دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ١٦، شمارهٔ ٢، صفحهٔ ٢٣٧-٢٢٩ (١٣٨٧)

مقایسه باززایی مستقیم و غیرمستقیم در *Eucalyptus microtheca* M.

مرتضی شبان‌نژاد ممقانی[*1]، محمدحسن عصاره[2]، منصور امیدی[3]، عباس قمری زارع[4]، شکوفه شهرزاد[5]

١-* نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، پست الکترونیک: mrshabannejad@gmail.com
٢- دانشیار، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران.
٣- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
٤- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٥- کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگلها ومراتع کشور، تهران.

تاریخ دریافت: ١٣٨٦/٦/١ تاریخ پذیرش: ١٣٨٦/١١/١٣

چکیده

بذر *E. microtheca* در محیط MS بدون هورمون کاشته شد و ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی، هیپوکتیل و دیسک برگی از گیاهچه‌های رشد یافته جدا گردید. ریزنمونه‌ها در محیط MS با نیمی از مقادیر نیترات و حاوی ١٢ غلظت متفاوت از هورمون‌های NAA و Kin کشت گردیدند. ریزنمونه‌های کشت شده، در فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی به ترتیب در ٢٥ و ١٩ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ٤ هفته باززایی انجام شد. طی تجزیه‌های آماری بهترین محیط کشت برای باززایی غیرمستقیم در بافت‌های برگ کوتیلدونی و دیسک برگی به ترتیب حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر Kin و ٢ میلی‌گرم در لیتر NAA بعلاوه ١ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. برای باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های هیپوکتیل تیمار حاوی ١ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ١ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌عنوان بهترین محیط تعیین گردید. تعداد نمونه باززایی شده نشان دهنده برتری باززایی مستقیم نسبت به باززایی غیرمستقیم بود.

واژه‌های کلیدی: تمایززدایی، باززایی، ریزازدیادی و *E. microtheca*

مقدمه

تاکنون ٧٠٠ گونه، زیرگونه و هیبرید طبیعی از جنس اکالیپتوس شناسایی شده است (Pinto *et al*, 2002). اکالیپتوس‌ها بیش از ١٠٠ سال پیش وارد ایران شدند (عصاره و سردابی، ١٣٨٦). ثابتی در سال١٩٦٢ تعداد ٣٠ گونه اکالیپتوس را با توجه به خصوصیات نزدیک به شرایط اکولوژیکی مناطق گرمسیری ایران، از ایالت‌های مختلف استرالیا وارد ایران نموده و در ایستگاه‌های سازگاری در جنوب ایران (خوزستان، فارس، کرمانشاه و لرستان) کاشت (عصاره و سردابی، ١٣٨٦). *E. microtheca* گونه‌ای بومی استرالیا است که استقرار آن در سودان، عراق، پاکستان و نیجریه موفق بوده است (عصاره و سردابی، ١٣٨٦). در آزمایشات سازگاری که از سال ١٩٦٨ در ایران شروع شده و تاکنون ادامه دارد، مورد خاصی از حمله آفات و امراض به این گونه مشاهده نشده است. در آن نواحی که برای مدتی از سال باتلاقی

می‌شوند این گیاه می‌تواند رشد کند و تا ٤٣ درجه سانتی‌گراد در تابستان و سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد در زمستان را تحمل می‌کند (مرتضوی جهرمی، ۱۳۷۳). در سرمای شدید سال ۱۹٦۲ در ایران فقط گونه *E. viminalis* توانست مقاومت کند و گونه‌های *E. camaldulensis* و *E. microtheca* که دارای ریشه‌های جستجوگر هستند به مرور زمان خود را در مناطق گچساران، دهنو ممسنی و تلمبه‌خانه نورآباد احیا کردند (مرتضوی جهرمی، ۱۳۷۳).

