نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیستم و دوم، شماره سوم، ۱۳۹٤
http://jwfst.gau.ac.ir

تکثیر غیر جنسی صنوبر هیبرید "مفید" (*Populus euphratica* Oliv. ×*P. alba* L.) از طریق کشت بافت

*علی جعفری مفیدآبادی[1] و شکوفه شهرزاد[2]
[1]دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، [2]کارشناس مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٤/۱٤

چکیده

سابقه و هدف: تولید چوب موردنیاز و کاهش فشار بهره برداری از سطح جنگل‌ها، نیازمند به توسعه زراعت چوب است. زراعت چوب با گونه‌های سریع‌الرشد نظیر صنوبر در کشور انجام می‌شود. جهت افزایش عملکرد چوب در زراعت آن، هیبریدهای صنوبرهای با عملکرد بالا اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد. تولید انبوه نهال هیبرید معرفی شده، به روش‌های معمول سنتی، به‌دلیل عدم تأمین هسته اولیه، نیازمند صرف زمان طولانی است. لذا جهت تسریع در تولید انبوه نهال روش‌های کشت بافت می‌بایست به‌کار گرفته شود.

مواد و روش: به‌منظور ایجاد روش ازدیاد درون شیشه‌ای هیبرید *X* .(*Populus euphratica* Oliv *P.alba* L.)، جدید معرفی شده به‌نام صنوبر "مفید"، سرشاخه‌های درخت بالغ از نهالستان تحقیقاتی گروه زیست فناوری موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهران جمع‌آوری شدند. ریزنمونه حاوی جوانه‌های انفرادی، به‌وسیله تیمارهای مختلف سترون‌سازی ضدعفونی و جهت استقرار به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA انتقال یافته‌اند. برای شاخه‌زایی نمونه‌های استقرار یافته، به محیط‌های کشت پرآوری (DKW, MS, WPM) حاوی ترکیب و غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد گیاهی کشت منتقل شده‌اند. آزمون ارزیابی فاکتورهای

*مسئول مکاتبه: jafarimofidabadi@gamil.com

مؤثر در ازدیاد درون شیشه‌ای، در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۹ تیمار حاصل از ترکیب سه نوع محیط کشت (DKW, MS, WPM)، و سه تیمار هورمونی (BA+2iP, BA, 2ip) با سه تکرار انجام شد. گیاهچه به‌دست آمده جهت ریشه‌زایی به محیط کشت DKW فاقد هورمون‌های رشد گیاهی انتقال یافتند.

یافته‌ها: استفاده از محلول کلراید مرکوریک ۰/۱ درصد به‌مدت ۱ دقیقه با ۹۰ درصد توان ایجاد ریزنمونه‌های سالم نشان داد که بهترین محلول برای سترون‌سازی است. ریز نمونه‌های سترون شده قبل از انتقال به محیط‌های کشت پرآوری، در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مستقر شدند. تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای پرآوری، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. بیشترین تعداد متوسط شاخه (۳/۲) و مناسب‌ترین رشد طولی شاخه (۱/٤٦٥ سانتی‌متر پس از اولین واکشت)، در محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip باضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA اتفاق افتاد. چرخه‌های فراوان تکثیر از جدا کردن قطعات درون شیشه‌ای شاخه حاوی تک جوانه جانبی به‌وجود آمد. ریشه‌دار شدن مشاهده شد. گیاهچه‌های حاصل در محیط کشت DKW، فاقد هورمون‌های رشد گیاهی اتفاق افتاد. سازگاری تدریجی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شیشه‌های درب دار حاوی خاک سبک (پیت، هوموس و ماسه با نسبت ترکیبی یکسان) در داخل گلخانه انجام شد. گیاهچه‌های سازگار شده به مزرعه انتقال یافتند.

نتیجه‌گیری: نهال‌های زیادی از هیبرید صنوبر معرفی شده "مفید" به‌راحتی با کشت ریز نمونه‌های تک جوانه در محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و چرخه‌های تولید بعدی به‌دست آمده است. تولید تجاری نهال‌های این هیبرید برای افزایش سطح زراعت چوب و افزایش عملکرد چوب موردنیاز کشور ضروری است.

واژه‌های کلیدی: جوانه انتهایی، جوانه جانبی، صنوبر هیبرید "مفید"

مقدمه

۱/۲ میلیون هکتار از ۱۲/٤ میلیون هکتار عرصه جنگلی ایران از توان تولید چوب صنعتی برخوردار است (عصاره و اخلاقی، ۲۰۰۹). همین سطح ناچیز نیز با روند تخریبی سریع و نگران کننده‌ای روبرو

