

واکنش متفاوت دورگ‌های بین گونه‌ای صنوبر به تکثیر از طریق ریزازدیادی

صدف خسروان^۱، حسین میرزایی ندوشن*^۲، عباس قمری زارع^۳ و محمدعلی ابراهیمی^۴

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، تهران

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

پست الکترونیک: nodoushan2003@yahoo.com

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۴- دانشیار، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۱

چکیده

گونه‌های مختلف صنوبر قابلیت‌های متفاوتی دارند که آنها را از هم متمایز می‌کند. ولی این تفاوت‌ها موجب شده است که برخی از گونه‌ها در شرایط متضاد اقلیمی سازگاری پیدا کنند. دورگ‌های بین این گونه‌ها نیز قابلیت‌های بینابینی از خود نشان می‌دهند که ممکن است بتوانند دامنه اکولوژیک صنوبرها را گسترش دهند. در این تحقیق سه پایه از دورگ‌های بین گونه‌ای حاصل از تلاقی بین دو گونه از صنوبر به نام‌های سپیدار (*Populus alba*) و پده (*Populus euphratica*) با ریزازدیادی تکثیر شدند تا ضمن بهینه‌کردن روش تکثیر این دورگ‌ها، تفاوت‌های احتمالی واکنش به ریزازدیادی در آنها نیز بررسی شود. در بخش پرآوری دورگ‌های مورد مطالعه واکنش‌های متفاوتی به محیط کشت‌های مورد استفاده از خود نشان دادند، به طوری که یکی از دورگ‌ها در سطوح سه‌گانه محیط‌های پرآوری، به میزان زیادی ریشه هم تولید کرد. این دورگ در مرحله پرآوری از نظر صفاتی مانند تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد جوانه‌های جانبی و مقدار ریشه برتری زیادی نسبت به سایر پایه‌ها از خود نشان داد. در مرحله ریشه‌زایی هم پایه برتر در مرحله تکثیر، برتری ویژه‌ای از نظر تعداد و طول ریشه از خود نشان داد. سهولت در ریشه‌دهی یکی از دورگ‌ها، که در صورت انتخاب به عنوان یک رقم تجاری باید به صورت رویشی تکثیر و توسعه داده شود، می‌تواند امتیاز ویژه‌ای برای این دورگ باشد. البته اثر متقابل موجود بین دو عامل مورد مطالعه هم در بیشتر موارد برتری یکی از دورگ‌ها را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، تکثیر غیرجنسی، دورگ بین گونه‌ای، صنوبر، سپیدار، پده

مقدمه

ویژگی‌های متفاوتی می‌باشند و به شرایط متفاوت اقلیمی سازگاری پیدا کرده‌اند. در کشور ما به دلیل تعدد اقلیم‌های حیاتی و تفاوت‌های زیادی که بین شرایط اقلیمی در مناطق مختلف وجود دارد تمایز زیادی بین عناصر رویشی مناطق مختلف دیده می‌شود. گونه‌های مختلف صنوبر نیز از نظر

صنوبرها در زمره تندرشدترین گونه‌های جنگلی خزان‌کننده هستند که به طور عمده در جنگل‌های معتدله، نیم‌گرمسیری تا گرمسیری نیمکره شمالی پراکنده شده‌اند. جنس صنوبر دارای گونه‌های متعددی است که دارای

رغبت بیشتر در زراعت چوب توسط صاحبان اراضی هم بشود (Mirzaie-Nodoushan *et al.*, 2015). توانمندی صنوبرها در تولید مناسب مواد سلولزی حاصل ویژگی‌های متعدد رویشی آنهاست. این ویژگی‌ها هریک سهم متفاوتی در فتوسنتز و رشد صنوبرها دارند (Tavousi-Rad *et al.*, 2016). صنوبرها حتی در برگ هم تنوع گسترده‌ای را در درون و بین گونه‌های مختلف از خود نشان داده‌اند (Marron *et al.*, 2007) و ویژگی‌های مورفولوژیک و ریزمورفولوژیک آنها از قبیل ابعاد برگ و حتی تعداد و ابعاد روزنه در برگ نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان فتوسنتز گیاه دارند. اگرچه تنوع زیادی بین پرونانس‌های مختلف پده وجود دارد (Ghadiripour *et al.*, 2015) که می‌تواند آنها را از نظر برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک حتی از هم متمایز کند، ولی استفاده از تنوع موجود در بین گونه‌های مختلف صنوبر دامنه وسیع‌تری از تنوع را ایجاد می‌کند. به عبارت دیگر هم تنوع درون گونه‌ای و هم تنوع بین گونه‌ای در صنوبرها ظرفیت اصلاحی گسترده‌ای را در اختیار به‌نژادگران قرار می‌دهد. به‌همین منظور سال‌هاست که در داخل کشور ما هم محققان در پی به‌دست آوردن دورگ‌های بین گونه‌ای با انجام تلاقی بین گونه‌های مختلف جنس صنوبر (*Populus*) هستند (Jafari-Mofidabad & Joorabchi, 2001; Jafari-Mofidabad, 2015). برخی از محققان حتی به‌دنبال استفاده از تنوع قابل استحصال از تلاقی بین دو جنس صنوبر و بید بوده و هستند تا بتوانند تا جای ممکن تولید مواد لیگنوسلولزی را در واحد سطح افزایش دهند (Ahmadi *et al.*, 2009). در ایران Jafari-Mofidabad (۲۰۱۵)، با کشت جنین بالغ حاصل از تلاقی بین گونه‌های *P. nigra* و *Populus caspica* به تولید دورگ‌های بین گونه‌ای اقدام کرد. وی تخمدان‌های حاصل از تلاقی بین دو گونه مذکور که در سنین ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی بودند را در شرایط سترون بر روی محیط کشت MS فاقد هورمون رشد گیاهی حاوی دو غلظت ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز کشت کرد و با تفاوت معنی‌دار

