بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیرمستقیم گیاه فلفل‌دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.) در شرایط کشت درون شیشه ای

محمود اطرشی* و کوثر مرادی

اصفهان، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (ABRII)، بخش کشت بافت گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۹

چکیده

این پژوهش با هدف تعیین بهترین ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی درطول کالوس‌زائی ریزنمونه‌ها در باززایی غیرمستقیم فلفل‌دلمه‌ای انجام می‌شود. اثر غلظت‌های متفاوت و ترکیب اکسین‌های NAA، IBA و 2,4-D و سیتوکینین‌های BAP و Kin در محیط کشت MS برروی باززائی غیرمستقیم ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه مورد بررسی قرار گرفت. بهترین نتیجه در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA از کالوس تولید شده، از ریزنمونه کوتیلدون و رشد طولی شاخساره‌ها نشان داده شد. همچنین شاخساره های طویل شده در همان محیط کشت پایه MS حاوی زغال فعال بیشترین ریشه زائی را نشان دادند. بعد ازمرحله مقاوم سازی، ۹۵-۹۰ درصد از گیاهچه ها ریشه دار شده به گلخانه منتقل شده و رشد مناسبی نشان دادند.

واژه های کلیدی: باززائی غیرمستقیم، تولید کالوس، فلفل‌دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L)، ریزنمونه، تنظیم کننده های رشد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۳۱-۲۲۳۵۸۵۸ ، پست‌الکترونیکی: otroshy@yahoo.com

مقدمه

فلفل‌دلمه‌ای با نام علمی (*Capsicum annuum* L.) گیاهی یکساله متعلق به تیره Solonaceae می باشد که زیستگاه اصلی آن کشور مکزیک و آمریکای جنوبی است. این گیاه دارای خواص دارویی بسیار ارزشمند بوده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی، فشار خون بالا، چاقی، دیابت و افزایش اشتها کاربرد دارد (۵،۱۵). چندین مطالعه بر روی خواص داروئی این گیاه انجام شده که نتایج مطالعات بر روی خواص دارویی این گیاه حاکی از ان است که فلفل دلمه‌ای دارای خواص ضدسرطان می باشد (۱).

تکثیر و ازدیاد فلفل در ایران از طریق کاشت بذور وارداتی از دیگرکشورها صورت می گیرد که این بذرها، با قیمت بالا وارد شده و ضمن تحمیل هزینه بر اقتصاد، کشور را با مشکلات و محدودیت های وارداتی نیز مواجه می‌کند و دارای معایبی همچون درصد جوانه زنی پایین، هدر رفتن مقدار زیادی بذر همچنین وجود خواب در بذرها، هستند که باعث شده باززائی این گیاه دچار مشکل شود (۲). اندام زایی غیر مستقیم به عنوان یک منبع جایگزین تنوع ژنتیکی به منظور بهبود سوماکلون‌ها با صفات زراعی و صنعتی جالب، از اهمیت خاصی برخوردار است. اندام زایی غیر مستقیم در فلفل دلمه‌ای به ندرت گزارش شده است (۱۵). تشکیل کالوس هنگامی صورت می گیرد که ریزنمونه‌های مختلف شامل: کوتیلدون، هیپوکوتیل، نوک ساقه در محیط کشت و در معرض طیف گسترده ای از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی قرار می گیرند(۷،۱۳،۱۶،۱۸). کالوس‌های به وجود آمده از کوتیلدون که معمولا دارای جوانه های کوچک رشد نیافته هستند، در پاسخ به سطوح بالای اکسین به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکنین تولید می شوند(۱۳).

