دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۶۴-۵۶ (۱۳۹۴)

اثرات کاهش و افزایش منابع نیتروژنی بر رشد درون‌شیشه‌ای صنوبر لرزان

سید محمد شتاب بوشهری[۱*]، حسن حاج نجاری[۲] ، طیبه سهیلا نراقی[۳] و بهرام ایمانی[۳]

۱ *- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد پژوهشی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، تهران
پست الکترونیک Boushehri@irost.ir

۲- استادیار، بخش تحقیقات باغبانی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

۳- کارشناس پژوهشی، گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۴- کارشناس ارشد پژوهشی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۱

چکیده

صنوبر لرزان (*Populus tremula* L.) از گونه‌های ارزشمند غیر بومی جنس *Populus* در ایران است که از طریق ریزازدیادی می‌تواند تکثیر شود. منابع مختلف نیتروژن معدنی محیط کشت ACM (شاهد) در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ برابر نیتروژن کل با نسبت ۱ به ۲ از NH_4^+: NO_3^-، ازت کل فقط به‌فرم NO_3^- و ازت کل با نسبت ۱ به ۱ از NH_4^+: NO_3^- تغییر داده شدند. در پایان دوره کشت، صفات مورفولوژیک مواد گیاهی درون شیشه شامل طول شاخساره، تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد برگ، شدت سبزینگی و وزن تر و خشک اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اختلاف بین تیمارها از نظر افزایش طول شاخساره معنی‌دار بود، از این‌رو می‌توان ازت معدنی کل محیط شاهد را تا نصف کاهش داد. به‌طوری‌که بیشترین وزن تر و خشک نیز در تیمار کاهشی نیم برابری ازت کل به‌دست آمد. کاهش و افزایش سطح نیتروژن موجب افت در میزان شاخه‌دهی در شاخساره‌ها شد و تیمارهای کاهشی و افزایشی به‌غیر از تیمار ۱ به ۱ از NH_4^+: NO_3^- با شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند. البته بیشترین میزان سبزینگی در تیمار یک و نیم برابر ازت در محیط کشت با نسبت ۱ به ۱ از NH_4^+: NO_3^- به‌دست آمد. به‌نحوی‌که بهبود محیط کشت از طریق ایجاد تعادل یونی مناسب‌تر و در نتیجه افزایش توان جذب نیتروژن موجود در غلظت بهینه از سوی شاخساره‌ها امکان‌پذیر شد. بنابراین ادامه استفاده و تداوم بازکشت‌ها در محیط تغییر یافته ACM موجب ارتقاء نسبی شاخص‌های رشد گردید.

واژه‌های کلیدی: صنوبرلرزان، محیط کشت اسپن، یون آمونیوم، یون نیترات، ریزازدیادی.

مقدمه

صنوبر لرزان (*Populus tremula* L.) از خانواده Salicaceae و از زیر تیره Trepidae می‌باشد. بیشتر گونه‌های جنس *Populus* دارای اهمیت اقتصادی بوده و گونه مورد بحث از گونه‌های غیر بومی جنس *Populus* در ایران است و از نظر جنگلکاری به‌عنوان گیاه پرستار، استفاده از چوب نرم و سبک آن در صنعت و از نظر تزئینی به‌لحاظ داشتن برگ‌های لرزان در فضای سبز شهری مورد توجه می‌باشد (Aghabeigi, 1995; Sabeti, 1955). گونه صنوبر لرزان با وجود آفتاب‌پسندی، از سرما و انجماد در