است. بهره‌برداری بی‌رویه از جنگل‌ها به‌طور عمده با هدف رفع نیازهای انسان انجام می‌گیرد. تبدیل اراضی جنگلی به باغ و زمین‌های زراعی، بهره‌برداری بی‌رویه، قاچاق چوب‌های صنعتی، قطع درختان با هدف تأمین سوخت، تاج‌بری درختان به‌منظور تعلیف دام و... نمونه‌های عینی تجاوز به عرصه‌های جنگلی است. این‌ها با هدف ایجاد درآمد و تأمین نیازهای اولیه انجام می‌گیرد (کلاگری، ۲۰۰٤؛ ۱۹۹۸). در طی ۳۰ سال گذشته سطح جنگل‌های زاگرس نیز مشابه جنگل‌های تجاری شمال به‌شدت تقلیل یافته است. این کاهش سطح، آن هم در چند دهه اخیر برای کشوری که در زمره کشورهای با پوشش کم جنگل قرار گرفته، زنگ خطر جدی محسوب می‌گردد (عصاره و اخلاقی، ۲۰۰۹). بنابراین باید با صیانت و حفاظت جدی از منابع جنگلی موجود و احیا آن‌ها، در جهت کاهش وابستگی مردم به عرصه‌های جنگلی اقدامات جدی صورت پذیرد. در این میان توسعه درختکاری با درختان سریع‌الرشد نظیر صنوبر، متناسب با شرایط اقلیمی مناطق مختلف کشور، می‌تواند در کاهش وابستگی کشور به منابع سلولزی و همچنین ایجاد اشتغال و کاهش وابستگی جنگل‌نشینان به عرصه‌های جنگلی تأثیرگذار باشد (کلاگری، ۲۰۰٤). صنوبر به‌عنوان گونه‌ای سریع‌الرشد از جمله درختانی است که به‌دلیل دارا بودن صفاتی از قبیل قدرت تولید جست، نیاز به مراقبت کم، دامنه اکولوژیکی نسبتاً بالا، دوره بهره‌برداری کوتاه‌مدت، قابلیت تکثیر غیرجنسی و امکان اصلاح کمی و کیفی آن، می‌تواند نقش بسیار مهمی در صیانت و احیای عرصه‌های جنگلی تخریب شده کشور ایفا نماید (جعفری مفیدآبادی ۲۰۰۸). به‌همین جهت این موضوع مورد توجه کشاورزان نیز قرار گرفته است. بنابراین توسعه زراعت چوب با گونه‌های سریع‌الرشد صنوبر و همچنین کاشت صنوبر و کاشت اکالیپتوس از دیگر گونه‌های سریع‌الرشد در عرصه‌های منابع طبیعی کشور، یک الزام است (عصاره و اخلاقی، ۲۰۰۹؛ جعفری مفیدآبادی، ۲۰۰۱). از میان گونه‌های صنوبر، هیبریدها به‌خاطر عملکرد بالا بیشتر در طرح توسعه زراعت چوب به‌کار گرفته می‌شوند (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۲۰۰۸؛ جعفری مفیدآبادی و مدیر رحمتی، ۲۰۰۰). هیبرید جدید صنوبر رقم "مفید" از تلاقی بین دو گونه صنوبر پده ***P.euphratica Oliv.*** و صنوبر کبوده ***P. alba L.*** جهت انتقال ژن عامل مقاومت در برابر گرمای هوا و شوری از پده به کبوده با استفاده از تغذیه مصنوعی جنین به‌دست آمده‌است (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۲۰۰۹) به‌همین خاطر این‌گونه برای توسعه زراعت چوب در مناطق گرم توصیه شده. گونه والد مادری هیبرید، صنوبر پده و متعلق به بخش تورانگاه (Turanga) می‌باشد. (کلاگری و همکاران، ۲۰۰۱) که از آسیای شرقی و مرکزی تا افریقای شمالی پراکنده شده و دارای گونه منحصر به فرد صنوبر افراتیکا

(P.euphratica Oliv.) می‌باشد (کلاگری و همکاران، ۱۹۹۸؛ ۲۰۰٤). این‌گونه بومی مناطق گرم و خشک و با خاک شور است که کمتر گونه‌ای از این خانواده می‌تواند در آن مقاومت کند (عصاره و اخلاقی، ۲۰۰۹). با وجود ویژگی‌های یادشده، دارای ساقه‌های خمیده و گاه کج و آفت زده است که این‌گونه را از زمره گونه‌های درختی که دارای چوب صنعتی هستند خارج می‌کند (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۲۰۰٦). این موضوع الزام به‌کارگیری روش‌های اصلاحی ژنتیکی را برای گونه یاد شده و سایر گونه‌های صنوبر فراهم می‌کند (لی و لی، ۱۹۸۵؛ لی و همکاران، ۱۹۸۳؛ کوئیدر و همکاران ۱۹۸٤؛ اشنایدر، ۱۹۷٤؛ کونوکس و همکاران، ۱۹۷۲؛ نوس و همکاران، ۱۹۸٦؛ راکوئین و تیسیرات ۱۹۹۳؛ راجورا و ژوفا، ۱۹۸٤). والد پدری هیبرید یاد شده *P. alba L.* متعلق به بخش لوس Leuce و زیر بخش Albidae می‌باشد که تحمل به شوری آن در مقایسه با سایر گونه‌های این بخش بیشتر است (مین جیبان و همکاران، ۲۰۰۰). ضمن این‌که از تنه سیلندریک و صاف برخوردار است که موجب می‌شود تا از چوب صنعتی مطلوبی برخوردار باشد (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۱۹۹۸؛ سوت و همکاران، ۱۹۲۷؛ زوفا، ۱۹۷۵). با توجه به احتمال تجمیع صفات خوب والدین در این هیبرید، استفاده از آن در توسعه زراعت چوب به‌ویژه در مناطق لب‌شور و شور با دوره رشد طولانی ممکن است مثبت ارزیابی شود و لازم است مورد آزمون قرارگیرد. به‌کارگیری هیبرید در توسعه زراعت چوب در کشور نیازمند بررسی امکان تکثیر انبوه آن با کمک روش تکثیر غیر جنسی سنتی و روش کشت بافت است. این تحقیق به‌منظور مطالعه فاکتورهای مؤثر در تکثیر انبوه آزمایشگاهی هیبرید برای تولید نهال سالم و اصیل بر اساس پروتکل اتحادیه اروپا (EPPO)[1] انجام شده است.

