DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6741

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۳۶-۳۲۷ (۱۳۹۰)

تکثیر غیر جنسی دورگ‌های دو جانبه پده وکبوده به روش کشت بافت

شکوفه شهرزاد*[۱] و میترا امام[۲]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس خبره، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران،
پست الکترونیک: shahrzad@rifr-ac.ir
۲- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور،تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲٤

چکیده

ریزازدیادی دورگ‌های دو طرفه پده (*Populus euphratica*) و کبوده (*P. alba*) *با برداشت* سرشاخه از پایه‌های دورگ‌های تولید شده مستقر در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از پیش سترون‌سازی توسط برس‌کشی با آب و مایع ظرفشویی، جوانه‌های جدا شده به همراه بخشی از ساقه (۱ تا ۱/۵ سانتی متر) توسط کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (w/v) به مدت ۱ دقیقه سترون گشته و در محیط کشت MS همراه با هورمون‌های BA ۰/۵ mg/l و IBA ۰/۰۱mg/l مستقر شدند. سپس سرشاخه‌های رشد یافته در ۹ تیمار شامل سه نوع محیط کشت MS، DKW و WPM حاوی ترکیب‌های متفاوت از 2iP، BA و IBA در سه تکرار و هر تکرار ۳۰ ریز نمونه در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی کشت شدند. پس از یک ماه داده‌ها آنالیز شدند. بهترین تیمار شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه، محیط کشت DKW حاوی BA ۰/۵ mg/l، 2iP ۰/۵ mg/l و IBA ۰/۰۱mg/l بود. به منظور ریشه‌زایی، شاخه‌های تولید شده به محیط کشت DKW فاقد هورمون منتقل، و کلیه آنها پس از دو هفته ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های حاصل در خاک سبک کشت شده و مراحل سازگاری تدریجی را در ژرمیناتور طی نمودند و پس از چهل روز نهال‌ها سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: دو رگ، پده (*Populus euphratica*)، کبوده (*Populus alba*)، ریزازدیادی.

مقدمه

ایجاد دورگ‌های دوجانبه صنوبرهای پده (*Populus euphratica*) و کبوده (*Populus alba*) تجمیع صفات مطلوب دو گونه و نیل به نتاج برتر و متفاوت نسبت به والدین و ایجاد کلن‌های مقاوم به تنش‌های محیطی و همچنین دستیابی به فرم مناسب در ساختار رویشی و نیز تولید چوب بیشتر با کیفیت مناسب را امکان‌پذیر نموده است (Jafari Mofidabadi *et al.*, 1998). فلسفه استفاده از کشت بافت در تکثیر این دورگ‌ها، تکثیر انبوه پایه هیبرید شده مورد نظر به جای سایر روش‌های تکثیر به علت عدم وجود پایه دورگ به تعداد مورد نیاز جهت قلمه زدن یا عدم امکان تکثیر از طریق سایر روش‌های جنسی (ازجمله عدم وجود بلوغ جنسی) می‌باشد. با توجه به اینکه این پایه جدید دورگ که می‌تواند وارث چوب صاف و مرغوب از کبوده و مقاومت بالا به شوری و خشکی و اسیدیته بالای خاک از

پده باشد، ضمن پوشش دادن مناطق نیمه‌خشک وسیع کشور، دارای چوب مرغوب و قابل استفاده در تولیدات تجاری نیز خواهد بود، ازدیاد این گونه از طریق کشت بافت کاملا ضروری می‌باشد.

از طرف دیگر برای ایجاد باغ مادری گونه دورگ مزبور، با توجه به نوین بودن این گونه دورگ نیز روش تکثیر از طریق ریز ازدیادی جهت حفظ و تثبیت صفات آن اهمیت ویژه‌ای می‌یابد.

ایجاد باغ مادری پس از کلن‌سازی گیاه مزبور از طریق ریزازدیادی آن و دستیابی به پایه‌های خالص و مرغوب از این دورگ‌های با ارزش می‌تواند جهت مصارف اقتصادی و صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. امکان تداوم کار در کلیه فصول سال و دستیابی به تعداد زیادی نهال طی مدت زمان کوتاه، از دیگر مزایای این نوع تکثیر است.

