

ریزادیدای اکالیپتوس گونه *Eucalyptus citriodora* H.

زهرا آبروش^{۱*}، محمد حسن عصاره^۲ و میترا امام^۳

۱- نویسنده و مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد پژوهشی، گروه زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، پست الکترونیک: abravesh@rifr-ac.ir

۲- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۳- استادیار پژوهشی، گروه تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۹

چکیده

در بین گونه‌های درختان جنگلی سخت چوب، *Eucalyptus citriodora* درخت سریع‌الرشدی است که به دلیل دارا بودن اسانس معطر در عطرسازی، داروسازی و داشتن چوب نرم و سبک در صنایع کاغذسازی و مبل‌سازی کشت می‌شود. در این تحقیق، ریزادیدای *E. citriodora* به روش کشت جوانه جانبی در محیط کشت‌های MS و WPM بررسی شد. سترون‌سازی با دو محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی اعمال گردید. شاخه‌زایی با هورمون‌های سیتوکینین (Kin, BAP)، اکسین (IBA) و جیبرلین (GA3) در دو سطح محیط کشت در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. ریشه‌زایی نیز با هورمون‌های اکسین IBA، NAA و IAA در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آماربرداری از تعداد شاخه‌ها و جوانه‌ها، طول شاخه، سبزیگی، تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و تعداد کل ریشه انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین تیمار سترون‌سازی محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی به مدت ۱۸ دقیقه بود. تکثیر مطلوب و رشد طولی شاخه در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) و هورمون‌های سیتوکینین Kin, BAP، GA₃ و IBA به ترتیب در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۱ (۰/۳، صفر، ۰/۱ و ۰/۰۱) میلی‌گرم در لیتر، به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP بود. ریشه‌زایی مطلوب در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات)، با تیمار هورمونی NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر و تیمار تلفیقی IAA + IBA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. در نهایت، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط گلخانه سازگار شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کشت بافت روش مناسبی برای تکثیر این گونه ارزشمند در زمانی کوتاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت درون شیشه‌ای، محیط کشت، MS و WPM و *E. citriodora*

مقدمه

سریع‌الرشد برای جنگل‌کاری و بهره‌برداری در صنایع چوب، کاغذ، روغن‌های اسانسی و سایر کاربردها هستند (Assareh, 2000; Jawanshir and Mossadegh, 1973). گونه‌های مختلف اکالیپتوس منابع مهمی برای مصارف دارویی، صنعتی، فضای سبز، زراعت چوب و سوخت

توان محدود تولید چوب در جنگل‌های کشور، لزوم دستیابی به منابع غنی چوب را ضروری کرده است. گونه‌های مختلف اکالیپتوس از جمله *Eucalyptus citriodora* (Lemon-scented Gum) از گونه‌های مهم و

گرما می‌باشد. همچنین به منظور کیفیت چوب، دوام چوب، تولید الیاف سلولزی، توسعه جنگل‌کاری، تولید عسل و تولید اسانس معطر (لیمویی) مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت اقتصادی این گونه از نظر کیفیت چوب (چوب نرم) و اسانس معطر موجود در برگ (Javanshir & Mossadegh, 1973)، برای بهره‌برداران نیاز به تکثیر انبوه با صفات ژنتیکی برتر می‌باشد. تکثیر از طریق ریزازدیادی می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر گونه‌های این جنس باشد. تحقیقات فراوانی در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف اکالیپتوس در ایران و جهان انجام شده است. مطالعات اولیه کشت بافت روی اکالیپتوس به طور وسیع روی کشت کالوس از بافت‌های دانه‌رست (Jacquot, 1964) و بافت‌های کامبیومی انجام شد (De Bergh, 1983). کاربرد گره‌ها به عنوان ریزنمونه و امکان ایجاد ریشه از آنها موجب شد که توجه محققان به سمت تکثیر درون شیشه‌ای (*in vitro*) از این طریق معطوف شود.

برای اولین بار تکثیر شاخه از بخش‌های گرهی درختان برگزیده ۲۰ ساله *E. citriodora* گزارش شد (Gupta et al, 1981). تولید گیاهچه از بخش‌های دانه‌رستی *E. globulus* (Hartney, 1981)، شاخه چندگانه از جوانه‌های انتهایی درختان ۲۰-۱۰ ساله *E. citriodora* (Mascarenhas et al, 1982) و تولید شاخه‌های چندگانه از مرستم شاخه دانه‌رست‌های ۵ روزه در حال جوانه‌زنی *E. citriodora* (Lakshmi Sita & Vaidyanathan, 1979) گزارش شد. همچنین تکثیر شاخه را از دانه‌رست‌های ضد عفونی شده *E. citriodora* (Grewal et al, 1980)، تشکیل شاخه‌های چندتایی از بخش‌های گرهی سریع‌الرشد *E. camaldulensis* (Gupta et al, 1983) و استقرار موفقیت‌آمیز گیاهچه‌ها از بخش‌های گرهی درختان بالغ *E. camaldulensis* گزارش کردند (Mascarenhas et al, 1982; Mascarenhas & Gupta, 1987). تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار از ریزازدیادی کشت جوانه گونه *E. gongylocarpa* (Akbari et al, 2007)، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گونه *E. melliodora* (Assareh & Sardabi, 2008) و شاخه‌زایی و

هستند. اکالیپتوس‌ها تولیدکنندگان مهمی از سنگین‌ترین بادوام‌ترین چوب‌ها و مولد فیبر برای ساخت کاغذ سفید با کیفیت عالی می‌باشند، به طوری که می‌توان این جنس را یکی از با ارزش‌ترین منابع چوب در بین پهن‌برگان محسوب کرد (Javanchir & Mossadegh, 1973). از اکالیپتوس علاوه بر موارد فوق برای جلوگیری از فرسایش خاک در برابر آب و باد (Jawanshir & Mossadegh, 1973)، کاهش آلودگی هوا و پاکسازی خاک از آلاینده‌های شیمیایی (Keneshloo & Eghtesadi, 2011)، تولید آفت‌کش‌هایی با منشأ گیاهی و طبیعی (Fallahi et al., 2013) به منظور پایداری محیط‌زیست و جذب آلاینده‌های موجود در خاک و هوا (گیاه پالایی) (Kamalpour, et al, 2014; Hosseinzadeh, et al 2017) استفاده می‌شود.

