DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.5722

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۱۳-۳۰٤ (۱۳۹۱)

تأثیر هورمون‌های TDZ و 2,4-D بر تولید کالوس و اندام‌زایی در گونه *Eucalyptus rubida*

سعیده قدیری سردرود[۱]، عباس قمری‌زارع[*۲]، محمدحسن عصاره[۳]، شکوفه شهرزاد[٤] و غلامرضا بخشی خانیکی[٥]

۱*- کارشناس‌ارشد، دانشگاه پیام نور مرکز تهران، تهران
۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست‌الکترونیک: ghamari-zare@rifr-ac.ir
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٤- کارشناس خبره، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٥- استاد، دانشگاه پیام نور مرکز تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰٦/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۲۹

چکیده

اکالیپتوس‌ها متعلق به خانواده Myrtaceae و بومی استرالیا هستند. گونه *Eucalyptus rubida* یک گونه سریع‌الرشد با تولید چوب، خواص دارویی بالا و مناسب جنگل‌کاری در بخشی از مناطق ایران است. بعلت آنکه ایران ازجمله کشورهای با پوشش کم جنگلی است، تولید انبوه گونه مذکور در جنگل‌کاری‌ها مفید می‌باشد. بنابراین در این پژوهش اثر هورمون‌های TDZ و 2,4-D بر تولید کالوس و اندام‌زایی در *E. rubida* مورد بررسی قرار گرفت. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها دو گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشند که در کالوس‌زایی و پیشبرد کالوس به سمت جنین‌زایی و یا اندام‌زایی در غلظت‌های متفاوت نقش بسزایی دارند. بنابراین بذر *E. rubida* به‌منظور تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی در محیط کشت MS با نصف میزان نیترات کشت شد. از کاشت ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی، ریشه و ساقه گیاهچه‌های حاصل در محیط کشت MS با ۹ تیمار هورمونی مختلف TDZ و 2,4-D جهت کالوس‌زایی و متعاقب آن اندام‌زایی از کالوس استفاده شد. بر اساس تجزیه نتایج آزمون آماری بهترین تیمار جهت کالوس‌زایی TDZ: ۰/۵ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l، تولید کالوس‌های ریشه‌زا TDZ: ۰/۱ mg/l، 2,4-D: ۱ mg/l و تولید کالوس‌های جنین‌زا TDZ: ۰/۵ mg/l، 2,4-D: ۰/۵ mg/l شناسایی گردید.

واژه‌های کلیدی: *Eucalyptus rubida*، جنین‌زایی، اندام‌زایی، کالوس، کوتیلدون، کشت‌بافت.

مقدمه

اکالیپتوس‌ها جزو گونه‌های سریع‌الرشد، متعلق به خانواده Myrtaceae و بومی اقیانوسیه به‌ویژه استرالیا می‌باشند (Assareh & Sardabi 2007). خانواده Myrtaceaدارای ۸۰ سرده و بیش از ۳۰۰۰ گونه می‌باشد (Javanshir & Mossadegh 1973). در برخی از منابع برای این سرده ٤٥٥ گونه، ۲٤ واریته، ۸ زیرگونه و ۱۱٥ هیبرید ذکر شده است (Chen *et al.*, 1990).

درختان گونه‌هایی از اکالیپتوس بیش از یکصد سال پیش به ایران وارد شدند و در جنوب کشور که محیط