مواد و روش‌ها

سرشاخه‌ها از تک درخت پایه (هیبرید رقم مفید) در فصل پاییز از مزرعه تحقیقاتی گروه تحقیقات زیست فناوری موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور حاوی جوانه‌های جانبی برداشت شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه، جهت پیش سترون‌سازی بر اساس روش معمول در ضدعفونی ریزنمونه‌ها (شهرزاد و امام، ۲۰۰۰) ابتدا توسط آب و مایع ظرف‌شویی برس‌کشی شده‌اند تا کلیه آلودگی‌های سطحی آن پاک شود. جهت سترون‌سازی، جداکشت‌ها (جوانه‌های جانبی به‌عنوان جداکشت به‌همراه

1- Eourpian plant production organization

نیم الی یک سانتی‌متر از ساقه) در دو محلول سترون کننده، تیمار هیپوکلریت سدیم ۲ درصد در دو دوره زمانی ۵ و ۱۰ دقیقه‌ایی و تیمار کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد و در دو دوره زمانی ۱ و ۳ دقیقه انجام شد. اثرات تیمارهای سترون‌سازی در زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در قالب مقایسه میانگین انجام شد. ریزنمونه‌ها پس از چند بار شستشو توسط آب مقطر، جهت استقرار به محیط کشت MS[1] حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA[2] و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[3] منتقل شدند. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۲ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور ٤٥٠٠ الی ٥٠٠٠ لوکس و دوره‌ی روشنایی ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌های استقرار یافته جهت ارزیابی توان شاخه‌زایی (پر آوری)، به محیط‌های کشت شاخه‌زایی MS, DKW[4] و WPM[5] حاوی ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد (جدول ۱) واکشت شدند. ارزیابی توان شاخه‌زایی ریز نمونه‌ها در قالب طرح آماری کامل تصادفی با ۹ تیمار و سه تکرار انجام شد. میانگین تعداد شاخه ایجاد شده روی ریز نمونه و رشد طولی شاخه‌ها به‌عنوان دو شاخص مورد تجزیه و تحلیل اثرات محیط‌های کشت در پرآوری ریز نمونه‌ها قرار گرفت. شاخه‌ها در مرحله ۲ الی ۳ سانتی‌متری رشد طولی به محیط کشت ریشه‌زایی DKW فاقد هورمون‌های رشد گیاهی منتقل شدند. گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن و انجام موفق سازگاری تدریجی در خاک سبک گلدانی (پیت، خاک برگ، ماسه به نسبت ۱:۱:۱) به نهالستان منتقل گردیده‌اند.

جدول ۱- تیمارهای محیط کشت با ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد گیاهی جهت بهینه‌سازی شاخه‌زایی.

Table 1- Culture media combining with different growth regulators treatment for shoot induction.

	BA میلی‌گرم در لیتر mg/l	BA +2ip[6] میلی‌گرم در لیتر mg/l	2ip میلی‌گرم در لیتر mg/l
MS	0.5	0.5 +0.5	0.5
DKW	0.5	0.5 +0.5	0.5
WPM	0.5	0.5 +0.5	0.5

1- Murashige and Skoog 1962
2- 6-Benzylaminopurine
3- Indale-3-butyric Acid
4- DKW/Jugland medium
5- Woody palnt medium
6- N6[2-Isopentyl] adenine

