دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

# بررسی باززایی مستقیم از ریزنمونه گره گیاه علف مار (*Capparis spinosa* L.) در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف

**مژده شیخی حموله[۱]، لیلا فهمیده[۲]، فاطمه بناءکاشانی[۳] و محمود سلوکی[۴]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، زابل، ایران.
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
۳- دانشگاه تهران، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، ایران
۳- دانشگاه زابل، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، زابل، ایران
تاریخ ارسال: ۹۷/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱
صفحه: ۵۴ تا ۶۱

**چکیده**

**علف مار یا کبر با نام علمی *Capparis spinosa* L. از گیاهان دارویی بوته‌ای و چندساله اقلیم‌های گرم و خشک است که در تابستان رشد می‌کند. این گیاه حاوی ترکیبات مهمی از جمله فلاونوئیدها، ترپن‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها و گلیکوزینولات‌ها می‌باشد. علی‌رغم نیاز روزافزون برای تکثیر انبوه این گیاه، اطلاعات کمی در مورد روش‌های ازدیاد آن وجود دارد. در این پژوهش برگ لپه‌ای، برگ، غنچه، پرچم، محور روی لپه، ریشه، گلبرگ، کاسبرگ و گره در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی KIN، NAA، BAP و IBA با غلظت‌های مختلف به‌منظور باززایی مستقیم گیاهچه، برای تولید شاخساره کشت شدند، تا بهترین محیط کشت‌ها برای تولید شاخساره و ریشه در کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های مختلف گیاه علف مار شناسایی شود. در آزمایش حاضر به‌جزء ریزنمونه‌های گره، هیچکدام از ریزنمونه‌ها باززایی نشان ندادند و میزان باززایی سایر ریزنمونه‌ها صفر بود. باززایی گیاه علف مار در مدت ۵ تا ۸ هفته از ریزنمونه گره حاصل شد. بهترین محیط برای تولید شاخساره محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و بهترین محیط ریشه‌دهی محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. با توجه به اهمیت گیاه دارویی علف مار و مشکل تکثیر این گیاه از طریق بذر، استفاده از این محیط‌ها و ریزنمونه گره به‌منظور تکثیر این گیاه در شرایط کشت درون شیشه ای پیشنهاد می‌گردد.**

**واژه‌های کلیدی: ریزنمونه، باززایی، Capparis spinosa، کشت بافت، تنظیم‌کننده رشد**

## مقدمه

پیشرفت‌های بیوتکنولوژی در کوتاه‌کردن مراحل اصلاح کلاسیک گیاهان مختلف کاربرد دارد. روش‌های اصلاحی کلاسیک می‌تواند در ترکیب با روش‌های کشت بافت، برای تغییر ژنتیکی صفات مطلوب به‌کار برده شود (۳۴). کلید دستیابی به کاربرد موفق بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات، داشتن سیستم باززایی کارآمد می باشد که می‌تواند در هیبریداسیون بین گونه ای، موتاسیون، اصلاح واریته‌های هیبرید، ریزازدیادی سریع و انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد. اصلاح سیستم‌های کشت بافت و افزایش کارایی باززایی گیاهچه در گیاهانی که مشکل تکثیر بذر دارند، یکی از راه حل های مناسب در جهت تکثیر این گیاهان است (۱۰،۳۳).

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی هم پای بشر داشته و یکی از مهم‌ترین منابع تامین غذا و داروی بشر در طول نسل‌ها بوده است (۱۴).

