جنگل و فرآورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران
دورهٔ ۷۰، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۶
ص ۱۹۹-۲۰۷

ریزازدیادی توس (*Betula litwinowii*) از طریق کالوس برگ آن

جمیله نظری[۱]، وحیده پیام نور[۲*]، مهدی علیزاده[۳]، کمال قاسمی بزدی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکدهٔ علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. دانشیار گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴. دانشیار سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات پنبه کشور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۶

چکیده

گونه‌های توس به‌دلیل دارا بودن ارزش دارویی، صنعتی و زینتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. *Betula litwinowii* یکی از دو گونه توس در حال انقراض ایران می‌باشد که در سنگده ساری رویش دارد. در پژوهش حاضر، ریزنمونه‌های برگ پس از اعمال تیمارهای سترون‌سازی (کلرید جیوه ۰/۱ درصد، الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد در زمان‌های مختلف) در دو محیط کشت WPM و MS با غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و 2,4-D جهت تولید کالوس و باززایی گونه *B. litwinowii* در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کشت گردیدند. نتایج نشان داد تیمار کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه بهترین روش سترون‌سازی ریزنمونه‌ها بود. محیط کشت پایه WPM حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهترین محیط کالوس‌زایی شناخته شد. همچنین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات برای القای اندام‌زایی کالوس‌ها مناسب بود. ترکیب BAP ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و آدنین سولفات ۲۰ میلی‌گرم در لیتر با ۲۰ درصد اندام‌زایی به‌عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. درنهایت گیاه‌چه‌ها در محیط WPM حاوی IBA و NAA (یک میلی‌گرم در لیتر) ریشه‌دار شدند. روش ریزازدیادی توس که در پژوهش حاضر بهینه گردید، در بیوتکنولوژی با هدف پیشبرد ژنتیکی درختان توس و نیز ریزازدیادی در مقیاس وسیع و تکثیر تجاری نیز قابل توصیه است.

واژگان کلیدی: سترون‌سازی، کالوس‌زایی، محیط‌کشت، *Betula litwinowii*

مقدمه

توس (*Birch*) با نام علمی (*Betula sp*) از پهن‌برگان بومی ایران بوده و بازمانده جنگل‌های اولیه خزری با تجدید حیات بسیار محدود و در خطر نابودی و انقراض است [۱]. از بین ۱۰۰ تا ۱۴۰ گونه در جهان، فقط دو گونه با نام‌های علمی *B. pendula* در منطقه جنگلی سیامرزکوه استان گلستان که توسط کردعلیوند و همکاران (۱۳۹۱) و *B. litwinowii* در منطقه جنگلی سنگده استان مازندران، توسط زارع و همکاران (۲۰۱۰) شناسایی‌شده، وجود دارد که بیشتر به‌صورت درختی و در بخش‌هایی به‌صورت درختچه‌های کوتاه دیده می‌شود [۲، ۳]. خواص منحصر به فرد دارویی توس (ضد سرطان قوی، کاربرد در درمان ایدز و هپاتیت)، اهمیت این درخت و تلاش جهت جلوگیری از انقراض آن را دوچندان می‌کند [۴، ۵]. یکی از روش‌های

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۷۳۵۸۱۲
Email: Mnoori56@gmail.com

