مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره اول، (پیاپی۳) بهار ۱۳۸۹، صفحه ۱۲-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۲۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۸/۱۲/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۴/۱۵

ریزازدیادی گیاه فلفل دلمه‌ای در شرایط کشت درون شیشه

محمود اطرشی [۱]*، کوثر مرادی و مجتبی خیام نکوئی [۱]
[۱] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (ABRII)، اصفهان، ایران

چکیده
اثر هورمون‌های مختلف رشد و زغال فعال بر روی ریزازدیادی فلفل دلمه‌ای (گلد فلیم) با استفاده از کشت تک گره بررسی گردید. نتایج نشان داد اضافه نمودن زغال فعال به محیط کشت، روشی مفید جهت رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌دار کردن آنها بوده، از طرف دیگر، مانع تشکیل کالوس در انتهای ریزنمونه‌ها می‌شود. همچنین نشان داده شد که بهترین تیمار برای ریزازدیادی فلفل دلمه‌ای، محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA است. ریزنمونه‌های رشدکرده در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار شدند. ۷۰ تا ۹۰ درصد از گیاهچه‌های منتقل شده به گلخانه زنده مانده، رشد نمودند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزازدیادی، زغال فعال، کشت تک گره، فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.)

مقدمه

فلفل دلمه‌ای با نام علمی (*Capsicum annum* L.) گیاهی یکساله متعلق به خانواده Solonaceae است که زیستگاه اصلی آن کشور مکزیک و آمریکای جنوبی است (Sanatombi and Sharma, 2007). این گیاه دارای خواص دارویی بسیار ارزشمند بوده، در درمان بسیاری از بیماری‌ها، از جمله: بیماری‌های قلبی، فشار خون بالا، چاقی، دیابت و افزایش اشتها کاربرد دارد (Nuez *et al*., 1996). در رویکرد سنتی، این گیاه به وسیله بذر تکثیر می‌گردد. تکثیر و ازدیاد فلفل در ایران معمولاً از طریق کاشت بذرهای وارداتی از دیگرکشورها صورت می‌گیرد که این بذرها، با قیمت بالا وارد شده، ضمن تحمیل هزینه بر اقتصاد، کشور را با مشکلات و محدودیت‌های وارداتی نیز مواجه می‌کند. به همین جهت، استفاده از تکنیک‌های مختلف کشت بافت در جهت تکثیر فلفل و تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: otroshy@abrii.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۳۳۶۸۷۶۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

بیماریزا می‌تواند گامی مهم در جهت رفع مشکلات موجود در مسیر تولید و تکثیر آن، کاهش هزینه‌های اولیه کشت و کار این گیاه، ترغیب تولیدکنندگان به سرمایه‌گذاری در این زمینه و در نهایت، ایجاد زمینه مناسب اشتغال کشاورزی گردد. تاکنون پژوهشگران مختلفی در سطح دنیا تلاش کرده‌اند تا از طریق تکنیک‌های مختلف کشت بافت، روش مناسب و مقرون به صرفه‌ای برای ازدیاد فلفل دلمه‌ای پیدا کنند (Phillips and Hustenberger, 1985; Harini, 1993; Christopher and Rajam, 1996; Hyde and Phillips, 1996; Hussain *et al*., 1999). تکثیر این گیاه با استفاده از تکنیک کشت بافت از قسمت‌های مختلف گیاه، از جمله: جوانه‌های انتهایی، جوانه‌های جانبی، ساقه، هیپوکوتیل و کوتیلدون گزارش شده است (Agrawal *et al*., 1989)، ولی اکثر روش‌های ریزازدیادی فلفل به شدت وابسته به رقم (*C. baccatum, C. frutescens and C. praetermissum*) خاصی بوده و در مورد ارقام دیگر کارایی چندانی نداشته است (Agrawal *et al*., 1989).