سازگاری به‌شرایط مختلف اقلیمی از یکدیگر متمایز شده‌اند. به‌عنوان نمونه در مناطق جنوبی و گرمسیر کشور گونه‌ای به‌نام پده یا *Populus euphratica* به‌خوبی قادر به رویش می‌باشد (Calagari *et al.*, 2008). به‌طوری‌که در این مناطق، پده حتی قادر است کلنی‌های بزرگی را در حواشی رودخانه‌ها تشکیل دهد (Eusemann *et al.*, 2013). این گونه از نظر تحمل به شوری و قلیائیت خاک و نیز درجه حرارت زیاد بسیار مقاوم است (Arndt *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2002). اما متأسفانه به‌دلیل کج و معوج و غیر استوانه‌ای بودن تنه، فاقد ارزش تجاری و صنعتی لازم است. در مقابل، گونه‌ای مانند سپیدار با نام علمی *Populus alba* مقاومت کمتری به‌شرایط سخت محیطی دارد ولی تنه‌ای استوانه‌ای با ارزش بالای صنعتی و تجاری دارد که آن را از پده هم از نظر ویژگی‌های زیستگاهی و هم از نظر ارزش تجاری و کاربری به‌خوبی متمایز می‌کند. دورگ‌های بین دو گونه پده و سپیدار می‌توانند ویژگی‌های مطلوب هر دو را در یک دورگ مجتمع کنند و همین ایده، سال‌هاست که انگیزه تلاش محققان متعددی در دورگ‌گیری بین دو گونه مذکور شده است (Jafari-Mofidabad, 2015). لازم به‌ذکر است که با وجود اهمیت کشت گونه‌های درختی تندرشد به‌منظور کاهش فشار بر جنگل‌های طبیعی، سطح زیر کشت این گونه‌ها از جمله صنوبرها کاهش یافته است که گاهی خشکسالی، کم‌خطرتر بودن سایر کشت‌های زراعی، نبود سیستم تنظیم بازار و تضمین خرید و نظایر اینها دلیل این کاهش سطح زیر کشت عنوان شده است (Yousefi & Modir-Rahmati, 2013). البته یکی از دلایل اصلی کاهش رغبت صنوبرکاری در کشور را باید کم بودن عملکرد چوب در واحد سطح دانست. برای افزایش محصول در صنوبرکاری‌ها در جهت رفع نیازهای داخلی می‌توان در کنار افزایش سطح زیر کشت گونه‌های مختلف این جنس، افزایش عملکرد در واحد سطح را هم مورد توجه قرار داد. یکی از مؤثرترین روش‌های افزایش عملکرد چوب در واحد سطح، استفاده از دورگ‌های بین گونه‌ای سازگار با مناطق رویشی صنوبرها در ایران است که می‌تواند سبب ایجاد

به‌عنوان بهترین تیمار سترون‌سازی تشخیص داده شد. نامبردگان همچنین چهار تیمار هورمونی را با استفاده از محیط کشت پایه MS به‌کار گرفتند و ترکیب هورمونی IBA به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر، BAP به‌مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، 2-4D به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و Kin به‌مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با محیط پایه MS را به‌عنوان بهترین تیمار کالوس‌زایی تشخیص دادند. البته در تحقیق نامبردگان با افزایش سن ریزنمونه میزان کالوس‌زایی کاهش یافت. همچنین به‌منظور ریشه‌زایی از تیمار هورمونی NAA و IBA هر یک به‌میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با محیط پایه MS با ۱/۲ نترات به‌عنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی استفاده شد. در دستورالعمل ریزازدیادی صنوبرها تنها تنظیم هورمون‌های مختلف دغدغه محققان نیست، بلکه تنظیم سایر اجزاء محیط کشت نیز گاهی کارساز بوده است. در این زمینه Shetabboushehri و همکارانش (۲۰۱۵) در تنظیم نیتروژن مورد نیاز در محیط کشت به این نتیجه رسیدند که تعادل یونی مناسب‌تر موجب افزایش توان جذب نیتروژن توسط شاخساره‌ها می‌شود.

در سطح بین‌المللی نیز سابقه طولانی در ریزازدیادی صنوبرها وجود دارد. از جمله Gupta و Agraval (۱۹۹۱) با استفاده از محیط کشت MS جوانه‌های درختان ۱۵ ساله صنوبر اورآمریکانا را تکثیر کردند. در زمینه ریزازدیادی دورگ‌های بین گونه‌ای صنوبرها نیز Ziauka و Kuusiene (۲۰۱۴)، اقدام به تکثیر دورگ بین گونه‌های سپیدار (*P. aba*) و صنوبر لرزان (*P. tremula*) از طریق کشت جوانه‌های رویشی در محیط عاری از هورمون کردند. در تحقیق فوق از محیط کشت بدون هورمون WPM و دو گزینه متفاوت از نظر هوادهی در تکثیر رویشی به‌صورت ریزازدیادی استفاده شد تا روش تکثیر بر روی دورگ جدید بهینه شود. به‌عبارت دیگر ریزنمونه‌ها در دو شرایط متفاوت قرار داشتند. به نحوی که در یکی سرپوش ظرف کاملاً بسته شده بود تا از ورود گازهای خارجی ممانعت شود و در دیگری سرپوش ظرف بدون پارافیلیم بسته شده بود به‌نحوی که امکان ورود هوای خارج از ظرف وجود داشت. دو نوع ریزنمونه به‌صورت جوانه انتهایی و

بین سنین کشت تخمدان‌ها بهترین رشد و استقرار را در غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آورد. با به‌دست آمدن دورگ‌های بین گونه‌ای در صنوبرها تکثیر رویشی نهال‌های حاصل از دورگ‌گیری که معمولاً تعدادشان کم هست، چالش بعدی محققان است که به‌شیوه‌های مختلف قابل انجام شده است. ریزازدیادی یکی از روش‌های مرسوم است که تاکنون در مواردی نتیجه مناسبی از آن به‌دست آمده است (Emam & Shahrzad, 2001; Tavassoli Asgari et al., 2012; Asadi & Mirzaie-Nodoushan, 2011). در ایران ریزازدیادی گونه‌های مختلف جنگلی سابقه زیادی دارد. برخی از گونه‌های صنوبر به‌دلیل عدم تشکیل ریشه بر روی قلمه به‌سختی از طریق قلمه تکثیر می‌شوند و ناگزیر باید از طریق روش‌های دیگر تکثیر رویشی مانند ریزازدیادی تکثیر شوند (Shetabboushehri et al., 2015). از این‌رو در تکثیر رویشی صنوبرها از ریزازدیادی به‌دفعات استفاده شده است. به‌عنوان نمونه در کشور ما Naraghi و Izadpanah (۲۰۰۰) با کشت جوانه انتهایی گونه‌ای از صنوبر به‌نام صنوبر لرزان یا *Populus tremula* موفق به تولید نهال این گونه شدند. در سپیدار که یکی از گونه‌های تندرشد صنوبر است و چوب آن ارزش صنعتی زیادی دارد و در زراعت چوب جایگاه رفیعی پیدا کرده است Tavassoli Asgari و همکاران (۲۰۱۲) نیز به‌منظور تکثیر رویشی از ریزازدیادی استفاده کردند. محققان مذکور در سترون‌سازی نمونه‌ها از کلرید جیوه ۰/۱٪ به‌مدت ۴ دقیقه استفاده کردند و از محیط کشت DKW به‌همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2iP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BA برای شاخه‌زایی بهترین نتیجه را گرفتند و از همان محیط کشت ولی بدون هورمون در ریشه‌زایی استفاده کردند. بنابراین با استفاده از تخمدان نارس و بالغ هم Sadat و همکاران (۲۰۰۷) اقدام به تکثیر رویشی صنوبر پده کردند. این محققان از پنج تیمار مبتنی بر اتانول، کلرور مرکوریک و هیپوکلریت سدیم برای سترون‌سازی استفاده کردند که تیمار اتانول ۷۵٪ به‌مدت ۱ دقیقه به‌همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه

حامل جوانه‌های رویشی دورگ‌های مورد نظر از نهالستان برداشت شده و در آزمایشگاه ابتدا با آب و مایع صابون و سه مرتبه برس‌کشی و شستشو با آب مقطر، آلودگی‌های سطحی به‌میزان زیادی کاهش یافتند. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۴۰٪ هیپوکلریت سدیم قرار گرفته و بعد سه مرتبه با آب مقطر به‌خوبی شستشو شدند. در پایان مرحله سترون‌سازی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه قرار گرفتند و در ادامه سه‌بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. روش ریزازدیادی شامل قطعه‌ای از شاخه به‌ضخامت تقریبی سه میلی‌متر به‌همراه یک جوانه رویشی بود که به‌وسیله اسکالپل و در شرایط عاری از آلودگی و زیر لامینارفلو جدا شد و بر روی محیط کشت قرار گرفت.

