تأثیر ریزنمونه، ترکیب هورمونی و ژنوتیپ در ریزازدیادی فلفل

زهره محب محمدی[۱]، مجید طالبی[۱*]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۱] و غزاله خاکسار[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۵)

چکیده

فلفل (*Capsicum annuum*) به‌طور عمده از طریق بذر تکثیر می‌گردد. در ایران، از بذر هیبرید فلفل استفاده می‌شود که یک محصول وارداتی است. از آنجا که جوانه‌زنی بذر فلفل‌های گلخانه‌ای و تثبیت گیاهچه آنها زمان زیادی نیاز دارد، فن کشت بافت امکان تولید سریع تعداد کثیری گیاه که از لحاظ ژنتیکی مشابه هستند را فراهم می‌کند. در این تحقیق، تأثیر ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر کالوس‌دهی و باززایی گیاه کامل ارزیابی شد و بهترین ترکیب محیط کشت و ریزنمونه جهت ریزازدیادی ارقام تجاری فلفل در ایران ارائه گردید. نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع ژنوتیپ، اثر متقابل ریزنمونه و تیمار هورمونی، اثر متقابل این دو عامل با عامل ژنوتیپ روی صفات مورد ارزیابی را در سطح ۱٪ معنی‌دار نشان داد. براساس نتایج این مطالعه، ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون در ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر IAA + ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP جهت ریزازدیادی فلفل مناسب تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد به منظور ریزازدیادی فلفل در مقیاس وسیع در گلخانه، استفاده از ریزنمونه برگ با توجه به تعداد بیشتر آن در گیاه، مقرون به صرفه‌تر باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، کالوس‌دهی، جوانه‌دهی، باززایی

مقدمه

فلفل گیاهی با موارد مصرف متنوع نظیر افزودنی‌های غذایی، طعم دهنده‌ها، معطر کننده غذا و استفاده‌های دارویی است، که بذرهای هیبرید و نسل F۱ حاصل از ژنوتیپ‌های خاص آن عمدتاً به‌صورت وارداتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، دست‌ورزی ژنتیکی و تکثیر گیاهان تراریخت مبتنی بر توانایی باززایی سلول‌های دست‌ورزی شده است. از آنجایی که جوانه‌زنی بذر فلفل و تثبیت گیاهچه آن زمان زیادی نیاز دارد (۱) استفاده از کشت بافت در تولید نشای فلفل حائز اهمیت است. چرا که از اهداف تکثیر درون شیشه‌ای سبزی‌ها می‌توان به تولید سریع شمار زیادی ریزنمونه از گونه‌هایی که تولید بذر آنها مشکل است، تکثیر یکنواخت ریزنمونه‌هایی که از نظر ژنتیکی مشابهند، تولید گیاهان عاری از ویروس و بهنژادی گیاهان تغییر یافته ژنتیکی اشاره کرد (۱).

تحقیقات نشان داده که قابلیت اندام‌زایی در ژنوتیپ‌های مختلف (۹، ۱۱، ۲۱ و ۲۲) و محیط‌های کشت مختلف (۱۱، ۱۸ و ۲۱) به‌طور مشهودی متفاوت است. اندام‌زایی به واسطه تیدیازورون (TDZ) در ده کولتیوار مختلف فلفل به‌طور خاص بسته به نوع ژنوتیپ گزارش شده است. از ده ژنوتیپ *C.annuum* واریته‌های CA960، G4 و X-235 حداکثر تعداد

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

ساقه نابجا را تولید کردند (۲۳). در مطالعه دیگری، کشت درون شیشه‌ای شش کولتیوار کشت شده در مزارع مختلف متعلق به گونه‌های *C. annuum*، *C. chinense* و *C. frutescense* بررسی شد که بیشترین تعداد جوانه در هر ریزنمونه متعلق به کولتیوار Umorok در گونه *C. chinense* بود (۲۰).

رشد و ریخت‌زایی گیاهان تحت شرایط درون شیشه‌ای به میزان زیادی تحت تأثیر انتخاب مناسب ریزنمونه قرار می‌گیرد (۱۵). در پژوهشی، ریزنمونه‌های برگ جوان همه کولتیوارها، باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های کوتیلدون نشان داده‌اند (۱۶). علاوه بر این، تحریک کالوس‌دهی و تشکیل ساقه در ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل *C. annuum* بیشتر از ریزنمونه نوک ساقه گزارش شد (۷). در آزمایش دیگری، نشان داده شد که کوتیلدون قابلیت باززایی بهتری نسبت به هیپوکوتیل دارد (۱۴). علاوه بر نوع ریزنمونه و ژنوتیپ گیاه، ترکیب هورمونی محیط کشت نیز اثر به‌سزایی بر موفقیت باززایی دارد.