بازززایی در شرایط درون شیشه‌ای، القاء کالوس‌زایی و شاخه‌زایی به‌طور غیرمستقیم می‌باشد. گزارش‌های متعددی در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف توس انجام‌شده است. زونگ- مینگ چینک و همکاران (۲۰۰۰) جهت ریزازدیادی گونه *B. platyphylla* از مریستم انتهایی و بافت های برگ استفاده کردند. بیشترین ساقه‌زایی در محیط کشت WPM[1] حاوی BAP[2] (۲/۲ میلی‌گرم در لیتر) با ۶/۵ گرم در لیتر آگار بود [۶]. ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) جهت ریزازدیادی ژنوتیپ‌های مختلف *B. pendula*، نهال‌هایی را از کشورهای سوئد، فنلاند و آلمان تهیه نمودند. ریزنمونه‌های سوئد با اتانول ۷۰ درصد و کلرید جیوه ۰/۲ درصد، کلون‌های آلمان با کلرید جیوه ۰/۲ درصد در مدت‌زمان کم و کلون‌های فنلاند با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم یک درصد سترون‌شده و در محیط کشت‌های WPM، N_6[3] و LS[4] با غلظت هورمونی ۰/۱ و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin و ۰/۲۵ و یک میلی‌گرم در لیتر Zeatin کشت گردیدند. در محیط کشت WPM با ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[5] ۸۵ – ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی کردند [۷]. هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) ریزنمونه‌های برگی *B. pendula* را با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و در مواردی که آلودگی شدید بود از کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌مدت ۷ دقیقه سترون‌سازی نمودند، سپس در محیط کشت‌های MS[6] و WPM کالوس‌زایی دادند و در محیط WPM با ۴/۴ میکرو مولار BAP اندام‌زایی کرده و تبدیل به گیاه‌چه شدند [۸]. شادرینا و سچستیبراتو (۲۰۱۰) تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد BA، Zeatin و IBA[7] در ریزازدیادی برخی گونه‌های توس *B. pubescens*، *B. pendula* و *B. nigra* از ریزنمونه برگ را مورد بررسی قراردادند. بیان نمودند که غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر Zeatin یا BA بیشترین درصد شاخه‌زایی از برگ را داشت [۹]. ایکسیومی و همکاران (۲۰۱۲) جهت کشت بافت گونه *B. luminifera* در چین از محیط کشت‌های WPM، MS و MS ½ و ریزنمونه برگ استفاده نمودند. کالوس‌زایی در هر سه محیط امکان‌پذیر بوده و تولید شاخسار در محیط MS با یک میلی‌گرم در لیتر TDZ[8] و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۸۰ درصد بوده و ریشه‌زایی ساقه‌ها در محیط کشت MS ½ حاوی هورمون IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر اتفاق افتاد [۱۰]. با وجودی که در خارج از کشور برای ازدیاد گونه‌های توس از طریق کشت بافت تلاش‌های زیادی شده است ولی در ایران تحقیقی در این خصوص صورت نگرفته و این اولین گزارش با هدف ریزازدیادی توس *B. litwinowii* از طریق ریزنمونه برگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ۵ عدد نهال *B. litwinowii* ۴-۵ ساله از نهالستان شرکت فریم سنگده تهیه شد. ریزنمونه‌ها پس از شستشو با مقداری مایع شوینده در محلول قارچ‌کش بنومیل به غلظت ۴ گرم در لیتر به‌مدت یک ساعت غوطه‌ور گردیدند. جهت سترون‌سازی از ۴ تیمار در ۴ تکرار با حداقل ۶ ریزنمونه در محیط کشت MS طبق جدول ۱ استفاده شد. نمونه‌های کشت شده به‌طور روزانه جهت مشاهده آلودگی بازدید شدند و بهترین تیمار سترون‌سازی انتخاب گردید.

تیمارهای هورمونی مورد استفاده جهت کالوس‌زایی *B. litwinowii* با ریزنمونه برگ در جدول ۲ آورده شده است. ریزنمونه‌های برگی در دو محیط کشت WPM و MS با ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و pH ۵/۷-۵/۸ کشت

1. Woody plant medium
2. 6-Benzyl amino purine
3. Chu (N6) Medium
4. Linsmaier and Skoog medium
5. α -Naphtalene acetic acid
6. Murashige and Skoog medium
7. Indole-3- butyric acid
8. Thidiazuron

شدند. سپس نمونه‌ها به اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. نمونه‌های کشت شده به‌طور هفتگی جهت مشاهده کالوس‌زایی بازدید شدند و ۳۰ روز پس از کشت درصد کالوس زایی در ترکیب‌های مختلف هورمونی و محیط کشت‌های مختلف گزارش گردید.

پس از تعیین درصد کالوس‌زایی در تیمارهای مختلف هورمونی و محیط کشت‌های متفاوت، برای این‌که کالوس‌های اولیه قابلیت تقسیم سلولی خود را از دست ندهند، هر ۴ – ۶ هفته یک‌بار بازکشت شدند. سپس جهت القای اندام‌زایی و رشد بهتر کالوس‌ها، در محیط کشت منتخب با ترکیب هورمونی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر AS (آدنین سولفات) باز کشت شدند. پس از ۸ هفته که اندام‌زایی به کالوس‌ها القا شد، کالوس‌های درشت در اندازه ۱–۲ سانتی‌متری با ۴ تکرار که در هر تکرار ۲–۳ کالوس در ترکیب‌های هورمونی جدول ۳ کشت شدند.

