Archive of SID

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیستم، شماره سوم، ۱۳۹۲
http://jwfst.gau.ac.ir

گزارش کوتاه علمی

باززایی مستقیم توس (*Betula litwinowii*) از طریق کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه تک‌گره

*جمیله نظری[۱]، وحیده پیام‌نور[۲]، مهدی علیزاده[۳] و کمال قاسمی‌یزدی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار مؤسسه تحقیقات پنبه کشور

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱٤

چکیده

توس (*Betula* sp) در ایران بازمانده جنگل‌های اولیه خزری و رو به انقراض است. دامنه پراکنش محدود و شرایط رویشگاهی نامساعد جنس توس و نبود زادآوری در رویشگاه‌های طبیعی و ناتوانی در تکثیر جنسی باعث در معرض انقراض قرار گرفتن آن شده و استفاده از فنون درون‌شیشه‌ای را برای حمایت بیش‌تر از این جنس مورد تاکید قرار می‌دهد. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی محیط کشت و تیمارهای سترون‌سازی برای ریزازدیادی *B. litwinowii*، یکی از سه گونه شناسایی شده این جنس در ایران با استفاده از ریزنمونه تک‌گره است. ریزنمونه‌ها به‌صورت تصادفی از نهال‌های ۵-٤ ساله جمع‌آوری و با اعمال تیمارهای مختلف سترون‌سازی در دو محیط کشت MS و WPM با غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA کشت شدند. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمایش فاکتوریل دو عامله در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS و MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد برای استریل کردن ریزنمونه‌های تک‌گره، بهترین حالت استفاده از تیمار کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه بود و دو محیط کشت MS و WPM با غلظت‌های مختلف هورمونی برای تولید برگ تک‌گره مناسب بودند. بیش از ۷۵ درصد جوانه‌های جانبی تک‌گره‌ها در هر دو محیط کشت بالا به برگ تبدیل شدند و در نهایت ۱۰ درصد از تک‌گره‌ها تنها در محیط کشت WPM قادر به ساقه‌زایی و تولید ریشه شدند.

واژه‌های کلیدی: *Betula litwinowii*، کشت بافت، ریزازدیادی، سترون‌سازی

* مسئول مکاتبه: jamile.nazari85@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توس (*Betula* sp) درختی سریع‌الرشد و نورپسند از تیره غان است (برزکار، ۱۳۸٤). در ایران تنها ۳ گونه از این جنس با نام‌های *B. pendula* (کردعلیوند، ۱۳۹۱)، *B. litwinowii* (زارع و همکاران، ۲۰۱۰؛ کردعلیوند، ۱۳۹۱) و *B. pubescens* (کردعلیوند، ۱۳۹۱) شناسایی شده که بازمانده جنگل‌های اولیه خزری هستند (نظری، ۱۳۹۱). سهم توده‌های توس در ترکیب جوامع جنگل‌های شمال ایران بسیار ناچیز بوده و در معرض خطر انقراض است (جلیلی و ارزانی، ۱۹۹۹). بنابراین استفاده از روش‌های کشت بافت در تکثیر آن با توجه به وجود مشکلات ناشی از نبود دسترسی آسان به رویشگاه‌های طبیعی و صعب‌العبور بودن راه‌ها، همچنین پراکنده شدن سریع بذور و مشکلات مربوط به جوانه‌زنی، می‌تواند راه‌حل مناسبی برای حمایت و حفاظت از این ذخیره ژنتیکی با ارزش باشد. اولین بار هاتینین و یحی‌اوقلی (۱۹۷٤) اقدام به تکثیر *B. penelula* از طریق کشت بافت کردند. جانسون و ولاندر (۱۹۹۰) در کشور سوئد بر روی کشت بافت گونه‌های مختلف توس در مدت زمان کوتاه به‌جای استفاده از قلمه‌ها، آزمایش‌هایی انجام دادند. ایشان ریزنمونه‌ها را در محیط کشت‌های WPM[1]، MS[2] و N_6[3] کشت دادند و مشخص شد محیط مناسب برای شاخسار از تک‌گره‌ها محیط WPM شامل هورمون‌های BAP[4] و NAA[5] می‌باشد. ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) برای ریزازدیادی ژنوتیپ‌های مختلف *B. pendula* و جنگل‌کاری در عرصه، نهال‌هایی را از کشورهای سوئد، فنلاند و آلمان تهیه نموده و هر یک از ژنوتیپ‌ها با توجه به‌شدت آلودگی تحت تیمارهای سترون‌سازی قرار گرفتند. کلون‌های سوئد با اتانول ۷۰ درصد و کلریدجیوه ۰/۲ درصد، کلون‌های آلمان با کلرید جیوه ۰/۲ درصد در چند ثانیه و کلون‌های فنلاند با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد سترون شده و در محیط کشت‌های WPM، N_6 و LS[6] با غلظت هورمونی مختلف Kin[7] و ۲۵ Zeatin[8] کشت دادند که در نهایت ۱۰۰-۸۵ درصد ژنوتیپ‌های مختلف ریشه‌زایی داشتند. هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) طی پژوهشی که بر روی ریزازدیادی *B. pendula* داشتند، برای سترون‌سازی از هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد شامل مایع شوینده توئین- ۸۰ مدت ۱۵ دقیقه و در مواردی که آلودگی شدید بود از