کاشت گونه‌های اکالیپتوس می‌تواند راه‌حل مناسبی برای از بین بردن آلودگی خاک مزارع باشد. با توجه به نیاز روزافزون به فراورده‌های حاصل از آن (چوب، اسانس و ...) و ناکافی بودن تولید داخلی، اهمیت زراعی آن در زمینه‌های مختلف فوق بیش از پیش نمایان می‌شود. هر چند کاشت اکالیپتوس در نواحی گرم و خشک دربردارنده نکات منفی مانند دریافت آب زیاد از اعماق زمین، تخلیه آب‌های زیرزمینی (Rad et al, 2010) و بروز پدیده آلودگی برای سایر گیاهان (Najafi Ashtiani et al, 2008; Souza et al, 2003) می‌باشد ولی حتی در این نقاط هم به صورت زراعت چوب (۶ تا ۸ سال) و برداشت‌های کوتاه‌مدت و بهبود ساختمان و تخلخل سطحی خاک (Sardabi et al., 2010) ایجاد فضای سبز به‌ویژه در جاهایی که شرایط پوشش گیاهی نامناسب است (Karami, et al, 2007)، توصیه می‌شود.

تولید غیرجنسی این گیاه با استفاده از روش‌های معمول پیوند و قلمه مشکلات بسیاری دارد، بنابراین به‌منظور به‌دست آوردن تعداد زیادی گیاهچه که از نظر ژنتیکی یکسان و از نظر رشد طبیعی بوده و ترجیحاً قابلیت بالایی از نظر فتوسنتز داشته باشد، ضروریست. گونه *E. citriodora* به این دلیل اهمیت دارد که گونه‌ای سریع‌الرشد و مقاوم به

دو محیط کشت از هورمون‌های GA₃, IBA, Kin, BAP و P.V.P (Poly Vinyl Pyrolidone) (ماده بازدارنده ترشحات فنلی) استفاده شد. در مجموع هشت تیمار و هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار با پنج شیشه و هر شیشه با شش ریزنمونه انجام گردید. این عملیات طی سه بازکشت و با تناوب زمانی چهار هفته انجام شد (جدول ۲). در پایان هر مرحله از تعداد شاخه و جوانه‌ها (ضریب ازدیادی)، طول شاخه و میزان سبزی‌نگی شاخه بین یک تا چهار کدگذاری شد که کد ۱ (نشانگر خشکی و نکروزگی کامل پهنک) و کد ۴ (نشانگر رنگ سبز تیره پهنک بود). pH محیط‌ها بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. ریزنمونه‌های ساقه‌ای به طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر در ظروف کشت به قطر ۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۹ سانتی‌متر و حاوی ۵۰cc محیط کشت قرار گرفتند و به اتاق رشد با دمای ۲۵ ± ۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند.

ریشه‌زایی: انتقال شاخه‌های با طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر به دست آمده از مرحله شاخه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی منتقل شدند تا گیاهچه‌ها بتوانند سطح تولید هورمون‌های طبیعی خود را به دست آورند. ریشه‌زایی در محیط کشت MS (۱/۲ نیترا) به همراه BAP در نه تیمار مختلف هورمونی اکسین شامل IAA, NAA و IBA و تیمارهای تلفیقی NAA+IAA, NAA+IBA و IBA+IAA کشت شدند. هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار با پنج شیشه و در هر شیشه شش ریزنمونه بود (جدول ۳)، پس از شش هفته میانگین تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و تعداد ریشه‌ها در تیمارهای کشت به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در برنامه آماری (version 9) SAS در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در دو سطح محیط کشت و دو سطح سیتوکینین برای شاخه‌زایی و طرح کاملاً تصادفی برای ریشه‌زایی انجام شد. میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از شستشو با آب در گلدان‌های حاوی مخلوط پیت، ورمیکولیت و پرلیت به نسبت

ریشه‌زایی دو گونه *E. grandis* و *E. globulus* را با موفقیت در شرایط گلخانه‌ای و سازگاری در عرصه (Emam et al, 2007) و ریشه‌زایی و ایجاد گیاهچه از درختان چهار ساله *E. citriodora* در بازکشت‌های چهارم و پنجم (Gupta et al, 1981) را گزارش کردند.

