مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.342563.2765

جلد ۳۷، شماره ۳، صفحه ۴۰۲-۳۸۱ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.3.1.6

اثر پیش‌تیمارهای دمایی و نوع کربوهیدرات بر القاء آندروژنز در کشت بساک *Capparis spinosa* L.

سیده معصومه مصطفوی[۱]، محمدرضا عبداللهی[۲*]، دارا دستان[۳] و حسن ساریخانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

پست الکترونیک: m.abdollahi@basu.ac.ir

۳- استادیار، گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۹ | تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۰

چکیده

گیاه کبر (*Capparis spinosa* L.)، یک منبع غنی از فلاونوئید روتین است که نقش مهمی در سلامتی انسان دارد. در تحقیق حاضر اثرات تیمارهای سرمایی (۲۵°C به عنوان شاهد، ۴°C و ۷°C به مدت‌های ۲، ۴ و ۷ روز)، گرمایی (۲۵°C به‌عنوان شاهد، ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز، ۳۲°C به‌مدت ۲ و ۴ روز و ۳۵°C به‌مدت ۸ ساعت) و کربوهیدرات بر کارایی آندروژنز در کشت بساک کبر بررسی گردید. همچنین اثرات مالتوز و ساکارز در غلظت‌های ۳۰ g L^{-1} و ۶۰ g L^{-1} در ترکیب با دو تیمار دمایی (۱- ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز و ۲- ۷°C به‌مدت ۷ روز + پیش‌تیمارهای آزاسیتیدین و 2,4-D) روی القاء آندروژنز بررسی شد. تیمارهای دمایی و کربوهیدرات اختلاف آماری معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۱) از نظر تشکیل کالوس و رویان داشتند. تیمار ۷°C به‌مدت ۲، ۴ و ۷ روز بیش‌ترین درصد (در هفته سوم: به‌ترتیب ۸۰، ۷۸/۳۴ و ۷۶/۶۷ درصد) و سرعت کالوس زایی (به‌ترتیب ۷/۸۵، ۷/۷۵ و ۷/۶۰ کالوس در هفته) و تیمار ۷°C به‌مدت ۷ روز بیش‌ترین تولید رویان (۰/۵۷ رویان در هر بساک) را ایجاد کردند. تیمار ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بیشترین درصد (در هفته سوم: ۱۰۰٪) و سرعت کالوس‌زایی (۹/۴۴ کالوس در هفته) را داشت. در حالی‌که تیمارهای ۳۲°C به‌مدت ۲ و۳ روز و همچنین ۳۰°C به مدت ۱۴ روز بیشترین تعداد رویان به‌ازای هر بساک (به‌ترتیب ۰/۲۲، ۰/۲۰ و ۰/۱۸ رویان) را تولید کردند. استفاده از ۳۰ g L^{-1} مالتوز در ترکیب با تیمار ۳۰°C به‌مدت۱۴ روز بیشترین درصد (در هفته سوم: ۹۱/۶۶٪) و سرعت کالوس‌زایی (۸/۹۴ کالوس در هفته) را ایجاد کرد در حالی‌که ۳۰ g L^{-1} مالتوز در ترکیب با تیمار ۷°C به‌مدت ۷ روز + پیش‌تیمارهای آزاسیتیدین و 2,4-D، بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک (۰/۵۵ رویان) را تولید کرد. نتایج این تحقیقات جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی کبر از اهمیت بالایی برخوردار می باشد.

واژه‌های کلیدی: کبر (*Capparis spinosa* L.)، کشت بساک، کالوس‌زایی، رویان‌زایی، تیمار دمایی، کربوهیدرات.

مقدمه

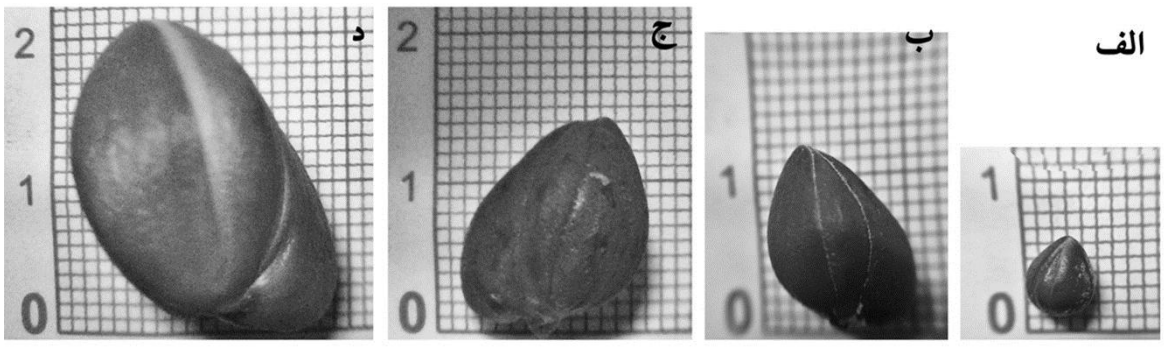
در سال‌های اخیر از گیاهان دارویی نه تنها در قالب مکمل‌های غذایی، بلکه به‌عنوان دارو برای درمان و پیشگیری از بسیاری بیماری‌ها استفاده شده است. در مقایسه با داروهای شیمیایی، تولید دارو از گیاهان دارویی ارزان‌تر و دارای عوارض جانبی کمتر می‌باشد. گیاهان دارویی توانایی تولید ترکیب‌های شیمیایی گسترده‌ای را با وظایف بیولوژیکی متنوع دارند (Santini & Novellino, 2014). اثبات وجود مواد مغذی، آلکالوئیدها، پلی‌فنل‌ها و فیتواستروژن‌ها در گیاهان دارویی، توانمندی آنها را به‌عنوان داروهای جدید برای درمان و پیشگیری از بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، التهاب کبد و آسیب‌های قلبی و عروقی افزایش خواهد داد (Santini & Novellino, 2014). کبر (*Capparis spinosa* L.)، یک گیاه چندساله دیپلوئید (۲n=۲x=۲۴) از خانواده Capparidaceae و جنس *Capparis* است (Patricia *et al*., 2012). این گیاه در مناطق مختلف جهان، به‌ویژه در کشورهای آسیایی و آفریقایی رشد می‌کند (Nabavi *et al*., 2016). قسمت‌های هوایی و ریشه‌های *C. spinosa* از زمان‌های بسیار قدیم در آشپزی و طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است (Sher & Alyemeni, 2010). همچنین اثرهای مفید گیاه کبر در کاهش قند و چربی خون مشخص شده است (Vahid *et al*., 2017). در سال‌های اخیر، چندین مطالعه تجربی و بالینی، اثرهای درمانی و همچنین فعالیت‌های بیولوژیکی (اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی، ضدمیکروبی و ضددردی) گیاه کبر را گزارش کرده‌اند (Rahnavard & Razavi, 2016؛ Nabavi *et al*., 2016). علاوه‌بر کاربردهای دارویی ذکر شده، گیاه کبر بالغ سیستم‌های ریشه‌ای وسیع را توسعه می‌دهد و نقش مهمی در کنترل رواناب، حفظ ذخایر آب خاک و جلوگیری از فرسایش خاک دارد (Cornelini *et al*., 2008). با وجود اهمیت بالای این گیاه دارویی متأسفانه این گیاه در بیشتر نقاط دنیا به‌صورت خودرو بوده و در زمینه اهلی‌سازی و اصلاح این گیاه دارویی با ارزش مطالعات چندانی انجام نشده است. به‌همین دلیل تلاش برای اهلی‌سازی و بهبود ژنتیکی این گیاه از اهمیت بسزایی برخوردار است. با توجه به ماهیت چندساله بودن گیاه کبر و دشواری بکارگیری روش‌های به‌نژادی سنتی در گیاهان چندساله، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تکثیر و اصلاح ژنتیکی این گیاه مناسب می‌باشند. یکی از روش‌های بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان، به‌ویژه گیاهان دگرگشن، روش دابل‌هاپلوئیدی می‌باشد. تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید از طریق روش‌های درون‌شیشه‌ای می‌توانند فرایند تولید لاین خالص و در نهایت تولید ارقام هیبرید در گیاهان دگرگشن را به حداقل برسانند (Germana, 2011). دابل‌هاپلوئیدها می‌توانند در شرایط طبیعی یا در محیط درون شیشه‌ای ایجاد شوند. جنین‌های هاپلوئید در شرایط طبیعی از طریق بکرزایی (پارتنوژنز) یا روش حذف کروموزومی پس از تلاقی‌های دور حاصل می‌شوند. روش‌های درون‌شیشه‌ای تولید گیاهان هاپلوئید شامل کشت تخمدان و تخمک (ژینوژنز) و کشت بساک و میکروسپور (آندروژنز) هستند (Shariatpanahi *et al*., 2012). تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساک در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی دارویی استفاده شده است (Ferrie *et al*., 2011). فاکتورهای بسیار زیادی از قبیل ژنوتیپ گیاهان مادری، شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله رشد و نمو میکروسپورها، پیش‌تیمار بساک‌ها یا غنچه‌ها، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد آندروژنز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bajaj, 1990). یکی از فاکتورهایی که بر موفقیت آندروژنز در کشت بساک تأثیر به‌سزایی داشته است اعمال تنش روی بساک‌ها یا غنچه‌های گیاه می‌باشد (Germana, 2011). محققان تنش‌ها را به سه دسته مختلف تقسیم کردند (Shariatpanahi *et al*., 2006a). این سه دسته شامل ۱- تنش‌هایی که به فراوانی برای القاء جنین‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که شامل تنش‌های سرمایی، گرمایی، کمبود مواد غذایی و کلشی‌سین می‌باشند،

