جهت تهیه فایل WORD 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

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۲۲۴-۲۱۱ (۱۳۹۳)

بررسی دو روش ریزازدیادی مرسوم و فتواتوتروفیک در گونه *Eucalyptus maculata*

منصوره صداقتی*[۱]، میترا امام[۲]، عباس قمری‌زارع[۳]، محمدحسن عصاره[۴] و خدیجه کیارستمی[۵]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، فیزیولوژی گیاهی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست الکترونیک: sedaghati@rifr-ac.ir
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۴- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۵- دانشیار، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۸

چکیده

گونه *Eucalyptus maculata* جزو درختان سریع‌الرشد سازگار به شرایط آب و هوایی ایران است و در جنگل‌کاری، مصارف صنعتی و دارویی اهمیت دارد. در این مطالعه، تکثیر گونهٔ مذکور به روش‌های درون‌شیشه‌ای فتواتوتروفیک و درون‌شیشه‌ای مرسوم انجام و کارایی این دو روش مقایسه شد. به این منظور، جوانه‌های انتهایی گیاهک‌های جوان به‌عنوان ریزنمونه انتخاب گردیدند. تعدادی از این ریزنمونه‌ها برای ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای مرسوم انتخاب و به محیط کشت پایه MS نصف غلظت نیترات با تیمارهای هورمونی مختلف در شرایط استریل منتقل شدند. تعدادی نیز برای روش درون‌شیشه‌ای فتواتوتروف به ظروف Magenta (G7) حاوی ۷۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS نیم‌قدرت فاقد قند و آگار با ورمیکولایت انتقال یافتند و میزان تبادل گازی ظروف Magenta (G7) با فضای بیرون و درون با تعداد فیلترهای متفاوت بررسی شد. پس از یک ماه، در ریزازدیادی مرسوم، در مرحله شاخه‌زایی برای تعداد شاخه، تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (با میانگین ۲/۵۲ عدد شاخه) و برای طول شاخه تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (با میانگین ۲/۰۷cm) مناسب بود. بهترین تیمار ریشه‌زایی نیز تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (با میانگین ۱/۶۲ عدد) بود. در شرایط فتواتوتروفیک، نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد نشان داد که بین تیمارهای فیلتری اختلاف معنی‌داری نبود، ولی تیمار ۴ فیلتر در وضعیت بهتری بود. البته روش فتواتوتروفیک نسبت به ریزازدیادی مرسوم مناسب‌تر بود. در نهایت نهال‌های حاصل به گلخانه و بعد از طی مراحل سازگاری با موفقیت به خاک منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس، ریزازدیادی، فیلتر، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی.

مقدمه

اکالیپتوس، درختی جنگلی است که بیش از ۴ میلیون هکتار در ۵۸ کشور دنیا را تحت پوشش خود درآورده است (Merkle & Dean, 2000). در حال حاضر توسعه کشت گونه‌های مختلف اکالیپتوس برای جنگل‌کاری و بهره‌برداری در صنایع چوب و کاغذ و سایر کاربردها، در

جهت تهیه فایل WORD 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

سرتاسر جهان رو به افزایش است. گونه‌های اکالپتوس، درختانی دگرگشن هستند و دورگ‌گیری طبیعی بین گونه‌ای سبب تفرق صفات بسیاری در نسل‌های بعد می‌گردد، بنابراین برای حفظ ویژگی‌های برتر، از فنون ریزازدیادی در جهت ازدیاد سریع گونه‌ها و واریته‌های آن استفاده می‌شود. تکثیر این گیاه از طریق بذر به دلیل تفاوت‌های وسیع ژنتیکی با گیاهان مادری مناسب نبوده و از طرفی تولید غیرجنسی این گیاه با استفاده از روش‌های معمول مشکل و یا غیرممکن است. بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین برای تکثیر این گونه امری ضروریست (Assareh, 2000).

زیست‌فناوری گیاهی فرصت‌های فوق‌العاده‌ای را برای رشد سریع و پیشرفت علم فراهم آورده است. ریزازدیادی یا تکثیر و تولید انبوه گیاهان، یکی از مهمترین و موفقیت‌آمیزترین کاربردهای زیست‌فناوری است. از دیگر مزایای آن، تکثیر سریع کلن‌ها، حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی، محیط کنترل شده و شرایط سترون از نظر کنترل آلودگی است (Moini & Kahrizi, 2003). استفاده از شیوه‌های معمول کشت درون‌شیشه‌ای به‌منظور ریزازدیادی گیاهان باغی، زراعی، جنگلی و مرتعی با بهره‌گیری از روش‌های اندام‌زایی و جنین‌زایی بدنی کاربرد فراوانی دارد. اما این روش‌ها به دلیل هزینه‌های گزافی که به واسطه آنها در طی مراحل مختلف ریزازدیادی، از مقدماتی تا نهایی و نیز در طی تکثیر تجارتی بر تولیدکنندگان وارد می‌شود، به نوعی با محدودیت روبرو هستند (Assareh & Sabaghzade, 2003). در بررسی‌های Kozai و همکاران (۱۹۸۸)، دلایل متعددی را در مورد تلفات گیاهان تولید شده در مراحل مختلف کشت بافت به روش معمول گزارش نمودند. از دست دادن ۲۰ تا ۵۰٪ گیاهان به دلیل عدم تحمل تنش‌های محیطی بعد از انتقال به خاک، پایین بودن میزان فتوسنتز به دلیل کاهش فعالیت روبیسکو و متابولیسم ناقص، تعرق شدید از لایه‌های نازک کوتیکول، فعالیت غیرطبیعی روزنه‌ها، ریشه‌زایی ناقص و شیشه‌ای شدن گیاهک‌ها از موارد ذکر شده در این گزارش بود.

