بررسی جنین‌زایی بدنی در برخی از گونه‌های اکالیپتوس

محمد حسن عصاره [1]

چکیده

به منظور بررسی جنین زایی بدنی در گونه‌های اکالیپتوس، نوع ریز نمونه (بساک، محور زیرلپه، لپه‌ها، پهنک برگ و دمبرگ)، نوع محیط کشت (MS, B5)، انواع هورمونها از قبیل اکسینها (NAA,2,4-D) و سایتوکینینها (BAP, TDZ) به علاوهٔ شرایط محیطی (نور، تاریکی و درجه حرارت) مورد آزمایش قرار گرفتند. کالوس جنین زای حاصل از ریز نمونه محور زیر لپه در گونهٔ *Eucalyptus camaldulensis* درمحیط کشت اولیه که عبارت بود از محیط کشت B5 محتوی ۲ میلیگرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر BAP، تشکیل گردید و زمانی که در محیط کشت ثانویه B5 تغییر یافته با ترکیب ۰/۵ تا ۱/۰ میلیگرم بر لیتر 2,4-D قرار داده شدند، رشد و نمو خود را آغاز نمودند. در ضمن زمانی که در محیط کشت اولیه از ۱ تا ۲ میلیگرم بر لیتر NAA و ۰/۲۵ میلیگرم بر لیتر TDZ استفاده شد نیز نتایج قابل قبولی حاصل گردید. تعداد زیادی از جنینها همزمان در محیط کشت MS نیمه قدرت یا کامل، در شرایط نوری ۴۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ و بدون هورمون، جوانه زده و به مرحله بلوغ رسیدند. جنینهای ثانویه در محیط کشت ثانویه نیز بدست آمد. ریز نمونه محور زیر لپهٔ گونهٔ *E. sargentii* وقتی که در محیط کشت اولیه شامل ۱ میلیگرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلیگرم بر لیتر TDZ قرار گرفت، تعدادی جنین غیرهمزمان تولید کرد. هنگامی که برای جنین زایی بدنی در سایر گونه‌های اکالیپتوس از همین روشها استفاده شد، ریشه‌زایی یا اندام‌زایی مشاهده

۱- عضو هیأت‌علمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان خوزستان، اهواز - صندوق پستی ۳۳۴۱ - ۶۱۳۳۸

گردید، اما جنین‌زایی صورت نگرفت. تلاشهای انجام شده برای برقراری کشتهای تعلیق یاخته‌ای جنین‌زا رضایت بخش نبود. گیاهکهای تولید شده از جنینهای بدنی به‌طور موفقیت‌آمیزی استقرار یافته و با ظاهر مورفولوژیکی کاملاً طبیعی به مدت چندین ماه به رشد و نمو خود ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: کالوس، جنین زایی بدنی، اکالیپتوس، اندام زایی

مقدمه و سابقهٔ تحقیق

جنس *Eucalyptus* متعلق به خانوادهٔ *Myrtaceae* بوده و مرکز گسترش آن استرالیا می‌باشد، اما بعضی از گونه‌های آن در سرزمین‌های گینهٔ نو، تیمور و فیلیپین نیز یافت شده است Turnbull و Boland ، (۱۹۸۴). در حال حاضر توسعهٔ کشت گونه‌های مختلف اکالیپتوس برای جنگلکاری و بهره‌برداری در صنایع چوب و کاغذ و سایر کاربردها در سرتاسر جهان رو به افزایش است. چون تمام گونه‌های اکالیپتوس درختانی دگرگشن هستند، دو رگ‌گیری طبیعی بین گونه‌ای سبب ایجاد تفرق پیچیده در نسلهای بعد می‌گردد. بنابراین حفظ ویژگیهای اکالیپتوس با روشهای ازدیاد جنسی دشوار است. برای حفظ ویژگیهای برتر، استفاده از روشهای معمول ازدیاد غیرجنسی، همچون قلمه، خوابانیدن، پیوند و کوپیوند به دلیل مشکل بودن پرآوری[1] ریشه‌های نابه‌جا میسر نبوده یا موفقیت بدست آمده بسیار اندک است.

امروزه در بسیاری از آزمایشگاههای پژوهشی از فنون ریز ازدیادی درون شیشه‌ای در جهت ازدیاد سریع گونه‌ها و واریته‌های مناسب اکالیپتوس استفاده می‌شود (Ouyang و Peng ، ۱۹۹۰). از طریق این روش، انتقال ویژگیهای ارزشمند ژنتیکی به

1- Proliferation

صورت دست نخورده به نسلهای بعد امکان‌پذیر است. فنون کشت بافت، علاوه بر توانایی بالقوهٔ ازدیاد غیرجنسی نباتات نسبت به روشهای معمول، به عنوان ابزاری ارزشمند برای مهندسی ژنتیک، مطالعات ملکولی و فیزیولوژیکی شناخته شده است.