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمون آنالیز واریانس متغیرها (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

جدول ۱. تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

کد	تیمارهای مختلف سترون‌سازی
۱	ماده ضد باکتری[1] 8-HQC ۰/۱ گرم در لیتر به‌مدت ۱ ساعت، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۵–۸ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه
۲	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۵ ثانیه و کلرید جیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه
۳	کلرید جیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه
۴	کلرید جیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه

جدول ۲. ترکیب‌های مختلف هورمونی محیط کشت، جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

کد	ترکیب هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	محیط کشت پایه
۱	BAP (۱) + 2,4-D(۰/۱)	WPM / MS
۲	BAP (۲) + 2,4-D(۰/۲)	WPM / MS
۳	2,4-D(۲)	WPM / MS
۴	BAP (۰/۵) + 2,4-D (۲)	WPM / MS

جدول ۳. ترکیب‌های مختلف هورمونی محیط کشت جهت اندام‌زایی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

نام محیط کشت	ترکیب‌های هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)
A	BAP (۰/۵) + AS(۲۰)
B	NAA (۰/۵) + AS(۲۰)
C	BAP (۱) + NAA(۰/۵) + AS(۲۰)
D	BAP (۰/۵) +NAA (۱) + AS(۲۰)

1. Hydroxy Quinoline Citrate

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌های برگ گونه *B. litwinowii* در جدول ۴ ارائه شده است. بر اساس نتایج، درصد آلودگی تیمارهای مختلف سترون‌سازی در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ۴ تیمار سترون‌سازی بر درصد آلودگی ریزنمونه‌های برگ گونه *B. litwinowii* در جدول ۵ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تیمار سترون‌سازی کد ۱ و ۲ با بیشترین درصد آلودگی در کلاس a و تیمار کد ۴ و ۳ با کمترین درصد آلودگی در کلاس b قرار گرفتند. ولی بر اساس اثر منفی استفاده طولانی مدت کلریدجیوه بر روی زندمانی و رشد ریزنمونه‌ها جهت سترون سازی از تیمار کد ۳ که نسبت به تیمارهای کد ۱ و ۲ درصد آلودگی کمتر و نسبت به تیمار ۴ درصد کالوس‌زایی بالاتری داشت، استفاده شد.

تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگی *B. litwinowii* در محیط کشت و ترکیب‌های هورمونی مختلف، در جدول ۶ ارائه شده است. بر اساس نتایج، اثرهای ساده و متقابل محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی در سطح یک درصد بر کالوس‌زایی ریزنمونه های برگ معنی‌دار بود. درصد کالوس‌زایی محیط کشت WPM و MS به‌ترتیب ۵۱/۲ و ۱۲/۶ می‌باشد که محیط کشت WPM به‌عنوان محیط منتخب انتخاب گردید. علاوه بر درصد بالای کالوس‌زایی محیط WPM، کالوس‌هایی با رنگ سبز فسفری و بافتی ترد داشتند و کالوس‌های محیط MS سفید رنگ و با بافتی شل بودند.

جدول ۴. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

درصد آلودگی	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
بین تیمارهای سترون‌سازی	۳	۳۰۴۰/۰۸۳	۱۳/۶۹	۰/۰۰۲
درون تیمار سترون‌سازی	۸	۲۲۲/۰۰		
کل	۱۱			

جدول ۵. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد آلودگی برگ *B. litwinowii*

کد	ترکیب تیمارهای سترون‌سازی	درصد آلودگی*
۱	ماده ضد باکتری 8-HQC ۰/۱ گرم در لیتر به‌مدت ۱ ساعت، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۵–۸ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه	۶۳^{a}±۷/۵۵
۲	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۵ ثانیه و کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه	۶۵^{a}±۵/۰۰
۳	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه	۱۳^{b}±۱/۵
۴	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه	۵^{b}±۰/۵

