دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۲۳-۳۱۳ (۱۳۸۸)

جنین‌زایی بدنی در دو گونه از اکالیپتوس (*Eucalyptus. microcarpa* و *E. melliodora*)

زهرا وطن‌پور[۱*]، محمدحسن عصاره،[۲] عباس قمری‌زارع[۳] و خدیجه کیارستمی[٤]

۱- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، دانشگاه الزهراء، تهران. پست الکترونیک: zahravatanpour@yahoo.com
۲- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.
۳- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.
٤- استادیار، دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهراء، تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۲/٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

با نمونه‌گیری از نهال‌های دو گونه مهم اکالیپتوس به نام‌های *Eucalyptus melliodora* و *E. microcarpa* یک روش تکثیر مطمئن برای باززایش گیاه در شرایط درون شیشه‌ای بدست آمد. کالوس‌هایی با باززایش بالا از نمونه‌های لپه و زیرلپه از هر دو گونه (لپه و محور زیرلپه در گونه *E. melliodora* به‌ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۳۰ و در گونه *E. microcarpa* به‌ترتیب ۰/٤۲ و ۰/۳۸) پس از کشت بر روی محیط غذایی MS با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر شکر، ٦/۸ گرم در لیتر آگار، ۰/۱ میلی‌گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. در بعضی مراحل، باززایش مستقیم شاخه بدون عبور از مرحله کالوس در هر گونه اتفاق افتاد. در این موارد گاهی جنین‌های بدنی از سطح کالوس‌های اندامی مشاهده شدند. شاخه‌های باززایش شده از هر دو گونه قابلیت تولید ریشه را روی محیط MS تغییر یافته عاری از تنظیم کننده‌های رشد داشتند و گیاهچه‌ها با موفقیت ۳۵ درصدی به خاک منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس، *Eucalyptus melliodora*، *E. microcarpa*، جنین‌زایی بدنی و باززایی.

مقدمه

گونه‌های مختلف اکالیپتوس یک منبع عمده الوار برای تولید کاغذ و اسانس حاصل از برگ هستند (Eldridge *et al.*, 1994). با توجه به چرخه طولانی مدت پرورش گونه‌های جنگلی، دستکاری ژنتیکی ابزار ارزشمندی جهت افزایش رشد، توانایی ریشه‌دهی و کیفیت محصول یا مقاومت به امراض است (Peacock *et al.*, 1995). چنین برنامه‌هایی نیازمند به‌کارگیری روند گیاهان باززایی شده به دو طریق می‌باشد ۱- باززایی که منجر به تمایز شاخه و بعد تشکیل ریشه می‌شود ۲- باززایی از طریق جنین‌زایی بدنی با جوانه‌زنی و نمو گیاهک‌های درون شیشه.

اندام‌زایی منجر به تشکیل شاخه نابجا (Mullins Lakshima-Sita & Shbha Rani, 1985 *et al*., 1995;) یا جنین‌های غیرجنسی برای چند گونه از اکالیپتوس (Watt *et al*., 1991; Muralidharan & Mascarenhas, 1989; Muralidharan & Mascarenhas, 1987). گزارش شده است اولین جنین‌زایی بدنی در اکالیپتوس در مورد گونه *E. citriodora* از جنین‌های مشابه حاصل از کالوس‌هایی با ساختمان دانه‌ای گزارش شده است (Lakshima–Sita, 1993). به‌طوری‌که در سال ۱۹۹٦ همین محقق جنین‌زایی بدنی در کالوس مشتق از شاخه‌های درختان ٤ ساله *E. grandis* را در محیط MS با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش نموده است (نقل از Assareh، 2000).

بنابراین انگیزش جنین‌های بدنی در گونه *E. dunnii* در محیط MS با ۵/۵ تا ۱٦/۵ میکرومول NAA به تنهایی یا مخلوط با 2,4-D (٤/۵ میکرومول) انجام شد (Assareh، 2000). هدف اصلی از این مطالعه که برای اولین بار در مورد دو گونه *E. microcarpa* و *E. melliodora* انجام شد تولید جنین‌های بدنی از طریق باززایی از کالوس بود. لازم به تذکر است که از این روش در تکثیر بسیاری از گونه‌های دیگر جنگلی در کشور استفاده شده است (Emam *et al*. 2007 و Sadat *et al*. 2007).

