بهینه‌سازی پرآوری و ریشه‌زایی سه رقم پسته (*Pistachio vera* L.) در کشت درون‌شیشه‌ای با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

حدیثه حاج جعفری نژاد[۱]، مریم دهستانی اردکانی[۲*]، کاظم کمالی[۳]

تاریخ ارسال: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۹

چکیده

ریزازدیادی پسته (*Pistacia vera* L.) به دلیل وابستگی شدید به ژنوتیپ، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و پاسخ متفاوت به تنظیم‌کننده‌های رشد، با چالش‌های متعددی همراه است. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی مراحل مختلف ریزازدیادی شامل استقرار، پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های دانهالی ارقام "تیرماهی اردکان"، "تیرماهی میبد" و "حاج‌عبدالهی" انجام شد. ریزنمونه‌ها پس از جوانه‌گیری بذور و ضدعفونی با کلریدجیوه در زمان‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه، در محیط کشت MSمستقر شدند. مرحله پرآوری شاخساره با سطوح مختلف BA (۰ تا ۴ میلی‌گرم در لیتر) وIBA (۰ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و مرحله ریشه‌زایی (در رقم "تیرماهی اردکان") با هشت تیمار محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و NAA انجام شد. نتایج نشان داد که مدت زمان ضدعفونی، اثر معنی‌داری بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه به ترتیب نمره ۱/۷۷ و ۱/۸۸ از ۵ ثبت شد. در مرحله پرآوری، بیشترین تعداد شاخه (۵/۶۶ شاخه به ازای هر ریزنمونه) در رقم "تیرماهی اردکان" در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین طول شاخساره نیز ۳/۹۲ سانتی‌متر در رقم "حاج‌عبدالهی" با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA ثبت شد. در مرحله ریشه‌زایی، تیمار MS حاوی ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر تیامین + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط‌کشت WPMهمراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد (۵/۴ ریشه) و طول ریشه (۲/۶۸ سانتی‌متر) را ایجاد کردند. این نتایج نشان می‌دهد که بهینه‌سازی محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد به‌صورت وابسته به ژنوتیپ، نقش کلیدی در موفقیت ریزازدیادی پسته دارد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، شاخه‌زایی، ریزنمونه، ریشه‌زایی، قهوه‌ای شدن.

۱ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان.
۲ دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان.
۳ دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، ایران.
* نویسنده مسئول: mdehestani@ardakan.ac.ir

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) از مهم‌ترین محصولات آجیلی به‌شمار می‌رود که به‌دلیل سازگاری با شرایط کم‌آبی و ارزش تغذیه‌ای بالا، به‌ویژه در نواحی خشک و نیمه‌خشک جایگاه ویژه‌ای دارد (Yang *et al*., 2005; Nezami & Gallego, 2023; Ranjbar *et al*., 2025). این محصول نقش اقتصادی کلیدی در کشورهای واقع در مناطق نیمه‌بیابانی و بیابانی خاورمیانه، آسیای مرکزی، حوزه مدیترانه و ایالات متحده آمریکا (عمدتاً ایالت کالیفرنیا) ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که از حدود یک میلیون تن پسته تولیدی جهان، نزدیک به ۹۸/۶۴ درصد آن در پنج کشور ایالات متحده آمریکا، ترکیه، ایران، چین و سوریه تولید می‌شود (Faostat, 2020). روش‌های سنتی تکثیر این گیاه مانند قلمه‌زنی اغلب با مشکلاتی مواجه‌اند و پیوند زدن، هرچند معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد، از ناسازگاری پیوندک- پایه و نرخ بقای پایین رنج می‌برد (Yang *et al*., 2005; Mohammed & Arkwazee, 2024). این چالش‌ها تحقیقات قابل توجهی را در زمینه تکنیک‌های کشت بافت پسته، با هدف تکثیر کلونی کارآمد، بهبود ژنتیکی و حفاظت از ژرم‌پلاسم، به دنبال داشته است (Yang *et al*., 2005; Nezami & Gallego, 2023; Mojtahedi & Zadeh Parizi, 2008; Kaushik *et al*., 2025).

کشت بافت یا ریزازدیادی، شامل کشت درون شیشه‌ای سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌های گیاهی در شرایط کنترل‌شده برای تولید کلون‌های عاری از بیماری و تسهیل تولید انبوه است (Kaushik *et al*., 2025; Sindhu *et al*., 2025). این رویکرد مزایایی مانند تکثیر سریع، بهبود ژنتیکی و حفظ طولانی‌مدت منابع ژنتیکی را ارائه می‌دهد، به ویژه برای گونه‌هایی که ظرفیت باززایی کمی از طریق روش‌های مرسوم مانند پسته دارند (Sindhu *et al*., 2025; Açikgöz *et al*., 2025). بررسی‌های اولیه، پتانسیل کشت بافت برای پسته را برجسته کرده و بر نقش آن در غلبه بر موانع تکثیر تأکید دارند (Yang *et al*., 2005). تحقیقات بر جنبه‌های مختلفی از جمله توسعه پروتکل‌های عملی برای ریزازدیادی پایه‌های مهم پسته و ارقام تجاری متمرکز شده‌اند (Azghandi *et al*., 2008). این پروتکل‌ها معمولاً شامل چندین مرحله هستند: ضدعفونی سطحی، استقرار کشت، فرمولاسیون محیط کشت پایه و بهینه‌سازی تنظیم‌کننده‌های رشد برای تکثیر شاخه و ریشه‌زایی (Kaushik *et al*., 2025; Azghandi *et al*., 2008). علی‌رغم پیشرفت‌ها، کشت بافت پسته هنوز با چالش‌هایی از جمله شیشه‌ای شدن، تراوش فنلی منجر به قهوه‌ای شدن و فراوانی کم باززایی در برخی ژنوتیپ‌ها مواجه است (Akdemir *et al*., 2014; Kilic & Uysal, 2023). یکی از چالش‌های مهم در کشت بافت پسته،

ظرفیت پایین باززایی است (Açikgöz *et al*., 2025). مطالعات، ترکیبات مختلف محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGR) را برای بهبود پتانسیل تکثیر ارقامی مانند 'Uzun' و 'Siirt' بررسی کرده‌اند (Açikgöz *et al*., 2025). به‌عنوان مثال، تیمار ضدعفونی با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه، نرخ ضدعفونی بالا (۸۰٪) و نرخ آلودگی پایین (۲۰٪) را برای بذرهای 'Siirt' فراهم کرد، به طوری که نرخ جوانه‌زنی در برخی آزمایش‌ها به ۷۱٪ رسید (Açikgöz *et al*., 2025).

