ریزازدیادی *Eucalyptus occidentalis* Endl.

زهرا آبروش[۱]*، محمدحسن عصاره[۲] و میترا امام[۲]

[۱] کارشناس ارشد مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
[۲] عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۷)

چکیده

گونهٔ *Eucalyptus occidentalis* Endl. از درختان مهم و تندرشد در زراعت چوب و بهره‌برداری اقتصادی در صنایع چرم‌سازی، کاغذسازی، تهیهٔ اسانس و داروسازی است. در این تحقیق، ریزازدیادی این گونه به‌طریق کشت جوانه در محیط کشت MS و GD بررسی شد. بر روی نمونه‌ها، تیمار سترون‌سازی، استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی اعمال شد. آزمایش‌فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. تیمار سترون‌سازی مورد استفاده، غوطه‌وری به‌مدت یک دقیقه در محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه بود. براساس داده‌های آماری، تکثیر مطلوب و رشد طولی شاخسارهٔ گونهٔ *E. occidentalis* در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP، GA_3 و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، به‌همراه P.V.P در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS محتوی نصف غلظت نیترات با هورمون اکسین IBA در غلظت میلی‌گرم در لیتر صورت می‌گیرد. سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط گلخانه با موفقیت صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: تولید کلن، ریزازدیادی، ، محیط کشت، *Eucalyptus occidentalis*، MS، GD.

*نویسنده مسئول تلفن: ۰۲۱۴۴۵۸۰۲۸۰ email: z.abravesh@gmail.com

مقدمه و هدف

رشد فزایندهٔ جمعیت و صنعتی شدن زندگی بشر، موجب افزایش تقاضای چوب و تخریب بیشتر جنگل‌ها و تعارض جنبه‌های محیط‌زیستی و اقتصادی عرصه‌های پوشیده از درخت شده است. گونه‌های مختلف اکالیپتوس منابع مهمی برای تولید چوب، کاغذ، سوخت و اسانس هستند. اکالیپتوس‌ها، سنگین‌ترین، سخت‌ترین و با دوام‌ترین چوب‌ها را تولید می‌کنند، به‌طوری‌که می‌توان این جنس را یکی از باارزش‌ترین منابع چوب‌های جنگلی جهان محسوب کرد. در ایران با توجه به نیاز صنایع چوب و کاغذ به چوب و ناکافی بودن تولید داخلی، اهمیت زراعی چوب با استفاده از درختان تندرشدی مانند اکالیپتوس بیش از پیش نمایان می‌شود. هر چند کاشت اکالیپتوس در نواحی گرم و خشک دربردارندهٔ نکات منفی مانند دریافت آب زیاد از اعماق زمین و تخلیهٔ آبهای زیرزمینی (راد و همکاران، ۱۳۸۹) و بروز پدیدهٔ آللوپاتی برای دیگر گیاهان (نجفی آشتیانی و همکاران، ۱۳۸۷؛Souza *et al*., 2003) است، حتی در این نقاط هم به‌صورت زراعت چوب و برداشت‌کوتاه-مدت و بهبود ساختمان و تخلخل سطحی خاک توصیه می‌شود (سردابی و همکاران، ۱۳۸۹).

گونهٔ *E. occidentalis* به این دلیل اهمیت دارد که گونه‌ای تندرشد، سازگار به خاک‌های فقیر و مقاوم به شوری و خشکی است. این‌گونه به‌دلیل کیفیت چوب، دوام چوب، تولید الیاف سلولزی در صنایع کاغذسازی، توسعهٔ جنگلکاری، تولید عسل و تولید اسانس نیز مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت اقتصادی این گونه از نظر کیفیت چوب و تانن موجود در چوب و پوست (جوانشیر و مصدق، ۱۳۵۱)، بهره‌برداران به تکثیر انبوه با صفات ژنتیکی برتر نیاز دارند. تکثیر از طریق ریزازدیادی می‌تواند یکی از راه‌های رسیدن به این هدف باشد. تحقیقات فراوانی در زمینهٔ کشت بافت گونه‌های مختلف اکالیپتوس انجام گرفته است، ولی در مورد گونهٔ *E. occidentalis* اطلاعاتی در زمینهٔ تحقیقات درون-شیشه‌ای در ایران و جهان یافت نشد. مطالعات اولیهٔ کشت بافت روی اکالیپتوس به‌طور وسیع در زمینهٔ کشت کالوس از بافت‌های دانه‌رست (Jacquiot, 1964) و بافت‌های کامبیومی صورت گرفت (De Bergh, 1983). کاربرد گره‌ها به‌عنوان ریزنمونه و امکان ایجاد ریشه از آنها نیز موجب شد توجه محققان به تکثیر درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) از این طریق معطوف شود.

