ارزیابی اثرات نیترات نقره در محیط ریز ازدیادی فلفل (*Capsicum annum*)

ناهید حبیبی[1*]، سید حسین نعمتی[2]

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشگاه فردوسی، مشهد ۲-سید حسین نعمتی ،استادیار گروه علوم باغبانی , دانشگاه فردوسی، مشهد.

*نویسنده مسئول nahidhabibi121@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی اثرات نیترات نقره بر ریز ازدیادی فلفل *Capsicum annum* در شرایط درون شیشه ای آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. کشت ریز نمونه های جوانه های ساقه به روی محیط کشت پایه MS نیمه جامد حاوی بنزیل آمینو پورین (BAP)،نفتالین استیک اسید(NAA)ونیترات نقره($AgNO_3$) موجب نمو شاخساره های نابجا و جانبی پس از گذشت ۷ هفته از کشت گردید. ریشه زایی شاخساره هایی که در شرایط درون شیشه ای حاصل شده اند نیز در محیط کشت پایهMS حاوی IBAانجام شد. بر اساس مشاهدات، بالاترین میزان باززایی و تعداد شاخساره به روی محیط کشت موراشیگ اسکوگ (MS) حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیترBAP،۰/۴ میلی گرم بر لیترNAAو۸/۰میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ گزارش شد. در حالی که مناسب ترین محیط کشت ریشه زایی این شاخساره های باززایی شده با ۴/۰ میلی گرم بر لیتر IBAو۳/۰میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ می باشد.۶ هفته پس از انتقال به محیط کشت ریشه زایی، گیاهان به منظور سازگاری به گلخانه منتقل شده ودر مخلوط کمپوست کاشته شدند.

کلمات کلیدی: ریز ازدیادی، کشت بافت

مقدمه

فلفل با نام علمی (*Capsicum annum* L.) متعلق به خانواده Solanaceae است. روش های سنتی که در تکثیر گیاه فلفل مورد استفاده قرار می گیرند دارای معایبی از جمله کوتاه بودن عمر گیاهچه، پائین بودن سرعت جونه زنی، خطر آلودگی گیاهچه ها به انواع پاتوژن ها از جمله قارچ ها، باکتری ها، ویروس ها و نماتدهاست. از طرفی افزایش دما سبب محدودیت تولید خواهد شد. اما کاربرد روش های مدرن بیوتکنولوژی موجب افزایش کمی و ارتقا کیفی محصول خواهد شد. تا کنون مطالعات چندی در زمینه ریز ازدیادی این گیاه انجام شده است (Hussain et al., 1999). در این تحقیق برای افزایش راندمان روش های ازدیاد درون شیشه ای فلفل رقم سبز (California wonder) اقدام به ارزیابی اثرات نیترات نقره در محیط ریز ازدیادی نمودیم.

مواد و روش‌ها

بعد از ضدعفونی بذر های رقم سبز (California wonder) در محلول اتانول ۷۰٪ وسپس هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ و خشک کردن در محیط محیط کشت که در ظروف پتری هستند قرار گرفت و با پارافیلم سطح پتری پوشیده شد. کشت ها در اتاق کشت با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور فلورسنت سفید و ۸ ساعت تاریکی با شدت $70\pm3\mu Mol/m^2/s$ نگهداری شدند. ریز نمونه ها به منظور افزایش رشد هر ۱۴ روز یکبار به محیط کشت جدید حاوی ترکیبات مشابه انتقال داده شدند. پس از گذشت ۴ هفته شاخساره های کوچکی (به طول ۱/۰-۰/۵ سانتی متر) حداقل در ۷۰ درصد ریز نمونه ها پدیدار شدند. بعد از گذشت ۷ هفته از کشت طول شاخساره های باززایی شده به ۲ سانتی متر رسید، سپس ساقه ها را طوری برش داده که هر ریز نمونه دارای یک گره باشد. ۵ عدد از این ریز نمونه ها مجددا به ظروف پتری حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت پایه MS و مواد تنظیم کننده رشد BAP (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر) و NAA(۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی گرم بر لیتر) و غلظت های ۰، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم

