نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و ششم، شماره اول، ۱۳۹۸
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2019.14326.2284
۷۵-۸۸

کالوس‌زائی و اندام‌زائی از جداکشت‌های مختلف گیاه علف مار (*Capparis spinosa* L.) تحت شرایط درون‌شیشه‌ای

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

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران،
[۲]دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، [۳]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، تهران، ایران، [۴]دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: گیاه کبر .*Capparis spinosa* L مهم‌ترین گونه خانواده Capparaceae بوده که به‌عنوان یکی از گیاهان مهم دارویی محسوب می‌گردد. کاربرد دارویی این گیاه به‌دلیل غنی‌بودن ریشه‌ها و جوانه‌های مولد گل و میوه‌ها از ترکیبات دارویی مانند فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، پکتین‌ها، اسانس‌ها و به‌ویژه گلیکوزیدها و گلیکوزینولات‌ها است. با توجه به اهمیت گیاه دارویی علف مار و مشکل تکثیر این گیاه از طریق بذر، در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط کشت به‌منظور تولید کالوس و باززایی این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. جهت انجام پژوهش حاضر جداکشت‌های برگ لپه‌ای، برگ، غنچه، پرچم، محور روی لپه، ریشه، گلبرگ، کاسبرگ و گره در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی مختلف کشت شدند. از دو سطح مختلف 2,4-D (۳ mg/l و ۲/۵) همراه با ۰/۰۱ mg/l کاینتین و سه سطح NAA) (۳mg/l، ۲/۵ و ۲) در ترکیب با ۰/۵ mg/l BA برای کالوس‌زایی استفاده گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار و هر تکرار با ۵ ریزنمونه انجام شد. به‌منظور باززایی گیاهچه از کالوس‌های تولید شده، کالوس‌ها برای تولید شاخساره در محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده رشد و ترکیب هورمونی KIN، NAA، BAP و IBA با غلظت‌های مختلف کشت شدند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس مشخص نمود که اثر تغییرات ریزنمونه و برهمکنش ترکیبات هورمونی و ریزنمونه برای سه صفت وزن تر، وزن خشک کالوس و درصد کالوس‌دهی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود ولی اثر تغییرات تنظیم‌کننده رشد برای صفت درصد کالوس‌دهی معنی‌دار نشد. در مجموع تمام ترکیبات هورمونی مختلفی که برای کالوس‌دهی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند، مناسب بودند ولی عکس‌العمل ریزنمونه‌ها برای تولید کالوس متفاوت بود. به‌طوری‌که ریزنمونه پرچم بالاترین درصد کالوس‌دهی (۱۰۰ درصد) را در تمامی محیط‌کشت‌ها داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که بهترین ترکیبات هورمونی برای کالوس‌دهی از نظر میانگین وزن تر کالوس، محیط کشت MS حاوی ۰/۰۲ $mg.l^{-1}$ NAA + ۱ $mg.l^{-1}$ KIN (با میانگین

* مسئول مکاتبه: l.fahmideh@uoz.ac.ir

۰/۲۷ میلی‌گرم بر لیتر) و برای میانگین وزن خشک کالوس نیز محیط کشت MS حاوی $mg.l^{-1}$ NAA ۳+ $mg.l^{-1}$ BAP ۰/۵ و MS حاوی $mg.l^{-1}$ NAA ۰/۰۲+ $mg.l^{-1}$ KIN ۱ (به‌ترتیب با میانگین ۰/۰۲۶ و ۰/۰۲۷ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. بهترین محیط برای تولید شاخساره از کالوس محیط کشت MS حاوی $mg.l^{-1}$ KIN ۲ (۴۰ درصد) و $mg.l^{-1}$ NAA ۲ (۴۰ درصد) برای تولید ریشه محیط کشت MS حاوی $mg.l^{-1}$ NAA ۱ (۳۰ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش با کاربرد غلظت¬های مختلف تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه، بهترین ریزنمونه و بهترین تنظیم‌کننده رشد جهت به‌دست آوردن بیش‌ترین کالوس برای تولید گیاهچه انتخاب شد. بر اساس نتایج حاصله، ریزنمونه پرچم و تمامی ترکیبات هورمونی مورد استفاده برای کالوس‌زایی مناسب بودند. بیش‌ترین تولید شاخساره را تیمار NAA ($۲mg.l^{-1}$) و KIN ($۲mg.l^{-1}$) و تولید ریشه تیمار NAA ($۱mg.l^{-1}$) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای داشتند. بنابراین استفاده از این تیمارها و ریزنمونه‌های ذکر شده در این پژوهش که بهترین کالوس‌زایی و در ادامه بیش‌ترین تولید شاخساره و ریشه را به‌منظور تکثیر این گیاه در شرایط کشت درون شیشه‌ای نشان دادند، پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده رشد، ریزنمونه، علف مار، کالوس‌دهی، کشت درون‌شیشه‌ای

