Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Micropropagation of Red Bell Pepper hybrid cultivar (*Capsicum annuum* L.) through *in vitro* axillary buds proliferation

Reza Amini Nasab[1], Raheem Haddad[*2], Amir Sahraroo[3], Ghasem-ali Garoosi[4]

1. Ph.D. Student of Plant Biotechnology, Dept. of Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail: re_amininasab@yahoo.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir
3. Assistant Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: asahraroo@gmail.com
4. Associate Prof., Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail: garoosi@eng.ikiu.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 05.31.2024
Revised: 06.15.2024
Accepted: 07.06.2024

Keywords:
Activated charcoal,
Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.),
Plant growth regulators,
Proliferation,
Single node culture

ABSTRACT

Background and Objectives: Production of agricultural crops using imported seeds, causes currency to leave the country and increase the cost of production. In Iran, Bell Pepper as an important vegetable crop with high nutritional and medicinal value, is mainly produced through imported hybrid seeds. Therefore, the use of plant tissue culture techniques is one of the most effective methods to remove dependence on seed imports and mass propagation of plants without morphological and genetic variations**.** The purpose of this research was to investigate and optimize the micropropagation of the Lorca red bell pepper commercial hybrid cultivar (*Capsicum annuum* L.) through *in vitro* axillary buds proliferation using nodal segment explant and finally creating a rapid and efficient protocol for the mass propagation of colored bell pepper tissue culture seedlings.

Materials and Methods: In this research, the effect of different concentrations of plant growth regulators, benzyl amino purine (BAP) and indole-3-butyric acid (IBA) on *in vitro* proliferation of axillary buds was investigated using nodal segment explant in the form of completely randomized design (CRD) with three replications. As well as, the effect of activated charcoal as an absorbent in controlling browning and preventing the formation of callus tissue at the end of explants and stimulating rooting in them was tested. In addition, MS medium containing gibberellic acid (GA3) was used to stimulate the elongation of the propagated axillary buds.

Results: The results showed that the highest rate of axillary buds proliferation (7.98 numbers) was created in the treatment of MS medium containing 5 mg L^{-1} BAP + 0.2 mg L^{-1} IBA with 78.33 % shoot induction. The best elongation of shoot buds (2.69 cm) was achieved by stimulating the elongation of shoot buds in the treatment of MS medium containing 0.25 mg.L^{-1} GA_3 and then subculture of them in MS medium supplemented with 0.25 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} IBA along with 1 g L^{-1} activated charcoal. The shoot explants that were elongated properly, were rooted during subculture on MS medium containing 1 g L^{-1} activated charcoal. The rooted plantlets, after the acclimatization stage in Phytotron, were transferred to the greenhouse and 80% of them survived and grew well.

Conclusion: This experiment showed that the highest rate of axillary buds proliferation is created in medium containing high concentration of cytokinin (5 mg L^{-1} BAP) and low concentration of auxin (0.2 mg L^{-1} IBA) and by stimulating the mitotic divisions in the shoot cambium layer. Also it was observed that adding a suitable concentration of activated charcoal to the MS medium is an effective method to prevent the oxidative browning on the base of explants and no formation of callus tissue and it has play an important role in the optimal growth of plantlets and their rooting.

Cite this article: Amini Nasab, Reza, Haddad, Raheem, Sahraroo, Amir, Garoosi, Ghasem-ali. 2025. Micropropagation of Red Bell Pepper hybrid cultivar (*Capsicum annuum* L.) through *in vitro* axillary buds proliferation. *Journal of Plant Production Research*, 31 (4), 177-193.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2024.22479.3150
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

ریزازدیادی رقم هیبرید فلفل دلمه‌ای قرمز (*Capsicum annuum* L.) از طریق تکثیر درون‌شیشه‌ای جوانه‌های جانبی

رضا امینی‌نسب[۱]، رحیم حداد*[۲]، امیر صحرارو[۳]، قاسمعلی گروسی[٤]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. رایانامه: re_amininasab@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. رایانامه: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

۳. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: asahraroo@gmail.com

٤. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. رایانامه: garoosi@eng.ikiu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۰۳/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۰۳/۲٦
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۰٤/۱٦

واژه‌های کلیدی:
پرآوری،
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی،
زغال فعال،
فلفل دلمه‌ای،
کشت تک‌گره

چکیده

سابقه و هدف: تولید محصولات کشاورزی با استفاده از بذرهای وارداتی، باعث خروج ارز از کشور و افزایش هزینه تولید می‌گردد. در ایران فلفل دلمه‌ای به عنوان یک محصول سبزی مهم با ارزش غذائی و داروئی بالا، به‌طور عمده از طریق بذرهای هیبرید وارداتی تولید می‌شود. بنابراین استفاده از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی، یکی از مؤثرترین روش‌های رفع وابستگی از واردات بذر و تکثیر انبوه گیاهانی بدون تغییرات مورفولوژیکی و ژنتیکی است. هدف از اجرای این پژوهش، بررسی و بهینه‌سازی ریزازدیادی رقم هیبرید تجاری فلفل دلمه قرمز Lorca، به روش تکثیر درون شیشه جوانه‌های جانبی با استفاده از ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره جهت تکثیر انبوه نشاءهای کشت بافتی فلفل دلمه رنگی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ٦- بنزیل آمینو پورین (BAP[1]) و ایندول-۳- بوتیریک اسید (IBA[2]) در تکثیر درون شیشه جوانه‌های جانبی با استفاده از ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره به‌صورت آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی گردید. هم‌چنین اثر زغال فعال به‌عنوان یک ماده جاذب در کنترول قهوه‌ای شدن و جلوگیری از تشکیل بافت کالوس در انتهای ریزنمونه‌ها و ریشه‌دار کردن آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. افزون بر این جهت طویل شدن جوانه‌های جانبی تکثیر شده، از تیمار محیط کشت MS حاوی اسید جیبرلیک (GA_3[3]) استفاده شد.

1- Benzylaminopurine
2- Indole-3-butyric acid
3- Gibberellic acid

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بالاترین میزان تکثیر جوانه‌های جانبی (۷/۹۸ عدد) در تیمار محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۷۸/۳۳ درصد القاء ساقه‌زائی ایجاد گردید. بهترین رشد طولی جوانه‌های ساقه (۲/۶۹ سانتی‌متر) با تحریک طویل شدن نوساقه‌ها در تیمار محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و سپس واکشت آن‌ها در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه یک گرم در لیتر زغال فعال به‌دست آمد. ریزنمونه‌های ساقه دارای رشد طولی مناسب، طی واکشت در محیط کشت پایه MS حاوی یک گرم در لیتر زغال فعال، ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، پس از مرحله سازگارسازی در اتاقک رشد، به گلخانه منتقل شده و ۸۰ درصد آن‌ها زنده مانده و به‌خوبی رشد نمودند.