مواد و روشها

برای کشت کالوس ابتدا بذر گونه‌های *E. microcarpa* و *E. melliodora* از پایه‌های دوازده ساله واقع در شمال خوزستان (عرض جغرافیایی '۱٦ °۳۲ شمالی و طول جغرافیایی'٤۸ °۲۵ شرقی با میانگین دمای روزانه ۲۷ درجه سانتی‌گراد و نوع خاک شنی لومی) جمع‌آوری شدند. سطح بذرها پس از شستشو با آب جاری به مدت یک ساعت با هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ سترون و بعد با آب‌مقطر دو بار سترون شدن ۳ بار شسته شدند. سپس به محیط MS بدون تنظیم کننده رشد حاوی ساکارز (۳٪) و آگار (٦/۸٪) و pH=۵/۸ که به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده بودند، انتقال یافتند. لپه‌ها و محور زیرلپه (٤ هفته‌ای) جدا گردیده و به‌عنوان منبع ریزنمونه برای القاء کالوس و باززایی گیاهک‌ها بکار رفتند. به‌منظور تعیین شرایط بهینه تشکیل کالوس با باززایی بعدی گیاه، ۵ تا ۷ ریزنمونه از محورهای زیر لپه به‌طور افقی روی محیط‌کشت قرار گرفتند. مدتی بعد از تشکیل کالوس، ریزنمونه‌ها به ظروف بزرگتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتقال یافتند. این محیط با اکسین‌های NAA و 2,4-D با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، سیتوکنین‌های BAP به غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر انتقال یافتند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. هر تیمار شامل ۵ تکرار و هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه بود.

همه نمونه‌های کشت شده به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. سطح برخی از کالوس‌های بدست آمده به علت سنتز آنتوسیانین قرمز رنگ شد. بنابراین شش تا هشت هفته بعد از کشت، قطعات بافت کالوس که خوب رشد کرده بودند به محیط القاء شاخه انتقال یافتند. محیط القاء شاخه‌زایی شامل تیمارهای هورمونی NAA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، BAP

(۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ (۰/۰۱ میلی‌گرم درلیتر) بود. سایر شرایط مانند موارد ذکر شده در بالا بود و همه آزمایش‌ها حداقل دو بار تکرار شدند.

از شاخه‌های تکثیر یافته فوق قطعاتی به طول ۳-۲ سانتی‌متر جدا و به محیط MS حاوی ساکارز (۳٪)، آگار (۶/۸٪) و NAA (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌منظور القاء ریشه‌زایی انتقال یافتند. بعد از ۳ تا ٤ هفته زمانی که ریشه‌ها تشکیل شدند گیاهان به مخلوطی از پیت، پرلیت و ماسه با نسبت ۱:۱:۱ سترون انتقال یافتند.

به‌منظور اطمینان از رویان‌زا بودن کالوس‌های دانه‌ای حاصل از کشت محور زیر لپه و لپه هر دو گونه از روش برش‌گیری میکروسکوپی استفاده شد. برای انجام این عمل، کالوس‌های رویان‌زا به مدت ۲٤-۱٦ ساعت در تثبیت‌کننده اتانل ۱۰۰ درجه، فرمالدئید و اسید استیک به نسبت: ۹۰ :۵:۵ تثبیت شدند و به مدت ۲٤-۱٦ ساعت در آب جاری قرار گرفتند. به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای قالب‌گیری مراحل زیر انجام شد. الکل ۲۵، ۵۰ و ۷۰ درصد هر کدام نیم ساعت، الکل ۹۰ و ۹٦ درصد هر کدام یک ساعت بعد الکل مطلق ۱۰۰٪ دو بار، هر کدام یک ساعت، گزیلول – الکل (۱:۱) نیم ساعت، گزیلول خالص نیم ساعت، گزیلول – پارافین (۱:۱) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت و پارافین ۳ بار و هر بار یک ساعت. از نمونه‌ها پس از قالب‌گیری، برش‌های ۸ میکرونی تهیه و پس از گسترش برش‌ها روی لام، مرحله پارافین‌زدایی و رنگ‌آمیزی به‌ترتیب زیر انجام شد. گزیلول ۱۰ دقیقه، الکل ۹٦، ۹۰، ۷۰، ۵۰ و ۲۵ درصد هر کدام دو دقیقه، شستشو با آب‌مقطر، قراردادن نمونه‌ها در هماتوکسیلین نیم ساعت، شستشو با آب‌مقطر، عبور از تمایزدهنده هماتوکسیلین (الکل ۷۰٪)، رنگ‌آمیزی با قرمز کنگو ۱٪ آبی ۱۵ دقیقه، شستشو با آب‌مقطر، عبور از الکل ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹٦ درصد و گزیلول و آنگاه لام دائمی تهیه شد.

