



بررسی تأثیر محیط کشت‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کشت تک گره گیاه پیپنو (*Solanum muricatum* Aiton) در شرایط کشت بافت

مائده عقدایی^۱ - سید حسین نعمتی^{۲*} - لیلا سمیعی^۳ - احمد شریفی شریف آباد^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۳۱

چکیده

پیپنو یک سبزی میوه‌ای متعلق به خانواده سولاناسه بوده که مشکل اساسی در توسعه‌ی کشت این گیاه تکثیر آن می‌باشد که از طریق بذر موفقیت اندکی دارد. از این رو این پژوهش با هدف تکثیر انبوه از طریق کشت بافت انجام گردید. به منظور دستیابی به بهترین نوع محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از ریزنمونه تک گره پیپنو استفاده گردید. این تحقیق در قالب سه آزمایش جداگانه با استفاده از چهار نوع محیط کشت (MS، SH و B₅)، دو نوع سیتوکینین (بنزیل آدنین (BA) و کینتین (Kin)) و دو نوع اکسین (ایندول بوتریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA)) برای تعیین بهترین محیط کشت و دستیابی به ترکیب مناسبی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک گره پیپنو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS بود. در آزمایش پرآوری شاخه، بیشترین تعداد شاخساره، تعداد برگ، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره القا شده در اثر کاربرد محیط کشت MS غنی شده با دو میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد. همچنین بیشترین میزان طول شاخساره و طول برگ به ترتیب با کاربرد محیط کشت MS غنی شده با یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با دو میلی‌گرم در لیتر Kin و تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. در آزمایش ریشه‌زایی، بیشترین میانگین تعداد ریشه و کیفیت ریشه با استفاده از IBA با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد، در حالی که بیشترین میانگین طول ریشه با کاربرد IBA با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در مجموع بهترین نتایج با محیط کشت MS، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin جهت پرآوری و همچنین غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پیپنو به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ایندول بوتریک اسید، بنزیل آدنین، پیپنو، پرآوری، ریشه‌زایی، کشت بافت

مقدمه

خشک شده و کنسرو شده مصرف می‌شود (۱۶، ۱۷ و ۴۰). داشتن میوه‌های خوراکی آبدار، معطر و شیرین، تنوع زیاد در رنگ و شکل میوه و همچنین مصارف مختلف این محصول منجر به پرورش تجاری آن در کشورهای آمریکای جنوبی از جمله بولیوی، کلمبیا، اکوادور و پرو و همچنین کشورهای نظیر نیوزیلند و استرالیا شده است (۳۰). این گیاه به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص برای نخستین بار در سال ۱۳۸۲ در ایران معرفی و جهت بومی‌سازی مورد توجه قرار گرفت (۱۹).

هرچند اغلب ارقام پیپنو از نظر جنسی بارور بوده و بذره‌های زنده تولید می‌کنند، اما قدرت جوانه‌زنی ضعیف بذر و سطح بالای هتروزیگوتی بذر که منجر به تفرق صفات در دانه‌ها می‌شود، به‌عنوان دو عامل منفی و تأثیرگذار در زمینه‌ی تکثیر این گیاه از طریق بذر می‌باشد (۲۵، ۲۷، ۲۹ و ۳۰). میزان جوانه‌زنی بذر پیپنو در

پیپنو (*Solanum muricatum* Aiton) گیاهی علفی و دیپلوئید ($2n=24$) متعلق به خانواده سولاناسه^۵ منشأ گرفته از کوه‌های آند بوده، که در مناطق مختلف دارای نام‌های مختلفی از جمله پیپنو، خربزه‌ی گلابی، گلابی خربزه، شاه کیوی و توما می‌باشد (۳، ۵، ۷، ۱۶ و ۳۰). پیپنو به‌عنوان یک سبزی میوه‌ای تقریباً ناشناخته به‌صورت میوه تازه، سبزی پخته شده، یخ‌زده، سالاد میوه، آب‌میوه، شربت، ژله،

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته دکتری و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: Nemati@um.ac.ir)

۳- استادیار گروه گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.76833

۱۳۹۵ انجام پذیرفت. بدین منظور بذور پپینو از شرکت Plant World Seed انگلستان خریداری گردید. به منظور گندزدایی سطحی، بذور به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت چهار دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند و نهایتاً به مدت ۴/۵ دقیقه سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور گندزدایی شده جهت جوانه زنی، در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ^۱) استریل شده (به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد) کشت گردیدند. ظروف کشت در اتاقک رشد و تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور حدود ۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه‌های حاصل از جوانه زنی بذور به عنوان مواد مادری برای تأمین ریزنمونه تک گره به کار گرفته شدند.

تعیین بهترین محیط کشت

به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت جهت ریزازدیادی گیاه پپینو، آزمایشی به صورت فاکتوریل (با آرایش ۲×۴) شامل دو فاکتور محیط کشت و زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و پنج تکرار (هر تکرار حاوی ۴ ریزنمونه) طراحی گردید. بدین منظور در زیر هود استریل ریزنمونه‌های تک گره به طول ۱۰ میلی متر حاوی جوانه از گیاهان مادری جدا شده و بر روی محیط کشت‌ها مختلف (MS، ۱/۲ SH، MS (شنگ و هیلدبرانت^۲) و B₅ گامبورگ^۳) کشت گردید. ارزیابی اثر محیط کشت بر تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ در طی زمان‌های دو و چهار هفته پس از کشت ریز نمونه‌ها بررسی شد.

مرحله پرآوری

جهت بررسی تأثیر بنزیل آدنین (BA)^۴ و کینتین (Kin)^۵ بر پرآوری شاخساره در محیط پایه‌ی MS، BA با غلظت‌های نیم، یک و دو میلی گرم در لیتر در ترکیب با غلظت‌های نیم، یک و دو میلی گرم در لیتر Kin و همچنین BA به تنهایی با غلظت‌های دو، چهار و شش میلی گرم در لیتر استفاده گردید. قبل از اتوکلاو کردن pH محیط کشت بر روی ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های حاوی تک گره در زیر هود استریل به محیط کشت انتقال یافتند. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سیزده تیمار و پنج تکرار که تعداد مشاهده در هر تکرار ۴ ریزنمونه بود انجام گردید. شاخص‌های کمی از جمله تعداد شاخساره القا شده، طول شاخساره، تعداد برگ، طول برگ و

بستر خاکی، پتری‌دیش و بستر پیت به ترتیب ۴، ۲۸ و ۵۶ درصد گزارش شده است (۱۹)، که بیانگر قدرت جوانه‌زنی ضعیف بذر این گیاه به‌ویژه در بستر خاکی و ضرورت کاربرد روش‌های تکثیر رویشی به منظور ازدیاد این گیاه می‌باشد. با وجود اینکه قلمه‌زدن رایج‌ترین روش تکثیر پپینو می‌باشد (۱۲ و ۲۸)، ازدیاد این گیاه از طریق قلمه به دلیل خطر انتقال بیماری‌های ویروسی با مشکل روبرو می‌باشد (۳۷).