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم برای درمان بیماری‌ها بوده‌اند و در تمدن‌های پیشین جمع‌آوری و کشت آن‌ها در مکان‌های مقدس مانند دیرها و صومعه‌ها متداول بوده است. استفاده از گیاهان در طب سنتی در ایران و سایر کشورهای جهان متداول بوده و بر اساس شواهد تاریخی، کشور ایران در این زمینه پیشتاز و از کشورهای مطرح جهان بوده است (۲۳). گیاه علف مار یا کبر با نام علمی *Capparis spinosa* L. گیاهی بوته‌ای تک‌پایه و چند ساله است که متعلق به راسته میخک‌سانان (*Caryophyllales*)، تیره کبر (*Capparaceae*) و سرده کبرها (*Capparis*) می‌باشد (۲۵). علف مار جز گیاهانی است که در اوایل تیر تا اواخر شهریور، درست زمانی که دمای هوا بالا و رطوبت خاک در کم‌ترین حد خود می‌باشد گل می‌دهد و دوره رشد زایشی آن تکمیل می‌شود (۴۳). گونه‌های *Capparis* در نواحی گرمسیری دنیا رشد می‌کند و شامل بیش از ۲۵۰ گونه می‌باشد (۱۷ و ۴۲). کبر گیاهی سازگار با خاک‌های فقیر بوده و قادر است در مکان‌هایی با محدودیت آب و مواد غذایی رشد کند (۳۲). این گیاه مقاوم به خشکی و گرمای شدید است و اغلب به‌صورت آویزان و خزنده در لابه‌لای خاک و صخره‌ها دیده می‌شود (۸، ۲۲ و ۳۵). در ایران این گونه در بخش‌های شمالی، شمال‌غرب، مرکز، و شرق کشور پراکنش دارد (۳۸). استفاده دارویی از این گیاه به‌دلیل غنی بودن ریشه‌ها و جوانه‌های مولدگل و میوه‌ها از ترکیبات دارویی مانند فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، پکتین‌ها، اسانس‌ها و به‌ویژه گلیکوزیدها و گلیکوزینولات‌ها است (۲۳ و ۲۶). پوست ریشه گیاه به‌عنوان ماده مقوی، مدر و قابض کاربرد سنتی دارد و همچنین، در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های پوستی، کلیه، کبد، طحال، کم‌خونی، اعصاب، نقرس، دیابت و روماتیسم استفاده می‌شود (۲ و ۱۱). پژوهش‌های اخیر نشان داده است که این گیاه خاصیت ضد میکروبی (۲۸ و ۲۹) و ضد قارچی قوی دارد همچنین حاوی مقدار زیادی آنتی‌اکسیدان بیوفلاونوئید روتین می‌باشد (۱). اخیراً تولید وسیع و تجاری این گیاه در کشورهای مختلف مورد توجه قرار گرفته است اما مشکلات و موانعی به‌علت درصد کم جوانه‌زنی دانه‌ها وجود دارد (۳۴ و ۳۹). با توجه به

خواص دارویی متعدد و استفاده‌های تغذیه‌ای و تجاری این گیاه و لزوم کشت آن، بررسی تیمارهای مختلف برای تولید آن ضروری می‌باشد از مشکلات کشت این گیاه، خفتگی بذر آن است. بر این اساس تکثیر این گیاه با استفاده از بذر بسیار مشکل بوده و به‌صورت رویشی صورت می‌گیرد.

کشت سلول و بافت گیاهی که کشت درون‌شیشه‌ای و یا کشت استریل نیز نامیده می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی است. هر چند که هزینه زیاد و نیاز به نیروی کار ماهر و متخصص از جمله معایب این روش به‌شمار می‌آید (۳۶). مهم‌ترین روش تکثیر کشت بافت گیاهان باززایی از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است (۴۰). معمولاً محیط کشت حاوی 2,4-D به تنهایی نیز برای تولید کالوس علف مار مؤثر نیست و بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب 2,4-D و KIN (۱-۵ mg/l) مشاهده شده است. همچنین تشکیل کالوس ترد و تازه در دوره زمانی کوتاه ۲۰ تا ۲۵ روز شروع می‌شود (۶). در آزمایشی از قسمت‌های مختلف گل‌های بسته و تلقیح‌نیافته گیاه علف مار در مزرعه برای باززایی استفاده کردند که بهترین نتیجه از کشت سلول‌های تلقیح‌نیافته در محیط MS حاوی ۸۸ میلی‌مول ساکارز و ۱۳ میکرومول ۵- بنزیل آمینو پورین به‌دست آمد (۱۰). موافقی و همکاران در پژوهشی در سال ۱۳۸۷ به بررسی باززایی گیاه دارویی علف مار (کبر) با استفاده از کشت قطعات هیپوکتیل پرداختند. قطعات جداکشت هیپوکتیل در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید نفتالین استیک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۵- بنزیل آمینو پورین (BAP)، بیش‌ترین تولید شاخساره را داشتند. آن‌ها گزارش کردند که افزایش مقدار اسید نفتالین استیک، تولید شاخساره را متوقف کرد و باعث تولید کالوس گردید. ریشه‌زایی قطعات جداکشت در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید نفتالین استیک بهینه بود. پس از چهار هفته، ریشه‌های تشکیل شده در پای شاخساره‌ها قابل رؤیت بود (۳۰).

هدف از انجام این آزمایش تعیین بهترین ریزنمونه و بهترین سطح تنظیم‌کننده رشد جهت به‌دست آوردن بیش‌ترین کالوس و در ادامه تعیین بهترین محیط برای باززایی گیاه علف مار بود تا بتوان با توجه به مشکل تکثیر این گیاه از طریق بذر، با استفاده از نتایج حاصل از این پژوهش، تکثیر و تولید این گیاه را در شرایط درون شیشه بهینه نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه، ضدعفونی و کشت بذور: این پژوهش در پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شده است. در این پژوهش از بذور جمع‌آوری‌شده از مناطق مرکزی ایران و بوته کامل این گیاه در حوالی دانشگاه صنعتی اصفهان استفاده شد. بذور درون آب با دمای متفاوت به‌صورت متناوب قرار داده و روی کاغذ صافی درون پتری‌دیش و درون ژرمیناتور با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۴ °C و رطوبت ۷۰ درصد نگهداری شدند. بعد از دو هفته بذور جوانه زده به گلدان منتقل شدند. در این پژوهش جداکشت‌های برگ‌های لپه‌ای، برگ، ریشه، پرچم، غنچه گل، محور زیر لپه، کاسبرگ و گلبرگ در محیط کشت‌های مختلف کشت شدند. ابتدا ریزنمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در ظرفی زیر آب جاری شیر شسته شدند، بعد به‌مدت ۸ الی ۱۰ دقیقه بسته به ضخانت ریزنمونه، در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد و یک قطره مایع ظرفشویی قرار گرفت، سپس ۳ بار با آب مقطر و هر بار به‌مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند تا هیپوکلریت آن‌ها کاملاً شسته شود. بعد از این مرحله ریزنمونه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار

گرفتند و دوباره ۳ مرحله با آب مقطر استریل، هر مرحله برای ۲ دقیقه، شسته شدند تمامی مراحل استریل همراه با تکان دادن ریزنمونه‌ها بود (۱۸). (بهتر است بعد از مرحله آب جاری، بقیه مراحل زیر هود انجام شود). به‌منظور به‌دست آوردن بهترین نوع ریزنمونه، غلظت‌های مؤثر تنظیم‌کننده رشد و بهینه کردن محیط کشت MS درون‌شیشه‌ای برای تولید پینه و گیاه از آن به‌صورت زیر عمل شد.

