تأثیر شش نوع هورمون بر رویان‌زایی بدنی در گونه *Eucalyptus rubida*

عباس قمری زارع[1*] و سعیده قدیری سردرود[2]

[1] تهران، **سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی**

[2] **تهران، دانشگاه پیام نور مرکز تهران، گروه علوم گیاهی**

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳۰

چکیده

ایران به لحاظ پوشش جنگلی، کشوری فقیر محسوب می‌گردد. بنابراین جنگل‌کاری با درختان سریع‌الرشد، مانند اکالیپتوس گزینه‌ای مناسب است. با توجه به مشکلاتی که در تکثیر غیرجنسی اکالیپتوس‌ها با روش‌های معمول وجود دارد، پژوهشگران بسیاری روش‌های ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای را بکار گرفته‌اند. در این پژوهش نیز برای اولین بار، امکان تکثیر *Eucalyptus rubida* از طریق رویان‌زایی بدنی بررسی شد. ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه حاصل از گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی، در محیط کشت MS با ۳۶ تیمار هورمونی نیمه‌جامد و ۳ تیمار هورمونی در محیط کشت MS به‌صورت سوسپانسیون و در مجموع ۳۹ تیمار کشت گردید. بهترین نتایج، در محیط کشت سوسپانسیون با تیمار هورمونی 2,4-D ۱ mg/l، BA ۰/۲ mg/l و ABA ۲۰ ppm با استفاده از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه در محیط کشت اولیه با تیمار هورمونی TDZ و 2,4-D حاصل شد. به‌طوری‌که سلول‌های حاصل از کالوس‌های رویان‌زا تا سه مرحله کروی، قلبی و اژدری پیش رفتند.

واژه‌های کلیدی: *Eucalyptus rubida*، رویان‌زایی بدنی، کالوس و کشت بافت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۸۵۹۷۳۸ ، پست الکترونیکی : ghamari-zare@rifr-ac.ir

مقدمه

اکالیپتوس از دو واژه یونانی Eu به معنای خوب و Calyotus به معنای پنهان مشتق شده است (۲). جنس اکالیپتوس متعلق به تیره Myrtaceae، زیرتیره Leptospermoideae، تبار Leptospermeae و زیرتبار Eucalyptinae می‌باشد (۱ و ۳).

درختان اکالیپتوس بیش از یکصد سال پیش به ایران وارد شد و در جنوب کشور که محیط مناسبی برای آنها بود کشت شدند. با توجه به سریع‌الرشد بودن گونه‌های مختلف اکالیپتوس، نیاز کشور به واردات چوب‌های صنعتی، مشکل سازمان‌های اجرایی از نظر انتخاب گونه‌های سازگار و مناسب، ضرورت اجرای برنامه‌های جنگل‌کاری و احیای جنگل‌های مخروبه (سردابی و همکاران، ۱۳۷۷) و همچنین خواص دارویی، تولید چوب بالا، مناسب جنگل‌کاری بودن گونه *E. rubida* که در بخشی از کشور ایران که دارای پوشش کم جنگلی است (۲)، اهمیت این بررسی بیش از پیش روشن می‌گردد. اما با توجه به‌اینکه باززایی اکالیپتوس‌ها به‌طور طبیعی از طریق بذر موجب تفرق در نتاج می‌گردد و نیز مشکلات ناسازگاری عمل پایه و پیوندک و عدم ریشه‌زایی در قلمه‌ها، تکثیر به روش کشت بافت در جنس اکالیپتوس مفید به‌نظر می‌رسد.

کشت بافت و سلول گیاهی ابزار مهمی برای مهندسی ژنتیک و مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی است (۱ و ۳). این روش‌ها امکان تولید گیاه کامل را از یک سلول یا بافت

جدا شده از هر اندام گیاهی و همچنین امکان تولید هزاران گیاهچه، مشابه گیاه مادری را در مدت زمان بسیار کوتاه و در فضای فیزیکی بسیار محدود، در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) فراهم کرده است. با پیشرفت علم روش‌های متنوع و کارآمدتری نیز از روش‌های قدیمی مشتق گردیدند، که یکی از فناوری‌های جدید، رویان‌زایی بدنی می‌باشد (۱۳ و ۱۴). رویان‌زایی بدنی (Somatic embryogenesis) فرایندی است که به‌وسیله آن سلول‌های غیرجنسی تحت تمایز، یک ساختار دوقطبی (Bipolar) شامل هر دو محور ریشه و ساقه را تشکیل می‌دهند. اولین نتایج در مطالعه رویان‌زایی بدنی در شرایط درون شیشه‌ای مربوط به کشت تعلیقی در *Daucus carota* است (۱۳ و ۱۴). Assareh (۱۹۹۸) نیز به‌منظور بهبود کشت بافت، باززایی، اندام‌زایی، رویان‌زایی بدنی و ریزازدیادی به روش فتوتروفیک را در چند گونه اکالیپتوس ارائه کرد(۴). رویان‌زایی بدنی و باززایی مستقیم با بکارگیری هورمون‌های IBA و 2,4-D بر روی *E. globulus* (۱۰) و در *E. tereticornis* با استفاده از ۱۰/۷۴ میکرومول NAA برای تولید کالوس و ۲/۲۲ میکرومول BAP (۱۱) نیز انجام شده است. تولید رویان بدنی گونه *E. nitens* به‌کمک تیمار BAP ۰/۵ mg/l + NAA۱mg/l و انتقال کالوس‌ها به تیمار BAP ۰/۵mg/l در محیط MS انجام شد (۵). گزارش‌هایی نیز در مورد تولید رویان بدنی در گونه‌های *E. citriodora* (۹)، *E. dunnii* (۱۵ و ۱۸) و *E. grandis* (۱۷ و ۱۸) ارائه شده است.

