

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران

جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۴۹-۵۵ (۱۳۹۴)

## تولید دو رگه‌های بین گونه‌ای بین سفیدپلت (*Populus caspica*) و صنوبر نیگرا (*Populus nigra*) با استفاده از کشت جنین بالغ

علی جعفری مفیدآبادی

دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

پست الکترونیک: jafarimofidabadi@gamil.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۹

### چکیده

کشت جنین بالغ برای تولید دورگه‌های بین گونه‌ای بین گیاه سفیدپلت (*Populus caspica*) با صنوبر (*P. nigra*) مورد استفاده قرار گرفت. گرده‌افشانی دستی بر روی گل ماده شاخه‌های گلدار سفیدپلت با دانه گرده صنوبر نیگرا در قالب سیستم اصلاحی ترکه و آب انجام شد. تخمدان‌های بوجود آمده در سنین مختلف (۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی)، ایزوله و برای جوانه‌زنی جنین در شرایط سترون به محیط کشت MS فاقد هورمون‌های رشد گیاهی و حاوی دو غلظت مختلف ساکارز (۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر) منتقل شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین سنین جنین برای جوانه‌زنی آنها وجود داشت. به طوری که جنین‌های ۱۴ روزه بیشترین مقدار جوانه‌زنی (۸۵٪) جنین را در مقایسه با سایر سنین داشتند. اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت برای جوانه‌زنی جنین مشاهده نشد، اما اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح ۱٪ بین آنها در متوسط رشد رویشی گیاهچه‌ها دیده شد. به طوری که بیشترین رشد رویشی (متوسط ۴۱/۴ سانتی‌متر) در محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر به دست آمد. در حالی که متوسط ۲/۰۹ سانتی‌متر رشد رویشی در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز اتفاق افتاد. گیاهچه‌ها به محیط‌های کشت مشابه قبل از انتقال آنها به گلدان‌های حاوی خاک زراعی منتقل شدند. در مجموع پس از انجام سازگاری تدریجی موفق در گلخانه ۱۷۲ نهال به مزرعه منتقل شد.

واژه‌های کلیدی: تخمدان، تخمک، کشت جنین، دورگه‌گیری بین گونه‌ای، گرده‌افشانی دستی، سفیدپلت و صنوبر.

### مقدمه

به‌همراه درخت سپیدار یا سفیدار (*Populus alba* L.) زیربخش (*Albide*) است که بعضی آن دو را با هم استفاده می‌کنند. اگرچه شباهت‌هایی بین آنها وجود دارد، اما در شکل ظاهری ساقه و به‌ویژه ساقه درختان کهنسال و انشعابات ساقه‌ها و مورفولوژی گل‌ها بین دو درخت سپیدار و سفیدپلت اختلاف زیادی وجود دارد (Jalilvand, 1989). این گونه، از صنوبرهای بومی ناحیه هیرکانی می‌باشد که به‌دلیل انشعابات باز، تاج پهن، تنه موج‌دار، قائم‌نبودن کامل

درخت سفیدپلت (*Populus caspica* L.) بومی جنگل‌های شمال ایران است و از ارسباران و طالش و آستارا تا گرگان و اطراف بجنورد انتشار دارد (Jalili & Jamzad 1999). گاهی در بعضی از دره‌ها همراه با درخت توسکا و در جنگل‌های جلگه‌ای چمستان نور و در حوالی نوشهر و آستانه اشرفیه گیلان در کنار سفیدرود دیده می‌شود (Kalagari et al., 2007). سفیدپلت (*Populus caspica*)