اولین گزارش جنین زایی بدنی [۱] در اکالیپتوس در مورد گونه *E. citriodoa* از جنینهای مشابه حاصل از کالوسهایی با ساختمان دانه‌ای [۲] بود (Lakshimi- sita، ۱۹۷۹). وی در مقاله‌ای دیگر، مراحل کروی [۳] و قلبی شکل [۴] را گزارش نمود (Lakshimi- sita، ۱۹۸۲). این اندامها به دلیل وجود مواد فنلی در محیط کشت، قادر به نمو و تکامل نبودند. همین محقق در سال ۱۹۸۶ جنین زایی بدنی در کالوس مشتق شده از شاخه‌های درختان چهار ساله *E. grandis* را در محیط کاشت MS با ۰/۱ میلیگرم بر لیتر NAA [۵] و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر کینتین گزارش نمود. Kirby و Change - Le (۱۹۹۰)، با کشت محور زیرلپه، لپه و برگهای دانهالهای جوان گونه‌های *E. dunnii, E. rudis, E. grandis, E. botryoides* و برگهای جوان همگروه‌های درختان بالغ گونهٔ *E. grandis* ساختارهای جنین مانندی را مشاهده نمودند، اما موفق به اخذ جنین کامل نگردیدند.

جنین‌زایی بدنی در گونهٔ *E. dunnii* در یکی از کارهای موفق، گزارش شد. انگیزش جنینهای بدنی در این گونه از دانهالهای سه روزه بر محیطی با NAA (۵/۵ یا ۱۶/۵ میکرومول) به تنهایی یا مخلوط با 2,4-D [۶] (۴/۵ میکرومول) انجام شد. محیط عاری از اکسین حاوی ۱۰٪ (حجم به حجم) شیرهٔ نارگیل یا یک گرم بر لیتر کازئین هیدرولیز شده توانست نمو جنینهای بدنی را تحریک نماید (Regina و همکاران، ۱۹۹۶). در جدیدترین مقالهٔ منتشر شده، Bondyopadhyas و همکاران (۱۹۹۹) توانستند

1- Somatic embryogenesis
2- nodular calli
3- globular
4- heart shap
5- Naphthaleneacetic acid
6- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

جنینهای بدنی را از سطح کالوس اندام‌زا[۱] در گونهٔ *E. nitens* بدست آورند. همچنین ساختارهای سازمان یافتهٔ مشابه با جنینهای بدنی نیز در گونهٔ *E. globulus* مشاهده گردید.

هدف اصلی از این مطالعه که برای اولین بار در مورد پنج گونه از اکالیپتوس شامل: *E. camaldulensis*، *E. sargentii*، *E. microtheca*، *E. gunnii* و *E. viminalis* انجام شده است تولید جنینهای غیرجنسی (بدنی) از طریق باززایی از کالوس در دو نوع محیط جامد و مایع بوده است.

مواد و روشها

از محیط کشت B5[۲] (Gamborg و همکاران، ۱۹۶۸) در ترکیب با دامنهٔ گسترده‌ای از هورمونهای رشد گیاهی نظیر سایتوکینین‌ها شامل BAP[۳] به غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر و TDZ[۴] در سطوح ۰/۰۵ تا ۰/۲۵ میلیگرم بر لیتر، واکسین‌ها شامل 2,4-D در سطوح ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، میلیگرم بر لیتر یا سطوح پایین شامل ۰/۱ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر و NAA ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلیگرم بر لیتر به عنوان محیط کشت اولیه استفاده گردید. تمام کالوسهای بدست آمده از محیط کشتهای اولیه به محیط کشت ثانویه که عبارت بود از یک محیط B5 تغییر یافته با ترکیبهای آلی شامل ۵۰۰ میلیگرم بر لیتر گلوتامین، ۵۰۰ میلیگرم بر لیتر کازئین هیدرولیز شده، ۳٪ ساکاروز و با ۰/۷ ٪ آگار منتقل شدند. از سطوح پایین دو نوع اکسین شامل 2,4-D در سطوح ۰/۱ و ۰/۵ یا بندرت ۰/۱ میلیگرم بر لیتر یا NAA در سطوح ۰/۱ و ۰/۵ میلیگرم در محیط کشت ثانویه استفاده گردید. این انتقال، به منظور اجازه دادن به نمو و بلوغ جنین انجام گردید.

1- Organogenic callus
2- B5: Gamborg B5 medium
3- 6-benzylaminopurine
4- tidiazoron

چون مفیدترین بافتها برای انگیزش جنین زایی،بافتهای نونهال هستند، بنابراین بافتهای مورد استفاده برای انگیزش کشت سلولهای جنین‌زا عبارت بودند از بساک (در گونهٔ *E. gunnii*)، پهنک برگ و دمبرگ گیاهان درون شیشه‌ای، محور زیر لپه و لپه‌های گونه‌های اکالیپتوس و دانهالهای درون شیشه‌ای حاصل از بذر حقیقی. در محیط‌های اولیه و ثانویه، pH قبل از عمل اتوکلاو روی ۵/۷ تنظیم گردید. کشت‌های انجام شده در محیط‌های اولیه و ثانویه تحت شرایط تاریکی با درجه حرارت ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کشتهایی که ریشه، اندام و یا جنین بدنی تشکیل داده بودند، در نهایت به محیط کشت MS نیمه قدرت یا کامل، عاری از هورمون و تحت شرایط نور ۴۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ منتقل شدند.