مطالعات دیگر نشان دادند، تشکیل کالوس از کوتیلدون در فلفل به رقم بستگی دارد (۶،۱۴). هدف از اجرای این پروژه، دستیابی به شیوه ای نوین جهت تکثیر گیاه فلفل دلمه‌ای با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می باشد به طوری که مشکلات تولید و تکثیر این گیاه به شیوه مرسوم را حل نموده و ضمن تولید انبوه آن با هزینه‌ای پایین، از خروج ارز از کشور نیز جلوگیری گردد. در این تکنیک با بررسی اثر هورمون های مختلف در باززایی گیاه فلفل دلمه‌ای، بهترین ترکیب هورمونی برای باززائی غیرمستقیم مشخص شده و با بهینه سازی تولید کالوس از ریزنمونه-های فلفل دلمه‌ای، می توان از آن در جهت برنامه‌هایی مانند انتقال ژن و کشت پروتوپلاست استفاده کرد. لذا استفاده ازتکنیک‌های مختلف کشت بافت در جهت تکثیر فلفل می‌تواند گامی مهم در جهت تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری ازعوامل بیماریزا باشد.

مواد و روشها

منبع ریزنمونه و ضدعفونی: در این تحقیق بذرهای فلفل دلمه‌ای که بصورت اکوتیپ هلندی تجاری در بازار موجود می باشند جهت کشت در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور استفاده شدند. در ابتدا به منظور ضدعفونی نمودن سطحی، بذرها به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۷۰درصد غوطه‌ور گردیده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به همراه یک قطره توین ۲۰ قرار گرفتند. سپس بذرها سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جوانه‌زنی، بذرها در یک پتری دیش حاوی۳۰ میلی‌لیتر محیط پایه MS (۱۷) استریل کشت داده شده ودر اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و دمای ۲۴°c به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند.

القای کالوس: ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه حاصل از رشد گیاهچه ۱۵ روزه در شرایط استریل هر کدام به سه قسمت مساوی تقسیم شده (به طول نیم سانتیمتر) و به صورت افقی در ظروف کشت حاوی محیط پایه MS به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل اکسین های (NAA) و (2,4-D) با غلظت های (۰، ۱، ۲ و۳ میلی گرم در لیتر) به تنهائی و سیتوکینین‌های (BAP) (۰، ۱، ۲ ،۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) ، kinetin (۰، ۱، ۲ ،۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) به همراه اکسین های NAA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و (IBA) (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و حاوی ۳ درصد ساکارز و ۵/۸ گرم در لیتر آگار ، جهت تولید کالوس کشت شدند. در هر تیمار هورمونی سه تکرار و در هر تکرار پنج ریزنمونه کشت شد. عمل سترون‌سازی محیط‌های کشت در اتوکلاو با فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱°C برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و دمای ۲۴°c به مدت چهار هفته نگهداری شدند. میزان کالوس دهی هر ریزنمونه پس از چهار هفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

باززائی: کالوس‌های تولید شده جهت باززائی به محیط باززائی شامل محیط پایه MS به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل سیتوکینین‌های KIN وBAP با غلظت های (۰، ۱، ۲ ،۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) و اکسین های IBAو NAA با سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و حاوی ۳ درصد ساکارز و ۵/۸ گرم در لیتر آگار منتقل شدند. پس از ۲۰ روز جوانه‌های باززائی شده به محیط رشد طولی شامل محیط کشت MS به همراه تنظیم‌کننده های رشد گیاهی۱ میلی گرم در لیتر BAP و۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به همراه ۳ درصد ساکارز، ۶ گرم در لیتر آگار و ۰/۴ درصد زغال فعال منتقل شدند. گیاهچه‌های باززائی شده در همان محیط رشد طولی، ریشه زائی شدند.

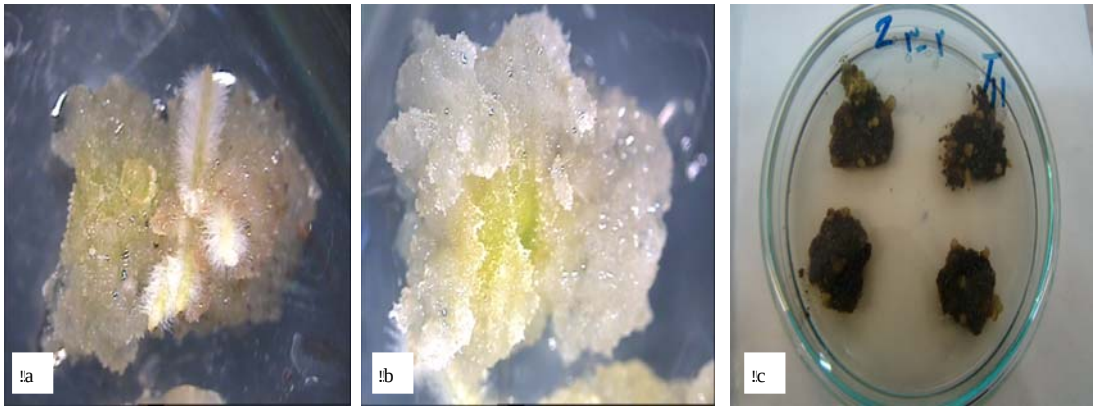
سازگار سازی و انتقال به گلخانه: قبل از انتقال و کشت گیاهچه‌های حاصل در شرایط درون شیشه به گلخانه،