گلستان و کلکسیون صنوبر ایستگاه تحقیقات البرز کرج جمع‌آوری شدند. جمع‌آوری دانه گرده، با انتقال شاخه‌های نر به گلخانه برای وادار کردن آنها به ریزش زود هنگام انجام شد. جوانه شاخه‌های گلدار گل ماده برای جلوگیری از گرده‌افشانی با دانه‌های گرده ناخواسته نیز در اطاقک‌های ایزوله جداگانه در گلخانه نگهداری شدند. گرده‌افشانی مصنوعی با دانه گرده جمع‌آوری شده صنوبر نیگرا (والد پدری) روی گل‌های ماده خوشه‌های گلدار سفیدپلت به صورت گرد و غبار شدید انجام گردید. گل‌آذین تلقیح شده از شاخه‌های گلدار در فواصل ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز جمع‌آوری شدند. کپسول‌های بسته چسبیده به محور گل‌آذین در زیر هود لامینار با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و محلول هیپرکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه مورد ضدعفونی سطحی قرار گرفتند. محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) برای تغذیه جنین‌های بارور شده، تخمدان‌های ضدعفونی شده به طرف آزمایشگاهی (ویال‌های ۴۰ سی‌سی) حاوی محیط MS جامد فاقد هورمون‌های رشد گیاهی منتقل شدند. گیاهچه‌های حاصل قبل از انتقال به گلدان برای انجام سازگاری تدریجی با انجام واکنش در اطاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نوری ۴۵۰۰-۵۰۰۰ لوکس حاصل از لامپ‌های آفتابی و مهتابی نگهداری شدند. محیط کشت MS با دو سطح ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات برای جوانه‌زنی جنین و تولید گیاه مورد آزمون قرار گرفت. در ضمن pH محیط کشت، روی ۵/۷ قبل از انجام اتوکلاو تنظیم شد. محیط کشت‌های مورد استفاده پس از ریختن در ویال‌های شیشه‌ای ۲۰ میلی‌لیتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. یادداشت‌برداری از درصد جوانه‌زنی تخمدان‌ها در فاصله ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روزه پس از گرده‌افشانی و متوسط رشد رویشی گیاهچه‌های حاصل برای بررسی اثرات سن جنین و مقدار ساکارز محتوای محیط کشت تجزیه و تحلیل گردیدند.

تنه، نمو قطری قاعده و شکل سینوسی ساقه در محل یقه کمتر استفاده صنعتی دارد و بیشتر به مصرف تهیه ذغال می‌رسد (Kalagari et al., 2007).

از آنجایی که این گونه در زمره گونه‌های بومی ایران می‌باشد، از این رو اصلاح آن برای افزایش استفاده صنعتی ضرورت دارد. ضرورت اصلاح صفات کمی و کیفی این گونه در حال انقراض به وسیله روش‌های اصلاحی، به ویژه برای برطرف کردن شکل سینوسی ساقه در محل یقه و شاخه‌دوانی نیازمند به اصلاح از طریق روش‌های مختلف از جمله تولید دورگه‌های بین گونه‌ایست. با توجه به دویایه بودن آنها و وجود زمینه تکثیر غیرجنسی فعال، روش اصلاح آنها از طریق دورگه‌گیری بسیار آسان می‌باشد (Confalonieri et al., 2008, Kevin, 2004, Sharma, et al., 2004, Rajora & Rahman, 2003). اصلاح از طریق تولید هیبریدهای جدید بین گونه‌ای به لحاظ ظهور پدیده هتروزیس در افزایش عملکرد کمی و کیفی، خاصه در گونه‌های گیاهی با توان تکثیر غیرجنسی، روش کارایی است که به منظور معرفی دورگه‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ahmedi et al., 2008., Raqiu & Jafari Mofidabadi, et al., 1998). Trousard, 1993. برای این منظور، تلاقی به روش گرده‌افشانی دستی بین پایه‌های برتر سفیدپلت و صنوبر نیگرا (*Populus nigra L.*) در کلکسیون ارقام صنوبر ایستگاه تحقیقات البرز کرج انجام و با استفاده از کشت تخمدان درون شیشه‌ای جنین بالغ برای انجام تغذیه مصنوعی جنین و گزینش کلن‌های برتر برای بهبود صفات کمی و کیفی و جنگکاری اقتصادی مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

گرده‌افشانی مصنوعی بین پایه‌های انتخابی ماده سفیدپلت با دانه گرده صنوبر نیگرا در قالب کشت شاخه در آب (Twig & pots) انجام شد. برای این منظور شاخه‌های گلدار گل ماده سفیدپلت به عنوان والد مادری و شاخه گلدار حاوی گل نر صنوبر نیگرا به ترتیب از پایه‌های بومی استان