1- Woody Plant Medium
2- Murashige and Skoog Modified Medium
3- Chu (N_6) Medium
4- 6-Benzyl Amino Purine
5- α-Naphtalene Acetic Acid
6- Linsmaier and Skoog Medium
7- Kinetin
8- Zeatin

www.SID.ir

Archive of SID

کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌مدت ۷ دقیقه استفاده نمودند. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌ها در هر دو محیط کشت WPM و MS شامل ۲/۲ میکرومولار BAP و ۲/۸۵ میکرومولار IBA تبدیل به گیاه‌چه شدند. مگینوسون و همکاران (۲۰۰۹) طی پژوهشی با استفاده از محیط کشت WPM، تأثیر سه هورمون BAP، TDZ[1] و Zeatin را در ساقه‌زایی به‌دست آمده از جوانه‌های جانبی دو گونه *B. papyrifera* Varen و *B. platyphylla* VerDale بررسی کردند. از بین سه سیتوکنین استفاده شده Zeatin تأثیر بهتری در ساقه‌زایی داشت. قان (۲۰۱۲) برای سترون‌سازی تک‌گره‌های *B. microphylla var. paludosa* از هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و کلرید جیوه ۰/۱ درصد استفاده کرد و سپس بر روی محیط کشت MS شامل ۰/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BAP کشت نمود. بر خلاف در حال انقراض بودن توس در ایران و با وجود مرور منابع و پژوهش‌های مختلف برای ریزازدیادی گونه‌های مختلف توس در خارج از کشور، در داخل کشور این پژوهش برای اولین بار انجام شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش ۵ نهال ۵-٤ ساله ریشه لخت با قطر ۲-۱ سانتی‌متر از نهالستان سنگده واقع در استان مازندران تهیه شد. ۵۰ ساقه شامل ۱۰-٦ تک‌گره به‌صورت تصادفی از تمام قسمت‌های اندام نهال تهیه و ریزقلمه‌های تک‌گره به طول ۳ سانتی‌متر شامل یک جوانه جانبی برش داده شد و در مقداری مایع شوینده توئین- ۸۰ شستشو و سپس با آب معمولی آب‌کشی شدند. پس از آن در محلول قارچ‌کش بنومیل به غلظت ٤ گرم در لیتر به‌مدت ۱ ساعت غوطه‌ور گردیدند. سپس زیر هود لامینارفلو به‌دلیل آلودگی زیاد ریزنمونه‌ها، برای سترون‌سازی از روش جدید و تلفیقی علیزاده (۱۳۹۰) استفاده شد. براساس آن ٤ تیمار سترون‌سازی در نظر گرفته شد که در جدول ۱ ارایه شد و بهترین تیمار براساس درصد آلودگی کم و زندمانی ریزنمونه‌ها انتخاب گردید.