انجام عمل مقاوم سازی ضروری است. به این منظور ریشه گیاهچه‌ها پس از خروج از ارلن با آب شستشو داده شدند تا محیط جامد اطراف ریشه به طور کامل حذف گردد. سپس این گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی ترکیب پیت‌ماس و پرلایت با نسبت ۱به ۳ کشت گردیده و در اتاق رشد فیتوترون تحت شرایط رطوبت نسبی ۷۵ درصد، دمای ^{o}C ۲۵ و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس برای مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت روی گلدان‌ها با یک لیوان پلاستیکی شفاف به مدت یک هفته پوشانده شدند. در طول این دوره ۲۰ روزه گیاهان با محلول مغذی یا کود کامل که شامل تمام عناصر غذائی باشد (با غلظت ۲ در هزار) آبیاری شدند. پس از دوره ۲۰ روزه مقاوم‌سازی گیاهان ۱۰ تا ۱۵ برگی به گلخانه انتقال داده شدند. گیاهچه‌های مقاوم سازی شده در گلخانه و با فواصل بین گیاهچه‌ای ۵۰ سانتی‌متر کشت شدند. دمای بستر گلخانه بین ۱۸ تا ۲۰ درجه و دمای فضای گلخانه در شب ۱۹ درجه و در روز ۲۱ درجه سانتی‌گراد و بهینه میزان رطوبت نسبی در این شرایط ۵۵ تا ۶۰ درصد بود.

تجزیه و تحلیل داده ها: داده های بدست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SAS در قالب چند آزمایش فاکتوریل مجزا با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی و ۳ تکرار به اجرا در آمد. در نهایت با استفاده از برنامه Excel نمودارهای مربوط به آنها رسم گردید.

