**مقاله علمی پژوهشی**
مجله دوفصل نامه
**مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی**
**ISSN 2588-5073** چاپی
**ISSN 2588-5081** الکترونیکی online
**دوره ۱٤، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱٤۰٤**
**صفحه ۱۷۹-۱٦۵**

Research Article
**Genetic Engineering and Biosafety Journal 2026**
Volume 14, Number 2, Pages: 165-179

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.14.2.2

# تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده فلفل دلمه‌ای از طریق کشت بساک

# Production of Doubled Haploid Plants of Bell Pepper (*Capsicum annuum*) Through Anther Culture

سید معین ذکریا[۱]، علیرضا زبرجدی[۱و۲*]، ابوذر اسدی[۳]، مریم گل‌آبادی[۳]، دانیال کهریزی[٤] و خوزِ ماریا سِگی سیمارو[۵]

**Seyed-Moein Zakaria[1], Alireza Zabarjadi[1,2*], Abozar Asadi[3], Maryam Golabadi[3], Danial Kahrizi[4], José María Seguí Simarro[5]**

۱-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. ٤- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ۵- موسسه حفاظت و بهبود تنوع زراعی، دانشگاه پلی تکنیک والنسیا، اسپانیا

1. 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 Polite`cnica de Vale`ncia, Valencia, Spain

*Corresponding Author, Email: zebarjadiali@yahoo.com
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(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

کشت بساک به عنوان روشی کارآمد برای تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف (DH) شناخته شده است که ابزاری قدرتمند برای تسریع برنامه‌های اصلاح گیاهان، به ویژه در گیاهان خودگشن مانند فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum*) محسوب می‌شود. در این مطالعه، چهار هیبرید تجاری F1—نیروین، آرانسیا، تارنتو و ماسیلیا—از نظر توانایی تولید کالوس، جنین و گیاهچه از طریق کشت بساک ارزیابی شدند. جوانه‌های گل با مرحله مناسب تکوین میکروسپور (اواخر تک‌هسته‌ای تا اوایل دوهسته‌ای) بر اساس رنگ‌آمیزی DAPI پس از پیش‌تیمار سرمایی انتخاب شدند و بساک‌های آن‌ها بر روی پنج محیط مختلف حاوی غلظت‌های گوناگون کینتین و 2,4-D کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با چهار تکرار انجام شد. صفاتی شامل درصد القای کالوس، جنین‌زایی و باززایی گیاه ثبت شدند. نتایج نشان داد که همه تیمارها، به جز شاهد (فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی)، باعث تشکیل کالوس شدند. بالاترین میزان القای کالوس (78.47%) در هیبرید ماسیلیا روی محیط C4 مشاهده شد که حاوی بیشترین غلظت 2,4-D بود. در مقابل، بالاترین میزان جنین‌زایی (52.62%) در هیبرید تارنتو روی محیط C2 ثبت شد. با این حال، باززایی گیاه به طور کلی پایین بود و تنها جنین‌های حاصل از آرانسیا و تارنتو توانستند به گیاهچه کامل تبدیل شوند. این یافته‌ها بر نقش حیاتی ترکیب مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد و انتخاب ژنوتیپ در موفقیت کشت بساک تأکید دارند. بهینه‌سازی شرایط فیزیولوژیک، محیطی و کشت می‌تواند به طور قابل توجهی کارایی تولید گیاهان DH در فلفل دلمه‌ای را افزایش داده و به برنامه‌های اصلاحی این گیاه ارزشمند کمک کند.

**رفرانس دهی این مقاله Citation**

Zakaria S M, Zebarjadi 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
URL: http://gebsj.ir/article-1-535-en.html

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 14, Number 2, 2026**

**خلاصه**

کشت بساک به‌عنوان یکی از روش‌های کارآمد در تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده، ابزاری مؤثر در تسریع برنامه‌های اصلاح نباتات به‌ویژه 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 به‌منظور 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 به‌صورت 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 تنظیم کننده 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 میلی‌گرمدر لیتر ) با ۷۸/٤۷ درصد بود، در حالی که بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم Tarento در محیط C2 (۰/۱۵ میلی گرم در لیتر کاینتین و ۰/۱۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D) با ۵۲/٦۲ درصد مشاهده شد. با این حال، باززایی گیاهچه‌ها تنها در محیط C2 با مقدار ٤/٤ 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 تعیین کننده‌ای 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 به‌نژادی این گیاه باارزش مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** جنین‌زایی، کشت بساک، فلفل دلمه‌ای، هاپلوئید مضاعف‌شده

## Introduction

**مقدمه**

امنیت غذایی از حیاتی ترین چالش‌های قرن حاضر است و نقش تعیین کننده 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 باستان شناسی 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).

