دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ٤٤-۳۵ (۱۳۸۹)

تکثیر درون‌شیشه‌ای درختان بالغ اکالیپتوس گرندیس (*Eucalyptus grandis*)

میترا امام*[1]، محمدحسن عصاره[2]، شکوفه شهرزاد[3] و کیکاووس خجیر[4]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست الکترونیک: memam@rifr-ac.ir
۲- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٤- کارشناس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی نوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

اکالیپتوس گرندیس، یک گونه گیاهی سریع‌الرشد، با ارزش و دارای اهمیت اقتصادی و صنعتی فراوانی است که به‌دلیل فیبرهای چوبی آن در صنعت کاغذسازی و تولید زغال و سوخت، در مقیاس وسیعی کشت می‌شود. برای تکثیر رویشی این گونه به طریق کشت بافت از جوانه‌های رأسی و جانبی درختان بالغ از منطقه شمال ایران (ایستگاه تحقیقاتی واز چمستان) و در فصل‌های مختلف سال استفاده شد. برای ضدعفونی کردن سطحی نمونه‌ها، تیمارهای مختلفی از کلرورجیوه مورد آزمون قرار گرفت. نمونه‌برداری در فصل تابستان و ضدعفونی با تیمار کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه، به عنوان بهترین تیمار ضدعفونی سطحی انتخاب شد. برای باززایی و تکثیر، ترکیبات مختلفی از هورمون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. تکثیر مطلوب شاخه در محیط کشت تغییر یافته MS واجد نیم غلظت نیترات و هورمون‌های BA، IBA، Kin، و GA به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. انتقال شاخه‌های باززایی شده به محیط تکثیر دارای هورمون‌های Zeatin و IAAبه‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر جهت رشد طولی شاخه مناسب بود. ریشه‌زایی در محیط کشت تعدیل یافته MS دارای ۱/٤ غلظت از املاح پرمصرف، IBA و NAA هر یک به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. این گیاهچه‌ها با موفقیت در شرایط گلخانه‌ای سازگار و به عرصه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس گرندیس، باززایی، تکثیر درون‌شیشه‌ای.

مقدمه

اکالیپتوس، از گونه‌های جنگلی سریع‌الرشد با منشأ استرالیا می‌باشد. بعضی از این گونه‌ها دارای اهمیت تجاری بوده و برای تولید چوب، کاغذ و اسانس‌های روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gupta & Mascarehans, 1987) اکالیپتوس گرندیس در مقیاس وسیع برای مصارف صنعتی در تولید خمیر کاغذ استفاده می‌شود. گزارش‌های نادری از تکثیر درختان بالغ اکالیپتوس گرندیس به روش کشت بافت وجود دارد. انجام پیوند و ریشه‌دهی قلمه از درختان بالغ، به دلیل

طبیعت هتروزیگوت و دوره طولانی بلوغ تا گلدهی آنها، جهت تکثیر کلنی اکالیپتوس مشکل می‌باشد (Ahuja, 1993). تکثیر جنسی از طریق بذر منجر به تنوع زیادی در محصولات شده و تکثیر مرسوم رویشی نظیر قلمه و پیوند نیز برای گرندیس موفق نبوده است. جنگلبانان در سال‌های اخیر از تکثیر رویشی کشت بافت به‌عنوان ابزاری جهت ایجاد درختان متحدالشکل از ژنوتیپ‌های شناخته شده با حفظ فرم ژنتیکی و فیزیولوژیکی آنها استفاده می‌نمایند (Ahuja, 1993). در این تحقیق، ریزازدیادی گیاه از طریق کشت قطعات گره‌ای ساقه گیاهان بالغ اکالیپتوس گرندیس بررسی شده است. تشکیل گیاهان منفرد با استفاده از ریزنمونه‌های تهیه شده از بخش‌های گرهی دانه‌رست، بوته و درختان جوان توسط Hartney و Barker (۱۹۸۳) گزارش گردید ولی موفقیتی با ریزنمونه‌های پایه‌های بالغ گزارش نشده است. در این خصوص Lakshmi Sita و Shoharani (۱۹۸۵) تشکیل شاخه‌های چندگانه ازمریستم‌های بدست آمده از دانه‌رست و همچنین ریزنمونه‌های تهیه شده از محل گره درختان پنج ساله گرندیس را گزارش کردند. پرآوری شاخه به طور مداوم با BAP (۲-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ - ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد و بعد از تشکیل شاخه‌های چندگانه اولیه، برای پرآوری بیشتر غلظت‌های بسیار پایین سیتوکینین BAP (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) مناسب بود. Lakshmi Sita (۱۹۹۳) در تحقیق خود، چندین ترکیب از غلظت‌های پایین کاینتین، BAP و NAA را به کار برده و در میان آنها محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین ترکیب تکثیر شاخه شناخته شد. به طوری‌که در هر لوله در مدت چهار هفته به طور متوسط بیش از ۱۰۰ شاخه تولید شد. Hartney و Barker (۱۹۸۳) همچنین تکثیر شاخه و ریشه‌دهی آن را گزارش کرده‌اند.

