مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد نوزدهم، شماره چهارم، ۱۳۹۱
http://jopp.gau.ac.ir

کاربرد عصاره‌های فیلتر شده قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* و *Ophiostoma ulmi* در شرایط کشت بافت، به منظور غربال‌کردن و تحمل به بیماری مرگ هلندی نارون در نارون چینی (*Ulmus parvifolia* Jacq.) و اوجا (*Ulmus campestris* L.)

***مریم ممقانی[۱]، کامران رهنما[۲]، کامبیز مشایخی[۳] و حسین حقیقی[۱]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

چکیده

بیماری مرگ هلندی از مهمترین بیماری‌های نارون در اکثر مناطق کشت این گیاه می‌باشد. استفاده از کشت بافت گیاهی تحت شرایط آزمایشگاه، مطالعه اثرات متقابل گیاه نارون و عامل بیماری مرگ هلندی نارون را تسهیل می‌کند و می‌تواند از طریق انتخاب، اصلاح و تکثیر ژنوتیپ‌های مقاوم به کنترل این بیماری، کمک کند. به این منظور، طی سال‌های ۸۳ تا ۸۵ اقدام به نمونه‌برداری از درختان اوجا و نارون چینی مناطق جنگلی استان‌های گلستان و مازندران شد. به‌منظور بررسی توانایی کال زایی و میزان رشد کالوس این دو گونه، پس از اعمال تیمارهای ضدعفونی کننده، ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه MS با تیمارهای مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند. کالوس‌های رشد یافته نارون چینی و اوجا با غلظت‌های مختلفی از عصاره قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* مایه‌زنی شدند. در پایان، پس از تلقیح، وزن کالوس‌ها و قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد که در مقایسه رشد کالوس نارون چینی در حضور عصاره عامل بیماری به‌طور معنی‌داری بیشتر از رشد کالوس اوجا است. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰ درصد، میزان کاهش وزن کالوس‌های نارون چینی، ۱۳/۲ درصد و اوجا، ۲۸ درصد بود. همچنین زنده‌مانی سلول‌های نارون چینی در غلظت ۵۰، ۲۳ درصد بود،

*مسئول مکاتبه: ghazi_m2004@yahoo.com

درحالی‌که زنده‌مانی کالوس‌های اوجا در غلظت ۵۰، ۲ درصد بود. نتایج نشان می‌دهد که در حضور عصاره عامل بیماری، میزان تحمل و زنده مانی کالوس‌های نارون چینی از کالوس‌های اوجا بیشتر است. براساس این بررسی، گونه نارون چینی نسبت به اوجا بیشترین مقاومت را به عصاره عامل بیماری نشان دادند. بنابراین با این روش می‌توان نسبت به انتخاب کالوس‌های متحمل، غربال کردن گیاهان مقاوم را تسریع نمود.

واژه‌های کلیدی: مرگ هلندی نارون، کشت بافت، *Ophiostoma novo-ulmi*

مقدمه

گیاه نارون از جنس *Ulmus* و خانواده *Ulmaceae* با بیش از ۳۰ گونه می‌باشد، که معروفترین گونه‌های آن ملج[1]، نارون مجنون[2]، اوجا[3]، نارون چتری[4] و نارون چینی[5] هستند. عامل بیماری مرگ هلندی نارون[6]، شامل دو گونه از قارچ *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* هستند (ممقانی و همکاران، ۲۰۰۹). زوال و خشکیدگی درختان نارون بر اثر این بیماری در مناطق مختلف جهان همواره مدنظر بوده و سالیانه مبلغ قابل توجهی جهت بهبود درختان آلوده یا جایگزینی آنها هزینه می‌شود. بیماری مرگ هلندی نارون، اولین بار در سال ۱۹۱۸ از اروپای شمال غربی گزارش شد (کارنوسکی و میکلر، ۱۹۸٦). این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۹۵۹، بر روی درختان ملج و اوجا از منطقه پارک ملی گلستان گزارش شد و سپس در سایر نواحی جنگلی گسترش یافت (رهنما و همکاران، ۲۰۰۰). امروزه برخلاف کاهش کشت نارون در قسمت‌های مختلف کشور، هنوز آلودگی‌هایی در سطح جنگل‌ها به خصوص در استان گلستان مشاهده می‌شود. این بیماری یکی از عوامل محدودکننده احداث جنگل و پارک در سطح جهان به‌شمار می‌رود (رهنما و همکاران، ۲۰۰۲).

1- *Ulmus glabra*
2- *Ulmus glabra* var. *pendula*
3- *Ulmus campestris*
4- *Ulmus carpinifolia* var. *umbraculifera*
5- *Ulmus parvifolia*
6- Dutch Elm Disease

درختان نارون[1] از ارزشمندترین درختان صنعتی موجود در جنگل‌های شمال ایران است که علاوه بر ارزش اقتصادی، از گونه‌های مهم در تشکیل اکوسیستم جنگل‌های شمال ایران محسوب می‌شوند. امروزه تعداد این درختان به شدت رو به کاهش است که یکی از مهم‌ترین دلایل آن وقوع بیماری مرگ هلندی نارون است. روند توسعه بیماری در مناطق مختلف کشور، لزوم پژوهش در زمینه این بیماری را هر چه بیشتر روشن می‌سازد. به‌طورکلی مناسب‌ترین روش مبارزه با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. ریز ازدیادی این درختان از طریق کشت بافت که امکان تکثیر کالوس‌های مقاوم نارون را فراهم می‌سازد، از اهمیت زیادی برخوردار است (ممقانی و همکاران، ۲۰۰۷b). کشت سلول و بافت‌های گیاهی طی سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته که در سطح وسیع برای انتقال ژن‌های ایجادکننده مقاومت به آفات و بیماری‌های گیاهی، مورد استفاده قرار می‌گیرد (پیریک، ۱۹۹۷). از طرف دیگر اصلاح گیاهان به‌روش انتخاب[2]، علاوه بر وقت‌گیر بودن، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست (آروین، ۲۰۰۲؛ شاه پیری و همکاران، ۲۰۰٤). از مزایای دیگر کشت بافت، تکثیر گونه‌های گزینش شده و همچنین امکان انجام کار در تمام طول سال می‌باشد (ویدورانگ و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از مهمترین دستاوردهای کشت بافت، استفاده از این روش در زمینه شناسایی و تولید درختان مقاوم به مرگ هلندی نارون بوده است (ززگولا، ۱۹۸۸). با استفاده از مایه‌زنی توده سلولی تمایز نیافته نارون به عامل بیماری یا عصاره صاف‌شده عامل بیماری، می‌توان سطوح توانمندی فیزیولوژیک گیاه نارون را در مقابله با بیماری، سریع‌تر تعیین نمود (روبرتز، ۱۹٦٦؛ روبرتز، ۱۹۷۲؛ پیجوت و همکاران، ۱۹۹۰a). گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم را با قرار دادن سلول‌های گیاهی در معرض عوامل بیماریزا (عصاره‌خام) یا توکسین آنها (عصاره خالص) و سپس باززایی گیاهان از سلول‌های زنده مانده، می‌توان انجام داد (تاکایی و هیروتسوکا، ۱۹۸٤؛ درافایل و همکاران، ۲۰۰۱). سلول‌های زنده مانده ممکن است به‌عنوان واریانت‌های ژنتیکی در یک ریزنمونه وجود داشته باشند یا واریانت‌های سوماکلونال باشند که در شرایط آزمایشگاه به‌وجود آمده‌اند. هر دو نوع کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی جهت مطالعه عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده می‌شوند (ززگولا، ۱۹۸۸). لستر و اسمالی (۱۹۷۲) موفق شدند با