Gupta & Mascarenhas (1987) استقرار موفقیت‌آمیز گیاهچه‌ها را از تک‌گره‌های ساقه درختان بالغ *E. camaldulensis* گزارش کردند. Hartney *et al*. (1983) تشکیل گیاهان منفرد را از تک‌گره‌های ساقه دانه‌رست، بوته و درختان جوان *E. grandis* گزارش کردند، ولی از ریزنمونه‌های حاصل از درختان بالغ نتیجه‌ای حاصل نشد. عصاره و سردابی (۱۳۸۶) در زمینهٔ شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گونهٔ *E. melliodora* تحقیق کردند. به گزارش صداقتی و همکاران (۱۳۸۷) ریزازدیادی گیاهچه‌های حاصل از پایهٔ مادری نسبت به گیاهچه‌های حاصل از دانه‌رست گونهٔ *E. maculata* بهتر عمل کرد. Sharma & Ramamurthy (2000) تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار را از تک‌گره‌های جانبی حاصل از گیاهان چهار سالهٔ گونهٔ *E. tereticornis* گزارش کردند. اکبری و همکاران (۱۳۸۶) ریزازدیادی گونهٔ *E. gongylocarpa* را بررسی کردند و موفق به استقرار و تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار از کشت جوانه شدند. Bonga & Aderkas (1992) ترکیب محیط‌های کشت بر روی گونه‌های جنگلی را مقایسه کردند.

از اهداف مهم این تحقیق دستیابی به نوعی روش کاربردی مناسب برای تکثیر انبوه به‌صورت غیرجنسی (کلن) در این گونهٔ درختی و نیز بهینه‌سازی شرایط محیط کشت و سازگاری گیاهک‌ها و معرفی یک مدل تولیدی با تأکید بر جنبه‌های اقتصادی با روش‌های نوین ریزازدیادی است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش، در سال‌های ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۹ در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور اجرا شد. شاخه‌های واجد جوانهٔ حاصل از پایهٔ دوسالهٔ گیاه *E. occidentalis* به آزمایشگاه انتقال یافت و بعد از حذف برگ‌های اضافی، به قطعات کوچک واجد جوانه تقسیم شد. محیط کشت، وسایل و ظروف کشت به‌وسیلهٔ اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار یک کیلوگرم بر سانتیمتر مربع به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه ضدعفونی شد. برای سترون‌سازی، همهٔ نمونه‌ها با آب معمولی شسته شده و به‌منظور کاهش آلودگی سطحی، پنج دقیقه در آب و مایع ظرفشویی قرار داده شدند، پس از آن با آب جاری آبشویی شده و در زیر هود با جریان هوای سترون یکطرفه با استفاده از محلول ۰/۱ درصد کلرور جیوه در مدت زمان‌های یک و دو دقیقه ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون شسته شده و سپس کشت شدند. این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. برای ساقه‌زایی از محیط کشت‌های MS و GD که غلظت‌های یونی متفاوتی نیز دارند، به‌عنوان محیط‌های پایه استفاده شد. پس از اعمال تیمارهای هورمونی (شامل تیمار تلفیقی BAP و 2iP، در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ به‌همراه GA_3 در غلظت ۰/۱۵ و IBA در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) محیط کشت برتر برای ساقه‌زایی انتخاب و در آزمایش‌های بعدی از آن استفاده شد. به‌منظور تعیین بهترین تیمار هورمونی برای شاخص‌های رشد، شامل صفات ضریب ازدیاد رشد طولی شاخه و سبزینگی آن، از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2iP (به‌طور مجزا و تلفیقی)، GA_3 و IBA در غلظت‌ها و تیمارهای ذکرشده در جدول ۴ به‌همراه P.V.P (Poly Vinyl Pyrolidone) (مادهٔ بازدارندهٔ ترشحات فنلی) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت انتخاب‌شده و برای ریشه‌زایی از هورمون‌های IBA، IAA و NAA (در غلظت‌های ۰/۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات استفاده شد. ریزنمونه‌های کشت‌شده در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، شدت نور ۵۰۰۰ -۳۰۰۰ لوکس و طول دورهٔ روشنایی ۱۶ ساعت و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. فاکتورهای ضریب ازدیاد شاخه، رشد طولی و سبزینگی شاخه و نیز تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه محاسبه شد. نرمال‌سازی داده‌ها با نرم‌افزار MINITAB، آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج سترون‌سازی ریزنمونه‌ها نشان داد که تیمار سترون‌سازی محلول کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت یک دقیقه با سه بار آبشویی با آب مقطر سترون، نسبت به تیمار زمانی دو دقیقه، آلودگی کمتر و درصد بقای بیشتری (۸۱/۴۸ درصد) داشت. برای تعیین محیط کشت برتر، ریزنمونه‌های *E. occidentalis* در دو محیط MS و GD در تیمارهای مختلف BAP و 2iP در غلظت‌های (۰/۵+ ۰/۵) و (۱ + ۱) میلی‌گرم در لیتر همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و شاخص‌های رشد بررسی شد. عامل محیط کشت بر صفات ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخه معنادار بود (جدول ۱).

