نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره سوم، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی تیمارهای سترون‌سازی جهت کشت درون شیشه‌ای دو گونه مختلف درخت توس (*Betula sp*)

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

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه جنگل‌شناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار موسسه تحقیقات پنبه کشور

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۲

چکیده

توس (*Betula sp*) از گونه‌های رو به انقراض ایران می‌باشد و زادآوری طبیعی آن در جنگل‌های شمال کشور بسیار اندک است. مشکلات مربوط به زادآوری و جوانه‌زنی طبیعی بذر آن از یک طرف و آلودگی‌های همراه بذرهای از طرف دیگر اهمیت استفاده از کشت‌های درون شیشه را در جهت حفظ، بقا و اصلاح آن‌ها دو چندان کرده است. به‌این منظور کشت بافت دو گونه از جنس توس از طریق ریزنمونه بذری مدنظر قرار گرفت. بذرهای گونه *B. litwinowii* از منطقه جنگلی سنگده استان مازندران و *B. pendula* از ارتفاعات جنگل سیاه‌مرزکوه استان گلستان به‌طور تصادفی از ۱۰ پایه درختی جمع‌آوری شدند و تحت ۷ تیمار سترون‌سازی مختلف قرار گرفتند. این پژوهش با آزمایش فاکتوریل دو عامله در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار ۱۰ تایی اجرا گردید. تیمارهای سترون‌سازی از نظر آماری در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان دادند. بهترین نتیجه از به‌کارگیری تیمار تلفیقی ٢٤ ساعت قارچ‌کش دیفنوکونازول ۳ درصد همراه با آب گرم ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه و کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد که با اعمال این تیمار، ۱۰۰-۹۵ درصد بذرهای هر دو گونه عاری از هر گونه آلودگی باکتریایی و قارچی بودند.

* مسئول مکاتبه: jamile.nazari85@gmail.com

بذرهای استریل شده در محیط کشت پایه MS و B_5 کشت شدند. در نهایت بذرهای گونه *B. litwinowii* ۱۷/۳ درصد و *B. pendula* نیز ١٤ درصد جوانه‌زنی داشته و ریشه‌دار شدند. از گیاه‌چه‌های حاصل می‌توان جهت ریزازدیادی این گونه‌ها که در مناطق صعب‌العبور پراکنش داشته و جمع‌آوری بذرهای آن‌ها با مشکلاتی مواجه است استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سترون‌سازی، بذرها، *Betula litwinowii*، *Betula pendula*، کشت درون‌شیشه‌ای

مقدمه

توس (*Betula sp*) درختی یک‌پایه و نورپسند از تیره‌ی *Betulaceae* و از گونه‌های چوبی نیمکره‌ی شمالی است. در ایران، فقط سه گونه آن با نام‌های علمی *B. pendula*، *B. pubescens* و *B. litwinowii* در ارتفاعات بالای ۲۰۰۰ متر از سطح دریا در مناطق صعب‌العبور و سنگلاخی پراکنش داشته و جزو ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شوند (کردعلیوند، ۲۰۱۲). بذرهای این گونه به‌راحتی تحت تأثیر عوامل محیطی مخرب قرار گرفته و قادر به رقابت با بذر سایر گونه‌ها جهت جوانه‌زنی در عرصه‌های طبیعی نمی‌باشند. عوامل بیماری‌زایی چون قارچ‌های *Stromatinia betulae woronin*، *Macrosporium commune* Rabenb، *Trichothecium roseum*، *Penicilium* sp و بذرهای توس را سریع آلوده کرده و باعث عدم جوانه‌زنی آن‌ها می‌شوند (ژورالیف و سلیوانووا، ۱۹۷۹). آلودگی بذرهای توس در رویشگاه‌های ایران نیز به‌وسیله قارچ‌های *Fusarium oxysperum*، *Alternaria alternata*، *Trichothecium roseumm*، *Amblyosporium echnolatum*، *Penicillum implicatum* و *Trichodema harzianum* توسط نظری (۲۰۱۳) گزارش شده است. مشکلات مربوط به جوانه‌زنی، رشد و استقرار بذرهای توس در عرصه‌های جنگلی، عدم موفقیت در ازدیاد رویشی این درخت از طریق قلمه‌ها به‌دلیل سخت ریشه‌زا بودن آن‌ها (هاگمن و همکاران، ۲۰۰۷)، همچنین قرار گرفتن در فهرست گیاهان در معرض خطر انقراض (جلیلی و ارزانی، ۱۹۹۹) اهمیت استفاده از روش‌های نوینی مثل کشت بافت جهت کشت، توسعه و حفاظت از این ذخیره ژنتیکی با ارزش بیش از پیش نمایان می‌گردد. برای ازدیاد درون شیشه‌ای بذرهای گونه‌های مختلف توس پیش‌تر از تیمارهای سترون‌سازی مختلفی استفاده شد که می‌توان به تیمار الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و هیدروژن پراکسید ۳ درصد به‌مدت یک دقیقه بر روی ریزنمونه بذری گونه *B. schmidtii* در

