تکثیر غیر جنسی پده (*Populus euphratica*) به روش کشت بافت

شکوفه شهرزاد[۱]، *میترا امام*[۲]

چکیده

پس از انتخاب پایه از رویشگاههای مناسب و برداشت سرشاخه‌ها، عملیات سترون سازی بر روی جوانه‌ها انجام گردید بطوریکه تیمارهای:

۱- شستشو با آب و مایع ظرفشویی

۲- شستشو با بنومیل ۱٪ بمدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه

۳- سترون سازی با اتانول ۷۰٪ بمدت ۳۰ ثانیه

۴- کلرور مرکوریک ۰/۱٪ بمدت یک دقیقه

به ترتیب به عنوان بهترین روش پیش سترون سازی و سترون سازی انتخاب گردیدند. نمونه‌ها در محیط کشت‌های مختلف با غلظتهای هورمونی متفاوت مستقر گشتند. یادداشت‌برداری از میزان رشد طولی، ضریب ازدیاد، سبزینگی، میزان کالوس و شیشه‌ای شدن سطوح شاخ و برگها، انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان داد که بهترین محیط کشت جهت استقرار، شاخه‌زایی و تکثیر، محیط کشت MS با نصف میزان نیترات وهورمونهای BA و Kinetin به میزانهای ۰/۵ میلی گرم بر لیتر و IBA بمیزان ۰/۰۱ میلی گرم برلیتر است. ریشه‌زایی بر روی محیطهای کشت پایه مشترک با تغییر در میزان و نوع و نیز تلفیق هورمون ریشه‌زا، انجام گردید و بهترین میزان ریشه‌زایی از لحاظ کیفی و کمی‌نیزبا حضورIBA بمیزان ۰/۱میلی گرم بر لیتر تعیین گشت. گیاهچه‌های حاصله در خاک استریل سبک (حاوی

۱- کارشناس مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

۲- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

پیت، خاک برگ و ماسه به نسبت مساوی) کشت و پس از انجام موفق سازگاری تدریجی در ژرمیناتور و گلخانه به مزرعه انتقال داده شدند.

واژه‌های کلیدی

خارج از شیشه *Ex vitro* ، درون شیشه *In vitro*، ریز ازدیادی Micropropagation،پده *Populus euphratica*، کشت سر شاخه Shoot tip culture

مقدمه و هدف

پده درختی دو پایه از تیره ***Salicacea*** و از راسته ***Amentales*** می باشد. گونه‌های این تیره درختی و درختچه‌ای هستند این درخت گسترش بسیار وسیعی دارد و با توجه به اینکه بومی مناطق گرم و خشک است و مقاومت آن نسبت به خاک شور زیاد می باشد (ثابتی ۱۳۴۴) بایستی از کشت و توسعه این گونه بیش از پیش استقبال نمود. درخت پده با توجه به خصوصیات رشدی مناسب و نورپسندی شدیدی که در کنار مقاومتش به شوری و ایستادگی در مقابل شنهای روان دارد، اهمیت بسزایی جهت کاشت در اطراف کویرهای مرکزی ایران و خوزستان پیدا کرده است. خواص فیزیکی و کاربرد اقتصادی چوب پده، در کنار سایر خصوصیات آن قابل توجه می باشد و با توجه به برخی مشکلات زادآوری این گونه، از طریق قلمه، ریشه جوش و یا پاجوش، روش کشت بافت آن، اهمیت خاصی پیدا می نماید (ضیایی ۱۳۶۸).

هدف از این تحقیق بررسی بکارگیری تکثیر غیر جنسی پده به روش کشت بافت بود که پس از انتخاب پایه مناسب از رویشگاههای طبیعی گیاه، و با بکارگیری بهترین روش سترون سازی و استفاده از غلظتهای مختلف هورمونی، بهترین تیمار جهت شاخه‌زایی، تکثیر و ریشه‌زایی با در نظر گرفتن متغیرهای رشد طولی و ضریب ازدیاد

تعیین گردید. این گونه به لحاظ مقاومت به دامنه شوری و اسیدیته و همچنین پراکنش وسیعش در ایران، در دورگ‌گیری بین گونه ای و داخل گونه‌ای همواره به عنوان یکی از والدین مورد استفاده قرار می‌گیرد و جهت تکثیر انبوه هیبریدهای تولید شده از طریق مذکور نیز، نیاز به تکنیک ریز ازدیادی می‌باشد.

همچنین اصلاح ژنتیکی پایه‌ها با استفاده از روش کشت بافت و تکثیر پایه‌های برگزیده، و امکان تداوم کار در کلیه فصول سال و دست یابی به تعداد زیادی نهال طی مدت زمانی کوتاه، از دیگر مزایای این نوع زادآوری است

مواد و روشها

نمونه‌ها از مناطق رویشگاهی استان خوزستان (حاشیه رودخانه کارون)، استان تهران (باغ گیاهشناسی مؤسسه) و استان کرمان به ترتیب از درختان ۲۰ ساله، ۲۳ و ۳۰ ساله جمع آوری شد.

برداشت سر شاخه‌ها از پایه برگزیده (تنه صاف واستوانه ای شکل و دارای چتر متقارن) در فصول مختلف سال انجام گرفت و پس از جدا سازی برگها و قسمتهای زائد، بخشهای انتهایی سرشاخه‌ها با ابعاد حدود ده سانتی متر با شرایط مختلف پیش سترون‌سازی اولیه مانند، شستشو با آب و مایع ظرفشویی و استفاده از قارچ کش ۱٪ به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه و تلفیق روشهای فوق، یا بصورت کاملاً خشک و بدون استفاده از محلولهای پیش سترون‌سازی، در داخل پلاستیکهای تمیز در درون یخچال نگهداری شده و در کوتاهترین زمان ممکن به آزمایشگاه کشت بافت انتقال داده شدند.