گونه *E. rubida* بومی استرالیا بوده و در استان‌های شمالی و جنوبی ایران نیز به‌صورت دست‌کاشت موجود است، به‌طوری‌که تمامی مزایای اکالیپتوس‌ها شامل مصارف تجاری، دارویی و ... را دارا می‌باشد. عدم وجود بذر کافی برای تولید نهال برای جنگل‌کاری در زراعت چوب و استخراج مواد دارویی و نیز مشکلات تولید کلن به‌علت ناسازگاری عمل پیوند و عدم ریشه‌زایی در قلمه‌ها به‌دلیل وجود مواد بازدارنده ریشه‌زایی در بافت‌های بالغ، بررسی امکان تکثیر انبوه این گونه از طریق رویان‌زایی بدنی هدف این پژوهش قرار گرفت.

مواد و روشها

بذر گونه *E. rubida*، از درختان سازگاریافته در استان گیلان، رضوان‌شهر، نهالستان شاندرمن و مجاور جنگل‌های شفارود جمع‌آوری شد. برای تولید گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی مراحل پیش‌سترون‌سازی بذرها، شامل شستشو با محلول حاوی مایع ظرفشویی به‌مدت ۵ دقیقه، قرارگیری در زیر آب جاری به‌مدت ۲ ساعت و غوطه‌وری در الکل ۷۰٪ (v/v) به‌مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. سپس سترون‌سازی زیر هود مخصوص کشت بافت شامل غوطه‌ور کردن بذرها در هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (v/v) به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. آنگاه بذرها سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. بذرهای سترون شده در شرایط سترون در محیط کشت MS با یک دوم میزان نیترات در قالب طرح کاملا تصادفی، در ۳ تکرار و در هر تکرار ۸۰ عدد بذر کشت شد. بذرها به‌مدت ۳۰ روز در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور kLux ۹-۷، دمای $۲۵^{\circ c}$±۲۳ و ۸ ساعت تاریکی در همان دمای $۲۵^{\circ c}$-۲۳ قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه حاصل از گیاهچه‌های عاری از آلودگی، جدا شده و در محیط کشت MS با تیمارهای هورمونی متفاوت به‌منظور تولید رویان مصنوعی کشت شدند. در مجموع در این پژوهش ۳۶ تیمار هورمونی در محیط کشت MS نیمه‌جامد (جدول های ۱ و ۳ تیمار هورمونی متفاوت در محیط کشت MS مایع (جدول ۲) استفاده شد. به‌منظور تبدیل صفات کیفی کالوس‌ها به صفات کمی، به‌طور جداگانه برای هر صفت مورد بررسی، کدهایی مطابق جدول ۳ در نظر گرفته شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل گردیدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی محیط‌های کشت نیمه‌جامد MS برای رویان‌زایی (مقادیر هورمون‌ها بر حسب mg/l)

کد تیمار	TDZ	2,4-D	Kinetin	BA	NAA	ABA	زغال فعال	کمپلکس ویتامین*
۱	۰/۰۵	۰/۵	–	–	–	–	–	–
۲	۰/۰۵	۱	–	–	–	–	–	–
۳	۰/۰۵	۱/۵	–	–	–	–	–	–
۴	۰/۱	۱/۵	–	–	–	–	–	–
۵	۰/۱	۰/۵	–	–	–	–	–	–
۶	۰/۵	۰/۵	–	–	–	–	–	–
۷	۰/۵	۱	–	–	–	–	–	–
۸	۰/۵	۱/۵	–	–	–	–	–	–
۹	۰/۱	۱	–	–	–	–	–	–
۱۰	–	۲	–	–	–	–	–	–
۱۱	–	۳	–	–	–	–	–	–
۱۲	–	۴	–	–	–	–	–	–
۱۳	–	۴	–	–	–	–	3gr/1000 cc	–
۱۴	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	–
۱۵*	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	–
۱۶**	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	–
۱۷	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	به جز تیامین
۱۸*	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	✔
۱۹	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	✔ ✔
۲۰	–	۱	–	۰/۲	–	–	3gr/1000 cc	–
۲۱***	–	۱	–	۰/۲	–	–	–	–
۲۲	–	۲	۱	–	–	–	–	–
۲۳	–	۲	۲	–	–	–	–	–
۲۴	–	۲	۲	–	–	۲۰	–	–
۲۵	–	۲	۲	–	–	–	–	ASA
۲۶	–	–	–	–	–	۲۰	–	ASA
۲۷	–	–	–	–	–	۱۰	–	ASA
۲۸	–	–	–	–	–	۲۰	–	–
۲۹	–	–	–	۰/۲	۱	–	–	–
۳۰	–	–	–	۱	۱	–	–	–
۳۱	–	–	–	۱	۲	–	–	–
۳۲	–	–	–	۲	۲	–	–	–
۳۳	–	–	–	۱	۳	–	–	–
۳۴	–	–	–	–	۱	–	–	–
۳۵	–	–	–	–	۲	–	–	ASA
۳۶	–	–	۰/۵	–	۱	–	–	ASA