گیاه کَبَر یا علف مار متعلق به راسته میخک‌سانان (*Caryophyllales*)، تیره کبر (*Capparaceae*) و سرده کبرها (*Capparis*) است (۲۴). این گیاه جز گیاهانی ست که در اوایل تیر تا اواخر شهریور، گل می‌دهد و دوره رشد زایشی آن درست زمانی که دمای هوا بالا و رطوبت خاک در کمترین حد خود است تکمیل می‌شود (۴۰). علف مار یا کبر در کشورهای حوزه مدیترانه، در صنایع شیمیایی، غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می‌شود (۳۸). روتین[۱] یک آنتی‌اکسیدان بیوفلاونوئیدی قوی در بدن است که به‌عنوان یک مکمل رژیمی در شکنندگی مویرگ‌ها استفاده می‌شود (۲۰). استفاده دارویی از این گیاه به‌دلیل غنی‌بودن ریشه‌ها و جوانه‌های مولد گل و میوه‌ها از ترکیبات دارویی نظیر فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، پکتین‌ها، اسانس‌ها و به‌ویژه گلیکوزیدها و گلیکوزینولات‌ها است (۲۶،۲۲). وجود این ترکیبات ارزشمند بیوشیمیایی و قیمت بالای آن‌ها، باعث شده است که از جوانه‌های زایشی و میوه‌های نارس این گیاه به‌عنوان خاویار گیاهی یاد شود (۲۳). در سه دهه اخیر به‌دلیل افزایش تقاضا و بهره‌برداری بی‌رویه از بخش‌های زایشی و همچنین مشکلات موجود در زمینه تکثیر این گونه، جمعیت آن در جهان از جمله ایران با کاهش روبرو شده است (۳۵،۲۳). تکثیر گیاه کبر به‌طور سنتی از طریق بذر و قلمه‌زنی صورت می‌گیرد که هر دو روش با مشکلاتی مواجه می‌باشند. بذرها دو پوسته‌ای هستند که سلول‌های هر دو پوسته بعد از رسیدگی چوبی و ضخیم می‌شوند (۳۶). از این رو بذر کبر دارای خواب مکانیکی است و در صورت فراهم‌بودن شرایط محیطی مطلوب، درصد جوانه‌زنی در حد کمتر از ۵ درصد است (۳۲،۲).

همانند بسیاری از گیاهان مهم اقتصادی، تکثیر آزمایشگاهی گیاه *C. spinosa* با استفاده از کشت بافت، می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های تکثیر سنتی در نظر گرفته شود. به‌علاوه باززایی از طریق قطعات ریزنمونه در جهت حفظ ژنوتیپ‌های خاص حائز اهمیت است (۷).

قطعات ریزنمونه در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند به دو طریق مستقیم و غیرمستقیم، شاخه‌های نابجا تولید کنند. در

1- Routine

اکثر مطالعات تشکیل مریستم‌های شاخساره به‌طور غیرمستقیم یعنی پس از تشکیل کالوس و بر روی آن صورت می‌گیرد (۹،۸). مهم‌ترین روش تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت، باززایی گیاهچه از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است (۳۷). امینی و همکاران (۱) در تحقیقی نشان دادند که تشکیل کالوس اولین رویداد در روند کشت بافت گیاهی است. کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی تمایز نیافته است که از ریزنمونه‌های گیاهان بالغ کشت‌شده در محیط‌های کشت مناسب به‌دست می‌آید. معمولا محیط کشت حاوی 2,4-D به‌تنهایی نیز برای تولید کالوس موثر نیست و بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب 2,4-D و KIN ($mg.l^{-1}$ ۱ :($mg.l^{-1}$ ۵–۱) مشاهده شده است (۱). همچنین تشکیل کالوس تازه در دوره زمانی کوتاه ۲۰ تا ۲۵ روز شروع می‌شود (۱). تاکنون چندین تحقیق برای باززایی این گیاه انجام شده است در پژوهشی از قطعات گره برای ریزازدیادی گیاه کبر استفاده کردند. شاخساره‌ها در محیط MS حاوی Zea ($mg.l^{-1}$۱) بیشترین میزان تولید را داشتند و بیشترین ریشه‌دهی در غوطه‌وری شاخساره‌های تولیدی در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر IAA به مدت ۴ ساعت به‌دست آمد (۶). در آزمایش دیگر باززایی گیاه *C. spinosa*، بعد از کشت ریزنمونه‌های گره در محیط MS حاوی ۴ میکرومول BAP، ۰/۳ میکرومول IAA و ۰/۳ میکرومول $GA_3$ به‌دست آمد (۳۵).