۲- تنش‌هایی که کمتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل اشعه گاما، تنش اتانول، تیمار سانتریفوژ، کاهش فشار اتمسفر، عامل ماده‌زایی و آبسزیک اسید جزء این دسته‌بندی تنش‌ها هستند، ۳- گروه سوم تنش‌هایی هستند که جدیداً مورد استفاده قرار گرفته‌اند و شامل pH بالای محیط کشت، الیگوساکارید کاراگینن (*Carrageenan Oligosaccharides*)، تنش فلزی‌های سنگین و القاءکننده‌های شیمیایی می‌باشند (Shariatpanahi *et al*., 2006a). از بین این تنش‌ها، تنش‌های دمایی (سرمایی و گرمایی) در کشت بساک بسیاری از گیاهان از قبیل کلزا، گندم و گاوزبان اروپایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Abdollahi *et al*., 2004؛ Shariatpanahi *et al*., 2006b؛ Chardoli Eshaghi *et al*., 2015). همچنین تنش گرمایی برای القاء جنین‌زایی میکروسپور در کلزا، گندم، تنباکو و بادمجان استفاده شده است (Shariatpanahi *et al*., 2006b). یکی دیگر از فاکتورهای کلیدی مؤثر بر القاء آندروژنز ترکیب محیط کشت می‌باشد. قند مورد استفاده در محیط‌های کشت بافت هم به‌عنوان منبع تأمین‌کننده کربن و انرژی و هم به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی در محیط‌های کشت بکار می‌رود (Ferrie *et al*., 1995). مشخص شده که نوع و غلظت قند مورد استفاده در محیط کشت، آندروژنز را در گونه‌های گیاهی مختلف از قبیل جو، کلزا، گاوزبان اروپایی و ذرت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wojnarowiez et al., 2004؛ Yadollahi *et al*., 2011؛ Chardoli Eshaghi *et al*., 2015؛ Ismaili & Pour Mohammadi, 2016). ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز کربوهیدرات‌های اصلی بکاررفته در محیط‌های کشت آندروژنز می‌باشند (Orsinky *et al*., 1990؛ Ferrie *et al*., 1995). البته تاکنون تحقیقی در مورد القاء آندروژنز از طریق کشت بساک در گیاه کبر انجام نشده است. بنابراین در این تحقیق اثر نوع و غلظت کربوهیدرات مورد استفاده در محیط کشت و همچنین اثر اعمال پیش‌تیمارهای مختلف گرمایی و سرمایی بساک‌ها بر القاء آندروژنز، کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی، در کشت بساک گیاه کبر بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

غنچه‌های گل گیاه کبر در اندازه‌های مختلف، در بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ از رویشگاه طبیعی آن در قلعه اسماعیل‌خانی (روستای خاکریز)، واقع در شهرستان اسدآباد استان همدان با مختصات جغرافیایی '۳۷/ ۳۴ تا '۵۰/ ۳۴ عرض شمالی و '۹/ ۴۷ تا '۵۱/ ۴۷ طول شرقی و ارتفاع متوسط ۱۶۰۷ از سطح دریا، جمع‌آوری و برای کشت بساک در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱- اندازه‌های مختلف غنچه‌های گیاه کبر استفاده شده در آزمایش سیتوژنتیکی

الف- غنچه ۰/۵ سانتی‌متری، ب- غنچه ۱ سانتی‌متری، ج- غنچه ۱/۵ سانتی‌متری، د- غنچه ۲ سانتی‌متری

تعیین مراحل مختلف نمو میکروسپور

برای تعیین مراحل مختلف نمو میکروسپور، غنچه‌های گل گیاه کبر در اندازه‌های مختلف شامل ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ سانتی‌متری (شکل ۱- الف، ب، ج و د)، از گیاهان مادری برداشت و به‌منظور تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپورها، بساک‌ها از داخل این غنچه‌ها جدا شدند. برای رنگ‌آمیزی، بساک‌ها به‌مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در محلول استوکارمن (یک گرم پودر کارمن در ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال ۴۵٪) قرار داده شدند (Sharma & Sharma, 1972) و بعد بساک‌های رنگ‌آمیزی شده توسط یک پنس بر روی یک لام آزمایشگاهی، پاره شده تا میکروسپورها آزاد شوند. برای تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورها از یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر استفاده شد.

سترون کردن سطحی غنچه‌ها

در این پژوهش غنچه‌های خیلی جوان (غنچه‌های ۰/۵ سانتی‌متری) حاوی بساک‌های ۱/۵ میلی‌متری از گیاه کبر جدا شده و در آزمایشگاه به‌مدت ۱۲ دقیقه با محلول هیپوکلرید سدیم ۲/۵٪ ضدعفونی شدند و بعد ۳ مرتبه با آب‌مقطر سترون، شستشو شدند. بعد از طی مراحل مذکور، در زیر هود لامینار و در شرایط سترون، عمل حذف کاسبرگ و گلبرگ‌ها انجام گردید و بعد از آن ریزنمونه‌های بساک روی محیط کشت در پتری‌دیش‌های مجزا کشت شدند.

محیط کشت‌های مورد استفاده

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز برای انجام آزمایش‌ها از شرکت مرک آلمان و سیگما آمریکا تهیه شدند. در این پژوهش به‌منظور کشت بساک کبر از محیط کشت تلفیقی شامل نمک‌های معدنی محیط کشت B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) و ویتامین‌های محیط کشت NLN-13 (Fletcher *et al.*, 1998) استفاده شد. در همه آزمایش‌ها از ترکیب هورمونی ۲mg/L توفوردی (2,4-D) و ۰/۵ mg/L بنزیل‌آمینوپورین (BAP) در محیط کشت بساک استفاده گردید. در محیط کشت جامد از عامل ژلی آگار به مقدار ۸gr/L استفاده شد. برای سترون‌سازی محلول نمک‌های معدنی B_5 از اتوکلاو و برای ضدعفونی ویتامین‌های NLN و قند مالتوز از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر بیوفیل-جت کانادا استفاده شد.

آزمایش‌ها

در این پژوهش سه آزمایش مجزا به‌شرح زیر انجام گردید.

آزمایش اول: بررسی اثر سطوح مختلف پیش‌تیمار سرمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ پیش‌تیمار سرمایی مختلف (بدون پیش‌تیمار سرمایی، پیش‌تیمارهای سرمایی ۴°C به‌مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۷ روز، پیش‌تیمارهای سرمایی ۷°C به‌مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۷ روز) در سه تکرار (هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ پرچم به‌عنوان یک تکرار) انجام شد. لازم به ذکر است که در تمامی تیمارها قبل از اعمال پیش‌تیمار سرمایی، بساک‌ها به‌مدت یک ساعت با محلول حاوی ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت پیش‌تیمار شدند.

آزمایش دوم: بررسی اثر سطوح مختلف پیش تیمار گرمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

در این آزمایش اثر ۵ سطح پیش‌تیمار گرمایی (بدون پیش‌تیمار گرمایی، ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز، ۳۲°C به‌مدت زمان‌های ۲ و ۴ روز و ۳۵°C به‌مدت ۸ ساعت) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ پرچم به‌عنوان یک تکرار) روی القاء آندروژنز در کشت بساک گیاه کبر بررسی گردید. در این آزمایش نیز مشابه با آزمایش قبل بساک‌ها قبل از کشت با محلول حاوی ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت پیش‌تیمار شدند.

آزمایش سوم: بررسی اثر نوع و غلظت کربن مورد استفاده در محیط کشت و پیش‌تیمار دمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

در این آزمایش اثر نوع و غلظت کربن مورد استفاده در محیط کشت در ترکیب با پیش‌تیمارهای دمایی مختلف بر میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک گیاه کبر بررسی شد. به این منظور، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ پرچم به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد) طراحی شد. به‌طوری که نوع پیش‌تیمار در دو سطح (پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز و پیش‌تیمار سرمایی ۷°C به‌مدت ۷ روز در ترکیب با پیش‌تیمار آزاسیتیدین و توفوردی به‌مدت یک ساعت) به‌عنوان فاکتور اول در نظر گرفته شد. نوع کربوهیدرات در دو سطح (مالتوز و ساکارز) به‌عنوان فاکتور دوم و غلظت کربوهیدرات در دو سطح (۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شدند.

شرایط نگهداری اطاق کشت بافت بساک

در تمامی آزمایش‌ها، بساک‌های کشت شده بعد از اعمال پیش‌تیمارهای مناسب، به اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه با دمای ۲۵±۲ °C و رطوبت ۵۰٪ منتقل شدند.

بررسی‌های سیتولوژیکی با شمارش کروموزومی

در این روش ابتدا نوک ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذرهای گیاهان مادری و رویان‌های حاصل از کشت بساک در داخل محلول آلفا–مونو برومونفتالین برای سه ساعت در دمای اتاق قرارگرفتند و بعد از خارج شدن از محلول ذکرشده، سه مرتبه با آب‌مقطر سرد آبکشی شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت به محلول تثبیت‌کننده کارنوی شامل الکل ۹۶٪ و اسیداستیک با نسبت ۳ به ۱ (V/V) انتقال یافته و دوباره سه مرتبه با آب‌مقطر شستشو داده شدند. هیدرولیز مواد گیاهی مذکور در محلول HCl ۱ نرمال، در دمای ۶۰°C و به‌مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. برای توقف هیدرولیز، نمونه‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه به‌مدت ۵ دقیقه در آب‌یخ ۰°C شستشو داده شدند. پس از خشک کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی، برای رنگ‌آمیزی، به‌مدت ۱ ساعت به محلول استوکارمن ۱٪ (۱ گرم رنگ کارمن در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۴۵٪) انتقال داده شدند. پس از این مرحله، نمونه‌ها همراه با استیک اسید ۴۵٪ بر روی لام له شده و کروموزوم‌ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ برابر قابل رؤیت شدند.

صفات مورد مطالعه و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

در این آزمایش صفاتی از قبیل درصد کالوس‌زایی در هفته‌های دوم، سوم و پنجم، درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر، سرعت کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک به‌شرح زیر محاسبه شدند.

درصد کالوس‌زایی در هفته های دوم، سوم و پنچم بعد از کشت بساک

به‌منظور محاسبه درصد کالوس‌زایی، تعداد کالوس‌های القاء شده در هر پتری‌دیش (در هفته‌های دوم، سوم و پنجم) شمارش شد و بر تعداد بساک‌های کشت شده تقسیم گردید و بعد عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد.

درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر

برای محاسبه این صفت، تعداد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر در هر پتری‌دیش با استفاده از کاغذ شطرنجی شمرده شده و بر تعداد بساک‌های کشت شده تقسیم گردید و حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

سرعت کالوس‌زایی

برای محاسبه صفت سرعت کالوس‌زایی از فرمول زیر استفاده شد (Maguire, 1962).

$$\text{سرعت کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌ها در هفته دوم}}{2} + \frac{\text{تعداد کالوس‌های القاء شده در هفته سوم}}{3} + \frac{\text{تعداد کالوس‌های القاء شده در هفته پنجم}}{5}$$

میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک

به‌منظور محاسبه این صفت، تعداد رویان‌های تشکیل شده در هر پتری‌دیش شمارش شد و بر تعداد بساک‌های کشت شده در هر پتری‌دیش تقسیم گردید.