انتخاب نوع ریزنمونه نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت کشت بافت دارد. همان‌گونه که در مطالعات مربوط به سیستم‌های غوطه‌وری موقت در پسته‌های جوان گزارش شده است، ریزنمونه‌های نوک شاخه و جوانه‌های گره‌ای از متداول‌ترین و کارآمدترین گزینه‌ها به شمار می‌روند (Akdemir *et al*., 2014). در گونه‌های خویشاوند پسته، از جمله *Pistacia lentiscus* L.، پژوهش‌ها عمدتاً بر استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخه استخراج‌شده از درختان بالغ بنه متمرکز بوده‌اند. این مطالعات به بررسی چالش‌هایی نظیر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، تأثیر زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (مانند نوامبر، دسامبر و ژانویه) و همچنین تفاوت‌های ژنوتیپی در میزان موفقیت کشت پرداخته‌اند (Kilic & Uysal, 2023).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs)، به ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، نقش مهمی در کنترل تقسیم سلولی، تمایز و اندام‌زایی در کشت بافت دارند. غلظت‌ها و ترکیبات بهینه آنها به صورت تجربی برای هر گونه و نوع ریزنمونه تعیین می‌شود تا تشکیل کالوس، تکثیر شاخه و توسعه ریشه را القا کند (Azghandi *et al*., 2008). مطالعات پیشین در زمینه ریزازدیادی نشان داده‌اند که ترکیب محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در موفقیت جوانه‌زنی و تکثیر شاخه در ارقام مختلف دارد. به‌عنوان مثال، بیشترین درصد جوانه‌زنی در ارقام پسته 'Siirt' و 'Uzun' به‌ترتیب حدود ۷۱ و ۶۹ درصد در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۶-بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA) و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید (GA_3) گزارش شده است (Açikgöz *et al*., 2025). همچنین نتایج حاصل از تکثیر شاخه نشان داد که محیط کشت MS در مقایسه با محیط گیاهان چوبی (WPM) کارایی بالاتری داشت و موجب افزایش تعداد و طول شاخه‌ها شد. در این راستا، استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌عنوان دوز بهینه سیتوکینین معرفی شده و در هر دو رقم، میانگین حدود ۲/۶ شاخه در هر ریزنمونه را به همراه داشته است. اگرچه رقم 'Siirt' از نظر تعداد و طول شاخه‌ها عملکرد

بهتری نسبت به 'Uzun' نشان داده است، تفاوت بین ارقام از نظر آماری معنی‌دار نبوده است. این یافته‌ها بر اهمیت انتخاب مناسب محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد در بهینه‌سازی فرایند ریزازدیادی تأکید دارند (Açikgöz *et al*., 2025). در مطالعه‌ای Kilic & Uysal (۲۰۲۳) به تکثیر درون شیشه‌ای درختان بنه (*Pistacia lentiscus* L.)و بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر جوانه‌زنی و ریشه‌دهی پرداخت. استفاده از BAP و GA3 باعث افزایش تشکیل جوانه و تیمار IBA بیشترین موفقیت ریشه‌دهی را در ژنوتیپ وحشی ایجاد کرد. بهرام‌نژاد و همکاران (۱۳۹۸) در پژوهشی نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزافزایی پسته رقم "بادامی زرند" را بررسی کردند. نتایج نشان داد که افزودن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و زغال فعال تأثیر معنی‌داری بر مقدار استقرار جوانه‌ها نداشت. بیشترین شمار نوساقه در محیط‌کشت DKW (Driver-Kuniyuki.Walnut) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA یا حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک‌اسید (GA) و هم‌چنین در محیط کشت نیم‌غلظت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA یا ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA به‌دست آمد. رشد طولی نوساقه‌ها در محیط کشت MS بیشتر بود.

با توجه به اهمیت اقتصادی پسته، محدودیت‌های روش‌های سنتی تکثیر، و چالش‌های موجود در کشت بافت این گونه از جمله قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، ظرفیت پایین باززایی و وابستگی ژنوتیپی پاسخ‌ها، هدف از این پژوهش بهینه‌سازی مراحل کلیدی ریزازدیادی شامل استقرار، پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی سه رقم پسته در شرایط درون‌شیشه‌ای بود. به‌طور مشخص، این مطالعه با هدف بررسی اثر مدت زمان ضدعفونی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها) و نوع محیط کشت بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی ارقام مختلف پسته انجام شد تا ترکیب‌های هورمونی و محیط کشت مناسب برای افزایش کارایی تکثیر، بهبود رشد گیاهچه‌ها و دستیابی به پروتکل پایدار و قابل تکرار ریزازدیادی پسته معرفی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه بذری رقم "تیرماهی" از شهرستان‌های اردکان و میبد و نمونه بذری رقم "حاج‌عبدالهی" از شهرستان اردکان استان یزد از درختان پایه بذری ۸۰-۷۰ ساله تهیه شد. پس از جدا کردن لایه پریکارپ، بذرها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا کاملاً خشک شدند (Benamar *et al*., 2009). سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار گرفتند. به منظور ضد عفونی بذرها از هیپوکلریت سدیم ۱۰ ٪ و قارچ کش بنومیل دو در هزار استفاده شد (Tokatli *et al*., 2010). سپس بذرها داخل

گونی نخی مرطوب برای جوانه‌زنی نگهداری شدند. پس از چهار تا پنج روز که در بذرها جوانه‌زنی صورت گرفت، بذرها به گلدان‌های پلاستیکی مشکی رنگ با عمق ۳۰ و قطر ۱۴ سانتی‌متر حاوی ماسه، در عمق چهار تا پنج سانتی‌متر کشت شدند. بعد از اینکه دانهال‌ها به طول ۳۰-۲۵ سانتی‌متر (چهار تا پنج هفته بعد از کشت بذر) رسیدند، اقدام به جوانه‌گیری شد. نمونه‌های جدا شده (به اندازه ۱۵- ۱۰ میلی‌متر) پس از حذف برگ‌ها و شاخه‌های اضافی برای کشت آماده شدند (Safari *et al*., 2013).

ضدعفونی ریزنمونه‌ها

به منظور کاهش آلودگی جوانه‌ها، فلس‌برداری از روی آنها صورت گرفت. منتها لازم بود فقط لایه‌های رویی فلس‌های جوانه برداشته شود چون در غیر این صورت جوانه‌های استفاده شده در محلول‌های ضدعفونی کننده به شدت نکروز شده و در محیط کشت قادر به رشد و نمو نبودند. برای ضدعفونی و همچنین کاهش تولید فنل، ابتدا نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه در ۰/۰۵ گرم اسید سیتریک محلول در ۱۰۰ میلی‌لیترآب مقطر شستشو داده شدند، سپس به محلول حاوی ۰/۰۵ گرم اسید سیتریک + ۰/۸ گرم کلریدجیوه محلول در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل و به مدت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه ضدعفونی گردید و در نهایت به آب مقطر حاوی اسید سیتریک به مدت دو تا سه دقیقه برای شستشو منتقل گردید (این مرحله برای سه مرتبه تکرار شد تا مواد ضد عفونی کننده کاملاً شست-وشو داده شوند). پس از ضدعفونی، نمونه‌های گیاهی به روی کاغذ صافی استریل منتقل و سپس به محیط کشت منتقل شدند (شکل ۲الف). لازم به ذکر است که عملیات ضدعفونی و استقرار گیاهان در محیط کشت در زیر لامینار و در مجاورت شعله چراغ الکلی با دقت انجام شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار صورت گرفت.