در سال‌های اخیر، تأثیر هورمون‌های اکسین، سیتوکینین و دیگر هورمون‌ها در باززایی ساقه گونه‌های *Capsicum* مطالعه شده است (۱۵). گونی و رائو (۱۴) برای اولین بار ترکیبات هورمونی مختلف را برای بررسی اندام‌زایی در کولتیوارهای کالیفرنیا واندر و پیمنتو در *C. annuum* و هیبریدی از *C. frutscense* با استفاده از ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط کشت پایه MS حاوی هورمون‌های اکسین نظیر IAA، NAA و 2.4.D و سیتوکینین مانند BA, Kin, Zea و ۶- بنزیل ۹- تترا هیدروپیران آدنین، آدنین و شیره نارگیل بررسی کردند و مشخص شد که در هر سه نوع ژنوتیپ، BA باعث تحریک جوانه‌زایی ساقه در ریزنمونه کوتیلدون می‌گردد. اما بیشترین باززایی ساقه در محیط حاوی ۵/۷-۲/۸ میکرومولار IAA و ۸/۸ میکرومولار BA حاصل شده است. زآتین فقط در کوتیلدون رقم هیبرید، جوانه‌زنی را تحریک نمود و ریشه‌دهی در ترکیب ۲/۸۵-۵/۷۱ میکرومولار IAA یا ۵/۳۷ میکرومولار NAA، بهتر صورت گرفت (۱۴). نتایج اگراوال و همکاران (۵) نشان داد که ترکیب IAA و BA برای تحریک تولید جوانه ساقه از دیگر اکسین‌ها نظیر IBA، NAA و 2.4.D بهتر عمل می‌کند (۵). بازده کشت بافت در جنس *Capsicum* نسبتاً کندتر از دیگر اعضای خانواده سولاناسه بوده است که به‌علت طبیعت سخت پاسخ‌دهی، وابستگی ژنوتیپی زیاد و تشکیل ساقه‌های روزت می‌باشد (۱۵).

تقریباً همه ارقام تجاری فلفل تحت کشت در ایران، هیبریدهای وارداتی نسل F1 می‌باشند و استفاده از بذرهای گیاهان F1 سبب تفرق صفات می‌شود. بنابراین، سالانه ارز زیادی از کشور خارج می‌گردد. از طرفی، اصلاح نباتات و فناوری DNA نوترکیب و انتقال ژن به یافتن روش‌های قابل اعتماد برای تکثیر و باززایی گیاهان نیاز دارد. بنابراین، در این تحقیق، باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون و برگ ۱۵ ژنوتیپ تجاری *C. annuum* با تیمارهای هورمونی مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این تحقیق، تولید کالوس فعال و یافتن روشی جهت باززایی و بررسی تأثیر محیط‌های کشت مختلف، ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه در ریزازدیادی فلفل در مقیاس وسیع در گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، بذرهای ۱۲ ژنوتیپ تجاری مهم فلفل دلمه‌ای با رنگ‌های متنوع، دو ژنوتیپ فلفل قلمی شیرین و یک ژنوتیپ فلفل زینتی (جدول ۱) استفاده شد. ضدعفونی بذرها، در آب استریل حاوی هیپوکلریت سدیم (۲/۵٪ کلر فعال) و ۶ میکرولیتر توئین ۱۰٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت پایه MS حاوی ۶ گرم بر لیتر آگار و ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز با pH برابر ۵/۸ در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. بذرهای کشت شده ۷-۱۰ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۴ °C در اتاق رشد نگهداری شدند. حدود ۱۵-۲۰ روز پس از کشت بذرها، ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون از گیاه والد جدا و در محیط‌های کشت حاوی تیمارهای هورمونی مختلف (جدول ۲)، در سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار کشت

جدول ۱. انواع ژنوتیپ‌های تحت آزمایش

ژنوتیپ	نوع فلفل	خصوصیات گیاه
گانگا	فلفل فضای سبز (زینتی)	سرعت رشد بالا
هلسینکی	فلفل بلوکی زرد	قدرت باردهی بالا- مقاوم به سفیدک پودری و ویروس Tm:2- هیبرید
هورا	فلفل بلوکی قرمز	هیبریدF_1
زامبونی	فلفل بلوکی قرمز	میوه‌دهی مناسب در آب و هوای گرم- مقاوم به Tm:2 و F_1-TSWV
آرانکیا	فلفل بلوکی نارنجی	دارای مقاومت به ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی نژاد ۳ و پژمردگی خالدار گوجه‌فرنگی- هیبریدF_1
لیریکا	فلفل بلوکی زرد	مقاوم به سفیدک TSWV، PVY و TMV3. هیبریدF_1
۳۵-۹۰۶آر.زد	فلفل بلوکی قرمز	هیبریدF_1
الیت	فلفل بلوکی سبز	هیبریدF_1
مازورکا	فلفل بلوکی قرمز	مقاوم به لکه تلخ- مقاوم به موزاییک گوجه‌فرنگی. هیبرید F_1
دمره سرویزیه	فلفل سبز قلمی	هیبریدF_1
ماکسی مالیا	فلفل بلوکی نارنجی	هیبریدF_1
موزی	فلفل کشیده سبز روشن	هیبریدF_1
ارنج مکس	فلفل بلوکی نارنجی	هیبریدF_1
بومی	فلفل بلوکی سبز	–
هانی	فلفل بلوکی قرمز	هیبریدF_1

جدول ۲. تیمارهای هورمونی اعمال شده برای ریشه‌زایی

تیمار هورمونی	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	IBA (mg/L)
۱	۱	۰	۰
۲	۰	۰	۱
۳	۰	۱	۰
۴	۰/۵	۰	۰
۵	۰/۵	۰/۵	۰
۶	۰/۱		۰/۰۵

شدند. ریزنمونه‌ها در شرایط دمایی $^{\circ}C$ ۲±۲۴ و به‌مدت دو هفته در تاریکی کامل نگهداری شدند؛ سپس در شرایط ۱۶ ساعت نور قرار گرفتند. پنج صفت مختلف شامل میزان کالوس‌دهی در دوره زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت با مقیاس استاندارد هوکرونی برز (۴)، درصد باززایی پس از ۲۰ روز و تعداد گیاهان باززا شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به منظور طویل شدن ساقه‌های روزت، از مقادیر ۱-۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین استفاده شد. پس از طویل شدن ساقه‌ها، محیط‌های کشت

مختلف (جدول ۲) و دماهای ۲۵ °C و ۲۸ °C جهت ریشه‌زایی ارزیابی و در نهایت بعد از سازگاری گیاهان باززا شده، به گلدان منتقل شدند. کلیه آزمایش‌ها در پایه طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل توسط برنامه‌های نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری گردید.

