نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص.۲۲-۱۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 1, Spring 2018, P. 13-22
ISSN: 2008 - 4730

اثر ریز نمونه و سطوح هورمونی بر باززایی مستقیم در رقم محلی خاتونی خربزه

زهره چنارانی[۱]- فرهاد شکوهی فر[۲]- مجتبی ممرآبادی[۳*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۲

چکیده

خربزه گیاهی جالیزی و با ارزش اقتصادی بالا به شمار می‌رود که سطح زیر کشت قابل توجهی را در ایران و استان خراسان به خود اختصاص داده است. بکارگیری تکنیک‌های نوین در سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی می‌تواند در جبران کاستی‌های گذشته نقش مهمی ایفاء نماید. اکوتیپ خاتونی می‌تواند به عنوان رقمی محلی و بازارپسند در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. در این مطالعه اثر دو فاکتور ریزنمونه و مقادیر مختلف هورمون BAP در محیط کشت با هدف بهینه سازی شرایط باززایی مستقیم در اکوتیپ خاتونی بررسی شد. جوانه‌ی جانبی انتهای برگ‌های لپه‌ای، برگ‌های حقیقی و محور زیر لپه در محیط‌های کشت RM1 (حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP)، RM2 (حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم درلیترBAP)، RM3 (حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP)، RM4 (حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیترBAP)، RM5 (حاوی ۱ میلی‌گرم در لیترBAP) و RM6 (یک تیمار ترکیبی از دو هورمون BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. ریزنمونه‌ی برگ لپه‌ای در مقایسه با سایر ریز نمونه‌ها باززایی بیشتری نشان داد و القای ساقه‌زایی در محیط کشت با افزایش میزان BAP افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: برگ حقیقی، برگ لپه‌ای، خربزه، محور زیرلپه، هورمون BAP

مقدمه

خربزه .*Cucumis melo* L یکی از مهم‌ترین محصولات اقتصادی و متعلق به خانواده *Cucurbitaceae* است و به دلیل دگرگرده افشانی و عمر طولانی گل از تنوع بالایی برخوردار است. اقلیم مناسب کشت این گیاه نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است. ایران بعد از چین و ترکیه سومین کشور تولیدکننده خربزه است که استان‌های خراسان، سمنان و خوزستان به ترتیب بالاترین میزان عملکرد در هکتار را به خود اختصاص می‌دهند (۷). رقم خاتونی جزء ارقام محلی ایرانی است که علاوه بر اهمیت اقتصادی، از نظر کیفیت و طعم ارزش بالایی دارد و بیش‌ترین سطح زیرکشت را در ایران به خود اختصاص می‌دهد (۲۲). در سال‌های اخیر تلاش هایی برای معرفی ارقام اصلاح شده خاتونی توسط محققین و شرکت‌های داخل و خارج از کشور صورت گرفته است. با این حال این تلاش‌ها تنها به به گزینی در جهت انتخاب صفات به زراعی محدود بوده است و هنوز برای دستیابی به ارقام مقاوم خربزه به بیماری‌ها از جمله پژمردگی فوزاریومی تلاشی صورت نگرفته است.

یکی از مشکلات اصلی تولید ملون‌ها در بسیاری از کشورهای تولید کننده، حساسیت زیاد این محصول به بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی بویژه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* است. تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و یا گیاهانی با صفات زراعی ارزشمند همواره در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه بوده‌است با این وجود معرفی آن‌ها با روش‌های اصلاح کلاسیک از طریق تلاقی بسیار زمان بر و پر هزینه خواهد بود و علاوه بر آن سبب انتقال طیف وسیعی از صفات غیرمطلوب به رقم مورد نظر خواهد شد. از سوی دیگر وجود مشکلات و محدودیت‌های تلاقی بین گونه‌ای و بین جنسی کارائی استفاده از روش‌های کلاسیک را کم نموده‌است. این محدودیت‌ها استفاده از تکنیک‌ها و ابزارهای جدیدی را مورد توجه قرار داده است. مهندسی ژنتیک امکان بدست آوردن یک ژن خاص را از منابع حیاتی خارج از گونه گیاهی مورد نظر ممکن نموده است. ارائه تکنیک‌های انتقال ژن، وارد نمودن یک ژن جدید را در گیاه هدف ممکن ساخته است. بنابراین، تکنیک‌های نوین از جمله انتقال ژن برای استفاده از ژن‌های مقاوم،