نتایج

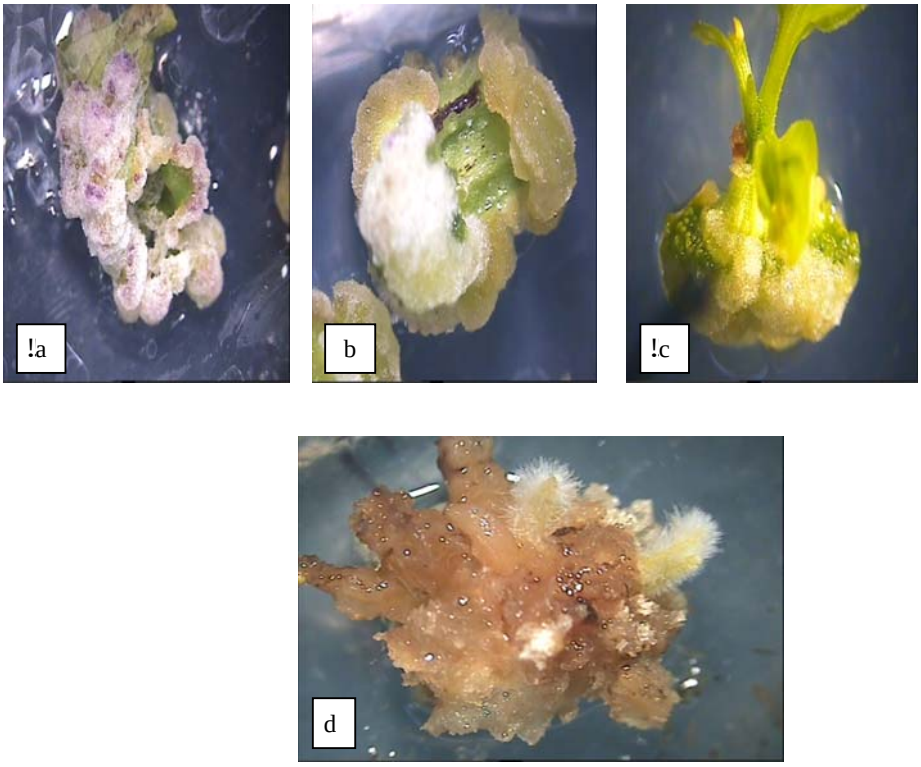
در این پژوهش اثر افزودن غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP و KIN به تنهایی یا در ترکیب با اکسین های IBA، 2,4- D و NAA در باززائی ریزنمونه های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد باززایی در محیط های حاوی غلظت بالای سیتوکنین و غلظت پایین اکسین مشاهده شد. براساس مقایسه میانگین تاثیر ریزنمونه های مورد استفاده در میزان باززایی مشخص شد که میزان باززایی ازریزنمونه ی کوتیلدون بیشتر از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل استدر ابتدای آزمایش نشان داده شد. ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای در محیط MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد اکسین 2,4- D و NAA تولید کالوس ترد و شکننده کردند و پس از انتقال کالوس ها به محیط MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد سیتوکنین BAP و KIN و اکسین IBA و NAA جهت باززائی، جوانه های باززائی شده مشاهده نگردید و تعدادی از کالوس‌ها تولید ریشه نابجا کردند (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر تنظیم کننده های رشد 2,4-D (a) و NAA (b,c) در نوع کالوس

همچنین تعدادی از کالوس ها افزایش حجم داشتند و پس از ۲۵ روز قهوه ای و نکروزه شدند (شکل۱c). از طرف دیگر قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط MS به همراه هورمون های سیتوکینین BAP و KIN در ترکیب با

هورمون‌های اکسین IBA و NAA تولید کالوس های با بافت فشرده و سخت کردند و تنها کالوس‌هایی که در محیط حاوی تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA بودند نتیجه مثبتی در باززائی ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای از کالوس را نشان دادند(شکل ۳). اما کالوس های تولید شده در محیط حاوی تنظیم کننده‌های رشد KIN و IBA پس از تولید کالوس و واکشت مجدد هیچگونه باززائی را نشان ندادند (شکل ۲).

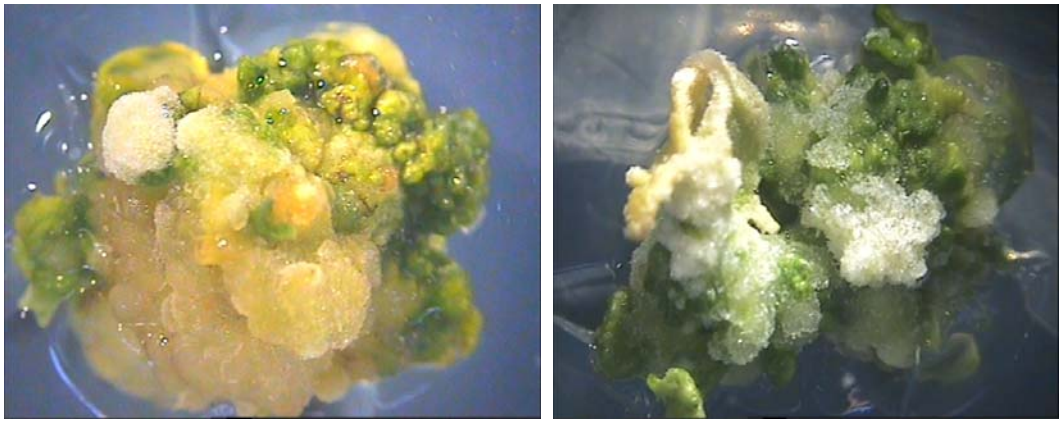


شکل ۲- کالوس حاصل از ریز نمونه‌های کوتیلدون (a) ، هیپوکوتیل (b) ، نوک ساقه (c) و ریشه (d) در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA

سیتوکنینBAP ، نقش بسزائی در باززائی ریزنمونه‌های کوتیلدون فلفل دلمه‌ای داشت. نتیجه نشان داد که کالوس های حاصل از ریزنمونه‌های کوتیلدون پس از واکشت در محیط MS به همراه هورمون سیتوکینین BAP در ترکیب با هورمون اکسین IBA حاوی درصد بالائی از جوانه های باززائی بودند (شکل ۳).