نتیجه‌گیری: این آزمایش نشان داد که بیش‌ترین میزان تکثیر جوانه‌های جانبی در محیط کشت حاوی غلظت بالای سیتوکینین (۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) و غلظت پایین اکسین (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA) و با تحریک تقسیمات میتوزی لایه کامبیوم ساقه ایجاد می‌گردد. هم‌چنین مشاهده شد که افزودن غلظت مناسبی از زغال فعال به محیط کشت MS، روشی مؤثر برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن اکسیداتیو انتهای ریزنمونه‌ها و عدم تشکیل بافت کالوس بوده و در رشد مطلوب گیاهچه‌ها و ریشه‌دار شدن آن‌ها نقش به‌سزائی دارد.

استناد: امینی‌نسب، رضا، حداد، رحیم، صحرارو، امیر، گروسی، قاسمعلی (۱۴۰۳). ریزازدیادی رقم هیبرید فلفل دلمه‌ای قرمز (*Capsicum annuum* L.) از طریق تکثیر درون‌شیشه‌ای جوانه‌های جانبی. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۱ (۴)، ۱۹۳-۱۷۷.
DOI: 10.22069/JOPP.2024.22479.3150

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.) گیاهی یک‌ساله و متعلق به خانواده Solanaceae است. از نظر سطح کروموزومی، تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید جنس *Capsicum* برابر با ۲n=۲x=۲٤ بوده و این جنس دارای ۲۵ گونه وحشی و ۵ گونه اهلی است (۱). این گیاه به‌علت برخورداری از ویتامین‌ها، به‌ویژه ویتامین C، انواع آنتی‌اکسیدان‌ها و املاح معدنی فراوان، علاوه بر استفاده غذایی دارای خواص دارویی بسیار ارزشمند بوده و به‌عنوان یک محصول سبزی مهم مورد توجه اکثر کشورهای جهان می‌باشد (۲ و ۳).

تکثیر فلفل دلمه‌ای در ایران اغلب از طریق کاشت بذرهای هیبرید وارداتی نسل F1 صورت می‌گیرد که این بذرها با قیمت بالا وارد کشور شده و ضمن خروج ارز و تحمیل هزینه بالای تولید، کشور را با مشکلات و محدودیت‌های وارداتی مواجه می‌کند. از طرفی استفاده از سیستم کشت مستقیم بذر دارای معایبی هم‌چون وجود خواب در بذرها، درصد جوانه‌زنی پایین و هدر رفتن مقدار زیادی بذر بوده که باعث می‌شود تکثیر این گیاه دچار مشکل گردد. به‌علاوه فلفل دلمه به تغییرات دمایی و بسیاری از پاتوژن‌ها به‌ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها حساس است که این یک عامل محدودکننده برای تکثیر آن گیاه محسوب می‌شود. بنابراین استفاده از تکنیک‌های مختلف کشت بافت جهت تکثیر فلفل دلمه‌ای و تولید گیاهانی با کیفیت بالا، بدون تغییرات ژنتیکی و مورفولوژیکی و عاری از عوامل بیماری‌زا می‌تواند گامی مهم در جهت رفع مشکلات موجود، کاهش هزینه‌های اولیه کشت و تکثیر این گیاه، ترغیب تولیدکنندگان به سرمایه‌گذاری در این زمینه و در نهایت ایجاد زمینه مناسب اشتغال در حوزه کشاورزی باشد (۳، ٤ و۵).

با مطالعه منابع مختلف در خصوص روش‌های کشت بافت گیاه فلفل، اثرات ژنوتیپ، نوع و ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه‌های مختلف از جمله جوانه‌های انتهائی، جوانه‌های جانبی، ساقه، برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون بر باززائی مستقیم و غیرمستقیم این گیاه مورد بررسی قرار گرفته و در اکثر آزمایش‌ها از محیط کشت پایه MS استفاده شده است (۵، ٦ و ۷). در پژوهشی، ریزازدیادی فلفل دلمه رقم گلدفلیم از طریق کشت ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره در غلظت‌های مختلفی از سیتوکنین‌های BAP و KIN[1] در ترکیب با اکسین‌های NAA[2] و IBA به‌همراه زغال فعال بررسی شد. نتایج نشان داد که بهترین تیمار جهت تکثیر شاخساره، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، به همراه زغال فعال ۰/٤ درصد بود (۳). مطالعه ریزافزایی فلفل دلمه‌ای اکوتیپ‌های چین و مجارستان به روش اندام‌زائی مستقیم و با استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در ۵ ترکیب هورمونی مختلف شامل سیتوکنین BAP و اکسین‌های IBA و IAA[3] نشان داد که بیش‌ترین میزان باززائی ساقه، در محیط کشت MS حاوی ٦ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و از ریز نمونه هیپوکوتیل به دست آمد. بهترین تیمار جهت رشد طولی ساقه‌های ایجاد شده محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. ریشه‌زائی ساقه‌های رشدیافته در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی صورت گرفت (٤). در پژوهش دیگری، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، IBA و NAA بر اندام‌زائی مستقیم در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل،