جدول ۱- تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌های تک‌گره *Betula litwinowii*.

کد	تیمارهای مختلف سترون‌سازی
۱	باکتری‌کش HQC[2] به‌مدت ۱ ساعت، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۸-۵ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه
۲	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۵ ثانیه و کلریدجیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه
۳	کلریدجیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه
٤	کلریدجیوه ($HgCl_2$) ۰/۱درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه

1- Thidiazuron
2- 8- Hydroxy Quinoline Citrate

www.SID.ir

Archive of SID

پس از سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها به اندازه ۲-۱/۵ سانتی‌متر با یک جوانه، در دو محیط کشت پایه MS و WPM شامل غلظت ثابت NAA و غلظت‌های مختلف هورمون BAP با ٤ تکرار طبق جدول ۲ کشت شدند.

جدول ۲- ترکیبات مختلف هورمون‌های مورد استفاده محیط کشت برای تولید شاخسار ریزنمونه تک‌گره *Betula litwinowii*

کد	ترکیب هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	محیط کشت پایه
A	(۰/۲) NAA (۰/۲) + BAP	WPM / MS
B	(۰/۲) NAA (۰/٤) + BAP	WPM / MS
C	(۰/۲) NAA (۱) + BAP	WPM / MS
D	(۰/۲) NAA (۲) + BAP	WPM / MS

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل دو عامله در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و SPSS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل معنی‌دار (LSD) صورت گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس به‌دست آمده از بررسی تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌ها در جدول ۳ ارایه شده است. براساس نتایج تجزیه واریانس، درصد آلودگی ریزنمونه‌ها تحت‌تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد آلودگی ریزنمونه‌های تک‌گره *Betula litwinowii*

درصد آلودگی	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
بین تیمارهای سترون‌سازی	۱۳۹۱۷/٦٦۷	۳	٤٦۳۹/۲۲۲	۲۸/۳٤۸	۰/۰۰۰
درون تیمار سترون‌سازی	۱۳۰۹/۳۳۳	۸	۱٦۳/٦٦۷		
کل	۱۵۲۲۷	۱۱			
ضریب تغییرات (درصد)			۲۷/۵		

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین ٤ تیمار سترون‌سازی بر درصد آلودگی تک‌گره‌های *B. litwinowii* به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ٥ درصد، در جدول ٤ ارایه شده است. کم‌ترین درصد آلودگی ریزنمونه‌های تک‌گره در تیمار ٤ مشاهده شد، ولی براساس نتایج این پژوهش استفاده طولانی‌مدت از کلریدجیوه تأثیرات منفی روی ریزنمونه‌ها گذاشته و سبب تولید نشدن برگ گردید. از این‌رو در این پژوهش برای سترون نمودن ریزنمونه‌های تک‌گره از تیمار سترون‌سازی کد ٣، که نسبت به تیمارهای کد ١ و ٢ درصد آلودگی کم‌تر و نسبت به تیمار ٤ درصد تولید برگ بالاتری داشت، استفاده شد.

جدول ٤- مقایسه میانگین درصد آلودگی تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه‌های تک‌گره *Betula litwinowii*

کد	ترکیب تیمارهای سترون‌سازی	درصد آلودگی
١	باکتری‌کش HQC به‌مدت ١ ساعت، الکل ٧٠ درصد به‌مدت ٨-٥ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم ٢٥ درصد به‌مدت ٣ دقیقه	٧٩/٣[a]
٢	الکل ٧٠ درصد به‌مدت ٢٥ ثانیه و کلریدجیوه ٠/١ درصد به‌مدت ٥ دقیقه	٨١/٧[a]
٣	کلریدجیوه ٠/١ درصد به‌مدت ٧ دقیقه	١٥[b]
٤	کلریدجیوه ٠/١درصد به‌مدت ١٠ دقیقه	١٠[b]

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ٥ درصد با آزمون LSD نشان نمی‌دهند.

