تکثیر غیرجنسی صنوبر لرزان (*Populus tremula*) به روش کشت بافت

طیبه سهیلا نراقی[1]، معصومه ایزدپناه[2]

چکیده

در این پژوهش عوامل موثر در سترون سازی،شاخه زایی و ریشه زایی جوانه‌های درختان بالغ صنوبر لرزان مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور جوانه‌های انتهایی از پایه‌های بالغ انتخابی پس از برداشت در فصول مختلف سال،با تیمارهای متفاوت مستقر سترون سازی و در محیط کشت‌های WS و ACM شدند.

تحقیقات انجام شده، نشان داد که جوانه‌های خواب زمستانه با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ به مدت ۶ دقیقه و کلرور جیوه ۰/۱ در صد به مدت ۱۰ ثانیه به میزان ۹۳ در صد سترون گشته و در محیط کشت ACM حاوی هورمون 6-BAP در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر مستقر شدند.

در مرحله شاخه زایی، بهترین نتایج در محیط کشت ACM با ترکیب هورمونی BAP به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر بدست آمد.

شاخه‌ها در محیط ACM حاوی اکسین‌های IBA (۰/۵ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۱ میلی گرم در لیتر) پس از گذشت ۷ روز به میزان ۹۶٪ ریشه دار شدند.

گیاهچه‌های ریشه دار پس از انتقال به گلدان‌های حاوی مخلوط پیت، ورمیکولایت، ماسه به نسبت (۱:۱:۱) و طی مراحل مختلف سازگاری در (ژرمیناتور - گلخانه) به مزرعه منتقل گشتند. نهالها در مزرعه با۷۵ ٪ موفقیت مستقر شدند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، صنوبر لرزان (*Populus tremula*)، صنوبراروپائی (*European aspen*) ، کشت بافت،کشت جوانه

۱-کارشناس موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

مقدمه و هدف

صنوبر لرزان (*Populus tremula*) از جنس صنوبر (*Populus*) و متعلق به سرده (*Salicaceae*) واز راسته (*Amentales*) به شمار می‌رود.

این گونه گیاهی دو پایه است. در برابر سرما مقاوم و برای بقاء به فضای کمی نیاز دارد. خود رابا ساختار جنگل به خوبی وفق می‌دهد. در زمینهائی که از نظر مواد معدنی فقیرند و نیز در زمینهای غرقاب به خوبی رشد می‌کند.

صنوبرهای لرزان موارد استفاده مختلفی دارند،به عنوان مثال:در کاغذ سازی،کبریت سازی،بسته بندیهای سبک و غذای دام مورد استفاده قرار می‌گیرند. صنوبر لرزان به خاطر رشد سریعش، برای تهیه بیوماس مورد توجه واقع شده است،چوب این گونه به علت دارا بودن وزن مخصوص زیاد (حدود ۰/۵) از کیفیت بالایی جهت کاغذ سازی برخوردار است. اکثر گونه‌های صنوبر به دلیل وجود سرآغازه‌های ریشه در زیر پوستشان به آسانی از طریق قلمه تکثیر می‌شوند، اما صنوبرهای لرزان به دلیل عدم وجود این سرآغازه‌های ریشه (۳) به سختی با قلمه تکثیر می‌یابند واز دیرباز تاکنون این گیاهان توسط بذر زیاد می‌شوند (۱۸)،که روش قابل اعتمادی برای تکثیر گیاهان بالغ برگزیده نیست.

با توجه به اهمیت کاربرد چوب این گونه در صنایع چوب و کاغذ وبا در نظرگرفتن آن که در فرآیند صنعتی شدن به چوبهایی با ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی تعریف شده نیاز است.بنابراین یافتن روشی سریع و عملی برای تکثیر این گیاه ضروری است. هدف از این پژوهش، استفاده از تکنیک کشت بافت و ریزازدیادی از طریق کشت جوانه است. در این روش کمترین تغییرات ژنتیکی حاصل می‌شود. زیرا جوانه علاوه بر ثبات ژنتیکی لازم، توانایی تکثیر و تولید اندامهای جدید را دارد و تکثیر می‌تواند در تمام طول سال تداوم داشته باشد.

سابقه تحقیق

بیش از ۶۰ سال پیش Gautheret (۱۹۳۶)، توانست بافت کامبیوم *P.nigra* را با موفقیت کشت کند. بعد از آن محققان بسیاری در مورد این جنس به پژوهش پرداختند و نتایج متفاوتی بدست آوردند. از آن جمله Mathes (۱۹۶۱)، از بافت کامبیوم *P.tremuloides* توانست کالوس و بعد ریشه و شاخه بگیرد، اما به دلیل عدم اطمینان از ارتباط صحیح بین ریشه‌ها و ساقه‌ها گیاهچه‌های کامل بدست نیامدند.

