" نهال و بذر"
جلد ۲٤ ، شماره ٤، سال ۱۳۸۷

اثر منابع مختلف نیتروژنی بر خصوصیات رشدی شاخساره های درون شیشه یک ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.)

Effects of Different Sources of Nitrogen on *In vitro* Growth Characteristics of a Selected Genotype of Wild Cherry (*Prunus avium* L.)

حسن حاج‌نجاری[۱]، طاهره حسنلو[۲]، امیر هوشمند اصغری[۳] و معصومه ایزدپناه[۴]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۲- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تهران
۴- مربی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸٦/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۹/۷

چکیده

حاج نجاری، ح.، حسنلو، ط.، اصغری، ا. ه.، و ایزدپناه، م. ۱۳۸۷. اثر منابع مختلف نیتروژنی بر خصوصیات رشدی شاخساره های درون شیشه یک ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.). **نهال و بذر ۲٤**: ۷۶۲-۷۴۹.

این پژوهش به منظور بررسی روند جذب انتخابی فرم‌های مختلف نیتروژن در محیط کشت موراشیج و اسکوگ (MS) بر شاخساره‌های درون شیشه حاصل از ریزقلمه‌های جمع‌آوری شده از یک ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.) در جنگل‌های شهرستان نور انجام شد. بهینه‌سازی محیط پرآوری با مطالعه تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر افزایش عملکرد تولید نهال و کیفیت شاخساره‌های ریزازدیادی از طریق بررسی صفات رشدی انجام شد. به منظور تولید انبوه گیاهان هم‌گروه، صفات رشدی مختلف مانند ارتفاع شاخساره، درصد برگ غیر فعال، تعداد برگ در شاخساره، وزن خشک و ضریب ازدیاد در سه مقطع زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤۵ روز پس از کشت مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور بررسی تاثیر نیتروژن بر فعالیت‌های بیولوژیک مانند میزان جذب (وزن خشک)، ضریب ازدیاد از طریق بررسی تولید جست‌های جدید و سایر صفات رشدی مانند ارتفاع شاخساره‌ها از منابع آمونیم و نیترات شامل NH_4NO_3، KNO_3 و $KNO_3+NH_4NO_3$ با غلظت‌های متفاوت به عنوان منبع تامین‌کننده نیتروژن در محیط کشت موراشیج و اسکوگ استفاده شد. اثر هر یک از منابع نیتروژنی در شش غلظت به صورت مستقل بر صفات رشد مطالعه شد. نتایج مقایسه تیمارهای نیتروژنی نشان داد که کاربرد فرم ترکیبی نیتروژنی ($KNO_3+ NH_4NO_3$) به مدت ۳۰ روز در مقایسه با سایر منابع نیتروژنی اثر بهتری بر روند رشد شاخساره‌های ژنوتیپ انتخابی داشت. دامنه غلظتی مناسب برای این منبع، غلظت‌های ۰/۸ تا ۱ برابر نیتروژن در مقایسه با محیط MS بود. به این ترتیب دوره کشت به حداقل لازم کاهش یافت و مانع مصرف لوکس عناصر از سوی گیاهان درون شیشه شد.

واژه‌های کلیدی: گیلاس وحشی، ریزازدیادی، منابع نیتروژن، تولید انبوه، صفات رشدی، ضریب ازدیاد.

نویسنده مسئول: hassanhajnajari@yahoo.com

مقدمه

گونه آلوکک یا گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.) متعلق به تیره گل سرخیان (Rosaceae) و بومی اروپاست (Ivanika, 1992). این گیاه به صورت خودرو در اغلب جنگل‌های شمال ایران از آستارا، طوالش و گیلان تا مازندران و گرگان انتشار دارد و دارای نام‌های محلی متعدد از جمله گیلاس، آلوکک، هلی کک و هلی کلان است (Sabeti, 1993). جوانه‌زنی بذر گیلاس به راحتی ممکن نیست و نیاز به زمان پس‌رسی بلندمدت دارد. ارقام اهلی شده و تجارتی گیلاس در نهالستان‌ها غالباً از طریق پیوند بر پایه‌های رویشی و یا بذری تکثیر می‌شوند. قلمه‌های ارقام مختلف گیلاس معمولاً به دلیل سخت ریشه‌زایی برای تکثیر استفاده نمی‌شوند در حالی که قابلیت تکثیر این پایه به روش کشت بافت بسیار بالا است (Ivanika, 1992). شاخساره‌های درون شیشه در مراحل مختلف رشد و نمو خود جهت فعالیت‌های بیولوژیک به مقادیر متفاوتی از عناصر پرمصرف و کم مصرف نیاز دارند. در یک بررسی، به منظور اثر اجزای غذایی آلی و معدنی سازنده محیط کشت سیب (*Malus domestica* Borkh.) بر صفات رشدی و ضریب ازدیاد شاخساره‌های استارک اسپور «Starkspur» و پایه رویشی ام-۲۶ «M-26» در دو گروه سنی، اجزای محیط کشت به سه گروه مختلف عناصر پرمصرف و کم مصرف، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و هورمون‌ها و نیز در سه گروه تلفیقی از گروه‌های غذایی فوق در محیط دولایه (Bilayer) شامل محیط کامل آگاریزه و محیط مایع لوییزا (Luisa) تفکیک و گروه‌بندی شدند. نتایج نشان داد که شاخساره‌های مسن درون شیشه«M-26»