این گونه دگرگشن بوده و بوسیله بذر تکثیر می‌شود. *E. microtheca* از نظر شکل ظاهری مطلوب نیست اما با آزمایش هیبریدهای جدید و انتخاب پایه‌های برتر قابل اصلاح است (عصاره و سردابی، ۱۳۸٦). حفظ ژنوتیپ‌های برتر در این گونه به علت دگرگشن بودن آن بسیار دشوار می‌باشد. کشت درون شیشه ابزاری است که امکان شناخت و کنترل عوامل موثر در تمایززدایی، باززایی و تکثیر انبوه غیرجنسی را فراهم می‌سازد. باززایی به شکل‌های متفاوت از قبیل باززایی مستقیم، باززایی غیرمستقیم و جنین‌زایی سوماتیکی قابل مشاهده است. برای عبور از این مراحل بایستی تیمارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی برای مدت زمان مناسب استفاده گردد. نحوه باززایی درون شیشه برای تکثیر غیرجنسی انبوه ژنوتیپ‌های خالص و انتقال ژن مهم است (Tang & Newton, 2005؛ سادات، ۱۳۸٦). برای باززایی اکالیپتوس‌ها روش‌های متفاوتی معرفی شده است (Yang, 2004؛ عصاره و سردابی، ۱۳۸٦). اندام‌زایی در *E. urophylla* (Tibok *et al*, 1995)، باززایی مستقیم در *E. tereticornis* (Sonkara Rao, 1988) و جنین‌زایی سوماتیکی در *E. sargentii* و *E. camaldulensis* (Assareh, 1998) مثال‌هایی از پژوهش‌های انجام شده بر روی اکالیپتوس‌ها می‌باشند.

مقایسه روش‌های باززایی گونه‌های مختلف اکالیپتوس بیانگر نتایج زیر می‌باشد: ۱- ریزنمونه‌هایی مانند هیپوکتیل پتانسیل زیادی برای باززایی در اکالیپتوس‌ها دارند. ۲- استفاده از NAA همراه با یک سیتوکینین مناسب نتایج مثبتی داشته است. ۳- استفاده از یک ماده مکمل مانند انواع هورمون‌ها و یا اسیدهای آمینه می‌تواند نقش بسیار مهمی در القاء جنین‌زایی سوماتیکی داشته باشد.

در این پژوهش با استفاده از هورمون‌های NAA[1] و Kin[2] بهترین تیمارها جهت شناسایی انواع باززایی و مقایسه آنها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مبدا بذرهای *E. microtheca* دهنوممسنی در استان فارس با طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳۱ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۸ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۱٤۰ متر از سطح دریا بود. جهت سترون‌سازی، بذرها به مدت ۳ ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. ضد عفونی سطحی با استفاده از الکل ۷۰٪ (به مدت ۵ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (به مدت ۵ دقیقه) و در انتها سه بار شستشو با آب مقطر (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در زیر هود مخصوص کشت بافت انجام شد. محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) بدون هورمون ساخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید. بذرهای مذکور درون محیط مذکور کشت شده و به مدت ۳۰ روز در فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی (۲۷ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹ درجه

1- α-naphthalene acetic acid
2- Kinetin

سانتی‌گراد) نگهداری شدند. از هر تیمار ٤ تکرار و در هر تکرار ٦ ریزنمونه کشت گردید. پس از این مدت ریزنمونه برگ‌های کوتیلدونی، دیسک‌های برگی و هیپوکتیل‌ها از گیاهچه‌های رشد یافته جدا شدند و در محیط MS (با نیمی از مقادیر نیترات) تکمیل شده بوسیلهٔ ۱۲ تیمار هورمونی حاصل از ٤ سطح NAA همراه با ۳ سطح Kin کشت گردیدند (جدول ۱).

یادداشت برداری ۳ روز پس از کشت آغاز و تولید کالوس، وجود کالوس‌های جنین‌زا و نوع باززایی به روش Pinto و همکاران (2002) ثبت گردید (جدول ۱). داده‌های بدست آمده از تیمارهای متفاوت نرمال شد و به روش GLM در نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل انجام گرفت و دسته بندی صفات بوسیلهٔ گروه‌بندی دانکن صورت گرفت.