تولید پینه: برای بررسی تأثیر تنظیم‌کننده رشد بر پینه‌زایی شش سطح غلظت‌های مختلف در نظر گرفته شدند که در جدول ۱ آورده شده‌اند. بعد از افزودن تنظیم‌کننده رشد به محیط‌های کشت MS کامل، pH محیط روی ۵/۸-۵/۶ تنظیم گردید و عمل استریل کردن در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. هر ریزنمونه در ٤ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه کشت داده شدند. واکشت‌ها هر هفته و به‌مدت سه هفته مورد بررسی دقیق و اندازه‌گیری قرار گرفتند.

جدول ۱- تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت MS جهت تولید پینه.

Table 1. Plant growth regulator treatments used in MS medium for callus production.

تیمار Treatment	اجزاء محیط کشت Medium culture components
تیمار اول (PGR 1)	0.1 mg.l^{-1} KIN +2.5 mg.l^{-1} 2,4-D
تیمار دوم (PGR 2)	0.1 mg.l^{-1} KIN +3 mg.l^{-1} 2,4-D
تیمار سوم (PGR 3)	0.5 mg.l^{-1} BAP +2 mg.l^{-1} NAA
تیمار چهارم (PGR 4)	0.5 mg.l^{-1} BAP +2.5 mg.l^{-1} NAA
تیمار پنجم (PGR 5)	0.5 mg.l^{-1} BAP +3 mg.l^{-1} NAA
تیمار ششم (PGR 6)	1 mg.l^{-1} KIN +0.02 mg.l^{-1} NAA

اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک کالوس: جهت اندازه‌گیری وزن اولیه ریزنمونه‌ها، ابتدا وزن پتری‌دیش حاوی محیط جامد یادداشت‌برداری گردید و بعد از اضافه نمودن ریزنمونه‌ها مجدداً وزن پتری‌دیش‌ها محاسبه گردید که با کسر این دو عدد وزن اولیه ریزنمونه‌ها محاسبه گردید. سریعاً بعد از تشکیل کالوس، کالوس از محیط برداشته و وزن گردید (زیرا کالوس به سرعت آب خود را از دست می‌دهد) و عدد به‌دست آمده را از وزن اولیه ریزنمونه کسر و وزن تر کالوس به‌دست آمد. هنگامی که وزن تر به‌دست آمد، کالوس‌ها را در آون در دمای ۸۰ °C به‌مدت ۲ روز قرار داده و سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. به‌دلیل کاهش سریع و غیرقابل کنترل وزن تازه، وزن خشک معیار مطمئن‌تری برای اندازه‌گیری رشد کالوس است. برای به‌دست آوردن درصد پینه، تعداد نمونه‌های کالوس‌دهنده تقسیم بر تعداد کل نمونه‌های موجود در هر پتری‌دیش گردید و عدد حاصله در صد ضرب شد (۱٤ و ۲۷). پس از انجام این آزمایش تیـمارهای تنظیم‌کننده رشد مؤثر در امر کال‌زایی انتخاب شدند.

تولید شاخساره و ریشه: به‌منظور باززایی گیاهچه از کالوس‌های تولید شده، ابتدا از تمام قسمت‌های گیاه مانند برگ، ساقه، میوه نارس، هیپوکوتیل، گره، گلبرگ، کاسبرگ، ریشه، پرچم (میله و بساک) و

مادگی برای باززایی غیرمستقیم استفاده شد. نمونه‌ها بعد از استریل شدن در محیط کشت‌های موجود در جدول ۲ برای ایجاد شاخساره از پینه کشت شدند و برای هر ریزنمونه ٤ تکرار قرار داده و درون هر ظرف نیز ۵ ریزنمونه قرار داده شد. واکشت نیز تقریباً ۲۰ روز یک‌بار در محیط‌های تازه تهیه شده‌ای محیط‌های قبلی صورت گرفت. بعد از حدود ۳ هفته از کشت اولیه، اولین آثار تولید شاخساره نمایان شد. در ادامه برای تولید ریشه ریزنمونه‌هایی که بعد از سه بار واکشت، شاخساره خوبی ایجاد کرده بودند به محیط کشت‌های موجود در جدول ۳ برای ریشه‌زایی منتقل شدند.

جدول ۲- تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده جهت ایجاد شاخساره از پینه.

Table 2. Plant growth regulator treatments used for shoot production from callus explants.

تیمار Treatment	اجزاء محیط کشت Medium culture components
تیمار اول a (PGR 1)	MS + 1 mg.l^{-1} KIN
تیمار دوم a (PGR 2)	MS + 2 mg.l^{-1} KIN
تیمار سوم a (PGR 3)	MS + 1 mg.l^{-1} NAA
تیمار چهارم a (PGR 4)	MS + 2 mg.l^{-1} NAA
تیمار پنجم a (PGR 5)	MS + 0.5 mg.l^{-1} BAP
تیمار ششم a (PGR 6)	MS + 1 mg.l^{-1} BAP
تیمار هفتم a (PGR 7)	MS + 2 mg.l^{-1} BAP

جدول ۳- تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد مورد مورد استفاده جهت ریشه‌دهی شاخساره.

Table 3. Plant growth regulator treatments used for rooting of the shoots.