1- *Ulmus* sp.
2- Selection

کشت برگی نارون سیبریایی[1] بر روی محیط کشت MS حاوی ۵ تا ۱۰ میکرومولار BA، کالوس تولید کند (وال و همکاران، ۱۹۹۷). بنجوریا و همکاران (۱۹۹۸) به‌منظور ریزازدیادی نارون کاملین[2]، از برگ و رگبرگ میانی به‌عنوان ریزنمونه استفاده کردند. تکثیر نارون *U. minor* از طریق کشت بافت شاخه‌های جوانه‌دار نیز انجام شده است (کورچت و همکاران، ۱۹۹۳). اوستری و وارد (۲۰۰۳) موفق شدند با انجام آزمایش‌های کشت درون‌شیشه‌ای مقاومت چندین کلون از کالوس حاصل از برگ سپیدار[3] را به بیماری لکه برگی سپتورویایی[4] ارزیابی کنند. همچنین آگراوال و گوپتا (۱۹۹۱)، جهت دست‌یابی به کلون‌های مقاوم به بیماری لکه برگی سپتوریایی، از روش کشت سرشاخه‌های جوانه‌دار سپیدار، بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[5] کردند. پیجوت و همکاران (۱۹۹۰b) بیان کردند که جهت بررسی مقاومت گیاه نارون به مرگ استفاده هلندی، انجام آزمون بیماری‌زایی بر روی کالوس در مقایسه با انجام این آزمون بر روی قلمه‌های نارون از نظر زمانی مقرون به صرفه‌تر است. والنتاین و همکاران (۱۹۸۸) به‌منظور بررسی مقاومت *Populus tremuloides* به شانکر *Hypoxylon mammatum*، کالوس‌های ریزازدیاد شده این گیاه را در تماس عصاره خالص عامل بیماری قرار دادند. هامرش لاگ (۱۹۸۸) کشت‌های کالوس گیاه *Prunus persica* را در معرض عصاره خالص شده باکتری *Xanthomonas campestris* قرار داد و گیاهچه‌های مقاوم از کالوس‌های زنده مانده را باززایی نمود. پیجوت نشان داد که کالوس‌های *Ulmus americana* (مقاوم به مرگ هلندی نارون) در حضور عصاره *Ophiostoma ulmi* زنده ماندند، درحالی که کالوس‌های به‌دست آمده از درختان حساس در حضور عصاره قارچ از بین رفتند (پیجوت و همکاران، ۱۹۹۰a؛ کروری و همکاران، ۱۹۹۲). در این بررسی برای اولین بار، قابلیت زنده‌مانی سلول‌های کالوس در دو گونه نارون چینی و اوجا به‌عنوان یک الگوی عملی با ترکیبات رنگ آمیزی حیاتی مورد آزمایش قرار گرفته است. هدف از این پژوهش تعیین بهترین محیط کشت پایه به همراه مناسبترین غلظت هورمونی برای استقرار و

1- *Ulmus pumila*
2- Commelin
3- *Populus* sp.
4- *Septoria mosiva*
5- Murashige and Skoog

ریزازدیادی ریزنمونه‌های گرفته شده از دو گونه نارون چینی و اوجا به روش کشت بافت و بررسی میزان تحمل کالوس این دو گونه به عصاره قارچ عامل مرگ هلندی نارون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی جهت تولید کالوس: طی بازدیدهای مکرر، در سال‌های ۸۳، ۸٤ و ۸۵ اقدام به نمونه‌برداری از جوانه‌های انتهایی و جانبی درختان اوجا و نارون چینی جنگل‌های استان گلستان (گرگان، شصت کلاته) و مازندران (بهشهر) صورت گرفت.

کشت ریزنمونه‌ها و ازدیاد کالوس‌ها: نمونه‌ها را به قطعات ۲ تا ۵ سانتی‌متر تقسیم کرده و به‌منظور کاهش آلودگی سطحی ریزنمونه‌ها، آنها را با مایع ظرفشویی و آب، برس کشی شدند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در قارچکش بنومیل ۱ درصد غوطه‌ور گردیدند. سپس به کمک تیغ استریل، فلس‌های روی جوانه‌ها جدا شد، پس از شستشو، نمونه‌ها به‌مدت پنج دقیقه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. در آخرین مرحله، ریزنمونه‌ها در محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند. در هر مرحله ضدعفونی، آبکشی نمونه‌ها با آب دوبار تقطیر استریل انجام شد (فینک و همکاران، ۱۹۸٦). ریزنمونه‌ها را به قطعات ۱ سانتی‌متری به‌صورت مورب برش زده که هر قطعه با یک گره یا جوانه‌جانبی یا انتهایی همراه بود. یک برش کوچک با نوک اسکالپل استریل در طول شاخه ایجاد گردید و ریزنمونه‌ها به صورت عمود یا کمی‌مورب، به عمق ۳ میلی‌متر داخل محیط کشت قرار داده شدند. به‌منظور کشت ابتدایی ریزنمونه‌ها و تعیین بهترین محیط کشت و مناسب ترین تیمار برای رشد کالوس‌ها از محیط کشت MS استفاده شد. به‌منظور بررسی تاثیر محیط‌های کشت مختلف بر رشد ریزنمونه‌ها و کالوس زایی از محیط پایه MS با ۸ تیمار تنظیم کننده رشد و ۳ تکرار استفاده شد. تیمارها شامل: بدون تنظیم‌کننده رشد (شاهد)، شیر نارگیل ۲۰ درصد، شیر نارگیل ۲۰ درصد همراه با توفوردی[1] (٤ml از محلول پایه ۰/۵ پی‌پی‌ام)، توفوردی (ml ۳ از محلول پایه ۰/۵ پی‌پی‌ام)، بنزیل آمینو پورین (BA) (۰/۱ پی‌پی‌ام)، نفتالین استیک اسید (NAA) (ml ٤ از محلول پایه ۰/۵ پی‌پی‌ام) و کینتین (Kin) (۰/۵ پی‌پی‌ام).