Wolter (۱۹۶۸)، نشان داد که می‌توان از ریزنمونه‌های *P.tremuloides* با اضافه کردن BA[1] به محیط کشت پایه، شاخه بدست آورد و آنها را ریشه دار کند. Winton (۱۹۷۰ و ۱۹۷۱)، توانست از طریق کشت کالوس صنوبر لرزان تعداد کمی گیاه تتراپلوئید بدست آورد. Whithead (۱۹۷۷)، ظرفیت اندام‌زایی جوانه‌های صنوبر را برای تکثیر مورد بررسی قرار داد. بعد از ۶ تا ۸ هفته او توانست از هر جوانه کشت شده ۱۲۰ تا ۲۲۰ شاخه تولید نماید. بابهره‌گیری از این روش Christe (۱۹۷۸)، و انجام کشت مریستم موفق به ایجاد شاخه در صنوبر لرزان گردید. Barocka (۱۹۸۵)، صنوبر لرزان را در سطح انبوه از گیاهان نونهال و جوان تکثیر نمود. Chalupa (۱۹۷۹)،بر روی گیاهان بالغ ۲۰ -۱۷ ساله صنوبر لرزان و Ahuja (۱۹۸۳ و۱۹۸۴)، در مورد درختان ۴۰ -۱۷ ساله پژوهشهای خود را دنبال کردند و این گیاه را در سطح تجارتی تکثیر نمودند.

مواد و روشها

نمونه‌ها از پایه‌های بالغ که کلیه ویژگیهای یک درخت برگزیده را داشتند از ایستگاه منطقه البرز مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع و استان مازندران تهیه گردیدند.به منظور بررسی اثر فصل بر نحوه رشد،نمونه‌گیری در تمام فصول سال انجام گرفت و نمونه‌ها در

1- Benzyl amino purine

کیسه‌های پلاستیکی و در یخدان به آزمایشگاه انتقال یافت تا مراحل مختلف سترون سازی در باره آنها انجام شود.

سترون سازی نمونه‌ها در دو مرحله صورت گرفت:

الف - پیش سترون سازی جوانه‌ها: جهت کاهش آلودگیهای سطحی، روشهای مختلف پیش سترون سازی از جمله برس کشی با مایع ظرفشویی، استفاده از قارچ‌کش بنومیل ۱ - ۰/۵ در صد به مدت ۳۰دقیقه، شستشو با آب جاری به مدت ۱ - ۲ ساعت، قرار دادن نمونه‌ها ۶۰ - ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و فلس برداری جوانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

ب - روشهای سترون‌سازی جوانه‌ها: از این مرحله کار در زیر هود مخصوص کشت بافت صورت گرفت. برای سترون کردن جوانه‌ها از محلولهای هیپوکلریت سدیم (۱ - ۰/۵ درصد) و کلرور مرکوریک ۰/۱ در صد در زمانهای مختلف استفاده شد.

استقرار ریز نمونه‌ها که به نحو معمول قسمتی از شاخه حاوی یک جوانه فلس گرفته به اندازه ۰/۵ سانتیمتر بود در محیطهای کشت ACM[۱] (۱) و WS[۲] (۲۳) حاوی هورمونهای BA (۰/۵-۱ mg/l) و NAA[۳] (۰/۰۲-۰/۰۵ mg/l) صورت گرفت. ظروف کشت در انکوباتور با دمای متغیر، شب ۱۵ درجهٔ سانتیگراد و روز، ۲۵ درجهٔ سانتیگراد، طول روز ۱۶ ساعت و شدت روشنایی ۴۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. بدیهی است جوانه‌های آلوده که تقریبا بعد از یک هفته تا یک ماه، علائم آلودگی را نشان‌دادند،حذف گردیده و سایر جوانه‌ها در فواصل زمانی ۳ تا ۴ هفته بازکشت شدند.

جهت شاخه زایی و تکثیر جوانه‌ها، علاوه بر استفاده از محیطهای فوق هورمونهای Adenine[۴]، (۰-۲۰mg/l)، BA، (۵/۵-۱mg/l)، NAA، (۰/۰۲mg/l) بکار گرفته شدند.

1- Ahuja Culture Medium
2- Wolter & Skoog Medium
3- Naphthalene Acetic Acid
4- Adenine یک نوع سیتوکینین

برای بازکشت، شاخه‌های منفردی که از نظر سبزینگی، طول و تعداد میانگره تا حد امکان همسان بودند انتخاب می‌شدند.به طور معمول پس از استقرار و شروع شاخه زایی، سه بازکشت انجام می‌گرفت و در هر تیمار هورمونی ۵۰ تکرار (۱۰ ظرف کشت و در هر ظرف ۵ شاخه) در نظر گرفته شد. در پایان هر ماه آمار تعداد جوانه و شاخه، طول شاخه، ضریب سطح برگ، شدت سبزینگی، وجود یا عدم وجود پدیده شیشه‌ای شدن و تولید کالوس، ثبت گردید. داده‌های مربوط به تعداد جوانه و شاخه و طول شاخه‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج با روش آماری آزمایش دو فاکتوری در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و میانگینها با آزمون دانکن در سطح ۵ ٪ مقایسه شد.