نتایج

نتایج اولیه آزمایشها نشان داد که در برخی از تیمارها، شاخه‌زایی مستقیم و بدون تشکیل کالوس صورت گرفت (شکل ۱). به دنبال انتقال لپه‌های هر دو گونه به محیط القاء کالوس، تشکیل کالوس در برخی از تیمارها بعد از دو هفته آغاز شد. کالوس‌ها به‌طور عمده در لبه لپه‌ها تشکیل و به تدریج به بخش‌های دیگر ریزنمونه گسترش یافتند. معمولا کالوس‌ها کرمی یا سبز با ظاهر دانه‌ای یا صاف و نرم یا سفت بودند (شکل ۲).

بدین ترتیب در محور زیرلپه دو گونه بعد از ۲ تا ۳ هفته تشکیل کالوس در دو انتهای قسمت‌های بریده شده آغاز شد. در بیشتر موارد کل ریزنمونه قبل از تشکیل کالوس متورم می‌شد. به‌طوری‌که کالوس‌های مشتق از محور زیر لپه نیز به‌طور عمده کرمی و سبز با ظاهر دانه‌ای یا صاف و نرم یا سفت بودند و این کالوس‌ها نیز مانند کالوس‌های حاصل از لپه‌ها در برخی موارد رنگدانه‌های آنتوسیانینی سنتز می‌کردند.

در لپه و محور زیرلپه هر دو گونه *E. microcarpa* و *E. melliodora*، بیشترین میزان کالوس از محیط حاوی BAP(۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. سه تا چهار هفته پس از کشت در قسمت بریده شده انتهائی محور زیرلپه تشکیل شد (شکل ۳). لپه‌ها تکثیر شاخه بعد از ۳ تا ٤

هفته بعد از انتقال بافتها به محیط باززایی اتفاق افتاد. در طول این مدت بافتها به تدریج متراکم و دانه‌ای شدند. در مورد شاخص‌ها (شاخه‌زایی و وزن تر اندام هوایی) و تعداد جوانه، به‌ترتیب پاسخ‌های برتر از تیمارهای هورمونی TDZ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد (جدول ۱). در هر دو گونه ۱۰ تا ۱۱ باززایی در هر لپه مشاهده شد و زمانی که نمونه‌های باززایی شده هر دو نوع ریزنمونه حدود ۰/۵ سانتی‌متر شدند به ظروف بزرگتر انتقال یافتند.

به‌منظور تشکیل ریشه، قطعه‌هایی از شاخه به طول ۲-۱ سانتی‌متر جدا و در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف اکسین انتقال یافتند. بعد از ۲ هفته بیشتر شاخه‌های حاصل از هر دو نوع ریزنمونه ریشه‌دار شدند. *E. melliodora* نسبت به *E. microcarpa* پاسخ مطلوب‌تری را نسبت به تمامی تیمارهای هورمونی مذکور نشان داد (شکل ۱). به‌طوری‌که شاخه‌های ریشه‌دار شده هر دو گونه به خاک منتقل و به تدریج به شرایط گلخانه و بعد به مزرعه سازگار گردیدند.

بنابراین کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی BAP (۰/۱میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) هر دو گونه مشکوک به رویان‌زایی بودند (شکل ٤). این ساختارهای جنین مانند از کالوس‌های متراکم سخت با سلول‌های تخم‌مرغی یا کروی یکسان تشکیل شده بودند. دو هفته پس از تشکیل کالوس اجتماعات سلولی تشکیل شدند و با انتقال رویان‌های بدنی کروی به محیط عاری از هورمون، سایر مراحل نمو رویان طی شد و بیشتر رویان‌های بدنی جوانه زده و لپه‌هایی به رنگ سبز روشن و ریشه را در یک زمان تشکیل دادند (شکل ۵). به‌منظور اطمینان از رویان‌زا بودن کالوس، از کالوس‌های مزبور برشهای میکروسکوپی تهیه شد. این برشها مؤید رویان‌زا بودن کالوس‌های مورد نظر بود (شکل ٦). رویان‌های بدنی جوانه‌زده که ظاهری طبیعی داشتند به‌طور موفقیت‌آمیزی در خاک سازگار شده و گیاهان حاصل از رشد رویان برای مدت طولانی در گلخانه نگهداری شدند (شکل ۷).