نتایج

هفت روز پس از کشت، کال‌زایی از محل بریدگی ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی و دیسک برگی شروع شد. رنگ این کالوس‌ها از کرم روشن تا زرد پررنگ متغیر بود. باززایی فقط در کالوس‌هایی که متمایل به رنگ کرم روشن بودند مشاهده شد. برگ‌های کوتیلدونی در مقادیر کم NAA، کالوس کمی ایجاد نمودند. با افزایش مقدار NAA تولید کالوس بیشتر شده، کالوس‌های جنین‌زا بوجود آمد و باززایی به صورت غیرمستقیم بود (جدول ۱). این کالوس‌ها دارای تعداد زیادی ریشه و گیاهچه غیرطبیعی بودند (شکل ۱. A و B). ریشه‌زایی در کالوس ریزنمونه‌های هیپوکتیل مشاهده گردید. درتیمار $H_{٦}$ (جدول ۱) کالوس بسیار کم و به رنگ زرد روشن متمایل به سبز بود. پس از گذشت ٤ هفته ریزنمونه‌های هیپوکتیل به صورت مستقیم در این تیمار باززایی شدند، به‌نحوی که از انتهای بریده شده ریزنمونه‌های هیپوکتیل که فاقد کالوس بودند یا به مقدار بسیار کم کالوس وجود داشت، تعداد بسیار زیادی ریزشاخه بوجود آمد (شکل ۱. C و D). در ریزنمونه‌های دیسک برگی، باززایی به صورت غیرمستقیم بود. در مقادیر کم NAA کالوس‌هایی کرم رنگ تا سفید همراه با ریشه‌های کوتاه پوشیده از کرک وجود داشت. در مقادیر زیاد این هورمون نیز کالوس‌های زرد کم رنگ مشاهده می‌شد. طی تجزیه‌های آماری، بهترین ریزنمونه، هیپوکتیل (شکل ۲) و بهترین نوع باززایی، باززایی مستقیم بود (شکل ۳)، همچنین برترین ترکیب هورمونی برای هر ریزنمونه با توجه به تعداد باززایی تعیین گردید (جداول ۲ و۳).

بحث

در این بررسی بهترین تیمار برای باززایی مستقیم ریزنمونه‌های هیپوکتیل *E. microtheca* محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از هورمون‌های NAA و Kin بود. نتایج حاصل از این بررسی با گزارش Sankara Rao (1988) در مورد نوع وغلظت اکسین استفاده شده برای باززایی مستقیم در گونه دیگر *E. tereticornis* همسویی نشان می‌دهد. اما با توجه به تفاوت در نوع و میزان سیتوکنین و ریزنمونه استفاده شده، مقایسه دستاوردها مطالعه بیشتری را می‌طلبد.

ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی در تیمار حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین تعداد باززایی را داشتند. Pinto و همکاران (2002) چهار نوع ریزنمونه دیسک برگی، ساقه، برگ کوتیلدونی و هیپوکتیل را برای جنین‌زاییسوماتیکی*E. globulus* مورد بررسی قرار دادند. بهترین تیمار در این آزمایش حاوی ۳ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای برگ‌های کوتیلدونی بوده است. پس می‌توان گفت بر روی برگ‌های کوتیلدونی هورمون NAA

در مقادیر ۳ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر اثر مشابهی بر روی دو گونه *E. microtheca* و *E. globulus* دارد. در پژوهشی دیگر Muralidharan و همکاران (1989) در گونه *E. citrodora* با استفاده از ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، باززایی مستقیم و ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه گلوتامین و کازئین هیدرولیز شده (هرکدام ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) جنین‌زایی سوماتیکی از برگ‌های کوتیلدونی به‌دست آوردند (Muralidharan *et al*, 1989). نتایج حاصله از پژوهش حاضر در دستیابی به بیشترین میزان باززایی با نتایج Muralidharan و همکاران (1989) مطابقت ندارد. ولیکن تأییدی مجدد بر توانایی مقادیر زیاد NAA در تحریک کال‌زایی و باززایی غیرمستقیم برگ‌های کوتیلدونی در اکالیپتوس‌ها می‌باشد.