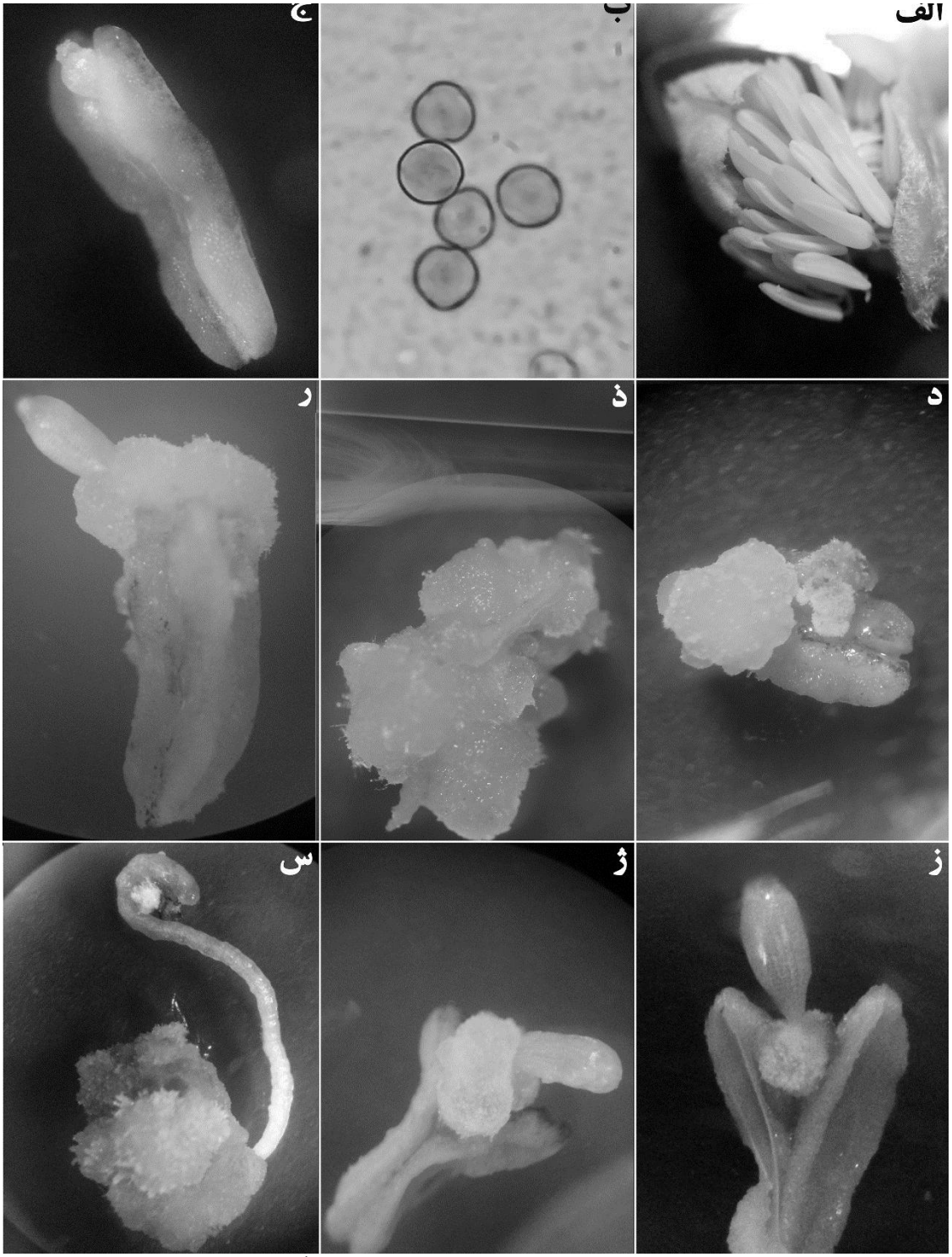
آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab روی باقیمانده‌ها انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید. برای تبدیل داده‌های درصدی از روش جذری استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

نتایج آزمایش مقایسه اندازه غنچه‌ها (داده‌ها نشان داده نشده است) نشان داد که غنچه‌های ۰/۵ سانتی‌متری (شکل ۱- الف)، حاوی بساک‌های ۱/۵ میلی‌متری (شکل ۲- الف) بودند که بعد از رنگ‌آمیزی میکروسپورها مشخص گردید که میکروسپورهای موجود در این بساک‌ها اکثراً در مرحله تک هسته‌ای میانه تا تک هسته‌ای انتهایی (شکل ۲- ب) و مناسب برای القاء آندروژنز در کشت بساک گیاه کبر بودند. بساک‌های کشت شده بر روی محیط کشت القاء کالوس، بعد از گذشت ۷-۵ روز متورم شدند (شکل۲- ج)، به‌طوری که بعد از ۱۴-۱۰ روز کالوس‌زایی را آغاز کردند (شکل ۲- د) و کالوس‌ها بعد از ۲ هفته دیگر بزرگتر شدند (شکل ۲- ذ). به‌تدریج رویان‌ها بر روی بافت کالوس القاء شدند و برای القاء رویان‌های بیشتر و رشد رویان‌ها، این کالوس‌ها در محیط کشت مشابه واکشت شدند. بعد از گذشت ۵-۳ هفته رویان‌های القاء شده رشد و نمو کرده و بالغ شدند (شکل ۲- ر، ز و ژ). بعضی از رویان‌ها پس از بلوغ از بین رفتند و سایر رویان‌ها به محیط کشت باززایی (محیط کشت B_5-NLN حاوی ۱ mg/L BAP و ۰/۱mg/L NAA) منتقل گردیدند. در یکسری از رویان‌ها، نشانه‌های باززایی گیاه مشاهده گردید (شکل ۲- س)، ولی متأسفانه گیاهچه‌های حاصل بعد از مدتی از بین رفتند.

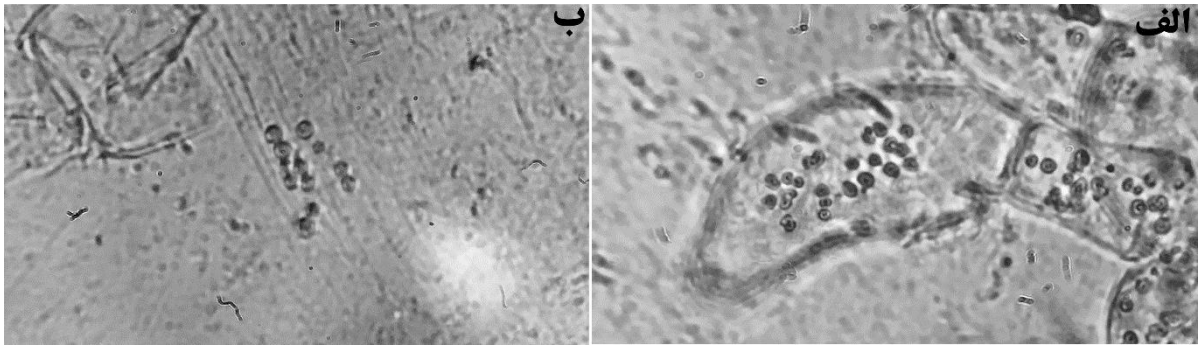
شمارش کروموزوم‌های رویان‌های حاصل از کشت بساک گیاه کبر

به‌منظور تعیین سطح پلوییدی رویان‌های تولید شده در کشت بساک کبر، مطالعات سیتولوژیکی به کمک روش اسکواش بر روی نوک ریشه‌های گیاه دیپلوئید و رویان‌های حاصل از کشت بساک این گیاه انجام شد. نتایج نشان داد که گیاهان مادری دیپلوییید بوده و حاوی ۲n=۲x=۲۴ کروموزوم هستند (شکل ۳- الف)، در حالی‌که رویان‌های حاصل، ماهیت هاپلوئید داشته و دارای n=x=۱۲ کروموزوم بودند (شکل ۳- ب).



شکل ۲- مراحل القاء کالوس و رویان در کشت بساک گیاه کبر

الف- غنچه ۰/۵ سانتی‌متری حاوی بساک‌های ۱/۵ میلی‌متری مناسب برای القاء آندروژنز؛ ب- میکروسپورهای گیاه کبر در مرحله تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی، مناسب برای القاء آندروژنز؛ ج- یک بساک متورم شده، ۵-۳ روز بعد از کشت بر روی محیط کشت القاء کالوس؛ د- القاء کالوس در بساک‌های کشت شده بعد از ۱۴-۱۰ روز از کشت بساک؛ ذ- کالوس‌های رشد کرده بعد از گذشت ۱ ماه از کشت بساک؛ ر، ز و ژ- رویان‌های رشد کرده، ۵-۳ هفته بعد از واکشت کالوس‌های رویان‌زا در محیط کشت جدید؛ س- نشانه‌های باززایی گیاه در برخی از رویان‌ها



شکل ۳- آنالیز سیتوژنتیکی سلول‌های حاصل از ریشه‌های گیاهان مادری و رویان‌های حاصل از کشت بساک گیاه کبر

الف) سلول دیپلوئید بدست آمده از آزمون سیتولوژیکی نوک ریشه گیاهچه کبر با ۲۴ کروموزوم (۲n=2x=۲۴)

ب) سلول هاپلوئید بدست آمده از آزمون سیتولوژیکی رویان حاصل از کشت بساک کبر با ۱۲ کروموزوم (n=x=۱۲)

آزمایش اول: بررسی اثر سطوح مختلف پیش‌تیمار سرمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

اثر پیش‌تیمارهای سرمایی روی صفات مختلف آندروژنیک در کشت بساک کبر تجزیه واریانس شد (جدول ۱). پیش تیمارهای سرمایی مختلف تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ برای تمامی صفات مورد مطالعه داشتند.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمارهای مختلف سرمایی بر صفات مختلف آندروژنیک در کشت بساک گیاه کبر

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک	درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر	سرعت کالوس‌زایی
پیش‌تیمار سرمایی	۶	۶۲۶/۲۰**	۱۲۶۵/۰۸**	۱۶۷/۸۶**	۰/۰۷**	۲۵۷/۹۴**	۴/۹۵**
خطای آزمایشی	۱۴	۱۰/۷۰	۵/۹۵	۱/۱۹	۰/۰۰۱	۵/۹۵	۰/۰۲
درصد ضریب تغییرات (C.V.)		۸/۹۰	۳/۷۴	۱/۱۲	۱۰/۶۷	۸/۹۱	۲/۳۸