## نتایج

### اثرات سن جنین در جوانه‌زنی جنین

یک هفته پس از انتقال کپسول‌های ایزوله شده به محیط‌های کشت جامد، جوانه‌زنی جنین به تدریج آغاز شد (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اثرات سن جنین در جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سن جنین برای جوانه‌زنی در سطح یک درصد ( $P \leq 0.1$ ) وجود داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین سن جنین در جوانه‌زنی به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیانگر اختلاف معنی‌دار بین سن ۱۴ روزه با سایر سنین مورد مطالعه در سطح یک درصد ( $P \leq 0.1$ ) بود (جدول ۲). بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین (۸۵٪) از کشت تخمدان ۱۴ روزه سفیدپلت حاصل شد. یک هفته پس از انتقال کپسول‌های ایزوله شده به محیط‌های کشت جامد، جوانه‌زنی جنین بتدریج آغاز شد (شکل ۱). البته کمترین مقدار جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه در صنوبر سفیدپلت پس از گرده‌افشانی اتفاق افتاد.

تفاوتی بین محیط‌های کشت وجود نداشت و هر دو در یک گرو قرار گرفتند (جدول ۳). با وجود این بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین (۵۶/۶۷٪) از کشت تخمدان سفیدپلت در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز اتفاق افتاد. این مقدار برای محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز برابر ۵۴/۶۷٪ بود.

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس

داده‌های مربوط به درصد جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه

منابع تغییر	درجه آزادی	جوانه‌زنی جنین	رشد گیاهچه
سن	۲	۱۲۹۲۶**	۱/۱۳
محیط کشت	۱	۶۰	۸۰/۵۰**
سن * محیط کشت	۲	۵۰۰	۱/۵۴
خطا	۵۴	۲۸۸	۰/۶۲
کل	۵۹		

\*\*= اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۲- دسته‌بندی میانگین اثرات سن جنین بر اساس

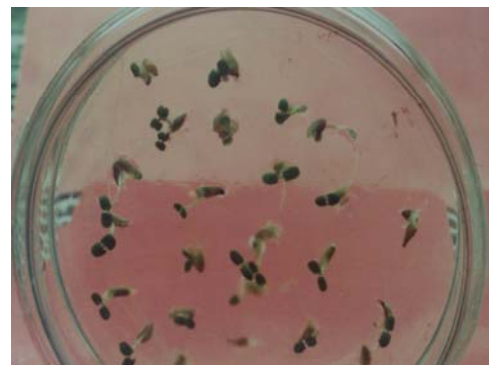
جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها به روش دانکن

سن جنین	درصد جوانه‌زنی	رشد ارتفاعی (cm)
۱۴	۸۵a	۳/۰۱a
۲۱	۴۲b	۳/۴۹a
۱۰	۴۰b	۳/۲۵a

حروف متفاوت بیانگر اختلافات معنی‌دار آماری در سطح ۱٪ می‌باشد.

### اثرات سن جنین در رشد گیاهچه

نتایج حاصل از اثرات سن جنین بر رشد رویشی گیاهچه‌های جوانه‌زده نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0.1$ ) بین آنها در متوسط رشد رویشی گیاهچه‌ها وجود ندارد (جدول ۱). بدین معنی که رشد رویشی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تحت تأثیر سن جنین نمی‌باشد. به‌رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار، جنین‌هایی با سن ۲۱ روزه با رشد ارتفاعی گیاهچه درون شیشه‌ای ۳/۴۹ سانتی‌متر مناسب‌ترین گیاهچه را تولید کردند (جدول ۲).



شکل ۱- جوانه‌زنی تخمدان‌های ۱۴ روزه در محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز

### اثرات محیط کشت در جوانه‌زنی جنین

نتایج حاصل از اثرات محیط کشت در جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ( $P \leq 0.1$ ) بین محیط‌های کشت برای جوانه‌زنی جنین وجود ندارد (جدول ۱). مقایسه میانگین جوانه‌زنی جنین به روش دانکن نیز نشان داد که از نظر جوانه‌زنی جنین

حاصل از آن نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین آنها ( $P \leq 0.1$ ) وجود نداشت و هرکدام (سن جنین و محیط‌های کشت) اثرات مستقل خود را بر روی درصد جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه‌ها داشتند (شکل ۲ و ۳).