آزمایشهایی نیز به منظور مطالعهٔ اثر کشت مایع بر جنین‌زایی انجام شد. دو نوع دستگاه لرزا[۱] شامل دستگاه لرزای افقی[۲] و دستگاه لرزای عمودی[۳] در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در دستگاه لرزای افقی از ظروف ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری و در دستگاه لرزای عمودی از لوله‌های شیشه‌ای دهانه تنگ مخصوص (T شکل) برای بازکشت کالوسهای جنین‌زا[۴] (که از محیط کشت جامد بدست آمده بودند) استفاده گردید. به منظور آزمایش اثر لرزش بر پرآوری کالوس جنین زا در کشت‌های تعلیق یاخته‌ای[۵]، دورهای مختلف لرزش ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ دور در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در دستگاه لرزای عمودی، لوله‌ها به آرامی حول یک محور افقی چرخش نموده، به‌طوری که بافت، که به دیواره لوله می‌چسبید، به تناوب در معرض هوا قرار می‌گرفت. کشتها در هر دو دستگاه لرزا پس از هر بازکشت مورد آزمون قرار گرفته و از وزن‌تر کالوس، پرآوری کالوس جنین‌زا، جنینهای بدنی ثانویه، رنگ کالوس و اندام‌زایی و یا

1- shaker
2- orbital shaker
3- side-necked rotating wheel shaker
4- embryogenic callus
5- cell suspension culture

ریشه‌زایی یادداشت برداری به عمل می‌آمد.

از جنینهای بدنی (همزمان[۱] یا غیرهمزمان[۲]) که از محیط کشت ثانویه گونه‌های موفقیت‌آمیز اکالیپتوس بدست آمده بودند، به منظور آزمایش بلوغ و میزان تبدیل به گیاهک نمونه‌برداری انجام گردید.

جنینهای بدنی در محیط MS عاری از هورمون باز کشت شده و به مدت ۴ هفته در شرایط نور قرار داده شدند بعد گیاهک‌های طبیعی یا دو قطبی [۳](توسعهٔ لپه‌ها و وجود ریشه) را به جیفی پات (پیت فشرده) انتقال داده تا تغییر را از شرایط هتروتروف به اتوتروف طی نمایند.

آزمونها در قالب یک آزمایش فاکتوریل با تیمارهای نوع ترکیب هورمونی و نوع ریز نمونه، در یک طرح کاملاً تصادفی نامتعادل پایه‌ریزی شد. یک واحد آزمایشی یک پتری دیش بوده که هر کدام میانگین ۴ تا ۱۰ زیرنمونه را شامل می‌شد. از تشکیل کالوس پس از چهار و شش هفته از آغاز کشت، یادداشت برداری شده و مقادیر به صورت درصد ارائه شدند. همچنین میانگین سطوح تیماری توسط آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ابتدا اثر BAP در دو سطح ۰/۱ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر و 2,4-D در سه سطح ۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلیگرم بر لیتر در محیط کشت اولیه و با استفاده از ریزنمونه‌های محور زیرلپه، لپه، پهنک برگ و دمبرگ در گونهٔ *E. camaldulensis* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایشها، افزایش سطح BAP و کاهش سطح 2,4-D ,تشکیل کالوس را

1- synchronous
2- asynchronous
3- bipolar

کاهش داد (جدول شمارهٔ ۱). در مقابل، مقدار کالوس نرم[۱] با افزایش غلظت 2,4-D و کاهش غلظت BAP افزایش یافت. وقتی که کالوسهای بدست آمده به محیط کشت ثانویه با تیمار هورمونی ۰/۵ تا ۱/۰ میلیگرم بر لیتر 2,4-D منتقل شدند، تعداد اندکی از کشت‌های ریزنمونهٔ محور زیرلپه، کالوس جنین زا تشکیل دادند. تشخیص کالوس جنین زا توسط شکل و رنگ انجام گرفت. بدین ترتیب که سطح صاف کالوس با بخش کوچک زرد تا سفید بیانگر کالوس جنین زا بود که در قبل نیز توسط Gill (۱۹۹۴) برای گونهٔ *E. tereticornis* مشخص شده بود. در ضمن این بخش، دانه‌ای[۲] و از لحاظ مورفولوژیکی ناهمگن به نظر آمد. بر اساس مطالعهٔ فوق این موضوع به دلیل تمایز سلولهای مجتمع جنینی[۳] از کالوسها بود. با بازکشت کالوسهای جنین زا به محیط کشت MS عاری از هورمون و قرار گرفتن در شرایط نوری، تمایز صورت گرفته و مراحل نمو به تدریج مشاهده گردید. ادامهٔ فرایند نمو در این جنینها به ایجاد ریشه‌منجر گردیده، اما لپه تشکیل نشد. تولید گیاهک‌های غیر کامل می‌تواند با پیچیدگی شرایط محیطی و فرایندهای نموی مرتبط با بلوغ جنین، پیوند داشته باشد.

TDZ که در زمرهٔ فعالترین مواد شبه سایتوکینین است برای اولین بار در این تحقیق، به منظور انگیزش جنین زایی بدنی درگونه‌های اکالیپتوس مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، اثر TDZ (۰/۲۵ میلیگرم بر لیتر) در ترکیب با NAA در غلظتهای مختلف (۱/۰، ۲/۰، ۳/۰، ۴/۰ میلیگرم بر لیتر) و 2,4-D بر تشکیل کالوس و جنین زایی بدنی در لپه و محور زیرلپهٔ گونهٔ *E. camaldulensis* آزمایش شد. هنگامی که از ترکیب TDZ و NAA استفاده شد، نتایج رضایت‌بخشی بدست آمد. در هر دو نوع ریزنمونه یعنی محور زیرلپه و لپهٔ گونهٔ *E. camaldulensis* در محیط کشت اولیه، کالوس تشکیل شد. مقادیر و مورفولوژی کالوس به نوع و غلظت NAA وابسته بود (جدول شمارهٔ ۲).