با توجه به اهمیت صنعتی و ارزش اقتصادی گونه *E. citriodora* تکثیر آن از طریق کشت بافت امری ضروری به نظر می‌آید. در این تحقیق امکان تولید گونه درختی *E. citriodora* با استفاده از کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت. از اهداف مهم این تحقیق دستیابی به یک روش کاربردی برای تکثیر به صورت غیرجنسی در این گونه درختی و نیز بهینه کردن شرایط محیط کشت در شیوه ریزازدیادی و امکان توصیه کشت و بهره‌برداری صنعتی گونه سازگار فوق پس از موفقیت در ریزازدیادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذر گونه *E. citriodora* (Lemon-scented Gum) استفاده گردید که در ایران پایه کاشته شده‌ای نداشت، بذر این گونه از شرکت Kim seed استرالیا تهیه شد. بذرهای پس از بوجاری، به منظور حذف آلودگی‌های سطحی، به مدت دو ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. آنگاه در شرایط سترون به زیر هود لامینارفلو منتقل شده و به طور جداگانه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت پنج دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی با ۱ درصد کلر فعال (دترژنت) به مدت ۱۸ دقیقه غوطه‌ور شدند و بعد سه مرتبه عمل شستشو با آب مقطر سترون انجام شد. پس از پایان عمل ضدعفونی، بذرهای درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) کامل فاقد قند و هورمون کشت شدند. پس از جوانه‌زنی بذرهای، محور بالای دو برگ لپه‌ای رشد کرده و دارای ۲ تا ۳ میانگره شدند. سپس به قطعات حاوی جوانه تقسیم شده و به محیط‌های کشت MS (۱/۲ غلظت نیترا) و WPM (Driver & Kuniyuki, 1984) به منظور یافتن بهترین محیط شاخه‌زایی انتقال داده شدند (جدول ۱). در هر

۱:۱:۱ سترون شده، کشت شدند. برای حفظ بیشترین رطوبت، به منظور انجام سازگاری تدریجی گیاهان، سرپوش به تدریج روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شد و گلدان‌ها به گلخانه در شرایط نوری و دمایی طبیعی منتقل شدند. دارای منافذی شد تا اینکه به‌طور کامل برداشته شد و گیاهان با شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.

جدول ۱- مقایسه غلظت یونی نمک‌های موجود در محیط‌های کشت

WPM	MS (۱/۲N)	یون
۴/۹۴	۱۰/۳۰۵	NH ₄ (mM)
۱۲/۶۱	۱۰/۵۲	K ⁺
۱/۵	۱/۵	Mg ⁺⁺
۳	۲/۹۹	Ca ⁺⁺
۰/۲۲۴	۰/۲۲۴	Na ⁺
۹/۶۴	۱۹/۷	NO ₃ ⁻
۱/۲۵	۱/۲۵	PO ₄ ⁻
۷/۴۴	۱/۷۶	SO ₄ ⁻
۱/۳۱	۶	Cl ⁻
-	۵	I ⁻ (μM)
۱۳۲	۱۳۲	Mn ⁺⁺
۲۰	۲۹	Zn ⁺⁺
۱۰۰	۱۰۰	B ⁺⁺⁺
۱/۰۳	۱/۰۳	Mo ⁺⁺⁺
-	۰/۱۰۵	Co ⁺⁺
۱/۰۳	۰/۱	Cu ⁺⁺
-	-	Ni ⁺⁺
۱۰۰	۱۰۰	Fe ⁺⁺
۱۴/۵۸	۳۰/۰۰۵	N(mM)
۰/۵۱	۰/۵۲	NH ₄ NO ₃ (mM)
۴۲/۳۹	۵۴/۹۲	قدرت یونی کل (mM)

در محیط MS (1/2N) مقادیر NH₄NO₃ و KNO₃ به ۱/۲ مقدار اصلی تقلیل یافته است.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی جوانه‌های *E. citriodora* در محیط کشت درون شیشه‌ای

شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)	شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)
۱	MS (۱/۲N) + ۰/۳BAP + ۰ Kin	۵	WPM + ۰/۳ BAP + ۰ Kin
۲	MS (۱/۲N) + ۰/۳ BAP + ۲Kin	۶	WPM + ۰/۳BAP + ۲Kin
۳	MS (۱/۲N) + ۰/۵BAP + ۰ Kin	۷	WPM + ۰/۵ BAP + ۰ Kin
۴	MS (۱/۲N) + ۰/۵ BAP + ۲Kin	۸	WPM + ۰/۵ BAP + ۲Kin

میزان غلظت هورمون‌های جیبرلین (GA₃=۰/۱ mg/l) و اکسین (IBA=۰/۰۱ mg/l) در جدول ۲ ثابت است.

جدول ۳- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی ریشه‌زایی شاخساره‌های *E. citriodora* در محیط کشت درون

شیشه‌ای



شکل ۱- جوانه‌زنی گونه *E. citriodora*

شماره	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)
۱	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IBA
۲	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IAA
۳	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ NAA
۴	MS (۱/۲ N) + ۱ IBA
۵	MS (۱/۲ N) + ۱ IAA
۶	MS (۱/۲ N) + ۱ NAA
۷	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IBA + ۰/۵ NAA
۸	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IAA + ۰/۵ NAA
۹	MS (۱/۲ N) + ۰/۵ IAA + ۰/۵ IBA

نتایج

به‌منظور کاهش آلودگی‌های سطحی و ترشحات فنلی و بهینه‌سازی روش سترون‌سازی، از آب جاری و دو محلول هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه استفاده شد. نتایج سترون‌سازی بذرها در دو محلول هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۸ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه نشان داد که درصد جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌های تولید شده از بذرها به ترتیب ۹۸/۳۳ درصد و ۷/۱۴ درصد بود (شکل ۱). در هر دو تیمار آلودگی باکتریایی و قارچی مشاهده نشد، در نمونه‌های سترون شده با محلول کلرید جیوه تندش جوانه‌زنی در بذرها انجام شده ولی در تعدادی از آنها بذرها پس از جوانه‌زنی کالوسی شده و رشد نکردند.