به ترتیب در محیط تلفیقی ویتامین‌ها و هورمون‌ها از بالاترین ضریب ازدیاد معادل ۱۱/۳ برخوردار بودند، اما «استارک اسپور» در هیچ یک از تیمارهای غذایی دولایه از نظر ضریب ازدیاد نسبت به شاهد (محیط آگاریزه) برتری نشان نداد (Hajnajari, 1991). در شرایط دسترسی آسان و فقدان محدودیت یک عنصر غذایی خاص، غلظت آن ماده یا مواد معدنی عامل محدودکننده رشد نخواهد بود، ولی در صورت کمبود، مشکلات رشد به صورت‌های مختلف بروز می‌کند. در شرایط کمبود نیتروژن، جذب پتاسیم در گیاهان چچم(*Lolium perenne* L.) و تربچه (*Raphanus sativa* L.) تا ۲۰ برابر افزایش می‌یابد (Asghari, 1997). علی‌رغم انتخاب بهترین محیط کشت در پایان هر مرحله از فرایند ریزازدیادی مقادیر قابل توجهی محیط کشت، که قسمت اعظم آن را عناصر معدنی تشکیل می‌دهند بلا استفاده مانده و دور ریخته می‌شود. فرم نیتروژن جذب شده اصولاً به وسیله فراوانی نیتروژن در محیط و قابلیت دسترسی به آن تعیین می‌شود و NO_3^- و NH_4^+ فرم‌های نیتروژنی مهم برای تغذیه گیاهی هستند. به نظر می‌رسد بعضی گونه‌ها به طور ژنتیکی فرم خاصی از نیتروژن را ترجیح می‌دهند. به عنوان مثال گیاه

صنوبر سفید (*Populus alba* L.) جذب NH_4^+ را بر جذب NO_3^- ترجیح می‌دهد. نتایج پژوهش Peuke and Tischner (1990) و Wiren *et al.* (1997) بر گونه صنوبر کالیفرنیایی (*Populus trichocarpa* Hook.) نشان داد که این گیاه به NH_4^+ حساس است و گیاهان در محیط بدون NH_4^+ یا در غلظت‌های پایین NH_4^+ بهتر رشد می‌کنند. کرکبی و منگل (Kirkby and Mengel, 1967) نیز تاثیر منابع مختلف نیترات، اوره و آمونیم بر تعادل یونی بافت‌های مختلف در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum*) را اندازه‌گیری و اعلام کردند که گیاهان تحت تاثیر نیترات در مقایسه با بافت‌های تحت تاثیر آمونیم غلظت‌های کاتیونی بالاتری دارند. بر اساس مشاهدات کیانی و همکاران (Kayani *et al.*, 1990) بافت‌های تحت تیمار اوره حد واسط این دو تیمار بودند. Taylor and Bloom (1998) روند جذب انتخابی از سوی ذرت را در محیط کنترل شده بررسی و گزارش کردند وقتی NO_3^- و NH_4^+ تامین شوند جذب یون‌های نیترات با مشکل بیشتر صورت گرفت و در صورت وجود فقط یک فرم نیتروژنی معین در محیط، NO_3^- یا NH_4^+، میزان جذب مشابه بود، ولی وقتی هر دو فرم نیتروژن به صورت ترکیبی وجود داشت میزان جذب یون‌های آمونیوم (NH_4^+) به دوبرابر فرم نیتراتی (NO_3^-) افزایش یافت (Taylor and Bloom, 1998). محققین دیگر نیز اثر pH محیط کشت حاوی NH_4-N بر جذب پتاسیم، کلسیم و یون‌های دیگر را در چغندر قند بررسی کردند. مقدار پتاسیم و کلسیم با کاهش pH که در اثر جذب NH_4^+ ایجاد شده بود کاهش یافت و برای گیاهانی که در محیط دارای NO_3^--N زندگی می‌کردند در pH یکسان، میزان جذب کلسیم، منیزیم و پتاسیم بالاتر بود. با توجه به اثر pH و احتیاج گیاهان به نگهداری خنثی بودن بار الکتریکی در طی جذب فرم‌های کاتیونی و آنیونی نیتروژن، شرایط کاربرد نیترات و آمونیم برای گیاهان اهمیت به سزایی می‌یابد (Ogura-Tsujita and Okubo, 2006؛ Taylor and Bloom, 1998). نتایج تحقیقات فوق و سایرین در خصوص نقش اتیلن در ریزازدیادی این گونه از طریق ریزوم نشان داد که در حضور بازدارنده‌های اتیلن و با کاهش نیترات آمونیم و نیترات پتاسیم به میزان ۲۵ تا ۵۰ درصد نسبت به محیط شاهد در صد شاخه‌زایی بسیار افزایش یافت (Shimasaki, 1992) . در پژوهش حاضر ضمن تعیین فرم و غلظت بهینه عناصر نیتروژنی به بررسی اثر ناشی از تغییرات کمی و کیفی آن‌ها بر شاخساره‌های در دست تکثیر پرداخته شد تا ضمن کاهش هزینه تولید نهال، تغییرات صفات رشدی، ضریب ازدیاد و دلایل فیزیولوژیک آن‌ها نیز مشخص شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در بهمن ماه ۱۳۷۵ از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های نورسته حداکثر یک ساله از درخت انتخابی گیلاس وحشی، حدوداً

