DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.7678

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۱، صفحه ۱۰۰-۹۱ (۱۳۹۳)

تأثیر هورمون‌های Kinetin، 2,4-D و TDZ بر جنین‌زایی سوماتیکی *Eucalyptus saligna*

سعیده قدیری سردرود[۱] و عباس قمری زارع[۲*]

۱- کارشناس ارشد، زیست‌شناسی علوم گیاهی، دانشگاه پیام نور، مرکز تحصیلات تکمیلی تهران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

پست‌الکرونیک: ghamari-zare@rifr-ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸

چکیده

گونه *Eucalyptus saligna* درختی است با خواص دارویی، چوب صنعتی و رشد سریع که برای جنگل‌کاری در ایران مناسب می‌باشد. با توجه به اهمیت فراوان توسعه جنگل‌کاری و مشکلاتی که در تکثیر اکالیپتوس‌ها به روش‌های معمول وجود دارد، روش‌های ریزازدیادی برای تولید نهال گونه‌ها و ارقام مرغوب آنها مورد توجه قرار گرفت. روش جنین‌زایی سوماتیکی برای اولین بار در تکثیر گونه *E. saligna* در این پژوهش به‌کار گرفته شد. چهار نوع ریزنمونه، ریشه، ساقه، برگ و هیپوکوتیل ناشی از گیاهچه‌های بذری رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت MS با ۱۳ تیمار هورمونی متفاوت برای جنین‌زایی سوماتیکی بررسی شدند. بهترین ریزنمونه ریشه و بهترین تیمار، تیمار حاوی ۲ mg/l 2,4-D و ۲ mg/l کینتین بودند. در کل نتایج جنین‌زایی سوماتیکی این پژوهش در مقایسه با سایر پژوهش‌های انجام شده بر روی اکالیپتوس‌ها مؤثرتر بود و کالوس‌های جنین‌زا به‌منظور رسیدن به مرحله بلوغ به ۳ تیمار محیط کشت MS حاوی ABA با غلظت‌های متفاوت منتقل شده و تیمار حاوی بیست ppm از ABA سه مرحله کروی، قلبی و اژدری را به وضوح نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس، جنین‌زایی سوماتیکی، ریزازدیادی، هیپوکوتیل و کالوس

مقدمه

ایران به لحاظ تنوع گونه‌های گیاهی و ذخایر ژنتیکی گیاهی در جهان ازجمله کشورهای کم‌نظیر و استثنایی می‌باشد. ولی در مقایسه با سایر نقاط دنیا به لحاظ پوشش جنگلی، جزو کشورهای با پوشش کم جنگل محسوب می‌گردد (Sagheb Talebi *et al*., 2005). بنابراین، به‌منظور غنی‌کردن ترکیب گونه‌های جنگل، جنگل‌کاری با مناسب‌ترین گونه‌های درختی بومی و غیربومی از اهمیت خاصی برخوردار است و اولین قدم، انتخاب مناسب‌ترین گونه می‌باشد. با توجه به سریع‌الرشد بودن، خواص دارویی و تولید چوب بالا در گونه‌های مختلف اکالیپتوس، این گونه‌ها ازجمله مواردی هستند که نه تنها در ایران بلکه در سرتاسر دنیا بر روی آنها سرمایه‌گذاری شده و در جنگل‌کاری‌ها از آنها استفاده می‌گردد. بنابراین، محققان درصدد برآمدند تا از طریق روش‌های گوناگون به تکثیر این گونه‌های مناسب بپردازند. اما از آنجایی که باززایی اکالیپتوس‌ها به‌طور طبیعی از طریق بذر موجب تنوع در نتایج آن می‌گردد، همچنین مشکلاتی نظیر ناسازگاری عمل پیوند و عدم ریشه‌زایی در قلمه‌ها به‌علت وجود مواد بازدارنده ریشه‌زایی در بافت‌های بالغ، پیش‌رو بود و به دلیل این که این گونه‌ها گیاهان چند ساله دگرگشن هستند و تلاقی بین گونه‌ای در بین آنها فراوان است که منجر به الگوهای پیچیده در تفرق نتایج می‌شود، روش کشت بافت انتخاب گردید. روش‌های گوناگون کشت بافت نسبت به