البته کشت در ظروف دربسته را برای تبادل گازی و جلوگیری از آلودگی و ممانعت از خروج رطوبت را Hew و همکاران (۱۹۹۵) در کشت بافت مناسب ندانستند. از دیگر محدودیت‌های ریزازدیادی به روش معمول، می‌توان به وقوع جهش‌های پی‌درپی اشاره کرد که به‌ویژه در هنگام استفاده از جوانه نابجا و کالوس رخ می‌دهد، البته آلودگی‌های داخلی و خارجی، شیشه‌ای شدن، تراوش مواد سمی و ترکیبات فنلی در محیط کشت، افزایش اتیلن و دیگر گازهای نامناسب نیز بر کیفیت رشد اثر نامناسب دارند (Assareh & Sardabi, 2007). برای غلبه بر مشکلات ذکر شده در ریزازدیادی به روش معمول، روش جدید ریزازدیادی فتواتوتروفیک مطرح شد که عبارت از تکثیر درون شیشه‌ای گیاه در شرایطی مانند افزایش غلظت CO_2، شدت‌های بالای نور و محیط کشت فاقد ساکارز است (Assareh & Sabaghzade, 2003; Assareh, 2002). دی‌اکسیدکربن یکی از عوامل بسیار مؤثر در افزایش رشد گیاهان در شرایط فتواتوتروفیک است. کاهش میزان جهش، پایین بودن احتمال آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و افزایش زنده‌مانی گیاهان در زمان انتقال به خاک به علت عدم استفاده از هیدرات کربن در محیط کشت، از مزایای این روش به‌شمار می‌روند (Assareh & Sabaghzade, 2003).

شرایط بهینه گازی و ترکیب غذایی برای تکثیر برخی گونه‌های اکالیپتوس در شرایط فتواتوتروفیک را Assareh (۲۰۰۱) گزارش نمود. ریزازدیادی گونه *E. uro-grandis* در سه نوع ظرف کشت MP-PFA (Miracle Pack- fluorocarbon polymer film)، MP-OTP (Miracle Pack- OTP® film) و Vitron (Lower-cost OTP® film made of TPX and CPP) تحت تأثیر CO_2 غنی شده، PPFD (Photosynthetic photon flux density) پایین و فقدان قند با استفاده از اسفنج رزینی فنل (Phenol resin foam) به عنوان گهرمایه (Substrate)، توسط Tanaka و همکاران (۲۰۰۵) مورد بررسی گرفت. بهترین رشد و کیفیت در ظروف Vitron مشاهده شد. در همین رابطه Kozai و Kubota (۲۰۰۱)

جهت تهیه فایل WORD 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

مزایای ریزازدیادی فتواتوتروفیک در ظروف کشت با اندازه‌های متفاوت و تهویه مناسب را برای گیاهان چوبی از قبیل آکاسیا (*Acacia mangicum*)، قهوه (*Coffea arabusta*) و اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) شرح دادند. در ریزازدیادی فتواتوتروفیک بر روی *E. camaldulensis* در حضور CO_2 غنی شده و نشده با چهار ماده نگهدارنده ماتریکس- آگار، ماتریکس- ژلرایت، پلاستیک خالص و ورمیکولایت، رشد و میزان فتوسنتز خالص اکالیپتوس در شرایط CO_2 غنی‌شده به طرز معنی‌داری افزایش یافت و رشد و درصد زنده‌مانی در ورمیکولایت در شرایط CO_2 غنی‌شده نسبت به سایر تیمارها بهتر بود (Kirdmanee *et al.*, 1995). گونه *E. maculata* از نظر ترکیبات شیمیایی اسانس با سایر گونه‌ها تفاوت فاحشی دارد و با بیش از ۵۰٪ ترکیبات سیترونلی می‌تواند منبع مناسبی برای تولید این ماده باشد که ضمن اثرات ضدباکتریایی در صنایع عطرسازی نیز مصرف فراوانی دارد (Bigdeli, 1995).

به این ترتیب، در این پژوهش برای اولین بار در جهان، امکان تکثیر درون‌شیشه‌ای گونه درختی *E. maculata* و همچنین در شرایط فتواتوتروفیک با ظروف کاشت دارای تعداد فیلترهای متفاوت (۱، ۲ و ۳ فیلتر)، مورد بررسی قرار گرفت. البته رسیدن به روشی کاربردی برای تکثیر غیرجنسی و انبوه این گونه، بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و مقایسه این دو روش ریزازدیادی از دیگر اهداف این پژوهش بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: بذرهای گونه *E. maculata* از شرکت Kembell seed ایالت Perth در جنوب‌غربی استرالیا تهیه شد. بذرهای سالم جدا و پس از قرار گرفتن در زیر آب جاری به مدت دو ساعت و شستشو با الکل ۷۰٪، توسط محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد حجم در تیمارهای زمانی مختلف (۱۵، ۱۳ و ۱۰ دقیقه) سترون شدند. سپس با حفظ شرایط استریل در محیط هورمونی مناسب (MS نصف غلظت نیترات حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA) در حضور آگار مستقر شد. در فواصل زمانی یک تا چهار ماه بازکشت شدند و پس از تولید تعداد کافی شاخه برای کشت در شرایط ریزازدیادی مرسوم و فتواتوتروف، مورد استفاده قرار گرفتند. از شاخه‌های سالم (shoot tip) حاصل از ریزازدیادی دانه‌رست گونه *E. maculata* با طول متوسط ۲±۲۵ میلی‌متر به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد.

شرایط ریزازدیادی مرسوم: شش تیمار هورمونی شاخه‌زایی با محیط کشت پایه MS نصف غلظت نیترات (pH ۵/۸ –۵/۷)، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۶/۸ گرم در لیتر آگار آماده شد (جدول ۱). کلیه مواد، ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰–۲۵ دقیقه اتوکلاو گردید. ریزنمونه‌ها در تیمارهای مذکور در ۴ تکرار و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) کشت شدند. سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۵۲۵۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. پس از ۲۰ روز پارامترهای رشد شامل رشد طولی (سانتی‌متر)، تعداد شاخه، تعداد جوانه و شدت سبزینگی ثبت گردید. با توجه به اینکه سبزینگی شاخصی کیفی است به شاخص کمی تبدیل شد. برای تعیین میزان شدت سبزینگی از اعداد ۰– ۴ استفاده شد که صفر: زرد و چهار: سبز پررنگ و شاداب در نظر گرفته شد. بقیة طیف‌های بین زرد تا سبز پررنگ نیز شماره‌های بینابینی گرفتند.

