Plant Prod., 2023, 46(3), 441-454
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2023.43507.2096
Received: 15 April 2023
Accepted: 1 August 2023

Plant Productions

Research Article

Production of triploid plants of mooseer (*Allium hirtifolium*) through endosperm culture

Amin Jahanian[1], Alireza Motallebi-Azar [2*], Jaber Panahandeh [3], Mohammadreza Dadpour [4]

1. Ph.D Student in Breeding and Biotechnology of Horticultural Plant, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2,3,4. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Citation: Jahanian, A., Motallebi-Azar, A., Panahandeh, J., & Dadpour, M.R, (2023) Production of triploid plants of mooseer (Allium hirtifolium) through endosperm culture. Plant Productions, 46(3), 441-454.

Abstract

Introduction

The endosperm (3n) is the food source for the embryo, which has received two polar nuclei from the maternal parent 2n and one sperm cell from the paternal parent 1n. Traditionally, triploid plants are created by crossing between tetraploid plants and diploid plants. To carry out this method, it is necessary to create tetraploid lines, and it is possible to double the chromosomes of diploid species by using substances that inhibit the formation of the division spindle. The advantage of endosperm culture over the traditional method is that the production of triploid plants in endosperm culture is done in a single step, and the time required to generate a triploid plant is less than in the traditional method. Increasing the level of ploidy of the nucleus can affect the plant's physiological and biochemical processes as well as altering the rate of photosynthesis, respiration, activity of genes, enzymes, and expression of isoenzymes compared with diploid types. They will have a new phenotype and can surpass the range of traits of their diploid ancestors such as increasing biomass and changing the quality and concentration of plant active ingredients, increasing resistance to drought stress, and resistance to pests. Therefore, the chance of their selection will increase.

Materials and methods

Immature seeds were collected in late May, about 35 to 45 days after pollination, and mature seeds were harvested after fully ripening approximately in late July, and disinfection using a stereomicroscope with 60 times magnification under a laminar hood. The endosperm tissue was separated from the seed coat and embryo. In this study, mature and immature endosperm tissues of the mooseer plant were cultured onto hormonal compounds for callus induction in dark conditions for three months. In further experiments, the effects of sucrose were investigated at two levels of 30 and 50 gl^{-1} and the combination of BAP and NAA treatments on mooseer

* **Corresponding Author:** Alireza Motallebiazar
E-mail: motallebiazar@ gmail.com

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

production. The flow cytometry method and chromosome counting were used to determine the ploidy levels of regenerated plants.

Results

In this study, the treatment of 1 mg L^{-1} of NAA and 1 mg L^{-1} of BAP indicated the highest percentage of callus formation in both mature and immature tissues of mooseer endosperm. Seedlings produced in the treatment of 0.5 mg L^{-1} of NAA and 3 mg L^{-1} of BAP in culture medium with 50 g of sucrose caused the production of bulblet with greater length and diameter. The present study identified the cytogenetic properties, chromosome counts, and stomatal sizes of triploid plants regenerated from both mature and immature endosperm tissue of mooseer, using flow cytometry. A total of 12 triploid seedlings were obtained from mature tissue, while 8 seedlings were obtained from immature tissue.

Conclusion

Traditionally, triploids are produced by hybridization between induced superior tetraploids and diploids, but endosperm culture is a one-step protocol. In this study, according to the sexual and asexual propagation (propagation through daughter bulbs) of mooseer, the modification and production of the triploid plants in mooseer allow the propagation of this plant through daughter bulbs. Generally, triploid plants were successfully produced through the endosperm culture method.

Keywords: Bulblet, Chromosome, Flow cytometry, Mooseer, Ploidy, Seed.

تولیدات گیاهی

مقاله پژوهشی

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۲، ۴۶(۳)، ۴۵۴-۴۴۱
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2023.43507.2096
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰

تولید گیاهان تریپلوئید موسیر به روش کشت آندوسپرم

امین جهانیان [۱]، علیرضا مطلبی آذر [۲*]، جابر پناهنده [۳]، محمد رضا دادپور [۴]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲،۳، ۴-دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

آندوسپرم منبع تغذیه جنین می باشد که به صورت 3n می‌باشد که دو هسته قطبی از والد مادری(2n) یک یاخته اسپرم از والد پدری (1n) دریافت کرده است. به طور سنتی گیاهان تریپلوئید از تلاقی گیاهان تتراپلوئید با گیاهان دیپلوئید ایجاد می‌شوند. برای انجام این روش ایجاد لاین‌های تتراپلوئید ضروری است و دو برابر کردن کروموزوم‌های گونه‌های دیپلوئید با استفاده از مواد بازدارنده تشکیل دوک تقسیم ممکن می‌شود. مزیت کشت آندوسپرم نسبت به روش سنتی تلاقی در این است که فرآیند تولید گیاهان تریپلوئید در کشت آندوسپرم یک پروتکل یک مرحله ای می باشد که زمان مورد نیاز برای تولید گیاه تریپلوئید کمتر از روش سنتی می باشد. این آزمایش در سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. این تحقیق بر اساس طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت که در هر تکرار تعداد ۸ عدد آندوسپرم کشت شد. در این مطالعه از بافت‌های بالغ و نابالغ آندوسپرم گیاه موسیر در ترکیبات هورمونی برای پینه‌زایی به مدت سه ماه در شرایط تاریکی کشت گردید. در آزمایش بعدی، تاثیر میزان ساکارز در دو سطح ۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر و ترکیب تیمارهای هورمونی BAP و NAA بر تولید پیازچه مورد بررسی قرار گرفت. از روش شمارش کروموزومی و فلوسایتومتری برای تعیین و تایید گیاهچه‌های باززایی شده با سطح پلوئیدی تریپلوئید استفاده گردید. در این پژوهش تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد پینه زایی در هر دو بافت بالغ و نابالغ آندوسپرم موسیر بدست آمد. گیاهچه‌های تولیدی در تیمار نیم میلی‌گرم در لیتر NAA و سه میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت دارای ۵۰ گرم ساکارز باعث تولید پیازچه‌های با طول و قطر بیشتر شد. بررسی‌های سیتوژنتیک شمارش کروموزوم، فلوسایتومتری و اندازه روزنه گیاهان تریپلوئید باززایی شده از بافت آندوسپرم را شناسایی نمودند. در پایان آزمایش تعداد ۱۲ گیاهچه تریپلوئید از بافت آندوسپرم بالغ و تعداد ۸ گیاهچه از بافت نابالغ بدست آمد. نتایج نهایی این آزمایش استفاده از ترکیب هورمونی BAP و NAA را برای پینه‌زایی بهتر در گیاه موسیر پیشنهاد می‌کند و برای تولید گیاهان با صفات رشدی بهتر و تولید پیازچه‌های با کیفیت‌تر از اکسین NAA در غلظت پایین و سایتوکینین BAP در غلظت بالاتر همراه با درصد بالاتر ساکارز توصیه می‌شود. در این آزمایش با توجه به افزایش جنسی و غیر جنسی (پیاز دختری) موسیر، بهنژادی و تولید گیاه تریپلوئید در موسیر، افزایش این گیاه را از طریق پیاز دختری امکان‌پذیر می‌کند. در این تحقیق به طور موفقیت آمیزی گیاهان تریپلوئید با روش کشت آندوسپرم تولید شدند.