۳۰ ساله، در ایستگاه تحقیقاتی جنگل نور انجام شد. به منظور حفظ رطوبت درون بافتی، نمونه‌ها داخل کیسه نایلونی و فلاکس سرد به آزمایشگاه منتقل شدند. سترون کردن نمونه‌ها پس از شستشوی تحت فشار آب جاری در یک مرحله با محلول ۱٪ قارچ‌کش بنومیل و چند قطره صابون مایع به مدت ۲۰ دقیقه و در مرحله بعد در آب مقطر حاوی اسید اسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر اقدام به غوطه‌ور کردن جوانه‌ها به ترتیب در الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و آبشویی، هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه و سه مرتبه شستشو با آب مقطر و در نهایت محلول ۰/۵٪ کلرورمرکوریک و سه بار آبکشی با آب مقطر سترون، زیر لامینار فلو در محیط مورد نظر کشت شدند (Asghari, 1997). برای استقرار ریزنمونه‌ها شامل جوانه‌های انتهایی و جانبی از محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کامل با غلظت نیتروژن نصف و سوکرز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر و ترکیب هورمونی IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، BA(۱ میلی‌گرم در لیتر)، Kin (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، Zip (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و اسید آمینه‌های آرژینین، آسپاراژین و گلوتامین با غلظت‌های ۵ میلی گرم در لیتر استفاده شد. ریز قلمه‌های استقرار یافته حامل ۱ تا ۳ جوانه با برگ‌های اولیه باز شده جهت ازدیاد به محیط کشت MS حاوی IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. به منظور سرعت بخشیدن به رشد طولی نمونه‌ها از محیط کشت MS با غلظت نیتروژن نصف (به عنوان شاهد) و ترکیب هورمونی IBA، BA و GA3 به ترتیب با غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد و نمونه‌ها سه بار به فاصله یک ماه در این محیط بازکشت شدند (Izadpanah, 2002). در این تحقیق شاخساره‌های انتخابی به محیط‌های حاوی تیمارهای موردنظر به اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۵ درجه سانتی‌گراد شب و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تمامی داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. مدت دوره کشت نمونه‌ها ۴۵ روز و زمان مشاهدات ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کشت بود. صفات ریخت‌شناسی مورد بررسی شامل ارتفاع شاخساره، تعداد کل برگ در شاخساره، تعداد برگ زرد در شاخساره، ضریب ازدیاد و نیز میزان جذب از طریق اندازه‌گیری وزن خشک بود. ضریب ازدیاد با میانگین تعداد جوانه‌های جانبی جدید نسبت به تعداد جوانه اولیه کشت شده در محیط محاسبه شد (ضریب ازدیاد= میانگین تعداد جوانه‌های جانبی جدید/ تعداد جوانه اولیه کشت شده). معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارها در طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت و در آزمایش‌هایی که بیش از دو تیمار در یک

آزمایش منظور شده بود از آزمون فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی استفاده شد.

نتایج و بحث

غلظت‌های منابع تامین‌کننده نیتروژن در محیط‌های کشت مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه واریانس واکنش شاخساره‌های درون شیشه ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی به تیمارهای غلظتی نیتروژن نسبت به شاهد نشان داد که میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره، ضریب ازدیاد و میانگین وزن خشک در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲). گروه‌بندی میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده بر اساس داده‌های حاصل از به کارگیری غلظت‌های مختلف در هر فرم نیتروژنی انجام شد (جدول‌های ۳ و ۴). بررسی‌ها و مقایسه‌های صفات مرفولوژیک و فیزیولوژیک اثر ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف فرم نیتروژنی (NH_4NO_3) نشان داد که بین تیمارها از نظر ضریب ازدیاد، ارتفاع بلندترین شاخساره و وزن خشک در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس ازکشت تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). بالاترین میزان ضریب ازدیاد (۱/۹۰)، ۱۵ روز پس از کشت با کاربرد غلظت‌های مختلف فرم نیتروژنی NH_4NO_3 در نمونه‌هایی مشاهده شد که دارای غلظت ۰/۲ MS بودند که نسبت به شاهد (۱/۲۳) بالاتر بود. نمونه‌های کشت شده در محیط ۰/۴MS ، ۰/۶MS و ۰/۸MS در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۳). بررسی‌ها نشان داد که با گذشت ۳۰ روز پس از کشت بیشترین ضریب ازدیاد در تیمارهای ۰/۸MS و ۱MS از فرم آمونیومی ایجاد شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها (۰/۴MS و ۰/۶MS) و شاهد نداشت (جدول ۳). بالاترین ضریب ازدیاد (۲/۸۰) در محیط دارای این فرم نیتروژن، ۴۵ روز پس از کشت، در نمونه‌های دارای نیتروژن برابر با غلظت آن در محیط MS ۱ بود که نسبت به شاهد (۲/۵۰) بالاتر بود و پایین‌ترین ضریب ازدیاد در نمونه‌های کشت شده در محیط‌های حاوی ۰/۲MS و ۱/۲MS مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین میزان رشد (ارتفاع بلندترین شاخساره) ۱۵ روز بعد از کشت در نمونه‌های کشت شده در محیط شاهد وجود داشت در حالیکه ۳۰ و ۴۵ روز بعد از کشت بلندترین ارتفاع شاخساره در نمونه‌های کشت شده در محیط‌های حاوی ۰/۸MS و ۱MS مشاهده شد که نسبت به شاهد بالاتر بود(جدول۳). بالاترین مقدار وزن خشک، ۱۵ روز بعد از کشت، در نمونه‌های دارای ۱/۲MS، ۱MS، ۰/۸MS و ۰/۶MS نیتروژن مشاهده شد. پایین‌ترین وزن خشک در نمونه‌های کشت شده در محیط‌های شاهد بود (جدول۳). بیشترین مقدار وزن خشک، ۳۰ روز پس از کشت در نمونه‌های کشت شده در محیط‌های ۰/۶MS پدید آمد در حالی که ۴۵ روز پس از کشت بالاترین سطح جذب در نمونه‌های کشت شده در غلظت‌های ۰/۶MS و ۱MS مشاهده شد که نسبت به شاهد بالاتر بودند (جدول۳). مشاهدات نشان داد که کاربرد NH_4NO_3 از نظر ارتفاع بلندترین شاخساره در غلظت‌های بین MS ۰/۸ تا