برای ریشه زایی از محیط کشت ACM به اضافه غلظت‌های متفاوتی از اکسین‌های IBA[1] (۰-۱ mg/l) و NAA (۰-۰/۵ mg/l) استفاده شد.

گیاهچه‌های ریشه دار به خاک انتقال یافت. در ابتدا مخلوط خاک (ماسه، ورمیکولایت، پیت ماس)به مدت ۱ ساعت در آون ۶۰ درجهٔ سانتیگراد سترون گشته و در گلدانهای پلاستیکی ریخته شد و سپس گیاهچه‌ها از محیط کشت بیرون آورده شده و پس از شستشو با آب مقطر در خاک کشت شدند و روی آنها با سرپوش نایلونی پوشانیده شد. گلدانها در ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵۰ ٪ قرار گرفتند. کیسه‌های نایلونی پس از چند روز به تدریج سوراخ شده و طی دو هفته سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها با رطوبت طبیعی صورت پذیرفت. بعد از ۸ هفته، گلدانهایی که بین ۳۵- ۱۵ سانتیمتر طول داشتند به گلخانه انتقال و پس از طی فصل زمستان در بهار به مزرعه منتقل شدند.

1- Indole -3- Butyric Acid

نتایج

حذف فلسها از روی جوانه‌ها در دو مرحلهٔ قبل و بعد از سترون سازی مورد بررسی قرار گرفت. جدول شمارهٔ ۱ مقایسهٔ اثر حذف فلسها را از روی جوانه‌ها در فصول مختلف سال نشان می‌دهد. حذف فلسها باعث می‌گردد تا میکروارگانیسمهای آلوده کننده در برابر مواد ضد عفونی کننده سریعتر از بین بروند و میزان آلودگی این نمونه‌ها در مقایسه با نمونه‌هایی که بعد از مرحلهٔ سترون سازی فلس برداری شده‌اند، بسیار پایین تر گردید. اماباید به این نکته توجه داشت که حذف فلسها قبل از مرحلهٔ سترون سازی باعث ازدیاد تعداد جوانه‌های مرده می‌شود. به طوری که جوانه‌های بهاره و تابستانه‌ای که به این ترتیب فلس برداری شده‌اند بین ۷۷ و ۸۷/۴ درصد از بین رفته‌اند. با توجه به مجموعهٔ نتایج (جدول شمارهٔ ۱) هر چه زمان برداشت جوانه‌ها از فصل بهار به زمستان نزدیکتر شود میزان موفقیت در از بین بردن آلودگیهای سطحی و همچنین زنده ماندن جوانه‌هایی که فلس برداری آنها قبل از مرحله سترون سازی صورت گرفته، بیشتر می‌گردد.

در جدول شمارهٔ ۲ تأثیر فصل نمونه گیری و نوع تیمارهای سترون سازی را بر نحوهٔ زنده ماندن جوانه‌ها می‌بینیم.در تمام موارد شستشوی اولیه با استفاده از برس و مایع ظرفشویی و آب، قرار دادن در محلول قارچ کش بنومیل ۷۰ در صد و قرار گیری ریزنمونه‌ها در معرض آب جاری به مدت ۲ ساعت در حذف آلودگی‌های سطحی (قارچی و باکتریایی)نمونه‌ها بسیار موثر بوده.استفاده از درصدهای متفاوت هیپوکلریت سدیم در زمانهای متفاوت همراه کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد، نتایج مختلفی را در طول سال نشان می‌دهد. در بهترین تیمار (محلول هیپوکلریت ۱ درصد به مدت ۶ دقیقه و کلرورمرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ ثانیه) ۹۳ درصد جوانه‌ها سترون شدند. این جوانه‌ها در محیط ACM حاوی BA در غلظت (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۰/۰۲ میلی گرم بر لیتر) فعال شده و رشد طبیعی خود را آغاز کردند (تصویر شمارهٔ ۱).

در تجزیه و تحلیل آماری صفات مورد بررسی محیط کشت ACM اختلاف کاملاً معنی داری را با محیط WS نشان داد (جدول شمارهٔ ۳ و ۴)، که به عنوان محیط کشت بهینه جهت شاخه زایی و تکثیر معرفی می‌گردد (تصویر شمارهٔ ۲). بیشترین تعداد شاخه، جوانه و رشد طولی در محیط ACM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر NAA دیده شد (نمودار شمارهٔ ۱). همچنین در این تیمار شاخه‌ها بیشترین شدت سبزینگی و مناسبترین اندازهٔ پهنگ برگ را داشتند، (تصویر شمارهٔ ۲). استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA سبب ایجاد ریشه در ۹۶ در صد شاخه‌های کشت شده در محیط ACM شده است (تصویر شمارهٔ ۳). افزایش غلظت اکسین در این مرحله باعث تولید کالوس و کاهش میزان ریشه دهی گردید (نمودار شمارهٔ ۲).