محیط کشت MS (نیشیکاوا و اید، ۱۹۹۳)، تیمار کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه روی ریزنمونه‌های بذری گونه‌های *B. pendula* و *B. pubescens* (دود، ۲۰۰٤) که موفق به جوانه‌زنی ۳۰ درصد بذرها شده و تیمار الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و کلریدجیوه ۰/۲ درصد و توئین-۲۰ به‌مدت ۷ دقیقه بر روی ریزنمونه بذری گونه *B. pendula* در محیط کشت‌های MS و WPM (هاگمن و همکاران، ۲۰۰۷) اشاره کرد. این پژوهش برای اولین بار در ایران با هدف تولید گیاه‌چه‌های دو گونه *B. pendula* و *B. pubescens* با تعیین بهترین تیمار سترون‌سازی جهت کاهش و از بین بردن آلودگی در شرایط کشت درون شیشه‌ای صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گونه *B. pendula* از منطقه جنگلی سیاه‌مرزکوه در ٤٦ کیلومتری شهر فاضل‌آباد استان گلستان و بذرهای *B. pubescens* از منطقه جنگلی سنگده واقع در ۱۰۰ کیلومتری ساری استان مازندران تهیه شدند. بذرها در اواخر فصل پاییز از ۱۰ پایه برتر بر اساس شادابی و عدم وجود بیماری‌ها جمع‌آوری شدند. به‌منظور تعیین بهترین تیمار سترون کننده، بذرها ابتدا تحت ۷ تیمار مختلف سترون‌سازی طبق جدول ۱ قرار گرفتند و سپس با ۳ تکرار که هر تکرار شامل ۱۰ بذر در محیط کشت غذایی، عصاره سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) که محیط مناسب برای رشد قارچ‌های بیماری‌زا است، کشت گردید. سپس بهترین تیمار سترون جهت استفاده در مرحله بعدی این پژوهش شامل کشت بذرها در محیط کشت پایه MS و B_5 با ۳ تکرار ۱۰ تایی تعیین شد.

جدول ۱- تیمارهای مختلف سترون‌سازی ریزنمونه بذرهای توس.

کد	تیمارهای سترون‌سازی بذرها
۱	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه
۲	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم۱۰ درصد به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه
۳	قارچ‌کش دیفنوکنازول ۳ درصد به‌مدت ۲۵ دقیقه
٤	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه
۵	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه
٦	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه
۷	قارچ‌کش دیفنوکنازول ۳ درصد به‌مدت ۲٤ ساعت + تیمار حرارتی (آب گرم ۵۵ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۳۰ دقیقه + کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه

این پژوهش به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل با دو عامل گونه گیاهی و تیمار سترون‌ساز در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) متغیرها و با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و SPSS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) صورت گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس به‌دست آمده از اثر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر روی آلودگی بذرهای گونه‌های *B. litwinowii* و *B. pendula* در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج درصد آلودگی بذرها، در بین تیمارهای سترون‌سازی و گونه‌های مختلف توس در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشت، اما اثر متقابل آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس عامل‌های آزمایشی و اثر متقابلشان بر میزان آلودگی بذر در دو گونه توس.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مقدار F
تیمار سترون‌سازی	٦	۹۹**
گونه	۱	۷/۲*
تیمار سترون‌سازی × گونه	٦	۱/۹n.s
خطا	۲۸	
کل	٤۱	
ضریب تغییرات (درصد)		۲۲/٤