نتایج و بحث

ریزنمونه برگ و کوتیلدون ابتدا در محیط MS فاقد هورمون کمی متورم شده و بعد از حدود دو هفته کالوس ضعیف زرد رنگی در ناحیه اطراف دمبرگ ایجاد و در نهایت ریزنمونه‌ها زرد شده و از بین رفتند. تاکنون نیز هیچ گزارشی مبنی بر باززا شدن گیاه فلفل از ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون در محیط بدون هورمون ارائه نشده است.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان کالوس‌دهی، جوانه‌زنی و تولید گیاه کامل

در ایجاد توده کالوس، ترکیب هورمونی ۳ mg/L BAP و ۱ mg/L IAA بهتر عمل کرد. این اثر مثبت در افزایش حجم کالوس تا حدود ۳۰ روز نیز دیده شد. سرعت جوانه‌زنی در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت (شکل ۱- الف). تیمار هورمونی ۵ mg/L BAP +۱ mg/L IAA سبب کالوس‌دهی کمتری شد. اما در باززایی، بهتر از ترکیب هورمونی BA و NAA عمل کرد. نتایج نشان داد که وجود هورمون NAA بیشتر باعث افزایش تولید کالوس می‌گردد و در جوانه‌زنی و باززایی کمتر ایفای نقش نمود (جدول ۳).

گونی و رائو (۱۴) بهترین باززایی ساقه را در ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط BAP +۱-۰/۵ mg/L IAA ۲ mg/L گزارش کردند (۱۴). بنابراین، ترکیب سیتوکنین BAP و اکسین طبیعی IAA در تولید جوانه و اندام‌زایی نقش مؤثری دارد؛ چنین اثر توأم BA و IAA توسط بریکوسکی و همکاران (۸) نیز عنوان شده است. در تحقیق دیگری، تشکیل کالوس در غلظت‌های مختلف BAP تفاوت معنی‌دار نداشته است.، ولی این هورمون نسبت به Kin قدرت بیشتری در تشکیل کالوس داشته، به‌طوری‌که با تیمار ۵ mg/L BAP +۱ mg/L IAA حدود ۸۰٪ ریزنمونه‌ها تولید کالوس کرده‌اند (۷). برخلاف نتیجه مزقانی و همکاران (۱۷) مبنی بر این که BA بیشتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر باعث اثر سمی روی پریموردیوم ساقه می‌شود و باززایی کمی ایجاد می‌کند، در این تحقیق BAP ۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر همراه با اکسین IAA تأثیر مثبت در باززایی از کالوس داشته است.

نتایج میانگین اندازه کالوس در روز دهم کشت بافت نشان داد که تیمار هورمونی۳ میلی‌گرم در لیتر BA توانایی کافی در تولید کالوس ابتدایی نداشته، ولی با گذشت زمان میزان کالوس افزایش یافت. میزان جوانه‌زنی کالوس در این محیط کم بود و اکثر کالوس‌ها به سمت آبکی شدن پیش رفتند و در نهایت تعداد جوانه باززای کمی تشکیل شد. این در حالی است که اگراوال و همکاران (۵) گزارش کردند که BAP به تنهایی در همه ریزنمونه‌ها باعث جوانه‌زایی مستقیم می‌گردد. بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک گیاه که به رشد و تمایز منجر می‌شوند، دارای الگوی هورمونی در سیستم متابولیسمی هستند و این الگوهای هورمونی خود تحت کنترل سیستم ژنتیک گیاه قرار دارند (۲). در نتیجه، به نظر می‌رسد که اثر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق باعث چنین تأثیری شده باشد.

نتایج نشان داد تیمارهای هورمونی مقادیر ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، با وجود این که حجم کالوس زیادی تولید کردند، اما در تعداد جوانه و میزان باززایی کمتر از تیمار هورمونی ۱ و ۲ (۵ mg/L هورمون BA) عمل نمودند. علی‌رغم نتایج تحقیق حاضر، تیمار ۱ mg/L BAP +۰/۱ mg/L NAA در کشت بافت فلفل تونسی سبب افزایش اندام‌زایی و نمو ریزنمونه‌ها شد (۶). اما اغلب گزارش‌ها تأثیر BA و IAA را در باززایی فلفل کارآمدتر دانسته‌اند (۵، ۱۴ و ۱۷). البته همانطور که نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد در ۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با NAA میزان کالوس‌دهی و باززایی زیاد می‌باشد. در این تحقیق، محیط حاوی کاینتین در ترکیب با BA و IAA باعث افزایش حجم

الف ب ج

شکل ۱. تأثیر تیمارهای هورمونی مختلف بر تولید کالوس و باززایی آن در رقم لیریکا: الف) میزان کالوس و جوانه‌زنی در تیمار mg/L ۳ BAP+ mg/L IAA ۱، ب) تأثیر تیمار هورمونی mg/L IAA ۱+ mg/L BAP ۲+ mg/L Kin ۱ بر میزان جوانه‌زنی و ج) تأثیر تیمار NAA mg/L ۰/۱ + mg/L BAP ۱بر میزان جوانه‌زنی

جدول ۳. تیمارهای هورمونی مورد استفاده در ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون و تأثیر ریزنمونه و نوع تیمار بر صفات مورد ارزیابی