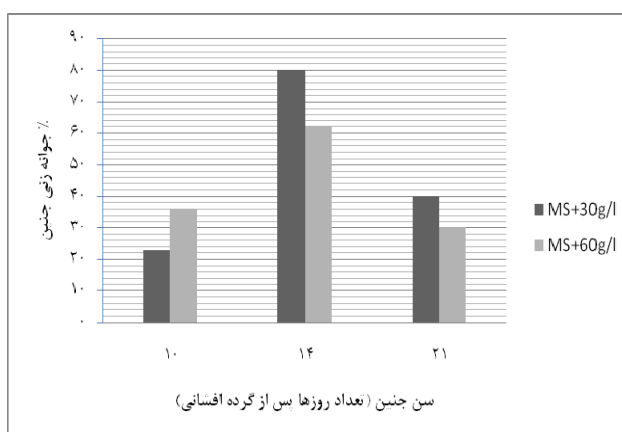
جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات محیط کشت در جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها به روش دانکن

محیط کشت	درصد جوانه‌زنی	رشد ارتفاعی گیاهچه (cm)
۳۰ گرم در لیتر	۵۶/۶۷a	۲/۰۹a
۶۰ گرم در لیتر	۵۴/۶۷a	۴/۴۱b

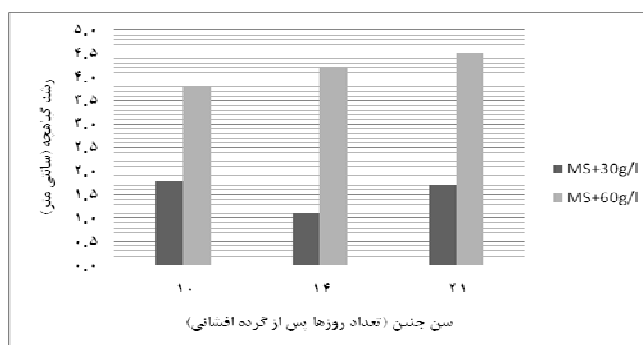
حروف متفاوت بیانگر اختلافات معنی‌دار آماری در سطح ۱٪ می‌باشد.

### اثرات محیط‌های کشت در رشد گیاهچه

نتایج حاصل از ارزیابی اثرات محیط کشت MS بر روی وضعیت رشد رویشی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P \leq 0.1$ ) بین محیط کشت MS حاوی ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر محیط‌های کشت بر روی رشد رویشی گیاهچه‌ها نیز نشان‌دهنده اختلاف آماری بین آنها بود. محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین رشد متوسط رویشی (۴/۴۱ سانتی‌متر) را در برابر ۲/۰۹ سانتی‌متر رشد متوسط رویشی گیاهچه در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز داشت (جدول ۳). نتایج حاصل از تأثیر متقابل محیط کشت و سن جنین روی جوانه‌زنی تخمک سفیدپلت و رشد رویشی گیاهچه‌های