مواد و روشها

ریزنمونه‌های مورد استفاده، قطعات گره‌ای اکالیپتوس گرندیس بالغ موجود در منطقه چمستان نور بود. شاخه‌ها در اندازه‌های ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر از درختان برگزیده تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه با محلول ضدعفونی قارچ‌کش و کلرورجیوه در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت (بسته به فصل نمونه‌برداری و منشأ گیاهان مادری) سترون شده و پس از چند بار شستشو با آب‌مقطر، قطعات گره‌ای در اندازه‌های ۵ تا ۸ میلی‌متر جدا شده و تحت شرایط ضدعفونی کشت شدند. نمک‌های معدنی و ویتامین‌های MS (Murashige.& Skoog, 1962) با شکر (۳٪) و آسکوربیک اسید (۱۰۰mg/l) به عنوان محیط پایه به کار گرفته شد (جدول ۱).

قطعات گره‌ای بر روی محیط غذایی شامل محدوده وسیعی از سیتوکنین‌ها مثل کینتین، BAP، 2ip و ژیبرلین و اکسین IBA کشت شدند. دامنه غلظتی هورمون‌های مورد استفاده عبارت از BAP (۱-۰) به همراه Kin (۰/۲-۰)، GA (۰/۲۵-۰) و IBA (۰/۰۱ - ۱) بود. محیط‌های کشت پس از افزودن و انحلال ۰/۶۸ درصد آگار در شرایط فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در شرایط ۱۶ ساعت نور با شدت (۵۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۵ تیمار هورمونی مختلف به کار گرفته شد (جدول ۱). در هر تیمار تعداد ۵ تکرار (۵ ظرف کشت) و در هر تکرار ۶ ریزنمونه وجود داشت.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به کار گرفته شده در مرحله شاخه‌زایی

ترکیب هورمونی / تیمار	IAA	IBA	TDZ	Zeatin	BA	GA	Kin	2ip
T1	–	۰/۰۱	–	–	–	۰/۰۱	۰/۲	۰/۵
T2	–	۰/۰۱	۰/۰۲۵	–	–	۰/۰۱	–	۰/۵
T3	–	۰/۰۱	–	–	۰/۵	۰/۰۱	۰/۲	–
T4	–	۰/۰۱	–	–	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۲	–
T5	۰/۲		–	۱	–	–	–	–

غلظت هورمون‌ها برحسب mgl^{-1} می باشد.