تاکنون تحقیق جامعی مبنی‌بر استفاده از ریزنمونه‌های مختلف تحت تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد پرکاربرد صورت نگرفته است. لذا این پژوهش با هدف بررسی امکان باززایی مستقیم *C. spinosa* با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف شامل برگ لپه‌ای، برگ رشدیافته، غنچه، پرچم، محور روی لپه، ریشه، گلبرگ، کاسبرگ و گره در محیط کشت MS مختلف حاوی غلظت‌های متفاوت برخی تنظیم‌کننده‌های رشد (KIN، NAA، BAP و IBA) انجام شد، تا ریزنمونه مناسب و همچنین بهترین محیط کشت‌های مورد نیاز برای تولید شاخساره، ریشه و گیاه کامل انتخاب شود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه، ضدعفونی و کشت گیاه

این پژوهش در پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. از تمام قسمت‌های بوته کامل این گیاه که جمع‌آوری نمونه گیاهی از محوطه دانشگاه صنعتی اصفهان صورت گرفت و از بخش‌های مختلف گیاه به‌عنوان ریزنمونه در تیمارهای مختلف استفاده شد. ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای، برگ، ریشه، پرچم، غنچه گل، محور زیر لپه، کاسبرگ و گلبرگ در محیط کشت‌های مختلف کشت شد. ابتدا نمونه را به مدت ۲ ساعت در ظرفی زیر آب جاری قرار داده تا درصورت وجود گرد و خاک، اسپور قارچ و دیگر آلودگی‌ها، شسته شود، بعد به‌مدت ۸ الی ۱۰ دقیقه بسته به ضخامت نمونه، در هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ و یک قطره مایع ظرفشویی قرار گرفت، سپس نمونه‌های گیاه از ظرف خارج شده و ۳ بار با آب مقطر و هر بار به‌مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند تا هیپوکلریت آنها کاملاً شسته شود. در ادامه نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند و دوباره ۳ مرحله با آب مقطر استریل، هر مرحله برای ۲ دقیقه، کاملاً شسته شدند. به‌منظور به‌دست‌آوردن بهترین محیط‌ها برای تولید شاخساره و ریشه در کشت درون شیشه‌ای گیاه علف مار، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه‌های مختلف اجرا شد.

### باززایی مستقیم تولید شاخساره و ریشه

برای ایجاد شاخساره در باززایی مستقیم هفت محیط جامد تهیه شد (جدول ۱). از تمام قسمت‌های گیاه مانند برگ لپه‌ای، برگ رشدیافته، غنچه، پرچم، محور روی لپه، ریشه، گلبرگ، کاسبرگ و گره برای باززایی مستقیم استفاده شد. برای هر ریزنمونه ۴ تکرار (پتری دیش) در نظر گرفته شد و درون هر پتری دیش ۵ عدد ریزنمونه قرار داده شد. واکشت نمونه‌ها ۲۰ روز یک بار در محیط‌های تازه تهیه شده‌ی محیط‌های قبلی صورت گرفت. بعد از حدود ۳ هفته از کشت اولیه، اولین آثار تولید شاخساره نمایان شد. در ادامه برای تولید ریشه ریزنمونه‌هایی که بعد از سه بار واکشت، شاخساره خوبی ایجاد کرده بودند به محیط‌کشت‌های موجود در جدول ۱ منتقل شدند.

در ادامه درصد تولید شاخساره و تولید ریشه نیز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد ریزنمونه‌های به شاخساره تبدیل شده و یا ریشه دار شده شمارش و به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت‌شده برای هر نوع محیط کشت (تعداد کل ریزنمونه‌های کشت‌شده: ۴ تکرار ضرب در ۵ عدد ریزنمونه کشت شده در هر تکرار، مجموعا ۲۰ نمونه) تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد.

جدول ۱- محیط کشت‌های مورد استفاده جهت تولید شاخساره و ریشه

Table 1. The mediums used to produce shoots and the root

| نام محیط کشت The name of the medium | تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در محیط کشت MS Components of the medium | |
|---|---|---|
| | شاخساره | ریشه |
| محیط کشت اول | حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین | حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید |
| محیط کشت دوم | حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین | حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید |
| محیط کشت سوم | حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید | حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید |
| محیط کشت چهارم | حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید | حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید |
| محیط کشت پنجم | حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۶ - بنزیل آمینوپورین | حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید |
| محیط کشت ششم | حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۶ - بنزیل آمینوپورین | - |
| محیط کشت هفتم | حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر ۶ - بنزیل آمینوپورین | - |

## تجزیه‌های آماری

تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی باززایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار با نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office Exel 2010 مورد بررسی قرارگرفت. با توجه به اینکه داده‌های حاصل از اندازه گیری صفات بر اساس درصد بودند (درصد تولید شاخساره و درصد تولید ریشه)، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X_1=\sqrt{X2}$ استفاده شد (۱۱).