1- friable
2- granular
3- embryonic cell aggregates

NAA با غلظتهای ۱/۰ و ۲/۰ میلیگرم بر لیتر در ترکیب با TDZ با غلظت ۰/۲۵ میلیگرم بر لیتر پس از چهارمین و ششمین هفته از کشت در شرایط تاریکی و درجهٔ حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد به طور معنی‌داری مقادیر بیشتر تشکیل کالوس را در مورد ریزنمونهٔ محور زیر لپه نشان داد. در همان سطح از TDZ و با غلظت بالای NAA کالوس خیلی فشرده بدست آمد، در حالی که با سطح پایین NAA کالوس نرم تولید گردید. رنگ کالوس در تیمارهای مختلف از روشن تا تیره متغیر بود (جدول شمارهٔ ۳). سلولهای جنین زا در بعضی از کالوسها بر روی ریزنمونه محور زیر لپه توسعه یافتند. این مشاهده با یافته‌های Bondyopadhyas و همکاران (۱۹۹۹) که بر گونه‌های *E. nitens* و *E. globulus* بدست آمده بود مشابهت نشان می‌دهد. براساس نتایج بدست آمده توسط آنها، میزان باززایی گیاه در کالوس حاصل از قطعات محور زیرلپه در مقایسه با ریزنمونه‌های لپه‌ای بیشتر بود (به ترتیب ۳۵- ۳۰٪ و ۲۵-۲۰٪). پس از ۱۵ روز از استقرار کالوسها در محیط کشت ثانویه، بخش‌های جنین زای سفید و نظام یافته در یک طرف کالوس مشاهده گردید که با یافته‌های Regina و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعات آنها در مورد ریزنمونه‌های دانهال مختلف گونهٔ *E. dunnii* همخوانی دارد. کالوسهای جنین‌زا (بخشهای سفید شده) در طی سه هفته به نمو ادامه داده و مجتمع‌های جنین زا[1] و مرحلهٔ کروی تشکیل شدند و وقتی که به محیط کشت عاری از هورمون و در شرایط نور منتقل شدند، مراحل مختلف جنینهای بدنی شامل مراحل کروی، قلبی شکل، نیزه‌ای[2] و لپه‌دار[3] توسعه یافتند (عکس‌های شمارهٔ ۱ و ۲) در تعدادی از کشت‌های کالوس جنین‌زا در محیط کشت ثانویه، جنین ثانویه[4] تشکیل شد. هنگامی که پیش جنینها[5] به یک محیط کشت عاری از اکسین و یا در محیطی شامل غلظتهای اندک

1- embryogenic aggregates
2- torpedo
3- cotyledonary
4- secondary embryo
5- proembryos

اکسین منتقل شوند، جوانه زنی و بلوغ جنینها انجام می‌گیرد. بیشتر جنینهای بدنی به صورت ساختار دو قطبی (همزمان) جوانه زده و لپه‌های به رنگ سبز روشن و ریشه‌ها را در یک زمان تشکیل می‌دهند (عکس شمارهٔ ۳). با این روش در بازکشت‌های مختلف تعداد زیادی جنین تولید شد (عکس شمارهٔ ۴). درصد اندکی از جنینهای جوانه زده، حالات غیرطبیعی را همچون توقف رشد و یا تشکیل لپه‌های غیرطبیعی و پوسیده شدن را نشان دادند.

جنینهای بدنی که جوانه زده و ظاهری طبیعی داشتند با نسبت زنده‌مانی ۸۰٪، به طور موفقیت‌آمیزی سازگار شده[1] و گیاهان بالغ حاصل از رشد جنین که از نظر مورفولوژیکی ظاهری طبیعی داشتند برای یک دورهٔ طولانی در گلخانه نگهداری شدند (عکس شمارهٔ ۵). این موفقیت اولین تولید جنینهای بدنی گونه *E. camaldulensis* بوده که در این مقاله گزارش می‌شود.

کشت تعلیق یاخته‌ای به منظور آغازش کالوس جنین زا درگونهٔ *E. camaldulensis* انجام گرفت. این کار به منظور تولید جنینهای بدنی در بیورآکتور و در نهایت تولید بذر مصنوعی مورد نیاز بود. در ضمن از همان روش جنین‌زایی بدنی در محیط جامد استفاده گردید، بااین تفاوت که از آگار استفاده نشد. برخلاف نتایج محیط کشت جامد، کشت بافت در ظروف و لوله‌های مخصوص در هر دو نوع دستگاه لرزا به شکل سازمان نیافته بوده و اندامهای معلق در محیط کشت مایع قهوه‌ای شده که این وضعیت به دلیل ترشح ترکیبهای فنلی بود. وزن تر کالوس پس از سه بازکشت در دستگاه لرزای افقی نسبت به دستگاه لرزای عمودی بیشتر بود. هر چند که هیچ یک از دو نوع دستگاه لرزا جنین یا اندام شبه جنین تولید نکردند، ولی تعدادی از نمونه‌ها در دستگاه لرزای افقی ریشه‌زایی فراوانی نشان دادند. چون استفاده از روش فوق موفقیتی در تولید جنینهای دو قطبی