در این تحقیق، برای اولین بار تکثیر فلفل دلمه‌ای و ریزازدیادی آن از طریق کشت ریزنمونه حاصل از میانگره در رقم مورد اشاره در ایران، انجام گردید. همچنین، ریشه‌دار شدن شاخساره‌های تولیدی، مقاوم‌سازی گیاهچه‌ها جهت سازگاری با محیط طبیعی و انتقال آنها به شرایط گلخانه نیز ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کشت بذرها

در ابتدا به منظور ضدعفونی نمودن سطحی، بذور به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۹۶٪ غوطه‌ور گردیده، پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۲۰٪) به همراه یک قطره توین ۲۰٪ قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جوانه‌زنی، بذرها در یک ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) استریل کشت داده شده، در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۴۰۰ لوکس و دمای ۲۴°C به مدت ۵ هفته نگهداری شدند.

کشت تک گره

ظروف حاوی گیاهچه‌های ۵-۴ هفته‌ای (با اندازه تقریبی ۱/۵- ۱ سانتی‌متر) حاصل از کشت بذرها در شرایط استریل از ارلن خارج شدند. در مرحله بعد، ساقه آنها به شیوه‌ای برش داده شد که هر ریزنمونه حاصل دارای ۱ گره باشد. سپس هر ۵ ریزنمونه به صورت عمودی در ظروف کشت حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی واکشت شدند. این تنظیم‌کننده‌های رشد شامل سیتوکینین‌های BAP (۲-۱ -۰ میلی گرم بر لیتر) و Kin (۲-۱ -۰ میلی‌گرم بر لیتر) و اکسین‌های IBA (۰/۵-۰/۲-۰ میلی‌گرم بر لیتر) و یا NAA (۰/۵-۰/۲-۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی مورد استفاده در آزمایش

محیط‌کشت پایه	BAP (میلی‌گرم بر لیتر)	IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	NAA (میلی‌گرم بر لیتر)
MS	۰	۰	–
MS	۱	۰/۲	–
MS	۲	۰/۵	–
MS	۰	–	۰
MS	۱	–	۰/۲
MS	۲	–	۰/۵
	Kin (میلی‌گرم بر لیتر)		
MS	۰		
MS	۱	۰	–
MS	۲	۰/۲	–
		۰/۵	–
MS	۰	–	۰
MS	۱	–	۰/۲
MS	۲	–	۰/۵

علاوه بر هورمون‌های یاد شده، همه محیط‌کشت‌ها دارای ۳ درصد ساکارز، ۶ گرم در لیتر آگار و۰/۴٪ زغال فعال نیز بودند. pH محیط‌ها در ۵/۸ تنظیم شده، عمل سترون‌سازی آن‌ها در اتوکلاو با فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱°C برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاق رشد با شرایط ذکر شده در بالا و به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. پس از آن که گیاهچه‌ها به مطلوب رشد خود رسیدند، برای انجام دور بعدی کشت تک‌گره استفاده شدند و یا مقاوم‌سازی شده، به گلخانه انتقال داده شدند.

سازگارسازی و انتقال به گلخانه

قبل از کشت گیاهچه‌های حاصل در شرایط گلخانه، عمل سازگارسازی آنها در فیتوترون صورت گرفت. برای این کار، گیاهچه‌ها در شرایط *in vitro* به گلدان‌های حاوی ترکیب پیت‌ماس و کوکوپیت با نسبت ۳/۱ منتقل شده و در فیتوترون تحت شرایط رطوبت نسبی ۷۵ درصد، دمای ۲۵°C و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس برای مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. در مرحله بعد، گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه منتقل گردیده، تحت شرایط درجه حرارت شب ۱۲ درجه سانتی‌گراد، طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

این طرح به‌صورت چند آزمایش فاکتوریل مجزا با طرح پایه کاملاً تصادفی و ۳ تکرار به اجرا در آمد. ظروف حاوی گیاهچه‌های کشت شده به صورت تصادفی (نقشه چیدن تصادفی ظروف با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Excel تهیه گردید) در داخل اتاق رشد قرار گرفتند.

