Archive of SID

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۴، شماره ۲، صفحه ۳۰۸-۲۹۸ (۱۳۹۷)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.114745.2083

کالزایی *Betula pendula* Roth. از طریق کشت بافت ریزنمونه‌ها و محیط کشت‌های مختلف

وحیده پیام‌نور[1*] و راضیه جعفری حاجتی[2]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، پست الکترونیک: mnoori56@gmail.com
۲- دکترا، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

Betula pendula Roth. یکی از گونه‌های مهم خانواده Betulaceae در ایران به علت رویشگاه طبیعی محدود و عدم زادآوری در معرض خطر انقراض می‌باشد. استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی راه حلی مناسب برای تکثیر غیرجنسی این گونه و همچنین حفاظت و حمایت آن در شرایط کنترل شده‌است. در این پژوهش کالزایی *B. pendula* با استفاده از پنج ریزنمونه (برگ، ساقه، تک‌گره، دمبرگ و پوست) در دو محیط کشت WPM و NT با دو ترکیب هورمونی (A: ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) و (B: ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، ریزنمونه دمبرگ و تک‌گره حداقل درصد کالزایی را داشتند و تنها در محیط کشت NT با ترکیب هورمونی A کالزایی کردند. کالزایی، وزن تر و خشک ریزنمونه‌های پوست، ساقه و برگ در محیط کشت NT و WPM با ترکیب B نسبت به محیط‌های با ترکیب هورمونی A به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. ریزنمونه پوست در محیط کشت WPM و NT با ترکیب هورمونی A بالاترین درصد کالزایی (به‌ترتیب ۸۱/۱۴٪ و ۷۰/۳۶٪) را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها نشان داد. متوسط وزن تر و خشک این ریزنمونه در محیط کشت NT با همین ترکیب هورمونی بالاتر از محیط کشت WPM بوده‌است.

واژه‌های کلیدی: کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک، محیط کشت.

مقدمه

توس (*Betula pendula* Roth.) از گونه‌های مهم خانواده Betulaceae است و یکی از گونه‌های موجود در کشور ایران می‌باشد. گونه‌های مختلف توس در نیمکره شمالی و شرق اروپا تا قسمت شمالی آسیا و به‌صورت درختچه در بوره‌آل حضور دارند (Raal *et al.*, 2010؛ Demirci *et al.*, 2004). این گونه در ایران از ارتفاعات ۲۳۰۰ توچال به بالا، در ارتفاعات ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ متری دودانگه ساری، دره لار هراز آمل، سیاه‌بیشه چالوس و سیاه‌مرزکوه گرگان به‌صورت توده‌های پراکنده مشاهده و گزارش شده‌است (Zare, 2002). *B. pendula* درختی سریع‌الرشد است که متوسط ارتفاع آن در توده خالص معمولاً کمتر از ۲۵ متر بوده و به‌ندرت حتی در بهترین رویشگاه‌ها به ارتفاع ۳۰ متر می‌رسد. متوسط سن بیولوژیکی آن تقریباً ۱۰۰ سال است، اگرچه بسیاری از پایه‌های آن تا بالای ۱۵۰ سال هم زنده می‌مانند. توس با بذر تکثیر یافته، تک‌پایه و بادگرده‌افشان می‌باشد (Vakkari, 2009) و به‌علت قابلیت بالای تولید مواد مؤثره

www.SID.ir

Archive of SID

دارویی دارای ارزش است. امروزه تقاضا برای این ترکیب‌های دارویی گیاهی افزایش یافته است. براساس مطالعات اخیر عصاره‌ها و تری‌ترپنوئیدهای اصلی جدا شده از پوست ساقه جنس‌های توس دامنه وسیع فعالیت‌های زیستی دارند. تأثیرات آنتی‌اکسیدان (Ju *et al.*, 2004)، آنتی‌ویروس (Aiken & Chen, 2005)، آنتی‌قارچ (Jasicka-Misiak *et al.*, 2010)، ضدسرطان (Laszczyk, 2009) و فعالیت‌های آنتی HIV (Bori *et al.*, 2012) این ترکیب‌ها مورد بررسی قرار گرفته و اثبات شده‌است.

برخی از گیاهان مانند گونه‌های مختلف توس در ایران، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و با توجه به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه و عدم زادآوری طبیعی گونه، برداشت از عرصه با مشکل مواجه است. از سویی *B. pendula* براساس I.U.C.N. (۲۰۰۱) از گونه‌های در معرض خطر انقراض می‌باشد و نیاز به تکثیر این گونه، حفاظت و احیاء رویشگاه‌های آن احساس می‌گردد.