کشت بافت صنوبر از سال ۱۹۳٤ شروع شد. در این خصوص Garcia Valdecantos (1987) اعلام کرد که تمام تلاش‌ها و تجارب بدست‌آمده درمورد کشت بافت پده ناموفق بوده، زیرا استریل کردن نمونه‌های بالغ با مشکل روبرو بوده است. در ایران این نوع تحقیقات بر روی صنوبر در سال ۱۳۷۰ آغاز گردید و کشت جوانه انتهایی *Populus tremula* توسط نراقی و همکاران (Naraghi *et al*., 2000) تا حد تولید گیاه‌چه و نهال موفقیت‌آمیز بود. کشت جوانه انتهایی و ایجاد نهال *Populus caspica* توسط (Emam & Shahrzad, 2000) با موفقیت انجام گردید. همینطور Shahrzad و Emam (۲۰۰۱) با استفاده از آنتی بیوتیک توانستند بر آلودگی نهان ریزنمونه‌های پده فائق آمده و از کشت جوانه انتهایی تولید گیاهچه و نهال نمایند. در ضمن Jafari Mofidabadi و همکاران (1998) نیز موفق به ایجاد دورگ دو جانبه بین پده و کبوده شدند. آنها با غلبه بر ناسازگاری فیزیولوژیکی، فاصله زمانی بین زمان گلدهی و گرده‌افشانی صنوبرهای کبوده و پده به وسیله جمع‌آوری گرده‌های پده از مناطق جنوبی ایران که دارای آب و هوای گرمتری هستند توانستند این دورگ‌گیری را با موفقیت انجام دهند. همچنین، آنها تخمدان‌های تلقیح شده را با استفاده از اتانول ۷۰٪ و مرکوریک کلراید ۰/۵ گرم بر لیتر و آب مقطر سترون شده، سترون نمودند و محیط کشت مصنوعی MS (Skoog & Murashige, 1962) جهت تغذیه جنین بکار بردند.

مواد و روشها

سرشاخه‌های پایه‌های دورگ دو طرفه پده و کبوده (*P. euphratica* × P. *Alba*) در فصل پاییز از مزرعه تحقیقاتی گروه تحقیقات زیست‌فناوری برداشت شدند. پس از انتقال مواد گیاهی به آزمایشگاه ابتدا ده سانتی‌متر انتهایی سرشاخه‌ها را جدا کرده و توسط آب و مایع ظرف‌شویی برس کشیده تا کلیه آلودگی‌های سطحی پاک شدند (مرحله پیش‌سترون‌سازی). سپس جوانه‌های روی سرشاخه‌ها به همراه نیم تا یک سانتی‌متر از ساقه جدا شدند. مواد گیاهی در محلول‌های سترون‌کننده مانند هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (v/v) و یا کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (W/V) در زمان‌های متفاوت تیمار شده و پس از چندین بار شستشو توسط آب مقطر، برای استقرار در محیط‌های کشت تهیه شده از قبل آماده شدند (جدول ۲).

برای کشت جوانه‌های سترون شده، کلیه وسایل و ابزار مورد استفاده توسط اتوکلاو سترون شدند و پس از قطع قاعده ریزنمونه‌ها توسط اسکالپل، به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mg/l BA (6-Benzylaminopurine) و ۰/۰۱ mg/l IBA منتقل شدند. جوانه‌هایی که دچار

آلودگی یا سوختگی نشده بودند پس از یک ماه واکشت شدند.

محیط کشت‌های مناسب جهت واکشت جوانه‌های مستقر شده به منظور شاخه‌زایی و تکثیر بر روی سه محیط کشت پایه متفاوت MS، WPM (McCown & Sellmer, 1987) و DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) در سه تیمار هورمونی ساخته شد (جدول ۱) و ریز نمونه‌های استقرار یافته در ۳ تکرار (در هر تکرار ۳۰ ریز نمونه) در طرح کاملا تصادفی کشت شدند. داده‌ها توسط نرم‌افزار MINITAB تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱- تیمارهای متفاوت محیط کشت و هورمون جهت بهینه‌سازی شاخه‌زایی

هورمون / محیط کشت	BA (mg/l)	2iP (mg/l)	BA و 2iP (mg/l)
DKW	۰/۵	۰/۵	۰/۵ و ۰/۵
MS	۰/۵	۰/۵	۰/۵ و ۰/۵
WPM	۰/۵	۰/۵	۰/۵ و ۰/۵

میزان IBA در هر ۹ تیمار mg/l ۰/۰۱ بود.