نتایج

در این مطالعه، اثر افزودن غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین (BAP، Kin) به تنهایی، یا در ترکیب با هورمون‌های اکسین (NAA، IBA) به محیط پایه MS در رشد ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای حاصل از تک‌گره بررسی گردید. در شروع کار، از محیط کشت MS به همراه BAP و IBA بدون زغال فعال استفاده شد، نتیجه نشان داد ریزنمونه‌ها، ۲ هفته پس از کشت در این محیط بدون تولید ریشه در انتها کالوس‌دار شدند (شکل ۱) (جدول ۲).

جدول ۲- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پارامترهای رشد در ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای

BAP (میلی‌گرم بر لیتر)	IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	زغال فعال ٪۰/۴	تعداد شاخه فرعی	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه
۰	۰	+	۰/۰۴	۱/۱۳	۳/۰۰	۱/۱۳
۰	۰	–	۰/۰۲۷	۰/۷۸	۰/۲	۰/۷۸
۱	۰	+	۰/۲۹	۱/۲۰	۴/۰۰	۱/۲۰
۱	۰	–	۰/۰۹	۰/۸۳	۰/۳۵	۰/۸۳
۲	۰	+	۰/۴۴	۱/۱۸	۶/۰۰	۱/۱۸
۲	۰	–	۰/۲	۰/۸۱	۰/۳	۰/۸۱
۰	۰	+	۰/۳۴	۱/۱۴	۲/۰۰	۱/۱۴
۰	۰	–	۰/۰۴	۰/۸۶	۰/۲	۰/۸۶
۱	۰/۲	+	۰/۱۸	۱/۱۹	۳/۰۰	۱/۱۹
۱	۰/۲	–	۰/۰۵	۰/۸۱	۰/۳	۰/۸۱
۲	۰/۵	+	۰/۲۶	۱/۱۸	۳/۰۰	۱/۱۸
۲	۰/۵	–	۰/۰۷	۰/۷۵	۰/۳۵	۰/۷۵