کلمات کلیدی: بذر، پلوئیدی، پیازچه، فلوسایتومتری، کروموزوم، موسیر

---

* **نویسنده مسئول:** علیرضا مطلبی آذر
رایانامه: motallebiazar@ gmail.com

مقدمه

موسیر با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss طبق آخرین طبقه‌بندی گیاه‌شناسی در تیره Amaryllidaceae قرار گرفته است که در رده‌بندی قبلی در تیره Alliaceae طبقه‌بندی شده بود (Friesen et al., 2021). از لحاظ تنوع گونه‌ای، جنس *Allium* از تنوع زیادی برخوردار بوده به طوری که بیش از ۹۰۰ گونه اهلی و وحشی از این جنس در نیمکره شمالی زمین گسترش دارد (Friesen et al., 2021). موسیر ایرانی با نام انگلیسی Persian Shallot یا mooseer یکی از گونه‌های بومی ایران از جنس *Allium* است که در مناطق سردسیر و نسبتاً مرتفع کشور رویش دارد. موسیر دارای پیاز نسبتا کروی به قطر ۵–۲/۵ سانتی‌متر با پوشش خارجی خاکستری از رشته‌ها یا الیاف جدا از هم است. ساقه یا تیرک گل موسیر بلند، ۱۲۰–۸۰ سانتی‌متر ارتفاع و بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر قطر دارد. ساقه ابتدا توپر است و در انتهای آن گل‌آذین کروی گیاه قرار دارد و در فصلی که گیاه خشک و بذرها پراکنده می‌گردند به‌صورت یک لوله زرد تو خالی باقی می‌ماند. زمان گل‌دهی موسیر، اردیبهشت ماه است (Farhadi et al., 2022).

کشت بافت گیاهی امکان افزایش انبوه بسیاری از گیاهان دارویی مهم را فراهم کرده است. گیاهان تولید شده از طریق کشت درون شیشه‌ای، عاری از بیماری و از نظر ژنتیکی و کیفی یکنواخت می‌باشند (George et al., 2008). گیاهان موسیر تکثیر شده یا استفاده از روش کشت شیشه‌ای معمولا از قدرت رشد بالایی نسبت به گیاه موسیری که به روش‌های سنتی تکثیر می‌شود، برخوردار است. همچنین به دلیل یکنواختی گیاهان بدست آمده از کشت بافت و نیز سازگاری بهتر آن ها، عملکرد و میزان بهره‌وری افزایش می‌یابد (Hajiheidar et al., 2017).

به طور سنتی گیاهان تریپلوئید از تلاقی گیاهان تتراپلوئید با گیاهان دیپلوئید ایجاد می‌شوند (Bahadur et al., 2015). برای انجام این روش ایجاد لاین‌های تتراپلوئید ضروری است و دو برابر کردن کروموزوم‌های گونه‌های دیپلوئید با استفاده از مواد بازدارنده تشکیل دوک تقسیم ممکن می‌شود. یکی از ویژگی‌های گیاهان تریپلوئید عقیم بودن است که این یک صفت نامطلوب در گیاهانی که به صورت تجاری با بذر تکثیر می‌شوند می‌باشد. با این وجود، گیاهان تریپلوئید در درختان، درختچه‌ها و گیاهانی که تکثیر رویشی دارند برای بیوماس آن‌ها مهم می‌باشد چون که رشد رویشی در این گیاهان زیاد می‌باشد و دلیل این امر این است که از مقدار فراوان انرژی فتوسنتزی که برای تولید میوه و بذر مصرف می‌شود جلوگیری به عمل می‌آید و انرژی فتوسنتزی فقط صرف رشد رویشی می‌شود (Wang et al., 2016). به‌طور کلی افزایش در سطح پلوئیدی هسته می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه اثر گذاشته و طی آن میزان فتوسنتز، تنفس، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و بیان ایزوآنزیم‌ها را تغییر دهد، بنابراین گیاهان پلی پلوئید نسبت به انواع دیپلوئید اغلب فنوتیپ جدیدی را نشان خواهند داد و ممکن است از محدوده صفات اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیبات فعال گیاهی، افزایش مقاومت به تنش خشکی و مقاومت در برابر آفات فراتر رفته و در نتیجه این عمل، شانس انتخاب آن‌ها افزایش یابد (Wang et al., 2016).

