



The effect of iron oxide nanoparticles on the cultivation of anthers of bell pepper (*Capsicum annuum* L.)

Mohammadi M^a, Haddad R^{b*}, Garossi GA^b

^a M.Sc. student in Biotechnology, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

^b Associate Professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Mohammadi M, Haddad R, Garossi GA. The effect of iron oxide nanoparticles on the cultivation of anthers of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Cell and Tissue . 2026; 17(1):73-88.

<https://doi.org/10.61882/JCT/17..1.73>

KEYWORDS

Regeneration,
Plant growth regulators,
Embryogenesis,
Callus formation,
Tissue culture.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: The anther culture technique is used *in vitro* for many plant species as an effective tool for obtaining haploid and doubled-haploid lines.

Aims: This study aimed to investigate the influence of different concentrations of iron oxide nanoparticles and benzylaminopurine (BAP) on callus formation, embryogenesis, regeneration, and rooting in bell pepper anther culture

Materials and Methods: The experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design under *in vitro* culture conditions. Flower buds of appropriate size (equal sepal to petal ratio or slightly longer petal) were collected from the greenhouse, and acetocarmine solution was used to determine the growth and development stage of microspores. The results showed that the most suitable stages for embryogenesis induction were the late mononuclear and early binuclear stages. In order to sterilize the flower buds, 70% ethanol for 30 seconds and 5% sodium hypochlorite for 20 minutes were used, and after each stage, they were washed three times with sterile distilled water. Then, the anthers were separated from the flower bud and placed in C medium containing 2 mg/L naphthalene acetic acid (NAA), different concentrations of BAP (0, 0.1, 0.5, and 1 mg/L), and different concentrations of iron oxide nanoparticles (0, 1, 10, and 20 mg/L). After that, the explants cultured in C medium were kept at 35°C in a dark place for 8 days in order to apply heat treatment. Then, they were transferred to 25°C in the light for 4 days. After this period, in order to induce embryogenesis, the explants were transferred from C medium to R medium

* Corresponding author. Tel.:02833901242 Fax:

E-mail address: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

DOI: : <https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.73>

Received: 24 Nov. 2024 ; Received in revised form: 8 Nov. 2025 ; Accepted: 9 Feb. 2026

Original Article

© Author



and were subcultured every three weeks until embryos emerged. For further growth and root development, the embryos were transferred to V medium.

Results: The analysis of variance showed that different concentrations of iron oxide nanoparticles had a significant effect on the percentages of embryogenesis, regeneration, and rooting, but had no significant effect on the percentage of callus formation. The results of the mean comparison showed that among the different concentrations of iron oxide nanoparticles, the 1 mg/L treatment produced the highest embryogenesis percentage (11.11%). Furthermore, the mean comparison results for regeneration indicated that the 1 mg/L treatment resulted in the highest regeneration percentage (16.66%). The results of the interaction effects showed that among the different concentrations of iron oxide nanoparticles and BAP, the highest percentage of embryogenesis was observed in the treatment of 20 mg/L iron oxide nanoparticles and 0 mg/L BAP. Also, the treatment of 20 mg/L iron oxide nanoparticles and 0 mg/L BAP had the highest percentage of regeneration (33.33%). After sufficient growth and root formation, the obtained plants were removed from the glass culture containers and transferred to pots containing sterilized culture medium and watered for adaptation. The tops of the pots were covered with plastic cups, and after three days, the cups were pierced, and the plastic was gradually removed from the plant for further adaptation. Ploidy levels were determined by chromosome counting after staining the root tip cells. The results showed that out of the 23 obtained plants, 21 were diploid and had $2n=2x=24$ chromosomes, and 2 were haploid and had $n=x=12$ chromosomes.

Discussion: Applying different concentrations of iron oxide nanoparticles in medium C had a positive effect on the regeneration of bell pepper plants. Iron is a vital micronutrient for several key cellular processes in plants. In addition, iron is essential for ensuring the structural integrity of proteins. Iron nanoparticles positively affect plant growth in tissue culture by increasing morphological parameters. The beneficial effects of nanoparticles on plants are related to their high solubility and reactivity, which affect how they interact with membranes and other cellular components, due to their large specific surface area. The treatment of 20 mg/L of nanoparticles and 0 mg/L of BAP had the highest regeneration percentage. The culture medium containing nano-iron leads to the plant benefiting from the element iron directly at all different stages of growth and its participation with other nutrients, and therefore the production of many nutrients containing it leads to the transfer of their excess to different parts of the plant. The presence of nano iron in the culture medium has led to a nutritional balance in the plant and, as a result, has improved the plant growth process by increasing the amount of nutrients and elements accumulated in the microsample. Cytokinins act as a nutrient reservoir, which leads to an increase in the percentage of elements in the microsample and an increase in the percentage of sugars in the culture medium, which is important in the structural processes in tissues and affects the accumulation of sugars in it, and is reflected in increased vegetative growth.

Conclusion: In bell pepper anther culture, different concentrations of iron oxide nanoparticles, along with plant growth regulators at different concentrations, showed a great effect on embryogenesis, regeneration, and rooting.



تاثیر نانوذره اکسید آهن در کشت بساک گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.)

مریم محمدی^۱، رحیم حداد*^۲، قاسمعلی گروسی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
^۲ دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: هدف از انجام این مطالعه، بررسی غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن در کشت بساک گیاه فلفل دلمه‌ای روی صفات درصد کالوس‌زایی، جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی است. مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شد. جوانه‌های گل در اندازه مناسب از گلخانه جمع آوری شده و پس از مراحل مختلف استریل، بساک‌ها در محیط کشت C حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن (۰، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. نتایج: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که به کار بردن غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن تاثیر معنی‌داری بر درصد جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه دارد. نتایج اثرات متقابل نشان داد که در بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن و BAP بیشترین درصد جنین‌زایی (۳۸/۸۸ درصد) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن و صفر میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. همچنین تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن و صفر میلی‌گرم در لیتر BAP دارای بیشترین درصد باززایی (۳۳/۳۳ درصد) بود. تعیین سطوح پلوئیدی از طریق شمارش کروموزومی به وسیله رنگ آمیزی سلول‌های نوک ریشه انجام گرفت که از ۲۳ گیاه بدست آمده ۲۱ عدد دیپلوئید و ۲ عدد هاپلوئید بودند. نتیجه‌گیری: غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌های مختلف، نوع محیط کشت مورد استفاده، پیش تیمار دمایی، اندازه غنچه و مرحله مناسب میکروسپور تاثیر زیادی را در جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه فلفل دلمه‌ای نشان دادند.</p>	<p>باززایی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، جنین- زایی، کالوس‌زایی، کشت بافت</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۰</p>

