جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ریزازدیادی پایهٔ بالغ و دانهال گونهٔ اکالیپتوس گلوبولوس (*Eucalyptus globulus*)

میترا امام*[1] و محمدحسن عصاره[1]
[1]عضو هیأت علمی مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
(تاریخ دریافت: ۹/ ۷ / ۸۸، تاریخ تصویب: ۱۱ / ۲ / ۸۹)

چکیده

اکالیپتوس گلوبولوس *blue gum* (*E. globulus*) از جمله گونه‌های مهم و تندرشد برای جنگلکاری و بهره‌برداری در صنایع چوب، کاغذ، تولید اسانس و عسل مرغوب است. با توجه به آنکه ناسازگاری عمل پیوند و رد آن و همچنین عدم ریشه‌زنی قلمه‌ها در بافت‌های بالغ مشکلاتی اساسی در اکالیپتوس‌هاست، تکثیر گیاه مزبور به‌کمک روش‌های ریزازدیادی در این تحقیق انجام گرفت. جوانه‌های رویشی جانبی از پایه‌های بالغ برگزیده در جنگل‌های شمال ایران و نیز دانهال‌های حاصل از بذر در فصول مختلف سال جمع‌آوری و با محلول‌های مختلف کلرور جیوه و هیپوکلریت سدیم در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت، بسته به فصل و ژنوتیپ گیاه ضدعفونی شدند. برای تشکیل شاخه از ریزنمونه‌های حاصل از پایهٔ بالغ و دانهال گونهٔ *E. globulus* اثر پنج تیمار هورمونی، شامل غلظت‌های مختلف از هورمون‌های سیتوکنین و اکسین (صفر تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر) در سه تکرار آماری با یک آزمایش واریانس بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. صفات مختلف از جمله طول شاخه، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخه، تجزیه و تحلیل شدند. مناسب‌ترین روش سترون‌سازی جوانه‌های پایهٔ بالغ، غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس در محلول کلرور جیوه ۰/۵ درصد به‌مدت ده دقیقه و در مورد جوانه‌های دانهال، استفاده از محلول کلرور جیوه ۰/۱ درصد، به‌مدت ۶ دقیقه و در فصل بهار بود. در مرحلهٔ شاخه‌زایی، تکثیر و رشد طولی مطلوب شاخه‌های حاصل از جوانهٔ پایهٔ بالغ، در محیط MS تغییریافته (نصف غلظت از عناصر غذایی پرمصرف) با هورمون‌های IAA و Zeatin به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. تشکیل شاخه از جوانهٔ دانهال در محیط دارای BAP ۰/۵ به‌همراه Kin ۰/۲، GA3 ۰/۱ و IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت. در مرحلهٔ ریشه‌زایی، شاخه‌هایی به‌طول یک و نیم سانتی‌متر از منشأ بالغ و دانهال، در محیط ۱/۴ غلظت از املاح پرمصرف MS و هورمون‌های اکسین تلفیقی NAA و IBA هریک به‌مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر دارای ریشه شدند. نهال‌های حاصل، پس از سازگاری تدریجی با شرایط گلخانه‌ای، با موفقیت در خاک جای گرفتند.

واژه‌های کلیدی: گلوبولوس، ریزازدیادی، کشت جوانه، بالغ، دانهال .

*نویسندهٔ مسئول: تلفن: ۰۲۱ ۴۴۵۸۰۲۸۲ Email: emam@yahoo.com

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه و هدف

اکالیپتوس‌ها درختانی تندرشد هستند و منشأ آنها استرالیا است که بالغ بر ۸۰۰ گونه و هیبرید را در بر می‌گیرند. اکالیپتوس گلوبولوس، نوعی درخت اقتصادی مهم، با ارزش تجاری فراوان است و برای تولید فیبرهای چوبی که به‌طور گسترده در صنعت کاغذ مصرف دارد، کشت می‌شود (جوانشیر، ۱۳۵۱). مهم‌ترین کاربرد دیگر چوب آن در تولید جعبه‌های بسته‌بندی صنعتی است. همچنین این گیاه به‌طور وسیعی برای تولید خمیر ریون (ابریشم مصنوعی) به کار می‌رود و برگ‌های آن اسانس تولید می‌کند. این درخت به‌عنوان سایبان و بادشکن و نیز در تولید گرده و عسل اهمیت دارد (جوانشیر، ۱۳۵۱). ناسازگاری عمل پیوند و رد آن و همچنین عدم ریشه‌زنی قلمه‌ها در بافت‌های بالغ از مشکلات اساسی در اکالیپتوس‌هاست (paton *et al.*, 1970)، بنابراین ریزازدیادی می‌تواند ابزار مهمی برای برنامه‌های اصلاحی و تجدید حیات جنگل باشد. زمانی که همشکل بودن گیاهان از نظر ژنتیکی مد نظر باشد، می‌توان از تعداد زیادی گیاهچهٔ کلون‌شده، برای تحقیقات جداکشتی[1] و فیزیولوژیکی استفاده کرد. در مورد گونهٔ گلوبولوس، اطلاعات در زمینهٔ تحقیقات درون شیشه‌ای در ایران وجود ندارد. Hartney (1980) تولید گیاهچه‌های گلوبولوس را از کشت بخش‌های دانه‌رستی این گونه گزارش کرد. Mascarehans *et al.* (1982) استقرار موفقیت‌آمیز گیاهچه‌های گلوبولوس را در شرایط درون شیشه از بخش‌های گرهی شاخه‌های جانبی درختان بالغ اظهار داشتند. تحقیقات Trindade *et al.* (1990) بر روی گلوبولوس نشان داد که مقادیر زیاد سیتوکنین در غلظت‌های کم اکسین برای افزایش ضریب تکثیر شاخه لازم است. Lakishma sita (1993) در دانهال‌های پنج سالهٔ این گونه در محیط دارای هورمون‌های NAA، Kin و BA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۱، طی چهار تا پنج هفته به شاخه‌های متعدد رسید. با توجه به اینکه این گونهٔ وارداتی، ارزش تجاری، صنعتی و اقتصادی دارد و در ایران در زمینهٔ تکثیر و انبوه‌سازی کلون‌های برگزیدهٔ آن اقدامی صورت نگرفته، طی تحقیق حاضر، امکان تکثیر و تولید انبوه گونهٔ مزبور از راه کشت بافت و با هر دو منشأ بالغ[2] و دانهال[3]، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