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 ٦۳۷۵ هکتار با میانگین تولید ١٤/٧ تن در هکتار و تولید خالص سالیانه ۹۳ هزار تن گزارش کرده است. آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی ایران برای محصولات گلخانه‌ای در سال ١٤٠٢، 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 ٤٣٥٥١ تن به ترتیب بیشترین سطح زیر کشت و بیشترین مقدار تولید در کشور برای این محصول را دارد (آمار نامه جهاد کشاورزی، ١٤٠٢)

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 نرزایی یا آندروژنز است که شامل کشت درون شیشه‌ای بساک و میکروسپورهای جدا شده می‌باشد (Parra-Vega & Seguí-Simarro, 2016). رایج ترین روش برای تولید گیاهان هاپلوئید در فلفل کشت بساک است (Bhojwani, 2001). در مورد پاسخ به القاء آندروژنز، فلفل سومین گیاه مقاوم در خانواده سولاناسه است و پاسخ به آندروژنز 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 درگونه‌های 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 اگزوژن مانند (IAA) برای شروع تقسیم سلولی در میکروسپور به سمت مورفوژنز 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 تاثیر 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 میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم 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). تاثیر 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 ، ٣٤/٩ و ٣٠/٠٤ 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 میلی‌گرم بر لیتر روی کشت بساک ۱۱۸ اکسیشن و



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 گلایسین و ۰/۰٤ 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 ۰/۱میلی‌گرم 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 (٦٦/١٦ درصد) از خود نشان داده است (Zamani *et al*., 2021).

پژوهشی که به منظور ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن 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 اکسیدآهن 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 اکسیدآهن و ۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، گزارش شده است. این نتایج، پتانسیل نانوذره اکسیدآهن 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 تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر روی بساک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها
## Materials and Methods

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 ١٦ 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.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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. به‌منظور اعمال پیش‌تیمار سرمایی، گلچه‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

**تعیین سطح توسعه میکروسپور:** به‌منظور 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 به‌عنوان 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 اندازه گیری 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 به‌مدت 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 ۱/۵درصد وزنی–حجمی انجام گرفت. ابتدا گلچه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد، گلچه‌ها به‌مدت 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.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 به‌گونه‌ای 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 به‌عنوان پایه‌ای برای بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روند تمایز و باززایی بساک‌ها به کار گرفته شد (de Vaulx *et al*., 1981). به‌منظور بهینه‌سازی پاسخ کشت بساک، پنج تیمار تنظیم کننده 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 تنظیم کننده رشد گیاهی مطابق جدول ۳ بودند. تیمار C5 به‌عنوان شاهد (فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی) در نظر گرفته شد تا امکان مقایسه اثر خالص محیط پایه بدون تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی فراهم گردد. تمامی محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه توسط اتوکلاو استریل شدند.

در نهایت، پتری‌دیش‌ها با پارافیلم درزگیری و به اتاقک رشد با شرایط دمایی ۱ ±۲۵ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. واکشت بساک‌ها هر ۲۰ روز یکبار انجام شد. پس از القای کالوس و تمایز جنین‌ها، گیاهچه‌های حاصل به محیط کشت MS بدون تنظیم کننده 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 تنظیم کننده های 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 |

**تعین 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، به‌منظور 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 تعین سطح هموزیگوتی**: به منظور بررسی گیاهان بازا شده دیپلوئید برای تعیین خلوص ژنتیکی از لحاظ هموزیتی و هتروزیگوتی از مارکر مولکولی استفاده شد.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