۱- مقدمه

فلفل دلمه‌ای با نام علمی *Capsicum annuum* از خانواده Solanacea می‌باشد که اهمیت اقتصادی و غذایی بسیار زیادی دارد (۱). فلفل دلمه‌ای یک گیاه گلدار دولپه‌ای است که در نواحی معتدله به صورت یک ساله ولی در نواحی گرمسیری ممکن است رشد آن تا چند سال تداوم داشته باشد. فلفل گیاهی خودگشن است اما بر اساس تعداد و میزان فعالیت زنبورها در طول دوره

* نویسنده مسئول؛ رحیم حداد تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۲۴۲

آدرس پست الکترونیک: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

گرده‌افشانی، دگرگشتی هم در این گیاه دیده شده است (۲). گل‌های فلفل دوجنسی (Hermaphrodite)، کامل و دارای اندام‌های جنسی نر و ماده هستند. کشت بافت گیاهی هسته زیست‌شناسی گیاهی است که برای حفاظت، تکثیر انبوه، دستکاری ژنتیکی، تولید ترکیبات زیست‌فعال و بهبود گیاه مهم است. از جمله روش‌های درون شیشه‌ای القای هاپلوئیدی می‌توان به آندروژنز (کشت بساک و میکروسپور) و ژینوژنز (کشت تخمک و تخمدان) اشاره نمود (۳). آندروژنز را می‌توان به سه مرحله ۱- القای جنین‌زایی ۲- باززایی هاپلوئیدها و به‌دنبال آن ۳- دابلینگ کروموزوم مصنوعی متمایز کرد (۴، ۵). تکنیک کشت بساک در شرایط آزمایشگاهی در بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌عنوان ابزاری موثر در به‌دست آوردن خطوط هاپلوئید و دابل هاپلوئید استفاده می‌شود (۶). بسته به نوع گونه‌های گیاهی و تا حدودی محیط کشت، گرده آندروژنی یا مستقیماً تبدیل به جنین می‌شود و گیاهچه را به‌وجود می‌آورد یا به‌صورت غیرمستقیم ابتدا کالوس تشکیل می‌دهد و بعد جنین را ایجاد می‌کند و در نهایت تبدیل به گیاهچه می‌شود (۷). بدین ترتیب با دوبرابر کردن کروموزوم‌ها در گیاهان هاپلوئید می‌توان لاین‌های هموزیگوت پایدار ژنتیکی را در زمان کوتاهی به‌دست آورد. چنین گیاهانی در برنامه‌های اصلاحی برای تولید واریته‌های جدید مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳). در خانواده سولاناسه، فلفل از نظر پاسخ‌دهی به آندروژنز در رتبه سوم قرار دارد. برخی از ژنوتیپ‌های فلفل مقاوم هستند و فراوانی جنین‌زایی در کشت بساک هنوز کم است و یا اصلاً واکنشی مشاهده نمی‌شود (۸). از جمله مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در کشت بساک گیاه فلفل دلمه‌ای می‌توان به ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیک گیاهان دهنده بساک، توسعه مرحله میکروسپور و اندازه غنچه، اعمال تیمارهای سرمایی و گرمایی، ترکیبات محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اشاره کرد (۹، ۱۰). نانو تکنولوژی به‌عنوان یک فناوری جدید در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. نانو ذرات، ذراتی به ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند و دارای ویژگی مهمی مانند نسبت سطح به حجم بالا، ویژگی‌های نوری، حرارتی و الکتریکی هستند که دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برجسته‌ای از نظر جذب و فعالیت هستند (۱۱). در سال‌های اخیر، کاربرد نانوذرات با موفقیت منجر به حذف آلاینده‌های میکروبی از ریزنمونه‌ها شده و نقش مثبت نانوذرات در القای کالوس، اندام‌زایی، جنین‌زایی جسمی، تنوع سوماکلونال و تولید متابولیت ثانویه نشان داده شده است (۱۲). در کشت بافت گیاهی گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان دهنده ورودی‌های مثبت فناوری نانو است. نانوذرات به‌طور گسترده‌ای برای بهبود جوانه‌زنی بذر استفاده شده است (۱۳)، ادغام نانوذرات طلا در محیط کشت MS باعث بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در *Arabidopsis thaliana* شد و طول غلاف و تعداد دانه در گیاهان تیمار شده با ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات طلا بیشتر بود. تیمار با نانوذرات طلا فعالیت آنتی‌اکسیدانسی را بهبود بخشید و منجر به کاهش بیان (miR398 و miR408) شد. این تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی ممکن است مسئول اثرات مفید نانوذرات طلا باشد (۱۵). در *Brassica nigra* افزودن نانوذرات اکسیدروی (۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت MS از جوانه‌زنی بذر جلوگیری کرد. در حضور نانوذرات اکسیدروی، طول ساقه و ریشه به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار گرفتند. از سوی دیگر، رشد ریز نمونه‌های ساقه روی محیط کشت MS حاوی ۱ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی منجر به تشکیل ریشه شد (۱۶). افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کبالت به محیط کشت اصلاح شده MS باعث افزایش تعداد شاخه‌ها، طول ساقه و ریشه‌زایی در *Mentha longifolia* شد (۱۷). تاثیر نانو مواد بسته به ترکیب شیمیایی، دوز، اندازه، پایداری و نوع ترکیب محیط کشت، روش کاربرد، نوع ریز نمونه و گونه گیاهی آن‌ها متفاوت است (۱۸). هدف از این پژوهش بررسی آندروژنز از طریق کشت بساک در گیاه فلفل دلمه‌ای و تاثیر نانوذره اکسید آهن در کالوس‌زایی، جنین‌زایی، باززایی و تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه از یک نوع ژنوتیپ فلفل دلمه‌ای (Nirvin) استفاده شد. جوانه‌های گل در اندازه مناسب (نسبت بین کاسبرگ و گلبرگ برابر و یا گلبرگ کمی بلندتر) از گلخانه جمع آوری شده و به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انتقال یافتند.

تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپورها: به منظور تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپورها، بساک‌ها از جوانه‌های گل جدا و برای رنگ آمیزی از محلول استوکارمین استفاده شد. بدین صورت که یک گرم پودر کارمن در ۴۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل شد. سپس ۵۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. برای تشدید رنگ ۱ تا ۲ قطره هیدروکسید آهن به آن اضافه شد. بساک‌ها پس از رنگ آمیزی روی لام آزمایشگاهی له و میکروسپورهای آن‌ها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند (۱۹). در بسیاری از گونه‌ها مناسب‌ترین مرحله برای القای جنین‌زایی، اواخر تک‌هسته‌ای تا اوایل دوهسته‌ای (پس از اولین میتوز دانه‌گرده) است (شکل ۱ ب و ت).