بحث

مقایسه اثر تیمارهای هورمونی BAP (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نیز تیمارهای هورمونی TDZ (۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در رویان‌زایی بدنی موجب شد که تیمار هورمونی دوم ایجاد رویان نکرد و با کاهش سطح 2,4-D و BAP تشکیل کالوس رویان‌زا بدهد و میزان کالوس افزایش یافت. علت احتمالی این امر انباشته شدن اکسین در انتهای قسمت بریده شده است (Marks & Simpson, 1994).

در تیمارهای هورمونی BAP با 2,4-D در تمام غلظت‌ها، کالوس رویان‌زا تولید کرد. درصورتی‌که عصاره (۱۳۷۹) بر روی *E. camaldulensis* با (۰/۲۵TDZ میلی‌گرم در لیتر) و NAA) (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم درلیتر) چنین نتیجه‌ای را بدست آورد. این امر را می‌توان به متفاوت بودن شرایط محیطی و فیزیولوژیکی گیاه یا متفاوت بودن سطح درونی هورمون‌های گیاه نسبت داد. این نتایج با یافته‌های Panaia و همکاران (2004)، بر روی Restionaceae و

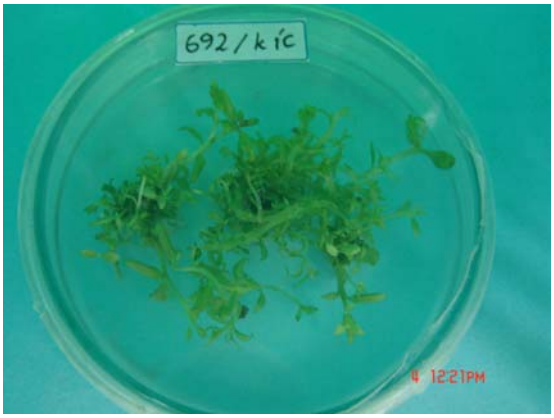
نیز Pesce و Rugini (2004) بر روی (*Prunus avium* × *P. Pseudocerasus*) و Loiseaue و همکاران (1995)، Newman و همکاران (1996) و نیز Zaffari و همکاران (2000) در گوجه فرنگی، نخود فرنگی و موز مطابقت دارد. بیشترین میزان کالوس‌های رویان‌زا از لپه‌ها در قیاس با محور زیرلپه‌ها بدست آمد. این یافته‌ها مغایر با نتایج Trindade و Pais (2003) و عصاره (۱۳۷۹) بود.

بررسی داده‌های حاصل از شاخه‌زایی کالوس‌ها در دو گونه *E. microcarpa* و *E. melliodora* نشان داد که تیمار TDZ(۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۰/۵میلی‌گرم در لیتر) شاخه‌زایی خوبی ایجاد کرده شاخه‌ها از نظر کیفی قویتر و شاداب‌تر بودند و با دو تیمار هورمونی دیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند. Velteheva و Svetleva (2005) بر روی گیاه لوبیا(*Phaseoleus vulgaris*) نتیجه مشابهی را بدست آوردند. در دو تیمار هورمونی دیگر با افزایش غلظت BAP و NAA میزان شاخه‌زایی افزایش یافت. این نتایج با یافته‌های Rahman Khan و همکاران (2002)، Ndoye و همکاران (2003)، Bennet و همکاران (1994) و Sharma و Rammurthy (2000) همسویی داشتند.

