

تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده فلفل دلمه‌ای از طریق کشت
بساکProduction of Doubled Haploid Plants of Bell Pepper
(*Capsicum annuum*) Through Anther Cultureسید معین ذکریا^۱، علیرضا زبرجدی^{۱*}، ابوذر اسدی^۲، مریم گل‌آبادی^۳، دانیال کهریزی^۴ و خوز ماریا سیگی
سیمارو^۵Seyed-Moein Zakaria¹, Alireza Zabarjadi^{1,2*}, Abozar Asadi³, Maryam
Golabadi³, Danial Kahrizi⁴, José María Seguí Simarro⁵۱- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. ۲- پژوهشکده
گیاهان دارویی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. ۳- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی،
واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. ۴- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس،
تهران، ایران. ۵- موسسه حفاظت و بهبود تنوع زراعی، دانشگاه پلی تکنیک والنسیا، اسپانیا1. Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture, Razi
University, Kermanshah, Iran. 2. Research Institute of Medicinal Plants, Razi University,
Kermanshah, Iran. 3. Department of Plant Production and Genetics Engineering, Islamic
Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran. 4. Department of Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 5. Cell Biology Group-
COMAV Institute, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: zebarjadiali@yahoo.com

zebarjadiali@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۹ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۲۹)

Received: 2025/11/18 | Accepted: 2026/01/19 | Published: 2026/1/19

Abstract

Anther culture is recognized as an efficient method for producing doubled haploid (DH) plants, serving as a powerful tool to accelerate plant breeding programs, especially in self-pollinated crops such as bell pepper (*Capsicum annuum*). In this study, four commercial F1 hybrids—Nirvin, Arancia, Tarento, and Massilia—were evaluated for their capacity to produce callus, embryos, and plantlets through anther culture. Flower buds at the appropriate microspore developmental stage (late uninucleate to early binucleate) were selected based on DAPI staining following a cold pre-treatment, and their anthers were cultured on five different media containing various concentrations of kinetin and 2,4-D. The experiment was conducted in a factorial based on a completely randomized design (CRD) with four replicates. Traits including callus induction, embryogenesis, and plant regeneration percentages were recorded. The results indicated that all treatments, except for the control (lacking plant growth regulators), induced callus formation. The highest callus induction rate (78.47%) was observed in the Massilia hybrid on medium C4, which contained the highest concentration of 2,4-D. In contrast, the highest embryogenesis rate (52.62%) was recorded in the Tarento hybrid on medium C2. However, plant regeneration was generally low, and only embryos derived from Arancia and Tarento successfully developed into complete plantlets. These findings highlight the critical role of both appropriate growth regulator combinations and genotype selection in the success of anther culture. Optimization of physiological, environmental, and culture conditions can significantly enhance DH plant production efficiency in bell pepper and contribute to breeding programs for this valuable crop.

Keywords: Anther culture, Bell pepper, Doubled haploid, Embryogenesis

چکیده

Citation رفرانس دهی این مقاله

Zakaria S M, Zabarjadi A, Asadi A, Golabadi M, Kahrizi D, Seguí Simarro J M. (2026). Production of Doubled Haploid Plants of Bell Pepper (*Capsicum annuum*) Through Anther Culture. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 165-179. Doi: [10.61882/gebsj.14.2.2](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.2.2)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-535-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

کشت بساک به عنوان یکی از روش‌های کارآمد در تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده، ابزاری مؤثر در تسریع برنامه‌های اصلاح نباتات به ویژه در گیاهان خودگشن نظیر فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum*) محسوب می‌شود. در این پژوهش، چهار رقم هیبرید تجاری فلفل دلمه‌ای شامل Nirvin، Arancia، Tarento و Massilia به منظور ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید کالوس، جنین و گیاهچه از طریق کشت بساک مورد بررسی قرار گرفتند. گلچه‌های در مرحله مناسب رشد میکروسپور (اواخر تک هسته‌ای و اوایل دو هسته‌ای) پس از اعمال تیمار سرمایی و رنگ‌آمیزی با DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)، جداسازی و در پنج محیط کشت مختلف حاوی سطوح متنوع از Kinetin و 2,4-D کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد و صفات مربوط به درصد کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که همه تیمارها به جز تیمار شاهد (فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی) منجر به کالوس‌زایی شدند. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به رقم Massilia در محیط C4 (حاوی بالاترین غلظت 2,4-D یعنی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) با ۷۸/۴۷ درصد بود، در حالی که بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم Tarento در محیط C2 (۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر کایتین و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) با ۵۲/۶۲ درصد مشاهده شد. با این حال، باززایی گیاهچه‌ها تنها در محیط C2 با مقدار ۴/۴ درصد برای رقم Tarento و ۱/۲۳ درصد برای رقم Arancia مشاهده شد و جنین‌های حاصل از رقم‌های Arancia و Tarento توانستند به گیاهچه‌های کامل تبدیل شوند. بر اساس یافته‌ها، ترکیب مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و انتخاب ژنوتیپ مؤثر نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت کشت بساک دارد. بهینه‌سازی دقیق شرایط فیزیولوژیکی، محیطی و ترکیبات کشت می‌تواند موجب افزایش کارایی تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده در فلفل دلمه‌ای گردد و در برنامه‌های به نژادی این گیاه با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: جنین‌زایی، کشت بساک، فلفل دلمه‌ای، هاپلوئید مضاعف شده

مقدمه

Introduction

امنیت غذایی از حیاتی‌ترین چالش‌های قرن حاضر است و نقش تعیین‌کننده در تضمین آینده‌ای پایدار ایفا می‌کند. جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ میلادی به حدود ۹ میلیارد نفر خواهد رسید (FAO, 2009). تامین غذای این جمعیت نیازمند تولید دو برابری در واحد سطح است (Wijerathna-Yapa *et al.*, 2022). علوم بیوتکنولوژی در کشاورزی به عنوان راهکاری استراتژیک، در کشورهای در حال توسعه مورد توجه جدی قرار گرفته است (Hasandokht, 2006).

فلفل دلمه‌ای با نام علمی (*Capsicum annuum*) گیاهی دیپلوئید ($2n=2x=24$)، دو جنسه، خود گرده افشان و از خانواده سولاناسه است. این گیاه بوته‌ای و چندساله بوده و دارای گل‌های ستاره‌ای یا زنگوله‌ای شکل است (Anaya-Esparza *et al.*, 2021). این گیاه بطور گسترده در مناطق معتدل و گرمسیری در سراسر جهان کشت می‌شود. اهمیت این گیاه به دلیل ارزش میوه (محتوای بالای کپسایسین، ماده خشک، ویتامین‌ها A، C و B کمپلکس)، مواد معدنی، اسانس‌ها، کاروتنوئیدها و کاربردهای مختلف آن در آشپزی، صنعت و تزئینات است (Barroso *et al.*, 2015). میوه فلفل دلمه‌ای بزرگ، گوشتی، چهارگوش و دارای تنوع رنگی قرمز، زرد، سبز، نارنجی و سیاه اس (Basu & De, 2003; Pickersgill, 1997; Smith & Heiser Jr, 1957; Zhigila *et al.*, 2014) بر اساس شواهد باستان‌شناسی فلفل با قدمت حداقل ۷۰۰۰ سال به عنوان یکی از اولین جنس‌های گیاهی از آمریکای مرکزی می‌باشد که اهلی شده است (Koleva Gudeva *et al.*, 2013).

برنامه‌های اصلاحی که بر پایه روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت بافت برای فلفل دلمه‌ای ارائه شده‌اند، زمان مورد نیاز برای به دست آوردن ارقامی که دارای ویژگی‌های مورد نظر بازار مصرف (مانند مقاومت در برابر بیماری‌ها، آفات و صدمات حمل و نقل) هستند را کاهش داده است (Maraschin *et al.*, 2005). طبق آمار سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (FAO) در سال زراعی ۲۰۲۳ سطح زیر کشت فلفل در جهان دو میلیون هکتار با میانگین تولید ۱۸/۵ هزار تن در هکتار و تولید خالص سالیانه ۳۸ میلیون تن است. FAO در سال ۲۰۲۳ سطح زیر کشت فلفل در ایران را ۶۳۷۵ هکتار با میانگین تولید ۱۴/۷ تن در هکتار و تولید خالص سالیانه ۹۳ هزار تن گزارش کرده است. آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی ایران برای محصولات گلخانه‌ای در سال ۱۴۰۲، سطح زیر کشت فلفل دلمه‌ای را ۱۸۹۵ هکتار و میانگین تولید ۱۲/۲ تن در هکتار گزارش کرده است. استان اصفهان با ۳۷۹ هکتار کشت و تولید سالیانه ۴۳۵۵۱ تن به ترتیب بیشترین سطح زیر کشت و بیشترین مقدار تولید در کشور برای این محصول را دارد (آمار نامه جهاد کشاورزی، ۱۴۰۲).