از محیط کشت پایه 1/2MS (Murashige & Skooge, 1962)، به‌همراه هورمون IBA به‌میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و هورمون BA به‌میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و 2iP به‌میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای کشت و استقرار اولیه نمونه‌ها استفاده شد. در کشت ریزنمونه‌ها برای استقرار اولیه، ابتدا از ویال‌های شیشه‌ای به ارتفاع ۷ و قطر ۳ سانتی‌متر استفاده شد و از هر پایه حداقل ۳۶ ریزنمونه در ویال‌های اشاره شده کاشته شد (شکل ۱).

نمونه‌ها پس از کشت در اتاق رشد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. دمای اتاق رشد در شرایط 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در بازکشت و پرآوری نیز از سه محیط کشت به‌شریحی که در جدول ۱ ارائه شده است، استفاده شد. به‌نحوی که از هر پایه منتخب ۴ شیشه به هر محیط کشت اختصاص داده شد. شیشه‌های کشت به‌صورت مستمر مورد بررسی قرار گرفتند و آلودگی‌های احتمالی و سایر اتفاقات از جمله تغییرات مورفولوژیکی نمونه‌های کشت شده به‌صورت مشاهده‌ای گزارش شدند. درصد آلودگی حاصل از تیمار مورد استفاده در سترون‌سازی در پایه‌ها و تکرارهای مختلف گزارش شدند. در پایان مرحله پرآوری و پس از ۴۵ روز صفاتی مانند تعداد شاخه، میانگین طول شاخه‌ها، طول و عرض برگ‌های تولیدی و میزان تولید ریشه ارزیابی و گزارش

قطعات ساقه حاصل از شاخه‌های تولیدی در شرایط *In Vitro* نیز در این تحقیق استفاده شد. جوانه‌های انتهایی در شرایط سرپوش کاملاً بسته شده تکثیر شدند ولی در ظروف نیمه باز پرآوری مشاهده نشد. تعداد شاخسارهای تولیدی در جوانه‌های انتهایی در مجموع سه برابر شاخسارهای تولیدی از قطعات ساقه بود. ساقه‌های تولیدی در شرایط کاملاً ایزوله طویل‌تر و از نظر تعداد نیز بیش از ساقه‌های تولیدی در شرایط نیمه باز بودند. در تحقیق ذکرشده نقش گازهای تولیدی توسط ریزنمونه‌ها در فرایند تکثیر و ریزازدیادی تأیید شد.

در تحقیقات گسترده‌ای که طی سال‌های گذشته در کشور انجام شده است، تعدادی دورگ بین گونه‌ای بین گونه‌های پده (*P. euphratica*) و سپیدار (*P. alba*) به‌دست آمد که دارای تنوع ژنتیکی گسترده‌ای هستند. تعدادی از این دورگ‌ها از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک برتری‌های خاصی نسبت به سایرین از خود نشان دادند که باید تکثیر شوند تا هم تعداد پایه دورگ‌ها افزایش یابد و هم بهترین فرایند و پروتکل تکثیر برای این دورگ‌ها به‌دست آید. از این‌رو تکثیر سه پایه از مطلوب‌ترین دورگ‌های تولیدی با استفاده از دو روش تکثیر ریزازدیادی به‌صورت *In Vitro* به‌منظور تعیین بهترین شرایط ریزازدیادی و نیز بررسی تفاوت‌های احتمالی پایه‌های مختلف در واکنش به ریزازدیادی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در پی انجام یک طرح تحقیقاتی ادامه‌دار در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تلاقی بین گونه‌های مختلف صنوبر انجام شده و یا در حال انجام است که به‌تبع آن تعدادی دورگ بین گونه‌ای حاصل کار این پروژه‌های تحقیقاتی است که باید تکثیر شده و مورد ارزیابی‌های بعدی قرار گیرند. با تلاقی بین دو گونه صنوبر به‌نام‌های پده (*P. euphratica*) و سپیدار (*P. alba*) هم دورگ‌های متعددی حاصل شد که به‌منظور بهینه‌کردن روش ریزازدیادی سه پایه برتر از این دورگ‌ها که نسبت به سایر پایه‌های تولیدی برتری‌های مورفولوژیک نشان دادند با شماره‌های ۱ تا ۳ مشخص شده و از طریق ریزازدیادی تکثیر شدند. به این منظور سرشاخه‌های

شدند. از محیط کشت ACM به شرح جدول ۱ هم برای ریشه‌زایی نمونه‌ها استفاده شد و پس از ۳۰ روز به حجم ریشه‌های تولیدی در پایه‌های سه‌گانه درجات بین ۱ تا ۵ داده شد. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شده و تفاوت‌های مشاهده شده در بین پایه‌های مختلف در محیط اکسل به نمودار تبدیل شدند.

جدول ۱- تیمارهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله پرآوری و ریشه‌زایی در تکثیر آزمایشگاهی سه پایه برتر دورگ بین گونه‌ای صنوبرهای پده و سپیدار

NAA (mg/L)		IBA (mg/L)		2iP (mg/L)	BAP (mg/L)	سطوح هورمون	محیط کشت
۰/۱	۰/۵	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۵	۰/۵	۰/۲	
-	-	-	+	+	+	-	محیط استقرار اولیه 1/2MS
-	-	-	-	-	-	+	محیط پرآوری MS
-	-	+	-	+	+	-	محیط پرآوری DKW
-	-	-	-	-	+	-	محیط پرآوری WPM
+	+	-	-	-	-	-	محیط ریشه‌زایی ACM

علامت + به معنی حضور سطح هورمون و علامت - به معنی عدم حضور سطح هورمون در محیط کشت مورد نظر است.