در مرحله انتقال به خاک گلدان، محلول پاشی خاک با محلول قارچ کش بنومیل ۰/۵ درصد و استفاده از پاکتهای پلاستیکی جهت حفظ رطوبت نسبی بهترین شرایط را جهت بقاء گیاهچه‌ها تضمین می نماید. برداشت سرپوش گلدانها پس از ۲۰ روز و آبیاری منظم همراه محلول پاشی گیاهان با محلول کود تجارتی میکرو ۲/۵ در هزار میزان تلفات گیاهان را در مرحله سازگاری تا حد ۱۰ ٪ کاهش داد (تصویر شمارهٔ ۴). گیاهان سازگار شده‌ای که به مزرعه انتقال یافتند در حال حاضر چهار فصل رشد را پشت سر گذاشته و بین ۲/۵ تا ۶/۵ متر ارتفاع دارند (تصویر شمارهٔ ۵).

بحث و نتیجه گیری

سترون سازی جوانه‌هایی که فلس گیری در آنها قبل از مرحله سترون سازی صورت گرفته بود با موفقیت بیشتری توأم شد. این بدان علت است که وجود فلسهایی که بر روی جوانه قرار گرفته‌اند، مکان مناسبی برای پنهان ماندن میکروارگانیسم‌ها بشمار می‌روند. برداشتن این فلسها، امکان تماس مواد سترون کننده با عوامل آلوده کننده را بیشتر می‌کند

Ahuja (۱۹۸۴)، در رابطه با تکثیر صنوبر لرزان به نتایج مشابهی دست یافت. در مورد فصل نمونه برداری باید گفت که حذف آلودگیها در جوانه‌هایی که در اواخر پاییز و زمستان برداشت شدند با موفقیت بیشتری همراه بود.زیرا پوشش ضخیم سطح ساقه و فلسهای جوانه‌های خواب از بافتهای آسیب‌پذیر داخل جوانه محافظت کرده و امکان بکار بردن مواد سترون‌کننده را در غلظتهای بالاتر ومؤثرتر فراهم ساخت. Gupta و همکاران (۱۹۹۱)، در مورد استقرار *P.euramericana* و Gebhardt (۱۹۸۹)، جهت کشت جوانه‌های صنوبر لرزان، از جوانه‌های خواب زمستانه استفاده کردند. استفاده از پیش تیمار مکانیکی برس کشی همراه مایع ظرفشویی با زدودن کرکها و کاهش ترشحات صمغی امکان تماس بیشتر مواد سترون‌کننده را با سطوح آلوده فراهم می‌کند، Chun و همکاران (۱۹۸۶)، در دورگ گیری دو گونه *P.alba* و *P.grandidentata* همین اثرات را گزارش کردند. استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۶ دقیقه و بعد محلول کلرورمرکوریک ۰/۱ درصد بهترین روش برای حذف آلودگیهای سطحی بوده است. نقش کلرورمرکوریک به عنوان کامل کنندهٔ مرحله سترون سازی بسیار اساسی است. Gupta و همکاران (۱۹۸۵)، جهت سترون ساختن جوانه‌های *Pseudotsuga menziesii* و *Pinus lambertiana* ابتدا از هیپوکلریت سدیم و در انتها کلرورمرکوریک ۰/۰۵ درصد استفاده نمودند.

تجزیه و تحلیلهای آماری صفات شاخه زایی، جوانه زنی و رشد طولی جوانه‌ها بیانگر این واقعیت است که محیط ACM به طور محسوسی بر محیط WS برتری دارد. این تفاوت از نظر آماری نیز معنی دار است. یکی از عوامل تعیین کنندهٔ کارآیی محیط کشت قدرت یونی ترکیبهای موجود در آن می‌باشد (Bonga و Aderkas، ۱۹۹۲). بنابراین قدرت یونی زیاد و ترکیب مواد موجود در محیط ACM برای رشد این گیاه مناسبتر بود (جدول شمارهٔ ۵).

با مقایسهٔ ترکیبهای محیط ACM و WS موارد زیر قابل توجه است:

- عنصر ازت در محیط کشت به صورت یونهای NO3 و NH4 وجود دارد و نسبت NH4/NO3 در نحوهٔ ریخت زایی و رشد طولی شاخه‌ها موثر است. این نسبت در محیط ACM ۵ برابر محیط WS است و این موضوع نشان می‌دهد که در مرحله اول مجموع نیتروژن بیشتر در تکثیر بهتر این گیاه موثر بوده و در مرحله دوم این گیاه به مقدار بالای یون NH4 حساسیتی ندارد. Kirby (۱۹۸۷) در مورد تأثیر نسبت بین NH4/NO3 در محیط‌های مورد استفاده در درختان جنگلی به نتایج مشابهی رسیده.