آندوسپرم منبع تغذیه جنین می باشد که به صورت 3n می‌باشد که دو هسته قطبی از والد مادری 2n یک یاخته اسپرم از والد پدری 1n دریافت کرده است (Wang et al., 2016). اولین تلاش برای رشد آندوسپرم نابالغ در سال ۱۹۳۳ در گیاه ذرت بر روی محیط کشتی که شامل عصاره سیب زمینی و عصاره ذرت جوان بود انجام شد و پرآوری کوچکی از یاخته‌ها در نزدیکی جنین مشاهده شد (Thomas and Chaturvedi, 2008). باززایی از بافت آندوسپرم اغلب به عنوان چالش تکنیکی می‌باشد. از مهم‌ترین عوامل موثر در کشت آندوسپرم می توان به نوع ژنوتیپ، زمان

نمونه گیری(آندوسپرم بالغ و نابالغ) و محیط کشت اشاره کرد(Wang et al., 2016). در تولید گیاهان تریپلوئید توت (*Morus alba*) با استفاده از بافت نابالغ آندوسپرم (۱۷-۲۰ روز پس از گرده‌افشانی) بیشترین میزان کالوس‌زایی (۵۸ درصد) از ترکیب هورمونی ۵ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار NAA به دست آمد (Thomas et al., 2000). در مطالعه‌ای روی کشت آندوسپرم بالغ و نابالغ گیاه شمشاد سرخ (Burning bush) حدود ۵۰ درصد از نمونه‌های آندوسپرم نابالغ و ۱۴ درصد از نمونه‌های آندوسپرم بالغ پس از ۸ هفته تاریکی و ۴ هفته روشنایی بر روی محیط کشت MS همراه با ۲/۲ میکرو مولار BAP و ۲/۷ میکرو مولار NAA، پینه‌های سبز رنگ و فشرده تشکیل شدند (Thammina et al., 2011). در یک تحقیق نوآورانه با استفاده از کشت آندوسپرم و استفاده از تیمار کلشی‌سین در پینه‌های گیاه زینتی همانتوس (*Haemanthus albiflos*) گیاهان تریپلوئید و هگزاپلوئید تولید شد (Nakano et al., 2021). افزایش غیر جنسی گیاه موسیر سبب شده است که تنوع ژنتیکی در سطح پلوئیدی در این گیاه وجود نداشته باشد و در صورت وجود فقط در طبیعت و از طریق جهش‌های طبیعی تولید شده است. متاسفانه تحقیقات در مورد بهنژادی این گیاه تنها به چند مورد بررسی تنوع مرفولوژیکی و ژنتیکی توده‌های بومی موجود محدود بوده است و اخیرا برنامه به‌نژادی این گیاه در گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در حال اجرا می‌باشد. علاوه بر افزایش جنسی و تولید بذر در گیاه موسیر، امکان افزایش غیر جنسی سبب می‌شود که در صورت تولید گیاه تریپلوئید که فاقد قدرت تولید بذر هستند با استفاده از این مزیت گیاهان تریپلویید تولید شده را حفظ نمود.

با توجه به محدود بودن برنامه‌های اصلاحی برای گیاه موسیر که از گیاهان بومی کشورمان است این تحقیق با هدف ایجاد سطح پلوئیدی جدید (تریپلوئید) با استفاده از روش‌های نوین کشت بافت (کشت آندوسپرم) در کمترین زمان ممکن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور نابالغ و بالغ موسیر، از چتر موسیرهای کاشته شده در بخش سبزیکاری مزرعه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشکده کشاورزی واقع در بلوار شهدای غواص، (38° 1′ 54.77″ N, 46° 23′ 40.43″ E)، به ترتیب اواخر اردیبهشت ماه (حدود ۴۰ روز پس از گرده‌افشانی (DAP, day after pollination و اوایل تیر ماه برداشت شدند. مواد گیاهی به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز منتقل شدند و مراحل ضد عفونی بذور انجام گرفت. ابتدا بذرها در زیر آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن چند قطره Tween 20 به داخل آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. پس از این مرحله بذرها با آب مقطر آبشویی شدند و به داخل هود لامینار منتقل شدند. در داخل هود لامینار بذور به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال (همراه با تکان دادن ملایم) قرار داده شد. سپس بذور با آب مقطر استریل آبشویی و با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن سه مرتبه آبشویی با آب مقطر استریل، مراحل ضد عفونی تکمیل گردید. پوشش بذر و جنین از بافت آندوسپرم با استفاده از استریومیکروسکوپ (Nikon, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی ۶۰ جدا گردید. هشت ریز نمونه آندوسپرم به داخل پتری دیش‌های حاوی محیط کشت MS دارای ترکیبات هورمونی انتقال داده شد.

محیط کشت پینه‌زایی و باززایی

برای تولید پینه از بافت آندوسپرم موسیر از ترکیب غلظت‌های مختلف 2-4,D (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از اکسین‌ها و BAP (

۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از سایتوکینین‌ها استفاده گردید. کشت‌ها به‌مدت سه ماه در شرایط تاریکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۳ ماه از کشت آندوسپرم و تولید پینه، پینه ها به قطعه های کوچکتر تقسیم شدند و در همان تیمارهای پیشین (تیمارهای پینه‌زایی) برای مدت ۴۰ روز در شرایط روشنایی ۱۶ و تاریکی ۸ ساعت کشت شدند و سپس برای مدت ۳۰ روز به محیط کشت MS فاقد هورمون‌های گیاهی منتقل شدند و پس از آن صفات شاخساره و پیازچه اولیه شمارش شدند.

تولید پیازچه

پس از تولید شاخساره کافی، شاخساره ها به محیط کشت MS حاوی BAP (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ میلی گرم در لیتر) در دو غلظت ۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز جهت تولید پیازچه و بررسی طول و قطر پیازچه منتقل شدند. پس از تولید پیازچه، گیاهچه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی نصف غلظت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۴۵ روز منتقل شدند.