کشت درون شیشه‌ای، به‌عنوان یک روش جایگزین برای ازدیاد گیاهان، منجر به ایجاد تحولی عظیم در تکثیر گیاهان شده است (۲۶). با توجه به مشکلات بیان شده در مورد تکثیر پپینو از طریق بذر و قلمه، از تکنیک‌های مختلف کشت بافت می‌توان در جهت تکثیر و تولید انبوه پپینو، تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری‌زا استفاده نمود. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه‌ی ریزازدیادی پپینو با استفاده از ریزنمونه‌های کشت تک گره و نوک شاخه (۶ و ۲۷)، پروتوپلاست (۳۳) و باززایی شاخه از کالوس (۳۴) انجام شده است. آتکینسون و گاردنر (۲) بذور گیاه پپینو را پس از استریل کردن (به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم)، بر روی محیط کشت پایه MS (حاوی ویتامین‌های B₅، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار) پرورش دادند. جهت پرآوری شاخه و ایجاد شاخه‌های جانبی ریزنمونه‌های تک گره و نوک شاخه گیاهچه‌های پپینو حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه‌ای، از محیط MS غنی‌شده با سه درصد ساکاروز، ویتامین‌ها، ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۰/۷ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر GA₃ استفاده کردند (۲، ۱۳ و ۲۵). همچنین کاووسوگلو و سولوسگلو (۶) محیط MS غنی‌شده با غلظت یک میلی گرم در لیتر BAP را به‌عنوان بهترین محیط جهت پرآوری شاخه در هر ریزنمونه تک گره و غلظت دو میلی گرم در لیتر NAA را به‌عنوان بهترین محیط ریشه‌زایی معرفی کردند. در مطالعه‌ای دیگر، پریک (۲۷) شاخچه‌های پپینو را در محیط کشت MS غنی‌شده با دو درصد ساکارز و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA ریشه‌دار کرد. با وجود تحقیقات محدود انجام گرفته بر روی گیاه پپینو، هنوز مشکل تکثیر این گیاه به‌قوت خود باقی‌مانده است و نیازمند انجام تحقیقاتی بیش‌تر و دقیق‌تر در این راستا می‌باشد. از اینرو پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی جهت ریزازدیادی پپینو انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و نحوه‌ی تهیه ریزنمونه

این پژوهش در قالب سه آزمایش جداگانه در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال

1- Murashige and Skoog

2- Schenk and Hildebrandt (SH)

3- Gamborg (B₅)

4- Benzyl adenine (BA)

5- Kinetin (Kin)

شاخص‌های مختلف رشدی پیپینو تأثیر معنی‌داری داشت، در حالی که هیچ یک از صفات مورد بررسی تحت تأثیر برهمکنش این دو عامل (محیط کشت و زمان) قرار نگرفت. براساس نتایج، تمامی صفات اندازه‌گیری شده در زمان چهار هفته پس از کشت افزایش معنی‌داری در مقایسه با دو هفته پس از کشت نشان دادند (جدول ۱).

براساس نتایج، نوع محیط کشت در میزان موفقیت تکثیر کشت بافت پیپینو نقش مهمی داشت و همه‌ی فاکتورهای مورد بررسی تحت تأثیر نوع محیط کشت قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ریزنمونه‌ها از نظر تعداد شاخساره در محیط کشت MS نسبت به سه محیط کشت دیگر واکنش بهتری نشان دادند و بیش‌ترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS به‌دست آمد، در حالی که بیش‌ترین طول شاخساره مربوط به محیط MS $\frac{1}{2}$ بود که تفاوت معنی‌داری را نسبت به محیط B5^۳ نشان داد (جدول ۲). همچنین بیش‌ترین تعداد ریشه و طول ریشه به‌ترتیب مربوط به محیط کشت MS، MS $\frac{1}{2}$ و MS $\frac{1}{2}$ بود. از نظر تعداد برگ بین محیط کشت‌های معنی‌داری در محیط SH^۴ مشاهده شد، در حالی که بیش‌ترین طول برگ در محیط کشت MS حاصل گردید که منجر به بروز اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط کشت‌های دیگر گردید (جدول ۲). در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد که در بین محیط کشت‌های مورد بررسی، بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک‌گره پیپینو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS می‌باشد (جدول ۲).

هرچند مطالعات زیادی در مورد ریزازدیادی و به‌ویژه در مورد تأثیر و مقایسه‌ی محیط کشت‌های مختلف بر کشت درون شیشه‌ای پیپینو وجود ندارد، با این وجود در بیش‌تر پژوهش‌های انجام گرفته بر روی پیپینو (۲، ۶، ۱۳، ۲۵ و ۲۷) همواره محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده در این آزمایش مبنی بر برتری محیط کشت MS در مقایسه با دیگر محیط کشت‌های با نتایج هدایت و خوشخوی (۱۱) روی گیاه پیرتروم مطابقت دارد؛ این محققین با بررسی محیط کشت‌های مختلف (MS، SH و B5) بر ریزافزایی گیاه پیرتروم^۵ بیان کردند که بیش‌ترین تعداد، طول و وزن تر شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاصل گردیده که منجر به برتری این محیط کشت در مقایسه با محیط کشت‌های SH و B5 شده است، و دلیل این امر را بهینه‌تر بودن محیط کشت MS و به‌عبارتی مناسب‌تر بودن نمک‌های تشکیل دهنده‌ی محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر ذکر کردند (۱۱). محیط کشت

کیفی (کیفیت شاخساره (بالا‌ترین کیفیت ۴، کیفیت متوسط ۳، کیفیت کم ۲ و بدون کیفیت ۱) و رنگ شاخساره‌های گیاه (رنگ سبز تیره ۳، سبز زرد ۲ و زرد ۱)) مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص‌های کمی مربوط به طول شاخساره و طول برگ با خط‌کش مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