روش‌های سنتی ظرفیت تکثیر غیر جنسی بهتری را در محدوده وسیعی از گیاهان به دلیل کارآمدتر بودن توانایی باززایی بافت‌ها در شرایط درون شیشه نشان می‌دهند. علاوه بر این کشت بافت و سلول گیاهی ابزار مهمی برای مهندسی ژنتیک و مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی است (Assareh & Sardabi, 2007). این روش امکان تولید گیاه کامل را از یک سلول یا بافت جدا شده از هر اندام گیاهی و همچنین امکان تولید هزاران گیاهچه، مشابه گیاه مادری را در مدت زمان بسیار کوتاه و در فضای فیزیکی بسیار محدود، در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) فراهم ساخته است. با پیشرفت علم، روش‌های متنوع و کارآمدتری نیز از روش‌های قدیمی مشتق گردیدند، که یکی از فناوری‌های جدید، جنین‌زایی سوماتیکی می‌باشد. بنابراین، جنین‌زایی سوماتیکی تکنیک مؤثری است که در طی آن سلول‌های غیرجنسی یا پیکری، تحت شرایط خاص به جنین‌های سوماتیکی تمایز می‌یابند، و امکان تکثیر انبوه مواد ژنتیکی اصلاح شده و نگهداری تعداد زیادی ژنوتیپ در یک فضای محدود را که از طریق سایر روش‌های اصلاحی امکان‌پذیر نمی‌باشد، فراهم می‌سازد. در همین راستا محققانی مانند Bajaj (۱۹۹۵)، به نقل از پژوهشگران مختلف پدیده جنین‌زایی سوماتیکی را در بیش از ۳۰۰ گونه شامل محدوده وسیعی از گیاهان، ازجمله درختان، غلات، سبزی‌ها، میوه‌ها، گیاهان زینتی و دارویی گزارش نمود، که از میان این ۳۰۰ گونه ۱۵۰ مورد مربوط به بررسی جنین‌زایی در گونه‌های چوبی و هیبریدهای مربوط به آنهاست (Dunstan *et al*., 1995).

در تحقیقی Assareh (۱۹۹۸)، به‌منظور بهبود کشت بافت، باززایی، اندام‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی و ریزازدیادی به روش فتواتوتروفیک را در چند گونه اکالیپتوس گزارش نمود. همچنین Nugent و همکاران (2001)، نیز جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی مستقیم را توسط هورمون‌های IBA و 2,4-D بر روی گونه *E. globulus* گزارش نمودند. جنین‌زایی سوماتیکی بر روی گونه *E. nitens* به وسیله تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و انتقال کالوس‌ها به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP در محیط MS نیز انجام شد (Bandyopadhyay *et al*, 1999). گزارش‌هایی نیز در رابطه با تولید جنین سوماتیکی در گونه‌های *E. citriodora* (Muralidharan and Mascarenhas, 1995; Muralidharan and Mascarenhas, 1987)، *E. dunnii* (Watt *et al*., 1999) و *E. grandis* (Watt *et al*., 1999 and Watt *et al*., 1991) به ثبت رسیده است.

گونه *E. saligna* بومی استرالیا بوده و در استان‌های شمالی و جنوبی ایران به‌صورت دست‌کاشت سازگار گردیده و تمامی مزایای اکالیپتوس‌ها شامل مصارف صنعتی، دارویی و ... را دارد. با توجه به عدم وجود گزارشی مبنی بر تکثیر این گونه از طریق کشت بافت، در این پژوهش امکان تکثیر آن به روش جنین‌زایی سوماتیکی و تولید جنین‌های پیکری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

بذر گونه *E. saligna* از استان گیلان، رضوان‌شهر، نهالستان شاندرمن، مجاور جنگل‌های شفارود جمع‌آوری و برای ایجاد کالوس و جنین‌زایی استفاده گردید. محیط‌کشت MS نیز در بعضی از مواقع با تغییراتی در ترکیبات و غلظت‌های آن برای جنین‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. در اغلب موارد نیز یک یا چند تنظیم‌کننده رشد شامل غلظت‌های متفاوت از 2,4-D، TDZ و کینتین نیز به آن اضافه شد. در مجموع در این پژوهش ۱۳ تیمار هورمونی متفاوت در محیط MS به صورت نیمه‌جامد بکار رفت (جدول ۱). در ابتدا به منظور تولید کالوس و پیشبرد آن به سمت جنین‌زایی ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی، ساقه، ریشه و یا هیپوکوتیل، حاصل از گیاهچه‌های سه هفته‌ای عاری از آلودگی جدا شدند، و در محیط MS با ۱۳ تیمار هورمونی مختلف (جدول ۱) کشت گردیدند. یادداشت‌برداری ۱۰ روز پس از کشت آغاز شد و تا ۳ ماه ادامه یافت. کیفیت کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های اولیه از نظر تمایل آنها به جنین‌زایی ثبت شد (جدول ۳) و به‌منظور تبدیل صفات کیفی به صفات کمی جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری برای هر صفت مورد بررسی کدهایی مطابق با جدول ۳ در نظر گرفته شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید.