در مرحله بعد شش تیمار هورمونی ریشه‌زایی آماده گردید (جدول ۲) که شاخه‌های ریزازدیادی شده در قطعات ۱۵–۲۰ میلی‌متری انتخاب و به محیط‌کشت پایه MS با نصف غلظت نیترات (pH ۵/۸ –۵/۷)، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۶/۸ گرم در لیتر آگار منتقل و در اتاق رشد با شرایط مذکور نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها در تیمارهای مذکور در ۴ تکرار و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) کشت شدند. آنگاه پس از گذشت ۲ ماه پارامترهای ریشه‌زایی شامل رشد طولی ریشه،

تعداد ریشه، وجود و عدم وجود تارهای‌کشنده روی ریشه ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وجود و عدم وجود تارکشنده از اعداد صفر: عدم وجود تارکشنده و یک: وجود تارکشنده استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای مختلف شاخه‌زایی ریزازدیادی مرسوم بر *E. maculata*

تنظیم کننده رشد تیمار	اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)			سیتوکینین (میلی‌گرم بر لیتر)		
	IBA	BA		TDZ	Kin	2ip
	۰/۰۱	۰/۱	۰/۳	۰/۵	۰/۰۱	۰/۲	۰/۵
T1	+	−	−	+	−	+	−
T2	+	−	+	−	−	+	−
T3	+	+	−	−	−	+	−
T4	+	−	−	−	+	−	+
T5	+	−	−	+	−	−	+
T6	+	−	+	−	−	−	+

جدول ۲- تیمارهای محتلف ریشه‌زایی ریزازدیادی مرسوم بر *E. maculata*

تنظیم‌کننده رشد تیمار	اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)					
	IBA			NAA		
	۰/۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۵	۱
I	−	+	−	−	−	−
II	+	−	−	−	−	−
III	−	−	+	−	−	−
IV	−	−	−	+	−	−
V	−	−	−	−	+	−
VI	−	−	−	−	−	+

شرایط فتواتوتروفیک: الف) آماده‌سازی ظروف- برای کشت از ظروف کشت Magenta (G7) با حجم ۳۴۰ میلی‌لیتر استفاده شد. برای بررسی اثر تعداد و مکان فیلتر (تبادل هوای سترون) بر روی ظروف، از فیلترهای غشایی با جنس پلی‌پروپیلن به قطر ۸ میلی‌متر و با قطر منافذ ۰/۰۲ میکرومتر استفاده شد. از سه روش فیلترگذاری شامل: ۱- یک فیلتر در درپوش، ۲- دو فیلتر در دیواره‌های جانبی و یک فیلتر در درپوش، ۳- چهار فیلتر در دیواره‌های جانبی استفاده شد. ریزنمونه‌ها در ۵ تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) قرار گرفتند. هر ظرف حاوی ۷۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS نیم قدرت بدون قند، بدون آگار و حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. از ورمیکولایت (۱۴گرم) به‌عنوان بستر استفاده شد و pH محیط کشت قبل از اتوکلاو بر روی ۵/۸ تنظیم گردید. تمامی کشت‌ها به مدت شش هفته در اتاقک رشد مجزا، اتاق رشدی در شرایط تغذیه غیرمستقیم CO_2 به میزان

۳۰۰۰±۱۰۰ppm (فتواتوتروفیک) با دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، در روز و ۲ ±۱۹ درجه سانتی‌گراد در شب با رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد، شدت نور ۵۰۰±۵۲۵۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت نور روزانه قرار گرفتند. برای جبران آب تبخیر شده هر هفته ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به ظروف کشت اضافه شد.

ب) تجزیه و تحلیل رشد- در پایان هفته ششم پس از کشت، طول گیاهچه، تعداد شاخه، تعداد ریشه، وزن تر و خشک، تعداد و سطح برگ و میزان کلروفیل اندازه‌گیری شد. سطح برگ با استفاده از دستگاهLeaf Area Meter و میزان کلروفیل نیز با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Cecil 2000 اندازه‌گیری شد.

انتقال گیاهچه‌ها به گلدان: شاخسارهای ریشه‌دار شده بعد از شستن کامل ریشه از محیط کشت به گلدان‌های حاوی پیت، پرلیت و ورمیکولیت (به نسبت ۴:۱:۴) منتقل شدند. برای حفظ صد در صد رطوبت در اطراف آنها از سرپوش پلاستیکی استفاده شد و پس از یک ماه، سرپوش‌ها سوراخدار شده و به‌تدریج بعد از سه ماه، سازگاری کامل با شرایط گلخانه بوجود آمد و زنده‌مانی آنها بررسی شد.

بررسی‌های آماری: آزمایش‌ها در دو روش مجزا (فتواتوتروفیک و ریزازدیادی مرسوم) و هر یک از نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (۱۹۹۸) تجزیه و تحلیل، و میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند. همچنین برای مقایسه دو روش ریزازدیادی (مرسوم و فتواتوتروفیک) از آزمون Tجفت نشده استفاده شد.

نتایج

شرایط ریزازدیادی مرسوم: بهترین روش سترون‌سازی بذر، قرار گرفتن بذرها به مدت ۲ ساعت در زیر آب جاری و ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ حجم با ۶۱٪ میزان استقرار بود.