1-2,4 Dichloro Phenoxy Acetic Acid

تهیه عصاره قارچ عامل مرگ هلندی نارون: جدایه قارچ *O. novo-ulmi* مورد استفاده در این پژوهش از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. به‌منظور تهیه سوسپانسیون اسپور عامل بیماری، از محیط کشت مایع سیب زمینی- دکستروز[1] (PDB) استفاده شد. کشت‌های مایع تلقیح شده با قارچ عامل مرگ هلندی نارون به‌مدت ۲۵ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و نور پایین بر روی دستگاه چرخان (۹۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. بعد از این مدت، از کشت‌های سوسپانسیون اسپور، عصاره‌های عاری از اسپور تهیه شد. برای انجام این کار، مایع درون ارلن‌ها از پارچه ململ اتوکلاو شده ٤ لایه عبور داده شد، سپس برای تهیه عصاره قارچ حاوی توکسین سراتوالمین[2] (CU)، سوسپانسیون اسپور قارچ از کاغذهای صافی نیترو سلولزی با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و عصاره صاف شده بلافاصله در غلظت‌های لازم استفاده شد (پیجوت و همکاران، ۱۹۹۰a). جهت اطمینان از نبودن اسپور و مسیلیوم عامل بیماری در عصاره صاف شده، یک سی‌سی از عصاره مذکور بر روی سطح پتری‌های حاوی محیط‌کشت آب – آگار[3] دو درصد، کشت مخطط انجام شد و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شدند، بعد از یک هفته هیچ گونه رشدی از قارچ بر روی محیط کشت مذکور مشاهده نشد (هامرش لاگ، ۱۹۸۸) که عدم رشد قارچ بر روی محیط کشت موید عدم وجود پروپاگول عامل بیماری در عصاره صاف شده بود.

مایه‌زنی نهال‌های نارون چینی با عصاره عامل بیماری: مایه‌زنی نهال‌های نارون با عصاره در دو ناحیه ۵ سانتی‌متری بالای طوقه و دیگری به فاصله ۲۵ سانتی‌متری از محل تلقیح اول انجام شد.

بررسی تاثیر عصاره قارچ بر رشد کالوس‌های نارون در محیط کشت پایه MS با رقت $\frac{1}{2}$:

به‌منظور ارزیابی و سنجش زنده مانی سلول‌های کالوس در غلظت‌های مختلف عصاره از محیط کشت MS با غلظت $\frac{1}{2}$ و pH=۵/٦ استفاده شد. میزان تمام عناصر تشکیل‌دهنده این محیط کشت که شامل محلول ماکرو، میکرو، آهن، ویتامین‌ها، گلیسین و میواینوزیتول بود، به نصف تقلیل یافت، ولی مقادیر ساکارز و آگار مصرفی ثابت بود و تغییری نکرد (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲). محیط فوق، بعد از

1- Potato Dextrose Broth
2- Cerato-ulmin
3- Water Agar

اتوکلاو شدن داخل ظروف شیشه ای ریخته شد. تحت شرایط استریل غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ درصد از عصاره تهیه و به هر یک از تیمارها در ٤ تکرار اعمال شد. محیط کشت MS بدون عصاره به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. جهت مایه زنی، قطعات کالوس با وزن ۰/۵گرم انتخاب و در سطح محیط قرار داده شدند و به‌مدت ۷ هفته در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (پیجوت و همکاران، ۱۹۹۰a). به‌منظور اندازه‌گیری قابلیت زنده مانی سلول‌ها در حضور عصاره قارچ، از آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم[1] استفاده شد (تاویل و مازور، ۱۹۷۵). به‌این‌ترتیب که ۰/۵ گرم از کالوس‌های مایه‌زنی‌شده با عصاره قارچ در محلول بی‌رنگ تترازولیوم یک درصد گذاشته شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ٤۰ تا ٤۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت در شرایط تاریکی نگه‌داری شد. سرانجام، روش رنگبری از کالوس توسط الکل اتیلیک ۹٦ درصد صورت گرفت و در نتیجه استخراج رنگ از نمونه‌ها انجام شد (ابراهیم و کوییک، ۲۰۰۱). میزان آسیب وارد شده توسط عصاره عامل مرگ هلندی نارون به نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد با دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ٤۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (پلا و همکاران، ۲۰۰۳). در پایان به‌منظور تعیین قابلیت رشد کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره، کشت آنها بر روی محیط MS در پتری انجام شد (ممقانی، ۲۰۰۷a).

طرح آماری: پس از مایه‌زنی کالوس‌ها، با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، با ٦ تیمار و ٤ تکرار، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌فزار R و منحنی دز – پاسخ[2] انجام شد (ریتز و استریبیگ، ۲۰۰۵).

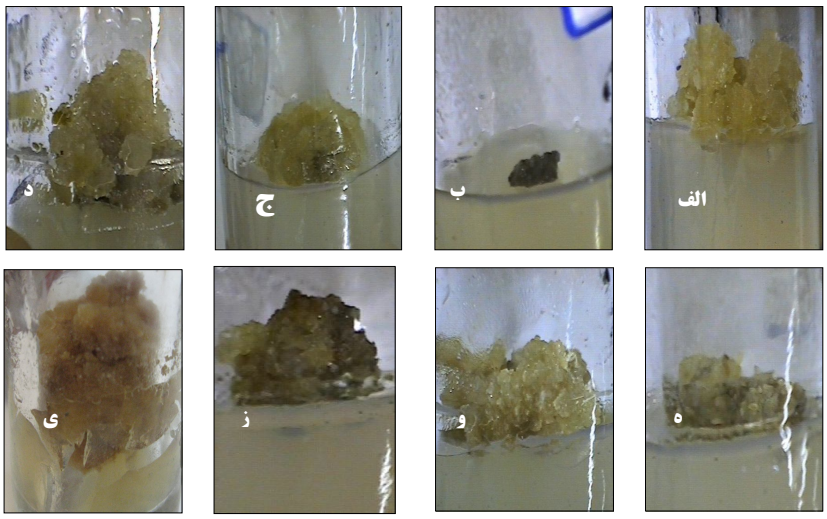
نتایج

مقایسه رشد کالوس نارون چینی در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد و شیرنارگیل در محیط پایه MS: نوع محیط و تنظیم‌کننده‌های رشد روی وزن کالوس‌ها تاثیر متفاوتی داشتند (شکل ۱). تاثیر تیمارهای اعمال‌شده به محیط پایه MS بر روی میزان رشد کالوس‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تیمارها به‌روش دانکن نشان داد که تیمار MS حاوی ۲۰ درصد شیر

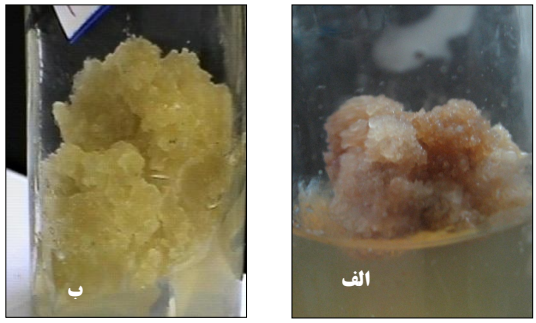
1- Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC test)
2- Dose Response Curve

نارگیل (A) افزایش معنی‌داری در وزن کالوس‌ها نسبت به سایر تیمارها داشت. بالاترین وزن کالوس مربوط به تیمار ۲۰ درصد شیرنارگیل با وزن ۲/۳۷ گرم و کمترین مربوط به تیمار شیرنارگیل به همراه توفوردی با وزن ۰/۱٦ گرم بود (جدول ۱).