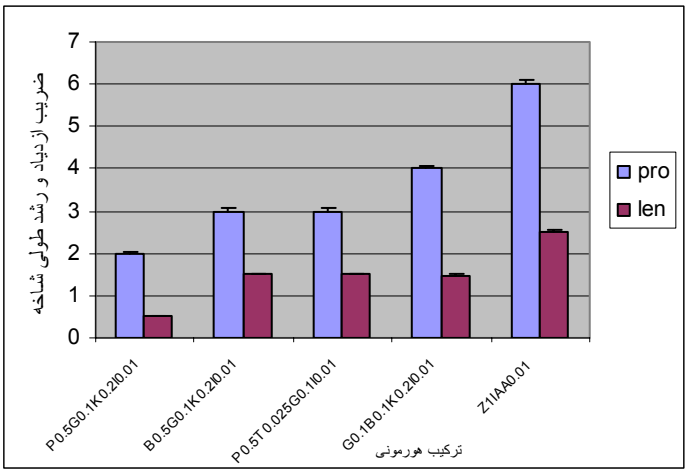
پس از استقرار جوانه‌ها سه واکشت انجام شد که فاصله این واکشت‌ها ٤ هفته بود. تجزیه و تحلیل آماری میانگین‌های تعداد شاخه، تعداد جوانه و رشد طولی شاخه انجام شد و داده‌های حاصل از انجام آزمایش‌ها در قالب طرح فاکتوریل یک عاملی (هورمون) بر پایه طرح کاملاً تصادفی با نرم‌افزار Minitab مورد بررسی و حداقل تفاوت معنی‌دار در بین داده‌ها با آزمون توکی در سطح ۵٪ محاسبه گردید. آزمون نرمالیته داده‌ها با ضریب Anderson-Darling انجام گردید.

در مرحله پیش‌تیمار ریشه‌زایی، شاخه‌ها به محیط پایه بدون هورمون برای یک ماه منتقل شدند. برای شروع ریشه‌زایی، شاخه‌های با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر در محیط واجد ¼ غلظت از نمک‌های MS و هورمون‌های اکسین شامل IAA، IBA و NAA با دامنه غلظتی متفاوت از صفر تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (به طور مجزا و تلفیقی) کشت شدند. گیاهان حاصل برای طی مراحل سازگاری پس از انتقال به گلدان‌های سرپوشیده حاوی مخلوط خاک پیت، پرلیت و ورمیکولیت ضدعفونی شده با نسبت ٤:١:٤، به مدت ۲ ماه در گلخانه تحقیقاتی نگهداری شده و پس از عبور از تونل سازگاری به خارج از گلخانه و خاک مزرعه منتقل شدند.

نتایج

تیمار سترون‌سازی بهینه برای جوانه‌های تهیه شده از پایه بالغ گرندیس در فصل تابستان بود. به‌طوری‌که بالاترین درصد زنده‌مانی (٨٤ درصد) و کمترین میزان آلودگی (۱۱ درصد) و نکروزه شدن جوانه‌ها (۹ درصد) در این تیمار بدست آمد. در جدول ۱ بهترین تیمار ضدعفونی نمونه‌ها در هر فصل مشخص شده است، به طوری‌که در فصل بهار ضدعفونی نمونه‌ها با محلول کلرورجیوه ۰/۱ درصد در زمان ۳ دقیقه، ۷۸ درصد زنده‌مانی را به همراه داشت و به‌ترتیب ۲۷ و ۲۲ درصد زنده‌مانی جوانه‌ها در تیمار غوطه‌وری در محلول کلرورجیوه ۰/۳ درصد برای زمان ۳ دقیقه (در پائیز) و در محلول کلرورجیوه ۰/۵ درصد برای ۵ دقیقه (در زمستان) حاصل شد. استقرار جوانه‌ها در محیط کشت MS (با نصف غلظت نیترات) پس از ۵ تا ٦ هفته منجر به تولید شاخه‌هایی در اندازه ۱۰ تا ۱۵ میلیمتر شد. به منظور حذف ترشحات فنلی مترشحه از ریزنمونه‌ها، محلول اسکوربیک‌اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه شد. تکثیر شاخه‌ها در محیط حاوی هورمون‌های 2ip و Kin مناسب نبود و موجب کوتاه شدن