1- weaning

نداشت، بنابراین از کالوسهای جنین‌زای بدست آمده در محیط کشت جامد به عنوان منبع اولیه کالوس استفاده گردید. کالوس جنین زا از محیط کشت B5 نیمه قدرت، شامل ۰/۵ میلیگرم بر لیتر 2,4-D بدست می‌آید. چنین کالوسهایی که از مجتمع‌های سلولی جنین‌زا مشتق می‌شوند به انتقال و بازکشت به محیط کشت تازه نیاز داشتند. در غیر این صورت کشتها به واسطهٔ کمبود مواد غذایی و کاهش آب و نیز تجمع ترکیبهای ناخواسته، تحلیل خواهند رفت. در نتیجهٔ چرخش یکنواخت، تعدادی تکه‌های کروی شکل در ظروف مشاهده گردید که به تدریج تعداد اندکی از آنها سخت شده و مراحل نموی جنینهای بدنی را بروز دادند، اما بیش از مرحلهٔ نیزه‌ای پیش نرفتند که ممکن است به دلیل عدم تعادل در محیط کشت غذایی، شرایط محیطی (نور و درجه حرارت) و سرعت لرزش باشد. برای تولید انبوه جنین غیرجنسی در کشتهای تعلیقی و استفاده از بیورآکتور و در نهایت تهیهٔ بذر مصنوعی در سطح وسیع در گونهٔ *E. camaldulensis* انجام تحقیقات تکمیلی ضروری و مورد نیاز است.

به منظور مطالعهٔ اثر محیط کشتهای پایه (اولیه و ثانویه) و دو نوع سایتوکینین شامل BAP در غلظتهای ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر و TDZ در غلظتهای مختلف، به صورت ترکیب با دو نوع اکسین شامل NAA در غلظتهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلیگرم بر لیتر و 2,4-D در غلظت‌های مختلف، بر تشکیل کالوس گونهٔ *E. sargentii* به‌منظور جنین‌زایی بدنی آزمایشهایی انجام شد. ریزنمونه‌های مختلفی نیز، همچون لپه، پهنک برگ، دمبرگ و نوک ریشه مورد استفاده قرار گرفت. پس از کوششهای بسیار، تعداد اندکی گیاهک‌های دو قطبی غیرهمزمان از محور زیرلپه بدست آمده که به یک محیط کشت اولیه محتوی ۱/۰ میلیگرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلیگرم بر لیتر TDZ بازکشت شدند. هنگامی که قسمتهای جنین‌زا به محیط کشت جوانه‌زنی منتقل شده و در شرایط نور قرار داده شدند، بخشهای جنین‌زا ابتدا به صورت جوانه‌های سبز تمایز یافته و آنگاه ریشه تولید کردند (عکس شمارهٔ ۶). نمو جنین از این کالوس،

غیرهمزمان بوده و تمام مراحل می‌توانست در یک ظرف کشت بدون بازکشت اولیه کردن مشاهده شود که با مشاهدهٔ Ouyang و همکاران (۱۹۸۱) مطابقت دارد.

کوششهای بسیاری به منظور تولید کالوس جنین زا در سایر گونه‌های اکالیپتوس (*E. viminalis*، *E. microtheca* و *E.gunnii*) انجام گرفت که با عدم موفقیت همراه بود. لکن تنوع کالوس از نظر کمی و کیفی با طیف وسیع مشاهده گردید. چنین کالوسهایی، در بعضی موارد اندام‌زا یا ریشه‌زا بوده، اما جنین زا نبودند (جدول‌های شمارهٔ ۴ و ۵). تعداد زیادی از تیمارهای هورمونی باانواع مختلف ریزنمونه، همراه با ترکیبهای مختلف محیط کشت به منظور انگیزش یک مسیر جنین زایی مورد آزمایش قرار گرفتند. اما جنین یا ساختار شبه جنین[1] بدست نیامد. ممکن است که بعضی از شرایط آزمایش که در این مطالعه به اجرا درآمدند، محرکهای مناسبی برای انگیزش مسیر نموی جنین زایی در این سه گونهٔ اکالیپتوس نباشند. بنابراین قضاوتی قطعی مبنی بر این که این سه گونه توانایی بالقوه‌ای برای تشکیل جنینهای بدنی ندارند، نمی‌توان اظهار داشت. به ویژه با توجه به این که جنین زایی بدنی به طور گسترده‌ای در این مطالعه برای گونه‌های *E. camaldulensis* و *E. sargentii* و در مطالعات دیگر، در سایر گونه‌های اکالیپتوس مشاهده شده است.

1- embvyo-like structures

BAP:2,4-D (میلی‌گرم‌برلیتر)	تشکیل کالوس (٪)							
	دمبرگ		پهنک برگ		محور زیر لپه		لپه	
	چهارمین هفته	ششمین هفته	چهارمین هفته	ششمین هفته	چهارمین هفته	ششمین هفته	چهارمین هفته	ششمین هفته
۰/۵+۰/۵	۱۰±۶/۱۲c	۴۵±۲۰/۲۴b	۵۵±۲۲/۹۱b	۶۵±۱۸/۷۱ab	۰±۰/۰۰c	۷۰±۹/۳۵a	۵±۵/۰۰b	۲۵±۷/۹۱b
۰/۱+۰/۵	۲۵±۶/۱۲b	۶۰±۱۰/۰۰ab	۲۰±۱۴/۵۸bc	۴۰±۱۵/۰۰b	۳۰±۵/۰۰ab	۴۰±۱۰/۰۰b	۱۰±۶/۱۲b	۲۵±۷/۹۱b
۰/۵+۱/۰	۴۵±۲۲/۹۱ab	۹۰±۶/۱۲ a	۱۵±۶/۲c	۴۵±۲۰/۰۰b	۵±۵/۰۰c	۳۵±۶/۱۲b	۲۰±۵/۰۰b	۳۵±۱۲/۷۵b
۰/۱+۱/۰	۸۰±۱۲/۲۴a	۹۰±۶/۱۲a	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰a	۳۵±۱۲/۷۵a	۷۵±۱۳/۶۹a	۱۰±۶/۱۲b	۲۵±۷/۹۱b
۰/۵+۲/۰	۵۵±۹/۳۵ab	۶۰±۱۰/۰۰ab	۹۰±۶/۱۲a	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰±۶/۱۲c	۷۰±۵/۰۰a	۶۰±۱۶/۶۶a	۹۵±۵/۰۰a
۰/۱+۲/۰	۳۰±۱۸/۳۷b	۴۰±۱۲/۷۵b	۳۵±۱۵/۰۰bc	۶۵±۱۸/۷۱ab	۴۰±۱۰/۰۰a	۸۵±۶/۱۲a	۵۵±۱۲/۲۵a	۱۰۰±۰/۰۰a