روش هاپلوئیدی ابزاری مهم در اصلاح نباتات است که امکان استفاده از تنوع ژنتیکی را افزایش می‌دهد. تولید لاین‌های خالص با استفاده از روش‌های کلاسیک به‌نژادی در فلفل بین هفت تا هشت چرخه (نسل) طول می‌کشد. می‌توان با القای درون شیشه‌ای گیاهان هاپلوئید مضاعف شده زمان این چرخه را به زیر یک سال کاهش داد و در وقت و هزینه‌ها صرف جویی کرد (George, 2009; Greenleaf, 1986; Grubben & Denton, 2004; Irikova *et al.*, 2016; Ochoa-Alejo, 2012). روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید در فلفل نرزاری یا آندروژن است که شامل کشت درون شیشه‌ای بساک و میکروسپورهای جدا شده می‌باشد (Parra-Vega & Seguí-Simarro, 2016). رایج‌ترین روش برای تولید گیاهان هاپلوئید در فلفل کشت بساک است (Bhojwani, 2001). در مورد پاسخ به القاء آندروژن، فلفل سومین گیاه مقاوم در خانواده سولاناسه است و پاسخ به آندروژن برای این گیاه بین ۰ تا ۱۰ درصد گزارش شده است (ERCAN & Şensoy, 2011; Seguí-Simarro *et al.*, 2011).

اولین گزارش‌ها در مورد تولید گیاهان هاپلوئید فلفل از طریق کشت بساک در گونه‌های آسیایی بود است (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). محققان از کشت بساک فلفل با استفاده از تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی IAA و Kinetin در سطوح مختلف بر پایه محیط کشت MS موفق به تولید گیاه هاپلوئید شدند. این محققان گزارش کردند که اکسین اگزورژن مانند IAA برای شروع تقسیم سلولی در میکروسپور به سمت مورفوژن هاپلوئید ضروری است و از چند صد بساک کشت شده، تنها ۰/۱ درصد گیاهچه‌های زنده تولید شده است (George & Narayanaswamy, 1973). اولین گزارش کشت بساک بر روی فلفل اروپایی توسط (Novak, 1974) منتشر شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش شامل تولید کالوس و جنین از کشت بساک چندین گونه از فلفل‌های اروپایی بوده است. در ادامه گونه‌های مختلف فلفل که اغلب *C. annuum* بوده‌اند به‌منظور القاء هاپلوئیدی از طریق کشت بساک مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (Seguí-Simarro *et al.*, 2011).

در تحقیقی که روی کشت بساک فلفل انجام شده است نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش کمیت و کیفیت جنین‌های حاصله بوده است این تحقیق پایه بسیاری از تحقیقات در این زمینه بوده است (de Vaulx *et al.*, 1981). در پژوهشی که به‌منظور بررسی تأثیر مرحله توسعه میکروسپور بر روی القاء گیاهان هاپلوئید در فلفل انجام شده است محققان ابتدا مراحل تکاملی میکروسپور را بر اساس تعداد هسته به چهار سطح تقسیم‌بندی کردند و سپس بساک‌های مراحل مختلف را بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر Kinetin کشت کردند و نتایج این تحقیق نشان داد که مرحله بهینه میکروسپور برای تولید جنین، اواخر مرحله تک هسته‌ای و اوایل مرحله دو هسته‌ای است. این مرحله حاوی (۷۵٪) میکروسپور دو هسته‌ای بوده است (Kim *et al.*, 2004). تأثیر ژنوتیپ فلفل در تولید گیاه هاپلوئید از طریق کشت بساک نیز بررسی شده است، در این تحقیق ژنوتیپ‌های متفاوتی (هفت ژنوتیپ چارلستون، شش ژنوتیپ دلمه‌ای، هشت ژنوتیپ کاپیا و هفت ژنوتیپ فلفل سبز) را آزمایش کردند و نشان دادند که بطور میانگین شش ژنوتیپ فلفل دلمه‌ای، هفت ژنوتیپ چارلستون، هشت ژنوتیپ کاپیا به‌ترتیب دارای مقادیر ۵۳، ۳۴/۹ و ۳۰/۰۴ درصد هاپلوئیدی مضاعف شده خود به خودی بودند (Keleş *et al.*, 2015). همچنین در پژوهشی، تأثیر سطوح مختلف 2,4-D در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ میلی گرم بر لیتر روی کشت بساک ۱۱۸ اکسیشن و

۱۱ ژنوتیپ از نسل‌های F1 و BC مورد ارزیابی قرار گرفته است. محیط کشت مورد استفاده، محیط MS بود که علاوه بر 2,4-D، حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin، ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر بیوتین، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر گلايسين و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر ویتامین B12 به‌عنوان مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان آندروژنز در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شده است. این یافته نشان‌دهنده اهمیت بهینه‌سازی غلظت اکسین برای القاء موثر آندروژنز در کشت بساک فلفل دلمه‌ای است، بطوری که افزایش غلظت 2,4-D فراتر از حد مطلوب می‌تواند منجر به کاهش بازده تولید جنین شود (Grozeva et al., 2021).

ارزیابی کارایی کشت بساک در چهار رقم هیبرید فلفل دلمه‌ای تحت تأثیر سطوح مختلف نیترات نقره و تیمار تاریکی نشان می‌دهد که با افزایش دوره تنش تاریکی تا ۱۰ روز، پتانسیل جنین‌زایی و نرخ باززایی گیاهچه‌ها به‌طور معنی‌داری بهبود می‌یابد. در این راستا، استفاده از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره در محیط کشت CP، بیشترین میزان باززایی (۷۱/۱۱ درصد) را به همراه داشته است. همچنین از میان ارقام مورد مطالعه، رقم پلاتو در ترکیب با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره، بالاترین عملکرد را در تشکیل جنین بساک (۶۶/۱۶ درصد) از خود نشان داده است (Zamani et al., 2021).

پژوهشی که به منظور ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن و بنزیل آمینو پورین (BAP) بر جنبه‌های مختلف باززایی در کشت بساک فلفل دلمه‌ای صورت گرفته است، نشان می‌دهد که ترکیب این دو عامل می‌تواند بر درصد جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی تأثیر بسزایی بگذارد. براساس یافته‌های این پژوهش، بالاترین میزان جنین‌زایی (۸۸/۳۸٪) زمانی مشاهده شد که تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن همراه با عدم وجود BAP (۰ میلی‌گرم در لیتر) به کار گرفته شد. به طور مشابه، بیشترین نرخ باززایی (۳۳/۳۳٪) نیز در همین ترکیب تیماری، یعنی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن و ۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، گزارش شده است. این نتایج، پتانسیل نانوذره اکسید آهن را به عنوان یک عامل مؤثر در بهبود روش‌های باززایی گیاهان، خصوصاً در گونه‌هایی مانند فلفل دلمه‌ای، برجسته می‌سازد (Mohammadi et al., 2026) (محمدی et al., 2026).