فاصله میان‌گره‌ها و بازدارندگی رشد گردید. شاخه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون‌های BA و Kin رشد مناسبی را از خود نشان دادند. افزودن ژیبرلیک اسید به محیط کشت، منجر به رشد طولی سریع شاخه‌ها شد. برای تولید شاخه‌های متعدد، محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات به همراه هورمون‌های BA، IBA، Kin و GA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. بیشتر از ۲۰ تا ٤۰ شاخه از هر گره کشت شده، بدست آمد (شکل ۲). برای تولید شاخه‌های با ظاهر مورفولوژیکی و رشد طولی مناسب، شاخه‌ها روی محیط MS حاوی هورمون‌های IAA و Zeatin (به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) واکشت شدند. تیمار هورمونی Zeatin با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر علاوه بر افزایش ضریب ازدیاد موجب شدت رشد طولی شاخه‌ها شد و تأثیر آن نسبت به سایر تیمارهای هورمونی اعمال شده مطلوب‌تر بود. تأثیر تیمار هورمونی بر صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه معنی‌دار (جدول۳) و در محیط حاوی هورمون‌های IAA و Zeatin (به‌ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) بیش از سایر تیمارها بود (نمودار ۱). ریشه‌زایی روی محیط کشت حاوی ٤/۱ غلظت از املاح پرمصرف MS و تیمار تلفیقی از هورمون‌های اکسین (IBA و NAA از هر کدام ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد (جدول٤). برای وصول ریشه‌های با رشد طولی مناسب از محیط کشت MS حاوی ۲/۵ گرم در لیتر زغال فعال و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA استفاده شد. گیاهان حاصل برای طی مراحل سازگاری پس از انتقال به بستر پیت : پرلیت: ورمیکولیت ضدعفونی (با نسبت ٤:۱:٤) در گلدان‌های سرپوش‌دار و به مدت ۲ ماه در گلخانه تحقیقاتی، نگهداری شده و پس از عبور موفق از تونل سازگاری به خارج از گلخانه و خاک مزرعه (اشکال ۱-۵) منتقل شدند. سازگاری این گیاهان به نسبت ۸۷ درصد بود.



نمودار ۱- تأثیر ترکیب هورمونی بر صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه نمونه‌های بالغ گونه گرندیس

جدول ۲- تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد زنده‌مانی جوانه‌های اکالیپتوس گرندیس

فصل	تیمار ضدعفونی	زمان ضدعفونی (دقیقه)	درصد زنده‌مانی	درصد آلودگی	درصد نکروزگی
بهار	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۱	٤۸	۲۲	۳۰
بهار	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۲	٦۷	۲۱	۱۲
بهار	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۳	۷۸	۱۳	۹
تابستان	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۷	۸٤	۱۱	۵
تابستان	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۹	۳۳	۳۱	۳٦
تابستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	٤	٦۸	۲۰	۱۲
تابستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	٦	۵۱	۱۹	۳۰
تابستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۸	۵۸	۳۰	۱۲
پائیز	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۲	۲۵	٦۱	۱۳
پائیز	کلرورجیوه ۰/۱ درصد	۳	۸	۵۱	۲۳
پائیز	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۲	۱۲	٦٦	۲۲
پائیز	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۳	۲۷	۷۱	۲
پائیز	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۵	۵	۵۱	٤۲
زمستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۵	۲۱	۵۰	۲۹
زمستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۷	۲٤	٤٦	۳۰
زمستان	کلرورجیوه ۰/۳ درصد	۱۰	۲۲	۳۹	۳۹
زمستان	کلرورجیوه ۰/۵ درصد	۳	۲۰	٤۰	٤۰
زمستان	کلرورجیوه ۰/۵ درصد	۵	۲۸	۳٤	۳۸

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی گیاهچه‌های اکالیپتوس گرندیس

منابع تغییر	درجه آزادی	MS	
		ضریب ازدیاد	رشد طولی
هورمون	٤	۷/۱۰*	۱/٤۱۸**
خطا	۱۰	۲/۲	۰/۳۳
کل	۱٤		