زمستان آسیب‌پذیری کمتری نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند در مناطق معتدله و سردسیر ایران به‌عنوان حصار بادشکن باغ‌ها؛ مزارع و استفاده در پارک‌های جنگلی حاشیه شهرها توصیه شود. تکثیر صنوبرها از قلمه چوبی شاخه‌های یک یا دو ساله متداول است و معمولا قلمه‌ها از این طریق به‌راحتی ریشه‌دار می‌شوند. اما قلمه صنوبر لرزان برخلاف سایر صنوبرها به‌علت عدم تشکیل سرآغازنده‌های ریشه، سخت ریشه‌زا است. استفاده از پیوند و قلمه‌های سبز و ریشه‌جوش نیز در کلن‌کردن انبوه ژنوتیپ‌های جدید حاصل از هیبریدهای کلاسیک و یا تراریخته روشی کند است، از این‌رو ریزازدیادی به‌خصوص برای کلن‌های تراریخته ضروریست (Ahuja, 1993). کشت بافت یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی این گونه با قابلیت تکثیر زیاد می‌باشد. کشت بافت صنوبر لرزان در سال ۱۹۷۰ آغاز گردید (Winton, 1970). البته پیش از آن اولین گیاهچه‌های باززایی شده صنوبر لرزان از کشت کالوس ارقام تریپلویید به‌دست آمد (Winton, 1968; Wolter, 1968) و با کشت سلولی آن ادامه یافت (Ahuja, 1983). در تحقیق فوق، Ahuja محیط کشت ACM (Aspen Culture Medium) را که تغییر یافته محیط کشت WPM (Woody Plant Medium)، (Lloyd & McCown, 1980) است معرفی و جوانه‌های جانبی و انتهایی در حال خواب صنوبر لرزان را با موفقیت کشت و در نهایت به نهالستان منتقل کرد (Ahuja, 1983; Ahuja, 1993) و در سال ۱۹۸۴ این محیط کشت را برای تکثیر تجاری صنوبر لرزان بهینه کرد (Ahuja, 1983). گزارش Mandal (1989) نیز نشان داد که جوانه‌های جانبی کشت شده در محیط ACM شاخه‌زایی خوبی نشان دادند. نتایج آزمایش‌های وی دلالت بر این داشت که برای انگیختن و تحریک جوانه‌ها استفاده از هورمون‌ها ضروری نبود ولی هورمون BAP تعداد جوانه‌های باززایی شده را افزایش داد. در آزمایش دیگری که اثرات pH محیط کشت بر روند رشد درون شیشه بررسی شد، درصد باز شدن جوانه‌ها و نیز پرآوری در محیط کشت WPM با اسیدیته pH=۷، بیش از pH بسیار اسیدی ۳/۸ و نرمال ۵/۶ بود (Garelkova & Ganchev, 1992). به هر شکل بهینه‌سازی محیط کشت یک ضرورت همیشگی به‌نظر می‌رسد، به‌طوری که Diphosard (1976) پیشنهاد کرده است که برای کشت بافت گیاهانی که تاکنون بررسی نشده‌اند باید آزمایش‌هایی با طیف وسیع برای انتخاب محیط کشت پایه مناسب انجام گیرد. سپس تغییرات در سه غلظت کم، متوسط و زیاد در چهار گروه، قندها (ساکارز)، نمک‌های پرمصرف، اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها انجام شود. بین عوامل مهم بهینه‌کردن محیط کشت برای یک گونه گیاهی می‌توان از مقدار ازت کل، نسبت NH_4^+ به NO_3^-، مقدار کل یون‌ها، مقدار کلسیم و کلراید را نام برد (McCown & Sellmer, 1987). نیترات‌ها چون به آسانی جذب و متابولیسم می‌شوند منبع خوب ازت به‌شمار می‌روند و بیدار کردن جوانه‌های در حال خواب، برطرف شدن چیرگی انتهایی و تحریک به ریشه‌دهی را به NO_3^- نسبت می‌دهند (Bonga & Aderkas, 1992). به‌طور کلی جذب نیترات‌ها نسبت به آمونیوم در بیشتر گیاهان برای سوخت و ساز بیشتر است (Hosseinishokraii, 1975). به‌نحوی‌که بهترین رشد کالوس ریزقلمه‌های چای در نسبت ۷ به ۳ از: NO_3^- NH_4^+ گزارش شده است (Cheng *et al.*, 1994) و بیشترین وزن خشک گیاه گل راعی (*Atropa belladonna*) با نسبت‌های ۲ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ به‌دست آمد و استفاده از منبع نیتراتی تنها موجب تجمع نیترات در بافت‌ها شد، اما در نسبت ۱ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ این تجمع اتفاق نیفتاد (Salonen, 1984). بنابراین بررسی جذب انتخابی منابع نیتروژنی در ریزازدیادی توت‌فرنگی نشان داد در ابتدا جذب NH_4^+ و بعد NO_3^- انجام شد، در حالی که تجزیه همزمان محیط‌های کشت نیز دلالت بر سرعت تخلیه بالای NH_4^+ از محیط نسبت به NO_3^- بود (Hdider *et al.*, 1994). بافت‌های گیاهی قادر به ذخیره NH_4^+ نیستند، زیرا تجمع آن ایجاد مسمومیت می‌کند. پس به‌سرعت برای تولید اسیدهای آمینه مثل آسپاراژین و گلوتامین مصرف می‌شود (Hosseinishokraii,1975). در بیشتر تحقیقاتی که از یون NH_4^+ به‌تنهایی در محیط کشت گیاه استفاده شده نشانه‌های

سمیت در گیاهان نیز بروز کرده است (Magalhaes & Huber, 1989)، با وجود این مشاهدات مشخص شده که برخی از گیاهان مانند برنج، سیب‌زمینی و آناناس در محیط‌های آمونیومی رشد بهتری داشته و پاسخ خوبی به محیط‌های فاقد NH_4^+ ندادند (Hosseinishokraii, 1975; Bonga & Aderkas, 1992). در مجموع چنین به‌نظر می‌رسد که نسبتی از: NO_3^- NH_4^+، از مصرف تنهای هر یک از این یون‌ها در محیط کشت برای رشد نرمال گیاهک‌ها بهتر باشد و نسبت مناسب بستگی مستقیم به ژنوتیپ و نوع بافت مورد نظر خواهد داشت. در آزمایش‌های کشت بافت‌های گیاهی مسئله بهینه‌کردن محیط کشت و تعادل یونی عناصر غذایی همواره مورد توجه بوده و پیش نیاز آزمایش‌های هورمونی به‌شمار می‌رود (McCown & Sellmer, 1987). در این تحقیق به مطالعه رفتار مورفولوژیکی گیاه صنوبر لرزان در برابر تغییرات ازت آمونیومی و نیتراتی پرداخته شد تا اثرات کاهشی و افزایشی این دو یون در محیط کشت معرفی شده ACM در مراحل مختلف کشت بررسی شود.