**: اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ را نشان می‌دهد.

در هفته دوم بعد از کشت، پیش‌تیمارهای سرمایی ۷°C به‌مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۷ روز بیشترین درصد کالوس‌زایی (به‌ترتیب ۵۱/۶۷، ۵۰/۰۰ و ۴۶/۶۷ درصد) را داشتند و کمترین درصد کالوس‌زایی در این هفته مربوط به شاهد (۱۱/۶۷٪) بود. همچنین همین پیش‌تیمارهای سرمایی، در هفته سوم بعد از کشت نیز

بیشترین درصدهای کالوس‌زایی (به‌ترتیب ۸۰/۰۰، ۷۸/۳۴ و ۷۶/۶۷ درصد) را داشتند و تیمار شاهد کمترین درصد کالوس‌زایی (۲۱/۶۷٪) را در هفته سوم به خود اختصاص داد. در هفته پنجم تمامی پیش‌تیمارهای سرمایی استفاده شده بدون تفاوت معنی‌دار با هم بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشتند و کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد (۸۰/۰۰٪) بود. پیش‌تیمار سرمایی ۷°C به‌مدت ۷ روز بیشترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر (۳۸/۳۴٪) را ایجاد کرد و کمترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر مربوط تیمار شاهد (۸/۳۴٪) بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای سرمایی روی صفات مختلف آندروژنیک در کشت بساک گیاه کبر

پیش‌تیمار سرمایی	میانگین مربعات صفات			
	درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر
شاهد	۱۱/۶۷d	۲۱/۶۷d	۸۰/۰۰b	۸/۳۴d
۴°C به‌مدت ۲ روز	۳۶/۶۷b	۷۱/۶۷b	۱۰۰/۰۰a*	۳۱/۶۷b
۴°C به‌مدت ۴ روز	۳۱/۶۷bc	۷۰/۰۰b	۱۰۰/۰۰a	۳۰/۰۰bc
۴°C به‌مدت ۷ روز	۲۶/۶۷c	۵۸/۳۴c	۹۸/۳۴a	۲۶/۶۷c
۷°C به‌مدت ۲ روز	۵۱/۶۷a	۸۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۲۶/۶۷c
۷°C به‌مدت ۴ روز	۵۰/۰۰a	۷۸/۳۴a	۱۰۰/۰۰a	۳۰/۰۰bc
۷°C به‌مدت ۷ روز	۴۶/۶۷a	۷۶/۶۷a	۱۰۰/۰۰a	۳۸/۳۴a

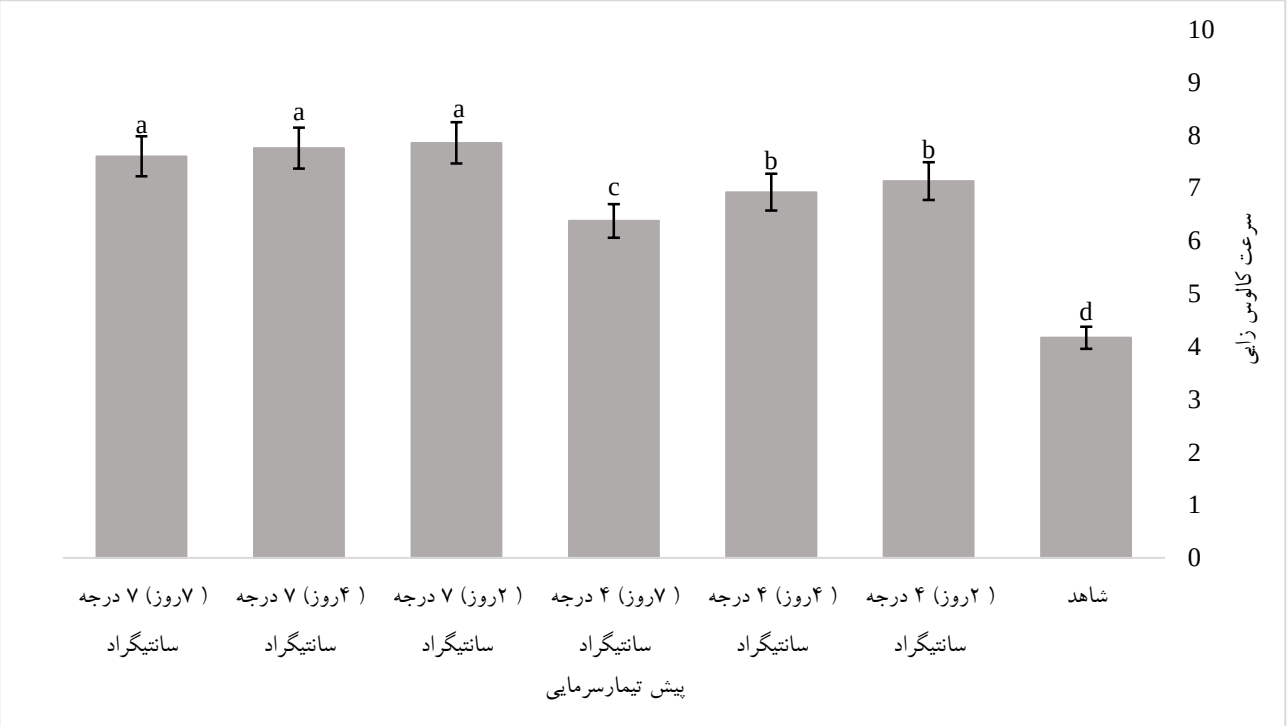
*: حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری است.

پیش‌تیمارهای سرمایی ۷°C در هر سه زمان ۲، ۴ و ۷ روز بیشترین سرعت‌های کالوس‌زایی را به‌ترتیب ۷/۸۵، ۷/۷۵ و ۷/۶۰ کالوس در هفته داشتند. کمترین سرعت کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد (۴/۱۷ کالوس در هفته) بود (شکل ۴).

بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک متعلق به پیش‌تیمار سرمایی ۷°C به‌مدت ۷ روز بود (۰/۵۷). کمترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد (۰/۰۸) بود (شکل ۶).

آزمایش دوم: بررسی اثر سطوح مختلف پیش‌تیمار گرمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

پیش‌تیمارهای گرمایی مختلف از نظر تمامی صفات مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ داشتند (جدول ۳).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای سرمایی مختلف روی صفت سرعت کالوس‌زایی در کشت بساک گیاه کبر

بیشترین درصد کالوس‌زایی در هفته دوم مربوط به پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز (۸۳/۳۴٪) و کمترین درصد کالوس‌زایی متعلق به تیمار شاهد (۱۱/۶۷٪) بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در هفته سوم مربوط به پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز (۱۰۰٪) و کمترین درصد کالوس‌زایی متعلق به پیش‌تیمار گرمایی شاهد (۲۱/۶۷٪) بود. البته پیش‌تیمارهای مختلف گرمایی در هفته پنجم هیچ تفاوت معنی‌دار آماری از نظر صفت درصد کالوس‌زایی نداشتند. پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بیشترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر (۴۵/۰۰٪) را به خود اختصاص داد. کمترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر مربوط به تیمار شاهد (۸/۳۴٪) بود (جدول ۴).

همچنین پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بیشترین سرعت کالوس‌زایی (۹/۴۴ کالوس در هفته) را داشت. در حالی‌که کمترین سرعت کالوس‌زایی (۴/۱۷ کالوس در هفته) متعلق به تیمار شاهد بود (شکل ۵).

بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک مربوط به پیش‌تیمارهای گرمایی ۳۲°C در مدت زمان‌های ۲ و ۳ روز و همچنین پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بود (به‌ترتیب ۰/۲۲، ۰/۲۰ و ۰/۱۸)، به‌طوری‌که با هم اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. کمترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک در تیمار شاهد (۰/۰۸) مشاهده شد (شکل ۶).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار گرمایی روی صفات مختلف آندروژنیک در کشت بساک گیاه کبر

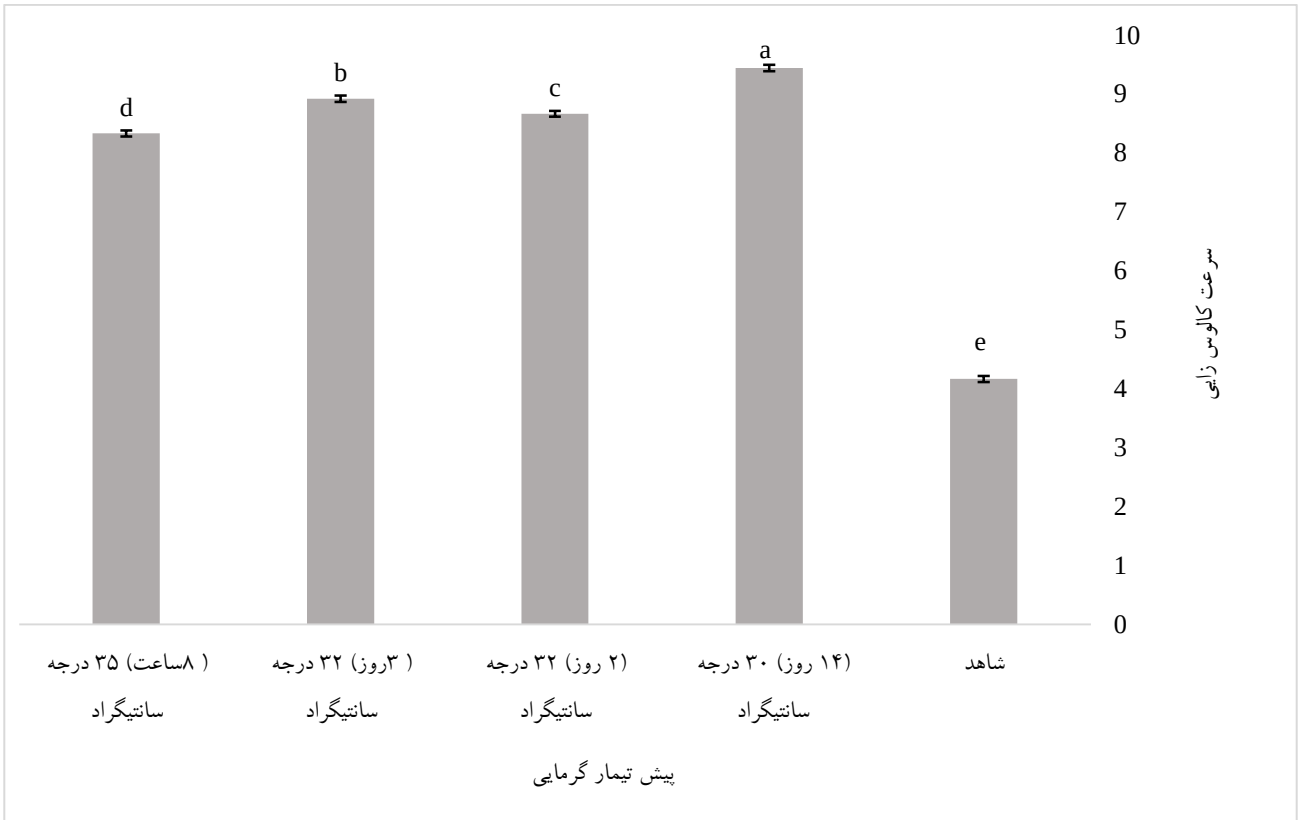
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک	درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر	سرعت کالوس‌زایی
تیمار گرمایی	۴	۱۵/۷۶**	۳۱۲۰/۸۳**	۲۴۰/۰۰**	۰/۰۰۹**	۵۸۰/۸۰**	۱۳/۶۱**
خطای آزمایش	۱۰	۰/۰۵	۵/۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۶	۱۵	۰/۰۰۸۳۷
درصد ضریب تغییرات (C.V.)		۳/۲۰	۲/۸۵	۰/۰۰۰	۱۵/۸۱	۱۲/۷۷	۱/۱۵