استقرار ریزنمونه‌ها

پس از ضدعفونی، جهت استقرار ریزنمونه‌ها از محیط کشت MS، (Murashige & skoog, 1962) استفاده شد. ریزنمونه‌ها در شیشه‌های مربایی با قطر دهانه هفت و طول ۱۰ سانتی‌متر به عنوان ظروف کشت شدند (شکل ۲ ب). هدف از این مرحله در سیستم ریزازدیادی استقرار ریزنمونه استریل در کشت و تحریک فرایند نمو شاخه برای ازدیاد در مرحله بعدی بود. پس از کشت، شیشه‌ها به اتاقک رشد منتقل شده و تحت شرایط نوری با شدت ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین دمای محیط در دوره تاریکی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در دوره روشنایی بین ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید (Mingao *et al*., 2011). پس از کشت و نگهداری گیاهچه‌ها در شرایط مناسب برای رشد، واکشت نمونه‌ها

هر سه تا چهار هفته یک‌بار انجام گرفت و پس از واکشت دوم نمونه‌ها به محیط‌های شاخه‌زایی انتقال یافتند.

پرآوری شاخساره

پس از استقرار نمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای و تشکیل شاخساره‌ها به اندازه سه تا چهار سانتی‌متر از آنها برای پرآوری استفاده شد. در این آزمایش مقادیر BA در ۷ سطح (۰، ۰/۱، ۰/۴، ۰/۷، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و IBA در دو سطح (۰ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز ترکیبی از آنها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲ ج). پس از گذشت شش هفته از کشت، طول شاخه‌های پرآوری شده و تعداد شاخه‌ها ارزیابی شدند. مرحله پرآوری در قالب فاکتوریل به صورت طرح کامل تصادفی با ۱۴ تیمار، سه رقم در شش تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

ریشه‌زایی

بعد از شاخه‌زایی وقتی طول شاخه‌های ایجاد شده به پنج تا هفت سانتی‌متر رسید، به محیط ریشه‌زایی وارد شدند. در این آزمایش ریشه‌زایی فقط روی گیاهچه‌های پسته رقم "تیرماهی اردکان" صورت گرفت. در مرحله ریشه‌زایی نیز از هشت تیمار مختلف محیط‌کشت (مانند MS، ½ MS، WPM (Woody Plant Medium) و LS (Linsmaier-Bednar & Skoog, 1966) و نیز تنظیم کننده‌های رشدی (IBA و NAA) استفاده شد. مرحله ریشه‌زایی در قالب طرح کامل تصادفی با هشت تیمار، در رقم " تیرماهی اردکان" و در شش تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از مدت زمان ۲۱ روز نوک ریشه‌های خارج شده از قسمت پایین قلمه‌ها آشکار شد (شکل ۲ د). البته برای ریشه‌زایی از تیمارهای مختلف تاریکی و روشنایی استفاده شد، که مدت زمان هفت روز تاریکی اولیه به منظور القاء ریشه‌زایی مد نظر قرار گرفت. مرحله ریشه‌زایی حدود چهار هفته به طول انجامید و پس از آن تعداد و طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. تیمارهای مورد استفاده جهت ریشه‌زایی به شرح زیر بودند:

(T1): محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد گیاهی

(T2): محیط کشت MS + ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر تیامین + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T3): محیط کشت MS ۱/۲ + ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر تیامین + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T4): محیط کشت MS + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T5): محیط کشت WPM + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T6): محیط کشت MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T7): محیط کشت WPM + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA

(T8): محیط کشت LS + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

سازگاری

پس از اینکه گیاهچه‌ها در محیط کشت ریشه‌دار شدند، از شیشه خارج (در شرایط غیر استریل) و آگار چسبیده به ریشه‌ها با احتیاط و به طور کامل با آب جاری شست‌وشو داده شد تا برای انتقال به محیط خاک آماده شوند. محیط مورد استفاده شامل کوکوپیت: پرلیت به نسبت ۲: ۱ بود. ترکیب مورد نظر با قارچ‌کش بنومیل ۱ در ۱۰۰۰ ضد عفونی شد. پس از انتقال گیاهچه‌ها به خاک، گلدان‌ها زیر سرپوش‌های مناسب قرار گرفتند. طی ۱۰ روز اول در رطوبت ۹۰٪ نگهداری شدند و به تدریج با هوادهی گیاهان به شرایط کمبود رطوبت و شرایط عادی سازگار شدند. لازم به ذکر است که گیاهان در شرایط نوری شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت محیط حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی داده‌ها از نظر نرمال بودن آزمون شده و تجزیه و تحلیل آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

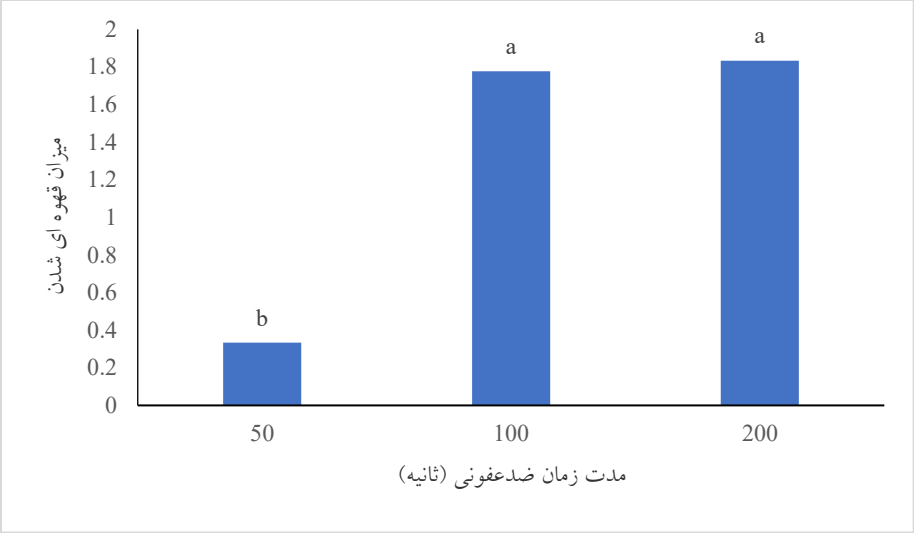
بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثر مدت زمان ضدعفونی در سطح احتمال یک درصد بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر رقم و اثر متقابل رقم و مدت زمان ضدعفونی بر میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها تأثیر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر رقم و تیمار بر میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سه رقم پسته.