در ابتدا بذرها توسط آب و مایع ظرفشویی به‌مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد و پس از قرارگرفتن در آب جاری به مدت ۲ ساعت و بعد اتانول ۷۰ درصد (V/V) به مدت ۳۰ ثانیه پیش‌سترون شدند. بذرهای پیش‌سترون‌شده داخل

هود مخصوص کشت بافت توسط آب ژاول ۴۰ درصد (V/V) به مدت ۳۰ ثانیه و بعد کلرید جیوه ۰/۱ درصد (W/V) به مدت ۳۰ ثانیه سترون شدند و پس از سه مرتبه آبشویی به‌منظور تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی بذرهای سترون شده در زیر هود مخصوص کشت بافت در ویال‌های حاوی محیط کشت MS با نصف میزان نیترات کشت شدند (جهت کاهش آلودگی هر ریزنمونه داخل یک ویال مستقر گردید). به‌منظور تولید کالوس، ساقه، ریشه و برگ کوتیلدونی گیاهچه‌های حاصل قطعه‌قطعه شده و به‌عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS با ۱۳ تیمار هورمونی متفاوت جهت تولید کالوس مستقر گردیدند (جدول ۱). تعدادی از کالوس‌ها که جنین روی آنها تشکیل شده بود به محیط نیمه‌جامد همراه با ABA (۱۰ و یا ۲۰ ppm) منتقل شدند تا جنین‌ها به بلوغ برسند (جدول۲). در برخی موارد نیز کالوس‌ها از روی محیط کشت اولیه نیمه جامد به محیط کشت نیمه جامد دیگری با غلظت‌های متفاوت هورمونی به‌منظور بلوغ جنین‌ها منتقل گردیدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی محیط‌های کشت MS برای جنین‌زایی اندام‌های اولیه (مقادیر هورمون‌ها به mg/l است و کلیه محیط‌ها به صورت نیمه جامد می‌باشند)

تیمار	TDZ	2,4-D	کینتین	ABA	اسکوربیک اسید
۱	۰/۰۵	۰/۵	–	–	–
۲	۰/۰۵	۱	–	–	–
۳	۰/۰۵	۱/۵	–	–	–
۴	۰/۱	۱/۵	–	–	–
۵	۰/۱	۰/۵	–	–	–
۶	۰/۵	۰/۵	–	–	–
۷	۰/۵	۱	–	–	–
۸	۰/۵	۱/۵	–	–	–
۹	۰/۱	۱	–	–	–
۱۰	–	۲	۱	–	–
۱۱	–	۲	۲	–	–
۱۲	–	۲	۲	۲۰	–
۱۳	–	۲	۲	–	۱۰۰

جدول ۲- تیمارهای هورمونی محیط‌های کشت MS برای جنین‌زایی کالوس (مقادیر هورمون‌ها به mg/l است و کلیه محیط‌ها به صورت نیمه جامد می‌باشند)

تیمار	ABA	اسکوربیک اسید
۱۴	۲۰	۱۰۰
۱۵	۱۰	۱۰۰
۱۶	۲۰	–

ده روز پس از کاشت، یادداشت‌برداری آغاز شد و تا ۳ ماه ادامه یافت و کیفیت کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های اولیه از نظر تمایل آنها به جنین‌زایی و کیفیت کالوس ثبت و به‌منظور تبدیل صفات کیفی به صفات کمی جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری برای هر صفت یک کد در نظر گرفته شد (جدول ۳).