نتایج تجزیه واریانس بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات رشدی شاخه نشان داد که عامل محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات ضریب ازدیادی (شاخه و جوانه) و رشد طولی شاخه گونه *E. citriodora* در دو محیط کشت MS (۱/۲) نیترات) و WPM پاسخ متفاوتی دادند و اثر اصلی عامل محیط کشت و تیمارهای هورمونی و اثر متقابل آنها بر شاخص‌های مورد مطالعه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

مقایسه میانگین گیاهچه‌های کشت شده در محیط کشت MS (۱/۲) نیترات) ضریب ازدیادی و طول شاخه بیشتری نسبت به محیط کشت WPM داشتند. بنابراین می‌توان محیط کشت MS (۱/۲) نیترات) را به‌عنوان محیط کشت بهینه برای شاخه‌زایی این گونه توصیه نمود (جدول ۵) (شکل ۲).

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیادی، رشد طولی و سبزیگی شاخه دانه‌رست *E. citriodora* در دو محیط کشت MS و WPM

منبع تغییرات	درجه آزادی	ضریب ازدیادی	طول شاخه (cm)	سبزیگی (درجه ۱ تا ۴)
محیط کشت	۱	۰/۲۱۹**	۰/۱۵**	۰/۰۰۰۵ ^{ns}
تیمار هورمونی	۳	۰/۰۲۷**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۳۷ ^{ns}
اثر متقابل محیط در تیمار هورمونی	۳	۰/۰۴۶**	۰/۰۲۵**	۰/۰۰۲ ^{ns}
خطا	۱۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات		۳/۲۰	۱/۴۶	۴/۶۱

^{ns}: اختلاف معنی‌دار وجود ندارد و ** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

هورمونی بر شاخص‌های رشدی در جدول ۵ نشان می‌دهد که بیشترین رشد طولی شاخه در تیمار هورمونی BAP با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و تکثیر شاخه و جوانه (ضریب ازدیادی) در تیمار هورمونی BAP با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و Kin با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. البته میانگین‌های شاخص رشدی در تیمار T₂ نسبت به سایر تیمارهای به کار رفته به طور معنی‌داری بالاتر بود.

در مقایسه بین دو محیط کشت، نتایج نشان‌دهنده برتری محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) بر محیط کشت WPM بود (جدول ۵). این برتری را می‌توان در معنی‌دار بودن تفاوت بین آنها برای ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه مشاهده نمود. از لحاظ سبزی‌نگی تفاوت معنی‌داری بین دو محیط کشت مشاهده نشد و در یک گروه قرار گرفتند. علاوه بر این نتایج نشان داد که محیط کشت WPM با تیمارهای مختلف سیتوکینین BAP و Kin در غلظت‌های متفاوت، به طور مشابه عمل نموده و تفاوت تیمارها و غلظت‌ها تأثیری در سبزی‌نگی نداشت. اگرچه سبزی‌نگی در محیط کشت WPM به طور طبیعی بود، اما در بعضی از نمونه‌ها به سمت قهوه‌ای شدن رفت. برتری محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) بر محیط کشت WPM را می‌توان ناشی از بالاتر بودن قدرت یونی محیط کشت MS نسبت به WPM دانست (جدول ۱).



شکل ۲- شاخه‌زایی گونه *E. citriodora* در کشت درون شیشه‌ای
 بررسی اثر هورمون BAP در دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر روی صفات ضریب ازدیادی، رشد طولی و سبزی‌نگی شاخه دانه‌رست نشان داد که هورمون BAP در دو غلظت مختلف تأثیر یکسان و مشابهی داشت. اثر هورمون Kin بر روی ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه در غلظت‌های مختلف تأثیر یکسانی نداشت. بنابراین حضور Kin بر روی صفات ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه تأثیرگذار بود. بیشترین ضریب ازدیاد شاخه مربوط به تیمار توأم دو سیتوکینین BAP و Kin است و نبود هورمون Kin با هورمون BAP سبب کاهش ضریب ازدیاد شاخه و افزایش رشد طولی شاخه گردید.
 مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت در تیمارهای

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت در تیمارهای هورمونی بر شاخص‌های رشد طولی، ضریب ازدیادی و سبزی‌نگی شاخه

دانه‌رست *E. citriodora*

کد	ترکیب محیط کشت پایه (میلی‌گرم در لیتر)	ضریب ازدیادی	طول شاخه	سبزی‌نگی (درجه ۱ تا ۴)
T ₁	MS (1/2N) + 0/3 BA + 0 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۱۰/۱۱±۰/۰۵۶bc	۲/۹۱±۰/۰۱ a	۳/۳۷±۰/۰۴۶ a
T ₂	MS (1/2N) + 0/3 BA + 0/2 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۱۳/۸۱±۰/۰۳۷a	۲/۰۶±۰/۰۳۲ c	۳/۳۰±۰/۰۳۶ a
T ₃	MS (1/2N) + 0/5 BA + 0 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۱۰/۷۸±۰/۰۴ bc	۲/۴۶±۰/۰۱۳ b	۲/۹۴±۰/۰۵۸ a
T ₄	MS (1/2N) + 0/5 BA + 0/2 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۱۱/۴۲±۰/۰۸۴ab	۱/۹۵±۰/۰۱۲c	۳/۰۶±۰/۰۷۷ a
T ₅	WPM + 0/3 BA + 0 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۵/۷۶±۰/۰۹۷ c	۱/۴۱±۰/۰۰۳ d	۳/۳۸±۰/۰۶۳ a
T ₆	WPM + 0/3 BA + 0/2 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۸/۸۹±۰/۰۲۲ c	۱/۳۰±۰/۰۲۶ d	۳/۰۲±۰/۰۲۲ a
T ₇	WPM + 0/5 BA + 0 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۶/۵۵±۰/۰۳d	۱/۳۴±۰/۰۰۵ d	۲/۷۵±۰/۰۷۷ a
T ₈	WPM + 0/5 BA + 0/2 kin + 0/1 GA ₃ + 0/01 IBA	۸/۷۲±۰/۰۲۵c	۱/۳۲±۰/۰۰۷ d	۳/۴۶±۰/۰۸۲a

حروف مشابه به معنی عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد است.