جدول ۱- غلظت مولی یون‌های آمونیوم و نیترات در تیمارهای اعمال شده محیط کشت ACM

تیمارهای محیط کشت	میلی‌مول (mM)		
	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+/NO_3^-
N (ACM)	۵	۹/۷۱	۰/۵۱۵
۰/۵ N	۲/۵	۴/۹	۰/۵۱
۱/۵ N	۷/۵	۱۴/۶	۰/۵۱۴
N_1	۷	۷	۱
۰/۵ N_1	۳/۷	۳/۷	۱
۱/۵ N_1	۱۱	۱۱	۱
N_2	۰	۱۴/۷	۰
۰/۵ N_2	۰	۷/۳	۰
۱/۵ N_2	۰	۲۲	۰

N: کل ازت معدنی محیط کشت ACM با نسبت ۲ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+

N_1: کل ازت معدنی محیط کشت ACM با نسبت ۱ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+

N_2: کل ازت معدنی محیط کشت ACM فقط به فرم NO_3^-

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش تغییرات ازت آمونیومی و نیتراتی در محیط کشت ACM، از ریزقلمه‌های کشت بافتی صنوبر لرزان با طول ۱/۵ سانتی‌متر استفاده شد که در هر شیشه مربایی (۱۰ × ۷/۵ سانتی‌متر) تعداد شش ریزقلمه روی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت ACM تغییر یافته نیمه‌جامد کشت شد.

در پایان دوره کشت یک ماهه، اقدام به آمارگیری در هـر شیشه از کلیه شاخساره‌های درون شیشه شد و تمام صفات مورفولوژیک طول شاخساره (L)، تعداد شاخساره جدید (S)، تعداد برگ (Le) و درجه سبزینگی (Co) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری شدت سبزینگی قابل مشاهده از طریق نمره‌دهی براساس درجه‌بندی سبز پر رنگ تا بدون سبزینگی به‌ترتیب از پنج تا صفر درجه‌بندی و میانگین‌گیری بعدی محاسبه شد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود ترکیبات ازته معدنی محیط کشت ACM، NH_4NO_3 و $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ با نسبت مولی ۲ به ۱ یونی: NO_3^- NH_4^+ که بدون تغییر به‌عنوان شاهد (N) در نظر گرفته شد. براساس مقدار ازت کل معدنی ACM نسبت ۱ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ محاسبه شد و

با کد (N_1) و ازت کل معدنی ACM با نسبت ۱ به صفر از: NH_4^+ NO_3^- (N_2) نامگذاری شدند، که به این‌ترتیب در آخرین تیمار یون NH_4^+ از محیط ACM حذف شد. به‌غیر از شاهد (N) مقدار ازت کل تیمارهای N_1 و N_2 به‌ترتیب ۰/۵ و ۱/۵ برابر شد (جدول ۱). بنابراین با اعمال تیمارهای کاهشی و افزایشی ازته بقیه عناصر محیط ACM خصوصا K، P و Ca ثابت نگه داشته شدند. هر شیشه حاوی محیط کشت‌های تغییر یافته به‌عنوان یک تکرار از یک تیمار در نظر گرفته شد. برای هر تیمار تعداد پنج تکرار و جمعاً ۴۵ واحد آزمایشی در نظر گرفته شد.

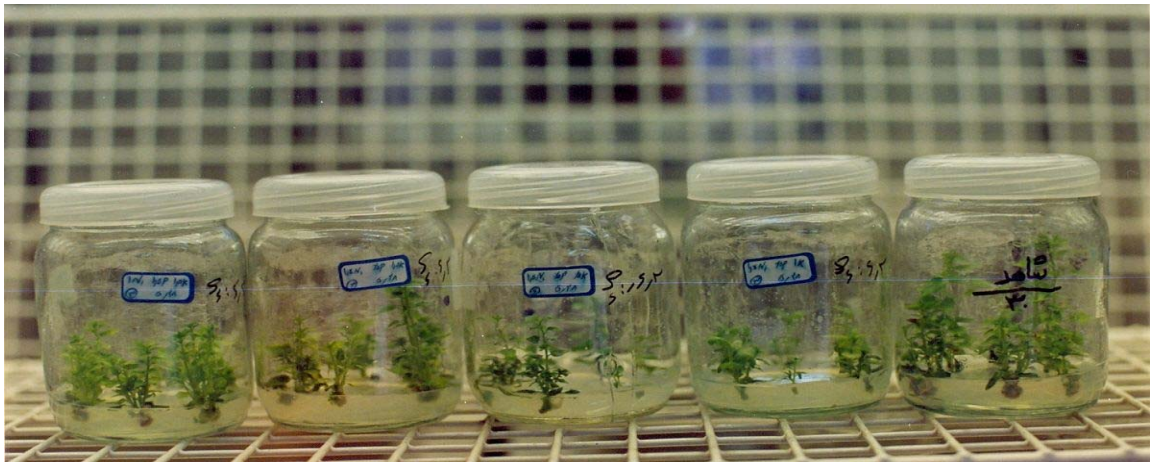
شرایط و عوامل فیزیکی و دمایی اتاق رشد برای همه واحدهای آزمایشی یکسان بود. در محیط کشت ACM هورمون‌های NAA و BAP به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و شرایط اتاق رشد ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در دمای به‌ترتیب ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس در نظر گرفته شد. گیاهچه‌های قوی و پرریشه انتخاب و از شیشه خارج شدند و پس از حذف آگار از ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به خاک گلدان حاوی پرلیت، پیت ماس و خاک ضد عفونی شده (به نسبت‌های مساوی) انتقال داده و بعد از گذراندن مراحل سازگاری در ژرمیناتور، به گلخانه منتقل شدند.