شکل ۲- اثرات متقابل محیط‌های کشت با سن جنین در جوانه‌زنی جنین



شکل ۳- اثرات متقابل محیط‌های کشت با سن جنین در رشد ارتفاعی گیاهچه

## بحث

گیاهچه‌ها به صورت غیرمستقیم شد. البته اختلاف معنی‌داری بین غلظت ساکارز محتوای محیط‌های کشت در جوانه‌زنی جنین در تلاقی سفیدپلت به عنوان والد مادری با صنوبر نیگرا مشاهده نشد. بر خلاف این نتیجه، در مطالعات قبلی (Jafari Mofidabadi & Modir Rahmati, 2000) دورگه‌های بین گونه‌ای صنوبر پده با کبوده و تلاقی معکوس آنها برای وادارکردن تعداد بیشتر جنین‌های محتوای تخمدان تلقیح شده به رشد و رشد گیاهچه‌های حاصل، اثرات ساکارز محتوای محیط کشت به عنوان مکمل تغذیه‌ای جنین مؤثر واقع شد. محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز موجب بیشترین جوانه‌زنی جنین شد (Jafari Mofidabadi & Rahmeti Modir, 2000). استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی IAA (Indule-3-aceticacid) و BAP (6-Benzylaminopurine) در محیط کشت MS موجب کالزایی از تخمدان‌های گرده‌افشانی شده گردید که باززایی گیاه و ریشه‌زایی آن نیازمند به محیط‌های کشت ساقه‌زایی و ریشه‌زایی بود (Payamnoor et al., 2013). پیش از این جوانه‌زنی جنین از کشت تخمدان در محیط کشت Half-MS نیز موفق گزارش شده است (Jafari Mofidabadi & Rahmeti Modir, 2000).

## منابع مورد استفاده

- Ahmedi, A., Azad-fer, D. and Jafari- Mofidabadi, A., 2008. Embryo-rescue as a tool in Inter generic in *Salix* famiy (*Salix alba* x *Populus caspica*) hybridization. Iranian Journal of Rangelands and Forestes Plant Breeding and Genetic Research, 6: 149-157.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bissofi, S. and Carbonera, D., 2003. *In vitro* Cultur and genetic engineering of *Populus* spp: synergy for forest tree improvement. Jornal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Netherlands, 72:109- 138.
- Jafari- Mofidabadi, A., Modir Rahmati, A. and Tavassoli, A., 1998. Application of ovary and ovule culture in *Populus alba* . X. *P. euphratica Olive*. Silvae Genetica, 47:332-334.
- Jafari- Mofidabadi, A., and Modir Rahmati, A., 2000. Production *Populus euphratica Olive*. x *P. alba L.* hybrid poplar through ovary and ovule cultures. Plant Genetic Newsletter. 122:13-15.-

جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین تحت تأثیر دوره بلوغ آن در گروه‌های متعلق به جنس سلیکاسه، متفاوت است. جنین سفیدپلت در طی یک دوره ۱۰ روزه به بلوغ می‌رسد و قادر به جوانه‌زنی در محیط کشت MS حاوی درصد‌های مختلف ساکارز (۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر) می‌باشد. مشابه این نتایج در مورد دیگر صنوبرها نظیر کبوده (Jafari Mofidabadi & Modir Rahmati, 2000)، صنوبر سفیدپلت *Populus caspica* و بید (*Salix alba*, Ahmed et al., 2008) نیز گزارش شد. بر خلاف صنوبر کبوده (Jafari Mofidabadi et al., 1998)، صنوبر پده برای بلوغ کامل جنین به صورت درون شیشه‌ای حداقل به یک دوره ۴۵ روزه نیاز دارد (Jafari Mofidabadi et al., 2000). به طوری که بیشترین درصد جوانه‌زنی از کشت تخمدان ۱۴ روزه سفیدپلت به دست آمد. مشابه این نتایج، در کشت تخمدان صنوبر کبوده به عنوان والد مادری در تلاقی صنوبر کبوده با پده بیشترین درصد جوانه‌زنی در کشت تخمدان ۱۴ روزه مشاهده شد (Jafari Mofidabadi et al., 1998). مشابه نتایج فوق در گزارش Ahmadi و همکاران، (۲۰۰۸) تطابق در کشت تخمدان بید از گونه دیگری از جنس سالیکاسه نیز گزارش شد. کمترین مقدار جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه در صنوبر سفیدپلت پس از گرده‌افشانی اتفاق افتاد که این موضوع نیز با گزارش (Jafari Mofidabadi et al., 1998) در خصوص جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه صنوبر کبوده در تلاقی با صنوبر پده گرده‌افشانی شده با صنوبر پده و بید (Ahmadi et al., 2008) تطابق دارد. دلیل کاهش جوانه‌زنی جنین از تخمدان ۲۱ روزه، تشکیل بافت‌های رشته‌ای شکل سفیدرنگ اطراف تخمک که مانع تماس تخمک‌ها با سطح محیط کشت می‌شوند، عنوان شد (Jafari Mofidabadi et al., 1998). ایزوله کردن جنین در سن کمتر از ۱۰ روز در مطالعات سایرین (Kelagari, et al., 2003, Zuffa, et al. 1996) به دلیل کافی نبودن زمان لازم برای بلوغ جنین، و در واقع کشت جنین نارس بود و به همین دلیل موجب کالزایی و باززایی