نتایج و بحث

جداکشت برای ریزازدیادی از سرشاخه‌های درخت مادری در فصل پاییز تهیه شد. زیرا در این فصل بخش مریستمی جوانه‌ها که در حالت خواب هستند و توسط فلس‌ها پوشیده شده‌اند از اثـرات سـمی محلول‌های سترون کننده محافظت می‌شوند ضمن این‌که جوانه‌های در حالت خواب تحریـک‌پـذیری بیشتری در مقابل محیط کشت و هورمون‌های رشد در مقایسه با جوانه‌های فعال شده دارند. این نتایج مشابه گزارشات جعفری مفیدآبادی (۲۰۰۰) و شهرزاد و امام (۲۰۰۰) در خصوص گونه‌های دیگری از صنوبر است. برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی در حذف کرک‌ها و ترشحات صمغی سـطح فلس‌ها مؤثر بود و امکان وجود آلودگی‌های سطحی را به حداقل خود می‌رساند. بررسی تیمارهای به‌کار گرفته شده جهت سترون‌سازی ریز نمونه‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها در سطح ۵ در صد برای کنترل آلودگی درون شیشه‌ای، سوختگی ریز نمونه‌ها و زنده‌مانی آن‌ها به روش مقایسه میانگین کی اسکوئر وجود دارد (جدول ۲). استفاده از تیمار کلرورمرکوریک ۰/۱ درصد به‌مدت یک دقیقه موجب بیشترین در صد زنده‌مانی (۹۰ درصد) ریز نمونه‌ها شد (جدول ۲). محلـول کلـرور مرکوریـک کـه از سمی‌ترین محلول‌های سترون‌سازی می‌باشد باید در غلظت پایین یا زمان کوتاه اعمال شود تا کمتر بر جوانه‌ها اثر بگذارد و از انهدام و مرگ بافت‌ها توسط آن جلوگیری شود. این نتایج با نتایج امام و شهرزاد (۲۰۰۰) در صنوبر کاسپیکا و نوس و همکاران (۱۹۸٦) در گونه صنوبر اورامریکانا مطابقت دارد. با این تفاوت که امام و شهرزاد در گونه سفید پلت از سرشاخه‌های درخت بالغ جنگلی برداشت کردند. در این مرحله به‌علت وجود آلودگی زیاد برای سترون‌سازی از محلول کلرورمرکوریک ۰/۱ در زمان طولانی‌تری استفاده نمودند. استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ده دقیقه اگرچه مقدار آلودگی‌ها را کاهش داد لیکن موجب افزایش سوختگی گردید. اختلاف بسـیار معنـی‌داری بـین تیمارهـای سـترون‌سـازی ریزنمونه‌ها در سطح یک در صد برای کنترل آلودگی و مقدار سوختگی آن‌ها در اثـر اعمـال تیمارهـا، مشاهده شده است (جدول ۲). ریزنمونه‌های سالم به‌منظور استقرار قبل از اعمال تیمارهای پرآوری، در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتـر BA و ۰/۰۱ میلـی‌گـرم در لیتـر IBA قبـل از اعمـال تیمارهای پرآوری (شاخه‌زایی و قدرت رویشی شاخه‌ها) به‌مدت یک هفته نگهداری شدند. در مرحلـه استقرار ریزنمونه و شاخه‌زایی استفاده از هورمون IBA به‌میزان ۰/۰۱ میلـی‌گـرم در لیتـر در تحریـک شاخه‌زایی مؤثر بود و افزایش این هورمون تشکیل کالوس را نیز تحریک می‌کند (شهرزاد و امام، ۲۰۰۰).

نوس و همکاران (۱۹۸٦) نیز گزارش کردند که حضور اکسین در محیط کشت، شاخه‌زایی را در کشت کالوس صنوبر تحریک می‌کند.

جدول ۲- اثرات تیمارهای سترون‌سازی در کنترل آلودگی، سوختگی و تولید جدا کشت‌های سالم.

Table 2. Effect of sterilization treatment for control of contamination and survival explant.

تیمارهای سترون‌سازی Sterilization treatment	درصد آلودگی (درصد) contamination	درصد سوختگی (درصد) unsurvival explant	درصد ریز نمونه سالم (درصد) survival explants
هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ۵ دقیقه Sodium hypochlorite 2% 5 min.	18.69**	18.69**	62.61*
هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ۱۰ دقیقه Sodium hypochlorite 2% 10 min.	6.66	6.66	86.66
کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد ۱ دقیقه Chloromercury 0.1% 1 min	5	5	90
کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد ۳ دقیقه Chloromercury 0.1% 3 min.	7	5	88

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون کی اسکوئر

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده (تعداد شاخه در هر جوانه و رشد طولی شاخه‌ها) بر اساس آزمون F نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین محیط‌های کشت برای تعداد شاخه و برای رشد طولی شاخه (سانتی‌متر) وجود دارد (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر محیط‌های کشت به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین محیط‌های کشت برای تولید انبوه نهال درون شیشه‌ای است. محیط کشت DKW حاوی مخلوط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و 2ip موجب بیشترین تعداد شاخه به‌وجود آمده از هر جوانه (۳/۲) شد و با محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در یک گروه قرار گرفت (جدول ٤). بیشترین رشد متوسط طولی شاخه (سانتی‌متر) به‌عنوان منبع اولیه تکثیر انبوه درون شیشه‌ای نیز در محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و 2ip مشاهده شد و با محیط کشت DKW حاوی مخلوط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و 2ip در یک گروه قرار گرفت (جدول ٤). وجود اختلاف معنی‌دار بین محیط‌های کشت بر روی شاخه‌زایی به‌دلیل قدرت یونی متفاوت در سه نوع محیط کشت DKW, MS و WPM می‌باشد. قدرت یونی محیط‌های کشت MS و DKW یکسان لیکن در محیط کشت

WPM اندازه آن به نصف رسید. به‌همین دلیل محیط کشت MS و DKW در مقایسه با محیط کشت WPM از توانمندی پرآوری بیشتری برخوردار گشتند. این نتایج با گزارش راکوئین و تروسارد (۱۹۹۳) همخوانی دارد. مقدار یون کلسیم در محیط کشت DKW حدود سه برابر محیط کشت WPM است (شهرزاد و امام (۲۰۰۰) و همین امر ممکن است در پرآوری درون شیشه‌ای صنوبر هیبرید یاد شده عامل برتری در شاخه‌زایی و افزایش رشد طولی شاخه باشد.