تکنیک کشت بافت گیاهی

فناوری زیستی با استفاده از راهکارهای کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک و نشانگرهای مولکولی قادر است کارآیی گیاهان را به‌عنوان منابع تجدیدپذیر افزایش دهد (Kumar & Gupta, 2008؛ Mulabagal & Tsay, 2004). قلمه‌های توس از دسته سخت ریشه‌زا بوده و تکثیر غیرجنسی آنها به سختی قابل انجام است. در کنار تلاش برای تکثیر از طریق بذر استفاده از تکنیک کشت بافت به‌عنوان ابزاری مناسب برای تکثیر و ریزازدیادی گونه‌هایی با این ویژگی در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط و تولید انبوه در زمان کوتاه می‌تواند حائز اهمیت باشد. کالزایی این گونه به‌عنوان اولین قدم در تکثیر درون شیشه‌ای مورد توجه قرار گرفت.

کالوس‌زایی از برگ *B. pendula* توسط Simola (۱۹۸۵) در محیط کشت N7 با ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیستات و ترکیب هورمونی (۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین) انجام شده است. کالزایی با استفاده از برگ‌های جوان *B. platyphylla* var. *japonica* در محیط کشت MS با ۱ میکرومولار NAA و ۱ میکرومولار N- (2-chloro-4-pyridyl)-N9- phenylurea توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۳) مورد بررسی قرار گرفته است. Fan و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی کالزایی ریزنمونه جوانه گونه *B. platyphylla* Suk.، محیط کشت NT و ترکیب هورمونی (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 6-BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ) را مناسب برای القاء کالوس معرفی نمودند. Nazari (۲۰۱۳) محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D را مناسب‌ترین محیط برای کالوس‌زایی برگ گونه *B. litwinowii* گزارش کردند. Mehrirad و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر سن پایه و نور بر کالزایی و تولید ماده مؤثره دارویی گونه *B. litwinowii*، اعلام نمودند که کالزایی و متعاقباً تولید ماده مؤثره این گونه در تاریکی امکان‌پذیر نیست.

در این تحقیق کالزایی ریزنمونه‌های مختلف گونه *B. pendula* در دو محیط کشت با ترکیب هورمونی متفاوت مورد بررسی قرار می‌گیرد. معرفی ریزنمونه و محیط کشت با ترکیب هورمونی مناسب برای تولید کالوس از اهداف این پژوهش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها در دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر از پایه‌هایی به قطر ۱۵ تا ۲۵ سانتی‌متر در اردیبهشت از منطقه سیاه‌مرزکوه علی‌آباد در محدوده طول جغرافیایی ″۳۰ ′۴۲ °۵۴ شرقی تا ′۵۰ °۵۴ غربی و عرض جغرافیایی °۳۵ ۳۶ شمالی تا ″۳۰ ′۴۲ °۳۶ جنوبی واقع در فاصله ۱۸ کیلومتری جنوب‌شرق شهر گرگان تهیه گردید. سرشاخه‌ها پس از تقسیم به قطعات ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متری برای کنترل آلودگی تحت تیمارهای سترون‌سازی قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

تیمارهای پیش سترون‌سازی به‌صورت شستشو با آب جاری، قرار دادن در مایع ظرفشویی به مدت ۳ دقیقه و بعد ضدعفونی با ۴ گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها به داخل هود لامینار منتقل شده و تیمارهای سترون‌سازی شامل شستشو با آب مقطر سه مرتبه، قرار دادن در کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه و شستشوی دوباره با آب مقطر سه مرتبه به‌منظور حذف محلول سترون‌سازی اعمال شد (Nazari *et al.*, 2013).

از نمونه‌های ضدعفونی شده، ساقه، برگ، دمبرگ و تک‌گره و پوست داخلی (سبز رنگ) جدا و به قطعات ۵ تا ۱۰ میلی‌متر تقسیم شدند. برای القاء کالوس، ریزنمونه‌ها در دو محیط کشت پایه NT و WPM، با ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار، pH برابر ۵/۷ و دو ترکیب هورمونی (A: ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ (Fan *et al.*, 2010)) و (B: ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (Nazari *et al.*, 2013)) کشت داده شدند و در شرایط ۱۶ ساعت نوری در اتاقک رشد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در هر پتری ۸ ریزنمونه قرار گرفت و برای هر تیمار ۷ پتری‌دیش در نظر گرفته شد. پس از القاء و رشد اولیه کالوس‌ها در طول ماه اول، درصد کالوس‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها برای تکمیل دوره رشدی خود به مدت ۲ ماه هر چهار هفته یک‌بار بازکشت شدند. در پایان سه ماه وزن تر کالوس‌ها در هر تکرار (نمونه) با تیمارهای متفاوت اندازه‌گیری شد، سپس کالوس‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد آون خشک و وزن خشک آنها نیز محاسبه شد. آنالیز داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 مورد تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج

بررسی کالزایی پنج ریزنمونه پوست، ساقه، برگ، دمبرگ و تک‌گره نشان داد که سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ در دو محیط کشت WPM و NT با ترکیب‌های هورمونی A و B کالوس‌زایی داشتند، ولی ریزنمونه دمبرگ و تک‌گره فقط در محیط کشت NT با ترکیب هورمونی A کالوس تولید نمودند. با توجه به نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱، درصد کالزایی، وزن تر و وزن خشک کالوس‌های این پنج ریزنمونه در محیط کشت NT با ترکیب هورمونی A که مشترک در همه ریزنمونه‌ها بودند، تفاوت کاملاً معنی‌دار با حدود اطمینان ۹۹٪ با هم داشتند. نتایج تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ در دو محیط کشت و دو ترکیب هورمونی A و B در جدول ۲ حکایت از آن دارد که درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه در سطح احتمال ۰/۰۱٪ کاملاً معنی‌دار است ولی درصد کالوس‌زایی تحت تأثیر محیط کشت و اثر متقابل محیط کشت و ترکیب هورمونی معنی‌دار نشده است. ترکیب هورمونی، اثر متقابل ریزنمونه و محیط‌کشت و اثر متقابل ریزنمونه و ترکیب هورمونی در سطح احتمال ۰/۰۵٪ و اثر متقابل سه فاکتور (ریزنمونه، محیط‌کشت و ترکیب هورمونی) در سطح ۰/۰۱٪ باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در درصد کالزایی شده است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول‌های ۳ و ۴) نشان می‌دهد که وزن تر و خشک کالوس‌های سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ اختلاف کاملاً معنی‌داری با حدود اطمینان ۹۹٪ دارند، این اختلاف تحت تأثیر محیط کشت، ترکیب هورمونی، اثر متقابل ریزنمونه و محیط کشت و اثر متقابل محیط کشت و ترکیب هورمونی در سطح احتمال ۰/۰۱٪ معنی‌دار است. اما اثر متقابل ریزنمونه و محیط کشت و اثر متقابل سه فاکتور ریزنمونه، محیط کشت و ترکیب هورمونی بر وزن تر و خشک کالوس‌ها معنی‌دار نبود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی، وزن تر و خشک پنج ریزنمونه پوست، ساقه، برگ، دمبرگ و تک‌گره تحت محیط کشت NT و ترکیب هورمونی (1mg/l BAP,0.1 mg/L 2,4-D)

	منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
درصد کالوس‌زایی	بین گروهی (ریزنمونه‌های مختلف)	۴	۲۱۲۱۲/۳۸	۵۳۰۳/۰۹	۱۹۴/۲۹**
	درون گروهی (اشتباه)	۳۰	۸۱۸/۸۳	۲۷/۲۹	
	کل	۳۴	۲۲۰۳۱/۲۱		
وزن تر	بین گروهی (ریزنمونه‌های مختلف)	۴	۶۳۳۵۶۴/۶۰	۱۵۸۳۹۱/۱۵	۱۵/۶۸**
	درون گروهی (اشتباه)	۳۰	۳۰۲۹۰۲/۸۳	۱۰۰۹۶/۷۶	
	کل	۳۴	۹۳۶۴۶۷/۴۳		
وزن خشک	بین گروهی (ریزنمونه‌های مختلف)	۴	۶۷۴۲/۳۸	۱۶۸۵/۵۹	۳۲/۸۷**
	درون گروهی (اشتباه)	۳۰	۱۵۳۸/۳۸	۵۱/۲۸	
	کل	۳۴	۸۲۸۰/۷۶		

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱٪

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ تحت محیط کشت و ترکیب هورمونی متفاوت

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
ریزنمونه (a)	۲	۸۷۱۸/۸۰	۴۳۵۹/۴	۱۶۷/۲۲**
محیط کشت (b)	۱	۲۸/۳۵	۲۸/۳۵	۱/۰۹ns
ترکیب هورمونی (c)	۱	۳۱۷۳۸/۵۲	۳۱۷۳۸/۵۲	۱۲۱۷/۴۳**
اثر متقابل a×b	۲	۴۳۹/۴۴	۲۱۹/۷۲	۸/۴۲**
اثر متقابل a×c	۲	۳۰۲۲/۵۱	۱۵۱۱/۲۶	۵۷/۹۷**
اثر متقابل b×c	۱	۴۷/۵۵	۴۷/۵۵	۱/۸۲ns
اثر متقابل a×b×c	۲	۲۳۶/۵۳	۱۱۸/۲۶	۴/۵۴*
خطا	۷۲	۱۸۷۷/۰۵	۲۶/۰۷	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱٪؛ *: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵٪؛ ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تجزیه واریانس وزن تر سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ در محیط کشت و ترکیب هورمونی متفاوت