*: نصف میزان نیترات معمول، **: دو برابر نیترات معمول، ***: فسفات ۴ برابر میزان معمول و ASA: آسکوربیک اسید

✔ کمپلکس کامل ویتامین (بیوتین 1 mg/l، کلسیم 0.5 mg/l، ریبوفلاوین 0.5 mg/l، اسیدفولیک 0.5 mg/l، آسکوربیک‌اسید 100 mg/l، تیامین 10 mg/l)

✔ ✔ کمپلکس ویتامین + نیکوتینیک اسید + پیریدوکسین

جدول ۲- تیمارهای هورمونی محیط‌های کشت سوسپانسیون MS برای رویان‌زایی (مقادیر هورمون‌ها بر حسب mg/l)

تیمار	2,4-D	BA	ABA	کمپلکس ویتامین*
۱	۱	۰/۲	۲۰	–
۲	۱	۰/۲	–	–
۳	۱	۰/۲	۲۰	ASA

**: نیترات دو برابر میزان معمول و ASA: آسکوربیک اسید

جدول ۳- تولید کالوس، نوع و اندازه کالوس در ریزنمونه‌های کشت شده

کد	تولید کالوس	کد	توانایی رویان‌زایی
۰	عدم تولید کالوس	۰	عدم تولید کالوس
۱	کالوس بسیار محدود	۱	کالوس فاقد کیفیت گلوبولار
۲	کالوس محدود یکنواخت	۲	کالوس بسیار محدود گلوبولار
۳	کالوس نسبتا بزرگ یکنواخت	۳	کالوس گلوبولار
۴	کالوس بزرگ یکنواخت	۴	کالوس گلوبولار با کیفیت مناسب
۵	کالوس بسیار بزرگ و یکنواخت	۵	کالوس درشت، بسیار گلوبولار و با کیفیت مناسب

نتایج

در حدود ۱۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت نیمه‌جامد، با ۳۶ تیمار هورمونی متفاوت (جدول ۱)، کالوس‌زایی (شکل ۴) از محل بریدگی ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه شروع شد. برخی از کالوس‌هایی که کیفیت مطلوبی داشتند به محیط کشت‌های مایع (جدول ۲) منتقل شدند. سلول‌های حاصل از کالوس‌های رویان‌زا تا مرحله اژدری پیش رفتند (شکل ۳).

تأثیر هورمون‌های TDZ و 2,4-D بر تولید کالوس‌های رویان‌زا: نه تیمار هورمونی مختلف TDZ و 2,4-D (جدول ۱) بر ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ اثر کاملا متفاوتی بر کالوس‌زایی و تولید کالوس رویان‌زا داشتند (جدول ۴). در مجموع تیمار هورمونی ۸ حاوی ۰/۵ mg/l :TDZ، ۱/۵ mg/l :2,4-D از نظر کالوس‌زایی و تیمار ۶ حاوی ۰/۵ mg/l :TDZ، ۰/۵ mg/l :2,4-D از نظر تولید کالوس‌های رویان‌زا (کالوس‌های کروی شکل و متراکم) بهترین تیمارها بودند.

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی و تولید کالوس رویان‌زا در گونه *E. rubida* با استفاده از ۹ تیمار هورمونی TDZ و 2,4-D (جدول ۱)

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات	F value	Pr>F
کالوس‌زایی	۸	۲۱/۸۸	۱۹/۳۴	۰/۰۰۰۱
تولید کالوس رویان‌زا	۸	۲۴/۳۴	۲۵/۲۳	۰/۰۰۰۱

تأثیر هورمون 2,4-D بر تولید کالوس‌های رویان‌زا: پس از گذشت سه ماه از اثر ۹ تیمار هورمونی مختلف TDZ و 2,4-D (جدول ۱) بر ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، ریشه و ساقه، مقادیر کاملا متفاوتی کالوس تولید شد. بنابراین به‌منظور بررسی نقش 2,4-D به تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در کالوس‌زایی و تولید کالوس‌های رویان‌زا چهار تیمار هورمونی مختلف 2,4-D در نظر گرفته شد (جدول ۱). این تیمارها نشان دادند که افزایش 2,4-D به تنهایی و در غیاب اکسین‌ها و سیتوکینین‌های دیگر، تأثیر خاصی بر تولید کالوس و پیشبرد آن به سمت رویان‌زایی نداشته و افزایش 2,4-D به همراه سایر هورمون‌های رشد تولید کالوس را افزایش داد (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی و تولید کالوس رویان‌زا در گونه *E. rubida* با استفاده از ۴ تیمار هورمونی 2,4-D

