

Optimization of the micropropagation protocol for the UCB1 pistachio rootstock

*Fereshteh Kamiab

Associate Professor, Department of Horticulture-Ornamental Plants, Raf.C., Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran.

*Corresponding author: fereshteh.kamiab@iau.ac.ir

Recieved:2025/9/12

Accepted:2025/9/17

Abstract

Rootstock propagation is one of the most important applications of tissue culture and this industry has been expanding in recent years. UCB1 root stock pistachio is also one of the important rootstocks that is economically important for agriculture due to its good attributes. Considering its significance in agriculture industry, a study that determines the optimization of the micropropagation process of UCB1 pistachio in tissue culture conditions should be considered. The present study was conducted to develop an efficient protocol for in vitro organogenesis of pistachio through various optimizations of growth regulators. MS medium containing BAP (2mg/l) was the most suitable combination for bud establishment. shoots were cut into approximately 5-centimeter pieces and used in MS culture media containing 2 mg/l BAP Then, they were transferred to culture medium containing different concentrations of BAP (1-0.5-1.5-2 mg/L). The highest growth and regeneration rate of branches were observed in the DKW medium containing 1.5 mg/l BAP. The shoots were rooting in the medium with 2 mg/l IBA after the second cultivation and compatibility was done with 80% survival in peat moss and perlite. The results of the studies also showed that best regeneration in the culture medium containing 1.5 mg/l BAP was observed.

Keywords: Micropropagation, optimization, pistachio rootstock, shoot regeneration

Extended abstract

Introduction

Rootstock selection, indispensable for fruit cultivation, has become one of the significantly followed topics of research and development worldwide and in our country. The selection and use of rootstocks in fruit cultivation are extremely important. In recent years, there has been an increasing interest in clonal rootstocks with superior characteristics. The main desired features in clonal rootstocks include ease of propagation, uniform growth, possession of a vigorous root system, absence of graft incompatibility, resistance to various diseases and pests, good tolerance to abiotic stress conditions, reduction of the juvenile period of the grafted variety, positive effects on fruit yield and quality, and alternate bearing. The use of rootstocks obtained through vegetative propagation methods is rapidly increasing in world fruit cultivation. Research continues on the propagation of pistachio rootstocks through tissue culture, one of the vegetative propagation methods. *Pistacia* species are generally heterozygous and display segregation when propagated by seeds. Pistachio rootstocks propagated by seeds cause a decrease in yield and irregularities in newly established and old orchards. For this purpose, the micropropagation method under in vitro conditions offers a significant advantage for the production of *Pistacia* species. The micropropagation method facilitates the production of disease-free plant material, a high multiplication rate, ease in healthy plant production, and the ability to produce irrespective of the vegetative period. In recent years, with the introduction of vegetatively propagated rootstocks, producer's tendencies to use these rootstocks have increased. This will lead to uniformity in pistachio orchards in the near future. UCB-1 (*P. atlantica* x *P. integerrima*), a hybrid rootstock widely used and clonally propagated among *Pistacia* rootstocks, is obtained through interspecific hybridization breeding. It has become a preferred rootstock in the establishment of pistachio orchards. It is a strong rootstock that provides high yields in gardens where irrigation is available. It has high tolerance to salinity and cold (Jacygrad et al., 2020; Raoufi et al., 2020). This study aims to investigate the possibilities of micropropagation under in vitro conditions, a vegetative propagation method for UCB-1 rootstock, a hybrid of *Pistacia atlantica* and *Pistacia integerrima*. The performance of UCB-1 rootstock under in vitro conditions will be determined with different applications during the shoot formation and rooting stages.

Materials and Methods

This experiment was conducted in 1401 with the aim of optimizing the microbiology protocol of the ornamental plant *Philodendron Black* in the tissue culture laboratory of the Department of Agricultural Sciences, Islamic Azad University of Rafsanjan. Plant samples (whole plants) were divided into smaller pieces using a sharp blade and superficial washing with running water for 30-40 minutes. After that, the samples were exposed to 70% alcohol under a laminar hood for 45 seconds and then exposed to 2.5% sodium hypochlorite with one to two drops of Tween 20 for 15 minutes and finally washed three to five times with sterile distilled water. shoots were cut into approximately 5-centimeter pieces and used in MS culture media containing 2 mg/l BAP. Then, they were transferred to culture medium containing different concentrations of BAP (1-0.5-1.5-2 mg/L). The culture containers were transferred to a growth room with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness, a light intensity of 3000 lux, and a temperature of $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$. regeneration percentage, number of leaves, and seedling length were evaluated after thirty days. After several stage of proliferation, strong shoots were placed in rooting medium culture containing 2 mg/l of IBA. After rooting stage, plants were adapted in peat moss and perlite.