جدول ۳- اثرات محیط‌های کشت در پرآوری (شاخه‌زایی و رشد طولی) بر اساس آزمون F.

Table 3. Effect of culture media on shoot proliferation (mean number of shoot per explants and shoot length) based on F test.

منبع تغییرات S.O.V.	Df	MS		F	
		رشد طولی	شاخه‌زایی	رشد طولی	شاخه‌زایی
محیط‌های کشت	8	1.2926	0.08011	4.74*	2.64*
خطا	18	0.4896	0.01691		
کل	26				

* اختلاف معنی‌دار بین محطی‌های کشت در سطح ۵ درصد

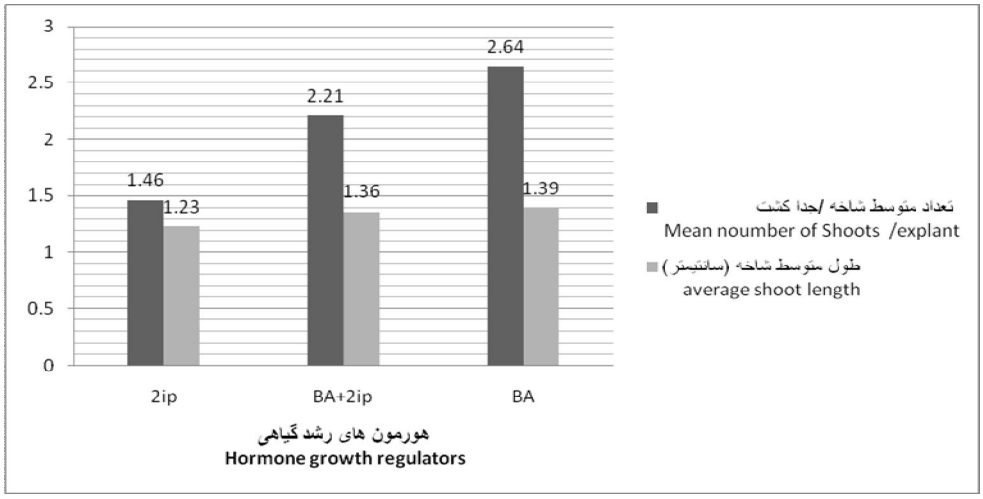
جدول ٤- مقایسه میانگین عملکرد محیط‌های کشت در پرآوری با استفاده از آزمون دانکن.

Table 4. Comparison between mean effect of culture media on shoot proliferation using Ducan multiple test.

محیط کشت Culture media	تیمار هورمونی (میلی‌گرم در لیتر) Hormone treatment Mg/l	تعداد شاخه Number of shoot/explant		رشد طولی Shoot lenght	
		میانگین	گروه‌بندی	میانگین	گروه‌بندی
MS_1	BA (0.5)	3	a	1.39	Ab
MS_2	2ip (0.5)+BA (0.5)	2.85	b	1.23	C
MS_3	2ip (0.5)	1.63	c	1.19	C
DKW_1	BA (0.5)	2.89	ab	1.36	B
DKW_2	2ip (0.5)+BA (0.5)	3.2	a	1.46	A
DKW_3	2ip (0.5)	1.76	c	1.13	C
WPM_1	BA (0.5)	2.46	bc	1.23	C
WPM_2	2ip (0.5)+BA (0.5)	2.31	b	1.58	A
WPM_3	2ip (0.5)	1.46	c	1.18	Bc

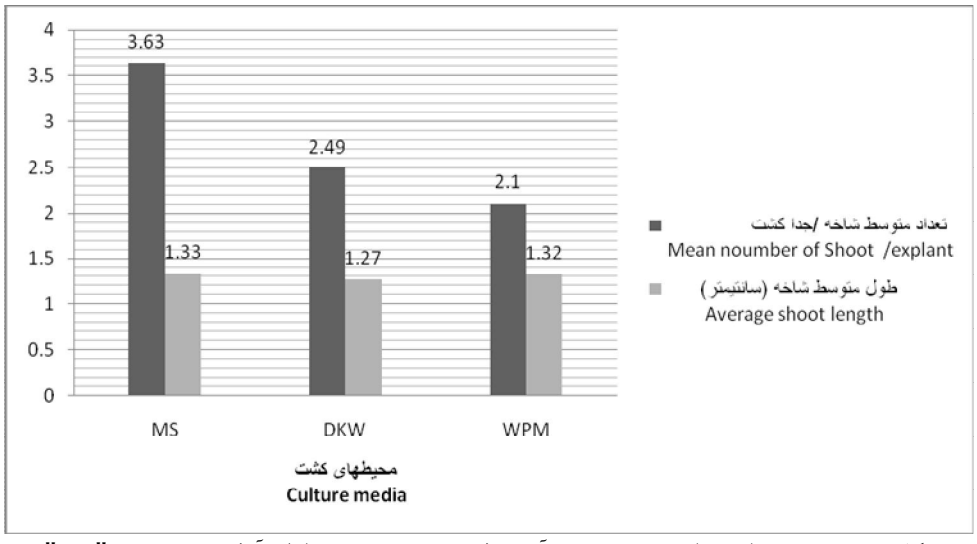
حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