مرحله ریشه‌زایی

جهت تعیین بهترین ترکیب و مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده‌های رشدی گیاهی جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پیپینو، شاخساره‌هایی با طول پنج سانتی‌متر از محیط پرآوری شاخه جدا شده و به ظروف مربایی حاوی ۳۵ میلی‌لیتری از محیط MS فاقد هورمون (به‌عنوان شاهد) و محیط MS غنی شده با ایندول بوتریک اسید^۱ (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) یا نفتالین استیک اسید^۲ (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. چهار شاخچه در هر شیشه مربایی (به‌عنوان یک تکرار) کشت گردید. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید و شاخص‌های رشدی مرتبط با ریشه‌زایی از جمله تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه و همچنین کیفیت ریشه در زمان چهار هفته پس از کشت ارزیابی شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده که دارای وضعیت رشدی مناسبی بودند از محیط کشت خارج و پس از شستن ملایم ریشه‌ها با آب مقطر و حذف کامل آگار از محیط اطراف ریشه، برای گذراندن مرحله سازگاری به سه نوع محیط کشت پیت + ماسه (با نسبت مساوی)، پیت + پرلایت (با نسبت مساوی) و یا پیت خالص منتقل شدند (شکل ۵) و پس از گذشت دو هفته به مرور پلاستیک‌های کشیده شده بر روی آن‌ها قیچی شد تا کم کم با هوای گلخانه گیاهان سازگار شوند. درنهایت بعد از یک ماه به گلدان‌های بزرگتر بدون روکش مطابق شکل ۶ منتقل شدند و درصد سازگاری گیاهان بعد از دوماه محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳ و مقایسه میانگین صفات بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی محیط کشت‌ها

نتایج نشان داد که نوع محیط کشت و زمان داده‌برداری بر

3- Gamborg et al.

4- Schenk and Hilderbrandt

5- *Tanacetum cinerariaefolium*

1- Indole-3-butyric acid (IBA)

2- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

MS از نظر چندین نمک معدنی پرمصرف از جمله نیترات و آمونیوم غنی تر می باشد. بنابراین مناسب تر بودن و رشد بیش تر ریزنمونه ها در محیط کشت MS نسبت به سایر محیط کشت ها احتمالاً ناشی از نیاز

بیش تر پرآوری شاخه و رشد شاخه پپینو به غلظت بالاتر نمک ها در این محیط کشت MS می باشد (۸ و ۱۸).

جدول ۱- تأثیر زمان نمونه برداری بر برخی شاخص های مختلف رشدی پپینو در شرایط درون شیشه ای

Table 1- Effect of sampling time on some growth parameters of pepino *in vitro*

زمان Time	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (mm)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (mm)
تغییر رشد بعد از دو هفته Changing growth after two weeks	0.72 ^a	3.37 ^b	1.04 ^a	6.37 ^b	1.96 ^b	9.43 ^a
تغییر رشد بعد از چهار هفته Changing growth after four weeks	0.81 ^a	6.22 ^a	1.54 ^a	16.93 ^a	3.29 ^a	3.00 ^b

* میانگین هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

جدول ۲- اثر محیط کشت های مختلف بر برخی شاخص های رشدی پپینو در شرایط درون شیشه ای

Table 2- Effect of different tissue cultures on some growth parameters of pepino *in vitro*

محیط کشت Tissue culture medium	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (mm)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (mm)
MS	1.35 ^a	6.41 ^{ab}	2.49 ^a	18.84 ^a	4.03 ^a	14.99 ^a
1/2 MS	1.16 ^b	7.84 ^a	1.96 ^b	20.35 ^a	3.96 ^a	11.42 ^b
SH	1.05 ^{bc}	6.22 ^{ab}	1.59 ^{bc}	13.15 ^{ab}	2.33 ^b	6.39 ^c
B5	0.92 ^c	5.45 ^b	1.21 ^c	7.01 ^b	4.10 ^a	10.93 ^b

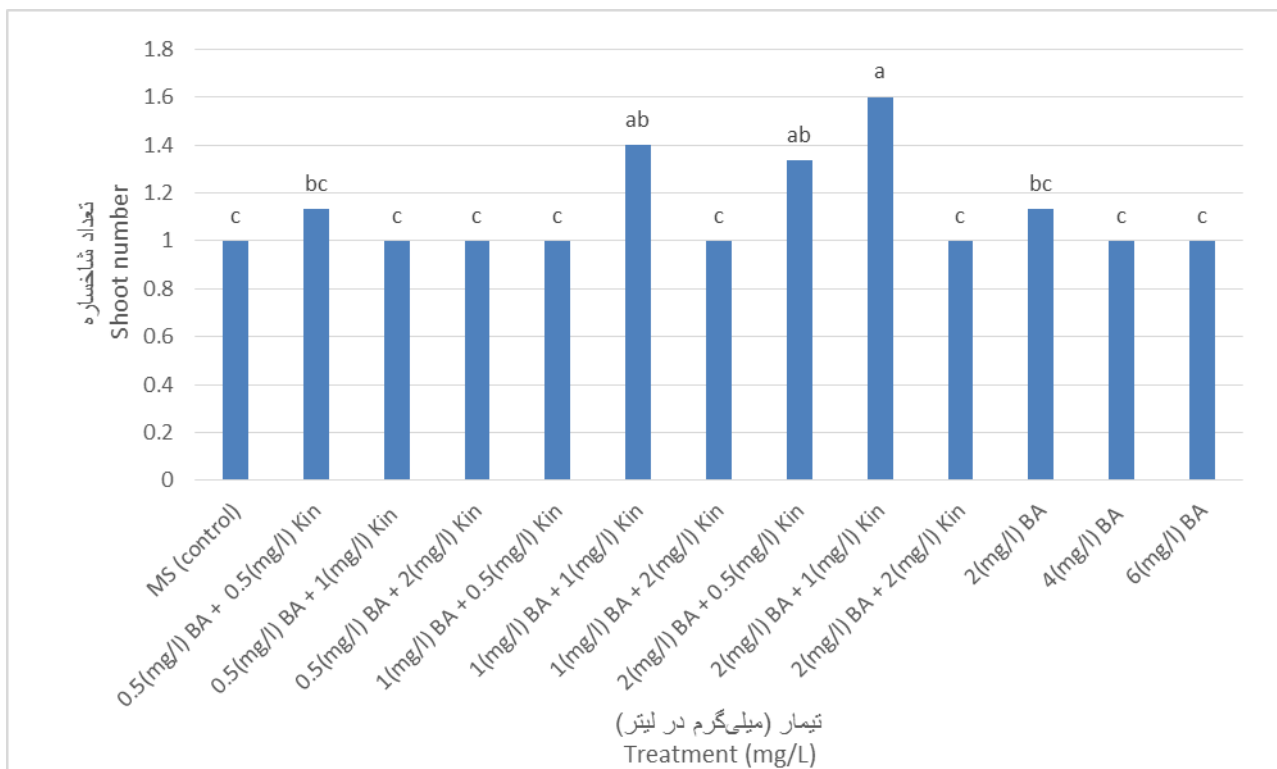
* میانگین هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با هم ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