Results and Discussions

Multiple shoots were induced from nodal segments of mature trees of *Pistacia vera* L. on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with benzylaminopurine (BAP). Maximum shoot production was obtained from shoot tips taken from in vitro proliferated shoots when cultured on solidified DKW medium containing 1.5 mg/l BAP on the 30th day. Rooting of microshoots was achieved in 1/2 MS medium supplemented with indole butyric acid (IBA). Rooted plantlets reassumed independent growth after a short period of acclimatisation. Stable regenerated plants were established in the greenhouse.

Conclusion

In the study, the shoot medium containing BAP hormone yielded positive results. It was determined that the dose of 1/5 mg L-1 BAP provided the best results in terms of duration of shooting, However, in the study, rooting did not occur in the plantlets and transferred to the rooting medium.

vitrification is a common problem in in vitro micropropagation. With this phenomenon, a watery and transparent appearance of foliage and foliage with stem and wind are seen. The leaves have fewer stomata and the cuticle is usually very thin, and many of the stomata may have lost their function. There are several reports showing the effects of high levels of benzyl adenine on the development of vitrification. This experiment showed that High temperature in growth chamber increased vitirification and also, high agar concentration (7 g/l) decreased this problem.

بهینه سازی پروتکل ریزازدیادی پایه پسته UCB1

فرشته کامیاب*

دانشیار، گروه کشاورزی باغبانی-گیاهان زینتی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول:

fereshteh.kamiab@iau.ac.ir

پذیرش : ۱۴۰۴/۶/۲۶

دریافت : ۱۴۰۴/۶/۲۱

چکیده

تکثیر پایه های درختان میوه یکی از مهم ترین کاربردهای کشت بافت محسوب می شود و این صنعت در طی سالیان اخیر در حال گسترش بوده است. پایه رویشی پسته UCB1 نیز یکی از مهمترین پایه های درخت پسته است که به دلیل رشد زیاد و عملکرد زیاد و مقاومت به بیماری ها از نظر اقتصادی اهمیت زیادی برای کشاورزان و باغداران دارد. با توجه به گرایش زیاد کشاورزان و بهره اقتصادی مناسب این پایه اصلاح شده، انجام تحقیقی که بهینه سازی فرآیند ریزازدیادی پسته UCB1 در شرایط کشت بافت را مشخص نماید، ضروری به نظر می رسد. مطالعه حاضر به منظور فراهم ساختن پروتکلی کارآمد برای ریزازدیادی درون شیشه ای این پایه از طریق بهینه سازی غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد انجام گرفته است. ریز نمونه های جوانه انتهایی و جانبی به محیط استقرار حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP منتقل شدند و سپس بعد از رشد جوانه ها به منظور پرآوری به محیط های حاوی غلظت های مختلف BAP (۱-۰/۵-۲ میلی گرم در لیتر) انتقال یافتند. بیش ترین میزان رشد و میزان باززایی شاخساره در محیط کشت حاوی ۱/۵ میکروگرم در لیتر BAP مشاهده گردید. گیاهچه ها در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر از هورمون اسید اینول بوتیریک ۷۵ درصد ریشه دادند. و با ۸۰ درصد زنده مانی در پیت ماس و پرلیت سازگار شدند. بنابراین مناسب ترین محیط کشت برای پرآوری محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: باززایی شاخساره، بهینه سازی، پایه پسته، ریزازدیادی

انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد با گواهی CC BY-NC ۴.۰ صورت گرفته است.

[/http://creativecommons.org/licenses/by/4.0](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)



مقدمه

انتخاب پایه (Rootstock) که برای کشت درختان میوه ضروری است، به یکی از موضوعات مهم تحقیق و توسعه در سراسر جهان و کشور ما تبدیل شده است. انتخاب و استفاده از پایه‌ها در کشت میوه اهمیت بسیار زیادی دارد. در سال‌های اخیر، علاقه‌مندی به پایه‌های کلونال با ویژگی‌های برتر افزایش یافته است. ویژگی‌های مطلوب در پایه‌های کلونال شامل سهولت در تکثیر، رشد یکنواخت، داشتن سیستم ریشه‌ای، عدم ناسازگاری پیوند، مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفات، تحمل مناسب در برابر تنش‌های غیرزیستی، کاهش دوره نو نهالی پیوند، اثرات مثبت بر عملکرد و کیفیت میوه و کاهش تناوب باردهی می باشد (Ak and Korkmaz, 2019)