مناسبی برای آنها بود، کشت شدند. در سال ۱۳٤۲ بیش از ۳۰ گونه مختلف توسط دکتر ثابتی در اختیار سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور قرار گرفت تا نتیجه رشد و مقاومت آنها در شرایط مختلف کشور مورد مطالعه قرار گیرد (Sabeti, 1976, Assareh & Sardabi 2007). گونه *E. rubida* یک گونه سریع‌الرشد با تولید چوب و خواص دارویی بالا است و مناسب جنگل‌کاری در بخش‌هایی از مناطق ایران می‌باشد؛ ایران ازجمله کشورهای با پوشش کم جنگلی است (Saghebtalebi *et al*., 2005). با توجه به سریع‌الرشد بودن گونه‌های مختلف اکالیپتوس از یک سو و نیاز کشور به واردات چوب‌های صنعتی و مشکل سازمان‌های اجرایی به‌ویژه سازمان جنگلها، مراتع و آبخیزداری کشور از نظر انتخاب گونه‌های سازگار و مناسب به‌منظور اجرای برنامه‌های جنگلکاری و احیای جنگلهای مخروبه از طرف دیگر، اهمیت این بررسی بیش از پیش روشن می‌گردد. با توجه به عدم دسترسی به بذر این گونه می‌توان از روش‌های تکثیر غیرجنسی برای ازدیاد آن همانند فنون کشت بافت به‌عنوان ابزاری ارزشمند برای مطالعات ژنتیکی، مولکولی و فیزیولوژیکی استفاده نمود (Assareh, 1998). تمام انواع کشت بافت گیاهی نیز دو گام اساسی را دربرمی‌گیرد. ابتدا باید بخشی از گیاه به نام ریزنمونه از گیاه کامل جدا شود، این کار موجب به هم خوردن برهم‌کنش‌های یاخته‌ای، بافتی و یا اندامی می‌شود که ممکن است در یک گیاه کامل دیده شود. سپس بخش جدا شده گیاه باید در یک محیط ویژه قرار داده شود، به‌گونه‌ای که توانایی بروز استعداد ذاتی یا انگیخته شده‌ای را داشته باشد (Gamborg, 2002). یکی از دستاوردهای بی‌نظیر در کشت بافت، کشف روش‌های جنین‌زایی سوماتیکی است (Steward *et al*., 1958., Reinert, 1958). جنین‌زایی سوماتیکی فرایندی است که به وسیله آن سلول‌های غیرجنسی تحت تمایز، یک ساختار دوقطبی شامل هر دو محور ریشه و ساقه را تشکیل می‌دهند.

اساس کالوس یک بافت توموری گیاهی کم و بیش سازمان نیافته است که از زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته به وجود می‌آید. بنابراین کالوس توده‌ای بی‌شکل از سلول‌های پارانشیمی سازمان نیافته و با دیواره نازک است که در حقیقت پاسخی حفاظتی به جراحت می‌باشد. بافت ریزنمونه، یک بافت تمایزیافته است که به‌عنوان ماده آغازین برای تولید کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طی تشکیل کالوس‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، تمایز و اختصاصی شدن سلول‌های مادری متوقف شده و سلول‌های ریزنمونه تمایززدایی می‌شوند. فرایند تمایززدایی نیز با تغییر فعالیت متابولیکی سلول همراه است (Assareh & Sardabi 2007). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (هورمون‌ها) به ۵ رده تقسیم می‌شوند که شامل اکسین‌ها نظیر 2,4-D (2,4-Dichloro phenoxy acetic acid)، سیتوکینین‌ها نظیر TDZ (Thidiazurun)، جیبرلین‌ها نظیر GA3 (Gibberellic acid)، اتیلن و اسیدآبسیزیک می‌باشد. اکسین‌ها به دو گروه طبیعی همانند IAA (Indole-3-acetic acid) و مصنوعی همانند 2,4-D تقسیم‌بندی می‌شوند. نقش اکسین‌ها در رشد و نمو گیاهان متنوع است، ازجمله این که در غلظت‌های بالا باعث تشکیل ریشه شده و در غلظت‌های پایین موجب تشکیل جوانه می‌شوند. تعدادی از اکسین‌ها به خصوص 2,4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند. اکسین‌ها در تشکیل کالوس نیز نقش دارند و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری

می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز همانند اکسین‌ها به دو گروه طبیعی همانند 2ip (6-γ-γ-Dimethylallylamino-purine) و مصنوعی همانند TDZ تقسیم می‌شوند. سیتوکینین‌ها در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند. این دسته از تنظیم‌کننده‌های رشد، موجب تقسیم سلولی شده و رشد و تشکیل کالوس را سبب می‌شوند (De Klerk, 2006).