جدول۱- تجزیهٔ واریانس شاخص‌های رشد، ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخهٔ جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* تحت تأثیر محیط‌های کشت

منبع تغییرات	درجه آزادی	ضریب ازدیاد	طول شاخه (سانتی‌متر)	سبزینگی
محیط	۱	۲۲ /۱۹*	۰/۰۰۴ns	۳/۳۳*
تیمار هورمونی	۱	۰/۲۶ns	۰/۰۲ns	۰/۰۷ns
اثر متقابل محیط در تیمار هورمونی	۱	۲/۳۹ns	۰/۰۰۳۶ns	۰/۰۳ns
خطا	۸	۳/۸۱	۰/۰۷	۰/۳۱

ns: عدم اختلاف معنادار؛ *: اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد

مقایسهٔ میانگین شاخص‌های رشد، شامل ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخهٔ جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* در دو محیط کشت MS و GD همراه با تیمارهای هورمونی ذکرشده نشان داد محیط کشت MS در مقایسه با محیط کشت GD، تأثیر بهتری بر ضریب ازدیاد شاخه (متوسط تعداد شاخه در ریزنمونه) و سبزینگی دارد و تأثیر دو تیمار هورمونی اعمال‌شده در این دو صفت از نظر آماری متفاوت نیست و هر دو در یک گروه قرار دارد. در محیط کشت MS هر سه فاکتور اندازه‌گیری‌شده در هر دو تیمار هورمونی اعمال‌شده در یک گروه قرار دارند (جدول ۲).

جدول۲- مقایسهٔ میانگین شاخص‌های رشد ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخهٔ جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* تحت تأثیر سیتوکینین‌های مختلف

محیط	تیمار سیتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	ضریب ازدیاد	طول شاخه (سانتی‌متر)	سبزینگی
GD	(BAP + 2iP): (۰/۵+۰/۵) + GA_3: ۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۴/۵۸b	۰/۷۳a	۳/۰۲ab
GD	(BAP + 2iP): (۱+۱) + GA_3: ۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۳/۹۹b	۰/۸۵a	۲/۷۵b
MS	(BAP + 2iP): (۰/۵+۰/۵) + GA_3: ۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۶/۴۱a	۰/۸۰a	۳/۹۶a
MS	(BAP + 2iP): (۱+۱) + GA_3: ۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۷/۶۰a	۰/۸۵a	۳/۹۱a

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطوح مورد نظر است.