۱/۵ پسته‌ای که از طریق بذر تکثیر می‌شوند، باعث کاهش عملکرد و بی‌نظمی در باغ‌های جدید و قدیمی می‌شوند. هم ۹۵ چنین، نرخ موفقیت پیوند بین پایه و پیوندک نیز پایین است. مشخص شده است که نرخ جوانه‌زنی بذرهای گونه‌های پسته بسیار پایین است که این موضوع به‌ویژه برای تولیدکنندگان نهال یک مشکل مهم محسوب می‌شود. (Beede, 2017; Jacygrad et al., 2020)

برای حل این مشکل، روش ریزازدیادی (Micropropagation) در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) مزیت قابل توجهی برای تولید گونه‌های پسته فراهم می‌کند. این روش امکان تولید مواد گیاهی عاری از بیماری، نرخ تکثیر بالا، سهولت در تولید گیاه سالم و تولید مستقل از فصل رشد را فراهم می‌سازد (Iliev et al., 2010). در سال‌های اخیر، با معرفی پایه‌های تکثیر شده به‌صورت رویشی، تمایل تولیدکنندگان به استفاده از این پایه‌ها افزایش یافته است. این امر در آینده نزدیک منجر به یکنواختی در باغ‌های پسته خواهد شد. افزون بر این، پایه‌های کلونال دارای ویژگی‌های مثبتی مانند تحمل در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که علاقه‌مندی به تولید و تکثیر آن‌ها را افزایش داده است (Aghasi Kermani et al., 2017).

پایه هیبریدی UCB-1 (ترکیبی از *P. atlantica* و *P. integerrima*) یکی از پایه‌های پسته‌ای است که به‌طور گسترده استفاده شده و به‌صورت کلونال تکثیر می‌شود. این پایه از طریق اصلاح نژادی بین گونه‌ای به‌دست آمده و در سال‌های اخیر به پایه‌ای ترجیحی برای احداث باغ‌های پسته تبدیل شده است. این پایه قوی بوده و در باغ‌هایی که آبیاری مناسب دارند، عملکرد بالایی ارائه می‌دهد. هم چنین، تحمل بالایی نسبت به شوری و سرما دارد (Jacygrad et al., 2020; Raoufi et al., 2020).

کشت‌های آزمایشگاهی گونه‌های *Pistacia* با نرخ تکثیر بالا معمولاً به غلظت‌های نسبتاً بالای سیتوکنین برای تکثیر نیاز دارند (Benmahiou, 2017) و پس از آن، برای دستیابی به حداکثر ریشه‌زایی، به غلظت‌های بالای اکسین نیاز است (Tilkat et al., 2009).

مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نهال‌های *P. vera* در محیط‌هایی حاوی یکی از سه نوع مختلف سیتوکنین، از جمله meta-Topolin (mT) یا ۶-benzylaminopurine (BAPP)، عملکرد متفاوتی دارند. (کلونال مشتق شده از نهال‌های *P. vera* در محیط‌های حاوی mT به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی رشد گیاه، شاخه‌های قابل استفاده بیشتری تولید کرده و درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار به‌طور قابل توجهی بالاتر بود، در مقایسه با محیط‌هایی که حاوی BAP بودند).

بر اساس مطالعات محققان انتظار می‌رود که شاخه‌های پسته کشت شده با mT حداقل به اندازه BAP در شاخص‌های کمی تکثیر شاخه (Benmahiou et al., 2012) مانند شاخه‌دهی، افزایش وزن تر، طول کل شاخه‌ها) عملکرد داشته باشند. همچنین، استفاده از سیتوکنین mT احتمالاً باعث بهبود عملکرد ریشه‌زایی در مراحل بعدی خواهد شد.

در گزارش دیگری نشان دادند که بیشترین پرآوری پسته UCB1 در محیط کشت MS با یک میلی گرم در لیتر BAP صورت گرفت (Ekinci et al., 2023). هم چنین نشان داد که ترکیب هورمون‌های سیتوکینینی بنزیل امینو پورین (BAP) و متا توپولین با (mT) با غلظت‌های ۱۰ میکرومولار در لیتر بیشترین پرآوری و شاخه زایی را در پسته UCB-1 ایجاد کرد. هدف این مطالعه بررسی امکان ریزازدیادی پایه UCB-1 در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به‌عنوان یک روش تکثیر رویشی است. عملکرد این پایه در مراحل تشکیل شاخه و ریشه‌زایی با کاربردهای مختلف بررسی خواهد شد.

