بهبود محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشدی در ریزازدیادی پایه رویشی پسته قزوینی

قاسمعلی گروسی[1*]، سارا ملکی[2] و اسمعیل نظامی آلانق[1]

[1] قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی

[2] زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲

چکیده

پایه رویشی پسته قزوینی به‌عنوان یکی از پایه‌های مهم پسته در تحمل به شوری، آهکی و مقاوم به خشکی به‌شمار می‌آید. به‌منظور تهیه یک دستورالعمل مطمئن و تعیین محیط کشت بهینه برای ریزازدیادی این پایه، کارایی محیط کشت‌های GNH تغییریافته (GNH-A و GNH-B) در مقایسه با محیط‌کشت‌های MS، WPM، DKW یا GNH مطالعه شد. علاوه بر این تأثیر مقادیر مختلف BAP (۱/۱، ۱/۸ یا ۳/۶ mg/l) و ال-گلوتامین (۰/۰، ۴۰۰، ۸۰۰ یا ۱۶۰۰ mg/l) برای بهبود میزان نوساقه‌زایی با کمترین نارسایی‌های فیزیولوژیکی بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد جوانه و تعداد نوساقه به‌ازای هر ریزنمونه (جداکشت) با اختلاف معنی‌داری در محیط کشت GNH-A (به‌ترتیب ۳/۱۶ ± ۳۴/۴۶ و ۰/۴۶±۴/۲۳) در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها بدست آمد. همچنین اضافه نمودن مقادیر مختلف BAP به محیط کشت، تأثیر معنی‌داری روی تمامی صفات رشدی مورد مطالعه داشت؛ به‌طوری‌که بیشترین تعداد نوساقه به‌ازای هر جداکشت (۰/۴۸± ۶/۶۶) در محیط کشت GNH-A حاوی BAP ۳/۶ mg/l به‌دست آمد. افزودن ۸۰۰ mg/l ال-گلوتامین به محیط کشت GNH-A با اختلاف معنی‌داری رشد طولی و وزن تر نوساقه‌های تولید شده را (به‌ترتیب ۰/۰۶±۱/۲۰ cm و ۰/۰۲g ± ۰/۳۱) در مقایسه با سایر مقادیر استفاده شده افزایش داد. باوجوداین، در مرحله ریشه‌زایی درصد ریشه‌زایی با استفاده از NAA در مقایسه با IBA با اختلاف معنی‌داری افزایش یافت. از این‌رو انتظار می‌رود که نتایج ارائه شده در این مطالعه دیدگاه‌های جدیدی در زمینه توسعه محیط کشت‌های کارآمد برای گیاهان با ارزش اقتصادی، ازجمله پسته پیش روی محققان قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: *Pistacia vera*، پایه رویشی قزوینی، ریزازدیادی، ال-گلوتامین و تنظیم‌کننده‌های رشدی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۱۵۹ ، پست الکترونیکی: agaroosi90@yahoo.com

مقدمه

پایه‌رویشی پسته قزوینی (*Pistacia vera* cv. Ghazvini) به عنوان یکی از پایه‌های رویشی مهم متحمل به خاک‌های شور و آهکی (۲۶، ۲۹) و مقاوم به تنش‌های خشکی (۷ و ۴۰) محسوب می‌شود. تلاش برای ریزازدیادی آن در شرایط درون‌شیشه (*in vitro*) بجای استفاده از روش‌های تکثیر سنتی باغبانی (۴۵ ، ۴۶)، با هدف تولید مقرون به‌صرفه نونهال‌های یکدست و عاری از هرگونه بیماری می تواند از راهکارهای مهم و عملی در تولید و کشت نهال پسته به‌ویژه در مناطق بیابانی و شوره‌زار کشور محسوب شود. علی‌رغم مزایای یاد شده، در این روش دستیابی به دستورالعمل‌های بومی بمنظور ریزازدیادی سریع و اقتصادی گیاهان باغی نیازمند بهینه‌سازی متغیرهای متعددی از قبیل ترکیبات معدنی محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشدی می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ریزازدیادی برخی کولتیوارهای *P. vera* بااستفاده از محیط کشت‌های متداول شامل DKW (۱۹)، WPM (۳۱) و MS (۴۱) به‌دلیل مشکلات متعددی از جمله سرعت پایین نوساقه‌زایی و نارسایی‌های رشدی و فیزیولوژیکی همراه بوده است (۴،

۲۱، ۴۵، ۵۶). بدین منظور بهینه‌سازی ترکیبات مختلف محیط کشت ازجمله منبع کربنی، تنظیم‌کننده‌های رشدی و یا شرایط محیطی (نور، دما یا رطوبت محیط) مورد توجه بسیاری از محققان بوده است (۴، ۶، ۱۱، ۴۸، ۵۱). نظر به تأثیر بارز ترکیبات معدنی محیط کشت روی شاخص‌های رشدی از قبیل میزان نوساقه‌زایی و وزن تر تولید شده در ریزازدیادی درختان میوه (۴۴)، این مهم در مطالعات ریزازدیادی پسته کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از اینرو در این مطالعه تأثیر برخی از عناصر پرمصرف روی متغیرهای رشدی پایه رویشی قزوینی بررسی خواهد شد. گزارش‌های متعددی از تأثیر تنظیم‌کنندهای رشدی مختلف از قبیل BAP (6-benzylaminopurine) در ریزازدیادی پسته توسط سایر محققان ارائه شده است (۲۷، ۴۸، ۵۵). با توجه به اینکه عموما نیاز گیاه به تنظیم‌کننده‌های رشدی، در شرایط درون‌شیشه با توجه به نوع و غلظت ترکیبات معدنی محیط کشت متفاوت است (۲۲، ۲۳، ۵۴)؛ در این مطالعه تأثیر مقادیر مختلف این تنظیم‌کننده رشدی روی میزان نوساقه‌زایی همراه با محیط‌کشت‌های تغییر یافته بررسی خواهد شد. ال-گلوتامین از مهمترین اسید آمینه-های درون‌سلولی می‌باشد که به عنوان منبع نیتروژن نقش-های متعددی را در متابولیسم سلولی ایفا می‌نماید. افزودن این اسید آمینه به ترکیبات محیط کشت در بهبود بازدهی باززایی از کالوس، دانه گرده، جنین‌زایی سوماتیکی و همچنین بهبود شاخص‌های رشدی در مرحله ریزازدیادی گونه‌های چوبی تأثیر بارزی داشته است (۵، ۱۵، ۲۵، ۵۲). در این مطالعه تأثیر ال-گلوتامین در مرحله نوساقه‌زایی پسته، به عنوان منبع نیتروژن در محیط‌کشت‌های تغییر یافته روی میزان نوساقه‌زایی و رشد کیفی پایه رویشی مذکور مورد مطالعه قرار خواهد گرفت. ریشه‌زایی پسته در شرایط درون‌شیشه به عوامل مختلفی ازجمله ژنوتیپ، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی بستگی دارد؛ به‌طوری‌که استفاده از IBA (Indole-3-butyric acid) و NAA (1-Naphtaleneacetic acid) در گونه‌های مختلف *Pistacia* بیشترین درصد موفقیت را داشته‌اند (۴، ۵۱، ۵۵)؛ از اینرو در این مطالعه تأثیر مقادیر مختلف این تنظیم‌کننده‌های رشدی در ریشه‌زایی پایه‌رویشی قزوینی مطالعه خواهد شد.