بر لیتر $AgNO_3$ قرار داده شد. تنظیم دقیق pH محیط کشت به روی ۵/۸ با استفاده از HCl ۱ مولار یا KOH ۱ مولار انجام گردید. ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار و ۰/۴٪ ذغال فعال به محیط کشت اضافه شد. استریلیزه کردن محیط کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید (فشار ۱۱۸ کیلو پاسکال). هنگامیکه طول شاخساره ها به ۶-۵ سانتی متر رسیدند، زمان انتقال به محیط کشت ریشه زایی که شامل محیط کشت پایه MS حاوی IBA (۱، ۲، ۴ میلی گرم بر لیتر) و $AgNO_3$ (۰، ۱، ۲، ۳ میلی گرم بر لیتر) است فرا می رسد. کشت ها در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت تحت شرایط نور فلورسنت سفید، $70\pm3\mu Mol/m^2/s$ نگهداری شدند. شاخساره ها هر ۲ هفته یکبار واکشت شدند. پس از گذشت ۶ هفته، ریشه زایی شاخساره ها، ریشه های نسبتا طویل و ریشه های جانبی کوتاهتر مشاهده گردیدند. در محل قاعده شاخساره مقداری کالوس نیز در مراحل اولیه ریشه زایی تشکیل شده بود. شاخساره های ریشه دار شده از محیط کشت خارج و ریشه ها با آب گرم شیر (تقریبا ۳۵ درجه سانتی گراد) شسته شدند تا آگار چسبیده به آن ها جدا شود. هر یک از گیاهان به طور جداگانه به گلدان های پلاستیکی حاوی مخلوط کمپوست، ورمی کولایت و پرلایت (به نسبت ۲:۱:۱) منتقل گردیدند. گیاهان به طور کامل با آب شسته شدند. گیاه داخل گلدان با کیسه های پلاستیکی پوشانده و در اتاق رشد در دمای ۲±۲۰ درجه سانتی گراد و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت تحت شرایط نور فلورسنت سفید، $300\pm3\mu Mol/m^2/s$ نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز پوشش پلاستیکی از قسمت بالایی گیاه برداشته تا گیاه با کاهش رطوبت نسبی مواجه شده و مرحله سازگاری درشرایط درون شیشه ای را بهتر تحمل کند. باقی مانده پوشش پلاستیکی نیز بعد از ۲ هفته دیگر بر داشته شد.گیاهان به گلخانه منتقل شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SAS نسخه ۹/۱، آنالیز انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف نیترات نقره (AgNO3) در ترکیب با مواد تنظیم کننده رشد BAP، NAA بر میزان باززایی شاخساره های حاصل از ریز نمونه های گره در جدول ۱ آورده شده است. استفاده از تیمارهای مختلف AgNO3 اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. میزان باززایی شاخساره ها در غلظت ۸ میلی گرم بر لیتر AgNO3 با تیمارهای ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر NAA ۱۰۰٪ بود.

جدول ۱- نتایج اثرات نیترات نقره بر میزان باززایی شاخساره های حاصل از ریز نمونه های گره

تنظیم کننده های رشد		(٪) باززایی شاخساره در غلظت های مختلف $AgNO_3$(mg/L)			
BAP(mg/L)	NAA(mg/L)	۰	۲	۴	۸
۰/۵	۰/۱	۱۳/۷h	۲۲/۴g	۶۰/۰c	۸۳/۱a
۱	۰/۲	۱۵/۱۰h	۳۷/۳fg	۷۱/۲c	۹۴/۲a
۱/۵	۰/۴	۱۷/۰۴i	۴۴/۹fg	۷۷/۶c	۱۰۰/۰a

اعداد با حروف مشترک درهر جدول دارای اختلاف معنی دار ($P<0.05$) نیستند.

نتایج اثر غلظت های مختلف نیترات نقره ($AgNO_3$) در ترکیب با مواد تنظیم کننده رشد BAP، NAA بر تعداد شاخساره در هر ریز نمونه باززایی شده در جدول ۲ گزارش شده است. استفاده از تیمارهای مختلف $AgNO_3$ اختلاف معنی داری در سطح ۵

درصد داشتند. تعداد شاخساره در هر ریز نمونه باززایی شده در غلظت ۸ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ با تیمارهای ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر NAA حداکثر و در غلظت ۰ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ و تیمارهای ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA حداقل گزارش گردید.