بهترین تیمار برای باززایی دیسک‌های برگی *E. microtheca* حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. Gurumurthi & Parkash (2005) برای باززایی دیسک‌های برگی *E. tereticornis* ابتدا کالوس‌های ترد و شکننده بوسیله هورمون NAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌دست آورده و سپس این کالوس‌ها را به محیط حاوی BAP[1] (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده‌اند. مقدار بهینه شده NAA برای دیسک‌های برگی *E. tereticornis* و *E. microtheca* یکسان می‌باشد ولی هورمون BAP در مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر بیشتری نسبت به Kin در مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر داشته است. Visser و همکاران (1992) در آزمایش‌های خود نشان دادند که BAP از جمله هورمون‌هایی است که توانایی تحریک رشد به صورت مستقیم را دارد ولیکن Kin اینگونه نیست.

تعداد باززایی در برگ‌های کوتیلدونی *E. microtheca* بسیار کمتر از ریزنمونه‌های دیگر بود. Dedico (2007) نیز در باززایی دیسک‌های برگی *E. camaldulensis* نتایج مطلوبی به‌دست نیاورده است. عدم وجود پاسخ مناسب برای دیسک‌های برگی *E. microtheca* و *E. camaldulensis* می‌تواند نشان دهندهٔ تخصصی شدن سلول‌ها باشد به‌نحوی که ابتدا سلول‌ها باید تمایززدایی شوند (تولید کالوس) و دوباره وارد فاز تمایز مجدد گردند (اعمال تیمارهای متفاوت). این روش با ٥٤٪ موفقیت همراه بوده است (Parkash & Gurumurthi, 2005)، که نسبت به ۱۲٪ نتیجه حاصله از آزمایشات نگارنده بسیار چشمگیرتر می‌باشد.

جهت باززایی غیرمستقیم نسبت سایتوکنین به اکسین ۲۰ به ۱ (محمودی کردی، ۱۳۷۹)، ٦ به ۱ (جورابچی، ۱۳۷۹) و ٤ به ۱ (سادات، ۱۳۸٤) پیشنهاد شده است. که کاملا با نتایج نگارنده و Parkash و Gurumurthi (2005) مغایرت دارد. شاید به‌توان این اختلافات را مربوط به نوع ریزنمونه، سطح پلوئیدی، اختلاف در جنس و یا گونه دانست (چاولا، ۱۳۸۲).

در جمع‌بندی نهایی می‌توان گفت با افزایش مقدار اکسین NAA، کال‌زایی افزایش یافته ولی Kin تاثیر چندانی بر روی کال‌زایی نداشته است. تولید کالوس‌های جنین‌زا نیز فقط در تیمارهای حاوی NAA زیاد و با حضور مقدار کمی Kin مشاهده شد. همچنین نوع باززایی به شدت تحت تاثیر ریزنمونه و نسبت سیتوکنین به اکسین بوده است.