مقایسه ظاهری کال‌های نارون چینی و اوجا از نظر میزان رشد و رنگ: اندازه‌گیری کال‌ها پس از ۳ هفته نشان می‌دهد که میزان زنده مانی کال‌های نارون چینی رشد یافته بر روی محیط پایه MS مکمل با شیر نارگیل، در مقایسه با کال‌های اوجا بیشتر بود، به طوری که بعد از این مدت کالوس‌های رشد کرده نارون چینی تمام سطح محیط را فرا گرفتند ولی این رشد در کالوس اوجا بسیار آهسته بود. کال به وجود آمده از نارون چینی، کرم و روشن ولی در اوجا به سرعت از رنگ زرد به قهوه‌ای تغییر رنگ دادند (شکل ۲).



شکل ۱- مشخصات ظاهری کال‌های واکشت شده نارون چینی در محیط پایه MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد، الف: شیرنارگیل بیست درصد، ب: شیر نارگیل + توفوردی، ج: توفوردی، د: بنزیل آدنین، ه: کینتین، و: نفتالین استیک اسید، ز: شاهد، ی: کالوس کشت شده در تیمار شیرنارگیل ۲۰ درصد.



شکل ۲- مقایسه کالوس، الف: اوجا و ب: نارون چینی در محیط کشت MS حاوی شیر نارگیل.

تلقیح عصاره صاف شده عامل بیماری به نهال‌های نارون چینی: بیست روز پس از مایه‌زنی نهال‌های نارون چینی به عصاره، علایم بیماری ظاهر شد. علایم ابتدایی به‌صورت تغییر رنگ تدریجی و ظهور علایم پژمردگی بود. بعد از مدتی شاخه‌ها خشک و حالت پژمردگی در آنها ایجاد شد. علایم ایجاد شده در نهال‌ها توسط عصاره حاوی توکسین به علایمی که سوسپانسیون قارچ در نهال‌ها ایجاد می‌کند، شابهت داشت.

نتایج به دست آمده از مایه زنی عصاره به کالوس‌ها: ۷ هفته بعد از مایه زنی عصاره عامل بیماری به کالوس‌های نارون چینی و اوجا، وزن کال‌ها یادداشت شد. طبق منحنی‌های دز – پاسخ، داده‌ها از معادله لجستیک نوع چهار پارامتری (g_4) تبعیت می‌کردند. براساس نمودارهای به‌دست آمده، کالوس‌ها پاسخ‌های متفاوتی به رقت‌های مختلف عصاره نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره، وزن کالوس در هر دو گونه کاهش می‌یابد. هنگامی‌که عصاره قارچ با غلظت ۵۰ درصد به کالوس‌ها مایه زنی شد، رشد کالوس‌ها متوقف شد. پس از ۱۰ روز در کالوس‌های مایه‌زنی شده با غلظت ۵۰ درصد، حالت نکروز و قهوه‌ای شدن مشاهده شد. در حالی که در غلظت‌های ۱ و ۵ درصد اثر بازدارنده در رشد کالوس‌ها مشاهده نشد و کالوس‌ها از نظر وزنی در مقایسه با تیمار شاهد در یک سطح قرار داشتند. از غلظت صفر تا ۱۰ درصد در وزن کالوس نارون چینی تغییری مشاهده نشد، ولی کاهش وزن کالوس در غلظت ۲۰ درصد شدید بود. افزایش غلظت عصاره در تیمارهای ۲۰ و ۵۰ درصد منجر به کاهش ۰/۷ گرمی‌میزان رشد کالوس شد (شکل ۳). روند مشابهی برای رقم اوجا نیز مشاهده شد، ولی کاهش وزن کالوس در نارون چینی بیشتر بود. به‌طوری‌که تفاوت وزن کالوس اوجا

در غلظت‌های مختلف زیاد نبود. با توجه به نتایج حاصل (شکل ٤)، مجانب پایین و شیب از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، ولی مجانب بالایی اختلاف معنی‌داری داشت و فرمول (۱)، معادله ٤ پارامتری گامپرتز به این صورت است:

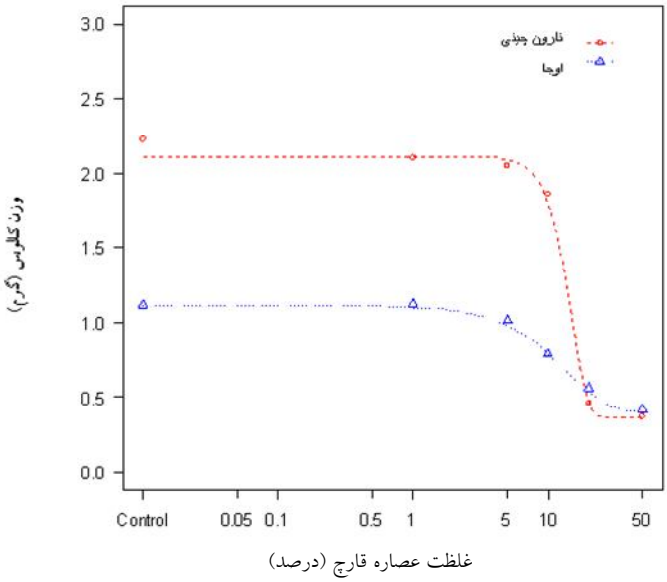
$$f(x)= c + (d-c) \exp (-\exp(b(\log(x)- e))) \quad (۱)$$

بنابراین نمودار به این صورت اصلاح شد و همان‌طور که مشاهده می‌شود، در دو غلظت ۲۰ و ۵۰ درصد، تفاوتی در کاهش وزن دو گونه کالوس مشاهده نشد و این کاهش وزن در هر دو گونه تقریباً معادل ۰/۵ گرم بود (شکل ٤). ولی افزایش وزن کالوس نارون چینی در غلظت ۱۰ درصد حدود ۱/۸ گرم و در اوجا حدود ۰/۷ گرم بود. نتایج نشان می‌دهد که سرعت رشد کالوس در دو گونه نارون چینی و اوجا متفاوت است (شکل ۵). همچنین در هر دو گونه با افزایش غلظت، سرعت رشد کالوس کمتر شد، ولی در نارون چینی به دلیل رشد بیشتر کالوس، کاهش رشد بیشتر مشاهده شد.