نتایج

قرار گرفتند که در هر سه مورد پایه دوم در دسته اول و سایر پایه‌ها در دسته دوم قرار گرفتند. از نظر شادابی هم دسته‌بندی دانکن پایه‌ها را در دو دسته هم‌پوشان قرار داد که به دلیل عدم اختلاف معنی‌دار پایه‌ها در تجزیه واریانس این دسته‌بندی نادیده گرفته شد و هر سه پایه در یک دسته قرار داده شدند. از نظر ریشه‌زایی در مرحله پرآوری هم با توجه به اینکه تنها یکی از دورگ‌ها در این مرحله ریشه تولید کرد، بدیهی است که پایه‌ها در دو دسته مختلف قرار گرفتند. دسته‌بندی محیط‌های کشت از نظر صفات مورد مطالعه هم محیط‌های انتخابی را در دسته‌های مختلف قرار داد (جدول ۴) که در همه موارد محیط کشت DKW در دسته اول قرار گرفت. با این حال از نظر تعداد شاخه و طول شاخه‌های تولیدی محیط کشت DKW در رتبه اول، محیط کشت MS در رتبه دوم و محیط کشت WPM در رتبه سوم قرار گرفتند. ولی از نظر صفات طول و عرض برگ و تعداد جوانه تولیدی محیط‌های کشت MS و WPM به صورت مشترک در دسته دوم قرار گرفتند. در ضمن از نظر شادابی نمونه‌ها نیز محیط کشت‌های DKW و WPM به طور مشترک در دسته اول قرار گرفتند.

روش مورد استفاده در ضدعفونی کردن نمونه‌ها که بر اساس تجربیات سایرین تعیین شده بود، به خوبی و با درصد پائینی از آلودگی مواجه شد. نمونه‌ها به خوبی استقرار یافتند (شکل ۱) و آماده انتقال به محیط تکثیر یا پرآوری شدند. داده‌های حاصل که در پایان دوره تکثیر از روی نمونه‌ها گزارش شده بود مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و حاصل آن در جدول ۲ خلاصه شد. دورگ‌ها از نظر صفاتی مانند تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد جوانه تولیدی و ریشه‌زایی در مرحله پرآوری در سطح یک درصد با هم اختلاف داشتند. همین‌طور محیط‌های کشت سه‌گانه نیز از نظر همه صفات مورد بررسی، در سطح یک درصد تفاوتی معنی‌دار از خود نشان دادند (جدول ۲). نکته قابل توجه اینکه اثرات متقابل دورگ و محیط کشت هم در صفاتی مانند طول شاخه، عرض برگ و تعداد جوانه از نظر آماری معنی‌دار شدند. میانگین صفات مورد مطالعه در سطح پایه‌ها دسته‌بندی و نتایج آن در جدول ۳ ارائه شد. پایه‌های مورد مطالعه از نظر تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد جوانه در دو دسته متمایز

محیط‌های کشت ریشه‌ای تولید نکردند (شکل ۳). بر اساس نتایج دسته‌بندی میانگین‌های حاصل از محیط کشت‌های سه‌گانه مورد مطالعه، پایه شماره ۲ بیشترین ریشه را در محیط کشت MS تولید کرد و محیط کشت WPM از این نظر در مرتبه دوم قرار گرفت ولی به لحاظ آماری با محیط کشت DKW در دسته دوم قرار گرفتند (جدول ۴).

نمونه‌ای از تفاوت رشد در محیط‌های مختلف کشت مورد مطالعه از نظر تعداد و طول شاخه در شکل ۲ ارائه شده است. پایه‌های مورد مطالعه از نظر تولید ریشه در سطوح مختلف محیط کشت هم تفاوت صفر و یک با یکدیگر نشان دادند. به این مفهوم که پایه شماره ۲ در همه محیط‌های کشت مورد مطالعه تولید ریشه کرد ولی سایر پایه‌ها در هیچ یک از



شکل ۱- کشت نمونه‌های سترون شده برای استقرار اولیه در محیط کشت 1/2MS و آغاز رشد در آنها

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ریزازدیادی سه دورگ صنوبر

منابع تغییر	DF	تعداد شاخه	طول شاخه	طول برگ	عرض برگ	شادابی نمونه	تعداد جوانه	ریشه‌زایی در مرحله تکثیر
دورگ	۲	۸/۸۴**	۱۶/۴۷**	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۱/۲۲ ^{ns}	۱۶/۰۹**	۱۶**
محیط کشت	۲	۱۵/۸۸**	۹/۶۳**	۰/۴۳**	۰/۵۵**	۶/۱۳**	۵/۳۸**	۱/۹**
دورگ * محیط کشت	۴	۱/۴۳ ^{ns}	۲/۸۹*	۰/۰۴ ^{ns}	۰/۱۲**	۰/۵۵ ^{ns}	۱/۷۸*	۱/۹**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۶۹	۰/۹۰	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۴۹	۰/۶۴	۰/۱۴

** و * : اختلاف معنی دار در سطح یک و پنج درصد، ns = فاقد اختلاف معنی دار

جدول ۳- دسته‌بندی میانگین دورگ‌های بین گونه‌ای صنوبرهای پده و سپیدار مورد مطالعه در ریزازدیادی

با استفاده از روش دانکن و بر اساس ویژگی‌های رویشی

دورگ‌ها	تعداد شاخه	طول شاخه (cm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	شادابی نمونه (درجه ۱ تا ۵)	تعداد جوانه	ریشه‌زایی در مرحله تکثیر (درجه ۱ تا ۵)
پایه ۱	۳/۴b	۳/۲b	۱/۳a	۰/۶۵a	۳/۷a	۴/۶b	۰/۰b
پایه ۲	۴/۷a	۵/۲a	۱/۵a	۰/۷۰a	۳/۵a	۶/۳a	۲/۰a
پایه ۳	۳/۱b	۳/۲b	۱/۴a	۰/۷۲a	۳/۱a	۴/۱b	۰/۰b

حروف الفبای متفاوت در ستون‌ها حکایت از اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها دارد.

جدول ۴- دسته‌بندی میانگین محیط کشت‌های مورد استفاده در ریزازدیادی دورگ‌های بین گونه‌ای صنوبر با استفاده از روش دانکن و بر اساس ویژگی‌های رویشی

محیط کشت	تعداد شاخه	طول شاخه (cm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	شادابی نمونه (درجه ۱ تا ۵)	تعداد جوانه	ریشه‌زایی در مرحله تکثیر (درجه ۱ تا ۵)
MS	۳/۵b	۳/۹b	۱/۲b	۰/۶b	۲/۷b	۴/۵b	۱/۱۳a
DKW	۵/۰a	۴/۸a	۱/۶a	۰/۹a	۳/۵a	۵/۸a	۰/۳۸b
WPM	۲/۸c	۳/۰c	۱/۳b	۰/۵b	۴/۱a	۴/۷b	۰/۵b

حروف الفبای متفاوت در ستون‌ها حکایت از اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها دارد.