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و * معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

شکل ۱- جوانه قابل کشت اوکالیپتوس گرندیس

شکل ۲- شاخه‌زایی اوکالیپتوس گرندیس

شکل ۳- ریشه‌زایی شاخه‌های اوکالیپتوس گرندیس

شکل ٤- گیاه اوکالیپتوس گرندیس در مرحله سازگاری

شکل ٥- گیاه اوکالیپتوس گرندیس استقرار یافته در مزرعه

جدول ٤- درصد ریشه‌زایی نمونه‌های بالغ گرندیس در تیمارهای مختلف هورمونی اکسین

تیمار هورمونی ریشه‌زایی (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار تاریکی	درصد نکروزگی	درصد ریشه دهی
IBA 0.5	−	۱۰	۱۲
IBA 0.5	+	۳۰	۲۰
NAA 0.5	−	۲۰	۲
NAA 0.5	+	۵	صفر
IBA 0.5و NAA 0.5	−	صفر	٦۰
NAA 0.5 و IBA 0.5	+	۱۰	٤۰
IAA 0.5	−	۳۵	۲۵
IAA 0.5	+	۱۰	۲۰

بحث

تیمار بهینه ضدعفونی برای جوانه‌های پایه بالغ *E. grandis* در این تحقیق، استفاده از محلول کلرورجیوه ۰/۱ درصد برای ۷ دقیقه بود. در حالی‌که بهترین تیمار ضدعفونی جوانه‌های جانبی *E. gunni* و *E. viminalis* استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ برای ۲۰ دقیقه بود (عصاره و سردابی، ۱۳۸٦). از طرفی، در ضدعفونی ریزنمونه‌های اوجا، محلول ۰/۳ درصد کلرورجیوه در زمان ۱۲ دقیقه در ابتدای فصل زمستان مناسب بود (امام و همکاران، ۱۳۸٦). در این تحقیق، استفاده از محلول کلرورجیوه به جای محلول هیپوکلریت سدیم این حسن را داشت که در غلظت پایین‌تر و زمان مصرف کوتاهتر این محلول، می‌توان حداکثر زنده‌مانی با حداقل نکروزه شدن جوانه‌ها را بدست آورد.

محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه برای تعداد زیادی از گونه‌های اکالیپتوس در مرحله تکثیر و آغاز ریشه‌زایی استفاده می‌شود. همچنین Silvae و همکاران (۱۹۹۳) مشابه تحقیق اخیر برای ریزازدیادی *E. grandis* از این محیط استفاده نمودند. یکی از مشکلات تکثیر شاخه‌ها در این تحقیق، وجود ترشحات فنلی نمونه‌ها بود که استفاده از محلول آسکوربیک اسید به‌عنوان آنتی اکسیدانت برای حذف این مواد مؤثر بود. امام (۱۳۸٤) از همین روش برای حذف ترشحات فنلی ریزنمونه‌های کیکم بهره جست. همچنین Gill و Gill (۱۹۹٤) از ماده PVP برای این منظور استفاده نمودند.

در این تحقیق، برای تولید شاخه‌های متعدد از جوانه، محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات به همراه هورمون‌های BA، IBA، Kin و GA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در این راستا Jones و Van Staden (۱۹۹۳) تکثیر و طویل شدن شاخه گرندیس را در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بدست آورند. احتمال دارد که BAP از Kin در تحریک و تولید سیتوکنین درونزای گیاه مؤثرتر باشد (Vankova *et al.*, 1991). در مورد *E. grandis* ریزنمونه‌های گره‌ای درختان جوان به همان نسبت درختان مسن به تحریک شاخه‌زایی پاسخ می‌دهند ولی به هرحال شاخه‌های تولیدی از منبع جوان نسبت به درختان بالغ به ریشه‌زایی پاسخ مناسب‌تری می‌دهند. ضمنا