(جدول ۶) بیان می‌کند که اثر تیمارهای مختلف اکسین بر صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

نتایج ریشه‌زایی: قبل از تجزیه واریانس صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از جذر ریشه دوم انجام شد. نتایج تجزیه واریانس

جدول ۶- تجزیه واریانس صفات تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه گونه *E. citriodora* تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

MS		درجه آزادی	منبع تغییرات
تعداد ریشه	تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار		
۰/۱۹**	۰/۰۸۴**	۸	تیمار
۰/۰۲	۰/۰۰۹	۱۸	خطا
۱۱/۷۳	۸/۹		ضریب تغییرات

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گونه *E. citriodora* در شرایط گلخانه سازگار شدند (شکل ۴).



شکل ۳- ریشه‌زایی گونه *E. citriodora*

در مقایسه میانگین‌های تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه عامل تیمار تلفیقی هورمون IBA+IAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار هورمونی NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر ترکیب‌های هورمونی مؤثرتر بودند. از نظر تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه تشکیل شده، تیمار NAA و تیمار تلفیقی هورمون اکسین IBA+IAA را می‌توان به‌عنوان تیمار هورمونی بهینه برای ریشه‌زایی توصیه نمود. در مقایسه بین تیمارها برای صفت طول ریشه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و از آوردن آن در جدول صرف‌نظر گردید (جدول ۷) (شکل ۳).

جدول ۷- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ریشه‌زایی بر شاخص‌های تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه گونه *E. citriodora*

تحت تأثیر تیمارهای مختلف اکسین

تعداد ریشه	تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار	تیمار اکسین (میلی‌گرم در لیتر)
۲/۸ ± ۰/۴ bc	۰/۱۳ ± ۱/۹۳ ab	IBA: ۰/۵
۲/۴۶ ± ۰/۲۹ c	۱/۰۶ ± ۰/۰۶۳ bc	IAA: ۰/۵
۷/۱۱ ± ۰/۹۹ a	۲/۰۶ ± ۰/۲۹ ab	NAA: ۰/۵
۶/۱۱ ± ۱/۱۱ ab	۲/۰۰ ± ۰ ab	IBA: ۱
۴/۰۰ ± ۱/۰۰۱ abc	۱/۶۶ ± ۰/۳۳ ab	IAA: ۱
۷/۶۶ ± ۱/۵۳۹ a	۲/۳۷ ± ۰/۶۲ a	NAA: ۱
۲/۳۳ ± ۱/۳۳ cd	۰/۶۷ ± ۰/۲۶ cd	NAA+ IBA: ۰/۵+۰/۵
۰/۸ ± ۰/۲۰۰۲ d	۰/۳۳ ± ۰/۶۶ d	NAA+ IAA: ۰/۵+۰/۵
۸/۷۳ ± ۳/۱۳۷ a	۲/۲۶ ± ۰/۶۷ a	IBA+ IAA: ۰/۵+۰/۵

حروف مشابه به معنی عدم معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد است.

اندام‌زایی (Naraghi, 2003 و Kirby et al, 1987)، شادابی و ضریب ازدیاد شاخه‌ها می‌شوند، در فتوستتز و حفظ فشار تورژسانس در هنگام خروج پتاسیم از سلول‌ها و بیوستتز کلروفیل و افزایش رشد میانگره‌ها نقش دارند. بنابراین به‌نظر می‌رسد غلظت مواد در محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) به مقدار بهینه مورد نیاز برای گونه *E. citriodora* نزدیکتر باشد، این مسئله می‌تواند دلیل برتری محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM در این تحقیق باشد. در مورد شاخه‌های یکم Emam (2007) و در مورد *E. occidentalis* Abravesh (2013) به نتایج مشابهی دست یافتند. اثرهای تغییر محیط کشت MS بر روی تکثیر شاخه گونه *E. citriodora* مورد بررسی قرار گرفت (Grewal et al, 1980). هنگامی که غلظت املاح نیترات آمونیم و نیترات پتاسیم به نصف تقلیل یافت، ضریب تکثیر دو برابر افزایش یافت. ولی افزایش دو برابری این نمک‌ها اثرهای مثبتی بر ضریب تکثیر نداشت. شاخه‌های گونه نوعی رز *R. multiflora* در محیط WPM رشد می‌کند ولی نسبت به محیط کشت MS از نمو کمتری برخوردار است (Van der Salm, 1994). نتایج گزارش شده توسط Emam (2007) و Grewal و همکاران (1980) دلالت بر این دارد که رشد سریع شاخه‌ها وابسته به غلظت نیترات است.