جدول ۵- همبستگی بین کلیه ترکیب‌های دوگانه صفات مورد مطالعه در دورگ‌های صنوبر تکثیر شده در سه محیط کشت

صفات مورد مطالعه	تعداد شاخه	طول شاخه	طول برگ	عرض برگ	شادابی نمونه	تعداد جوانه
تعداد شاخه	۱					
طول شاخه	۰/۶۷**	۱				
طول برگ	۰/۳۱(*)	۰/۵۰**	۱			
عرض برگ	۰/۳۶*	۰/۴۸**	۰/۷۷**	۱		
شادابی نمونه	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۱۴ ^{ns}	-۰/۰۱ ^{ns}	۱	
تعداد جوانه	۰/۶۴**	۰/۷۹**	۰/۵۳**	۰/۴۵**	۰/۳۹**	۱

ns = غیر معنی‌دار، * و ** = معنی‌دار در سطح یک، پنج و ده درصد، ns = غیر معنی‌دار



شکل ۲- تفاوت رویش یک نمونه ثابت در محیط‌های کشت سه گانه مورد استفاده در مرحله تکثیر و پرآوری

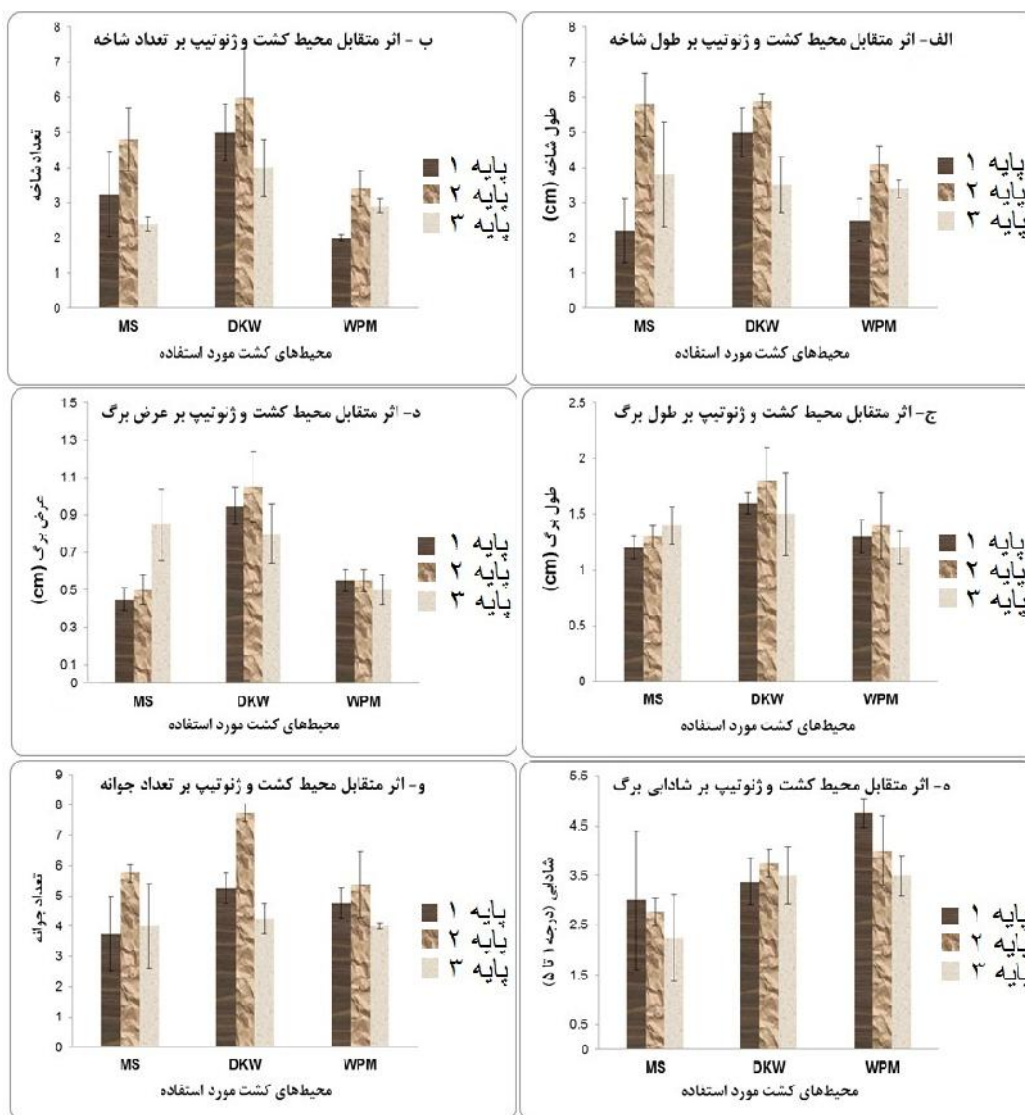


شکل ۳- ریشه‌دهی یکی از پایه‌های دورگ در محیط تکثیر و پرآوری

محیط‌های کشت رتبه سوم را به خود اختصاص داد (شکل ۴د). از نظر طول برگ هم دقیقاً همین شرایط حاکم بود (شکل ۴ج) ولی از نظر آماری این اثرات معنی‌دار نشدند (جدول ۲). از نظر تعداد جوانه تولیدی هم اگرچه تغییر رتبه در سطوح محیط کشت وجود داشت ولی بیشتر تفاوت اختلاف بین میانگین پایه‌ها در سطوح سه‌گانه محیط کشت بود که سبب معنی‌دار شدن اثر متقابل پایه و محیط کشت شد (شکل ۴).

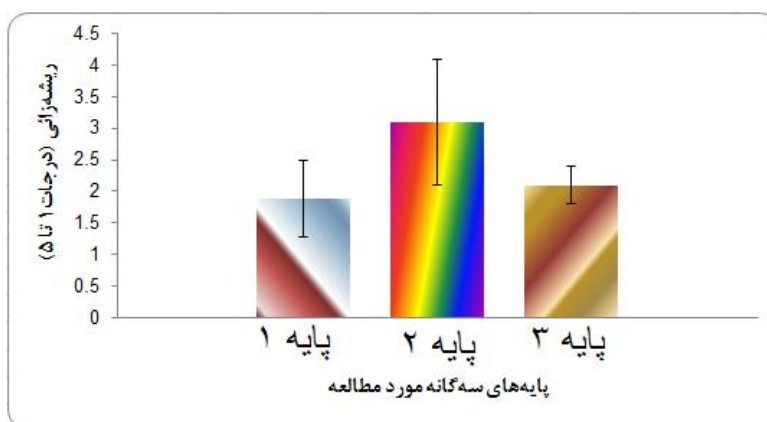
همبستگی‌های دوگانه بین بیشتر صفات، به‌جز شادابی، در سطح بالایی معنی‌دار شد (جدول ۵). با این حال همبستگی دوگانه بین تعداد شاخه و عرض برگ در سطح پنج درصد و با طول برگ در سطح ده درصد معنی‌دار شدند. نکته قابل توجه در همبستگی‌ها اینکه صفت شادابی فقط با صفت تعداد جوانه همبستگی معنی‌دار نشان داد.