تیمار Treatment	اجزاء محیط کشت Medium culture components
تیمار اول b (PGR 1)	MS + 1 mg.l^{-1} NAA
تیمار دوم b (PGR 2)	MS + 2 mg.l^{-1} NAA
تیمار سوم b (PGR 3)	MS + 3 mg.l^{-1} NAA
تیمار چهارم b (PGR 4)	MS + 1 mg.l^{-1} IBA
تیمار پنجم b (PGR 5)	MS + 3 mg.l^{-1} IBA

تجزیه و تحلیل‌های آماری: این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ٤ تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد و قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office Excel 2010 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این‌که داده‌های حاصل از اندازه‌گیری برخی صفات بر اساس درصد بودند (درصد کالوس‌دهی، درصد ریشه‌دهی و درصد تولید شاخساره)، برای این‌که داده‌ها دارای توزیع نرمال

باشند، از تبدیل داده جذری $X_1=\sqrt{X2}$ استفاده شد. در مواردی هم که صفر وجود داشت از تبدیل $X_1=\sqrt{X2+0.5}$ استفاده گردید (۱۵).

نتایج و بحث

با توجه به جدول ٤، اثر تغییرات ریزنمونه و برهمکنش محیط و ریزنمونه برای سه صفت وزن تر، وزن خشک کالوس و درصد کالوس‌دهی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود ولی اثر تغییرات تنظیم‌کننده رشد برای صفت درصد کالوس‌دهی معنی‌دار نشد. ریزنمونه‌ها به‌طور میانگین یک هفته بعد از کشت، متورم شده و یک تا دو روز بعد نیز تولید کالوس در آن‌ها مشاهده شد.

جدول ٤- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات وزن تر، وزن خشک کالوس و درصد کالوس‌دهی.

Table 4. Analysis of variance of fresh weight, dry weight and callus percentage traits.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر کالوس(گرم) Callus fresh weight (gr)	وزن خشک کالوس (گرم) Callus dry weight (gr)	درصد کالوس‌دهی (درصد) Callus percentage (%)
تنظیم‌کننده رشد PGR	5	0.0166**	0.00062**	151.8196ns
ریزنمونه Explant (E)	8	0.152**	0.10052**	38088.9891**
تنظیم‌کننده رشد × ریزنمونه PGR × E	40	0.0048**	0.00029**	418.54**
خطا Error	162	0.0010	0.000012	84.739
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)	-	15.517	12.119	13.557
میانگین Mean	-	0.1078	0.0111	67.8892

ns، ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

ns, ** are not significant and significant at 1% level of probability, respectively.

تولید پینه

میانگین وزن تر: با توجه به جدول **۵**، مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها بر اساس وزن تر در تیمارهای مختلف نشان داد که ریزنمونه برگ رشدیافته (۰/۱٤ گرم)، برگ کوتیلدونی (۰/۱۵ گرم) و غنچه (۰/۱٦ گرم) در تیمار اول، برگ کوتیلدونی (۰/۲۰ گرم) و برگ رشدیافته (۰/۲۱ گرم) در تیمار دوم، غنچه (۰/۲۵ گرم) در تیمار سوم، (۰/۲۵ گرم) در تیمار چهارم و غنچه (۰/۲۷ گرم) در تیمار پنجم، و برگ رشدیافته (۰/۲۷ گرم) در تیمار ششم بیش‌ترین میزان میانگین وزن تر را داشتند و در همه تیمار مورد بررسی کم‌ترین میزان مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه گیاهچه (صفر) بود. طی پژوهشی نشان داده شده که کشت دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۲۵ باززایی بهینه کالوس از ریزنمونه گلآذین سوسن در محیط میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمده است (۱۲).

در آزمایشی دیگر، القای کالوس در ریزنمونه‌های فلسی ارنیتوگالوم در تمیارهای دارای ٤-١ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ٢ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (١٩). نتایج این آزمایش‌ها بیانگر این مطلب هست که هورمون 2,4-D به همراه یک سیتوکنین برای کالوس‌زایی مناسب‌تر می‌باشد.

جدول ٥- مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد برای وزن تر.

Table 5. Mean comparison of explant and plant growth regulator interaction for fresh weight.

جدا کشت Explant	تیمار اول PGR 1	تیمار دوم PGR 2	تیمار سوم PGR 3	تیمار چهارم PGR 4	تیمار پنجم PGR 5	تیمار ششم PGR 6
برگ کوتیلدونی Cotyledon leaf	0.15 ^{a}	0.20 ^{a}	0.19 ^{b}	0.25 ^{a}	0.19 ^{b}	0.23 ^{ab}
گره Node	0.12 ^{ab}	0.081 ^{bc}	0.14 ^{bc}	0.15 ^{b}	0.15 ^{c}	0.22 ^{ab}
غنچه Bud	0.16 ^{a}	0.13 ^{b}	0.25 ^{a}	0.19 ^{ab}	0.27 ^{a}	0.14 ^{c}
برگ رشدیافته Growth leaf	0.14 ^{a}	0.21 ^{a}	0.17 ^{b}	0.18 ^{ab}	0.17 ^{bc}	0.27 ^{a}
کاسبرگ Sepals	0.076 ^{bc}	0.080 ^{bc}	0.071 ^{de}	0.073 ^{e}	0.14 ^{bc}	0.18 ^{bc}
گلبرگ Petals	0.04 ^{cd}	0.049 ^{cd}	0.098 ^{cd}	0.079 ^{c}	0.097 ^{d}	0.19 ^{bc}
پرچم Flag	0.052 ^{cd}	0.036 ^{cd}	0.046 ^{ef}	0.054 ^{cd}	0.054 ^{e}	0.049 ^{d}
هیپوکتیل Hypocotyl	0 ^{d}	0 ^{d}	0 ^{f}	0 ^{d}	0 ^{e}	0 ^{d}
ریشه گیاهچه Plant root	0 ^{d}	0 ^{d}	0 ^{f}	0 ^{d}	0 ^{e}	0 ^{d}

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ١ درصد ندارند.

Means with at least one same letter are not significantly different (P≤1%).