ارزیابی اثرات متوسط هورمونی محتوی محیط کشت‌ها، بیانگر این است که هورمون ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین تعداد ۲/٦٤ شاخه و متوسط رشد طولی شاخه (۱/۳۹ سانتی‌متر) بهترین هورمون رشد گیاهی برای تولید انبوه نهال از طریق کشت می‌باشد (شکل ۱). بررسی اثرات متوسط هورمون‌های رشد گیاهی در تکثیر نیز موید این است که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با غلظت پایین برای تحریک شاخه‌زایی مؤثرتر است. استفاده از مقدار زیاد هورمون رشد گیاهی BA (٦ میلی‌گرم در لیتر) به‌دلیل اثرات نامطلوب موجب رشد چند شاخه‌ای شد (شهرزاد و امام، ۲۰۰۰) بنابراین با توجه به نتایج جدول ٤، مقدار کمتر BA برای تکثیر این‌گونه پیشنهاد می‌شود. مشابه مطالعه جهت تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، محیط کشت فاقد هورمون کاملاً ضروری است. زیرا با نگهداری حداقل به‌مدت یک ماه قبل از اعمال تیمار اکسین برای القای ریشه‌زایی در محیط کشت فاقد هورمون، درصد ریشه‌زایی بالایی اتفاق افتاد. این نتایج با نتایج کونفالونوری و همکاران (۲۰۰۳) در مورد گونه‌های مختلف صنوبر مشابهت دارد. ریشه‌زایی دورگه‌ها در این آزمایش پس از حذف هورمون‌های سیتوکنین به‌راحتی و با درصد بالایی اتفاق افتاد. شهرزاد و امام (۲۰۰۰) نتایج مشابهی با حذف هورمون‌های سیتوکنین و افزایش همزمان هورمون IBA به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در گونه صنوبر پده *P.eupratica* oliv. در ایجاد ۸۲ درصد ریشه‌زایی به‌دست آوردند. امام و شهرزاد در گونه *P.caspica* در مورد پیش تیمار ریشه‌زایی استفاده از محیط کشت MS فاقد هورمون برای یک الی دو هفته و به‌دنبال آن افزایش IBA به‌میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را توصیه نمودند. آرگوس (۱۹۸٦ و ۱۹۷٤) نیز ریشه‌زایی صنوبرهای بالغ را در حضور اکسین NAA و IBA به‌ترتیب با غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترموفق گزارش کرد. ارزیابی اثرات متوسط محیط‌های کشت در تکثیر انبوه نهال هیبرید نشان داد که به‌طور کلی محیط کشت MS با میانگین تعداد ۲/٦۳ شاخه از هرجوانه و متوسط رشد طولی ۱/۳۳ سانتی‌متر (پس از هر واکشت) مناسب‌ترین محیط کشت است و می‌تواند مانند محیط کشت DKW گیاهچه‌های حاصل از چرخه تکثیر در محیط کشت DKW بدون هورمون‌های رشد گیاهی ریشه‌دار شوند (شکل ۳).



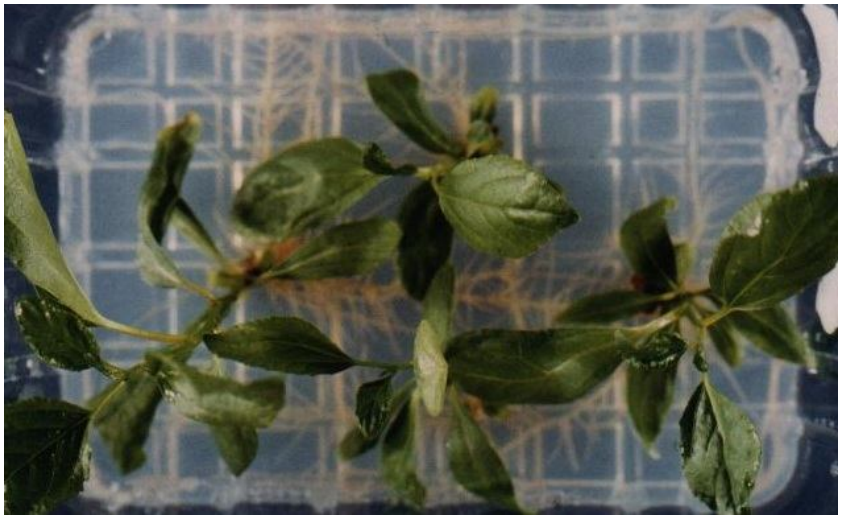
شکل ۱- اثرات متوسط هورمون‌های رشد در پرآوری (تعداد شاخه و رشد طولی آن) صنوبر هیبرید "مفید".