گونه *E. rubida* بومی استرالیا بوده و در استان‌های شمالی و جنوبی ایران به صورت دست‌کاشت موجود است که تمامی مزایای اکالیپتوس‌ها شامل مصارف تجاری- دارویی را دارد. در این پژوهش به‌منظور تکثیر انبوه درون شیشه‌ای این گونه، اثر هورمون‌های TDZ و 2,4-D بر امکان تولید کالوس جنین‌زا با هدف دسترسی به جنین‌زایی سوماتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذر گونه *E. rubida*، از استان گیلان، رضوان‌شهر، نهالستان شاندرمن، مجاور جنگل‌های شفارود جمع‌آوری گردید. به‌منظور تولید گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی، مراحل پیش‌سترون‌سازی بذرها شامل شستشو به وسیله محلول مایع ظرفشویی به مدت ۵ دقیقه، قرارگیری در زیر آب جاری به مدت ۲ ساعت و غوطه‌وری در الکل۷۰٪ (v/v) به مدت ۲۰ ثانیه و بعد مراحل سترون‌سازی داخل هود مخصوص کشت‌بافت، شامل غوطه‌ور کردن بذرها در هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (v/v) به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. آنگاه بذرها سه بار با آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. بذرهای سترون شده در شرایط سترون (داخل هود مخصوص کشت‌بافت) در محیط کشت MS با یک دوم میزان نیترات که به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰°C قرار گرفته بود، مستقر گردیدند.

بذرهای سترون‌شده روی محیط مذکور در طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار و در هر تکرار ۸۰ بذر کشت شدند و به مدت ۳۰ روز در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵°C) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹°C) به‌منظور ایجاد شرایط طبیعی شبانه‌روزی نگهداری گردیدند. ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی به صورت قطعات مربع شکل با ابعاد ۳ میلی‌متر در ۳ میلی‌متر و به نحوی که سطح پشتی برگ (سطح پر روزنه) به سمت بالا باشد، ساقه با ابعاد ۳ تا ٤ میلی‌متر و ریشه در اندازه‌های ۳ تا ٤ میلی‌متر، حاصل از گیاهچه‌های عاری از آلودگی، جدا شده و در محیط MS با ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) کشت شدند.

جدول ۱- نه تیمار هورمونی در محیط کشت MS به‌منظور بررسی تأثیر آنها بر تولید کالوس و اندام‌زایی

کد	TDZ(mg/l)	2,4-D(mg/l)
A	۰/۰۵	۰/۵
B	۰/۰۵	۱/۰
C	۰/۰۵	۱/۵
D	۰/۱	۱/۵
E	۰/۱	۰/۵
F	۰/۵	۰/۵
G	۰/۵	۱/۰
H	۰/۵	۱/۵
I	۰/۱	۱/۰

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 و یا اندام‌زایی ثبت شد. داده‌ها

توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید و مقایسه میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده (کالوس، شاخه، ریشه و جنین) توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

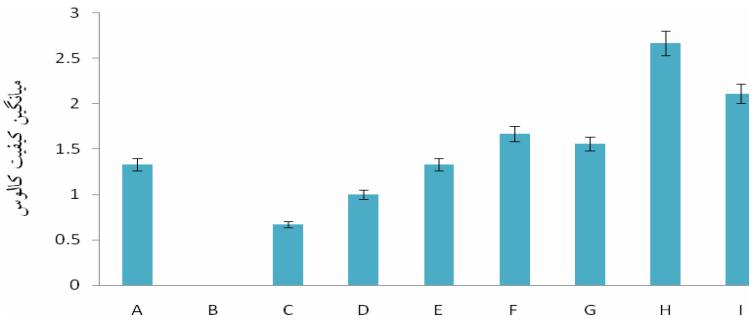
نتایج

ده روز پس از کاشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت با تیمارهای هورمونی (جدول ۱)، کالوس‌زایی از محل بریدگی ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی، ساقه و ریشه شروع شد. این کالوس‌ها از نظر کیفیت با یکدیگر تفاوت داشتند و تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات پس از گذشت سه ماه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر سه صفت بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی TDZ و 2,4-D بر کالوس‌زایی، تولید کالوس اندام‌زا و تولید کالوس جنین‌زا در گونه *E. rubida*