میانگین وزن خشک: بیش‌ترین میزان میانگین وزن خشک متعلق به ریزنمونه گره (٠/٠١٥ گرم) در تیمار اول و ششم، برگ رشدیافته (٠/٠١٤ گرم) و برگ کوتیلدونی (٠/٠١٣ گرم) در تیمار دوم، گلبرگ (٠/٠٥٧٢٢ گرم) در تیمار سوم، برگ کوتیلدونی (٠/٠٢٥ گرم) و گره (٠/٠٢٣ گرم) در تیمار چهارم، غنچه (٠/٠٢٦ گرم) و کاسبرگ (٠/٠٢٧ گرم) در تیمار پنجم بود و کم‌ترین میزان در همه تیمارهای مورد بررسی در ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه گیاهچه (صفر) مشاهده گردید (جدول ٦).

جدول ٦- مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد برای وزن خشک.

Table 6. Mean comparison of explant and plant growth regulator interaction for fresh weight.

جدا کشت Explant	تیمار اول PGR 1	تیمار دوم PGR 2	تیمار سوم PGR 3	تیمار چهارم PGR 4	تیمار پنجم PGR 5	تیمار ششم PGR 6
برگ کوتیلدونی Cotyledon leaf	0.012 ^{ab}	0.013 ^{a}	0.0190 ^{b}	0.025 ^{a}	0.028 ^{a}	0.019 ^{d}
گره Node	0.015 ^{a}	0.0046 ^{b}	0.0175 ^{b}	0.023 ^{a}	0.019 ^{b}	0.028 ^{a}
غنچه Bud	0.012 ^{ab}	0.0054 ^{b}	0.0249 ^{b}	0.014 ^{bc}	0.026 ^{a}	0.026 ^{ab}
برگ رشدیافته Growth leaf	0.012 ^{ab}	0.014 ^{a}	0.0080 ^{c}	0.018 ^{ab}	0.0084 ^{cd}	0.023 ^{bc}
کاسبرگ Sepals	0.0069 ^{bc}	0.0064 ^{b}	0.0047 ^{c}	0.006 ^{cd}	0.027 ^{a}	0.012 ^{e}
گلبرگ Petals	0.0036 ^{cd}	0.0043 ^{bc}	0.05722 ^{a}	0.004 ^{d}	0.012 ^{c}	0.022 ^{c}
پرچم Flag	0.0054 ^{c}	0.0025 ^{bc}	0.0025 ^{c}	0.003 ^{d}	0. 004 ^{de}	0.004 ^{f}
هیپوکتیل Hypocotyl	0 ^{d}	0 ^{c}	0 ^{c}	0 ^{d}	0 ^{e}	0 ^{g}
ریشه گیاهچه Plant root	0 ^{d}	0 ^{c}	0 ^{c}	0 ^{d}	0 ^{e}	0 ^{g}

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

Means with at least one same letter are not significantly different (P≤1%).

میانگین درصد کالوس‌دهی: مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها بر اساس درصد وزن کالوس در تیمارهای مختلف آشکار نمود که بیش‌ترین میانگین درصد کالوس‌دهی مربوط به غنچه، گلبرگ و پرچم در تیمار اول، دوم، سوم و چهارم، برگ کوتیلدونی، غنچه و پرچم در محیط کشت پنجم و در تیمار ششم مربوط به کاسبرگ و پرچم (۱۰۰) بود. نتایج همچنین نشان داد که کم‌ترین میانگین در همه تیمارهای مورد بررسی مربوط به ریزنمونه‌های هیپوکتیل و ریشه گیاهچه (صفر) بود (جدول ۷). در مجموع از بین تیمارهای مختلفی که برای کالوس‌دهی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند نتایج تمامی محیط‌ها مناسب بود ولی از بین ریزنمونه‌های مختلف عکس‌العمل ریزنمونه‌ها برای تولید کالوس متفاوت بود به‌طوری‌که ریزنمونه پرچم بالاترین درصد کالوس‌دهی (۱۰۰ درصد) را در تمامی تیمارها داشت. در شکل ۱ مراحل کالوس‌زایی گیاه علف مار تحت شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داده شده است. کالوس‌زایی توسط ترکیبی از این دو هورمون گیاهی در گیاهان دیگری مانند *Kaempferia galangal* L. و *Curcuma longa* L. نیز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مشابهی را داشته است (۳۷).

جدول ۷- مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها بر اساس درصد وزن کالوس در محیط کشت‌های مختلف.

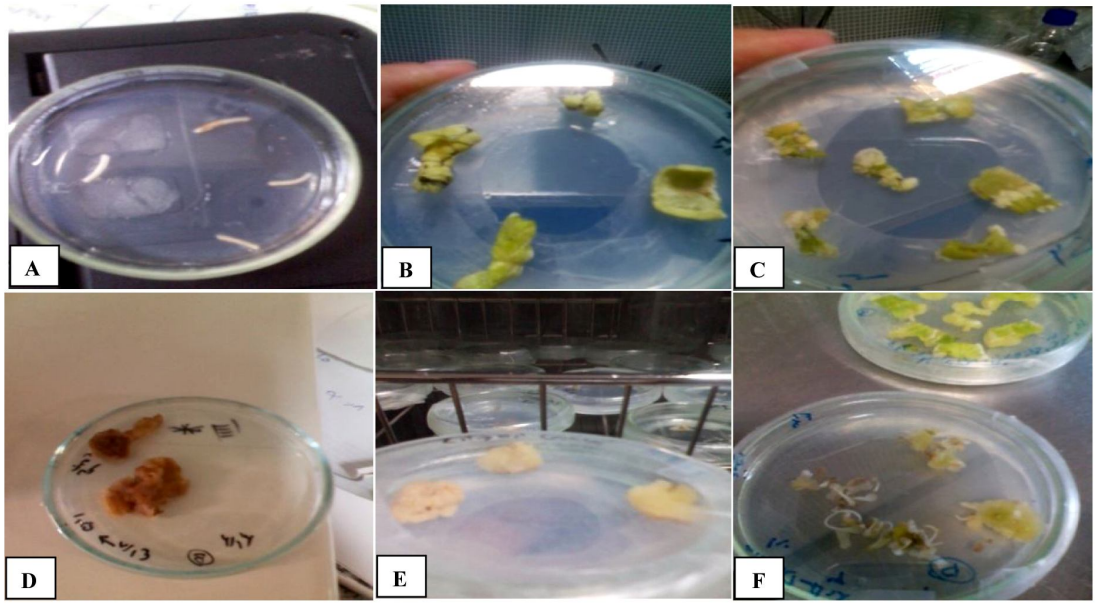
Table 7. Comparison of the average of explants for on the percentage of callus weight in different media.