پس از دستیابی به بهترین تیمار شاخه‌زایی، شاخه‌های هر دو دورگ تکثیر شدند. هنگامی که طول هر شاخه به اندازه مناسب (حدود ۲ تا ۳ سانتی متر) رسید وارد مرحله ریشه‌زایی گشتند. در این مرحله ابتدا کلیه شاخه‌ها به محیط کشت DKW فاقد هورمون منتقل شدند. پس از ریشه‌دار شدن گیاهچه‌های حاصل در خاک سبک (پیت، خاک برگ و ماسه به نسبت‌های مساوی) که در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفته بودند کشت شدند و مراحل سازگاری تدریجی را در ژرمیناتور، همراه با سرپوش‌های پلاستیکی گذراندند و در نهایت پس از حذف سرپوش، نهال‌ها سازگار شدند (شکل ۱).

نتایج

بررسی تیمارهای مورد استفاده جهت سترون‌سازی ریز نمونه‌های برداشت شده در فصل پاییز از پایه‌های دورگ پده و کبوده نشانگر آن بود که استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲٪ (v/v)، اگرچه آلودگی را کنترل می‌کند ولی درصد سوختگی ریز نمونه‌ها را افزایش می‌دهد (جدول ۲- تیمار ۲). بنابراین بهترین تیمار برای سترون‌سازی این ریزنمونه‌ها استفاده از کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (w/v) به مدت یک دقیقه بود که توانست ۹۰٪ ریزنمونه سترون و سالم به جای بگذارد (جدول ۲ - تیمار۳). با افزایش زمان استفاده از کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (w/v) میزان سوختگی نیز افزایش یافت (جدول ۲، تیمار ٤).

جدول ۲- تیمارهای مختلف سترون‌سازی

شماره تیمار	هیپوکلریت سدیم (٪۲$^{v}/_{v}$)	کلرور مرکوریک (٪۰/۱$^{w}/_{v}$)	آلودگی (٪)	سوختگی (٪)	زنده‌مانی در سلامت (٪)
۱	۵ دقیقه	–	۲۰	۱۳	٦٧
۲	۱۰ دقیقه	–	۵	۳۰	٦٥
۳	–	۱ دقیقه	۵	۵	۹۰
٤	–	۳ دقیقه	۵	۷	۸۸

– در هر تیمار ۵۰ ریزنمونه مورد آزمایش قرار گرفت.

ریزنمونه‌های سالم و سترون در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mg/l BA و ۰/۰۱ mg/l IBA استقرار یافتند.