ریزنمونه	تیمار	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	Kin (mg/L)	میانگین تولید کالوس (مقیاس هوکرونی برز)	۱۰ روز	۲۰ روز	۳۰ روز	تعداد جوانه	باززایی
برگ	۱	۵	–	۱	–	۴/۸۶^{b}	۱۰/۰۹^{d}	۱۲/۷۲^{ed}		۸/۲۷^{b}	۱۶/۲۶^{a}
	۲	۵	۰/۱	–	–	۵/۳۲^{a}	۹/۴۹^{d}	۱۱/۵۲^{f}		۷/۵۵^{c}	۱۲/۵۱^{c}
	۳	۳	–	–	–	۱/۵۱^{f}	۱۰/۱۵^{d}	۱۲/۹۴^{d}		۲/۸۸^{f}	۶/۹۱^{e}
	۴	۱	۰/۱	–	–	۴/۲۱^{cd}	۱۴/۳۰^{a}	۱۶/۶۹^{a}		۲/۰۰^{g}	۳/۲۷^{f}
	۵	۲		۱	۱	۳/۱۰^{e}	۱۳/۸۴^{ab}	۱۴/۶۵^{c}		۱/۹۶^{g}	۶/۳۴^{e}
کوتیلدون	۱	۵	–	۱	–	۳/۹۰^{d}	۱۰/۰۳^{d}	۱۰/۱۶^{g}		۴/۲۹^{d}	۱۳/۶۱^{b}
	۲	۵	۰/۱	–	–	۴/۴۳^{c}	۱۲/۰۲^{c}	۱۲/۱۳^{ef}		۳/۳۶^{e}	۸/۶۶^{d}
	۳	۳	–	۱	–	۵/۰^{ab}	۱۳/۱۸^{b}	۱۵/۶۹^{b}		۱۲/۴۶^{a}	۱۵/۷۲^{a}

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف یکسان می‌باشند در سطح ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌دار ندارند.

کالوس شده، ولی در تولیدجوانه ساقه‌زا نقش چندان مؤثری ندارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر ریزازدیادی *C. frutescens* انجام شد، نتایج مشابه با تحقیق حاضر به‌دست آمد (۱۹). زمانی‌که مقدار هورمون BAP، پنج برابر Kin بود، بیشترین تعداد ساقه حاصل گشت. ولی در صورتی‌که میزان BAP دو برابر Kin بود، باززایی کاهش یافت.

به‌طورکلی، علاوه بر نوع تنظیم‌کننده رشد، نسبت سیتوکنین به اکسین هم بسیار مهم است و در باززایی نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۳). به‌عنوان مثال، گزارش شده که در کشت کوتیلدون فلفل اگر مقدار BA نسبت به IAA معادل ۰/۷ باشد، بیشترین درصد کالوس‌زایی و در صورتی‌که مقدار BA حدود ۱/۵ تا ۴ برابر میزان IAA باشد بیشترین اندام‌زایی حاصل می‌گردد (۱۷).

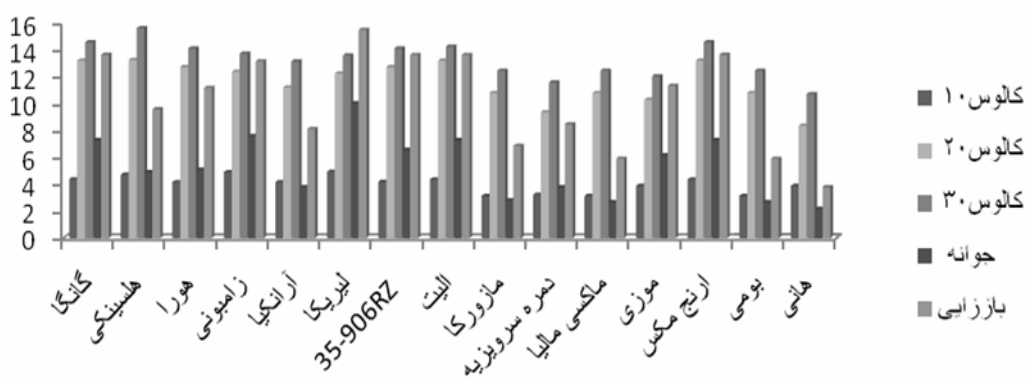
اثر ژنوتیپ‌های مختلف

نتایج تجزیه واریانس در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه در هر دو ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمارهای

جدول ۴. مقایسه میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی

منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه کالوس (مقیاس هوکرونی برز)			تعداد جوانه ۲۰ روز	میزان باززایی
		۱۰ روز	۲۰ روز	۳۰ روز		
رقم	۱۴	۹/۴۸**	۵۶/۹۸**	۴۳/۲۷**	۱۳۱/۳۶**	۶۵/۶۲**
ریزنمونه × هورمون	۷	۶۸/۶۱**	۱۶۹/۱۲**	۲۱۷/۹۰**	۶۲۹/۱۷**	۳۳۱/۶۶**
رقم × ریزنمونه × هورمون	۹۸	۴/۱۱**	۱۴/۳۷**	۱۵/۶۳**	۲۸/۲۰**	۱۰/۱۰**
CV	۲۴۰	۰/۹۵	۲/۶۶	۳/۶۹	۱/۳۱	۳/۶۳