جدول۱- غلظت‌های مختلف منابع تامین‌کننده نیتروژن در محیط‌های کنترل و تیمارشده نسبت به محیط شاهد در ریزازدیادی ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی

Table 1. Different concentrations of N sources in the treated media compared to control MS medium in micropropagation of the selected genotype of wild cherry

تیمار Treatments	منبع تامین کننده و غلظت نیتروژن (میلی گرم در لیتر) نسبت به محیط MS Source and concentrations of N (mg l^{-1}) compared with MS medium		
	KNO_3	NH_4NO_3	NH_4NO_3+KNO_3
1	1.2 MS	1.2 MS	1.2 MS
2	1.0 MS	1.0 MS	1.0 MS
3	0.8 MS	0.8 MS	0.8 MS
4	0.6 MS	0.6 MS	O.6 MS
5	0.4 MS	0.4 MS	0.4 MS
6	0.2 MS	0.2 MS	0.2 MS
7 (Control)	0.5 MS	0.5 MS	0.5 MS

جدول۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) پاسخ شاخساره های درون شیشه ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی به تیمارهای غلظتی نیتروژن

Table 2. Variance analysis (mean squares) of the response of *In vitro* shoots of the selected cherry genotype to different concentrations of nitrogen

صفات رشدی Growth characteristics		روز بعد از کشت Days after culture		
		15	30	45
Mean height of longest shoot	میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره	0.0667**	0.232**	0.271**
Coefficient of multiplication	ضریب ازدیاد	0.0440**	0.433**	0.739**
Dry weight mean	میانگین وزن خشک	0.0002**	0.001**	0.004**

**: Significant at 1% probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

۱MS، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کشت، نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری ایجاد کرد، ضمن این که ضریب ازدیاد نیز در زمان‌ها و غلظت‌های فوق از NH_4NO_3، و نیز در غلظت۱MS، تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (جدول۳). استفاده از غلظت‌های نیتروژن در فرم KNO_3، ۱۵ روز بعد از کشت نشان داد که میزان بیوماس گیاهی در تیمارهای غلظتی مختلف از این فرم نیتروژن نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین وزن خشک مربوط در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۸MS وجود داشت که بیش از دو برابر نمونه‌های شاهد بود وکمترین مقدار وزن خشک در تیمار شاهد بود (جدول۴). نتایج بررسی ارتفاع شاخساره، ۱۵ روز پس از کشت در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتروژن فرم نیتراتی (KNO_3) نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها وجود داشت. بیشترین ارتفاع شاخساره در گروه شاهد و سپس در نمونه‌های تیمار شده با نیتروژن به مقدار ۰/۸MS مشاهده شد. از نظر ضریب ازدیاد هیچ تفاوت معنی‌داری در ۱۵ روز اول بین نمونه‌ها مشاهده نشد (جدول۴). نتایج آماری نشان داد که تفاوت

جدول۳- میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره، ضریب ازدیاد و وزن خشک در تیمارهای غلظتی NH_4NO_3 در زمان های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کشت

Table 3. Mean of longest shoot height, coefficient of multiplication and dry weight in different concentrations of NH_4NO_3 15, 30 and 45 days after culture of *Prunus avium* in MS media

صفات Characteristics	روز بعد از کشت Days after culture	غلظت نیتروژن (NH_4NO_3) نسبت به محیط MS Different concentrations of NH_4NO_3 compared with MS medium						
		1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	Control
ارتفاع بلندترین شاخساره Longest shoot height (cm)	15	1.41ab	1.41ab	1.31ab	1.31ab	1.06c	1.16bc	1.50a
	30	2.27b	2.76a	2.62a	2.30b	2.13bc	2.12bc	2.10c
	45	2.46b	3.12a	3.05a	2.56b	2.44b	2.19c	2.33c
ضریب ازدیاد Coefficient of multiplication	15	1.20c	1.20c	1.29b	1.26b	1.26b	1.90a	1.23cb
	30	1.85b	2.40a	2.55a	2.10ab	2.00ab	1.85b	2.00ab
	45	1.73f	2.80a	2.15d	2.55b	2.18d	1.95e	2.50c
وزن خشک Dry weight (mg)	15	0.04a	0.04a	0.04ab	0.04ab	0.04ab	0.04c	0.02d
	30	0.10d	0.11b	0.10c	0.11a	0.08e	0.07e	0.10d
	45	0.11d	0.13a	0.13b	0.14a	0.12c	0.09e	0.12bc

در هر ردیف حروف مشابه، عدم تفاوت معنی دار تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن نشان می دهند.

Means followed by similar letters in each row are not significantly different at 5% level according to Duncan's test.