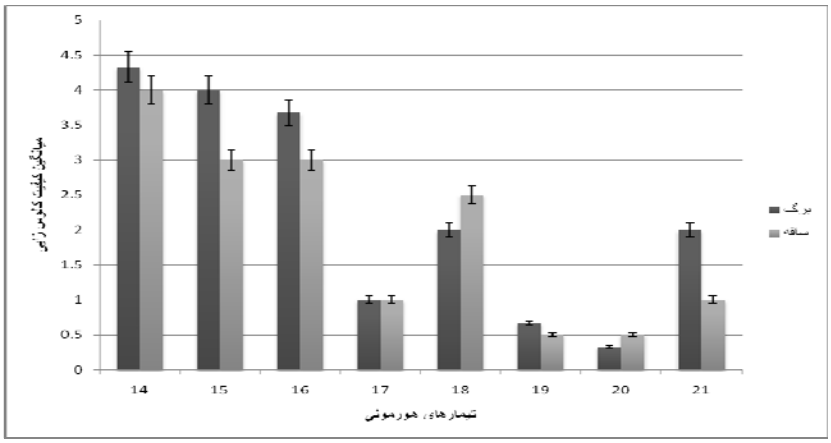
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F value	Pr>F
کالوس‌زایی	۳	۰/۸	۲/۳۸	۰/۰۷۶
تولید کالوس رویان‌زا	۳	۰/۲	۰/۷۹	۰/۵

تأثیر هورمون‌های BA و 2,4-D بر تولید کالوس‌های رویان‌زا: نتایج ۸ تیمار هورمونی 2,4-D همراه با TDZ و یا بدون TDZ (جدول ۱) پس از گذشت سه ماه بر ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و ساقه گیاهچه‌های دانه‌زاد گونه *E. rubida* بر کالوس‌زایی و تولید کالوس‌های رویان‌زا بسیار متفاوت بودند (جدول ۶). تیمار شماره ۱۴ (BA: ۰/۲ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l) در بین ۸ تیمار هورمونی مختلف 2,4-D و BA (جدول ۱) بر ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی و ساقه گونه *E. rubida* بیشترین میزان کالوس را تولید کرد (شکل ۱). گرچه میزان کالوس تولید شده در ریزنمونه برگ لپه‌ای توسط این تیمار بیشتر از ریزنمونه ساقه بود ولی اختلاف آنها از نظر آماری معنی‌دار نبود. میزان کالوس تولید شده در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و ساقه توسط تیمار شماره ۱۷ برابر بود. در حالی که تیمارهای شماره ۱۵، ۱۶ و ۲۱ باعث تولید کالوس بیشتر در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای شدند؛ تیمار شماره ۱۸ موجب تولید کالوس بیشتر در ریزنمونه‌های ساقه شد (شکل ۱).

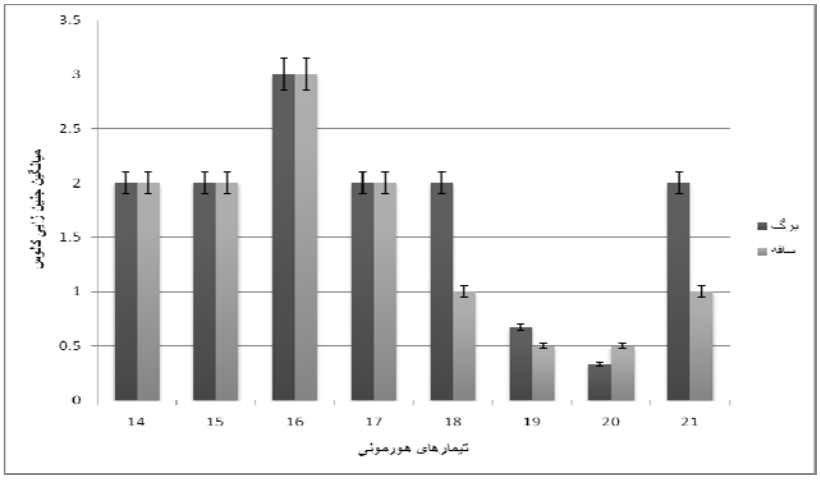
تیمار شماره ۱۶ (BA: ۰/۲ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l و نیترات دو برابر) نیز در بین ۸ تیمار هورمونی مذکور (جدول ۱) بیشترین میزان کالوس رویان‌زا را در میان ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و ساقه داشت (شکل ۲). میزان کالوس رویان‌زا تولید شده از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و ساقه در تیمارهای شماره ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷ با هم برابر بود. در صورتی که در تیمارهای ۱۸، ۱۹ و ۲۱ ریزنمونه برگ لپه‌ای و در تیمار ۲۰ ریزنمونه ساقه بیشترین میزان کالوس رویان‌زا را تولید کردند (شکل ۲).