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
ریزنمونه (a)	۲	۴۷۳۲۹۴/۶۵	۲۳۶۶۴۷/۳۲	۴۲/۳۴**
محیط کشت (b)	۱	۱۶۹۴۷۱/۵۶	۱۶۹۴۷۱/۵۶	۳۰/۳۲**
ترکیب هورمونی (c)	۱	۳۳۹۴۳۹/۷۵	۳۳۹۴۳۹/۷۵	۶۰/۷۳**
اثر متقابل a×b	۲	۱۰۳۷۲۷/۸	۵۱۸۶۳/۹	۹/۲۸**
اثر متقابل a×c	۲	۱۱۸۱۶/۷۶	۵۹۰۸/۳۸	۱/۰۶ns
اثر متقابل b×c	۱	۴۱۱۴۱/۹۲	۴۱۱۴۱/۹	۷/۳۶**
اثر متقابل a×b×c	۲	۱۱۲۴/۶۴	۵۶۲/۳۲	۰/۱۰۱ns
خطا	۷۲	۴۰۲۳۹۵/۷۲	۵۵۸۸/۸۳	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱٪؛ ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

جدول ۴- تجزیه واریانس وزن خشک سه ریزنمونه پوست، ساقه و برگ در محیط کشت و ترکیب هورمونی متفاوت

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
ریزنمونه (a)	۲	۴۵۶۷/۶۱	۲۲۸۳/۸۱	۵۱/۱**
محیط کشت (b)	۱	۵۶۱/۹۱	۵۶۱/۹۱	۱۲/۵۷**
ترکیب هورمونی (c)	۱	۱۰۷۹/۷۵	۱۰۷۹/۷۵	۲۴/۱۶**
اثر متقابل a×b	۲	۹۵۷/۷۸	۴۷۸/۸۸	۱۰/۷۱**
اثر متقابل a×c	۲	۱۷۸/۲۸	۸۹/۱۴	۱/۹۹ns
اثر متقابل b×c	۱	۳۲۱/۹۸	۳۲۱/۹۸	۷/۲**
اثر متقابل a×b×c	۲	۷۹/۰۵	۳۹/۵۲	۰/۸۸ns
خطا	۷۲	۳۲۱۷/۸۸	۴۴/۶۹	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱٪؛ ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و ترکیب هورمونی بر صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دار شده، وزن تر و خشک آنها در جدول ۵ مورد بررسی قرار گرفته است. ریزنمونه پوست در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی A با بالاترین درصد کالزایی (۸۱/۱۴٪) تفاوت معنی‌داری با سایر فاکتورها دارد. این ریزنمونه در محیط کشت NT و ترکیب هورمونی A نیز درصد کالزایی بالایی (۷۰/۳۶٪) را نشان داده است. ریزنمونه دمبرگ حداقل درصد کالوس‌زایی را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشت. شکل و رنگ کالوس ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت با ترکیب‌های هورمونی متفاوت در شکل‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه، محیط کشت و ترکیب‌های هورمونی متفاوت بر درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها (ترکیب هورمونی A: 1mg/l BAP,0.1 mg/L 2,4-D؛ ترکیب هورمونی B: 0.1mg/l BAP, 0.01mg/l TDZ)

تیمارها	درصد کالوس‌زایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)
پوست× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی A	۷۰/۳۶ b	۵۴۴/۹۶ a	۵۴/۲ a
ساقه× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی A	۴۹/۷۶ c	۲۹۸/۷ b	۲۸/۵۹ bc
برگ× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی A	۳۹/۲۹ d	۲۸۱/۹۷ bc	۲۴/۰۳ c
دمبرگ× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی A	۷/۷۵ fj	۱۲۴/۹۷ d	۱۱/۹۲ d
تک‌گره× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی A	۶/۸۶ j	۲۹۷/۶۶ b	۳۵/۴ b
پوست× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی B	۲۱ e		
ساقه× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی B	۱۵/۸۶ ef		
برگ× محیط کشت NT× ترکیب هورمونی B	۱۰/۴۳ f		
پوست× محیط کشت WPM× ترکیب هورمونی A	۸۱/۱۴ a		
ساقه× محیط کشت WPM× ترکیب هورمونی A	۴۲/۱۴ cd		
برگ× محیط کشت WPM× ترکیب هورمونی A	۳۷/۱۴ d		
پوست× محیط کشت WPM×ترکیب هورمونی B	۱۹/۲۹ e		
ساقه× محیط کشت WPM×ترکیب هورمونی B	۱۰/۱۴ f		
برگ× محیط کشت WPM× ترکیب هورمونی B	۹/۸۶ f		

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین درصد کالزایی، وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها تحت تأثیر ریزنمونه، محیط کشت و اثر متقابل آنها