مواد و روش ها

این آزمایش در سال ۱۴۰۱ با هدف بهینه سازی پروتکل ریزاردیای پایه پسته UCB1 در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی رفسنجان انجام گردید. نمونه های گیاهی (چوانه های جانبی و انتهایی) از قسمت های جوان درختدر فصل بهار جدا شدند و به وسیله تیغ تیز به قطعات کوچک تر تقسیم گردیدند و آبشویی سطحی با آب جاری به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه صورت گرفت. پس از آن، نمونه ها در زیر هود لامینار به مدت ۴۵ ثانیه در معرض الکل ۷۰٪ و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در معرض هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به همراه یک الی دو قطره تواین ۲۰ قرار گرفتند و در نهایت سه الی پنج مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو شدند. ریز نمونه های چوانه در محیط استقرار MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۷ گرم اگر قرار گرفتند و پس از ۳۰ الی ۴۰ روز شاخه های رشد کرده از چوانه ها جدا گردید و به منظور تکثیر و پرآوری در محیط کشت DKW حاوی غلظت های مختلف BAP (۱-۱/۵-۲۰/۵ میلی گرم در لیتر) و ۶/۵ گرم اگر انتقال یافتند. ظروف کشت به اتاق رشد به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای روز ۲۷±۱ درجه سانتیگراد و دمای شب ۲۵±۱ انتقال داده شدند. درصد شاخه های جدید ایجاد شده و تعداد برگ و طول شاخساره ۲۸ روز بعد از ساب کالچر اندازه گیری شدند. سپس شاخه های بلند و رشد یافته پس از چند مرحله پرآوری و ساب کالچر قبل از چوبی شدن به محیط یک دوم MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر هورمون ریشه زایی IBA منتقل و پس از ۲۰ روز ریشه های ستاره ای مشخص گردید و در سینی کشت های ۱۱۲ حفره ای کشت گردیدند در گلخانه سازگاری مراحل سازگاری انجام شد نحوه سازگاری به این صورت بود که طی دو هفته رطوبت نسبی از ۱۰۰ درصد به ۵۰ درصد کاهش یافت (دمای محیط سازگاری ۲۲ تا ۲۷ درجه) و از زیر پلاستیک سازگاری خارج گردیدند و در محیط طبیعی گلخانه قرار گرفتند و ۸۰ درصد گیاهان سازگار شدند. مراحل ریزاردیای از استقرار تا سازگاری در شکل یک نشان داده شده است.



شکل ۱: مراحل مختلف ریزاردیای استقرار ریزنمونه، پرآوری و ریشه زایی و سپس سازگاری در گلخانه پسته UCB1

روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

برای اطمینان از نرمال بودن داده ها، تست نرمال به روش کولموگروف-اسمیرنوف انجام و سپس با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه واریاس گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا و میانگین ها نیز بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه گردید و رسم منحنی ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. تمامی تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ صورت پذیرفت. داده های جمع آوری شده از هر دو مرحله آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) با ۳ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از تأیید نرمالیت داده ها، برای مقایسه میانگین ها بین تیمارهای مختلف، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در مواردی که تفاوت معنی داری مشاهده گردید ($P < 0.05$)، مقایسه میانگین های گروهی با استفاده از آزمون مقایسه چندگانه LSD (Least Significant Difference) انجام شد تا تفاوت های معنی دار بین هر جفت از تیمارها مشخص شود. تمامی تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این پژوهش در مورد بهینه سازی پروتکل های کشت درون شیشه ای پسته در بخش های زیر ارائه شده است.

نتایج و بحث

در جدول (۱)، اثر سطوح مختلف هورمون بنزیل آدنین (BAP) شامل غلظت های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی گرم در لیتر، بر سه شاخص مهم شامل درصد باززایی شاخساره، تعداد برگ و طول شاخساره بررسی شده است. نتایج حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) نشان داد که تفاوت بین سطوح مختلف BAP از نظر درصد باززایی شاخساره و طول شاخساره معنادار بوده است ($P < 0.05$)، در حالی که در تعداد برگ تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P = 0.978$).

بیش ترین درصد باززایی مربوط به سطح ۱/۵ میلی گرم در لیتر (با میانگین 79.50 ± 0.50) و بیش ترین طول شاخساره مربوط به سطح ۲ میلی گرم در لیتر (با میانگین 0.54 ± 0.03 سانتی متر) بوده است.