		میانگین مربعات	
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی	قهوه‌ای شدن
رقم (A)	۲	^{ns}۰/۱۳	^{ns}۰/۹۱
مدت زمان ضدعفونی (B)	۲	^{ns}۰/۰۲	**۱۳/۰۱
A×B	۴	^{ns}۰/۰۲	^{ns}۰/۲۴
cv	-	۱۵/۱۸	۸/۳۱
خطا	–	۰/۷۴	۰/۴۱

** دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns}: عدم معنی‌داری

با توجه به شکل ۱، با افزایش مدت زمان ضدعفونی از ۵۰ به ۱۰۰ ثانیه به‌طور معنی‌داری میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها افزایش یافت. بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه با نمره ۱/۷۷ و ۱/۸۸ به‌دست آمد (شکل ۱)



شکل ۱- مقایسه میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌های باغی تحت اثر زمان‌های مختلف ضدعفونی در سه رقم پسته مورد مطالعه

شکل ۲- مراحل رشدی ریزنمونه‌های دانهالی الف: کشت ریزنمونه جوانه، ب: مرحله استقرار، ج: پرآوری و د: ریشه‌زایی در رقم "تیرماهی اردکان"

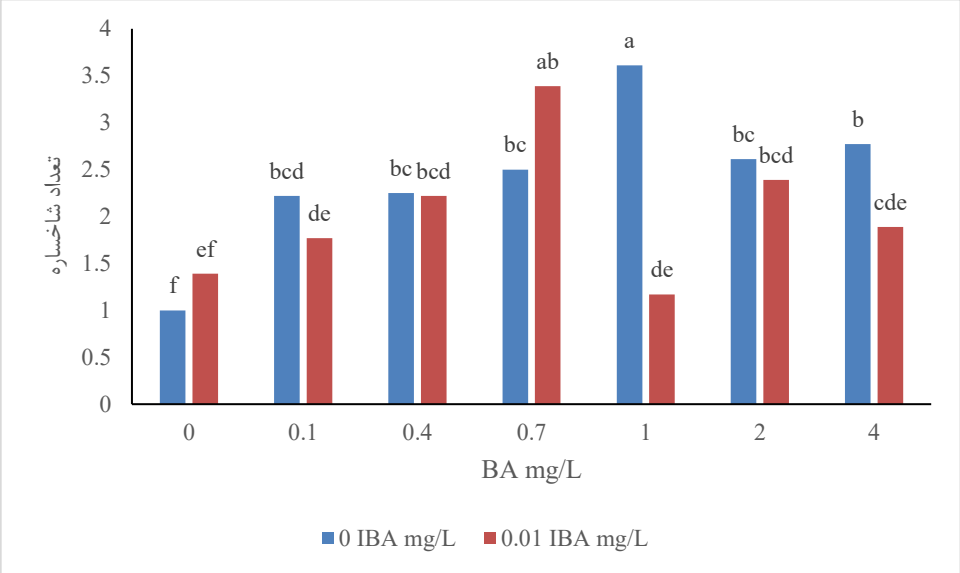
شاخه‌زایی

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، بین تیمارهای مختلف، ارقام و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در شاخه‌زایی ریز نمونه‌های دانهالی وجود داشت. بیشترین میزان شاخه‌زایی در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین شاخه‌زایی ۳/۶۱ و بدون افزودن IBA به‌دست آمد (شکل ۳). با بررسی اثر متقابل رقم و تنظیم‌کننده‌های رشدی مشخص شد که محیط‌کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با تولید ۵/۶۶ شاخه در رقم تیرماهی اردکان بیشترین تأثیر را در پرآوری شاخساره داشته است (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمار و رقم بر طول و تعداد شاخساره ریزنمونه‌های جوانه سه رقم پسته.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخساره	طول شاخساره
تیمار	۱۳	۷/۰۹**	۴/۱۹**
رقم	۲	۹/۶۳ **	۰/۷۲ **
تیمار × رقم	۲۶	۳/۳۷ **	۱/۸۱**
خطا	۲۱۰	۰/۹۸	۱/۰۷
خطا کل	۲۵۱	-	-

** تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳- اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر میزان شاخه‌زایی سه رقم پسته

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود با بررسی میانگین‌های اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشدی و رقم، مشخص شد که بهترین تیمار برای شاخه‌زایی در رقم "تیرماهی اردکان" ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۴ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است که میانگین شاخه‌زایی در این تیمار ۵/۶۶ بود. بعد از آن تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، در رقم "تیرماهی میبد" دارای میانگین ۴/۳۳ شاخه‌زایی بود. با توجه به مقایسه میانگین شاخه‌زایی در سه رقم، چنین استنباط می‌شود که برای شاخه‌زایی در رقم "تیرماهی اردکان" نسبت به ارقام دیگر زمانی که مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BA بکار برده شده موثرتر بوده است.

جدول ۳- اثر متقابل رقم و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد شاخساره ریزنمونه‌های دانهالی.

رقم	"تیرماهی"	اردکان"	"تیرماهی	میبد"	"حاج	عبداللهی"
BA (mg/L)	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA
۰	۱/۰^{h}	۳/۰^{cde}	۲/۵۰^{defg}	۱/۵۰^{fgh}	۲/۱۶^{defgh}	۳۳/۱ ^{gh}
۰/۱	۱/۰^{h}	۲/۳۳^{defgh}	۱/۸۳^{efgh}	۱/۰^{h}	۱/۸۳^{efgh}	۲/۵۰^{defg}
۰/۴	۱/۰^{h}	۱/۸۳^{efgh}	۳/۵۰^{bcd}	۱/۶۶^{efgh}	۲/۱۶^{defgh}	۲/۱۶^{defgh}
۰/۷	۲/۶۶^{cdefg}	۳/۸۳^{bc}	۲/۵۰^{defg}	۱/۶۶^{efgh}	۲/۰^{efgh}	۲/۵۰^{defg}
۱	۱/۸۳^{efgh}	۱/۸۳^{efgh}	۲/۰^{efgh}	۲/۰^{efgh}	۳/۰^{cde}	۲/۰^{efgh}
۲	۲/۱۶^{defgh}	۲/۶۶^{cdefg}	۴/۳۳^{b}	۱/۵^{fgh}	۲/۸۳^{cdef}	۱/۵ ^{fgh}
۴	۲/۳۳^{defgh}	۵/۶۶^{a}	۱/۸۳^{efgh}	۲/۱۶^{defgh}	۲/۳۳^{defgh}	۲/۱۶^{defgh}

طول شاخساره

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس، بین تیمارهای مختلف، ارقام و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در طول شاخساره ریزنمونه‌های دانهالی وجود داشت (جدول ۲). بررسی جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین طول شاخساره در رقم "حاج عبدالهی" با میانگین طول شاخه ۳/۹۲ سانتی-متر در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمده و همین تیمار در رقم "تیرماهی میبد" منجر به کاهش طول شاخه به ۱/۴۱ سانتی‌متر شد (جدول ۴).

جدول ۴- اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و رقم بر طول شاخساره ریزنمونه‌های دانهالی.