نتایج بر پایه طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها بر اساس حداقل تفاوت معنی‌دار در بین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح پنج درصد) دسته‌بندی شدند (جدول ۴).

نتایج

طول شاخساره: مشاهدات مورفولوژیک از نظر صفت طول شاخساره با کاهش ازت کل محیط ACM به نصف با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت، اما با افزایش ۱/۵ برابری نسبت به شاهد این کاهش معنی‌دار شد (جدول ۲). کاهش طول با تغییر نوع ازت کل به نیتراتی یا آمونیومی نیز دیده شد، اما میانگین کاهش رشد در ازت نیتراتی به‌نسبت بیش از مخلوط ازت نیتراتی و آمونیومی بود. کاهش و افزایش ازت کل نیتراتی (N_2) به یک، نصف و یا ۱/۵ برابر و همچنین کاهش و افزایش ازت کل در فرم آمونیومی (با افزایش نسبی آمونیوم در ACM) به یک، نصف و یا ۱/۵ برابر تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند.

شاخه‌دهی: با توجه به جدول ۲ مشاهده می‌شود که تغییرات کمی و کیفی نیتروژن بر سطح شاخه‌دهی مؤثر بوده و این تغییرات عمدتا اثرات نامطلوب بر تولید شاخه‌های درون شیشه جدید داشتند. تیمارهای کاهشی نصف و افزایشی ۱/۵ برابر کردن ازت کل ACM باعث کاهش معنی‌دار شاخه‌زایی شدند که این تغییرات برای هر دو فرم از منبع نیتروژنی از نوع آمونیاکی (N_1) و یا نیتراتی (N_2) نیز صدق می‌کند (شکل ۱).



شکل ۱- گیاهک‌های صنوبر لرزان کشت شده در تعدادی از تیمارهای ازته

برگ‌دهی: مشاهدات و نتایج تیمارهای اعمال شده کاهشی و افزایشی ازت بر صفت برگ‌دهی از نظر تعداد برگ با مشاهدات مربوط به شاخه‌دهی مشابهت نزدیکی نشان داد. میانگین تعداد برگ از ۲۶ عدد در شیشه در محیط شاهد ACM به ۱۱/۲ عدد در محیط نیتراتی (N_2) رسید. تعداد برگ در محیط ACM به‌طور میانگین ۲۶ عدد بود، هرچند تفاوت آماری با محیط آمونیومی (۲۱/۲) نشان داد اما از نظر عددی میانگین تعداد برگ‌ها نزدیک به‌هم بودند (جدول ۲).

شدت سبزینگی: بیشترین شدت سبزینگی در تیمار ۱/۵ برابر ازت آمونیومی (همراه با نیترات به‌نسبت ۱:۱) مشاهده شد که با سایر تیمارها نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نشان داد و کمترین شدت سبزینگی نیز مربوط به کاهش و افزایش تیمارهای ازت به‌فرم نیتراتی بود.

جدول ۲- اثرات مورفولوژیک محیط کشت‌های تغییریافته ACM بر گیاهک‌های صنوبر لرزان در پایان دوره کشت

تیمارهای محیط کشت ACM	میانگین طول شاخساره‌ها (cm)	میانگین تعداد جوانه‌های جانبی	میانگین تعداد برگ	شدت سبزینگی[x]
(ACM)N	۷/۲[a]	۳/۵[a]	۲۶[a]	۳/۶[bc]
۰/۵N	۶/۸۲[a]	۲/۶۸[bc]	۱۴/۸[cd]	۳/۱۶[cde]
۱/۵N	۴/۱۲[b]	۲/۲۴[cd]	۱۷/۶[bc]	۳/۸۸[b]
N_1	۴/۶[b]	۳/۱۴[ab]	۲۱/۲[b]	۳/۷۴[b]
$۰/۵N_1$	۴/۲۴[b]	۲/۷۶[bc]	۱۸/۲[bc]	۳/۴۲[bcd]
$۱/۵N_1$	۳/۶۴[b]	۲/۷۶[bc]	۲۱[b]	۴/۶۸[a]
N_2	۱/۳۸[c]	۱/۵۸[d]	۱۱/۲[de]	۳[de]
$۰/۵N_2$	۱/۸۶[c]	۱/۸۶[d]	۱۰[e]	۲/۴[f]
$۱/۵N_2$	۱/۶۴[c]	۱/۵۸[d]	۹/۱۴[e]	۲/۶۶[ef]