مواد و روشها

الف) **ماده گیاهی، ضدعفونی و شرایط کشت**: سرشاخه-های پایه‌رویشی پسته قزوینی (*P. vera*, cv. Ghazvini) در بازه زمانی اواخر زمستان تا اوایل بهار از مرکز تحقیقات کشاورزی استان قزوین تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. قطعات ساقه دارای ۱-۲ جوانه حدود ۲ ساعت در زیر آب جاری شستشو، سپس با الکل ۹۶ درصد به مدت ۴-۳ ثانیه و کلرید جیوه ۰/۰۵ درصد به مدت ۴-۳ دقیقه ضدعفونی و در نهایت ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس هر دو طرف قطعات ساقه بمنظور حذف مناطق آسیب دیده بریده شده و در محیط - کشت MS حاوی BAP و IBA به‌ترتیب با غلظت‌های ۱/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۵/۷ : pHو ۵/۷گرم در لیتر فیتوآگار (Merck) به عنوان جامد-کننده، کشت و در اتاق رشد در دمای°C ۲±۲۵ و شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/روشنایی) با لامپ‌های سرد-سفید با شدت روشنایی ۴۰ $\mu mol\ m^{-2}\ S^{-1}$ قرار گرفتند. پس از شروع رشد جوانه‌های جانبی و انتهایی، در دوره رشدی ۳۰ روزه بمنظور تولید ماده گیاهی مورد نیاز، نوساقه‌های رشد یافته به جداکشت‌های حاوی ۱ تا ۲ جوانه تقسیم و به محیط کشت جدید منتقل گردید (۱۶).

ب) تأثیر محیط‌کشت‌های مختلف روی متغیرهای رشدی: در این آزمایش تأثیر محیط کشت‌های MS، DKW، WPM، GNH (۴۱)، GNH-A یا GNH-B (جدول ۱) روی متغیرهای رشدی پایه رویشی قزوینی مورد ارزیابی قرار گرفت. به هریک از ترکیبات محیط کشت، BAP و IBA به‌ترتیب ۱/۱ و ۰/۱ میلی گرم درلیتر، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵/۷ گرم در لیتر آگار (Merck)

اضافه و پس از تنظیم pH:۵/۷ اتوکلاو گردید (۱۸). به ازای هرتیمار ۴ ظرف شیشه‌ای حاوی ۲۸۰ سی‌سی با درب‌های کریستالی در نظر گرفته شده و در هر ظرف ۴ جداکشت با ۱-۲ جوانه جانبی (به عبارتی ۱۶ تکرار به‌ازای هرتیمار محیط کشت) کشت و به اتاق رشد با شرایط نوری و دمای یاد شده در بالا منتقل گردیدند. پس از ۳۰ روز از شروع آزمایش صفات رشدی از قبیل تعداد جوانه، تعداد نوساقه، طول نوساقه (cm) و وزن تر (g) تولید شده به ازای هر جداکشت، یادداشت‌برداری گردید.

جدول ۱- ترکیبات معدنی محیط کشت‌های مورد استفاده برای ریز ازدیادی پایه رویشی قزوینی

	Media (mg/l)					
	MS Murashige and Skoog, 1962	DKW Driver and Kuniyuki, 1984	WPM McCown, 1980	GNH Nezami *et al*, 2010	GNH-A*	GNH-B*
Macroelements						
NH_4NO_3	۱۶۵۰	۱۴۱۶	۴۰۰	۱۶۵۰	۸۰۰	۴۰۰
KNO_3	۱۹۰۰	-	-	۲۵	۲۵	۲۵
$MgSO_4.7H_2O$	۳۷۰	۷۴۰	۳۷۰	۵۴۰	۵۴۰	۵۴۰
$CaCl_2.2H_2O$	۴۴۰	۱۴۷	۹۶	-	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	–	۱۹۶۰	۵۵۶	۸۰۰	۴۰۰	۴۰۰
KH_2PO_4	۱۷۰	۲۵۹	۱۷۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰
NaH_2PO_4	-	-	-	۵۰	۵۰	۵۰
K_2SO_4	-	۱۶۵۰	۹۹۰	-	-	۱۵۶۰
Microelements						
$MnSO_4.H_2O$	۱۶/۹	۳۳/۵	۲۲/۳	۱۶/۹	۱۶/۹	۱۶/۹
$ZnSO_4.7H_2O$	۸/۶	۱۷	۸/۶	۸/۶	۸/۶	۸/۶
H_3BO_3	۶/۲	۴/۸	۶/۲	۶/۲	۶/۲	۶/۲
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸	۳۳/۴	۲۷/۸	۲۷/۸	۲۷/۸	۲۷/۸
Na2EDTA	۳۷/۳	۴۴/۷	۳۷/۳	۳۷/۳	۳۷/۳	۳۷/۳
KI	۰/۸۳	-	-	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۸۳
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۲۵	-	-	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
Vitamins						
Thiamine-HCl	۰/۱	۲	۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
Nicotinic acid	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
Pyridoxine-HCl	۰/۵	۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
Glycine	۲	۲	۲	۲	۲	۲
myo-Inositol	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* Nezami-Alanagh و همکاران (۴۲)

ج) تأثیر ال-گلوتامین و BAP روی متغیرهای رشدی: براساس نتایج حاصل از تأثیر محیط کشت، تأثیر مقادیر مختلف BAP (۰/۱، ۱/۸ یا ۳/۶ mg/l) و ال-گلوتامین (۰/۰، ۴۰۰، ۸۰۰ یا ۱۶۰۰ mg/l) در محیط کشت‌های GNH-A و GNH-B روی متغیرهای رشدی جداکشت‌های قزوینی مورد ارزیابی قرار گرفت. شرایط آزمایش و نگهداری جداکشت مطابق روش یادشده در قسمت بالا بود.