به منظور کاهش آلودگی‌های سطحی نمونه‌ها سرشاخه‌های جدا شده، با مایع ظرفشویی و آب برس کشی شده و سپس بمدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در قارچ کش بنومیل ۱٪ غوطه‌ور، و پس از آن چندین بار توسط آب مورد شستشو قرار گرفتند. متعاقب آن ریز

نمونه‌ها در اندازه‌های ۰/۵تا۲ سانتی‌متری آماده شده و در الکل ۷۰٪ بمدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور گردیدند (جدول ۱).

پس از مراحل فوق در داخل اتاقک تمیز، سترون سازی بر نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های گیاهی به ترتیب در محلولهای سترون کننده مانند هیپوکلریت سدیم و کلرور مرکوریک ۰/۱٪ در مدت لازم غوطه‌ور گردیدند. (محلول سترون کننده میتواند فقط یکی از محلولهای فوق باشد). مجدداً مواد گیاهی توسط آب مورد شستشو قرار گرفتند و بدین ترتیب آماده کشت شدند.

به علت وجود آلودگی نهان در گونه پده، پس از دو بازکشت متوالی، ترشحات باکتریایی ایجاد گردید. عدم مقابله با آلودگیهای نهان منجر به نکروزه و زرد شدن گیاهان گردید. لذا در محیط کشت این گیاهان بایستی از آنتی بیوتیک مشخصی استفاده نمود (۱).

در این تحقیق پس از استفاده از تعدادی آنتی بیوتیک، استفاده‌از Carbenicillin موفقیت بیشتری را دارا بود و نمونه‌ها در دامنه غلظتی ۵۰تا ۴۰۰میلی گرم بر لیتر مورد آزمایش قرار گرفتند این آنتی بیوتیک در آب محلول بوده و این محلول توسط دستگاه فیلتر استریل سترون گردیده و به محیط کشت واجد دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد اضافه گردید. پس از سترون سازی مواد گیاهی در اتاقک تمیز و در شرایط کاملاً سترون و کنار شعله، عملیات کشت انجام شد و جوانه‌های استریل شده به محیطهای کشت تهیه شده جهت استقرار، انتقال یافتند. سپس جوانه‌های مستقر شده در شیشه‌ها در سبدی با فاصله مناسب چیده و به اتاقک رشد منتقل شدند (تصویر ۱). بازکشت مکررجوانه ها، ماهیانه و با حذف نمونه‌های آلوده و قسمتهای خشک و کالوس مانند انجام می‌گرفت. و جوانه‌های سر سبز و سر حال در محیط کشت‌های MS[1] با

1- Mourashige and Skoog medium

نصف میزان نیترات، WPM (8) و DKW(5) در دامنه هورمونی متفاوت IBA بمیزان ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و BA[1]، Kinetin هر کدام بمیزان صفر تا یک میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفتند، بنابر این در مجموع سه محیط کشت با سه تیمار هورمونی متفاوت، یا ۹ تیمار در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت و در هر تیمار ۳۰ تکرار در نظر گرفته شدو در هر تکرار ریز نمونه‌های مستقر شده بطول یک تا یک ونیم سانتی‌متر بودند. پس از سه بار تکرار عملیات و تهیه گزارش، در انتهای هر دوره با احتساب میانگین‌های مربوط به عوامل مورد بررسی، نتایج حاصل در قالب طرح آماری فاکتوریل در طرح پایهٔ به‌طور کامل تصادفی تجزیه شدند و میانگینها با روش دانکن مورد دسته‌بندی قرار گرفتند. پس از بدست آمدن بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، شاخه‌های پده تکثیر گردیدند (تصویر ۲) و نمونه‌های با طول ۲ الی ۳ سانتیمتر، جهت ریشه‌زنی وارد مرحله ریشه‌زایی شدند. در این مرحله نیز ابتدا کلیه شاخه‌ها را در محیط کشت پایه مناسب فاقد هورمون مستقر کرده و پس از حدود ۱۵ تا ۲۰ روز، بازکشت شاخه‌های مربوط به محیط ریشه زا، انجام گردید. در برخی مواقع شاخه‌ها در این نوع محیط ریشه‌دار می‌شدند و این مسئله در کوتاه سازی زمان کاشت و باز کاشت گیاهچه، تا مرحله انتقال آن به خاک موثر می‌باشد، بدین ترتیب مرحله ریشه دار کردن گیاه در محیط کشت، از کار حذف می‌گردید. در غیر این صورت، شاخه‌های سالم و فاقد ریشه را از محیط کشت بدون هورمون ویا محیط کشت شاخه‌زایی اولیه به محیط دارای هورمونهای ریشه زا مانند NAA[2] و IBA در محدوده غلظتی ۰/۱ تا ۱ میلیگرم بر لیتر، بطور منفرد یا تلفیقی، منتقل گردیدند. سپس نمونه‌های هر تیمار هورمونی بطور مساوی تحت تأثیر تیمارهای تاریکی و روشنایی قرار گرفت. علاوه بر آن قاعده تعدادی از شاخه‌ها برای مدت سی ثانیه تا یک دقیقه در محلول غلیظ IBA (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) فرو برده و