N: کل ازت معدنی محیط کشت ACM با نسبت ۲ به ۱ از $NH_4^+:NO_3^-$

N_1: کل ازت معدنی محیط کشت ACM با نسبت ۱ به ۱ از $NH_4^+:NO_3^-$

N_2: کل ازت معدنی محیط کشت ACM فقط به فرم NO_3^-

[x]: میانگین‌های شدت سبزینگی بر حسب درجه‌بندی از بدون سبزینگی (۱) تا سبز تیره (۵).

- میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسانی هستند از نظر آماری با هم تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- وزن تر و خشک گیاهک‌های رشد کرده صنوبر لرزان ۳۰ روز بعد از کشت (بر حسب گرم)

تیمارهای محیط کشت	(ACM)N	۰/۵N	۱/۵N	N_1	$۰/۵N_1$	$۱/۵N_1$	N_2	$۰/۵N_2$	$۱/۵ N_2$
وزن تر	۱/۹۲	۲/۳۳	۰/۸۳	۱/۲۷	۰/۶۶	۱/۲۵	۰/۹۹	۰/۸۵	۱/۲۵
وزن خشک	۰/۱۷	۰/۲	۰/۲	۰/۱۱	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۱	۰/۰۸	۰/۱۲

جدول ۴- مجموع مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای محیط کشت بر گیاهک‌های کشت بافتی صنوبر لرزان

منابع تغییر	df	L	S	LE	CO
تیمار	۸	۱۷۸/۶۹**	۱۸/۶۴**	۱۳۳۹/۲۵**	۱۸/۹۴**
بلوک	۴	۱/۳۹n.s.	۰/۰۱n.s.	۲۰/۵۲n.s.	۰/۴۱n.s.
اشتباه	۳۲	۲۵/۶۱	۸/۷۱	۲۷۴/۲۶	۴/۸۰
کل	۴۴	۲۰۵/۷۱	۲۷/۳۷	۱۶۳۴/۰۴	۲۴/۱۶

n.s.: اختلاف غیر معنی‌دار (p> ۰/۰۵) و **: معنی‌دار در سطح یک‌درصد

L طول شاخساره‌ها (cm)، S تعداد جوانه‌های جانبی، LE تعداد برگ، CO شدت سبزینگی

بحث

طول شاخساره‌ها با کاهش ازت کل ACM تفاوت آماری با شاهد نشان نداد، از این‌رو می‌توان در تولید انبوه صنعتی صنوبر ازت کل مصرفی شاهد را (با نسبت ۲ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ در ACM) به نصف کاهش داد. چون رشد طولی بیش از اندازه موجب کاهش قطر شاخساره‌ها می‌شود، بنابراین به‌نظر می‌رسد همراه شدن فرایند جبران کاهش قطر در مرحله ریشه‌زایی که با تولید ریشه‌های نابجا همراه است، با توجه به سقف محدود سوخت و ساز گیاهان، می‌تواند موجب کندشدن فرایند رشدی از نظر تعداد و طول ریشه‌ها همزمان با رسیدن به قطر مطلوب شود. افزایش وزن تر و خشک گیاهک‌ها در تیمار N ۰/۵ نسبت به N و N۱/۵ حکایت از جذب بهینه آب و تشکیل بافت‌های ساختمانی توسط گیاهک‌ها در این تیمار دارد (جدول ۳). افزایش غلظت نیتروژن کل به ۱/۵ برابر، موجب کاهش شاخص رشد شده که دلالت بر تجمع نیترات در بافت‌ها و در نتیجه اختلال در رشد نرمال را نشان داده است. قطعا در فاصله بین ۱ و ۰/۵ برابر، چنانچه بقیه مواد و عناصر محیط کشت ثابت باشند مقدار مناسب‌تری نیز قابل دستیابی است که با تغییر در عناصر دیگر مقدار آن تغییر خواهد کرد. از نظر تئوری بهینه‌ترین مقدار عناصر در محیط کشت زمانی خواهد بود که پس از ۳-۴ هفته در هر دوره کشت، کمترین میزان از عناصر پر و کم‌مصرف در محیط کشت باقی بماند. هرچند رسیدن به شرایط جذب کامل عناصر در محیط کشت قابل دسترسی نیست ولی بهره‌گیری از آزمایش‌های مشابه تفکیک اجزای محیط کشت در غلظت‌های مختلف می‌توان از یکسو کیفیت نهال‌های ریزازدیاد شده و سرعت تکثیر آنان را در واحد زمان افزایش داد و از سوی دیگر شرایط را برای هرچه بیشتر اقتصادی‌کردن تولید انبوه ارقام بومی و خارجی سریع‌الرشد و نیز سایر درختان از طریق گیاهان کشت بافتی فراهم کرد.