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۲- استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: mamarabadi@um.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i1.48644

در خربزه می تواند به عنوان یک روش اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. به منظور انتقال یک ژن جدید به گیاه، بررسی شرایط کشت بافت و بهینه سازی روش باززائی مستقیم اهمیت بالائی دارد و اصلاح ژنتیکی گیاهان از جمله ملون‌ها با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت و بیوتکنولوژی، پتانسیل خوبی را برای تولید میوه هایی با کیفیت بالا و ایجاد ارقام مقاوم به تنش‌های محیطی و زیستی ایجاد کرده است (۴ و ۵).

باززایی مستقیم در شرایط درون شیشه‌ای یکی از مراحل کلیدی در موفقیت برنامه‌های انتقال ژن می‌باشد (۲۰). از طرفی، اندام زایی فرایندی است که در آن شاخساره‌های جدید در شرایط درون شیشه‌ای از طریق تقسیم سلولی و تمایزیابی به وجود می‌آید و به تدریج مریستم انتهایی جدید در شاخساره تولید و نهایتا طویل شدن شاخساره اتفاق می افتد. اندام‌زایی غیرمستقیم خربزه به دلیل زمان بر بودن دست یابی به گیاه کامل و احتمال بروز تنوع سوماتیکی و عدم ثبات ژنتیکی و تولید گیاهان شیمر از نظر سطح پلوئیدی مطلوب نیست، عوامل مختلفی در بهینه سازی شرایط باززایی مستقیم در ارقام ملون مورد توجه بوده است. انتخاب ریزقلمه مناسب، تعیین سطوح هورمون سیتوکنیین مانند بنزیل آمینو پورین (BAP)[1] از جمله این عوامل است (۱۹). اثر ریزقلمه‌های تهیه شده از بافت‌های مختلف خربزه مانند ریزنمونه‌های کوتیلدونی و یا برگ حقیقی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۹). باززایی شاخساره‌های خربزه در شرایط درون شیشه ای به طور مستقیم از برگ‌های لپه ای (۶ و ۱۹) و برگ‌های حقیقی (۱۱و۲۷) و محور زیرلپه (هیپوکوتیل) (۱۲ و ۱۵) گزارش شده است. همچنین باززایی خربزه از طریق اندام زایی (۱، ۱۳، ۱۷، ۱۹ و ۲۶) گزارش شده است. موفقیت در باززایی در ارقام مختلف ملون تا حد زیادی تحت تاثیر ژنوتیپ گیاه می باشد (۲۱). بررسی ترکیبات هورمونی نیز نشان داده‌است که غلظت‌های متفاوت هورمون‌های BAP و NAA در باززایی خربزه اثرات متفاوتی اعمال می نمایند.

اولین گزارش از اندام‌زایی مستقیم توسط بلکمون و همکاران (۲۳) ارائه شد. آن‌ها توانستند از ریزنمونه‌های لپه‌ای و برگ ارقام مختلف خربزه در محیط MS به ترتیب حاوی ۰/۱ : ۲ :۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip– NAA– سایکوسل، گیاهان کامل به دست آورند. تابعی و همکاران (۲۶) از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، زیرلپه، برگ و جوانه‌های ۱۰ روزه رقم ارلز[2] با سطوح مختلف هورمونی از طریق باززایی مستقیم، ساقه تولید کردند. در این میان بیشترین باززایی در حضور به ترتیب ۰/۱: ۱: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP : IAA: 2,4-D گزارش شد. در بررسی‌های انجام شده توسط یاداو و همکاران (۲۷) روشی سریع و کارا برای باززایی ساقه از ریزنمونه‌های برگ دو رقم معروف هالس و آناناس[3] با به کارگیری ۱/۱۳، ۰/۸۸، ۵/۱ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب AgNO3 : NAA: BAP گزارش شده است. آن‌ها توانستند از هر ریزنمونه ۱۰۰–۸۰ درصد باززایی به دست آورند. کوروک و همکاران (۵)، اثر ژنوتیپ، ترکیب هورمونی و سن ریزنمونه را روی باززایی ساقه از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای سه ، چهار و شش روزه ۱۰ ژنوتیپ ترکیه ای گیاه خربزه بررسی کردند. در غلظت‌های ۱/۱۳: ۰/۸۸: ۰/۲۶میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ABA: IAA: BAP در ریزنمونه‌های چهار روزه بیشترین فراوانی باززایی (۹۰ درصد) را نشان دادند. در گزارشی از اندام‌زایی خربزه رقم کریولو[4] با بررسی ریزنمونه‌های سه روزه هفت ژنوتیپ در محیط حاوی سه سطح (۰/۱–۰/۵–۱) BAP و سه سطح (۰–۰/۵–۰/۵) IAA، بیشترین باززایی مستقیم شاخه با سطح یک میلی‌گرم در لیتر BAP به طور میانگین بالای ۷۰ درصد در مجموع ژنوتیپ‌ها به دست آمد (۱۶). تنها گزارش در مورد اندام‌زایی مستقیم خربزه رقم خاتونی مربوط به تحقیقی است که توسط نداف و همکاران انجام شده است (۲۰). در این تحقیق با بررسی ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای گیاهچه‌های ۷ روزه بیشترین باززایی بدست آمد (۶۴ درصد).