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات
میانگین کیفیت کالوس‌زایی	۸	۲۱/۸۸**
میانگین کیفیت تولید کالوس اندام‌زا	۸	۱۳/۵۳**
میانگین کیفیت تولید کالوس جنین‌زا	۸	۲٤/۳٤**

میانگین‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۱$ اختلاف معنی‌دار دارند.

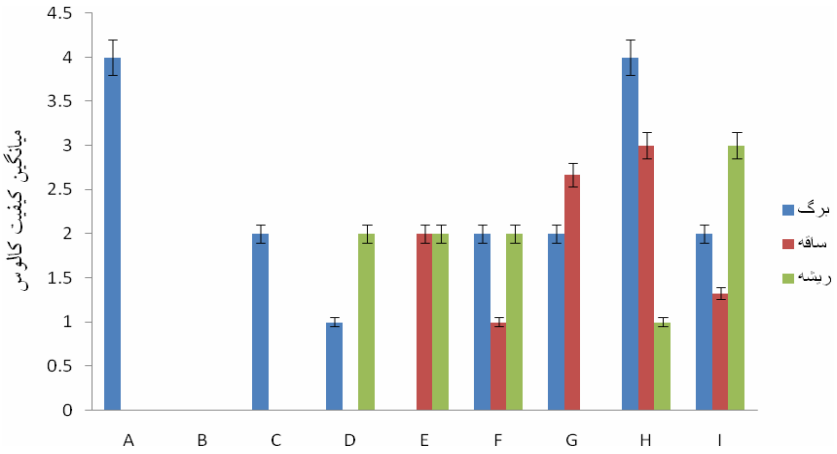


شکل ۱- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین کیفیت کالوس (۰- کالوس تولید نشده، ۱- کالوس بسیار محدود، ۲- کالوس محدود یکنواخت، ۳- کالوس نسبتا بزرگ آبدار و یکنواخت، ٤- کالوس بزرگ آبدار و ۵- کالوس بسیار بزرگ).

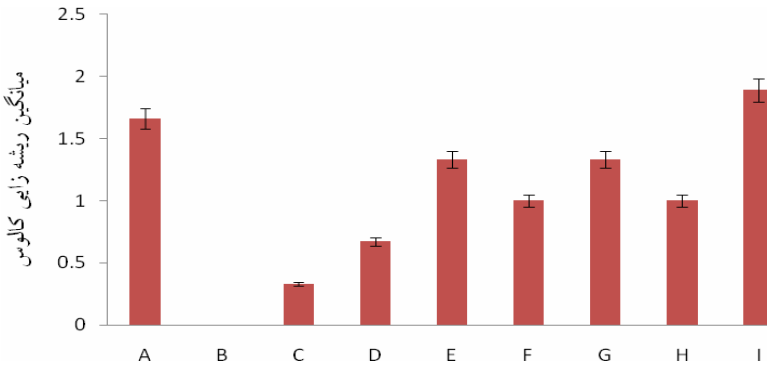
بیشترین میزان کالوس‌زایی در میان ریزنمونه‌های برگی متعلق به تیمارهای A و H، در میان ریزنمونه‌های ساقه متعلق به تیمار H و در مورد ریزنمونه‌های ریشه متعلق به تیمار I بود (شکل ۲). در مجموع تیمار هورمونی H از نظر کالوس‌زایی بهترین تیمار ($\alpha \leq \%1$) (شکل ۱) بود. در مقایسه تیمارهای هورمونی H و I (شکل ۱) با سایر تیمارها بالا رفتن همزمان TDZ و 2,4-D موجب افزایش میزان کالوس‌زایی در کلیه ریزنمونه‌ها به خصوص در ریزنمونه‌های

ساقه و برگ گردید. نقش 2,4-D بسیار واضح‌تر از TDZ بود. زیرا افزایش میزان 2,4-D مؤثرتر از میزان TDZ بود. زیرا میزان TDZ در تیمار H با تیمارهای G و F یکسان بود و فقط میزان 2,4-D افزایش یافت (جدول ۱).