**: اختلاف آماری معنی‌دار را در سطح ۰/۰۱ نشان می‌دهد.

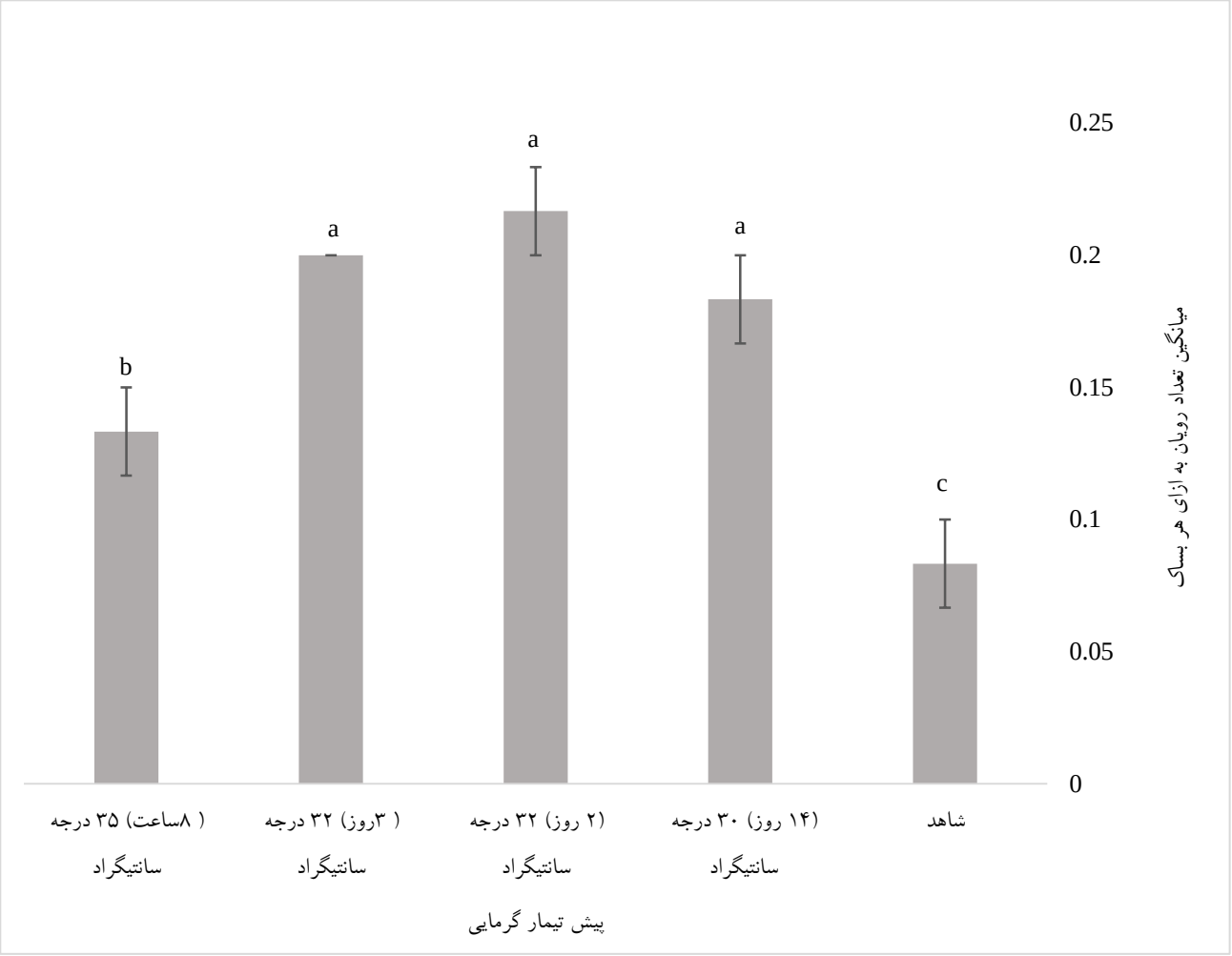
جدول ۴- مقایسه میانگین پیش‌تیمار گرمایی بر صفات مختلف آندورژنیک در کشت بساک گیاه کبر

پیش‌تیمار گرمایی	میانگین مربعات			
	درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	درصد کالوس‌های بزرگ از ۳ میلی‌متر
شاهد	۱۱/۶۷d	۲۱/۶۷d	۸۰/۰۰a	۸/۳۴d
۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز	۸۳/۳۴a	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a*	۴۵/۰۰a
۳۲°C به‌مدت ۲ روز	۶۶/۶۷bc	۹۱/۶۷b	۱۰۰/۰۰a	۳۶/۶۷b
۳۲°C به‌مدت ۳ روز	۷۱/۶۷b	۹۵/۰۰b	۱۰۰/۰۰a	۳۵/۰۰b
۳۵°C به‌مدت ۸ ساعت	۶۳/۳۴c	۸۳/۳۴c	۱۰۰/۰۰a	۲۶/۶۷c

*: حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماریست.



شکل ۵- مقایسه میانگین پیش‌تیمارهای مختلف گرمایی برای صفت سرعت کالوس‌زایی در کشت بساک گیاه کبر



شکل ۶- مقایسه میانگین پیش‌تیمارهای مختلف گرمایی برای صفت میانگین تعداد رویان در هر بساک در کشت بساک گیاه کبر

آزمایش سوم: بررسی اثر نوع و غلظت کربن مورد استفاده در محیط کشت و پیش‌تیمار دمایی بر القاء آندروژنز در کشت بساک کبر

اثر متقابل نوع پیش‌تیمار دمایی و نوع و غلظت کربوهیدرات روی صفات مختلف القاء آندروژنز در کشت بساک کبر تجزیه واریانس شد (جدول ۵). دو نوع پیش‌تیمار دمایی مختلف اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۱ برای تمامی صفات مورد مطالعه بجز درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم داشتند. انواع و غلظت‌های مختلف کربوهیدرات استفاده شده در محیط کشت اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ برای صفت درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم و در سطح ۰/۰۱ برای بقیه صفات مورد مطالعه داشتند. اثرهای متقابل نوع پیش‌تیمار و نوع کربوهیدرات اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ برای صفات درصد کالوس‌زایی در هفته‌های دوم، سوم و پنجم داشتند، در حالی‌که برای سایر صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۱ نشان دادند. اثرهای متقابل نوع پیش‌تیمار در غلظت کربوهیدرات برای صفات درصد کالوس‌زایی در هفته‌های دوم و سوم، میانگین تعداد رویان به‌ازای بساک و سرعت کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۱ داشتند، در حالی‌که برای صفت درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ نشان دادند و برای صفت درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر نوع پیش‌تیمار و نوع غلظت کربوهیدرات بر صفات مختلف آندروژنیک در کشت بساک گیاه کبر

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک	درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر	سرعت کالوس‌زایی
پیش‌تیمار	۱	۱۰۶۶/۶۷**	۳۰۱/۰۰**	۱۶/۶۷^{ns}	۰/۳۲۶۶**	۵/۴۲۲۶**	۲/۲۸۱۷**
نوع کربوهیدرات	۱	۲۸۱۶/۶۷**	۴۴۰۱/۰۰**	۱۸۳۷/۵۰**	۰/۳۰۳۷**	۳۰/۲۳۰۹**	۲۶/۳۲۰۲**
غلظت کربوهیدرات	۱	۲۰۱۶/۶۷**	۳۸۷۶/۰۰**	۱۰۴/۷۰**	۰/۰۲۰۴**	۶/۳۰۹۹**	۱۳/۶۰۰۲**
پیش‌تیمار× نوع کربوهیدرات	۱	۲۰۴/۱۷**	۱۷۶/۰۰**	۱۰۴/۷۰**	۰/۱۸۳۷**	۳/۸۰۴۵**	۱/۲۴۵۲**
پیش‌تیمار× غلظت کربوهیدرات	۱	۲۰۴/۱۷**	۱۷۶/۰۰**	۳۷/۵۰*	۰/۰۱۰۴**	۰/۰۷۸۱^{ns}	۰/۵۰۰۷**
نوع کربوهیدرات× غلظت کربوهیدرات	۱	۴/۱۷^{ns}	۲۶/۰۰^{ns}	۰/۰۰۰۰۱ns	۰/۰۱۵۰**	۱/۸۹۷۷**	۰/۰۰۶۷^{ns}
پیش‌تیمار× نوع کربوهیدرات× غلظت کربوهیدرات	۱	۱۶/۱۷^{ns}	۱۲۶/۰۰**	۰/۰۰۰۰۰۹ns	۰/۰۰۶۶**	۰/۴۳۲۶^{ns}	۰/۳۱۳*
خطای آزمایشی	۱۶	۱۶/۶۷	۱۳/۵	۸/۳۳	۰/۰۰۰۷	۰/۱۵۷۴	۰/۰۵۰۰
درصد ضریب تغییرات (C.V.)		۱۰۶۶/۶۷**	۳۰۱/۰۰**	۱۶/۶۷^{ns}	۰/۳۲۶۶**	۵/۴۲۲۶**	۲/۲۸۱۷**

*، ** و ns: به‌ترتیب اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و عدم اختلاف آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند.