د) تأثیر نوع اکسین روی ریشه‌زایی: براساس نتایج گزارش شده توسط سایر محققان (۴، ۵۱، ۵۵)، در این آزمایش تأثیر IBA و NAA بطور جداگانه در مقادیر ۰/۰، ۱، ۲ یا ۳ میلی‌گرم درلیتر روی القاء و توسعه ریشه

نوساقه‌های پایه‌رویشی قزوینی در محیط‌کشت GNH حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵/۷ گرم در لیتر آگار مطالعه شد. به ازای هر تیمار ۴ تکرار با ۴ جداکشت در هر تکرار در نظر گرفته شده و پس از ۳۰ روز میزان ریشه-زایی، درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه‌های ایجاد شده به ازای هر ریزنمونه یادداشت‌برداری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح‌های کاملا تصادفی انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای آماری SAS 9.1 استفاده شد. لازم به ذکر است که قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، باقیمانده داده‌های خام محاسبه شده و بعد از نظر نرمال بودن با آزمون Shapiro- Wilk مورد بررسی قرار گرفته و در صورت نیاز برای داده‌های شمارشی (از قبیل تعداد نوساقه تشکیل شده، تعداد جوانه و غیره) از تبدیل ریشه دوم ($\sqrt{X+0.5}$) و تبدیل زاویه‌ای ($Arcsin\sqrt{X}$) برای داده‌های درصدی (درصد ریشه‌زایی) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح (α= ۰/۰۱) انجام شد.

نتایج

بیش از ۶۰ درصد جداکشت‌های ضدعفونی شده براساس روش یادشده در قسمت مواد و روش‌ها عاری از هرگونه آلودگی باکتریایی و قارچی بود. باوجوداین، ترشح ترکیبات فنولی به‌ویژه در طول ۲ تا ۳ ماه اول شروع آزمایش به عنوان یکی از محدودیت‌های رشدی پایه‌رویشی قزوینی بود. بدین منظور انتقال جداکشت‌ها به محیط کشت جدید و شستشوی جداکشت‌ها در زیر لامین‌ایرفلو به مدت ۲-۳ دقیقه با آب مقطر استریل هر ۲-۳ روز، تأثیر بسیار زیادی روی بقای جداکشت‌ها و جوانه‌زنی سریع آنها داشت.

الف) تأثیر محیط‌کشت روی متغیرهای رشدی: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار محیط کشت‌های مختلف روی میزان نوساقه‌زایی (P=۰/۰۰۰۳)، تعداد جوانه (P <۰/۰۰۰۱)، رشد طولی (P=۰/۰۰۸۰) و وزن تر (P=۰/۰۵۲۴) بود (جدول ۲).

جدول ۲- آنالیز تجزیه واریانس تاثیر نوع محیط‌کشت روی برخی صفات رشدی

منبع تغییرات		میانگین مربعات (MS)			
	درجه آزادی	میزان نوساقه‌زایی	تعداد جوانه	رشد طولی نوساقه (cm)	وزن تر (g)
محیط‌کشت	۵	۰/۰۸۶۳ **	۰/۲۳۷۳**	۱/۵۹۴۱**	۰/۰۳۴۶ *
خطا	۷۴	۰/۰۱۶۳	۰/۰۳۱۸	۰/۴۶۸۱	۰/۰۱۴۹
کل	۷۹				

*بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ و ** بیانگر اختلاف معنی دار در سطح α=۰/۰۱ می‌باشد

جدول۳- مقایسه آزمون چند دامنه‌ای دانکن تاثیر نوع محیط‌کشت روی برخی صفات رشدی

نوع محیط‌کشت	میزان نوساقه‌زایی	تعداد جوانه	رشد طولی نوساقه (cm)	وزن تر (g)
MS	۲/۸۳ ± ۰/۳۲^{bc}	۱۷/۰۸±۲/۴۳^{c}	۱/۳۶ ± ۰/۱۹^{ab}	۰/۳۸ ± ۰/۰۵^{ab}
DKW	۲/۵ ± ۰/۳۲^{c}	۱۶/۱۱±۱/۷۹^{c}	۱/۹۱ ± ۰/۲۴^{a}	۰/۲۹ ± ۰/۰۲^{b}
WPM	۳/۸۳ ± ۰/۵^{ab}	۲۱/۰۰±۲/۲۴^{bc}	۱/۰۰ ± ۰/۱۱^{b}	۰/۲۹ ± ۰/۰۳^{b}
GNH	۳/۹۲ ± ۰/۳^{ab}	۲۳/۳۰±۲/ ۳۱^{bc}	۱/۴۸ ± ۰/۱۱^{a}	۰/۳۹ ± ۰/۰۳^{a}
GNH-A	۴/۲۳ ± ۰/۴۶^{a}	۳۴/۴۶±۳/۱۶^{a}	۱/۴۳ ± ۰/۱۸^{ab}	۰/۳۴ ± ۰/۰۳^{ab}
GNH-B	۴/۶۶ ±۰ /۵۱^{a}	۲۵/۶۶±۲/۹۳^{b}	۱/۰۸ ± ۰/۱^{b}	۰/۲۷ ± ۰/۰۳^{b}

حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۱ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

براساس آزمون مقایسه چند دامنه دانکن، در حالیکه بیشترین میزان نوساقه‌زایی و تعداد جوانه به‌ازای جداکشت با اختلاف معنی‌دار در محیط‌کشت‌های GNH-B و GNH-A به‌ترتیب ۵۱/ ۰± ۴/۶۶ و ۳/۱۶ ± ۳۴/۴۶ بدست آمد؛ رشد طولی نوساقه‌های رشد یافته در محیط‌کشت‌های DKW و GNH به‌ترتیب با ۲۴ /۰ ± ۱/۹۱ cm و ۰/۱۱ cm ± ۱/۴۸ از میانگین بیشتری برخوردار بودند. همچنین بیشترین وزن تر در محیط‌کشت GNH (۰/۰۳ g ± ۰/۳۹) بدست آمد (جدول ۳).

ب) تأثیر ال-گلوتامین و BAP روی متغیرهای رشدی: با توجه به نتایج مطلوب استفاده از محیط کشت‌های تغییر یافته GNH-A و GNH-B روی برخی صفات رشدی از قبیل نوساقه‌زایی و تعداد جوانه، به‌منظور بهبود رشد طولی و وزن تر نوساقه‌های رشد یافته، تأثیر مقادیر مختلف ال-گلوتامین و BAP روی هر دو محیط‌کشت مزبور بطور جداگانه بررسی شد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس بیانگر تأثیر متقابل معنی‌دار نوع محیط کشت تغییریافته × BAP روی میزان نوساقه‌زایی و تعداد جوانه تولید شده (به‌ترتیب P=۰/۰۱۹۲ و P <۰/۰۰۰۱)؛ معنی‌دار بودن اثرات اصلی BAP و ال-گلوتامین روی رشد طولی (به‌ترتیب با P <۰/۰۰۰۱ و P=۰/۰۱۸۰)؛ نوع محیط کشت (P=۰/۰۰۱۹)، BAP (P=۰/۰۰۰۱) و ال-گلوتامین (P=۰/۰۲۹۷) روی وزن تر بود (جدول ۴).