کاربرد هورمون BA و Kin) بود (شکل ۲). به طور کلی نتایج نشان داد که برای القای شاخه زایی در ریزنمونه تک گره پپینو و همچنین افزایش طول شاخه القا شده به دو نوع هورمون BA و Kin نیاز می باشد که براساس نتایج با افزایش غلظت BA تا سطح دو میلی گرم در لیتر روند افزایشی در پرآوری ریزنمونه مشاهده شد. براساس نتایج، بیش ترین تعداد برگ در ریزنمونه، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره در محیط کشت MS حاوی دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin) به دست آمد، در حالی که بیش ترین میزان طول برگ مربوط به تیمار یک میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin (1BA+1Kin) بود که موجب بروز اختلاف معنی دار نسبت به سایر تیمارهای اعمال شده گردید (جدول ۳). در مجموع، بهترین ترکیب سائتوکنین جهت پرآوری شاخه پپینو در محیط کشت MS، غلظت دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin بود که منجر به بروز اختلاف معنی دار نسبت به سایر تیمارها شد.

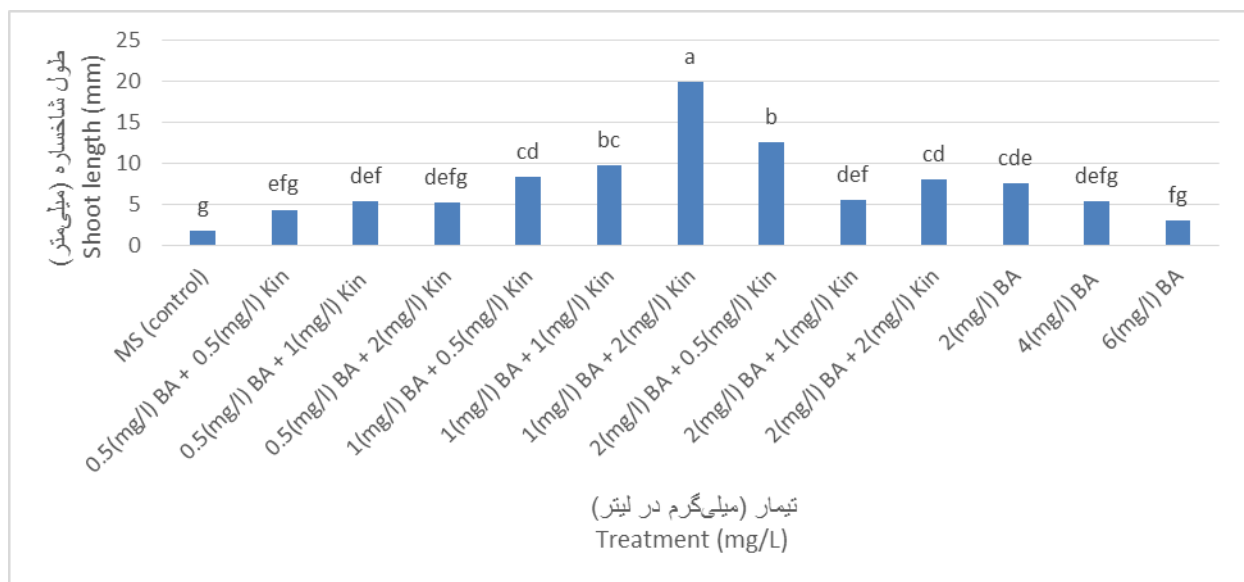
تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون سائتوکنین جهت پرآوری ریزنمونه

بررسی نوع هورمون سائتوکنین بر میزان پرآوری ریزنمونه تک گره پپینو نشان داد که شاخص های مختلف رشدی تحت تأثیر نوع هورمون سائتوکنین قرار گرفت و غلظت بهینه ی تنظیم کننده های رشد گیاهی برای تولید شاخساره های نابه جا بین تیمارها متفاوت بود. بهترین ترکیب جهت باززایی شاخساره، محیط کشت MS غنی شده با غلظت دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin بود (1Kin+2BA)، هر چند از نظر آماری با دو تیمار (2BA+0.5Kin) و (1BA+1Kin) تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۱).

بیش ترین طول شاخساره القا شده در تیمار یک میلی گرم در لیتر BA همراه با دو میلی گرم در لیتر Kin (1BA+2Kin) به دست آمد که منجر به بروز اختلاف معنی داری نسبت به بقیه تیمارها گردید، در حالی که کم ترین طول شاخساره مربوط به تیمار شاهد (MS) بدون



شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر تعداد شاخساره در هر ریزنمونه پپینو در شرایط درون شیشه‌ای
 Figure 1- Effect of different treatments of BA and Kin on number of shoots per explant of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر طول شاخساره پپینو در شرایط درون شیشه‌ای
 Figure 2- Effect of different treatments of BA and Kin on shoot length of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)

جدول ۳- تأثیر تیمارهای بنزیل آدنین و کینتین بر برخی شاخص‌های رشدی پپینو در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3- Effect of BA and Kin treatments on some growth parameters of pepino *in vitro*

تیمار Treatment	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length	رنگ شاخساره Shoot color	کیفیت شاخساره Shoot quality
MS (شاهد) MS (control)	3.73 ^e	4.37 ^{de}	2.00 ^c	1.20 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	4.00 ^{de}	4.57 ^{de}	2.00 ^c	1.27 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 1 mg/l kin	5.60 ^{bcd}	6.77 ^{de}	2.00 ^c	1.47 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 2 mg/l kin	4.80 ^{cde}	11.53 ^{bc}	2.00 ^c	3.00 ^b
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	6.46 ^{abc}	7.00 ^{cde}	2.00 ^c	2.80 ^b
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 1 mg/l kin	5.40 ^b	21.03 ^a	2.00 ^c	1.73 ^{cd}
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 2 mg/l kin	6.73 ^{ab}	8.16 ^{cd}	2.87 ^a	3.13 ^b
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	4.47 ^{de}	5.73 ^{de}	2.00 ^c	2.13 ^c
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 1 mg/l kin	7.80 ^a	14.21 ^b	3.00 ^a	4.00 ^a
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 2 mg/l kin	6.47 ^{abc}	4.41 ^{de}	2.93 ^a	2.73 ^b
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 2 mg/l BA	6.34 ^{abc}	6.69 ^{de}	2.60 ^b	2.87 ^b
۴ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 4 mg/l BA	5.13 ^b	7.22 ^{cde}	2.07 ^c	2.07 ^c
۶ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 6 mg/l BA	4.00 ^{de}	3.31 ^e	2.20 ^c	1.00 ^e

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

تولید شده باشد که سبب کاهش طول شاخساره شده است. مشخص شده است که در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های باززایی شده افزایش می‌یابد به دلیل استفاده آن‌ها از هورمون‌ها و مواد غذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های باززایی شده در این محیط‌ها از رشد کم‌تر برخوردار می‌باشند (۱۴).