با توجه به قابلیت کشت بساک در تولید گیاهان هاپلوئید و ایجاد لاین‌های هموزیگوت، می‌توان از این روش به‌عنوان ابزاری مؤثر در برنامه‌های اصلاحی فلفل دلمه‌ای بهره‌برداری نمود. در این پژوهش، به‌منظور ارزیابی پتانسیل کشت بساک فلفل دلمه‌ای برای تولید کالوس، جنین و گیاهچه، ابتدا با استفاده از رنگ آمیزی به روش DAPI مراحل مختلف توسعه میکروسپور بررسی شد و گلچه‌های مناسب انتخاب شدند. سپس تأثیر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روی بساک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از چهار رقم هیبرید تجاری فلفل دلمه‌ای شامل Nirvin، Arancia، Tarento و Massilia استفاده شد. این ارقام به دلیل عملکرد بالا، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و بازارپسندی مطلوب از جمله ارقام برتر محسوب می‌شوند. بذور این ارقام از شرکت Rijk Zwaan تهیه گردید. بذور در سینی‌های نشا حاوی بستر پرلیت و کوکوپیت به نسبت حجمی ۲ به ۱ کشت شدند. تولید نشا و پرورش گیاهان مادری در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. دمای گلخانه در دوره روشنایی بین ۲۵ تا ۳۳ درجه سلسیوس و در دوره تاریکی بین ۱۷ تا ۲۸ درجه سلسیوس تنظیم گردید.

چهل روز پس از کشت، نشاها به بستر خاک لوم-شنی گلخانه منتقل شدند. آبیاری گیاهان به‌صورت هفتگی و به‌طور متناوب با آب معمولی و محلول کود کامل NPK (۲۰-۲۰-۲۰) حاوی ریزمغذی‌ها با غلظت یک گرم در لیتر انجام شد. برای کنترل آفات، از حشره‌کش‌های دیکلروس و کنفیدور جهت مبارزه با مگس سفید و تریپس، و از آبامکتین با غلظت ۱ در ۱۰۰۰ برای کنترل کنه استفاده گردید.

یک هفته پس از آغاز گل‌دهی، گل‌ها جهت تعیین مرحله رشد میکروسپورها و کشت بساک نمونه‌برداری شدند. گلچه‌ها بر اساس شاخص‌های ظاهری شامل نسبت طول کاسبرگ به گلبرگ حدود ۸۰ به ۲۰ انتخاب شدند. گلچه‌های برداشت‌شده بلافاصله در کاغذ صافی مرطوب پیچیده شده و بر روی یخ قرار گرفتند. به منظور اعمال پیش‌تیمار سرمایی، گلچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

تعیین سطح توسعه میکروسپور: به منظور ارزیابی دقیق مرحله نمو میکروسپورها و مشاهده وضعیت هسته، از روش رنگ‌آمیزی دی‌آمینیدینو فنیل ایندول (DAPI) استفاده شد. برای کشت بساک از غنچه‌هایی استفاده شد که میکروسپورهای آنها در مرحله اواخر تک هسته‌ای و اوایل دو هسته‌ای قرار داشتند. این مرحله رشدی به عنوان بهینه‌ترین شرایط فیزیولوژیکی برای القای پاسخ میکروسپورها در سیستم کشت بافتی شناخته شده است (Ashok Kumar & Murthy, 2004; Kim *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2003). برای آماده‌سازی محلول DAPI، ابتدا بافر ایزولیتینگ هسته (NIB) مطابق با فرمول ارائه‌شده در (جدول ۱) تهیه گردید. سپس محلول استوک DAPI با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. برای حل کردن پودر DAPI از استون خالص استفاده شد و در نهایت، با ترکیب اجزای ذکرشده در (جدول ۲)، محلول DAPI آماده گردید.

غنچه‌های گل از چهار رقم در اندازه‌های مختلف (از غنچه‌های اولیه تا قبل از باز شدن غنچه‌ها) جمع‌آوری و به ترتیب اندازه دسته بندی شدند. طول کاسبرگ و گل‌برگ هر غنچه با کولیس اندازه‌گیری شد. بساک‌ها از گل‌ها جداسازی و یک بساک بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول DAPI بر روی بساک اضافه گردید و با استفاده از نوک پنس، عمل اسکواش انجام شد تا میکروسپورها آزاد شوند. نمونه با لامل پوشانده شد و در تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در طول موج UV مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- ترکیبات مورد نیاز برای ساخت یک لیتر محلول NIB

Table 1. Ingredients needed to make one liter of NIB solution

Gram/Liter	Molecular weight(mg)	Concentration(mM)	Material
1.57	157.6	10	Tris-HCl pH 7
3.48	348.19	10	Spermine tetra hydrochloride
0.58	58.4	10	NaCl
23.64	118.18	200	Hexylene glycol (2,5-hexanediol)

جدول ۲- ترکیبات مورد نیاز برای تهیه ۱۰ میلی لیتر محلول DAPI

Table 2. Ingredients required to prepare 10 ml of DAPI solution

amount	Material
5 ml	NIB
12.5 µl	DAPI stock
50 µl	Triton X-100
4.93 ml	Glycerin

کشت بساک‌ها: فرایند استریل‌سازی سطحی گلچه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد وزنی-حجمی انجام گرفت. ابتدا گلچه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد، گلچه‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم قرار گرفتند و مجدداً سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. برای حفظ شرایط فیزیولوژیک میکروسپورها و جلوگیری از آسیب به بساک‌ها، گلچه‌های استریل‌شده درون پتری‌دیش استریل و روی یخ نگهداری شدند.

جداسازی کاسبرگ و گلبرگ‌ها با استفاده از اسکالپل و پنس استریل انجام شد و بساک‌ها با دقت از میله پرچم جدا گردیدند. سپس بساک‌ها با استفاده از پنس استریل به گونه‌ای که سطح شکمی آن‌ها رو به پایین باشد، روی محیط کشت قرار داده شدند.

در این پژوهش از محیط پایه C که توسط de Vaulx و همکاران در سال ۱۹۸۱ برای کشت بساک فلفل پیشنهاد شده است، استفاده شد. محیط یادشده حاوی ۷ گرم در لیتر آگار بود و به عنوان پایه‌ای برای بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روند تمایز و باززایی بساک‌ها به کار گرفته شد (de Vaulx *et al.*, 1981). به منظور بهینه‌سازی پاسخ کشت بساک، پنج تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی مختلف شامل غلظت‌های متفاوتی از Kinetin و 2,4-D براساس بررسی نتایج مطالعات گذشته تنظیم و به محیط پایه افزوده شد. این دو تنظیم‌کننده رشد از پرکاربردترین مواد در کشت بافت محسوب می‌شوند و نقش آن‌ها در القای کالوس، جنین‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای در مطالعات متعددی گزارش شده است (George *et al.*, 2007; Nowaczyk & Kisiała, 2006). تیمارهای اعمال‌شده شامل پنج محیط کشت (C1 تا C5) با ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی مطابق جدول ۳ بودند. تیمار C5 به عنوان شاهد (فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی) در نظر گرفته شد تا امکان مقایسه اثر خالص محیط پایه بدون تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی فراهم گردد. تمامی محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه توسط اتوکلاو استریل شدند.

در نهایت، پتری‌دیش‌ها با پارافیلیم درزگیری و به اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 1 درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. واكشت بساک‌ها هر ۲۰ روز یکبار انجام شد. پس از القای کالوس و تمایز جنین‌ها، گیاهچه‌های حاصل به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی منتقل شدند تا امکان رشد و نمو طبیعی آن‌ها بدون دخالت تنظیم‌کننده‌های رشد فراهم گردد (de Vaulx *et al.*, 1981).

جدول ۳- غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت

Table 3. Concentration of growth regulators used in culture medium

2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Medium
0	0.15	C1
0.15	0.15	C2
0.015	0.015	C3
0.25	0.15	C4
0	0	C5

تعیین سطح پلوئیدی: فلوسیتومتری ابزاری پیشرفته برای تعیین ویژگی‌های سلولی است که عملکرد آن بر پایه پراکنش نور و انتشار فلورسانس توسط سلول‌های مورد بررسی استوار می‌باشد. این دستگاه، یکی از ابزارهای کارآمد و سریع در تعیین سطح پلوئیدی بافت‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. در این مطالعه، به منظور تشخیص سطح پلوئیدی گیاهان باززایی‌شده، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. بدین منظور، از برگ‌های جوان و سالم هر نمونه و نیز یک رقم یا ژنوتیپ مرجع با پلوئیدی مشخص استفاده شد. نمونه برگ در حضور بافر استخراج هسته به‌وسیله تیغ استریل خرد شد و سوسپانسیون حاصل از صافی نایلونی عبور داده شد. سپس هسته‌های آزادشده با رنگ فلورسنت متصل‌شونده به DNA، Propidium iodide رنگ‌آمیزی و پس از طی زمان مناسب، توسط دستگاه فلوسایتومتری BD FACSCanto II تحلیل شدند. هیستوگرام‌های به‌دست‌آمده بررسی و جایگاه قله نمونه‌ها با قله مرجع مقایسه شد. سطح پلوئیدی بر اساس نسبت فلورسانس نمونه به مرجع و با احتساب مقدار DNA مرجع تعیین گردید.