- یون پتاسیم در محیط ACM ۱۲/۶۱ و در محیط WS ۳/۵۶۹ می‌باشد. افزایش میزان پتاسیم به دلیل نقشی که این کاتیون در تنظیم عمل آنزیمهای مهم درون سلول وکنترل فرآیندهای انتقال غشایی و تورژسانس دارد، رشد و تکثیر شاخه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

- همچنین افزایش رشد طولی و تعداد بیشتر شاخه در محیط ACM می‌تواند به علت بالا بودن میزان فسفر در این محیط باشد. Sharma (۱۹۸۹)، با افزایش یون فسفر در محیط ایجاد شاخه و تولید گیاهچه در گونه *Brassica napus L.* را شاهد بود.

- محیط ACM حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم لیزین [1] می‌باشد که محیط WS فاقد آن است. Mandal (۱۹۸۹)، در تحقیقی در مورد گونه صنوبر لرزان نتیجه گرفت که ترکیب تیامین [2] و لیزین در غلظت زیاد بیوسنتز چندین ویتامین را تحریک می‌کند و به طور موثر جانشین سیتوکینین در فرآیند تولید شاخه می‌گردد.

در بررسی تأثیر همزمان دو عامل محیط کشت و غلظت هورمونی بر شاخه زایی، جوانه زنی و رشد طولی نمونه‌ها، مشخص شد که بیشترین میزان تکثیر و رشد گیاه مربوط به محیط ACM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم BA و ۰/۰۲ میلی‌گرم NAA بوده است. Ahuja (۱۹۸۴)، به نتیجه مشابهی رسیده.

استفاده از IBA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در

1- Lysine 2- Thiamine

لیتر بهترین تیمار ریشه‌زایی بوده است.این مسأله با نتایج گرفته شده توسط Ahuja در (۱۹۸۴)، در مرحله ریشه‌زایی مطابقت دارد.

استقرار نهالها در مزرعه با ۲۵ ٪ تلفات همراه بود. Schulzke (۱۹۸۹)، به دنبال بررسی نتایج گرفته شده از کاشت بیش از ۷۰۰۰۰ نهال بدست آمده از کشت بافت صنوبر لرزان در مناطق مختلف جنگلی آلمان نتیجه گرفت که کاشت این گونه در مناطق خشک با خسارتهای بیشتر از ۱۰ ٪ روبرو بوده است.

سپاسگزاری

از همکاران گرامی خانمها مهندس میترا امام و شکوفه شهرزاد جهت همکاری در طول اجرای طرح و آقای دکتر میرزائی ندوشن به دلیل راهنمائی در تجزیه و تحلیلهای آماری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. از ریاست محترم مؤسسهٔ تحقیقات جنگلها و مراتع و مسئولان محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

جدول شمارهٔ ۱ - اثر حذف فلسها از روی جوانه‌ها

ردیف	زمان فلس‌گیری	فصل نمونه‌گیری	روش پیش سترون‌سازی	روش سترون‌سازی	درصد آلودگی	درصد جوانه مرده و سوخته	درصد جوانه فعال و زنده
۱	قبل از سترون شدن	بهار	a+b+c(10")	K(10´)+M(10")	۱۷/۳	۷۷	۵/۷
۲	بعد از سترون شدن	بهار	a+b+c(40")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۴۷	۴۳/۸	۹/۲
۳	قبل از سترون شدن	تابستان	a+b+c(20")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۴	۷۸/۳	۸/۶
۴	بعد از سترون شدن	تابستان	a+b+c(60")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۳۱/۹	۱۳/۶	۴۵/۵
۵	قبل از سترون شدن	اوایل پاییز	a+b+c(40")+Q(2h)	K(20´)+M(20")	۴/۳	۵۱/۷	۴۴
۶	بعد از سترون شدن	اوایل پاییز	a+b+c(30")+Q(2h)	K(20´)+M(20")	۲۶/۸	۴۸/۶	۲۴/۶
۷	قبل از سترون شدن	اوایل پاییز	a+b+c(30")+Q(2h)	K(20´)+M(10")	۸	۱۰	۸۲
۸	بعد از سترون شدن	اوایل پاییز	a+b+c(40")+Q(2h)	K(20´)+M(10")	۱۰۰	-	-

محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵٪=O
محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪=M
محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪=d
محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ = k

شستشو با برس و آب و مایع ظرفشویی =a
قرار گرفتن در محلول بنومیل ۰/۵٪ نیم ساعت =b
قرار گرفتن در اتانول ۷۰٪ =c
قرار گرفتن در جریان آب جاری =Q

جدول شمارهٔ ۲- تأثیر فصل نمونه‌گیری و نوع تیمارهای سترون شده بر نحوه زنده‌مانی جوانه‌ها