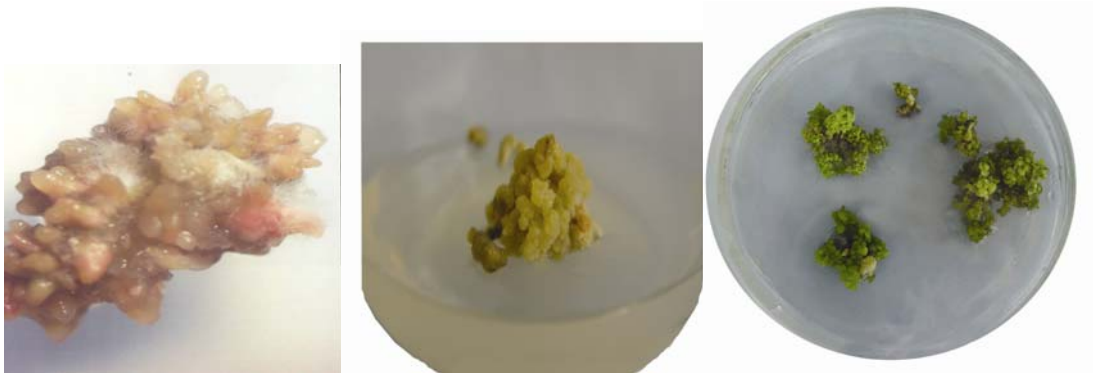
بنابراین بیشترین میزان تعداد جوانه با تیمار هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد و بین دو تیمار هورمونی دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از مطالعات صورت گرفته توسط Arockiasamay و همکاران (2002) بر روی *Solanum trilobatum*, Sharma و Rammurty (2000) بر روی پایه‌های ٤ ساله *E. teriticornis* مؤید نتایج این آزمایش است.

از نظر وزن تر اندام هوایی و شاخص رشد طولی در تیمار TDZ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۰/۵ میلی گرم در لیتر) اختلاف معنی‌داری با تیمارهای هورمونی دیگر مشاهده شد. نتایج Herve و همکارانش (2001) روی *E. gunnii* برخلاف نتایج بدست آمده در این پژوهش بود و علت احتمالی این امر تفاوت در نوع گونه‌هاست.

به‌منظور ارزیابی ریشه‌زایی گیاهک‌های حاصل از کالوس در هر سه گونه، ٤ تیمار هورمونی ریشه‌زایی شامل NAA (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در محیط بدون هورمون فقط بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. این یافته‌ها با نتایج Marcar و همکاران (2002) بر روی *E. grandis* W. Hill و *E. globules labill* و نیز نتایج David و Laine' (1994) بر روی *E. grandis* مطابقت داشت. Gupta و همکاران (1983) نشان دادند که گونه‌های مختلف اکالیپتوس نیازهای متفاوتی به اکسین‌های مختلف دارند. همین‌طور Roksana و همکاران (2002) نشان دادند که پاسخ‌های شاخه‌زایی و ریشه‌زایی از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت است.



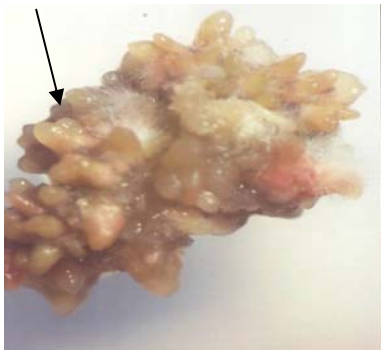
شکل ۱- شاخه‌زایی مستقیم در گونه *E. microcarpa*



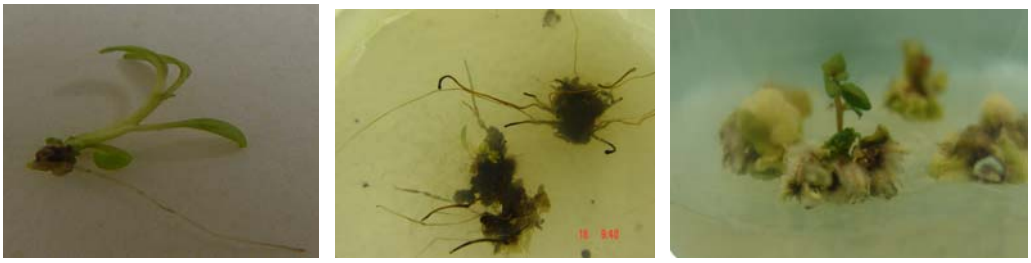
a کالوس سبز سفت b کالوس کرم نرم و صاف c کالوس کرم دانه‌ای

شکل ۲- شکل‌های مختلف کالوس *E. microcarpa*

شکل ۳- تشکیل کالوس در محور زیرلپه

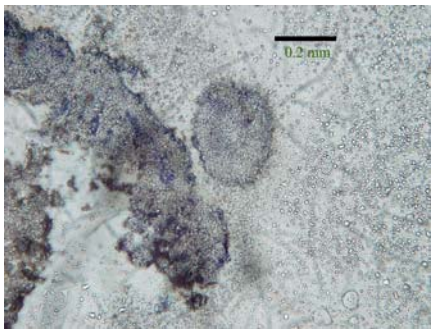


شکل ٤- کالوس‌های رویان زا (رویان در مرحله قلبی شکل)