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه نمی‌باشند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$)

جدول شماره ۲ ـ اثر محیط کشت B5 تکمیل شده با نسبتهای مختلف NAA:TDZ بر تشکیل کالوس روی محور زیر لپه و لپه گونه *E. camaldulensis* پس از ۶ هفته قراردادن در تاریکی و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد

NAA+TDZ (میلی‌گرم‌برلیتر)	تشکیل کالوس (٪)			
	محور زیر لپه		لپه	
	چهارمین هفته	ششمین هفته	چهارمین هفته	ششمین هفته
۱/۰+۰/۲۵	۹۱/۹۰±۰/۶۹a	۹۷/۲۳±۱/۸۳a	۳۵/۱۹±۱۰/۴۵ab	۶۶/۹۹±۶/۹۹a
۲/۰+۰/۲۵	۸۴/۲۸±۴/۷۹a	۹۷/۵۴±۱/۵۱a	۵۵/۶۹±۶/۵۹ab	۷۶/۲۳±۰/۷۲a
۳/۰+۰/۲۵	۶۶/۸۶±۴/۲۵b	۸۶/۹۹±۳/۲۱b	۷۰/۱۴±۷/۵۷a	۷۱/۵۷±۱۵/۶۷a
۴/۰+۰/۲۵	۵۴/۲۴±۳/۷۱c	۵۹/۲۵±۳/۴۷c	۴۴/۵۹±۷/۹۵ab	۴۹/۲۴±۱۳/۷۲a

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه نمی‌باشند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند. ($P<۰/۰۵$)

جدول شماره ۳ ـ اثر غلظت NAA بر کیفیت کالوس در زیرنمونه‌های محور زیر لپه گونه *E.camaldulensis* پس‌از ۶ هفته قراردادن در تاریکی و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد

NAA+TDZ (میلی‌گرم‌برلیتر)	سختی‌کالوس*	تشکیل کالوس	کالوس‌اندام‌زا	رنگ کالوس
۱/۰+۰/۲۵	-	++++	++	کرم رنگ ـ زرد
۲/۰+۰/۲۵	+	+++	++++	زرد ـ سبز یاکرم
۳/۰+۰/۲۵	+++	++	+	رنگ‌قهوه‌ای
۴/۰+۰/۲۵	++++	+	-	خاکستری و قهوه‌ای قهوه‌ای تیره

*کیفیت کالوس برحسب معیارهای مشاهده‌ای زیر تعیین گردید:

ـ = عدم مشاهده‌ویژگی + = کم ++ = متوسط +++ = زیاد ++++ = خیلی زیاد

جدول شماره ۴ ـ اثر محیط کشت B5 تکمیل شده با نسبتهای مختلف 2,4-D:BAP بر تشکیل کالوس بر محور زیر لپه و لپه گونه *E.microtheca* پس‌از ۶ هفته قراردادن در تاریکی و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد

2,4-D+ BAP (میلی‌گرم‌برلیتر)	تشکیل کالوس (٪)			
	محور زیر لپه		لپه	
	چهارمین هفته	ششمین هفته	چهارمین هفته	ششمین هفته
۲/۰+۰/۱	۷۸±۶/۶۳a	۹۸±۲/۰۰a	۸۲±۴/۸۹a	۹۲±۴/۸۹a
۲/۰+۰/۵	۴۶±۵/۰۹b	۵۸±۵/۸۳b	۵۶±۵/۰۹c	۷۲±۹/۶۹bc
۱/۰+۰/۱	۷۶±۵/۰۹a	۸۴±۵/۰۹a	۶۶±۴/۰۰ab	۸۲±۵/۸۳ab
۱/۰+۰/۵	۳۸±۸/۶۰b	۵۶±۵/۰۹b	۴۲±۱۰/۱۹c	۵۶±۹/۲۷c
۰/۵+۰/۱	۴۲±۸/۶۰b	۵۴±۸/۱۲b	۴۶±۹/۲۷c	۵۴±۵/۰۹c
۰/۵+۰/۵	۱۰±۳/۱۶c	۱۰±۶/۳۲c	۱۲±۵/۸۳d	۱۴±۴/۰۰d

در هر ستون میانگین‌هایی که حروف مشابه ندارند در سطح ۵ درصد اختلافی معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$)