برداشت نمونه از گیاهان بالغ گلوبولوس در منطقهٔ چمستان نور و زاغمرز بهشهر در فصول مختلف سال انجام گرفت. ویژگی‌های گیاه‌شناسی پایهٔ بالغ چمستان و زاغمرز چنین است: قطر درخت ۵۰-۴۰ سانتی‌متر، ارتفاع ۲۰-۱۰ متر و سن گیاه ۳۰-۲۰ سال. شاخه‌ها در اندازه‌های ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری با قطر ۱ تا ۱/۵سانتی‌متر از درختان مزبور جدا شده و وارد مرحلهٔ پیش‌سترون‌سازی شدند: الف: برس‌کشی با مایع ظرفشویی؛ ب: برس‌کشی با محلول الکلی (اتانول ۷۰ درصد)؛ ج: قرار دادن نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در محلول الکلی (اتانول ۷۰ درصد)؛ د: شست‌وشوی نمونه‌ها با محلول‌های قارچ‌کش کاپتان ۰/۱ درصد و تیرام ۰/۵ درصد در زمان‌های متفاوت.

سترون‌سازی جوانه‌ها در زیر هود مخصوص کشت صورت گرفت. برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول‌کلرور جیوه ۰/۱، ۰/۵ و۰/۳ درصد به‌ترتیب در زمان‌های ۲ تا ۱۰ دقیقه برای غلظت‌های ضعیف و از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه برای کلرور جیوه ۰/۵ درصد استفاده شد. همچنین به‌طور معمول به‌همراه این محلول‌ها از چند قطره مایع ظرفشویی یا صابون مایع به‌عنوان عامل مرطوب‌کننده برای جلوگیری از تشکیل حباب روی سطح نمونه و نفوذپذیری بیشتر محلول سترون‌سازی استفاده شد. برای حذف این محلول‌ها در هر مرحله، جوانه‌ها سه بار با آب مقطر سترون‌شده شست‌وشو داده شدند. جوانه‌ها در آخرین مرحلهٔ شست‌وشو در آب حاوی اسید اسکوربیک سترون نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها اغلب حاوی یک یا دو جوانه و یک پایه به ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند. قبل از قرار دادن ریزنمونه در محیط، ۱ تا ۲ میلی‌متر از انتهای قاعدهٔ آن قطع شد. بذرهای اکالیپتوس از شرکت Kembell seed شهر Perth در جنوب غربی استرالیا تهیه شد. ضد عفونی بذر با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (۱ درصد کلر فعال) در زمان‌های متفاوت ۵،

1- Explant

2- Mature
3- Seedling

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱۰ و ۲۰ دقیقه انجام گرفت. علاوه بر آن، دانهال‌های یکساله از منشأ این بذرها نیز برای برداشت جوانه استفاده شدند. برای استریل جوانه‌های دانهال از تیمار کلرورجیوه ۰/۱ درصد در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ دقیقه استفاده شد. نمک‌های معدنی و ویتامین‌های MS (Murashige & Skoog, 1962) با ساکارز (۳ درصد) و آسکوربیک اسید ($100 mgl^{-1}$) به‌عنوان محیط پایه به‌کار گرفته شد. تیمارهای هورمونی مختلفی (T1-T5) برای تشکیل شاخه از جوانه استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مختلف برای تشکیل شاخه از جوانه

هرمون	BA	2ip	Z	Kin	TDZ	GA	IAA	IBA
۱	۰/۵	-	-	۰/۲	-	۰/۱	-	۰/۰۱
۲	-	۰/۵	-	-	۰/۰۲۵	۰/۱	-	۰/۰۱
۳	۰/۱	-	-	۰/۲	-	۰/۱	-	۰/۰۱
۴	-	-	۱	-	-	-	۰/۲	-
۵	-	۰/۵	-	۰/۲	-	۰/۱	-	۰/۰۱

