برتری در آزمایش اول در دو غلظت ۶/۵ و ۸ گرم در لیتر به همراه ترکیب EM2 مورد استفاده قرار گرفت. این ماده با غلظت ۵ گرم در لیتر محیط کشت MS2 برای *E. camaldulensis* و در محیط کشت Defossard برای گونه *E. viminalis* مورد استفاده قرار گرفت. pH تنظیم شده برابر ۵/۸ و شرایط نگهداری مشابه آزمایش قبل در نظر گرفته شد. ۴ تیمار (با یا بدون EM2 و نیز با ۶/۵ یا ۸ گرم در لیتر آگار) با ۹ تکرار و هرتکرار مشتمل بر ۴ ریزنمونه در یک زمان برای هر دو گونه انجام شد. تعداد شاخه‌های شیشه‌ای بر حسب درصد پس از ۵ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت و داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS و روشهای مقایسه میانگینی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

در نخستین بررسی بعمل آمده اثر نوع و غلظت ژل و ابعاد (گنجایش) ظرفها بر عارضه شیشه‌ای شدن بافتها در اکالیپتوس کامالدولنسیس مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش استفاده از فیتوژل نسبت به آگار در محیط کشت به افزایش وزن تر و کاهش وزن خشک منجر گردید. میزان درصد آب درون بافتی با فیتوژل (۸۸/۲۲٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر از کشتهای انجام شده در آگار (۸۱/۲۹٪) مشاهده گردید. به علاوه، جوانه‌ها و شاخه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی آگار دیفکوباکتو (غلظت ۷ گرم در لیتر) سطح کمتری از شیشه‌ای شدن را نشان دادند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- تاثیر انواع ژل‌و ظرفها برمیزان ظهورپدیده شیشه‌ای شدن در کشت بافت

تیمارها	وزن تر توده شاخه‌حاصل‌شد از یک ریزنمونه (g)	وزن خشک به توده حاصل شده از یک ریزنمونه (g)	نسبت آب موجود در بافتها به توده شاخه حاصل از یک ریزنمونه (٪)	توصیف کیفی شیشه‌ای شدن بافتها
نوع ژل Gelling agents				
دیفکوباکتو آگار	۰/۳۰۹a	۰/۰۵۹a	۸۱/۲۹b	+
فیتوژل	۰/۳۸۶b	۰/۰۴۴a	۸۸/۲۲a	++
ظرفها				
SBFJ -۱	۰/۳۶۵ab	۰/۰۵۵ab	۸۳/۴۴b	++
LBFY -۲	۰/۳۱۳ab	۰/۰۵۳ab	۸۳/۱۶b	+
DSJ -۳	۰/۴۷۹a	۰/۰۷۰a	۸۴/۰۳b	+
GA7-۴	۰/۲۳۵b	۰/۰۲۹b	۸۸/۳۹a	+++

میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن مقایسه شده‌اند. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده بیانگر عدم معنی‌دار شدن آنها در سطح ۵٪ است. +، ++، +++ به ترتیب مبین مشاهده شاخه‌های شیشه‌ای کم ، زیاد و خیلی زیاد در تیمارها می‌باشد.

شکل و ابعاد ظرفهای کشت نقش کمی در بروز عارضه شیشه‌ای شدن را ایفا نمود. محتوی آبی بافتها در ظرفهای DSJ با ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر ظرفهای بکار گرفته شده بود، درحالی‌که این میزان در ظروف LBFJ در مقایسه با سایر تیمارها در حداقل مشاهده گردید (جدول شماره ۱). احتمالاً مهمترین عامل در افزایش شاخه‌های شیشه‌ای در DPJ به دلیل عدم تبادل هوا و تهویه ناکافی در اثر درهای خاص این ظرفها است. در هر حال نتایج این آزمایش بیانگر عدم موفقیت در حذف کامل شاخه‌های شیشه‌ای شده می‌باشند (شکل شماره ۱).

شکل شماره ۱- برگها و شاخه‌های شیشه‌ای شده در *E. viminalis*

برای بهبود شاخه‌زایی آزمایش دیگری طراحی و در آن دو نوع غلظت از باکتوآگار (به دلیل موفقیت این نوع ژل در کنترل شیشه‌ای شدن در آزمایش قبلی) به میزان ۶/۵ و ۸ گرم در لیتر به همراه یا بدون استفاده از ماده ضد شیشه‌ای شدن EM2 انجام گرفت. ترکیب تجزیه شده این ماده که ضمن حرارت در محیط کشت اضافه شده در جدول شماره ۲ درج گردیده است.