*حروف لاتین مشابه نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۶. تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت، تیمارهای هورمونی و اثر متقابل آن‌ها بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی *B. litwinowii*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
محیط کشت	۱	۱۱۸۵۹/۲	۶۷/۶	۰/۰۰۰
تیمارهای هورمونی	۳	۳۸۰۶/۷	۲۱/۷	۰/۰۰۰
محیط کشت × تیمارهای هورمونی	۳	۳۰۰۰/۸	۱۷/۱	۰/۰۰۰
خطای باقیمانده	۲۴	۱۷۵/۴		
کل	۳۱			

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی در جدول ۷ ارائه شده است. ۴ کلاس مختلف مشاهده شد که محیط کشت WPM به همراه تیمار هورمونی A و B، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۱/۴ درصد) را داشته و برتر شناخته شد. اگرچه اثر متقابل تیمارهای هورمونی A و B در محیط کشت WPM در یک کلاس قرار گرفت، ولی تیمار هورمونی A صرف نظر از این‌که درصد بالاتر کالوس‌زایی را در نمونه داشت، غلظت هورمون‌های مصرفی آن، دقیقا نصف هورمون‌های تیمار B بوده است لذا محیط کشت و ترکیب هورمون قابل توصیه جهت کالوس‌زایی *B. litwinowii* می‌باشد.

بازکشت کل کالوس‌ها در ۲ مرحله، طی ۴ –۶ هفته در همین ترکیب هورمونی و محیط کشت انجام و بدین ترتیب مواد غذایی کالوس‌ها تامین شده و رشد بهتری یافتند. القای اندام‌زایی کالوس‌ها در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات طی ۴ هفته انجام شد (شکل ۲– الف و ب). پس از تحریک اندام‌زایی، کالوس‌ها در ۴ ترکیب هورمونی دیگر برای تولید گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج تجزیه واریانس آن در جدول ۸ ارائه شده است که بین تیمارها در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری داشتند.

بر اساس مقایسه میانگین‌های ارائه شده در جدول ۹ اندام‌زایی کالوس‌های برگی در ۲ کلاسه قرار گرفته اند. ترکیب هورمونی با کد A با ۲۰ درصد اندام‌زایی به‌عنوان ترکیب هورمونی مناسب انتخاب می‌شود. شروع اندام‌زایی و تولید گیاه‌چه در محیط کشت‌هایی که حاوی سیتوکنین بودند، به لحاظ زمانی سریع‌تر صورت گرفت. مشخص شد کالوس‌ها تا رسیدن به مرحله اندام‌زایی، مراحل مختلف تغییر شکل را طی می‌کنند که به ترتیب: بی‌شکل، گلبولی شکل و در نهایت اندام‌زایی می‌باشد (شکل ۱). محیط کشت A با تولید بیشترین و با کیفیت‌ترین گیاهچه‌ها به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار جهت اندام‌زایی کالوس‌های برگی *B. litwinowii* می‌باشد (شکل ۱– ج).

پس از طی ۴ هفته، بخش‌های اندام‌زایی شده جدا و در محیط کشت WPM حاوی هورمون BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، GA_3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و آدنین سولفات (۲۰ میلی‌گرم در لیتر)، گیاه‌چه‌ها طویل‌تر شده و رشد مناسبی پیدا کردند شکل (۱– د). در نهایت، گیاه‌چه‌ها با بازکشت در محیط کشت‌های حاوی اکسین‌های NAA و IBA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر، ریشه‌دار شدند شکل (۱– ه).

جدول ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی برگ *B. litwinowii*

محیط کشت	ترکیب هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	کالوس‌زایی (درصد)*
MS	BAP (۱) + 2,4-D(۰/۱)	۱۴^{bc}±۱/۵۰
MS	BAP (۲) + 2,4-D(۰/۲)	۱۷/۲^{bc}±۲/۷۰
MS	2,4-D(۲)	۱۳/۸^{bc}±۱/۷۱
MS	BAP (۰/۵) + 2,4-D(۲)	۵/۵^{c}±۱/۰۰
WPM	BAP (۱) + 2,4-D(۰/۱)	۹۱/۴^{a}±۷/۹۹
WPM	BAP (۲) + 2,4-D(۰/۲)	۷۹/۷^{a}±۹/۵۰
WPM	2,4-D(۲)	۶/۲^{c}±۰/۷۸
WPM	BAP (۰/۵) + 2,4-D(۲)	۲۷/۲^{b}±۳/۳۰