## نتایج و بحث

### نتایج باززایی مستقیم تولید شاخساره و ریشه

با توجه به نتایج آزمایشات باززایی، هیچ‌کدام از ریزنمونه‌های مورد استفاده در باززایی به جز ریزنمونه گره، به تیمارهای اعمال‌شده پاسخی نداد و میزان باززایی سایر ریزنمونه‌ها صفر بود. تغییرات محیط (ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشدی) برای ریزنمونه گره در سطح یک درصد برای تولید شاخساره معنی‌دار شد (جدول ۲).

در مورد ریشه‌دهی، تغییرات محیط در سطح یک درصد معنی‌دار شد. از آنجا که تولید شاخساره فقط برای ریزنمونه گره اتفاق افتاد، لذا ریشه‌دهی فقط برای شاخساره‌های حاصل از ریزنمونه گره انجام شد.

از ریزنمونه‌های (برگ لپه‌ای، برگ، غنچه، پرچم، محور روی لپه، ریشه، گلبرگ، کاسبرگ و گره) استفاده‌شده در این پژوهش، در محیط اول که محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN و محیط سوم که محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بوده میزان باززایی در ریزنمونه گره در هر دو محیط ۳۰ درصد بوده است. که این میزان نیز بعد از حدود ۲۰ الی ۳۰ روز مشاهده شد (جدول ۳). در محیط دوم و چهارم که به‌ترتیب شامل محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN و محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود، مطابق جدول ۳، میزان باززایی ریزنمونه گره، به‌ترتیب ۵۰ و ۶۰ درصد بوده که اولین علائم باززایی در این محیط‌ها تقریباً ۲ هفته بعد از کشت مشاهده شد (شکل ۱-A) و هیچکدام از ریزنمونه‌ها باززایی نشان ندادند و میزان باززایی سایر ریزنمونه‌ها صفر بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد تولید شاخساره حاصل از ریزنمونه گره در محیط کشت‌های مختلف

Table 2. Analysis of variance of the percentage of shoots production from node explants in different environments

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات (MS) درصد تولید شاخساره |
|---|---|---|
| تیمار | ۶ | ۱۹/۸ ** |
| اشتباه | ۲۱ | ۱/۱۶ |
| CV | - | ۱/۸ |
| میانگین | - | ۳۴/۳ |

**: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد تولید شاخساره باززایی مستقیم در محیط‌های مختلف
Table 3. Comparison of the average percentage yield of direct regeneration shoots in different environments

| نام محیط کشت<br>The name of the medium | درصد تولید شاخساره باززایی مستقیم<br>Percentage of direct regeneration shoots production |
|---|---|
| MS+Kin 1 | ۳۰ c |
| MS+Kin 2 | ۵۰ b |
| MS+NAA 1 | ۳۰ c |
| MS+NAA 2 | ۶۰ ab |
| MS+BAP 0.5 | ۰ d |
| MS+BAP 1 | ۰ d |
| MS+BAP 2 | ۷۰a |

در مورد محیط‌های پنجم و ششم باززایی که شامل محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود، باززایی حتی در ریزنمونه گره نیز مشاهده نشد. اما در مورد محیط هفتم که شامل محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود، تولید شاخساره ریزنمونه گره ۷۰٪ بعد از ۱ هفته از کشت در محیط باززایی مشاهده شد (جدول ۳). تنها محیطی که باعث تحریک و تولید ریشه‌دهی در شاخساره‌های تولیدی شد محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود که بعد از ۳ الی ۴ هفته از کشت شاخساره‌ها (48 شاخساره تولیدشده) در این محیط ریشه‌دهی مشاهده شد و در ۴۰٪ شاخساره‌ها توانست تولید ریشه نماید.