بر اساس نتایج حاصل از آزمون مقایسه چند دامنه دانکن (جدول ۵)، تأثیر مقدار تنظیم‌کننده رشدی روی میزان نوساقه‌زایی بطور معنی‌داری متأثر از نوع محیط کشت به‌کار برده شده بود؛ به‌طوری‌که بیشترین تعداد نوساقه به‌ازای ریزنمونه (۶/۶۶ ±۰/۴۸) با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهای هورمونی مورد مطالعه در این آزمایش، در محیط کشت GNH-A حاوی ۳/۶ mg/l BAP مشاهده گردید. استفاده از BAP (۱/۱ یا ۱/۸ mg/l) یا ال-گلوتامین (۸۰۰mg/l) منجر به افزایش طول نوساقه‌ها تا ۱/۲۲cm با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها گردید. صفت وزن تر نیز که براساس آنالیز تجزیه واریانس بطور معنی‌داری متأثر از اثرات اصلی تیمارهای بکار برده شده در این آزمایش شده بود؛ به‌نحوی‌که بیشترین وزن تر (تا g ۰/۳۱ ±۰/۰۱) بطور جداگانه در محیط کشت GNH-A همراه با ۱/۸ mg/l BAP یا ۸۰۰mg/l ال-گلوتامین بدست آمد.

جدول ۴- آنالیز تجزیه واریانس تاثیر نوع محیط کشت، ال-گلوتامین و BAP روی برخی صفات رشدی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)			
		میزان نوساقه‌زایی	تعداد جوانه	رشد طولی نوساقه(cm)	وزن تر (g)
محیط کشت	۱	۰/۰۷۷۰*	۰/۲۳۵۶**	۰/۵۳۳۲ns	۰/۱۳۵۱**
BAP	۲	۰/۲۱۵۹**	۰/۲۰۱۳**	۲/۸۱۷۰**	۰/۲۶۶۹**
ال-گلوتامین	۳	۰/۰۴۲۶ ns	۰/۰۴۹۷ns	۰/۶۰۵۲*	۰/۱۲۴۸*
محیط کشت× BAP	۲	۰/۰۸۵۴*	۰/۲۹۳۸**	۰/۵۲۷۱ns	۰/۰۲۲۶ns
محیط کشت × ال گلوتامین	۳	۰/۰۴۴۱ ns	۰/۱۰۴۱*	۰/۰۵۲۰ns	۰/۰۷۰۵ ns
BAP × ال-گلوتامین	۶	۰/۰۲۳۳ ns	۰/۰۵۱۸ns	۰/۰۸۳۲ns	۰/۱۴۰۴ ns
ال-گلوتامین× محیط‌کشت × BAP	۶	۰/۰۲۷۱ ns	۰/۰۴۳۶ns	۰/۱۷۶۱ns	۰/۰۵۴۵ns
خطا	۲۴۸	۰/۰۲۱۲	۰/۰۲۹۰	۰/۱۷۶۹	۰/۰۱۳۶
کل	۲۷۱				

ns بیانگر اختلاف غیر معنی‌دار؛ * اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ و ** اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۱ براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

جدول ۵- مقایسه آزمون چند دامنه‌ای دانکن تاثیر نوع محیط‌کشت روی برخی صفات رشدی پایه رویشی قزوینی

GNH_B× BAP (mg/l)			GNH_A× BAP(mg/l)		
۳/۶	۱/۸	۱/۱	۳/۶	۱/۸	۱/۱
۴/۸۵±۰/۲۶^{a}	۴/۹۲±۰/۳۱^{a}	۴/۳۱±۰/۲۸^{a}	۶/۶۶±۰/۴۸^{a}	۴/۵±۰/۳۳^{b}	۴/۴۱±۰/۲۳^{b}	نو ساقه زایی
۳۷/۸۵±۲/۱۶^{a}	۳۳/۰۲±۱/۹۳^{a}	۳۳/۷۷±۱/۳۸^{b}	۳۵/۰۸±۱/۸۷^{a}	۳۳/۷±۲/۱۸^{a}	۳۶/۱۸±۱/۹۱^{a}	تعداد جوانه
ان-گلوتامین (mg/l)			BAP(mg/l)			رشد طولی
۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۰/۰	۳/۶	۱/۸	۱/۱	(cm)
۱/۰۱±۰/۰۴^{b}	۱/۲۱±۰/۰۶^{a}	۱/۰۵±۰/۰۴^{ab}	۱/۱۵±۰/۰۵^{ab}	۰/۹۰±۰/۰۳^{b}	۱/۱۹±۰/۰۴^{a}	۱/۲۲±۰/۰۵^{a}	
ان-گلوتامین (mg/l)			BAP(mg/l)		محیط کشت		وزن تر (g)
۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۰/۰	۳/۶	۱/۸	۱/۱	GNH_B	GNH_A	
۰/۲۶±۰/۰۱^{b}	۰/۳۱±۰/۰۲^{a}	۰/۲۹±۰/۰۲^{ab}	۰/۲۷±۰/۰۱^{ab}	۰/۲۴±۰/۰۱^{b}	۰/۳۱±۰/۰۲^{a}	۰/۲۶±۰/۰۱^{b}	۰/۳۱±۰/۰۱^{a}	

حروف مختلف در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱=α بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