بنابراین محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت بهینه برای شاخه‌زایی این گونه توصیه می‌شود.

در مراحل بعدی آزمایش اثر ۱۲ تیمار هورمونی بر شاخص‌های رشد در محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت بهینه بررسی شد. نتایج آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف سیتوکینین مورد استفاده از نظر ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه تفاوت معنادار وجود دارد (جدول ۳).

جدول۳- تجزیهٔ واریانس شاخص‌های رشد ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای مختلف سیتوکینین و جیبرلین

منبع تغییرات	درجه آزادی	ضریب ازدیاد	طول شاخه (سانتی‌متر)	سبزینگی
تیمار	۱۱	۷/۷۳**	۰/۰۱۹*	۰/۱۴ns
خطا	۲۴	۱/۶۱	۰/۰۰۹	۰/۰۷

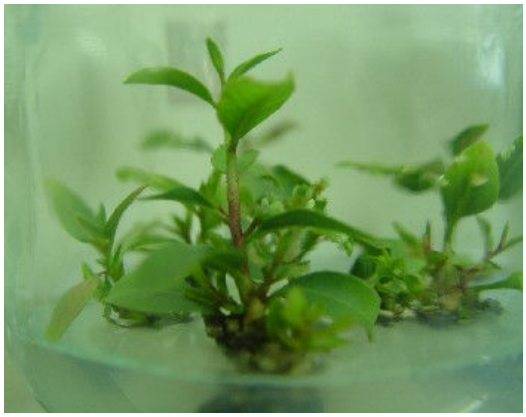
ns: عدم اختلاف معنی‌دار؛ *: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد؛ **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

براساس نتایج به‌دست آمده، میانگین تعداد شاخه بر روی محیط کشت MS با تیمار هورمونی BAP، GA_3 و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر از دیگر تیمارهای هورمونی بیشتر بود. میانگین طول شاخه در تیمار هورمونی BAP، 2iP، GA_3 و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۰/۱۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر از سایر تیمارهای هورمونی بیشتر بود. میانگین سبزینگی شاخه در تیمارهای مختلف مورد استفاده تفاوت اندکی داشت، به‌طوری‌که در تیمارهای دارای GA_3 با غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر از تیمارهای هورمونی دارای GA_3 با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بیشتر بود (جدول ۴ و شکل ۱).

جدول ۴- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای مختلف سیتوکینین و جیبرلین

تیمار	ضریب ازدیاد	طول شاخه (سانتی‌متر)	سبزینگی
BAP:۰/۵ + GA_3 :۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۱/۹۷a	۱/۱۷abc	۳/۴۹ab
BAP:۰/۵ + GA_3 :۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۷/۷۱de	۱/۱۲abcd	۳/۰۳b
2iP:۰/۵ + GA_3 :۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۸/۴۰cde	۱/۰۰۳cd	۳/۷۲a
2iP:۰/۵ + GA_3 :۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۶/۹۹e	۰/۹۴d	۳/۷۳a
BAP:۰/۵ + 2iP:۰/۵ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۱۱/۳۲ab	۱/۱۹ab	۳/۶۹a
BAP:۰/۵ + 2iP:۰/۵ + GA_3:۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۱۰/۷۵abc	۱/۰۳bcd	۳/۵۳ab
BAP:۰/۵ + 2iP:۱ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۹/۹۲abcd	۱/۲۳a	۳/۶۹a
BAP:۰/۵ + 2iP:۱ + GA_3:۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۱۰/۵۱۲abc	۱/۱۱abcd	۳/۴۲ab
BAP:۱ + 2iP:۰/۵ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۸/۹bcde	۱/۰۷abcd	۳/۶۲a
BAP:۱ + 2iP:۰/۵ + GA_3:۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۱۱/۲۳ab	۱/۰۶abcd	۳/۲۳ab
BAP:۱ + 2iP:۱ + GA_3:۰/۱۵ + IBA:۰/۰۱	۸/۰۱de	۱/۰۵abcd	۳/۶۳a
BAP:۱ + 2iP:۱ + GA_3:۰/۱ + IBA:۰/۰۱	۹/۶۶bcd	۱/۰۹abcd	۳/۳۰ab

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطوح مورد نظر است.