جدول ۶- **تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی و تولید کالوس رویان‌زا در گونه *E. rubida*** با استفاده از ۸ تیمار هورمونی 2,4-D و BA

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F value	Pr>F
کالوس‌زایی	۷	۴۲/۷۲	۱۳۹/۹۷	۰/۰۰۰۱
تولید کالوس رویان‌زا	۷	۱۳/۸۸	۱۰۹/۹۳	۰/۰۰۰۱

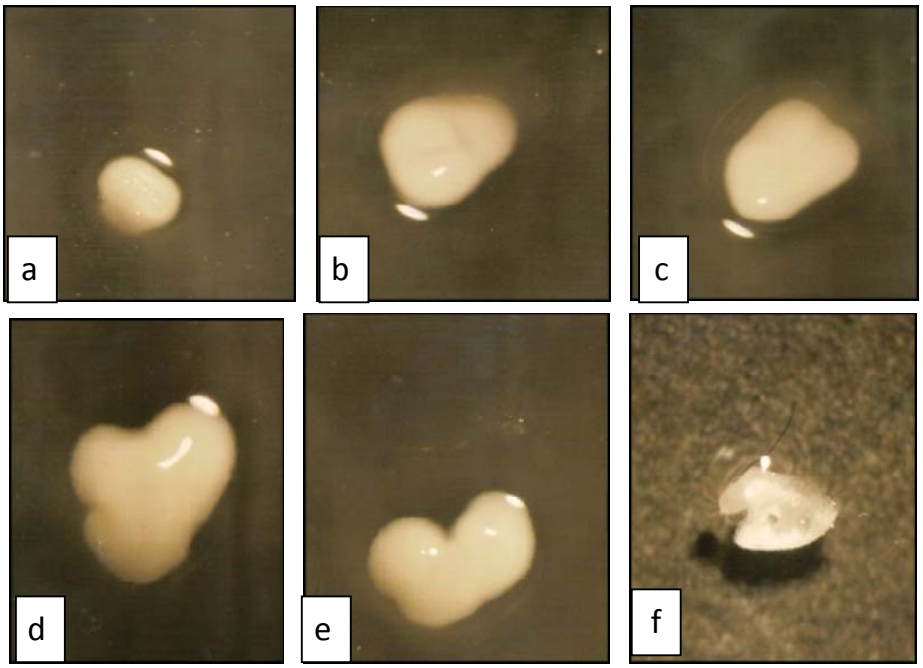


شکل ۱- مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی BA و 2,4-D (جدول ۱) بر کیفیت کالوس از ریزنمونه‌های برگ و ساقه گونه *E. rubida*



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی BA و 2,4-D (جدول ۱) از نظر رویان‌زایی کالوس از ریزنمونه‌های برگ و ساقه در گونه *E. rubida*

تأثیر هورمون‌های BA و 2,4-D در کشت سوسپانسیون بر تولید کالوس‌های رویان‌زا: در بین سه تیمار حاوی BA و 2,4-D شامل تیمار ۱ (BA: ۰/۲ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l و ABA)، تیمار ۲ (BA: ۰/۲ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l و نیترات دو برابر) و تیمار ۳ (BA: ۰/۲ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l و ABA به همراه آسکوربیک اسید)، (جدول ۲)، پس از گذشت سه ماه، تنها کالوس‌های ریزنمونه‌های ریشه در تیمار ۱ در کشت مایع (سوسپانسیون) موفق به تولید رویان مصنوعی گردیدند (شکل ۳). شایان ذکر است که به‌منظور جلوگیری از کمبود مواد غذایی و دسترسی مداوم کالوس‌ها به هورمون‌های موجود در محیط کشت، در طول سه ماه هر هفته محیط کشت مایع (سوسپانسیون) تعویض شد.

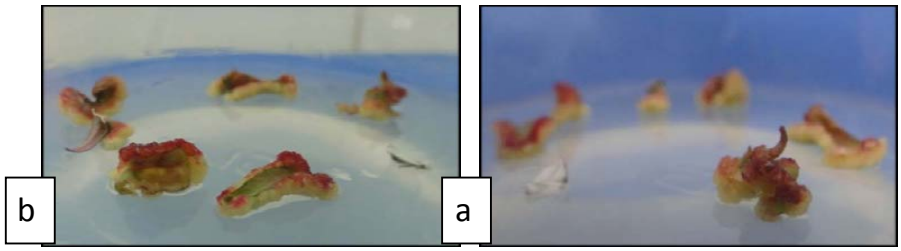


شکل ۳- مراحل تشکیل رویان بدنی در کشت مایع (سوسپانسیون) در گونه *E. rubida* حاصل از کالوس‌های ریزنمونه‌های ریشه در تیمار ۱ (جدول ۲) پس از گذشت سه ماه. (مرحله کروی (a)، اتمام مرحله کروی و ورود به مرحله قلبی (b و c)، شروع مرحله قلبی (d)، مرحله قلبی (e)، مرحله اژدری (f))

تأثیر هورمون‌های Kinetin و 2,4-D بر تولید کالوس‌های جنین‌زا : در بررسی ریزنمونه‌های لپه و ریشه گیاهچه‌ها در محیط کشت MS با ۴ ترکیب مختلف هورمونی از Kinetin و 2,4-D (جدول ۱) پس از گذشت سه ماه مقادیر کاملا متفاوتی کالوس و کالوس رویان‌زا تولید کردند (جدول ۷). اما کالوس‌های تیمارهای TDZ و 2,4-D و همچنین 2,4-D و BA از نظر کیفیت مطلوب‌تر درشت، بسیار گلوبولار بودند (شکل ۴).