در این آزمایش تاثیر نوع ریزنمونه های مختلف در باززائی غیر مستقیم اختلاف معنی داری را نشان داد (جدول ۱ و۲)

در حالی که هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه هیچگونه باززائی جوانه نداشتند و فقط تولید ریشه فرعی داشتند که پس از مدتی تبدیل به کالوس سخت و قهوه ای و نکروزه شدند. بیشترین درصد باززائی در محیط‌های حاوی غلظت بالای سیتوکنین و غلظت پایین اکسین مشاهده شد.



شکل ۳- جوانه‌های باززائی شده اطراف ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA

جدول ۱- تاثیر هورمون‌ها و نوع ریزنمونه در درصد کالوس‌زائی، تعداد جوانه باززائی شده و تعداد ریشه در ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه فلفل‌دلمه‌ای

هورمون های رشد	غلظت (میلی گرم در لیتر)	تعداد ریشه در هر ریز نمونه	درصد کالوس زائی	تعداد جوانه باززائی شده در هر ریزنمونه
BAP	۰	۰/ ۷ b	۰/ ۰۴ b	۰/۴ c
BAP	۱	۰/ ۷ b	۰/۰۱ d	۰/ ۴ c
BAP	۲	۰/۷ b	۰/۰۱ d	۰/۶ b
BAP	۳	۰/۸ a	۰/۰۱ d	۰/۸ a
BAP	۴	۰/۶ c	۰/۰۲ c	۰/۴ c
IBA	۰	۰/۴ d	۰/۰۴ b	۰/ ۴ c
IBA	۰/۵	۰/ ۴ d	۰/۰۴ b	۰/ ۵ b
IBA	۱	۰/ ۳ d	۰/۰۳bc	۰/۶ b

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

جدول ۲ - تاثیر نوع ریزنمونه در درصد کالوس‌زائی، تعداد جوانه باززائی شده و تعداد ریشه در ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه فلفل‌دلمه‌ای

ریزنمونه	تعداد ریشه در هر ریز نمونه	درصد کالوس زائی	تعداد جوانه باززائی شده در هر ریزنمونه
کوتیلدون	۰/ ۴ d	۰/۰۷ a	۰/ ۸ a
هیپوکتیل	۰/ ۴ d	۰/۰۲ c	۰/ ۴ c
ریشه	۰/ ۸ a	۰/۰۲ c	۰/ ۲ d
نوک ساقه	۰/ ۵ d	۰/۰۲ c	۰/ ۵ b

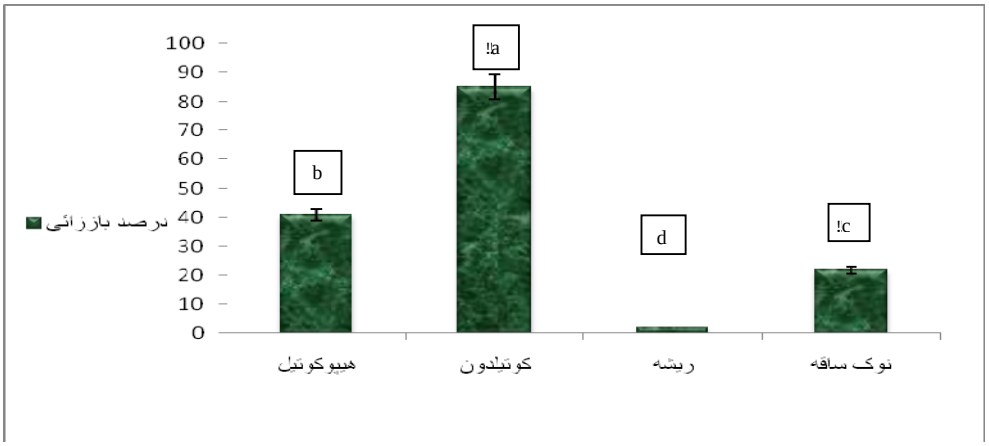
میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

در نهایت بهترین تیمار که در آن ریزنمونه‌های کوتیلدون بیشترین باززائی‌را نشان دادند در محیط کشت MS به همراه هورمون های ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA بود(جدول ۳ و شکل ۳).