جدول شماره ۲- ترکیبهای موجود در ماده ضد شیشه‌ای اندامهای گیاهی در شرایط *In vitro* موسوم به EM2

- ماده خشک	٪۸۹
- هیدراتهای کربن(شامل D-Galactose و 3,6-Anhydro)	۸۱۷ میلی‌گرم بر گرم ماده جامد
- عناصر تجزیه و تحلیل شده	
کلسیم	۴/۹۶ میلی‌گرم بر گرم ماده جامد
سدیم	۲۰/۷۶ " " " " "
منیزیم	۲/۶۴ " " " " "
پتاسیم	۰/۳۸ " " " " "
یون سولفات	۱۶/۶ " " " " "
- خاکستر	۶۳/۲۴ " " " " "
- پروتئین گیاهی	۱/۱ " " " " "

نتایج بیانگر کاهش درصد شاخه‌های شیشه‌ای شده در غلظت بالای باکتوآگار می‌باشند. استفاده از EM2 در هر دو غلظت آگار اثرات مطلوب داشته، لکن بهترین نتیجه استفاده از غلظت ۵ گرم در لیتر EM2 به همراه ۸ گرم در لیتر باکتورآگار حاصل شد که میزان شاخه‌های شیشه‌ای شده این گونه گیاهی را به حداقل ممکن رساند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- تاثیر غلظت آگار و ماده ضد شیشه‌ای شدن EM2 در کنترل عارضه شیشه‌ای شدن در مرحله شاخه‌زایی اکالیپتوس کامالدولنسیس در شرایط *In Vitro*

غلظت آگار	شاخه‌های شیشه‌ای شده (٪)	
	۶/۵ گرم در لیتر	۸ گرم در لیتر
شاهد (بدون EM2)	۴۷/۲۲±۵/۰۱a	۳۵/۵۶±۱۰/۸۵a
۵ گرم در لیتر EM2	۲۵/۰۰±۷/۲۲b	۱۳/۸۹±۴/۳۹b

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و حروف مشابه بیانگر عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها و ± دامنه SE را مشخص می‌نماید.

مشاهدات در این تحقیق نشان دادند که آثار شاخه‌های شیشه‌ای در این گونه از اکالیپتوس معمولاً در هفته سوم و به خصوص در هفته چهارم و پنجم هویدا می‌شوند. برگها در روی شاخه‌های آلوده کاملاً شیشه‌ای، شفاف و بسیار ضخیم در مقایسه با حالت طبیعی می‌باشند. علاوه بر خصوصیات مذکور رنگ برگها به سبز کمرنگ، کاملاً شفاف و درخشنده تغییر می‌یابند (شکل شماره ۲).

در بررسی انجام شده با روش مشابه آزمایش قبلی برای کنترل شیشه‌ای شدن در *E. viminalis* مشاهده گردید که غلظت آگار تاثیر معنی‌داری نداشته، درحالی‌که استفاده از ماده EM2 به شدت میزان عارضه را کاهش می‌دهد (جدول شماره ۴).

شکل شماره ۲- مقایسه شاخه‌های شیشه‌ای (سمت چپ) و طبیعی (سمت راست) در کشت بافت اکالیپتوس کامالدولنسیس با یا بدون استفاده از EM2 پس از ۵ هفته بعد از کشت ریزنمونه

جدول شماره ۴- تاثیر غلظت آگار و ماده EM2 در کنترل عارضه شیشه‌ای شدن در کشت بافت E. viminalis در شرایط In Vitro

غلظت آگار	شاخه‌های شیشه‌ای شده (٪)	
	۶/۵ گرم در لیتر	۸ گرم در لیتر
شاهد بدون EM2	۳۸/۸۹±۹/۴۲a	۳۶/۱۱±۱۱/۱۱a
۵ گرم در لیتر EM2	۱۱/۱۱±۴/۳۹b	۸/۳۳±۴/۱۷b

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و حروف مشابه بیانگر عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها و ± دامنه SE را مشخص می‌نماید.