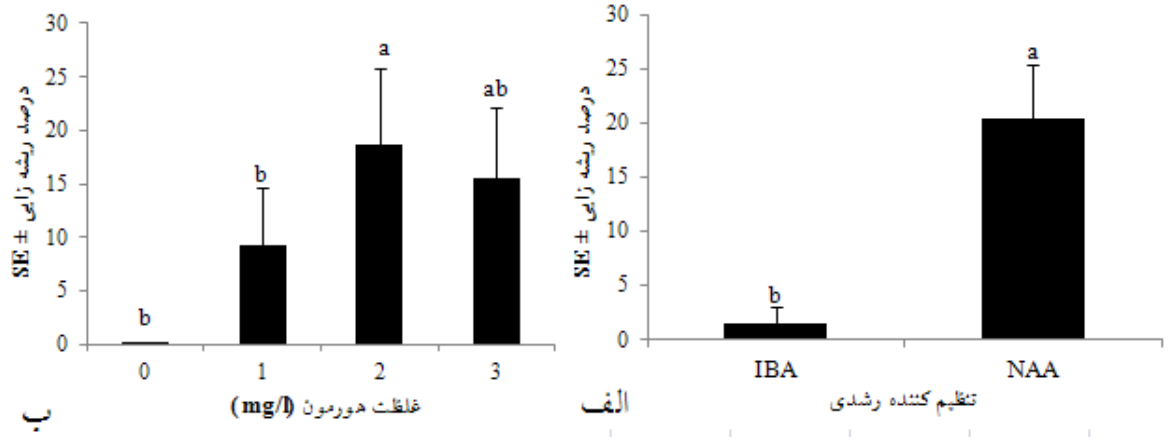
ج) تأثیر اکسین روی ریشه‌زایی پایه‌های رویشی قزوینی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد ریشه‌زایی بطور معنی‌داری متأثر از نوع تنظیم‌کننده رشدی (P=۰/۰۰۰۴) و غلظت مورد استفاده (P=۰/۰۵۵۹) بود (جدول ۶)؛ به‌طوری‌که بیشترین درصد ریشه‌زایی (۵٪ ±۲۰) در محیط کشت GNH حاوی NAA ۲ mg/l مشاهده شد (شکل ۱الف و ب). براساس جدول تجزیه واریانس تأثیر متقابل نوع تنظیم‌کننده رشدی × غلظت برای دو صفت تعداد ریشه (P=۰/۰۳۸۸) و طول ریشه (P=۰/۰۱۴۶) معنی‌دار بود؛ به‌نحوی‌که غلظت NAA ۲ mg/l منجر به حصول ۱/۹۳ ±۰/۷۵ ریشه در هر جداکشت با طول ۰/۷۸ ±۰/۲۶cm گردید (جدول ۶ و شکل ۱).

جدول ۶- آنالیز تجزیه واریانس تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA و NAA روی صفات ریشه‌زایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد ریشه‌زایی (%)	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)
تنظیم کننده رشد	۱	۱/۲۷۷۰**	۰/۴۱۳۳**	۲/۹۷۰۷*
غلظت	۳	۰/۲۴۸۳*	۰/۰۸۹۱*	۰/۸۱۹۶*
غلظت × تنظیم کننده رشد	۳	۰/۲۱۲۸^{ns}	۰/۰۸۵۶*	۰/۹۷۵۹*
خطا	۱۲۰	۰/۰۹۵۷	۰/۰۲۹۷	۰/۲۶۷۳
کل	۱۲۷			

	NAA (mg/l)				IBA (mg/l)			
	۳	۲	۱	۰/۰	۳	۲	۱	۰/۰
تعداد ریشه به ازای ریزنمونه$^{\#}$	۰/۹۳±۰/۵۱^{ab}	۱/۹۳±۰/۷۵^{a}	۰/۴۳±۰/۲۴^{b}	۰/۰^{b}	۰/۰۶±۰/۰۶^{a}	۰/۰^{a}	۰/۰^{a}	۰/۰^{a}
طول ریشه به ازای ریزنمونه	۰/۲۱±۰/۱۰^{ab}	۰/۷۸±۰/۲۶^{a}	۰/۳۴±۰/۱۸^{b}	۰/۰^{b}	۰/۱۲±۰/۱۲^{a}	۰/۰^{a}	۰/۰^{a}	۰/۰^{a}

^{ns} بیانگر اختلاف غیر معنی‌دار؛ * اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ و ** اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۱ می‌باشد؛$^{\#}$حروف مختلف در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۱ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.



شکل۱-مقایسه آزمون چند دامنه‌ای دانکن تاثیر عوامل اصلی نوع (الف) و غلظت تنظیم‌کننده رشدی (ب) روی درصد ریشه‌زایی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۱ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

مرحله ضدعفونی و استقرار جداکشت درختان میوه به‌ویژه پسته باتوجه به پوشیده شدن جوانه‌ها توسط فلس‌های متعدد و تولید ترکیبات فنولی مختلف با مشکلات متعددی ازجمله آلودگی باکتریایی، قارچی و مرگ جوانه‌ها بدلیل تولید ترکیبات فنولی سمی همراه است. با توجه به اینکه سن گیاه و همچنین زمان نمونه‌برداری به‌عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار در افزایش بازدهی ضدعفونی محسوب می‌شود (۲۲)؛ طی نمونه‌برداری‌های متعدد در بازه زمانی اسفند ماه تا اردیبهشت ماه، استقرار مواد گیاهی مربوط به فرودین ماه به دلیل میزان آلودگی پایین و تولید فنول کمتر، با موفقیت بیشتری همراه بود (نتایج نشان داده نشده است). علاوه بر این تأثیر نوع ماده ضدعفونی در مراحل ضدعفونی و استقرار بخوبی شناخته شده است. کلرید جیوه براساس نفوذپذیری سریع و قدرت بیشتر آن در ضدعفونی جوانه‌های پسته بازدهی ضدعفونی را بیش از ٪۶۰ افزایش داد.

استفاده از محیط کشت بهینه به‌عنوان یکی از ملزومات اصلی دستیابی به دستورالعمل‌های موفق در زمینه ریزازدیادی گونه‌های مختلف در شرایط درون‌شیشه ازجمله پسته به‌شمار می‌آید. مشکلات متعددی از قبیل شیشه‌ای شدن (Hyperhydricity)، نکروزگی نوک ساقه (shoot-tip necrosis) و تولید کالوس پایه در انتهای نوساقه در نتیجه استفاده از محیط کشت‌های رایج از قبیل MS، WPM و DKW گزارش شده است (۳، ۴، ۱۸، ۵۶). باتوجه به اینکه عموما هریک از محیط کشت‌های MS، DKW و WPM بطور اختصاصی برای برخی از گونه‌های گیاهی بهینه‌سازی شده‌اند، استفاده آنها به شکل رایج در ریزازدیادی گونه‌های مختلف گیاهی، در موارد متعدد عموما همراه با بروز مشکلاتی از قبیل فقر یا مسمویت عنصر و عناصر خاص (ناشی از کمبود یا بیش از حد آستانه تحمل رشدی گیاه) در شرایط درون‌شیشه همراه بوده است (۸، ۹، ۲۸). در مطالعات پیشین استفاده از محیط کشت GNH به دلیل برخی تغییرات در عناصر پرمصرف در مقایسه با MS، منجر به کاهش و یا حذف برخی از نارسایی‌های رشدی فیزیولوژیکی در پسته گردید (۱۶–۱۷، ۳۴–۳۷). در این پژوهش بر اساس گزارش قبلی (۴۴)، محیط کشت‌های تغییر یافته (GNH-A و GNH-B) طراحی و تاثیر آنها همراه با سایر محیط کشت‌های MS، DKW، WPM یا GNH روی برخی صفات رویشی پسته مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسات چند دامنه‌ای دانکن (جدول ۳) نشان داد که استفاده از محیط‌کشت تغییر یافته GNH-A در مقایسه با سایر محیط کشت‌های مورد استفاده، منجر به افزایش معنی‌دار در میزان نوساقه‌زایی و تعداد جوانه به‌ازای هر جداکشت گردید.