اثرات متقابل سطوح مختلف دو عامل مورد مطالعه، پایه‌ها و محیط کشت بر روی صفات در شکل ۴ ارائه شده است. اگرچه از نظر نموداری در همه صفات مورد مطالعه ترتیب میانگین‌های پایه‌ها در سطوح مختلف محیط کشت ثابت نیست و اثر متقابل دیده می‌شود ولی این اثرات متقابل فقط در صفات طول شاخه، عرض برگ و تعداد جوانه از نظر آماری معنی‌دار شدند. دلیل معنی‌دار شدن این اثرات در طول شاخه، گذشته از اختلاف در تفاوت میانگین پایه‌ها در سطوح سه‌گانه محیط کشت، اختلاف در رتبه آنها هم بود. به‌طوری‌که پایه سوم از نظر طول شاخه (شکل ۴الف) در محیط کشت DKW رتبه سوم را داشت ولی همین پایه در سایر محیط‌های کشت رتبه دوم را به خود اختصاص داد. در مورد عرض برگ نیز همین نوع تفاوت مشاهده شد. به‌طوری‌که پایه سوم در محیط MS رتبه اول و در سایر



شکل ۴- اثرات متقابل پایه و محیط‌های کشت مورد استفاده بر ویژگی‌های مورد مطالعه

در ریزاردیادی پایه‌های دورگ بین صنوبر پده و سپیدار



شکل ۵- ریشه‌زایی متفاوت در پایه‌های سه‌گانه مورد مطالعه از دورگ‌های بین صنوبر پده و سپیدار

از نظر ریشه‌زایی در محیط کشت، ریشه‌زایی مورد استفاده (ACM) هم‌گرچه در هر سه پایه ریشه‌دار شده و به‌خوبی در شرایط گلخانه هم مستقر شدند ولی باز پایه دوم بیشترین مقدار ریشه را تولید کرد (شکل ۵).

بحث

از نظر تیمار مورد استفاده در رفع آلودگی‌های سطحی به‌نظر می‌رسد که شستشو با آب و مایع صابون توام با برس‌کشی و استفاده از محلول ۴۰٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه و سترون‌سازی به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه روش مناسبی برای سترون‌سازی این نمونه‌های گیاهی بودند. این روش سترون‌سازی نمونه‌های گیاهی صنوبر توسط سایر محققان نیز با اندک تفاوت، مناسب ارزیابی شده است (Tavassoli Asgari et al., 2012). در سترون‌سازی مریستم پایه‌های مورد مطالعه نیز استفاده از محلول ۲۰٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتن در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه به مدت ۲ دقیقه روش مناسبی بود، زیرا آلودگی زیادی در نمونه‌ها مشاهده نشد.

در تکثیر رویشی گونه‌های جنگلی به‌طور اعم و صنوبرها به‌طور اخص، بیشتر مطالعات ریزازدیادی و کشت بافت بر روی بهینه‌کردن محیط کشت مناسب برای تکثیر یک رقم یا کلن یا پایه خاص متمرکز شده است و بیشترین تأکید بر تنظیم املاح معدنی، ویتامین‌ها، هورمون‌های رشد و سایر نیازهای شیمیایی انجام شده است. با این حال عوامل دیگری غیر از ترکیب شیمیایی محیط کشت هم ممکن است در تعداد شاخسارهای حاصل از یک کشت بافت یا ریزنمونه و سایر رفتارهای ریزنمونه‌ها مؤثر باشند. به‌عنوان مثال نقش ژنوتیپ در توفیق در ریزازدیادی تاکنون کمتر مورد توجه قرار گرفته است که شاید به‌دلیل محدودیت تنوع ژنتیکی در صنوبرهاست. امروزه با توفیقاتی که در تولید دورگ‌های بین گونه‌ای صنوبرها چه در ایران (Jafari Mofidabadi, 2015) و چه در سایر نقاط دنیا (Chauhan

et al., 2004) حاصل شده تنوع ژنتیکی زیادی در صنوبرها ایجاد شده است که ضمن ایجاد فرصت مناسب در معرفی ارقام جدید و پرمحصول، در تکثیر رویشی آنها نیز باید تمهیدات لازم فراهم شود. ریزازدیادی از جمله روش‌هایی است که می‌تواند در تکثیر پایه‌های جدید و خوش‌آبیه به‌ویژه در ابتدای تولید آنها به‌کار گرفته شود. با تولید تعداد زیادی از دورگ‌های بین گونه‌ای در تلاقی بین گونه‌های *Populus euphratica* و *Populus alba* در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و انتخاب تعدادی از آنها به‌عنوان پایه‌های خوش‌آبیه، ریزازدیادی آنها و تفاوت‌های احتمالی در واکنش آنها به ریزازدیادی در دستور کار محققان قرار گرفت که این تحقیق بخشی از این تلاش‌هاست.

از نظر ویژگی‌های تعیین‌کننده در ریزازدیادی، تفاوت‌های زیادی بین پایه‌ها مشاهده شد. در مطالعات سایر محققان نیز تفاوت‌های زیادی بین ویژگی‌های مورفولوژیک کلن‌های مختلف صنوبر مشاهده شده است که منشأ ژنتیکی مشترکی برای آنها گزارش نشده است (Chauhan و همکاران، ۲۰۰۴؛ Asadi و همکاران، ۲۰۰۵؛ Marron و همکاران، ۲۰۰۷). البته تفاوت در ویژگی‌های مورد مطالعه در ریزازدیادی این پایه‌ها می‌تواند از قابلیت‌های متفاوت ژنتیکی در پایه‌های مورد بررسی حکایت داشته باشد. از آنجا که تفاوت‌های ویژگی‌های مورفولوژیک می‌تواند منشأ اختلاف در میزان فتوسنتز در کلن‌های مختلف صنوبر یا هر گونه دیگر شود (Chauhan و همکاران، ۲۰۰۴)، می‌توان انتظار داشت که در مقایسه‌های نهایی این پایه‌ها که خود از بین تعدادی پایه دورگ انتخاب شده‌اند به برتری نسبی و انتخاب یکی از این پایه‌ها ختم شود. از این‌رو توصیه می‌شود این سه پایه در مقایسات کلن‌های صنوبر در مناطق مختلف جغرافیایی وارد شوند تا بتوانند قابلیت‌های خود را در محیط‌های مختلف نیز آشکار کنند. این اختلاف‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت بین پایه‌ها از نظر ویژگی‌های ریزمورفولوژیک از جمله تعداد و ابعاد روزنه‌ها باشد (Homaie و همکاران، ۲۰۱۴). به‌همین دلیل توصیه

هورمون‌های درون‌زاد از مهمترین آنها هستند که به شدت تحت تأثیر عوامل بیرونی مانند نور و دمای محیط هستند (Suzuki & Kerbauy, 2006). اساساً نور و هورمون‌های درون‌زاد در گیاهان نقش مهمی را در رشد و نمو (Symons & Reid, 2003) و تقسیم سلولی در مریستم انتهایی (Von Arnim & Deng, 1996) گیاهان ایفا می‌کنند. در این پژوهش نمونه‌گیری از روی درختان در اواسط زمستان انجام شد تا میزان هورمون‌های درون‌زاد در پایه‌های مورد نظر در شرایط مناسب باشد. البته تجربه دیگران هم نشان داده است که بهترین زمان نمونه‌گیری از درختان صنوبر برای ریزازدیادی در فصل زمستان است. زیرا در این زمان هورمون‌های درونی این گونه‌ها در شرایط مطلوب بوده و نمونه‌ها بهتر به ریزازدیادی پاسخ خواهند داد. دلایل مختلفی در علاقه وافر به کاربری و تحقیق در زمینه صنوبرها در محققان و متولیان امر در منابع طبیعی وجود دارد که مهمترین آنها تندرشد بودن گونه‌های مختلف صنوبر است. البته ویژگی‌های دیگری نیز در صنوبر وجود دارد که مزید بر این علت می‌شود. از جمله این قابلیت‌ها، پالایش آلودگی‌ها در اراضی آلوده (Castiglione *et al.*, 2009) و زینتی بودن برخی از کلن‌ها و ارقام آنهاست (Ziauka & Kuusiene, 2014).