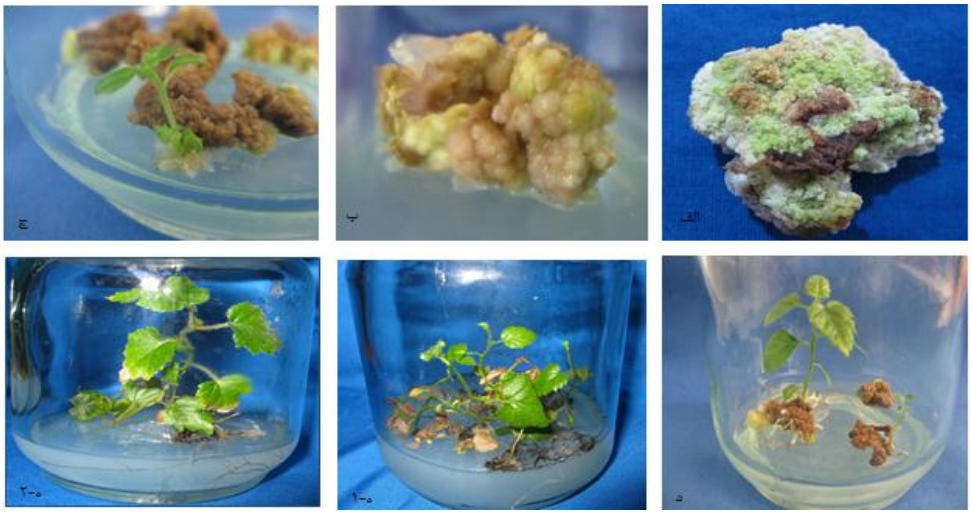
* حروف لاتین مشابه نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۸. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف جهت اندام‌زایی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

اندام‌زایی	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
بین تیمارهای سترون‌سازی	۳	۲۴۴/۴۴۴	۶/۹۰۲	۰/۰۱۳
درون تیمار سترون‌سازی	۸	۲۵/۴۱۷		
کل	۱۱			

جدول ۹. مقایسه میانگین اندام‌زایی ریزنمونه بر گ *B. litwinowii* در ترکیب هورمونی مختلف

کد	تیمارهای هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	اندام‌زایی (درصد)*
A	BAP (۰/۵) + AS(۲۰)	۲۰/۰^{a}±۱۲/۹۰
B	NAA (۰/۵) + AS(۲۰)	۳/۳^{b}±۵/۰۰
C	BAP (۱) + NAA (۰/۵) +AS(۲۰)	۰/۰^{b}±۰/۰۰
D	BAP (۰/۵) NAA+ + (۱)AS(۲۰)	۳/۳^{b}±۵/۰۰



شکل ۱. مراحل اندام‌زایی کالوس‌ها از ریزنمونه برگی توس (الف)؛ بازکشت کالوس جهت القای اندام‌زایی (ب)؛ تغییر شکل کالوس به فرم گلبولی و القای اندام‌زایی (ج)؛ اندام‌زایی کالوس (د)؛ بازکشت گیاه‌چه در محیط حاوی اکسین جهت القای ریشه‌زایی (ه)؛ ریشه‌زایی و تولید گیاه‌چه کامل از اندام‌زایی کالوس برگ (ه-۱), در فصل پاییز (ه-۲)؛ در فصل بهار