**استخراج DNA**: استخراج DNA ژنومی‌با 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 شوینده‌ی Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) می‌باشد. بافر استخراج پیش از استفاده، در حمام آب گرم یا بر روی‌هات‌بلاک با دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥٠ دقیقه گرم شد. برای استخراج DNA ژنومی‌با کیفیت مطلوب، از ٣٠٠ میلی‌گرم برگ‌های جوان و سبز گیاه استفاده گردید. نمونه‌ها درهاون چینی و با استفاده از نیتروژن مایع به‌صورت کامل پودر شدند و بلافاصله به ویال‌های ٢ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان تکمیل آماده‌سازی سایر نمونه‌ها، بر روی یخ نگهداری شدند. پس از افزودن بافر استخراج نمونه‌ها در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥٠ دقیقه انکوبه شدند. پس از تیمار با فنل:کلروفرم:ایزوآمیل‌الکل و سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی DNA جدا گردید (این مرحله سه بار تکرار شد). DNA با ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد، با اتانول ٧٠٪ شستشو و سپس خشک گردید. در نهایت، DNA در آب مقطر حل و در دمای ٢٠- 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 (TTTGCATGTTTTACCCATTCC – (CAMS-679-R (ATGTGAAACACATAGGTAGC استفاده گردید. برای انجام واکنش PCR، از یک حجم نهایی ٢٠ میکرولیتر استفاده شد. در این واکنش، ١ میکرولیتر از بافر X١٠ شامل کلرورید منیزیم (با غلظت نهایی ١.٥ میلی‌مولار) به همراه ١ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها (با غلظت نهایی ٠.٥ میلی‌مولار) اضافه گردید. ٠.٥ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Forward و Reverse با غلظت نهایی ١٠ پیکومول بر میکرولیتر استفاده شد. همچنین، ٠.٢ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (با فعالیت نهایی ١ واحد) به مخلوط افزوده شد. به عنوان الگو، ٢ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ٤٠٠ نانوگرم بر میکرولیتر (معادل ٤٠ نانوگرم) استفاده گردید. در نهایت، حجم واکنش با آب دو بار تقطیر به ٢٠ 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 کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. برای هر تکرار یک پتری دیش (هشت سانتی‌متری) در نظر گرفته شد و تعداد ١٤ بساک در هر تکرار کشت شد. فاکتورها شامل رقم در چهار سطح و محیط کشت در پنج سطح بودند. حدود ٥٠ 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 ٥ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث
## Results and Discussion

### 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 ٤). مرحله اول مربوط به میکروسپورهای اولیه در فاز تک‌هسته‌ای بود. نسبت طول گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین ٤٦/٦ درصد اندازه‌گیری شد. در این مرحله، میکروسپورهایی با هسته‌های تازه تشکیل شده و میکروسپورهای بدون هسته مشاهده شد (شکل ١-E). مرحله دوم شامل بساک‌هایی با ترکیبی از میکروسپورهای تک‌هسته‌ای بالغ و آغاز مرحله دوهسته‌ای بود. نسبت گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین٦٠/٢ درصد بود و در این مرحله تکامل هسته‌ها کامل بود (شکل ١-F).

مرحله سوم مربوط به میکروسپورهایی بود که کاملاً وارد مرحله دوهسته‌ای شده بودند. نسبت گلبرگ به کاسبرگ در این مرحله به‌طور میانگین ٧٠ درصد بود (شکل ١-G).