جدول ۲- نتایج اثرات نیترات نقره بر تعداد شاخساره در هر ریز نمونه باززایی شده

تعداد شاخساره در هر ریز نمونه باززایی شده در غلظت های مختلف $AgNO_3$ (mg/L)				تنظیم کننده های رشد	
۸	۴	۲	۰	NAA(mg/L)	BAP(mg/L)
۱/۸±۰/۱a	۱/۴±۰/۷ab	۱/.±۰/۰b	۰/۷±۰/۲bc	۰/۱	۰/۵
۳/۴±۰/۲a	۳/۰±۰/۱ab	۲/۸±۰/۳b	۲/۱±۰/۷bc	۰/۲	۱
۴/۳±۰/۴a	۳/۸±۰/۳b	۲/۸±۰/۰c	۲/۵±۰/۳cd	۰/۴	۱/۵

اعداد با حروف مشترک درهر جدول دارای اختلاف معنی دار ($P<0.05$) نیستند.

نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف نیترات نقره ($AgNO_3$) در ترکیب با IBA بر طول ریشه در شاخساره های ریشه دار شده در جدول ۳ گزارش شده است. استفاده از تیمارهای مختلف $AgNO_3$ اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. بلندترین ریشه ها در شاخساره های ریشه دار شده در غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ با تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر IBA و کوتاهترین آن ها در غلظت ۰ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ و تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر IBA مشاهده گردید.

جدول ۳- نتایج طول ریشه در شاخساره های ریشه دار شده

طول ریشه در شاخساره های ریشه دار شده در غلظت های مختلف $AgNO_3$(mg/L)				تنظیم کننده های رشد
۳	۲	۱	۰	IBA(mg/L)
۲/۸±۰/۹a	۲/۱±۰/۴a	۱/۶±۰/۶b	۰/۹±۰/۷c	۱
۵/۴±۰/۱a	۴/۷±۰/۲b	۳/۸±۰/۱c	۲/۵±۰/۳d	۲
۶/۴±۰/۲a	۵/۹±۰/۰b	۴/۲±۰/۷c	۳/۵±۰/۳d	۴

اعداد با حروف مشترک درهر جدول دارای اختلاف معنی دار ($P<0.05$) نیستند.

نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف نیترات نقره ($AgNO_3$) در ترکیب با IBA بر تعداد ریشه در هر شاخساره در جدول ۴ آماده است. استفاده از تیمارهای مختلف $AgNO_3$ اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. بیشترین تعداد ریشه ها در هر شاخساره در غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ با تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر IBA و کوتاهترین آن ها در غلظت ۰ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ و تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر IBA گزارش شد.

جدول ۴- نتایج تعداد ریشه در هر شاخساره

تعداد ریشه در هر شاخساره در غلظت های مختلف $AgNO_3$(mg/L)				تنظیم کننده های رشد
۳	۲	۱	۰	IBA(mg/L)

۱	۰/۱±۰/۴bc	۰/۶±۰/۱b	۰/۹±۰/۰b	۱/۸±۰/۹a
۲	۰/۵±۰/۲c	۰/۸±۰/۱c	۱/۷±۰/۱b	۲/۰±۰/۱a
۴	۰/۸±۰/۲d	۱/۲±۰/۷c	۲/۶±۰/۰b	۳/۴±۰/۱a

اعداد با حروف مشترک درهر جدول دارای اختلاف معنی دار ($P<0.05$) نیستند.