از بین تیمارهای شاخه‌زایی اعمال شده در محیط کشت MS دارای سیتوکینین (BAP) در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب هورمونی JBA، GA₃، kin و BAP در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، صفر و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب بهترین تیمار هورمونی برای شاخص ضریب ازدیادی و رشد طولی شاخه بودند. بسیاری از پژوهشگران از سیتوکینین BAP، به‌عنوان بهترین تیمار هورمونی برای ضریب ازدیاد شاخساره استفاده کرده‌اند. به‌عنوان مثال Assareh و همکاران (2007) تیمار تلفیقی BAP (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و kin (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) را بهترین تیمار شاخه‌زایی برای *E. gongylocarpa* Blakely اعلام نمودند. Bennet (1992) بیان کرد که طول شاخه در *E.*



شکل ۴- سازگاری گونه *E. citriodora* در گلخانه

بحث

استفاده از آب جاری در کاهش آلودگی سطحی و ترشحات فنلی بذرهای *E. citriodora* تأثیر مثبتی داشت. نتایج مشابهی در مورد بذرهای اکالیپتوس (Hartney and Barker, 1980) و جوانه‌های پایه بالغ درخت تا *Celtis caucasica* (Dadvar, et al, 2013) گزارش گردید. کاربرد محلول هیپوکلریت سدیم تأثیری قوی بر حذف آلودگی‌ها دارد ولی در غلظت‌های زیاد باعث از بین رفتن و سوختگی ریزنمونه‌ها شده و به‌نظر می‌رسد استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم در مدت زمان طولانی برای بذرهای ریز اکالیپتوس که دارای پوسته‌ای نسبتاً سخت می‌باشند، مناسب‌تر است. نتایج این پژوهش با نتایج سایر پژوهشگران در بکارگیری محلول هیپوکلریت سدیم به‌منظور سترون‌سازی بذرهای گل محمدی (Abravesh et al, 2012) و بذرهای اکالیپتوس (Akbari et al, 2007) همسویی دارد. براساس نتایج این پژوهش مشخص شد که بین محیط‌های کشت MS و WPM از نظر شاخص‌های رشدی میانگین ضریب ازدیاد و رشد طولی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در تحقیقات انجام شده توسط Bonga & Aderkas (1992) و Naraghi (2003) یکی از عوامل تعیین‌کننده کارایی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن می‌باشد. مقدار یون نیتروژن، کلر و روی در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت WPM است. این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه نقش مهمی دارند و سبب کنترل pH و تحریک

سویی با انتقال این گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک سترون و در زیر سرپوش پلاستیکی گیاهچه‌ها زنده‌مانی نداشته و از بین رفتند. بررسی شاخه‌های انتقال یافته از محیط فاقد هورمون به محیط‌های ریشه‌زایی نشان می‌دهد که تیمار هورمونی NAA و تیمار هورمونی تلفیقی IBA + IAA سبب افزایش و تیمار هورمونی تلفیقی NAA+ IAA سبب کاهش تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار گردید. از سوی تیمار هورمونی تلفیقی IBA+IAA سبب افزایش تعداد ریشه شد. بنابراین اکسین‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت اثر یکسانی روی تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه نداشتند، در حالی که بر روی رشد طولی ریشه تأثیر یکسانی داشتند. بنابراین نوع و غلظت تیمارهای اکسینی در رشد طولی ریشه تأثیری نداشت.

در تحقیقی مشابه Assareh و همکاران (2007) بهترین تیمار ریشه‌زایی گونه *E. gongylocarpa* را هورمون IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اعلام کردند. سایر پژوهشگران بهترین ریشه‌زایی را برای گونه *E. citriodora* در محیط کشت تغییر یافته MS (۰/۲ غلظت) حاوی IBA ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند (Koriesh et al, 2002). در مورد *Eucalyptus phylacis* بهترین تیمار ریشه‌زایی را هورمون IBA با غلظت ۵μM (Bunn, 2005a) و در تحقیق دیگری IBA و NAA به ترتیب با غلظت ۵μM و ۰/۵ μM را بهترین تیمار ریشه‌زایی (Bunn, 2005b) اعلام نمودند. استفاده از سیتوکینین BAP یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باززایی مورینگا (MS کامل) و بعد استفاده از NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منجر به بهبود ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از کالوس شد (Asadi-Corom et al, 2013).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش نشان داد که محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) در مقایسه با محیط کشت WPM محیط مناسبتری بود. همچنین به‌کارگیری هورمون سیتوکینین BAP با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر

در محیط دارای کینتین طولی‌تر بوده و برگ‌ها شاداب‌تر بر روی ساقه باقی ماندند، اما تکثیر شاخه آن به نسبت کم بوده است. بنابراین اثر سیتوکینین BAP به‌طور جداگانه و به‌صورت تلفیقی در رشد طولی شاخه و تکثیر شاخه با توجه به غلظت به‌کاررفته، متفاوت است. کاربرد تلفیقی هورمون‌ها در ازدیاد شاخه‌ها توسط محققان دیگر در مورد *E. gongylocarpa* (Akbari et al, 2007) و در مورد *E. tereticornis* (Lakshmi-Sita, 1993) گزارش شده است. شاخه‌های *E. globulus* کشت شده در محیط کشت تکثیر حاوی ترکیب تلفیقی BAP و Kin رشد بهتری را نسبت به شاخه‌های کشت شده در دو محیط کشت حاوی BAP و محیط کشت حاوی Kin به‌طور جداگانه نشان داده‌اند (Assareh & Sardabi, 2008). در این تحقیق، شاخه‌ها در محیط کشت BAP دارای برگ‌های قرمزی بودند که روی ساقه پایدار نبودند. جوانه‌های جدید از شاخه‌ها خارج شدند اما رشد آنها به آرامی انجام شد، در حالی که شاخه‌های محیط کشت حاوی Kin طولی‌تر و رنگ برگ‌های آنها سبز بود و در روی شاخه باقی ماندند، اما ضریب تکثیر شاخه‌ها در مقایسه با محیط کشت حاوی BAP کمتر بود. محیط کشت حاوی BAP و Kin از نظر تکثیر شاخه‌زایی بهتر از محیط کشت حاوی BAP بدون Kin بود. در محیط کشت حاوی BAP و Kin برگ‌های پایینی آن از حد طبیعی بزرگتر شده و رنگ آنها متمایل به قرمز بود که با نتایج Assareh & Sardabi (2008) همسویی دارد (شکل ۲).