شکل ۱- نمای از مراحل باززایی مستقیم تحت شرایط درون شیشه‌ای: شکل A- تولید مستقیم شاخساره از جداکشت گره، شکل B- قرار دادن شاخساره‌ها ایجادشده در محیط ریشه‌دهی، شکل C- انتقال گیاهان باززا شده به گلدان
Figure 1. A view of the direct regeneration stages under in vitro conditions: Fig. A-Direct production of shoots from the nodule, Fig. B- Placing shoots created in the root zone, Fig. C. Transferring plants rebuilt to the pot

در آزمایش حاضر از بین ۹ ریزنمونه استفاده شده تنها از ریزنمونه گره باززایی مشاهده شد. بهترین محیط برای باززایی مستقیم در آزمایش حاضر محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و بهترین محیط ریشه‌دهی نیز محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. در پژوهشی اقدام به باززایی این گیاه از ریزنمونه گره نمودند که بیشترین میزان تولید شاخه در ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات و بیشترین میزان تولید ریشه در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (۵). عملکرد اصلی سیتوکینین‌ها در گیاهان، تسریع تقسیم سلولی می‌باشد (۱۲). در آزمایشی از قسمت‌های مختلف گل‌های بسته و تلقیح‌نیافته گیاه علف مار در مزرعه برای باززایی استفاده کردند که بهترین نتیجه از کشت سلول‌های تلقیح‌نیافته در محیط MS حاوی ۸۸ میلی‌مول ساکارز و ۱۳ میکرومول BAP به‌دست آمد (۴). قطب زاده کرمانی و همکاران در پژوهشی به باززایی گیاه ازمک (*Cardaria draba* L.) از طریق کشت بافت پرداختند و مشخص نمودند که تیمار با غلظت تنظیم‌کننده رشد سه میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه نیم میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار سه میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌ترتیب بهترین کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و مناسب‌ترین تعداد شاخه در ریزنمونه‌های محور زیر لپه را نشان دادند. همچنین بهترین ریشه‌زایی برای ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای به‌ترتیب در تیمارهای با غلظت تنظیم‌کننده رشد نیم میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی انجام گرفت (۱۸).

در پژوهشی دیگر نیز بیشترین درصد باززایی را در ساقه‌های جدید گیاه کلزا در غلظت ۴ میلی‌گرم BAP بدون حضور اکسین مشاهده کردند (۳۱). اما گو و همکاران (۱۹) معتقدند که حضور اکسین در کنار سیتوکینین باعث باززایی بهتر بر روی ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای می‌شود. قاسمی و همکاران نیز (۱۷) بیان می‌کنند که حضور NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باعث اندام‌زایی مؤثر کلزا می‌شود. گونه‌های مختلف براسیکا نیز با وجود مقدار بالای سیتوکینین و کم اکسین ساقه‌زایی بهتری داشتند اما در گیاه *Brassica juncea* و *Brassica campestris* با وجود

اکسین در محیط تعداد شاخه به‌شدت کاهش می‌یافت (۲۱) و ترکیب BAP و NAA باعث عدم شاخه‌زایی و یا کم‌شدن تعداد ساقه جدید کلزا در محیط کشت گردید (۱۳).

جرج و رائو (۱۵) گزارش کردند که تولید نوساقه از برگ لپه خردل هندی در محیط کشت با ترکیب تیماری B1N1 خیلی‌کم بوده و این سطح تنظیم‌کننده رشد مانع ساقه‌زایی می‌شود. نتایج پژوهشی مشخص نمود که در باززایی مستقیم دو نوع بابونه، بهترین ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون به‌ترتیب با ۷۸/۷۵ و ۷۵ درصد شاخساره‌زایی بودند. همچنین برترین رقم و ترکیب تنظیم‌کننده رشد، رقم بابونه شیرازی با ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ip-۲ به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS بود (۲۵). در مطالعه‌ای که بر روی تکثیر درون شیشه‌ای پامچال (*Primula acaulis* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخساره صورت گرفت، مشاهده نمودند که تعداد ریشه‌های اصلی و فرعی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد قرار گرفت، به‌طوری که بیشترین تعداد ریشه در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده گردید (۳۰).