Lakshmi sita (۱۹۹۳) بر نهال‌های بذری و درختان ۵ ساله این گونه در محیط مشابه با هورمون‌های NAA، Kin و BA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ در طی ٤ تا ۵ هفته به شاخه‌های متعدد رسید و با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط مشابه تحقیق اخیر، به ریشه‌زایی دست یافت. Jones و Van staden (۱۹۹۳) با کلن‌های گرندیس در محیط MS حاوی NAA، Kin و BA با غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۲ و ۰/۱ به شاخه‌زایی رسیدند و ریشه‌زایی و استقرار موفقی در خاک داشتند. استفاده از دو محیط تکثیر مختلف، شرایط شاخه‌زایی و به دنبال آن ریشه‌زایی را در این گونه بهتر می‌کند، هرچند همیشه تکثیر شاخه را افزایش نمی‌دهد. در این تحقیق، واکشت شاخه‌های بدست آمده بر محیط بهینه تکثیر، در محیط حاوی Zeatin و IAA در تحریک افزایش رشد طولی شاخه و در پی آن ریشه‌زایی گیاه مؤثر بود. در این خصوص Bennett و همکاران (۱۹۹٤) نیز در تحقیقی مشابه به این نتایج دست یافته بودند. تحریک ریشه‌زایی با تولید فلاوونوئیدهای خاص با تأثیر سیتوکنین محیط تکثیر شاخه در ارتباط است. سیتوکنین‌های درونزا یک نقش ویژه در تولید ریشه‌های نابجا ایفا می‌کنند (Bollmark *et al.*, 1988). همچنین Warrag و همکاران (۱۹۹۰) نیز در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA رشد طولی شاخه را مشابه تحقیق اخیر بدست آوردند و علاوه بر آن مشاهده کردند که استفاده از این هورمون در افزایش ریشه‌زایی شاخه‌ها مؤثر بوده است.

در این تحقیق شاخه‌ها بر محیط ربع غلظت از املاح ماکروالمان و اکسین IBA و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۳ تا ٤ هفته ریشه دادند و درصد این ریشه‌زایی حدود ٦۰ بود. در این خصوص Joshi و همکاران (۲۰۰۳) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌زایی بر هیبرید اکالیپتوس را بدست آوردند. علاوه بر آن، استفاده از تیمار تاریکی در تسریع ریشه‌زایی گیاهان تأثیر چندان مثبتی نداشت. همین‌طور De fossard و Cresswell (۱۹۷٤) با همین روش از نهال‌های بذری گرندیس به ریشه‌زایی رسیدند. در این پژوهش، افزودن زغال فعال به محیط تیمار ریشه‌زایی در طویل شدن شاخه و افزایش درصد ریشه‌زایی مؤثر بود. در تحقیقات دیگری Jones و Van staden (۱۹۹۳) در محیط کشت حاوی زغال فعال ریشه‌زایی مناسبی را برای شاخه‌های هیبرید حاصل از دو گونه *E. grandis* و *E. urophylla* بدست آوردند.

منابع مورد استفاده

– امام، م. شهرزاد، ش و نراقی، ط.س.، ۱۳۸٦. تکثیر درون شیشه ای اوجا (*Ulmus carpinifolia*) از طریق کشت جوانه. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵(٤): ۳۰٤– ۲٦۹.

– امام، م.، ۱۳۸٤. ریزازدیادی کیکوم (*Acer cineracense*) از طریق کشت سرشاخه‌ای. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۳: ۳۷–۱.

– عصاره، م.ح. و سردابی، ح.، ۱۳۸٦. اکالیپتوس، شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فن‌آوری‌های نوین. جلد اول. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ٦۷۲ صفحه.

– Ahuja, M.R., 1993. Micropropagation *a la carte*, 1-8. In: Ahuja, M.(Ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 507p.

– Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and Mcdavid, D.A.J., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Annals of Botany, 74: 53-58.