آزمایش ملکولی برای تعیین سطح هموزیگوتی: به منظور بررسی گیاهان باز شده دیپلوئید برای تعیین خلوص ژنتیکی از لحاظ هموزیتی و هتروزیگوتی از مارکر مولکولی استفاده شد.

استخراج DNA: استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB و با اعمال تغییرات جزئی بر اساس دستورالعمل (Saghai Maroof et al., 1994) انجام شد. ماده اصلی مورد استفاده در این روش، ترکیب شوینده Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) می‌باشد. بافر استخراج پیش از استفاده، در حمام آب گرم یا بر روی هات‌بلاک با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه گرم شد. برای استخراج DNA ژنومی با کیفیت مطلوب، از ۳۰۰ میلی‌گرم برگ‌های جوان و سبز گیاه استفاده گردید. نمونه‌ها در هاون چینی و با استفاده از نیتروژن مایع به صورت کامل پودر شدند و بلافاصله به ویال‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان تکمیل آماده‌سازی سایر نمونه‌ها، بر روی یخ نگهداری شدند. پس از افزودن بافر استخراج نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از تیمار با فنل:کلروفرم:ایزواکلیل‌الکل و سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی DNA جدا گردید (این مرحله سه بار تکرار شد). DNA با ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد، با اتانول ۷۰٪ شستشو و سپس خشک گردید. در نهایت، DNA در آب مقطر حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

آزمایش واکنش زنجیره پلی‌مراز (Polymerase chain reaction): در این پژوهش، از یک جفت آغازگر (SSR) متعلق به خانواده فلفل که توسط (Olszewska & Tomaszewska-Sowa, 2021) معرفی شده‌اند، با مشخصات (CAMS-679-F (TTTGCATGTTTACCCATTCC) – (CAMS-679-R (ATGTGAAACACATAGGTAGC) برای انجام واکنش PCR، از یک حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. در این واکنش، ۱ میکرولیتر از بافر X1۰ شامل کلروئید منیزیم (با غلظت نهایی ۱.۵ میلی‌مولار) به همراه ۱ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها (با غلظت نهایی ۰.۵ میلی‌مولار) اضافه گردید. ۰.۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Forward و Reverse با غلظت نهایی ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر استفاده شد. همچنین، ۰.۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (با فعالیت نهایی ۱ واحد) به مخلوط افزوده شد. به عنوان الگو، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر (معادل ۴۰ نانوگرم) استفاده گردید. در نهایت، حجم واکنش با آب دو بار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برای انجام واکنش از دستگاه PCR (Thermocyclers) شرکت Bio-Rad استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیه تحلیل داده‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. برای هر تکرار یک پتری دیش (هشت سانتی‌متری) در نظر گرفته شد و تعداد ۱۴ بساک در هر تکرار کشت شد. فاکتورها شامل رقم در چهار سطح و محیط کشت در پنج سطح بودند. حدود ۵۰ روز پس از اعمال تیمارها صفات (درصد بساک‌های تولید کننده کالوس، درصد بساک‌های تولید کننده جنین، درصد گیاهچه‌های تولید شده از جنین‌ها) اندازه‌گیری شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از محیط نرم افزار Excel و نرم افزارهای SAS.V9 استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد.

Results and Discussion

نتایج و بحث

رنگ آمیزی میکروسپور

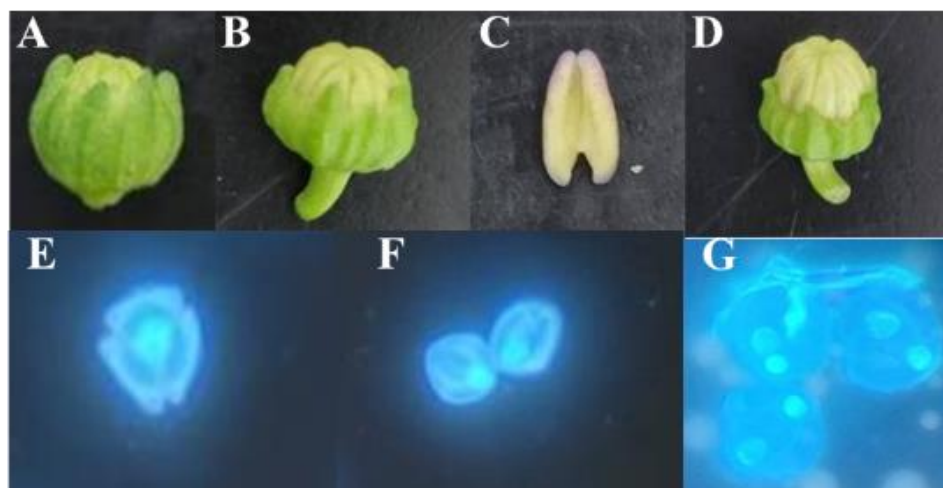
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی میکروسپورها با رنگ DAPI نشان داد که مراحل رشد گلچه‌ها و توسعه میکروسپورها را می‌توان به سه مرحله متمایز تقسیم کرد (جدول ۴). مرحله اول مربوط به میکروسپورهای اولیه در فاز تک‌هسته‌ای بود. نسبت طول گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین ۶/۶۴ درصد اندازه‌گیری شد. در این مرحله، میکروسپورهایی با هسته‌های تازه تشکیل شده و میکروسپورهای بدون هسته مشاهده شد (شکل ۱- E). مرحله دوم شامل بساک‌هایی با ترکیبی از میکروسپورهای تک‌هسته‌ای بالغ و آغاز مرحله دوهسته‌ای بود. نسبت گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین ۲/۶۰ درصد بود و در این مرحله تکامل هسته‌ها کامل بود (شکل ۱- F).

مرحله سوم مربوط به میکروسپورهای بود که کاملاً وارد مرحله دوهسته‌ای شده بودند. نسبت گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین ۷۰ درصد بود (شکل ۱- G).

جدول ۴- ویژگی های گل و مراحل توسعه میکروسپور در فلفل دلمه ای

Table 4. Flower characteristics and microspore development stages in bell pepper

Petal length (mm)	Sepal length (mm)	(%) Petal to flower ratio	Flower length (mm)	Microspore development stage
2.8	3.2	46.6	6	Single nuclear
5	3.3	60.2	8.3	Late mononuclear Early binuclear
7	3.2	70	10	Binuclear



شکل ۱- مراحل رشد غنچه فلفل دلمه ای و توسعه میکروسپور. A: مرحله قبل از تک هسته ای. B: مرحله اواخر تک هسته ای و اوایل دو هسته ای. C: بساک مرحله تک هسته ای با انتهای ارغوانی رنگ. D: مرحله دو هسته ای. E: میکروسپور در مرحله تک هسته ای. F: میکروسپور مرحله اواخر تک هسته و اوایل دو هسته ای. G: میکروسپور در مرحله دو هسته ای

Fig 1. Stages of bell pepper bud growth and microspore development. A: Pre-mononuclear stage. B: Late mononuclear and early binuclear stages. C: Mononuclear anther with purple tip. D: Binuclear stage. E: Microspore at mononuclear stage. F: Late mononuclear and early binuclear microspore. G: Microspore at binuclear stage

تعیین سطح پلوئیدی

برای ارزیابی ماهیت ژنتیکی گیاهان باززای حاصل از کشت بساک، ابتدا فلو سایتومتری به کار گرفته شد. منحنی های حاصل از آنالیز نشان داد که تمامی نمونه های بررسی شده دارای الگوی مشابه با گیاهان دیپلوئید شاهد بودند. این امر نشان می دهد که بیشتر گیاهچه های به دست آمده دارای سطح پلوئیدی دو برابر بوده و روند مضاعف شدن خود به خودی کروموزوم ها در طی مراحل اولیه جنین زایی روی داده است. چنین پدیده ای در مطالعات مختلف بر روی آندروژنز فلفل نیز گزارش شده و یکی از عوامل اصلی دستیابی به گیاهان دابل هاپلوئید محسوب می شود (Germana, 2011; Supena et al., 2006).