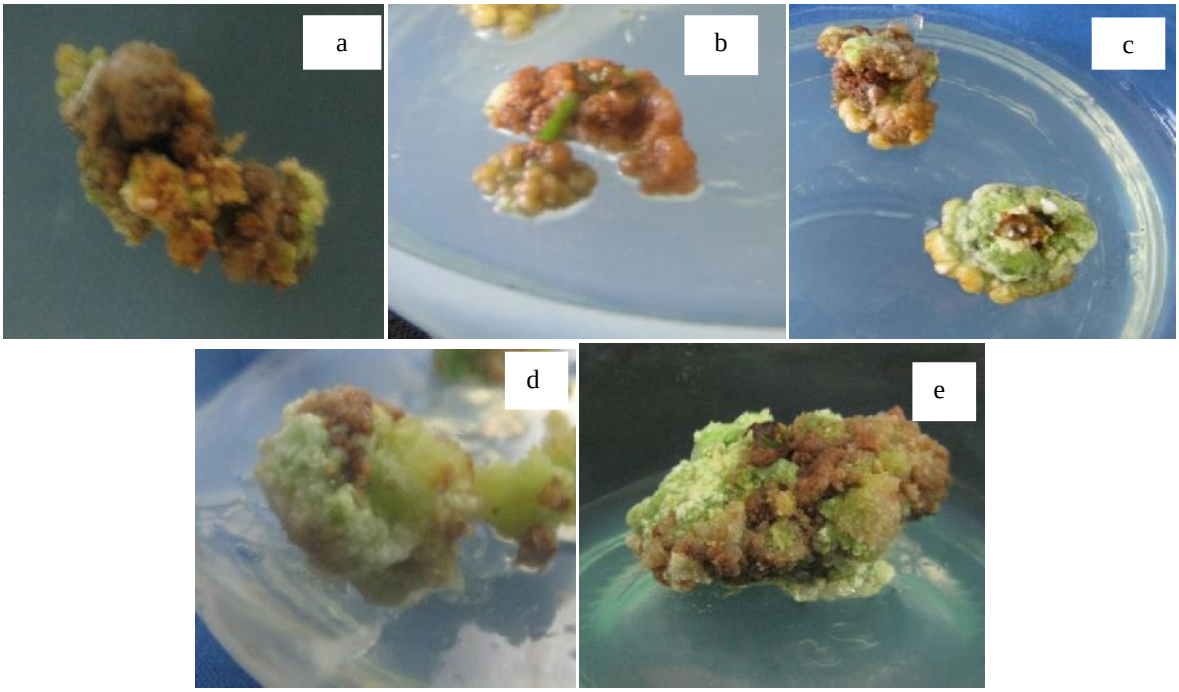
تیمارها	درصد کالوس‌زایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)
پوست	۴۷/۹۵ a	۳۵۰/۵ a	۳۸/۱ a
ساقه	۲۹/۴۷ b	۱۹۸/۰۵ b	۲۴/۱۷ b
برگ	۲۴/۱۸ c	۱۸۵/۲۴ bc	۲۱/۱۷ bc
محیط کشت NT	۳۴/۴۵ a	۲۸۹/۵ a	۳۰/۴ a
محیط کشت WPM	۳۳/۲۹ ab	۱۹۹/۶۷ b	۲۵/۲۳ b
پوست×محیط کشت NT	۴۵/۶۸ ab	۴۴۳/۹۱ a	۴۵/۴۶ a
ساقه×محیط کشت NT	۳۲/۸۱ c	۲۰۹/۳۵ bcd	۲۴/۴۴ bc
برگ×محیط کشت NT	۲۴/۸۶ de	۲۱۵/۲۷ bc	۲۱/۳ cd
پوست×محیط کشت WPM	۵۰/۲۱ a	۲۵۷/۰۷ b	۳۰/۷۴ b
ساقه×محیط کشت WPM	۲۶/۱۴ d	۱۸۶/۷۵ bcd	۲۳/۹ c
برگ×محیط کشت WPM	۲۳/۵ de	۱۵۵/۲ d	۲۱/۰۵ cd