با توجه به ارزش زراعی و اقتصادی رقم خاتونی در استان خراسان و ضرورت مهیا نمودن شرایط بهره مندی از فناوری‌های نوین در افزایش کیفیت و مقاومت این گیاه در برابر تنش‌های مختلف، در این مطالعه با هدف بهینه‌سازی شرایط باززایی مستقیم گیاهچه کامل در شرایط آزمایشگاهی اثر عواملی از جمله ریزنمونه و سطوح مختلف هورمونی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از بذور رقم محلی خاتونی (اهدائی آقای دکتر علی رضا سبحانی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی) استفاده شد. بذور جهت تولید گیاهچه استریل در درون شیشه مورد استفاده قرار گرفتند. ضدعفونی بذور پس از جدا سازی پوسته بذر در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر انجام شد. در شرایط استریل بذور سه بار و هر مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس بذور روی کاغذ صافی استریل خشک گردیده و در محیط پایه MS[5] (۱۷) کشت شدند. پس از کشت، شیشه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند و سپس به اتاق رشد با دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا

1- 6-Benzylaminopurine (BAP)
2- Earl's
3- Ananas
4– Criollo
5- Murashige and Skoog

برگ‌های کوتیلدونی توسعه یابند و در تعدادی از نمونه‌های رشد گیاه تا زمان ظهور برگ‌های حقیقی تداوم یافت.

بررسی اثر نوع ریزنمونه و هورمون BAP در راندمان باززایی

راندمان باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، برگ حقیقی و محور زیرلپه رقم خاتونی خربزه مورد بررسی قرار گرفت. ریز نمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل رشد یافته در شرایط درون شیشه تهیه شد. ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیرلپه از گیاهچه‌های ۱۰ روزه و ریزنمونه‌ی برگ حقیقی از گیاهچه‌های ۲۰ روزه در شرایط استریل جداسازی شد. پنج تیمار هورمونی با غلظت متفاوت از هورمون BAP (۶- بنزیل آمینو پورین) جهت مقایسه باززایی مستقیم ریز نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در این تیمارها سطوح ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط پایه‌ی MS اضافه شد و یک تیمار حاوی ترکیبی از دو هورمون BAP ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA (نفتالین استیک اسید) ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مورد استفاده قرار گرفت. از هر نمونه سه ریز قلمه در هر شیشه حاوی هر محیط کشت قرار گرفت و در سه تکرار کشت شد. محیط‌ها حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار و pH= ۵/۸ بودند. ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا بروز ساقه زایی نگهداری شدند. روشنایی با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع به وسیله لامپ‌های فلورسنت سفید تامین شد. نمونه‌ها پس از کشت در شرایط روشنایی و دمای مشابه مرحله جوانه زنی نگهداری شدند.

بررسی اثر غلظت BAP در طویل شدن ساقه‌های باززایی شده

نوساقه‌های تولید شده از محل تمایز از ریزنمونه جدا و به محیط طویل شدن ساقه منتقل شدند. جهت طویل شدن ساقه‌های باززا شده دو نوع محیط هورمونی (ME_1 و ME_2) با غلظت‌های متفاوت هورمون BAP مورد بررسی قرار گرفت. در محیط ME_1 میزان هورمون BAP با همان نسبت مشابه هورمون در محیط باززایی استفاده شد و در محیط ME_2 میزان هورمون نسبت به محیط باززایی یک سطح کاهش یافت.