مطالعه سیتوژنتیکی (شمارش کروموزوم)

در این آزمایش با توجه به تحقیقات پیشین در زمینه سیتولوژی موسیر از پیش تیمار آلفابرومونفتالین به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق استفاده شد. پس از این مرحله برای تثبیت نمونه‌ها از محلول کارنوی (Carnoy) شامل یک قسمت اسید استیک گلاسیال و سه قسمت اتانول (۹۵ تا ۱۰۰ درصد) استفاده گردید. ریشه‌ها را پس از خارج کردن از محلول تثبیت و شستشو با آب مقطر، در اسید کلریدریک یک نرمال در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه قرار داده شد تا عمل هیدرولیز در ریشه‌ها انجام شود. ریشه‌های هیدرولیز شده به طور کامل شستشو داده شد و سپس در محلول رنگی استو اورسئین به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. برای تهیه نمونه میکروسکوپی ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده هر کدام جداگانه روی لام گذاشته قسمت انتهایی نوک ریشه منطقه مریستمی را با استفاده از تیغ مخصوص برش داده شد و سپس یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد روی نمونه ریخته و لامل روی آن گذاشته شد و سپس با قرار دادن لام و لامل بین کاغذ صافی روی لامل چند ضربه زده شد تا ضمن خروج رنگ های اضافی، یاخته‌های مریستمی در یک سطح پخش گردند. بدین ترتیب نمونه برای مشاهده در زیر میکروسکوپ Nikon DXM 1200 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) آماده شد.

فلوسایتومتری

برای انجام آزمایش فلوسایتومتری از روش (Doležel et al., 2007) استفاده گردید. حدود ۲۰ تا ۳۰ میلی‌گرم برگ تازه گیاهان باززایی شده و گیاه استاندارد پیاز = *Allium cepa* L. Alice (2C DNA 34.89 pg) (تهیه شده از موسسه گیاه‌شناسی و آزمایشگاه فلوسایتومتری اوسلوموک کشور جمهوری چک Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic) را در یک میلی‌لیتر بافر هسته به مدت حدود ۳۰ ثانیه در داخل پتری دیش خرد نموده و بلافاصله از فیلتر نایلون مش با عدد مش ۵۰ میکرومتر عبور داده شد تا مواد اضافی حذف گردد و پس از اضافه نمودن رنگ پروپیدیوم ید میزان ۱۰۰ میکرولیتر و اضافه نمودن آنزیم RNase به مقدار ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داخل سوسپانسیون هسته و نمونه‌ها آماده قرار دادن در دستگاه فلوسایتومتری شد. تمامی مراحل آماده نمودن نمونه بر روی یخ خشک انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح کاملا تصادفی در سه تکرار که در هر تکرار تعداد ۸ عدد آندوسپرم کشت شد. تجزیه واریانس داده‌ها و نیز مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. نمودارهای

مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel رسم شد.

نتایج و بحث

درصد پینه‌زایی

روش متداول برای تولید گیاهان به روش کشت آندوسپرم ایجاد پینه از این بافت می‌باشد که ترکیب هورمونی متشکل از یک اکسین و یک سایتوکینین برای این منظور استفاده می‌شود که گونه گیاهی عامل تعیین کننده در انتخاب نوع هورمون و غلظت می‌باشد (Phillips and Garda, 2019). بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات ساده نوع بافت آندوسپرم و تنظیم کننده رشد گیاهی و اثرات متقابل آن‌ها بر درصد پینه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی نشان داد که بافت آندوسپرم بالغ نسبت به بافت نابالغ پینه‌زایی بیشتری داشتند و در بین تیمارهای هورمونی برای هر دو بافت بالغ و نابالغ، ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین ترکیب برای این منظور بود (جدول ۲). بیشترین درصد پینه‌زایی در بافت بالغ آندوسپرم ۸۷/۶۲ درصد و در بافت نابالغ ۶۲/۴۹ بدست آمد. در تیمارهای نیم میلی‌گرم در لیتر BAP و یک و نیم میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و همچنین نیم میلی‌گرم در لیتر Kin و یک و نیم میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در بافت نابالغ آندوسپرم پینه‌زایی مشاهده نشد، ولی در تیمارهای هورمونی بافت بالغ در تمامی تیمارها پینه‌زایی وجود داشت. در هر دو نوع بافت استفاده از هورمون اکسین 2,4-D نسبت به هورمون NAA برای پینه‌زایی مناسب نبود که این یافته در تضاد با نتایج آزمایش فرهادی و همکاران (۲۰۱۷) بود که عنوان کردند استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد پینه‌زایی (۶۹٪) در ریز نمونه صفحه پایگاهی گیاه موسیر را دارا بود. در تایید یافته‌های این تحقیق در ارتباط با تاثیر تنظیم کننده‌های رشد در پینه‌زایی موسیر، استفاده از ریز نمونه صفحه پایگاهی (طبق پیاز) در تیمار NAA به همراه BAP، در محیط کشت‌های حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر NAA میزان تولید پینه بالا بود و باززایی از سطح پینه ۵ تا ۶ هفته پس از کشت مشاهده گردید (Ghahremani et al., 2012).

تعداد شاخساره و پیازچه اولیه

تجزیه واریانس تعداد شاخساره و پیازچه اولیه نشان داد که اثرات ساده بافت آندوسپرم و تنظیم کننده رشد و نیز اثر متقابل این دو فاکتور در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین تعداد شاخساره و پیازچه اولیه نیز تقریبا مشابه نتایج تیمارهای پینه‌زایی بود و بیشترین تعداد شاخساره اولیه در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP در هر دو بافت بالغ و نابالغ به ترتیب ۷۶/۲۵ و ۴۳/۷۵ بود (جدول ۲). برای تعداد پیازچه اولیه تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP در هر دو بافت بالغ و نابالغ به ترتیب با ۱۵/۲۵ و ۱۸/۷۵ بیشترین تعداد پیازچه اولیه را تولید کردند و بین بافت بالغ و نابالغ تفاوت معنی‌داری از نظر این صفت مشاهد نشد (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین تولید پیازچه اولیه نشان داد که به غیر از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP در هر دو نوع بافت آندوسپرم که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند، بقیه تیمارها با همدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲).