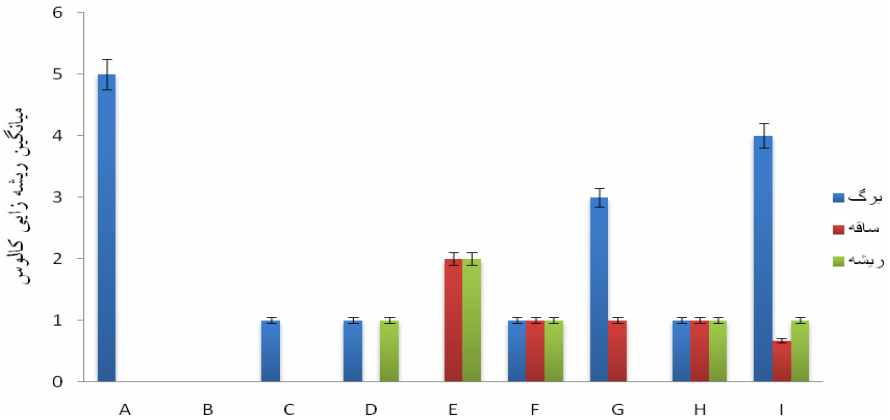
کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کوتیلدونی، ساقه و ریشه در هر ۹ تیمار از نظر میزان ریشه‌زایی کالوس نیز (در این پژوهش اندام تولید شده تنها ریشه بود) با یکدیگر متفاوت بودند ($\alpha \leq \%1$) (جدول ۲).



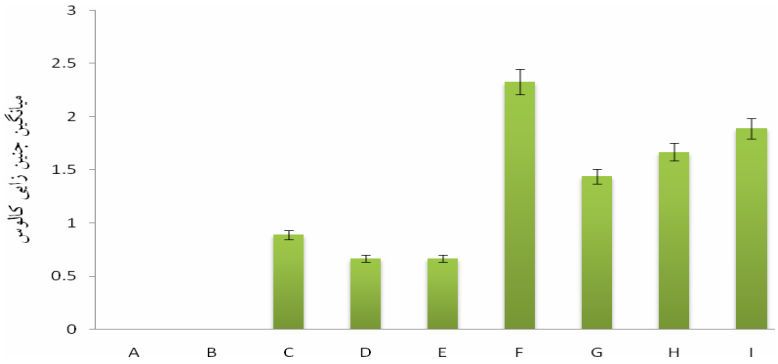
شکل ۲- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین کیفیت کالوس به تفکیک ریزنمونه (۰- کالوس تولید نشده، ۱- کالوس بسیار محدود، ۲- کالوس محدود یکنواخت، ۳- کالوس نسبتا بزرگ آبدار و یکنواخت، ٤- کالوس بزرگ آبدار و ٥- کالوس بسیار بزرگ).



شکل ۳- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین میزان ریشه‌زایی کالوس (۰-کالوس تولید نشده، ۱- کالوس فاقد اندام‌زایی، ۲- کالوس بسیار محدود ریشه‌زا، ۳- کالوس محدود و ریشه‌زا، ٤- کالوس ریشه‌زا و ٥- کالوس بسیار ریشه‌زا).