محیط‌های کشت با ۶/۸ درصد آگار جامد شده و در شرایط فشار۱/۰۶ کیلوگرم / سانتی‌متر مربع به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس روشنایی) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در هر تیمار، ۳۰ ریزنمونه و سه تکرار آماری در نظر گرفته شد و نتایج چهار هفته بعد از کشت ثبت شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه در محیط نرم‌افزار آماری SAS و در قالب طرح فاکتوریل GLM بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و برای مقایسهٔ میانگین صفات مورد ارزیابی، از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد استفاده و نمودار آنها در Excel ترسیم شد. ضریب ازدیاد شاخه به‌صورت میانگین تعداد جوانه و شاخهٔ ایجادشده از هر جوانه برای هر ریزنمونه و در هر تیمار به‌دست آمد. برای رشد طولی شاخه، میانگینی از رشد طولی شاخه‌های ریزنمونه‌های هر تیمار در نظر گرفته شد. برای تعیین حد سبزینگی، داده‌ها از حالت کیفی به کمی تبدیل شد، به این ترتیب که اعداد یک تا چهار به‌ترتیب (یک: رنگ زرد قهوه‌ای؛ دو: رنگ سبز زرد؛ سه: رنگ سبز کمرنگ؛ چهار: رنگ سبز تیره) در نظر گرفته شد و میانگینی از حد سبزینگی برگ‌های ریزنمونه‌های هر تیمار به‌عنوان حد سبزینگی نمونه‌ها ثبت شد. در مرحلهٔ پیش‌تیمار ریشه‌زایی، شاخه‌ها به‌مدت یک ماه به محیط پایهٔ بدون هورمون منتقل شدند. برای شروع ریشه‌زایی، شاخه‌های با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از فاز پیش‌تیمار به محیط نیم غلظت از نمک‌های پرمصرف MS و غلظت‌های متفاوت از اکسین‌های شامل NAA و IBA از صفر تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط تاریکی و روشنایی اتاق رشد کشت شدند. برای دستیابی به ریشه‌های فعال دارای تارکشنده از محیط کشت MS مکمل دارای زغال فعال ۲/۵ گرم در لیتر و GA_3 ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. گیاهان حاصل، مراحل سازگاری را در گلخانهٔ تحقیقاتی با شرایط دمای ۲۰ درجهٔ روز و ۱۵ درجهٔ شب، طی کردند.

نتایج

پس از انجام تیمارهای مختلف استریل روی ریزنمونه‌های گیاه بالغ در تمام فصول سال، تیمار بهینهٔ استریل در هر فصل تعیین شد و بیش‌ترین درصد زنده‌مانی گیاه در فصل بهار به‌دست آمد. جدول‌های ۲ و ۴ بیانگر آن است که تیمار استریل بهینه برای جوانه‌های گلوبولوس از پایهٔ بالغ چمستان و زاغمرز، در فصل بهار در حالت پیش‌سترون‌سازی با غوطه‌وری جوانه‌ها در محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌دنبال آن برس‌کشی و شست‌وشوی نمونه‌ها با آب و مایع ظرفشویی و سپس سترون‌سازی نمونه‌ها با محلول

کلرورجیوه ۰/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه حاصل شد، به‌طوری که بیش‌ترین درصد زنده‌مانی با کمترین درصد آلودگی و نکروزه شدن جوانه‌ها برای هر دو ژنوتیپ در این تیمار به‌دست آمد. در تیمارهای مختلف شست‌وشو با قارچ‌کش‌های تیرام و کاپتان، استفاده از محلول کاپتان ضمن حذف نسبی آلودگی‌های قارچی از سطح بافت، موجب افزایش زنده‌مانی نمونه‌ها شد، به‌طوری که شست‌وشو با محلول کاپتان ۰/۱ درصد در زمان نیم ساعت در تلفیق با تیمار ضدعفونی با محلول کلرور جیوه در زمان ۱۰ دقیقه بیش‌ترین درصد استریل شدن نمونه‌ها و کمترین حد آلودگی را به‌همراه داشت (جدول ۴). استفاده از تیمارهای ضدعفونی دارای مرحلهٔ شست‌وشو با قارچ‌کش، منجر به کاهش آلودگی نمونه‌ها می‌شود، ولی با افزایش نکروزه شدن نمونه‌ها، زنده‌مانی آنها را کاهش می‌دهد (جدول‌های ۲ و ۴). تیمار بهینهٔ استریل جوانه‌های دانهال، تیمار کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۶ دقیقه بود. تیمار مناسب ضدعفونی بذرها شامل دو ساعت غوطه‌وری نمونه‌ها در آب جاری و سپس شست‌وشوی آنها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و پس از شست‌وشو با آب مقطر انتقال آنها به محیط پایهٔ MS بدون هورمون در شرایط استریل کشت بود. ریزنمونه‌ها از هر دو منشأ بالغ و جوان بررسی شدند. استقرار جوانه‌ها در محیط کشت MS، به تولید شاخه‌های ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متری طی چهار هفته منجر شد. تشکیل شاخهٔ اولیه از جوانه، در محیط دارای BA[1] ۰/۱ به‌همراه Kin[2] ۰/۲، GA3[3] ۰/۱ و IBA[4] ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. با توجه به رشد طولی نامناسب و کوتاه شدن میانگره‌ها (رزتی شدن) در بیشتر شاخه‌های دارای منشأ بالغ در محیط مزبور، از محیط کشت MS حاوی هورمون‌های IAA[5] و Zeatin (به‌ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان محیط کشت مکمل شاخه‌زایی برای نمونه‌های بالغ و برای تولید شاخه‌هایی با رشد طولی مناسب استفاده شد.