1- Indole Butiric Acid

2-Naphtalene acetic acid

سپس به خاک انتقال یافتند و تعدادی از شاخه‌ها بدون فرو بری در هورمون جهت ریشه‌زایی به خاک منتقل شدند. خاک مورد نظر جهت انتقال شاخه‌ها نیز تشکیل شده بوداز (ماسه، پرلیت و خاک برگ به نسبت مساوی) که قبلاً بمدت یک ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی گراد سترون گردیده بود. پس از آنکه عملیات ریشه‌زایی انجام شد (تصویر ۳) و طول ریشه‌ها به ۳ میلی‌متر یا بیشتر رسید، گیاهچه‌های حاصل به خاک منتقل گشتند و پس از آبیاری توسط آب و محلول قارچ کش بنومیل ۰/۵٪ و قرار دادن سر پوشهای پلاستیکی بر دهانه گلدان (جهت حفظ رطوبت در اطراف گیاه تازه انتقال یافته) آنها را به ژرمیناتور منتقل کرده و پس از ده روز سرپوشها را برداشته و گیاهچه هامورد آبیاری قرار گرفتند و مجدداً سر پوشها را قرار داده و در طی یک هفته منافذی در آن، جهت سازگاری گیاهچه با رطوبت هوای داخل ژرمیناتور ایجاد شد و با افزودن به این منافذ، طی دو تا سه هفته، بطور کلی سرپوشهارا برداشته (تصویر ۴) و به مرور، نهال‌ها با شرایط طبیعی و خاک غیر استریل گلخانه و مزرعه سازگار گشتند (تصویر ۵ و ۶).

سابقه تحقیق

علیرغم پژوهشهای زیاد انجام شده در زمینه کشت صنوبر از سال ۱۹۳۴ به بعد، تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه کشت بافت این گونه، از جمله کشت جوانه آن انجام نگرفته است. Garcia-Valdecantos و همکارانش در سال ۱۹۸۹ اعلام کردند تمام کارها و تجارب بدست آمده در مورد کشت بافت پده ناموفق بوده زیرا استریل کردن نمونه‌های بالغ با مشکل روبرو بوده است و Xu Miaozhen و همکارانش در سال ۱۹۷۸ پس از بریدن قاعده شاخه پده و غوطه ور سازی آن درمحلول IBA چهل میلی گرم بر لیتر برای مدت ۱/۵ساعت، شاخه‌ها را به محیط فاقد هورمون منتقل نمودند و پس از ۱۰۹ روز توانستند ریشه‌های خاکستری مشاهده نمایند. در ایران تحقیقات برروی صنوبر در سال ۱۳۷۰ آغاز گردید و کشت جوانه انتهایی *P. tremula* در سال ۱۳۷۴

توسط نراقی، تا حد تولید گیاهچه و تولید نهال موفقیت‌آمیز بود (منتشر نشده) و همچنین کشت جوانه انتهایی و ایجاد نهال *P. caspica* توسط امام در سال ۱۳۷۶انجام گردید (منتشر نشده) و جعفری در سال ۱۳۷۷، به ایجاد دو رگ دوطرفه بین *P.alba* × *P.euphratica* و *P.euphratica* ×*P.alba* اقدام نمود که در دورهٔ اجرای این تحقیق اقدام به کشت بافت و سلول گونه‌های مختلفی از صنوبر نیز نمود.

نتایج

برداشت سرشاخه‌های پده از جنگلهای خوزستان واقع در حاشیه رود کارون به علت ضعیف بودن پایه‌ها، بیش از دو مرتبه انجام نگردید و در نهایت کار بر روی پایه‌های برگزیده پده، واقع در موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع تهران و استان کرمان، ادامه یافت. قابل ذکر است کلیه درختان موجود در تهران، کرج، خوزستان و استان کرمان و همچنین سایر نقاط ایران دارای آفت شته مومی بوده که این آفت سلامت گیاه را بطور جدی تهدید می‌نماید.

بهترین زمان برداشت جوانه از درختان فوق، تابستان و اوایل پاییز بوده، و کشت جوانه‌های فوق در ادامه پاییز و زمستان، علی‌رغم محدودیت جوانه‌ها در هر شاخه، با اجرای عملیات فلس برداری امکان پذیر است. استقرار جوانه‌های برداشت شده از باغ گیاه شناسی با موفقیت انجام گردید و کلیه تیمارها در مورد نمونه‌های استان کرمان هم موفقیت آمیز بود. نهایتاً مواد گیاهی با قطع انتهایی سر شاخه به طول ده سانتی متر و حذف پهنک برگهای آنها از محل اتصال به دمبرگ و بصورت کاملاً خشک در پلاستیکهای سر بسته و در یخچال نگهداری شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

از بررسی روشهای پیش سترون‌سازی و سترون‌سازی مواد گیاهی مربوط به دو استان تهران و خوزستان نتایج زیر بدست آمد (جدول ۱):

- استفاده از قارچ کش بنومیل در فاصله زمانی برداشت تا کاشت باعث افزایش

جوانه‌های از دست رفته می شود و در تیمار پیش سترون سازی هم تأثیر مثبتی در کاهش آلودگیها ندارد.

-با کاهش مدت نگهداری جوانه، از زمان برداشت تا کاشت، میزان آلودگی پس از استقرار جوانه‌ها، کاهش می یابد.

-استفاده از کلرور مرکوریک ۰/۱٪بمدت یک دقیقه، برای سترون سازی جوانه‌های پده ضروری میباشد ولی جهت احتیاط می توان از هیپو کلریت سدیم ۲٪ بمدت چند دقیقه قبل از تیمار فوق استفاده نمود.

-اضافه نمودن Carbenicillin بمیزان ۱۰۰میلی گرم بر لیتر جهت حذ ف و کنترل آلودگیهای باکتریایی نهان در پده موثر بوده و می توان با اضافه نمودن این آنتی بیوتیک به محیط کشت پده، طی ۴تا ۵بازکشت، بطور کلی آلودگی نهان را حذف نمود.