البته بین اثرهای متقابل نوع و غلظت کربوهیدرات در محیط کشت اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ برای صفات میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک و درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر وجود داشت، در حالی‌که برای سایر صفات دیگر اختلاف معنی‌دار آماری بین آنها وجود نداشت. اثرهای متقابل سه‌گانه نوع پیش‌تیمار با نوع و غلظت کربوهیدرات برای دو صفت درصد کالوس‌زایی در هفته سوم و میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۱ و برای صفت سرعت کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ داشتند. این اثرهای متقابل سه‌گانه برای سایر صفات، اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند.

کاربرد قند مالتوز با غلظت ۳۰gr/L به‌همراه پیش‌تیمار ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۱/۶۶٪) در هفته سوم گردید. کمترین درصد کالوس‌زایی در هفته سوم مربوط به استفاده از قند ساکارز با غلظت ۶۰gr/L در ترکیب با پیش‌تیمار گرمایی (۳۶/۶۶٪) بود. استفاده از قند مالتوز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به همراه پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز منجر به بیشترین سرعت کالوس‌زایی (۸/۹۴) در صفت سرعت کالوس‌زایی گردید. کمترین سرعت کالوس‌زایی مربوط به استفاده از قند ساکارز با غلظت ۶۰gr/L و پیش‌تیمار گرمایی (۴/۶۰) بود. کاربرد قند مالتوز با غلظت ۳۰gr/L به‌همراه پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت بیشترین میانگین تعداد رویان را به‌ازای هر بساک (۰/۵۵) ایجاد کرد. کمترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک (۰/۰۰) مربوط به استفاده از قند ساکارز با غلظت‌های ۳۰gr/L و ۶۰gr/L به‌همراه پیش‌تیمار گرمایی بود (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع پیش‌تیمار و نوع و غلظت کربوهیدرات بر روی صفات درصد کالوس‌زایی در هفته سوم، سرعت کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک در کشت بساک گیاه کبر

پیش‌تیمار	کربوهیدرات		میانگین مربعات صفات		
	مالتوز	ساکارز	درصد کالوس‌زایی در هفته سوم	سرعت کالوس‌زایی	میانگین تعداد رویان به‌ازای بساک
پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به مدت ۱۴ روز	۰	۳۰	۶۱/۶۶ c	۶/۵۹ d	۰/۰۰ d
	۰	۶۰	۲۸/۳۳ f	۴/۶۰ f	۰/۰۰ d
	۳۰	۰	۹۱/۶۶ a	۸/۹۴ a	۰/۰۶۶۷ c
	۶۰	۰	۶۳/۳۳ c	۷/۳۴ c	۰/۰۳۳۳ c
پیش‌تیمار سرمایی ۷°C به‌مدت ۷ روز در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ µM (5-azac), ۲۰۰ µM (2,4-D)	۰	۳۰	۵۰/۰۰ d	۵/۹۱ e	۰/۰۶۶۷ c
	۰	۶۰	۳۶/۶۶ e	۴/۹۵ f	۰/۰۵۰۰ cd
	۳۰	۰	۷۸/۳۳ b*	۷/۸۱ b	۰/۵۵۰۰ a
	۶۰	۰	۵۱/۶۶ d	۶/۳۳ d	۰/۳۶۶۷ b

*: حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

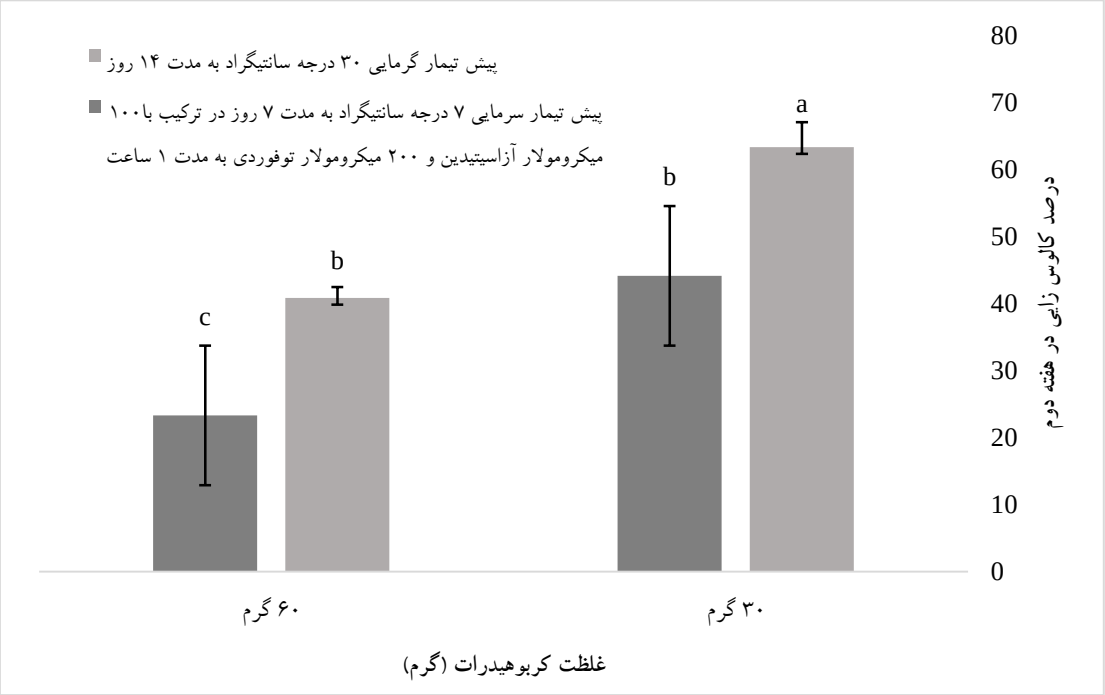
کاربرد قند مالتوز در محیط کشت به همراه پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی در هفته دوم (۶۳/۳۳٪) گردید. کاربرد قند ساکارز به همراه پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت، کمترین درصد کالوس‌زایی در هفته دوم (۲۸/۳۴٪) را به‌همراه داشت. همچنین استفاده از قند مالتوز در محیط کشت به همراه هر دو پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز و پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم (به‌ترتیب ۹۹/۱۶٪ و ۹۶/۶۷٪) شد. استفاده از قند ساکارز به‌همراه پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت کمترین درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم (۷۷/۵۰٪) را به‌همراه داشت. همچنین کاربرد قند مالتوز در محیط کشت به‌همراه پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز منجر به تولید بیشترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر (۳۱/۶۷٪) گردید. استفاده از قند ساکارز به‌همراه پیش‌تیمار گرمایی و پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت کمترین درصدهای کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر (به‌ترتیب ۶/۶۷٪ و ۵/۸۴٪) را به‌همراه داشت (جدول ۷).

جدول ۷- مقایسه میانگین نوع پیش‌تیمار و نوع کربوهیدرات بر صفات درصد کالوس‌زایی در هفته‌های دوم و پنجم و درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر در کشت بساک گیاه کبر

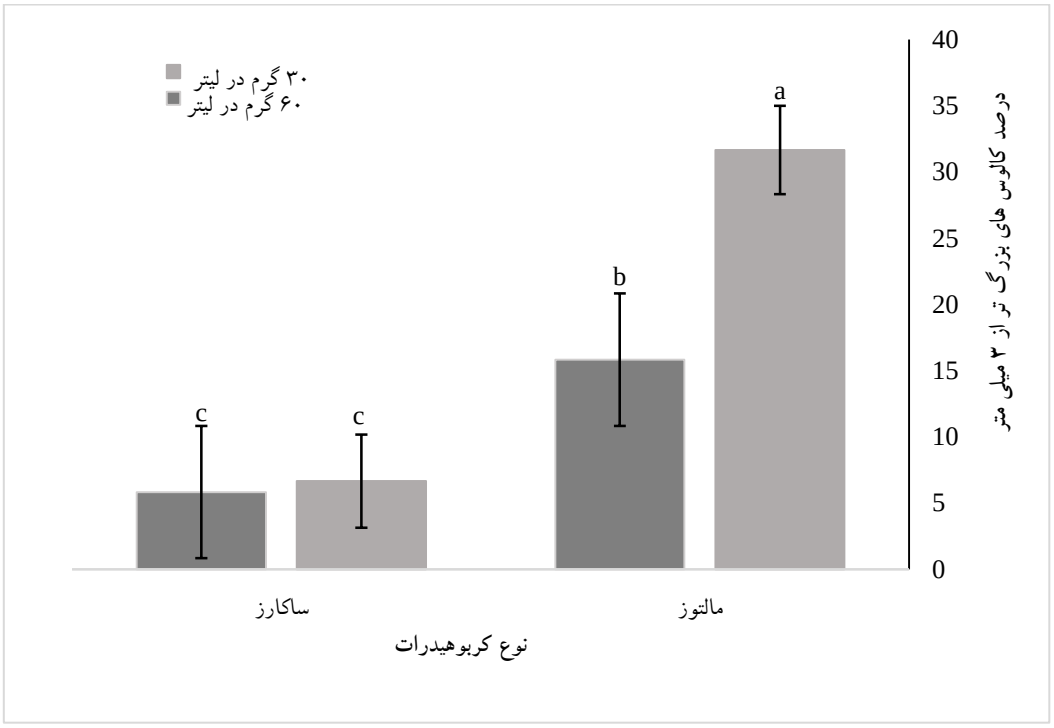
پیش‌تیمار	کربوهیدرات	درصد کالوس‌زایی در هفته دوم	درصد کالوس‌زایی در هفته پنجم	درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر
پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز	مالتوز	۶۳/۳۳a	۹۹/۱۶a	۳۱/۶۷a
	ساکارز	۳۵/۸۴bc	۷۷/۵۰c	۶/۶۷c
پیش‌تیمار سرمایی ۷°C به‌مدت ۷ روز در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ µM (5-azac), ۲۰۰ µM (2,4-D)	مالتوز	۴۴/۱۷b	۹۶/۶۷a	۱۵/۸۳b
	ساکارز	۲۸/۳۴c	۸۳/۳۳b	۵/۸۴c

*: حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

همچنین استفاده از ۳۰gr/L کربوهیدرات در محیط‌کشت به همراه پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی در هفته دوم (۶۳/۳۳٪) شد. در حالی‌که استفاده از ۶۰gr/L کربوهیدرات به‌همراه پیش‌تیمار سرمایی در ترکیب با پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار آزاسیتیدین و ۲۰۰ میکرومولار توفوردی به‌مدت یک ساعت کمترین درصد کالوس‌زایی در هفته دوم (۲۳/۳۴٪) را به‌همراه داشت (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع پیش‌تیمار و غلظت کربوهیدرات در محیط کشت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک گیاه کبر



شکل ۸- مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع و غلظت کربوهیدرات در محیط کشت روی صفت درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر در کشت بساک گیاه کبر

همچنین استفاده از قند مالتوز با غلظت ۳۰gr/L در لیتر بیشترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر (۳۱/۶۷٪) را تولید کرد و کمترین درصد کالوس‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر مربوط به قند ساکارز با غلظت‌های ۶۰gr/L و ۳۰gr/L (به‌ترتیب ۶/۶۷ و ۵/۸۸٪) بود (شکل ۸).