جدول ۴- میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره، ضریب ازدیاد و وزن خشک در تیمارهای غلظتی KNO_3 در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کشت

Table 4. Mean of longest shoot height, coefficient of multiplication and dry weight in different concentrations of KNO_3 15, 30 and 45 days after culture of *Prunus avium* in MS media

صفات Characteristics	روز بعد از کشت Days after culture	غلظت نیتروژن (KNO_3) نسبت به محیط MS Different concentrations of KNO_3 compared with MS medium						
		1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	Control
ارتفاع بلندترین شاخساره Longest shoot height (cm)	15	1.09f	1.13e	1.31b	1.29c	1.25cd	1.25cd	1.50a
	30	1.58bc	1.58cd	1.51e	1.43f	1.62b	1.55d	2.10a
	45	1.25d	1.50c	1.79b	1.59c	1.84b	1.61c	2.33a
ضریب ازدیاد Coefficient of multiplication	15	1.20ba	1.23a	1.26a	1.26a	1.20a	1.23a	1.23a
	30	1.50c	1.85a	1.80a	1.70bc	1.55c	1.70ac	2.00a
	45	1.73ef	2.10d	2.03c	1.80f	1.73e	2.10b	2.45a
وزن خشک Dry weight (mg)	15	0.03c	0.03d	0.04a	0.03b	0.02e	0.02de	0.01f
	30	0.09e	0.12b	0.11c	0.13a	0.10d	0.07f	0.10d
	45	0.10c	0.13b	0.12b	0.16a	0.11bc	0.11b	0.12b

در هر ردیف حروف مشابه، عدم تفاوت معنی دار تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن نشان می دهند.

Means followed by similar letters in each row are not significantly different at 5% level according to Duncan's test.

معنی‌دار بین نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتروژن با منبع نیتراتی KNO_3، ۳۰ روز پس از کشت، از نظر ضریب ازدیاد، ارتفاع بلندترین شاخساره و وزن خشک وجود داشت به طوری که بالاترین ضریب ازدیاد در نمونه‌های مربوط به تیمارهای ۱MS و ۰/۸MS بود ولی تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشت ولی نمونه‌های شاهد دارای ارتفاع شاخساره بلندتری بودند (جدول ۴). استفاده از غلظت‌های مختلف نیتروژن در فرم KNO_3، ۴۵ روز پس از کشت نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر ارتفاع بلندترین شاخساره بین تیمارها وجود داشت. بالاترین ارتفاع شاخساره مربوط به نمونه‌های شاهد (۲/۳۳) بود. بالاترین ضریب ازدیاد در منبع نیتروژنی KNO_3، مربوط به نمونه‌های شاهد بود و پس از آن نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۲MS و ۰/۸MS بیشترین ضریب ازدیاد را داشتند. بررسی نتایج نشان داد که طولانی شدن زمان کشت از ۱۵ به ۳۰ و ۴۵ روز در محیط دارای فرم نیتروژنی KNO_3، اثر مثبتی بر افزایش ضریب ازدیاد داشت (جدول۴).

استفاده از غلظت‌های مختلف در فرم ترکیبی نیتروژن (NH_4NO_3+KNO_3) در ۱۵ روز اول دوره کشت هیچ گونه اثر معنی‌داری بر ضریب ازدیاد و ارتفاع شاخساره‌ها نداشت (جدول ۵) ولی تیمار غلظتی ۱ MS اثر بیشتری را بر وزن خشک و تعداد برگ در شاخساره‌های نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد (جدول۵). نتایج نشان داد که استفاده از تیمارهای غلظتی فرم ترکیبی نیتروژن (نیتراتی و آمونیومی)، ۳۰ روز پس از کشت دارای اختلاف معنی‌دار از نظر میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره‌ها بودند. به طوری که غلظت‌های ۰/۲MS و ۰/۴MS به ترتیب با ۲/۸ و ۲/۴ سانتی‌متر نسبت به شاهد با متوسط ارتفاع ۲/۱ سانتی‌متر برتری نشان دادند (جدول ۶). بررسی‌های مربوط به اثر فرم ترکیبی نیتروژن بر ضریب ازدیاد، میانگین تعداد برگ و وزن خشک نیز معنی‌دار بود (جدول ۶). مقایسه وزن خشک شاخساره‌های برداشت شده ۳۰ روز پس از کشت و مقایسه آن با مرحله قبلی، روند رو به رشد تولید بیوماس را در تمامی تیمارها نشان داد. نتایج آماری به کارگیری غلظت‌های مختلف از مخلوط دو منبع نیتروژن ثابت کرد که شاخساره‌های قرار گرفته در غلظت‌های پایین نیتروژن از رشد طولی بهتری در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد برخوردارند و مقایسه وزن خشک نیز روند رو به رشد تولید بیوماس گیاهی را تا ۴۵ روز از زمان کشت نشان داد (جدول‌های ۶ و۷). این افزایش در مورد صفت تولید بیوماس در غلظت‌های ۰/۸MS و ۱MS نیتروژن مشهودتر بوده و تیمار غلظتی ۱ MS بهترین نتیجه را به خود اختصاص داد.