افزایش ۱/۵ برابری ازت کل، موجب کاهش معنی‌دار طول شاخساره‌ها شد که این خسارت ناشی از بروز سمیت حاصل از زیاده‌روی در مصرف منابع نیتروژنی می‌باشد. در تحقیقی که De Block (1990) بر روی یک هیبرید صنوبر لرزان انجام داد، گزارش کرد که جذب بیش از حد یون‌های NH_4^+ باعث تجمع آنها در بافت‌ها شد. شدت افزایش جذب یون‌های آمونیوم موجب تخلیه آن از محیط کشت و کاهش سطح اسیدیته شد. کاهش اسیدیته محیط به‌نوبه خود باعث سوختگی برگ‌های درون شیشه شد. وی در نهایت با بهینه‌سازی تعادل یونی محیط کشت از طریق تصحیح نسبت: NO_3^- NH_4^+، موفق به رفع مشکل فوق شد. هرچند یون NH_4^+ به‌سرعت از محیط کشت جذب می‌شود (Carrier *et al.*, 1990) اما در صورت وجود ترکیبات کربوهیدراتی به‌عنوان منبع انرژی در محیط، تجمع آن در بافت‌ها مانند یون نیترات ایجاد سمیّت نمی‌کند چون به‌دلیل تحرک زیاد خود به‌سرعت توسط گیاه برای تولید اسیدهای آمینه و آمیدهایی نظیر آسپاراژین و گلوتامین (Glutamine & Asparagine) مصرف می‌شود. بنابراین با افزایش جذب یون‌های NH_4^+، و تبدیل سریع آن به آمیدها و اسیدهای آمینه، مقدار زیادی مواد قندی مصرف می‌شود (Hosseinishokraii, 1975). به‌صورت مشابه در این تحقیق، به‌دلیل ثابت بودن سطح ساکارز در محیط کشت ACM، افزایش یون NH_4^+ نسبت به یون NO_3^- در تیمارهای N_1 کاهش رشد ایجاد شد. به‌همین ترتیب وزن تر و به‌تبع آن وزن خشک نیز در این تیمارها کاهش معنی‌دار نشان دادند. بنابراین به‌نظر می‌رسد حتی در صورت وجود منبع کربوهیدرات در محیط کشت به‌دلیل وجود سیستم کنترلی در سطح جذب و سوخت و ساز از سوی ژنوم، با رسیدن به یک سقف مشخص از جذب عناصر و رفع نیاز غذایی، مسیر متابولیک به‌طرف تجمع، مصرف لوکس و در نهایت سمیت، سوختگی و مرگ هدایت می‌شود. شاخساره‌ها قبل از ظهور سوختگی دچار تأخیر در فرایند رشد نظیر کاهش سطح برگ و ارتفاع می‌شوند. افزایش ۱/۵ برابری غلظت کل در شرایط هم سطحی دو منبع نیتروژنی هرچند در داخل کرت‌های فرعی معنی‌دار نشد ولی مقایسه صفات تعداد برگ، تعداد جوانه‌های جانبی و شدت