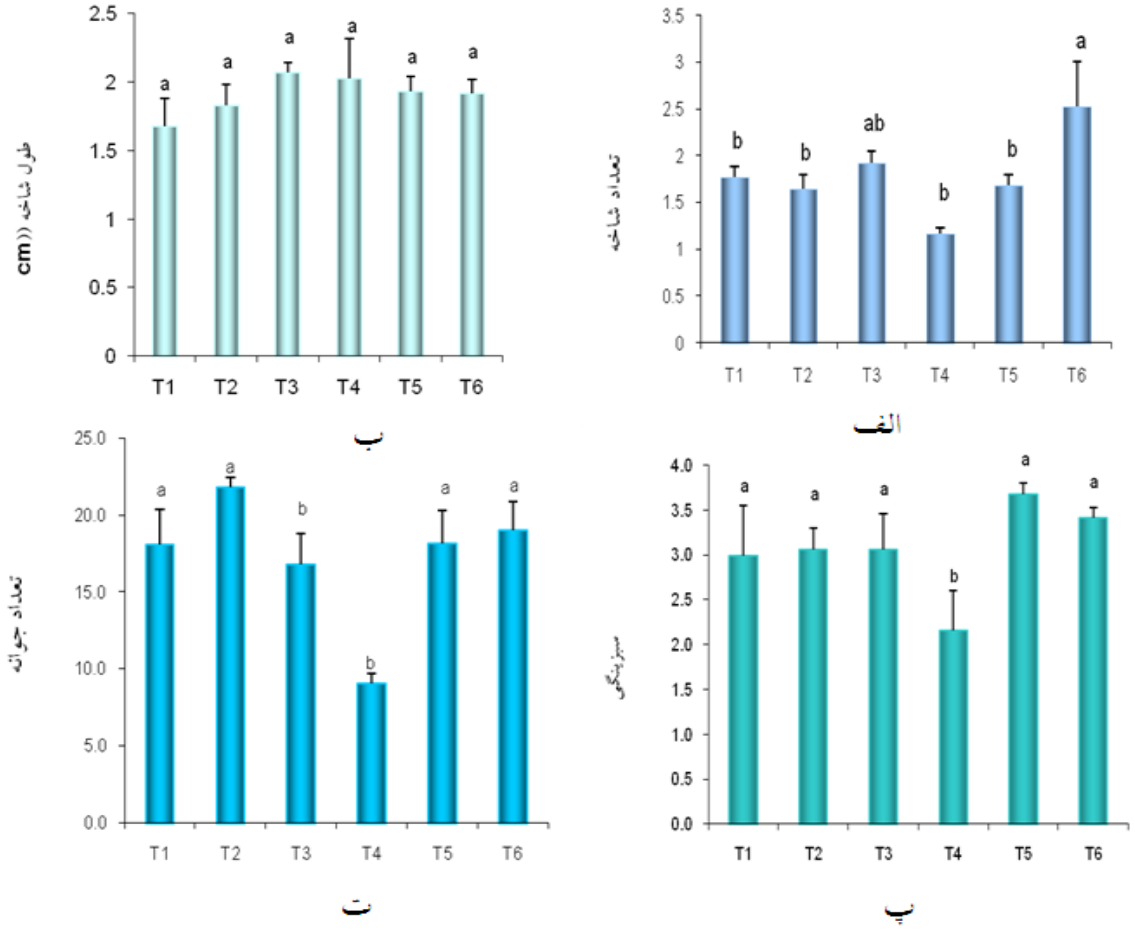
تیمار هورمونی (T6) ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بجز با تیمار هورمونی (T3) ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌دار شاخساره بیشتری تولید نمود (شکل ۱- الف). البته تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بکاررفته بر رشد طول شاخه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۱- ب). شدت سبزینگی در محیط (T5) ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نسبت به سایر تیمارها سبزتر و شاداب‌تر بود، و از نظر آماری برتر از تیمار هورمونی (T4) ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود (شکل ۱- پ). در تولید بیشترین تعداد جوانه نیز تیمار هورمونی (T2) ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA حداکثر تعداد جوانه را داشت (شکل ۱- ت).

شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با میانگین ۱/۶۲ در مقایسه با محیط کشت‌های دارای ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بطور معنی‌داری تعداد ریشه بیشتری تولید نمود (شکل ۲- الف). همچنین محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA از نظر طول ریشه اصلی با محیط کشت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA اختلاف معنی‌دار داشت (شکل دوم- ب) و از نظر وجود تارهای‌کشنده نیز با محیط کشت‌های دارای ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به طور معنی‌دار اختلاف مشاهده شد (شکل ۲- پ). البته بین تیمارها از نظر تعداد ریشه فرعی تفاوت آماری مشاهده نشد اما محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA(با میانگین ۳/۹) حداکثر ریشه فرعی را تولید نمود (شکل ۲- ت).

شرایط فتواتوتروفیک: در تیمارهای فیلتری از نظر شاخص‌های رشد (طول گیاهچه، تعداد شاخه، تعداد ریشه، وزن تر و خشک، تعداد و سطح برگ و میزان کلروفیل) تفاوت آماری مشاهده نشد ولی در طول شاخه، تعداد برگ، وزن تر، وزن خشک و میزان کلروفیل تیمار ۴ فیلتره در

وضعیت بهتری نسبت به سایر تیمارها بود (شکل ۳- الف، ت؛ شکل ۴- الف، ب). از نظر تعداد شاخه و سطح برگ تیمار سه فیلتره حداکثر رشد را نشان داد (شکل ۳- ب، پ).

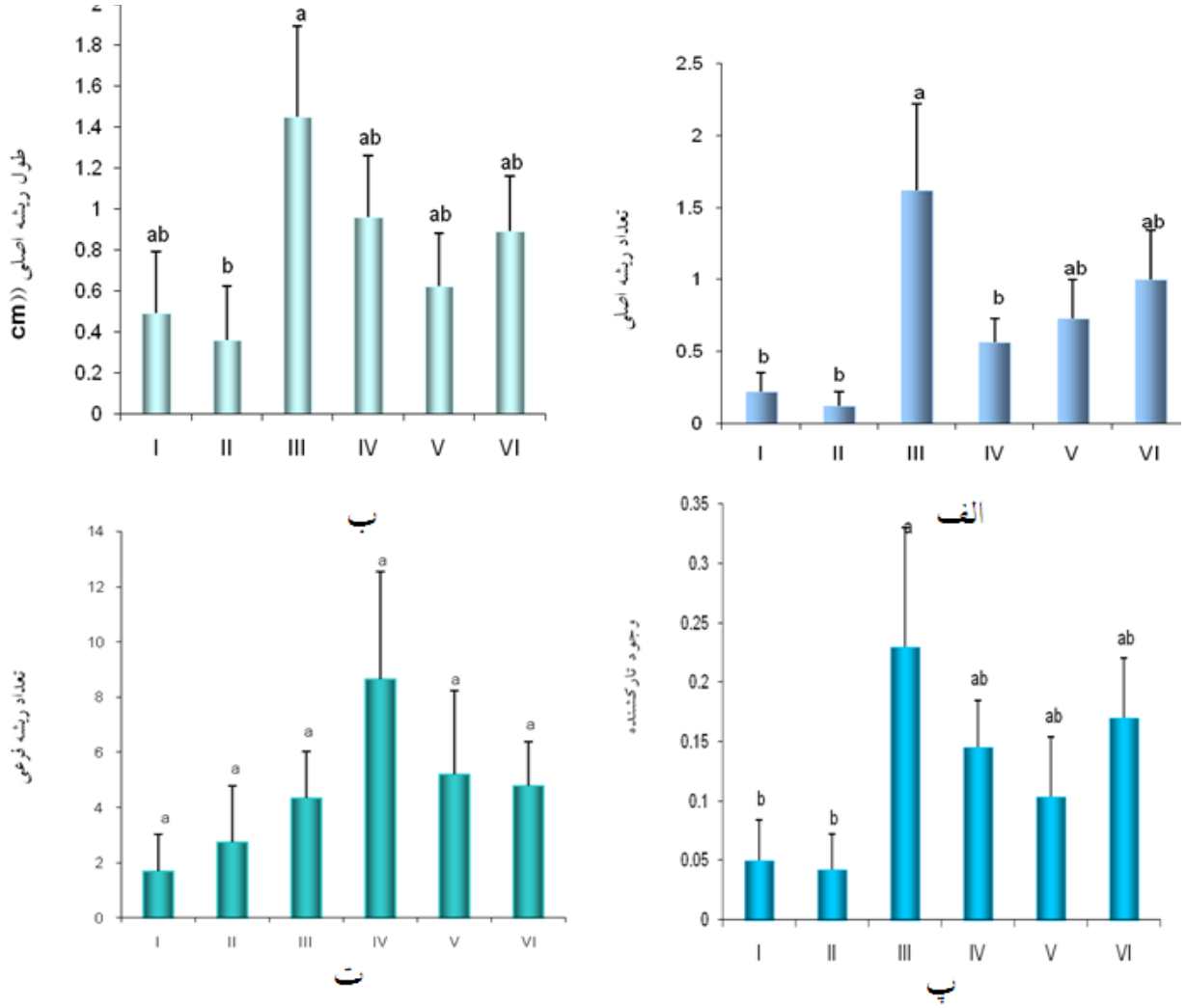
برای مقایسه دو روش ریزازدیادی (مرسوم و فتواتوتروفیک) از آمون Tجفت نشده استفاده شد و پارامترهای رشد شامل طول و تعداد شاخه، سطح و تعداد برگ و تعداد ریشه تجزیه آماری شده و با هم مقایسه گردیدند. مشاهده شد که بین دو روش در شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار وجود داشت که روش فتواتوتروفیک در برخی شاخص‌های رشد ازجمله سطح برگ، طول شاخه (P<۰/۰۱) و تعداد ریشه (P<۰/۰۵) نسبت به ریزادیادی مرسوم اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۳- شکل ۵).