در مورد به کارگیری سطوح غلظتی MS، کاربرد غلظت‌های کم‌تر از ۰/۶ NH_4NO_3 و غلظت‌های کمتر از ۰/۴ در مورد فرم KNO_3 ودرنهایت در مورد فرم ترکیبی دو منبع، کاربرد غلظت ۰/۲ عوارض شدیدتری از کمبود نیتروژن را نشان دادند. در مجموع، استفاده از فرم ترکیبی

جدول ۵- پاسخ شاخساره های درون شیشه ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی به تیمارهای غلظتی نیتروژن به فرم ترکیبی نیتروژن (NH_4NO_3+KNO_3)، ۱۵ روز پس از کشت

Table 5. The response of *in vitro* shoots of the selected cherry genotype to the concentration treatments in combined form of nitrogen (KNO_3+NH_4NO_3) 15 days after culture

	Growth characteristics صفات رشدی				
غلظت نیتروژن نسبت به MS Nitrogen concentration compared to MS (mg l^{-1})	وزن خشک Dry weight(mg)	میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره Mean height of longest shoot (cm)	ضریب ازدیاد Coefficient of multiplication	میانگین تعداد برگ در شاخساره Mean leaf number	درصد برگ های از بین رفته در شاخساره Dried leaf number (%)
1.2 MS	0.03 ab	1.34 a	1.23 a	5.08 ab	23.75 ab
1.0 MS	0.04 a	1.56 a	1.23 a	5.43 a	15.60 b
0.8 MS	0.03 ab	1.41 a	1.20 a	4.28 c	24.46 ab
0.6 MS	0.03 ab	1.50 a	1.23 a	4.25 cd	24.08 ab
0.4 MS	0.03 ab	1.63 a	1.29 a	4.18 d	23.36 ab
0.2 MS	0.03 ab	1.53 a	1.20 a	3.30 e	38.74 a
Control	0.02 c	1.50 a	1.23 a	4.28 c	15.25 b

در هر ستون حروف مشابه، عدم تفاوت معنی دار تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن نشان می دهند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at 5% level according to Duncan's test.

جدول ۶- پاسخ شاخساره های درون شیشه ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی به تیمارهای غلظتی نیتروژن به فرم ترکیبی نیتروژنی (NH4NO3+KNO3)، ۳۰ روز پس از کشت

Table 6. The response of *in vitro* shoots of the selected cherry genotypes to the concentration treatments in combined form of nitrogen (KNO_3+NH_4NO_3) 30 days after culture

	Growth characteristics صفات رشدی				
غلظت نیتروژن نسبت به MS Nitrogen concentration related to MS (mg l^{-1})	وزن خشک Dry weight (cm)	میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره Mean height of longest shoot(cm)	ضریب ازدیاد Coefficient of multiplication	میانگین تعداد برگ در شاخساره Mean of leaf number	درصد برگ های از بین رفته در شاخساره Dried leaf number (%)
1.2 MS	0.10 bc	2.10 ab	1.90 b	8.83 b	17.20 bc
1.0 MS	0.13 a	2.71 ab	1.70 c	9.25 a	11.33 c
0.8 MS	0.12 ab	2.52 ab	1.95 b	8.58 b	28.53 ab
0.6 MS	0.10 bc	2.08 ab	2.05 ab	7.30 c	30.91 ab
0.4 MS	0.10 bc	2.83 a	2.35 a	7.72 c	28.43 ab
0.2 MS	0.06 d	2.81 a	1.80 bc	6.28 d	40.29 a
Control	1.10 bc	2.10 ab	2.00 ab	6.43 d	21.49 bc

در هر ستون حروف مشابه، عدم تفاوت معنی دار تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن نشان می دهند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at 5% level according to Duncan's test.

نیتروژن در مقایسه با فرم های KNO_3 یا NH_4NO_3، به طور جداگانه اثر بهتری را بر روند رشد داشته و برای ریزازدیادی گونه مورد بررسی اقتصادی‌تر هستند. مقایسه اثر ناشی از کاربرد فرم‌های مختلف نیتروژن بر صفات رشدی مانند ارتفاع شاخساره‌ها، ضریب ازدیاد، نشان‌دهنده اثر متفاوت این فرم‌ها بر فرآیند رشد در طول دوره کشت است. طی مراحل نمو و تشکیل اندام جهت رسیدن به رشد بهینه بسته به گونه ، مقدار معینی نیتروژن مورد نیاز است که حدود ۲ تا ۵ درصد از وزن خشک گیاهی را تشکیل می‌دهد و زمانی که مقدار آن زیر سطح بهینه باشد رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهد. افزایش مقدار نیتروژن نه تنها بر رشد اثر دارد بلکه بر الگوی اصلی هر یک از صفات مرفولوژیک گیاه نیز تاثیر می گذارد، زیرا نیتروژن جزء ساختمانی آمینواسیدها، آمیدها و بازهای تشکیل دهنده اسیدهای نوکلئیک است (Salisbury, 1988 ؛Scarpon, 1985). بیشتر محیط‌های کشت که برای کشت سلول یا بافت گیاهی استفاده می شوند حاوی نیتروژن به فرم آلی یا غیر آلی یا ترکیبی از هر دو فرم نیترات و یا آمونیم هستند. نیتروژن و کربن دو عنصر ضروری برای کشت بافت و سلول‌های گیاهی هستند. نیتروژن از عوامل ضروری برای سنتز DNA ، RNA، ماکرومولکول‌ها و پروتئین‌ها است و فرم نیتروژن اثر زیادی بر رشد و تمایز بافت های کشت شده دارد. با تاکید بر نتایج به دست آمده مبنی بر تاثیر منفی کاهش غلظت منابع نیتروژنی بر شاخص‌های رشدی شاخساره‌ها مانند وزن تر و خشک، می‌توان اذعان داشت که کاهش نیتروژن درون بافتی موجب بروز عوارض فیزیولوژیک در شاخساره‌ها مانند کاهش شدید رشد طولی و در نهایت تولید بوته‌چه‌های متراکم می‌شود. مقایسه تیمارهای غلظتی هر سه فرم نیتروژن با یکدیگر نشان داد که واحد غلظتی مناسب برای فرم آمونیم غلظت‌های ۰/۸ تا ۰/۱ و برای فرم نیترات غلظت‌های ۰/۴ تا ۰/۸ و برای فرم ترکیبی از دو منبع غلظت‌های ۰/۴ تا ۱/۲ بود. به کارگیری فرم ترکیبی منابع نیتروژنی در مقایسه با فرم‌های تفکیکی اثر بهتری بر روند رشد داشت. محققین دیگر نیز اقدام به بررسی تاثیر غلظت‌های عناصر غذایی مختلف محیط در غلظت دوبرابر، ۱/۲ و ۱/۴ بر روند جذب نیتروژن، پتاسیم، کلسیم، فسفر و منیزیم در ریزازدیادی سه پایه رویشی گیلاس وآلبالو Gisela 5، Inmil GM 9، Camil GM 79 کردند. آنان با تجزیه اندام‌های گیاهی مختلف درون شیشه شامل برگ، شاخساره و کالوس، نتیجه گرفتند بیشترین جذب صورت گرفته مربوط به نیتروژن و پتاس بود و پایه رویشی Gisela 5 بیشترین سطح تجمع نیتروژن در برگ ها و جذب نیتروژن، پتاسیم، کلسیم و منیزیم را داشت (Ruzic *et al.*, 2006). تحقیق روزیچ و همکاران (۲۰۰۶) از نظر روش به کارگیری غلظت‌های پلکانی املاح معدنی محیط کشت به ویژه نیتروژن و بررسی میزان جذب آن توسط شاخساره‌های درون شیشه گیلاس در مرحله پرآوری به روش تحقیق حاضر شباهت دارد، اما آن‌ها به جای روند جذب هریک از فرم‌های