1- Benzyl-Amino-Purine
2- Furfuryl- Amino-Purine
3- Gibberelic Acid 3
4- Indole Butyric Acid
5- Indole Acetic Acid

شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان‌دهندهٔ تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر میانگین صفات سبزینگی، رشد طولی شاخه و ضریب ازدیاد در مورد نمونهٔ بالغ است که در مورد دو صفت اول از نظر آماری و در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (آزمون دانکن) و ابتدا در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Zeatin و IAA و پس از آن در محیط کشت دارای BA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، بیشتر از دیگر محیط کشت‌های استفاده شده بود. شکل‌های ۴ و ۵ بیانگر آن است که برای شاخه‌هایی از منشأ دانهال، تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر میانگین صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (آزمون دانکن) و در محیط MS حاوی هورمون‌های BA ۰/۵، Kin ۰/۲، GA3 ۰/۱ و IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر این میانگین‌ها بیش‌ترین حد خود را داشت. از طرفی در بین غلظت‌های مختلف هورمونی، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون، تأثیر بیشتری در افزایش تکثیر و رشد طولی شاخه‌ها داشت (شکل‌های ۶ و ۷). استفاده از محلول آنتی اکسیدانت اسید آسکوربیک، نقش موثری در حذف ترشحات فنلی نمونه‌ها در مراحل مختلف استقرار، رشد و تکثیر گیاه داشت. جدول ۵ نشان می‌دهد که ریشه‌زایی گیاهچهٔ گلوبولوس بر محیط ۱/۴ غلظت از املاح پرمصرف MS و هورمون‌های اکسین تلفیقی NAA[6] و IBA هریک به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (شکل ۸). استفاده از شرایط تاریکی به‌همراه تیمارهای هورمونی، تأثیر مثبتی بر افزایش ریشه‌زایی نسبت به تیمارهای مشابه در شرایط روشنایی نداشت. گیاهان حاصل برای طی مراحل سازگاری پس از انتقال به مخلوط خاک پیت : پرلیت: ورمیکولیت با نسبت ۲: ۰/۵ :۲ استریل در گلدان‌های سرپوش‌دار و در گلخانهٔ تحقیقاتی، به‌مدت دو ماه نگهداری شدند (شکل ۹) و سازگاری نهال‌ها حدود ۶۰ درصد بود.

6- Naphtalene Acetic Acid

جدول۲- تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد زنده‌مانی جوانه‌های گلوبولوس بالغ در فصل‌های مختلف

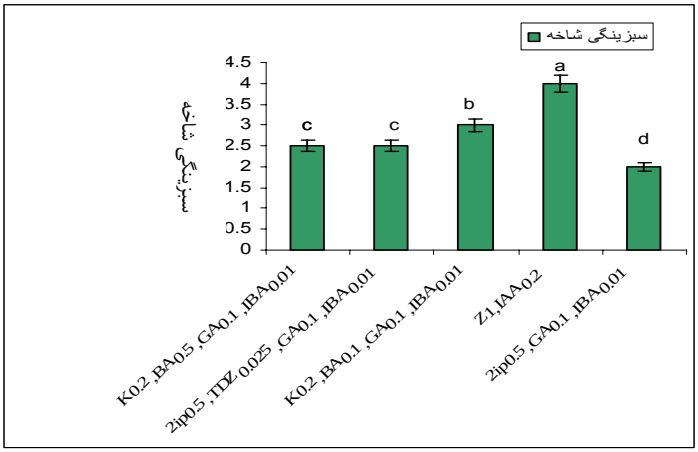
فصل نمونه‌برداری	تیمار استریل (درصد)	درصد زنده‌مانی جوانه	درصد آلودگی جوانه	درصد نکروزه شدن جوانه
بهار	کلرور جیوه ۰/۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه	۷۶	۲۴	صفر
تابستان	کلرور جیوه ۰/۵ به‌مدت ۱۲ دقیقه	۷۳	۱۸	۹
پاییز	کلرور جیوه ۰/۵ به‌مدت ۱۵ دقیقه	۲۶	۶۰	۱۴
زمستان	کلرور جیوه ۰/۵ به‌مدت ۲۰ دقیقه	۱۲	۶۲	۲۶