- Payamnoor, V., Hashemi, S., Jafari Mofidabadi, A. and Ahmedi, A. 2013. Inter-specific hybridization in Salicaceae (*Populus nigra* x *P. deltoids* and *P. nigra* x *Salix alba*) using an embryo rescue techniques. Agriculture & Forestry, 59: 59-65.
- Rajora O.P. and Rahman M.H., 2003. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus* × *canadensis*) cultivars, Theor. Appl. Genet. 106: 470–477.
- Raqiun, C. and Troussard, L., 1993. *In vitro* ovary embryo culture as a tool for poplar hybridization. Can. J. Bot., 71:1271-1275.
- Sharma, D.R., Kaur, R. and Kumar, K., 2004. Embryo rescue in plants- a review. Euphatica 89:325-337.
- Zuffa, L., Giordano, E., Pryor, L.D. and Stettler R.F., 1996. Trends in poplar culture: some global and regional perspectives., in: Stettler, R.F., Bradshaw, H.D., Heilman, P.E. Jr. and Hinckley T.M. (Eds.), Biology of *Populus*, NRC Research Press, Ottawa, pp. 515–539.
- Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. Red Book of Iran. Iranian Research Institute of Forest and Rangeland, Tehran. Pp.748
- Jalilvand, H., 1989. Investigation of *Populus caspica* L. geographical distribution and ecological condition in north forests of Iran . M.Sc. dissertation. Tarbiat Modares University. Pp.165
- Kalagari, M., Jafari- Mofidabadi, A., Taberri, M., and Hosseini, S.M., 2003. Inter-specific hybridization of *P. euphratica* Olive. Through embryo rescue. Pajoohesh & Sazandegi, 61:6-9.
- Kalagari, M., Jafari MofidAbadi, A., Tabari, M. and Hoseini, S.M., 2007. Evaluation of genetic variation in *Populu euphratica* Oliv. population using peroxidase enzyme activities. Iranian Forest and Poplar Research. 15:115-122.
- Kevin, D.F., 2004. Extent and patents of hybridization among three species of *Populus* that constitute the riparian forest of southern Alberta, Canada. Canadian Journal of Botany, 82:253-264.
- Murashige. T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15:473-479.

## Production of inter-specific hybrid between *Populus caspica* and *P. nigra* using mature embryo culture

A. Jafari Mofidabadi\*

\*Assoc. Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan, Golestan, I.R.Iran  
Email: jafarimofidabadi@gamil.com

Received: 19.01.2015 Accepted: 29.04.2015

### Abstract

Mature ovary culture was used to develop inter-specific hybrid between *Populus caspica* L. and *P. nigra*. Manual pollination of *Populus caspica*, female flower was conducted by *P. nigra* L. pollen grains, using twigs and pod breeding system. Developed ovaries in different developmental stages (10, 14 and 21 days after pollination) were then aseptically transferred to hormone growth regulator free MS culture media supplemented by two different sucrose concentrations (30 and 60 g/L) for embryo germination. Analysis of collected data indicated that there were highly significant differences between embryos age for germination at  $\alpha=0.01$  level. Fourteen days old embryos showed highest embryo germination (85%) then the other two. There were no differences between culture media for embryo germination but highly significant differences was observed between culture media for growth rate of plantlets at  $\alpha=0.01$  level. MS medium supplemented with 60 g/L sucrose showed 4.41 cm growth rate while average 2.09 cm was observed for MS medium containing 30 g/L. Plantlets were transferred to the same medium within jars, before being transferred to the potting soil. One hundred seventy two plantlets were successfully acclimatized in green-house and transplanted to the field.

**Keywords:** Ovary, ovule, embryo culture, interspecific hybridization, manual pollination, *Populus caspica* and *P. nigra* L.