نظر به اینکه در محیط کشت GNH-A مقدار نمک NH_4NO_3 در مقایسه با محیط کشت GNH به ۱/۲ تقلیل یافته است؛ یکی از دلایل افزایش در میزان نوساقه‌زایی را می‌توان به تغییر نسبت یون‌های نیترات به آمونیوم مرتبط دانست. نسبت NO_3^- به NH_4^+ همراه با مقدار مناسب نیتروژن کل از متغیرهای مؤثر در افزایش میزان ریزازدیادی گونه‌های گیاهی به شمار می‌آید (۱۳، ۲۸، ۳۲، ۴۴). همچنین در برخی گزارش‌ها، غلظت NO_3^- توصیه شده در محیط کشت MS (۳۹/۴mM) از عوامل مهم محدود کننده رشدی در ریزازدیادی برخی گونه‌های گیاهی حساس به ترکیبات محیط کشت ذکر شده است. به‌طوری‌که کاهش غلظت NO_3^- به ۱/۲MS منجر به بهبود صفات رشدی در *Prunus sp.*، از گونه های حساس به ترکیبات محیط کشت گردید (۲۰، ۲۳، ۲۸، ۴۴، ۴۹). از طرفی، مقدار کم نیتروژن توصیه شده در محیط کشت WMP (۱۴/۷۱mM) منجر به فقر غذایی همراه با بروز برخی نارسایی‌های رشدی از قبیل علائم کلروزگی با تأثیرات متعاقب منفی روی تعداد نوساقه و رشد کیفی آنها در ریزازدیادی زردآلو، از گونه‌های

حساس جنس *Prunus sp.* به منابع نیتروژن محیط کشت گردید (۱۰). بررسی و مقایسه دقیق‌تر تأثیر ۴۰ نوع محیط کشت مختلف توسط شبکه عصبی مصنوعی (Artificial Neural Networks) روی یکی از پایه‌های رویشی جنس *Prunus* (GF677)، ضمن مشخص کردن تأثیر یون‌های عناصر پر مصرف روی صفات رشدی مورد مطالعه از قبیل میزان نوساقه‌زایی، تعداد جوانه و وزن تر، کاهش غلظت نمک‌های NH_4NO_3 و $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ به ۱/۲GNH در بهبود هرچه بیشتر شاخص‌های رشدی پیش‌بینی گردید (۴۴) که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. اخیرا پوتونگ و رید (۲۰۱۶) میزان نوساقه‌زایی را در *Prunus sp.* با ایجاد تغییرات در نسبت‌های $NH_4^+:NO_3^-$ (۱۰mM:۴۰mM؛ ۳۰mM:۶۰mM؛ ۴۵mM:۶۰mM) در مقایسه با محیط کشت MS بطور معنی‌داری افزایش دادند (۵۰). در این مطالعه تغییر نسبت $NH_4^+:NO_3^-$ به حدود ۱:۱ (۱۰mM:۱۰/۲۴mM) در مقایسه با سایر تیمارهای مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری در بهبود میزان نوساقه‌زایی داشت؛ که احتمالا بیانگر نیازهای متفاوت گونه‌های گیاهی به مقادیر مختلف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف می‌باشد.

افزودن BAP به محیط کشت در مقادیر mg/l ۰/۵–۴/۰ در ریزازدیادی گونه‌های مختلف *Pistacia sp.* منجر به افزایش معنی‌دار در میزان نوساقه‌زایی گردیده است (۱۲–۱۳، ۳۸–۳۹، ۴۴–۴۸)، باوجوداین نظر به این مهم که میزان تنظیم‌کننده رشدی مورد نیاز در مرحله ریزازدیادی با توجه به توازن ترکیبات محیط کشت متغیر است (۱، ۲، ۲۳)، در این مطالعه تأثیر BAP روی تمامی صفات رشدی معنی‌دار بود به‌طوری‌که بیشترین میزان نوساقه‌زایی در غلظت mg/l ۳/۶ BAP در محیط کشت GNH-A دیده شد. باوجوداین، استفاده از مقادیر بیشتر از mg/l ۱/۸ این هورمون تأثیر منفی روی برخی صفات رشدی (مانند رشد طولی) داشت. در گزارش قبلی (۱۷) نتایج بدست آمده نشان داد که افزون mg/l ۱ BAP در ترکیب با mg/l ۰/۲–۰/۱ IBA منجر به افزایش معنی‌دار روی برخی صفات رشدی از قبیل روند نوساقه‌زایی و وزن تر گردید؛ که با نتایج ما در این مطالعه مطابقت دارد.

ال–گلوتامین به‌عنوان یکی از مهمترین آمینواسیدهای داخل سلولی با تأمین نیتروژن مورد نیاز در متابولیسم سلولی، نیتروژن مورد نیاز سلول را برای بیوسنتز اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات حاوی نیتروژن را فراهم می‌سازد (۲۴). ال–گلوتامین اضافه شده به ترکیب محیط کشت در بهبود شاخص‌های رشدی سایر گونه‌های گیاهی در شرایط درون‌شیشه مؤثر بوده است (۵، ۲۴، ۵۲، ۵۳). در این مطالعه براساس نتایج حاصل (جدول ۵)، افزودن mg/l ۸۰۰ ال–گلوتامین در بهبود رشد طولی نوساقه‌ها و وزن تر تأثیر معنی‌داری داشت. با وجود تاثیر معنی‌دار هر دو نوع تیمار ال–گلوتامین و BAP در بهبود صفات رشد طولی و وزن تر، باتوجه به پایین بودن مقدار این صفات در مقایسه با محیط کشت‌های استاندارد مانند GNH (نمودار۱ و جدول ۳)، به نظر می‌رسد که مطالعات بیشتری با در نظر گرفتن تأثیر سایر عوامل رشدی از قبیل منابع کربنی و یا سایر تنظیم‌کننده‌های رشدی برای بهبود هرچه بیشتر محیط کشت تغییر یافته GNH-A لازم است.