جدول۳- تأثیر تیمار استریل بر درصد زنده‌مانی جوانه از پایهٔ بالغ گلوبولوس در فصل بهار

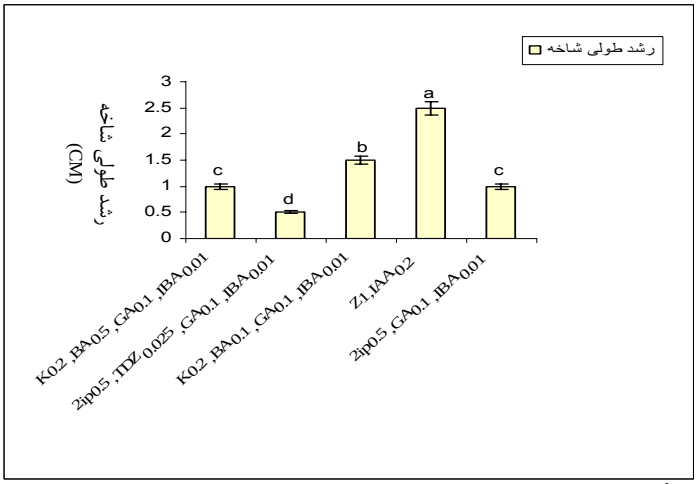
ژنوتیپ	تیمار کلرور جیوه (درصد)	زمان استریل (دقیقه)	درصد زنده‌مانی جوانه	درصد آلودگی جوانه	درصد نکروزه شدن جوانه
چمستان	۰/۳	۸	۱۰	۶	۸۴
چمستان	۰/۵	۱۰	۷۴	صفر	۲۶
چمستان	۰/۵	۱۵	۶۲	۳۲	۶
زاغمرز	۰/۳	۸	۴	۴	۹۲
زاغمرز	۰/۵	۱۰	۶۵	۱	۲۴
زاغمرز	۰/۵	۱۵	۴۲	۶	۵۲

جدول ۴- تأثیر نوع و غلظت قارچ‌کش بر درصد زنده‌مانی نمونه‌های بالغ گلوبولوس

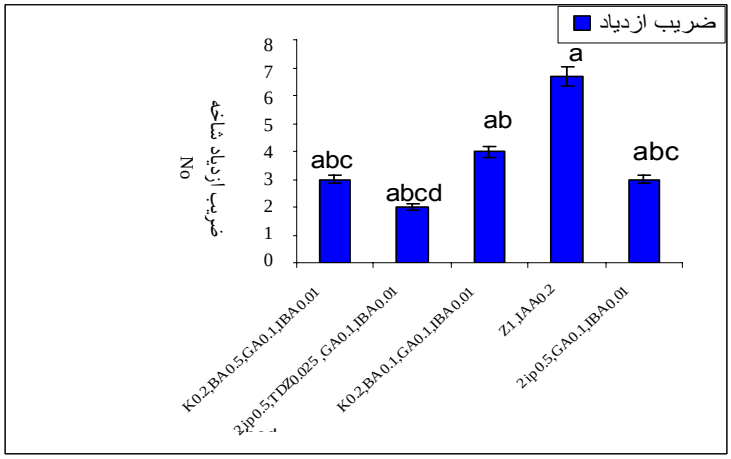
نوع قارچ‌کش و زمان کاربرد (۳۰ دقیقه)	تیمار کلرور جیوه (درصد)	زمان استریل (دقیقه)	درصد زنده‌مانی جوانه	درصد آلودگی جوانه	درصد نکروزه شدن جوانه
کاپتان ۰/۱ درصد	کلرور ۰/۵	۱۰	۵۰	۲۰	۳۰
کاپتان ۰/۱ درصد	کلرور ۰/۵	۱۲	۳۴	۱۵	۵۱
کاپتان ۰/۵ درصد	کلرور ۰/۵	۱۰	۲۴	۴۱	۳۵
کاپتان ۰/۵ درصد	کلرور ۰/۵	۱۲	۱۸	۳۷	۴۵



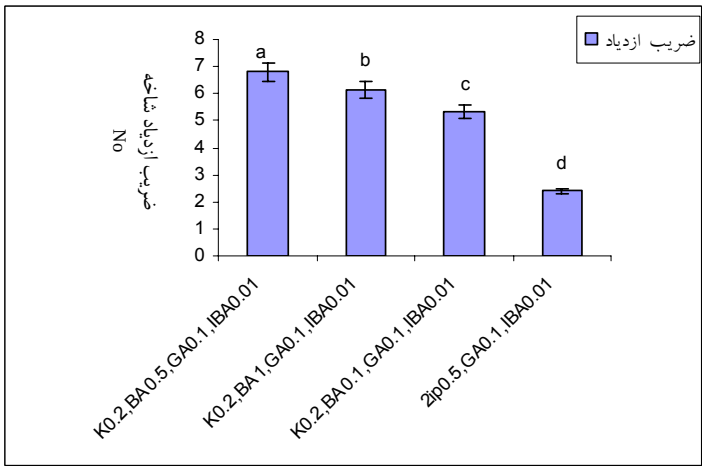
شکل۱- تأثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار میانگین‌های سبزینگی شاخهٔ گلوبولوس بالغ