جدا کشت Explant	تیمار اول PGR 1	تیمار دوم PGR 2	تیمار سوم PGR 3	تیمار چهارم PGR 4	تیمار پنجم PGR 5	تیمار ششم PGR 6
برگ کوتیلدونی Cotyledon leaf	82.14 b	92.26 a	79.25 b	96.88 a	100 a	83.34 a
گره Node	66.67 c	52.38 b	72.22 b	44.45 c	77.78 bc	83.34 a
غنچه Bud	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	88.89 a
برگ رشدیافته Growth leaf	91.67 ab	91.67 a	66.76 b	66.76 b	61.12 c	83.34 a
کاسبرگ Sepals	97.5 ab	94.45 a	83.33 ab	91.67 a	71.43 b	100 a
گلبرگ Petals	100 a	100 a	100 a	100 a	83.33 ab	60 b
پرچم Flag	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
هیپوکتیل Hypocotyl	0 d	0 c	0 c	0 d	0 d	0 c
ریشه گیاهچه Plant root	0 d	0 c	0 c	0 d	0 d	0 c

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

Means with at least one same letter are not significantly different (P≤1%).

تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به‌دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به‌طور کامل بیان نشوند (۲۰ و ۳۱). به‌علاوه، گزارش شده است که غلظت‌های خیلی‌زیاد 2,4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، باشد (۲۷). از جمله عواملی که در تولید کالوس مؤثرند، ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌ای رشد، محیط کشت، نوع هیدرات کربن، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب‌ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (۱۹ و ۲۱).



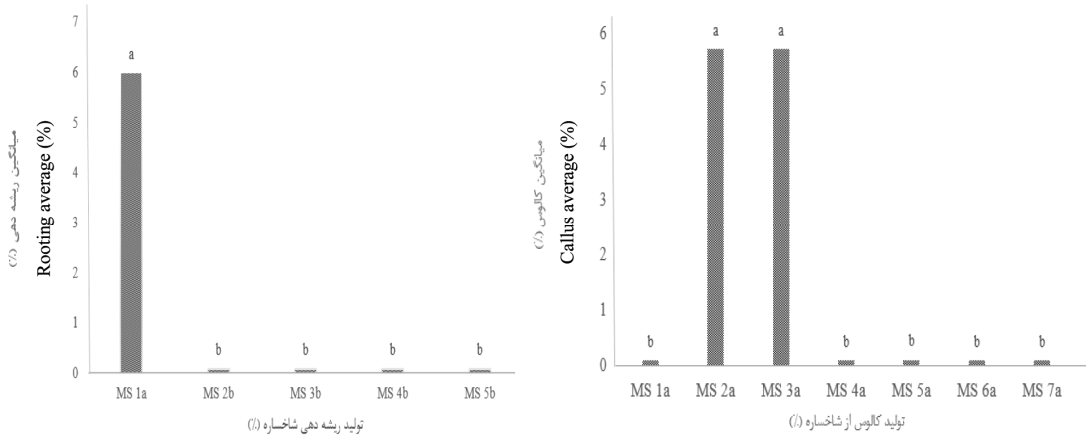
شکل ۱- مراحل کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی NAA $mg.l^{-1}$ ۰/۰۲ + KIN $mg.l^{-1}$ ۱ پس از ۲۱ و ٤۲ روز تحت شرایط درون‌شیشه‌ای: A- عدم تشکیل کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل. B- متورم و شکننده شدن ریزنمونه‌ها قبل از تشکیل کالوس. C- شروع تشکیل کالوس بعد از ۷ تا ده روز بعد از کشت. D- نکروز شدن کالوس. E- کالوس ریزنمونه گلبرگ بعد از واکشت دوم. F- تشکیل کالوس در ریزنمونه غنچه.

Fig. 1. Stages of callus induction in MS medium containing 0/02 $mg.l^{-1}$ NAA +1 $mg.l^{-1}$ KIN after 21 and 42 days under in vitro conditions: A- No callus formation in the hypocotyl explant. B- Swollen and fragile explant before the formation of calluses. C- Starting the callus after 7 to 10 days after the cultivation. D- Callous necrosis. E- Callus of petals explant after the second subculture. F- Callus formation in the bud explant.

نتایج باززایی

تولید شاخساره: براساس نتایج حاصله از بین کالوس‌های مورد استفاده، تولید شاخساره فقط از کالوس ریزنمونه گره حاصل شد (شکل ۲) که این تولید شاخساره در دو تیمار باززایی شامل محیط، تیمار PGR 2 a و PGR 4 a به‌میزان برابر ٤۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳-A).

تولید ریشه: با توجه به شکل ۲، در بین تیمارهای مورد استفاده برای ریشه‌دهی، فقط در تیمار سوم PGR 3 b ریشه‌زایی مشاهده شد، بنابراین تیمار مناسب تولید ریشه، تیمار سوم PGR 3 b بود که برای ۳۰ درصد از شاخساره‌ها تولید ریشه نمود. گیاهان باززایی شده بعد از گذشت ۲ هفته از ریشه‌دهی به گلدان منتقل شدند (شکل ۳-B).



شکل ۲-A: مقایسه درصد تولید شاخساره از کالوس و B: درصد ریشه‌دهی در تیمارهای مختلف.

Fig. 2. Comparison of the percentage of shoots production from callus and Rooting percentage in different treatments.

شکل ۳- A. تولید شاخساره از کالوس گره در تیمار دوم a (PGR 2) و تیمار چهارم a (PGR 4) B. کشت شاخساره‌های تولیدی در تیمار اول b (PGR 1) برای ریشه‌دهی.

Fig. 3. A. Producing Shoots of Callus Nodes PGR 2a and 2 PGR 4a. B. Growth of Shoots Produced in PGR 2b medium for rooting.