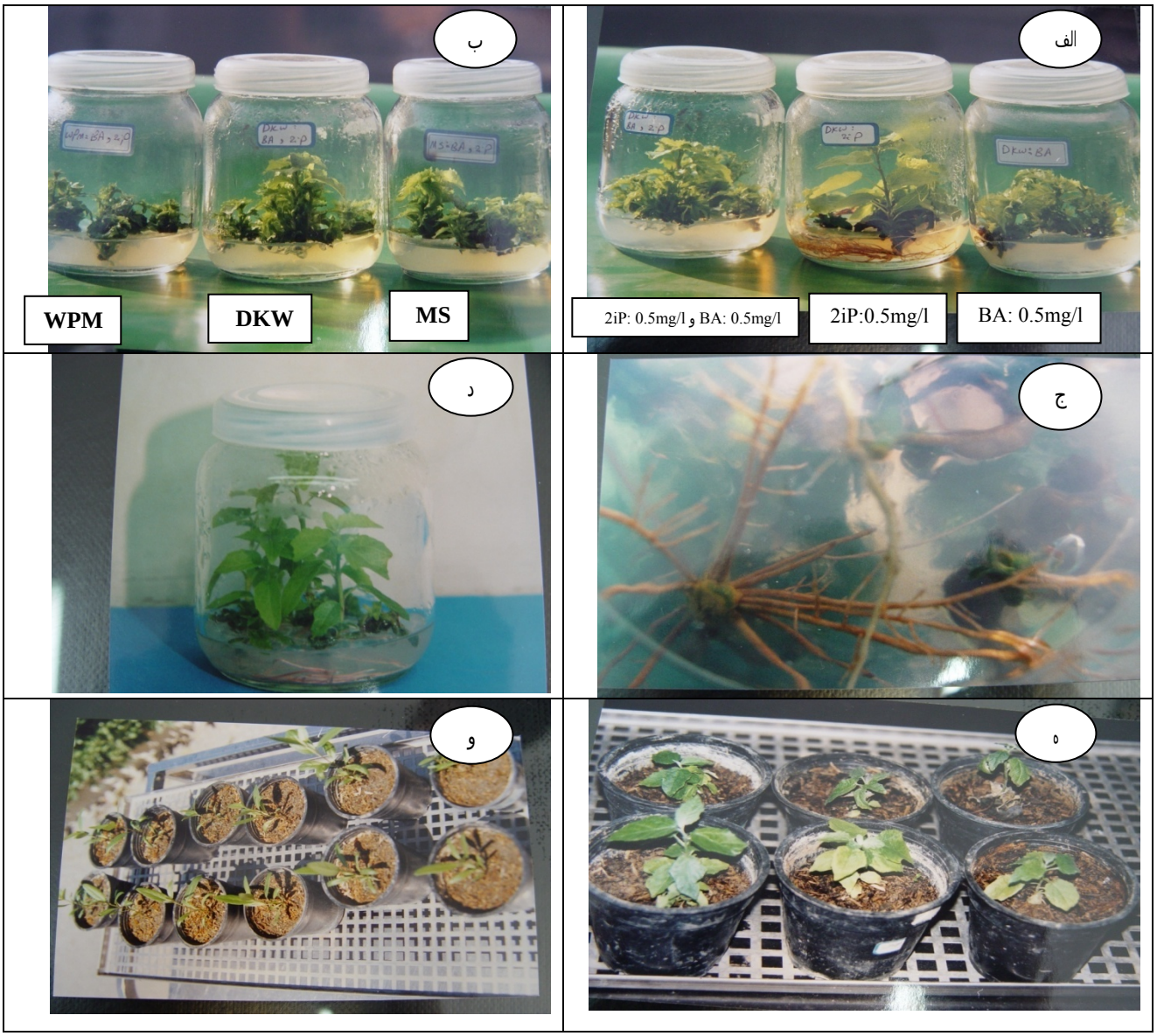
با استناد به گزارش‌ها در این تحقیق از سه نوع محیط کشت DKW، MS و WPM با غلظت‌های هورمونی متفاوت (جدول ۱) استفاده گردید که با توجه به بررسی‌های آماری ازجمله اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میانگین رشد طولی و شاخه‌زایی (شکل ۲ و ۳)،مشخص شد که DKW بهترین محیط کشت در این تحقیق بود (شکل ۱).