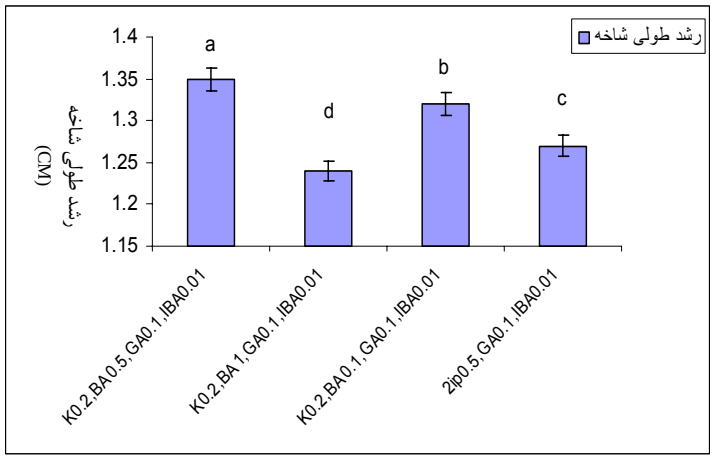
شکل ۲- تأثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار میانگین‌های رشد طولی شاخهٔ گلوبولوس بالغ



شکل۳- تأثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار میانگین‌های ضریب ازدیاد شاخهٔ گلوبولوس بالغ



شکل۴- تأثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار میانگین‌های ضریب ازدیاد شاخهٔ گلوبولوس از منشأ دانهال



شکل۵- تأثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار میانگین‌های رشد طولی شاخهٔ گلوبولوس از منشأ دانهال

جدول۵ - درصد ریشه‌زایی نمونه‌های گلوبولوس در تیمارهای مختلف هورمونی اکسین

تیمار هورمونی ریشه‌زایی	درصد بقای گیاهچه در محیط کشت	درصد ریشه‌دهی
IBA 0.5, NAA0	۹۰	۱۲
IBA 0.5, NAA0 و تیمار تاریکی	۷۰	۲۰
NAA 0.5, IBA0	۸۰	۲۸
NAA 0.5, IBA0 و تیمار تاریکی	۶۵	۳۲
NAA 0.5 و IBA 0.5	۱۰۰	۵۰
IBA 0.5, NAA0.5 و تیمار تاریکی	۹۰	۴۵

شکل۶- جوانهٔ رویشی گیاه

شکل۷ - تکثیر شاخه در محیط

شکل۸- گیاه ریشه‌دارشده در محیط کشت

شکل۹- نهال کشت بافتی در گلخانه

بحث

تیمار بهینهٔ استریل برای جوانه‌های پایهٔ بالغ *E. globulus* در این تحقیق، استفاده از محلول کلرور جیوهٔ ۰/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه در فصل بهار بود، در حالی‌که بهترین تیمار استریل جوانه‌های جانبی *E. gunni* و *E. viminalis* استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه بود (عصاره و سردابی، ۱۳۸۶). از طرفی در استریل ریزنمونه‌های اوجا، محلول ۰/۳ درصد کلرور جیوه به‌مدت ۱۲ دقیقه در ابتدای فصل زمستان مناسب بود (امام و همکاران، ۱۳۸۶). در این تحقیق، استفاده از محلول کلرور جیوه به‌جای محلول هیپوکلریت سدیم این حسن را داشت که در غلظت پایین‌تر و زمان مصرف کوتاه‌تر این محلول، می‌توان حداکثر زنده‌مانی با حداقل نکروزه‌شدهٔ جوانه‌ها را به‌دست آورد. محلول ضدعفونی‌کنندهٔ هیپوکلریت سدیم بر خلاف کلرور جیوه، بر افزایش ترشحات فنلی نمونه مؤثر است و درصد بقای ریزنمونه‌ها را کاهش می‌دهد (عصاره و سردابی، ۱۳۸۶). تغییرات فصلی نیز بر مقدار این ترشحات مؤثر است، به‌طوری که در بهار و تابستان مقدار این مواد کمتر و در فصل‌های پاییز و زمستان بیشتر است. تأثیر سن ریزنمونه و تغییرات فصلی توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (Gill & Gill, 1994). با توجه به زیاد بودن ترشحات فنلی نمونه‌ها که سبب کندی رشد و استقرار نمونه‌ها در محیط کشت می‌شد، استفاده از محلول آسکوربیک اسید به‌عنوان آنتی اکسیدانت، نقش مؤثری در برطرف کردن تأثیر منفی این ترشحات بر رشد و تکثیر گیاه داشت. امام (۱۳۸۴) از همین روش برای حذف ترشحات فنلی ریزنمونه‌های کیکم بهره جست. از طرف دیگر با افزایش آلودگی‌های سطحی گیاه در روند تغییر فصل از بهار تا زمستان، تغییر تیمارهای استریل از نظر افزایش غلظت محلول ضدعفونی و زمان کاربرد آن ضروری بود که این مسئله ضمن کاهش آلودگی‌های سطحی، بر بافت گیاه نیز تأثیر منفی گذاشت و سبب کاهش زنده‌مانی جوانه‌ها شد. استفاده از محلول قارچ‌کش کاپتان نیز ضمن حذف نسبی آلودگی‌های قارچی از سطح بافت، موجب افزایش نکروزه شدن و در نتیجه کاهش زنده‌مانی نمونه‌ها شد. استفاده از محلول قارچ‌کش کاپتان ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی‌های قارچی سطح نمونه‌ها در *E. gunni* توسط Assareh (1998) نیز گزارش شده است. محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه برای تعداد زیادی از گونه‌های اکالیپتوس در مرحلهٔ تکثیر و آغاز ریشه‌زایی استفاده می‌شود. Calderon (1994)، همانند تحقیق اخیر از این محیط، برای ریزازدیادی *E. globulus* استفاده کرد.