استفاده از EM2 به کاهش عارضه منجر می‌شود و شاخه‌های تولید شده در محیط کشت محتوی EM2 کیفیت قابل توجهی پیدا می‌کنند و همگی پس از چند بار بازکشت، به محیط ریشه‌زایی منتقل و پس از تولید ریشه به گلخانه منتقل شدند. ظاهر و مورفولوژی این گیاهان پس از چند ماه نگهداری در گلخانه کاملاً طبیعی بودند.

بحث

در گزارشهای پیشین شاخه‌های شیشه‌ای شده معمولاً در طی مرحله شاخه‌زایی مشاهده شده است. این پدیده به‌طور کلی یک خصیصه آبگیری اضافی را توسط آوندها در پی دارد که در کشت بافت گیاهان چوبی و علفی اتفاق می‌افتد. اصطلاحات متعددی در منابع در توصیف این عارضه فیزیولوژی ذکر شده که می‌توان به Translucency، Glauciness، Hyperhydricity و Vitrification اشاره کرد (Gaspar و همکاران، ۱۹۸۷). در همه موارد ذکر شده، نقطه مشترک، نحوه ظهور این پدیده می‌باشد که به صورت انباشت آب در سلولها و بافتهای هوایی گیاهکهای جوان تحت شرایط *In vitro* تجمع می‌یابد. اندامهای گیاهی مبتلا به این عارضه شفافیت پیدا کرده و در غالب موارد برگها و ساقه‌ها سبز کم‌رنگ مایل به زرد با درخشندگی خاص ظاهر شده و بافتها به آسانی شکسته می‌شوند (Werner و Boe، ۱۹۸۰).

تاثیر عوامل خارجی از جمله شرایط فیزیکی کشت، نوع و غلظت آگار بکار رفته، شرایط محیطی و نوع ظرفهای کشت و غیره و نیز تاثیر عوامل داخلی گیاه مثل آناتومی، مورفولوژی، فیزیولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی در ایجاد این عارضه دخالت دارند (Gaspar، ۱۹۹۱؛ Paques، ۱۹۹۱).

در این مطالعه شاخه‌های آلوده در دو گونه اکالیپتوس به نامهای *E. viminalis* و *E. camaldulensis* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نوع و غلظت آگار بکار رفته، ظرفهای کاشت و استفاده از ماده ضد شیشه‌ای شدن برای غلبه بر این رخداد نامطلوب مورد

بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول تاثیر انواع ژل شامل استفاده از ۷ گرم در لیتر باکتوآگار و ۲ گرم در لیتر ژل‌رایت یا فیتوژل و نیز بهره‌گیری از ظروف با ابعاد و ویژگیهای متفاوت به منظور کنترل عارضه استفاده شد. وزن تر و خشک و میزان آب موجود در بافتها بصورت شاخص برای کمی کردن عارضه مورد بررسی قرار گرفتند. براساس تجزیه و تحلیل داده‌ها نتیجه معنی‌داری بین تیمارها (فیتوژل و ژل‌رایت) برای هر دو شاخص وزن تر و خشک مشاهده نگردید، اما میزان آب موجود در بافت که اصلی‌ترین موضوع در ظهور شیشه‌ای شدن است به‌طور معنی‌داری خود را آشکار ساخت و در تیمار فیتوژل این عامل حدود ۸۸/۲۲٪ و در آگار مقدار آن ۸۱/۲۹٪ بود که به روشنی اثر نوع آگار را در پدیده نشان می‌هد (جدول شماره ۱). مشابه این نتیجه پیش‌تر توسط Pasqualetto و همکاران (۱۹۸۸) مشاهده و گزارش شده است. آنها ۷ گرم در لیتر دیفکوباکتوآگار و ۱، ۱/۵، ۲ گرم در لیتر ژل‌رایت را استفاده نمودند. نتایج بررسی‌های آنها نشان دادند که ژل‌رایت به‌طور مستمر در شیشه‌ای شدن برگها و شاخه‌ها موثر است. از طرفی همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشخص است رابطه‌ای مستقیم بین محتویات آبی بافتها و میزان شیشه‌ای شدن وجود دارد به عبارت دیگر شاخه‌های شیشه‌ای شده دارای محتویات آبی بیشتر می‌باشند. کاهش وزن خشک و لیگنین و میزان آب بیشتر بافتها که ظاهری متراکم و ضخیم را در مقایسه با بافتهای طبیعی نشان می‌دهند پیش‌تر به وسیله Gasper (۱۹۹۱) گزارش شده است. همچنین Kevers و Gaspar (۱۹۸۶) نشان دادند که میزان آب در بافتهای شیشه‌ای شده در فضاهای موجود پروتوپلاسمی تجمع و یا پراکنده می‌شود و به همین دلیل این بافتها قادر به انجام مناسب اعمال لیگنینی شدن بافتها را نیستند. در ضمن همین محققان در گزارشی دیگر کاهش لیگنینی شدن در بافتهای شیشه‌ای را به مختل شدن فعالیت آنزیمهای سازنده لیگنینی مرتبط دانسته‌اند. در مطالعه حاضر شکل و ابعاد ظرفهای به‌طور جزیی در شیشه‌ای شدن اندامها دخالت داشت. زمانی که ظرفهای ۱۰۰ میلی‌لیتری استفاده گردید محتویات آبی بافتها افزایش زیادی داشت درحالیکه این مسئله در ظرفهای LBFJ به کمترین مقدار