**: معنی‌دار در سطح ۱٪



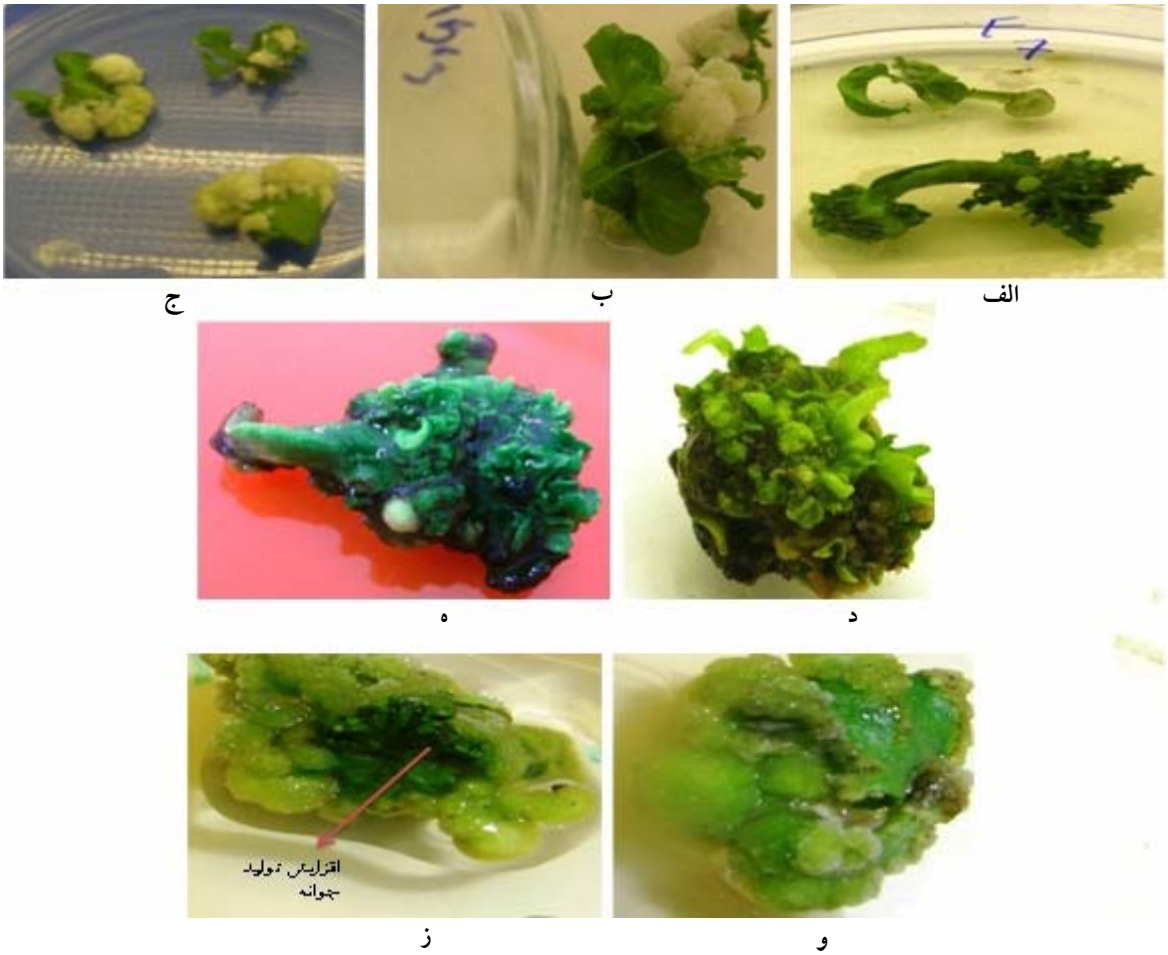
شکل ۲. تفاوت ژنوتیپ‌ها در صفات مورد ارزیابی

اعمال شده نشان داد. این تفاوت در میزان کالوس‌دهی، جوانه‌زنی و باززایی مشاهده گردید (جدول ۴). طبق نتایج به‌دست آمده، در بعضی ژنوتیپ‌ها توده سلولی کالوس سریع‌تر شکل می‌گیرد (شکل‌های ۱، ۳ و ۴)، در حالی‌که ارقامی مثل مازورکا، دمره سرویزیه، ماکسی مالیا، بومی و ارقامی بعد از ۱۰ روز کالوس بسیار ضعیفی تشکیل می‌دهند یا در بعضی تکرارها هنوز وارد فاز کالوس نشده‌اند (شکل ۲).

یکی از مشکلات ارائه یک راهکار عملی جهت ریزازدیادی *C. annuum* وابستگی ژنوتیپی شناخته شده است (۱۵). نتایج این پژوهش نشان داد که هم سرعت رشد کالوس و هم توانایی تشکیل جوانه تحت کنترل ژنوتیپ گیاه مادری می‌باشد (شکل‌های ۳- الف، ب و ج). این مطلب با مطالعات سایر محققین مطابقت دارد (۹ و ۲۱). اوچوآ- آلخو و رامیرز- مالاگون (۱۸) پس از بررسی باززایی ۱۶ کولتیوار فلفل تند، اختلاف در میزان جوانه‌زنی و اندام‌زایی را ناشی از تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف گزارش نمودند. در تحقیق ازورا و همکاران (۱۱) روی کشت بافت ۱۴ رقم فلفل دلمه‌ای، تشکیل جوانه در ارقام مختلف از ۸۷٪ تا ۹٪ متفاوت بود. اکثر پژوهش‌های جدید در مورد ریزازدیادی فلفل نیز بر دخالت ژنوتیپ بر قابلیت اندام‌زایی اذعان دارند (۸، ۱۷، ۲۰ و ۲۲). تفاوت ژنوتیپ در تولید کالوس و جوانه‌زنی به‌طور معمول به ژن‌های هسته‌ای، سیتوپلاسمی، یا برهمکنش آنها و اثر متقابل بین ژنوتیپ گیاه و محیط کشت نسبت داده می‌شود. وابستگی ژنوتیپی هم‌چنین می‌تواند در نتیجه اثر ثانویه فعالیت ژن نیز باشد. ژن‌های مؤثر در تغییر نمو گیاه معمولاً از طریق تنظیم سطوح مواد تنظیم‌کننده رشد درون‌زا عمل می‌کنند (۱۲).