در برخی از گونه‌ها جهت پرآوری شاخه از ترکیب هورمون‌های سیتوکینین و اکسین استفاده می‌کنند؛ از جمله سانتوموبی و شارما (۳۵) در بررسی کشت ریز نمونه‌های نوک شاخه فلفل بر روی محیط MS گزارش کردند که پرآوری شاخه در محیط کشت حاوی سیتوکینین‌ها به‌تنهایی یا در ترکیب با IAA رخ می‌دهد. همچنین در مطالعه دیگری، بهترین ترکیب جهت ریززادداری گیاه گوجه فرنگی را محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شده است (۲۱).

پاسخ مورفوژنیک ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر اجزای مختلف محیط کشت از جمله غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار می‌گیرد (۱۰). نتایج پژوهش حاضر در مورد غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که افزایش غلظت BA در سطح بالاتر از دو میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS منجر به کاهش پرآوری شاخه پپینو نسبت به غلظت دو میلی‌گرم در لیتر می‌شود، که این امر می‌تواند به دلیل مضر بودن مقادیر بیش از اندازه BA برای رشد شاخساره‌ها و همچنین نامناسب شدن شرایط کشت باشد (۲۰)، که نهایتاً سبب کاهش میزان پرآوری و میزان رشد شاخساره‌های القا شده می‌شود. براساس نتایج، میزان رشد شاخساره القا شده در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin)؛ به‌عنوان بهترین تیمار از نظر تعداد شاخساره به‌میزان بسیار کم بود (شکل ۳). به‌عبارتی دیگر، طول شاخساره در این تیمار تنها از شاخساره‌های تیمار شاهد بیش‌تر بود، که این کاهش میزان رشد می‌تواند به دلیل تعداد زیاد شاخساره



شکل ۳- ریزنمونه‌های گیاه پپینو کشت شده در محیط کشت حاوی 2 (mg/L) BA+ 1 (mg/L) Kin بعد از گذشت چهار هفته
Figure 3- Pepino explants on medium containing 2 (mg/L) BA+ 1 (mg/L) Kin after 4 weeks

است. در مجموع تأثیر مثبت سایتوکینین‌ها در پرآوری ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای می‌تواند به دلیل نقش مثبت سایتوکینین‌ها در اندام‌زایی و تسریع در تقسیم سلولی باشد. همچنین افزایش تعداد شاخساره در نتیجه کاربرد BA می‌تواند به دلیل کاهش چیرگی انتهایی در اثر کاربرد BA باشد که نهایتاً منجر به افزایش تعداد شاخساره شده است (۱۴).

تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون اکسین جهت ریشه‌زایی ریزنمونه

بر اساس نتایج، ریشه‌زایی ریزنمونه را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اکسین قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد تیمارهای اکسینی سبب افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه شده است. کاربرد سه تیمار IBA با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر و همچنین NAA با غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر بدون اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر سبب افزایش معنی‌دار تعداد ریشه نسبت به تیمار شاهد (محیط MS) گردید. با این وجود بیش‌ترین میانگین تعداد ریشه (۳۵ عدد) در تیمار IBA با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که منجر به افزایش ۳/۵ برابری تعداد ریشه در مقایسه با تیمار شاهد گردید (شکل ۴).

طول بلندترین ریشه و کیفیت ریشه نیز تحت تأثیر تیمارهای اکسینی قرار گرفتند؛ بیش‌ترین طول ریشه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد، در حالی که بهترین کیفیت ریشه مربوط به تیمار IBA با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۵). شایان ذکر است که بین دو تیمار IBA با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). نتایج نشان داد که در افزایش طول ریشه و بهبود کیفیت ریشه هورمون IBA مؤثرتر از NAA بوده که به‌نوعی بیانگر تأثیر متفاوت اکسین‌ها بر عکس‌العمل ریزنمونه می‌باشد. در مجموع بیش‌ترین میزان ریشه و بهترین کیفیت ریشه‌ها

تیکلت و همکاران (۳۸) با کاربرد سایتوکینین‌های مختلف به تنهایی یا در ترکیب با هم در محیط کشت MS بیان کردند که بیش‌ترین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه و بلندترین طول شاخه مربوط به محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA بوده است. هورمون BA برای تکثیر گونه‌های مختلف گیاهی از طریق کشت بافت به‌کار می‌رود و در برخی از مطالعات در اثر کاربرد BA نتایج مطلوب‌تری نسبت به سایر سایتوکینین‌ها حاصل شده است؛ از جمله گزارش شده است که تأثیر BA بر رشد توت‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به Kin و TDZ بهتر بوده است (۹). از طرف دیگر نیز گزارش‌هایی مبنی بر کارایی بهتر Kin در مقایسه با سایتوکینین‌های دیگر نیز در دسترس می‌باشد، که در این مورد می‌توان به نتایج بررسی ریزنمونه‌های تک‌گره تاجریزی^۱ روی محیط MS غنی شده با غلظت‌های مختلف Kin و BAP اشاره کرد که در این پژوهش مشخص شده است Kin در پرآوری شاخه و همچنین افزایش تعداد شاخه در هر ریزنمونه مؤثرتر از BAP بوده است (۲۳).