مسئله مهم در ریزازدیادی توس و یا هر گیاهی که ریزنمونه‌های آن از محیط خارج، مخصوصا عرصه‌های جنگلی که دارای آلودگی‌های بالایی می‌باشند، کنترل آلودگی‌ها در شرایط کشت بافت می‌باشد. سترون‌سازی مرحله‌ای مهم و الزامی جهت کاهش میزان آلودگی ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت است. از بین تیمارهای اعمال‌شده جهت سترون‌سازی ریزنمونه برگ، بکارگیری کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه نتایج بهتری در مقایسه با سایر تیمارها داشت که با نتایج هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی ریزنمونه برگ گونه *B. pendula* و همچنین تیمار کلرید جیوه استفاده‌شده بر روی ریزنمونه‌های تک‌گره کلون‌های آلمان در تحقیق ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت [۷، ۸]. طبق نتایج تحقیق حاضر در همه ترکیب‌های هورمونی به استثنای محیط حاوی هورمون 2,4-D، محیط کشت بهینه جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*، محیط کشت WPM بود که نسبت به محیط کشت MS درصد کالوس‌زایی بالاتری داشت. با وجودی که سن و

اندازه ریزنمونه‌های اولیه به‌کاربرده شده در تحقیق یکسان بوده ولی برتری ویژگی‌های کیفی ازجمله بافت و رنگ کالوس‌های ایجادشده در محیط کشت WPM به‌طور معنی‌داری نسبت به کالوس‌های ایجادشده در محیط کشت MS مشخص بود. برتری کالوس‌های کشت شده در محیط کشت WPM با نتایج زونگ-مینگ چینگ و همکاران (۲۰۰۰) بر روی گونه *B. platyphylla* هم‌سو می‌باشد. این نویسندگان ضمن مقایسه دو محیط کشت WPM و MS، محیط WPM را جهت کالوس‌زایی گونه‌های توس معرفی نمودند [۶]. در عین حال با تحقیق هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) که توانستند کالوس‌های هر دو محیط کشت WPM و MS را تا مرحله اندام‌زایی و تولید گیاه‌چه برسانند و همچنین با نتایج ایکسیومی و همکاران (۲۰۱۲) که ریزازدیادی گونه *B. luminifera* را در محیط کشت‌های WPM، MS و MS ½ مقایسه کرده و محیط کشت‌های MS و MS ½ را به عنوان محیط برتر جهت تولید گیاه‌چه معرفی نمودند، مغایرت داشت [۸، ۱۰]. در تحقیق حاضر نیز همانند نتایج هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) و ایکسیومی و همکاران (۲۰۱۲) در هر دو محیط کشت MS و WPM کالوس‌زایی وجود داشت ولی فقط کالوس‌های محیط کشت WPM قادر به اندام‌زایی و تولید گیاه‌چه ریشه‌دار بودند [۸، ۱۰]. از ۴ ترکیب هورمونی با غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D، ترکیب هورمونی BAP با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با بیشترین درصد کالوس‌زایی مناسب‌ترین ترکیب شناخته شد. بهترین نتیجه جهت کالوس‌زایی *B. litwinowii* در محیط کشت WPM حاوی هورمون BAP و 2, 4-D به ترتیب به میزان یک و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. القای اندام‌زایی و تولید شاخسار از کالوس‌ها با بازکشت آن‌ها در محیط کشت حاوی هورمون Zeatin به میزان ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و آدنین سولفات به میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفته و نتایج مثبتی حاصل شد که با تحقیق ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) و شادرینا و سچستیبراتو (۲۰۱۰) که استفاده از Zeatin را جهت توسعه شاخسارها توصیه کرده بودند همسو می‌باشد [۷، ۹]. از ۴ ترکیب هورمونی اعمال شده در محیط کشت WPM جهت ساقه‌زایی، BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و آدنین سولفات ۲۰ میلی گرم در لیتر با ۲۰ درصد تولید شاخسار مناسب‌ترین محیط تشخیص داده شد. جهت ریشه‌زایی شاخسار در محیط کشت WPM از هورمون‌های NAA و IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که نتایج بسیار خوبی به دنبال داشت که با نتایج ایکسیومی و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت [۱۰].

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با استفاده از تکنیک‌های نوین چون کشت بافت و ریزازدیادی علاوه بر حفظ این ذخیره ژنتیکی با ارزش که رو به انقراض است، می‌توان با ازدیاد و تکثیر انبوه آن در شرایط آزمایشگاهی با زمان و مکان محدود همانند کشورهای اروپایی اقدام به احیا و توسعه آن در جنگل‌های تخریب یافته شمال نمود.

References

[1]. Jalili, A., and Arzani, H. (1999). A preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran (red data book of Iran), Research institute of forests and rangelands. Tehran.