جدول ۷- تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی و تولید کالوس رویان‌زا از ریزنمونه‌های لپه و ریشه گیاهچه‌های عاری از آلودگی گونه *E. rubida* با استفاده از ۴ تیمار هورمونی 2,4-D, Kinetin

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F value	Pr>F
کالوس‌زایی	۳	۱۳/۹۶	۱۳/۴۵	۰/۰۰۰۱
تولید کالوس رویان‌زا	۳	۸/۱	۸/۱۲	۰/۰۰۰۱



شکل۴- کالوس‌های رویان‌زا (گلوبولار) تشکیل شده از گیاهچه‌های عاری از آلودگی گونه *E. rubida* در محیط کشت MS حاوی BA و 2,4-D از ریزنمونه هیپوکوتیل (a) و ساقه (b)

تأثیر تیمارهای هورمونی ۱- Kinetin، ۲- NAA، BA و NAA و ۳- NAA بر تولید کالوس‌های رویان‌زا : دو تیمار هورمونی حاوی NAA به تنهایی و NAA به همراه ABA مورد استفاده، بنابراین NAA با یک یا چند نوع سیتوکینین به‌طور مجزا ترکیب (جدول ۱) و مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۱). در این دو تیمار بدون اینکه کالوسی تولید شود، ریزنمونه‌ها بطور مستقیم به سمت ریشه‌زایی میل کردند (شکل ۵).

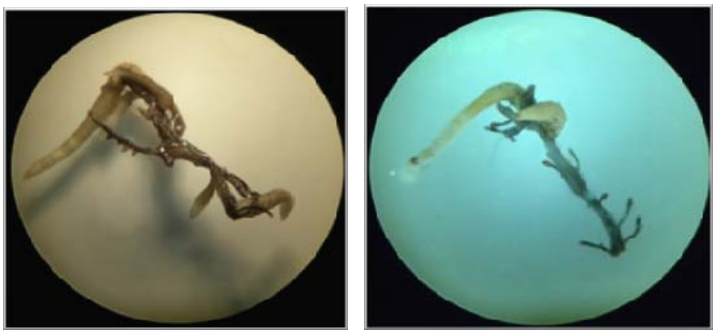
در همین راستا ابتدا تیمارهایی در نظر گرفته شد که در آنها NAA و BA با نسبت‌های متفاوت ترکیب شدند و ریزنمونه‌های ریشه و لپه در آنها کشت شد. اما پاسخ قابل قبولی در هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد، به این معنا که نه کالوسی تولید شد و نه اینکه ریزنمونه‌ها بطور مستقیم به سمت اندام‌زایی میل کردند. بنابراین این تیمارها حذف شدند. در تیمارهای بعدی NAA با Kinetin ترکیب شد و پس از گذشت چند هفته از کشت ریزنمونه‌های ریشه و لپه کالوس تولید کردند. برخی از کالوس‌های حاصل از آنها به تیمار حاوی Kinetin: ۰/۵ mg/l و NAA: ۱ mg/l منتقل شدند که هیچ تغییری در کالوس‌ها حاصل نشد و تیمارهای مذکور نیز حذف گردیدند.

بحث

اکسین‌ها به‌خصوص 2,4-D تشکیل رویان‌های بدنی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند. این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند (۶). نتایج حاصل از ۹ تیمار هورمونی مرکب از TDZ و 2,4-D در این پژوهش در حضور حداقل ۰/۱ mg/l از TDZ و افزایش میزان 2,4-D از ۰/۵ mg/l به ۱/۵ mg/l، بهبود

کیفیت کالوس‌های گلوبولار گونه *E. rubida* را به‌همراه داشت، که تقریبا همسو با نتایج Assareh (۱۹۹۸) در گونه *E. sargenti* بود. با توجه به اینکه محیط پایه در پژوهش وی B5 بود این امر نیازمند مطالعه بیشتری است. ایشان در گونه *E. viminalis* نیز نتایج کاملا مشابهی ارائه کرد.

استفاده از 2,4-D به میزان 2 mg/l برای کال‌زایی در گونه *E. camaldulensis* نیز توسط Warrag و همکاران (۱۹۸۹) گزارش شد(۱۶). Gupta و همکاران (۱۹۸۳) نیز نشان دادند که گونه‌های مختلف اکالیپتوس، نیازهای متفاوتی به اکسین‌ها دارند (۷).