در شکل ۳ مقایسه ۳ تیمار هورمونی متفاوت که متعلق به محیط کشت DKW می‌باشد نشانگر آن بود که 2iP (6-γγ- Dimethylallylamino purine) به تنهایی اثر بیشتری نسبت به BA و تلفیق این دو هورمون بر افزایش میانگین رشد طولی داشت که این نتیجه در مورد محیط کشت WPM مشابه، ولی در مورد محیط کشت MS معکوس بود. مشاهدات نشان داد وجود هورمون 2iP در محیط کشت، ریشه‌زایی را تحریک کرد. در بررسی اثر هورمون بر میانگین شاخه‌زایی (شکل ۲) نتایج نشان داد استفاده از تلفیق هورمون‌های BA و 2iP به‌ترتیب متعلق به محیط کشت‌های DKW و MS، شاخه‌زایی بیشتری نسبت به سایر تیمارهای حاوی یک نوع سیتوکنین وجود داشت و کمترین میزان شاخه‌زایی در هر سه نوع محیط کشت مورد استفاده، متعلق به تیمارهایی بود که فقط 2iP داشتند. مقایسه تیمارها در شکل ۲ نشانگر آن بود که اگرچه استفاده از تلفیق هورمون‌های BA و 2iP در محیط کشت DKW بیشترین ضریب ازدیاد شاخه‌زایی را ایجاد نمود، ولی بین تیمارهایی که BA به تنهایی داشتند با آنهایی که تلفیق دو هورمون را دارا بودند تفاوت معنی‌داری از نظر ضریب ازدیاد شاخه‌زایی وجود نداشت. در مقایسه شکل ۲ و ۳ مبنی بر تأثیر متقابل محیط کشت و هورمون بر میانگین شاخه‌زایی و رشد طولی، نتایج نشان داد که در هر سه نوع محیط کشت تیمارهایی که حاوی تلفیق دو هورمون BA و 2iP بودند از رشد طولی و ضریب ازدیاد شاخه‌زایی خوبی به طور همزمان برخوردار بودند. در راستای نتایج فوق بهترین تیمار ضریب ازدیاد شاخه‌زایی و رشد طولی با تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها در سطح ۵٪ (جدول۳)، محیط کشت DKW همراه با هورمون‌های BA و 2iP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و IBA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر بود.

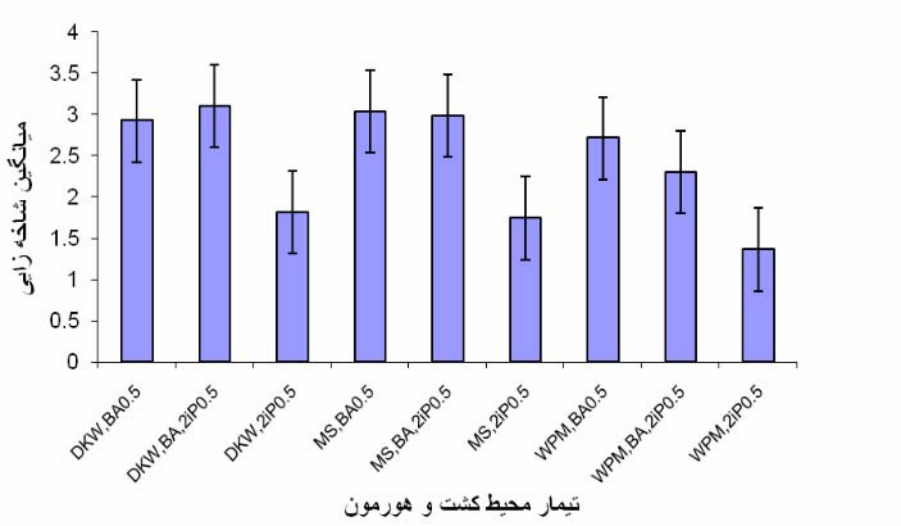
کلیه شاخه‌های ریزازدیادی شده هر دو نوع دورگ پس از انتقال به محیط کشت DKW فاقد هورمون طی ۱۵ روز ریشه‌دار شدند (شکل ۱). گیاهچه‌های حاصل در خاک سبک (پیت، خاک برگ و ماسه به نسبت‌های مساوی) که در

دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفته بودند کشت شدند و مراحل سازگاری تدریجی را در ژرمیناتور، همراه با سرپوش‌های پلاستیکی گذراندند و در نهایت پس از ٤٠ روز سرپوش‌ها حذف شده (شکل ۱) و نهال‌ها سازگار شدند.