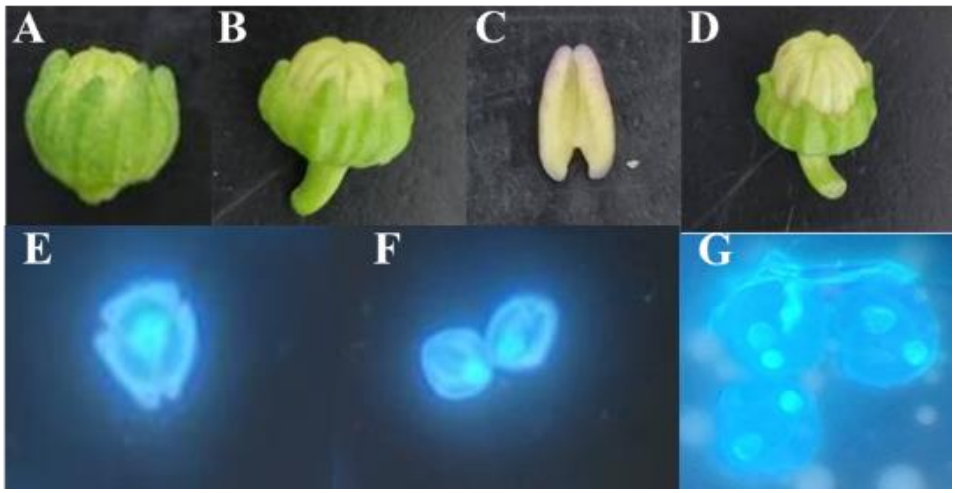


[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

**جدول ٤**- ویژگی های گل و مراحل توسعه میکروسپور در فلفل دلمه‌ای

**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 دلمه‌ای و توسعه میکروسپور. A: مرحله قبل از تک هسته‌ای. B: مرحله اواخر تک هسته‌ای و اوایل دو هسته‌ای. C: بساک مرحله تک هسته‌ای با انتهای ارغوانی رنگ. D: مرحله دو هسته‌ای. E: میکروسپور در مرحله تک هسته‌ای. F: میکروسپور مرحله اواخر تک هسته و اوایل دو هسته‌ای. G: میکروسپور در مرحله دو هسته‌ای

**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 به‌کار گرفته شد. منحنی‌های حاصل از آنالیز نشان داد که تمامی نمونه‌های بررسی‌شده دارای الگوی مشابه با گیاهان دیپلوئید شاهد بودند. این امر نشان می‌دهد که بیشتر گیاهچه‌های به‌دست‌آمده دارای سطح پلوییدی دو برابر بوده و روند مضاعف‌شدن خودبه‌خودی کروموزوم‌ها در طی مراحل اولیه جنین‌زایی روی داده است. چنین پدیده‌ای در مطالعات مختلف بر روی آندروژنز فلفل نیز گزارش شده و یکی از عوامل اصلی دستیابی به گیاهان دابل‌هاپلوئید محسوب می‌شود (Germana, 2011; Supena et al., 2006).

### مارکر SSR

الگوهای به‌دست‌آمده از الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که بخشی از گیاهان دارای الگوی تک‌باندی بودند که بیانگر هموزیگوت بودن آنهاست، در حالی‌که گروهی دیگر با الگوی دو باندی به‌عنوان گیاهان هتروزیگوت شناسایی شدند این نتایج حاکی از آن است که اگرچه بخشی از باززایی‌ها منجر به تولید دابل‌هاپلوئیدهای کاملاً هموزیگوت شده است، اما برخی گیاهان همچنان تنوع آللی را حفظ کرده‌اند.

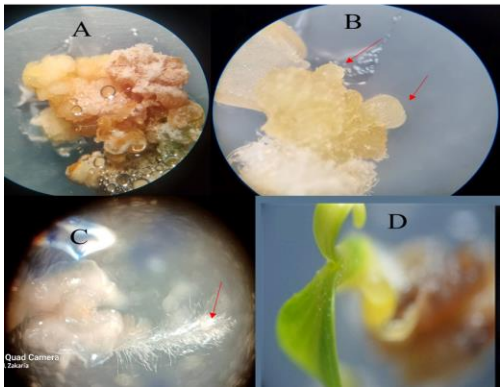
**کشت بساک:** این تحقیق اثربخشی جنین‌زایی و کالوس‌زایی میکروسپور و باززایی هموزیگوت در فلفل از طریق کشت بساک را تأیید می‌کند. با این حال، اکثر جنین‌های تولید شده در این مطالعه نتوانستند مسیر طبیعی تمایز به گیاهچه را طی کنند و به ساختارهای غیرطبیعی تبدیل