جدول ۱: میانگین $\pm$ انحراف معیار درصد باززایی شاخساره، تعداد برگ و طول شاخساره تحت تأثیر سطوح مختلف هورمون BAP

طول شاخساره (cm)	تعداد برگ	درصد باززایی شاخساره	سطح (Treat- ment)
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
0.00 ± 0.00	1.53 ± 3.67	0.00 ± 0.00	۰/۵۰
0.03 ± 2.22	4.00 ± 1.00	0.50 ± 69.50	۱/۰۰
0.04 ± 2.34	4.00 ± 1.00	0.50 ± 79.50	۱/۵
0.03 ± 2.54	4.00 ± 1.00	0.50 ± 49.50	۲/۰۰
0.2 ± 2.28	3.92 ± 1.00	31.98 ± 49.63	کل (Total)
.۰۰۰	.۹۷۸	.۰۰۰	P value

*One way ANOVA

نتایج مقایسه چندگانه LSD :

جهت بررسی دقیق تفاوت میانگین ها بین سطوح مختلف هورمون BAP، از آزمون مقایسه چندگانه LSD (Least Significant Difference) استفاده شد. نتایج به دست آمده برای هر متغیر وابسته در جدول ۲ و هم چنین به صورت بصری در نمودارهای (۴)، (۵) و (۶) به شرح زیر است:

- **درصد باززایی شاخساره:** بین تمامی سطوح مختلف غلظت BAP (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۰ میلی گرم در لیتر)، تفاوت معناداری از نظر درصد باززایی شاخساره مشاهده شد ($P < 0.001$) به ویژه، تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر، بالاترین درصد باززایی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. این موضوع نشان دهنده حساسیت بالای باززایی شاخساره به غلظت های مختلف BAP و اهمیت انتخاب غلظت بهینه برای حصول حداکثر باززایی است.
- **تعداد برگ:** بین تیمارهای مختلف از نظر تعداد برگ، هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشد. (به عبارتی، اگرچه میانگین تعداد برگ کمی بین سطوح مختلف BAP متغیر بود، این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبوده و نشان می دهد که BAP در غلظت های بررسی شده، تأثیر قابل توجهی بر تعداد برگ های تولیدی نداشته است.

- **طول شاخساره:** در خصوص طول شاخساره، تفاوت بین اغلب تیمارها معنادار بود ($P < 0.05$). بیشترین طول شاخساره مربوط به غلظت ۲,۰ میلی گرم در لیتر BAP بود که تفاوت معناداری با سطوح پایین تر داشت. بنابراین، افزایش غلظت BAP تا حدودی موجب افزایش طول شاخساره می شود، اما لازم به بررسی بیشتر در مطالعات آینده است تا غلظت بهینه برای هر دو شاخص (درصد باززایی و طول) مشخص شود.

جدول ۲: نتایج مقایسه چندگانه میانگین درصد باززایی شاخساره، تعداد برگ و طول شاخساره بین سطوح مختلف غلظت هورمون BAP با استفاده از آزمون LSD

نتیجه	سطح معناداری (Sig)	اختلاف میانگین (I-J)	غلظت (J)	غلظت (I)	متغیر وابسته
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۶۹/۵۰*	۱	۰/۵	درصد باززایی شاخساره
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۷۹/۵۰*	۱/۵	۰/۵	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۴۹/۵۰*	۲	۰/۵	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۱۰/۰۰*	۱/۵	۱	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۲۰/۰۰*	۲	۱	
معنادار	۰/۰۰۰۰	۳۰/۰۰*	۲	۱/۵	
غیر معنادار	۰/۷۳۳	-۰/۳۳۳	۱	۰/۵	تعداد برگ
غیر معنادار	۰/۷۳۳	-۰/۳۳۳	۱/۵	۰/۵	
غیر معنادار	۰/۷۳۳	-۰/۳۳۳	۲	۰/۵	
غیر معنادار	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۵	۱	
غیر معنادار	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۲	۱	
غیر معنادار	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۲	۱/۵	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۳۳۳*	۱	۰/۵	طول شاخساره (cm)
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۳۴۰*	۱/۵	۰/۵	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۵۳۷*	۲	۰/۵	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۱۱۷*	۱/۵	۱	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۳۱۳*	۲	۱	
معنادار	۰/۰۰۰۰	-۰/۱۹۳*	۲	۱/۵	

باززایی شاخساره

با افزایش غلظت BAP از ۰/۵ میلی گرم به ۱/۵ لیتر، درصد باززایی افزایش معنی داری پیدا کرد، به طوری که بیش ترین باززایی و تعداد برگ در تیمار ۱/۵ mg/l BAP مشاهده گردید. (نمودار ۱). سایتوکینین ها به تنهایی در محیط کشت، تشکیل شاخه را در بسیاری از گیاهان القا می کند (Rout et al., 2006).