ضد عفونی جوانه‌های گل: به منظور ضد عفونی سطحی، ابتدا جوانه‌های گل به مدت یک ساعت زیر آب شهری قرار گرفتند. سپس در داخل هود لامینار ایرفلو سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در ادامه به مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد (حجم به حجم) و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (وزن به حجم) ضد عفونی شدند. پس از هر مرحله ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۲۰).

کشت بساک: پس از مراحل استریل، بساک‌ها از جوانه‌های گل جدا و در محیط کشت C (Dumas de Valux, 1981) حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA، غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن (۰، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند (۲۱، ۲۲). ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت C (جدول ۱) به مدت ۸ روز در تاریکی و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد جهت اعمال تیمار گرمایی در آون نگهداری شدند. پس از آن به مدت ۴ روز به روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد انتقال داده شدند. به منظور القای جنین‌زایی، ریزنمونه‌ها از محیط کشت C به محیط کشت R (جدول ۱) حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA، چهار غلظت BAP (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و چهار غلظت نانوذره اکسید آهن (۰، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) انتقال یافتند و هر سه هفته یک بار واکشت شدند. پس از ظهور جنین‌ها در محیط کشت R، آن‌ها به محیط کشت V (جدول ۱) که فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است جهت توسعه ریشه و رشد بیشتر گیاه انتقال داده شدند.

سازگار کردن گیاهان حاصل از کشت بساک: گیاهچه‌های به دست آمده پس از رشد کافی و تشکیل ریشه، از ظروف کشت شیشه‌ای خارج و ابتدا ریشه‌ها با آب مقطر شسته شدند. سپس به گلدان‌های کوچک حاوی بستر کشت ضد عفونی شده با اتوکلاو (پرلیت، پیت ماس، کوکوپیت و خاک مزرعه به نسبت ۲۵ درصد) منتقل و آبیاری شدند و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ژرمیناتور قرار گرفتند. گلدان حاوی گیاهچه برای این که رطوبت نسبی در حد بالایی حفظ شود، بوسیله نایلون یا لیوان پلاستیکی پوشانده شدند. پس از گذشت سه روز، پلاستیک‌ها سوراخ گردید و به تدریج پلاستیک از روی گیاه برداشته شد تا سازگاری کامل گیاه انجام شود (شکل ۲ پ و ت).

جدول ۱: عناصر تشکیل دهنده محیط کشت C, R و V

	Medium C (mg/L)	Medium R (mg/L)	Medium V (mg/L)
Macroelements			
KNO ₃	2150	2150	1900
NH ₄ NO ₃	1238	1238	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	412	412	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	313	313	440
KH ₂ PO ₄	142	142	170
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	50	50	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	38	38	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	34	34	-
KCl	7	7	-
Microelements			
MnSO ₄ .H ₂ O	22/130	20/130	0/076
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3/625	3/225	1/000
H ₃ BO ₃	3/150	1/550	1/000
KI	0/695	0/330	0/010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0/188	0/138	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0/016	0/011	0/030
CoCl ₂ .6H ₂ O	0/016	0/011	-
AlCl ₃ .6H ₂ O	-	-	0/050
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0/030
Vitamin and amino acid			
Myo-inositol	100/00	100/00	100/00
Pyridoxine HCl	5/500	5/500	5/500
Nicotinic acid	0/700	0/700	0/700
Thiamine HCl	0/600	0/600	0/600
Calcium pantothenate	0/500	0/500	0/500
Vitamin B12	0/030	-	-
Biotin	0/005	0/005	0/005
Glycine	0/100	0/100	0/100
Chelated iron			
Na ₂ EDTA	18/65	18/65	37/30
FeSO ₄ .7H ₂ O	13/90	13/90	27/28

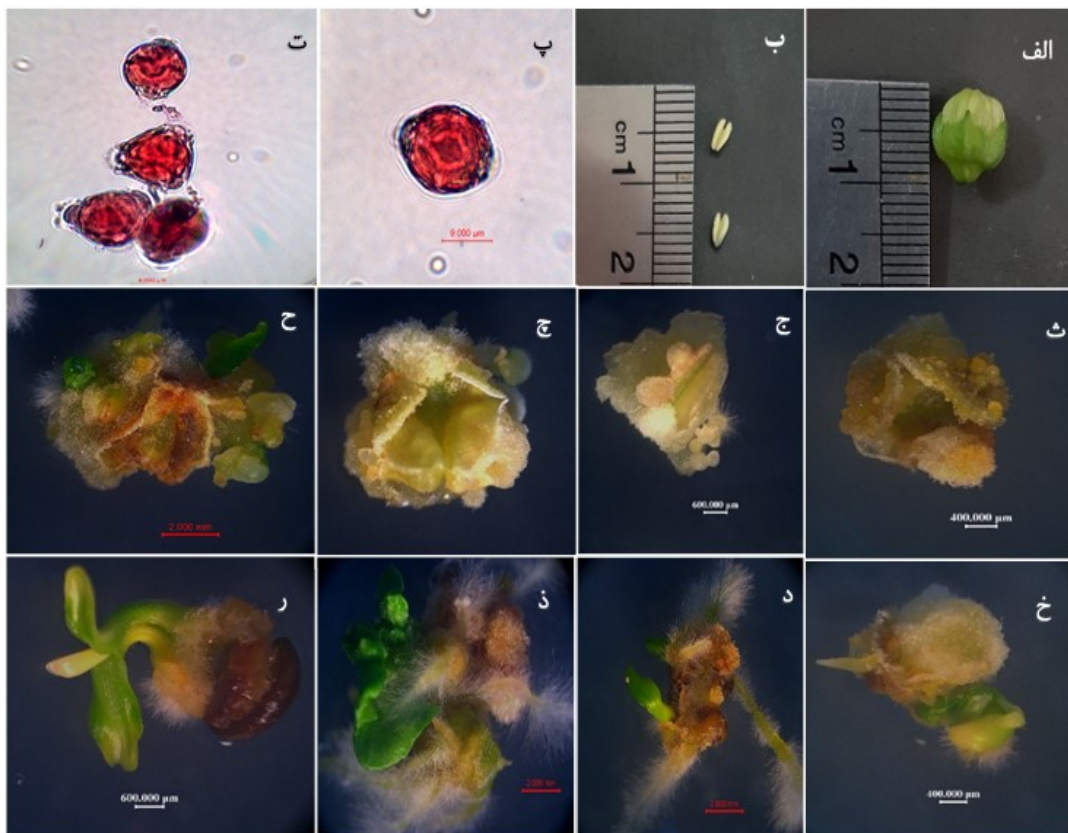
آزمایش سیتولوژیکی برای شمارش تعداد کروموزومها: ریشه‌های جوان به طول ۱ تا ۲ سانتی‌متر جدا و به مدت ۳ ساعت در داخل کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد قرار گرفتند. سپس سه بار با آب مقطر شسته شده و به مدت ۲۴ ساعت در محلول تثبیت‌کننده لویتسکی (فرمالدهید ۱۰ درصد و اسید کرومیک ۱ درصد به نسبت ۱:۱) در دمای ۴ درجه منتقل شدند. پس از آن به مدت ۳ ساعت زیر آب شهری قرار گرفتند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در اتانول ۷۰ درصد نگهداری شدند. هیدرولیز ریشه‌ها در NaOH یک نرمال به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور رنگ آمیزی ریشه‌ها از محلول هماتوکسیلین به مدت ۱۴ ساعت در تاریکی استفاده شد. در نهایت برای نرم شدن کامل بافت ریشه و تهیه لام، نوک ریشه‌ها به مدت ۲ ساعت در آنزیم سیتاز قرار گرفت (۲۳).