[2]. Kordalivand, A., Payamenoor, V., and Mohammadi, J. (2012). Investigation of morphological characteristics of fruit and leaves of birch species (*Betula pendula)* in various geographical conditions. 3th conference of Climate Change and Dendrochronology. May. 16-18 Sari, Iran, 1-9.

[3]. Zare, H., Akbarinia, L., Hosseini, S.M., Ejtehadi, H., and Amini, T. (2010). A New Record of *Betula Litwinowii* (Betulacae) and a review of the geographical distribution of the genus Betula in Iran, Botanical Journal, 16(2): 237-241.

[4]. Evseeva, N. V. (2005). Birch tree works wonders, tar oil, buds, leaves and sap therapy, Petersburg, Newsy Prospect Press, St. Petersburg.

[5]. Kutuzov, A. (2006). Kerosene, turpentine, birch tar natural power, St. Petersburg, Pitter Press, St. Petersburg.

[6]. Zong Ming Cheng, P., Schnurr, J., and Dai, W. (2000). Micropropagation of *Betula platyphylla* (Fargo) via shoot tip culture and regeneration from half tissues. Journal of Environmental horticulture, 18 (2): 1-5.

[7]. Ewald, D., Naujoks, G., Welander, M., Zhu, H., Hagqvist, R., Salonen, M. and Harrison, A. 2001. Micropropagation and birch field trials. Proceedings of the Workshop on high quality birch: clonal propagation and wood properties. August, 27-28 Ronneby, Sweden, 37-46.

[8]. Haggman, H., Sutela, S., and Welander, M. (2007). Micropropagation of *Betula pendula* Roth including genetically modified material. May 10-12, Florence, Italy, 153-162.

[9]. Shadrina, T. E., and Schestibratov, K. A. (2010). Efficient shoot regeneration from leaf explants of *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nigra*. In: International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone, Acta Horticulture, 885: 349-353.

[10]. Xiaomin, S., Zheng, Ch., Jing, W., Zaikang, T., Meifei, L., and Min, Zh. (2012). Establishment of leaf-explants regeneration system of *Betula luminifera* H. Winkl. Journal of Northwest A and F University (Natural Science Edition), 40(4): 61-67.

Micropropagation of birch (*Betula litwinowii*) from leaf callus

J. Nazari; M.Sc. Graduate of Silviculture and Forest Ecology of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran

V. Payam noor*; Associate Professor Department of Silviculture and Forest Ecology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran

M. Alizadeh; Associate Professor Department of Horticultural, Plant Production faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R. Iran

K. Ghasemi Bezdi; Associate Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Cotton Research Institute of Iran, Gorgan, I.R. Iran

(Received: 28 July 2014, Accepted: 28 October 2015)

ABSTRACT

Birch (Betula sp) species is too important because of little regeneration in mountain cliff region, medicinal, industrial and ornamental function. *Betula litwinowii* is one of two tree species *Birch* in Iran that is endangered and grown in Sangdeh of Sari County. In this study, leaf explants after sterilized by applying different treatments ($HgCl_2$ 0.1%, Ethanol 70% and NaClO 25% in different times) in both MS and WPM medium with various concentrations of BAP and 2,4-D hormones, for calli produce and reproduction of *B. litwinowii* species in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources *In vitro* lab were cultured. Result showed that $HgCl_2$ (0.1% for 7 min) was the best method for sterilization of explants. The WPM medium enriched BAP (1 mgl-1) and 2, 4-D (0.1 mgl-1) was found to be the best medium for callgenesis. The concentrations Zeatin (10 mgl-1) and AS (20 mgl-1) hormones Too were suitable for Stimulation organogenesis. Combination of BAP (0.5 mgl-1) and AS (20 mgl-1) hormones was selected the best treatment with 20% organogenesis. Finally, plantlets in WPM medium with (IBA and NAA 1 mgl-1) rooted. Micropropagation of *Birch* that improved in this research, in biotechnology research with aim of Birch genetics progression are usable.

Keywords: Sterilization, Callgenesis, Culture medium, *Betula litwinowii*

* Corresponding Author, Email: Mnoori56@gmail.com, Tel: +989113735812