ردیف	فصل نمونه‌گیری	روش پیش سترون‌سازی	روش سترون‌سازی	درصد آلودگی	درصد جوانه مرده و سوخته	درصد جوانه فعال و زنده
۱	بهار	a+b+c(10")	K(10´)+M(10")	۱۷/۳	۷۷	۵/۷
۲	بهار	a+b+c(40")+Q(2h)	K(10´)	۴۵	۴۸	۷
۳	بهار	a+b+c(20")+Q(2h)	O(10´)+M(10")	۴۷	۴۳/۸	۹/۲
۴	تابستان	a+b+c(20")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۴	۸۷/۴	۸/۶
۵	تابستان	a+b+c(20")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۲/۸	۸۳	۱۴/۲
۶	تابستان	a+b+c(20")+Q(2h)	K(20´)	۳/۷	۸۵	۱۱/۳
۷	پاییز	a+b+c(30")+Q(2h)	K(12´)+M(20")	۲۷	۷	۶۶
۸	پاییز	a+b+c(30")+Q(2h)	K(10´)+M(10")	۸	۱۰	۸۲
۹	پاییز	a+b+c(30")+Q(2h)	K(10´)	۴۷	۱۱	۴۲
۱۰	زمستان	a+b+c(40")+Q(2h)	O(6´)+M(10")	۶/۲	۳/۸	۹۰
۱۱	زمستان	a+b+c(40")+Q(2h)	O(8´)	۳۳/۵	۱۱/۵	۵۵
۱۲	زمستان	a+b+c(40")+Q(2h)	K(6´)+M(10")	۲/۸	۴/۲	۹۳

محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵٪=O
محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪=M
محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪=d
محلول هیپوکلریت سدیم ۱/ = k

شستشو با برس و آب و مایع ظرفشویی =a
قرارگرفتن در محلول بنومیل ۰/۵٪ نیم ساعت =b
قرارگرفتن در اتانول ۷۰٪ =c
قرارگرفتن در جریان آب جاری =Q

جدول شمارهٔ ۳- نتایج واریانس صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زایی و رشد طولی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	MS		
		رشد طولی	جوانه‌زایی	شاخه‌زایی
تیمارهای هورمون (A)	۲	۱/۲۲*	۰/۹۸۴ns	۱۹/۱۱۰*
محیط کشت (B)	۱	۱۳/۲۴۴**	۱۳۰/۷۱۸**	۶۱/۱۹۹**
AxB	۲	۰/۴۷۲ns	۱۱/۵۳۳*	۵/۲۳۴*
خطا	۱۲	۰/۲۱۳	۰/۶۰۳	۰/۷۵۹

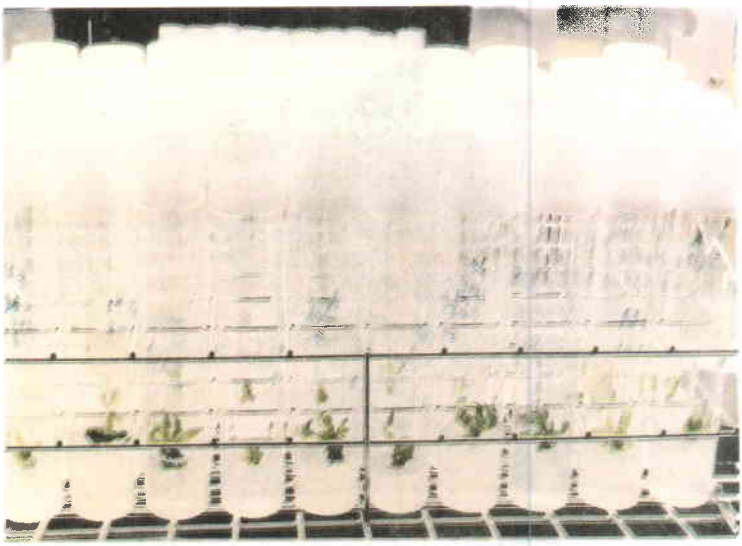
جدول شمارهٔ ۴- مقایسه میانگین شاخه‌زایی، جوانه‌زایی و رشد طولی تحت اثر محیط کشت و هورمون

محیط کشت	غلظت Adenin (میلیگرم در لیتر)	میانگین تعداد جوانه	میانگین تعداد شاخه	میانگین رشد طولی
ACM	۰	۱۱/۶۷۷ a	۸/۶۸ a	۳/۷۸۳ a
	۱۰	۹/۸۵ b	۳/۸۳۳ b	۲/۷۸ bc
	۲۰	۱۱/۵۸۳۳ a	۴/۴۶۷ b	۳/۴۵ ab
WS	۰	۵ d	۳/۰۱۶ bc	۲/۲۰۸ cd
	۱۰	۷/۶۴ c	۱/۹۵ cd	۱/۵۴۲ de
	۲۰	۴/۲۸۷ d	۰/۹۰ d	۱/۱۱۷ e
LSD		۱/۳۸۱	۱/۵۵	۰/۸۲۱

در کلیه تیمارها از ۰/۵ میلیگرم در لیتر BA و ۰/۰۲ میلیگرم در لیتر NAA استفاده شد.
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.
مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن انجام گرفت.