n.s: عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد **: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین درصد آلودگی بذرهای دو گونه توس کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای با اعمال تیمارهای سترون‌سازی در جدول ۳ ارایه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، بذرهای دو گونه از نظر درصد آلودگی تفاوت معنی‌داری نشان داد. طوری‌که میزان آلودگی بذرهای *B. pendula* تقریباً ۷ درصد بیشتر از بذرهای مربوط به *B. litwinowii* بوده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر مستقل گونه توس بر درصد آلودگی بذرهای کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد.

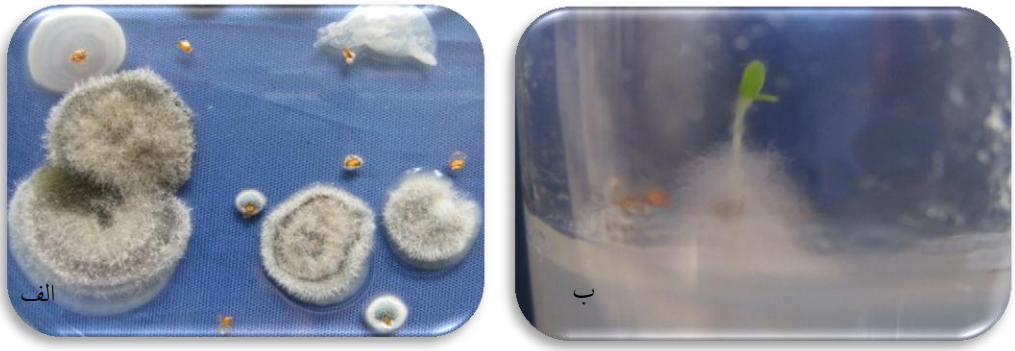
بذرهای گونه	میانگین درصد آلودگی در کلیه تیمارها
B. pendula	٤١/٤[a]
B. litwinowii	٣٤/ ٥[b]

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای سترون‌سازی بذرهای دو گونه بر درصد آلودگی آن‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای در جدول ٤ ارایه شده است. تیمار سترون‌سازی کد ۳ با بیشترین درصد آلودگی در کلاس a و تیمارها ٦ و ۷ نیز با کمترین درصد آلودگی در کلاس d قرار گرفتند. اگر چه تیمارها ٦ و ۷ از نظر درصد آلودگی با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی در تیمار ٦ به‌دلیل استفاده طولانی مدت از کلریدجیوه با وجود کاهش آلودگی، عدم استقرار جوانه‌زنی بذرها را سبب شد. تیمار حرارتی اعمال شده در تیمار ۷، باعث از بین رفتن آلودگی درون بذری شد و به‌عنوان بهترین تیمار سترون‌سازی انتخاب گردید و در مرحله بعدی اجرای این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر تیمارهای سترون‌سازی بر درصد آلودگی بذرهای توس کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد.

شماره تیمار	شرح تیمارها	درصد آلودگی
۱	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه	٦٧/٥[b]
۲	الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد مدت ۲۰ –۳۰ دقیقه	٦٤/٢[b]
۳	قارچ‌کش دیفنوکنازول به‌مدت ۲۵ دقیقه	٨٥/٨[a]
٤	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه	١٩/٢[c]
٥	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه	٢١/٧[c]
٦	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه	٦/٧[d]
۷	قارچ‌کش دیفنوکنازول ۳ درصد به‌مدت ٢٤ ساعت + تیمار حرارتی (آب گرم ٥٥ درجه) به‌مدت ۳۰ دقیقه + کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه	٠/٨[d]

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون LSD نشان نمی‌دهند.