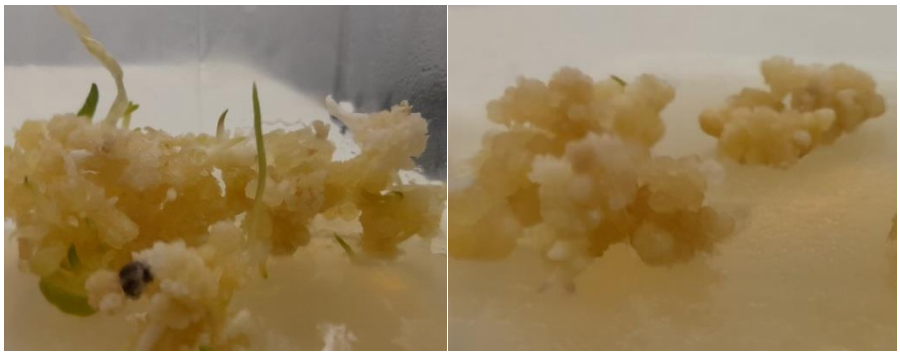

Figure 1. Callus production from mature endosperm tissue after about 3 months in dark conditions (left), transfer callus to light condition in MS medium without plant growth regulator PGR (right)

Figure 2. seperation bulblet onto 3 mgl^{-1} BAP and 1 m gl^{-1} NAA in 50 gl^{-1} sugar

نتایج آزمایشات Farhadi et al (2022) نشان داد که کاربرد ترکیبی NAA و BAP در محیط کشت موجب تسریع در ظهور پیازچه‌های موسیر می گردد. کاربرد تنظیم کننده‌های رشد برای تشکیل سریع پیازچه از ریز نمونه‌های گونه‌های مختلف جنس *Allium* گزارش شده است (Xu et al., 2008). در کشت‌های درون شیشه‌ای گونه‌های *Allium*، اکسین‌ها معمولاً به منظور تحریک تقسیم یاختهی و سیتوکینین‌ها برای تقسیم یاختهی و تمایزیابی پیازچه‌ها از بافت های گیاهی و پینه نقش دارند (Roksana et al., 2002). پیازچه تولید شده در شرایط کشت بافت به غلظت‌های مختلف NAA و BAP بستگی دارد (Khalid et al., 2001) و همچنین استفاده از این ترکیبات برای رشد پیازچه‌زایی سریع ریز نمونه‌های *A. cepa* var. aggregatum گزارش شده است (Hailekidan et al., 2013). استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۴ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین تولید ۱۵/۴ تا ۱۷/۲ پیازچه در گیاه *A. chinenesis* گزارش شده است (Xu et al., 2008). در بیشترمطالعات درون شیشه‌ای گیاهان پیازدار گونه‌های *Allium* تفاوت در غلظت‌های مورد استفاده در ترکیب NAA و BAP مربوط به نوع ریز نمونه و گونه مورد مطالعه بوده است (Gantait et al., 2010).

قطر و طول پیازچه

پس از پینه‌زایی موفق و تولید شاخساره و پیازچه‌های کوچک، برای افزایش اندازه در پیازچه‌ها، تیمارهای هورمونی همراه با اثر غلظت ساکارز برای بررسی صفات رشدی پیازچه شامل قطر و طول پیازچه مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌های با شاخساره و پیازچه اولیه برای مدت ۴۰ روز به محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند تا پیازچه‌های کوچک به اندازه یکنواخت برسند. پس از گذشت ۲ ماه از بازکشت پیازچه‌ها، اثر تیمارهای مختلف ارزیابی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای مورد بررسی بر شاخص‌های رشد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به غلظت ۳۰ گرم در لیتر تاثیرگذاری بیشتری در قطر پیازچه داشت به طوری که به غیر از تیمار نیم میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه نیم میلی‌گرم در لیتر BAP در بقیه تیمارها بین این دو سطح ساکارز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در بین تیمارهای هورمونی با افزایش غلظت سیتوکینین BAP از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تا ۳ میلی‌گرم در لیتر قطر پیازچه در ساکارز ۵۰ و ۳۰ گرم در لیتر به ترتیب از ۸/۳۲ و ۶/۵۲ میلی‌متر به ۲۲/۴۷ و ۱۷/۴۷ میلی‌متر رسید (شکل ۳).

Table 1. Analysis of variance the effect of plant growth regulators on callus percent and the number of primary shoots and primary bulbs in two types of endosperm tissue.

S.O.V	df	Mean of squares		
		Percentage of callusing	Number of primary shoots	Number of primary bulblet
Endosperm tissue	1	5633.628**	5130.141**	64.00**
PGR	7	4091.581**	2561.337**	208.563**
Endosperm tissue × PGR	7	685.016**	413.819**	20.00**
Error	48	300.812	185.734	9.240
CV (%)		13.12	9.37	14.28

Respectively, ns, *, ** indicate non-significance and significance at the probability level of 5% and 1%

Table 2. Effect of different PGR combination on callus formation and number of primary shoot and bulblet derived from mature and immature endosperm tissue

Type of tissue	PGR treatment	Callus percent	Number of primary shoots	Number of primary bulblet
Immature endosperm	1.5 mgl^{-1} 2,4- D+ 0.5 mgl^{-1} BAP	0.00 c	0.00 f	0.00d
	2 mgl^{-1} 2,4- D+ 1 mgl^{-1} BAP	8.33bc	4.75ef	1.00cd
	1.5 mgl^{-1} 2,4- D+ 0.5 mgl^{-1} KIN	0.00 c	0.00 f	0.00d
	2 mgl^{-1} 2,4- D+ 1 mgl^{-1} KIN	16.66bc	10.00def	2.50bcd
	0.5 mgl^{-1} NAA+ 0.5 mgl^{-1} BAP	20.83bc	14.00def	4.50bcd
	1 mgl^{-1} NAA+ 1 mgl^{-1} BAP	62.49 a	43.75bc	18.75a
	0.5 mgl^{-1} NAA+ 0.5 mgl^{-1} KIN	62.49 a	12.50def	3.00cd
	1 mgl^{-1} NAA+ 1 mgl^{-1} KIN	16.66bc	9.50def	3.00cd
Mature endosperm	1.5 mgl^{-1} 2,4- D+ 0.5 mgl^{-1} BAP	8.33bc	4.25ef	1.25cd
	2 mgl^{-1} 2,4- D+ 1 mgl^{-1} BAP	16.66bc	14.25def	3.25cd
	1.5 mgl^{-1} 2,4- D+ 0.5 mgl^{-1} KIN	29.16bc	26.00cde	5.75bc
	2 mg/l 2,4- D+ 1 mg/l KIN	37.49 b	31.25bcd	6.00bc
	0.5 mgl^{-1} NAA+ 0.5 mgl^{-1} BAP	33.33 b	29.00bcd	5.75bc
	1 mgl^{-1} NAA+ 1 mgl^{-1} BAP	87.62 a	76.25a	15.25a
	0.5 mgl^{-1} NAA+ 0.5 mgl^{-1} KIN	12.49bc	8.75def	2.50cd
	1 mgl^{-1} NAA+ 1 mgl^{-1} KIN	70.83 a	48.00b	9.00b