در مطالعه ای که توسط Ozden-Tokatli و همکاران (۲۰۰۵) با هدف بررسی پاسخ ریز نمونه های پسته به نیترات نقره انجام گرفت مشخص شد که افزودن نیترات نقره به هنگام استفاده از KIN در محیط کشت، هیچ گونه تاثیر مثبتی به روی باززایی گره ها نداشت، زیرا KIN به تنهایی و در حداقل غلظت می تواند بر باززایی ریز نمونه ها موثر واقع شود. اما کاربرد $AgNO_3$ خصوصا در غلظت های بالای BA از قهوه ای شدن بافت ها جلوگیری کرد. استفاده از $AgNO_3$ اثر بازدارندگی موثری بر تولید اتیلن دارد (Barghchi and Alderson, 1985). این اثرات در آزمایشات ما نیز به وضوح قابل مشاهده بود. اثرات بازدارندگی $AgNO_3$ به روی تولید اتیلن در محیط ریز ازدیادی پسته معنی دار بود و باززایی در این محیط کشت بالاتر از محیط کشت فاقد نیترات نقره مشاهده شد(Ozden-Tokatli et al., 2005). اثرات بازدارندگی $AgNO_3$ به روی تولید اتیلن و افزایش میزان باززایی در محیط کشت گونه های مختلف *Brassica* (Pua, 1993) و در *Helianthus annus* ، (Chirabi et al., 1991) و Mangosteen (Goh et al., 1997) نیز گزارش شد. همچنین Chi و همکاران (۱۹۹۰) بیان کردند که استفاده از AVG و $AgNO_3$ در محیط کشت سبب افزایش میزان باززایی ریز نمونه های چندین ژنوتیپ *Brassica* گردید. یون Ag^{2+} از تولید اتیلن در سلول ها ممانعت می کند (Yang and Hoffman, 1984). نیترات نقره قادر است تولید اتیلن را در محیط برون شیشه ای نیز محدود نماید (Goren et al., 1984). در *Hevea brasiliensis* اتیلن موجب افزایش پراکسیداز و آنزیم پلی فنول اکسیداز که از عوامل تولید ترکیبات فنولی و قهوه ای شدن بافت ها هستند می گردد که نیترات نقره مانع این گونه واکنش ها در محیط های ریز ازدیادی شده بود (Housti et al., 1992).در مطالعه ی ما به روی *Capsicum annum* L. cv. California wonder، افزایش میزان باززایی، تعداد شاخساره، ریشه زایی و تعداد ریشه ها در شاخساره ها در محیط ریز ازدیادی نیز حاصل عملکرد مثبت نیترات نقره در ممانعت از تولید اتیلن و ایجاد ترکیبات فنولی بود.

منابع

1. Barghchi, M. and Alderson, P.G. 1985. In vitro propagation of Pistacia vera L. and commercial cultivars Ohadi and Kalleghochi. J. Hortic. Sci. 60 (3):423–43.
2. Chi, G.L., Barfield, D.G., Sim, G.A. and Pua, E.C.1990. Effect of AgNO and aminovinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant Brassica genotypes. Plant Cell Rep. 9:195–198.
3. Chirabi, B.K.M., Latche, A., Roustan, J.P. and Fallot, J.1991. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of Helianthus annuus by ethylene inhibitors, silver and cobalt. Plant Cell Rep. 10: 204–207.
4. Goh, C.J., Ng, S.K., Lakshmanan, P. and Loh, C.S. 1997. The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (Garcinia mangostana L.) leaves cultured in vitro. Plant Sci. 124: 193–202.
5. 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 Rep. 19: 64–68.
6. Housti, F., Coupe, M. and d'Auzac, J. 1992. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of
7. Hevea brasiliensis callus. Physiol. Plant. 86: 445–450.Pua, E.C.1993. Cellular and molecular aspects of ethylene on plant morphogenesis of recalcitrant Brassica species in vitro. Bot. Bull. Acad. Sci. 34:191–209.Toussaint-Samat, M. 1993. A Histoly of Food. Basil Blackwell, USA.
8. Yang, S.F. and Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant
9. Physiol. 35: 155–189.

The Effects of Silver Nitrate On Micropropagation of *Capsicum annum* L. cv. California wonder

N. Habibi[1*], H. nemati[2]

1- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. 2- Associate Professor,Dep. of Horticultural Science, Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

*Corresponding author: nahidhabibi121@yahoo.com

Abstract

This study was conducted to determine the effects of silver nitrate on Micropropagation of *Capsicum annum* L. cv. California wonder as a factorial complete randomized design (RCD) with four replications. Shoot s nods were cultured on MS medium supplemented with BAP, NAA and $AgNO_3$, caused advantitious shoots proliferation after seven weeks. Shoots were also rooted on MS medium containing IBA. As the results, the highest rate of proliferation and the number of shoots were obtained on MS medium containing 1.5 mg/L BAP, 0.4 mg/L NAA and 8.0 md/L $AgNO_3$, Whereas the best medium culture for rooting these shoots was MS medium with 4.0 mg/L IBA and 3.0 mg/L $AgNO_3$. For acclimatized, plantlets were transplanted to compost mixed after 6 weeks from transferred to rooting medium culture.

Key words: Micropropagation, Tissue culture