در این مطالعه، ریشه‌ها همانند شاخساره‌ها، به‌طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس ایجاد شدند. از نتایج مهم این پژوهش، تولید ریشه پس از انتقال شاخساره‌های تولیدشده به محیط ریشه‌زایی بود. این نتیجه در پژوهش بر روی گونه *P. scotica* (گونه نادر اسکاتلندی) نیز مشاهده شده است (۳).

در پژوهش موافقی و همکاران (۲۹) باززایی گیاه کبر با استفاده از قطعات ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، بیشترین تولید شاخساره را داشتند. بیشترین میزان تولید ریشه نیز در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بعد از ۴ هفته، ریشه‌های تشکیل‌شده در پای شاخساره‌ها قابل رؤیت بود. همچنین ذکر کردند که افزایش مقدار NAA باعث کاهش تولید شاخساره و تولید کالوس می‌شود که با نتایج حاصله از این تحقیق که ریشه زایی شاخساره ها بعد از قرارگرفتن در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بعد از گذشت ۳ الی ۴ هفته مشاهده شد مطابقت دارد ولی برخلاف گزارش آنان تولید شاخساره در این تحقیق با افزایش غلظت NAA از ۱ به ۲ میلی گرم در لیتر بیشتر شد، مطابقت ندارد (۲۹).

تاثیر کاربرد غلظت‌ها و ترکیبات مختلف انواع سیتوکینین بر القای شاخساره‌زایی در کشت بافت عدس (*Lens Medik culinaris*) رقم گچساران نیز نشان داد که 2ip در القای شاخه‌زایی موثرتر از BAP می‌باشد (۳۹). در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) باززایی از ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP صورت گرفت (۲۷).

نتایج پژوهشی باززایی مستقیم را در ریزنمونه جوانه شاخه کشت شده اسفناج در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش کردند (۲۸). باززایی گیاه نعناع فلفلی با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات گره و نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با موفقیت صورت گرفت (۱۶). یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که بین مواد گیاهی در خصوصیاتی همانند سن جداکشت، ژنوتیپ، نوع تنظیم‌کننده رشدی مورد استفاده، شرایط و ترکیبات محیط کشت ارتباط وجود دارد (۱۰). بنابراین در مطالعات کشت بافت گیاهان، قسمتی از یک گیاه به‌عنوان جداکشت، می‌تواند در مقایسه با سایر قسمت‌های دیگر، توان سازگاری و باززایی بیشتری داشته باشد. این شرایط نشان می‌دهد که منبع جداکشت از فاکتورهای مهمی است (۱۰).

در مجموع در این تحقیق بین ریزنمونه‌های مختلف و تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده به‌جز ریزنمونه‌های گره، هیچکدام از ریزنمونه‌های مورد مطالعه باززایی نشان ندادند. باززایی گیاه علف مار در مدت زمان ۵ تا ۸ هفته، از ریزنمونه گره حاصل شد که بهترین محیط برای تولید شاخساره محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیترBAP و بهترین محیط ریشه‌دهی محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. لذا به منظور تولید انبوه این گیاه دارویی استفاده از ریزنمونه گره و این محیط‌ها پیشنهاد می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9517-43 انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می شود.