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

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

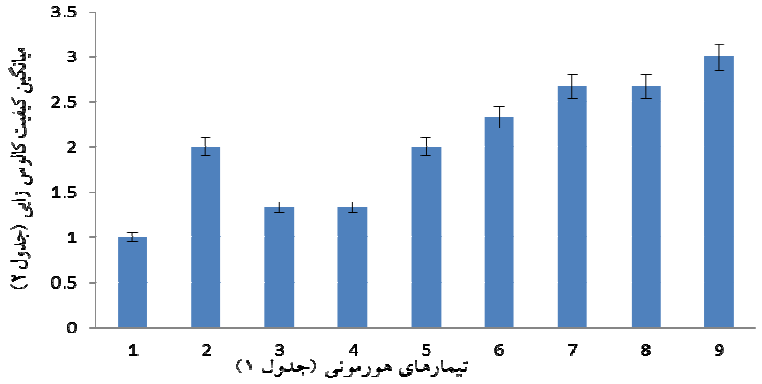
نتایج

تأثیر هورمون‌های TDZ و 2,4-D بر تولید کالوس‌های جنین‌زا

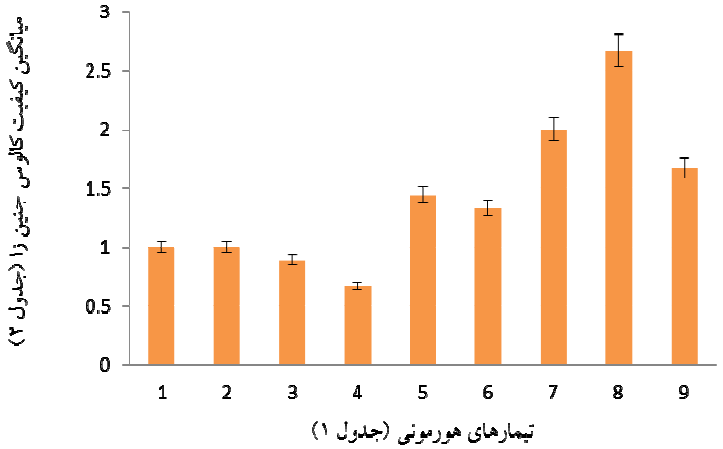
نه تیمار هورمونی مختلف TDZ و 2,4-D استفاده شده روی ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ حاصل از گیاهچه‌های عاری از آلودگی گونه *E. saligna* بیانگر اختلاف معنی‌داری برای کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا بود (جدول ۴). در مجموع تیمار هورمونی ۹ (TDZ: ۰/۱ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l) از نظر کالوس‌زایی (تولید کالوس‌های بزرگ و یکنواخت) و تیمار ۸ (TDZ: ۰/۵ mg/l، 2,4-D: ۱/۵ mg/l) از نظر تولید کالوس‌های جنین‌زا (کالوس‌های گلوبولار) بهترین تیمارها بودند (شکل‌های ۱ و ۲).

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا در گونه ***E. saligna*** با استفاده از ۹ تیمار هورمونی **TDZ** و **2,4-D**

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
کالوس‌زایی	۸	۱۷/۴۴**
تولید کالوس جنین‌زا	۸	۱۴/۲۲**



شکل۱- مقایسه تیمارهای هورمونی **TDZ** و **2,4-D** از نظر کیفیت کالوس در گونه ***E. saligna***



شکل ۲- مقایسه اثر تیمارهای هورمونی TDZ و 2,4-D بر جنین‌زایی کالوس در گونه *E. saligna*

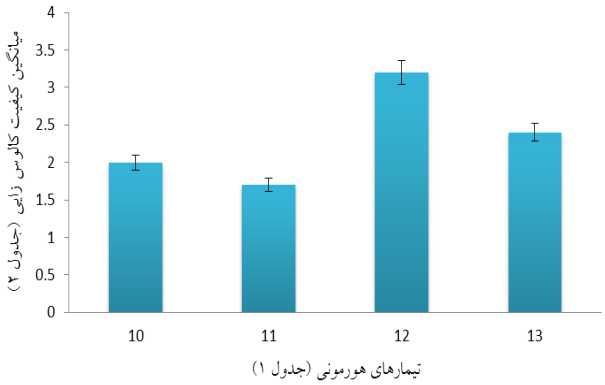
در مجموع با کیفیت‌ترین کالوس‌ها در ترکیب هم‌زمان TDZ و 2,4-D تولید شد (شکل ۱). حضور حداقل mg/l ۰/۱ از هورمون TDZ و افزایش میزان 2,4-D موجب بهبود کیفیت کالوس‌ها گردید (جدول ۱). مقایسه دو تیمار ۷ و ۸ (شکل ۲) نشان می‌دهد که افزایش 2,4-D تا میزان mg/l ۱/۵ با پیشبرد کالوس‌ها به سمت جنین‌زایی همراه بود.

تأثیر هورمون‌های کینتین و 2,4-D بر تولید کالوس جنین‌زا

میانگین مربعات دو صفت کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا پس از گذشت سه ماه در گونه *E. saligna* بیانگر اختلاف بسیار معنی‌دار (P ≤۰/۰۱) چهار تیمار هورمونی مختلف از کینتین و 2,4-D در هر دو صفت بود (جدول ۵).

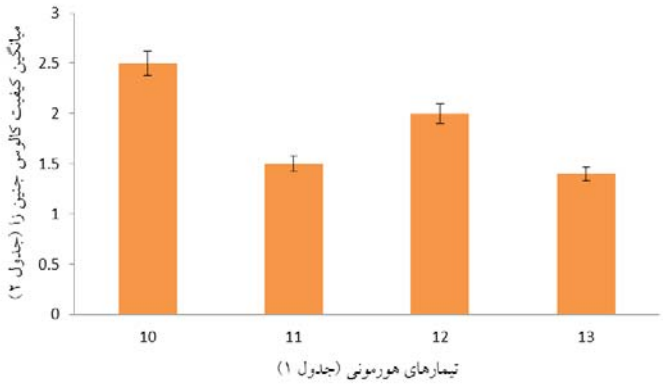
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر ۴ تیمار هورمونی کینتین و 2,4-D بر کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا در *E. saligna*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
میانگین کیفیت کالوس‌زایی	۳	۱۶/۹**
میانگین کیفیت تولید کالوس جنین‌زا	۳	۱۰/۲۶**



شکل ۳- مقایسه تیمارهای هورمونی کینتین و 2,4-D از نظر کیفیت کالوس در گونه *E. saligna*

در مقایسه میانگین دو صفت کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در ۴ تیمار هورمونی 2,4-D و کینتین در گونه *E. salinag* (جدول ۱) تیمار هورمونی ۱۲ (Kin: ۲ mg/l، 2,4-D: ۲ mg/l) و ABA) از نظر کالوس‌زایی به‌عنوان بهترین تیمار شناسایی گردید (شکل ۳). همچنین بهترین نتیجه جنین‌زایی از کالوس از تیمار ۱۰ (Kin: ۱ mg/l، 2,4-D: ۲mg/l) به‌دست آمد (شکل ۴).