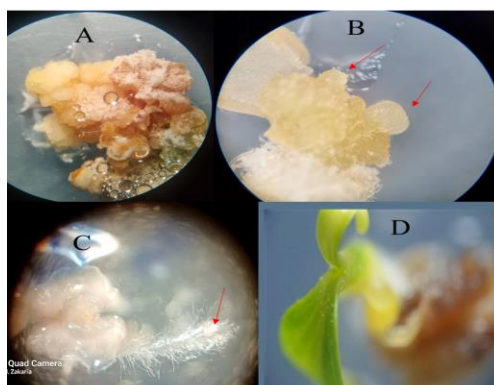
مارکر SSR

الگوهای به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که بخشی از گیاهان دارای الگوی تک بانندی بودند که بیانگر هموزیگوت بودن آنهاست، در حالی که گروهی دیگر با الگوی دو بانندی به عنوان گیاهان هتروزیگوت شناسایی شدند این نتایج حاکی از آن است که اگرچه بخشی از باززایی ها منجر به تولید دابل هاپلوئیدهای کاملاً هموزیگوت شده است، اما برخی گیاهان همچنان تنوع آلی را حفظ کرده اند.

کشت بساک: این تحقیق اثربخشی جنین زایی و کالوس زایی میکروسپور و باززایی هموزیگوت در فلفل از طریق کشت بساک را تأیید می کند. با این حال، اکثر جنین های تولید شده در این مطالعه نتوانستند مسیر طبیعی تمایز به گیاهچه را طی کنند و به ساختارهای غیرطبیعی تبدیل

شدند (شکل ۲). تنها جنین‌های رقم Arancia در محیط C1 و رقم Tarento در محیط C2 توانستند به گیاهچه‌های کامل تبدیل شوند (شکل ۲)، که درصد باززایی آن‌ها به ترتیب ۱/۳۳ و ۴/۴۲ درصد بود (شکل ۴). مشاهدات نشان داد که بساک‌ها در محیط C5 فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد پس از گذشت ۲۰ روز به رنگ قهوه‌ای تغییر کرده و نکروز شدند، درحالی که در همه تیمارها بساک‌های کشت شده پس از گذشت ۲۰ روز شروع به تولید کالوس کردند (شکل ۲). اولین جنین‌ها به طول ۲ تا ۳ میلی‌متر پس از حدود ۳۰ روز نمایان شدند (شکل ۲). سپس این جنین‌ها بتدریج تبدیل به گیاهچه یا اندام‌های ریشه مانند شدند (شکل ۲). پس از آن گیاهچه‌ها بتدریج در محیط MS رشد کرده و به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر هر دو عامل محیط کشت، ژنوتیپ و برهم‌کنش محیط × ژنوتیپ بر درصد بساک‌های کالوس‌زا در سطح احتمال ۰/۰۱ معنادار بود (جدول ۵). در مورد درصد بساک‌های تولیدکننده جنین نیز الگوی مشابهی مشاهده شد. تجزیه واریانس حاکی از معناداری اثر محیط، رقم و اثر متقابل آن‌ها بر توانایی بساک‌ها در القای جنین‌زایی بود (جدول ۵). این نتیجه نشان می‌دهد که جنین‌زایی نیز همانند کالوس‌زایی به شدت تحت تأثیر نوع محیط کشت و رقم قرار دارد. همچنین نتایج نشان دادند که درصد گیاهان باز شده از جنین‌های تشکیل شده نیز تحت تأثیر معنادار تیمارهای مورد بررسی قرار گرفته است (جدول ۵). این معناداری در سطح احتمال ۰/۰۱ برای همه عوامل اصلی و اثر متقابل آن‌ها، اهمیت تنظیم دقیق ترکیب محیط کشت برای باززایی موفق را برجسته می‌سازد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین چهار محیط کشت، مشخص شد که تمامی تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌جز تیمار شاهد، منجر به کالوس‌زایی در بساک‌های فلفل شدند (شکل ۴). همچنین، کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش، به القای کالوس واکنش نشان دادند. این یافته با نتایج تحقیق (Grozeva et al., 2021) هم‌راستا است که در آن، تمام ۱۷ ژنوتیپ فلفل مورد بررسی به کشت بساک پاسخ دادند. از نظر درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس، بیشترین میزان کالوس‌زایی در ژنوتیپ Massilia با مقدار ۷۸/۴۷ درصد در محیط C4 مشاهده شد و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Tarento با ۱۶/۰۳ درصد در محیط C2 بود. از سوی دیگر، محیط C4 بالاترین تأثیر را در القای کالوس در میان تیمارها نشان داد.

در خصوص جنین‌زایی، ژنوتیپ Nirvin هیچ پاسخی نشان نداد. بیشترین میزان جنین‌زایی مربوط به رقم Tarento در محیط C2 با ۵۲/۶۲ درصد بود و کمترین آن در رقم Arancia در محیط C4 با ۱/۵۱ درصد به‌دست آمد. از نظر تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی، محیط‌های C1 و C2 بیشترین نقش را در القای جنین‌زایی داشتند (شکل ۴). در بررسی‌های حاضر، در ژنوتیپ‌های Tarento و Arancia در محیط C2، درصد جنین‌زایی از کالوس‌زایی بیشتر بود. در مقابل، ژنوتیپ Massilia با اینکه در محیط C4 بیشترین کالوس‌زایی را داشت، اما هیچ جنینی تولید نکرد (شکل ۴).



شکل ۲- بساک‌های کشت شده در محیط C2 بعد از ۵۰ روز. A: کالوس ایجاد شده از بساک. B: جنین‌های ایجاد شده از کالوس. C: جنین‌های غیر طبیعی که اندام شبیه ریشه تبدیل شده است. D: گیاهچه تشکیل شده از جنین طبیعی.

Fig 2. Anthers cultured in C2 medium after 50 days. A: Callus formed from anthers. B: Embryos formed from callus. C: Abnormal embryos that have developed into root-like organs. D: Plantlet formed from normal embryo.



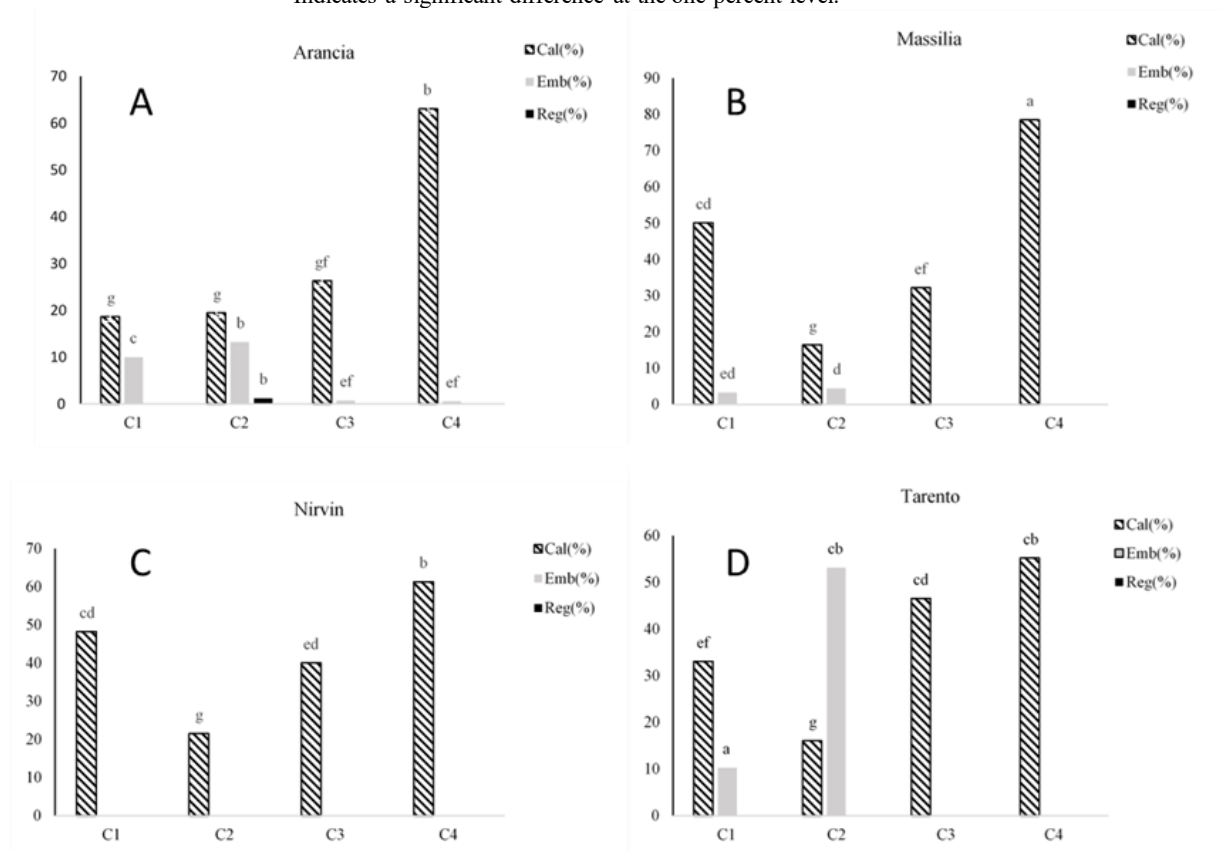
شکل ۳- باززایی گیاه در کشت بساک فلفل دلمه‌ای