جدول ۳ – تاثیر ترکیب هورمون‌های BAP و IBA درپارامترهای درصد کالوس‌زائی، تعداد جوانه باززائی شده و تعداد ریشه در ریز نمونه کوتیلدون فلفل دلمه ای

BAP (میلی گرم در لیتر)	IBA (میلی گرم در لیتر)	درصد کالوس زائی	تعداد جوانه باززائی شده در هر ریزنمونه	تعداد ریشه در هر ریز نمونه
۰	۰	۰/۴۹ b	۰/۷۱ b	۰/۷۱ c
۰	۰/۵	۰/۵۴ ab	۰/۷۱ b	۰/۷۵ c
۰	۱	۰/۳۲ bc	۰/۷۱ b	۰/ ۸۳ bc
۱	۰	۰/۲۱ c	۰/۷۱ b	۰/۹۸ ab
۱	۰/۵	۰/۲۵ c	۰/۷۱ b	۰/۰۱ ab
۱	۱	۰/۰۱ d	۰/۷۱ b	۱/۰۶ a
۲	۰	۰/۱۲ cd	۰/۷۱ b	۰/۸۴ b
۲	۰/۵	۰/۰۹ d	۰/۷۱ b	۰/۸۶ b
۲	۱	۰/۰۱ d	۰/۷۱ b	۰/۸۲ b
۳	۰	۰/۰۹ d	۰/۹۲ ab	۰/۷۱ c
۳	۰/۵	۰/۰۹ d	۰/۹۲ ab	۰/۷۱ c
۳	**۱**	**۰/۶۱ a**	**۱/۰۶ a**	**۰/۷۱ c**
۴	۰	۰/۲۳ c	۰/۷۱ b	۰/۷۶ c
۴	۰/۵	۰/۱۴ cd	۰/۷۱ b	۰/۷۶ c
۴	۱	۰/۲۷ c	۰/۷۱ b	۰/۷۸ c

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.



نمودار ۱– درصد باززائی ریزنمونه های مختلف فلفل دلمه‌ای در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده های رشد ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA

در این تحقیق نشان داده شد ریزنمونه کوتیلدون مناسبترین ریزنمونه جهت باززائی فلفل دلمه‌ای در بین تمام ریزنمونه ها می باشد (نمودار ۱).

پس از گذشت ۲۰ روز از کشت، جوانه‌های جانبی باززائی شده به منظور افزایش رشد ساقه به محیط رشد طولی، محیط کشت همان محیط کشت پایه MS حاوی ۳ میلی

گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA و زغال فعال، منتقل شدند و جوانه ها رشد مناسبی از نظر طول ساقه، تعداد میانگره و ریشه‌زائی را نشان دادند. همچنین در همین محیط رشد طولی، ریشه‌زائی انجام گرفت(شکل ۴).

(a) (b)

شکل ۴- رشد ریزنمونه کوتیلدون باززائی شده در محیط رشد طولی ۱۵ روز (a) و ۳۰ روز (b) پس از کشت

جهت واکشت گیاهچه‌ها از بهترین محیط جاوی هورمون-های ۱ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA به همراه زغال فعال) 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 اتاق رشد فیتوترون برای سازگار شدن به محیط طبیعی، به گلخانه منتقل شدند (شکل ۵) . حدود ۹۵-۹۰ درصد از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت مورد اشاره، در شرایط گلخانه نیز زنده ماندند و رشد مطلوبی از خود نشان دادند.

(a) (b)

شکل ۵- گیاهچه فلفل دلمه‌ای حاصل از کشت بافت، سازگار شده در فیتوترون (a) و گیاهچه فلفل دلمه‌ای حاصل از کشت بافت در گلخانه (b).