نتایج تجریه واریانس میزان تولید برگ و شاخسار ریزنمونه‌های تک‌گره در دو محیط کشت و ترکیبات هورمونی مختلف با استفاده از آزمایش فاکتوریل دو عامله در قالب طرح کاملاً تصادفی، در جدول ٥ ارایه شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود بین محیط کشت، تیمارهای مختلف هورمونی و اثر متقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ٥- تجریه واریانس تأثیر محیط کشت، تیمارهای هورمونی و اثر متقابل آن‌ها بر تولید برگ ریزنمونه‌های تک‌گره *Betula litwinowii*

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
محیط کشت	١	٨٨٣/٣٤٠	٨٣٣/٣٤٠	١/٥٠٨	٠/٢٣١
تیمارهای هورمونی	٣	٨٠١/١٤٦	٢٦٧	٠/٤٨٣	٠/٦٩٧
محیط کشت × تیمارهای هورمونی	٣	٣٥٩/٥٢١	١١٩/٨	٠/٢١٧	٠/٨٨٤
اشتباه آزمایشی	٢٤	١٣٢٦٠/٦٩٧	٥٥٢/٥		
کل	٣١	١٥٢٥٤/٧٠٥			
ضریب تغییرات (درصد)		٣١			

www.SID.ir

Archive of SID

تولید برگ تک‌گره‌ها در دو محیط کشت با تیمارهای مختلف هورمونی از درصد بالایی برخوردار بود و بیش‌تر جوانه‌های تک‌گره قادر به شکوفایی برگ بودند (جدول‌های ٦ و ٧). این روند رشد تا ۲ هفته بعد از کشت ادامه داشت ولی پس از این مدت، برگ‌های باز شده زرد و در نهایت به خشکی گرائیدند (شکل ۱- ب). اکثریت ریزنمونه‌های تک‌گره در هر دو محیط کشت از بین رفتند و تنها ۱۰ درصد از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی تیمار B ریشه‌زایی داشتند (شکل ۲- ج).

جدول ٦- درصد تولید برگ جوانه‌های تک‌گره *Betula litwinowii*.

محیط کشت	درصد تولید برگ و شاخسار
MS	٧٠/٦
WPM	٨٠/٨

جدول ٧- درصد تولید برگ و شاخسار جوانه‌های تک‌گره *Betula litwinowii* در تیمارهای مختلف هورمونی.

کد	تیمارهای هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	درصد تولید برگ و شاخسار
A	(٠/٢) NAA (٠/٢) + BAP	٨٢/٥
B	(٠/٢) NAA (٠/٤) + BAP	٧٤/٢
C	(٠/٢) NAA (١) + BAP	٧٧/٥
D	(٠/٢) NAA (٢) + BAP	٦٨/٧