مرحله ریشه‌زایی با توجه به نوع ژنوتیپ متأثر از انواع مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی است. به‌طوری‌که استفاده از NAA در تطابق با نتایج گزارش شده توسط سایرین (۳۹) منجر به افزایش معنی‌دار بازدهی ریشه‌زایی گردید. در حالیکه در برخی کولتیوارهای *P. vera* بازدهی ریشه‌زایی در حضور IBA به‌مراتب بیشتر از NAA گزارش شده است (۳۰، ۳۳، ۵۵، ۵۶)؛ که با نتایج ما مغایرت دارد.

در این پژوهش در راستای بومی‌سازی ریزازدیادی یکی از پایه‌های مهم رویشی پسته، ضرورت اعمال برخی تغییرات در ترکیبات محیط کشت، استفاده از BAP و همچنین کارایی استفاده از گلوتامین به‌عنوان اسید آمینه تأمین کننده منبع نیتروژن به‌منظور بهبود پارامترهای رشدی تشریح گردید. همچنین در مرحله ریشه‌زایی، نتایج گرفته شده

بیانگر تأثیر بارز NAA در مقایسه با IBA روی افزایش صفات ریشه‌زایی بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) و با کد طرح پژوهشی ۱۱۶۰۶ در آزمایشگاه کشت بافت گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و امتنان خود را از حمایت‌های انجام شده در طی اجرای پروژه ابراز می‌دارند.

منابع

۱-زبرجدی ع، معتمدی م، طراوت ا، اسماعیلی ا (۱۳۹۲) ریزازدیادی گیاه دارویی سرخاگل (*Echinacea purpurea* L.) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل انجمن زیست شناسی ایران ۲۶(۳): ۳۱۱-۳۱۹.

۲-کاویانی ب، غفاری ایسی زاد (۱۳۹۴) اثر غلظت‌های مختلف نفتالن‌استیک‌اسید و کینتین بر روی ریزازدیادی گیاه زینتی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) مجله زیست شناسی ایران ۲۸ (۵): ۹۲۰-۹۳۳.

3-Abousalim A, Mantell SH (1992) Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Mateur). Plant Cell Tissue Organ Cult 29:231–234.

4-Akdemir H, Süzerer V, Onay A, et al (2013) Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. Plant Cell, Tissue Organ Cult 1–12.

5-Ali A, Ahmad T, Abbasi NA, Hafiz IA (2009) Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar "moraiolo." Pakistan J Bot 41:783–795.

6-Al-Safadi B, Elias R (2013) Enhancement of Pistachio (Pistacia vera L.) Propagation *In Vitro* Utilizing the Shoot and Embryo Culture Techniques. Int J Fruit Sci 10:96–108.

7-Arzani K, Ghasemi M, Yadollahi A, Hokmabadi H (2013) Study of foliar epidermal anatomy of four pistachio rootstocks under water stress. IDESIA (Chile) 31:101–107.

8-Ashrafi EN, Vahdati K, Ebrahimzadeh H, Mirmasoumi M (2010) Analysis of *in vitro* explants mineral contents to modify medium mineral composition for enhancing growth of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Int J food, Agric Environ 8:325–329.

9-Bairu MW, Stirk A, Van Staden J (2009) Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell, Tissue Organ Cult 98:239–248.

10-Bell RL, Srinivasan C, Lomberk D (2009) Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. Vitr Cell Dev Biol 45:708–714.

11-Benmahioul B, Dorion N, Kaid-Harche M, Daguin F (2012) Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). Plant Cell, Tissue Organ Cult 108:353–358.

12-Benmahioul B, Kaïd-Harche M, Daguin F (2016) *In vitro* regeneration of Pistacia vera L. from nodal explants. J For Sci 62:198–203.

13-Can C, Ozaslan M, Toremen H, et al (2006) *In vitro* micrografting of pistachio, Pistacia vera L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. J Cell Mol Biol 5:25–31.

14-Cao W, Tibbitts TW (1993) Study of various NH_4^+/NO_3^- mixtures for enhancing growth of potatoes. J Plant Nutr 16:1691–704.

15-Das P (2010) Mass cloning of Rose and Mussaenda, popular garden plants, via somatic embryogenesis. Hort. Sci. (Prague) 37(2): 70-78.

16-Delijam MA, Garoosi GA (2013) In vitro micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera*. cv. Qazvini). MSc Thesis Imam Khomeini International University (IKIU). pp. 107

17-Delijam MA, Garoosi GA, Nezami-Alanagh E, Hosseini R (2016) Improving *Pistacia vera* micropropagation: with emphasis on the efficiency of minerals , vitamins and PGRs. J. Plant Mol. Breed. 4:43–54.

18-Dolcet-Sanjuan R, Claveria E (1995) Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia vera* L. and the beneficial effects of methyl jasmonate. J Am Soc Hortic Sci 120:938–942.

19-Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19:507–509.

20-Gago J, Pérez-Tornero O, Landin M, Burgos L, Gallego PP. (2011) Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: a practical case of data mining using apricot databases. J Plant Physiol 168:1858–1865.

21-García Martín E, Imbroda I, Lorente P, Andreu A (2012) Micropropagation and in vitro grafting techniques to assist the selection of a pistachio rootstock from a population of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) collected in the SE of Spain. Acta Hort (961):245-252.

22-George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology. Exegetics Limited

23-George EF, Hall MA, De Klerk G-J (2008) Plant Propagtion by Tissue Culture 3rd Edtition. Springer The Netherlands, pp 205–226.

24-Hamasaki RM, Purgatto E, Mercier H (2005) Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. Brazilian J Plant Physiol 17:383–389.

25-Haque M, Siddique AB, Islam SS (2015) Effect of Silver Nitrate and Amino Acids on High Frequency Plants Regeneration in Barley (Hordeum vulgare L.). Plant Tissue Cult Biotechnol 25:37–50.

26-Hokmabadi H, Arzani K, Grierson PF (2005) Growth, chemical composition, and carbon isotope discrimination of pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstock seedlings in response to salinity. Crop Pasture Sci 56:135–144.

27-Hussain N, Zaka MA, Tahir M, et al (2002) Growth response of barley to calcium under saline conditions. Pak J Agron 1(2-3): 77-79.

28-Ivanova M, Van Staden J (2009) Nitrogen source, concentration, and NH_4^+: NO_3^- ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured Aloe polyphylla. Plant Cell, Tissue Organ Cult 99:167–174.

29-Karimi S, Rahemi M (2012) Growth and Chemical Composition of Pistachio Seedling Rootstock in Response to Exogenous Polyamines under Salinity Stress. Int J Nuts Relat Sci 3:21–29.

30-Kılınc FM, Suzerer V, Ozden Y, Onay A(2015) Clonal micropropagation of Pistacia lentiscus L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. Plant Growth Regul. 75(1):75-88.