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

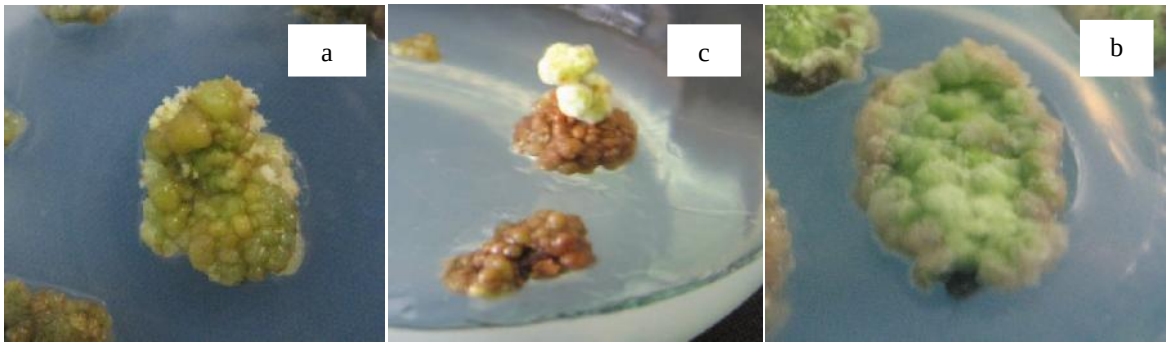
www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین درصد کالزایی، وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها تحت تأثیر ریزنمونه، محیط کشت و اثر متقابل آنها در جدول ۶ مورد بررسی قرار گرفته است. ریزنمونه پوست حداکثر کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس را دارد که میانگین این فاکتورها در این ریزنمونه تفاوت معنی‌داری نسبت به ریزنمونه‌های ساقه و برگ دارند. درصد کالزایی این ریزنمونه در محیط کشت NT تفاوت معنی‌داری با محیط کشت WPM نداشت ولی وزن تر و خشک کالوس‌ها در محیط کشت NT بیشتر از WPM بود که این تفاوت‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵٪ معنی‌دار بود. میانگین درصد کالزایی ریزنمونه ساقه تحت تأثیر محیط کشت NT و WPM با حدود اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار است.



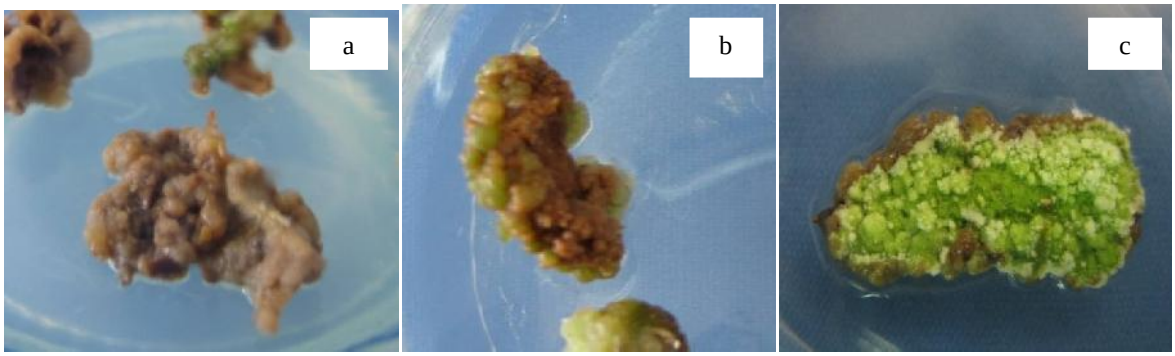
شکل ۱- کالزایی نمونه‌های a) دمبرگ، b) تک‌گره، c) ساقه، d) برگ، e) پوست تحت محیط کشت NT و ترکیب هورمونی 1mg/l BAP,0.1 mg/L 2,4-D



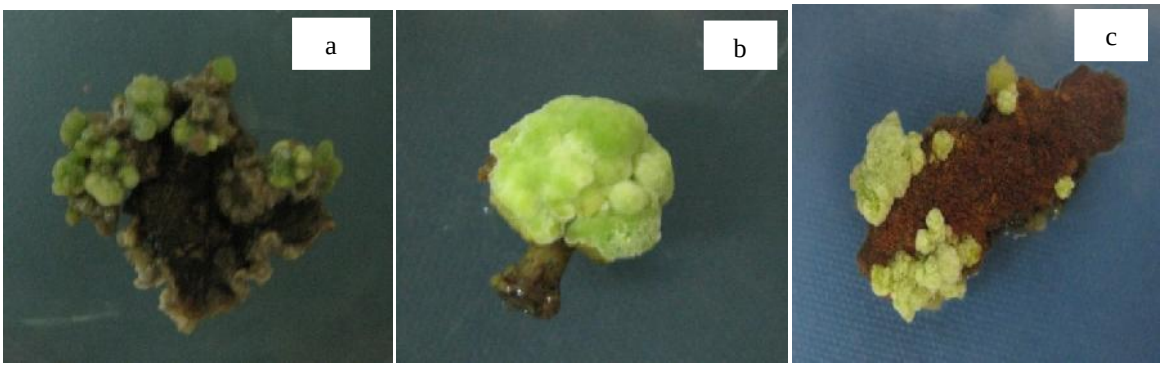
شکل ۲- کالزایی نمونه‌های a) برگ، b) ساقه، c) پوست تحت محیط کشت WPM و ترکیب هورمونی 1mg/l BAP,0.1 mg/L 2,4-D

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- کالزایی نمونه‌های a) برگ، b) ساقه، c) پوست تحت محیط کشت NT و ترکیب هورمونی 0.1mg/l BAP, 0.01mg/l TDZ