رقم	"تیرماهی اردکان"		"تیرماهی میبد"		"حاج عبداللهی"	
BA (mg/L)	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA	0 mg/L IBA	0.01 mg/L IBA
۰	۲/۷۵$^{a-h}$	۲/۷۵$^{a-h}$	۱/۸۲^{fgh}	۲/۶۷$^{a-h}$	۱/۷۵^{fgh}	۲/۲۵$^{c-h}$
۰/۱	۲/۷۵$^{a-h}$	۱/۵۰^{gh}	۱/۴۲^{h}	۳/۱۷$^{a-f}$	**۳/۹۲**^{a}	۱/۹۲$^{e-h}$
۰/۴	۳/۰$^{a-g}$	۲/۳۳$^{b-h}$	۱/۷۵^{fgh}	۲/۳۳$^{b-h}$	۳/۵۸^{abc}	۱/۵۰^{gh}
۰/۷	۲/۵۰$^{a-h}$	۲/۶۸$^{a-h}$	۲/۹۵$^{a-g}$	۱/۹۲$^{e-h}$	۳/۴۲$^{a-d}$	۲/۰$^{d-h}$
۱	۱/۹۲$^{e-h}$	۱/۸۳^{fgh}	۲/۵۳$^{a-h}$	۲/۰۸$^{d-h}$	۳/۸۰^{ab}	۲/۴۲$^{b-h}$
۲	۲/۲۰$^{c-h}$	۲/۴۳$^{b-h}$	۲/۶۲$^{a-h}$	۲/۰۸$^{d-h}$	۱/۷۵^{fgh}	۱/۷۵^{fgh}
۴	۳/۵۴^{abc}	۱/۹۲$^{e-h}$	۲/۴۲$^{b-h}$	۳/۳۷$^{a-e}$	۲/۵۸$^{a-h}$	۲/۴۲$^{b-h}$

حروف مختلف نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد

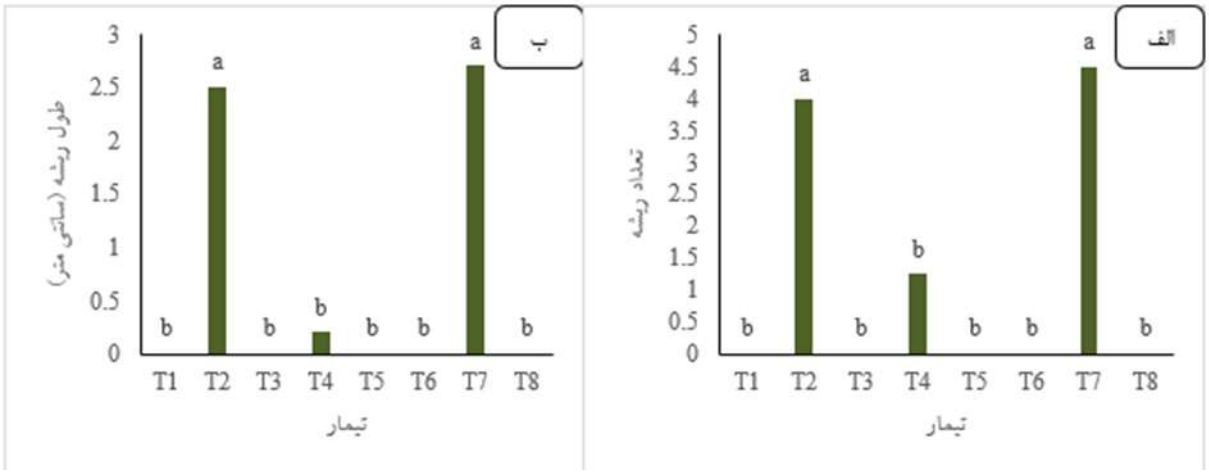
ریشه‌زایی

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر تعداد و طول ریشه گیاهچه‌های رقم تیرماهی اردکان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میانگین تعداد ریشه تولید شده (۴/۰ عدد)، در تیمار T2 در محیط‌کشت MS + ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر تیامین + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیز تیمار T7 شامل محیط کشت WPM + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۴/۵ عدد ریشه به‌دست آمد (شکل ۴ الف). همچنین این تیمارها بالاترین میانگین طول ریشه تولید شده (۲/۴۵ و ۲/۶۸ سانتی‌متر) را به خود اختصاص داد (شکل ۴ ب). در سایر تیمارها به جز T4 ریشه‌زایی صورت نگرفت (شکل ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمار و رقم بر طول و تعداد ریشه گیاهچه‌های پسته رقم "تیرماهی اردکان".

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد ریشه	طول ریشه
تیمار	۷	۱۴/۸۲**	۵/۵۳**
خطا	۴	۱/۳۲	۰/۱۴
خطا کل	۳۲	-	-
cv	-	۱۷/۴	۱۷/۱

** تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۴- اثر تیمارهای مختلف بر الف) تعداد و ب) طول ریشه دانهال‌های پسته.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که موفقیت ریزازدیادی پسته به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مدت زمان ضدعفونی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، محیط کشت و همچنین رقم قرار دارد. این یافته‌ها با ماهیت پیچیده و وابسته به ژنوتیپ فرایند کشت بافت در جنس *Pistacia* همخوانی دارد و تأیید می‌کند که بهینه‌سازی هر مرحله از ریزازدیادی برای دستیابی به باززایی پایدار ضروری است.

قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و اثر مدت زمان ضدعفونی

یکی از مراحل بحرانی در کشت بافت پسته (*Pistacia vera* L.)، ضدعفونی اولیه ریزنمونه‌ها و کنترل هم‌زمان آلودگی و قهوه‌ای شدن بافت است. نتایج این پژوهش نشان داد که مدت زمان ضدعفونی با کلرید جیوه اثر

معنی‌داری بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت، در حالی که اثر رقم و اثر متقابل رقم × مدت زمان ضدعفونی معنی‌دار نبود. این یافته بیانگر آن است که پاسخ ریزنمونه‌های دانهالی پسته به تنش ناشی از ضدعفونی، بیش از آنکه وابسته به ژنوتیپ باشد، تحت تأثیر شدت تیمار شیمیایی قرار دارد.

افزایش معنی‌دار قهوه‌ای شدن با افزایش مدت زمان ضدعفونی از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه، احتمالاً ناشی از آسیب به بافت‌های مریستمی و تحریک اکسیداسیون ترکیبات فنلی است. در پسته و سایر گونه‌های جنس *Pistacia*، حضور مقادیر بالای ترکیبات فنلی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده در استقرار موفق ریزنمونه‌ها محسوب می‌شود. آزادسازی این ترکیبات در اثر تنش‌های مکانیکی و شیمیایی و اکسیداسیون آن‌ها توسط آنزیم‌هایی نظیر پلی‌فنل‌اکسیداز، منجر به قهوه‌ای شدن محیط کشت و در نهایت کاهش زنده‌مانی ریزنمونه‌ها می‌گردد (Akdemir *et al*., 2014). .

در این پژوهش، استفاده از اسید سیتریک پیش و پس از ضدعفونی نقش مهمی در کاهش شدت قهوه‌ای شدن داشت، اما نتایج نشان داد که در زمان‌های طولانی‌تر تماس با کلرید جیوه، اثر حفاظتی اسید سیتریک برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن کافی نبوده است. مطالعات پیشین نیز گزارش کرده‌اند که اگرچه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند اسید سیتریک یا اسید آسکوربیک می‌توانند شدت قهوه‌ای شدن را کاهش دهند، اما تماس طولانی‌مدت ریزنمونه‌ها با مواد ضدعفونی‌کننده قوی مانند $HgCl_2$ می‌تواند منجر به نکروز بافت و کاهش توان باززایی شود (Benmahioul *et al*., 2012; Khamushi *et al*., 2019).