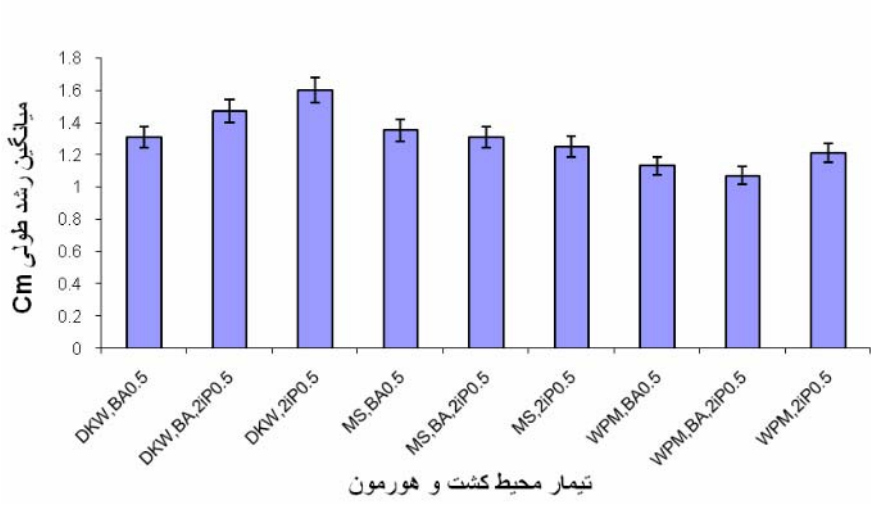
کلیه آزمایش‌ها بر روی هر دو نوع دورگ مادر پده و مادر کبوده به‌طور همزمان انجام شد و در همه مراحل نتایج یکسان بدست آمد (تفاوت‌های جزئی در نتایج نهایی بی‌تأثیر بودند).



شکل ۱- (الف) میزان شاخه‌زایی و رشد طولی دورگ مادر کبوده در محیط کشت DKW تحت تأثیر دو هورمون BA و 2iP، (ب) میزان شاخه‌زایی و رشد طولی دورگ مادر کبوده تحت تأثیر تلفیق دو هورمون BA و 2iP در محیط کشت‌های MS، WPM و DKW، (ج) ریشه‌زایی در صنوبرهای دورگ مادر پده، (د) ریشه‌زایی در دورگ‌های مادر کبوده، (ه) نهال‌های سازگار شده دورگ مادر کبوده، (و) نهال‌های سازگار شده دورگ مادر پده



شکل ۲- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میانگین شاخه‌زایی
میزان IBA در هر ۹ تیمار ۰/۰۱ mg/l بود.



شکل ۳- اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میانگین رشد طولی
میزان IBA در هر ۹ تیمار ۰/۰۱ mg/l بود.

بحث

.بهترین زمان برداشت سرشاخه‌ها برای ریزازدیادی فصل پاییز بود. زیرا در این فصل بخش مریستمی جوانه‌ها که در حالت خواب توسط فلس‌ها پوشیده شده‌اند از اثرات سمی سترون‌کننده‌ها محافظت می‌شوند.همچنین نتایج آزمایش‌ها نشان داد که جوانه‌های خواب تحریک‌پذیری بیشتری در مقابل قرارگیری ناگهانی در مقابل محیط کشت و هورمون‌های رشد گیاهی دارند.

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر میانگین شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه

منبع تغییرات	درجه آزادی	شاخه‌زایی	رشد طولی
محیط کشت و هورمون	۸	۱/۲۹*	۰/۰۸**
خطا	۱۸	۰/٤۹	۰/۰۱۷
کل	۲٦		

برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی در حذف کرک‌ها و ترشحات صمغی سطح فلس‌ها مؤثر بود و امکان وجود آلودگی‌های سطحی را به حداقل خود می‌رساند. محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (w/v) که از سمی‌ترین محلول‌های سترون‌سازی می‌باشد باید در غلظت پایین یا زمان کوتاه بر جوانه‌ها اثر بگذارد تا از انهدام و مرگ بافت‌ها توسط آن جلوگیری شود. این نتایج در مورد روش سترون‌سازی و فصل نمونه‌برداری با نتایج (Emam & Shahrzad, 2001) در گونه *P. caspica* و Gupta و Agrawal (1991) در گونه *P. euramericana* مشابه می‌باشد. با این تفاوت که امام و شهرزاد در گونه سفید پلت از سرشاخه‌های درخت بالغ جنگلی برداشت کردند که به علت وجود آلودگی زیاد، برای سترون‌سازی ریز نمونه‌ها از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (w/v) در زمان طولانی‌تر استفاده نمودند.