جدول ۵- تجزیه واریانس برای اثر محیط کشت و رقم بر روی کشت بساک چهار رقم فلفل دلمه‌ای

Table 5. Analysis of variance for the effect of growing medium and cultivar on anther production of four bell pepper cultivars

Mean of square			df	S.O.V
Regenerated plants	Embryogenic anthers	Callus-producing anthers		
5.99**	819.70**	4368.31**	3	Medium
3.27**	598.73**	378.12**	3	cultivar
3.27**	415.14**	275.28**	9	cultivar×Medium
0.02	3.22	41.82	32	Error
47.79	30.01	16.53		CV(%)

** Indicates a significant difference at the one percent level.



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت × رقم برای صفات درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس (Cal)، درصد بساک‌های تولیدکننده جنین (Emb) و درصد گیاهچه‌های تولید شده از جنین‌ها (Reg). A: Arancia cultivar. B: Massilia cultivar. C: Nirvin cultivar. D: Tarento cultivar.

شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت × رقم برای صفات درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس (Cal)، درصد بساک‌های تولیدکننده جنین (Emb) و درصد گیاهچه‌های تولید شده از جنین‌ها (Reg). A: Arancia cultivar. B: Massilia cultivar. C: Nirvin cultivar. D: Tarento cultivar.

نتایج به دست آمده نشان داد که مرحله دوم (اواخر تک‌هسته‌ای و آغاز دوهسته‌ای) بهترین بازده را در پاسخ به کشت بساک داشته است، چرا که میکروسپورها در این مرحله دارای هسته‌هایی با تکامل کامل بودند. این یافته‌ها با مطالعات پیشین از جمله (Ashok Kumar & Murthy, 2003; Kim et al., 2004) هم‌راستا است، که این مرحله را مناسب‌ترین فاز برای القای آندروژنز معرفی کرده‌اند. از سوی دیگر، در مرحله اول، به دلیل نارس بودن هسته و یا عدم تشکیل کامل آن، میکروسپورها قابلیت پاسخ‌دهی مناسبی به کشت بساک نداشتند. همچنین در مرحله سوم نیز به دلیل عدم حضور میکروسپورهای تک‌هسته‌ای، ظرفیت تمایزی مورد انتظار مشاهده نشد.

یافته‌های این پژوهش بیانگر آن است که هم نوع محیط کشت و هم ویژگی‌های ژنتیکی ارقام مختلف تأثیر قابل‌توجهی در فرآیند القای کالوس در بساک‌های فلفل دارند. معناداری اثر متقابل محیط $\times$ رقم نیز نشان می‌دهد که پاسخ هر رقم به شرایط محیطی خاص، متفاوت بوده و نمی‌توان یک محیط واحد را برای تمام ژنوتیپ‌ها به‌طور یکسان مؤثر دانست؛ بلکه تعامل بین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی محیط و ویژگی‌های ژنتیکی رقم نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان کالوس‌زایی دارد. همچنین تأثیر متقابل ژنوتیپ و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی محیط کشت بر القای کالوس در فلفل (*Capsicum annuum* L.) نیز توسط (Chaudhari, 1997) بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است که پاسخ‌های کالوس‌زایی به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تعامل بین ژنوتیپ‌های مختلف و ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی محیط کشت قرار دارند. به‌عنوان مثال، ژنوتیپ 'California Wonder' بیشترین رشد کالوس را در محیط MS حاوی ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان داد، در حالیکه ژنوتیپ 'Jwala' بیشترین تعداد جنین را در محیط MS با ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید کرد. این یافته‌ها مشابه نتایج این تحقیق بودند و نشان می‌دهند که برای بهینه‌سازی القای کالوس در فلفل، باید ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی محیط کشت متناسب با ویژگی‌های ژنتیکی هر ژنوتیپ تنظیم شوند. تفاوت میان ارقام در توان جنین‌زایی می‌تواند ناشی از ویژگی‌های ژنتیکی مرتبط با تمایز سلولی، واکنش‌پذیری میکروسپورها به استرس و حساسیت به ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی باشد. علاوه بر این، به‌نظر می‌رسد برخی ارقام در برخی محیط‌های خاص، شرایط فیزیولوژیکی بهینه‌تری برای تمایز جنینی ایجاد می‌کنند که تأکید بیشتری بر اهمیت انتخاب دقیق شرایط کشت بافت دارد.

نتایج به دست آمده در خصوص جنین‌زایی در این پژوهش با یافته‌های گزارش شده در گذشته هم‌راستا است (Barroso et al., 2015) در تحقیق مذکور، مشخص شد که جنین‌زایی در کشت بساک به‌طور معناداری تحت تأثیر اثر متقابل میان ترکیب محیط کشت و ویژگی‌های ژنتیکی ژنوتیپ‌ها قرار دارد. به‌عنوان نمونه، ژنوتیپ شماره ۹ در محیط کشت M2 با اختلاف معنی‌دار بالاترین میزان جنین‌زایی (میانگین ۱۶ جنین) را نشان داد، در حالی که سایر ژنوتیپ‌ها در همان محیط کشت پاسخ ضعیف‌تری داشتند. همچنین در پژوهشی محققان با کشت بیش از ۱۱۹۰۰۰ بساک فلفل، گزارش کردند که درصد جنین‌زایی بین ۱/۵ تا ۶/۱ درصد متغیر بوده و همچنین تأکید نمودند که دما نیز نقش مؤثری در موفقیت جنین‌زایی ایفا می‌کند (Kristiansen & Andersen, 1993). این یافته‌ها نشان داد که پاسخ‌های تمایزی در سیستم آندروژنز فلفل به‌سادگی قابل تعمیم نیستند و نیاز به طراحی اختصاصی ترکیب‌های محیطی برای هر ژنوتیپ وجود دارد. بر این اساس، بهینه‌سازی شرایط کشت به‌ویژه از لحاظ دما نگهداری نمونه‌ها، غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باید با در نظر گرفتن تفاوت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها صورت گیرد تا کارایی فرآیند جنین‌زایی افزایش یابد. پدیده وابستگی شدید توانایی جنین‌زایی به ژنوتیپ، در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است؛ به‌طوری‌که نتایج بررسی بر روی گونه‌های مختلف کلزا (*Brassica spp*) نشان می‌دهد که حتی در شرایط محیطی کاملاً یکسان و کنترل‌شده، نرخ موفقیت در کشت میکروسپور می‌تواند در میان ژنوتیپ‌های مختلف، تفاوت‌های چندبرابری داشته باشد (Frey & Müller, 2011). به‌عنوان مثال، در گونه کلزا (*B. napus*) برخی ژنوتیپ‌ها توانستند بیش از ۵۰ جنین در هر پتری‌دیش تولید کنند، در حالی که دیگر ژنوتیپ‌ها در همان شرایط کمتر از ۵ جنین تولید کردند. آن‌ها همچنین تأکید کردند که تنظیم دقیق فاکتورهایی مانند دمای تنش اولیه، حضور کربوهیدرات‌های خاص در محیط کشت و نوع تنظیم‌کننده رشد، در کنار انتخاب صحیح ژنوتیپ، از عوامل کلیدی در بهینه‌سازی فرآیند جنین‌زایی هستند.