۳- آنالیز آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار برای تیمارها انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت و برای تجزیه آماری داده‌های حاصل از پژوهش از نرم افزار SPSS استفاده شد.

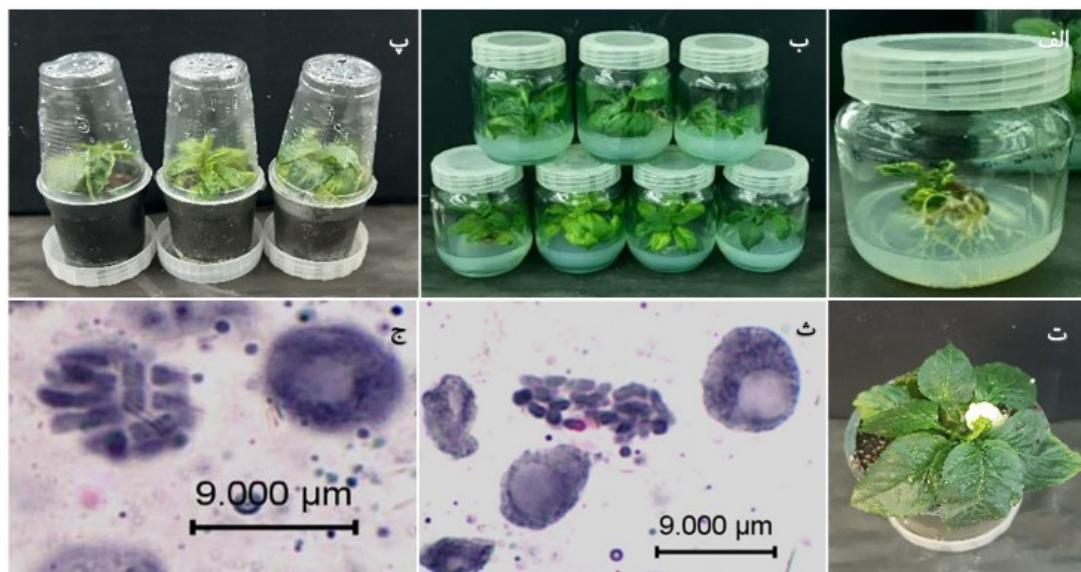
۴- نتایج

نتایج آزمایش تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپوره‌های فلفل نشان داد که در اکثر موارد جوانه‌هایی از گل مناسب هستند که اندازه گلبرگ و کاسبرگ با هم برابر و یا گلبرگ کمی بلندتر باشد و نیمی از بساک‌ها بنفش رنگ باشند (شکل ۱ الف و ب). جوانه‌هایی که در این مرحله از رشد قرار دارند عمدتاً حاوی میکروسپورهایی در انتهای مرحله تک هسته‌ای یا ابتدای مرحله دوهسته‌ای هستند (شکل ۱ پ و ت). ریز نمونه‌ها پس از انتقال به محیط کشت C و اعمال تیمار گرمایی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز متورم شدند. پس از گذشت ۱۴ تا ۲۰ روز، بساک‌ها شروع به کالوس‌زایی کردند و پس از گذشت ۴۰ تا ۵۰ روز در محیط کشت R، جنین‌ها بر روی کالوس القا شدند. مراحل جنین‌زایی کروی، قلبی، اژدری و کوتیلدونی در شکل ۱ نشان داده شده است. به‌منظور رشد جنین‌ها و تولید گیاهچه، آن‌ها به محیط کشت V بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند.



شکل ۱: مراحل مختلف کشت بساک فلفل، القا کالوس و جنین‌زایی. (الف) جوانه گل فلفل در اندازه مناسب جهت کشت بساک، (ب) بساک فلفل (نوک) بساک‌ها بنفش رنگ است، (پ) میکروسپوره‌های فلفل دلمه‌ای در مرحله تک هسته‌ای، (ت) میکروسپوره‌های فلفل دلمه‌ای در مرحله ابتدای دوهسته‌ای، (ث و ج) جنین‌های کروی شکل، (چ و ح) جنین قلبی شکل، (خ) جنین اژدری شکل، (د، ذ و ر) جنین کوتیلدونی.

در این مطالعه، ۳۱ گیاهچه حاصل گردید و ۲۳ گیاه رشد خود را کامل نمودند (شکل ۲ الف و ب). با شمارش تعداد کروموزوم‌ها مشخص شد که ۲۱ عدد از گیاهان دیپلوئید و دارای $2n=2x=24$ کروموزوم و ۲ عدد از گیاهان هاپلوئید و دارای $n=x=12$ کروموزوم هستند (شکل ۲ ث و ج).



شکل ۲: سازگاری گیاهان و تعیین سطوح پلوئیدی آن‌ها. (الف و ب) گیاهان کامل و احیا شده داخل شیشه، (پ) افزایش رطوبت نسبی محیط توسط پوشش پلاستیکی شفاف، (ت) برداشتن پوشش پلاستیکی برای سازگاری کامل گیاه، (ث) تصویری از کروموزوم یک گیاه دیپلوئید، (ج) تصویری از کروموزوم یک گیاه هاپلوئید.