تقلیل یافت. این موضوع ممکن است بدلیل اختلاف در تبادل گازی و تهویه در ظرفهای مرتبط باشد. Kavanagh و همکاران (۱۹۹۱) گزارش دادند که شکل ظرفها و میزان محیط کشت که در معرض هوای داخل ظرفهاقرار می‌گیرد تاثیر در کاهش یا افزایش رطوبت داخل و نیز در تبادل گازی موثر است. در ظرفها نیز در تهویه و تجمع گازهای مضر از جمله اتیلن و حفظ و یا تنظیم رطوبت فوق‌العاده اهمیت دارد. در این رابطه می‌بایستی مطالعه بیشتری در استاندارد نمودن در ظروف انجام داد به‌طوری‌که در ظروف ضمن انجام تبادل گازی و برقراری تعادل در رطوبت، به آلوده شدن محیط کشت به میکروارگانیسمهای خارجی منجر نشود. در ادامه این مطالعه به دلیل عدم موفقیت کامل در کاهش شیشه‌ای شدن بافتها، محصولی جدید به نام EM2 در ۵ گرم در لیتر و در ترکیب با دو غلظت مختلف آگار یعنی ۶/۵ و ۸ گرم در لیتر برای محیط کشت دوگونه اکالیپتوس استفاده شد. در این آزمایش ارتباطی جزیی بین سختی محیط کشت و شیشه‌ای شدن در *E. camaldulensis* مشاهده گردید. شاخه‌های شیشه‌ای شده به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت آگار کاهش پیدا کردند درحالیکه هر دو غلظت آگار در *E. viminalis* معنی‌دار نبود. Paques (۱۹۹۱) نشان داد که سختی آگار به کیفیت و کمیت نوع ژل وابسته است. برخی از محصولات آگار که به صورت مصنوعی و طبیعی ساخته شده‌اند باعث بهبود و یا تشدید عارضه می‌شوند و تاثیر آنها در شیشه‌ای شدن بافتها محرز شده است (Paques، ۱۹۹۱). یک نتیجه دیگر حاکی از تاثیر فوق‌العاده مطلوب محصول ضد شیشه‌ای EM2 (جدول شماره ۲) می‌باشد که بدون در نظر گرفتن غلظت آگار، در هر دو گونه اکالیپتووس میزان عارضه را به شدت تقلیل داد (جدول شماره ۳ و ۴). تاثیر EM2 در کاهش شیشه‌ای شدن در مطالعات Hdider و Desjardins (۱۹۹۳) ثابت شده است. در این گزارش درصد بالایی از گیاهچه‌های توت فرنگی حاصل از کشت بافت که به صورت غیرطبیعی به این عارضه دچار شده بودند بهبود یافت. در تحقیق آنها از دو محصول EM1 و EM2 به میزان ۵ گرم در لیتر استفاده شده بود که عارضه نامطلوب شیشه‌ای شدن را به‌طور کامل تحت کنترل درآوردند.