جدول۷- پاسخ شاخساره های درون شیشه ژنوتیپ انتخابی گیلاس وحشی به تیمارهای غلظتی نیتروژن به فرم ترکیبی نیتروژن (NH_4NO_3+KNO_3)، ۴۵ روز پس از کشت

Table 7. The response of *In vitro* shoots of the selected cherry genotype to the concentration treatments in combined form of nitrogen (KNO_3 + $NH4NO_3$)

غلظت نیتروژن نسبت به MS Nitrogen concentration related to MS(mg l^{-1})	Growth characteristics صفات رشدی وزن خشک Dry weight (mg)	میانگین ارتفاع بلندترین شاخساره Mean height of longest shoot (cm)	ضریب ازدیاد Coefficient of multiplication	میانگین تعداد برگ در شاخساره Mean leaf number	درصد برگ های از بین رفته در شاخساره Dried leaf number (%)
1.2 MS	0.14 d	2.50 ab	2.03 ab	10.50 ab	8.02 b
1.0 MS	0.23 a	2.63 ab	1.95 c	11.88 a	15.62 b
0.8 MS	0.18 b	2.22 b	2.10 ab	8.18 ab	29.89 ab
0.6 MS	0.17 b	2.23 b	2.40 a	7.16 b	28.53 ab
0.4 MS	0.16 bc	3.17 a	2.50 a	8.91 ab	24.89 ab
0.2 MS	0.15 c	3.12 a	2.03 ab	6.65 b	46.69 a
Control	0.14 cd	2.33 b	2.45 a	8.22 ab	27.81 ab

در هر ستون حروف مشابه، عدم تفاوت معنی دار تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن نشان می دهند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at 5% level according to Duncan's test.

نیتروژن، اقدام به اندازه‌گیری میزان جذب نیتروژن کل در اندام‌های گیاهی و مقایسه جذب در سه ژنوتیپ متفاوت کردند. در تحقیق حاضر مشخص شدکه میزان رشد ارتفاع شاخساره‌ها ۱۵ روز پس از کشت نسبت به اواسط دوره (۳۰ روز) و انتهای دوره (۴۵ روز) به شدت پایین بود و بعضاً با کاهش شدت سبزینگی و از بین رفتن برگ‌ها همراه بود. اثر مثبت استفاده از فرم ترکیبی نیتروژن (NH_4NO_3+KNO_3) بر ضریب ازدیاد در ابتدای دوره کشت بیشتر از اثر آن بر ارتفاع نسبت به فرم‌های تفکیکی نیتروژن بود، اما استفاده از فرم‌های تفکیکی منابع نیتروژنی در تمام طول دوره کشت بر ارتفاع و ضریب ازدیاد به یک نسبت اثر داشت. با توجه به نسبت NO_3^- به NH_4^+ این نکته که تغییر نسبت مولی محیط کشت بر گونه‌های گیاهی مختلف اثر متفاوتی دارد و بهترین نسبت مولی برای این گونه گیاهی نسبت ۲:۱ از نیترات به آمونیم است، کاربرد فرم ترکیبی (نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم) قابل دستیابی است. به نظر می‌رسد تغییر فرایند رشد به موازات تغییر فرم‌های مختلف نیتروژن و تغییر نسبت مولی نیترات به آمونیم مربوط به توانایی گونه‌های گیاهی در جذب نیترات یا آمونیم باشد. تقدم جذب نیتروژن فرم آمونیمی در آغاز دوره کشت زمانی که pH محیط بین ۵/۵ تا ۶/۵ تنظیم شده است توسط محققین زیادی به اثبات رسیده است. سطح اولیه اسیدیته محیط در ابتدای دوره موجب جذب آمونیم می‌شود ولی اسیدیته محیط در بلندمدت افزایش یافته و شرایط برای جذب نیترات فراهم شده و جذب این فرم