Mean followed by similar letters in each column, are not significantly different at the 5% level of probability.

Table 3. Analysis of the variance bulblet diameter and length under the PGR

		Mean of squares	
S.O.V	df	Bulblet diameter	Bulblet length
PGR	7	134.469**	166.962**
Error	24	1.884	4.375
CV (%)		10.9	7.87

Respectively, ns, *, ** indicate non-significance and significance at the probability level of 5% and 1%

در آزمایش Ghahremani Majd et al (2012) نتایج مشابهی از تاثیر تیمار هورمونی و غلظت ساکارز (از پیازچه‌های به دست آمده از کالوس‌های تولید شده از ریز نمونه صفحه پایگاهی) بدست آمد به طوری که در این تحقیق نیز استفاده از تیمار نیم میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه سه میلی‌گرم در لیتر BAP سبب تولید درشت‌ترین پیازچه شد. همچنین با افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر اندازه پیازچه افزایش پیدا کرد ولی در غلظت ۹۰ گرم در لیتر اندازه پیازچه کاهش یافت. در تحقیقات گوناگون اثر مثبت غلظت بالای ساکارز در تولید پیازچه گیاهان جنس *Allium* گزارش شده است (Saos, et al., 2002). نتایج تحقیق مشابه برای بهینه‌سازی باززایی پیازچه موسیر در محیط کشت MS همراه با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه (۱۲/۶۶) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۱میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (Hajiheidar et al., 2017). در طول پیازچه نیز مانند قطر پیازچه در دو غلظت ساکارز و بین تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۴). بزرگ‌ترین پیازچه از نظر طول مربوط به تیمار نیم میلی‌گرم در لیتر NAA و سه میلی‌گرم در لیتر BAP با ۳۹/۵۷ میلی‌متر بود. NAA به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم یاختهی دارد، بنابراین حضور آن برای باززایی لازم می باشد. BAP به عنوان یک سایتوکنین در تحریک رشد و نمو و تقسم یاختهی نقش دارد و اضافه کردن سایتوکنین به محیط کشت سبب باززایی گیاهان می‌شود (Bhatia, 2015; Davies, 2010). در بیشتر پژوهش‌های پیشین نیز مشاهده می‌شود که در تولید پیازچه در سایر گونه‌های جنس *Allium* غلظت های بیشتری برای سایتوکنین نسبت به اکسین در نظر گرفته شده است (Yan et al., 2009). به نظر می‌رسد که یاخته‌های بافت پیازچه موسیر به لحاظ افزایش پتانسیل اسمزی محیط کشت در غلظت ۴۵ گرم توانسته ارتباط جذبی مواد غذایی یاخته‌ها را با محیط کشت به طور نرمال بر قرار کنند و بنابراین باعث افزایش یاخته ای آنها شده است.

بررسی‌های سیتوژنتیکی

شمارش کروموزوم

انجام مطالعات سیتوژنتیک درمورد گیاهان اهمیت ژنتیکی یک گیاه، تشخیص وضعیت و بررسی تعداد، شکل و رفتار کروموزوم‌های آن است (Cherazi et al., 2012). اهمیت این مطالعات در این است که کروموزوم‌ها دارای ژن‌ها هستند و اطلاعات ژنتیکی مربوط به فنوتیپ گیاه را دارند.نتایج شمارش کروموزوم نشان داد گیاهچه‌های تریپلوئید با تعداد کروموزوم ۲۴ از باززایی پینه‌های بافت بالغ و نابالغ آندوسپرم تولید شدند (شکل b ۵) . در این مطالعه تعداد ۱۲ گیاهچه تریپلوئید از بافت آندوسپرم بالغ و تعداد ۸ گیاهچه از بافت نابالغ بدست آمد. گیاهان تریپلوئید با استفاده از روش کشت آندوسپرم با استفاده از شمارش کروموزمی در گیاهان مختلفی از جمله پاپایا (Sun et al., 2011)، کیوی فروت (Góralski et al., 2005) با موفقیت تولید شده است.

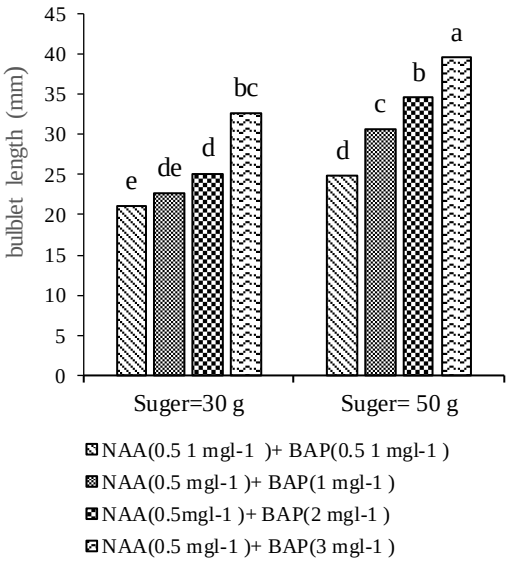

Figure 4. Effect of PGR treatments in two sugar level on bulb diameter of regenerated mooseer plants