عدم معنی‌داری اثر رقم بر میزان آلودگی و قهوه‌ای-شدن ریزنمونه‌ها نشان می‌دهد که ریزنمونه‌های دانهالی، در مقایسه با ریزنمونه‌های استخراج‌شده از درختان بالغ، پاسخ یکنواخت‌تری به تیمارهای ضدعفونی دارند. این موضوع با گزارش‌های Tilkat *et al*., (۲۰۰۹) همخوانی دارد که بیان کردند استفاده از ریزنمونه‌های جوان، به‌ویژه منشأ گرفته از دانهال‌ها، موجب کاهش مشکلاتی نظیر آلودگی و قهوه‌ای شدن در کشت بافت پسته می‌شود. با این حال، حتی در ریزنمونه‌های دانهالی نیز افزایش بیش از حد شدت ضدعفونی می‌تواند اثرات مخربی بر بقای بافت داشته باشد.

نتایج این مطالعه تأکید می‌کند که تعادل میان کارایی ضدعفونی و حفظ سلامت بافت گیاهی امری ضروری است. در این راستا، تیمارهای کوتاه‌تر ضدعفونی (۵۰ ثانیه) با کلرید جیوه، ضمن کنترل قابل قبول آلودگی، کمترین میزان قهوه‌ای شدن را نشان دادند و می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسب‌تری برای مرحله استقرار ریزنمونه‌های دانهالی پسته پیشنهاد شوند. این یافته با

نتایج پژوهش‌های پیشین که بر لزوم کاهش زمان تماس با $HgCl_2$ برای جلوگیری از آسیب بافتی تأکید دارند، هم‌راستا است (Akdemir *et al*., 2014; Benmahioul *et al*., 2012).

پرآوری شاخساره و نقش تنظیم‌کننده‌های رشد

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد، رقم و اثر متقابل آن‌ها بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های دانهالی پسته در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود، که نشان‌دهنده اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشدی در تنظیم مسیرهای اندام‌زایی در *Pistacia vera* است. این یافته با شواهد اخیر در پژوهش‌های مربوط به ریزازدیادی و تکثیر درون‌شیشه‌ای پسته همسوست که تأکید می‌کنند توازن هورمونی بین سیتوکینین و اکسین کلید دستیابی به شاخه‌زایی مؤثر، افزایش تعداد شاخساره‌ها و بهبود رشد گیاهچه‌ها است (Benmahioul *et al*., 2012).

در این مطالعه، بیشترین میزان شاخه‌زایی در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون افزودن IBA مشاهده شد، که نشان‌دهنده نقش غالب سیتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی مریستمی و فعال‌سازی جوانه‌های جانبی است. این نتیجه مورد تأکید قرار گرفته است که افزایش نسبت سیتوکینین به اکسین در محیط کشت می‌تواند موجب افزایش کارایی شاخه‌زایی شود (Benmahioul *et al*., 2012). بهرام‌نژاد و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند که بیشترین شمار نوساقه در محیط‌کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA یا حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک‌اسید (GA) و هم‌چنین در محیط کشت نیم‌غلظت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA یا ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA به‌دست آمد. رشد طولی نوساقه‌ها در محیط کشت MS بیشتر بود.

بررسی اثر متقابل رقم و تنظیم‌کننده‌های رشدی نشان داد که ترکیب ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تأثیر را در شاخه‌زایی رقم "تیرماهی اردکان"، با میانگین ۵/۶۶ شاخه در هر ریزنمونه داشت. این موضوع نشان می‌دهد که وجود میزان بسیار کم اکسین همراه با سیتوکینین بالاتر می‌تواند اثر هم‌افزا در القای شاخساره داشته باشد، که در ساختار هورمونی درون سلولی موجب تحریک بیشتر تقسیم و تمایز مریستمی می‌گردد. یافته‌های مشابه در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است که ترکیب صحیح اکسین و سیتوکینین می‌تواند هم تعداد و هم کیفیت شاخه‌ها را افزایش دهد (Osku *et al*., 2025).

تفاوت بین ارقام در پاسخ به تیمارهای هورمونی نیز نشان‌دهنده وابستگی ژنوتیپی به حساسیت به PGRها

است، موضوعی که در ریزازدیادی گونه‌های چوبی گزارش شده است. مطالعات جدید نشان می‌دهند که پاسخ به سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها در ارقام پسته می‌تواند متفاوت باشد و نیاز به بهینه‌سازی اختصاصی برای هر ژنوتیپ دارد تا نهایتاً بازده تکثیر درون‌شیشه‌ای افزایش یابد (Osku *et al.*, 2025).

در مورد طول شاخساره نیز، نتایج نشان داد که تیمار کشت با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در رقم "حاج عبدالهی" منجر به بیشترین طول شاخه گردید، در حالی که همین تیمار در رقم "تیرماهی میبد" منجر به کاهش طول شاخساره شد. این تفاوت بیانگر نقش اثر ژنوتیپی و نیاز به تنظیم دقیق PGRها برای دستیابی به اهداف مشخص در رشد شاخساره است. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، غلظت‌های پایین تا متوسط سیتوکینین‌ها معمولاً برای افزایش رشد طولی شاخساره مناسب‌تر هستند، در حالی که غلظت‌های بالاتر سیتوکینین ممکن است فقط موجب افزایش تعداد شاخه‌ها شود اما طول آن‌ها را کاهش دهد. این موضوع با نتایج گزارش‌شده و اصول کلی هورمونی در کشت بافت گیاهی همخوانی دارد، هرچند مطالعات اختصاصی بیشتری برای پسته مورد نیاز است (Osku *et al.*, 2025).

ریشه‌زایی

نتایج این پژوهش نشان داد که اثر تیمارهای مختلف محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد و طول ریشه گیاهچه‌های رقم تیرماهی اردکان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود که بیانگر نقش کلیدی ترکیب محیط کشت و نوع اکسین در فرآیند ریشه‌زایی است. بیشترین تعداد و طول ریشه در تیمارهای T2 (محیط کشت MS همراه با تیامین و IBA) و T7 (محیط کشت WPM همراه با IBA) مشاهده شد که نشان‌دهنده برتری این ترکیبات در القای ریشه‌های نابجا است. افزایش ریشه‌زایی در تیمار T2 را می‌توان به نقش هم‌افزای تیامین و اکسین نسبت داد. تیامین (ویتامین B1) یکی از اجزای ضروری محیط‌های کشت است که در متابولیسم سلولی، تنفس و تقسیم سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند و حضور آن می‌تواند کارایی اکسین‌ها را در تحریک مریستم‌های ریشه افزایش دهد. گزارش شده است که افزودن ویتامین‌ها به‌ویژه تیامین، موجب افزایش تعداد و رشد طولی ریشه در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود (George *et al.*, 2008). Vollmer *et al.* (۲۰۲۳) نشان دادند که افزودن ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین به محیط کشت، طول ریشه گیاهان سیب‌زمینی شیرین کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای را به طور قابل توجهی افزایش داد. در پژوهشی Deltalab *et al.* (۲۰۲۴) تائید کردند که اثر مفید تیامین، در ترکیب با IBA، یک پروتکل

موفقیت‌آمیز برای القای ریشه در ریزازدیادی بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) را تأیید می‌کند و به میزان بقای ۹۸/۶ درصد پس از سازگاری دست می‌یابد.