ریشه عامل مهمی در جذب آب و مواد غذایی است که در رشد بعدی گیاهک اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش به‌منظور ریشه‌دار نمودن گیاهچه‌های گونه *E. citriodora* آزمایش‌های متعددی انجام شد. درصد ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف، از صفر تا ۳۰ درصد متفاوت بود. در برخی از تیمارها و محیط‌های کشت مشاهده شد که با ریشه‌دار شدن گیاهچه نوک جوانه انتهایی قهوه‌ای شد و اندام هوایی به‌تدریج شروع به نکرورگی نموده و از بین رفت. در برخی تیمارها ریشه‌ها به‌صورت کوتاه و منشعب بودند. از

- phylacis* L. Jhson and K. Hill., A critically endangered relict from Western Australia. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 41: 812-815.
- Bunn E., 2005b. 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.
 - Dadvar, F., Rostami, Shahraji, T., Assareh, M. H., Emam, M. and Shirvany, A., 2013. Effects of different concentrations of plants regulators on *In vitro* micropropagation of *Celtis caucasica* Willd Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21; 13-23 (In Persian).
 - De Bergh, PC., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiology plant*, 59: 270- 276.
 - Driver, J., and Kuniyuki, A. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509.
 - Emam, M., Assareh, M.H., Shahrzad, Sh., Khojir, k., 2007. Asexual regeneration of two species of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* by tissue culture, Final report, Research Institute of Forests and rangelands, Tehran, Iran 45p (In Persian).
 - Fallahi, M., Heidari, A., Moharamipour, S., Imani, S., Maroof, A., 2013. Fumigation hexane extract three *Eucalyptus* species (*Eucalyptus microtheca*, *E. globules* and *E. camaldulensis*) on Saw Toothed *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) *Journal of Plant Protection*, 5 (1): 45-55.
 - Grewal, S. Ahuja, A. and Atal, C.K., 1980. Clonal multiplication of medicinal plants by tissue culture. *in vitro* proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora*. Hook. *Indian Journal of Experimental Biology*, 18:775-776.
 - Gupta, P.K., Mascarenhas, A.F. and Jagannathan, V., 1981. Tissue culture of forest trees clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. *Plant Science Letters* 20: 195-201.
 - Gupta, P.K., Mehta, U.J., and Mascarenhas, A.F., 1983. A tissue culture method for rapid propagation of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. torreliana* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 2: 296-299.
 - Gupta, P.K. and Mascarenhas, A.F., 1987. *Eucalyptus*. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 3. Martinus Nijhoff, Dordrecht/ Boston/ Lancaster, 416p.
 - Hartney, V.J., and Barker, P.K., 1980. Vegetative propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. IUFRO Symposium and Workshop on Genetic Improvement
- برای شاخه‌زایی و تیمارهای هورمونی اکسین IAA+IBA به‌طور تلفیقی و NAA به‌صورت جداگانه به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی مناسب‌ترین تیمارها برای گونه *E. citriodora* می‌باشند.
- ### منابع مورد استفاده
- Abravesh, z., Assareh, M.H., Tabaei-Aghdaei, S. R., 2012. Effect of Thermal Period on Seed Dormancy of *Rosa damascena* Mill. *Journal of Medicinal Plants and By-products* 1: 55-59.
 - Akbari Khabbaz, M., Ghamari Zare, A., Emam, M., Assareh, M.H., Ghorbanli, M., 2007. Micropropagation of *Eucalyptus gongylocarpa*, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 142-158 (In Persian).
 - Asadi-Corom, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Emam, M., Bakhshi-Khaniki, G.R., 2013. Responding populations of *Moringa peregrina* (Forssk). Fiori to different culture media in callus and regeneration production, *Forest and Wood Products, Journal of Natural Resources of Iran*, 66 (2): 167-176 (In Persian).
 - Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus* spp. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 3: 11-32 (In Persian).
 - Assareh, M.H., Ghorbanli, M. Akbari, M., Ghamari Zare, A. and Emam, M., 2007. Micropropagation, organogenesis and using new method of semiphotoautotrophic in *Eucalyptus gongylocarpa*, Pajouhesh- va- Sazandegi in *Natural Resources*, 75: 134-145 (In Persian).
 - Assareh, M.H & Sardabi., 2008. *Eucalyptus* (Description, Illustration & Propagation by Advanced Techniques), Volume 1, Publication of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran 672 P. (In Persian).
 - Bennet, I.J., McComb, J.A., Tonkin, CM. and McDavid, D.A.J., 1992. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of *Eucalyptus globules* and other *Eucalyptus* species. In: *Proceedings of conference on mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species*, France. Association FORêt-CELLulose (AFOCEL). PP. 195-201.
 - Bonga, J.M. & Aderkas, P.V. 1992. *In vitro* Culture of trees. Kluwer Academic Publishers, 236 pp.
 - Bunn E., Senaratna, T., Sivastihamparam, K. and Dixon, K., 2005a. *In vitro* propagation of *Eucalyptus*