منابع

Assareh, M.H. 1998. *In vitro* plant regeneration through organogenesis, somatic embryogenesis and photoautotrophic micropropagation of some *Eucalyptus spp*. Ph.D. thesis , National University of Ireland. P201.

Boulay, M. 1983. Micropropagation of forest resistant *Eucalyptus*. In: proceedings, workshop on *Eucalyptus*. Sacramento, California, Forest Services General. Technical Report: 102-107.

Boulay, M. 1985. Some practical aspects and applications of the micropropagation of forest trees. International symposium on *in. vitro* propagation of forest tree species. Bologna. Italy.

Durand-cresswell, R.J., M. Boulay, and A. Franchlet. 1982. Vegetative production of *Eucalyptus*. In*: Tissue culture in forestry*. (Bongo J.M. and durzan D.J. eds). Martinnus Nijhoff. The Hauge:150-181.

Gasper, T.H. 1991. Virtification in micropropagation. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 17. Y.P.S. Bajaj (ed). Springer-verlag, Berlin:116-123.

Gasper, T.H. C. kevers, M. Maene, M. paques and P.H. boxus. 1987. Virtification: *Cell, and tissue culture in forestry*. Vol . 1. General principles and biotechnology. (Bonga J.M. and durzan D.J.- eds). Martinnus Nijhoff, dordrecht: 152-166.

George, E.F and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Basingstoke, pp. 709.

Hdider, C. and Y. Desjardins . 1993. Prevention of shoot virtification of strawberry micropropagated shoot proliferated on liquid media by new antivirtifying agents. *Journal of plant science* 73: 651-657.

Kavanagh, A.P. Drew and C. Maynard. 1991. The effect of culture vessel on micropropagated. In: Cell, and tissue culture in forestry. Vol. 1. General principles and biotechnology (Bonga J.M., and Durzun D.J.-eds), Matinus Nijhhoff, Dordrecht: 202-211.

Kevers, C. and T.H. Gaspar. 1986. Vitrification of carnation in vitro: change in water content, extracellular space, air volume and ion levels. Physiologie vegetale 24: 647-653.

Kervers, C. and T.H. Gasper. 1985. Soluble, membrane and cell wall perxidases, phenylalanine ammonialaysate, and legnin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro. Journal of plant physiology*, 118:41-48.

Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation causes, remedies and prospects. *Acta Horticulture*, 289: 283-290.

Pasqualetto, P.L., R.H. Zimmerman and I. Fordham, 1988. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro. Plant cell, tissue and organ culture,* 14: 31-40.

Werner, E.M. and A.A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Malling-7 apple rootstocks. *HortScience*, 15: 509-510.

Occurrence and recovery of vittrification in plant tissue culture

M.H.Assareh[1] *& M.J. Hennerty*[2]

Abstract

Vitrification (Hyperhydricity) is a problem which often occurs in *in vitro* culture of woody plants. Vitrified shoots are abnormally glassy, thick and translucent. The so-called vitreous plants appears turgid, watery at the surface, less green and easily breakable. During the study tissue culture of *Eucalyptus spp.*, vitrified leaves and tissue were mostly observed in E. *camadulensis* and *E. viminalis*. Type and concentration of gelling agents, vessel types and also antivitrification agents to overcome such physiological disorder were examined for both species. The percentage of water content of tissue with Phytogel was significantly more (88.22%) than tissue with agar (81.29). Moreover, shoots of *E. camadulensis* grown on medium with 7.0 gl^{-1} Bacto-agar exhibited low levels of vitrification. The antivitrifying agent EM2 statistically decreased vitrified shoots with higher concentration of agar in *E. camaldulensis*. Results also showed that there was no significant difference between effects of the two agar concentrations in *E. viminalis*, but the antivitrifying agent EM2 at 5.0 gl^{-1} significantly reduced vitrification in comparison with control. Despite the lower growth and proliferation of the micropropagated shoots on the medium supplemented with EM2, the shoots produced with high quality and most of them were free of any symptoms of vitrification.

Key Words: Tissue culture, Vitrification, Hyperhydricity, EM2, *Eucalyptus*

[1] - Research Institute of Forests & Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran.

[2] - Dept. of Crop Science, Horticulture & Forestry, Faculty of Agriculture, UCD, Dublin, Ireland.