بحث

در این تحقیق برای اولین بار القاء آندروژنز در کشت‌های بساک گیاه کبر بررسی شد. به این منظور اثر تیمارهای مختلف از قبیل پیش‌تیمارهای سرمایی و گرمایی و همچنین نوع و غلظت کربوهیدرات مورد استفاده در محیط کشت بر روی القاء آندروژنز در بساک‌های کشت شده بررسی گردید. پیش‌تیمار سرمایی ۷°C مؤثرترین پیش‌تیمار در میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی بساک‌های کبر در مقایسه با سایر تیمارهای سرمایی بود. پیش‌تیمار سرمایی بساک‌ها به‌مدت ۴ روز منجر به افزایش درصد القاء کالوس (۵۰٪) و رویان (۰/۱۵ رویان به‌ازای هر بساک) در مقایسه با تیمار شاهد (۲۶/۶۷٪ کالوس‌زایی و ۰/۰۳ رویان به‌ازای هر بساک) در کشت بساک گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) گردید (Chardoli Eshaghi *et al*., 2015). اثرهای سودمند پیش‌تیمار سرمایی سبب کند شدن فرایند تجزیه بافت سوماتیک بساک شده و باعث حفاظت میکروسپورهای درون بساک در برابر ترکیب‌های سمّی که حاصل از تجزیه بساک است، می‌گردد (Duncan & Heberle, 1976). تیمار سرمایی موجب افزایش غلظت آمینواسیدهای آزاد و در نتیجه تغییر برنامه متابولیکی میکروسپورها می‌گردد، به‌طوری که برای منحرف کردن مسیر تکاملی میکروسپور به سمت رویان‌زایی مورد نیاز می‌باشد (Motallebi-Azar, 2010). Yang و همکاران (۲۰۱۱) پیش‌تیمار سرمایی ۴°C به‌مدت ۲ تا ۶ روز بر روی بساک‌های گیاه دارویی چای‌هو (*Bupleurum chinense*) را سبب القاء کالوس و رویان‌های بیشتری در مقایسه با تیمار شاهد دانستند. علاوه‌براین، پیش‌تیمار سرمایی نرخ تولید گیاهچه‌های هاپلوئید را از ۲/۵٪ به ۱۴/۲٪ افزایش داد (Yang *et al*., 2011). مطالعه اثر پیش‌تیمار سرمایی بر روی کشت بساک زیره (*Carum carvi* L.) نیز حکایت از آن داشت که اعمال پیش‌تیمار سرمایی ۶°C بر روی بساک‌ها، به‌طور معنی‌داری سبب فراوانی بیشتری از بساک‌های پاسخ‌ده به آندروژنز (۱/۶۱) به‌ازای هر ۱۰۰ بساک کشت شده در مقایسه با شاهد (۰/۲۳) می‌گردد (Smykalova *et al*., 2009). Tang و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که اعمال پیش‌تیمار سرمایی بر کشت‌های بساک رقم Lvcui در گیاه دارویی کارلا (*Momordica charantia*) به‌مدت ۲۴ ساعت، میزان القاء کالوس را به‌صورت معنی‌داری از ۲۲/۳۳٪ به ۵۱/۱۰٪ افزایش داد. به‌طور کلی مطالعات مذکور نشان می‌دهد که با وجود مؤثر بودن پیش‌تیمار سرمایی بر القاء آندروژنز، میزان مناسب این پیش‌تیمار در گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت است و دامنه این پیش‌تیمارهای سرمایی می‌تواند از ۴°C تا ۱۰°C باشد.

پیش‌تیمارهای گرمایی، معمولاً در محدوده دمایی ۳۷°C–۳۰ و برای دوره‌های زمانی مختلف (از چند ساعت تا چند روز) در کشت بساک بسیاری از گیاهان بررسی شده و اثرهای مثبت اعمال این نوع شوک‌های دمایی بر کالوس‌دهی و رویان‌زایی گامتی در گیاهان مختلف مرور شده است (Shariatpanahi *et al*., 2006a). در این آزمایش پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بیشترین درصد کالوس‌زایی را نسبت به سایر پیش‌تیمارهای گرمایی و تیمار شاهد داشته است. در حالی‌که بیشترین فراوانی رویان‌زایی در پیش‌تیمار ۲ روز در دمای ۳۲°C حاصل شده است. نتیجه حاصل از آزمایش ذکرشده با نتایج آزمایش‌های Chardoli Eshaghi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر پیش‌تیمارهای گرمایی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک گاوزبان اروپایی (*B. officinalis* L.) مطابقت دارد. این پژوهشگران با اعمال پیش‌تیمار گرمایی ۳۰°C به‌مدت ۱۴ روز بیشترین درصد

کالوس‌زایی (۷۱/۱۱٪) را بدست آوردند و پیش‌تیمار ۳۲°C به‌مدت ۳ روز نیز بیشترین رویان‌زایی (۰/۱۳ رویان به‌ازای هر بساک) را در پژوهش این محققان ایجاد کرد. در پژوهش انجام شده توسط Nomizu و همکاران (۲۰۰۴) پیش‌تیمار گرمایی بساک‌های کشت شده گیاه دارویی هپاتیکا (*Hepatica nobilis*) در ۳۵°C به‌مدت ۴ روز بیشترین میزان رویان‌زایی (۴۵/۲ رویان به‌ازای هر ۳۰ بساک) را ایجاد نمود. همچنین در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)، تیمار درجه حرارت بالا به‌مدت کوتاه (۳۵°C–۳۰) قبل از انتقال بساک‌ها به دمای ۲۵°C، مسیر توسعه میکروسپورها را به سمت رویان‌زایی تغییر داد (Germana, 2011). Song و همکاران (۲۰۰۷) با اعمال پیش‌تیمار گرمایی ۳۳°C به‌مدت یک ساعت بر بساک چهار واریته خیار (*Cucumis sativus* L.) نشان دادند که درصد رویان‌زایی در خیار، با استفاده از پیش‌تیمار گرمایی افزایش می‌یابد. همچنین در پژوهش انجام شده توسط Abdollahi و همکاران (۲۰۰۴) نیز اثر شوک گرمایی بر میکروسپورهای کلزا بررسی شد. این محققان بیان کردند که پیش‌تیمار گرمایی ۳۲°C به‌مدت ۸ ساعت سبب تغییر مسیر میکروسپورها از گامتوفیتی به اسپوروفیتی شده و در نهایت با تقسیمات متقارن، منجر به تولید رویان هاپلوئید گردید.

کربوهیدرات نقش مهمی را در کشت‌های درون‌شیشه‌ای به‌عنوان منبع کربن و انرژی ایفاء می‌کند. ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت به‌طور اولیه قادر به تولید نیازشان به مواد آلی از طریق فتوسنتز نیستند. به این ترتیب افزودن کربوهیدرات به محیط کشت لازم و ضروریست (George *et al.*, 2008). در این پژوهش کاربرد مالتوز با غلظت ۳۰gr/L در محیط کشت بساک کبر، آندروژنز را به میزان قابل توجهی افزایش داد. به‌عبارت دیگر استفاده از مالتوز در محیط کشت بساک کبر بر ساکارز ارجحیت دارد. نتیجه حاصل از آزمایش ذکرشده با نتایج آزمایش‌های Chardoli Eshaghi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر تیمارهای کربوهیدراتی مختلف بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک گاوزبان اروپایی، مطابقت دارد. در آزمایش این محققان بین کربوهیدرات‌های مورد استفاده در محیط کشت از نظر کارایی آندروژنز اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. به‌طور مشابهی، نتایج حاصل از کشت بساک گل گاوزبان اروپایی نشان داد که کاربرد مالتوز در غلظت‌های پایین (۳۰gr/L) در محیط‌کشت، میزان القاء کالوس را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. با توجه به اینکه ریزنمونه‌های کشت شده از گیاهان مادری پس از کشت دیگر خودپرور نیستند، بنابراین افزودن کربوهیدرات‌ها، به محیط‌کشت از اهمیت خاصی برخوردار است. بنابراین نوع و غلظت کربوهیدرات محیط‌کشت بر چگونگی رشد ریزنمونه‌ها و رفتار آنها از لحاظ جنین‌زایی مؤثر است (Kim *et al.*, 2004؛ Gram *et al.*, 1996؛ Burrell *et al.*, 2006؛ Majd *et al.*, 2006). محققان نشان دادند که مالتوز در مقایسه با ساکارز پایداری اسمزی محیط کشت را بهبود می‌بخشد و در غلظت‌های پایین رویان‌زایی را تحریک می‌کند (Sunderland & Huang, 1987). اگرچه ساکارز رایج‌ترین کربوهیدرات در کشت بافت گیاهی است اما کاربرد مالتوز در کشت بساک گیاهانی مانند بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) (Ferrie & Caswell, 2011) و زیره سیاه (*Carum carvi* L.) (Ferrie *et al.*, 2011) جایگزین ساکارز شده است. Bohanec و همکاران (۱۹۹۳) نیز نشان دادند که کاربرد مالتوز پاسخ آندروژنز را در گیاه دارویی گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum* Moench) بهبود می‌بخشد. Trejo-Tapia و همکاران (۲۰۰۲) اثر کربوهیدرات مالتوز و ساکارز را بر کشت بساک ارقام هیبرید برنج (*Japonica x Indica, Indica xJaponica*) مطالعه نمودند و بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۳/۳۳٪) را از کشت بساک‌های هیبرید MA92 × K در محیط‌های کشت حاوی مالتوز با غلظت ۳۰gr/L بدست آوردند. همچنین در پژوهش انجام شده توسط Yang و همکاران (۲۰۱۱) بر روی کشت بساک گیاه دارویی چای‌هو (*Bupleurum chinense*)، قند مالتوز به‌عنوان بهترین منبع تأمین کربن به میزان ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد.