– Bollmark, M., Kubat, B. and Eliasson, L., 1988. Variation in endogenous cytokinin content during

– Lakshmi sita, G. and Shoharani, B., 1985. *In vitro* propagation of *E. grandis* by tissue culture. Plant Cell Reports., 4: 63-65.
– Lakshmi sita, G., 1993. Micropropagation of Euc. In: Micropropagation of woody plants. M.R.Ahuja. Kluwer Academic Publisher. Netherlands, 507p.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for growth and bio assays with Tobbaco tissue culture. Physiology Plant, 15 :443-497
– Silvae, L.L., Teixeira, S.L. and De-Silvae, L.L., 1993. *In vitro* clonal propagation of *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden from nodal segments and epicormic shoots. Reista Ceres, 40: 390-396.
– Vankova, R., Hsiao, K. C., Bornmam, C. H. and Gaudinova, A., 1991. Effects of synthetic cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. Journal of Plant Growth Regulation, 10: 197-199.
– Warrag, E.I., Lesney, M.S. and Rockwood, D.L., 1990. Micropropagation of field tested superior *E. grandis* hybrids. New Forests, 4: 67-79.
adventitious root formation in Pea cuttings. Journal of Plant Physiology, 132: 262-265.
– Cresswell, R.J. and Defossard, R.A., 1974. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. Australian Forestry, 37:55-69.
– Gill, S.S. and Gill, R.I.S. 1994. Induction of embryo like structures in *Eucalyptus tereticornis*. Advances in plant science, 7: 159-162.
– Gupta, P.K. and Mascarehans, A.F., 1987. Eucalyptus, 385-399. In: Bonga, J.M. and D.J., Durzan (Ed.). Cell and Tissue Culture in Forestry,V3. Martinus Nijhoff Publishers, 416p.
– Hartney, V.J. and Barker, P.K., 1983. The vegetative propagation of the Eucalyptus by tissue culture. Silviculturae, 8: 791-792.
– Jones, N.B. and Van Staden, J., 1993. Micropropagation and establishment of *E. grandis* hybrids. Department of Botany, University of Natal. Repubilc of South Africa.
– Joshi, J., Bisht, P. and Sharma, K., 2003. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus grandis* E. tereticornis*. Silvae Genetica, 52: 110-113.

In vitro multiplication of mature *Eucalyptus grandis* Trees

M. Emam[*1], M.H. Assareh[2], S. Shahrzad[3] and K. Khojir[4]

1*- Corresponding author, M.Sc., Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran, I.R.Iran. Email: memam@rifr-ac.ir
2- Prof., Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran, I.R.Iran.
3- B.Sc., Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran, I.R.Iran
4- B.Sc., Research Centre of Natural Resources of Nooshahr, I.R.Iran

Accepted: 22.11.2009 Received: 05.10.2008

Abstract

Eucalyptus grandis is a fast growing species with economic and industrial value. It is cultivated for its wood fibers which is widely used in the paper industry, domestic fuel and charchoal production. For clonal propagation of superior genotypes of the species, apical and axillary buds from adult elite trees in forests of northern Iran (Chamestan- vase research station) were collected in different seasons. Application of 0.1% mercuric chloride solution for 7 minutes was the best treatment for surface sterilization of the samples in summer. Different compositions of hormones were evaluated for regeneration. The best shoot multiplication was obtained using a modified MS medium containing half strength Nitrate containing BA, IBA, Kin and GA3 with concentration of 0.1, 0.01, 0.2 and 0.1 mgl^{-1}, respectively. Shoots from the multiplication medium were transferred in MS medium (half strength Nitrate) containing 1 mgl^{-1} Zeatin and 0.2 mgl^{-1} IAA for shoot elongation. Rooting of shoots were achieved in MS with $^1/_4$ strength of macroelemants and 0.5 mgl^{-1} IBA plus 0.5 mgl^{-1} NAA. The plantlets were successfully established in greenhouse and field conditions.

Key words*:* *Eucalyptus grandis*, Regeneration, *In vitro* multiplication.