بررسی اثر هورمون NAA در ریشه‌زایی ساقه‌های طویل شده

جهت تشکیل سیستم ریشه‌ای قوی و گسترده، نوساقه‌های طویل شده روی محیط طویل شدن نوساقه از محل میان گره‌ها به صورت اریب جدا و به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل شدند. سه نوع محیط ریشه‌زایی شامل محیط MS عاری از هورمون (MR_A)، محیط MS تکمیل شده با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (MR_B) و محیط MS تکمیل شده با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (MR_C) تهیه شد.

سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار

گیاهان ریشه‌دار شده پس از شستشو با آب و حذف کامل آگار به گلدان‌های کوچک حاوی بستر کشت ترکیبی شده از نسبت‌های مساوی پیت: پرلیت: ورمی‌کولیت منتقل شدند. روی گیاهان جهت ممانعت از تنش رطوبتی با پوشش‌های پلاستیکی پوشانده و برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد. سپس در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. پس از ۴۸ ساعت، با ایجاد منافذی در پوشش‌ها و حذف تدریجی آن شرایط سازگاری گیاهان نسبت به محیط فراهم آمد.

آنالیز داده‌ها

آزمایشات باززایی با فاکتور ریزنمونه (در دو سطح برگ حقیقی، برگ لپه‌ای) و غلظت هورمون BAP (در پنج سطح RM_1 -RM_5) در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی آنالیز شدند. داده‌ها با نرم افزار SPSS و JMP آنالیز شدند و میانگین‌ها بوسیله‌ی آزمون دانکن مقایسه شدند. نمودارها در نرم افزار Microsoft Excel 2007 رسم شدند.

نتایج و بحث

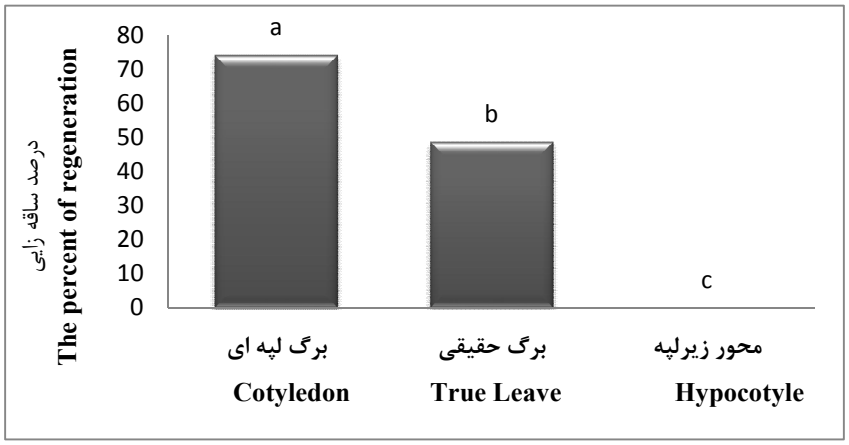
در اختیار بودن دستورالعمل باززایی مستقیم گیاهان در انجام برنامه‌های انتقال ژن ضروری است. به منظور بهینه‌سازی این شرایط در رقم خاتونی خربزه اثر هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف در ساقه‌زایی مستقیم، تیمارهای مناسب جهت طویل شدن ساقه‌ها و ریشه‌دار نمودن ریزساقه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