خوشبختانه گونه‌های صنوبر در میان درختان جنگلی به‌خوبی به مطالعات بیوتکنولوژی پاسخ داده و بافت برخی از گونه‌های آن انعطاف‌پذیری خاصی به این گونه مطالعات از خود نشان می‌دهند. به‌طوری‌که بر اساس گزارش‌های موجود گونه‌های صنوبر در زمره اولین گونه‌های جنگلی هستند که با استفاده از روش نجات جنین بر پدیده عدم سازگاری تلاقی‌های بین گونه در آنها فائق آمدند. نکته قابل ذکر در تفاوت‌های شاخصی که در سطوح مختلف هردو عامل پایه و محیط کشت در صفات مورد مطالعه بین دورگ شماره ۲ با سایر دورگ‌ها دیده شد، این بود که این برتری به دلیل تولید ریشه در محیط کشت تکثیر و پرآوری در این پایه بود که در سایر پایه‌ها و دورگ‌ها دیده نشد. بدیهی است این دورگ با تولید ریشه زیاد بهتر توانست از مواد

می‌شود این پایه‌ها در کنار سایر پایه‌های خوش آتیه صنوبر که در اثر دورگ‌گیری درون و بین گونه‌ای تولید شده‌اند از نظر ویژگی‌های ریزمورفولوژیک هم مطالعه شوند. گاهی تفاوت‌های مورفولوژیک بین کلن‌های مختلف حتی معیاری برای تشخیص بین ارقام مختلف تجاری در نظر گرفته شده‌اند. کما اینکه Marron و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که از تفاوت موجود بین برگ‌های کلن‌های مختلف صنوبر می‌توان آنها را از یکدیگر تفکیک کرد.

بر اساس گزارش‌های موجود تفاوت بین کلن‌های مختلف در واکنش به ریزازدیادی به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهمترین آنها را می‌توان ترکیب مواد غذایی محیط کشتی که به کار می‌رود، پایه نمونه مورد استفاده، نوع بافتی که استفاده می‌شود، شرایط محیطی اطاق رشد و هورمون‌های تنظیم‌کننده رشدی که به کار می‌رود، فهرست کرد (Shtereva *et al.*, 2014; Ozaslan *et al.*, 2005). در این بررسی هم تفاوت بین پایه‌هایی که در واقع هرسه از والدین پدری و مادری مشترک منشأ شده‌اند دیده شد. به عبارت دیگر از نظر صفات تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد جوانه که صفات تعیین‌کننده‌ای در ریزازدیادی هستند، دورگ‌ها اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند. البته تفاوت در سایر ویژگی‌های زیستی کلن‌های مختلف از یک گونه صنوبر به فراوانی گزارش شده است. از جمله این تفاوت‌ها، اختلافی است که بین کلن‌های مختلف از یک گونه صنوبر از نظر تغییرات آنزیمی در فصل ثابتی از سال مشاهده شده است (Saeedi & Azadfar, 2012). ولی با توجه به اینکه عقبه این دورگ‌ها مشترک است و این دورگ‌ها به اصطلاح خواهر و برادر تنی هستند و از یک جفت والدین مشترک حاصل شده‌اند، این تفاوت‌ها می‌تواند نوید تنوع ژنتیکی گسترده‌ای در سایر ویژگی‌های رویشی در ادامه فرایند رشد آنها داشته باشد.

در کنار عواملی مانند املاح معدنی، ویتامین‌ها و هورمون‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت، عوامل دیگری هم در نتیجه ریزازدیادی مؤثر هستند که

- Asadi, F. and Mirzaie-Nodoushan, H., 2011. Evaluation of different treatments in sexual reproduction of *Populus caspica* Bornm. for broadening its genetic basis in the nature of Iran. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 19: 441-452.
- Calagari, M., Modirrahmati, A., Asadi, F. and Bagheri, R., 2008. Study of ecological variations in leaf traits of *Populus euphratica* Oliv. in natural populations. The 2nd National Symposium of Poplar and its Importance in Wood Farming, 5-7 may 2008: 395-405.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Cicatelli, A., Rinaudo, C., Berta, G., Biondi, S. and Lingua, G., 2009. Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: a large-scale field trial on heavily polluted soil. Environmental Pollutant, 157: 2108-2117.
- Chauhan, N., Negi, M.S., Sabharwal, V., Khurana, D.K., and Lakshmikumaran, M., 2004. Screening inter-specific hybrids of *Populus* (*P. ciliata* * *maximowiczii*) using markers. Theoretical and Applied Genetics, 108: 951-957.
- Chen, S., Li, J., Fritz, E., Wang, S. and Hüttermann, A., 2002. Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress. Forest Ecology and Management, 168(1-3): 217-230.
- Emam, M., and Shahrzad, Sh., 2001. Micropropagation of white pellets (*Populus caspica*). Journal of Research and Development in Natural Resources. 53:84-90.
- Eusemann, P., Petzold, A., Thevs, N. and Schnittler, M., 2013. Growth patterns and genetic structure of *Populus euphratica* Oliv. (Salicaceae) forests in NW China—Implications for conservation and management. Forest Ecology and Management, 297: 27-36.
- Ghadiripour, P., Calagari M. and Saleheh Shushtari M.H., 2015. Study of growth and morphological characteristics of Euphrates poplar (*Populus euphratica*) provenances at experimental nursery of Khuzestan Province. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 23: 154-166.
- Gupta, P.K. and Agrawal, V., 1991. *In vitro* plantlet development for explants of 15 years old trees of *Populus euramericana* a hybrid poplar. Plant Science, 78: 99-105.
- Homaie, M., Mirzaie-Nodoushan, H., Asadicorom, F., Bakhshi-Khaniki, Gh.R. and Calagari, M., 2014. Evaluation of half-sib progenies and their parents of

غذایی موجود در محیط کشت استفاده کند. با این حال از آنجا که صنوبرها اساساً به صورت قلمه تکثیر می‌شوند و سهولت تکثیر در آنها به قابلیت رقم مورد نظر در ریشه‌دهی است، این دورگ از این نظر هم می‌تواند مورد توجه ویژه قرار گیرد. در ضمن با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل پایه و محیط کشت در قضاوت به برتری پایه‌ها باید به اثرات متقابل هم توجه داشت که از این نظر هم همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در بیشتر موارد به‌ویژه در صفات تعیین‌کننده‌ای مانند تعداد و طول شاخه‌های تولیدی و نیز تعداد جوانه، پایه شماره دو نسبت به سایرین برتری داشت.