شکل ۱- شاخه‌زایی *E. occidentalis*

برای تجزیه‌وتحلیل آماری صفات، به‌دلیل آن که در بعضی از تیمارها، ریشه تشکیل نشد، تبدیل داده‌ها به‌منظور دستیابی به پراکنش نرمال ضروری بود. از آزمایش تأثیر سه نوع اکسین مختلف در چهار غلظت

متفاوت ارایه شده در جدول ۶ بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای شاخه‌های جداکشت گونهٔ *E. occidentalis*، مشخص شد که اثر تیمارهای مختلف اکسین بر صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه مشابه نیست و تاثیر عامل تیمار هورمونی بر صفات مورد آزمون معنادار بوده و از تیماری به تیمار دیگر متفاوت است (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیهٔ واریانس صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشهٔ جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد جداکشت ریشه‌دار	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)
تیمار اکسین	۱۱	۱۳/۶۴**	۱۰۵/۲۸**	۳/۴۴**
خطا	۴۸	۱/۴۸	۱۱/۱۷	۰/۶۷

**: اختلاف معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

مقایسهٔ میانگین صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار و تعداد ریشهٔ شاخه‌های جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* در جدول ۶ آمده است. براساس نتایج، با افزایش مقدار غلظت اکسین‌های IBA و NAA تا یک میلی‌گرم در لیتر، تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه افزایش می‌یابد. در عین حال نتایج نشان می‌دهند عامل تیمار هورمونی IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نسبت به هورمون NAA و IAA مؤثرتر است. ازاین‌رو همین تیمار به‌عنوان تیمار هورمونی بهینه برای ریشه‌زایی شاخه‌های جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* توصیه می‌شود. اگرچه میانگین طول ریشه در هر شاخهٔ ریشه‌دار شده در شاخه‌هایی که در تیمار هورمونی IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر قرار داشتند، به‌طور معنادار بیشتر از شاخه‌هایی بود که در سایر تیمارهای هورمونی ریشه‌دار شده بودند (جدول ۶ و شکل۲).

جدول ۶- مقایسهٔ میانگین صفات تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشهٔ و طول ریشه جداکشت گونهٔ *E .occidentalis* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

تیمار اکسین	تعداد جداکشت ریشه‌دار	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)
IBA:۰/۱	۰/۱۹d	۰/۱۹d	۰/۱۹d
IBA:۰/۵	۲/۰۹bc	۳/۸۷cd	۲/۰۹a
IBA:۱	۴/۸۹a	۱۵/۱۱a	۲/۱۱ab
IBA:۲	۳/۳۳ab	۸/۹۱b	۱/۱۵bcd
NAA:۰/۱	۰/۷۸cd	۰/۷۹d	۰/۵۷cd
NAA:۰/۵	۱/۵۷cd	۲/۰۴d	۰/۹۰cd
NAA:۱	۲/۲۷bc	۳/۱۶d	۰/۶۲cd
NAA:۲	۴/۶۹a	۷/۹۱bc	۰/۹۵cd
IAA:۰/۱	۰/۱۹d	۰/۱۹d	۰/۱۹d
IAA:۰/۵	۰/۱۹d	۰/۱۹d	۰/۱۹d
IAA:۱	۱/۳۲cd	۱/۸۰d	۱/۵۹bc
IAA:۲	۱/۰۸cd	۱/۵۵d	۱/۳۱bcd

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطوح مورد نظر است.