شکل ۱- اثر تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر ویژگی‌های مختلف شاخه‌زایی در روش ریزازدیادی مرسوم بر ***E. maculate***:
الف) تعداد شاخه، ب) طول شاخه، پ) سبزینگی و ت) تعداد جوانه

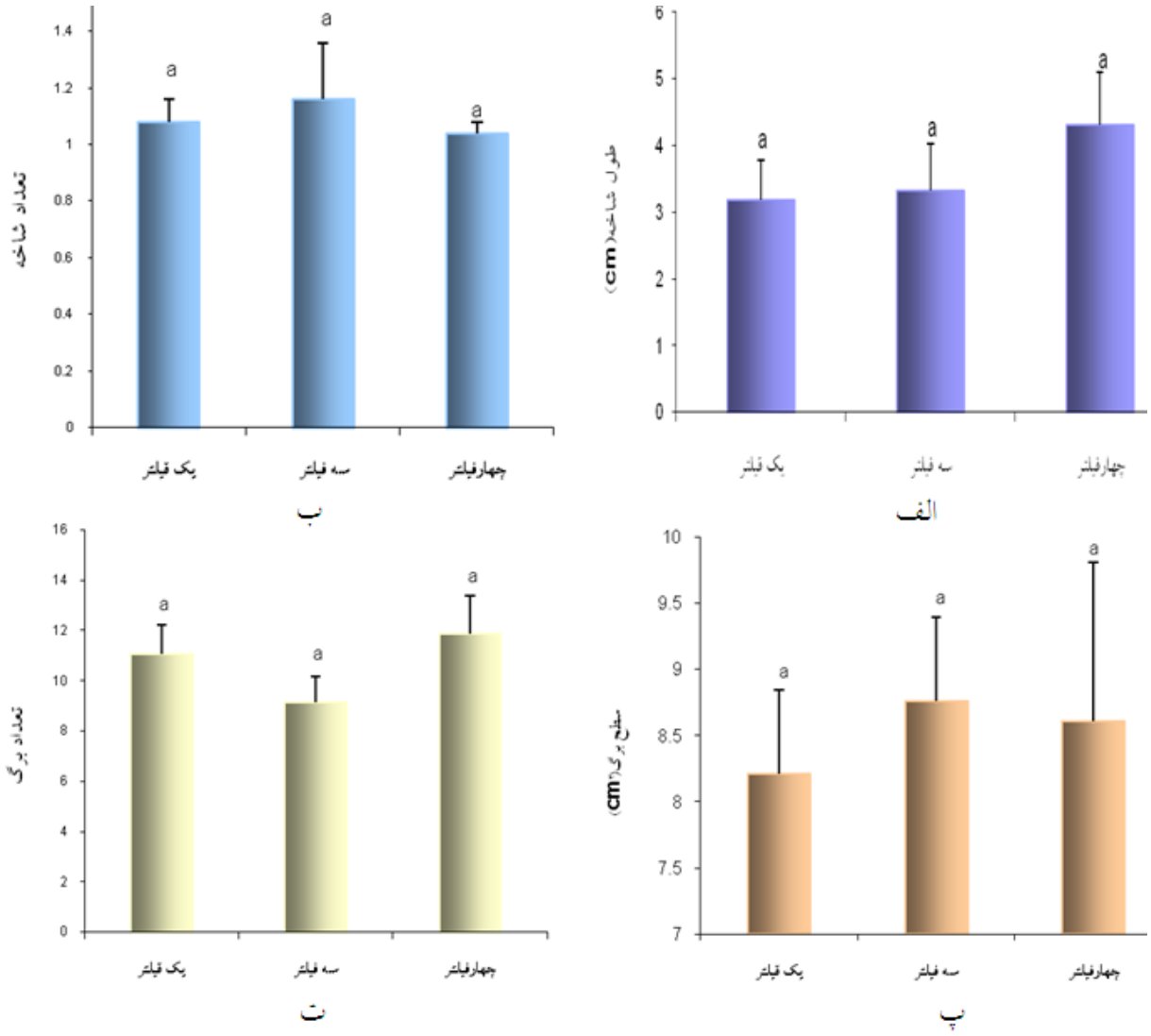
T_1=۰/۲ Kinetin، ۰/۵ BAP، ۰/۰۱ IBA، **T_2=۰/۲ Kinetin، ۰/۳ BAP و ۰/۰۱ IBA**،
T_3=۰/۲ Kinetin، ۰/۱ BAP و ۰/۰۱ IBA، **T_4=۰/۵ 2ip، ۰/۰۱ TDZ و ۰/۰۱ IBA**،
T_5=۰/۵ 2ip، ۰/۵ BAP و ۰/۰۱ IBA و **T_6= ۰/۵ 2ip، ۰/۳ BAP و ۰/۰۱ IBA**

(بر حسب میلی‌گرم بر لیتر)