+ : زغال فعال اضافه شده به محیط

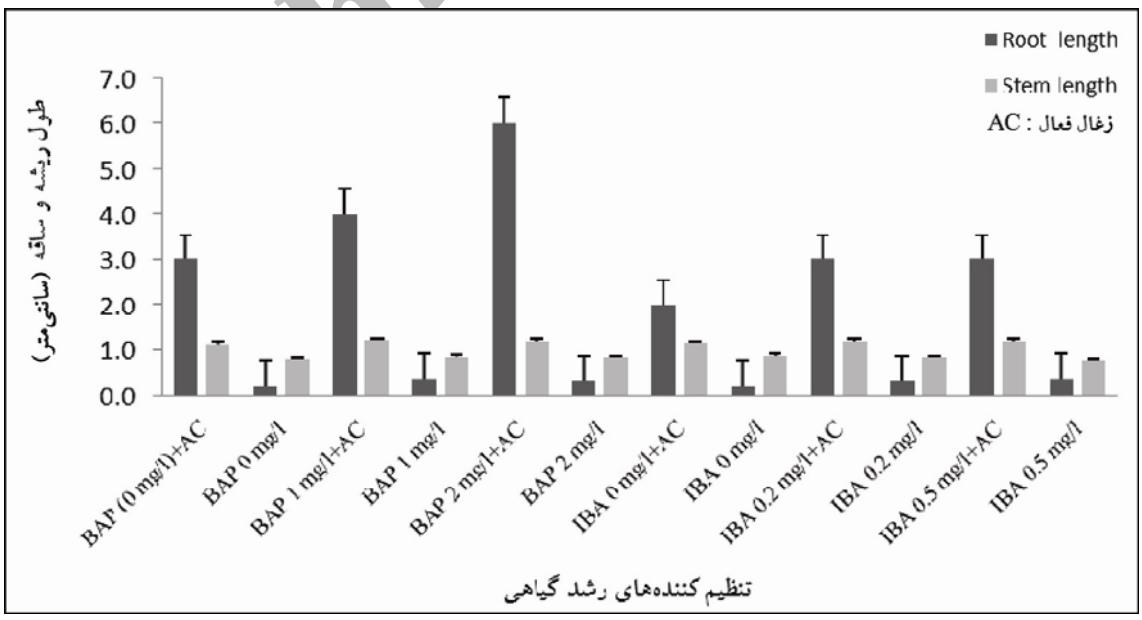
– : فاقد زغال فعال

Archive of SID

www.SID.ir

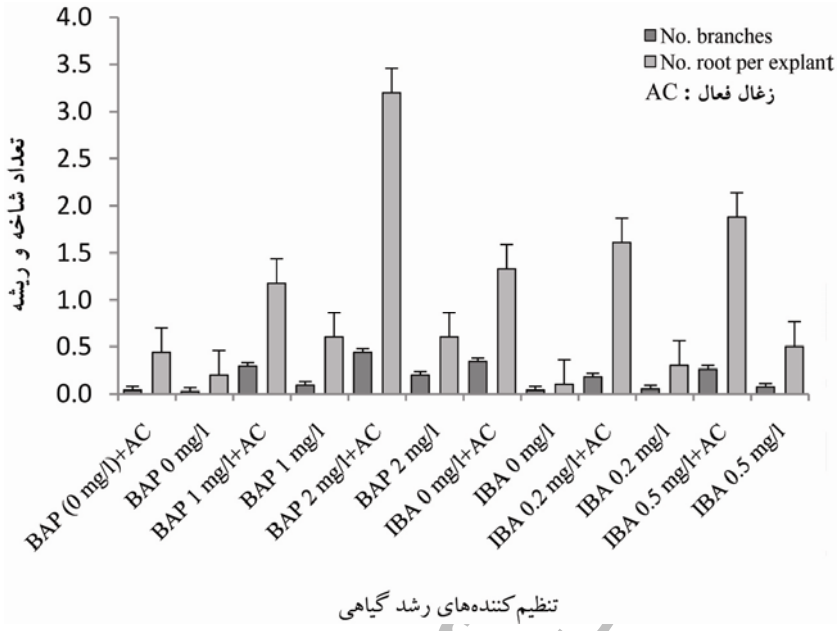
شکل ۱- تولید کالوس در انتهای ریزنمونه تک گره فلفل دلمه‌ای، ۲ هفته پس از کشت
در محیط MS با ترکیبات هورمونی مختلف از BAP و IBA ، فاقد زغال فعال

برای رفع این مشکل، در مرحله بعد، ۰/۴٪ زغال فعال به محیط‌های کشت باززایی اضافه شد. پاسخ ریزنمونه‌ها به این محیط مثبت بود و همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده، این ریزنمونه‌ها بدون اینکه هیچ حالت کالوسی در انتهای آن‌ها مشاهده شود، بخوبی رشد کرده، حتی برخی از آنها ریشه‌دار هم شدند (جدول ۴) . مقایسه میان تأثیر حضور و عدم حضور زغال فعال بر پارامترهای باززایی در گیاه فلفل در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

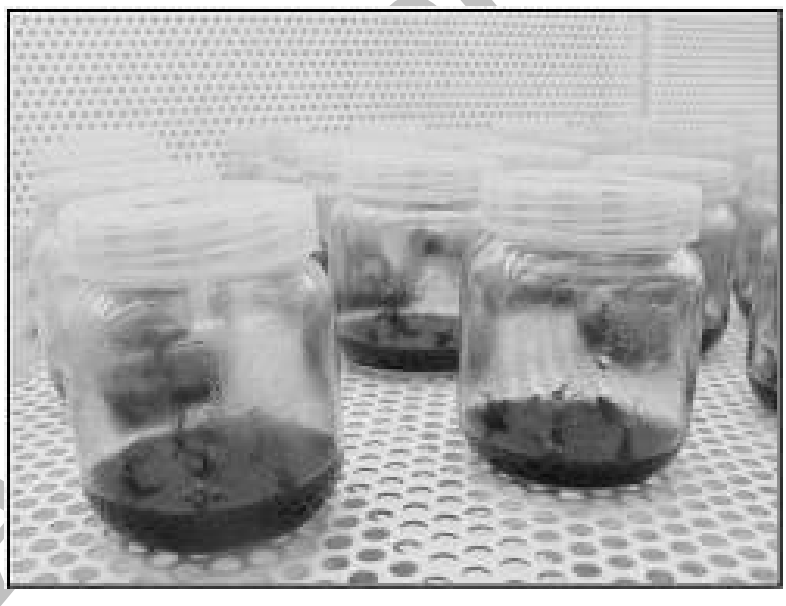


شکل ۲- اثر زغال فعال در محیط باززایی فلفل بر پارامترهای رشد (طول ریشه و ساقه)