گیاهچه‌های ریشه‌دارشدهٔ گونهٔ *E. occidentalis* به مدت دو ماه در شرایط گلخانه‌ای با شرایط نوری مطابق با شب و روز طبیعی قرار گرفتند و ۸۵ درصد سازگار شدند (شکل ۳).

شکل ۲- ریشه‌زایی *E. occidentalis*

شکل ۳- سازگاری در گلخانه *E. occidentalis*

بحث

در این پژوهش از تیمار قرارگیری در معرض آب جاری و شست‌وشو با آب و مایع ظرفشویی در پیش-سترون‌سازی نمونه‌های جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* استفاده و مشخص شد که این تیمار در کاهش آلودگی‌های سطحی در گونه‌های بررسی شده مناسب است. محلول کلرور جیوه ۰/۱ درصد در مدت یک دقیقه نسبت به زمان دو دقیقه در سترون‌سازی گونهٔ مورد بررسی نتایج بهتری به‌دنبال داشت. صداقتی و همکاران (۱۳۸۷) نیز زمان یک دقیقه را برای سترون‌سازی جداکشت‌های گونهٔ *E. maculata* مناسب گزارش کردند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. بر اساس نتایج این پژوهش مشخص شد که بین محیط‌های کشت MS و GD از نظر شاخص‌های رشدی میانگین ضریب ازدیاد و سبزینگی در ریزنمونه تفاوت معناداری وجود دارد. Bonga & Aderkas (1992) بیان کرده‌اند که یکی از عوامل تعیین‌کنندهٔ کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن است. مقدار یون منیزیم، منگنز، روی و بُر در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت GD است. این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه نقش مهمی دارند و سبب ازدیاد و طویل شدن شاخه‌ها، افزایش میان‌گره‌ها، افزایش تقسیم سلولی و بافت‌های مریستمی و تشکیل جوانه می‌شوند. به‌نظر می‌رسد نسبت و غلظت مواد در محیط کشت MS به مقدار بهینهٔ مورد نیاز *E. occidentalis* نزدیک‌تر باشد. این مسئله می‌تواند دلیل برتری محیط کشت MS نسبت به محیط کشت GD در تحقیق حاضر باشد. از بین تیمارهای شاخه‌زایی اعمال‌شده در محیط‌کشت MS دارای سیتوکینین‌های مختلف، مشخص شد که ترکیب هورمونی IBA، GA_3 و BAP به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار هورمونی برای شاخص ضریب ازدیاد و ترکیب هورمونی BAP، 2iP، GA_3 و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، بهترین تیمار برای شاخص رشد طولی شاخه بوده است. از نظر سبزینگی تفاوت زیادی در تیمارهای اعمال‌شده مشاهده نمی‌شود. تعداد زیادی از پژوهشگران از سیتوکینین BAP، به‌عنوان بهترین تیمار برای ضریب ازیاد شاخساره استفاده کرده‌اند. برای مثال در گونهٔ *E. melliodora*، تیمار هورمونی