در مرحله استقرار ریزنمونه و شاخه‌زایی استفاده از هورمون IBA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر در تحریک شاخه‌زایی مؤثر بود و افزایش میزان این هورمون تشکیل کالوس را تحریک می‌نماید (Emam & Shahrzad, 2001). در این خصوص Chalupa (1974) نیز گزارش کرد که حضور اکسین، شاخه‌زایی را در کشت‌های کالوس صنوبر به شدت تحریک می‌کند.

مقایسه قدرت یونی محیط‌های کشت DKW، MS و WPM نشان داد که قدرت یونی محیط کشت‌های DKW و MS مشابه بود ولی قدرت یونی محیط کشت WPM کمتر از نصف آنهاست. بنابراین نتایج در مورد رشد طولی و شاخه‌زایی بدون در نظر گرفتن اثر هورمون در شکل ۵ و ٦ نشان می‌دهد محیط‌های کشت DKW و MS از برتری برخوردار بودند که می‌تواند مربوط به مناسب بودن قدرت یونی محیط کشت‌های نامبرده برای این گونه باشد (Bonga & Von aderkas, 1992) .

میزان یون کلسیم در محیط کشت DKW حدود ۳ برابر دو محیط کشت دیگر می‌باشد و کلسیم علاوه بر دیگر وظایف مهمش در حفاظت از سلول و غشاء آن در برخی از فعالیت‌های سلولی مانند ساختن دیواره سلولی با تحریک اکسین‌ها دخالت دارد و فعالیت‌های هورمونی را تنظیم می‌نماید (Bonga & Von aderkas, 1992). چون کلسیم در محیط کشت DKW زیادتر بوده و بیشتر به صورت یون نیترات مصرف می‌شود و سمیت کلر در آن حداقل است، شاید توانسته در بهبود تکثیر و شاخه‌زایی این گونه‌ها مؤثر باشد.

در مجموع مقایسه جدول قدرت یونی نشان داد که محیط کشت DKW از لحاظ میزان و نوع مواد مورد نیاز گونه‌های مورد بررسی از درجه بهتری نسبت به دو محیط کشت دیگر برخوردار بود و محیط کشت WPM درجه آخر را به خود اختصاص داد.

در تیمارهای شاخه‌زائی BA در حد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. محققان مختلف در تکثیر گیاهان

چوبی مقادیر متفاوتی از ۰/۱ تا ٦ میلی‌گرم در لیتر BA را مورد آزمایش قرار دادند. اما به دلیل اثرات نامطلوب استفاده از BA زیاد ازجمله رشد چندشاخه‌ای، Biondi و همکاران (1984) مقادیر کمتر BA یا تعویض آن با سیتوکنین مناسب دیگر را برای تکثیر توصیه نمودند. در این آزمایش، از ۰/۵ میلی‌گرم 2ip بر لیتر به جای مقادیر بیشتر BA استفاده شد.

برای تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، اعمال پیش‌تیمار محیط کشت بدون هورمون کاملاً ضروری بود. القای تشکیل ریشه بوسیله اکسین به تجمع فلاونوئیدها منجر شده که این اتفاق در حضور سیتوکینین صورت نمی‌گیرد، پس حداقل یک ماه قبل از تیمار اکسین برای القای ریشه، باید شاخه‌ها بر محیط بدون هورمون کشت شوند. در ضمن Curir (1990) با انجام تحقیق بر تأثیر فلاونوئیدها بر القای تشکیل ریشه توسط اکسین در شاخه‌های اکالیپتوس به این حقیقت دست یافت. در همین راستا ریشه‌زایی دورگ‌ها نیز پس از حذف هورمون‌های سیتوکنین براحتی انجام شد. در همین رابطه Shahrzad و Emam (۲۰۰۰) با حذف هورمون‌های سیتوکنین و افزایش همزمان هورمون IBA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در گونه *P. eufratica* موفق به ایجاد ۸۲٪ ریشه‌زایی شدند و Emam و Shahrzad (۲۰۰۱) در گونه *P. caspica* در مورد پیش‌تیمار ریشه‌زایی استفاده از محیط کشت MS فاقد هورمون برای یک تا دو هفته و به دنبال آن افزایش IBA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر را توصیه کردند. در ضمن Ahuja (1983) نیز ریشه‌زایی صنوبرهای بالغ Aspen را در حضور اکسین‌های NAA و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به سهولت انجام داد.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام گردید، از این رو از مسئولان مؤسسه و همکاران گروه مذکور که در این پژوهش ما را همراهی نمودند سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