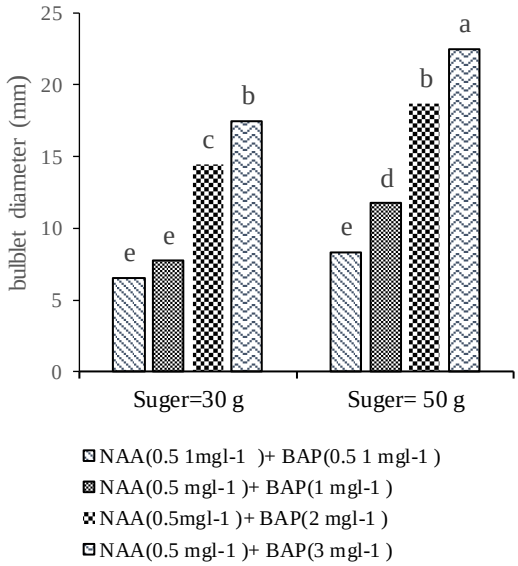

Figure 3. Effect of PGR treatments in two sugar level on bulb diameter of regenerated mooseer plants

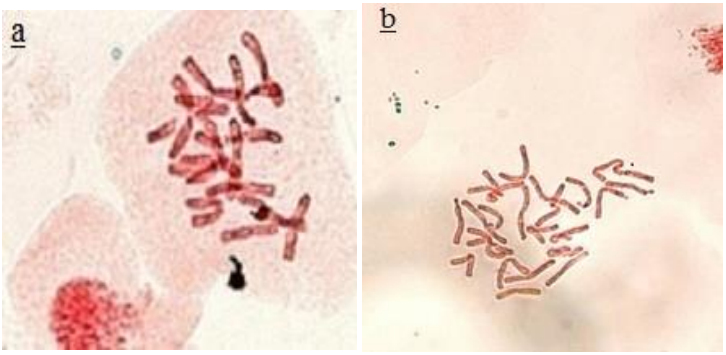

Figure 5. Chromosome number of plants regenerated from endosperm culture. a) Diploid plants (2n=2x=16). b) Triploid plants (3n=3x=24)

فلوسایتومتری

با توجه به آسان بودن روش کار فلوسایتومتری برای تعیین و تایید گیاهان با پلوئیدی جدید، در بیشتر تحقیقات بهنژادی گیاهان افزون بر شمارش کروموزومی از نتایج هیستوگرام فلوسایتومتری برای شناسایی گیاهان با سطح پلوئیدی جدید استفاده می‌شود (Asadi et al., 2019). بر اساس نتایج هیستوگرام بدست آمده از فلوسایتومتری (شکل ۶a)، گیاه استاندارد *Allium cepa* cv. Alice با اندازه ژنوم (2C DNA) ۳۴/۸۹ پیکوگرم بر روی کانال ۲۰۰ قرار دارند و گیاهان دیپلوئید موسیر که بر اساس نتایج (Baranyi and Greilhuber, 1999) که اندازه ژنوم 2C (DNA) موسیر را ۴۲/۹۴ تخمین زده بودند روی کانال ۲۴۰ قرار گرفته است. در هیستوگرام b شکل ۶، گیاه استاندارد بر روی کانال ۲۰۰ قرار دارد و گیاه تریپلوئید روی کانال ۳۶۰ قرار دارد. نسبت ۱/۵ به ۱ گیاهان تریپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید در بررسی فلوسایتومتری مشاهده شد که شمارش کروموزومی گیاهان تریپلویید بدست آمده را بیشتر تایید نمود.

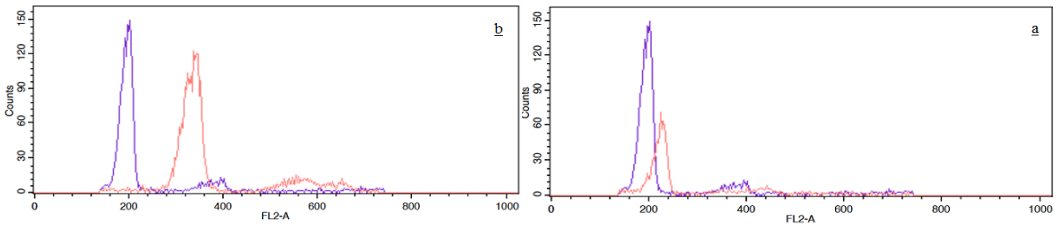

Figure 6. Flow cytometry histogram in plants regenerated from mooseer endosperm tissue a) standard plant (*Allium cepa* cv. Alice) (Blue curve) and mooseer diploid plant (Red curve), b) standard plant (Blue curve) and mooseer triploid plant (Red curve).

نتیجه‌گیری

مزیت کشت آندوسپرم نسبت به روش سنتی تلاقی در این است که فرآیند تولید گیاهان تریپلوئید در کشت آندوسپرم یک پروتکل یک مرحله ای می باشد که زمان مورد نیاز برای تولید گیاه تریپلوئید کمتر از روش سنتی می باشد. تریپلوئید بودن در برخی از گیاهان از لحاظ کمی و کیفی دارای خصوصیات بهتری نسبت به سایر سطح پلوئیدی می باشد. در این آزمایش بهترین ترکیب هورمونی برای پینه‌زایی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و BAP و برای رشد بهتر ساخساره و پیازچه ترکیب BAP در سطح بالاتر ار دو میلی‌گرم در لیتر و NAA در سطح نیم میلی‌گرم در لیتر در غلظت بالاتر ساکارز (۵۰ گرم در لیتر) برای تولید گیاهچه‌های موسیر مناسب بودند. با توجه به عدم تولید بذر در گیاهان تریپلوئید امکان افزایش و حفظ آن ها فقط برای گیاهانی امکان پذیر است که با روش رویشی (سوخ دختری) افزایش یابند. بهنژادی موسیر و تولید گیاه تریپلوئید در موسیر به دلیل افزایش رویشی امکان‌پذیر می باشد. از این رو، در پژوهش حاضر به طور موفقیت آمیزی گیاهان تریپلوئید از طریق روش کشت آندوسپرم تولید شدند.