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 ٤/٤۲ درصد بود (شکل ٤). مشاهدات نشان داد که بساک‌ها در محیط C5 فاقد تنظیم کننده های 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 به‌طول ۲ تا ۳ میلی‌متر پس از حدود ۳۰ روز نمایان شدند (شکل۲). سپس این جنین ها 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 بازا 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 تنظیم کننده رشد گیاهی به‌جز تیمار شاهد، منجر به کالوس‌زایی در بساک‌های فلفل شدند (شکل ٤). 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 ۷۸/٤۷ درصد در محیط C4 مشاهده شد و کمترین مقدار مربوط به ژنوتیپ Tarento با ۱٦/۰۳ 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 ۵۲/٦۲ درصد بود و کمترین آن در رقم Arancia در محیط C4 با ۱/۵۱درصد به‌دست آمد. از نظر تأثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی، محیط‌های C1 و C2 بیشترین نقش را در القای جنین‌زایی داشتند (شکل ٤). 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 ٤).



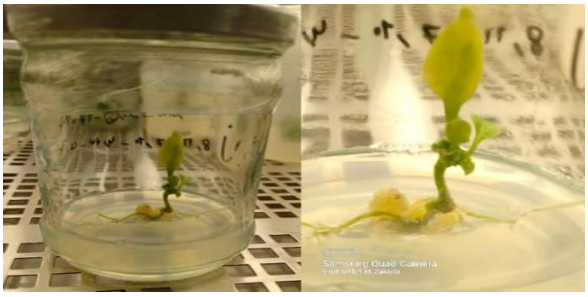

**شکل ۲**- بساک‌های کشت شده در محیط C2 بعد از ۵۰ روز. A: کالوس ایجاد شده از بساک. B: جنین‌های ایجاد شده از کالوس. C: جنین‌های غیر طبیعی که اندام شبیه ریشه تبدیل شده است. D: گیاهچه تشکیل شده از جنین طبیعی.

**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.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]



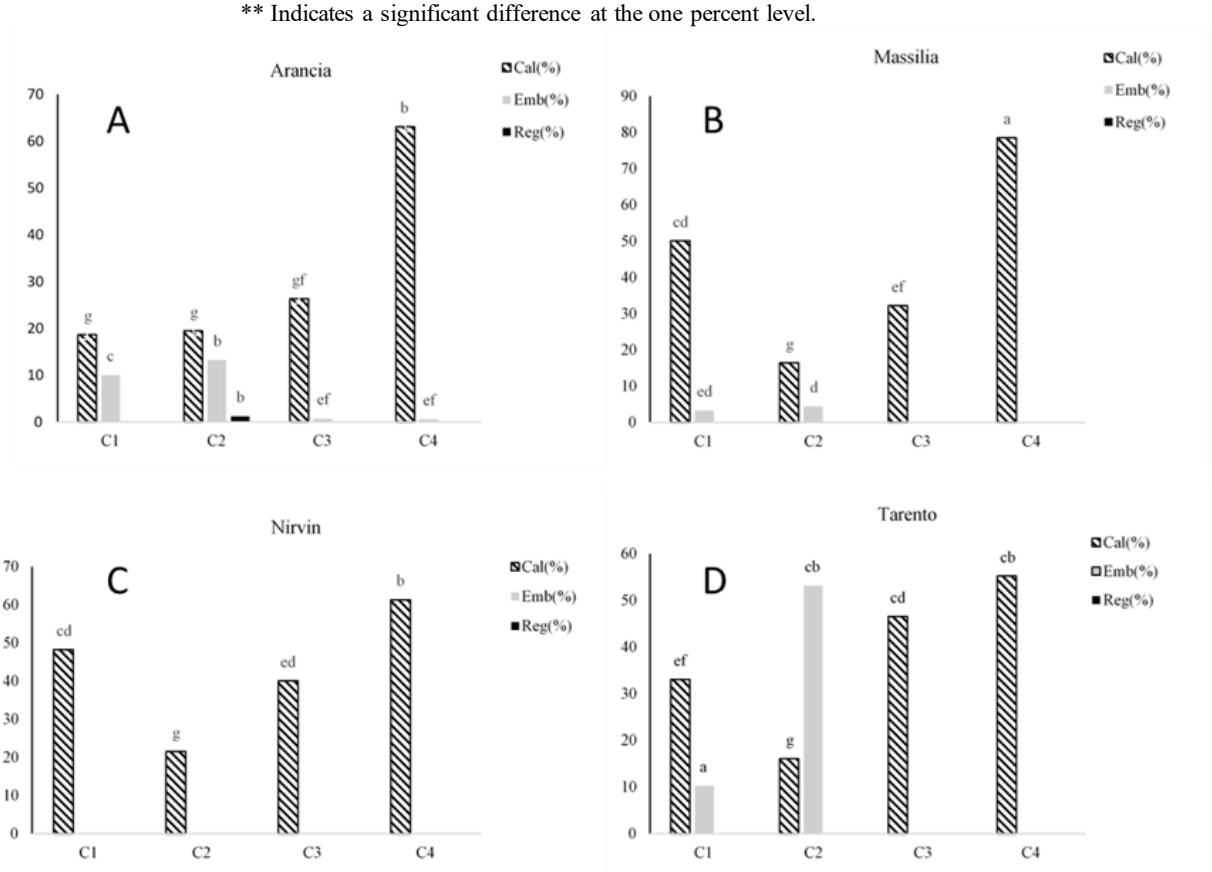
**شکل ۳**- باززایی گیاه در کشت بساک فلفل دلمه‌ای **Fig 3.** Plant regeneration in bell pepper anther culture