Figure 1-Mean effect of hormone growth regulators on shoot proliferation (mean number of shoot per explants and shoot length) of hybrid poplar “Mofid”



شکل ۲- اثرات متوسط محیط‌های کشت در پرآوری (تعداد شاخه و رشد طولی آن) صنوبر هیبرید "مفید".

Figure 2- Mean effect of culture media on shoot proliferation (mean number of shoot per explants and shoot length) of hybrid poplar “Mofid”



شکل ۳- گیاهان ریشه‌دار شده در محیط کشت DKW فاقد هورمون‌های رشد.

Figure 3- Rooted planltlets in DKW hormone free medium

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی با توجه به پرآوری درون شیشه‌ای مناسب (تعداد شاخه و رشد طولی آن)، محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip باضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA برای تهیه هسته اولیه و چرخه‌های تکثیر بعدی صنوبر هیبرید پیشنهاد می‌گردد. به‌منظور ریشه‌زایی موفق گیاهچه‌های حاصل در محیط کشت DKW فاقد هورمون‌های رشد گیاهی، استفاده از این نوع محیط کشت برای ریشه‌زایی و تولید نهال تجاری توصیه می‌شود.

منابع

1.Argus, G.W. 1974. An experimental study of hybridization and pollination in Salix (willow). Can. J. Bot. 52: 1613-1619.

2.Argus, G.W. 1986. The genus *Salix* (Salicaceae) in the southeastern United States. Syst. Bot. Monogr., 9: 1170.

3.Assareh, M.H., and Akhlaghi, S.J.S. 2009. Strategic Framework for Developing and promoting natural resources research in I.R. Iran, priciples, strategices, approaches. Institute of forests and ranglands. Pp: 379. (In Persian)

4.Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S., and Carbonera, D. 2003. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp: synergy for forest tree Improvement. Journal of Plant cell, Tissue and organ Culture. Springer Netherlands, 72: 109-138.

5.Jafari Mofidabadi, A., Modir-Rahmeti, A., Tavesoli, A., Kazemi, F., Kelagari, M., and Asadi, F. 2009. Application of embryo rescue (ovary, ovule-embryo culture) in interspecific poplar hybridization. J. of Pejohesh and Sazendegi. 43: 38-41. (In Persian)

6.Jafari Mofidabadi, A. 2001. Investigation of hertrotic effect in interspecific poplar hybrid *(Populus caspica* × *Populus alba L.)*. J. of genetic improvement of forests and rangelands plant species. 29: 13-21. (In Persian)

7.Jafari Mofidabadi, A. 2008. Propagation of *Populus caspica* through mature ovary. J. of genetic improvement of forests and rangelands plant species. 29: 13-21. (In Persian)

8.Jafari Mofidabadi, A., Zarin-ball, I., Atemad, A., and Shariet-Nejad. 2006. Application of ovary culture in interspecific hybridization of *Populus caspica* × *Populus alba L.* J. of agri. and Natural Resources. 13: 13-36. (In Persian)

9.Jafari Mofidabadi, A., and Modir Rahmati, A. 2000. Production of *Populus euphratica Olive. X p. alba L.* hybrid poplars through ovary and ovule cultures. Plant Genetic Newsletter. 122: 13-15.

10.Jafari mofidabadi., A., Modir Rahmati, A., and Tavassoli, A. 1998. Application of ovary and ovule culture in *Populus alba L.X.P. euphratica Olive.* Hybridization, Silvae Genetica, 47: 332-334.

11.Kalagari, M. 1998. Investigation of *Populus euphratica* Oliv. Population in Karoon River. J. of Pejouhesh and Sazendegi. 35: 20-26 (In Persian)

12.Kalagary, M. 2004. Investigation of genetic and ecological changing on *Populus euphratica Oliv.* natural population. Ph.D. dissertation Tarbiat Moderss University Iran. (In Persian)

13.Kalagary, M., Jafari Mofidabadi, A., Taberi, M., and Hosseni, S.M. 2001. Intra specific hybridization of Populus euphratica Oliv. Using embryo rescue. J. of Pejouhesh and Sazendegi 61: 6-9. (In persian)

14.Knox, R.B., Willing, R.R., and Pryor, L.D. 1972. Interspecific hybridization of poplars using recognition pollen. Silvae Genet. 21: 125-128.

15.Kouider, M., Skirvin, R.M., and Saladin, K.P. 1984. Culture immature embryo of *Populus deltoides In Vitro*. Can. J. For. Res. 14: 965-958.

16.Li, W., and Li, J. 1985. *In vitro* culture of hybrid ovules in *Populus*. Sci. Sliv. 21: 339-346.

17.Li, W., Wang, R., and Zhu, X. 1983. On the embryo development and ovule culture of interspecific hybrids between *Populus simonii* and *P. pyramidalis* Barkh. Acta Bot Sin. 25: 409-417.