عملکرد مناسب تیمار T7 نشان می‌دهد که محیط کشت WPM به‌دلیل غلظت کمتر عناصر پرمصرف، به‌ویژه نیتروژن و آمونیوم، محیط مناسب‌تری برای ریشه‌زایی گیاهان چوبی و نیمه‌چوبی فراهم می‌کند. این محیط نخستین بار برای گونه‌های چوبی معرفی شد و در مطالعات مختلف، برتری آن نسبت به MS در بهبود رشد و افزایش طول ریشه گزارش شده است (Lloyd & McCown, 1980). نتایج این پژوهش نیز این برتری را در رقم "تیرماهی اردکان" تأیید می‌کند.

در بیشتر تیمارها، به‌ویژه تیمارهای فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی یا دارای ترکیب NAA و IBA، ریشه‌زایی مشاهده نشد. این موضوع نشان‌دهنده پاسخ اختصاصی این رقم به نوع اکسین است. IBA به‌عنوان مؤثرترین اکسین در القای ریشه‌های نابجا شناخته می‌شود، زیرا پایداری بالاتری در بافت گیاهی دارد و کمتر باعث کالوس‌زایی می‌شود؛ در حالی که NAA در بسیاری از گونه‌ها موجب مهار رشد طولی ریشه یا افزایش کالوس می‌شود (Hartmann *et al*., 2018).

ریشه‌زایی محدود در تیمار T4 (MS + IBA) نیز نشان می‌دهد که حضور اکسین به‌تنهایی برای دستیابی به ریشه‌زایی مطلوب کافی نیست و ترکیب مناسب محیط کشت و مکمل‌های تغذیه‌ای نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت این فرآیند دارد. صفرنژاد و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند IBA برای ریشه‌زایی در کشت بافت گیاه گلابی (یک گیاه چوبی) مؤثر بوده است. همچنین در پژوهشی بیشترین تعداد، طول، حجم، وزن تر و خشک ریشه و شاخساره و همچنین طول ساقه اصلی گیاه *Ficus elastica Roxb. ex Hornem* در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که ریزازدیادی پسته (*Pistacia vera* L.)فرایندی چندعاملی، پیچیده و به‌شدت وابسته به شرایط کشت و ویژگی‌های ژنوتیپی است. موفقیت مراحل مختلف کشت بافت، از استقرار اولیه ریزنمونه‌ها تا پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مدت زمان ضدعفونی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ترکیب محیط کشت و رقم قرار گرفت. این موضوع ضرورت بهینه‌سازی مرحله‌به‌مرحله پروتکل ریزازدیادی را برای دستیابی به باززایی پایدار در پسته تأیید می‌کند. در مرحله استقرار،

مدت زمان ضدعفونی با کلرید جیوه نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت، به‌طوری‌که افزایش زمان تماس منجر به تشدید قهوه‌ای شدن و کاهش بقای بافت شد. استفاده از ریزنمونه‌های دانهالی موجب کاهش اثرات ژنوتیپی در این مرحله گردید، اما نتایج نشان داد که حتی در این ریزنمونه‌ها نیز کنترل شدت ضدعفونی برای حفظ سلامت بافت ضروری است. بر این اساس، تیمار ضدعفونی کوتاه‌تر توانست تعادل مناسبی میان کنترل آلودگی و کاهش قهوه‌ای شدن برقرار کند. در مرحله پرآوری، نقش غالب سیتوکینین‌ها به‌ویژه BAدر تحریک شاخه‌زایی تأیید شد و نتایج نشان داد که نسبت سیتوکینین به اکسین عامل کلیدی در افزایش تعداد شاخساره‌ها است. همچنین پاسخ متفاوت ارقام به تیمارهای هورمونی مشابه، وابستگی ژنوتیپی شاخه‌زایی در پسته را برجسته ساخت و نشان داد که هر رقم نیازمند تنظیم اختصاصی تنظیم‌کننده‌های رشد برای دستیابی به حداکثر کارایی تکثیر درون‌شیشه‌ای است. در مرحله ریشه‌زایی، برتری اکسین IBA نسبت به سایر تنظیم‌کننده‌ها مشخص شد و ترکیب آن با محیط‌های کشت مناسب و مکمل‌هایی مانند تیامین موجب افزایش معنی‌دار تعداد و طول ریشه گردید. نتایج نشان داد که محیط‌های کشت متناسب با گیاهان چوبی، به‌ویژه WPM، در کنار غلظت بهینه IBA می‌توانند نقش مؤثری در تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار با کیفیت بالا ایفا کنند.

به‌طور کلی، این پژوهش نشان داد که دستیابی به یک پروتکل موفق ریزازدیادی پسته مستلزم درک دقیق تعامل میان محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و ویژگی‌های ژنوتیپی است. نتایج حاصل می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای علمی برای توسعه پروتکل‌های تکثیر انبوه، حفظ ژرم‌پلاسم و تولید نهال‌های سالم و یکنواخت در برنامه‌های به‌نژادی و باغبانی پسته مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱. بهرام نژاد، زهرا، محمدی میریک، علی اکبر، دشتی، حسین، کریمی، حمیدرضا و تاج آبادی پور، علی. (۱۳۹۸). بهینه‌سازی کشت درون‌شیشه‌ای پسته بادامی ریز زرند با استفاده از جوانه‌های جانبی. مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ۲۰ (۴)، ۳۶۹-۳۷۶.

۲. صفرنژاد، عباس، علمداری، سیده بی‌بی لیلا، درودی، هادی و دلیر، مرضیه. (۱۳۹۵). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP وIBA) بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت در شیشه. علوم زیستی گیاهی، ۸(۲۹)، ۹۰-۷۷.

۳. نظری، فرزاد و رحیمی, ابراهیم. (۱۳۹۷). ریشه‌زایی و رشد شاخساره قلمه‌های فیکوس معمولی(*Ficus elastica Roxb. ex Hornem*) در پاسخ به ایندول بوتیریک اسید و پاکلوبوترازول. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) (علمی) ۳۱(۴)، ۹۸۲-۹۷۲.

4. Açikgöz, N., Polat, Ş., Güney, M., Kafkas, S., Güney, M., & Kafkas, E. (2025). In vitro propagation of Pistacia vera L. cultivars ‘Siirt’ and ‘Uzun’ as a tool for conservation and utilization of genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *73*(1).

5. Akdemir, H., Onay, A., & Pirinç, V. (2014). In vitro propagation of pistachio (*Pistacia vera* L.) and evaluation of phenolic oxidation problems. *Scientia Horticulturae*, *165*, 394–400.

6. Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., & Çiftçi, Y. O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. Plant Cell, *Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *117*(1), 65–76.

7. Azghandi, A. V., Habashi, A. A., Pur, A. T. A., Mojtahedi, N., Parizi, R. Z., Rostami, A. M., Rafi`ei, A., & Shakib, A. M. (2008). Developing Protocols for Mass Propagation of Important Pistachio Rootstocks and Commercial Cultivars Using Tissue Culture Techniques. *Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran*, 1-3.