1- Kinetin
2- Naphthaleneacetic acid
3- Indole-3-acetic acid

کوتیلدون و دمبرگ لپه‌ای در فلفل دلمه‌ای رقم کالیفرنیاواندر مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، بیش‌ترین میزان ساقه‌زائی از ریزنمونه دمبرگ لپه‌ای و در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. بهترین تیمار جهت رشد طولی ساقه، محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 گزارش شد. هم‌چنین افزودن زغال فعال ۰/۳ درصد و اسید سیتریک به‌همراه اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، باعث حذف رنگدانه‌های فنلی و جلوگیری از نکروزه شدن شاخساره‌ها گردید. ساقه‌های طویل‌شده در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به خوبی ریشه‌دار شدند (٦). آزمایش انجام شده در مورد باززائی ۱۰ رقم مختلف گونه فلفل به روش تکثیر جوانه‌های جانبی ساقه و با استفاده از ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره در غلظت‌های مختلف سیتوکنین‌های BAP و KIN به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین IAA و پلی‌آمین اسپرمیدین، نشان داد که ترکیب BAP و IAA مناسب‌ترین ترکیب جهت القای تکثیر شاخساره بوده و اسپرمیدین در ترکیب با غلظت بهینه BAP و IAA اثرات افزایشی قابل‌توجهی بر سرعت رشد، تکثیر شاخساره و ریشه‌زائی داشته است (۸). در بررسی پرآوری دو رقم تجاری فلفل دلمه‌ای زرد و قرمز به روش اندام‌زائی مستقیم، از ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه دارای تک‌گره در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، NAA و IAA استفاده گردید. بهترین پاسخ به باززائی ساقه، از ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی ٦ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید. القاء ریشه‌زائی شاخساره‌های طویل شده، در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBAانجام شد (۹). در آزمایش دیگری، دستیابی به یک پروتکل کارآمد جهت ریزازدیادی به روش اندام‌زائی مستقیم در چهار گونه فلفل با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IAA بررسی شد. بالاترین میزان تکثیر شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده گردید. جهت تحریک رشد طولی ساقه‌های جانبی از تیمار محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 استفاده شد. القاء ریشه‌زائی طی رشد طولی ساقه‌های جانبی آغاز و با واکشت ساقه‌های جانبی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد (۱۰). فلفل دلمه‌ای قرمز نسبت به سایر رنگ‌های فلفل دلمه طعم شیرین‌تری داشته که نه‌تنها به صورت سبزی خام و یا پخته قابل مصرف است، بلکه جهت تهیه ادویه پاپریکا و اسانس خوراکی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف از اجرای این پژوهش، بررسی و بهینه‌سازی ریزازدیادی رقم هیبرید تجاری فلفل دلمه قرمز Lorca، به روش تکثیر جوانه‌های جانبی با استفاده از ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره و ارزیابی تأثیر تنظیم‌کننده‌های سیتوکنین و اکسین بر پرآوری جوانه جانبی ساقه و در نهایت ایجاد یک پروتکل کشت درون‌شیشه‌ای سریع و کارآمد جهت تکثیر انبوه نشاءهای کشت بافتی فلفل دلمه قرمز بود.

مواد و روش‌ها

بذرهای رقم هیبرید F1 فلفل دلمه قرمز Lorca که از شرکت کشاورزی فلات ایران تهیه گردید، ابتدا جهت ضدعفونی کردن سطحی به مدت ۲۰ دقیقه زیر آب شهری شسته شده، سپس بذرها زیر هود لامینار پس از آبکشی با آب مقطر استریل، در اتانول ۷۰

درصد به مدت ٦٠ ثانیه غوطه‌ور و تکان داده شدند. در ادامه، سه بار شستشوی بذرها با آب مقطر استریل انجام شده و سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به همراه یک قطره توییین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند، در ادامه بذرها سه بار با آب مقطر استریل آبشویی و روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. جهت جوانه‌زنی بذرها، هر پنج عدد بذر استریل در ظروف شیشه‌ای حاوی۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه MS حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز با pH برابر ۵/۸ زیر هود لامینار کشت شدند. بذرهای کشت شده به اتاقک رشد منتقل شده و طی ۱۰-۷ روز نگهداری در شرایط فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه زده و پس از ٥-٤ هفته، گیاهچه‌های حاصل به‌عنوان منبع تأمین ریز نمونه ساقه دارای تک‌گره جهت تکثیر جوانه‌های جانبی مورد استفاده قرار گرفتند. ریز نمونه‌های ساقه دارای تک‌گره به طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر تهیه و هر سه ریزنمونه در یک ظرف شیشه‌ای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف BAP، KIN در ترکیب با IBA کشت شده و در اتاقک رشد با شرایط فتوپریودی ١٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش در سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت MS جهت بررسی القاء ساقه‌زائی شامل سیتوکینین‌های BAP (۰، ۳، ٤ و ٥ میلی‌گرم در لیتر) و KIN (۰، ۳، ٤ و ٥ میلی‌گرم در لیتر) و اکسین IBA (۰، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند. حدود ۱۰ روز پس از کشت تک‌گره، جوانه‌های جانبی شروع به رشد نموده و با گذشت زمان تعداد و اندازه آن‌ها افزایش یافته و بسته به میزان رشد ریزنمونه‌ها هر ۱۵ تا ۲۱ روز نسبت به واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت تازه اقدام گردید. در طی واکشت ریزنمونه‌ها، زغال فعال با غلظت یک گرم در لیتر (۰/۱ درصد وزنی-حجمی) به محیط‌های کشت اضافه شد. بعد از گذشت ٥-٤ هفته از کشت ریزنمونه ساقه دارای تک‌گره، تعداد جوانه‌های جانبی و تعداد برگ در هر ریزنمونه ثبت شده و بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد انتخاب گردید، جهت رشد طولی جوانه‌های جانبی، ابتدا ریزنمونه‌های دارای جوانه‌های جانبی ساقه به‌مدت یک هفته در تیمار محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 قرار گرفتند تا فرایند رشد طولی نوساقه‌ها تحریک گردد و در ادامه فشار تنظیم‌کننده‌های رشد از روی ریزنمونه‌ها برداشته شد. بدین‌منظور واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰، ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه زغال فعال ۰/۱ درصد انجام شد و پس از چهار هفته میزان رشد طولی ساقه‌های جانبی در هر شاخساره ثبت و بهترین تیمار رشد طولی انتخاب شد. شاخساره‌های ایجاد شده یا به‌عنوان منبع ریزنمونه جهت دور بعدی کشت تک‌گره استفاده شدند و یا این‌که ساقه‌های جانبی با طول ۳-۲/۵ سانتی‌متر از شاخساره جدا و طی واکشت در محیط MS حاوی زغال فعال ۰/۱ درصد، پس از چهار هفته ریشه‌دار شدند. معدودی از ریزنمونه‌های ساقه که ریشه‌دار نشده بودند با واکشت در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، پس از سه هفته ریشه‌دار شدند. در ادامه گیاهچه‌های ریشه‌دار با طول ٦-٤ سانتی‌متر وارد فاز سازگارسازی شده و سپس به گلخانه انتقال یافتند. تعداد ساقه‌های جانبی در هر ریزنمونه ثبت شده و درصد القاء ساقه‌زائی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Percentage of shoot induction} = \frac{\text{Number of shoot induced explants}}{\text{Total number of inoculated explants}} \times 100 \quad (۱)$$