در محیط کشت MS، ترکیب BA به‌همراه IBA، سطح متعادل هورمونی را برای تکثیر سریع شاخهٔ گلوبولوس در کشت ایجاد کرد. علت این رخداد، ترکیبات فلاوونوئیدی در محیط کشت BA بود، زیرا این هورمون فعالیت آنزیم‌های پرکسیداز را که موجب تجزیهٔ ترکیبات فلاوونوئیدی می‌شود، تشدید می‌کند (Curir *et al.*, 1990) و از طرفی هورمون BA با افزایش تولید سیتوکنین داخلی، در افزایش شاخه‌زایی مؤثر است (Bennett *et al.*, 1994). بر اساس نتایج این تحقیق، ترکیبی از سیتوکنین‌های مختلف (BA و Kin) بر ضریب ازدیاد شاخهٔ دانهال تأثیر مثبت دارد و این مسئله توسط دیگر محققان نیز اثبات شده است، از جمله Lakishma sita (1993) با تلفیق (۰/۱ mgl^{-1}) BA و (۰/۵ mgl^{-1}) Kin در محیط MS افزایش رشد طولی و ازدیاد شاخه را برای *E. tereticornis* مشاهده کرد. در

بررسی اخیر، رشد طولی نامناسب شاخه‌های حاصل از کشت جوانهٔ پایهٔ بالغ گلوبولوس، با واکشت نمونه‌ها در محیط مکمل شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های Zeatin ۱ میلی‌گرم و IAA ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، برطرف شد. طویل شدن شاخه برای افزایش ریشه‌زایی نیز، اجتناب‌ناپذیر است و روش‌های مختلف برای رسیدن به این هدف به‌کار می‌رود، از جمله افزودن هورمون GA3 و حذف هورمون اکسین در محیط کشت تکثیر (Bennett *et al*., 1994)، حذف یا کاهش BA و افزودن Zeatin در غلظت ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر (Warrag *et al*., 1990). در این تحقیق شاخه‌های پایه‌های بالغ علاوه بر آنکه در محیط مکمل شاخه‌زایی دارای رشد طولی مناسب شدند، در گذر از محیط مزبور ریشه‌های بیشتری تولید کردند و تا عبور از فاز ریشه‌زایی سالم ماندند. به‌نظر می‌رسد تحریک ریشه‌زایی با تولید فلاوونوئیدهای خاص، به‌دلیل تأثیر سیتوکنین محیط تکثیر شاخه (زاتین یا کینتین) است. این ترکیبات احتمالاً حساسیت ریزقلمه‌ها را به اکسین افزایش می‌دهند و در نتیجه سبب تولید ریشه‌های نابجا می‌شوند (Curir *et al*., 1990). ریشه‌ها در محیط ۱/۴ غلظت از املاح پرمصرف و اکسین IBA و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ریشه دادند و درصد این ریشه‌زایی حدود ۵۰ بود. استفاده از غلظت کمتر املاح پرمصرف در محیط کشت با کاهش توانایی اسمزی آن، در افزایش القای ریشه‌زایی گیاه مؤثر بود و افزایش هورمون اکسین از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر، به افزایش ریشه‌زایی گیاه انجامید. جدول ۴ نمایانگر نتایج مربوط به ریشه‌زایی شاخه‌های پایهٔ بالغ است. Joshi *et al*. (2003) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ریشه‌زایی بر هیبرید گیاه را به‌دست آوردند.

منابع

امام، میترا، شکوفه شهرزاد و طیبه سهیلا نراقی، ۱۳۸۶. تکثیر درون شیشه‌ای اوجا *Ulmus carpinifolia* از طریق کشت جوانه، فصلنامهٔ تحقیقات ژنتیک گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۳(۵۱): ۳۷-۱.

امام، میترا، ۱۳۸۴. ریزازدیادی کیکم *Acer cineracense* با کشت سرشاخه‌ای. فصلنامهٔ تحقیقات ژنتیک گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵(۴): ۳۰۴-۲۹۶.