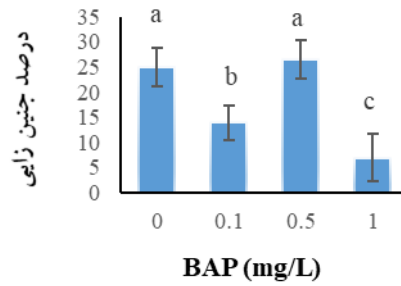
نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر اصلی و متقابل سیتوکینین و نانوذره اکسید آهن برای صفات مورد مطالعه (درصد کالوس‌زایی، جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی) در جدول ۲ نشان داده شده است. اثر اصلی و متقابل سیتوکینین و نانوذره اکسید آهن بر درصد جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد ولی بر درصد کالوس‌زایی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس اثر اصلی و متقابل سیتوکینین و نانوذره اکسید آهن بر درصد کالوس‌زایی، جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییرات
درصد کالوس‌زایی	درصد جنین‌زایی	درصد باززایی	درصد ریشه‌زایی		
۵۲/۱۰۴ ^{ns}	۱۰۳۳/۹۳۵ ^{**}	۴۳۷/۸۸۲ ^{**}	۵۲۳/۵۳۶ ^{**}	۳	سیتوکینین
۳۶/۶۶۶ ^{ns}	۵۰۹/۲۵۵ ^{**}	۲۶۸/۱۵۵ ^{**}	۲۰۴/۹۲۲ ^{**}	۳	نانوذره اکسید آهن
۵۷/۲۵۰ ^{ns}	۲۱۶/۰۳۶ ^{**}	۳۰۹/۲۶۲ ^{**}	۱۱۵/۱۷۱ ^{**}	۹	سیتوکینین × نانوذره اکسید آهن
۵۷/۸۹۴	۲۱/۱۸۲	۱/۶۰۲	۵/۳۶۲	۳۲	خطا
۷/۹۳	۲۵/۴۹	۱۱/۷۵	۱۸/۰۸		ضریب تغییرات (%)

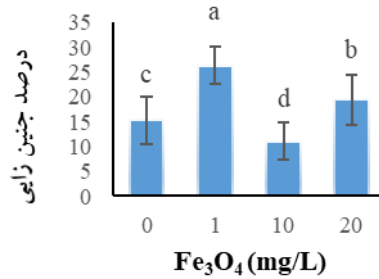
** و ns: به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی بر غلظت‌های مختلف BAP نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای بیشترین درصد جنین‌زایی (۲۶/۳۸ درصد) و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای کم‌ترین درصد جنین‌زایی (۶/۹۴ درصد) است که از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بودند (شکل ۳).



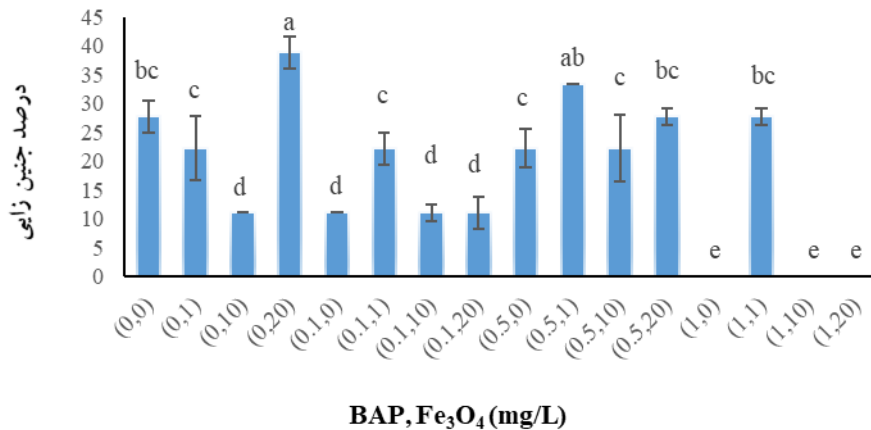
شکل ۳: مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی در غلظت‌های مختلف هورمون BAP

تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن بیشترین درصد جنین‌زایی (۲۶/۳۸ درصد) و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن کم‌ترین درصد جنین‌زایی (۱۱/۱۱ درصد) را نشان دادند که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بودند (شکل ۴).



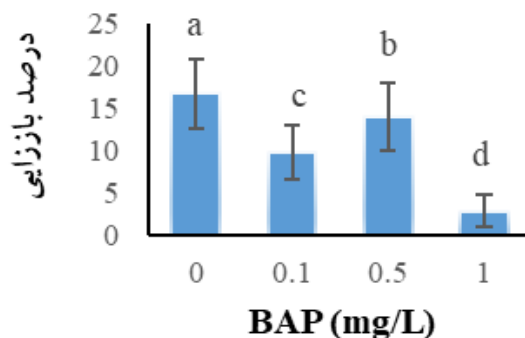
شکل ۴: مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن

مقایسه میانگین اثرات متقابل سیتوکینین و نانوذره اکسید آهن بر درصد جنین‌زایی نشان داد که در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، صفر میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن، تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن بیشترین درصد جنین‌زایی (۳۸/۸۸ درصد) را دارد (شکل ۵).



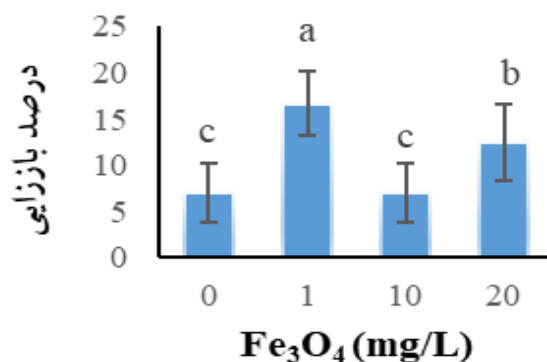
شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل BAP و نانوذره اکسید آهن بر درصد جنین‌زایی

نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی در غلظت‌های مختلف BAP در شکل ۶ نشان داد که بیشترین درصد باززایی (۱۶/۶۶ درصد) در تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و کم‌ترین آن در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند.



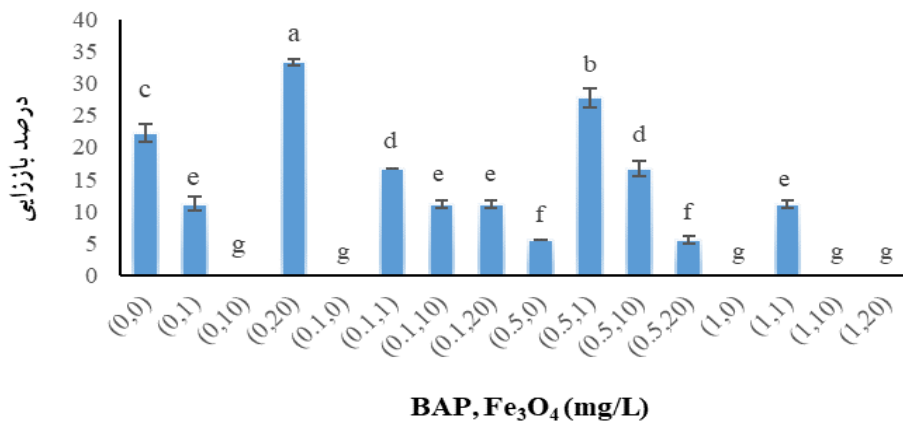
شکل ۶: مقایسه میانگین درصد باززایی در غلظت‌های مختلف BAP

اثر نانوذره بر درصد باززایی در شکل ۷ مشخص کرد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن دارای بیشترین درصد باززایی (۱۶/۶۶ درصد) و تیمار صفر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دارای کم‌ترین درصد باززایی (۶/۹۴ درصد) است که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین کم‌ترین و بیشترین درصد باززایی مشاهده شد.