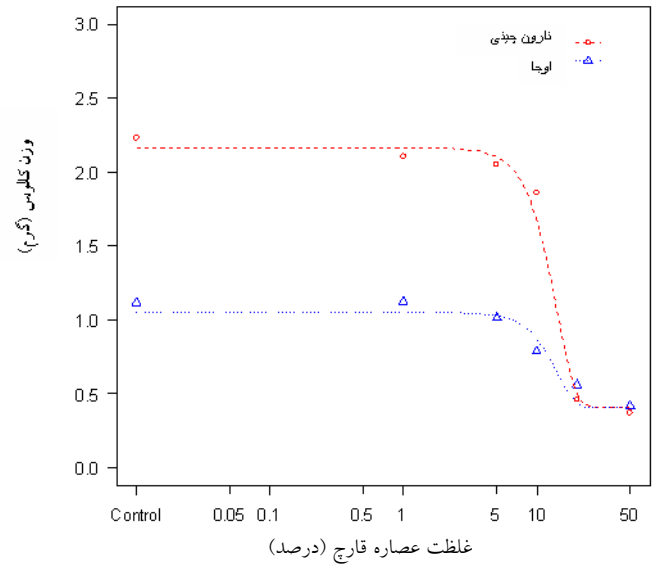
جدول ۱- تأثیر ترکیبات مختلف بر وزن و خصوصیات ظاهری کال‌ها در محیط MS (پس از ۳۵ روز نگـه‌داری در دمای۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با ۳ تکرار).

تیمارها	غلظت	وزن کالوس درمحیط کشتMS (گرم)	رنگ	شکل ظاهری
الف: شیرنارگیل ٪۲۰	۲۰ درصد	۲/۳۷[a]	زرد روشن	محکم و سخت
ب:شیرنارگیل همراه توفوردی (D-۲،٤)	٤cc از محلول پایه ۰/۵ پی پی ام با شیر نارگیل ٪۲۰	۰/۱٦[c]	تیره رنگ	سست
ج:توفوردی (D-۲،٤)	۳cc از محلول پایه ۰/۵ پی پی ام	۰/۱۹[c]	تیره رنگ	سست
د: بنزیل آدنین (BA)	۰/۱ پی پی ام	۰/۹۵[b]	زرد رنگ	نسبتا ترد و شکننده
و: نفتالین استیک اسید (NAA)	٤ cc از محلول پایه ۰/۵ پی پی ام	۱/۳۳[b]	کرم مایل به قهوه ای	سست و آبدار
ه: کینتین (Kin)	۰/۵ پی پی ام	۱/۰۹[b]	تیره رنگ	سست
ز: شاهد	فقط محیط کشت	۱/۰۸[b]	کرم رنگ	سست
LSD (۵ درصد)		۰/۵۸		

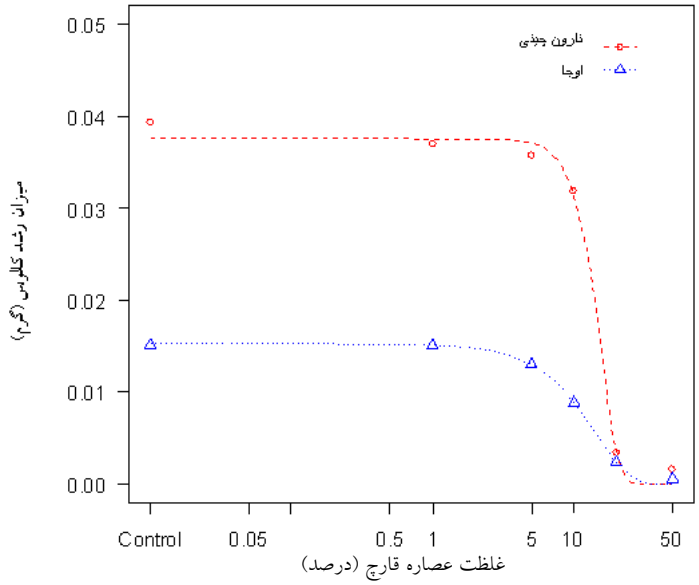
میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نیستند، در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار دارند. MS: محیط موراشیگ و اسکوگ.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره قارچ *Ophiostoma novo-ulmi*، در وزن کالوس دو گونه نارون چینی و اوجا پس از ۷ هفته.



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* در وزن کالوس دو گونه نارون چینی و اوجا پس از ۷ هفته، زمانی که دو شکل همپوشانی شدند.



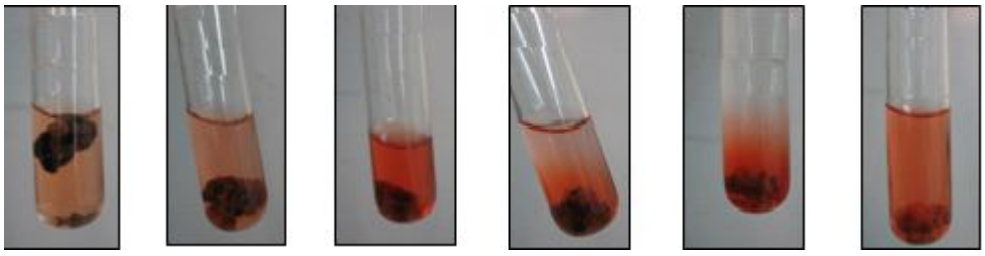
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره، در رشد کالوس دو گونه نارون چینی و اوجا پس از ۷ هفته.

نتایج آزمون ترازولیوم: در نتایج به‌دست آمده از آزمون ترازولیوم، میزان مایع رنگی خارج‌شده از سلول‌های کالوس در تیمارهای مختلف متفاوت بود. شدت رنگ محلول به‌دست آمده از کالوس هر دو گونه نارون چینی و اوجا در غلظت‌های پایین عصاره قرمز پررنگ بود درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر، کالوس رنگ کمتری به خود گرفته و این رنگ از قرمز کم‌رنگ به صورتی و حتی سفید یا بی‌رنگ متمایل شد (شکل‌های ٦ و ٧). میزان زنده‌مانی سلول‌های کالوس با استفاده از فرمول (۲):

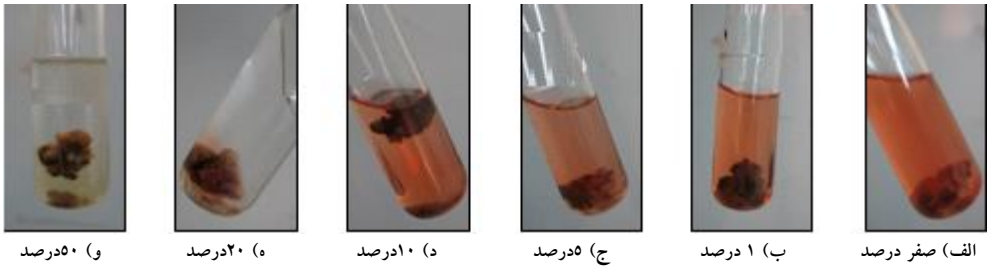
$$\frac{\text{OD تیمار مایه زنی شده}^{1}}{\text{OD شاهد}} \times 100$$

۱- OD: عدد خوانده شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٨٠ نانومتر.