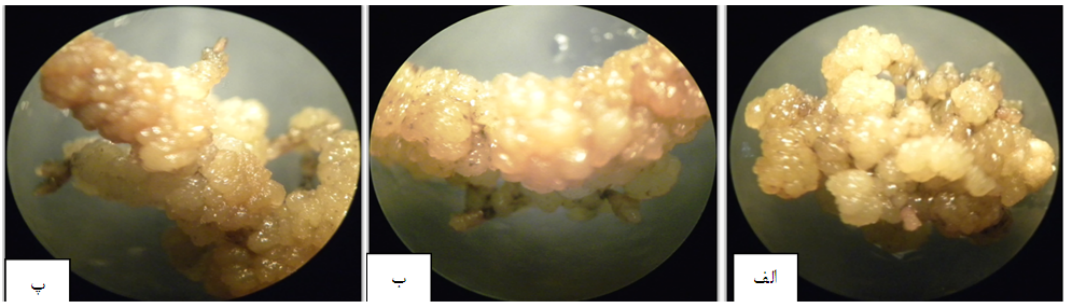


شکل ۴- مقایسه تیمارهای هورمونی کینتین و 2,4-D از نظر تولید کالوس‌های جنین زا در گونه *E. saligna*

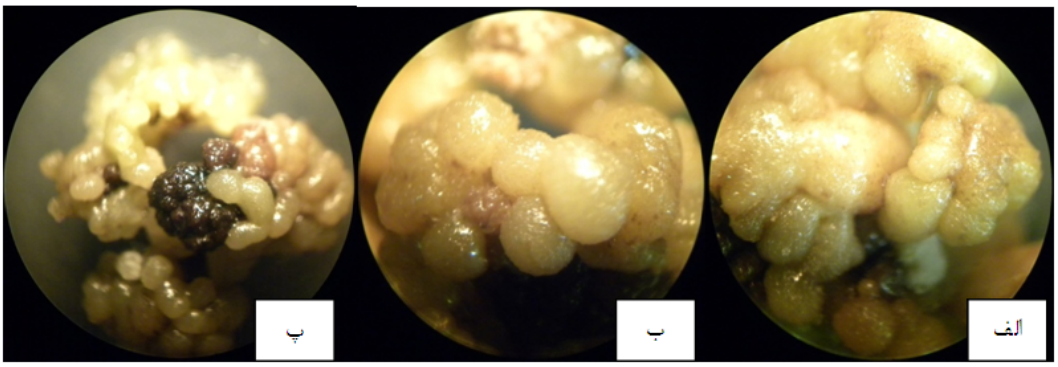
در مقایسه ۴ تیمار هورمونی مختلف از 2,4-D و کینتین (جدول ۱)، کیفیت کالوس‌های حاصل از چهار تیمار به خصوص در زمینه تولید کالوس‌های گلوبولار و جنین‌زا، از کالوس‌های حاصل از تیمارهای 2,4-D و TDZ نیز بهتر بود.

بهترین تیمار کالوس‌زایی، تیمار ۱۲ بود که حاوی ۲ mg/l، کینتین و ۲ mg/l، 2,4-D به همراه ABA بود (شکل ۳). از آنجایی که در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه نیز تیمارهای ۱۰ و ۱۲ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۱)، نقش 2,4-D در تولید کالوس‌های گلوبولار با کیفیت بسیار مناسب بیشتر از کینتین بود، زیرا تیمار ۱۰ حاوی ۱ mg/l، کینتین و تیمار ۱۲ حاوی ۲ mg/l، کینتین بودند.

در مورد تولید کالوس‌های جنین‌زا و در مقایسه به‌طور کلی تیمارهای ۱۰ و ۱۲ نشان دادند که 2,4-D نقش بیشتری از کینتین در تولید کالوس‌های جنین‌زا داشت (شکل ۴). از آنجایی که نتایج حاصل از کشت ریزنمونه‌های ریشه و هیپوکوتیل در گونه *E. saligna* در تیمار ۱۲ (۲ mg/l Kin:، 2,4-D: ۲mg/l و ABA) از نظر کیفیت کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا بسیار مطلوب و قابل توجه بود. کالوس‌های مربوط به تیمار ۱۰ (Kin: ۱ mg/l، ۲ mg/l 2,4-D:) پس از ۳ هفته به محیط کشت ۱۲ (Kin: ۲mg/l، 2,4-D: ۲mg/l) منتقل شدند (شکل ۵). همچنین، تعدادی از آنها نیز به‌منظور تکامل و رشد بیشتر به محیط کشت ۱۶(ABA: ۲۰ ppm) (جدول ۲) انتقال یافتند. و پس از گذشت ۳ هفته سه مرحله‌ی کروی، قلبی و اژدری جنین‌ها در کالوس‌های گلوبولار پدیدار شدند (شکل ۶).