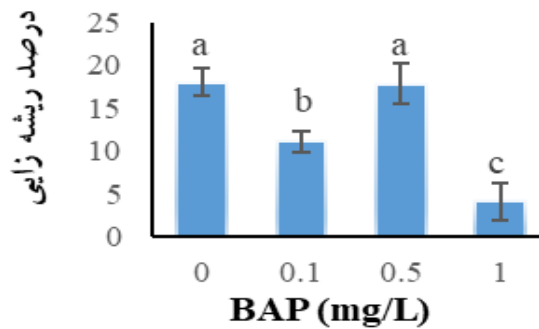
شکل ۷: مقایسه میانگین اثر نانوذره اکسید آهن بر درصد باززایی

مقایسه میانگین اثرات متقابل سیتوکینین و نانوذره اکسید آهن نشان داد که تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن دارای بیشترین درصد باززایی (۳۳/۳۳ درصد) است (شکل ۸).



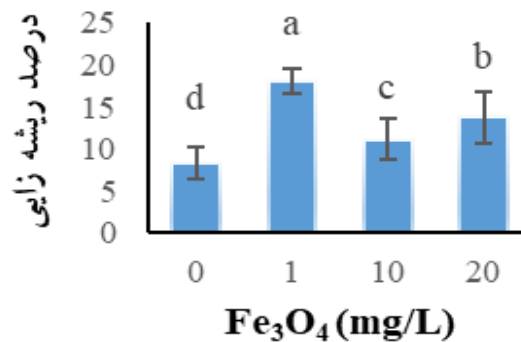
شکل ۸: مقایسه میانگین اثرات متقابل BAP و نانوذره اکسید آهن بر درصد باززایی

نتایج مقایسه میانگین اثر سیتوکینین بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۸/۰۵ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و کم‌ترین درصد ریشه‌زایی (۴/۱۶ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد که از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بودند (شکل ۹).



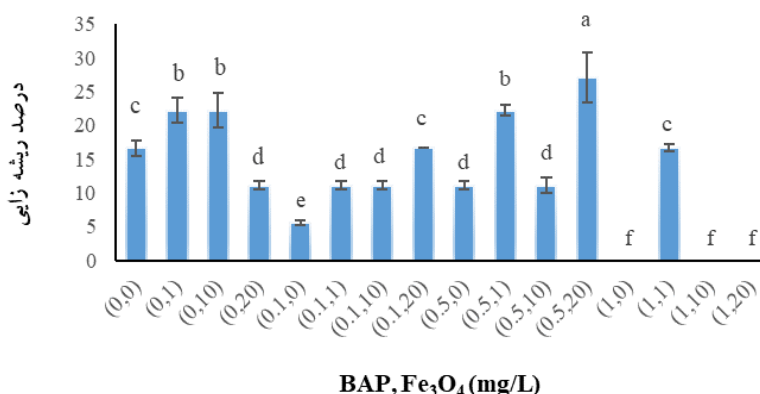
شکل ۹: مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف BAP

همچنین اثر نانوذره بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن دارای بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۸/۰۵ درصد) و کم‌ترین آن (۸/۳۳ درصد) در تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن به‌دست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن

اثرات متقابل سیتوکینین و نانوذره بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن دارای بیشترین درصد ریشه‌زایی است (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: مقایسه میانگین اثر متقابل BAP و نانوذره اکسید آهن بر درصد ریشه‌زایی

۵- بحث

انتخاب مناسب مرحله رشد میکروسپور عامل مهمی برای شروع کشت است، زیرا فقط مراحل خاصی از رشد و نمو میکروسپور به جنین‌زایی پاسخ می‌دهند (۲۴، ۲۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مناسب‌ترین مرحله برای رشد جنین آندروژنی در فلفل، میکروسپورهایی که در مرحله تک هسته‌ای و ابتدای دو هسته‌ای قرار دارند که این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (۲۶-۲۹). بسیاری از محصولات ژنی مخصوص مرحله اسپورفیت، قبل از میوز از سیتوپلاسم حذف می‌شوند و این باعث می‌شود که سلول در مرحله تک هسته‌ای، از نظر تمایز آزادانه عمل نماید، در حالی که معمولاً پس از میتوز دانه‌گرد، ژن‌های مخصوص مرحله گامتوفیتی رونویسی می‌شوند. بعد از تقسیم میتوز، سیتوپلاسم حاوی اطلاعات گامتوفیتی است، تا در نهایت گامت‌نر ایجاد شود. وجود برخی عوامل از جمله برخی تنش‌ها در این مراحل می‌تواند برنامه گامتوفیتی را متوقف کرده و باعث ظهور ژن‌های اختصاصی اسپورفیتی شوند که نتیجه آن تغییر مسیر سلول از گامتوفیتی به اسپورفیتی است (۳۰). پیش‌تیمار دمایی به‌عنوان یکی از موثرترین روش‌ها برای القای آندروژنز در کشت بساک فلفل در نظر گرفته می‌شود اما نوع پیش‌تیمار مورد استفاده (دمای پایین یا بالا) و مدت زمان پیش‌تیمار بسته به واریته یا ژنوتیپ متفاوت است (۳۱، ۳۲). در مطالعه حاضر اعمال تیمار گرمایی به مدت ۸ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نقش مثبتی بر آندروژنز گیاه فلفل داشت. طی مطالعه‌ای که توسط حیدری و همکاران (۳۳) انجام شد آن‌ها نشان دادند که اعمال تیمار حرارتی در کشت بساک فلفل از ۴ تا ۱۲ روز پاسخ آندروژنز را تحریک و بهترین نتایج را در هشت روز نشان می‌دهد و تیمار بساک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (بدون شوک حرارتی)، باعث عدم تولید جنین شد. همچنین مطالعات آن‌ها نشان داد که ژن‌کد کننده شوک گرمایی موجب تخریب دوک تقسیم و میکروتوبول‌ها شده و به این ترتیب موجب بازآرایی اسکلت سلولی و در نتیجه تغییر در چرخه سلولی میکروسپورها به سمت رویان‌زایی می‌شوند. استفاده از دوره تنش گرمایی حیاتی است و یک دوره کوتاه تیمار گرمایی نمی‌تواند تغییرات فراساختاری کافی را ایجاد کند و میکروسپورها تمایل دارند مسیر گامتوفیتی را دنبال کنند (۳۳). نتایج این مطالعه نشان داد که به‌کارگیری غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن در محیط کشت C بر جنین‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه تاثیر مثبت دارد (جدول ۲). نتایج مطالعه ایرانبخش و قادری (۲۱) نشان داد که به‌کارگیری نانو اکسید آهن در غلظت‌های مناسب می‌تواند موجب افزایش راندمان تولید گیاهان به‌ویژه در شرایط درون شیشه شود که با نتایج مطالعه فوق مطابقت دارد و به‌کاربردن غلظت‌های مختلف