شکل ۵- کشت ریزنمونه‌های لپه و تولید مستقیم ریشه (بدون تولید کالوس) در محیط حاوی NAA در گونه *E. rubida*

این پژوهش، نتایج Yeung (۱۹۹۵) که بیان داشت اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند و تمایز و تقسیم سلولی را تنظیم می‌کنند، مورد تأیید قرار می‌دهد. او نیز استعمال اکسین خارجی به‌ویژه 2,4-D را بر القا رویان‌زایی بدنی به‌خوبی مشاهده کرد (۱۹).

در این پژوهش افزایش 2,4-D به تنهایی (در ۴ تیمار هورمونی) در محیط کشت MS (جدول ۱) موجب افزایش رویان‌زایی بدنی در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، ریشه و ساقه نشد. بنابراین در گونه *E. rubida* بالا رفتن میزان 2,4-D به تنهایی و در غیاب هر نوع هورمون دیگر مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها تأثیر خاصی در تولید کالوس و پیشبرد آن به سمت رویان‌زایی نداشت. اما 2,4-D در کنار سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در رویان‌زایی بدنی مؤثر است. Warrag و همکاران (۱۹۸۹) نیز با استفاده از 2,4-D به تنهایی، تولید کالوس را در گونه *E. camaldulensis* گزارش کردند که با نتایج حاصل شده مغایرت داشت. در پژوهش حاضر ترکیب توام هورمون‌های 2,4-D: ۱ mg/l و BA: ۰/۲ mg/l در محیط کشت پایه MS و تأثیر آن بر کالوس‌زایی و تولید کالوس‌های رویان‌زا در گونه *E. rubida* بهترین نتایج را دربر داشت. در مورد تولید کالوس‌های رویان‌زا نیز، علاوه بر تیمار فوق، تیماری که میزان نیترات محیط کشت پایه آن به دو برابر میزان معمول مصرف افزایش یافته بود به‌عنوان تیمار برتر شناسایی گردید. این یافته با نتایج Assareh (۱۹۹۸) تقریبا همسو بود. وی در آزمایشهای مربوط به بررسی امکان رویان‌زایی در *E. camaldulensis* با استفاده از محیط کشت MS پایه، حاوی 2,4-D: ۱mg/l و BA: ۰/۱mg/l، نوع ریزنمونه را بر تشکیل کالوس موثر یافت که تا حد زیادی با نتایج این پژوهش مشابهت دارد. او بیان کرد که در دیسک‌های برگی تشکیل کالوس زودتر انجام شد، و میزان تشکیل کالوس در آنها بیشتر بود و با انتقال کالوس‌ها به محیط کشت ثانویه حاوی ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D رویان‌زایی بدنی انجام شد. Assareh (۱۹۹۸) همچنین مطالعات گسترده‌ای در مورد *E. microtheca* و تأثیر هورمون‌های BA و 2,4-D بر کالوس‌زایی و تولید کالوس‌های رویان‌زا در گونه مزبور دریافت که BA همراه با 2,4-D کالوس‌زایی قابل قبولی را سبب می‌گردد. همچنین وی گزارش داد که میزان تولید کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با کاهش غلظت BA از ۰/۵ به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر همراه با ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D افزایش یافت و فشردگی کالوس‌ها با افزایش 2,4-D و

کاهش BA، کاهش یافت. این نتایج نیز کم و بیش با نتایج حاصل در این پژوهش مطابقت داشت. اختلاف در میزان هورمون‌های مورد استفاده احتمالا به دلیل تفاوت نوع گونه و ریزنمونه‌های مورد آزمایش است.

از آنجائیکه پژوهش‌های زیادی از اثر تیمارهای حاوی 2,4-D و Kinetin بر کالوس‌زایی اکالیپتوس تاکنون به‌دست نیامد، اهمیت مطالعات بیشتر در مورد ترکیب Kinetin با سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها را برای رویان‌زایی بدنی در اکالیپتوس‌ها آشکار می‌سازد. نتایج بسیار قابل قبول رویان‌زایی بدنی گونه *E. dunnii* با استفاده از ۵/۵ –۶/۵ میکرومول NAA به تنهایی و یا به همراه ۴/۵ میکرومول 2,4-D (Termignoni *et al.* 1996) که باعث القا کالوس‌های رویان‌زا و تکامل رویان‌های بدنی شد با نتایج این پژوهش مغایرت داشت که نیازمند مطالعات بیشتری است. در همین راستا، Pinto و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مطالعاتی بر روی رویان‌زایی بدنی گونه *E. globules* عنوان کردند که سطوح کاهشی NAA در محیط کشت ثانویه بر روی کالوس‌های حاصل از کشت در محیط کشت MS فاقد هورمون تکثیر رویان‌های بدنی گلوبولار را افزایش می‌دهد. آنان همچنین همانند نتایج حاصل شده در این پژوهش گزارش کردند که اضافه کردن Kinetin به محیط کشت در تکثیر جنین‌های گلوبولار تأثیری ندارد (۱۲).