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان به این نکته پی برد که نوع و نسبت تنظیم‌کننده رشد در ایجاد کالوس و تمایز سلولی نقش به‌سزایی داشته است. در بررسی کشت کالوس مشاهده شد کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت متفاوت دارای خصوصیات ظاهری و رشد متفاوت هستند تعادل بین تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکنین یک عامل ریخت‌شناسی- ژنتیکی تعیین‌کننده و مهم به‌شمار می‌رود (۲). همچنین گزارش شده است که ترکیب تنظیم‌کننده رشد اکسین با سیتوکنین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن مؤثر است (۳). در مطالعه کشت کالوس و سوسپانسون سلولی درمنه به‌منظور تولید آرتیمیزینین انجام شد، نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی KIN (۰/۵ mg/l) + 2,4-D (۰/۵ mg/l) + NAA (۱ mg/l)، تیمار حاوی BA (۰/۲۵ mg/l) و NAA (۰/۵mg/l) برای رشد کالوس مناسب بودند و بهترین جداکشت در القا

تولید کالوس، جداکشت ریشه و مناسب‌ترین محیط کشت MS+2,4-D (KIN ۱mg/l + ۱mg/l) در گیاه آرتمیزیا بود. همچنین در همین پژوهش محیط MS +۰/۵ mg/l KIN و MS +۱ mg/l KIN از ساقه باززایی مستقیم صورت گرفت (۵). نتایج پژوهش‌های انجام شده جهت تولید کالوس از گیاه *Paspallum vaginatum* نیز نشان داد که نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین و سیتوکینین به‌عنوان اجزاء حیاتی در القای کالوس و باززایی گیاه هستند (۳۳). در گیاه *Stevia rebaudiana* با اضافه کردن بنزیل‌آدنین به محیط کشت‌های حاوی اکسین، تولید کالوس افزایش پیدا کرد (٤). همچنین گزارش شده است که جنس داتوره جهت تولید کالوس به حضور هم زمان اکسین و سیتوکینین نیازمند است (۱۳).

در پژوهشی باززایی ٦ ژنوتیپ پنبه مورد مطالعه واقع گردید که به این نتیجه دست یافتند که محیط کشت دارای 2,4-D و کنتین ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی شروع به کال‌زایی و درصد کال‌زایی بیش‌تری داشتند (١٦). انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشد مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون‌شیشه‌ای بازی می‌کند. پیچیدگی ریخت‌شناسی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تأثیر چشمگیری بر القاء کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (٢٤). هر چند که سن گیاهچه و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز در برخی از گیاهان دارای اهمیت است (۳۲). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که بهترین ریزنمونه از نظر درصد کالوس‌دهی، ریزنمونه پرچم بود که در تمام محیط‌ها بالاترین درصد کالوس‌دهی (۱۰۰ درصد) را داشت. بنابر نتایج حاصله از این پژوهش نوع جداکشت در تولید کالوس بسیار مؤثر می‌باشد. به‌طور مشابه اثر نوع جداکشت در تولید کالوس توسط پژوهشگران دیگر به اثبات رسیده است، به‌طوری‌که در گونه *Salsola pestifer* تولید کالوس از جداکشت‌های ساقه نسبت به جداکشت برگ بهتر انجام گرفت در حالی‌که جداکشت‌های برگ از گونه *Salsola lanata* در تشکیل کالوس مناسب‌تر بودند (٤١). اندام‌زایی در شرایط درون‌شیشه با استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی و همچنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات تنظیم‌کننده رشد در طول کشت وابسته است (۷). به‌طورکلی کنترل فرایندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سیتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را از کالوس سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به‌شدت به ژنوتیپ و مقدار تنظیم‌کننده رشد داخلی گیاه بستگی دارد (۹).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی شد تا با کاربرد غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد و نوع ریز نمونه، بهترین ریزنمونه و بهترین سطح تنظیم‌کننده رشد جهت به‌دست آوردن بیش‌ترین کالوس و همچنین در ادامه برای تولید گیاهچه انتخاب شود. از آن‌جا که تکثیر این گیاه از طریق بذر به‌علت داشتن خواب بذر مشکل است بنابراین استفاده از تیمارها و ریزنمونه‌های ذکر شده در این پژوهش که بهترین کالوس‌زایی و در ادامه بیش‌ترین تولید شاخساره و ریشه را داشتند (برای کالوس‌دهی ریزنمونه پرچم و تمامی تیمارهای مورد استفاده، برای تولید شاخساره محیط NAA ($۲ mg.l^{-1}$) و KIN ($۲ mg.l^{-1}$) و تولید ریشه محیط NAA ($۱ mg.l^{-1}$) به‌منظور تکثیر این گیاه در شرایط کشت درون شیشه پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Alkire, B. 1998. New crop factsheet: Capers: Center of New Crops and Plant Products. Purdue University USA.
2. Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z. 2007. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities. J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 43: 6. 481-492. (In Persian)
3. Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. Afr. J. Biotechnol. 8: 11. 2529-2534.
4. Ahmad, N., Fazal, H. and Zamir, R. 2001. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech. 13: 2. 174-177.
5. Asghari, G., Davazdah Emami, S., Hojjati, M., Valian, Z., Shakoori, A. and Asghari, M. 2013. Artemisinin production in plant, callus and cell suspension culture of *Artemisia aucheri* Boiss. J. Cell Tissue (JCT). 4: 3. 243-250.
6. Amini, F., Ganbarzade, Z. and Askary Mehrabadi, M. 2013. Optimization of callus production and plant regeneration in *Salsola arbuscula* pall. J. Cell Tissue (JCT). 4: 2. 129-137.
7. Akbas, F., Isikalan, C. and Namli, S. 2009. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Appl. Biochem Biotechnol. 158: 470-475.
8. Barbera, G. 1991. Programme de Recherche Agrimed Le Caprier (*Capparis* spp.). Comission des communaules Europe ennes. J. Serie Agric. 62p.
9. Bhaskaran, S. and Smith, R.H. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. J. Crop Sci. 30: 1329-1336.
10. Carra, A., Sajeve, M., Abbate, L., Siragusa, M., Sottile, F. and Carimi, F. 2012. *In vitro* Plant Regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from Floral Explants and Genetic Stability of Regenerants. J. Plant Cell Tissue Organ. Cul. 109: 373-381.
11. Chhaya, G. and Mihsra, S.H. 1999. Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic asid from *Capparis spinosa.* J. Ethnopharmacol. 66: 187-192.
12. Chang, C., Chang-Tesrn, C., Tsai, Y.C. and Wei-Chin, C. 1999. A Tissue culture protocol for propagation of a rare plant, Lilium speciosum Thunb. var. glorisoides Baker. J. Botanical Bulletin of Academia Sinica (BBAS). 41: 2. 139-142.
13. Dessouky, M., Taha, H. and El-Bahr, M. 2001. Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel*. L. J. Biotechnol. 4: 3. 23-30.
14. Eddouks, M., Lemhardi, A. and Michel, J.B. 2004. Caraway and caper: potential anthihyperglycaemic plants in diabetioc rats. J. Ethnopharmacol. 94: 143-148.
15. Fahmideh, L., Ranjbar, G.A., Alishah, O. and Babaeian Jelodar, N.A. 2015. Plant Regeneration from 6 Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genotypes Through Somatic Embryogenesis. J. Crop Breed. 7: 16. 40-48.
16. Fahmideh, L., Ranjbar, G.A., Alishah, O. and Babaeian Jelodar, N.A. 2010. Study of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Cotton. J. Crop Breed. 2: 67-80. (In Persian)
17. Fici, S. 2001. Intraspecific Variation and Evolutionary Trends in *Capparis Spinosa* L. Plant Syst. Evol. 223: 4. 123-141.
18. Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Hee, N.K. and Simon, J.E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropanes in sweet basil. J. Plant Physiol. 125: 539-555.
19. Han, Y., Jin, X., Wu, F. and Zhang, G. 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Zhejiang Univ. Sci. 12: 399-407.
20. Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. 2013. Plant callus: Mechanism of induction and repression. The Plant Cell. 25: 9. 3159-73.
21. Jamzad, Z. 2009. Thyme and savory Iran. Publishing Research Institute of Forests and Rangelands. 415p. (In Persian)
22. Kara, Z., Ecevit, F. and Karakaplan, S. 1996. Topark koruma elemani ve yeni bir Tanmsal urun olarak kapari (*Capparis spp*.). Tanm. Cevre ltiskileri Sempozyumu, Mersin. 108: 919-929.