سپاسگزاری

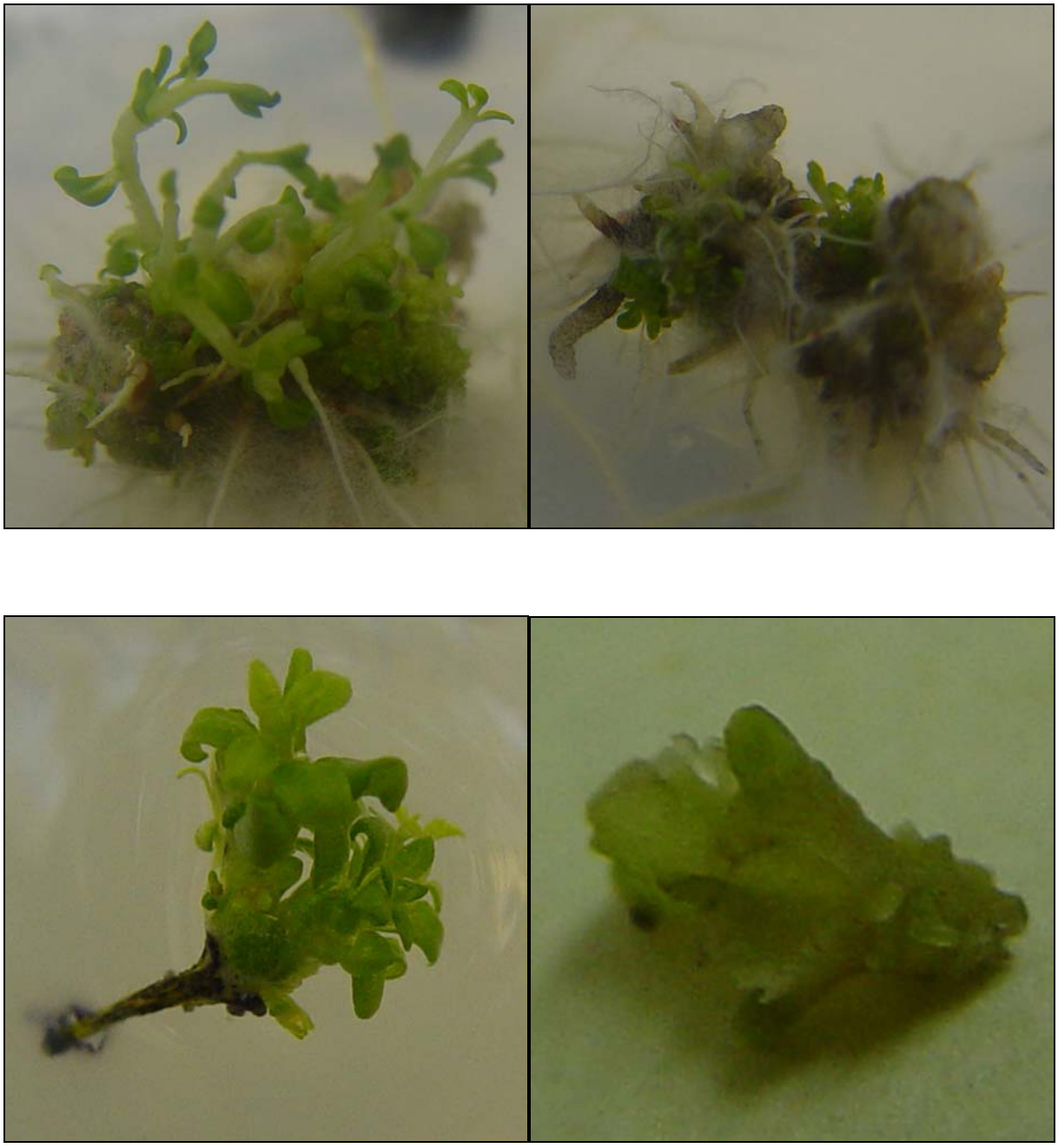
این پژوهش با همکاری مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و دانشگاه آزاد اسلامی کرج انجام گردیده است، به این وسیله قدردانی شایسته از مسئولین محترم این مؤسسه‌ها به عمل می‌آید.

[1]- Benzylamino purine

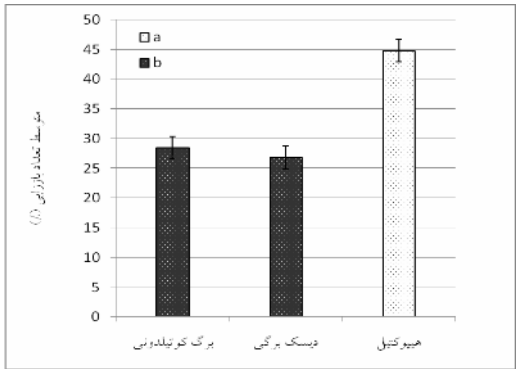
جدول ۱. ثبت صفات به روش Pinto و همکاران (2002).