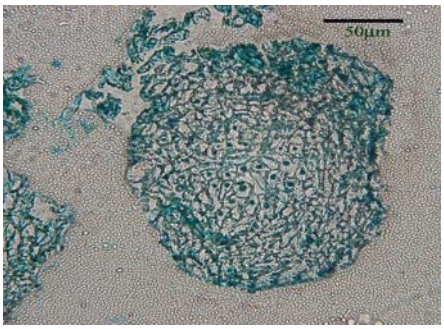


C *B* *A*

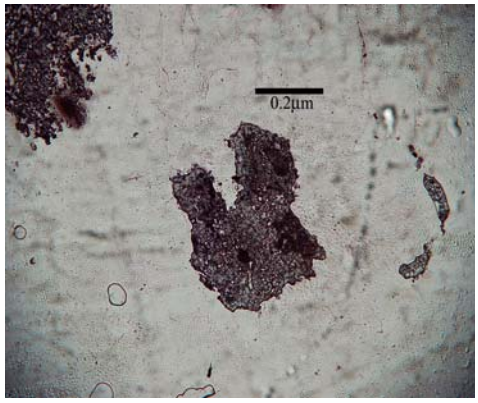
شکل ۵- گیاهک‌های حاصل از کشت رویان در محیط MS (A: گیاه متصل به کالوس روی محیط کشت، B: گیاه متصل به کالوس (آماده برای جداسازی) و C: یک نمونه گیاه کامل حاصل از رویان)



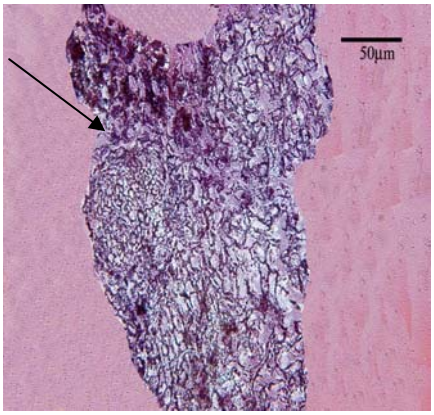
مرحله کروی



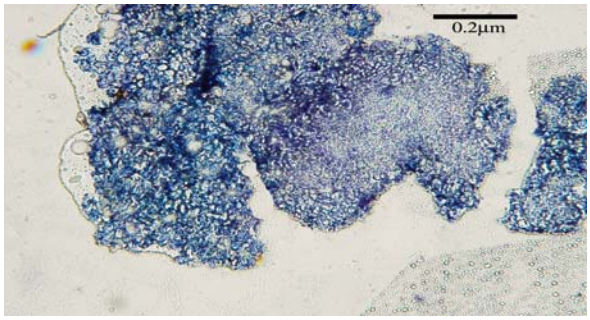
سلول‌های سازنده رویان‌های کروی



مرحله مشخص‌شدن لپه‌ها



مرحله شروع تشکیل جنین با ایجاد سلول‌های سازمان یافته



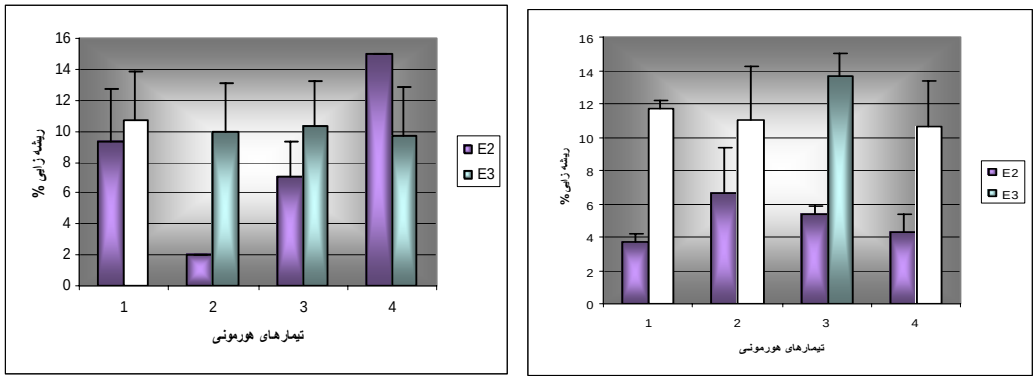
مرحله شروع تمایزیابی به رویان قلبی شکل

شکل ٦- برش‌گیری و مراحل مختلف تشکیل جنین

شکل ۷- گیاهچه حاصل از بازایی درون شیشه‌ای اکالیپتوس دو هفته پس از سازگاری در گلخانه

جدول ۱- مقایسه میانگین (به روش دانکن) اثر تیمارهای TDZ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) وBAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بر شاخص‌های طول شاخه (cm)، تعداد جوانه، تعداد شاخه، شدت سبزینگی و وزن تر (gr) در ریزنمونه‌های حاصل از *E. microcarpa* و *E. melliodora* .