شکل ۵- مراحل رشد و نمو کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ریشه در تیمار ۱۲ (Kin: ۲، 2,4-D: ۲ و ABA) در گونه *E. saligna* ۴ هفته پس از انتقال (الف)، ۵ هفته پس از انتقال (ب)، ۶ هفته پس از انتقال (پ)



شکل ۶- مراحل رشد و نمو کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ریشه پس از انتقال از تیمار ۱۲ (Kin: ۲، 2,4-D: ۲ و ABA:۲۰ ppm) به تیمار ۱۶ (ABA:۲۰ ppm) در گونه *E. saligna* ۳ هفته پس از انتقال (الف)، ۴ هفته پس از انتقال (ب)، ۵ هفته پس از انتقال (پ)

بحث

بررسی اثر ۹ تیمار هورمونی در محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوت TDZ و 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیکی در ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی، ریشه و ساقه (جدول ۱) نشان داد که حضور TDZ و 2,4-D در کنار یکدیگر سبب تشکیل باکیفیت‌ترین کالوس‌های گلوبولار و جنین‌زا شد. این نتیجه با نظر Kumar (1999)، مبنی بر این که 2,4-D به‌عنوان یک اکسین مصنوعی در کشت بافت و نگهداری کالوس حاصل از کشت بافت مفید می‌باشد، هم‌سو بود. در این مورد Gupta و همکاران (1983) نیز نشان دادند که گونه‌های مختلف اکالیپتوس، نیازهای متفاوتی به اکسین‌ها دارند که منطبق بر یافته‌های این پژوهش مبنی بر استفاده از اکسین در دو ترکیب هورمونی و عدم حذف آن بود. همچنین De Klerk (2006) در مورد طبقه‌بندی و نقش اکسین‌ها در کشت بافت گیاهان، این گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد را به دو دسته شامل اکسین‌های طبیعی مثل IAA و اکسین‌های مصنوعی مثل NAA و 2,4-D، تقسیم کرده و بیان داشت که در کشت بافت، اکسین‌ها عامل اصلی در تشکیل سلول‌های مریستمی از ریشه‌های نابجا، تقسیم سلولی، تشکیل و رشد کالوس، مهارکننده رشد جوانه‌های جانبی و مهارکننده رشد شاخه می‌باشند و همچنین یکی از نقش‌های اکسین‌ها به خصوص 2,4-D را القای جنین‌زایی سوماتیکی در کشت بافت برشمرد که کاملا منطبق بر یافته‌های این پژوهش بود. زیرا در حضور حداقل میزان کینتین و یا سیتوکینین افزایش غلظت 2,4-D با پیشبرد کالوس‌ها به سمت جنین‌زایی همراه بود. در همین راستا Yeung (۱۹۹۵) نیز اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها را مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی معرفی کرد که تمایز و تقسیم سلولی را تنظیم می‌کنند. وی همچنین اثرات استعمال اکسین خارجی به‌ویژه 2,4-D بر القاء جنین‌زایی سوماتیکی را نیز به‌خوبی استناد کرد. نتایج حاصل از ۹ تیمار در گونه *E. saligna* نیز حکایت از این داشت که در حضور حداقل ۰/۱ mg/l از TDZ افزایش میزان 2,4-D با بهبود کیفیت کالوس‌های گلوبولار همراه بود و حتی بالا رفتن میزان 2,4-D تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر نیز موجب بهتر شدن کیفیت کالوس‌ها و پیشبرد آنها به سمت جنین‌زایی سوماتیکی گردید. به صورت کلی نیز بهترین تیمار که سبب تولید کالوس‌های جنین‌زا شد، تیمار هورمونی شامل (TDZ: ۰/۱ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l) بود. نتایج مطالعات Assareh (1998) در مورد جنین‌زایی سوماتیکی در *E. sargenti* تقریبا هم‌سو با نتایج این پژوهش بود. وی از محیط کشت B5 همراه با ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌عنوان محیط کشت اولیه و دو ریزنمونه لپه‌ای و هیپوکوتیل استفاده کرد و در میان کلیه تیمارها، جنین‌های اولیه سوماتیکی، از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت اولیه حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و پس از انتقال به محیط کشت ثانویه حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تمایز یافتند. اما با توجه به این که غلظت پیشنهادی هورمون‌ها در زمینه جنین‌زایی در دو پژوهش یکسان بود و تفاوت در نوع گونه، نوع ریزنمونه و محیط کشت پایه بود، همچنین کالوس‌ها به محیط کشت ثانویه منتقل نشدند،