www.SID.ir



شکل ۳- اثر زغال فعال در محیط باززایی فلفل بر پارامترهای رشد (تعداد شاخه و ریشه)



شکل ۴- رشد مناسب ریزنمونه‌های فلفل حاصل از تک گره در محیط باززایی حاوی زغال فعال با ترکیب هورمونی BAP ۲ میلی‌گرم بر لیتر و IBA ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۳۰ روز پس از کشت

با گذشت ۳۵ روز از کشت تک گره‌های فلفل دلمه‌ای در محیط‌های مختلف، هر گیاهچه ۲-۳ شاخه تولید نمود. آزمایش‌ها نشان داد که نوع هورمون‌ها و غلظت‌های مختلف آن‌ها تأثیرات متفاوتی بر پارامترهای رشدی، چون: طول ساقه، تعداد شاخه فرعی، برگ و ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده فلفل داشته است (جدول ۳).

www.SID.ir

جدول ۳- اثر تنظیم‌کننده‌های گیاهی (BAP، Kin، IBA، NAA) حاوی زغال فعال بر میانگین اندازه‌های پارامترهای رشدی در ۴ ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای پس از ۳۵ روز

هورمون‌های رشد	تعداد شاخه فرعی	طول ساقه (cm)	تعداد برگ	فاصله میانگره (cm)	ریشه‌زایی (%)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	طول ریشه (cm)
BAP	**۰/۰۸	**۸/۲۹	**۳۰/۴۸	**۰/۱۹	**۱۰۰۰۸/۲۶	**۳۶/۲۹	**۱۹۷/۰۳
Kin	^{ns}۰/۰۰	**۶/۸۱	^{ns}۱۴/۳۶	*۰/۰۸	^{ns}۲۷۱/۸۵	^{ns}۱/۹۱	^{ns}۱۱/۸۷
IBA	^{ns}۰/۰۰	^{ns}۰/۲۵	^{ns}۹/۶۲	^{ns}۰/۰۰	**۴۹۸/۵۲	**۲۰/۸۹	**۲۲/۹۵
NAA	^{ns}۰/۰۰	^{ns}۰/۹۱	^{ns}۴۷/۶۱	^{ns}۰/۰۱	*۴۸۷/۸۶	^{ns}۰/۱۴	^{ns}۲/۹۴
BAP+IBA	^{ns}۰/۰۰	^{ns}۰/۵۹	^{ns}۴/۷۵	*۰/۰۶	*۱۱۲۷/۸	*۱۲/۰۹	^{ns}۷/۳۵
BAP+NAA	^{ns}۰/۰۰	^{ns}۱/۴۷	^{ns}۴۰/۴۳	*۰/۰۲	**۱۶۹۱/۸	*۶/۹۳	*۲۰/۰۸
Kin+IBA	*۰/۰۰	^{ns}۰/۵۷	^{ns}۱/۱۸	^{ns}۰/۰۲	**۵۵۱/۸۵	^{ns}۱/۳۷	*۷/۹۱
Kin+NAA	^{ns}۰/۰۰	^{ns}۰/۵۴	*۶/۳۱	^{ns}۰/۰۴	*۴۴۴/۰۷	^{ns}۳/۲۹	*۱۶/۳۵

ns: معنی دار نیست.

*: در سطح ۰/۰۵ ≥p معنی‌دار است.