نانوذره اکسید آهن در محیط کشت C تاثیر مثبتی در باززایی گیاه فلفل دلمه‌ای داشت (شکل ۷ و ۸). نتایج مطالعات السیه (۳۴) نشان داد که افزودن نانوذرات نقره به محیط کشت در جنین‌زایی سوماتیک، طول جنین، تمایز جنین به برگ و طول برگ‌ها در درخت خرما تاثیر مثبتی دارد. غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در محیط کشت MS تاثیرات متفاوتی را بر جنین‌زایی نشان دادند. محیط کشت حاوی ۱ میلی‌لیتر در لیتر نانوذرات نقره بهترین محیط برای تمایز کالوس جنین‌زا بود و بیشترین تعداد جنین سوماتیک را تولید کرد. افزایش غلظت نانوذرات به بالاتر از ۱ میلی‌لیتر در لیتر باعث کاهش تعداد جنین‌ها و طول آن شد که کم‌تر از تیمار شاهد بود، به این معنی که غلظت‌های پایین نانوذرات نقره باعث تکثیر و نمو می‌شود در حالی که افزایش غلظت نانوذرات نقره (۲ و ۴ میلی‌لیتر در لیتر) مانع از رشد می‌شود (۳۴). در مطالعه حاضر افزودن نانوذرات اکسید آهن به محیط کشت C تاثیر مثبتی بر جنین‌زایی گیاه فلفل نشان داد که با مطالعه السیه مطابقت دارد (شکل ۴ و ۵). ولی بیشترین درصد جنین‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن و بعد از آن در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن مشاهده شد (شکل ۴) که با توجه به نوع نانوذره و غلظت آن، همچنین نوع محیط کشت مورد استفاده، تنظیم‌کننده‌های رشد در غلظت‌های متفاوت و نوع گیاه مورد مطالعه، پاسخ‌های متفاوتی با مطالعات السیه مشاهده شد. طی مطالعه‌های دیگر که بر روی ریز نمونه هیپوکوتیل گیاه کلزا انجام شد، نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی می‌تواند باعث ایجاد کالوس و باززایی شاخساره شود، در حالی که غلظت‌های بالاتر (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) مانع از باززایی شاخساره شد (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که نانوذرات مس و نقره کاندیدای بالقوه برای تقویت جنین‌زایی سوماتیک و باززایی ریزنمونه‌های جنین بالغ گندم هستند. بیشترین کالوس‌های جنین‌زا در محیط غنی شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد (۳۶). افزودن نانوذرات به محیط کشت بافت گیاهی با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، بیان ژن، مهار تولید اتیلن بر تکثیر کالوس، تکثیر اندام هوایی، جنین‌زایی و ریشه‌زایی تاثیر می‌گذارد (۳۷). در *Tecomella undulata* درصد القای شاخساره، تعداد شاخساره و تشکیل کالوس با کشت ریزنمونه‌های ساقه در محیط MS با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نقره، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA افزایش یافت. اثرات مثبت نانوذرات نقره در اندام‌زایی ممکن است به دلیل مهار تولید اتیلن باشد. زمانی که ریزنمونه‌های گره‌ای در محیط کشت MS غنی شده با ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نقره، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA کشت داده شدند، تعداد ساقه، طول شاخه‌های القا شده و درصد شاخه‌های تولید شده به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. با این حال، در غلظت‌های بالاتر (بالاتر از ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) یک اثر مضر بر روی باززایی شاخساره مشهود بود (۳۸). در تحقیقی دیگر، افزودن نانوذرات نقره در غلظت ۵۰ ppm به محیط پایه MS باعث بهبود ویژگی‌های رشد گیاهچه‌های *Brassica juncea* با کاهش محتوای پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدئید و پرولین از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شد. با این حال، غلظت‌های بالاتر نانوذرات نقره (۱۰۰ تا ۴۰۰ ppm) اثر مضر بر رشد گیاهچه‌ها داشت (۳۹). در ریز نمونه گیاه موز، حداکثر فراوانی جنین‌زایی سوماتیک در محیط MS تقویت شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات روی و سپس نانوذرات اکسیدروی مشاهده شد. همچنین طول ساقه و طول ریشه با افزودن هر دو نانوذره به محیط MS افزایش یافت (۴۰). در *Daucus carota* تکثیر سلولی و تعداد جنین‌های سوماتیک در محیط MS حاوی نانوذرات اکسید آهن کاهش یافت (۴۱). به‌طور کلی نتایج این تحقیق و سایر محققین نشان داد که استفاده از نانوذرات مختلف و غلظت‌های متفاوت آن در محیط کشت‌های مختلف همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌های متفاوت می‌تواند تاثیرات متفاوتی را بر جنین‌زایی و باززایی گیاهان مختلف با ژنوتیپ‌های متفاوت نشان دهند. تاثیر غلظت‌ها و ترکیبات مختلف نانوذرات بر روی محیط‌های مختلف شایسته ارزیابی است تا به درک روشنی از مکانیسم‌های زیر بنایی پشت نقش نانوذرات در کشت بافت گیاهی برسیم. در نتایج مطالعه حاضر در مجموع ۲۸۸ بساک در شرایط آزمایشگاهی در محیط

کشت C کشت شد و ۵۲ جنین و ۲۳ گیاه کامل بدست آمد که در بین آن‌ها ۲ گیاه هاپلوئید و ۲۱ گیاه دیپلوئید بودند. فراوانی گیاهان آندروژنی به دست آمده به شدت به ژنوتیپ بستگی دارد. بنابراین نرخ پایین باززایی هاپلوئید، کاربرد کشت بساک در فلفل را محدود می‌کند (۴۲).

۶- نتیجه‌گیری

غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن همراه با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP تأثیر مثبتی را بر جنین‌زایی و باززایی گیاه فلفل دلمه‌ای از طریق کشت بساک در شرایط کشت درون شیشه‌ای نشان دادند. با بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد مختلف در باززایی گیاه فلفل، بهترین ترکیب برای باززایی گیاه شامل هورمون NAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، BAP با غلظت صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و نانوذره اکسید آهن با غلظت ۱ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود.