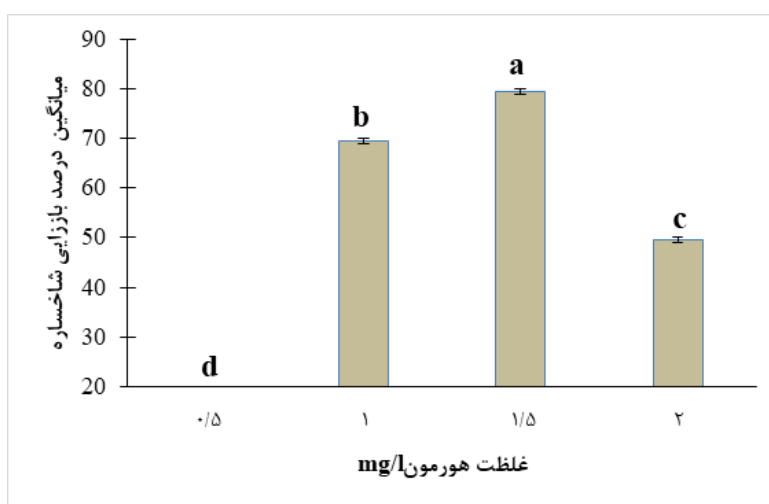
گونه های پسته مقاوم به رشد هستند و موفقیت ریزازدیادی کمی در شرایط درون شیشه ای دارند شرایط نشت مواد فنلی موجود در ساختار آن ها به درون ماده مغذی باعث تیره شدن محیط کشت و پیچیده شدن باززایی شاخه ها می شود. استفاده از نهال های جوان یکساله یا درختان جوان دو تا سه ساله در باغ منجر به موفقیت بالی استقرار می گردد و درصد بالایی از ریزنمونه ای جوانه در محیط کشت سبز می شوند. کاربرد گلوکونات کلسیم و گلوتامین در محیط کشت پرآوری به طور موثری میزان رشد شاخساره و سوختگی انتهایی را کاهش داد.

بیش ترین درصد باززایی مربوط به هورمون بنزیل آمینو پورین در سطح ۱/۵ میلی گرم در لیتر بود که در آزمایشی مشابه محققین دیگر نشان دادند که این هورمون در سطح یک میلی گرم در لیتر به همراه نفتالین استیک اسید بیشترین باززایی را در پسته نشان داده است (Nadalizadeh et al., 2023). در این آزمایش نیز در تمام تیمارهای هورمونی از هورمون نفتالین استیک اسید به مقدار ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر به همراه بنزیل آمینو پورین استفاده شد. با افزایش غلظت هورمون بیشتر از ۱/۵ میلی گرم در لیتر درصد باززایی کاهش یافت که موافق نتایج آزمایشات قبلی بوده است (Ekinci et al., 2023).

در آزمایشی دیگر بیان شد که BAP نسبت به Kin در باززایی شاخه مؤثرتر است که همسو با نتایج آزمایش این پژوهش است (Vishwakarma et al., 2013).

اثر تحریک کنندگی BAP در ساقه زایی در چندین گونه گیاهی دارویی و آروماتیک گزارش شده است.

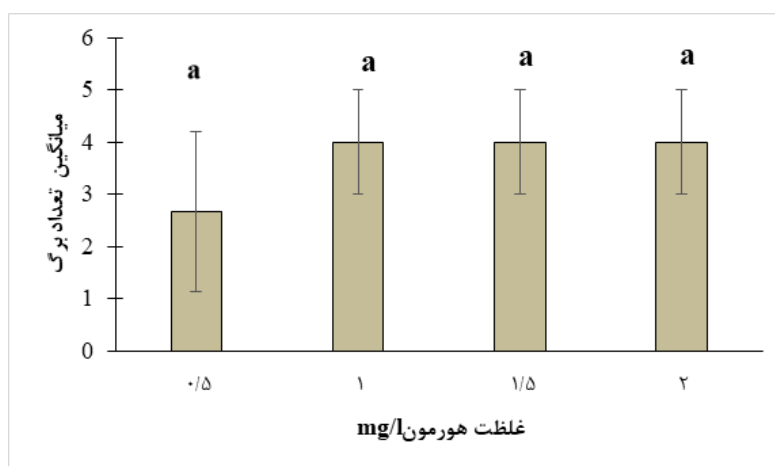
بیش ترین طول گیاهچه در تیمارهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. ریشه زایی در تمام گیاهچه های حاصل، پس از واکشت دوم با درصدهای مشابه صورت پذیرفت. تنها در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، تعداد ریشه های تولیدشده بیش تر از سایر تیمارها بوده است.