بحث

تا کنون مطالعات زیادی در زمینه باززایی غیرمستقیم فلفل-دلمه‌ای با روش‌های متنوع کشت بافت گزارش نشده است (۸،۱۲،۱۹). در مطالعات و گزارشات، اثر نوع ارقام، هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف بر باززایی غیرمستقیم این گیاه مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. در این تحقیق نتایج نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون درصد بالائی از باززائی غیرمستقیم را در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA

نشان داد، در حالی که هیپوکتیل ریشه و نوک ساقه باززائی نداشتند و پس از مدتی تبدیل به کالوس سخت و در نهایت نکروزه شدند.

در ابتدای آزمایش استفاده از دو تنظیم کننده رشد 2,4- D و NAA به تنهائی در همه ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکتیل، ریشه و نوک ساقه منجر به تولید کالوس ترد و شکننده شد که این کالوس‌ها پس از انتقال به محیط حاوی اکسین وسیتوکنین هیچکدام باززائی را نشان ندادند و در نهایت قهوه ای شدند. که این نتیجه با نتایج تحقیقات Dix و Street (۱۱) که نشان دادند کشت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط MS حاوی 2,4-D منجر به تولید دو نوع کالوس قوی و شکننده شد که بعد از کشت دوباره قهوه ای شدند، مطابقت داشت. بهترین تیمار در این تحقیق که در آن ریزنمونه‌های کوتیلدون بیشترین باززائی را نشان دادند در محیط کشت MS به همراه هورمون‌های BAP (۳ میلی گرم در لیتر) و IBA (۱ میلی گرم در لیتر) بود که این پاسخ با گزارش Stripichitt و همکاران (۱۹) که نشان دادند کالوس‌های به وجود آمده از کوتیلدون که معمولا دارای جوانه‌های باززا شده هستند و در پاسخ به سطوح بالای اکسین به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکنین، معمولا BAP تولید می شوند، مطابقت داشت.

در آزمایش حاضر جوانه‌های باززائی شده پس از انتقال به محیط کشت حاوی تنظیم کننده های رشد BAP (۱میلی گرم در لیتر) و IBA (۰/۵ میلی گرم در لیتر) رشد طولی مناسبی از نظر افزایش طول ساقه و تعداد شاخساره نشان دادند که این گزارش با نتایج منتشر شده توسط Christopher و Rajam (۹) مطابقت ندارد. در تحقیقات این گروه در محیط دارای 2,4-D و Kin از جنین های زیگوتی کالوس‌هایی به دست آمد که توانایی تولید شاخساره های متعددی، که قادر بودند به گیاه کامل تمایز یابند، را داشتند. در مطالعه دیگر توسط Gunay و Rao (۱۲) بر روی *Capsicum annuum* نشان داده شد، تولید کالوس و افزایش شاخساره‌ها تنها در محیط MS حاوی BAP بدست آمده و Kin تاثیر چندانی نداشته است.

به عنوان یک نتیجه مهم در این آزمایش مشخص شده که هورمون BAP نقش بسزائی در باززائی داشت این نتیجه، با نتایج سایر مطالعات انجام شده توسط نیکخو و همکاران (۲) ، یاری و همکاران (۳) و شرفی و همکاران (۴) مطابقت دارد. نقش BAP درتحریک فاز جوانه‌زنی یا باززائی تایید شده و در این راستا نشان داده شده است که استفاده از BAP در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر بهترین تیمار جهت باززایی فلفل از ریزنمونه‌های نوک ساقه می-باشد (۱۰). حدود ۹۵-۹۰ درصد از ریزنمونه‌های باززایی شده که پس از ریشه‌زایی جهت مقاوم سازی به فیتوترون و سپس به محیط گلخانه منتقل شدند دارای رشد مطلوبی بودند.

تشکر و قدردانی

شایسته است از مدیریت محترم و همچنین عوامل اجرائی پژوهشکده به پاس فراهم نمودن امکان اجرای این طرح همکاری صمیمانه‌ای داشتند نهایت سپاس و تشکر را داشته باشیم.