درصد پایین باززایی در برخی تیمارها حتی در حضور جنین‌های تشکیل شده، نشان‌دهنده آن است که تبدیل جنین به گیاهچه سالم و کامل به شرایط متفاوتی نیاز دارد که علاوه بر ترکیبات محیط القایی، می‌تواند تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی، نوری یا دمایی در مراحل بعدی رشد نیز باشد. این نتایج در مجموع حاکی از آن است که موفقیت در کشت بساک وابسته به بهینه‌سازی چند مرحله‌ای و دقیق تیمارها بر اساس ویژگی‌های رقم است. پژوهش‌های متعددی به منظور ارزیابی تأثیر عوامل مختلف بر بهینه‌سازی کارایی کشت بساک در گیاه فلفل (*Capsicum annum*) صورت گرفته است (Nowaczyk & Kisiała, 2006). نتایج این تحقیقات نشان داد که کارایی آندروژنر به طور قابل توجهی به ژنوتیپ و شرایط نگهداری کشت بساک بستگی دارد. همچنین، رابطه معنی‌دار بین طول دوره القای جنین‌زایی برای بساک در محیط C و سطح Kinetin در محیط مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که تبدیل جنین به گیاهچه سالم و کامل، فرآیندی چندعاملی است که علاوه بر ترکیبات محیط القایی، به شرایط فیزیولوژیکی، نوری یا دمایی در مراحل بعدی رشد نیز وابسته است. این مشاهدات، یافته‌های تحقیق حاضر را در خصوص اهمیت عوامل پس از القای جنین، تأیید می‌نماید.

در خصوص درصد بساک‌های تولید کننده کالوس می‌توان چنین اظهار کرد که باتوجه به اینکه محیط C4 دارای بیشترین مقدار تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D است و این محیط بالاترین تأثیر را در القای کالوس در میان تیمارها را نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که این تنظیم کننده رشد گیاهی نقش مؤثرتری نسبت به Kinetin در القای کالوس‌زایی ایفا کرده است (شکل ۴). این موضوع همچنین نشان‌دهنده تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌ها به سطوح مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی است. همچنین استفاده از 2,4-D، به‌ویژه در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین درصد القای کالوس را در رقم Pusa Jwala به همراه داشته است، در حالی که تیمارهای حاوی Kinetin به‌تنهایی یا در ترکیب با غلظت پایین 2,4-D، تأثیر کمتری از خود نشان دادند (Rao & Sangapure, 2014). از سوی دیگر، تفاوت در پاسخ ارقام به تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی نیز مشاهده شد. برای نمونه، نتایج مطالعات نشان داد که رقم G4 پاسخ مطلوب‌تری به تیمارهای ترکیبی با غلظت‌های بالاتر 2,4-D نشان می‌دهد، در حالی که رقم دیگری مانند Pusa Jwala در شرایطی با سطح پایین‌تر 2,4-D و حضور هم‌زمان BAP یا Kinetin عملکرد بهتری در تشکیل کالوس داشت. این نتایج حاکی از آن است که پاسخ به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به شدت تحت تأثیر ویژگی‌های ژنتیکی رقم است (Ranjan et al., 2018). تفاوت‌های معناداری در پاسخ آندروژنر بین ژنوتیپ‌ها و حتی گیاهان مجزا گزارش شده است؛ موضوعی که بر نقش کلیدی ژنوتیپ گیاه اهداکننده در تعیین کارایی آندروژنر در فلفل تأکید دارد، و این یافته با نتایج مطالعه حاضر نیز هم‌خوانی دارد (Niklas-Nowak et al., 2012). همچنین مشاهده شد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد 2,4-D تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر، میزان کالوس‌زایی افزایش می‌یابد و بیشترین کالوس‌های جنین‌زا در همان غلظت به‌دست آمدند؛ یافته‌ای که با نتایج این پژوهش هم‌راستا است (Pineda-Lázaro et al., 2011). تنظیم کننده رشد 2,4-D به‌عنوان یک اکسین مصنوعی قدرتمند، نقش کلیدی در القای تقسیم‌های سلولی غیر تمایز یافته و آغاز فرایند کالوس‌زایی ایفا می‌کند. این ترکیب با تقلید عملکرد اکسین‌های طبیعی، مسیرهای تنظیمی رشد را فعال کرده و موجب تحریک تقسیم‌های میتوزی در سلول‌های تمایز نیافته می‌شود که این امر پیش‌نیازی برای آغاز تمایز جنینی یا باززایی اندام‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای است (De Klerk, 2012). در این پژوهش نیز مشاهده شد که هر چه غلظت 2,4-D افزایش یافته است، تمایل به کالوس‌زایی بیشتر شده است، اما در مقابل، جنین‌زایی کاهش یافته است. این موضوع بیانگر آن است که تعادل بین سطوح اکسین و سیتوکینین برای تحریک مسیر جنین‌زایی و تمایز سلولی برای تولید گیاهچه‌های کامل، ضروری است.

در این پژوهش جنین‌های تولید شده عمدتاً از نوع غیر طبیعی بودند. همچنین در مطالعه‌ای نرخ باززایی جنین‌ها بین ۴/۸۳ تا ۸/۲۸ درصد گزارش شده و عمده جنین‌های رشد یافته غیرطبیعی بوده‌اند (Grozeva et al., 2021). این پدیده می‌تواند ناشی از عدم تعادل تنظیم کننده رشد گیاهی، ناپایداری ژنتیکی ناشی از کشت درون شیشه‌ای، و یا نامناسب بودن شرایط محیطی (نظیر نور، دما یا pH محیط) برای ادامه مسیر تکوین طبیعی جنین باشد. به‌علاوه، تولید گیاهچه از جنین‌های آندروژنتیک نیازمند محیط کشت باززایی مناسب، بدون تنش‌های فیزیولوژیکی،

و شرایط نوری و دمایی دقیق است. بنابراین، بررسی دقیق‌تر سطوح قند، تنظیم‌کننده‌های رشد و حتی افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها یا اسیدهای آمینه به محیط کشت می‌تواند در بهبود روند باززایی مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری کلی: تایج این پژوهش نشان داد که موفقیت در کشت بساک فلفل دلمه‌ای به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر مرحله نمو میکروسپور و همچنین ویژگی‌های ژنتیکی ژنوتیپ‌ها قرار دارد. به‌نظر می‌رسد مرحله نهایی رشد تک‌هسته‌ای میکروسپور، همراه با درصد اندکی از میکروسپورهای دوهسته‌ای، مناسب‌ترین مرحله برای القای مسیر جنین‌زایی در شرایط *in vitro* باشد. همچنین تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌ها به ترکیب‌های مختلف محیط کشت و تیمارهای هورمونی نشان‌دهنده وجود وابستگی شدید پاسخ اندروژنتیکی به زمینه ژنتیکی است. از سوی دیگر، اگرچه در برخی تیمارها تولید جنین به مقدار قابل‌توجهی مشاهده شد، اما تبدیل این جنین‌ها به گیاهچه با کارایی پایینی همراه بود؛ موضوعی که بیانگر وجود محدودیت‌هایی در مراحل بعدی باززایی و رشد جنین‌های حاصل از کشت بساک است. در مجموع، نتایج این مطالعه تأکید می‌کند که موفقیت در تولید گیاهان هاپلوئید و دبل‌هاپلوئید از طریق کشت بساک فلفل دلمه‌ای نیازمند انتخاب دقیق مرحله مناسب میکروسپور، ژنوتیپ مطلوب و بهینه‌سازی شرایط باززایی است.