سازگارسازی گیاهچه‌ها و انتقال به گلخانه: صحت و درستی تکنیک کشت بافت به موفقیت در سازگاری گیاهان باززا شده در شرایط درون شیشه با محیط طبیعی بستگی دارد. این گیاهان تغییرات مشخصی مانند تغذیه تغییریافته، موم کوتیکولی کاهش‌یافته، روزنه‌های غیرعملکردی و غیره را نشان می‌دهند. مرحله سازگاری گیاه را قادر می‌سازد که در محیط با رطوبت نسبی کم‌تر، نور بیش‌تر و نوسانات دمایی بالا به وضعیت رشد اتوتروفی برسد (۱۱). بنابراین قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، لازم بود که عمل سازگار کردن گیاهچه‌ها در اتاقک رشد صورت‌گیرد. بدین‌منظور ابتدا ۲۰ گیاهچه به‌خوبی ریشه‌دار شده با دقت از شیشه‌های کشت خارج و ریشه آن‌ها با آب مقطر استریل شسته شد تا محیط کشت اطراف ریشه‌ها کاملاً حذف گردد. سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی نشائی حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلایت استریل با نسبت ۳ به ۱ کاشته شدند و در شرایط اتاقک رشد به مدت چهار هفته نگهداری و در این مدت علاوه بر آبیاری روزانه، هفته‌ای یک‌بار با کود کامل مایع با غلظت دو در هزار آبیاری شدند. برای حفظ رطوبت نسبی اطراف گیاهچه‌ها، روی گلدان‌ها با لیوان‌های پلاستیکی شفاف که جهت تهویه مناسب سوراخ‌هایی در بالای آن‌ها ایجاد شده بود به‌مدت ۱۰ روز پوشانده شد. در طی این مدت با افزایش اندازه سوراخ‌ها رطوبت اطراف گیاهچه‌ها به‌تدریج کاهش یافته و در نهایت لیوان‌های پلاستیکی برداشته شد. پس از چهار هفته دوره سازگاری، گیاهان سازگار شده ۱۰ تا ۱۵ برگی به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی کوکوپیت، پرلایت و خاک باغچه با نسبت مساوی در گلخانه با میانگین دمای روز ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دمای شب ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰-۷۰ درصد منتقل شدند.

آنالیزهای آماری: داده‌های حاصل از ثبت پارامترهای رشد، به‌صورت آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تنظیم شده و با استفاده از نرم‌افزار SAS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت با استفاده از برنامه Excel نمودارهای مربوط به آن‌ها ترسیم گردید. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش پارامترهای رشد شامل، تعداد جوانه‌های جانبی ساقه، طول ساقه‌های جانبی، تعداد برگ در هر گیاهچه و درصد القاء ساقه‌زائی مورد بررسی قرارگرفت. به‌طورکلی اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر همه صفات موردنظر ارزیابی گردید و نتایج تجزیه واریانس نشان داد که این اثر در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. به‌عبارتی نوع تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت‌های مختلف آن‌ها اثرات متفاوتی بر پارامترهای رشد رویشی در رقم مورد مطالعه داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای پارامترهای رشدی مورد بررسی در گیاهچه‌های فلفل دلمه‌ای رقم Lorca.

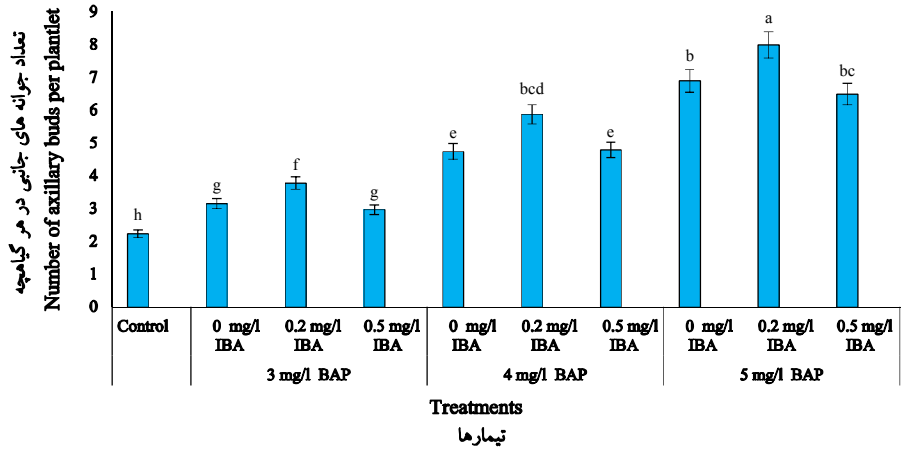
Table 1. Variance analysis of PGRs treatments for growth parameters investigated in Lorca cultivar bell pepper plantlets.

منبع تغییرات S.O.V	درجات آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares			
		تعداد جوانه‌های جانبی Number of axillary buds	طول ساقه Shoot length	تعداد برگ Number of leaves	درصد القاء ساقه‌زائی Percentage of shoot induction
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی PGRs	9	18.81**	0.21**	13.34**	650.23**
خطای آزمایش Error	20	0.23	0.04	0.43	50.44
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)	-	11.03	12.29	7.46	17.76

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد است

** indicates significance at the level of 1%

تعداد جوانه‌های جانبی: تعداد جوانه‌های جانبی در هر گیاهچه یکی از مهم‌ترین پارامترهای کمی در موفقیت آزمایش‌های پرآوری محسوب می‌شود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفت تعداد جوانه‌های جانبی در هر گیاهچه نشان داد که اعمال تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد مطالعه، بر روی این صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف برای صفت تعداد جوانه‌های جانبی نشان داد که بیش‌ترین تعداد جوانه‌های جانبی در گیاهچه (۷/۹۸) مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. هم‌چنین کم‌ترین تعداد جوانه‌های جانبی، در تیمار شاهد یعنی محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (۲/۲۳) مشاهده شد (شکل ۱).