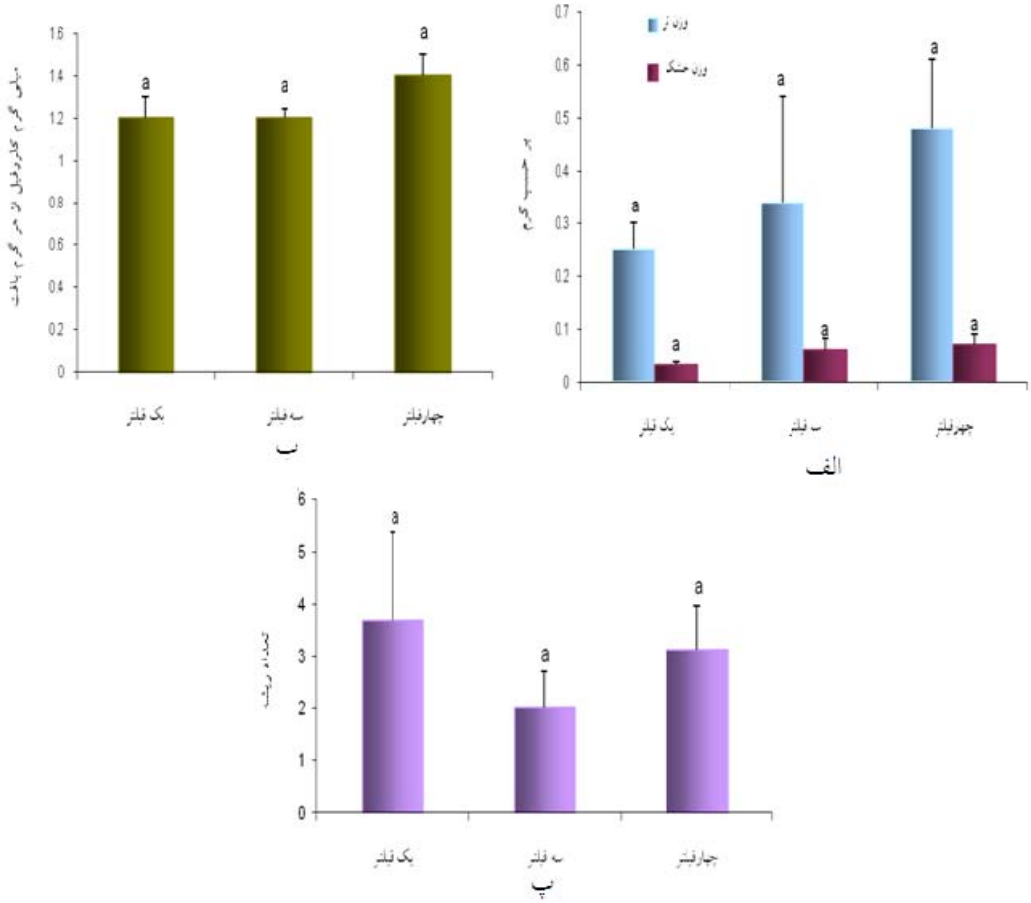


شکل ۲- اثر چند تیمار تنظیم‌کننده رشد بر ویژگی‌های مختلف ریشه‌زایی در روش ریزازدیادی مرسوم بر ***E. maculata***: الف) طول ریشه اصلی، ب) تعداد ریشه اصلی، پ) وجود تارکشنده و ت) تعداد ریشه فرعی

I= ۰/۵**IBA**، **II=** ۰/۱**IBA**، **III=** ۱**IBA**، **IV=** ۰/۱**NAA**، **V=**۰/۵**NAA** و **VI=** ۱**NAA** (میلی‌گرم بر لیتر)



شکل ۳- اثر تعداد فیلتر در ظروف کشت در روش فتواتوتروفیک
الف) طول شاخه، ب) تعداد شاخه، پ) سطح برگ و ت) تعداد برگ



شکل ۴- اثر تیمارهای تعداد فیلتر در ظروف کشت در روش فتواتوتروفیک
الف) وزن تر و خشک، ب) میزان کلروفیل و پ) تعداد ریشه

جدول ۳- آزمون t دو روش ریزازدیادی فتواتوتروفیک و مرسوم *E. maculata* و مقایسه میانگین شاخص‌های رشد (سطح برگ، تعداد برگ، طول شاخه، تعداد شاخه و تعداد ریشه)

شاخص‌های رشد	آزمون t	میانگین مشاهدات	
		روش فتواتوتروفیک	روش ریزازدیادی مرسوم
سطح برگ	۳۵/۲۸**	۸/۵۳±۰/۱۸	۱/۴۳±۰/۱
تعداد برگ	-۲/۸*	۱۰/۶۹±۰/۸۰	۱۷/۱۶±۲/۱۶
طول شاخه	۴/۷۶**	۳/۶±۰/۳۴	۱/۹۱±۰/۰۸
تعداد شاخه	-۴/۱۵*	۱/۰۹±۰/۰۴	۱/۷۹±۰/۱۶
تعداد ریشه	۲/۷۸*	۲/۹۳±۰/۴۹	۱/۳۵±۰/۲۸

** در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار، * در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار

شکل ۵- مقایسه دو روش ریزازدیادی مرسوم و فتواتوتروفیک: الف و ب) روش فتواتوتروفیک، ج) بهترین ریشه‌زایی در روش ریزازدیادی مرسوم و د) بهترین شاخه‌زایی در روش ریزازدیادی مرسوم

بحث

شاخه‌زایی دانه‌رست از گونـة *E. maculata* بـه روش ریزازدیادی مرسوم: تنظیم‌کننده‌های رشد بـر رشـد طـولی، تعداد شاخه‌هـا و ریشـه‌زایـی گونـة *E. maculata* اثـرات متفاوتی داشتند، بدین معنی که هر یک از این صفات به نوع خاصی از تنظیم‌کننده رشد پاسخ بهتری دادنـد. بررسـی اثـر سیتوکینین‌ها بر تعـداد شـاخه نشـان داد کـه بهتـرین تیمـار شاخه‌زایی در دانه‌رست، تیمار T6 ۰/۵ میلـی‌گـرم بـر لیتـر 2ip، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بـر لیتـر IBA بـود (شـکل ۱- الـف). اثـر مثبـت کـاربرد همزمـان سیتوکینین‌ها توسط محققان دیگر نیـز مـورد بررسـی قـرار گرفته است، ازجملـه Bunn (۲۰۰۵) نیـز در آزمایشـی در *Eucalyptus* spp. بیان داشت که ترکیـب BAP و Kinetin بر تکثیر شاخه نسبت به وجود هر یک از آنها به تنهایی اثـر بهتری داشته است و بهتـرین تیمـار شـاخه‌زایـی بـا کیفیـت مناسـب، ترکیـب ۰/۵۳۸ میلـی‌گـرم بـر لیتـر Kinetin و ۰/۰۵۶۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP بر روی گونة *E. impensa* بود. تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیترKinetin، ۰/۱ میلی‌گـرم بـر

لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA3 نیز توسط Assareh و همکاران (۲۰۰۷)، بهترین تیمار شاخه‌زایی در گونهٔ *E. gongylocarpa* Blakely اعلام شد.