– Ahuja, M.R., 1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. Silvae Genetica, 32: 131-135.
– Biondi, S., Canciani, L. and Bagni, N., 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Canadian Journal of Botany, 62: 2385–2390.
– Bonga, J.M. and Aderkas, P.V., 1992. *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, 236 p.
– Chalupa, V., 1974. Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus. Biol. Plant, 16: 316-320.
– Curir, P.C., VanSumere, F.,Termini, A., Barthe, P.,Marchesini, A. and Dolci, M., 1990. Flavonoid accumulatiom is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, 92: 1148 –1153.
– Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindisii x J. regia*). Horticultural Science, 9: 507-509.
– Emam, M., and Shahrzad, Sh., 2001. Micropropagation of *Populus caspica*. Pajouhesh va Sazandegi in Natural Resources, 53:84-90.
– Garcia- valdecantos, J.L. and Padro, A., 1989. Vegetative propagation of *Populus euphratica* in spoin. Recent development in poplar selection and propagation techniques proceedings Meeting of the EUFRO working party, 52.02.10. Hann. Munden, October 2-6: 185- 189.
– Gupta and Agraval., 1991. *In vitro* plantlet development for explants of 15 years old trees of *Populus euramericana* a hybrid poplar. Plant Science, 78: 99-105.
– Jafari Mofidabadi, A. Modir-Rahmati, A. and Tavasoli, A., 1998. Application of ovary and ovule culture in *Populus alba* L. × *P. euphratica* Oliv Hybridization. Silvae Genetica, 47: 5-6.

– McCown, B.H. & Sellmer, J.C. 1982. Media and physical environment. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J (Eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1(pp. 4 -17).
– Murashige, T. and Skoog, F.,1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473 –597.
– Naraghi, T.S. and Izadpanah, M., 2000. Asexual regeneration of *Populus tremula* by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 87-108.
– Sabeti, H., 1965. Trees and shrubs of Iran. Tehran University Publications, 204-205.
– Shahrzad, Sh., and Emam, M., 2000. Asexual regeneration of *Populus euphratica* by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 11-23.

Micropropagation of *Populus euphratica and P. alba* hybrids by tissue culture

Sh. Shahrzad[1*] and M. Emam[2]

1*- Corresponding author, B.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran
E-Mail:Shahrzad @rifr-ac.ir
2- M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran

Received: 05.03.2011 Accepted: 19.06.2011

Abstract

In order to micropropagate *Populus euphratica*×*P. alba* and *P. alba*×*P. euphratica*, hybrids, shoot tips were harvested from research nursery of Biotechnology Department, Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran, Iran. The buds were established after sterilizing by $0.1\%^{W}/_{V}$ mercuric chloride for 1 minute on the MS medium containing 0.5mg/l BA and 0.01mg/l IBA. The shoots of the both hybrids were then transferred separately on 9 treatments, combinations of three different media (MS, WPM and DKW) with different ranges of hormones (IBA, 2iP and BA) in a completely randomized design with 3 replications and 3 time periods (every period was one month and each replication included 30 explants). The best treatment with the highest level of probability of shooting and the best growth in length were obtained using DKW medium with BA and 2iP by concentration of 0.5mg/l and 0.01mg/l IBA. Shoot rooting occurred in hormone free DKW medium after two weeks. The plantlets were established in polyethylene caps jam bottles, containing a light soil (1: 1: 1 peat, humus and sand) and kept in a germinator for acclimatization. They were acclimatized successfully and transferred to field after 40 days.

Key words: *Populus euphratica*, *P. alba*, Micropropagation, Hybrid.