تیمار	نوع و غلظت هورمون	واکنش ریزنمونه	برگ کوتیلدونی	دیسک برگی	هیپوکتیل
H_1	NAA۰/۵($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	-	-
		کالوس جنین‌زا	No	-	-
		نوع باززایی	-	-	-
H_2	NAA۰/۵($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	+++	+
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	-
H_3	NAA۰/۵($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	+	+	+
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	-
H_4	NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	+	++
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	INR
H_5	NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	+	+	+++
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	INR
H_6	NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	+	-
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	DIR
H_7	NAA۲/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	++	-
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	INR	-
H_8	NAA۲/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++++	++	+
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	INR	-
H_9	NAA۲/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	+++	++
		کالوس جنین‌زا	No	Yes	No
		نوع باززایی	-	INR	-
H_{10}	NAA٤/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	-	-
		کالوس جنین‌زا	No	No	No
		نوع باززایی	-	-	-
H_{11}	NAA٤/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++++	++	+
		کالوس جنین‌زا	Yes	Yes	No
		نوع باززایی	INR	-	-
H_{12}	NAA٤/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)	تولید کالوس	++	+	+++
		کالوس جنین‌زا	Yes	No	No
		نوع باززایی	INR	-	-

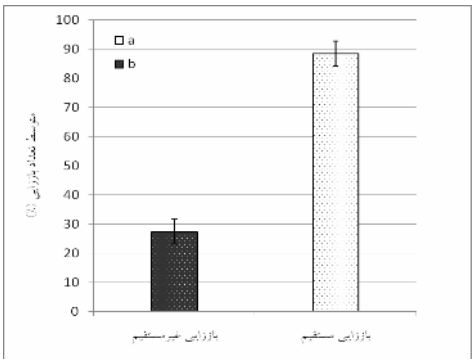
هر علامت + معرف مشاهده صفت در یک تکرار و – به معنی عدم مشاهده صفت است. Yes به معنی وجود پاسخ مناسب و No به معنی عدم وجود پاسخ مناسب می‌باشد. DIR: باززایی مستقیم (Direct regeneration)، INR: باززایی غیرمستقیم (Indirect regeneration).



شکل ۱. انواع باززایی. A و B: باززایی غیرمستقیم در ریزنمونه برگ کوتیلدونی. C و D: باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های هیپوکتیل.



شکل ۲. مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α = ٪۵).



شکل ۳. مقایسه میانگین نوع باززایی. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α = ٪۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح هورمون NAA به روش دانکن برای تعداد باززایی در *E. microtheca*

ریزنمونه	NAA ۰/۵ mg l^{-1}	NAA ۱/۰ mg l^{-1}	NAA ۲/۰ mg l^{-1}	NAA ٤/۰ mg l^{-1}
برگ کوتیلدونی	۱/۱۳۷۳b	۱/۱۳۷۳b	۲/۰۸۱۱b	۵/٤۲۵۸a
هیپوکتیل	۲/۷۸۹۱a	٤/۷۲۷٦a	۰	۰
دیسک برگی	۱/۵٦۵۵b	۰/۹۹۹۸b	٤/٦۱٦۱a	۰

حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α = ٪۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین سطوح هورمون Kin به روش دانکن برای تعداد باززایی در *E. microtheca*

ریزنمونه	Kin ۰/۰ mg l-1	Kin ۰/۵ mg l-1	Kin ۱/۰ mg l-1
برگ کوتیلدونی	۱/٤۰۷۱b	٤/٦۳۵۲a	۱/۸۱۸٦b
هیپوکتیل	۳/۳۱۱۰b	۱/۵۷۱۲c	۷/۹۱۰۵a
دیسک برگی	۱/۸۱٦۱b	۱/۹۲۱٤b	۵/۳۲٦۹a

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α = ٪۵).