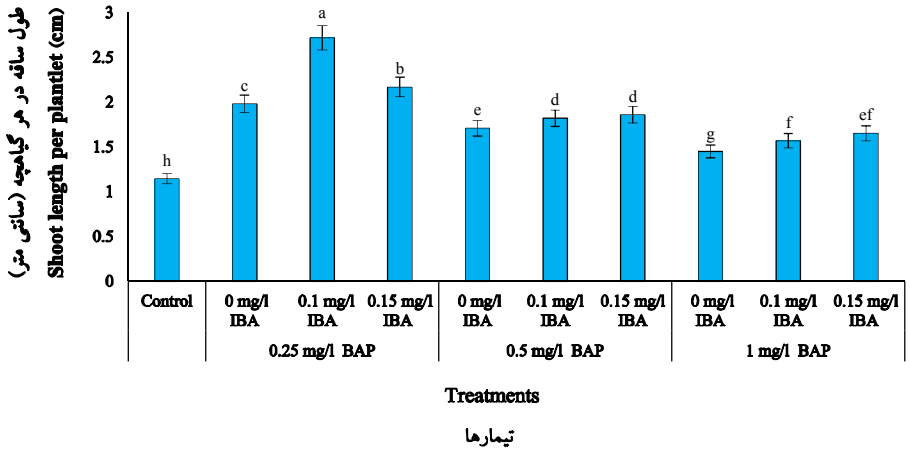


شکل ۱- اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA بر تعداد جوانه‌های جانبی در هر گیاهچه.

ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد باهم ندارند.

Fig. 1. The effect of GRPs treatment BAP and IBA on Number of axillary buds per plantlet.
Means followed by the same letters within columns are not significantly different at the 1% level.

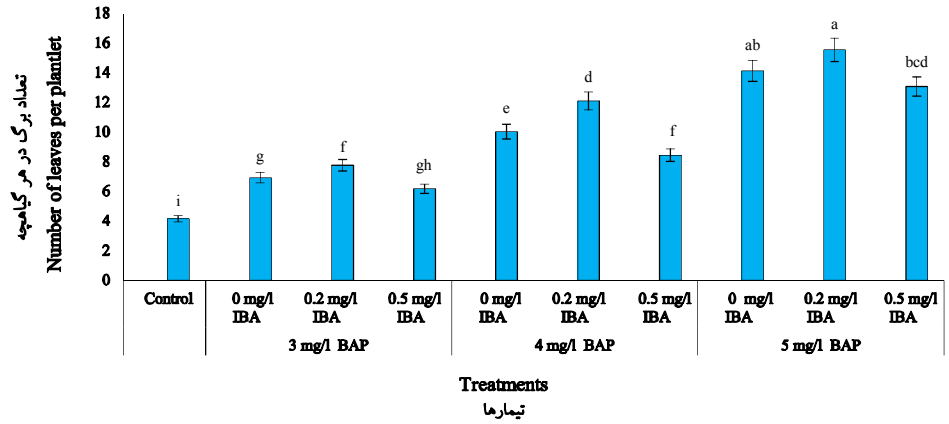
طول ساقه‌های جانبی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفت طول ساقه‌های جانبی نشان داد که اعمال تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد مطالعه بر روی صفت طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر تیمارها برای این صفت نشان داد که بیش‌ترین طول ساقه (۲/٦۹ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود که با سایر تیمارهای اعمال‌شده اختلاف معنی‌داری داشت، هم‌چنین کم‌ترین طول ساقه در تیمار شاهد (۱/۱۵ سانتی‌متر) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی طول ساقه‌های جانبی در هر گیاهچه.
ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد باهم ندارند.

Fig. 2. The effect of GRPs treatment BAP and IBA on Length of axillary shoots per plantlet.
Means followed by the same letters within columns are not significantly different at the 1% level.

تعداد برگ: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) برای صفت تعداد برگ در هر گیاهچه نشان داد که اعمال تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه برروی این صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسات میانگین اثر تیمارها برای صفت تعداد برگ نشان داد که بیش‌ترین تعداد برگ (۱۵/٥٤) مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. هم‌چنین کم‌ترین تعداد برگ در تیمار شاهد (٤/۱۵) دیده شد (شکل ۳).

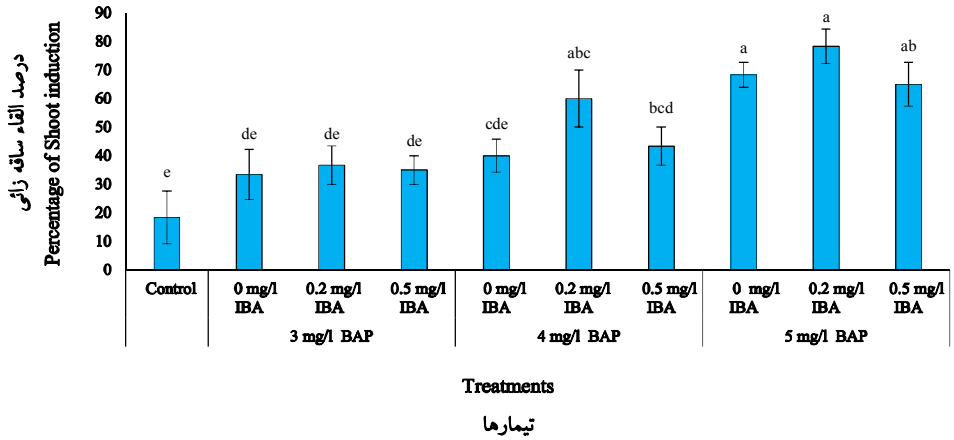


شکل ۳- اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی تعداد برگ در هر گیاهچه.

ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد باهم ندارند.

Fig. 3. The effect of GRPs treatment BAP and IBA on Number of leaves per plantlet.
Means followed by the same letters within columns are not significantly different at the 1% level.

درصد القاء ساقه‌زائی: درصد القاء ساقه‌زائی یکی از شاخص‌های مهم جهت ارزیابی پرآوری از طریق کشت درون‌شیشه است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) برای درصد القاء ساقه‌زائی نشان داد که اعمال تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه برروی این شاخص در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر تیمارها برای درصد القاء ساقه‌زائی نشان داد که بیش‌ترین درصد القاء ساقه‌زائی (۷۸/۳۳ درصد) مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. هم‌چنین پایین‌ترین درصد القاء ساقه‌زائی در تیمار شاهد (۱۸/۳۳) دیده شد (شکل ٤).



شکل ٤- اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی درصد القاء ساقه‌زائی.

ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد باهم ندارند.

Fig. 4. The effect of GRPs treatment BAP and IBA on percentage of shoot induction.
Means followed by the same letters within columns are not significantly different at the 1% level.