بررسی اثر متقابل ریزنمونه و تیمار هورمونی

اثر متقابل ریزنمونه و تیمار هورمونی در همه صفات مورد مطالعه بررسی گردید و نتایج تجزیه واریانس نشان داد که این



شکل ۳. الف، ب و ج) میزان جوانه‌زنی در رقم ۳۵-۹۰۶، رقم بومی و مازورکا از ریزنمونه کوتیلدون (از راست به چپ)؛ د) میزان جوانه‌زنی در تیمار ۵ mg/L BAP +۱ IAA mg/L ریزنمونه برگ؛ ه) میزان جوانه‌زنی در تیمار هورمونی ۳ mg/L BAP +۱ IAA mg/L در ریزنمونه کوتیلدون؛ و و ز) تأثیر زآتین در افزایش میزان جوانه‌زنی (و: رشد در محیط بدون زآتین، ز: رشد کالوس در محیط حاوی زآتین)

اثر در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۴). بالاترین سرعت تشکیل کالوس در ریزنمونه برگ و تیمار هورمونی ۵ mg/L BAP +۱ mg/L IAA صورت گرفت. ریزنمونه برگ و تیمارهورمونی ۱ mg/L BAP +۰/۱ mg/L NAA نیز بیشترین حجم کالوس بعد از ۲۰ روز و ۳۰ روز را به خود اختصاص داد. به نظر می‌رسد ریزنمونه برگ در تولید کالوس نسبت به ریزنمونه کوتیلدون بهتر است. بیشترین میزان جوانه در ریزنمونه کوتیلدون و تیمار ۳ mg/L BAP +۱ mg/L IAA حاصل شد (جدول ۵). بیشترین میزان اندام‌زایی در ریزنمونه برگ و تیمار ۵ mg/L BAP +۱ mg/L IAA و در ریزنمونه کوتیلدون و تیمار ۳ mg/L BAP +۱ mg/L IAA به‌دست آمد (شکل‌های ۳- د و ه).

وجود اختلاف معنی‌دار در اثر متقابل ریزنمونه و هورمون در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (۳، ۵ و ۲۲). از جمله، در تحقیقی روی ریزنمونه‌های مختلف فلفل نظیر ریشه، کوتیلدون، میانگره‌های ساقه، برگ و نوک ساقه مشخص شد که با افزایش غلظت BA در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون جوانه ساقه مستقیماً تشکیل می‌شود، ولی در برگ به سمت کالوس‌دهی پیش می‌رود (۵). اخیراً مقایسه باززایی هیپوکوتیل و کوتیلدون فلفل نشان داد که هیپوکوتیل باززایی بیشتری در

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون و ریزنمونه روی صفات مورد ارزیابی

اثرمتقابل هورمون و ریزنمونه	کالوس ۱۰روز	کالوس ۲۰ روز	کالوس ۳۰ روز	تعداد جوانه	میزان باززایی
a_1b_1	۴/۸۶^{b}	۱۰/۰۹^{d}	۱۲/۷۲^{ed}	۸/۲۷^{b}	۱۶/۲۶^{a}
a_1b_2	۵/۳۲^{a}	۹/۴۹^{d}	۱۱/۵۲^{f}	۷/۵۵^{c}	۱۲/۵۱^{c}
a_1b_3	۱/۵۱^{f}	۱۰/۱۵^{d}	۱۲/۹۴^{d}	۲/۸۸^{f}	۶/۹۱^{e}
a_1b_4	۴/۲۱^{cd}	۱۴/۳۰^{a}	۱۶/۶۹^{a}	۲/۰۰^{g}	۳/۲۷^{f}
a_1b_5	۳/۱۰^{e}	۱۳/۸۴^{ab}	۱۴/۶۵^{c}	۱/۹۶^{g}	۶/۳۴^{e}
a_2b_1	۳/۹۰^{d}	۱۰/۰۳^{d}	۱۰/۱۶^{g}	۴/۲۹^{d}	۱۳/۶۱^{b}
a_2b_2	۴/۴۳^{c}	۱۲/۰۲^{c}	۱۲/۱۳^{ef}	۳/۳۶^{e}	۸/۶۶^{d}
a_2b_3	۵/۰۰^{ab}	۱۳/۱۸^{b}	۱۵/۶۹^{b}	۱۲/۴۶^{a}	۱۵/۷۲^{a}

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف یکسان می‌باشند در سطح ۵٪ آزمون LSD معنی‌دار نیستند.

a_1: ریزنمونه برگ، a_2: ریزنمونه کوتیلدون. b: سطوح مختلف هورمونی؛ b_1: ۵ mg/L BAP +۱ IAA mg/L، b_2: ۰/۱ NAA mg/L + ۵ mg/L BAP، b_3: در ریزنمونه برگ ۳ mg/L BAP، b_3: در ریز نمونه کوتیلدون ۳ mg/L BAP +۱ IAA mg/L، b_4: NAA mg/L ۰/۱ + ۱ mg/L BAP، b_5: ۱ mg/L Kin +۲ mg/L BAP+۱ mg/L IAA

تیمارهای هورمونی مشابه دارد (۲۲). چنین به نظر می‌رسد که اندام‌های جوان باززایی بهتری نسبت به اندام‌هایی مسن‌تر دارند. شاید این به‌دلیل وجود تعداد سلول دارای قابلیت تولید گیاه کامل بیشتر، فعالیت میوزی بالاتر و تولید هورمون‌ها در اندام‌های جوان باشد. به‌عنوان مثال، به‌طور معمول سیتوکنین در اندام‌های جوان بیشتر تولید می‌شود (۳).