- Rapid multiplication of *Eucalyptus* by multiple shoot production. *Curr. Sci.*, 48: 350-352.
- Mascarenhas, A.F. Hazara, S., Potdar, U., Kulkarni, D.K. and Gupta, P.K., 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In: Fujiwara, A. (Ed.). *Plant Tissue Culture*, 1982. Proc 5th Int. Cong Plant Tissue Cell Cult, Tokyo, Japan, PP. 719-720.
 - Murashige, T. and F. Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-597.
 - Najafi Ashtiani, A., Assareh, M.H., Baghestani, M.A. and Angaji S.J., 2008. The Effects of methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh on Growth and germination rates of *Chenopodium album* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 24: 293-303 (In Persian).
 - Naraghi, T. S., 2003. *In vitro* propagation of *Taxus baccata* through shoot tip cultures, *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research.*, 11: 309-325 (In Persian).
 - Rad, M.H., Assareh, M.H., Meshkat, M.A., Dashtegian, K., and Soltani, M., 2010. Water requirement and production function of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) in arid environment. *Iranian Journal of Forest*, 2(1): 61-71 (In Persian).
 - Sardabi, H., Rahmani, A., Hamze, B., Assareh, M.H. and Ghorany, M., 2010. Impact of different Eucalypt species on forest soil properties in Guilan provinc, *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 18: 116-131 (In Persian).
 - 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: 525-902.
 - Van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., and Hanisch ten Cate C. H., 1994. Importannce of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L 'Moneyway. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 37: 73-77.
 - and Production of Fast Growing Tree Species. Sao Paulo. Brazil. PP 791-793.
 - Hartney, V.J., 1981. Vegetative propagation of the Eucalyptus in vitro. In: Proc IUFRO Sects., 2015. Int. Workshop, In Vitro, Cultivation For Tree Species, Fontainebleau, France, Association FORêt-CELLulose (AFOCEL). PP. 175-180.
 - Hosseinzadeh, J., Sardabi, H., Zarin-kaviani. 2017. Comparison of the growth of industrial Eucalyptus species and cultivars in tropical region of Mehran, *Forest and Wood Products*, 70 (1) :83-9.
 - Jawanshir, K., Mossadegh, A., 1973. *Eucalyptus*, Tehran University Press, 434 p, (In Persian).
 - Jacquot, C., 1964. Application de la technique de culture des tissue vegetaux a Letude de quelques problemes de physiologie de Labre. *Ann. Sci. for.* 21: 310-473.
 - Kamalpour, S., Motesharezadeh, B., Alikhani, H.A. and Zarei, M. 2014. Effects of some biotic factors in lead phytoremediation and phosphorous uptake by Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*). *Iranian Journal of Forest*, 5(4): 457- 470.
 - Karami, O, Jafarzadeh, A.K., Calbi, S, and Jalilvand, H., 2007. Study Eucalyptus cultivation and Its role in preventing the destruction of forests, The 2nd Regional Conference on Natural Resources and the Environment, Islamic Azad University of Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran (In Persian).
 - Keneshloo. H., Eghtesadi. A., 2011. The effect of afforestation in reduction oil pollution (heavy metals), *Journal of Natural Environment, Iranian Journal of Natural Resources*, 64: 185-197 (In Persian).
 - Kirby, E, G., T, Leustek. And M. S. Lee., 1987. Nitrogen nutrition. In: Bonga, J. M. and D. J. Durzan. *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 1, General Principles and Biotechnology*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. PP. 67-88.
 - Koriesh, E.M., Abd El-Fattah, Y.M., El-Dayem, M.A., El-Etriby, M.A., 2002. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus citriodora*, *Acta Horticulture*, 625:283-288
 - Lakshmi Sita, G. and Vaidyanathan, C.S., 1979.

Micropropagation of *Eucalyptus citriodora* H.

Z. Abravesh¹, M.H. Assareh², M. Emam³

1 MSc. Expert of Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. *Corresponding author: E-mail: abravesh@rifr-ac.ir

2- Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

3- Assistant professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

Received: 30.12.2017

Accepted: 10.09.2018

Abstract

Among species of hardwood forest trees, *Eucalyptus citriodora* is a fast growing plant that is cultivated for aromatic essential oils in perfumes, pharmaceuticals, and its soft and light wood in the paper and furniture industry. The micropropagation of *E. citriodora* Lemon-scented Gum was carried out in two medium culture of MS (1/2N) and WPM through bud culture. Sterilization was done using solutions of mercuric chloride 0.1% and sodium hypochlorite 20%. Shoot multiplication was done with cytokinin (BAP, Kin), auxin (IBA) and gibberellin (GA₃) hormones and rooting with auxin hormones IBA, NAA and IAA in only MS (1/2N) medium. The shoot multiplication was assessed in two medium using factorial experiment based on the completely randomized design (CRD) and rooting multiplication in one medium using CRD. Propagation coefficient, shoot length, greenity, total root and rooted seedlings were measured. The best sterilization was immersion seeds in 20 % sodium hypochlorite solution in 18 min. The best propagation and shoot elongation was obtained in MS (1/2N) medium coupled with BAP, Kin, GA₃ cytokinin hormones and auxin hormones IBA in 0.3, 0.2, 0.1, 0.01 mg l⁻¹ and 0.3, 0, 0.1, 0.01 mg l⁻¹ concentrations respectively by 200 mg l⁻¹ P.V.P. The best rooting treatments were a modified MS (1/2N) medium, auxin hormone NAA and IBA+IAA in 1 mg l⁻¹, 0.5mg l⁻¹. These plantlets transferred to soil and were kept in the greenhouse conditions. The results of this study show that tissue culture is a suitable method for the propagation of this valuable species in a short time.

Key words: *In vitro*, Culture medium, *Eucalyptus citriodora*, MS and WPM.