شکل ۱: آلودگی بذرهای *B. litwinowii* با اعمال تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر روی محیط کشت PDA، الف: آلودگی قبل از جوانه‌زنی، ب: آلودگی بعد از جوانه‌زنی در محیط کشت MS

بذرهای هر دو گونه توس که از دو منطقه جنگلی تهیه شدند، با اعمال بیشتر تیمارهای سترون‌سازی قادر به جوانه‌زنی نبودند و تنها با اعمال تیمار حاوی آب گرم (کد ۷) قادر به جوانه‌زنی شدند. بر اساس آن جوانه‌زنی دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* در محیط کشت‌های پایه MS و B_5 با اعمال تیمار فوق که در جدول ۵ ارائه شده است، حاکی از عدم معنی‌داری است.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس عامل‌های آزمایشی و اثر متقابلشان بر میزان جوانه‌زنی بذرهای دو گونه توس.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مقدار F
محیط کشت	۱	۱/۸$^{n.s}$
گونه	۱	۰/۲$^{n.s}$
محیط کشت × گونه	۱	۰/۱۵$^{n.s}$
خطا	۸	
کل	۱۱	
ضریب تغییرات (درصد)		۷٦/٦

n.s: عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

بذرهای سترون شده با تیمار تلفیقی (کد ۷) گیاهچه‌های کامل تولید کردند که حرارت باعث برتری آن شده است طوری‌که جوانه‌زنی بذرهای گونه *B. pendula* در محیط کشت‌های MS و B_5

به‌ترتیب ۱۰/۳ و ۷ درصد و در گونه *B. litwinowii* در محیط کشت‌های MS و B_5 به‌ترتیب ۱۰ و ٤ درصد بوده است. گیاه‌چه‌های هر دو گونه از نظر رشد و نمو به‌طور کامل طبیعی بودند (شکل ۲).

شکل ۲: مرحله رشد بذرهای توس در محیط کشت‌های پایه MS و B_5 با اعمال تیمار حرارتی:
الف: شروع جوانه‌زنی بذرهای، ب: رشد و طویل شدن ساقه‌ها، ج: تولید شاخسار و ریشه‌زایی آن‌ها

بحث

بذرها مهم‌ترین عامل تجدید حیات در گیاهان هستند که حفظ و بقای نسل گونه‌های گیاهی را به عهده دارند (متال و ماتر، ۱۹۹۸). بذرهای درختان جنگلی به طور پی در پی تحت تأثیر اختلالات فیزیکی و فیزیولوژیکی و عوامل زنده خسارت‌زا قرار می‌گیرند که در این میان، قارچ‌ها نسبت به عوامل خسارت‌زای دیگر بیشتر مطرح می‌باشند (فریدی و همکاران، ۲۰۰۹). گونه‌های جنس توس در ایران در رویشگاه‌های نامساعد و صعب‌العبور قرار داشته بنابراین جهت حمایت از این درخت با ارزش رو به انقراض، استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای در ازدیاد و توسعه آن می‌تواند بسیار مؤثر باشد. به خصوص با استفاده از این فنون می‌توان ریزنمونه‌های استریل، از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای حاصل در محیط آزمایشگاهی بدون نیاز به برداشت متناوب از مناطق جنگلی صعب العبور تهیه نمود. با وجود این که سترون‌سازی بذرهای توس در سوابق پژوهش مورد بررسی به الکل و کلریدجیوه خلاصه شده است (نیشیکاوا و اید، ۱۹۹۳؛ دود، ۲۰۰٤ و هاگمن و همکاران، ۲۰۰۷) ولی اعمال این تیمارها برای بذرهای مورد مطالعه کافی نبوده و تیمارهای دیگری با غلظت متفاوت این مواد و مواد استریل کننده جدید مثل کلریدجیوه مورد آزمایش قرار گرفت. از ۷ تیمار اعمال شده کمترین درصد آلودگی در تیمار تلفیقی قرار دادن بذرها به‌مدت ۲٤ ساعت در محلول حاوی قارچ‌کش دیفنوکنازول ۳ درصد و شستشو با آب مقطر گرم با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه و