18.Mingiian, P., Zhongyu, T., Baosong, W., and Qun, G. 2000. The Potential of willow genetic improvement. International Poplar Commission. Abstract of papers and presented at the 21 st Session of the Commission.

19.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A L.revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15: 473-479.

20.Noh, E.R., Kao, Y.B., and lee, S.K. 1986. Hybridization between incompatable popular species through ovary and embryo culture. Res. Rep. Inst for. Genet. 22: 9-14.
21.Rajora, O.P., and Zsuffa, L. 1984. Interspecific crossability and its relation to the taxonomy of the genus populus. In Proceedings of the 17th session of the International Poplar Commission, Ottawa, Canada.
22.Raqiun, C., and Trousard, L. 1993. *In vitro* ovary embryo culture as a tool for poplar hybridization Can. J. Bot., 71: 1271-1275.
23.Savaka, M.A., Dawson, J.O., Jokela, J.J., and Skirvin, R.M. 1987. A liquid culture method for rescuing immature embryos of eastern cottonwood. Plant Cell Tissue Organ Cult. 10: 221-226.
24.Schreiner, E.J. 1974. *Populus L.* Poplars. In Seeds of Woody Plants in the United States. Edited by C.S. Schopmeyer. Agricultural Handbook No. 450, forest Service, USDA, Washington, DC. Pp: 645-655.
25.Sharzad, S., and Emam, M. 2000. Asexual propagation of *Populus euphratica* Oliv. Using tissue culture. 2000. J. of genetic improvement of forests and rangelands plant species 29: 13-21 (In Persian)
26.Sout, A.B., Mckee, R., and Shreiner, F. 1927. The breeding of forest trees for pulpwood. N.Y. Bot. Gar. 28: 49-63.
27.Zsuffa, L. 1975. A summary review of inter specific breeding in the genus *Populus L.* In Proceedings 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, part 2. Dept. Environment, Canadian Forestry Service, Ottawa. Pp: 107-123.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 22 (3), 2015
http://jwfst.gau.ac.ir

Asexual reproduction of hybrid poplar "Mofid" (*Populus euphratica* Oliv. X *P.alba* L.) using tissue culture

A. Jafari Mofidabadi[1] and S. Sharzad[2]
[1]Associate Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan,
[2]Expert, Reaserch Institute of Forests and Ranglands
Received: 06/02/2014 ; Accepted: 07/05/2015

Abstract
Background and objectives: Decreasing of pressure on the forest area and wood production need to develop of wood cultivation. Wood cultivation with fast growing tree species such as poplar are being done in the country. In order to increasing wood yield, hybrids polars with highest yield have been often used. Mass production of new introduced hybrid cutting through conventional approaches need long time due to lack of initial sources. Therefore an *in vitro* system has to be applied for mass and quick cutting production.
Materials and methods: In order to establish *in vitro* proliferation of new hybrid poplar "Mofid" (*Populus euphratica* Oliv. × *P.alba* L.*)*, shoots were collected from mature tree in Research nursery belongs to the department of Research Institute of Forests and Rangelands. Explants with single node were disinfected by different isolation treatment and for establishment were transferred to MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.01 mg/l IBA. For shoots proliferation, established explants were transferred to the DKW, MS, WPM containing different combination and concentration growth regulators hormone treatment. For evaluation of most affecting factors on *in vitro* proliferation, the experiment was conducted in a completely randomized design with 9 treatments including three media (MS,WPM and DKW) and three growth regulators hormones (BA+ 0.5 mg/l, 2ip +0.5 mg/l and BA+0.5 mg/l plus 2ip+0.5 mg/l) with three replication. DKW hormone free medium was used for root induction.
Results: Mercuric chloride with % 0.1 (W/V) concentrated solutions for 1 minute with 90% survival rate of explants appeared to be suitable disinfection treatments. The establishments of explants were taken in MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.01 mg/l IBA. Analysis of variance indicated that there is significant differences between media for axillary shoot proliferation at α=0.5% level. Highest

*Crosponding author: jafarimofidabadi@gamil.com

shoot proliferation (3.2 mean number of new induced shoots per explant) and shoot elongation (1.465 cm mean height of shoots) have been observed for DKW medium containing 0.5 mg/l 2iP plus 0.5 mg/l BA. Numerous micropropagation circles have been initiated by *in vitro* nodal segments of shoots. Roots were induced in DKW hormone free medium after two weeks. Acclimatization of rooted plantlets took place in polyethylene caps jam bottle, containing a light soil (Peat, hummus and sand in equal percentages) in growth chamber. Successfully acclimatized plantlets transferred to field.

Conclusion: Mass *produc*tion of new introduced poplar hybrid "Mofid" can be easly achieved through single node culture in DKW medium containing 0.5 mg/l 2iP plus 0.5 mg/l BA and numerous propagation cycle. Commercial cutting production of this new hybrid is nessecery for wood cultivation development in the country.

Keywords: Shoot tips, Axillary bud, Hybrid poplar "mofid", *Populus euphratica* Oliv. × *P.alba* L., Micropropagation and asexual reproduction