در یک نتیجه‌گیری کلی بر اساس نتایج پژوهش‌های قبلی و این پژوهش، نقش 2,4-D و افزایش آن به‌ویژه در کالوس‌زایی و رویان‌زایی بسیار مشهود است. حداقل میزان 2,4-D لازم برای کالوس‌زایی و رویان‌زایی در گونه *E. rubida* به مقدار 0.5 mg/l پیشنهاد می‌گردد. همچنین ترکیب کردن 2,4-D با BA در محیط کشت مایع (سوسپانسیون) نتایج بسیار مطلوبی در جهت پیشبرد کالوس‌ها به سمت رویان‌زایی داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد که موجب تشکر و قدردانی است.

منابع

۱. عصاره م ح و سردابی ح ۱۳۸۶. اکالیپتوس، شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین. جلد اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

۲. ثاقب طالبی خ، ساجدی ت و یزدیان ف ۱۳۸۴. نگاهی به جنگلهای ایران. موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، بخش تحقیقات جنگل، ص ۱.

۳. سردابی ح، لطیفی م ف.، ضیابری س ض.، نامور خ.، خزایی ح.، شبابی ح و لسانی م ۱۳۷۷. بررسی سازگاری گونه‌های مختلف اکالیپتوس و کاج در مناطق ساحلی و کم ارتفاع شرق استان مازندران از ۱۳۵۰ تا ۱۳۶۷. نشریه شماره ۱۹۳ موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ص ۱۲۳.

4. Assareh, MH 1998 *In vitro* culture plant regeneration through organogenesis, somatic embryogenesis and photoautotrophic micropropagation of some *Eucalyptus*. PhD Thesis, p 200, National University of Ireland, Irland.

5. Bandyopadhyay, S, Cane, K, Rasmussen, G and Hamill, JD 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate *Eucalyptus* species- *Eucalyptus nitens* and *E. globules*. Plant Science 140: 189-198.

6. De Klerk, GJ 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemicals, P17-25.

7. Gupta, PP 1983 Microspore-derived haploid, diploid and triploid plants in *Petunia violaceae* Lindl. Plant Cell Reports, 2: 255-256.

8. Muralidharan, EM and Mascarenhas, AF 1987. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in

Eucalyptus citriodora. Plant Cell Reports, 6: 256-259.

9. Muralidharan, EM and Mascarenhas, AF 1995. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 2 Kluwer, Dordrecht, pp 23-40.
10. Nugent, G and Chandler, SF 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 85-88.
11. Prakash, MG and Gurumurthi, K 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Division of Plant Biotechnology and Cytogenetics, Institute of Forest Genetics and Tree Breeding, Coimbatore, 641 002, India.
12. Pinto G, Park Y, Silva S, Neves L, Araujo C and Santos C 2008. Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of Eucalyptus globules Labill., 95: 69-78.
13. Reinert, J 1958. Untersuchungen uber die morphogenese an gewbekulturen Berichet Deutsche Botanische Gesellschft, 71:15.
14. Steward, FC, Mapes, MO and Smith, J 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. American Journal of Botany, 45:693-703.
15. Termignoni, RR, Wang, Po-jen. and Ching-yeh-Hu. 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*., 45: 129-132.
16. Warrag, EEI 1989. Direct and indirect tissue culture micropropagation and greenhouse plantlet evolution of superior *Eucalyptus grandis* hybrids. Ph.D. Thesis , University of Florida, United State of America, Florida, pp.141.
17. Watt, MP, Blakeway, F, Cresswell, CF and Hrman, B 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. South African Forestry Journal, 157: 59-65.
18. Watt, MP, Blakeway, FC, Termignoni, FC and Jain, SM 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E dunni*. In Somatic Embryogenesis in Wood , SM, Gupta, Pk and Newton, RJ. 1999. Plants. Kluwer, Dordrecht. vol. 5. pp. 63– 78.
19. Yeung, EC 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, TA (ed) *In vitro* Embryogenesis in Plants: 205-248. Kluwar Academic Publishers, Dordrecht.

The effect of six plant growth regulators on somatic embryogenesis in *Eucalyptus rubida*

Ghamari Zare A.[1] and Ghadiri Sardrood S.[2]

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

[2] Tehran Payam Noor University, P.O. Box: 19395-4697, Tehran, Iran.

Abstract

Since Iran in comparison with other countries is a country with low cover forest, using fast-growing species of *Eucalyptus* could play a key role to extend such coverage. However, micropropagation methods applied for colon production of best-qualified verity and/or species of *Eucalyptus* by many researchers, because of difficulties in *Eucalyptus* propagation through usual methods. The possibility of micro propagation of Eucalyptus rubida (Candlebark Gum) through somatic embryogenesis was investigated for the first time. Leaf cotyledon, stem and root explants of un-contaminated *E. rubida* plantlets were cultured on semi-solid MS media with 36 hormone treatments and 3 MS liquid media, all together 39 MS media. The best results obtained in liquid MS media supplemented with 0.2 mg/l BA, 1 mg/l 2,4-D and ABA by root explants' calli on the first medium with 2,4-D and TDZ. Embryogenic calli proceeded three global, heart-shaped and torpedo stages.

Key words: *Eucalyptus rubida,* Somatic embryogenesis, Callus, Tissue culture.