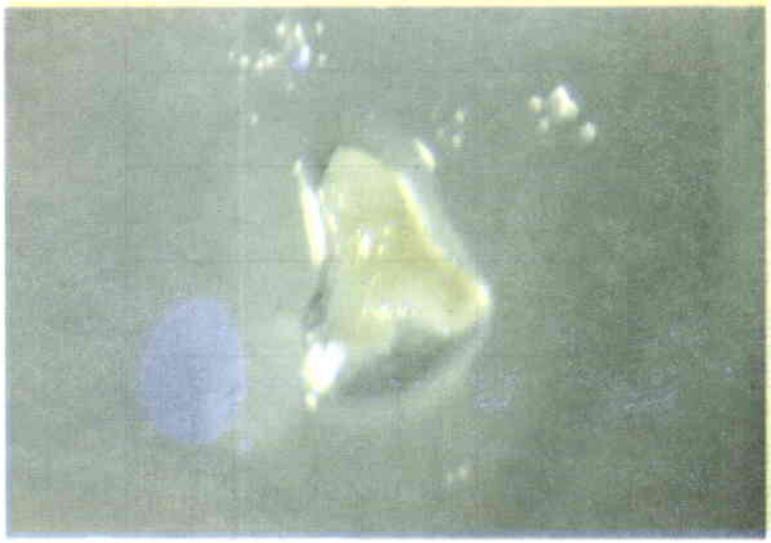
جدول شماره ۵ ـ اثر نسبتهای مختلف 2,4-D:TDZ برکیفیت کالوس در زیرنمونه‌های گونه‌های *E.viminalis, E.gunnii* پس‌از ۶ هفته قراردادن در تاریکی و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد

2,4-D:TDZ (میلی‌گرم‌برلیتر)	*E.gunnii*				*E.viminalis*			
	نرمی کالوس	تشکیل کالوس	کالوس اندام‌زا	رنگ کالوس	نرمی کالوس	تشکیل کالوس	کالوس اندام‌زا	رنگ کالوس
۰/۵+۰/۱	+	++	-	قرمز تا بنفش	+	+	-	خاکستری،سفید،کرم رنگ
۱/۰+۰/۱۰	++	+++	-	زرد - سبز بارنگدانه‌های	++	+++	-	زرد- سبز،خاکستری‌تاقهوه‌ای
۲/۰+۰/۱۰	+++	++++	-	قرمز	+++	++++	-	زرد تا کرم رنگ‌وقهوه‌ای
۰/۵+۰/۲۵	-	-	++	قرمز تیره، سبز تا قرمز، سبز	-	-	+++	روشن
۱/۰+۰/۲۵	+	+	+	روشن تا زرد	+	-	+	-
۲/۰+۰/۲۵	+++	++	-	- قرمز تا سبز روشن کرم تیره و قهوه‌ای روشن	++	++	+	قرمز تابنفش،قهوه‌ای،سبز رنگدانه‌های‌قرمز،قهوه‌ای تیره و روشن

*کیفیت کالوس برحسب معیارهای مشاهده‌ای زیر تعیین گردید:

- = عدم مشاهده ویژگی + = کم ++ = متوسط +++ = زیاد ++++ = خیلی زیاد

تصویر شماره ۱ - کالوس جنین زای گونه *E. camaldulensis* در مراحل مختلف نمو: a) کروی b) قلبی شکل c) نیزه‌ای d) مرحله اولیه لپه‌داری.