پیشنهادهای: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، انجام پژوهش‌های تکمیلی برای بهینه‌سازی مراحل پس از القای جنین‌زایی ضروری است. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، علاوه بر بررسی ترکیب‌های هورمونی مختلف، شرایط کشت از نظر عوامل فیزیکی و محیطی مانند دما، نور، ترکیب بستر و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا کارایی تبدیل جنین به گیاهچه افزایش یابد. همچنین بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های بیشتر می‌تواند به شناسایی منابع ژنتیکی برتر و معرفی *genotypes* مناسب‌تر برای تولید هاپلوئید و دبل‌هاپلوئید کمک کند. افزون بر این، استفاده از راهکارهایی مانند بهینه‌سازی مرحله برداشت بساک، پیش‌تیمارهای القایی و تنظیم شرایط باززایی می‌تواند در افزایش راندمان نهایی این سیستم مؤثر باشد. در نهایت، توسعه یک پروتکل کارآمد و ژنوتیپ‌وابسته برای کشت بساک فلفل دلمه‌ای می‌تواند نقش مهمی در تسریع برنامه‌های اصلاح نباتات و تولید لاین‌های خالص ایفا کند.

منابع

References

- Agricultural Statistics Center. (2024). Annual horticultural statistics report. Ministry of Agriculture, Iran. <https://get.agrodl.ir/statistics/horti/402.pdf>
- Ashok Kumar, H., & Murthy, H. (2004). Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. Plant cell, tissue and organ culture, 78, 201-208. doi: 10.1023/B:TICU.0000025637.56693.68 .
- Barroso, P., Rêgo, M., Rêgo, E., & Soares, W. (2015). Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. Genetics and Molecular Research, 14(4), 13349-13363. doi: 10.4238/2015.October.26.32.
- Basu, S. K., & De, A. K. (2003). Capsicum: historical and botanical perspectives. In *Capsicum* (pp. 21-35). Boca Raton, FL: CRC Press. doi:10.1201/9780203381151.
- Bhojwani, S. S., and Woong-Young Soh. (2001). Current trends in the embryology of angiosperms. In *Embryology of Angiosperms* (pp. 279-336). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. doi:10.1007/978-94-017-1346-6_10.
- Chaudhari, N. R. (1997). *In vitro* Genotype-environment interaction studies in Chilli. (*Capsicum annuum* L.) (Doctoral dissertation, Anand Agricultural University, Anand). doi:10.5281/krishikosh.5810044183.
- De Klerk, G. (2012). Micropropagation of bulbous crops: technology and present state. Floriculture and Ornamental Biotechnology, 6(1), 1-8 . doi:10.5580/f47.
- de Vaulx, R. D., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35° C. Agronomie, 1(10), 859-864 . doi:10.1051/agro:19811006.
- Ercan, N., & Şensoy, F. A. (2011). Androgenic responses of different pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 4(2), 59-61 . doi:10.52152/bibad.2011.059.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2007). Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background

- (Vol. 1). Dordrecht, The Netherlands: Springer Science & Business Media . doi:10.1007/978-1-4020-5039-8.
- George, L., & Narayanaswamy, S. (1973). HaploidCapsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78(4), 467-470 . doi: 10.1007/BF01275781.
- George, R. A. (2009). Vegetable seed production. CABI . doi: 10.1234/cabi.vsp.2009.
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 104(3), 283-300. doi: 10.1007/s11240-010-9852-z.
- Greenleaf, W. (1986). Pepper breeding. In J. G. Atherton & J. Rudich (Eds.), *Breeding vegetable crops* (pp. 67–134). London, UK: Springer. doi:10.1007/978-1-349-10264-6_3.
- Grozeva, S., Pasev, G., Radeva-Ivanova, V., Todorova, V., Ivanova, V., & Nankar, A. N. (2021). Double haploid development and assessment of androgenic competence of Balkan pepper core collection in Bulgaria. *Plants*, 10(11), 2414 . doi:10.3390/plants10112414.
- Grubben, G., & Denton, O. A. (2004). Plant resources of tropical Africa 2. Volume 2: Vegetables. Wageningen, The Netherlands: PROTA Foundation. doi:10.18356/abcd1234-5678-90ef-ghij-klmnopqrstuv.
- Hasandokht, M. (2006). Greenhouse managing (greenhouse production technology). In: Tehran: Marz Danesh.[In Persian]. doi:10.52345/md.2006.001.
- Irikova, T. P., Kintzios, S., Grozeva, S., & Rodeva, V. (2016). Pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications. *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 719-726 . doi: 10.3906/biy-1506-79.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., & Büyükalaca, S. (2015). Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676 . doi: 10.21273/HORTSCI.50.11.1671.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.-I., & Lee, K.-M. (2004). Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 77(1), 63-72 . doi:10.1023/B:TICU.0000016506.02796.6a.
- Koleva Gudeva, L., Gulaboski, R., Janevik-Ivanovska, E., Trajkova, F., & Maksimova, V. (2013). Capsaicin-inhibitory factor for somatic embryogenesis in pepper anther culture. *Electronic Journal of Biology*, 9(2), 29-36 . doi:10.52165/ejb.v9i2.6394.
- Kristiansen, K., & Andersen, S. B. (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67(1), 105-109. doi: 10.1007/BF00022732.
- Kumar, H. A., Murthy, H., & Paek, K. (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae*, 98(3), 213-222 . doi: 10.1016/S0304-4238(03)00003-7 .
- Maraschin, S. d. F., De Priester, W., Spalink, H. P., & Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental botany*, 56(417), 1711-1726 . doi: 10.1093/jxb/eri190.
- Mohammadi, M., Haddad, R., & Grousi, G. (2026). The effect of iron oxide nanoparticle and BAP in pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture. *Cell and Tissue*. doi:10.61882/jct.2026.2046649.2069. (In persian)
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., & Nowaczyk, P. (2012). Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *Folia Horticulturae*, 24(2), 141-146. doi: 10.2478/v10245-012-0017-x.
- Novak, F. (1974). Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 72, 46–54. doi: /full/10.5555/19751627567.
- Nowaczyk, P., & Kisiała, A. (2006). Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of applied genetics*, 47, 113-117 . doi: 10.1007/BF03194609.
- Ochoa-Alejo, N. (2012). Anther culture of chili pepper (*Capsicum* spp.). In *Plant cell culture protocols* (pp. 227-231). Springer . doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_17.
- Olszewska, D., & Tomaszewska-Sowa, M. (2021). Androgenesis—technology for obtaining genetically stable breeding material of *Capsicum annuum* L. *Agriculture*, 12(1), 19 . doi: 10.3390/agriculture12010019.
- Parra-Vega, V., & Seguí-Simarro, J. M. (2016). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). In *in vitro embryogenesis in higher plants*, 467-474 . doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6_26.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1), 129-133 . doi:10.1023/A:1002913228101.
- Pineda-Lázaro, A., Hernández-Amasifuen, A., & Díaz-Pillasca, H. (2023). The efficient procedure of embryogenic callus formation from anther in *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. *Revis Bionatura*, 8 (1) 29. doi: 10.21931/RB/2023.08.01.93.
- Ranjan, J., Chakrabarti, A., & Singh, S. (2018). Callus mediated regeneration through cotyledonary and hypocotyl explants in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Vegetable Science*, 45(01), 73-78 . doi: 10.61180.

- Rao, S., & Sangapure, P. (2014). Callus induction and organogenesis in *Capsicum annuum* L. cv pusajwala and g4. *World J. Pharma. Res*, 4(1), 644-657 . doi:10.1234/wjpr.2014.0401.644.
- Saghai Maroof, M., Biyashev, R., Yang ,G., Zhang, Q., & Allard, R. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5466-5470 . doi: 10.1073/pnas.91.12.5466.
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30(5), 765-778 . doi: 10.1007/s00299-010-0984-8.
- Smith, P. G., & Heiser Jr, C. B. (1957). Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 413-420 . doi: 10.2307/2482971.
- Supena, E., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 25, 1-10. doi: 10.1007/s00299-005-0028-y.
- Wijerathna-Yapa, A., Ramtekey, V., Ranawaka, B., & Basnet, B. R. (2022). Applications of in vitro tissue culture technologies in breeding and genetic improvement of wheat. *Plants*, 11 (17), 2273. doi: 10.3390/plants11172273.
- Zhigila, D. A., AbdulRahaman, A. A., Kolawole, O. S., & Oladele, F. A. (2014). Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of *Capsicum annuum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, 2014(1), 540868 . doi: 10.1155/2014/540868.
- Zamani, M., Moeini, A., & Chokan, R. (2021). The effect of silver nitrate and darkness on the anther culture efficiency of greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.). *Nahal Va Bazr*, 37(3), 317-333. doi: 10.22092/sppi.2022.357307.1242. (In persian).