23.Khanfar, M.A., Sabri, S.S., Zarga, M.H. and Zeller, K.P. 2003. The chemical constituents of *Capparis spinosa* of Jordanian origin. Nat. Prod. Res. 17: 9-14.
24.Khawar, K.M., Sarýhan, E., Sevimay, C. and Cocu, S. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. J. Period Biol. 107: 113-116.
25.Lowrence, G.H.M. 1951. *Taxonomy of vascular plants*. The Macmillan Company New York. 823p.
26.Matthaus, B. and Ozcan, M. 2002. Glucosinolate composition of young shoots and flower buds of capers (*Capparis species*) growing wild in Turkey. J. Agr Food Chem. 50: 7323-7325.
27.Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D., Hafez, I.A. and Kaleem, S. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. J. Bot. 44: 277-284. (In Persian)
28.Mohasneh, A.M. 2002. Screening of some indigeneus Qarari medicinal plants for antimicrobial activity. Phytother Res. 16: 8. 751-753.
29.Mohasneh, A.M., Abbas, J.A. and Eloglah, A.A. 1996. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in traditional medicine of Bahrain. Phytother Res. 10: 3. 251-253.
30.Movafeghi, A., Habibi, Gh. and Aliasgarpoor, M. 2009. Plant regeneration of *Capparis spinosa* L. using hypocotyl explants. J. Biol. 21: 2. 297-289. (In Persian)
31.Naik, P.K. and Nayak, S. 2005. Different modes of plant regeneration an factors affecting in vitro bulblet production in *Ornithogalum virens*. Sci. Asia. 31: 409-414.
32.Neyisci, T.A. 1987. Study on the slow burning plant species suitable for controlling forest. Turk J. Agric. For. 11: 3. 595-604.
33.Neibaur, I., Gallo, M. and Altpeter, F. 2008. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 44: 6. 480-486.
34.Orphanos, P.I. 1983. Germination of Caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. J. Hortic. Sci. 58: 267-270.
35.Rana, U. and Nuatiyal, AR. 1989. Coat seed dormancy in Acacia farnesia seeds. J. Seed Res. 17: 122-127.
36.Razavi, S.M., Ghasemian, A., Mousavi Samarin, S. and Arsh Neshin, H. 2016. Callus induction and analysis of active Constituents essential Oil (*Dracocephalum moldavica* L). J. Ecophytochemical Herbs Medicinal. 2: 88-94. (In Persian)
37.Saenouk, P. 2011. Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen. J. Bot. 43: 2415-2418.
38.Saghafi Khadem, F. 1995. Flora of Iran. (*Capparis spinosa* L.). Publications and Research Institute of Forests and Rangelands. Number 30. (In Persian)
39.Sozzi, G.O. and Chiesa, A. 1995. Improvement of Caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. J. Hortic. Sci. 62: 255-262.
40.Srivastava, S. and Srivastava, A.K. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. 27: 1. 29-43.
41.Stefaniak, B., Wozny, A. and Li, V. 2003. Plant micropropagation and callus induction of some annual *Salsola* species. J. Biol. Plant. 46: 2. 305-308.
42.Yazdi Samadi, B., Rezai, A. and Valizadeh, M. 2006. Statistical projects in agricultural research. Tehran University Press. Pp: 263-264. (In Persian)
43.Zohary, M. 1969. The species of Capparis in the Mediterranian and The Near Easter countries. J. *Bull Research Counc Israel*. 8: 49-64.