جدول شمارهٔ ۵- مقایسهٔ غلظت یونهای موجود در محیط کشت‌های ACM و WS بر حسب میلی‌مول

یون‌های موجود	محیط ACM	محیط WS
NH_4^{+1}	۴/۹۴	۰/۶۲۵
K^+	۱۲/۶۱	۳/۵۷
Mg^{+2}	۱/۵	۳/۱
Mn^{+2}	۰/۱۳۲	۰/۰۵
Zn^{+2}	۰/۰۳	۰/۰۱۱
Cu^{+2}	۰/۱۰۵	-
Co^{+2}	۰/۱	-
Na^+	۰/۲۲۴	۶/۳۱
Fe^{+2}	۰/۱۱	۰/۱۱
Ca^{+2}	۳	۱/۸
Po_4^{-3}	۱/۲۵	۰/۲۹
So_4^{-2}	۵/۶۷	۶/۰۹
Cl^-	۲	۱/۸۸
I^-	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹۶
NO_3^-	۹/۶۴	۴/۱
Bo^{-3}	۰/۱	۰/۰۰۵
Mo^{+3}	۰/۰۰۱	-
NH_4/NO^3	۱۴/۵۸	۴/۷۲۵
مجموع نیتروژن (N)	۰/۵۱	۰/۱۵
مجموع قدرت یونی	۴۱/۴	۲۷/۹۵



تصویر شمارهٔ ۱- مرحلهٔ استقرار جوانه‌ها

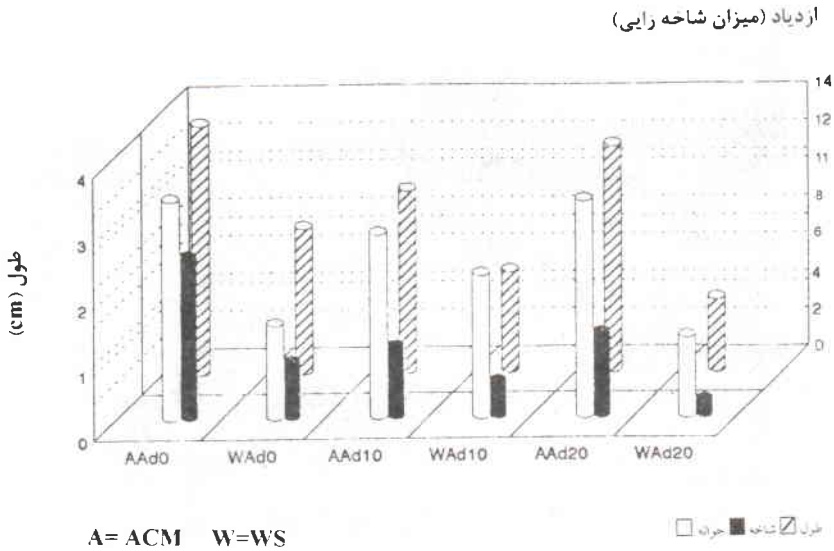
تصویر شمارهٔ ۲- مرحلهٔ تکثیر شاخه‌ها

تصویر شمارهٔ ۳- مرحلهٔ ریشه‌زایی و ایجاد گیاهچه کامل

تصویر شمارهٔ ۴- ایجاد سازگاری در گیاهچه در شرایط گلخانه

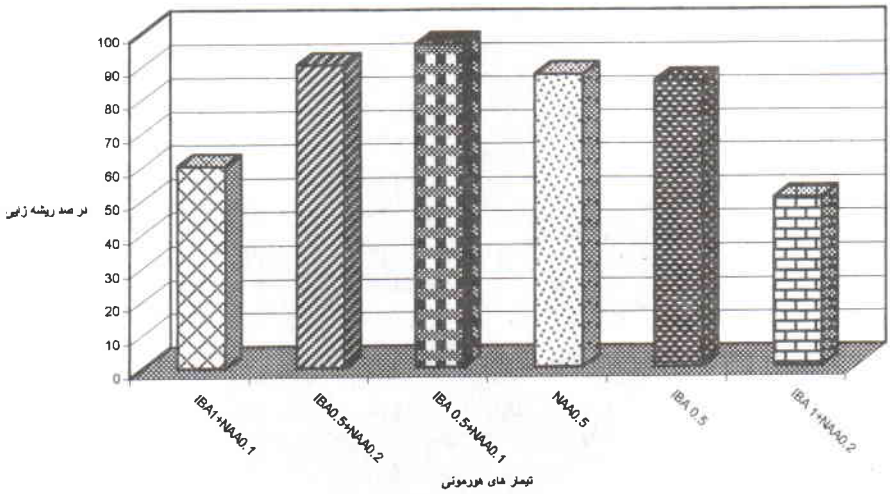
تصویر ۵- انتقال نهال به مزرعه

تصویر ۶- رشد رویشی پس از ۴ سال



A= ACM W=WS
Ad=Adenine

نمودار ۱- تأثیر متقابل محیط کشت و هورمون بر صفات شاخه زائی،جوانه زنی ورشد طولی



نمودار ۲- درصد ریشه‌زائی در تیمارهای مختلف هورمونی

منابع

1-Ahuja, M.R., 1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. Silvae Genet.32: 131-135

2-Ahuja, M.R., 1984. A commercially feasible micropropagation method for aspen. Silvae Genet. 32: 225-227

3-Ahuja, M.R., 1987.*In vitro* propagation of poplar and aspen. In: Bonga, J.M, and D. J., Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3. Martinus Nijhoff Publishers. 207-223

4-Barocka, K.H., M. Baus, E. Lontek, and F. Sievert, 1985. Tissue culture as a tool for *In vitro* mass propagation of a aspen. Z pflanzenzüchtung 94: 340-343

5-Bonga, J.M. and P.V., Aderkas, 1992. In Vitro Culture Of Trees. Kluwer Academic Publishers. 236 pp.