بیشتر مطالعات در زمینه کشت بافت اکالیپتوس، BAP را به‌عنوان سیتوکینین بسیار فعال بر تکثیر شاخه نشان داده‌اند (McComb, *et al*., 1996). در پژوهش حاضر نیز BAP بهترین سیتوکینین شناخته شد، زیرا در تیمار T4 که TDZ به جای BAP استفاده شد کاهش در تعداد شاخه، جوانه و میزان سبزینگی مشاهده شد (شکل ۱- الف، پ و ت). در این مطالعه همچنین جایگزینی 2ip به جای Kinetin در شاخه‌زایی پاسخ بهتری داد (تیمار T6، شکل ۱- الف). ترکیب BAP و Kinetin نیز برای شاخه‌زایی دانه‌رست این گونه ترکیب مناسبی بود، ولی استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP از همه بهتر بود. همچنین ترکیب 2ip و TDZ برای شاخه‌زایی مناسب نبود (تیمار T4؛ شکل ۱- الف).

مشاهدات این تحقیق مؤید این مسئله بود که در ریزازدیادی گونه *E. maculata*، شاخه‌زایی به‌طور بطئی و آهسته انجام شد. در تحقیقی Bunn (2005) بیان داشت که ساقه‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای گونهٔ *E. Impensa*، رشد بطئی داشته و یا رشد آنها متوقف شده بود که البته این پاسخ‌های مورفولوژیکی در کشت درون‌شیشه‌ای سایر گونه‌های اکالیپتوس نیز گزارش شده است (Bennet & McComb,1982; McComb *et al*.,1996)؛ البته ممکن است به دلیل نوع گونه و نوع هورمون مورد استفاده باشد. چون در ریزازدیادی هدف تکثیر شاخه با سبزینگی بهتر است، در عین حال تیمار ۰/۵ 2ip، ۰/۳ BAP و ۰/۰۱ IBA (میلی‌گرم بر لیتر) برای تکثیر گونه *E. maculata* بهتر به‌نظر می‌رسد.

ریشه‌زایی دانه‌رست در گونهٔ *E. maculata* به روش ریزازدیادی مرسوم: بهترین تیمار هورمونی ریشه‌زایی دانه‌رست این پژوهش، تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود. در تحقیقی Assareh و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعهٔ سه نوع تیمار ریشه‌زایی (فاقد هورمون، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA) بر گونه *E. gongylocarpa*، تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA را بهترین تیمار ریشه‌زایی خود اعلام نمودند.

در گونهٔ *E. impensa* نیز Bunn (2005)، تیمار ۱/۰۱۶ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۹۳۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA را بهترین تیمار ریشه‌زایی دانست و در تحقیق دیگری Bunn و همکاران (۲۰۰۵)، در گونه *E. phylacis* تیمار هورمونی ۱/۰۱۶ میلی‌گرم بر لیتر IBA را بهترین تیمار ریشه‌زایی اعلام نمودند که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مغایرت داشت. احتمالاً نوع گونه و غلظت هورمون‌ها علت مغایرت مذکور باشد.

القاء ریشه در بعضی از گونه‌های اکالیپتوس، مانند *E. marginata* و *E. intens*، به سختی و در بعضی مانند *E. camadulensis* Dehnh به سهولت انجام شد (McComb & Bennet, 1986). گونه *E. globulus* به آسانی تکثیر می‌شود؛ اما در شرایط درون‌شیشه، ریشه‌زایی حتی زمانی‌که نمونه‌ها از دانه‌رست گرفته شده بودند، نیز به سختی ممکن گردید (Hartney, 1983). ریشه‌زایی در گونهٔ *E. maculata* در این پژوهش نیز همین مطلب را تأیید و ریشه‌زایی آن به سختی انجام شد. سختی ریشه‌زایی در اکالیپتوس می‌تواند علل مختلفی داشته باشد. چندین گزارش درباره بازدارنده‌های ریشه‌زایی ویژه در اکالیپتوس وجود دارد. به‌طوری‌که برای اولین بار سال‌ها پیش این تنظیم‌کننده رشد به نام G توسط Paton و همکاران (۱۹۷۰)، از *E. grandis* جدا شد. همچنین وجود ترشحات فنلی نیز می‌تواند مانع ریشه‌زایی شود (Assareh & Sardabi, 2007).

ریزازدیادی فتواتوتروفیک: بررسی اثر تعداد فیلتر بر ریزازدیادی در شرایط فتواتوتروفیک نشان داد که از نظر طول شاخه، تعداد و سطح برگ، میزان کلروفیل و وزن تر و خشک تیمار ظروف چهار فیلتره در وضعیت بهتری بود ولی اختلاف معنی‌داری بین ظروف مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که در شرایط فتواتوتروفیک با افزایش غلظت CO_2، شرایط بهینه برای فتوسنتز فراهم شده که در میزان کلروفیل، وزن تر و خشک خود را نشان داده است. از آنجایی که از

نظر تعداد و مکان فیلتر تفاوت آماری مشاهده نشد، اما استفاده از هر یک از تیمارهای فیلتری با توجه به شرایط و امکانات آزمایشگاهی امکان‌پذیر است. به دلیل اینکه این آزمایش برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است، گزارشی برای مقایسه یافت نشد.

مقایسه کلی دو روش ریزازدیادی (ریزازدیادی مرسوم و فتواتوتروفیک): در مقایسه دو روش مذکور با استفاده از آزمون t جفت نشده، بین دو روش اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید و در برخی شاخص‌های رشد ازجمله سطح برگ، طول شاخه و تعداد ریشه برتری روش ریزازدیادی فتواتوتروفیک نسبت به ریزازدیادی مرسوم معنی‌دار بود. روش فتواتوتروفیک نسبت به شرایط ریزازدیادی مرسوم دارای مزایایی است، ازجمله افزایش رشد با افزایش میزان CO_2، کاهش نیاز به افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد و سایر مواد آلی به علت تولید درونی این مواد، افزایش میزان زنده‌مانی گیاهک‌ها به علت ایجاد شرایط اتوتروف، انجام فتوسنتز به علت عدم استفاده از قند و وجود CO_2 با غلظت بالا، پایین بودن آلودگی‌های قارچی و میکروبی به علت نبود قند و همچنین تولید شاخه و ریشه به طور همزمان است.