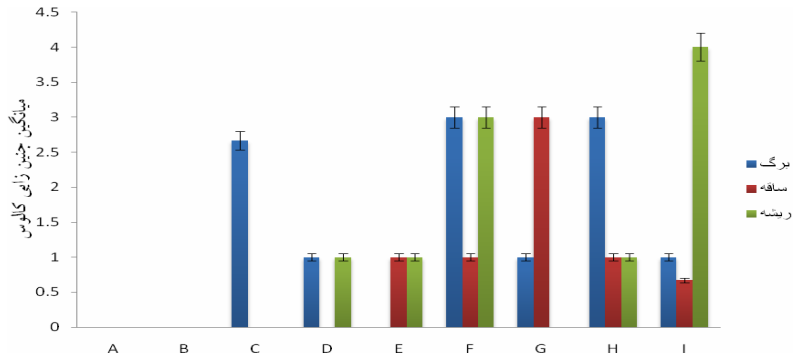
شکل ٤- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین میزان ریشه‌زایی کالوس به تفکیک ریزنمونه (۰- کالوس تولید نشده، ۱- کالوس فاقد اندام‌زایی، ۲- کالوس بسیار محدود ریشه‌زا، ۳- کالوس محدود و ریشه‌زا، ٤- کالوس ریشه‌زا، ۵- کالوس بسیار ریشه‌زا).



شکل ۵- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین میزان جنین‌زایی کالوس (۰- کالوس تولید نشده، ۱- کالوس فاقد کیفیت گلوبولار، ۲- کالوس بسیار محدود گلوبولار، ۳- کالوس گلوبولار، ٤- کالوس گلوبولار با کیفیت مناسب، ۵- کالوس درشت و بسیار گلوبولار و کیفیت مناسب.)

بیشترین میزان ریشه‌زایی کالوس در میان ریزنمونه‌های برگی متعلق به تیمار A و در میان ریزنمونه‌های ریشه و ساقه متعلق به تیمار E بود (شکل ٤). به‌طورکلی بهترین تیمار از نظر میزان ریشه‌زایی کالوس تیمار I بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($\alpha \leq 1\%$) (شکل ۳).

اختلاف بین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کوتیلدونی، ساقه و ریشه در هر ۹ تیمار نیز از نظر میزان جنین‌زایی کالوس کاملا معنی‌دار ($\alpha \leq 1\%$) بود (جدول ۲).



شکل ٦- نمودار مقایسه‌ای ۹ تیمار هورمونی (جدول ۱) از نظر میانگین میزان جنین‌زایی کالوس به تفکیک ریزنمونه (۰- کالوس تولید نشده، ۱- کالوس فاقد کیفیت گلوبولار، ۲- کالوس بسیار محدود گلوبولار، ۳- کالوس گلوبولار، ٤- کالوس گلوبولار با کیفیت مناسب، ۵- کالوس درشت و بسیار گلوبولار و کیفیت مناسب).

بیشترین میزان جنین‌زایی کالوس در میان ریزنمونه‌های برگی متعلق به تیمار F و H، در میان ریزنمونه‌های ساقه متعلق به تیمار G و در میان ریزنمونه‌های ریشه متعلق به تیمار I بود (شکل ٦). در کل بهترین تیمار از نظر ایجاد کالوس‌های جنین‌زا تیمار F بود ($\alpha \leq \%1$) (شکل ۵).

در مجموع در این پژوهش با کیفیت‌ترین کالوس‌ها در محیط‌های کشت با ترکیب هورمونی همزمان TDZ و 2,4-D تولید شد. در حضور حداقل TDZ:۰ /۵ mg/l افزایش میزان 2,4-D با بهبود کالوس‌ها همراه بود (شکل ۱ و ۲). در مورد تولید کالوس‌هایی با قابلیت جنین‌زایی حداقل TDZ مورد نیاز، ۰/۱ mg/l و حداقل 2,4-D مورد نیاز، ۰/۵ mg/l بود (شکل ۵ و ٦). شایان ذکر است که نتایج بهتری با افزایش 2,4-D همراه بود. در مورد تولید کالوس‌های ریشه‌زا به‌خصوص در ریزنمونه‌های برگی به نظر می‌رسد نقش TDZ بسیار بیشتر از 2,4-D بوده و بهترین نتیجه در غلظت ۰/۱ mg/l از TDZ به‌دست آمد (شکل ۳ و ٤).