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تکثیر شاخساره از ریز نمونه ساقه دارای تک‌گره در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ارائه نشده است (۳). با توجه به این‌که جنس فلفل و به‌ویژه گونه فلفل دلمه‌ای جهت باززائی و ایجاد تغییرات ژنتیکی در شرایط درون‌شیشه، گیاهی مقاوم بوده و جزء گیاهان ریکال‌سیترانت محسوب می‌شود، بنابراین انجام تکنیک‌های کشت بافت در این گیاه مستلزم دقت و آزمایش گام‌به‌گام می‌باشد (۱۰، ۱۲ و ۱۳). نتایج بررسی‌های پژوهش‌گران از جمله اختر و همکاران (۲۰۲۰) و گامودی و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که رایج‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای القاء مستقیم تکثیر شاخساره در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون، ساقه دارای تک‌گره و جوانه انتهایی ساقه، ترکیبی از سیتوکینین BAP و اکسین IBA یا IAA می‌باشد و استفاده از سایر سیتوکینین‌ها مثل کینتین (KIN) باعث ایجاد بافت کالوس در قاعده ریزنمونه‌ها می‌گردد (۹ و ۱۳). هم‌چنین استفاده از سیتوکینین تیدیازورون (TDZ) هرچند که باعث تولید تعداد قابل‌توجهی جوانه‌های جانبی می‌شود، اما این جوانه‌ها خیلی کوچک بوده و اکثراً روزت خواهند ماند، بنابراین طویل شدن نوساقه‌ها نیازمند تعداد واکشت بیشتری در محیط رشد طولی بوده که این امر باعث افزایش مدت اجرای پروژه می‌گردد (۱۰ و ۱۳). اثر مثبت BAP بر تکثیر جوانه‌های جانبی توسط سایر پژوهش‌گران از جمله اطرشی و همکاران (۲۰۱۱)، نیک‌خو و همکاران (۲۰۱۱)، محب‌محمدی و همکاران (۲۰۱٤) و پیش‌بین و همکاران (۲۰۱٤) تأیید شده است (۳، ٤، ۵ و ٦). از طرفی مندال (۲۰۲۲) در پژوهش خود بیش‌ترین تکثیر جوانه‌های جانبی را از بافت کالوس و با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه‌های جانبی و جوانه انتهائی ساقه در ترکیب سیتوکینین KIN و اکسین تو، فور- دی (2,4-D) به‌دست آورد (۱٤).

در این آزمایش، ابتدا از محیط کشت MS به‌همراه غلظت‌های مختلفی از سیتوکینین‌های BAP و KIN به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین IBA استفاده شد. نتایج نشان داد که در مقطع برش ریزنمونه‌ها، ۱۵ تا ۲۰ روز پس از کشت، بافت کالوس تولید گردید. جهت رفع این مشکل، در مرحله بعد به محیط‌های کشت، زغال فعال ۰/۱ درصد اضافه شد، پاسخ ریزنمونه‌ها به‌ویژه در محیط‌های حاوی سیتوکینین BAP مثبت بود و نه تنها تشکیل بافت کالوس به حداقل رسید، بلکه از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها جلوگیری شده و تقریباً تمامی ریزنمونه‌ها به‌خوبی رشد نموده و گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند. هم‌چنین مشخص شد که استفاده از KIN به تنهایی یا در ترکیب با IBA، باعث تشکیل بافت کالوس ترد و سفید-کرم در اطراف ریزنمونه‌ها می‌شود که در نهایت اکثر ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و از بین رفتند، بنابراین KIN به اندازه BAP در تکثیر مستقیم شاخساره تأثیر چندانی نداشته و تنها تعداد معدودی از ریزنمونه‌ها در تیمار حاوی KIN باززا شدند. از طرفی هدف این آزمایش پرآوری و تولید گیاهچه‌های همسان گیاه والدی بود بنابراین شاخساره‌های تولید شده از بافت تمایزنیافته کالوس امکان ایجاد تنوع در گیاهچه‌های تولیدی را افزایش می‌دهد و این اتفاق برای هدف پژوهش حاضر یک عامل منفی محسوب می‌شود. این نتیجه با نتایج مطالعات اطرشی و همکاران (۲۰۱۱)، نیک‌خو و همکاران (۲۰۱۱) و هاک و گوش (۲۰۱۸) مطابقت داشت (۳، ٤ و ۸). یکی از مشکلات تکثیر درون شیشه گونه فلفل، تولید گاز اتیلن در مقطع برش ریزنمونه‌هاست که باعث نکروزه شدن شاخساره، زردی، پیری و ریزش برگ‌های گیاهچه‌ها در فضای درون‌شیشه می‌شود. گامودی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه خود روی هشت رقم فلفل دلمه‌ای بیان نمودند که گاز اتیلن تولید شده در مقطع برش ریزنمونه‌هایی

هم‌چون هیپوکوتیل، کوتیلدون و گره ساقه، یک عامل محدودکننده برای القاء و تکثیر جوانه‌های جانبی بوده و این گاز فرایندهای رشد، اندام‌زائی، تمایز و پیری گیاهچه‌های درون‌شیشه را حتی در غلظت کمتر از ۰/۰۱ میکرومولار تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و استفاده از نیترات نقره به عنوان یک مهارکننده فعالیت گاز اتیلن، شرایط تکثیر و رشد جوانه‌های جانبی را بهبود می‌بخشید (۱۳). براساس مطالعات انجام شده توسط توماس (۲۰۰۸) یکی از روش‌های مؤثر و کم‌هزینه‌تر جهت مهار فعالیت اتیلن، استفاده از زغال فعال در محیط کشت می‌باشد (۱۵). زغال فعال دارای شبکه‌های زیادی از منافذ با سطح داخلی بالا است که می‌تواند مواد فنلی بازدارنده و سایر متابولیت‌های سمی که باعث قهوه‌ای شدن مقطع برش ریزنمونه‌ها می‌شوند، هم‌چنین گاز اتیلن و سایر ترکیبات ناشناخته غیررنگی را که باعث زردی برگ‌ها و نکروزه شدن شاخساره می‌گردند از محیط کشت حذف نماید، افزون بر این از تشکیل بافت کالوس جلوگیری کرده و نقش مؤثری بر اندام‌زائی، رشد طولی ساقه و ریشه‌زائی گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه دارد (۱۶ و ۱۷). در این پژوهش استفاده از زغال فعال ۰/۱ درصد در محیط کشت نتایج بهتری را ایجاد نمود و نتایج به‌دست آمده تأییدکننده نتایج مطالعات سایر پژوهش‌گران بود (۳، ۶ و ۱۳).