بنابراین این امر نیازمند مطالعه بیشتری است. اما Assareh (1998) در مطالعاتی که بر روی عوامل مؤثر بر تولید جنین‌های پیکری در *E. viminalis* انجام داد، تشکیل کالوس بعد از گذشت چهار هفته و در محیط کشت اولیه همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و 2,4-D را مشاهده کرد. ولی او حتی پس از انتقال کالوس‌ها به محیط کشت ثانویه حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نیز موفق به تولید کالوس‌های جنین‌زا نشد که این اختلاف با یافته‌های این پژوهش می‌تواند ناشی از یکسان نبودن گونه مورد بررسی باشد. در ضمن Assareh (1998) در مورد *E. microtheca* نیز نتایجی کاملا مغایر با نتایج این پژوهش به‌دست آورد و هیچ رشد کالوسی در محیط کشت حاوی TDZ و 2,4-D مشاهده نکرد. نتایجی که در مطالعه بر روی *E.viminalis* و *E. microtheca* توسط وی حاصل شد. با نتایج Nugent و Chandler (۲۰۰۱)، که بیان داشتند 2,4-D و سایر اکسین‌های سنتتیک در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در کشت بافت هیچ نتیجه‌ای ندارند کاملا هم‌سو بود اما با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش بر روی *E. saligna* در زمینه تولید کالوس‌های جنین‌زا مغایرت داشت که امکان دارد این امر به علت متفاوت بودن نوع گونه و ریزنمونه و یا اختلاف در غلظت‌های بکاررفته از دو تنظیم‌کننده رشد باشد. در مطالعاتی که بر روی جنین‌زایی سوماتیکی در گونه‌های درختی انجام شد، Bates و همکاران (1992) و Preece و همکاران (1987,1989) نیز جنین‌های سوماتیکی را از بذرهای بالغ و نارس زبان‌گنجشک سفید در محیط کشت اولیه MS حاوی ۱۰ میکرومول 2,4-D و ۰/۱ تا ۱ میکرومول در لیتر TDZ به‌دست آوردند. با توجه به نظر De Klerk (۲۰۰۶)، مبنی بر نقش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در تشکیل و رشد کالوس در کشت بافت و به خصوص نقش 2,4-D در القای جنین‌زایی سوماتیکی و نتایج به‌دست آمده در این پژوهش و سایر پژوهش‌های انجام شده بر روی چندین گونه از اکالیپتوس و سایر گونه‌های درختی، به نظر می‌رسد این دو گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس و پیشبرد آن به سمت جنین‌زایی مؤثر باشند، ولی به‌علت مغایرت این نتایج با برخی از مشاهدات در چند گونه اکالیپتوس، مطالعه و بررسی نقش این دو گروه از تنظیم‌کننده‌ها در تولید کالوس به خصوص کالوس‌های جنین‌زا ضروری به‌نظر می‌رسد. در این پژوهش بهترین ترکیب هورمون‌های 2,4-D و کینتین، تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود، و به‌عنوان محیط کشت اولیه در نظر گرفته شد و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه در آنها کشت گردید (جدول ۱). پس از گذشت حدود ۳۰ روز کالوس‌های گلوبولار کوچک تولید شد. بنابراین محیط کشت تعدادی از آنها تعویض شد، به این‌صورت که کالوس‌های حاصل از محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین به محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین منتقل شد که نتایج حکایت از تشکیل کالوس‌های بسیار گلوبولار با کیفیت بسیار مناسب و زوائد شبه جنینی داشت (شکل ۶). سابقه مطالعه کمی بر روی تیمارهای حاوی 2,4-D و کینتین در حال حاضر بر روی اکالیپتوس موجود است که این موضوع اهمیت مطالعات بیشتر در مورد ترکیب کینتین با سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها را در زمینه جنین‌زایی سوماتیکی در اکالیپتوس‌ها آشکار می‌سازد.

نکته حائز اهمیت در این پژوهش این است که تولید کالوس‌های گلوبولار با کیفیت بسیار مناسب از تیمارهای حاوی کینتین هنگامی حاصل شد که از این تیمارها به‌عنوان تیمارهای ثانویه استفاده گردید. بهترین نتیجه نیز در حضور ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین از ریزنمونه‌های ریشه و هیپوکوتیل حاصل شد که ریزنمونه‌های ریشه نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در تولید کالوس‌های گلوبولار برتری داشتند. با توجه به متفاوت‌بودن نوع ریزنمونه و غلظت هورمون‌های بکار رفته در محیط کشت نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده و همچنین به‌دست آمدن نتایج مطلوب در تولید کالوس‌های گلوبولار و جنین‌زا از تیمارهای حاوی کینتین هنگامی که از آنها به‌عنوان محیط کشت‌های ثانویه استفاده شد، اظهارنظر در مورد نقش کینتین به تنهایی و یا به صورت ترکیبی با سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در تولید کالوس‌های جنین‌زا و جنین‌زایی سوماتیکی اکالیپتوس نیازمند مطالعات بیشتر و گسترده‌تری است.