بحث

اکسین‌ها به‌خصوص 2,4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند، این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند (De klerk, 2006).

در بین تیمارهای کالوس‌زایی بهترین تیمار، تیمار TDZ: ۰/۱ mg/l همراه با 2,4-D: ۱ mg/l و در بین تیمارهایی که منجر به ایجاد کالوس با قابلیت جنین‌زایی شدند، تیمار TDZ:۰/۵ mg/l، 2,4-D: ۰/۵ mg/l برتر بود. در ضمن Assareh (۱۹۹۸) نیز در مورد *E. sargenti* تقریبا نتایج مشابهی بدست آورد، اما با توجه به این نکته که محیط پایه در پژوهش مذکور B5 بود این امر نیازمند مطالعه بیشتری است. همچنین نتایج حاصل از مطالعه بر روی گونه *E. viminalis* نیز کاملا مشابه نتایج ما در این پژوهش بود (Assareh, 1998).

در تحقیق دیگری Warrag (1989) استفاده از 2,4-D به میزان ۲ mg/l را برای کال‌زایی در *E. camaldulensis* گزارش کرد. همینطور Gupta و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که گونه‌های مختلف اکالیپتوس، نیازهای متفاوتی به اکسین‌ها دارند. درحالی‌که Yeung (1995) بیان داشت که اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که تمایز و تقسیم سلولی را تنظیم می‌کنند، این محقق همچنین اثرهای استعمال اکسین خارجی به‌ویژه 2,4-D بر القاء جنین‌زایی سوماتیکی را به خوبی مشاهده کرد. در این پژوهش با کیفیت‌ترین کالوس‌ها از محیط‌های کشت حاوی هورمون‌های TDZ و 2,4-D بدست آمد. افزایش میزان 2,4-D در حضور حداقل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با تحریک کالوس‌ها همراه بود. البته باید اضافه کرد که Nugent و همکاران (۲۰۰۱)، بیان داشتند که 2,4-D و سایر اکسین‌های سنتتیک در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا هیچ نتیجه‌ای ندارند که کاملا مغایر با نتایج بدست‌آمده در این پژوهش می‌باشد. ولی Assareh (1998)، در مورد *E. camaldulensis* بیشترین میزان کالوس‌زایی را در محیط کشت حاوی TDZ: ۰/۲۵ mg/l، 2,4-D: ٤ mg/l بدست آورد و Michalczuk و Druart (۱۹۹۹) نیز بیان داشتند در سلول‌های هویج 2,4-D، انباشتگی IAA داخل سلولی را تحریک کرده و در میان اکسین‌های مختلف که برای القای جنین‌زایی استفاده شد، 2,4-D کارآمدترین است. در ضمن Assareh (۱۹۹۸)، در مورد *E. gunni* بیشترین میزان کالوس‌زایی را در حضور TDZ:۰ /۱ mg/l،2,4-D۲: mg/l و اندام‌زایی و ریشه‌زایی را در حضور TDZ: ۰/۲۵ mg/l،2,4-D۱: −۰/۵ mg/l مشاهده کرد.

بر اساس نتایج پژوهش‌های قبلی و این پژوهش نقش 2,4-D و افزایش آن به خصوص در کالوس‌زایی و جنین‌زایی بسیار مشهود است. بنابراین حداقل میزان 2,4-D لازم برای کالوس‌زایی و جنین‌زایی نیز در گونه *E. rubida* مقدار ۰/۵ mg/l پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شده‌است؛ بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه یادشده تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Assareh, M.H, Sardabi, H., 2007. *Eucalyptus,* volume 1 Description, Illustration and Propagation by Advanced Techniques, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
- Assareh, M.H., 1998. *In vitro* culture plant regeneration through, organogenesis , somatic embryogenesis and photoautotrophic micro propagation of some *Eucalyptus*. National University of Ireland. PhD thesis, 200 p.
- Chen, Z., Xu, X. and Pan, R., 1990. Rubber tree: anther and ovule culture. In: Z. Chen *et al*. (Eds), Hand Book of Plant Cell Culture, Vol. 6. Perennial Crops. McGraw Hill, New York, pp, 453-467.
- DeKlerk. G.J., 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemical, P 17-25.
- Gamborg, C., 2002. The acceptability of forest management practices: an analysis of ethical accounting and the ethical matrix. Forest Policy Econ, 4:175-189.
- Gupta, P.P., 1983. Microspore-derived haploid, diploid and triploid plants in *Petunia violaceae* Lindl. Plant Cell Rep., 2: 255-256.
- Javanshir, K., and Mossadegh A., 1973. *Eucalyptus*, Tehran University Pub;. p. 434
- Michalczuk, L. and Druart, P., 1999. Indol-3-acetic acid metabolism in hormone autotrophic , embryogenic callus of Inmil (R) cherry rootstock (*Prunus incise* × serrula GM 9) and in hormone –