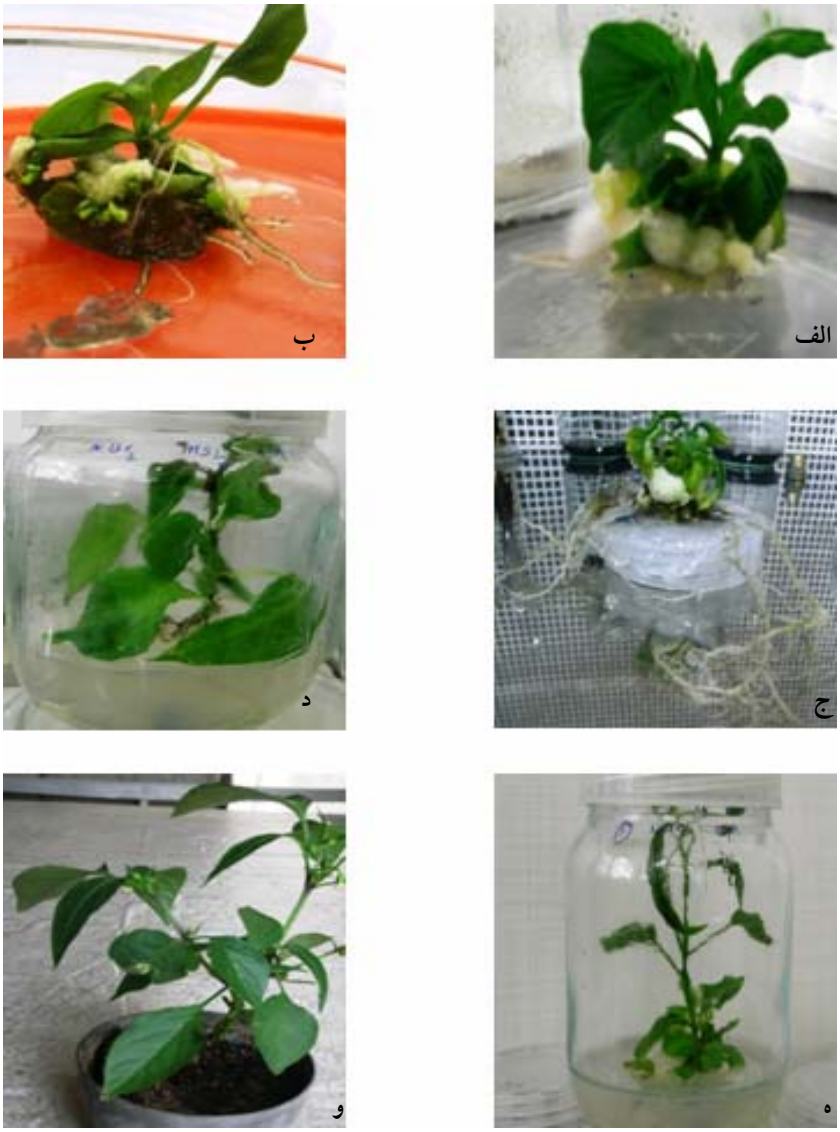
تیمار هورمونی مناسب جهت افزایش جوانه‌زنی

مشاهدات نشان داد که افزودن حدود ۱۰ میلی‌گرم در لیتر Zea باعث افزایش جوانه‌دهی در کالوس‌های رشد یافته و مناسب می‌گردد (شکل‌های ۳- و و ز). در تحقیقی بر ریزازدیادی فلفل گزارش شده که این ترکیب هورمونی باعث ایجاد حداکثر جوانه در کشت ریزنمونه نوک ساقه می‌گردد (۲۰). اثرهای مثبت این تیمار هورمونی در این تحقیق نیز مشهود بود، ولی از نظر آماری بررسی نگردید.

تیمار هورمونی جهت طویل شدن جوانه‌ها

یکی از مشکلاتی که همواره در مسیر تولید گیاهچه باززاشده در جنس *Capsicum* وجود داشته، ایجاد جوانه‌های رزت و درهم فشرده بوده است. به منظور طویل شدن جوانه‌های اندام‌زا، به‌طور معمول از تیمار هورمونی ۱ mg/L IAA +۱ mg/L GA3+ ۳ BAP استفاده می‌شود. در چندین مطالعه از GA3 هم جهت طویل شدن جوانه‌ها و هم رشد مداوم مفید، استفاده شده است (۶، ۱۰ و ۱۶). در این تحقیق نیز جوانه‌های رشد کرده در محیط حاوی جیبرلین از حالت روزت خارج شدند و تولید ساقه نمودند (شکل‌های ۴- الف و ب). ریشه‌زایی از سلول‌های مریستمی کالوس معمولاً تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله تغییرات املاح معدنی، نوع قند، تنظیم‌کننده‌های رشد، دما و نور (۳) قرار می‌گیرد.

در این تحقیق، آزمایش‌هایی جهت یافتن محیط کشت مناسب جهت ریشه‌زایی صورت گرفت. در مطالعه‌ای در تشکیل ریشه، هیچ وابستگی هورمونی شناخته نشد (۷). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که در تشکیل ریشه، دما بیش از تیمار هورمونی مؤثر است (شکل‌های۴- ب، ج، د و ه). بعد از مرحله ریشه‌دهی، به منظور بررسی رشد گیاهان باززا شده در محیط طبیعی حدود ۱۰ گیاه باززا شده بعد از سازگارسازی به گلدان



شکل ۴. الف) تأثیر جیبرلین بر طویل شدن جوانه‌ها از طریق تشکیل ساقه، ب) بررسی ریشه‌دهی در محیط MS پایه، ج) ریشه‌دهی در محیط MS حاوی NAA mg/L ۰/۵ (ایجاد ریشه طویل در گیاهچه‌های باززا شده در هر دو تیمار هورمونی در صورت قرار گرفتن در دمای ۲۸ °C)، د و ه) بررسی ریشه‌دهی دو رقم مشابه در محیط MS ۱/۲ و محیط MS حاوی NAA و IAA (شکل ه) و و) انتقال گیاه باززا شده به گلدان

منتقل شد که درصد زنده ماندن در گلدان حدود ۸۰٪ برآورد شد. این در حالی است که در مطالعه‌ای میزان زنده ماندن گیاهان باززا شدهٔ فلفل منتقل شده به خاک ۶۰٪ گزارش شده است (۲۲).