بنابراین به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در گونه *E. saligna* بهترین ریزنمونه مورد استفاده، ریشه و بهترین تیمار، تیمار ۱۲ یعنی محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l، 2,4-D و ۲ mg/l، کینتین بود (جدول ۱). به‌طوری‌که به خصوص پس از انتقال کالوس‌ها به محیط کشت نیمه

جامد حاوی ABA نتایج قابل قبول‌تری مشاهده شد (جدول ۲).

منابع مورد استفاده

- Assareh, M.H., 1998. Introduction of a novel micropropagation method in *Eucalyptus* through photoautotrophic conditions. The second international conference for agricultrophic and natural resources. Moscow Timirazev Agriculture Academy, Feb. 1-2, 2001, Moscow, Russia, pp. 201-205.
- Assareh, M.H. and Sardabi, H., 2007. *Eucalyptus*, Description, Illustration and Propagation by Advanced Technique, Research Institute of Forests and Rangeland Publication, Tehran, Iran, 672 P.
- Bajaj, Y.P.S., 1995. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed. Vol. I, 30, Spring-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 472 p.
- Bandyopadhyay S., Cane K., Rasmussen G., Hamill J.D., 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species, *Eucalyptus nitens* and *E. globules*. Plant Science, 140: 189-198.
- Bates, S., Preece, J. E., Navarrete, N.E., Van-Sambeek, J. W. and Gaffiney, G. R., 1992. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in White ash (*Fraxinus Americana* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31: 21-29.
- Dunstan, K.J., Taytours, T.E., and Thorpe, T.A., 1995. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *In vitro* Embryogenesis in Plants. (Thorpe, T.A., ed.), Kluwar Academic Publishers, Amsterdam, 471-538.
- De Klerk, G.J., 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemicals: 17-25.
- Gupta, P.P., 1983. Microspore-derived haploid, diploid and triploid plants in *Petunia violaceae* Lindl. Plant Cell Reports, 2: 255-256.
- Kumar, U.K., 1999. Methods in Plant Tissue Culture. Agro Botanica, Bikanes, India.
- Muralidharan E.M., and Mascarenhas A.F., 1987. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. Plant Cell Reports, 6: 256-259.
- Muralidharan E.M., and Mascarenhas A.F., 1995. Somatic Embryogenesis in Eucalyptus. In: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds) Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 2 Kluwer, Dordrecht: 23-40.
- Nugent, G. and Chandler, S.F., 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 85-88.
- Preece, J.E., Zhao, J. and Khung, F.H., 1987. *In vitro* callus production and somatic embryogenesis of ash (*Fraxinus*). Hort. Science, 22: 675p.
- Preece, J.E., Zhao, J. and Khung, F.H., 1989. Callus production and somatic embryogenesis of ash (*Fraxinus americana* L.). Hort. Science, 24: 377-380.
- Sagheb-Talebi, Kh., Sajedi, T. and Yazdian, F., 2005. Forest of Iran. Research Institute of Forest and Rangelands, pp. 1-28.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. and Smith, J., 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. American Journal of Botany, 45:693-703.
- Watt M.P., Blakeway F., Cresswell C.F., and Hrman B., 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. South African Forestry Journal, 157: 59-65.
- Watt, M.P., Blakeway, F.C., Termignoni, F.C. and Jain, S.M., 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In Somatic Embryogenesis in Woody Plants (eds. Jain, S.M., Gupta, P.K. and Newton, R.J.), Kluwer, Dordrecht, vol. 5:63– 78.
- Yeung, E.C., 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A., (ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwar Academic Publishers, Dordrecht: 205-248.

Effects of kinetin, 2, 4-D and TDZ on somatic embryogenesis of *Eucalyptus saligna*

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

1- M.Sc., Plant Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R.Iran.
2*-Corresponding author, Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R. Iran.
Email: ghamari-zare@rifr-ac.ir

Received: 28.12. 2013 Accepted: 09.03. 2014

Abstract

Eucalyptus saligna with several characteristics such as medicinal and industrial uses and fast growing feature could be considered as an appropriate case to be used in countries with low forest covers such as Iran. Although reforestation by *Eucalyptus* species is very important, but production difficulties by conventional methods, caused *in vitro* culture methods to be considerable. Somatic embryogenesis is an effective tool for reforestation with improved tree species. The method is more economical than other cloning methods. Somatic embryogenesis on *E. saligna* was studied in this work, for the first time. Four kinds of explants, root, stems, leaves and hypocotyls of seedlings, were grown at *in vitro* conditions on MS medium with 13 hormone treatments. The best explants was root and the best hormone treatment was 2 mg/l kinetin with 2 mg/l 2,4-D. In general, the somatic embryogenesis results of this study were more effective than previous studies on *Eucalyptus* species. The embryogenic calluses were transferred to three MS mediums supplemented with different ABA concentrations to reach to maturation. Treatment with 20 mg/l ABA showed three stages of globular, heart shape and torpedo.

Key word: *Eucalyptus saligna*, Somatic embryogenesis, Micropropagation, Hypocotyl and Callus.