نیتروژن افزایش می‌یابد (Stephane, 1995). افزایش سطوح صفت‌های رشدی مورد بررسی ممکن است مربوط به این تیمارها بر مقدار درون بافتی نیتروژن و جذب سایر یون‌ها نیز باشد(Hasanloo *et al*., 2006). با تغییر غلظت نیتروژن در محیط کشت، صفات مختلف رشدی شاخساره‌های درون شیشه نیز تغییر می‌کنند که این مشاهدات با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Gerenda`s and Sattelmacher, 1999؛ Gamborg and Shyluk, 1970؛ Baylet *et al.*, 1970). گیاهان به منظور ثبات تعادل کاتیونی، جذب فرم نیتروژنی خاصی را برای کاهش یا افزایش سطح نیتروژن نیز تعیین می‌کنند (Hasanloo *et al.*, 2006؛ Hidder *et al.*, 1994) ضمن این که مقدار نیتروژن به کار رفته و منبع تامین‌کننده آن در محیط کشت نقش مهمی در نحوه توزیع نیتروژن در بیوماس تولید شده دارد و ممکن است بر سطوح هورمونی درون بافتی شاخساره‌ها نیز تاثیر بگذارد (Gamborg and Shyluk, 1970؛ Ogura-Tsujita and Okubo, 2006). مصرف و متابولیسم نیتروژن معدنی جذب شده ضرورتاً در اولین مرحله قرار دارد که این مرحله خود تنظیم است و همچنین با احیاء نیترات و نیتریت و به وسیله مصرف و متابولیسم آمونیم به آمینو اسیدها در مراحل بعدی تنظیم می‌شود (Ruzic *et al*., 2006). در نهایت سیستم مسئول انتقال نیتروژن از نظر بیان و فعالیت، بستگی به دسترسی به فرم نیتروژن و میزان نیاز آن از سوی گیاه دارد و بنابراین باید به دقت تنظیم شود (Wiren *et al*., 1997).

References

Asghari, A. H. 1997. Influence of different concentrations of N, P, K and some carbohydrates on micropropagation of *Prunus* sp. MSc. Thesis. Faculty of Sciences, University of Tehran, Iran (in Farsi).

Baylet, J. M., Kiny, J., and Gamborg, O. L. 1972. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension culture. Planta 105:15-24.

Gamborg, O. L., and Shyluk, J. P. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiology 45:598-600.

Gerenda's, J., and Sattelmacher, B. 1999. Influence of nitrogen form and concentrations on growth and ionic balance of tomato and potato. Plant Nutrition Physiology and Applications 2:33-37.

Hajnajari, H. 1991. Influence of nutritional components on coefficient of

multiplication of «Starkspur» and «M-26». MSc. Thesis. Perugia University, Italy, and Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran (in Farsi).

Hasanloo, T., Hajnajari, H., Fahimi, H., and Nasiri, M. 2006. Evaluation of ionic equilibrium and propagation coefficient of jojoba *in vitro*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 24: 105-113 (in Farsi).

Hidder, C., Vezina, L. P., and Desjardins, Y. 1994. Short-term studies of NO_3 and NH_4 uptake by micropropagated strawberry shoots culture with or without CO_2 enrichment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 185-191.

Ivanika, J. 1992. Micropropagation of cherry (*Prunus* spp.). pp. 304-323. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer Verlag. Berlin, Germany.

Izadpanah, M. 2001. Micropropagation of cherry (*Prunus avium*). Pajouhesh-Va-Sazandegi 52: 68-74 (in Farsi).

Kayani S.A., Nagvi, H.H., and Ting, L.P. 1990. Salinity effects on germination and mobilization of reserves in jojoba seed. Crop Science 30: 704-708.

Kirkby, E.A., and Mengel, K. 1967. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. Plant Physiology 42: 6-14.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Ogura-Tsujita, Y., and Okubo, H. 2006. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxin, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 42: 614–616.

Peuke, A.D., and Tischner, R. 1990. Effects of variation in nitrogen nutrition on growth of poplar (*Populus trichocarpa*) clones. pp. 53-59. In: van Beusicem M.L. (ed.). Plant Nutrition-Physiology and Applications. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Ruzic, D.J.V., Cerovic, R.M., and Culafic, L.J. 2006. The effect of inheriting factor on mineral nutrition of low vigorous sweet cherry rootstocks. Acta Horticulturae 725: 385-390.

Sabeti, H. 1993. Trees and Shrubs of Iran. Tehran University Press. Tehran, Iran.

334 pp. (in Farsi).

Salisbury, F. B., and Ross Cleon, W. 1988. Assimilazione dell'azoto e dello zolfo. Fisioligia Vegetale. P: 204-214. Zanichelli Editore. Bologna, Italy (in Italian).

Scarponi, L. 1985. Il metabolismo dell'Azoto. Elementi di Biochimica Agraria P: 179-190. Galeano Editrice. Perugia, Italy (in Italian).

Shimasaki, K. 1992. The role of ethylene in the plantlet formation of *Cymbidium kanran* from rhizome culture. Plant Tissue Culture 9: 202-205.

Stephane, D. 1995. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut calluses. Plant Science 106: 185-193.

Taylor, A. R., and Bloom, A. J. 1998. Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. Plant and Cell Environment 21: 1255–1263.

Wiren, N.V., Gazzarrini, S., and Frommer, W.B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. Plant and Soil 196: 191-199.