جوانشیر، کریم، ۱۳۵۱. اوکالیپتوس، انتشارات دانشگاه تهران، ۴۳۴ ص.

عصاره، محمدحسن و حسین سردابی، ۱۳۸۶. اکالیپتوس، شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین، جلد اول، انتشارات مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۶۷۲ ص.

Assareh, M.H., 1998. *In vitro* culture plant regeneration through organogenesis, somatic embryogenesis and photoautotrophic micropropagatiion of some *Eucalyptus*. National university of Ireland, PhD thesis, 200 pp.

Bennett, I.J., J.A. McComb, C.M. Tonkin & D.A.J. Mcdavid, 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *globulus* Labill, Manual of Botany.

Calderon, X.V., 1994. Influence of calcium and gibberelic acid on *in vitro* adventitious shoot growth in *Eucalyptus globules*. Bosque, 15 : 33-38.

Curir, P., V. Sumerect & A. Termini, 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii Hook* micropropagated through axillary bud stimulation, *Plant Physiology*, 92: 1148-1153.

Gill, S.S. & R.I.S. Gill, 1994. Induction of embryo like structures in *Eucalyptus tereticornis*. *Advances in plant science*, 7: 159-162.

Hartney, V.J., 1980. Vegetative propagation of the Eucalyptus, *Australian forestry Research*, 10: 191-211.

Joshi, J., P. Bisht & K. Sharma, 2003. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus grandiS*, *E. tereticornis*, *Silvae Genetica*, 52: 110-113.

Lakishma sita, G., 1993. Micropropagation of *Eucalyptus* . In: Micropropagation of woody plants. M.R. Ahuja. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. Lerch, K., 1981. Copper monnooxygenases: Tyrosinase and dopamine B-monooxygenase. In: Metalions in Biological system. (Siegel, H., Ed.). Marchel Dekker Inc., New York: 143-186.

Mascarehans, A.F., S. Hazra, U. Potdar & P.K. Gupta, 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In*:* cell & tissue culture in forestry, V3, 1987. Bonga. D.X.Y. Durzan.

Murashige, T & F. Skoog, 1962. A revised medium for growth and bioassays with *Tobbaco* tissue culture, *Physiology Plant*, 15: 443-497.

Paton, D.M., R.R., Willing, W. Nicolis & L.D. Pryor, 1970. Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: A rooting inhibitor in adult tissue, *Australian Journal of Botany*, 18: 175- 183.

Trindade, H.J., G. Ferreira, M.S. Pais & R. Aloni, 1990. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *E. globulus* grown *in vitro*, *Australian Forestry*, 53(3): 221-223.

Warrag, E.I, M.S. Lesney & D.L. Rockwood, 1990. Micropropagation of field tested superior *E. grandis* hybrids, *New forests*, 4: 67-79.

Micropropagation of mature and seedling specimen of *Eucalyptus globulus*

M. Emam[*1] and M.H. Assare[1]
[1]Member of scientific board of Research Institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran
(Received: 31 November 2009, Accepted: 1 May 2010)

Abstract
Eucalyptus globulus is one of the most important and fast growing species used in afforestation for wood and paper industries, essence and honey production. Due to the graft process incompatibility, as well as hard proliferation of roots in adult tissues, in this study the plant reproduction has been carried out through micropropagation methods Vegetative lateral buds were collected from selected adult and seedling in northern forests in different seasons and disinfected with seveal solutions of mercury chloride and sodium hypochlorite in different concentrations and times intervals depending on season and plant genotype. Then, the effects of five hormonal treatments, including different concentrations of cytokinins and auxines (0 to 1 mgl^{-1}) on developing branches from micropropagation and seedling buds were studied in three replicated experiments with an statistical variance analysis based on a completely randomized design. Different characteristics such as shoot length, proliferation and greenish coefficient of shoot were measured. The most appropriate method of sterilization was immersion of buds in solution of 70% ethanol for 30 seconds and then in 0.5 % mercury chloride solution for 10 minutes in spring for mature specimen buds and 0.1 % mercuric chloride solution for 6 minutes in spring for seedling buds. The best proliferation of shoots from mature buds was achieved in MS medium (half strength Nitrate) containing 1 mgl^{-1} Zeatin and 0.2 mgl^{-1} IAA and for shoots from seedling buds was occurred at the same medium containing 0.5 mgl^{-1} BAP, 0.2 mgl^{-1} Kin, 0.1 mgl^{-1} GA3 and 0.01 mgl^{-1} IBA. Root germination in shoots with a length of 1.5 cm from the mature and seedling sources occurred in 1.4 concentration medium of MS macro elements and 0.5 mgl^{-1} of combined auxin hormones of NAA and IBA. After gradual adaptation of plantlets under greenhouse conditions, they were transferred and established successfully in soil.

Key words: *Eucalyptus globulus*, Micropropagation, Bud culture, Mature, Seedling.

[*]Corresponding author Tel: +98 21 44580282 Email: emam@yahoo.com