**: در سطح ۰/۰۱ ≥p معنی‌دار است.

به‌عنوان یک نتیجه مهم، در آزمایش ما نشان داده شد که در هفته چهارم پس از کشت تک‌گره، حداکثر تعداد جوانه‌ها در محیط پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و فاقد هر گونه اکسین به دست آمد. در این مطالعه، تأثیر معنی‌دار از IBA بر روی تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی مشاهده نگردید، لیکن حضور IBA در محیط کشت افزایش طول ریشه را باعث گردید (جدول ۴).

جدول ۴- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به همراه زغال فعال بر پارامترهای مختلف رشد ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای ۳۵ روز پس از کشت در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی

BAP (میلی‌گرم برلیتر)	IBA (میلی‌گرم برلیتر)	تعداد برگ	فاصله میانگره (cm)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	طول ریشه (cm)	درصد ریشه‌زایی (٪)
۰	۰	۲/۹۳h	abc۰/۲۵	f۱/۶۷	e۲/۲۰	e۱۱/۳۳
۰	۰/۲	۳/۷۳gh	c۰/۱۷	d۲/۴۷	e۲/۰۷	de۲۲/۶۷
۰	۰/۵	۴/۸۰dg	bc۰/۱۸	c۳/۴۷	abc۴/۸۰	de۲۵/۳۳
۱	۰	۵/۱۳d	abc۰/۲۵	d۲/۲۷	bcd۴/۴۷	de۲۳/۳۳
۱	۰/۲	۵/۲۰cd	abc۰/۲۹	d۲/۶۷	bcde۳/۳۳	de۲۱/۶۰
۱	۰/۵	۵/۰۷d	bc۰/۲۲	b۴/۰۷	cde۳/۰۷	cd۳۶/۰۰
۲	۰	۸/۰۷a	a۰/۳۶	c۳/۶۰	de۲/۴۷	ab۵۰/۶۷
۲	۰/۲	۶/۸۷ab	bc۰/۲۲	b۴/۱۷	a۸/۸۷	abc۴۰/۶۷
۲	۰/۵	۶/۴۰bc	ab۰/۳۱	a۵/۰۷	ab۵/۴۰	a۵۴/۰۰

داده‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند.

Archive of SID

www.SID.ir

ریزنمونه‌های ریشه‌دار نشده حاصل از مرحله باززایی جهت القای ریشه‌زایی به محیط پایه حاوی هورمون‌های IBA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) یا NAA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. حدود ۸۰٪ از ریزنمونه‌ها در این محیط ریشه‌دار شدند (جدول ۵).

جدول ۵- اثر نوع اکسین بر ریشه‌دهی در محیط حاوی ۰/۴٪ زغال فعال

نوع و غلظت اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	طول ریشه (cm) در هر ریزنمونه	ریشه‌زایی (٪)
IBA			
۰	-	-	-
۰/۲	-	-	-
۰/۵	۱/۶۱	۵/۲۲	۸۴/۴
NAA			
۰	-	-	-
۰/۲	-	-	۴۸/۵
۰/۵	۲/۷۱	۴/۰۲	-

جهت واکشت نمودن گیاهچه‌ها از بهترین محیط حاصل از نتایج به دست آمده استفاده گردید. این امر باعث شد که در مدت زمان نسبتاً کوتاهی تعداد زیادی گیاهچه باززایی شده فلفل دلمه‌ای تولید شود. این گیاهچه‌ها پس از سازگاری در فیتوترون، به گلخانه منتقل شدند (شکل ۵). حدود ۹۰-۷۰ ٪ از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت مورد اشاره، در شرایط گلخانه نیز زنده مانده، رشد مطلوبی از خود نشان دادند.

شکل ۵- گیاهچه حاصل از محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم BAP بر لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم IBA بر لیتر سازگار شده در فیتوترون، آماده انتقال به محیط طبیعی

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

تاکنون مطالعاتی در زمینه باززایی فلفل دلمه‌ای و اثر هورمون‌های مختلف بر ریزازدیای آن در خارج از کشور گزارش شده است (Arroyo and Revilla, 1991; Christopher and Rajam, 1994; Ezura *et al*., 1993; Phillips Szasz *et al*. 1995; Gunay and Rao, 1978 and Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al*., 1988). در این مطالعات، اثر ارقام، هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف، از جمله: ریشه، کوتیلدون، هیپوکوتیل و ساقه بر باززایی این گیاه بررسی و مطالعه شده است. در مجموع، به نظر می‌رسد، که کارا بودن روش‌های ارائه شده در این مقالات، به شدت به رقم مورد مطالعه بستگی داشته است.