منابع مورد استفاده

- جورابچی، ع.، ۱۳۷۹. تنوع سوماکلونال و گامتوکلونال در گیاهان باززایی شده از کشت سلول و کالوس گیاه صنوبر پده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، رشتهٔ زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه خاتم. ۱۸٦ صفحه.
- چاولا، اچ. اس.، ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. ترجمه محمد فارسی و جعفر ذولعلی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ٤۹۵ صفحه.
- سادات، ش.، عصاره، م.ح.، جعفری مفید آبادی، ع.، طبائی عقدایی، س.ر.، قمری زارع، ع. ۱۳۸٦. بررسی کالوس‌زایی و باززایی گیاه صنوبر پده (*Populus euphratica* Oliv.) با استفاده از کشت تخمدان. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۵: ۲۳۱-۲٤۲.
- سادات، ش.، ۱۳۸٤. بررسی تنوع سوماکلونال با استفاده از کشت تخمدان نارس و بالغ در صنوبر پده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، رشتهٔ اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۹۰ صفحه.
- عصاره، م. ح. و سردابی، ح.، ۱۳۸٦. اکالیپتوس، شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین. جلد اول. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ٦۷۲ صفحه.
- محمودی کردی، ف.، ۱۳۷۹. کشت بساک وایجاد گیاه‌هاپلوئید در صنوبر پده و بررسی مقایسه‌ای تشریحی گیاهان هاپلوئید ایجاد شده با دیپلوئید طبیعی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم. ۱٤۹ صفحه.
- مرتضوی جهرمی، س. م.، ۱۳۷۳. معرفی گونه‌های سازگار اکالیپتوس در مناطق غربی استان فارس. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع. شماره ۹۹. ۸۳ صفحه.
- Assareh, M. H.,1998. *In vitro* culture plant regeneration through organogenesis, somatic embryogenesis and photoautotrophic micropropagation of some *Eucalyptus*. National University of Ireland, Ph.D thesis, 200 p.
- Dedico, M., 2007. Genetic transformation the *Eucalyptus camaldulensis* with co-culture and *Agrobacterium tumefaciens*. University Federal of Parana, Ph.D thesis, 146 p.
- Muralidharan, E. M., Gupta, P.K. and Mascarenhas, A. F., 1989. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. Plant cell Reports, 8: 41-43.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with *Tobacco* tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-479.
- Pinto, G., Santos, C., Neres, L. and Araujo, C., 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* labill. Plant Cell Reports, 21: 208-213.
- Prakash, M. G. and Gurumurthi, K., 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. Current Science, 88: 1311-1315.
- Sonkara Rao, K., 1988. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Plant Cell Reports, 7: 546-549.
- Tang, W. and Newton, R. J., 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Elsevier, Plant physiology and Biochemistry, 43: 760-769.
- Tibok, A., Blackhall, N.W., Power, J. B. and Davey, M. R. 1995. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. Plant Science, 110: 139-145.
- Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R. and Saxena, P.K., 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron, substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. Plant Physiology, 99: 1704-1707.
- Yang, B. Z., 2004. Studies on *Eucalyptus* regeneration systems. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 17: 500-503.

Comparison of direct and indirect regeneration in *Eucalyptus microtheca* M.

M. Shabannejad Mamaghani*[1], M.H. Assareh[2], M, Omidi[3], A. Ghamari Zare[4], SH. Shahrzad[5]

1 –Corresponding author, MSc., Islamic Azad University, Karaj, I.R.Iran.
E-Mail: mrshabannejad@gmail.com
2 – Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Tehran, I.R.Iran.
3 – Prof., Faculty of Agriculture, Tehran University. Karaj, I.R.Iran
4 – Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Tehran, I.R.Iran.
5 - Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Tehran, I.R.Iran.

Received: 22.08.2007 Accepted: 01.01.2008

Abestract

Seeds of *E. microtheca* were cultured on hormone-free MS medium cotyledons, then leafs and hypocotyls were separated from plantlets. All explants were cultured on modified MS medium with half-strength nitrate and supplemented with 12 different concentrations of NAA and Kin. Cultured explants were maintained in incubator with 16h light and 8h dark at 25$^{\circ C}$ and 19$^{\circ C}$, respectively. The organs appeared after 4 weeks. The best medium for indirect regeneration of cotyledon and leaf tissues contained 4 mg l^{-1} NAA with Kin 0.5 mg l^{-1} and NAA 2 mg l^{-1} with Kin 1 mg l^{-1}, respectively. In direct regeneration of hypocotyls, the best treatment contained 1 mg l^{-1} NAA with 1 mg l^{-1}Kin. The frequency of regenerated samples showed that direct regeneration was better than indirect regeneration.

Key words: Dedifferentiation, regeneration, micropropagation and *Eucalyptus microtheca*