31-Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. In: Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society. pp 421–427.

32-Lopes MS, Araus JL (2008) Comparative genomic and physiological analysis of nutrient response to NH_4^+, NH_4^+:NO_3^- and NO_3^- in barley seedlings. Physiol Plant 134:134–150.

33-Mahdia F. Gabr SAH (2012) *In vitro* propagation of *Pistacia vera L.* rootstock 21:300–304.

34-Maleki S (2014a) Study the effect of auxin transfer inhibitors on Peroxidase and IAA-Oxidase activity in micropropagation of Ghazvini and UCB1 hybrid pistachio rootstocks . Thesis, Imam Khomeini International University (IKIU) pp. 98.

35-Maleki S, Garoosi GA, Haddad R, Nezami A E (2013) A step towards providing micropropagation protocol in *Pistacia vera* cv. Ghazvini rootstock: with emphasis on the effect of Scopoletin. In: National conference on the latest scientific research and Pistachios . University of Torbat Heydarieh, Pster.

36-Maleki S, Garoosi GA, Haddad R, Nezami-Alanagh E (2014b) The antioxidative effect of some shoot and root inducers in *Pistacia vera* (Ghazvini and UCB-1 rootstocks) under *in vitro* conditions. Genet Eng Biosaf J 2:135–144.

37-Maleki S, Garoosi GA, Haddad R, Nezami-Alanagh E (2015) Extraction and evaluation of peroxidases from *Pistacia vera* (UCB-1 and Gazvini rootstocks) in *in vitro* conditions. J Interam Soc Trop Hortic 56:21–27.

38-Marín JA, García E, Lorente P, Andreu1 P, Arbeloa1 A (2016) A novel approach for propagation of recalcitrant pistachio cultivars that sidesteps rooting by ex vitro grafting of tissue cultured shoot tips. Plant Cell Tissue Organ Cult 124:191–200.

39-Mascarello C, Fascella G, Zizzo GV, Mantovani E RB (2007) *In vivo* and *in vitro* propagation of Pistacia lentiscus L. vol 764, ISHS,. In: Proc. XXVII IHC-S10 Plant Biotechnology. In: Chief Read PE (ed) Acta Hortic., pp 299–306

40-Mohammadi AH, Banihashemi Z, Maftoun M (2007) Interaction between salinity stress and Verticillium wilt disease in three pistachio rootstocks in a calcareous soil. J Plant Nutr 30:241–252.

41-Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497.

42-Namli S, Ayaz E (2007) Influence of different cytokinins used in in vitro culture on the stoma

morphology of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). African J Biotechnol 6:561–563.

43-Nezami-Alanagh E, Garoosi GA, Haddad R (2010) The effect of PGRs on *in vitro* shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica*× *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. Iran J Gen Plant Breed 1: 34-43.

44-Nezami-Alanagh E, Garoosi GA, Haddad R, Maleki S., Landin M, Gallego PP. (2014) Design of tissue culture media for efficient Prunus rootstock micropropagation using artificial intelligence models. Plant Cell, Tissue Organ Cult 117:349–359.

45-Onay A (2000) Micropropagation of pistachio from mature trees. Plant Cell Tissue Organ Cult 60:159–163.

46-Onay A (2003) Micropropagation of pistachio. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, pp 565–588

47-Onay A, Pirinc V, Yildirim H, Basaran D (2004) *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). Plant Cell Tissue Organ Cult 77:215–219.

48-Ozden-Tokatli Y, Ozudogru EA, Akcin A (2005) *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. Sci Hortic (Amsterdam) 106:415–426.

49-Pérez-Tornero O, Burgos L (2000) Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell Tissue Organ Cult 63:133–141.

50-Poothong S, Reed BM (2016) Optimizing shoot culture media for Rubus germplasm: the effects of NH_4^+, NO_3^-, and total nitrogen. Vitr Cell Dev Biol - Plant. 52(3):265-275doi: 10.1007/s11627-016-9750-0

51-Safari Z, Mehrabi AA, Arminian A (2013) *In Vitro* proliferation and *ex vitro* rooting of wild pistachio (*Pistacia atlantica* spp Mutica, accession: Kabirkuh). Int J Agr Env 2:23–31.

52-Seran TH (2007) Anther Culture in Tea Improvement. Med Aromat Plant Sci Biotechnol 1(2): 234-239.

53-Siwach P, Gill AR (2011) Enhanced shoot multiplication in Ficus religiosa L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. Physiol Mol Biol Plants 17:271–280.

54-Smiciklas KD, Below FE (1992) Role of cytokinin in enhanced productivity of maize supplied with NH_4^+ and NO_3^-. Plant Soil An Int J Plant-Soil Relationships 142:307–313.

55-Tilkat E, Onay a., Yildirim H, Çetin Ozen H (2008) Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L. J Hortic Sci Biotechnol 83:328–333.

56-Yıldırım H (2012) Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. Sci Hortic (Amsterdam) 137:29–35.

Improvement of culture media and PGRs in *Pistacia vera* cv. Ghazvini micropropagation

Garoosi Gh.A.[1], Maleki S.[2] and Nezami-Alanagh E.[1]

[1] **Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, I.R. of Iran**

[2] **Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, I.R. of Iran**

Abstract

Pistacia vera cv. Ghazvini rootstock is considered as one of the important pistachio rootstocks in tolerance to salinity, calcareous and resistant to drought. In order to providing a reliable protocol for micro-propagation of this rootstock, the efficiency of modified GNH media (GNH-A and GNH-B) compared to MS, WPM, DKW or GNH media was studied. Moreover, the effect of different concentration of BAP (1.1, 1.8 or 3.6 mg/l) and L-glutamine (0.0, 400, 800 or 1600 mg/l) to improve shoot-let production rate with the lowest physiological disorders was survived. Results revealed that the greatest buds and shoots number per explants (34.46 ± 3.16 and 4.23 ± 0.46, respectively) were attained significantly on GNH-A medium compared to the other media studied. Integration of BAP at different concentrations, affected significantly all the studied growth traits, producing the highest shoot number (6.66 ± 0.48) when GNH-A was supplemented with 3.6 mg/l BAP. Furthermore, application of exogenous 800 mg/l L-glutamine in GNH-A medium improved significantly both shoots height and fresh weight (1.20± 0.06cm and 0.31±0.02g, respectively), in comparison with control. In rooting stage, the incorporation of NAA into media significantly increased rooting percentage compared to IBA. Finally, we strongly believe that these results will open new insights for researchers towards efficient culture media improvements for economically important woody plants, *Pistacia vera* species, in particular.

Key words: *Pistacia vera*, Ghazvini rootstock, micropropagation, L-gluthamin, plant growth regulators (PGRs)