در مراحل ابتدایی آزمایش از محیط‌های بدون زغال فعال برای باززایی ساقه دارای تک‌گره استفاده گردید که نتیجه آن عدم رشد مناسب شاخه، کالوسی شدن قاعده ریزنمونه و عدم تولید ریشه بود (به دلیل فنل تولید شده توسط ریزنمونه است، که ازرشد گیاه ممانعت می‌کند). برای حل این مشکل، زغال فعال به میزان ۰/۴٪ به محیط‌کشت باززایی حاوی هورمون‌های رشد اضافه شد. زغال فعال اثر قابل ملاحظه‌ای در رشد ریزنمونه‌ها و القای تولید ریشه در آنها داشت، ضمن این که مانع تولید کالوس در قاعده ریزنمونه‌های کشت شده در محیط شد. از آنجا که زغال فعال بعنوان یک ماده جاذب رنگ و متابولیت‌های مختلف شناخته می‌شود، احتمال می‌رود افزودن آن به محیط باعث جذب ترکیبات فنلی و دیگر مواد بازدارنده رشد از محیط‌کشت شده باشد اثر مثبت زغال فعال بر تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت توسط دانشمندانی، همچون Pan و Van Staden (۲۰۰۴) و Dennis (۲۰۰۸) تأیید شده است. اثر زغال فعال احتمالاً نتیجه‌ای است از خصوصیات این ماده مؤثره برای باند شدن و جذب فنولیک‌ها و دیگر عواملی که می تواند از تکثیر ریزنمونه‌ها ممانعت کند، این مواد اکسید شده سمّی بوده، منجر به قهوه‌ای یا کالوسی شدن بافت گیاهی و محیط‌کشت می‌گردند و موجب کاهش سرعت رشد و در نهایت در رشد گیاه به صورت محرک و یا بازدارنده نقش مهمی دارند.

در این مطالعه، بهترین تیمار جهت باززایی ریزنمونه‌های گیاه فلفل محیط پایه دارای سیتوکینین BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) بود که اثر مثبتی بر پارامترهای باززایی نظیر شاخه‌زایی، تولید برگ و حتی القای ریشه‌زایی در هر ریزنمونه داشت. در این مطالعه تأثیر معنی‌داری از IBA بر روی تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی مشاهده نگردید، لیکن حضور IBA در محیط‌کشت افزایش طول ریشه را باعث گردید.

این نتیجه، با نتایج سایر مطالعات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران مطابقت دارد. در این راستا، نشان داده شده است که استفاده از BAP در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بهترین تیمار جهت باززایی فلفل از ریزنمونه‌های نوک ساقه است (Christopher and Rajam, 1994). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده که بهترین تیمار برای تولید انبوه فلفل با استفاده از جوانه‌های رأسی، استفاده از محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بوده است (Sanatombi and Sharma, 2007). مشخص شده است که استفاده از سیتوکنین دیگر؛ یعنی Kin به تنهایی یا در ترکیب با هورمون‌های دیگر به اندازه BAP در باززایی گیاه نقش نداشته است و تنها تعداد کمی از ریزنمونه‌های گیاه فلفل در محیط‌های حاوی این تنظیم‌کننده رشد گیاهی باززایی شده‌اند (Phillips and Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al*., 1989). در این مطالعه، اگر چه تأثیر مثبتی از NAA در القاء ریشه‌دهی در مرحله بعد از باززایی

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده گردید، لیکن در مقایسه با IBA از تأثیر کمتری برخوردار بود، دیگر تحقیقات انجام شده (Husain *et al*. 1999) نیز نتایج مشابهی را بیان نموده‌اند که مؤید نتایج این مطالعه است.