کاربرد تیمارهای دمایی و کربوهیدرات به‌طور مؤثری باعث بهبود القاء آندروژنز در کشت بساک‌های گیاه کبر گردید که نتایج شمارش کروموزومی نیز ماهیت هاپلوئید

بودن رویان‌های حاصل را نشان داد. متأسفانه، با وجود دیده شدن نشانه‌های اولیه باززایی در رویان‌های حاصل، گیاه کامل در این تحقیق باززایی نشد. بنابراین با توجه به اهمیت گیاه کبر به‌عنوان یک گیاه دارویی که منبع غنی از مواد مؤثره روتین و کوئرسیتین می‌باشد، ادامه این تحقیقات در جهت بهینه‌سازی باززایی گیاه و تولید گیاهان دابل هاپلوئید و استفاده از این گیاهان در برنامه‌های اصلاحی کبر از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi, M.R., Moieni, A. and Jalali Javaran, M., 2004. Interactive effects of heat shock and culture density on embryo induction in isolated microspores culture of *Brassica napus* L. cv Global. Iranian Journal of Biotechnology, 2(2): 97-100.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding: 3-44. In: Bajaj, Y.P.S., (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry (Vol: 12): Haploids in Crop Improvement I. Springer, Berlin, 549p.
- Bohanec, B., Neskovic, M. and Vujicic, R., 1993. Anther culture and androgenetic plant regeneration in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 35: 259-266.
- Burrell, A.M., Lineberger, R.D., Rathore, K.S. and Byrne, D.H., 2006. Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. HortScience, 41: 1165-1168.
- Chardoli Eshaghi, Z., Abdollahi, M.R., Moosavi, S.S., Deljou, A. and Segui-Simarro, J.M., 2015. Induction of androgenesis and production of haploid embryos in anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 122: 321-329.
- Cornelini, P., Federico, C. and Pirrera, G., 2008. Arbusti autoctoni mediterranei per l'ingegneria naturalistica. Primo contributo alla morfometria degli apparati radicali. Collana Sicilia Foreste, 331p.
- Duncan, E.J. and Heberle, E., 1976. Effect of temperature shock on muclear phenomena in microspores of *Nicotina tabacum* and consequently on plantlet production. Protophasma, 90: 173-177.
- Ferrie, A.M.R. and Caswell, K.L., 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 104: 301-309.
- Ferrie, A.M.R., Bethune, T. and Mykytyshyn, M., 2011. Microspore embryogenesis in the Apiaceae. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 104: 399-409.
- Ferrie, A.M.R., Palmer, C.E. and Keller, W.A., 1995. Haploid embryogenesis: 309-344. In: Thorpe, T.A., (Ed.). In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 558p.
- Fletcher, R., Coventry, J. and Kott, L.S., 1998. Double Haploid Technology for Spring and Winter *Brassica napus*, Technical Bulletin, OAC Publication, Canada, 51p.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Qjiwa, K., 1968. Nutrient requirements of suspension culture of *soybean root* callus. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
- George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D., 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Dordrecht, The Netherlands, Springer, 504p.
- Germana, M.A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 283-300.
- Gram, T., Mattsson, O. and Joersbo, M., 1996. Division frequency of pea protoplasts in relation to starch accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 179-183.
- Ismaili, A. and Mohammadi, P.P., 2016. Effect of genotype induction medium carbohydrate source and polyethylene glycol on em-bryogenesis in maize (*Zea mays* L.) anther culture. Acta Physiologiae Plantarum, 38: 74.
- Kim, C.K., Oh, J.Y., Chung, J.D., Burrel, A.M. and Byrne, D.H., 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from in-vitro-grown leaf explant of rose. HortScience, 39: 1378-1380.
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, 2: 176-177.
- Majd, A., Chamandosti, F., Mehrabia, S. and Sheidai, M., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* L. Biological Science, 9: 729-734.
- Nabavi, S.F., Maggi, F., Daglia, M., Habtemariam, S., Rastrelli, L. and Nabavi, S.M., 2016. Pharmacological Effects of *Capparis spinosa* L. Phytotherapy Research , 30: 1733-1744.
- Nomizu, T., Niimi, Y. and Han, D., 2004. Haploid plant regeneration via embryogenesis from anther cultures of *Hepatica nobilis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 79: 307-313.
- Orsinky, B.L., McGregor, G.I., Johnson, G.I. and Kartha, K.K., 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anther cultures with medium with maltose. Plant Cell Reports 9: 365-369.
- Patricia, M.A., Julio, R.D. and Ana, I.H., 2012. IAPT/IOPB chromosome data 13. Taxon, 61(4): 889-902.
- Rahnavard, R. and Razavi, N., 2016. A review on the medical effects of *Capparis spinosa* L. Advanced Herbal Medicine, 2: 44-53.

- Santini, A. and Novellino, E., 2014. Nutraceuticals: beyond the diet before the drugs. Current Bioactive Compounds, 10: 1-12.
- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A., 2006a. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiologia Plantarum, 127: 519-534.
- Shariatpanahi, M.E., Belogradova, K., Hessamvaziri, L., Heberle-Bors, E. and Touraev, A., 2006b. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Reports, 25: 1294-1299.
- Shariatpanahi, M.E., Shakib, A.M. and Meybodi, D.E., 2012. Haploid and its Applications in Genetics and Plant Breeding. ABRII Publication, Iran, 276p.
- Sharma, A.K. and Sharma, A., 1972. Chromosome Techniques. Butter Worths, University Park Press, London, Baltimore, 724p.
- Sher, H. and Alyemeni, M.N., 2010. Ethnobotanical and pharmaceutical evaluation of *Capparis spinosa* L. validity of local folk and Unani system of medicine. Journal of Medicinal Plants Research, 4: 1751-1756.
- Smykalova, I., Smirous Jr, P., Kuboslova, M., Gasmanova, N. and Griga, M., 2009. Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). Acta Physiologia Plantarum, 31: 21-31.
- Song, H., Lou, Q.F., Luo, X.D., Wolukau, J., Diao, W., Qian, C. and Chen, J.F., 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 90: 245-254.
- Sunderland, N. and Huang, B., 1987. Ultrastructural aspects of pollen dimorphism. International Review of Cytology, 107: 175-220.
- Tang, Y., Xiaomei, L., Juan, L., Chao, M., Jia, L. and Huanxiu, L., 2012. Effect of different pretreatment on callus formation from anther in balsam pear (*Momordica charantia* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 6: 3393-3395.
- Trejo-Tapia, G., Amaya, U.M., Morales, G.S., Sa´nchez, A.D.J., Bonfil, B.M., Rodrı´guez-Monroy, M. and Jimenez-Aparicio, A., 2002. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 71: 41-46.
- Vahid, H., Rakhshandeh, H. and Ghorbani, A., 2017. Antidiabetic properties of *Capparis spinosa* L. and its components. Biomedicine & Pharmacotherapy, 92: 293-302.
- Wojnarowiez, G., Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R. and Cle´ment, C., 2004. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. Journal of Plant Physiology, 161: 747-755.
- Yadollahi, A., Abdollahi, M.R., Moieni, A. and Danaee, M., 2011. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. Acta Physiologia Plantarum, 33: 1905-1912.
- Yang, C., Zhao, Y., Wei, J., Zhao, L., Sui, C., Zhang, Z. and Cui, L., 2011. Factores affecting embryogenic callus production and plant regeneration in anther culture of *Bupleurum chinense.* Chinese Herbal Medicines, 3: 214-220.

Effects of temperature pretreatments and carbohydrate type on androgenesis induction in anther culture of *Capparis spinosa* L.

M. Mostafavi[1], M.R. Abdollahi[2*], D. Dastan[3] and H. Sarikhani[4]

1- M.Sc. graduate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, E-mail: m.abdollahi@basu.ac.ir
3- Department of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4- Department of Horticultural sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali University, Hamedan, Iran

Received: April 2020 Revised: March 2021 Accepted: April 2021

Abstract

Caper (*Capparis spinosa* L.) is a rich source of rutin, plays an essential role in human health. In the present study, the effects of cold (25°C as control, 4°C, and 7°C for 2, 4, and 7 days), heat (25°C as control, 30°C for 14 days, 32°C for 2 and 4 days, and 35°C for 8 hours), and carbohydrate treatments on the androgenesis efficiency were studied in the anther culture of caper. Also, the effects of maltose and sucrose at the concentrations of 30 and 60 g L^{-1} in combination with two temperature treatments (1- 30°C for 14 days and 2- 7°C for 7 days + azacytidine and 2,4-D pretreatments) on the androgenesis induction was evaluated. The temperature and carbohydrate treatments showed statistically significant differences ($P \leq 0.01$) in terms of callus and embryo formation. The 7°C for 2, 4, and 7 days produced the highest percentage (at the third week: 80, 78.34, and 76.67%, respectively) and callogenesis speed (7.85, 7.75, and 7.60 calli $week^{-1}$, respectively) and the 7°C for 7 days produced the highest embryo production (0.57 embryo $anther^{-1}$). The 30°C for 14 days treatment showed the highest percentage (at the third week: 100%) and callogenesis speed (9.44 calli $week^{-1}$). While the 32°C for 2 and 3 days and also 30°C for 14 days produced the highest number of embryos per anther (0.22, 0.20, and 0.18 embryo, respectively). The use of 30 g L^{-1} maltose in combination with the 30°C for 14 days produced the highest percentage (at the third week: 91.66%) and callogenesis speed (8.94 calli $week^{-1}$), while the 30 g L^{-1} maltose in combination with the 7°C for 7 days + azacytidine and 2,4-D pretreatments produced the highest mean embryo number per anther (0.55 embryo). The results of this research are of great importance for the use in the caper breeding programs.

Keywords: *Capparis spinosa* L., anther culture, callogenesis, embryogenesis, temperature treatment, carbohydrate.