محیط کشت MS با نیترات کامل به لحاظ بالا بودن غلظت یون نیترات آن، باعث شیشه‌ای شدن و کالوس زایی شاخ و برگها گردید (حدود ۸۰٪). بنابراین ترجیح داده شد محیط کشت فوق، در ادامه بررسی حذف گردد. استقرار جوانه‌ها بر روی محیط کشت پایه MS با نصف میزان نیترات همراه با هورمونهای BA بمیزان ۰/۵میلی گرم بر لیترو IBA بمیزان ۰/۰۱میلی گرم بر لیتر انجام گردید. قابل ذکر است نمونه‌های مورد بررسی در اجرای طرح آماری از پایه‌های موجود در استان کرمان می باشد. پس از استقرار مواد گیاهی برمحیط فوق از ریز نمونه هایی با ابعاد یک تایک ونیم سانتی متربرای بررسی نحوه تأثیر محیطهای کشت متفاوت بر رشد و تکثیر ریز نمونه‌ها در محیطهای MS با نصف میزان نیترات، WPM و DKW با سه نوع غلظت هورمونی انجام شد. نتایج مربوط نشان داد محیط کشت MS با نصف میزان نیترات به عنوان محیط کشت بهینه بر روی میانگین جوانه زنی، شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه‌ها، اثر مناسبتری داشته است (جدول ۵). اگرچه تفاوت معنی داری بین محیطهای MS با نصف میزان نیترات، WPM و DKW وجود ندارد ولی محیط کشت MS با نصف میزان نیترات، در رشد

مناسب شاخه ها و افزایش سبزینگی آنها موثرتر از دیگر محیطهای کشت مورد بررسی بوده است. زیرا شاخه‌ها در محیط کشت DKW حدود ۶۰٪ شیشه‌ای شده و کالوس زایی شدید از خود نشان دادند. و در محیط کشت WPM حدود ۴۰٪از شاخه‌ها دارای سبزینگی کم و تا حدودی متمایل به زرد بودند.

ترکیب هورمونی BA و kinetin هرکدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهمراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌لحاظ میانگین‌جوانه‌زنی، شاخه‌زایی و رشد طولی‌برتر شاخه‌ها، بهترین تیمار هورمونی محسوب گشت.

در مرحله ریشه‌زایی هم از ریز نمونه‌های متعلق به استان کرمان استفاده گردید. مصرف محیط کشت MS با نصف میزان نیترات و فاقد هورمون، نه تنها ریشه‌زایی را در پده تحریک ننمود و زمان ایجاد ریشه را در مرحله بعد کوتاهتر نکرد بلکه باعث شد شاخه‌های مستقر شده در این محیط مقداری از سبزینگی خود را از دست دادند، لذا جهت ریشه‌زایی از محیط کشت MS با نصف میزان نیترات همراه با IBA بمیزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد (جدول ۲) و پس از ۱۰ تا ۱۵ روز، ۸۲٪ ریشه‌ها نمایان گردیدند و طی ۳ تا ۴ روز، نهالها آماده انتقال به خاک گشتند (تصویر۳). استفاده از هورمون NAA بمیزان ۰/۵میلی گرم برلیتر به تنهایی و نیز تلفیق آن با IBA بمیزان ۰/۱ میلی گرم بر لیتر در تیمارهای تاریکی و روشنایی پس از ۸ تا ۱۰ روز، ریشه هایی با وضعیت غیر طبیعی وکالوس مانند ایجاد کرد. استفاده از کلیه تیمارهای *Ex vitro* نیز در ریشه‌زایی نمونه‌ها، موثر نبود (جدول ۳).

گیاهچه‌های حاصل پس از دو تا سه هفته در داخل گلدان و با ۹۳٪ موفقیت سازگار شدند (تصویر ۴). و هنگامی که نهالهای سازگار شده به طبیعت انتقال یافتند ۱۰۰٪ آنها به زندگی ادامه دادند و پس از ده تا پانزده روز استقرار در مزرعه، رشد رویشی بسیار خوبی را آغاز کردند (تصویر۵). نهالهای فوق پس از گذراندن دو فصل رویشی، دارای ۳تا۴متر طول و ۶تا۷سانتیمتر قطر برابر سینه شدند (تصویر ۶).

بحث و نتیجه گیری

بطور کلی دو راه برای مبارزه با آلودگی نهان وجود دارد:

۱ - کشت مریستم: زیرا میکروارگانیسم‌ها در درون سلولهای ناحیه مریستمی وجود ندارند.

۲ - اضافه کردن آنتی بیوتیک به محیط کشت : از آنجا که کشت مریستم خیلی پیچیده است، اضافه کردن آنتی بیوتیک به محیط کشت ساده ترین راه حذف آلودگی نهان می باشد.

استفاده از آنتی بیوتیک نیاز به دقت کافی دارد، چرا که غلظتهای زیاد آنتی بیوتیک مانع رشد و نمو گیاهان عالی، و باعث ایجاد مقاومت در باکتریها می شوند (پیریک ۱۳۷۶).

در مرحله استقرار جوانه و شاخه‌زایی از محیط کشت‌های متفاوت همراه باIBA بمیزان ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر استفاده گردید، زیرا وجود این میزان هورمون اکسین، اندامزایی را در مرحله شاخه‌زایی تحریک نموده و اگر بمیزان آن اضافه شود تشکیل کالوس می‌دهد.