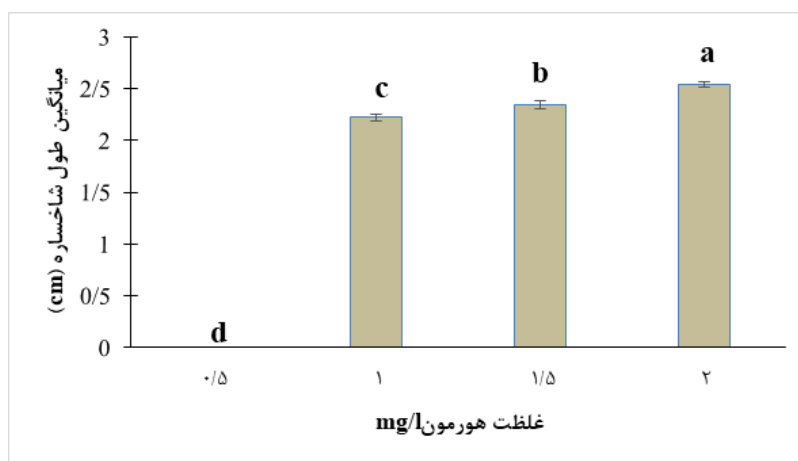
نمودار ۱: میانگین درصد باززایی شاخساره

یافته ها نشان می دهد رابطه ی نزدیکی بین طول شاخساره و شمار برگ و گره وجود دارد. بیش ترین طول و تعداد برگ در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شده است (نمودار ۲ و ۳).

در این سه نمودار، میانگین و انحراف معیار متغیرهای مختلف (درصد باززایی شاخساره، تعداد برگ و طول شاخساره) در تیمارهای مختلف غلظت BAP (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۰ میلی گرم در لیتر)، نمایش داده شده اند. حروف انگلیسی بالای هر ستون نمایانگر نتایج آزمون مقایسه میانگین ها (LSD) هستند؛ تیمارهایی که حروف متفاوت دارند، از نظر آماری تفاوت معنی دار نشان می دهند (سطح معنی داری ۰/۰۵).



نمودار ۲: میانگین تعداد برگ و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی



نمودار ۳: میانگین طول شاخساره و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی

ریشه زایی

به منظور ریشه دهی شاخه های جدید رشد کرده در محیط پراوری ، شاخه های بلند قبل از چوبی شدن جدا شدند و کالوس آن ها حذف گردید و در محیط یک دوم MS حاوی هورمون دو میلی گرم در لیتر از اسید ایندول بوتیریک قرار داده شدند و بعد از ۲۰ روز ریشه های ستاره ای ۷۵ درصد مشاهده گردید و مشابه نتایج آزمایش دیگر می باشد (Benmahiou ۲۰۱۷).

نتیجه گیری

ریزازدیادی درون شیشه ای یک روش مؤثر برای ازدیاد سریع گونه هاست که باعث تولید نتاجی با یکنواختی بالا می شود. بنابراین ایجاد تکنیک های کشتی کارآمد و منطقی و فرموله کردن ترکیب محیط کشت مناسب برای اندام خاص بعنوان یک شرط لازم برای ازدیاد درون شیشه ای گیاه می باشد. ژنوتیپ های مختلف با داشتن سطوح مختلف هورمون های داخلی اکسین و سیتوکینین پاسخ های مختلفی نسبت به شرایط محیط کشت نشان می دهند.

به عبارت دیگر ریزازدیادی یک روش تولید گیاهان در مقیاس وسیع است که از کشت بافت گیاهی استفاده می کند. در این روش، از جوانه های انتهایی و جانبی پسته به عنوان مواد اولیه استفاده شد و این بخش ها در محیط های کشت استریل و حاوی هورمون بنزیدل امینو پورین و نفتالین استیک اسی تکثیر شدند.

تکثیر پایه های رویشی درختان میوه یکی از مهم ترین کاربردهای کشت بافت محسوب می شود و این صنعت در طی سالیان اخیر در حال گسترش بوده است. با توجه به گرایش زیاد باغ داران و بهره اقتصادی مناسب پایه پسته UCB1، انجام تحقیقی که پروتکل ریزازدیادی این گیاه در شرایط درون شیشه ای را مشخص نماید ضروری به نظر می رسید. بر این اساس آزمایشی جهت بررسی فرایند ریزازدیادی پسته UCB1 با استفاده محرک های رشد انجام شد.