قرار دادن بذرها در کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. بر اساس نتایج پژوهش نظری (۱۳۹۱) که وجود قارچ‌های بیماری‌زا درون بذری بذرهای دو گونه توس را گزارش نمودند، اعمال تیمار حرارتی سبب از بین بردن این قارچ‌ها شده و علاوه‌بر استریل نمودن سطح بذر، آلودگی‌های درونی آن را نیز از بین برده و جوانه‌زنی بذرها، بدون آلودگی صورت گرفت. در سایر تیمارهای اعمال شده حتی زمانی‌که جوانه‌زنی اولیه بهتری صورت گرفته بود، آلودگی‌ها در مراحل بعدی آغاز و گیاه‌چه‌ها به سرعت از بین رفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که بذرهای جمع‌آوری شده دو گونه توس از رویشگاه‌های مختلف آلوده بوده و به راحتی قادر به جوانه‌زنی حتی در شرایط درون‌شیشه‌ای کنترل شده نیستند. در عرصه‌های طبیعی علاوه‌بر آن، به‌علت وجود رقابت بین گونه‌های جنگلی، شرایط رویشگاه و انتخاب طبیعی زادآوری طبیعی آن‌ها با مشکلات عدیده‌ای مواجه بوده و بحران انقراض آن بیش از پیش می‌شود؛ بنابراین توصیه می‌گردد پژوهش‌های تکمیلی در جهت ریزازدیادی این گونه‌ها از طریق کشت بافت صورت گیرد.

منابع

1.Dowd, N. 2004. The Improvement of Irish Birch. First published in 2004 by COFORD, National Council for Forest Research and Development, Belfield, Dublin 4, Ireland. 65p.

2.Faridi, F., Kavosi, M.R., Rahnama K. and. Nasrolahnejad, S. 2009. Isolation and Identification of Fungi Associated with Chestnut-Leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) Seed in Shast-Kalate Forest of Gorgan. J. Wood and Forest Science and Technology. 16: 2, 67-82

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

4.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.

5.Kordalivand, A. 2012. Genetic diversity of Birch based on morphology of leaf and fruit. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements. For the degree of M.Sc. in. Silviculture and Forest Ecology. 137p.

6.Mittal, R.K., and Mathur, S.B. 1998. Seed Pathology. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, and Danish Government Institute of Seed Pathology, Denmark. Pp: 177-190.

7.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.
8.Nishikawa, H. and Ide, Y. 1993. *In vitro* poropagation of *Betula schmidtii* from germinated seedlings. Full Tukyo Univ. 89: 163-169.
9.Zhuralf, A., Selivanova, T. 1979. Fungal disease ldentify trees and shrubs. Forest Publications. 248p.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 20 (3), 2013
http://jopp.gau.ac.ir

Optimization of surface sterilization treatments in two Birch (*Betula sp.*) species

***J. Nazari[1], V. Payam noor[2], M. Alizadeh[3] and K. Ghasemi Bezdi[4]**
[1]M.Sc. Student, Forestry faculty of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof. Dept. of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof. Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Assistant Prof. Cotton Research Institute of Iran, Gorgan
Received: 04/07/2013 ; Accepted: 06/23/2013

Abstract

Birch (*Betula sp.*) is considered as extinction species and its natural regeneration in Iranian forests is very slow. Difficulties in regeneration as well as natural seed germination of birch tree besides high levels of seed contaminations have justified the application *in vitro* culture with respect to its conservation and genetic improvement. Hence, the *in vitro* culture initiation using seed explants of two birch species was attempted. The seeds of *B. pendula* (collected from Sangdeh altitudes, Mazandaran) and *B. litwinowii* (from Siamarzkooh forests, Golestan region) were randomly harvested from the ten adult trees and then subjected to 7 surface sterilization treatments in 3 replications. The experiment was undertaken as completely randomized design in factorial arrangement (two factors) and 15 replications per each treatment. Application of Difnoconazole fungicide (3% for 24 h) followed by warm water (55°C in 30 min) and $HgCl_2$ (0.1% for 10 min) were recognized as the best treatment for seed sterilization as well as germination. With this treatment, 95-100% seeds were found to be free from bacterial and fungal contamination. Consequently, seeds of two species were cultured on MS and B5 media. The germination percentage for *B. litwinowii* and *B. pendula* were recorded as 17.3% and 14%, respectively. In conclusion, these *in vitro* raised plantlets may be used as a source explants for *in vitro* culture initiation of birch species, whose seed collection is so difficult in such impassable sites.

Keywords: Sterilization, Seed, *Betula litwinowii*, *Betula pendula*, *in vitro* Culture

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