از دیگر چالش‌هایی که همواره در مسیر باززائی گیاهچه‌ها در جنس *Capsicum* وجود دارد، ایجاد جوانه‌های رزت و درهم فشرده است. مطالعات انجام شده نشان داد که اکثر پژوهش‌گران جهت رفع این مشکل از تنظیم‌کننده رشد GA_3 استفاده نمودند (۶، ۱۰ و ۱۳). ایزگو و همکاران (۲۰۲۰) جهت تحریک طویل شدن نوساقه‌های تکثیر شده در گونه‌های فلفل مورد مطالعه، ریزنمونه‌ها را به‌مدت یک هفته در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 تیمار نمودند (۱۰). در این پژوهش جهت تحریک طویل شدن نوساقه‌ها از تیمار محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌مدت یک هفته استفاده و سپس واکشت ریزنمونه‌ها در تیمارهای با غلظت پایین تنظیم‌کننده‌های رشد انجام شد. بهترین رشد طولی شاخساره در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه زغال فعال ۰/۱ درصد مشاهده شد.

تشکیل ریشه‌های نابه‌جا، بسته به نوع ریزنمونه مورد استفاده، متفاوت است. در ریزنمونه‌های ساقه دارای تک‌گره، به دنبال تشکیل پریدرم، یاخته‌های مریستمی نزدیک به کامبیوم آوندی چوب و آبکش تحت‌تأثیر اکسین‌های درون‌زا و برون‌زا تقسیم شده و سرانجام ریشه‌های نابه‌جا تشکیل خواهد شد (۱۷). در این آزمایش پس از تکثیر شاخساره در بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، فرایند ریشه‌زائی طی رشد طولی شاخساره آغار گردید. هم‌چنین ریزنمونه‌های ساقه با طول ۳-۲/۵ سانتی‌متر از شاخساره جدا شده و با کشت در محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد و حاوی زغال فعال ۰/۱ درصد، بعد از چهار هفته ریشه‌دار شده و رشد خوبی داشتند. به‌نظر می‌رسد که زغال فعال علاوه بر این‌که یک ماده جاذب بوده و از قهوه‌ای شدن اکسیداتیو انتهای ریزنمونه‌ها و تشکیل بافت کالوس جلوگیری می‌کند، محیطی تاریک شبیه به شرایط محیط طبیعی را برای رشد ریشه گیاهچه‌ها فراهم می‌نماید. معدودی از ریزنمونه‌های ساقه که ریشه‌دار نشده بودند با واکشت در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، بعد از سه هفته ریشه‌دار شدند. این نتیجه با نتایج برخی از پژوهش‌گران از جمله نیک‌خو و همکاران (۲۰۱۱)، پیش‌بین و همکاران (۲۰۱۴) و جاها و همکاران (۲۰۲۲) همخوانی داشت (۴، ۶ و ۱۸).

در مرحله سازگارسازی که به معنای تطبیق تدریجی گیاهان باززا شده در شرایط درون‌شیشه با محیط طبیعی است، تعداد ۲۰ گیاهچه با رشد ریشه مناسب وارد فاز سازگاری شدند، پس از گذشت چهار هفته از شرایط سازگاری که گیاهچه‌ها با تشکیل دو تا چهار برگ جدید رشد خوبی را نشان داده و سازگار شدند، گیاهان سازگارشده ۱۰ تا ۱۵ برگی به گلدان‌های بزرگ‌تر در گلخانه منتقل شده و تعداد ۱٦ گیاه زنده مانده و رشد مناسبی داشتند. بنابراین میزان بقای گیاهان باززا شده حدود ۸۰ درصد برآورد گردید. گیاهان ایجاد شده در شرایط درون‌شیشه فقط تا حدی اتوتروف هستند زیرا در محیط بسته و استریل، غنی از ساکاروز و سایر مواد مغذی با رطوبت بالا و شدت نور کم رشد می‌کنند و این شرایط می‌تواند باعث تغییرات آناتومیکی و فیزیولوژیکی مانند روزنه‌های بیشتر در واحد سطح، فقدان یا کاهش تریکوم‌های برگ و کاهش لایه موم اپیکوتیکولار در گیاهان باززا شده گردد. بنابراین این گیاهان با انتقال به شرایط طبیعی به سرعت آب خود را از دست داده و بقاء آن‌ها به خطر می‌افتد (۱۱، ۲۰ و ۲۱). در این پژوهش مشاهده شد که گیاهچه‌های انتقال‌یافته زمانی که روی گلدان‌ها با لیوان‌های پلاستیکی شفاف یا کیسه‌های پلی‌اتیلن شفافی که چند سوراخ در آن‌ها وجود داشت پوشانده شدند، میزان بقاء به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافت. به‌نظر می‌رسد استفاده از سرپوش برای گلدان‌ها در حفظ و مدیریت رطوبت نسبی فضای اطراف گیاهچه‌ها نقش به‌سزائی دارد. یافته‌های حاضر نتایج تعدادی از پژوهش‌گران این حوزه را تأیید نمود (۳، ٦ و ۲۱).

نتیجه‌گیری کلی

در این آزمایش مشخص شد که بیش‌ترین میزان تکثیر جوانه‌های جانبی در محیط‌های حاوی غلظت بالای سیتوکینین و غلظت پایین اکسین و با تحریک تقسیمات میتوزی لایه کامبیوم ساقه ایجاد می‌گردد. هم‌چنین سیتوکینین BAP در مقایسه با سیتوکینین KIN در تکثیر شاخساره نقش مؤثرتری داشته و KIN به‌تنهایی و یا در ترکیب با اکسین IBA، غالباً باعث تشکیل بافت کالوس ترد و سفید-کرم در اطراف ریزنمونه‌ها شده و به اندازه BAP در تکثیر مستقیم شاخساره تأثیر نداشته است. علاوه‌بر این، مشاهده شد که افزودن غلظت مناسبی از زغال فعال (یک گرم در لیتر) به محیط کشت MS، روشی مؤثر برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن اکسیداتیو انتهای ریزنمونه‌ها و عدم تشکیل بافت کالوس بوده و با ایجاد یک محیط تاریک شبیه به شرایط محیط طبیعی، در ریشه‌دار شدن گیاهچه‌ها نقش به‌سزائی دارد. هم‌چنین تعداد گیاهان به‌طور مؤثر سازگار و دارای رشد رویشی مناسب پس از چهار هفته قرار گرفتن در شرایط سازگاری و انتقال به شرایط گلخانه ارزیابی شده و ۸۰ درصد آن‌ها زنده مانده و به‌خوبی رشد نمودند. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای رقم قرمز Lorca، بهترین نتیجه را جهت تکثیر شاخساره داشته و توصیه می‌شود برای پرآوری و تکثیر گیاهچه‌هایی همسان و عاری از بیماری در این رقم، از این ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

شایسته است که از گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان که در ایجاد زمینه علمی و امکان اجرای این طرح همکاری صمیمانه‌ای داشتند، شرکت فلات ایران، جهت تهیه بذرهای فلفل دلمه‌ای رقم Lorca و هم‌چنین از جناب آقای دکتر رضا فرجامی‌نژاد و سرکار خانم مهندس پروانه تقی‌دوست، کارشناسان محترم آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، جهت ارائه پیشنهادهای علمی مفیدشان، سپاسگزاری و قدردانی نمائیم.