سپاسگزاری

به این وسیله از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که امکان انجام این تحقیق را فراهم کردند، کمال تشکر را داریم. همچنین از رئیس و همکاران محترم گروه زیست‌فناوری همان مؤسسه به‌ویژه از سرکار خانم مهندس صدقتی که بی‌دریغ ما را در انجام این تحقیق یاری کردند و نیز سرکار خانم مهندس میرجانی (مسئول آزمایشگاه کشت بافت) به‌دلیل فراهم کردن همه امکانات مورد نیاز و سرکار خانم مهرآبادی به‌دلیل تلاش و همراهی در تأمین ملزومات این تحقیق، نهایت تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده:

- Ahmadi, A., Azadfar and, D., Jafari Mofidabadi, A., 2009. Embryo culture as a tool in intergeneric hybridization of Salicaceae (*Salix alba* X *Populus caspica*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 149-157.
- Arndt, S.K., Arampatsis, C., Foetzki, A., Li, X., Zeng, F. and Zhang, X., 2004. Contrasting patterns of leaf solute accumulation and salt adaptation in four phreatophytic desert plants in a hyperarid desert with saline groundwater. Journal of Arid Environments, 59(2): 259-270.
- Asadi, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Modir-Rahmati, A.R. and Naderishahab, M.A., 2005. Identification of poplar clones using morphological markers. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 12: 267-300.

- Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20: 261-272.
- Shetabboushehri, S. M., Hajnajari, H., Naraghi T. S. and Imani, B., 2015. Increment and decrement effects of nitrogen sources on *in vitro* shoot growth traits of Aspen (*Populus tremula* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research , 23:56-64.
 - Shtereva, L., Vassilevska-Ivanova, R., Karceva, T. and Kraptchev, B., 2014. Micropropagation of six *Paulownia* genotypes through tissue culture. Journal of Central European Agriculture, 15: 147-156.
 - Suzuki, R.M., Kerbauy, G.B. and Zaffari, G.R., 2004. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. Journal of Plant Physiology, 161:929-935.
 - Symons, G.M. and Reid, J.B., 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta*, 216:422-431.
 - Tavassoli Asgari, S., Ghamari Zare, A., Shahrzad, Sh., Khosroshahli M. and Sedaghati, M., 2012. Micropropagation of Iranian *Populus alba* species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20: 253-260.
 - Tavousi Rad, F., Ghamari Zare, A., Mirzaie-Nodoushan, H. and Yousefirad, M., 2016. Evaluation of poplar inter-specific progenies based on their morphologic and micro-morphologic traits. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 24: 675-686
 - Von Arnim, A. and Deng, X.W., 1996. Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 47:215-243.
 - Yousefi, B. and Modir-Rahmati, A.R., 2013. Investigation on adaptation and wood yield of different open crown poplar clones at Sanandaj comparative poplulum. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 21: 17-29.
 - Ziauka, J. and Kuusiene, S., 2014. Multiplication and growth of hybrid poplar (*Populus alba* × *P. tremula*) shots on a hormone-free medium. *Acta Biologica Hungarica*, 65(3): 346-354.
 - *Populus euphratica* based on their morphologic and micro-morphologic traits. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 21: 768-779.
 - Jafari Mofidabadi, A. and Joorabchi, E., 2001. Evaluation of genetic variation in new somaclonal genotypes of *Populus euphratica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 7: 27-40.
 - Jafari Mofidabadi, A., 2015. Production of inter-specific hybrid between *Populus caspica* and *P.nigra* using mature embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 49-55.
 - Marron, N., Dillen, S.Y. and Ceulemans, R., 2007. Evaluation of leaf traits for indirect selection of high yielding poplar hybrids. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 103-116.
 - Mirzaie-Nodoushan, H., Ghamari-Zare, A., Tavousi Rad, F. and Yousefirad, M., 2015. Inducing genetic variation in growth related characteristics of poplar germplasm, by producing inter-specific hybrids between *P. alba* and *P. euphratica*. *Silvae Genetica*, 64: 239-248
 - Murashige, T. and Skooge, 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 aspen (*Populus tremula*) by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 3: 87-108.
 - Ozaslan, M., Can, C. and Aytakin, T., 2005. Effect of explant source on *in vitro* propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19: 20-26.
 - Sadat, S., Assareh, M.H., Jafari Mofidabadi, A., Tabaei -Aghdaei, S.R. and Ghamari Zare, A., 2007. Study of callus induction and regeneration in *Populus euphratica* Oliv. via ovary culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 231-242.
 - Saedi, Z. and Azadfar, D., 2012. Comparison of peroxidaze and catalase levels of different clones of *Populus euramericana*. Iranian Journal of

Different responses of poplar inter-specific hybrids to micropropagation

S. Khosravan¹, H. Mirzaie-Nodoushan^{*2}, A. Ghamari Zare³ and M.A. Ebrahimi⁴

1 – M.Sc. Payamnoor University, Tehran, I.R.Iran.

2* – Corresponding author, Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran. Email: nodoushan2003@yahoo.com

3 - Associ. Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.

4 –Associ. Prof., Payamnoor University, Tehran, I.R.Iran.

Received: 17.06.2016 Accepted: 21.12.2016

Abstract

Populus species have distinct capabilities for which they are clearly differentiated. But the different capabilities made the species to be adapted to divergent climatic conditions. Inter-specific hybrids between the species have inter-mediate capabilities for which they may extend ecologic distribution of the genus. Asexual propagation of three inter-specific hybrid genotypes between two poplar species, *Populus alba* and *P. euphratica* were propagated through micropropagation technique, in order to optimize aseptic asexual propagation of the hybrids as well as investigating possible differences between the genotypes in responding to the propagation method. The hybrids showed different responses to three culture media so that one of the hybrids, in contrast to other hybrids, even produced plenty of roots in proliferation phase. The mentioned hybrid was highly superior to others, based on the recorded characteristics such as stem number, stem length, bud number and root score. The hybrids were significantly different based on their responses to rooting culture media. The superior hybrid of proliferation phase, showed superiority in rooting phase as well. In case of selection of the superior hybrid as a commercial cultivar, it should be propagated by cutting, for which easiness of rooting may be its specific and noticeable character. Interaction effects between the two factors, hybrids and culture media, also revealed the superiority of the mentioned hybrid.

Keywords: Asexual propagation, Micropropagation, Inter-specific hybrid, Poplar, *Populus alba*, *Populus euphratica*.