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

**Fig 4.** Comparison of the mean of the interaction of culture medium × cultivar for the traits percentage of anthers producing callus (Cal), percentage of anthers producing embryos (Emb), and percentage of plantlets produced from embryos (Reg). A: Arancia cultivar. B: Massilia cultivar. C: Nirvin cultivar. D: Tarento cultivar.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

نتایج به‌دست 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, 2004; Kim *et al*., 2004; Kumar *et al*., 2003) 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.

یافته های 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 × 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 تنظیم کننده 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 تنظیم کننده 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 تنظیم کننده 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، واکنش پذیری میکروسپورها به استرس و حساسیت به ترکیبات تنظیم کننده 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 به‌دست‌آمده در خصوص جنین‌زایی در این پژوهش با یافته‌های گزارش‌شده در گذشته هم راستا 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 ۱/۵تا 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 فرایند جنین‌زایی هستند.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 به‌منظور ارزیابی تأثیر عوامل مختلف بر بهینه‌سازی کارایی کشت بساک در گیاه فلفل (*Capsicum annuum*) صورت گرفته است (Nowaczyk & Kisiała, 2006). نتایج این تحقیقات نشان داد که کارایی آندروژنز به‌طور 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 ٤). این موضوع همچنین نشان‌دهنده تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌ها به سطوح مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی است. همچنین استفاده از ٢,٤-D، به‌ویژه در غلظت‌های ١ تا ٢ 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 ٢,٤-D، تأثیر کمتری از خود نشان دادند (Rao & Sangapure, 2014). از سوی دیگر، تفاوت در پاسخ ارقام به تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی نیز مشاهده شد. برای نمونه، نتایج مطالعات نشان داد که رقم G4 پاسخ مطلوب‌تری به تیمارهای ترکیبی با غلظت‌های بالاتر ٢,٤ D-نشان می‌دهد، در حالی که رقم دیگری مانند Pusa Jwala در شرایطی با سطح پایین‌تر ٢,٤ D-و حضور هم‌زمان BAP یا Kinetin عملکرد بهتری در تشکیل کالوس داشت. این نتایج حاکی از آن است که پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌شدت تحت تأثیر ویژگی‌های ژنتیکی رقم است (Ranjan et al., 2018). تفاوت‌های معناداری در پاسخ آندروژنز بین ژنوتیپ‌ها و حتی گیاهان مجزا گزارش شده است؛ موضوعی که بر نقش کلیدی ژنوتیپ گیاه اهداکننده در تعیین کارایی آندروژنز 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 ٢,٤-D تا ٢ 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 تمایزنیافته می‌شود که این امر پیش نیازی 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 ٤/٨٣ تا ٨/٢٨ 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،



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 قابل توجهی 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.

**پیشنهادها:** 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



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

(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: fundamentalresearch 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 embriogenesis 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., Spaink, 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 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.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]

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 BotanicalClub, 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).

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.14.2.2 ]