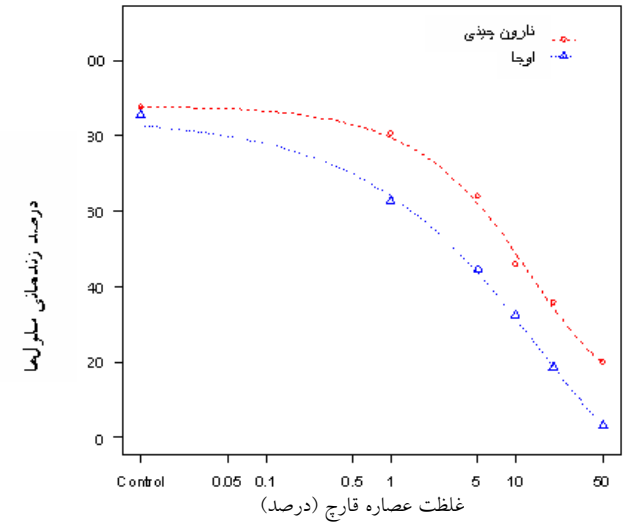
به‌دست آمد (ابراهیم و کوییک، ۲۰۰۱). با توجه به شکل ۸، درصد زنده‌مانی سلول‌های کالوس در هر دو گونه با افزایش غلظت رابطه معکوس دارد. در غلظت‌های بالای ۲۰ و ۵۰ درصد، میزان مرگ و میر در سلول‌ها بیشتر بود. در غلظت‌های پایین، برای مثال ۱۰ درصد میزان زنده‌مانی سلول‌های کالوس نارون چینی و اوجا به‌ترتیب معادل ۵۰ و ۳۵ درصد و در غلظت ۱ درصد به‌ترتیب ۹۰ و ۸۵ درصد است. درصد زنده‌مانی سلول‌های کالوس مایه‌زنی‌شده نارون چینی در غلظت ۵۰ درصد در مقایسه با گونه اوجا، ۲۰ درصد بود (شکل ۸).



شکل ٦- رنگ خارج شده از کالوس نارون چینی پس از قرارگرفتن در الکل اتیلیک ۹٦ درصد. از راست به چپ به ترتیب غلظت‌های: ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ درصد.



شکل ۷- رنگ خارج شده از کالوس اوجا پس از قرارگرفتن در الکل اتیلیک ۹٦ درصد. از راست به چپ به ترتیب غلظت‌های: ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ درصد.



شکل ۸- درصد زنده مانی سلول‌های کالوس نارون چینی و اوجا در غلظت‌های مختلف عصاره اندازه‌گیری شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر.

نتایج کشت مجدد کالوس‌های مایه‌زنی‌شده بر روی محیط MS با رقت $\frac{۱}{۲}$ نشان داد که در غلظت ۱ و ۵ درصد، کالوس نارون چینی قادر به ادامه رشد بود اما در غلظت‌های بالاتر قارچ‌های ساپروفیت مانع رشد کالوس شدند. در گونه اوجا هیچ گونه رشدی از کالوس بر روی محیط کشت MS با رقت $\frac{۱}{۲}$ مشاهده نشد. مایه‌زنی کالوس‌های نارون چینی و اوجا نشان داد که عصاره قارچ *O. novo-ulmi* بر روی میزان زنده‌مانی و رشد سلول‌های کالوس هر دو گونه تاثیر می‌گذارد. عصاره قارچ مذکور، روی رشد کالوس‌ها اثر ممانعت و بازدارندگی داشت و این ممانعت رشدی با افزایش غلظت عصاره بیشتر شد، ولی این اثر بازدارندگی در کالوس‌های اوجا بیشتر از نارون چینی بود. همچنین غلظت ۵۰ درصد عصاره در هر دو گونه، موجب توقف کامل در رشد کالوس‌ها شد.

بحث

کشت بافت گونه‌های درختی اغلب با مشکلاتی همراه است، این امر عمدتاً به دلیل ترشح مواد موسیلاژی، فنلی و یا سایر عوامل و انتخاب جوانه‌های گونه‌های درختی از محیط طبیعی غیرکنترل‌شده

می‌باشد. ترشح مقدار زیادی مواد موسیلاژی بعد از حذف فلس‌ها باعث شد، اثر پذیری مواد ضدعفونی کننده تقلیل یابد و تعداد زیادی از نمونه‌ها در طول آزمایش از بین رفتند که با استفاده از تیمار کلرید جیوه میزان آلودگی کاهش یافت. کشت درون شیشه‌ای گونه‌های چوبی به دلایل مختلف از جمله باززایی نسبتاً ضعیف، سرعت کم تکثیر، نقش خواب در جوانه‌ها، ضدعفونی سخت تر و ترشح مواد فنلی، نسبت به گونه‌های علفی مشکل تر است (پیریک، ۱۹۹۷). از آنجا که محیط پایه MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) در مورد بسیاری از گونه‌های درختی سخت‌چوب توسط پژوهش‌گران زیادی مورد استفاده قرار گرفته و استفاده از آن نیز نتیجه مطلوب داشته است. در این پژوهش نیز جهت کشت، استقرار و کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها از این محیط پایه با افزودن برخی تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. در این پژوهش افزایش وزن کالوس‌ها در محیط پایه MS در حضور شیر نارگیل نسبت به شاهد، اثر مطلوب این ترکیب را تایید می‌کند (جدول ۱) (ممقانی و همکاران، ۲۰۰۷b). علی رغم افزایش معنی دار وزن کالوس‌ها در تیمار حاوی شیر نارگیل، مشاهده شد که حضور توفوردی در تیمار شیر نارگیل تاثیر شیر نارگیل را کاهش می‌دهد. احتمالاً حضور توفوردی با شیر نارگیل یک اثر بازدارنده در میزان رشد کالوس‌ها دارد. نتیجه تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که شیر نارگیل در افزایش وزن کالوس‌ها تاثیر زیادی داشته است. پیجوت و همکاران (۱۹۹۰a) در کال زایی از برگ نارون آمریکایی[1] با استفاده از تیمار شیر نارگیل ۱۰ درصد به نتایج مشابهی دست یافتند. شیر نارگیل مایعی است با pH اسیدی (٦/۲) که محتوی ۳۰ تا ۳۵ درصد روغن است (ویدورانگ و همکاران، ۲۰۰۷). نکته دارای اهمیت در این بررسی، تاثیر مثبت این ترکیب طبیعی در افزایش وزن کالوس و به تعویق انداختن دوره پیری کالوس می‌باشد که می‌تواند به علت خاصیت شبه سیتوکنینی شیر نارگیل باشد، زیرا سیتوکینین‌ها هم در تشکیل کالوس و هم تسریع فرایندهای تقسیم سلولی نقش دارند (آروین، ۲۰۰۲). افزایش غلظت تنظیم کننده‌های رشد تا حد معینی باعث القاء بیشتر کال زایی می‌شود، به گونه ای که می‌توان آن را غلظت بحرانی کال زایی دانست و چنانچه از این حد بالاتر رود، باعث کاهش کال زایی می‌شود (ممقانی و همکاران، ۲۰۰۷b). وال و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که ایجاد کالوس از برگ نارون سیبریایی و اوجا به‌سهولت امکان‌پذیر است. توکسین موجب ظاهر شدن علایم فیزیولوژیک و مرفولوژیک مشابه با علائم بیماری مرگ هلندی نارون می‌شود (تاکایی و هیراتسوکا،