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبنی بر تأثیر مثبت کاربرد ترکیب دو سایتوکینین (BA و Kin) در پرآوری شاخه با نتایج گزارش شده در استویا^۲ (۱) و توت‌فرنگی (۳۳) مطابقت دارد. به‌طوری‌که بیش‌ترین القای شاخه ریزنمونه استویا در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمده است (۱). همچنین ساکیلا و همکاران (۳۳) جهت تکثیر درون شیشه‌ای توت‌فرنگی از قطعات گره ساقه به‌منظور پرآوری شاخه بر روی محیط کشت MS غنی شده با غلظت‌های مختلف BA به همراه Kin یا در ترکیب با GA₃ استفاده کردند و بیان کردند که بیش‌ترین پرآوری شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شده

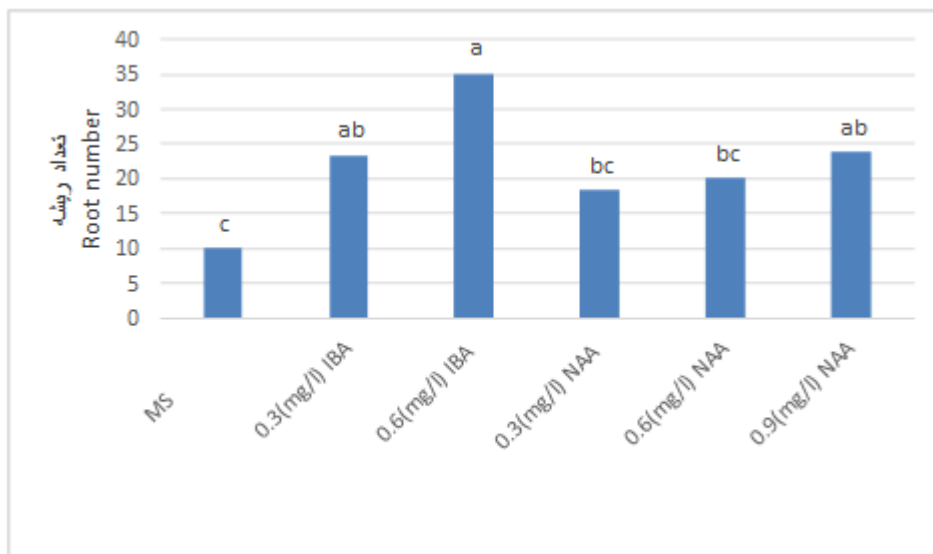
1- *Solanum nigrum*

2- *Stevia rebaudiana* Bertoni

رشدی مختلف از جمله تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده داشته است (۲۲). مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش آتکینسونوگاردنر (۲) شاخه‌های حاصل از ریزازدیادی جوانه انتهایی پپینو را پس از انتقال به محیط کشت MS غنی شده با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار نمودند.

ریزنمونه پپینو در محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

به‌خوبی مشخص شده است که نوع و غلظت اکسین مورد استفاده، به‌طور قابل ملاحظه‌ای درصد ریشه‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با بررسی ریزازدیادی فلفل دلمه‌ای بیان شده است که نوع هورمون و غلظت‌های مختلف آن تأثیرات متفاوتی بر پارامترهای



شکل ۴- تأثیر تیمارهای مختلف اکسین بر تعداد ریشه در هر ریزنمونه پپینو

Figure 4- Effect of auxin different treatments on number of roots per explant of pepino (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۵- ریزنمونه‌ی ریشه‌دار شده پپینو در تیمار ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر IBA

Figure 5- Rooted explants of pepino on medium containing 0.6 (mg/L) IBA

جدول ۴- تأثیر تیمارهای مختلف بر طول بلندترین ریشه و کیفیت ریشه پپینو
Table 4- Effect of different treatments on the longest root length and root quality of pepino

تیمار Treatment	طول بلندترین ریشه The longest root length (mm)	کیفیت ریشه Root quality
محیط MS (شاهد) MS culture (control)	1.78 ^c	2.00 ^b
۰/۳ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید 0.3(mg/L) IBA	4.63 ^a	3.33 ^{ab}
۰/۶ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید 0.6(mg/L) IBA	3.35 ^b	4.67 ^a
۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.3(mg/L) NAA	3.25 ^c	2.83 ^b
۰/۶ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.6(mg/L) NAA	2.03 ^c	2.33 ^b
۰/۹ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.9(mg/L) NAA	1.89 ^c	2.58 ^b

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

نشد و تنها غلظت دو میلی‌گرم در لیتر NAA موجب بیش‌ترین طول ریشه در هر ریزنمونه شده است (۶). ساباتینی و همکاران (۳۱) گزارش کردند که تمایز آغازهای ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده بستگی دارد. همچنین مشخص شده که سلول‌های تمایز یافته جهت پاسخ‌دهی به علائم و سیگنال‌های ارگانوژنیک به نوع و غلظت مناسبی از اکسین نیاز دارند (۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که واکنش ریزنمونه‌های پپینو به کاربرد IBA نسبت NAA بیش‌تر بوده است. تجزیه نوری تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یکی از فاکتورهای مهم در کشت بافت می‌باشد؛ تجزیه نوری IBA بسیار کندتر از اکسین‌های دیگر از جمله IAA می‌باشد. حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیر هنگام آن را به‌عنوان دلایل اصلی کارایی بهتر IBA نسبت به دو اکسین NAA و IAA ذکر کرده‌اند (۴۱). همچنین تأثیرگذاری بیش‌تر IBA نسبت به NAA می‌تواند ناشی از تفاوت در حساسیت بافت گیاهی به نوع تنظیم‌کننده‌ی رشد باشد (۳۹). نتایج حاصل از سازگاری گیاهان نیز نشان داد که گیاهان کشت شده در سه محیط پیت+ماسه، پیت+پرلایت و پیت خالص به ترتیب درصد سازگاری ۹۱/۶۶، ۴۲/۸۶ و ۸۴/۳۷ درصدی نشان دادند که بیانگر برتری محیط کشت پیت+ماسه جهت سازگاری گیاهچه‌های پپینو نسبت به محیط‌های دیگر بوده است (شکل ۶).

در انتها شایان ذکر است، اگر بخواهیم گیاهان سالم و یکنواختی را با صرف وقت کمتر در حجم زیاد تولید کنیم روش کشت بافت بهترین گزینه می‌باشد، که با این روش خزانه‌ی ژنی این گیاه نیز در ایران حفظ خواهد شد. اما در سطح کم و تولید محدود، روش قلمه

همچنین پادماپیرا و همکاران (۲۳) با بررسی غلظت‌های مختلف IBA و 2-4-D بر ریشه‌دهی تاجریزی^۱ بیان کردند که هر چند هر دو نوع اکسین تأثیر مثبتی در القا ریشه داشتند ولی با این وجود IBA نسبت به 2-4-D بر ریشه‌زایی مؤثرتر بوده و بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی IBA تولید شده است.