تیمار تنظیم‌کننده رشد (mg/l)	طول شاخه (cm)	تعداد جوانه	تعداد شاخه	وزن تر کالوس (gr)
۰/۰۱, TDZ ۰/۵NAA	a۱/۵٤۰	b۱۱/۱۰	a۸/۱۰	a۲/۱٤۵
۰/۱, BAP ۰/۵NAA	b۱/۲۷۰	b۹/۲۰	۹/۲۰	c۱/۰٤۰
۰/۲۵, BAP۱NAA	b۱/۲٤۰	a۱٦/۳۰	b٤/٦۱	b۱/۸۵۰



محور زیرلپه لپه

نمودار ۱- ریشه‌زایی نمونه‌های حاصل از کالوس در گونه‌های

E2: E. melliodora* و *E3: E. microcarpa

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد. مولفین بر خود فرض می‌دانند که از همکاران گروه مذکور و حمایت‌های مالی و معنوی آن مؤسسه صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

– Arockiasamy, D.I., Muthukumar B., Natarajan E. and Britto S.J., 2002. Plant regeneration from node and internodes explants of *Solanum trilobatum L*. Plant Tissue Culture, 12: 93-97
– Assareh, M.H., 2000. Somatic embryogenesis in some *Eucalyptus* spp. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetics Research, 3: 1-8.
– Bennett .I.J, McComb, J.A., Tonkin, C.M. and David, Mc., D.A.J. 1994, Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *In vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globules* Labill. Annals of Botany, 74: 53-58.
– Bodnayopadhyay, S., Cane, K. Rasmussen, G. and Hamill, J. D., 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate *Eucalyptus* species– *Eucalyptus nitens* and *E. globulus.* Plant Science, 14: 189-198.
– Eldridge, K., Davidson, J., Harwood, C., Wyk, G. van, 1994. *Eucalyptus* Domestication and Breeeding, Oxford University Press, Oxford.
– Emam, M., Shahrzad, Sh., and Naraghi, T.S., 2007. In vitro propagation of *Ulmus carpinifolia* through bud culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetics Research, 15: 296-304.
– Gupta, Pk. and Mascarenhas, A., 1986. *Eucalyptus.* Cell and Tissue Culture in Volume 3. Forestry.
– Herve, Ph., Alain, J., Paques, M., Marien, J.N., Boudet, A.M. and Teulieres, Ch., 2001. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone. *Comprative.* Histology Plant Science, 161:645–653.
– Laine´, E. and Davied, A., 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Reports, 13:473-476.
– Lakshima-Sita, G., Shbha Rani, B., 1985. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture, Plant Cell Rep., 4: 63-65.
– Lakshimi-Sita, G., 1993. Micropropagation of *Eucalyptus*. Kluwer Academeic Publisher, Printed in the Netherlands, 263-280.
– Loiseau, J., Marche, C., and Ledeunff, Y., 1995. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41.267-275.
– Marcar, M.E., Crawford, D.F., Saundres, A., Matheson, A.C. and Arnold, R.A., 2002. Genetic variation among provinces and families of *Eucalyptus grandies* Hill and *E. globulus labill. Subsp. Globulus* seedling in response to salinity and waterlogging. Forest Ecology and Management, 162: 231-249.
– Marks, R.R. and Simpson, S.E., 1994. Factors affecting shoot development in apical dominant *Acer cultivars in vitro*. J. hort. Sci., 69:543-551.
– Mullins, K.V., Hartney, V.J. Llewellyn, D.J. Strauss, S. and Dennis, E.S., 1995. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*,: In: Potts, B.M. Borralho, N.M.G. Reid, J.B. Cromer, R.N. Tibbits, W.N. Raymond, C.A. (Eds.), *Eucalyptus* Plantations : Improving Fiber Yield and Quality. Proc. CRCTHF-IUFRO Conf. Hobart,.
– Muralidharan, E.M., and Mascarenhas, A.F., 1987. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*, Plant Cell Rep., 6: 256-259.
– Muralidharan, M., Gupta, P.K. and Mascarenhas, A.F., 1989. Plant production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*, Plant Cell Rep., 8: 41-43.
– Ndoye.M, Diallo, I., and Gassama Dia, Y.K., 2003. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, Balanites aegyptiaca(l.) del. African Journal of Biotechnology, 2: 421-424.
– Newman, P.G., Krishnaraj, S., and Saxena, P.K., 1996. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill – somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyls explants induced with 6 –benzyladenine. International Journal of Plant Sciences, 157: 554-560.
– Panaia, M., Senaratna, T. Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K., 2004. The role of cytokinins and thidiazoron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. Australian Journal of Botany, 52:257-265.
– Peacock, J., 1995. Improving plantation *eucalyptus* with biotechnology, in: B.M. Potts, N.M.G. Borralho, J.B. Reid, R.N. Cromer, W.N. Tibbits, C.A. Raymond (Eds), *Eucalyptus* Plantation: Improving Fibre Yield and Quality. Proc. CRCTHF-IUFRO Conf. Hobart,.