1- *Ulmus americana*

۱۹۸٤). توکسین سراتوالمین از منافذ غشاء سلولی عبور کرده و وارد سلول‌های پارانشیمی بافت چوبی نارون می‌شود. با ورود مولکول‌های سراتوالمین به ناحیه سلول‌های پارانشیمی‌موجود در عناصر آوندی و واکنش آنها به توکسین، افزایش پدیده تنفس حادث می‌شود. همچنین روبرتز (۱۹٦٦) کاهش تعرق را در نارون‌های آلوده به *O. ulmi* گزارش کرد. بنابراین سراتوالمین می‌تواند در کاهش تعرق نقش داشته باشد. کاهش تعرق، افزایش تنفس، تخریب نفوذپذیری غشا و خسارت وارد بر الکترولیت‌ها بیانگر آن است که بین سراتوالمین و بافت‌های نارون در سطح سلولی اثر متقابلی وجود دارد. عوامل زیادی بر توسعه عامل مرگ هلندی نارون در درختان نارون تاثیر دارند. از جمله عوامل شناخته شده در میزبان که در حساسیت درختان نارون به قارچ *O. novo-ulmi* نقش دارند، می‌توان طول آوند چوبی، قطر آوندها و میزان رشد درخت، میزان انسداد آوندی، تولید نواحی لیگنینی شده، تولید تایلوز، تولید مواد شبه فیتوآلکسینی، میزان تعرق، تنفس و فتوسنتز را نام برد (روبرتز، ۱۹۷۲). وال و همکاران (۱۹۹۷) دریافتند که مایه زنی سلول‌های نارون *U. pumila* به وسیله اسپورهای قارچ *O. ulmi* موجب تحریک در فعالیت فنیل آلانین آمینو- لیاز[1] شده است. مایه زنی کشت‌های سوسپانسیون سلولی نارون سیبریایی (مقاوم) و اوجا (حساس) با اسپورهای *O. ulmi* نشان داد که تجمع اسکوپولتین هیدروکسی کومارین در این دو گونه متفاوت است، به طوری که در سوسپانسیون سلولی نارون سیبریایی بیشترین تجمع را یافتند. در آزمایشات دیگر مشاهده شد که اسکوپولتین[2] از جوانه‌زنی اسپورهای *O. ulmi* و رشد مسیلیوم‌های آن جلوگیری کرد (وال و همکاران، ۱۹۹۷). پیجوت و همکاران(a۱۹۹۰) مشاهد کردند که سلول‌های کالوس به دست آمده از برگ نارون آمریکایی تلقیح شده با عصاره *O. ulmi*، تفاوت‌هایی را با توجه به نوع رقم (حساس و مقاوم) در ساختار سلولی نشان می‌دهند. برای هر دو رقم مقاوم و حساس نارون، در غلظت بالای ۲ میکرو مولار از توکسین سراتوالمین، تخریب ۷۵ درصدی سلول‌ها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که میزان پژمردگی برگ‌ها با میزان توکسین سراتوالمین موجود در بافت برگ‌ها مرتبط است. یکی از سیستم‌های دفاع فیزیولوژیکی درختان نارون مقاوم به مرگ هلندی نارون، کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است (کروری و همکاران، ۱۹۹۲). به منظور تعیین زنده‌بودن سلول‌ها در کشت‌های سلولی، روش

1- Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)
2- Scopoletin

رنگ‌آمیزی با تترازولیوم توسط تاویل و مزور (۱۹۷۵) مثبت گزارش شده است. این روش بـر اسـاس زنده یا مرده‌بودن بافت‌ها و میزان تنفس نسبی بافت می‌باشد. منظـور از زنـده بـودن سـلول، اسـتعداد سلول برای انجام تقسیم سلولی می‌باشد. آزمون تترازولیوم کلراید یک روش بیوشیمیایی بـرای انـدازه گیری زنده‌بودن و سلامت سلول‌ها می‌باشد. از مزایای این روش، سریع‌بودن و دقت این روش اسـت که برآورد سریعی از قابلیت زیستی به‌دست می‌آید. اگرچه با استفاده از آزمون تترازولیـوم، همبـستگی مثبتی را بین درصد جوانه‌زنی در بذرها و حتی اسپور قارچ‌ها با درصد قابلیت حیـات آنهـا، مـی‌تـوان یافت (اگراوال و کوپتا، ۱۹۹۱). اما می‌توان همچنان در کشت‌های کوتاه‌مـدت از کـالوس‌هـای نـارون چینی و حتی اوجا در کمتر از طول سه هفته می‌تـوان بـا روش غربـال‌گیـری نـسبت بـه جمـع‌آوری کالوس‌های متحمل و پایدار همان‌طوری‌که در نتایج اشاره گردید، اقدام و پی‌گیری نمود.

منابع

1. Agrawal, V., and Gupta, S.C. 1991. In vitro plantlet development from explants of 25-year-old trees of *Populus*×*euramericana*, a hybrid popolar. Plant Sci. 78: 1: 99- 105.
2. Arvin, M. J. 2002. In vitro tissue culture of trees. Shahid Bahonar University of Kerman. 279p. (In Persian).
3. BenJouria, H., Jouanin, L., Bigot, C. and Dorion, N. 1998. Potentiality of cambium and leaf explants for genetic transformation of elms. Acta Horticulture. Eucarpia 19th International Symposium on Improvement of Ornamental plants. 27-30 juillet 1998 (Angers, France).
4. Corchete, M.P., Diez, J.J. and Valle, T. 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. Plant Cell Reports. 12: 534-536.
5. DeRafael, M. A., Valle, T., Babiano, M.J. and Corchete, P. 2001. Correlation of resistance and H_2O_2 production in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*. Physiol Plant. 111: 512-518.
6. Fink, U.V.M., Sticklen, M.B., Lineberger, D. and Domir, S.C. 1986. In vitro organogenesis Shoot tip, internode, and leaf explants of Ulmus×'Pioneer'. Plant Cell, Tissue. Organ Culture. 7: 237-240.
7. Hammerschlag, F. 1988. Selection of peach cells for insensitivity to culture filtrates of Xanthomonas campestris pv. Pruni and regeneration of resistant plants. Theor. Appl. Genet. 78: 865-869.
8. Ibrahim, A.M.H. and Quick, J.S. 2001. Heritability of heat tolerance wheat. Crop Sci. 40: 1401-1407.