شکل ۴- کالزایی نمونه‌های a) برگ، b) ساقه، c) پوست تحت محیط کشت WPM و ترکیب هورمونی 0.1mg/l BAP, 0.01mg/l TDZ

بحث

کالزایی به‌منظور تولید تعداد زیادی گیاهچه هم‌شکل در مدت زمانی کوتاه یکی از اهداف مهم روش‌های مختلف کشت بافت می‌باشد. با بررسی کالزایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه توس در این تحقیق ریزنمونه پوست نسبت به سایر ریزنمونه‌ها درصد کالزایی بالاتری را نشان داده است. یکی از علت‌های بالا بودن درصد کالوس‌زایی در نمونه پوست می‌توان به مقاومت بیشتر این نمونه در برابر آلودگی اشاره کرد و از سوی دیگر هنگام سترون‌سازی پوست خارجی قهوه‌ای رنگ در معرض محلول سترون‌سازی قرار می‌گیرد که از پوست داخلی جدا می‌شود. بنابراین سلولهای پوست سبز رنگ که برای کشت استفاده می‌شود آسیب کمتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها دیده‌اند.

تحقیقات محدودی در زمینه استفاده از ریزنمونه پوست برای کالزایی انجام شده است. Gastaldo و همکاران (۱۹۹۶) از ریزنمونه پوست گونه *Aesculus hippocastanum* L. برای جنین‌زایی سوماتیکی و تولید کالوس در محیط کشت MS استفاده نمودند. اما استفاده از ریزنمونه‌های جوانه و برگ گونه‌های مختلف جنس توس معمول می‌باشد (Zaki *et al.*, 2011؛ Fan *et al.*, 2010؛ Nazari *et al.*, 2013). Zaki و همکاران (۲۰۱۱) به‌منظور کالزایی ریزنمونه برگ گونه *B. utilis* با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های مختلف 2,4-D به این نتیجه رسیدند که استفاده از غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون باعث حداکثر کالوس‌زایی (۸۰٪) می‌شود. Nazari و همکاران (۲۰۱۳) کالوس‌زایی برگ گونه *B. litwinowii* در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی A را ۵۲٪ گزارش نمودند. در این مطالعه درصد کالزایی در محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی A در ریزنمونه پوست نسبت به نتایج Nazari و همکاران (۲۰۱۳)، بالاتر و در مورد ریزنمونه برگ، کمتر بوده است. ریزنمونه پوست در محیط کشت NT با ترکیب هورمونی A حداکثر وزن تر و خشک را نشان داده است. درصد کالزایی، وزن تر و خشک ریزنمونه‌های ساقه و برگ نیز در محیط NT و ترکیب هورمونی A بالاتر از سایر محیط کشت‌های مورد استفاده بوده است. ترکیب هورمونی B در هر دو محیط کشت باعث کاهش کلیه خصوصیات مورد بررسی کالوس‌ها شده است که با نتایج بدست آمده توسط Fan و همکاران (۲۰۱۰) که از ترکیب هورمونی B در محیط کشت NT استفاده نموده‌اند، مطابقت ندارد. از سوی دیگر ریزنمونه دمبرگ و تک‌گره تنها در محیط کشت NT با ترکیب هورمونی A قادر به کالوس‌زایی بودند. بررسی نوع و غلظت عناصر غذایی در محیط‌های کشت مورد استفاده نشان می‌دهد که محیط کشت NT حاوی مقادیر بالایی نیترات آمونیوم و منیزیم به‌صورت ($MgSO_4$) نسبت به محیط کشت WPM می‌باشد که به‌نظر می‌رسد تأثیر مثبتی بر رشد بافت تمایز نیافته داشته است.

گونه‌های مختلف توس و اندام‌های مختلف آن واکنش‌ها و نیازهای متفاوتی نسبت به محیط کشت، میزان سیتوکنین و اکسین دارند. در این تحقیق مشخص شد که کالوس‌زایی بالا در غلظت بالاتر سیتوکنین نسبت به اکسین نشان‌دهنده پاسخ مثبت تکثیر سلولی به میزان بالای سیتوکنین برای ریزنمونه پوست می‌باشد. بنابراین می‌توان بیان کرد که به‌منظور افزایش درصد کالزایی ریزنمونه‌های برگ، ساقه، دمبرگ و تک‌گره نیاز است که تغییرات هورمونی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به نتایج بدست آمده، این پژوهش محیط کشت NT حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D برای کالزایی ریزنمونه‌های مختلف *B. pendula* پیشنهاد می‌شود. ریزنمونه پوست به علت بالا بودن درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها از نظر تجاری برای تولید لاین سلولی، مناسب‌تر و نسبت به سایر ریزنمونه‌ها ارجحیت دارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مؤلفان بر خود لازم می‌دانند که از مساعدت‌های بی‌دریغ اداره کل منابع طبیعی استان گلستان و اداره منابع طبیعی علی‌آباد در نمونه‌برداری‌های مکرر و همکاری‌های خانم مهندس جمیله نظری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