نتایج پژوهش حاضر بیانگر مؤثرتر بودن کاربرد IBA نسبت به NAA بود که با نتایج گزارش شده در ریحان (۳۶) مبنی بر برتری محیط کشت MS غنی شده با ۲۰۳/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA نسبت به محیط‌های حاوی IAA یا NAA مطابقت دارد.

افزایش تعداد ریشه در اثر کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در توت فرنگی (۳۳) و همچنین افزایش طول ریشه در نتیجه کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در فلفل دلمه‌ای (۲۲) مطابقت دارد. IBA برای تحریک آغازش ریشه در کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۲۴). به طوری که نتایج مطلوبی در نتیجه کاربرد IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌های فلفل در محیط کشت پایه MS گزارش شده است (۱۵ و ۳۵). نتایج نشان داد که NAA تأثیر معنی‌داری بر کیفیت ریشه نداشته است که با نتایج گزارش شده در پپینو (۶) مبنی بر تولید با کیفیت‌ترین ریشه‌ها در اثر کاربرد غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA مطابقت ندارد.

در محیط MS تجهیز شده با سطوح مختلف NAA اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از صفات سرعت پرآوری، تعداد شاخه‌ها، طول شاخه، میزان ریشه‌دهی و کالوس‌دهی ریزنمونه پپینو مشاهده



شکل ۶- انتقال گیاهان ریشه‌دار شده در محیط کشت بافت به مخلوط‌های خاکی (A)، گیاهان سازگار شده در گلدان‌های حاوی پیت و ماسه (B)
Figure 6- (A) Transferring *in vitro* rooted plants to the soil mixtures, (B) Acclimatized plants in pots were filling with pit and sand

منابع

- 1- Ahmed M.B., Salihin M., Karim R., Razvy M.A., Hannan M.M., Sultana R., Hossain M., and Islam R. 2007. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2: 121-125.
- 2- Atkinson R.G., and Gardner R.C. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 10: 208-212.
- 3- Bermejo J.E.H., and León J. 1994. Neglected crops: 1492 from a different perspective (No. 26). Food and Agriculture Org.
- 4- Blakesley D., and Chaldecott M.A. 1997. The role of endogenous auxin in root initiation. Plant Growth Regulation 13: 77-84.
- 5- Blanca J.M., Prohens J., Anderson G.J., Zuriaga E., Cañizares J., and Nuez F. 2007. AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): implications for evolution and domestication. American Journal of Botany 94: 1219-1229.
- 6- Cavusoglu A., and Sulusoglu M. 2013. *In vitro* propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). Journal of Food Agriculture Environment 11:410-415.
- 7- Contreras C., González-Agüero M., and Defilippi B.G. 2016. A review of pepino (*Solanum muricatum* Aiton) fruit: a quality perspective. HortScience 51: 1127-1133.
- 8- Devi C.S., and Srinivasan V.M. 2008. *In vitro* propagation of *Gymnema sylvestre*. Asian Journal of Plant Sciences 7: 660-665.
- 9- Emarah 2008. Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria* spp.) through tissue cultures. International Journal of Product Development 13: 191-212.
- 10- Gamburg K.Z., and Semenova L.A. 1977. Clonal propagation, flowering and fruiting of tomato *in vitro*. Acta Horticulture 447: 147-148.
- 11- Hadayat M., and Khoushkhoui M. 2006. Effects of culture media and growth regulators on micropropagation of pyrethrum [*Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir) Schultz-Bip.]. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 4: 171-182. (In Persian).
- 12- Hrbans L., Hankins A., Mebrahtu T., Mullins J., and Rangappa M. 1996. Alternative crops research in Virginia, Progress in new crops. ASHS press, P: 87-96.
- 13- Jordan M., Obando M., Iturriaga L., Goreux A., and Velozo J. 1993. Organogenesis and regeneration of some Andean fruit species. Acta Horticulturae 336: 279-283.
- 14- Kojori F., Kiani G., Nematzadeh G.A., and Ghasemi Y. 2015. Effects of different growth regulators on *in vitro* direct shoot regeneration of strawberry cv. diamante (*Fragaria x ananassa* Duch.). Journal of Crop Breeding 7: 68-75.
- 15- Mohamed M.H., and Alsadon A.A. 2011. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annum*. Biologia Plantarum, 55, p. 370.
- 16- Mohan L., Paranidharan V., and Murugesan R. 2000. New records - on pepino (*Solanum muricatum*). Indian Phytopathology 53: 495-497.