9. Karnosky, D.F. and Mickler, A. 1986. Elms (*Ulmus* spp.).P 326- 340, In: Bajaj YPS (ED) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees. Springer-Verlag, Berlin.
10. Korori, S.A.A., Hinterstoisser, B., Lang, H. and Ebermann, R. 1992. Seasonal alteration of plant peroxidase isoenzymes pattern in *Larix decidua*. Phyton. 32: 307-313.
11. Lester, D.T., and Smalley, E.B. 1972. Response of *Ulmus pumila* and *U. pumila* × *rubra* hybrids to inoculation with *Ceratocystis ulmi*. Pyhtopathol. 62: 848-852.
12. Mamaghani, Gh.M. 2007a. Investigation to determine of disease tolerance to the fungus Dutch elm disease *Ophiostoma novo-ulmi* by tissue culture of Ulmus species. M.Sc. Thesis. Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan University. 127p. (In Persian).
13. Mamaghani, Gh.M., Mashayekhi, K. and Rahnama, K. 2007b. The investigation of the effect of various hormonal compounds and coconut milk on the growth and production of Chinese elm callus (*Ulmus parvifolia* Jacq.). J. Agric Sci. Natural Resou. 14: 155-163. (In Persian).
14. Mamaghani, Gh.M., Haghighi, H. and Rahnama, K. 2009. Evaluation of elm species for determination of resistance to Dutch elm disease by in vitro tissue culture.Proceeding of the 18th Iranian Plant Protection Congress. Hamedan. 156p. (In Persian).
15. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-497.
16. Ostry, M.E. and Ward, K.T. 2003. Field performance of *Populus* expressing somaclonal variation in resistance to *Septoria musiva*. Plant Sci. 163: 1-8.
17. Pelah, D., Kaushik, R.A. Nerd, A., Mizrahi, Y. 2003. Validity in vitro viability tests for predicting response of different vine cacti in the field to high and low temperatures. J. PACD. Pp: 68-71.
18. Pierik, R.L.A. 1997. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Pub. London. 384 p.
19. Pijut, P.M., Dolmir, S.C., Lineberger, R.D. and Schreiber, W.R. 1990a. Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. Plant Sci. 70: 191-196.
20. Pijut, P.M., Lineberger, R.D., Domir, S.C., Ichida, J.M. and Krause, C.R. 1990b. Ultrastructure of cells of *Ulmus americana* culture in vitro and exposed to the culture filtrate of *Ceratocystis ulmi*. Phytopathol. 80: 764-767.
21. Rahnama, K., Asade, Gh., Salahshor, E., Arabnejad, M. and Ebrahimi, E. 2000. Important spread Dutch elm disease and techniques for prevent eradication species elm family in Golestan Park. Meeting potencies Golestan state. Pp: 2-12. Abstract. (In Persian).

22. Rahnama, K., Asade, Gh. and Taheri, A. 2002. Epidemic wilt disease and forest trees dead in new regions of Golestan state and protective of species eradication. Articles abstract second meeting Golestan state research proposals. University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan. Pp: 52-53. (In Persian).
23. Ritz, C., and Streibig, J.C. 2005. Bioassay analysis using R. J. Statistical Software 12. URL http://www. bioassay. dk.
24. Robberts, B.R. 1966. Transpiration of elm seedlings as influenced by inoculation with *Ceratocystis ulmi*. For Sci. 12: 44-47.
25. Robberts, B. R. 1972. Net photosynthesis, growth, and transpiration in American elm seedlings as influenced by Dutch elm disease and plant water stress. Phytopathol. 62: 457-459.
26. Shahpeiri, A., Omidi, M., Ahmadiane tehrani, P., and Davodi, D. 2004. Study of tissue culture and somaclon variance in potato. J. Agric Sci. Iran. 2: 323-335. (In Persian).
27. Szczegola, M.H. 1988. Induction of mansonones by *Ophiostoma ulmi* in callus cell lines of *Ulmus americana* and *Ulmus pumila*. M.Sc. Thesis, Department of Forestry, Univercity of Toronto. Toronto. Canada.
28. Takai, S. and Hiratsuka, Y. 1984. Scanning electron microscope observations of internal symptoms of white elm following *Ceratocystis ulmi* infection and cerato-ulmin treatment. Can. J. Bot. 62: 1365-1371.
29. Tawill, L.E. and Mazur, P. 1975. Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can J. Bot. 53: 1097-1102.
30. Valentine, F., Biker, S., Balanger, R., Manion, P. and Griffin, D. 1988. Screening for resistance to *Hypoxylon mammatum* in *populus tremuloides* callus and micropropagated pla.ntlets. In: MR Ahuja (ed) Somatic Cell Genetics Cell of Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 181P.
31. Valle, T., Lopez, J.L., Hernandez, J.M. and Corchete, P. 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. Plant Sci. 125: 97-101.
32. Viduranga, Y.W., Conrad, O. P. and Phillip, J. B. 2007. Effect of different pre-treatments of fresh coconut kernels on some of the quality attributes of the coconut milk extracted. Food Chem. 101: 771-777.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 19(4), 2012
http://jopp.gau.ac.ir

Application of culture filtrates of *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi* under in vitro condition as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus parvifolia* and *Ulmus campestris*

M. Mamaghani[1], K. Rahnama[2], K. Mashayekhi[3] and H. Haghighi[1]
[1]Former M.Sc. Student of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof. of Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Associate Prof. of Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

Dutch elm disease is the most important disease of elm trees in most planting regions. The use of tissue culture of plant under in vitro condition, to make easy study of interaction elm trees and Dutch elm disease agent and help for control disease via selection, improvement and reproduction resistant genotype. For this purpose during years 2004 until 2006, samples were collected from *Ulmus campestris* and *Ulmus parvifolia* in Golestan and Mazandaran provinces forest. In order to study ability and value of callus growth this two species, after use sterilized treatment, samples cultivated on MS media with different treatments from growth regulator. Growth callus from *U. parvifolia* and *U. campestris* were inoculated with different concentration of culture filtrates of *Ophiostoma novo-ulmi*. Fresh weight callus and vital cells after exposed to different concentration of culture filtrate was measured. Results showed the weight callus on two species was different and growth of callus of *U. parvifolia* (Chinese elm) was more significant (P= 0/05) than *U. campestris*. As thought the rate of weight decrease of callus in *U. parvifolia* and *U. campestris*, at 10% concentration was 13/3 and 28% respectively. Rate of cell vitality at 50% concentration of culture filtrate in *U. campestris* was 2 % but in *U. parvifolia* in the same concentration was 23 %. So it could concluded that the rate of tolerance and viability Chinese elm cells was more after exposed to media culture filtrate. On the basis of this study, *U. parvifolia* (Chinese elm) show most resistant to Dutch elm disease. Therefore, this method can fast of screening with select of tolerant calli.

Keywords: Dutch elm disease; Tissue culture; *Ophiostoma novo-ulmi*

[*]Corresponding author; Email: ghazi_m2004@yahoo.com