منابع

۱- دانشور، م. ح. ۱۳۷۹. پرورش سبزی ها. انتشارات دانشگاه شهید چمران. ۴۶۱ صفحه.

۲- نیکخو، ه. محمدی، ع. رهنما، ح. و عباس زاده، ب. ۱۳۹۰. بهینه سازی محیط کشت گیاه فلفل دلمه ای در شرایط درون شیشه ای. مجله زراعت و اصلاح نباتات. ۷(۱): ۱-۱۱.

۳- یاری، ف . موسوی، ا . مستوفی، ی . سیدی، س. م. زمانی، ذ. ا. و لایمر، م. 1392. اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی و نوع کلات آهن بر پرآوری و ریشه زایی درون شیشه ای سه رقم گل سرخ شاخه بریده (*Rosa hybrida* L.). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۶ ، شماره ۱.

۴- شرفی، ع. هاشمی سهی ، ه. و جورابچی، ع. ۱۳۸۷. بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua*. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۱ ، شماره ۴.

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

6- Alibert, O. 1990. Essais de regeneration par organogenes e chez le piment (*Capsicum annuum*L.), Memoire pour'l'obtention duD.E.S.S. De Productivite Vegetale. Universite Paris. Stationd'Amelioration des Plantes, , pp. 37.

7- Arous, S., Boussaïd, M. and Marrakchi, M., 2001. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.), J. Appl. Hort, 3, 17-22.

8- Ashrafuzzaman, M., Hossain, M.M., Razi, I. M., Shahidul H. M., Shahidullah, S.M. and Shahin, z., 2009. Regeneration potential of seedling explants of chilli (*Capsicum annuum*), Afr. J. Biotechnol, 8,591–596.

9- Christopher, T., and Rajam, M. V., 1994. *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell Tiss Organ Cult, 38, 25-29.

10- 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.

11- Dix, P. J., and Street, H. E., 1975. Sodium chloride resistant cultured cell lines from Nicotiana synastris and *Capsicum annuum*, Plant Science Letters, 5, 231-237.

12- 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.

13- Franck-Duchenne, M., Wang, Y., Ben Tahar, S. and Beachy, R.N., 1998. *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide, Plant Cell Tissue Organ Culture, 53,79-84.

14- Jayashankar, S., 1998. Comparison of different *In vitro* regeneration and generic transformation strategies for chilli pepper (*Capsicum annuum* L.), Ph. D. Dessertation, New Mexico State University, Las Cruces.

15- Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S. and Ochoa-Alejo, N., 2010. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis, Biotechnol Adv, 28, 35–48.

16- Lee, Y.H., Kim, H.S., Kim, J.Y., Jung, M. Park, Y.S. and Lee J.S., 2004. A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation, Plant Cell Rep, 23, 50–8.

17- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Plant physiology, 15, 473–497.

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

19- Stripichitt, P., and Nawata, E., 1987 *In vitro* shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa), Japanese J Breeding, 37.

20- Yeung E., 1984. Histological and histochemical staining procedures. In: Vasil IK. (eds). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando Florida: Academics press. 689-697.

Investigation of callus and organogenesis of indirect plant (*Capsicum annuum* L.) under tissue culture condition

Otroshy M. and Moradi K.

Plant Tissue Culture Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The study was carried out to determinate the best combination of plant growth regulators during indirect explants regeneration on callogenesis of *Capsicum annuum*. Effects of different concentrations and combination of auxins (NAA, IBA and 2, 4- D) and cytokinins (BAP and Kin) in MS medium were evaluated on indirect regeneration of cotyledonary, hypocotyle, root and shoot tip explants. Regeneration of cotyledon derived calli and elongation of regenerated shoots showed the best results in MS medium supplemented with 3 $mg.l^{-1}$ BAP and 1 $mg.l^{-1}$ IBA. Also elongated shoots were mostly rooted on the same MS medium containing activated charcoal. After acclimatization, 90-95% of the rooted plantlets were transferred to the greenhouse condition and grew normally.

Key words: indirect regeneration, callus induction, (*Capsicum annuum* L.), explants, growth regulators.