BAP در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر و 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، بهترین پاسخ را از نظر رشد کیفی و شاخه‌زایی نشان داده‌اند. همچنین بیشترین مقدار تشکیل جوانه‌های نوپدید و نیز بهترین شاخص وزن تر در محیط کشت MS همراه با BAP ۰/۶mgl^{-1} حاصل شده است (عصاره و سردابی، ۱۳۸۶). براساس نتایج این تحقیق، کاربرد جیبرلین در افزایش رشد طولی و ضریب تکثیر شاخه مؤثر است. مقدار زیاد جیبرلین (۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) با سیتوکینین BAP و 2iP به ترتیب اثر افزایشی و کاهشی بر تکثیر شاخه دارد. کاربرد تلفیقی این دو هورمون در غلظت‌های کم (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با جیبرلین زیاد (۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) کاهش محسوس تکثیر شاخه را نشان می‌دهد و این کاهش، با افزایش مقدار 2iP (از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشتر مشهود است. از طرفی مقدار کم جیبرلین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) با هر یک از سیتوکینین‌های BAP و 2iP، اثر کاهشی بر تکثیر شاخه دارد و کاربرد تلفیقی این دو هورمون در غلظت‌های کم و با جیبرلین کم، سبب افزایش تکثیر شاخه می‌شود و این افزایش، با افزایش مقدار 2iP (از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌طور محسوسی، کاهش این روند را در پی دارد. بنابراین اثر سیتوکینین BAP به‌تنهایی و به‌صورت تلفیقی در رشد طولی شاخه و تکثیر شاخه بسته به‌غلظت به‌کاررفته، متفاوت است، این هورمون به‌علت توانایی زیاد در شاخه‌زایی، از هورمون 2iP در افزایش تشکیل شاخساره مؤثرتر است و هورمون 2iP تا حدی اثر بازدارندگی بر ازدیاد شاخه دارد. این موضوع با نتایج تحقیق Blomstedt *et al*. (1991) بر کشت شاخه‌های *E. reganas* که بیانگر اثر بازدارندگی 2ip در تلفیق با BAP در تکثیر شاخه‌هاست همسویی دارد. غلظت‌های کم اکسین برای افزایش ضریب تکثیر شاخه لازم است. این موضوع با تحقیقات Trindade *et al.* (1990) همسویی دارد. آنان در تحقیق خود اشاره داشتند که مقدار زیاد سیتوکینین در غلظت‌های کم اکسین بر افزایش ضریب تکثیر شاخه گونهٔ *E. globulus* مؤثر بوده است. همچنین مطابق تحقیق Mascarehans *et al*. (1982)، ترکیب BAP به‌همراه IBA، سطح متعادل هورمونی را برای تکثیر سریع شاخهٔ *E. globulus* در کشت ایجاد کرد.

نتایج ریشه‌زایی شاخه‌های انتقال‌یافتهٔ جداکشت گونهٔ *E. occidentalis* در تیمارهای هورمونی اعمال‌شده در محیط MS با نصف غلظت نیترات نشان داد اکسین‌های مختلف اثر مشابه و یکسانی در ریشه‌دار شدن جداکشت‌ها ندارند. بهترین تیمار از نظر تعداد ریشه‌های طبیعی ایجادشده، تحریک ریشه‌زایی و افزایش تعداد ریشه، تیمار هورمونی IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، اگرچه بیشترین رشد طولی ریشه در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شده است. Sharma & Ramamurthy (2000) نیز بیشترین ریشه‌زایی را برای *E. tereticornis* در محیط کشتHalf-MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند. اکبری و همکاران (۱۳۸۶) نیز موفق به ریشه‌زایی گونهٔ *E. gongylocarpa* در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA شدند.

افزایش تدریجی غلظت اکسین IBA و IAA تا مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر، سبب افزایش تعداد جداکشت ریشه‌دار، تعداد ریشه و طول ریشه می‌شود و در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، مقادیر یادشده کاهش می‌یابد. این موضوع با نتایج پژوهش صداقتی و همکاران (۱۳۸۷) که افزایش تعداد ریشه و طول ریشه را در گونهٔ *E. maculata* با افزایش غلظت IBA و NAA از ۰/۱ تا یک میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند، مشابه است. پیشنهاد می‌شود تکثیر این گونه در مناطق مختلف ایران مورد آزمون سازگاری قرار گیرد و پس از اجرای مراحل آزمون در مناطق مناسب جنگلکاری شود.

منابع

اکبری خباز، مریم، عباس قمری زارع، مه‌لقا قربانلی، محمد حسن عصاره و میترا امام، ۱۳۸۶. ریزازدیادی *Eucalyptus gongylocarpa* Blakely، فصلنامهٔ علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵(۲): ۱۵۸-۱۴۲.

جوانشیر، کریم و احمد مصدق، ۱۳۵۱. اکالیپتوس، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۴۳۴.

راد، محمدهادی، محمد حسن عصاره، محمدعلی مشکوه، کاظم دشتکیان و مهدی سلطانی، ۱۳۸۹. نیاز آبی و تابع تولید اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehen) در شرایط اقلیمی خشک، مجله جنگل ایران، ۲(۱): ۶۱ - ۷۱.