در بررسی مواد شیمیایی چهار محیط کشت بکار رفته، اختلاف اساسی بین محیطهای کشت پایه، در میزان ماکروالمانهای آنها می‌باشد، که احتمالاً مقدار نیتروژن دخالت بیشتری در این امر دارد، بطوریکه اگر به محیط کشت WPM میزان نیتراتی مشابه با محیط کشت MS اضافه نماییم، نتایجی همسان با محیط کشت MS نشان می‌دهد (Bonga و Adercas، ۱۹۹۲) (جدول ۴). علت اصلی تفاوت، قدرت یونی محیط کشتها می باشد، همانطور که رشد گیاهان مورد آزمایش (Azulea , Kalina) کاملاً در محیط کشت WPM و GD که دارای قدرت یونی مشابه می‌باشند، یکسان بود ولی بین WPM یا GD با MS تفاوت بسیار زیادی وجود داشت و قدرت یونی محیط کشت GD و WPM نسبت به MS پایین‌تر بود (Bonga و Adercas، ۱۹۹۲)، (McCown و Sellmer، ۱۹۸۷). با مقایسه چهار محیط کشت مورد استفاده در طرح

مشاهده شد که تفاوت عمده محیط کشت DKW و MSبا محیط کشت WPM در میزان قدرت یونی آنها بوده (جدول ۴) و باز با توجه به همان جدول مشاهده شد که قدرت یونی نیتروژن در محیط کشت MS نسبت به سایر محیطها بیشتر است و این خود توجیهی بر شیشه‌ای شدن برگها و ساقه‌ها در محیط کشت MS بمیزان ۸۰٪ و در محیط کشت DKW بمیزان ۶۰٪ می‌باشد، زیرا یکی از عوامل مهم و موثر بر شیشه‌ای شدن بافتها، نیتروژن بالای محیط کشت می باشد (McCown و Sellmer، ۱۹۸۷). بنابر این با کاهش میزان نیترات بمقدار یک دوم در محیط کشت MS، محیط مناسبی بدست آمد. با مقایسه قدرت یونی سه محیط کشت MS با نصف میزان نیترات، DKW و WPM مشخص گردید که تفاوت عمده بین آنها در میزان غلظت یونهای No_3^- ، NH_4^+ ، K^+ ، So_4^{-2} می‌باشد. نسبت غلظت یون آمونیوم به یون نیترات، در مناسبترین حالت بصورت ۱ به ۳ بوده و استفاده از این دو یون علاوه بر کنترل PH محیط کشت، باعث تحریک اندامزایی گردید (۷).

در مرحله ریشه‌زایی حذف هورمون BA از محیط کشت و اضافه نمودن هورمون اکسین به آن در ایجاد ریشه در ریز نمونه‌ها بسیار مؤثر بود.

سپاسگزاری

از همکاران ارجمندم خانم‌ها، مهندس ایزدپناه و مهندس نراقی در گروه کشت بافت و آقای دکتر نادری شهاب که در زمینه میکروبیولوژی مرا راهنمایی نمودند و همچنین از آقای مهندس کلاگری و آقای دکتر مدیر رحمتی که اطلاعات و مقالات با ارزشی در زمینه انتخاب رویشگاهها و همچنین فنولوژی و کاربردهای اقتصادی این گونه در اختیارم قرار دادند کمال تشکر را می نمایم.

از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که امکانات کافی را مهیا نمودند تا این تحقیق با موفقیت به انجام رسد و از مسئولین محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی که طی سالهای اجرای این طرح بر سر کار بودند کمال تشکر را می نمایم. از بخش تحقیقات گیاه‌شناسی، اداره کل منابع طبیعی استانهای خوزستان و کرمان که همکاریهای بسزایی در جهت انتخاب پایه برگزیده نمودند بی نهایت سپاسگزارم.

منابع

۱ - پیریک آر، ال. ام. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافتهای گیاهی، ترجمه دکتر عبدالرضا باقری با همکاری مهندس مهری صفاری، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲ - ثابتی، حبیب الله. ۱۳۴۴. درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۲۷۰.

۳ - ضیائی ضیابری، سید فخرالدین، ۱۳۶۸. پده (***Populus euphratica***)، صنوبری از بخش تورانگا، مجموعه مقالات سمینار جنگلکاری و درختکاری در زمینهای مرطوب، آبگیر و ماندابی، سازمان پژوهشای علمی و صنعتی ایران.

4- Bonga, J.M. and P. Von Adercas 1992. *In Vitro* culture of trees, 236 pp.

5- Driver, J. A. and H. Kuniyuki 1984. *In Vitro* propagation of paradox walnut root stocks, (***J. hindsii X J. rejia***) Hort. Science 19: 507-509.

6- Jafari Mofidabadi, A., A. R. Modir-Rahmati, and A. Tavasoli 1998. Application of ovary and ovule culture of ***Populus alba X Populus euphratica*** Olive. Hibridization, Silvea Genetic 47: 332-334.

7- McCown, B. H. and J. C. Sellmer 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Bonga, J.M. and Durzan, Dony , Cell and tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff Pub. (V1). (4-16).

8- McCown. B. H. 1987. North American hardwood. In: Bonga J.M., and Durzan-Dony. Cell and tissue culture on forestry, V2, Martinus, Nijhoff Pub. (246-260).

9- Garcia-valdecantos. J. L., and A. Padro 1989. Vegetative propagation of *Populus euphratica* in spoin. Recent developments in poplar selection and propagation techniques proceedings Meeting of the EUFRO working party, 52.02.10. Hann. Munden, October 2-6 185-189.

10 - Murashige. T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassy, With tobaco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.
11 - Wang, S. and C. Binghao, and L. Haqun 1996. Euphrates Poplar forest. China Environmental Science Press, Beijing.

Micropropagation of *Populus euphratica* using tissue culture

Shahrzad, Sh.[۱], *Emam, M.*[۲]

Abstract

After selecting the elite trees of ***Populus euphratica*** in different localities , shoot tips were excised and the buds were sterilized with different treatments as follows:

1 - Washing by tap water and detergent.