dependent, non-embryogenic calli of *Prunus domestica.* Physiologia Plantarum ., 100:1353-1364.
– Nugent, G. and Stephen, F.C., 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 85-88.
– Reinert, J, 1958. Untersuchungen uber die morphogenese an gewbekulturen. Berichet Deutsche Botanische Gesellschft, 71:15.
– Sabeti, H., 1976. Forests, Trees and Shrubs of Iran, Ministry of Agriculture and Natural Resources of Iran, Tehran, Iran.
– Saghebtalebi, Kh., Sajedi, T., and Yazdian, F., 2005. Forests of Iran, Research Institute
– of Forests and Rangelands Publications, 2nd Ed., 28 pp.
– 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.
– Warrag, E.E.I., 1989. Direct and indirect tissue culture micropropagation and greenhouse plantlet evolution of superior *Eucalyptus grandis* hybrids. Ph.D Thesis , University of Florida, pp.141.
– Yeung, E.C., 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A., (ed) *In Vitro* Embryogenesis in Plants: 205-248. Kluwar Academic Publishers, Dordrecht.

Effects of TDZ and 2,4-D growth regulators on callus production and organogenesis in *Eucalyptus rubida*

S. Ghadiri Sardrood[1], A. Ghamari Zare[2]*, M.H. Assareh[3], Sh. Shahrzad[4] and Gh. Bakhshi Khaniki[5]

1- M.Sc., Tehran Payam Noor University, Tehran, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assoc., Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran, E-mail: ghamari-zare@rifr-ac.ir
3- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
4- Researcher, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
5- Prof., Tehran Payam Noor University, Tehran, I.R.Iran.

Received: 11.09.2010 Accepted: 18.06.2011

Abstract

Eucalyptus species belongs to *Myrtaceae* family and native of Australia. *Eucalyptus rubida* with medicinal usage is a fast growing tree species, with high wood yielding. Iran is a country with low cover forest, therefore, it is suitable for silviculture programs in some part of the country. Auxins and cytokinines are two main groups of growth regulators with different concentrations, having important role in callus formation and in somatic embryogenesis as well as organogenesis stages. Requirement of seedling production of *E. rubida* was the reason for this study. Effects of 2,4-D and TDZ as the growth regulators on callus production and organogenesis of the species was investigated. *E. rubida* seeds were sterilized and cultured on MS medium with half of required nitrate concentration for a large number of sterile seedlings production. Explants of cotyledon, root and stem of the seedlings were planted on MS medium with nine different treatments of TDZ and 2,4-D hormones levels in order to callus formation and then organogenesis phenomena. The best recognized treatment for callus production was: TDZ with 0.5 mgl^{-1} and 2,4-D with 1 mgl^{-1}; for organogenic callus production was TDZ: 0.1 mgl^{-1}, 2,4-D: 1 mgl^{-1} and for embryogenic callus production was TDZ:0.5 mgl^{-1}, 2,4-D: 0.5 mgl^{-1}.

Key words: *Eucalyptus rubida*, Embryogenesis, Organogenesis, Hormone, Cotyledon and tissue culture.