سبزینگی نشان داد که بین تیمارهای N و N1 در غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ برابر تفاوت معنی‌دار وجود داشت. کاهش نیم برابری منبع نیتراتی احتمالا موجب افزایش تحرک نیتروژن درون بافتی در فرم آمونیومی شده و موجب رسیدن نیتروژن بیشتر به بخش هوایی و افزایش سطح کلروفیل کل و فعال شدن بیشتر جوانه‌های جانبی و همزمان رشد تعداد بیشتری از پهنک برگ‌ها شده است. حذف کامل منبع نیتروژن آمونیومی در هر سه غلظت موجب کاهش تمامی صفات رویشی و معنی‌دار شدن اختلاف در سطح ۵% در صفات طول شاخساره، تعداد جوانه‌های جانبی فعال، و تعداد برگ در شاخساره در تیمار N2 نسبت به تیمارهای N1 وN2 گردید (جدول ۲) که این نتایج با مشاهدات Salonen (۱۹۸۴) روی گل راعی مطابقت دارد ولی در کشت سلولی گندم، لوبیا و تنباکو در محیط کشت دارای ازت فقط در فرم NO_3^- نیز هرچند موفقیت‌آمیز بود اما کمتر از رشد در محیط حاوی NH_4^+ و NO_3^- بود (Kirby *et al.*, 1987). این می‌تواند بیانگر نقش یون NH_4^+ در سوخت و ساز و نیز اثرات نامطلوب تجمع نیترات در بافت‌های درون شیشه‌ای صنوبر لرزان باشد، زیرا میانگین وزن تر و خشک در این تیمارها نزدیک به‌هم و از نظر نسبی نیز کمتر از سایر تیمارهاست. البته در تیمار N_2 ۱/۵ وزن تر به‌دلیل جذب آب بیشتر افزایش یافت که احتمالا این واکنش شاخساره‌ها به‌منظور جبران اثرات تجمع نیترات در بافت‌ها می‌باشد. حذف کامل منبع آمونیومی موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک شاخساره‌ها در غلظت بالای منبع نیتروژن نیتراتی در مقایسه با غلظت‌های کمتر در تیمارهای N_2 ۰/۵ و $N_2$۱ نشد، بنابر واکنش گیاهک‌ها از نظر متغیرهای رشدی در دست بررسی، بنابراین در چنین شرایطی نشان داد با افزایش یون‌های NO_3^- تشکیل بافت‌های ساختمانی با مشکلات شدید همراه بود. بنابراین هرچند ازت نیتراتی بیشتر از ازت آمونیومی در متابولیسم گیاه شرکت می‌کند (Hosseinishokraii, 1975; Bonga & Aderkas, 1992) اما لزوم یافتن نسبت صحیح دو منبع در غلظت مناسب برای دستیابی به‌سرعت تکثیر و کیفیت مطلوب از نظر شدت سبزینگی، ارتفاع، تعداد جوانه‌های فعال و تعداد برگ ضرورت دارد. هرچند نسبت ۲ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ در نگاه اول برای کشت بافت صنوبرلرزان مناسب است، ولی کاهش سطح منبع نیتراتی در تیمار N_1 نسبت به تیمار شاهد N در تولید انشعابات جانبی و شدت سبزینگی اختلافات معنی‌داری نشان نداد. یعنی می‌توان دست‌کم از نظر این دو صفت سطح نیترات را کاهش داد. مشاهده می‌شود که در تیمارهای N و N_1 در غلظت کمتر (۰/۵) تفاوت میانگین صفات به‌نفع تیمار N1 معنی‌دار هم شد (جدول ۲). به‌طوری‌که در تیمار N2، حذف کامل منبع آمونیومی موجب کاهش شدید و خسارت بار صفات رشدی با اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمارهای N و N1 شد. به این ترتیب اهمیت بنیادین و تأثیر معنی‌دار نسبت مولی دو یون بر مورفولوژی مشخص شد. برای مثال در گونه کاج (*Picea glauca*) نسبت ۳ به ۱ از: NO_3^- NH_4^+ از سوی Thorpe (۱۹۸۹) برای تشکیل جوانه‌های نابجا مناسب تشخیص داده شد، زیرا در محیط فاقد نیترات فقط خاستگاه اولیه جوانه (needle primordia) تشکیل شد ولی شاخساره‌های نابجا تشکیل نگردید و به‌همین شکل در محیط فاقد NH_4^+ نیز جوانه‌های نابجا تشکیل نشد. به‌طور مشابه در تحقیق حاضر نیز در تمامی غلظت‌های N_2 (فاقد NH_4^+) تفاوت آماری معنی‌دار در تولید جوانه‌های فعال نسبت به محیط‌های حاوی هر دو منبع نیتروژنی در تیمارهای N و N_1 ثبت شدند.

صفت شدت سبزینگی نشانگر سطح غلظت کلروفیل کل برگ به‌شمار می‌رود و در سطح سازگاری گیاه پس از خروج از شرایط هتروتروف درون شیشه و انتقال به مرحله فعالیت کامل زیستی اتوتروف نقش تعیین‌کننده‌ای دارد، که این صفت در تیمار N_1 ۱/۵ به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها برتری نشان داد. کمترین شدت سبزینگی در تیمارهای N_2 فاقد منبع نیتروژنی آمونیوم دیده شد. از این‌رو به‌نظر می‌رسد مدیریت منبع نیتروژنی و نسبت مولی مناسب

آن در تمام مراحل ریزازدیادی تجاری صنوبرلرزان باید با پشتوانه تحقیقاتی انجام شود.

سپاسگزاری

در پایان از تمام عزیزان گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و سایر دوستانی که به هر نحو در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