ریزنمونه‌های باززایی شده پس از ریشه‌زایی در محیط حاوی IBA، جهت مقاوم‌سازی به فیتوترون و سپس به محیط گلخانه منتقل شدند. حدود ۹۰-۷۰٪ از گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت در گلخانه ماندگاری خوبی نشان داده و رشد مطلوبی داشتند. گیاهان رشد یافته پس از طی مراحل رویشی گل داده و میوه نیز تولید نمودند. در مجموع، روش به‌کار گرفته شده در این تحقیق که از طریق کشت ساقه دارای تک‌گره از گیاهان حاصل از بذر یا حاصل از تک‌گره‌های با واکشت متوالی صورت گرفت، روش مناسبی جهت ریزازدیادی و کشت انبوه این رقم است.

تشکر و قدردانی

شایسته است از آقای مهندس اسماعیل روح‌الامینی که در ایجاد زمینه علمی و امکان اجرای این طرح همکاری صمیمانه‌ای داشتند و همچنین از آقای دکتر سید علی حسینی تفرشی جهت ارائه برخی از پیشنهادهای علمی سپاسگزاری و قدردانی نماییم.

منابع

Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari, S. L. (1988) Shoot-tip culture of pepper for micropropagation. Current Science 57: 1347-1349.

Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari, S. L. (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *Mathania*). Plant Cell Tissue Organ Culture 16: 47-55.

Arroyo, R. and Revilla, M. A. (1991) *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Reports 10: 414-416.

Christopher, T. and Rajam, M. V. (1994) *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell Tissue Organ Culture 38: 25-29.

Christopher, T. and Rajam, M. V. (1996) Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red pepper. Plant Cell Tissue Organ Culture 46: 245-250.

Ezura, H., Nishimiya, S. and Kasumi, M. (1993) Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 12: 676- 680.

Gunay, A. L. and Rao, P. S. (1978) *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Science Letters 11: 365-372.

Harini, I. and Sita, G. (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annum* L.). Plant Science 89: 107-112.

Hussain, S., Jain, A. and Kothari, S. L. (1999) Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annum* L. Plant Cell Reports 19: 64-68.

Hyde, C. L. and Phillips, G. C. (1996) Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chilli pepper (*Capsicum annum* L.) via organogenesis. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 32:72–80.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Nuez, F., Gil-Ortega R. and Costa, J. (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi-Prensa, México D. F.

Pan, M. J. and Van Staden, J. (2004) The use of charcoal in *in vitro* culture. A review. Plant Growth Regulation 26: 155-163.

Phillips, G. C. and Hubstenberger, J. F. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture 4: 261-269.

Sanatombi, K. and Sharma, G. J. (2007) Micropropagation of *Capsicum annum* L. using axillary shoot explants Scientia Horticulturae 113: 96-99.

Archive of SID

www.SID.ir

Szasz, A., Nervo, G. and Fari, M. (1995) Screening for *in vitro* shoot forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. Plant Cell Reports 14: 666-669.

Dennis, T. T. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26: 618-631.

www.SID.ir

Micropropagation of *Capsicum annuum* L. *in vitro*

* **Mahmoud Otroshy, Kosar Moradi and Mojtaba Khayam Nekouei**

Agricultural Biotechnology Research Institute, Center of Iran (ABRII), Isfahan, Iran

Abstract

The effects of activated charcoal and different combinations of plant growth regulators for micropropagation of using nodal culture were investigated. Adding activated charcoal improved growth and root system of plantlets; on the other hand, on the bottom of explants, no callus was formed. The best response was observed on medium containing 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l IBA, with respect to the number of buds per explant and percentage of rooting. The explants grown on the medium containing IBA 0.5 mg/l were rooted. 70-90% of transferred plantlets to the greenhouse were survived and grown.

Key words: Plant Growth Regulators, Micropropagation, Activated charcoal, Nodal cutting, *Capsicum annuum* L.

Archive of SID

* Corresponding Author: otroshy@abrii.ac.ir

www.SID.ir