## منبع


1. Amini, F., Z. Ganbarzade and M. Askary Mehrabadi. 2013. Optimization of callus Production and Plant Regeneration in *Salsola arbuscula* pall. Journal cell and tissue, 4: 129-137 (In Persian).
2. Ayanoglu, A. and A. Mert. 1999. The effect of different Tratification duration and chemical treatment on the emergence of the seeds of two caper species (*Capparis Spinosa* L. *and Capparis Ovata Desf*). Turkish journal of botany, 5: 77-80.
3. Benson, E.E., J.E. Danaher, I.M. Pimbley, C.T. Anderson, J.E. Wake, S. Daley and L.K. Adams. 2000. In vitro micropropagation of Primula scotica: a rare Scottish plant. Journal of biodiversity and conservation, 9: 711-726.
4. Carra, A., M. Sajeve, L. Abbate, M. Siragusa, F. Sottile and F. Carimi. 2012. In vitro Plant Regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from Floral Explants and Genetic Stability of Regenerants. Journal plant cell tissue organ culture, 109: 373-381.
5. Chahar, O.P., P. Kharb, S.F. Ali, P. Batra and V.K. Chowdhury. 2010. Development of protocol on micropropagation in Ker (*Capparis decidua* (forsk) edgew). World. Applied. Sciences. Journal, 10: 695-698.
6. Chalak, L. and A. Elbitar. 2006. Micropropagation of *Capparis spinosa* L. Subsp. Rupestris Sibth. & Sm. By Nodal Cuttings. Journal Indian of biotechnology, 5: 555-558.
7. Debnath, M., C.P. Malik and P.S. Bisen. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Pharm biotechnology, 7: 33-49.
8. Dixon, R.A. and R.A. Gonzales. 1996. Plant cell culture: a practical approach. Edited by R.A. Dixon. IRL press, Oxford, UK, 252 pp.
9. Dodds, J.H. and L.W. Robert. 1995. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, 256 pp.
10. Fahmideh, L., Gh.A. Ranjbar, O. Alishah and N.A. Babaeian Jelodar. 2015. Plant regeneration from 6 Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genotypes through somatic embryogenesis. Journal of Crop Breeding, 7(16): 40-48 (In Persian).
11. Fahmideh, L., Gh.A. Ranjbar, O. Alishah and N.A. Babaeian Jelodar. 2010. Study of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Cotton. Journal crop breed, 2: 67-80 (In Persian).
12. Fathi, G. and B. Ismailpour. 2010. Plant growth regulators (principles and applications). Mashhad Jehad-Danshgahi Press, 288 pp (In Persian).
13. Fazekas, G.A., P.A. Sedmach and M.V. Palmer. 1986. Genetic and environmental effects on in vitro shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica juncea*. Plant cell, tissue and organ culture, 6: 177-180.
14. Gadzovska, S., S. Maury, A. Delaunay, M. Spasenoski, J. Joseph and D. Hagege. 2007. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant cell tissue culture, 89: 1-13.
15. George, L. and P.S. Rao. 1980. In vitro regeneration of mustard plants (*Brassica juncea* var. Rai-5) on cotyledon explants from non-irradiated irradiated and mutagen-treated seed. Annals of botany, 46: 107-112.
16. Ghanti, K., C.P. Kaviroj, R.B. Venugopal, F.T.Z. Jabeen and S. Rao. 2003. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. Journal Indian of biotechnology, 3: 594-598.
17. Ghasemi, B.J., G.I. Karlov and A. Ahmadikhah. 2007. Effects of genotype explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot in vitro organogenesis. Journal African of biotechnology, 6: 861-867.
18. Ghotbzadeh Kermani, S., Sh. Pourseyedi, Gh.A. Mohamadi, A. Moieni and A. Baghizadeh. 2015. Regeneration of White top (*Cardaria draba* L.) using issue Culture. Journal of Agricultural biotechnology, 7: 134-154.
19. Guo, Dp., Z.J. Zhu, X.X. Hu and S.J. Zheng. 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem Mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). Plant cell, tissue and organ culture, 83: 123-127.
20. Hemmati, K.H., A. Ghasem Nejad, K. Mashayekhi and P. Bashiri Sadr. 2012. Study of the effect of habitat on the amount of some flavonoid compounds of lime tree (*Tilia platifolia* L.). Journal of plant production research, 19: 148-141 (In Persian).
21. Jain, R.K., J.B. Chowdhury, D.R. Sharma and W. Friedt. 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. Plant cell, tissue and organ culture, 14: 197-206.
22. Khanfar, M.A., S.S. Sabri, M.H. Zarga and K.P. Zeller. 2003. The chemical constituents of *Capparis spinosa* of Jordanian origin. Natural product research, 17: 9-14.
23. Kontaxis, D.C. 1989. *Capers:* A new crop for California. California University Press, USA.
24. Lowrence, G.H.M. 1951. Taxonomy of vascular plants. The Macmillan Company New York, 823 pp.