2 - Sterilizing in 1% benlate for 30 to 60 minutes.

3 - Sterilizing in 70% ethanol for 5 minutes.

4- Sterilizing in 0.1% mercuric chloride for 1 minute.

These were selected as the best methods of sterilization. The explants were established in different media with different ranges of hormones. Regarding factors such as shoot length growth, roliferation, greenish, callus induction and vitrificated explants in this expriment the best medium for stablishing, shooting and regeneration of shoots was selected. MS medium with half strenght of nitrate and BA : 0.5 mg/l, Kinetin :0.5 mg/l, IBA : 0.01 mg/l were selected as the best medium. Then rhyzogenese treatments on this media was done with changing concentration , type and combination of rooting hormones. The best rooting level was obtained by 0.1 mg/l of IBA. Then the plantlets were established in strile soil (Peat - Sand - Homus in equal perecentages) with polyethylen cap and this plantlets then were transferred to germinator. Acclimatization steps on this plants were successfuly accomplished.

1- Plant biology expert (BSc.) of Research Institute of Forests and Rangelands

2- Scientific board member of Research Institute of Forests and Rangelands

جدول شمارهٔ ۱- روشهای مختلف سترون‌سازی و استقرار جوانه‌های پده

ردیف	محل برداشت نمونه	تاریخ برداشت	تاریخ سترون‌سازی	تعداد نمونه	اندازه نمونه cm	تیمار پیش‌سترون‌سازی	تیمار سترون‌سازی در زمان لازم	درصد آلودگی		درصد مرگ و میر	درصد جوانه‌های فعال و زنده	وضعیت فلس‌گیری	ملاحظات
۱	باغ گیاهشناسی	۷۳/۱/۱۴	۷۳/۱/۱۵	۱۰۰	۰/۵	A+B۳۰"	K۳۰"	۲۵	۵۰	-	۲۵	بدون فلس	جوانه انتهایی
۲	"	۷۳/۲/۲۷	۷۳/۲/۲۸	۲۰	"	A+Q+C۳۰"	M۳۰"	-	-	۹	۹۱	"	"
۳	"	"	"	"	"	"	K۵'+M۳۰"	-	-	۱۸/۷۵	۸۱/۲۵	"	"
۴	"	"	"	"	"	"	M۲'	-	-	-	۱۰۰	"	"
۵	"	۷۳/۴/۲۰	۷۳/۴/۲۱	"	"	"	M۱'	-	۳۰	۵۰	۲۰	"	جوانه جانبی
۶	اهواز	۷۳/۴/۲۵	۷۳/۷/۳۰	۴۰	۱/۵	P*APC۱'	L۱۰'	۲/۵	۱۷/۵	۱۰	۷۰	با فلس	جوانه جانبی
۷	"	"	"	۴۳	"	"	Lz۱۰'	-	۶/۹	۶/۹	۸۶/۲	"	"
۸	"	"	"	۳۲	"	"	M۱'	-	۶/۲۵	۶/۲۵	۸۷/۵	"	"
۹	"	"	"	۳۳	"	"	L۱۰M۱'	-	۶/۲۵	۱۲/۵	۸۱/۲۵	"	"
۱۰	"	"	"	۳۲	"	"	L۱۵'	-	۱۸/۱۸	۴/۵	۷۷/۳	"	"
۱۱	"	"	"	"	"	"	L۱۵M۱'	-	-	۱۴/۱	۷۵/۹	"	"
۱۲	"	"	۷۳/۸/۱۵	۴۰	"	"	L۱۰M۱'	-	-	۱۰۰	-	"	"
۱۳	"	"	"	"	"	"	M۱'	-	-	۱۰۰	"	"	"
۱۴	باغ گیاهشناسی	۷۳/۹/۲۷	۷۳/۹/۲۸	"	"	APC	M۱'	-	۲/۴	۴/۸	۹۲/۸	"	انتهایی
۱۵	"	"	"	"	"	"	L۵M۱'	-	۲/۷	۸/۱	۸۹/۱		
۱۶	"	"	"	۵۰	"	"	L۱۰M۱'	-	-	۷/۵	۹۲/۵	"	"
۱۷	"	"	"	۶۰	"	"	L۱۵'M۱'	-	-	۱۲/۳	۸۷/۶	"	"

*P نشانه استفاده از قارچ‌کش در زمان نگهداری است.

هیپو کلریت سدیم : L
HCl بافر : Z
شستشو با اتانول ۷۰٪ : C

هیپوکلریت سدیم ۱٪ : K
مرکوریک کلراید ۰/۱٪ : M
شستشو با برس و آب و مایع ظرفشویی : A

قرار گرفتن در مقابل آب جاری : Q
قارچ‌کش ۱٪ بمدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه : P

جدول شماره ۲- تیمارهای *In vitro* ریشه‌زایی (۱۴ تیمار و ۸ تکرار)

وضعیت ظاهری ریشه	درصد ریشه‌زایی	وضعیت نوری	میزان mg/l	نوع هورمون
ریشه‌ها به‌طور کامل طبیعی با قطر مناسب	۸۲	روشنایی	۰/۱	IBA
ریشه‌ها به‌طور کامل طبیعی با قطر مناسب	۷۴	تاریکی	۰/۱	IBA
-	-	روشنایی	۰/۵	IBA
-	-	تاریکی	۰/۵	IBA
-	-	تاریکی	۱	IBA
-	-	روشنایی	۱	IBA
-	-	روشنایی	۰/۱	NAA
-	-	تاریکی	۰/۱	NAA
ریشه‌ها غیرطبیعی و شکننده همراه با کالوس	۵۰	روشنایی	۰/۵	NAA
ریشه‌ها غیرطبیعی و شکننده همراه با کالوس	۵۷	تاریکی	۰/۵	NAA
-	-	روشنایی	۰/۱ ۰/۵	NAA IBA
-	-	تاریکی	۰/۱ ۰/۵	NAA IBA
ریشه‌ها غیرطبیعی و شکننده همراه با کالوس	۲۸	روشنایی	۰/۵ ۰/۱	NAA IBA
ریشه‌ها غیرطبیعی و شکننده همراه با کالوس	۲۸	تاریکی	۰/۵ ۰/۱	NAA IBA