شکل ۱- (الف): رشد جوانه‌ها و تولید برگ ۲ هفته پس از کشت در محیط MS با ترکیب هورمونی A، شکل (ب): شروع تغییر رنگ حاشیه برگ‌ها پس از ٤ هفته از کشت در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی B، شکل (ج): زرد و خشک شدن تک‌گره‌ها پس از ٦-٥ هفته از کشت.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- ریشه‌زایی ریزنمونه تک‌گره در محیط کشت WPM شامل ترکیب هورمونی B (الف): کشت ریزنمونه تک‌گره، (ب): رشد شاخسار طی ۳ هفته، (ج): ایجاد گیاه‌چه ریشه‌دار طی ٦-۵ هفته.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که از بین تیمارهای اعمال شده برای سترون‌سازی ریزنمونه تک‌گره، کاربرد کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه نتایج بهتری در مقایسه با سایر تیمارها داشت که با نتایج پژوهش هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی ریزنمونه تک‌گره گونه *B. pendula* بود و همچنین تیمار کلریدجیوه استفاده شده بر روی ریزنمونه‌های تک‌گره *B. pendula* روی کلون‌های آلمان در پژوهش ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت. افزایش مدت زمان استفاده از این ماده شیمیایی تا ۱۰ دقیقه با وجود کاهش درصد آلودگی‌ها، به‌دلیل سمیت ایجاد شده باعث کاهش زنده‌مانی ریزنمونه‌ها شده، به‌طوری‌که بعد از چند روز به زردی و خشکی گرائیدند. تیمار سترون‌سازی که شامل باکتری‌کش HQC به‌مدت ۱ ساعت، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۸-۵ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه و تیمار دیگر که شامل الکل ۷۰ درصد و کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه بود، قادر به حذف آلودگی‌ها حتی به‌میزان ۲۰ درصد هم نبود و همه ریزنمونه‌ها از بین رفتند. در پژوهش‌های ایوالد و همکاران (۲۰۰۱) بر روی تک‌گره کلون‌های سوئد و فنلاند *B. penelula* و هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) در کشت *B. penelula* که از تیمارهای بالا استفاده شده بود و نتایج موفقیت‌آمیزی به‌دست آمده بود که با این پژوهش هم‌سو نبود. به‌نظر می‌رسد آلوده شدن ریزنمونه‌های تک‌گره در تیمار ۱ به‌دلیل نداشتن قدرت نفوذپذیری مواد به داخل جوانه‌های خفته و در نتیجه ناتوانی در از بین بردن آلودگی‌های درون جوانه‌ای تک‌گره‌ها باشد. پژوهش‌گران زیادی توانسته‌اند با به‌کار بردن ترکیبات هورمونی مختلف و با استفاده از دو محیط کشت MS و WPM گیاه‌چه‌هایی با ریشه‌های انبوه از ریزنمونه تک‌گره تولید کنند که می‌توان به چند نمونه از جمله: جانسون و ولاندر

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۹۹۰) بر روی گونه‌های مختلف؛ مگینسون و همکاران (۲۰۰۹) بر روی *B. papyrifera* Varen و *B. platyphylla* VerDale و قان (۲۰۱۲) بر روی *B. microphylla var. paludosa* اشاره کرد. در این پژوهش برای تولید برگ و شاخسار اولیه محیط کشت‌های مورد استفاده با نتایج هاگمن و همکاران (۲۰۰۷) بر روی گونه *B. penelula* هم‌سو می‌باشد. در این پژوهش با وجود نتیجه بسیار مطلوب در باززایی اولیه (۹۰-۷۵ درصد)، حدود ۸۰ درصد از ریزنمونه‌ها پس از ۲ هفته، زرد و خشک شدند. برای رشد بهتر تک‌گره‌ها و جلوگیری ار خشک شدن آن‌ها تغییراتی در عناصر ماکرو، میکرو و مواد آلی محیط کشت و شرایط محیطی از جمله شدت نور، رطوبت و دما انجام شد ولی نتیجه‌ای نداشت و تنها بازکشت‌های مکرر در هر ۲ هفته یک‌بار، تا حدودی مؤثر بود و ۱۰ درصد از تک‌گره‌ها قادر به ریشه‌زایی شدند. با توجه به این‌که در این پژوهش تمام ریزنمونه‌ها به‌صورت عمودی بر روی محیط کشت قرار گرفته بودند و ارتباط ریزنمونه با محیط کشت فقط از طریق مقطع پایینی ساقه میسر بود (علیزاده، ۱۳۹۱)، بنابراین انجام پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های تکمیلی برای کشت افقی ریزنمونه و ریشه‌زایی تک‌گره با اعمال هورمون‌ها و محیط کشت‌های مختلف انجام گیرد.