8. Benamar B, kaid- harche M, Noelle D, & Florence D (2009). *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* l.). *Scientia horticulturae*. *122*: 479-483.

9. Benmahioul, B., Benamar, A., Dorion, N., Kaid-Harche, M., & Daguin, F. (2012). Micropropagation and *ex vitro* rooting of pistachio. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *108*(2), 353–358.

10. Deltalab, B., Kaviani, B., Kulus, D., & Sajjadi, S. A. (2024). Optimization of shoot multiplication and root induction in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. using thiamine (vitamin B1) and IBA: A promising approach for economically important African violet propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *156*(3), 74.
11. Faostat. Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2020). Production: Crops. Available online: http://faostat.fao.org (accessed on 19 November 2022).
12. Gabr, M., & Hassanen, S. (2012). In vitro propagation of *Pistacia vera* L. rootstock. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, *7*(1), 25-31.
13. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. *The Netherland, The Back Ground Springer*, *65*-175.
14. Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2018). *Plant propagation: Principles and practices* (9th ed.). Pearson Education.
15. Kaushik, P., Rani, M., Khurana, N., Pandey, P., Payal, & Kapoor, S. (2025). Revolutionizing Plant Tissue Culture: Harnessing Artificial Intelligence for Precision Propagation and Optimization. *The Natural Products Journal*, *15*(3).
16. Khamushi, M., Dehestani-Ardakani, M., Zarei, A., & Kamali Aliabad, K. (2019) An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* [Mill.]) under in vitro condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *138* (3):597-601
17. Kilic, M. U. & Uysal, H (2023). Establishment of In Vitro Cultures and Investigation of Micropropagation Possibilities in Shoot Tip Explants of Different Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* L.) Genotypes. *Biology Bulletin*, *50*(5), 931–945.
18. Linsmaier-Bednar, E. M., & Skoog, F. (1966). Thiamine requirement in relation to cytokinin in “normal” and “mutant” strains of tobacco callus. *Planta*, *72*(2), 146-154.
19. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators’ Society*, *30*, 421–427.
20. Mingao, l., Jinyan, H., Qian, An., Pingping, Z., Mingli, T., & Lifang, W. (2011). Regeneration and rapid propagation from stem esxplant of *pistacia chinensis* bunga. International conference on agricultural and natural resources engineering advances in biomedical engineering, Pp. 3-5.
21. Mohammed, A. A., & Arkwazee, H. A. (2024). Micrografting of *Pistacia vera* L.: A review. SVU-*International Journal of Agricultural Sciences*, *6*(1), 61–72.

A Review. *Journal of Plant Growth Regulator, 44*, 4931–4959.

27. Safari, Z., Mehrabi, A., Armini, A., & Safari, S. (2013). Rapid micropropagation of *p. atlantica* subsp. mutica. Intl *Journal of Agricultural Crop Science. 5*(3), 280-284.
28. Sindhu, S. G., Shwetha, G. V., Aramani, K., Kankanawadi, N., Shravanilakshmi, V., & Veenita, M. K. (2025). Tissue Culture and its Applications in Mulberry Propagation. *Annual Research & Review in Biology*, *40*(8), 47-58.
29. Ozden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Tilkat, E., & Onay, A. (2010). Current status and conservation of Pistacia germplasm. *Biotechnology Advances*, *28*(1), 130-141.
30. Vollmer, R., Espirilla, J., Sánchez, J.C., Arroyo, L., Acosta, M., Flores, G., Rojas, A., Ellis, D. and Azevedo, V. (2023). Thiamine improves in vitro propagation of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]–confirmed with a wide range of genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *152*(2),.253-266.
31. Yang, L., Shuchai, S., & Pingsheng, L. (2005). Progress of the tissue culture of Pistacia vera L. *Journal of Beijing Agricultural College*, *20*(2), 69-75.
22. Mojtahedi, N., & Zadeh Parizi, R. (2008). Developing protocols for mass propagation of important pistachio rootstocks and commercial cultivars using tissue culture techniques. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1-3.
23. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.
24. Nezami, E., & Gallego, P. P. (2023). History, Phylogeny, Biodiversity, and New Computer-Based Tools for Efficient Micropropagation and Conservation of Pistachio (*Pistacia* spp.) Germplasm. *Plants*, *12*(2), 323.
25. Osku, M., Roozban, M. R., Sarikhani, S., Lawson, S., Arab, M. M., Sadeghi-Majd, R., & Vahdati, K. (2025). Improved root architecture and seedling performance in pistachio (*Pistacia vera* L.) via radicle-tip excision. *BMC Plant Biology*, *25*(1), 1020.
26. Ranjbar, A., Moradinezhad, F., & Panahi, B. (2025). Roles of Micronutrients and Plant Growth Regulators on Abiotic Stresses Management of Pistachio Trees:

Optimization of Shoot Proliferation and Rooting of Three Pistachio (*Pistacia vera* L.) Cultivars in *In Vitro* Culture Using Plant Growth Regulators

Hadise Hajjafari Nejad[1], Maryam Dehestani- Ardakani[1,2*], Kazem Kamali[3]

Abstract

In vitro micropropagation of pistachio (*Pistacia vera* L.) faces several challenges due to strong genotype dependency, browning of explants, and differential responses to plant growth regulators (PGRs). This study was conducted to optimize various stages of micropropagation, including establishment, shoot proliferation, and rooting, in seedling explants of the cultivars "Tirmahi Ardakan," "Tirmahi Meybod," and "Haj-Abdollahi." After seed germination, explants were disinfected with mercuric chloride for 50, 100, and 200 seconds, and cultured on MS medium. The shoot proliferation stage was tested with different concentrations of BA (0–4 mg L^{-1}) and IBA (0 and 0.01 mg L^{-1}), while the rooting stage (in the "Tirmahi Ardakan" cultivar) was evaluated using eight culture media supplemented with IBA and NAA. Results indicated that disinfection duration had a significant effect on explant browning, with the highest browning observed at 100 and 200 seconds (scores of 1.77 and 1.88 out of 5, respectively). During shoot proliferation, the highest number of shoots (5.66 per explant) was obtained for "Tirmahi Ardakan" with 4 mg L^{-1} BA + 0.01 mg L^{-1} IBA, whereas the greatest shoot length (3.92 cm) was observed in "Haj-Abdollahi" with 0.1 mg L^{-1} BA. In the rooting stage, MS medium containing 1.6 mg L^{-1} thiamine + 1 mg L^{-1} IBA and WPM medium with 1.5 mg L^{-1} IBA produced the highest number of roots (4.5 roots per explant) and root length (2.68 cm), respectively. These results indicate that genotype-specific optimization of culture medium and plant growth regulators plays a crucial role in the successful micropropagation of pistachio.

Key Words: Plant growth regulators, Shoot proliferation, Explant, Rooting, Browning.

1 Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, P.O. Box 184, Ardakan, Iran.
2 Medicinal and Industrial Plant Research Institute, Ardakan, I. R. Iran.
3 Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd
*Corresponding Author: mdehestani@ardakan.ac.ir