جدول شماره ۳- تیمارهای *Ex vitro* ریشه‌زایی (۸ تیمار و ۸ تکرار)

درصد ریشه‌زایی	وضعیت نوری	نوع هورمون	نوع انتقال
صفر	روشنایی	-	انتقال شاخه‌ها مستقیماً به خاک
صفر	تاریکی	-	انتقال شاخه‌ها مستقیماً به خاک
صفر	روشنایی	IBA: ۱۰۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون
صفر	تاریکی	IBA: ۱۰۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون
صفر	روشنایی	IBA: ۵۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون
صفر	تاریکی	IBA: ۵۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون
صفر	روشنایی	IBA: ۱۰۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون
	تاریکی	IBA: ۱۰۰۰mg/l ۳۰ ثانیه	انتقال شاخه‌ها پس از غوطه‌وری در هورمون

جدول شمارهٔ ۴- مقایسه قدرت یونی چهار محیط کشت MS و MS ۱/۲ نیترات و WPM، DKW بر حسب میلی‌مول (mM)

نوع یون	MS	1/2MS نیترات	WPM	DKW
NH^{4+}	۲۰/۶۱	۱۰/۳۰۵	۴/۹۴	۱۷/۷
K^{+}	۲۰/۰۴	۱۰/۵۲	۱۲/۶۱	۲۰
Ca^{+2}	۲/۹۹	۲/۹۹	۳	۹/۳
Mg^{+2}	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
Mn^{+2}	۰/۱۳۲	۰/۱۳۲	۰/۱۳۲	۰/۱۹۸
Na^{+}	۰/۲۲۴	۰/۲۲۴	۰/۲۲۴	۰/۳
Fe^{+2}	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱	۰/۱۲۲
No_3^{-}	۳۹/۴	۱۹/۷	۹/۶۴	۳۴/۴
So_4^{-2}	۱/۷۶	۱/۷۶	۷/۴۴	۱۲/۳
Po_4^{-3}	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵	۲
$Fe\text{-}EDTA^{-3}$	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱
Co^{+2}	۰/۱۰۵	۰/۱۰۵	-	-
Cu^{+2}	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۰۰۱
MOO_4^{-2}	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳	۰/۰۰۱۶
I^{-}	۵	۵	-	-
Zn^{+2}	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	۰/۰۲	۰/۰۵۷
N(mM) کل	۶۰/۰۱	۳۰/۰۰۵	۱۴/۵۸	۴۲/۳۰
NH4/NO3(mM)	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۲۲
قدرت (mM) یونی کل	۹۴/۲۵	۵۴/۹۲	۴۲/۳۹	۹۴/۰۷۴

جدول شماره ۵- تأثیر محیط کشت بر روی میانگین جوانه‌زنی، شاخه‌زایی و رشد طولی جوانه‌ها

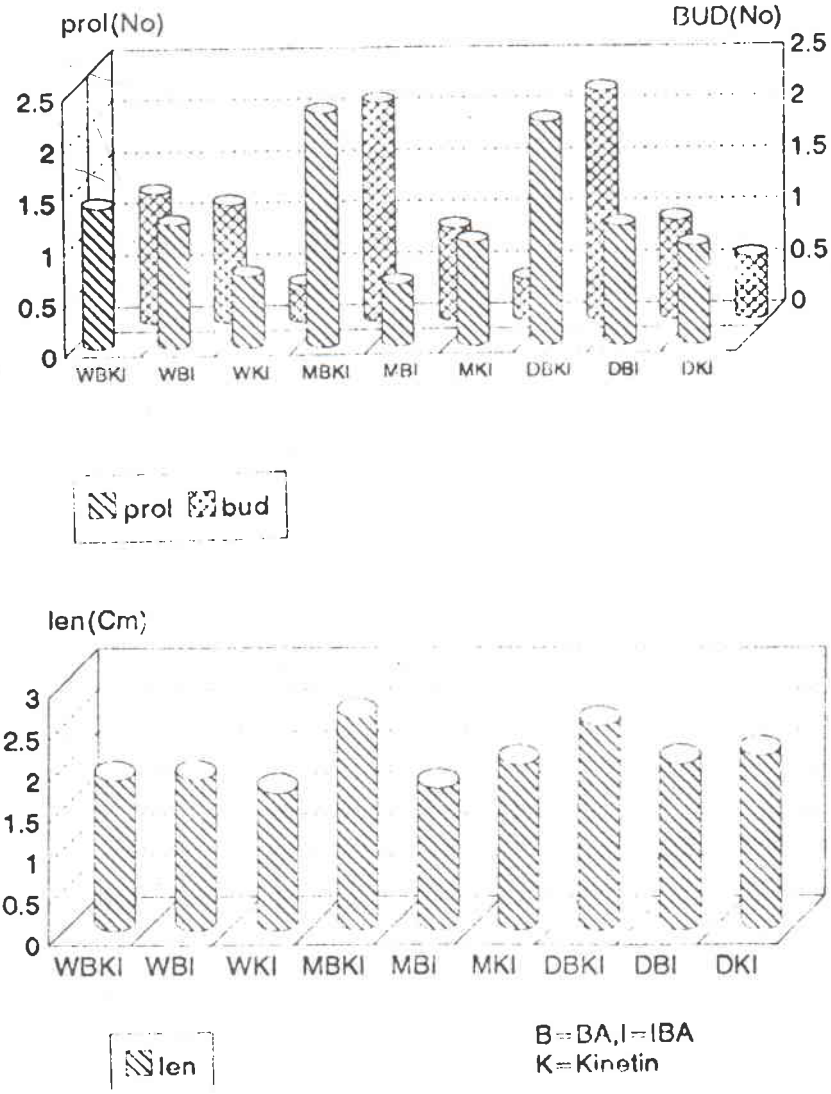
محیط کشت	شاخه‌زایی	جوانه‌زنی	رشد طولی
WPM	۱/۰۹۰a	۰/۹۳۰a	۱/۷۸۰a
MS	۱/۳۱۰a	۱/۱۵۰a	۲/۱۰۰a
DKW	۱/۴۴۰a	۱/۲۷۰a	۲/۲۰۰a
LSD	۰/۵۲۵۹	۰/۴۹۱۲	۰/۶۱۱۳
SX	۰/۱۷۷۰	۰/۱۶۵۳	۰/۲۰۵۸
α	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵

جدول شماره ۶- تأثیر متقابل محیط و هورمون بر روی میانگین جوانه‌زنی، شاخه‌زایی و رشد طولی جوانه‌ها

محیط کشت و تیمار هورمونی (mg/l)	شاخه‌زایی	جوانه‌زنی	رشد طولی
BA: 0.5 K: 0.5 WPM I: 0.1	۱/۳۷۰b	۱/۲۶۰b	۱/۸۳۰bc
BA: 1 WPM I: 0.01	۱/۲۱۰bc	۱/۱۵۰b	۱/۸۴۰bc
K: 1 WPM I: 0.01	۰/۷۱۰cd	۰/۳۷۰۰c	۱/۶۷۰c
BA: 0.5 K: 0.5 نیترات 1/2MS I: 0.01	۲/۲۸۰a	۲/۱۳۰a	۲/۵۷۰a
BA: نیترات ½MS 1 I: 0.01	۰/۶۲۰d	۰/۹۱۰bcd	۱/۷۲۰c
K: 1 نیترات ½MS I: 0.01	۱/۰۲۰bcd	۰/۴۱۰de	۲/۰۱۰abc
BA: 0.5 K: 0.5 DKW I: 0.01	۲/۱۸۰a	۲/۲۳۰a	۲/۴۶۰ab
BA: 1 DKW I: 0.01	۱/۱۷۰bcd	۰/۹۷۰bc	۲/۰۲۰abc
K: 1 DKW I: 0.01	۰/۹۷۰bcd	۰/۶۱۰cde	۲/۱۲۰abc
LSD	۰/۵۲۵۹	۰/۴۰۹۱۲	۰/۶۱۱۳
$S\bar{X}$	۰/۱۷۷۰	۰/۱۶۵۳۰	۰/۲۰۵۸
α	۰/۰۵۰	۰/۰۵۰	۰/۰۵۰

میانگینهایی که دارای حروف مشترک هستند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته و در یک دسته قرار می‌گیرند

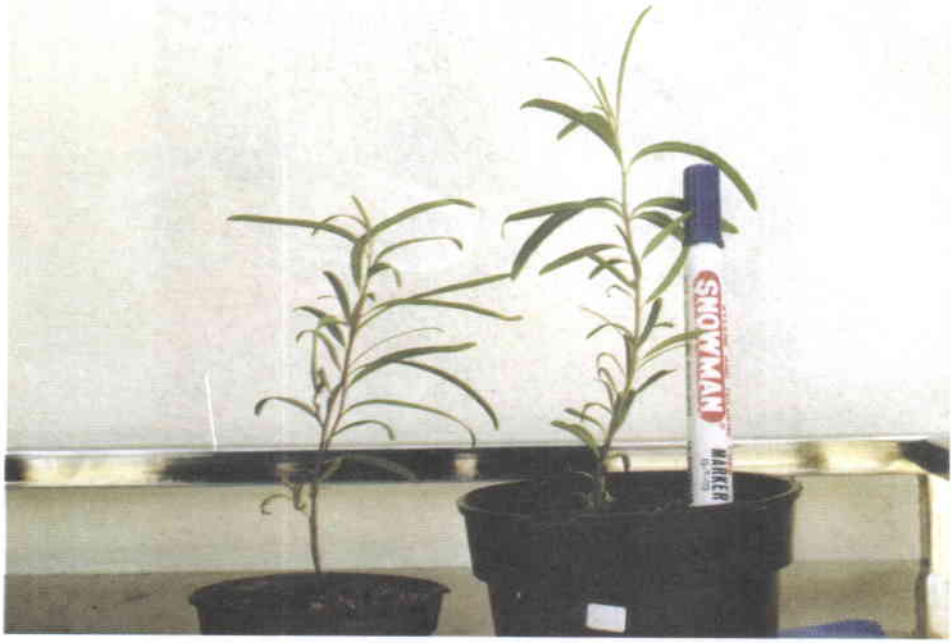
نمودار ۱- تأثیر متقابل محیط کشت و هورمون بر روی میانگین رشد طولی، شاخه‌زایی و جوانه‌زنی



تصویر ۱ - مرحله استقرار جوانه ها

تصویر ۲- مرحله تکثیر شاخه‌ها

تصویر ۳- مرحله ریشه‌زایی و ایجاد گیاهچه کامل



تصویر ۴- ایجاد سازگاری در گیاهچه با شرایط گلخانه

تصویر ۵- انتقال گیاهچه به مزرعه

تصویر ۶- نهال سازگار شده در مزرعه پس از سپری شدن دو فصل رویشی