بیش ترین میزان رشد و میزان باززایی شاخساره در محیط کشت حاوی ۱/۵ میکروگرم در لیتر BAP مشاهده گردید. گیاهچه ها در همان محیط کشت پس واکشت دوم ریشه زایی گردید و با صد در صد زنده مانی در پیت ماس و پرلیت سازگار شدند.

ضمن آنکه شیشه ای شدن یا ویتریفیکاسیون یکی از مسائل معمول در ریزازدیادی درون شیشه ای می باشد. گیاهچه های دارای این عارضه، ظاهری آبکی و شفاف داشته و اغلب با ساقه و برگ باد کرده مشاهده می شوند. برگ ها فاقد بافت پارانشیم نردبانی مطلوب بوده ولی در عوض دارای مزوفیلی با فضای بین سلولی بزرگ می باشند. برگ ها دارای تعداد روزنه کمتری بوده و معمولاً کوتیکول آن خیلی نازک می باشد بعلاوه بسیاری از روزنه ها ممکن است کارآیی خود را نیز از دست داده باشند. گزارش های متعددی وجود دارند که نشان دهنده ی تاثیر غلظت های بالای بنزیدل آدنین در ظهور شیشه ای شدن است. از طرف دیگر غلظت بالاتر اگر و کنترل دمای اتاق رشد بین ۲۲ تا ۲۷ درجه شیشه ای شدن را به طور قابل ملاحظه ای کاهش داد.

1. Ak, B.E. and Korkmaz, S. 2019. The usage and importance of dwarf rootstocks in modern fruit growing. Proceedings Book of 1st International Gobeklitepe Agriculture Congress, (ISBN 978-975-7113-71-3), p. 671-676.
2. Aghasi Kermani, S., HokmaBAPdi, H. and GhanBAPri Jahromi, M. 2017. The evaluation of the effect of Multiwall Carbon Nano Tube (MWCNT) on in vitro proliferation and shoot tip necrosis of pistachio rootstock UCB-1 (*P. integerrima* × *P. atlantica*). Journal of Nuts, 8(1): 49-59.
3. Benmahioul, B. 2017. Factors affecting in vitro micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera* L.). Agriculture and Forestry Journal, 1(1), 56-61.
4. Beede, R.H. 2017. Pistachio canopy management and its effect on yield components. 8 th Advanced in Pistachio Production, University of California, Davis.
5. Benmahioul, B. 2017. Factors Affecting in vitro Micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera* L.), Agriculture and Forestry Journal, 1(1): 56-61.
6. Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M. and Daguin, F. 2012. Micropropagation and ex vitro Rooting of Pistachio (*Pistacia vera* L.), Plant Cell Tissue Organ Culture, 108: 353–358
7. Ekinçi, H., Bekir Erol, A.K. and Saskin, N. 2023. Screening of some chemical disinfectants for explant sterilization during in vitro micropropagation of UCB-1 (*P. atlantica* × *P. integerrima*). In Baplkkan Agricultural Congress. p. 159.
8. Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G. and Jain, S.M. 2010. Plant micropropagation. Plant cell culture: essential methods, 1:1-23.
9. Jacygrad, E., Preece, J.E., Palmer, W.J., Michelmore, R. and Golino, D. 2020. Phenotypic segregation of seedling UCB-1 hybrid pistachio rootstock. Trees, 34: 531-541.
10. Lewis, F. 2021. Comparing the effects of cytokinin source and concentration on shoot growth in a micropropagation system of UCB-1 interspecific *Pistacia* rootstock. University of California, Davis.
11. Nadalizadeh Ghannad, A., Marashi, H., Seifi, A. and Moshiri, F. 2023. Optimization of callus induction and shoot regeneration in leaf and stem of *Pistacia vera* L. and UCB-1 (*P. atlantica* × *P. integerrima*). Plant Biotechnology Reports, 17(5): 605-613.
12. Rout, G.R., Mohapatra, A. and Mohan Jain, S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances, 24: 531-560.
13. Vishwakarma, U.R., Gurav, A.M. and Sharma, P.Ch. 2013. Regeneration of multiple shoots from petiole callus of *Viola serpens* Wall. Pharmacognosy Research, 5: 86-92.
14. Tilkat, E., Onay, A. and Ozden Tokatli, Y. 2009. In Vitro Rooting Improvement of Adult Pistachio, *Pistacia vera* L. 'ATLI'. Acta Horticulture. 839: 215-221.