- 17- National Research Council. 1989. Lost crops of the incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington, DC: The National Academies Press.
- 18- Nordine A., Bousta D., El Khanchoufi A., and El Meskaoui A. 2013. An efficient and rapid in vitro propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. International Journal of Pharma Bioscience and Technology 1: 118-129.
- 19- Nemati H., and Tehranifar A. 2007. Investigation of sexual and asexual propagation of a new vegetable called pepino in Iran (*Solanum muricatum*, Atio, pepino). Mashhad, Journal of Agricultural Science and Technology 21: 3-9. (In Persian)
- 20- O'Riordain F. 1987. The effects of benzyladenine, indole butyric acid and gibberellic acid on the micropropagation of the strawberry cultivar Clonard. In Vitro Culture of Strawberry Plants, pp. 47-53.
- 21- Otroshi M., and Karimi Dehkordi R. 2014. Effect of different concentrations of plant growth regulators on In vitro micropropagation of cherry tomato. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 5: 127-134.
- 22- Otroshi M., Moradi K., and Khayam Nekouei M. 2010. Micropropagation of *Capsicum annuum* L. in vitro. Iranian Journal of Plant Biology 2: 1-12.
- 23- Padmapriya H., Karthikeyan A.V.P., Jahir Hussain G., Karthi C., and Velayutham P. 2011. An efficient protocol for in vitro propagation of *Solanum nigrum* L. from nodal explants. Journal of Agricultural Technology 7:1063-1073.
- 24- Pan R., and Zhao Z. 1994. Synergistic effects of plant growth retardants and IBA on the formation of adventitious roots in hypocotyl cuttings of mungbean. Plant Growth Regulation 14: 15-19.
- 25- Pauli R. 1988. Micropropagation of pepinos (*Solanum illiricalum* Ait.). Acta Horticulturae 227: 387-389.
- 26- Pierik R.L.M. 1991. Horticulture new technologies and applications proceeding of the international seminar on new frontiers in horticulture. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 12: 141-53.
- 27- Pierik R.L.M. 1997. Micropropagation of *Solanum muricatum* Ait. (Pepino). In *High-Tech and Micropropagation V* (pp. 160-172). Springer, Berlin, Heidelberg. In Vitro Culture of Higher Plants. Springer Science and Business Media.
- 28- Prohens J., Rodríguez-Burruezo A., and Nuez F. 2005. Utilization of genetic resources for the introduction and adaptation of exotic vegetable crops: The case of pepino (*Solanum muricatum*, Ait.). Euphytica 146: 133-142.
- 29- Prohens J., and Nuez F. 1999. Strategies for breeding a new greenhouse crop, the pepino (*Solanum muricatum* Aiton). Canadian Journal of Plant Science 79: 269-275.
- 30- Prohens J., Ruiz J.J., and Nuez F. 1996. The pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): A "new" crop with a history. Economic Botany 50: 355-368.
- 31- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., and Scheres B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell 99: 463-472.
- 32- Sakamoto K., and Taguchi T. 1994. Somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepino (*Solanum muricatum*). In Somatic Hybridization in Crop Improvement I (pp. 244-254). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 33- Sakila S., Ahmed M.B., Roy U.K., Biswas M.K., Karim R., Razvy M.A., Hossain M., Islam R., and Hoque A. 2007. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2: 151-154.
- 34- Sakamoto K., and Taguchi T. 1991. Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. Theoretical and Applied Genetics 81: 509-513.
- 35- Sanatombi K., and Sharma G.J. 2007. Micropropagation of *Capsicum annuum* L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 35, p. 57.
- 36- Siddique I., and Anis M. 2008. An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. Acta Physiologiae Plantarum 30: 493-499.
- 37- Szyndel M.S., Kowalczyk K., and Pawelczak A. 2008. Elimination of tomato mosaic virus (ToMV) from pepino (*Solanum muricatum*) plants. Phytopathologia Polonica 49: 57-63.
- 38- Tilkat E., Onay A., Yildirim H., and Cetin Ozen H. 2008. Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 328-333.
- 39- Trewavas A.J., and Cleland R.E. 1983. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? Trends in Biochemical Sciences 8: 354-357.
- 40- Yildiz T., and Kalkan F. 2014. Some color and physical properties of pepino (*Solanum Muricatum* Aiton) fruit. Bulgarian Journal of Agricultural Science 20: 988-992.
- 41- Zarei M., Garoosi Gh., Nezami E., Hosseini R., and Ahmadi J. 2013. The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of Gisela 6 root stock. Journal of Cell and Tissue 4: 169-185.



Effect of Medium and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) *in vitro* Condition

M. Aghdaei¹- S.H. Nemati^{2*}- L. Samiei³- A. Sharifi⁴

Received: 09-12-2018

Accepted: 22-09-2019

Introduction: Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) is a diploid herbaceous plant belongs to the Solanaceae family, which is growing in subtropical zone, originates from Andes in South America. It is commercially grown for its fruit, which is appreciated not only for food but also for its appearance, in South American countries, including Bolivia, Colombia, Ecuador and Peru, as well as in countries such as New Zealand and Australia. Pepino is propagated by seed, cutting, and tissue culture methods. Most pepino cultivars are sexually fertile and produce viable seeds, but their seeds have poor germination and high level of heterozygosity causing to highly variable plants. Both mentioned negative aspects have limited the mass production of this plant through seed. In this case, stem cutting is used as the most common way of propagating pepino led to transmission of viral diseases and increasing propagation costs as two main limiting factors of pepino propagation. So, micropropagation systems are a promising tool to produce disease-free clonal plant material with low costs. Therefore, the present study was aimed to assess the effect of different media and plant growth regulators on micropropagation traits of pepino.

Materials and Methods: Three separate experiments were carried out in institute of plant sciences of Ferdowsi University of Mashhad in 2016. Pepino seeds were bought from company of Plant World Seed, UK, were cultivated on MS medium. Grown plants were used as source of providing explants. Four mediums, including MS, ½ MS, SH and B5 were used to determine the best culture medium for shoot regeneration of pepino using single node explant. A factorial experiment was conducted based on a completely randomized design. Some growth properties such as number of shoots, shoot length, number of roots, root length, leaf number and leaf length were evaluated after two and four weeks. In proliferation experiment, MS medium was compared with MS supplemented with different concentrations of BA (0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) and Kin (0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) applied as combined treatments, and also BA used alone at concentrations of 2, 4 and 6 mg L⁻¹ that was conducted based on a completely randomized design. For rooting of explants, an experiment was conducted based on a completely randomized design containing of two concentrations of IBA (at 0.3 and 0.6 mg L⁻¹) and three concentrations of NAA (at 0.3, 0.6 and 0.9 mg L⁻¹) in MS medium. Some growth properties including root number and length, root density and root quality were evaluated after four weeks

Results and Discussion: Results indicated that micropropagation rate of pepino was affected by culture medium type. The highest shoot length, number of root, root length and leaf number were obtained in MS medium, although statistically there was no significant difference between MS and ½ MS media. The highest number of shoots and leaf length were observed in MS medium, which led to a significant difference with other media (½ MS, SH and B5). Overall, Based on obtained results MS medium was the best culture medium for micropropagation of pepino using single node. In the proliferation experiment, the highest shoot and leaf number and plant color were obtained with using 2 mg L⁻¹ BA + 1 mg L⁻¹ Kin, whereas the highest shoot length and leaf length were observed in the 1 mg L⁻¹ BA + 2 mg L⁻¹ Kin and 1 mg L⁻¹ BA+1 mg L⁻¹ Kin treatments, respectively. Increasing in concentration of BA up to 2 mg L⁻¹ in combination with Kin had a positive effect on shoot proliferation, while applying BA at concentration 2, 4 and 6 mg L⁻¹ alone led to decrease in proliferation. Results obtained from rooting experiment showed that the highest root number, root density and root quality were obtained using IBA at the concentration of 0.6 mg L⁻¹, whereas the highest root length was observed by applying IBA at concentration of 0.3 mg L⁻¹, which led to a significant difference with other treatments. Furthermore,

1 and 2- Ph.D. Graduate and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*- Corresponding Author Email: Nemati@um.ac.ir)

3- Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran

results indicated that the effect of IBA on rooting of pepino microshoots was more than NAA.

Conclusion: Generally, the best results were obtained by MS medium, 2 mg L⁻¹ BA with 1 mg L⁻¹ Kin for shoot proliferation, and IBA at concentration of 0.6 mg L⁻¹ for the rooting of pepino nodal segments.

Keywords: BA, IBA, Proliferation, Rooting, Tissue culture