با توجه به اینکه تکثیر ریزنمونه‌های حاصل از پایه مادری به علت آلودگی‌های درونی و سطحی و نیز آزادسازی ترکیبات فنلی مشکل است (که این مسئله نیز در مسیری موازی با این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت)، بنابراین استفاده از شرایط فتواتوتروفیک در گونه مورد استفاده در این پژوهش، می‌تواند تحقیقات مکمل این مسیر باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه کلیه همکاران مؤسسه مذکور، به‌ویژه گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی و به‌خصوص خانم‌ها، شکوفه شهرزاد و طیبه سهیلا نراقی و همچنین از حمایت‌های بی‌دریغ دانشگاه الزهرا (س) سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

– Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus* spp. Iranian Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 3: 1-8
– Assareh, M.H., 2001. Introduction of a novel micropropagation method in *Eucalyptus* through photoautotrophic conditions. The Second International Conference for Agricultural and Natural Resources, Moscow Timirazev Agriculture Academy, Moscow, Russia.
– Assareh, M.H., 2002. Mass production of *Eucalyptus camadulensis* plantlet under photoautotrophic conditions. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 53: 79-83.
– Assareh, M.H. and Sabaghzade, H., 2003. The growth of river red gum in CO_2 enriched and non- enriched under photo and semi-photoautotrophic conditions. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 59: 80-87.
– Assareh, M.H., Ghorbanli, M., Ghamari Zare, A., Akbari Khabaz, M., 2007. Micropropagation, organogenesis and using new method of semi-photoautotrophic conditions in *Eucalyptus gangilocarpa*. Pajohesh-va-Sazandegi (In Natural Resources), 75: 134-145.
– Assareh, M.H. and Sardabi, H., 2007. Eucalyptus (Description, Illustration and Propagation by Advanced Techniques). Research Institute of Forests and Rangelands Publication, Tehran, 672p.
– Bennet, M.J. and McComb, J.A., 1982. Propagation of Jarrah (*E. marginata*) by organ and tissue culture. Australia Forest Research, 12:121-127.
– Bigdeli, M., 1995. Study and recognition of existing compounds in some species essential oils of Iran aromatic plants and their antibacterial properties. PhD Thesis, Islamic Azad University, Tehran.
– 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.
– Bunn, E., Senaratna, T., Sivastihamparam, K. and Dixon, K., 2005. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Jhnson and K. Hill., A critically endangered relict from Western Australia. *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant, 41:812-815.

– McComb, J.A., Bennet, I.J. and TonKinetinetin, C., 1996. *In vitro* Propagation of *Eucalyptus* species. In: Taji AM and Williams RP (eds) Tissue Culture of Australian Plants. University of New England, Armidale, 112-156.
– Moini, A. and Kahrizi, D., 2003. Plant tissue culture (Persian Translated "Plant Tissue Culture Practice: Taji, A., Williams, Richard, R., Dodd, William, A."), Basij Student Organization Publications, 52-80.
– Paton, D.M., Willing, R.R., Nicolis, W. and Pryor, L.D., 1970. Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: A rooting inhibitor in adult tissue. Australian Journal of Botany, 18:175-183.
– Tanaka, M., Giany, D.T.T., Marakami, A., 2005. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (*urophyla*×*grandis*). *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant, 41:173-180.
– Hartney, V.J., Barker, P.K., 1983. The vegetative propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. Silviculturae, 8:791-792.
– Hew, C.S., Hin, S.E., Yong, J.W.H., Gouk, S.S. and Tanaka, M., 1995. *In vitro* enrichment of CAM orchid plantlets. Journal of Horticultural Science, 70:721-730.
– Kirdmanee, C., Kitaya, Y. and Kozai, T., 1995. Effects of CO_2 enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro* Cellular and Develomental Biology-Plant, 31:144-149.
– Kozai, T. and Kubota, C., 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. Journal of Plant Research, 114:525-537.
– Kozai, T., Kubota, C. and Watanabe, I., 1988. Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto-trophic tissue culture. Acta Horticulture, 230:159-166.
– McComb, J.A. and Bennet, I.J., 1986. *Eucalyptus* spp. In: Bajaj YPS, ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1: Trees I. Berlin: Springer Verlag, 340-362

Study of conventional and photoautotrophic methods of micropropagation on *Eucalyptus maculata*

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

1*. Corresponding author, M.Sc. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
Email: sedaghati@rifr-ac.ir
2. M. Sc., Research Institute of Forests and Rangelands ,Tehran, I.R.Iran
3. Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
4. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
5. Assoc. Prof., Al-Zahra University, Tehran, I.R.Iran

Received:17.10.2010 Accepted:09.10.2012

Abstract

E. maculata is a fast growing species, adapted to climate conditions of Iran, which is important in agro-forestry, industrial and medical aspects. Proliferation of *E. maculata* was carried out using photoautotrophic and conventional micropropagation methods as well as comparing efficiency of the two methods. Terminal buds of young plants were used as explants. Explants were placed on MS medium with ½ nitrate and various growth regulators with different concentrations for conventional micropropagation and in Magenta (G7) containers with different number of filters for gas exchange with external and internal environments, containing 70 ml of half-strength, sugar and agar free MS medium, supplemented with vermiculite in photoautotrophic method. After one month, MS medium with ½ nitrate containing IBA (0.01 mgl^{-1}), BAP (0.3 mgl^{-1}), 2ip (0.5 mgl^{-1}) for shoot production (with average number of 2.52), IBA (0.01 mgl^{-1}), BAP (0.1 mgl^{-1}), Kinetin (0.2 mgl^{-1}) for shoot height growth (with average of 2.07 cm) and MS medium with ½ nitrate containing IBA (1 mgl^{-1}) for root production (with average number of 1.62) were the best media. In photoautotrophic method, results of study on growth indexes showed that there were not any significant differences between the studied treatments but treatment with 4 filters had better growth conditions. According to observation, photoautotrophic method had better growth characteristics than the conventional micropropagation of *E. maculata*. The micropropagated plantlets were transferred to greenhouse and field successfully.

Keywords: *Eucalyptus maculata*, micropropagation, filter, shooting and rooting.