سپاس گزاری

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ((۹۹۰۲۷۰۶۰)) انجام شده است.

References

Asadi, A., Zebarjadi, A., & Abdollahi, M. R. (2019). Production of Cucumber Doubled Haploid Plants via Ovule Culture. *Plant Productions*, *42*(1), 77–88. https://doi.org/10.22055/ [in persian]

Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (2015). Plant biology and biotechnology: Volume II: Plant genomics and biotechnology. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*, *II*, 1–768. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5

Baranyi, M., & Greilhuber, J. (1999). Genome size in *Allium*: In quest of reproducible data. *Annals of Botany*, *83*(6), 687–695. https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0871

Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00002-9

Cherazi, M., Naderi, R., Shah nejat boushehri, A., Hasani, M., & Zarifi, A. (2012). Evaluation of Karyotype and Ploidy Levels in Some Endemic and Exotic Daffodils (*Narcissus* sp.) Genotypes. *Plant Productions*, *35*(2), 13–27. https://plantproduction.scu.ac.ir/article_12162.html [in persian]

Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In *Plant hormones* (pp. 1–15). Springer.

Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, *2*(9), 2233–2244. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310

Farhadi, N., Panahandeh, J., Motallebi-Azar, A., & Mokhtarzadeh, S. (2022). Production of autotetraploid plants by in vitro chromosome engineering in *Allium hirtifolium*. *Horticultural Plant Journal*. https://doi.org/10.1016/J.HPJ.2022.12.013

Friesen, N., Smirnov, S. V, Leweke, M., Seregin, A. P., & Fritsch, R. M. (2021). Taxonomy and phylogenetics of *Allium* section Decipientia (Amaryllidaceae): morphological characters do not reflect the evolutionary history revealed by molecular markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *197*(2), 190–228.

Gantait, S., Mandal, N., & Das, P. K. (2010). An overview on in vitro culture of genus *Allium*. *American Journal of Plant Physiology*, *5*(6), 325–337.

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, *1*, 501.

Ghahremani Majd, H., Dashti, F., Piri, K., & Yari, M.-B. (2012). In vitro Belblet Formation of Mooseer (*Allium hirtifolium*). *PPT*, *1*(2), 65–73. https://ppt.basu.ac.ir/article_107.html

Góralski, G., Popielarska-Konieczna, M., Ślesak, H., Siwińska, D., & Batycka, M. (2005). Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, *47*(2).

Hailekidan, B., Andargie, M., & Assefa, K. (2013). In vitro plantlet regeneration from the bulbs of shallot (*Allium cepa* Var. group Aggregatum). *Research in Plant Sciences*, *1*(2), 45–52.

Hajiheidar, A., Tohidfar, M., Miri, S. M., Zarekarizi, A. R., Ghadermazi, S., & Samiee, K. (2017). Optimizing the regeneration and rooting of Iranian native shallot (*Allium stipitatum*) via in vitro. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *33*(2), 244–255. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.106967.1814

Kästner, U., Klahr, A., Keller, E. R. J., & Kahane, R. (2001). Formation of onion bulblets in vitro and viability during medium-term storage. *Plant Cell Reports*, *20*(2), 137–142.

Keller, E. R. J. (1993). Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of in vitro bulblets in onion and leek. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *40*(2), 113–120.

Khalid, A., De-ping, G., & Zhu-jun, Z. (2001). Effect of growth regulators on plantlet regeneration and bulbing in Onion (*Allium cep*a L.) in vitro. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *4*(3), 374–377.

Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*(1), 64–69. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008

Nakano, A., Mii, M., & Hoshino, Y. (2021). Simultaneous production of triploid and hexaploid plants by endosperm culture with colchicine treatment in diploid *Haemanthus albiflos*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *144*(3), 661–669. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01974-4

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *55*(3), 242–257.

Roksana, R., Alam, M. F., Islam, R., & Hossain, M. M. (2002). In vitro bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Tissue Cult*, *12*(1), 11–17.

SAOS, F. L. E. G., Hourmant, A., Esnault, F., & Chauvin, J.-E. (2002). In vitro bulb development in shallot (*Allium cep*a L. Aggregatum Group): effects of anti-gibberellins, sucrose and light. *Annals of Botany*, *89*(4), 419–425.

Sun, D. Q., Lu, X. H., Liang, G. L., Guo, Q. G., Mo, Y. W., & Xie, J. H. (2011). Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *104*(1), 23–29. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9795-4

Thammina, C., He, M., Lu, L., Cao, K., Yu, H., Chen, Y., Tian, L., Chen, J., Mcavoy, R., Ellis, D., Zhao, D., Wang, Y., Zhang, X., & Li, Y. (2011). In vitro regeneration of triploid plants of e*uonymus alatus* "compactus" (burning bush) from endosperm tissues. *HortScience*, *46*(8), 1141–1147. https://doi.org/10.21273/hortsci.46.8.1141

Thomas, & Chaturvedi, R. (2008). Endosperm culture: A novel method for triploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *93*(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6

Thomas, T. D., Bhatnagar, A. K., & Bhojwani, S. S. (2000). Production of triploid plants of mulberry (M*orus alba* L) by endosperm culture. *Plant Cell Reports*, *19*(4), 395–399. https://doi.org/10.1007/s002990050746

Wang, X., Cheng, Z. M. M., Zhi, S., & Xu, F. (2016). Breeding triploid plants: A review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *52*(2), 41–54. https://doi.org/10.17221/151/2015-CJGPB

Xu, Z., Um, Y.-C., Kim, C.-H., Lu, G., Guo, D.-P., Liu, H.-L., Bah, A. A., & Mao, A. (2008). Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and in vitro bulblet formation. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*(4), 521–528.

Yan, M. M., Xu, C., Kim, C. H., Um, Y. C., Bah, A. A., & Guo, D. P. (2009). Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Scientia Horticulturae*, *123*(1), 124–128. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.021