به‌طور معمول، ریشه‌هایی که به بافت کالوس متصل بودند هنگام قرار گرفتن در گلدان از گیاه جدا شده و گیاه خشک می‌گردد. ولی گیاهانی که دارای ریشه متصل به بافت آوندی بودند رشد مناسبی در گلدان نشان دادند (شکل ۴- و).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی mg/L IAA ۱+mg/L BAP ۵ میزان باززایی بیشتری نشان داد. از آنجا که هر برگ گیاه رشد کرده در محیط کشت را می‌توان به

۲-۳ ریزنمونه تبدیل کرد و از طرفی هر گیاه تعداد زیادی برگ در مقایسه با کوتیلدون ایجاد می‌کند و با توجه به قیمت هر بذر وارداتی، به نظر می‌رسد کشت بافت فلفل از طریق برگ به منظور ریزازدیادی در مقیاس وسیع در گلخانه، مقرون به صرفه باشد.

منابع مورد استفاده

۱. جعفرنیا، س. و م. همایی. ۱۳۸۷. راهنمای جامع و مصور کشت گلخانه‌ای خیار، گوجه‌فرنگی، فلفل و توت فرنگی. انتشارات آموزشگاه کشاورزی سبز ایران.

۲. سید طباطبایی، ب. ا. و م. امیدی. ۱۳۸۸. کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران.

۳. نوری قنبلانی، ق. ۱۳۷۱. تجربیاتی در زمینه کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه تبریز.

۴. مهرابی، ع. ا.، م. امیدی، ب. ا. سید طباطبایی، ع. ا. شاه نجات بوشهری و ر. توکل افشاری. ۱۳۸۱. بررسی کشت بافت و اثر کشت همجواری ریزنمونه‌ها در کلزا (*Brassica napus* L.). مجله علوم کشاورزی ایران ۳۳: ۶۲۷-۶۳۵.

5. Agrawal, S., N. Chandra and S.L. Kothari. 1989. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania). Plant Cell Tiss. Org. 16: 47-55.
6. Arous, S., M. Boussaid and M. Marrakchi. 2001. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.). J. Appl. Hort. 3: 17-22.
7. Ashrafuzzaman, M., M.M. Hossain, M. Razi Ismail, M. Shahidul Haque, S.M. Shahidullah and Sh. Uz-zaman. 2009. Regeneration potential of seedling explants of chili (*Capsicum annuum*). Afr. J. Biotechnol. 18: 591-596.
8. Borychowski, A., K. Niemirowicz-Szczytt and M. Jedraszko. 2002. Plant regeneration from sweet pepper *(Capsicum annuum* L.) hypocotyls explants. Acta Physiol. Plant. 24: 257-264.
9. Christopher, T. and M.V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell Tiss. Org. 46**:** 245-250.
10. Dabauza, M. and L. Pena. 2001. High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedlings explants. Plant Growth Regul. 33**:** 221-229.
11. Ezura, H., S. Nishimiya and M. Kasumi. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 12: 676-680.
12. Gahan, P.B. and E.F. George. 2008. Adventitious regeneration. PP. 355-402. *In:* George, E.F., M.A. Hall and G.J. Klerk (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, Springer Publishing, Dordrecht.
13. George, E.F. and P.C. Deburgh. 2008. Micropropagation: Uses and methods. PP. 29-64. *In*: George, E.F., M.A. Hall and G.J. Klerk (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, Springer Publishing, Dordrecht.
14. Gunay, A.L. and P.S. Rao. 1978. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Sci. Lett. 11: 365-372.
15. Kothari, S.L., A. Joshi, S. Kachhwaha and N. Ochoa-Alejo. 2010. Chilli peppers– A review on tissue culture and transgenesis. Biotechnol. Adv. 28: 35-48.
16. Kumar, V., A. Sharma, B.C.N. Prasad, S.B. Gururaj, P. Gridhar and G.A. Ravishankar. 2007. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill. influence of polyamines and polarity. Acta Physiol. Plant. 29: 11-18.
17. Mezghani, N., A. Jemmali, N. Elloumi, R. Gargouri-Bouzid and S. Kintzios. 2007. Morphohistological study on shoot bud regeneration in cotyledon cultures of pepper (*Capsicum annuum*). Biol. Bratislava. 62: 704-710.
18. Ochoa-Alejo, N. and R. Ramírez-Malagón. 2001. *In vitro* chili pepper biotechnology. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 37: 701-729.
19. Sanatombi, K. and G.J. Sharma. 2007. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. Sci. Hort. 113: 96-99.
20. Sanatombi, K. and G.J. Sharma. 2008. *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. Biol. Plant. 52: 141-145.
21. Szasz, A., G. Nervo and M. Fari. 1995. Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient regeneration using thidiazuron. Plant Cell Rep. 14: 666-669.

22. Valadez-Bustos, M.G., G. Carrillo-Castañeda, V.H. Aguilar-Rincón, A. Robledo-Paz, G.A. Aguado-Santacruz, E. Espitia-Rangel and S. Montes-Hernández. 2009. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum spp.*) plants from commercially important genotypes. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 45: 650-658.
23. Venkataiah, P., T. Christopher and K. Subhash. 2003. Thiadiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. J. Plant Biotechnol. 5: 245-250.