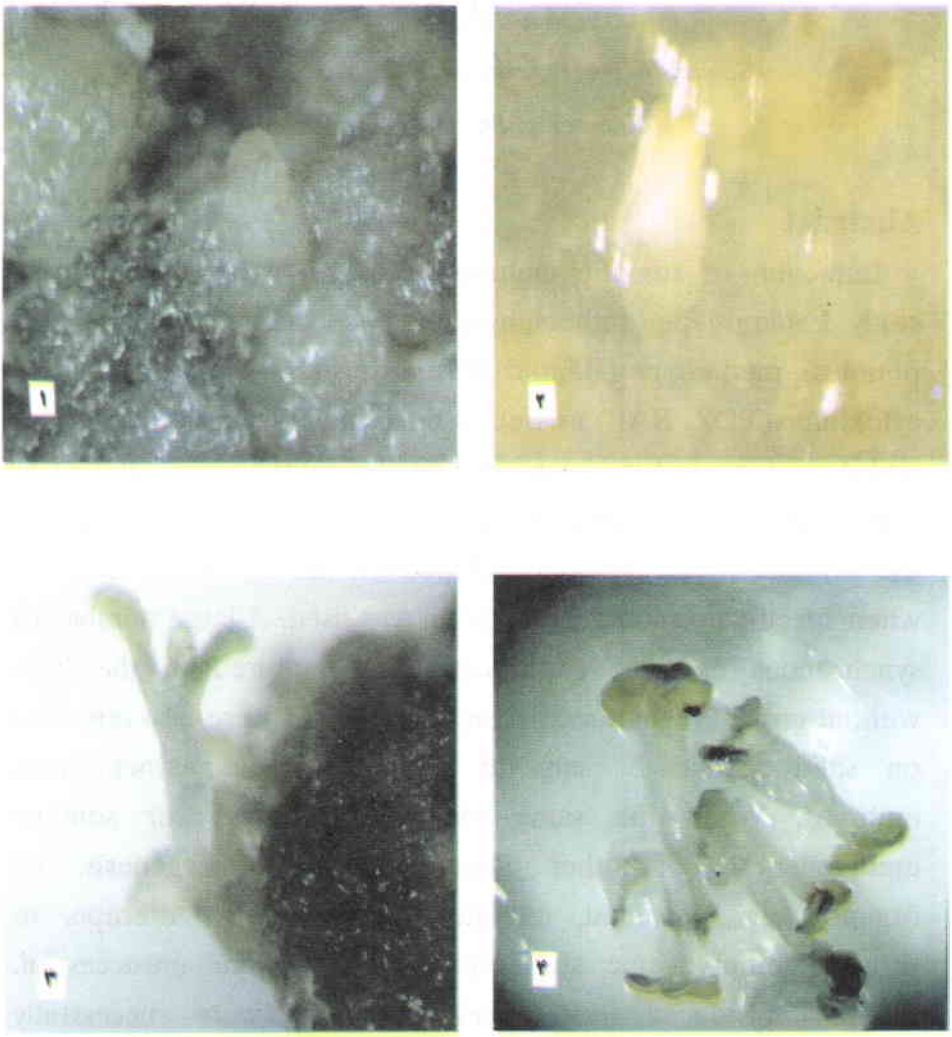


تصویر شماره ۲ - یک جنین بدنی بالغ و جوانه زدهٔ گونهٔ *E. camaldulensis* که از مرحلهٔ پیش جنین زایی (Proembryogenic stage) ایجاد شده و در محیط MS بدون هورمون در شرایط نوری پرورش یافته است

تصویر شماره ۳- جنینهای بدنی همزمان و مراحل نموی مختلف در طی فرایند جنین زایی بدنی از ریزنمونه‌های جنین زای گونهٔ *E. camaldulensis*

تصویر شماره ۴- جوانه زنی و تولید گیاهک از جنینهای بدنی گونهٔ *E. camaldulensis* در شرایط نوری بر محیط کشت عاری از هورمون

تصویر شماره ۵- گیاهان سازگار شده حاصله از جنینهای بدنی گونه *E. camaldulensis* در شرایط گلخانه



تصویر شماره ۶- مراحل ۱ تا ۴ به ترتیب از ظهور کالوس جنین زا تا تکامل گیاهک را در محیط کشت بدون هورمون در حضور نور نشان می‌دهد.

Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus spp.*

Assareh M. H.

Natural Resources Livestock Affair Research center

of Khoozestan Province, Ahvaz, Iran.

Abstract

Induction of somatic embryogenesis was attempted in this study. Explant type (anthers, hypocotyls, cotyledons, leaf discs and petioles), media type (B5 and MS), auxins (NAA and 2,4-D) and cytokinins (TDZ, BAP) as well as environmental conditions (light and dark, temperature) were evaluated. Embryogenic callus of *E. camaldulensis* originating from hypocotyl explants was formed on the primary medium and developed on the secondary medium when specific hormonal formulation was used. A large number of synchronous embryos geriminated and matured in the light without growth regulators. Secondary embryos were also obtained on solid media. *E. sargentii* produced some asynchronous embryos. When the same method was used for somatic embryogenesis of other *Eucalyptus spp.* rhizogenesis, or organogenesis, resulted, but no embryogenesis. Attempts to produce embryogenic suspension cultures were unsuccessful. Plantlets produced from somatic embryos were successfully weaned and grown in the greenhouse for several months and their appearance was morphologically normal.

Keywords: Callus, Somatic Embryogenesis, Eucalyptus, Organogenesis

منابع

1. Bandyopadhyay, S. K. Can; G. Rasmussen and J. D. Hamill, 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temprate eucalypt species; *Eucalyptus nitens* and *E. globulus. Plant Science Limerick* 140: 189-198.
2. Change - Le, Q. and E. G. Kirby, 1990. Induction of shoot and embryo-like structures in cultures derived from juvenile and adult explants of *Eucalyptus spp. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture.* Amsterdam, A, 1-74
3. Gamborg, O., R. A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 150-158.
4. Gill, S. S. and R. I. S. Gill, 1994. Induction of embryo-like structUres in *Eucalyptus tereticornis. Advances in Plant Sciences* 7: 159-162.
5. Lakshimi-sita, G., 1979. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary culture of *Eucalyptus. Plant Science Letters.* 14: 63-68.
6. Lakshimi-sita, G., 1982. Tissue culture of *Eucalyptus.* In : *Tissue Culture of Economically important plants* (Rao, A. N. ed), Singapore : 180-184.
7. Lakshimi-sita, G., 1986. Progress towards clonal propagation of *E. grandis. In : Plant Tissue Crlture and its Agricultural Application.* (Withers, L. A. and Anderson P. G. eds). Butter Worths, London: 159-166.
8. Muralidharan, E. M. and A. F. Mascarenhas, 1995. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: *Somatic embryogenesis in*

woody plant (Mohan Jain S., Gupta P. K. and Newton R. J. eds) vol. Z- Angiosperms. Kluwer Academic Publishers, *The Netherlands*: 23-39.

9. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15: 473-597.
10. Ouyang, Q. and H. Peng, 1990. *Eucalyptus.* In: perennial crops, part B: Timber and cork Trees. *Handbook of plant cell cultures* (Chen, Z. H., Evans, D. A, Sharp W. R. and Ammirato P. V. eds). Vol. 6, New York: 199-215.
11. Ouyang, Q., H. Z. Peng and Q. Q. Li, 1981. Studies on the development of embryoids from *Eucalyptus* callus. *Scientia Silvae Sinicae* 17: 1-7
12. Ouyang, Q., Q. Q. Li and H. Z. Peng, 1980. Preliminary report on the development of embryoids from *Eucalyptus. Acta Phytophysiol. Sinicae* 6: 429-432.
13. Regina, R. T., W. Po-jen and H. Ching-yeh, 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 129-132.
14. Turnbull, J. W. and D. J. Boland. 1984. *Eucalyptus. Biologist* 31: 49-56.