منابع

1.Alizadeh, M. 2012. A User Manual Plant Tissue Culture and Micropropagation. Publlicist Norouzi, 322p.

2.Barzekar, Gh. 2005. Parks and Forestry Promenades, Pp: 37-38.

3.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, Ronneby, Sweden, 27-28 August. Pp: 37-46.

4.Haggman, H., Sutela, S. and Welander, M. 2007. Micropropagation of *Betula pendula* Roth including genetically modified material. Springer, Pp: 153-162.

5.Huhtinen, O. and Yahyaogly, Z. 1974. Das frühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pfl änzchen beider Birke (*Betula pendula* Roth). Silvae Genetica. 23: 1-3. 32-34.

6.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 Iran, 764p.

7.Jansson, E. and Welander, M. 1990. Micropropagation of some adult *Betula* species. Rapport Institutionen for Tradgardsvetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, 55: 20.

www.SID.ir

Archive of SID

8.Kordalivand, A. 2012. Genetic diversity of Birch based on morphology of leat and fruit. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements. For the degree of M.Sc. in. Silviculture and Forest Ecology, 137p.
9.Magnusson, V.A., Castillo, C.M. and Dai, W. 2009. Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. Acta Horticulturae. Pp: 223-230.
10.Nazari, J. 2013. Optimization of culture medium and sterilization treatments for *Betula litwinowii* micropropagation. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements. For the degree of M.Sc. in. Silviculture and Forest Ecology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, 70p.
11.Qun, Zh. 2012. Tissue culture of endangered plant *Betula microphylla* var. *paludosa* and its pilotscale experiment in Shanghai area. J. Shanghai Jiaotong Univ. Agric. Sci. 30: 1. 50-54.
12.Zare, H., Akbarinia, M., Hosseini, S.M., Ejtehadi, H. and Amini Eshkevari, T. 2010. A New Record of *Betula litwinowii* (Betulacae) and a review of the geographical distribution of the genus Betula in Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 20 (3), 2013
http://jwfst.gau.ac.ir

Direct regeneration of *Birch* (*Betula litwinowii*) by *in vitro* culture nodal explants

***J. Nazari[1], V. Payamnoor[2], M. Alizadeh[3] and K. Ghasemi Yazdi[4]**
[1]M.Sc. Student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Faculty of Forest Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Assistant Prof., Cotton Research Institute
Received: 03/28/2013; Accepted: 11/05/2013

Abstract

Birch (*Betula sp*.) is considered as a survivor of Caspian primary forests and one of the extinct forest trees in Iran. In our country, Birch species is endangered because of limited distribution range, unfavourable habitat conditions, lack of regeneration in natural habitat and inability to reproduce sexually in natural condition. Therefore, using the technique of in vitro is very important to support this species. The objective of this study is to optimize culture medium and surface sterilization treatments for *B. litwinowii* micro-propagation, that is one of known Birch by use of nodal explants. Nodal explants were collected randomly from 4-5 years old of birch seedlings and sterilised by applying different treatments in both MS and WPM medium with various concentrations of BAP and NAA hormones were cultured. The obtained data were analyzed based on completely randomized design using SPSS and MSTATC software. The results revealed that HgCl2 (0.1% for 7 min) was the best treatment for surface sterilization of nodal explants. The MS and WPM media supplemented with various concentrations of hormones were suitable for culture establishment of nodal explants. More than 70% of single lateral bud nodal in both mediums becomes to leaves. Finally, 10% of nodal explants are able to produce shoot and roots in WPM medium.

Keywords: *Betula litwinowii*, Tissue Culture, Micropropagation, Sterilization

* Corresponding Author; Email: jamile.nazari85@gmail.com

www.SID.ir