6-Chalupa, V., 1974. Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus. Biol Plant. 16: 316-320

7-Chalupa, V., 1979. *In vitro* propagation of some broad leaved forest trees. Commun Inst For Czech 11: 159-170

8-Christie, V., 1978. Rapid propagation of aspen and silver poplar using tissue culture techniques. Pro. Int. Plant Propagation Soc. 28: 255-260

9-Chun, Y.W., R. B., Hall, and L. C., Stephens 1986. Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* proliferation of *Populus alba* x *Populus grandidentata.* Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 179-185

10- Gautheret, R.J., 1934. Culture du tissue cambial. CR Acad Sci. Paris Ser D 198: 2195-2196

11 - Gebhardt, K., 1989. Application of tissue culture in mass propagation and improvement of poplars. In: Recent developments in poplar selection and propagation techniques proceedings. Meeting of The IUFRO Working Party S2-02-10

Hann-Münden.October 2-6 1989

12-Gupta, P.K. and D. J., Durzan, 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menzcicsii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana). Plant Cell Rep.* 4: 177-179

13-Gupta, P.K. and L. Agrawa, 1991. *In vitro* plantlet development from explants of 25 years old trees of *P.euramericana* a hybrid poplar. Plant Science 78: 99 -105

14-Kirby, E.G, T. Levstek, and M. S., Lee 1987. Nitrogen nutrition. In: Bonga, J.M. and D. J., Durzan (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 1, General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publisher. pp 67-88

15-Mandal, A. 1989. Micropropagation of *Populus tremula*: condition for induction of shoots and roots. Scand. J. For Res. 4: 285-293

16-Mathes, M.C., 1961. The *in vitro* formation of plantlet from isolated aspen tissues, Phyton, 21: 137-141

17-McCown, B.H.,1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In:Davis, T.D. B. H., Haissig, and N. Sankhla, (eds) Adventitious Root Formation in Cutting. Dioscorides Press. Portland, Oregon, pp 289-303

18- Muhle, L. 1970. Recent advances in poplar breeding. In: Romberger, J.A., and P. Mikola, (eds) Int Rev. For RCS 3. Academic Press, New York, London, pp 1-67

19- Sharma, K. K. and T., Thorpe, 1989. In vitro regeneration of shoot buds and plantlets from seedling roots segments of *Brassica napus L.* Plant Cell Tissue Organ Cult 18: 129-141

20-Whithead, H.C.M and K. Giles, 1977. Rapid propagation of poplars by tissue culture methods. J. For. Sci. 7: 40-43

21-Winton, L.L., 1968. Plantlet formation from aspen tissue culture. Science 160: 1234-1235

22-Winton L.L., 1970. Shoot and tree production from aspen tissue culture. Am. J. Bot. 57:904-909

23-Winton, L.L., 1971. Tissue culture propagation of European aspen. For. Sci 17: 348-350

24-Wolter K.H., 1968. Root and shoot initiation in aspen tissue cultures. Science 219: 509-510

25-Schulzke, R., 1989. First experience in forest management with aspen from in -vitro propagation. In: Recent development in poplar selection and propagation techniques proceedings. Meeting of The IUFRO Working Party S2.02-10 Hann-Münden, October 1989 pp. 135-141

Asexual regeneration of Aspen *(Populs tremula)* by tissue culture

Naraghi, T. S., Izadpanah, M.

Research Institute of Forests and Rangelands Genetic and Physiology Dept.

P.O.Box: 13185-116, Theran,Iran.

Abstract:

In this research, effective factors in sterilization, shooting and *rhyzogenes* of *P. tremula* buds' from adult trees, were investigated. Apical buds were cut in different seasons and sterilizied with different treatments and then cultured on ACM and WS mediums.

We found that (a) winter is the best season for explantation. (b) The most effective sterlization methods was treating with 1% sodium hypochloride for 6 minutes and then with 0.1% mercuric chloride for 10 seconds.

The best treatment for effective proliferating was ACM medium containing BA (0.05 mg/l) + NAA (0.02 mg/l). In ACM medium containing both 0.5 mg/l IBA + 0.1 mg /l NAA, 96% of the shoots were rooted after one week.

Plantlets were transfered to sterile pots containing equal quantities of (peat, vermiculite, sand) and after gradual acclimatization (in germinator and greenhouse). These plants were planted in the field. 75% of the transplanted propagules were established in the field.

Keywords: Micropropagation, *Populus tremula*, European aspen, Tissue culture, Bud culture