شکل ۵- مراحل مختلف باززائی گیاه از ریزنمونه‌های ساقه دارای تک گره در فلفل دلمه‌ای رقم **Lorca**.

(**a**) کشت درون شیشه بذرهای استریل، (**b**) تولید گیاهچه استریل به عنوان منبع تأمین ریزنمونه‌های ساقه دارای تک گره، (**c**) کشت کردن ریزنمونه‌ها در تیمارهای مورد آزمایش، (**d**) القای تکثیر شاخساره، (**e** و**f**) طویل شدن جوانه‌های جانبی ساقه، (**g**، **h** و **i**) آغاز تشکیل ریشه و تکمیل ریشه‌زائی در ریزنمونه‌های ساقه، (**j** و **k**) سازگارسازی اولیه گیاهچه‌های باززا شده، (**l**) گیاهان باززا شده مقاوم.

Fig. 5. Different stages of plant regeneration from nodal shoot explants in Lorca cultivar (*Capsicum annuum* L.). (a) *In vitro* cultured of sterile seeds, (b) Sterile plantlet production as a source of supply nodal shoot explants, (c) Inoculate of explants in tested treatments (d) Induction of axillary buds proliferation, (e,f) Elongation of axillary buds, (g, h, i) Initiation of root formation and completion of rooting in shoot explants, (j, k) Initial acclimatization of regenerated plantlets, (l) Regenerated hardened plants.

منابع

1. Rohami, M., Mohammadi, A., Khosroshahli, M., Ahmadi, H., & Darandeh, N. (2010). Karyotype Analysis of several Ecotypes of *Capsicum annuum* L. in Iran. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38 (3), 177-180.
2. Choi, M. H., Kim, M. H., & Han, Y. S. (2023). Physicochemical properties and antioxidant activity of colored peppers (*Capsicum annuum* L.). *Food Science and Biotechnology*, 32 (2), 209-219.
3. Otroshy, M., Moradi, K., & Khayam Nekouei, M. (2011). The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annuum* L. by in vitro nodal cutting. *Trakia Journal of Sciences*, 9 (3), 21-30.
4. Nikkhoo, H., Mohammadi, A., Rahnama, H., & Abbaszadeh, B. (2011). *In vitro* culture optimization of *Capsicum annuum* L. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*. 7, 1-11.
5. Moheb Mohamadi, Z., Talebi, M., Sayed-Tabatabaei, B. E., & Khaksar, G. (2014). Effect of explants, hormonal combination and genotype on micropropagation of pepper. *Journal of Soil and Plant Interactions-Isfahan University of Technology*, 5 (2), 95-106.
6. Pishbin, N., Mousavi, A., Kalatejari, S., Shariatpanahi, M., & Jahromi, B. B. (2014). The effect of plant growth regulators and different types of explants on *in vitro* regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*, 5 (5), 139-146.
7. Rajam, M. V., Nandy, S., & Pandey, R. (2021). Biotechnology of red pepper. Genetically Modified Crops: Current Status, Prospects and Challenges Volume 2, 53-83.
8. Haque, S. M., & Ghosh, B. (2018). An improved micropropagation protocol for the recalcitrant plant Capsicum–a study with ten cultivars of Capsicum spp.(*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*) collected from diverse geographical regions of India and Mexico. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93 (1), 91-99.
9. Akther, S., Banu, T. A., Khan, S., Akter, S., Habib, A., Islam, M., ... & Sarkar, B. K. (2020). Micropropagation of two varieties of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 30 (2), 267-275.
10. İzgü, T., İlbi, H., & Mendi, Y. Y. (2020). Optimization of plant regeneration in different pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8 (2), 471-477.
11. Sharma, N., Kumar, N., James, J., Kalia, S., & Joshi, S. (2023). Strategies for successful acclimatization and hardening of *in vitro* regenerated plants: Challenges and innovations in micropropagation techniques. *Plant Science Today,* 10 (sp2), 90-97.
12. Hegde, V., Partap, P. S., & Yadav, R. C. (2017). Plant regeneration from hypocotyl explants in Capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App Sci*. 6, 545-557.
13. Gammoudi, N., Pedro, T. S., Ferchichi, A., & Gisbert, C. (2018). Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In vitro cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 145-153.
14. Mandal, M. (2022). Effect of plant growth regulators in the propagation of seedling explant *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Trakia Journal of Sciences,* 20 (4), 355.
15. Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*, 26 (6), 618-631.
16. Farsi, M., & Zolala, J. (2011). Introduction to plant biotechnology (5th ed.). Ferdowsi University of Mashhad. 553p. [Translated in Persian]
17. Bagheri, A., & Saffari, M. (2009). *In Vitro* Culture of Higher Plants (4th ed.). Ferdowsi University of Mashhad. 406p. [Translated in Persian]

18. Jha, K., Choudhary, P. K., & Agarwal, A. (2022). Optimization of important factors for efficient embryogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuumvar. grossum* L.) using anther culture technique. *NeuroQuantology,* 20 (8), 6051.
19. Smet, W., & De Rybel, B. (2016). Genetic and hormonal control of vascular tissue proliferation. *Current Opinion in Plant Biology,* 29, 50-56.20.
20. Barrales-López, A., Robledo-Paz, A., Trejo, C., Espitia-Rangel, E., & Rodríguez-De La O, J. L. (2015). Improved in vitro rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 274-283.
21. Jamir, S., Maiti, C. S., & Walling, I. (2019). Plantlet regeneration of naga king chilli (*Capsicum Chinense* JACQ.) from nodal segments through *in vitro* technique. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 (4), 553-558.