سردابی، حسین، احمد رحمانی، بهنام حمزه، محمد حسن عصاره و محمود قرآنی، ۱۳۸۹. اثر جنگل‌کاری گونه‌های مختلف اکالیپتوس بر خصوصیات خاک جنگلی در استان گیلان، فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۸(۱): ۱۱۶-۱۳۱.

صداقتی، منصوره، خدیجه کیارستمی و محمد حسن عصاره، ۱۳۸۷. بررسی کشت بافت گونه *Eucalyptus maculata* با استفاده از روش‌های مرسوم و نوین و مقایسه ترکیبات معطر در شرایط In Vitro و Ex Vitro، پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا.

عصاره، محمد حسن و حسین سردابی، ۱۳۸۶. اکالیپتوس (شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین)، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۶۷۲ ص.

نجفی آشتیانی، اکبر، عصاره، محمد حسن، محمد علی باغستانی میبدی و سید جواد انگجی، ۱۳۸۷. بررسی اثر آللوپاتیک اندام هوایی گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehen) بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه علف هرز سلمک (*Chenopodium album* L.)، فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۴(۳): ۳۰۳-۲۹۳.

Blomstedt, C., J. Ameron, 1991. Micropropagation of juvenile *E. regnans* (mountain ash), *Australian Journal of Botany*, 39: 178–186.

Bonga, J.M. & P.V. Aderkas, 1992. In vitro Culture of trees. Kluwer Academic Publishers, 236 pp.

De Bergh, P.C., 1983. Effects of agar brand & concentration on the tissue culture medium, *Physiologia Plantarum*, 59:270–276.

Gupta, P.K. & A.F. Maskarenhas, 1987. Eucalyptus In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol: 3, Martinus Nijhoff, Dordrecht/ Boston/ Lancaster, 385–399.

Hartney, V.J. & P.K. Barker, 1983. The vegetative propagation of the Eucalyptus by tissue culture, *Silviculture*, 8: 791–792.

Jacquiot, C., 1964. Application de la technique de culture des tissue vegetaux a Letude de quelques problemes de physiology de Labre, *Annales des Sciences Forestières*, 21: 310–473.

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, 3, 1987. Bonga. DJ. Durzan

Sharma, S.K., V. Ramamurthy, 2000. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees, *Plant Cell Reports*, (19)5: 511–518.

Souza, L.S., E.D. Velini, & R.C.S. Maiomoni-Rodella, 2003. Allelopathic effect of weeds and concentrations of Brachiaria decumbens on the initial development of eucalyptus (*Eucalyptus grandis*), *Journal of Applied Sciences*, 21(3): 525–902.

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.

Micropropagation of *Eucalyptus occidentalis* Endl.

Z. Abravesh[1*], M.H. Assareh[2], and M. Emam[2]

[1] M.Sc, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran
[2] Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran

(Received: 16 May 2012; Accepted: 26 January 2013)

Abstract

Eucalyptus occidentalis is an important and fast growing species in wood farming and economic exploitation for leather, paper, essence extraction and pharmaceutical industries. In this study, micropropagation of this species was investigated by planting seedlings in MS and GD medium. Sterilization, stability, shooting and rooting treatments were applied to samples as randomized completely design and factorial trails. 0.1 % mercuric chloride solution for 1 minute was used as sterilization treatment. The results showed that appropriate proliferation and elongated growth branches of *E. occidentalis* were observed in MS medium containing BAP, GA_3 and IBA hormones with 0.5, 0.15 and 0.01 mgl^{-1} concentrations with 200 mgl^{-1} P.V.P, respectively. The best rooting treatments was obtained in MS medium containing 1/2 Nitrate with IBA, in 1 mgl^{-1} concentration. Rooted seedlings were successfully adapted in greenhouse conditions.

Key words*:* Clone production, *Eucalyptus occidentalis*, GD, Medium, Micropropagation, MS.

*Corresponding author Tel: +982144580280 email: z.abravesh@gmail.com