25. Masoumi Asl, A., A. Aryan Nezhad and M. Dehdari. 2015. Investigation of direct regeneration in *Matricaria chamomilla* L. and Sharia (*Matricaria recutita* L.) in vitro. Journal of horticulture, 29: 601-609.
26. Matthaus, B. and M. Ozcan. 2002. Glucosinolate composition of young shoots and flower buds of Capers (*Capparis species*) growing wild in Turkey. Journal of agriculture and food chemistry, 50: 7323-7325.
27. Meftahizade, H., H. Moradkhani, B. Naseri, M. Lotfi and A. Naseri. 2010. Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. Medicinal plant research, 4: 240-246.
28. Mitra, S.K. and K.K. Mukherjee. 2001. Direct organogenesis in Indian spinach. Plant cell, tissue and organ culture, 67: 191-194.
29. Movafeghi, A., G.H. Habibi and M. Aliasgar pour. 2008. Journal of biologic of Iran, 21: 289- 297 (In Persian).
30. Noroozi Sharaf, A.R., M. Gholami, Y. Hamidoghli and H. Zakizadeh. 2012. In Vitro propagation of primrose (*Primula Acaulis* L.), via shoot tip explants. Agricultural biotechnology, 2: 35-41 (In Persian).
31. Ono, Y., T. Yoshinito and N. Kazuma. 1994. Effect of genotype on shot regeneration from cotyledonary explants of rape seed (*Brassica napus* L.). Plant cell reporters, 14: 13-17.
32. Orphanos, P.I. 1983. Germination of Caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. Journal of horticultural Science, 58: 267-270.
*33.* Ozyigit, I.I. 2009. In vitro shoot development from three different nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj-Napoca, 37: 74-78.
34. Ozyigit, I.I. and N. Gozukirmizi. 2008. High efficiency shoots and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal Pakistan of botany, 40: 1665-1672.
35. Rodrigues, R., M. Rey, L. Cuozzo and G. Ancora. 1990. In vitro propagation of caper (*Spinose* L.). In vitro cellular and developmental biology, 26: 531-536.
36. Sozzi, G.O. and A. Chiesa. 1995. Improvement of Caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. Journal of horticultural sciences, 62: 255-262.
37. Srivastava, S. and A.K. Srivastava. 2007. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-value secondary metabolites. Crit Rev Biotechnol, 27: 29-43.
38. Stephens, J.M. 2001. Capers: *Capparis spinose* L. University of Florida USA, On Internet: http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/MV/MV04000.pdf
39. Zaker Tavallaie, F., A. Bagheri, B. Ghareyazie and K.K. Sharma. 2009. Optimization of tissue culture condition in lentil (*Lens culinaris Medik.* cv. Gachsaran) to induce effective multiple shoot induction. Journal Iranian agronomy research, 7: 411-419 (In Persian).
40. Zohary, M. 1969. The species of *Capparis* in the Mediterranian and the near Easter Countries. Bull research council Israel, 8: 49-64.

# Investigation of The Direct Regeneration of *Capparis spinosa* L. in MS Medium Containing Different Hormonal

**Mozhdeh Sheikhi[1], Leila Fahmideh[2], Fatemeh Benakashani[3] and Mahmud Solouki[4]**

1- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Associate Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, (Corresponding author: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
3- Assistant Professor of Department of Agronomy and Plant Breeding Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Iran
4- Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
Received: December 8, 2018 Accepted: February 20, 2020

## Abstract

Caper bush (*Capparis spinosa* L.), is a perennial medicinal plant of hot and dry climates that grows in the summer. This plant contains important compounds such as flavonoids, terpenes, alkaloids, glycosides, and glycosinolates. Despite the ever-increasing need for the mass reproduction of this plant, there is little information about the methods of its proliferation. In this research, the cotyledon leaf, leaf, bud, stamen, cotyledon upper axis, root, petal, sepal, and node explants were cultured in MS medium containing KIN, NAA, BAP and IBA hormones at different concentrations in order to direct regeneration of seedlings for shoot. Experiment was conducted to identify the best media for production of shoots and roots *in vitro* cultivation of caper different explants. In present experiment, except node explants, none of the other explants were regenerated, and the regeneration from node explants were achieved in 5 to 8 weeks, where MS medium containing 2 mg/L BAP and MS medium containing 1 mg/L NAA were the best medium for production of shoots and rooting, respectively. Considering the importance of *Capparis spinose* as medicinal plant and its difficulty to reproduction by seed, use of these media and node explant are recommended to production of this medicinal plant under *in vitro* culture conditions.

**Keywords:** *Capparis spinosa* L, Explant, Hormone, Regeneration, Tissue culture