– Sharma, S. and Ramamurthy, V., 2000. Micropropagation of 4-year- old elite *Eucalyptus tertecornis* trees. Plant Cell Reports, 19: 511-518.
– Trindade, H.M. and Pais, S., 2003. Meristematic nodule culture: a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globules*. Trees, 17:308-315.
– Veltcheva, M.R., and Svetleva, D.L., 2005. *In vitro* regeneration of *Phaseoulus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Centeral. European Agriculture, 6 :53-56.
– Watt, M.P., Blakeway, F., Cresswell, C.F. and Herman, B., 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*, South Afr. For. J., 157: 41-43.
– Zaffari, G.R., Kerbauy, G.B. Kraus, J.E. and Romano, E.C., 2000. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63:187-192.
– Pesce, P. G., and Rugini, E., 2004. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclice secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry root stock colt (*prunus avium* * *p. pseudocerasus*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 79: 223-232.
– Ramzan Khan, M, Radid, H. and Quraishi, A., 2002. *In vitro* shoot development from juvenile cutting of field- Grown olive (*Olea europea* L. cv. Leccino) Online Journal *Biological Sciences*, 2: 438-440.
– Roksana, R., Alam, M.F., Islam, R. and Hossain, M.M., 2002. *In vitro* Bulble formation from shoot apex in Garlic (*Allium Sativum* L.) Plant Tissue Culture, 12:11-17.
– Sadat, Sh., Asareh, M.H., Jafari Mofid Abadi, A., Tabaei Aghdaei, S.R., and Ghamari Zare, A., 2007. Study of callus induction and regeneration in *Populus euphratica* Oliv. via ovary culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests plant Breeding and Genetics Research. 15: 231-242.

Somatic embryogenesis on two *Eucalyptus* species (*E. melliodora* and *E. microcarpa*)

Z. Vatanpoor*[1], M.H. Assareh[2], A. Ghamari-Zare[3], Kh. Kiarostami[4]

1*- Corresponding author, MSc. Al-Zahra Univ., Tehran, I.R. Iran. E-mail: zahravatanpour@yahoo.com
2– Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R. Iran.
3– Assist. Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R. Iran.
4– Assist. Prof., Al-Zahra Univ., Tehran, I.R. Iran.

Received:25.02.2009 Accepted: 22.11.2009

Abstract

A reliable and reproducible method for *In vitro* plant regeneration of two important temperate *Eucalyptus* species (*E. melliodora* and *E. microcarpa*) was developed utilizing seedling explants. Highly regenerative callus was obtained from individual cotyledon and hypo-cotyledon explants using MS basal nutrient medium with 30 gl^- sucrose, 6.8 g l^- agar, 0.1 mg l^- BAP and 0.5 mg l^- 2,4-D. In a few instances, direct shoot regeneration occurred without an intervening callus phase. Somatic embryos were observed occasionally in *E. melliodora* and *E. microcarpa* arising from the surface of organogenic callus. Regenerated shoots of both species could be rooted in a hormone free modified MS media and plantlets were transferred successfully to soil.

Key words: *Eucalyptus melliodora*, *E. microcarpa* and somatic embryogenesis.