- Aghabeigi, F., 1995. Useful Trees and Shrubs to be Planted in Iran. Falahate Iran, Esfahan, 240 p,
- Ahuja, M.R., 1983. Somatic cell genetics and rapid clonal propagation in aspen. Silvae Genetica, 32: 131-135.
- Ahuja, M.R., 1984. A commercially feasible micropropagation method for aspen. Silvae Genetica, 33:174-176.
- Ahuja, M.R., 1993. Regeneration and Germplasm preservation in Aspen-*Populus*. 183-193. In: Ahuja, M., R., (Ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 507 p.
- Bonga, J.M. and Aderkas, P.V., 1992. Media Preparation. 12-53. In*: In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Netherlands), 209 p.
- Carrier, D.J., Cosentino, G., Neufeld, R., Rho, D., Weber, M. and Archambault, J., 1990. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. Plant Cell Reports, 8: 635-638.
- Cheng, H., Wang, Y., Yang, S. and Wang, L., 1994. Effects of macroelements on the growth of tea callus and the accumulation of catechins. Journal of Tea Science,14: 31-36.
- De Block, M., 1990. Factors Influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiology, 93: 1110-1116.
- Diphosard, R., 1976. Tissue Culture for Plant Propagators. University New England Printer, Armidale, Australia, 409 p.
- Garelkova, Z. and Ganchev, P.,1992. Resistance of aspen (*Populus tremula* L.) regenerants to extreme values of pH under *in vitro* conditions. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 45: 83-85.
- Hdider, C., Vézina, L.P., and Desjardins, Y., 1994. Short-term studies of $^{15}NO_3^-$ and $^{15}NH_4^+$ uptake by micropropagated strawberry shoots cultured with or without CO_2 enrichment. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 37: 185-191.
- Hosseinishokraii, E., 1975. Plant Physiology. University of Iran's Revolutionary Guards, 255 p.
- Kirby, E.G., Leustek, T. and Lee, M., 1987. Nitrogen nutrition, 67-88. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J., (Ed.s), Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht (Netherlands), 440 p.
- Lloyd, G.B., and McCown, B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proceedings International Plant Propagators Society, 30: 421–437.
- Magalhaes, J.R. and Huber, D.M., 1989. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. Fertilizer Research, 21: 1-6.
- Mandal, A., 1989. Micropropagation of *Populus tremula* L.: Condition for induction of shoots and roots. Scandinavian Journal of Forest Research, 4: 285-293.
- McCown, B.H. and Sellmer, J.C., 1987. General media and vessels suitable for woody plant microculture, 4-140, In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J., (Ed.s), Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht (Netherlands), 440 p.
- Sabeti, H., 1955. Le Peuplier en Iran. Publication Board of Forestry. 92 p.
- Salonen, M.L., 1984. Influence of ammonium and nitrate nutrition on levels of ammonium, nitrate and total nitrogen in the callus of *Atropa belladonna* (Solanaceae). Annales Botanici Fennici, 21: 367-381.
- Thorpe, T.A., Bagh, K., Cutler, A.J., Dunstan, D.I., McIntyre, D.D., and Vogel, H.J., 1989. A ^{14}N and ^{15}N Nuclear Magnetic Resonance Study of Nitrogen Metabolism in Shoot-Forming Cultures of White Spruce (*Picea glauca*) Buds. Plant Physiology, 91:193-202.
- Winton, L.L., 1968. Plantlet formation in aspen tissue culture. Science, 160:1234-1235.
- Winton, L.L., 1970. Shoot and tree production from aspen tissue cultures. American Journal of Botany, 57: 904-909.
- Wolter K.E., 1968. Root and shoot initiation in aspen callus cultures. Nature, 219: 509–510.

Increament and decrement effects of nitrogen sources on *in vitro* shoot growth traits of Aspen (*Populus tremula* L.)

S. M. Shetabboushehri [1*], H. Hajnajari[2], T. S. Naraghi[3] and B. Imani[4]

1*- Corresponding author, Research expert, Department of Plant Production & Sustainable Agriculture, Agriculture Research Institute, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, I.R.Iran. E-mail: Boushehri@irost.ir
2- Assist., Prof., Research, Horticulture Department, Seed and Plant Improvement Institute. Karaj, I.R.Iran.
3- B. Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran.
4- Research expert, Department of Plant Production & Sustainable Agriculture, Agriculture Research Institute, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, I.R.Iran.

Received: 09.07.2014 Accepted: 10.02.2015

Abstract

European aspen (*Populus tremula* L.) is an adapted species of *Populus* genus in Iran which is propagated by micropropagation techniques. It seems necessary to increase the efficiency of the medium by giving appropriate balance between two main different nitrogen ionic sources. Total mineral nitrogen content (TNC) of ACM medium was changed into different concentrations of 0.5, 1 and 1.5. TNC treatments were defined as: 1- control NH_4^+: NO_3^- 1:2, 2 - NO_3^- without ammonium ions, and 3 - NH_4^+: NO_3^-- 1:1. Effects of mentioned treatments were determined at the end of subculture on several morphological traits such as shoot length, number of lateral shoots, leaf number, green intensity, fresh weight, and dry weight of *in vitro* shoots. Using half-TNC in ACM medium resulted in acceptable shoot length and the highest fresh and dry shoot weight. Increasing TNC concentration to 1.5 or decreasing to 0.5 was reflected in inhibition of shoot initiation but no statistical significant differences was observed between NH_4^+: NO_3^-- 1:1 treatment and the control. Most green intensity was recorded in 1.5 TNC of ACM medium with NH_4^+: NO_3^-- 1:1 treatment. This research showed that decreasing to half-TNC in the aspen basic media improved shoot length, as the most determinant trait of *in vitro* mass propagation of aspen micropropagation.

Keywords: Aspen, micropropagation, ACM, ammonium, nitrate.