۷- منابع

1. Irikova T, Grozeva S, Popov P, Rodeva V, Todorovska E. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) Depending on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2011;25(4):2604–9.
2. Dawson P. Vegetable Seed Production. By RAT George. Wallingford: CABI Publishing (1999), pp. 328, £ 49.95. ISBN 0-85199-336-2. *Experimental Agriculture*. 2000;36(4):520.
3. Shariatpanahi ME, Ahmadi B. Isolated microspore culture and its applications in plant breeding and genetics. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. 2016;487–507.
4. Tai GCC. Haploids in the improvement of solanaceous species. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 2005;56:173–90. https://doi.org/10.1007/3-540-26889-8_9
5. Asif M. Androgenesis: A Fascinating Doubled Haploid Production Process. Springer International Publishing. 2013. 7–44 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-00732-8_2
6. Gosal SS, Wani SH. Accelerated Breeding of Plants: Methods and Applications BT- Accelerated Plant Breeding, Volume 1: Cereal Crops. Springer International Publishing. 2020. 1–455 p.
7. Bhojwani SS, Dantu PK. Plant tissue culture: An introductory text. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. 2013;1–309. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
8. Baliyan N, Srivastava A, Rao M, Mishra AK, Bharti H, Khar A, et al. Correlation of stages of microsporogenesis with bud and anther morphology in pepper genotypes through DAPI staining with different levels of mordant in cytological fixative. *Protoplasma*. 2024;261(2):367–76.
9. Qin X, Rotino GL. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. In: *International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops Part 1: Vegetable Crops* 402. 1993. p. 313–6.
10. Jha K, Choudhary PK, Agarwal A. Doubled haploid production in *Capsicum annuum* L. using anther culture: a review. *Plant Archives*. 2021;21(1):168–73.
11. Mousavi SR, Rezaei M. Nanotechnology in agriculture and food production. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 2011;1(10):414–9.
12. Leifert C, Cassells AC. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2001;37:133–8.

13. Kim DH, Gopal J, Sivanesan I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Advances*. 2017;7(58):36492–505.
14. Acosta-Slane D, González-Franco AC, Hernández-Huerta J, Castillo-Michel H, Reyes-Herrera J, Sánchez-Chávez E, et al. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) effect on germination and morphological parameters in alfalfa, tomato, and pepper. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2024;52(2):13634.
15. Kumar V, Guleria P, Kumar V, Yadav SK. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environment*. 2013;461:462–8.
16. Zafar H, Ali A, Ali JS, Haq IU, Zia M. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:535.
17. Talankova-Sereda TE, Liapina K V, Shkopinskij EA, Ustinov AI, Kovalyova A V, Dulnev PG, et al. The Influence of Cu و Co Nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *mentha longifolia* in vitro. In: *Nanophysics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications: Selected Proceedings of the 3rd International Conference Nanotechnology and Nanomaterials (NANO2015)*, August 26-30, 2015, Lviv, Ukraine. Springer; 2016. p. 427–36.
18. Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai Y, Braam J, et al. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2010;29(3):669–75.
19. Ata A, KELEŞ D, TAŞKIN H, BÜYÜKALACA S. Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2019;43(2):123–37.
20. Shrestha SL, Luitel BP, Kang WH. Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2011;52:196–203.
21. Iranbakhsh A, Ghaderi A. The effect of nano-iron oxide on growth, physiology, and callogenesis in pepper in vitro. *Nova Biologica Reperta*. 2020;7(2):219–27. (In Persian)
22. Çağlar G, Aras V, Bayram A. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla in vitro haploid embriyo uyartımı. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*. 2004;17(1):87–94.
23. Asghari-Zakaria R, Kazemi H, Aghayev YM, Valizadeh M, Moghaddam M. Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in *Henrardia persica* (Boiss.) CE Hubb. *Caryologia*. 2002;55(4):289–93.
24. Das UR, Hadiuzzaman S, Sarker RH. Effects of microspore stage, pre-and post temperature and donor's environment on maize (*Zea mays* L.) anther culture response. *Plant Tissue Cult*. 1996;12(1):37–47.
25. Kim M, Kim J, Yoon M, Choi D-I, Lee K-M. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004;77:63–72.
26. Ciner DO, Tipirdamaz R. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annum* L.). *Turkish Journal of Botany*. 2002;26(3):131–9.
27. Parra-Vega V, González-García B, Seguí-Simarro JM. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35:627–33.

28. Olszewska D, Kisiala A, Niklas-Nowak A, Nowaczyk P. Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*. 2014;38(1):118–24.
29. Biner ŞB. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkileri. Akdeniz Üniversitesi; 1998.
30. Zulkarnain Z. Pemanfaatan Metode Kultur Antera dalam Pemuliaan Tanaman. *Journal Agronomie*. 2004;8(1):1–10.
31. Haridhi IK. The effect of cold pre-treatment period on callus formation of pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture of local aceh perintis genotype. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing; 2023. p. 12040.
32. De Vault RD, Chambonnet D, Pochard E. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35° C. *Agronomie*. 1981;1(10):859–64.
33. Heidari AA, Shariatpanahi ME, Mousavi A, Kalatejari S. Efficient androgenic embryo induction and plant regeneration in different genotypes of sweet pepper via anther culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2017;11(1):23–9.
34. Elsayh SAA. Impact of silver nanoparticles on enhancing in vitro proliferation of embryogenic callus and somatic embryos regeneration of date palm cv. Hayani International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology. 2021;6:40–52.
35. Mousavi Kouhi SM, Lahouti M. Application of ZnO nanoparticles for inducing callus in tissue culture of rapeseed. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018;14(2):133–41.
36. Malik WA, Mahmood I, Razzaq A, Afzal M, Shah GA, Iqbal A, et al. Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). *GM Crops Food*. 2021;12(1):564–85.
37. Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali M. Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016;180:1076–92.
38. Aghdaei M, Salehi H, Sarmast MK. Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulate* (Roxh.) Seem. Micropropagation. *Advances in Horticultural Science*. 2012;26(1):21–4.
39. Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, Saradhi PP, Khanna PK, Arora S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;167:2225–33.
40. Helaly MN, El-Metwally MA, El-Hoseiny H, Omar SA, El-Sheery NI. Effect of nanoparticles on biological contamination of in vitro cultures and organogenic regeneration of banana. *Australian Journal of Crop Science*. 2014;8(4):612–24.
41. Giorgetti L, Castiglione MR, Bernabini M, Geri C. Nanoparticles effects on growth and differentiation in cell culture of carrot (*Daucus carota* L.). *Agrochimica*. 2011;55(1):45–53.
42. Atilla ATA, Keles D, Taskin H, Buyukalaca S. Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*. 2019;43(2):123–37.