- Aiken, C. and Chen, C.H., 2005. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. Trends in Molecular Medicine, 11: 31-36.
- Bori, I.D., Hung, H.Y., Qian, K., Chen, C.H., Morris-Natschke, S. and Lee, K.H., 2012. Anti-AIDS agents 88. Anti-HIV conjugates of betulin and betulinic acid with AZT prepared via click chemistry. Tetrahedron Letters, 53(15): 1987-1989.
- Demirci, B., Paper, D.H., Demirci, F., Hüsnü Can Baser, K. and Franz, G., 2004. Essential oil of *Betula pendula* Roth. buds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1(3): 301-303.
- Fan, G.Z., Li, X.C., Wang, X.D. and Zhan, Y.G., 2010. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. African Journal of Biotechnology, 9(19): 2816-2820.
- Jasicka-Misiak, I., Lipok, J., Swider, I.A. and Kafarski, P., 2010. Possible fungistatic implications of betulin presence in Betulaceae plants and their hymenochaetaceae parasitic fungi. Zeitschrift für Naturforschung C, 65: 201-206.
- Gastaldo, P., Caviglia, A.M., Carli, S. and Paola Profumo, P., 1996. Somatic embryogenesis and esculin formation in calli and embryoids from bark explants of *Aesculus hippocastanum* L. Plant Science, 19: 157-162.
- Ju, E.M., Lee, S.E., Hwang, H.J. and Kim, J.H., 2004. Antioxidant and anticancer activity of extract from

www.SID.ir

Archive of SID

- Raal, A., Kanut, M. and Orav, A., 2010. Annual variation of yield and composition of the essential oil of common juniper (*Juniperus communis* L.) branches from Estonia. Baltic Forestry, 16: 50-56.
- Simola, L.K., 1985. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*. Scientia Horticulturae, 26: 77-85.
- Vakkari, P., 2009. Silver birch, *Betula pendula*. Technical guidelines for genetic conservation and use for silver birch. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use, Rome, Italy, 6p.
- Zaki, M., Sofi, M.S. and Kaloo, Z.A., 2011. A reproducible protocol for raising clonal plants from leaf segments excised from mature trees of *Betula utilis* a threatened tree species of Kashmir Himalayas. International Multidisciplinary Research Journal, 1(5): 7-13.
- Zare, H., 2002. Ecological Study on *Betula* in Sangdeh and Lar valley. M.Sc. Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran.
- Zhang, H., ShiuyA, M., Yokota, S. and Ebizuka, Y., 2003. Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*. Molecular Evolution of Oxidosqualene, 26(5): 642-650.

Betula platyphylla var. *japonica*. Life Sciences, 74: 1013-1026.
- I.U.C.N., 2001. IUCN Red list categories and criteria. IUCN, Gland, Switzerland.
- Kumar, J. and Gupta, P.K., 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2: 93-112.
- Laszczyk, M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. Planta Medica, 75: 1549-1560.
- Mehrirad, N., Payamnoor, V. and Nazari, J., 2015. Effect of tree age and light on *Betula litwinowii* callogenesis and betulin induced in vitro conditions. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1): 93-102.
- Mulabagal, V. and Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2: 29-48.
- 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, 70p.

www.SID.ir

Archive of SID

Callogenesis of *Betula pendula* Roth. via tissue culture of different explants and media

V. Payamnoor[1*] and R. Jafari Hajati[2]

1*- Corresponding author, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: mnoori56@gmail.com
2- Traditional Medicine Clinical Trials Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

Received: July 2017 Revised: March 2018 Accepted: March 2018

Abstract

Birch (*Betula pendula* Roth.) is one of the most important species exposed to extinction due to the limited natural habitat and lack of regeneration. Plant tissue culture technique is an appropriate solution for asexual reproduction of this species and to protect it in controlled conditions. In this research, callogenesis of *B. pendula* was investigated using five types of explants (leave, stem, nodal, petiole and bark) in WPM and NT media enriched with two hormonal combinations including A) 1mg/l BAP, 0.1 mg/l 2,4-D and B) 0.1 mg/l BAP, 0.01mg/l TDZ). The results indicated that the minimum callogenesis was observed in nodal and petiole explants in NT medium enriched with A hormonal combination. Callogenesis, fresh and dry weight of bark, stem and leave explants were significantly decreased in WPM and NT media containing B hormonal combination as compared with A hormonal combination. The maximum callogenesis was observed in bark explant in WPM (81.14) and NT (70.36) media with A hormonal combination as compared with other explants. The average fresh and dry weight of this explant in NT medium was more than that of WPM medium with the same hormonal combination.

Keywords: Callogenesis, wet weight, dry weight, medium.

www.SID.ir