اثر نوع ریزنمونه و غلظت هورمون BAP بر راندمان باززایی مستقیم

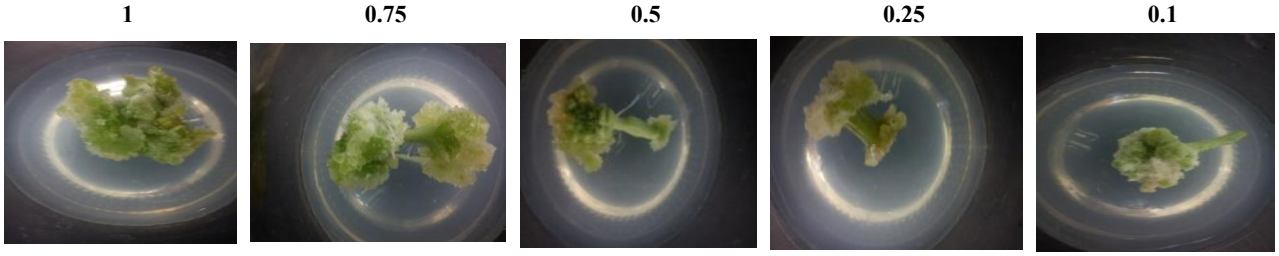
انتخاب ریزنمونه مناسب یک گام اصلی در دست یابی به روش‌های باززایی گیاهان است. در این آزمایش درصد ساقه زایی سه نوع ریزنمونه (محور زیرلپه، برگ‌های لپه ای و برگ حقیقی) مورد بررسی قرار گرفت. ظهور اولین ساقه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های مختلف به طور متوسط دو هفته بعد از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت اندام‌زایی مستقیم مشاهده شد. طی هفته اول کشت، رشد و توسعه ریزنمونه‌ها مشاهده شد. شروع و فراوانی باززایی در ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود. نتایج نشان داد که بیشترین راندمان باززایی در تمامی سطوح هورمونی مربوط به ریزنمونه برگ لپه‌ای است (شکل ۱).

مشاهدات نشان داد که ریزنمونه محور زیرلپه در تمام تیمارهای هورمونی مورد مطالعه فقط تشکیل بافت کالوس داده و هیچ ساقه‌ای

تشکیل نشد (شکل ۲). در ریزنمونه‌های محور زیرلپه تا مدت ۶ ماه هیچگونه باززائی در هیچ یک از محیط‌های کشت آزمون شده مشاهده نشد.



شکل ۱- اثر نوع ریزنمونه بر درصد ساقه‌زایی خربزه رقم' محلی خاتونی'
Figure1- The effect of explant types on shoot regeneration percent of *Cucumis melo* L., cv. *Khatooni*)

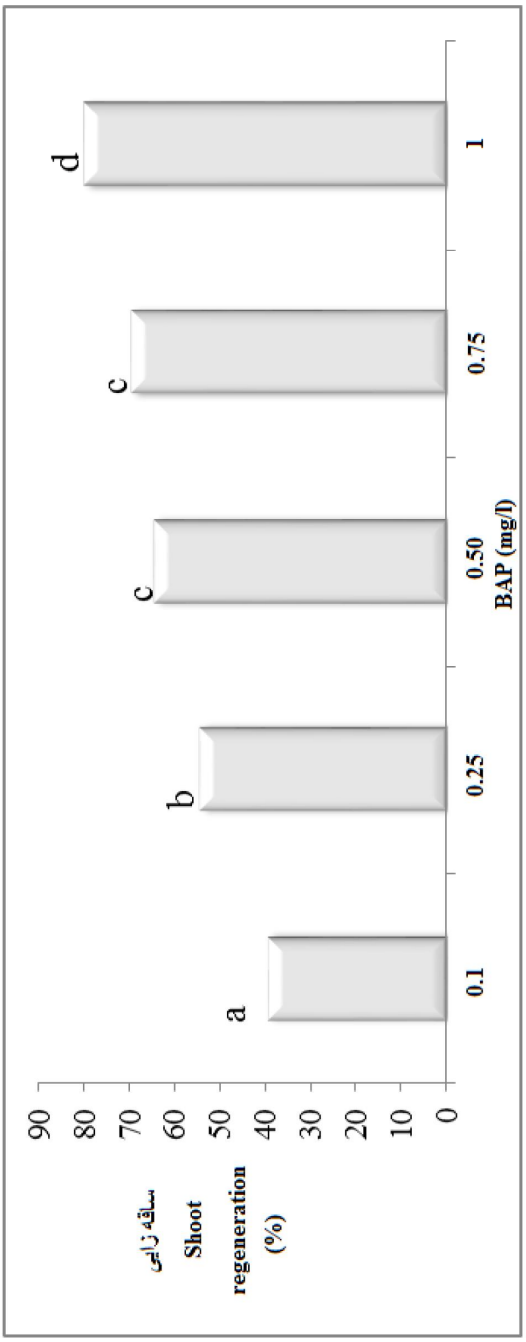


شکل ۲- اثر ریزنمونه محور زیرلپه خربزه رقم' محلی خاتونی' در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP
Figure 2- The effect of hypocotyls explants of *Cucumis melo* L. cv. *khatooni* in different concentrations of BAP (1, 0.75, 0.5, 0.25, and 0.1 mg/l)

با توجه به نقش اساسی سایتوکینین‌ها در تحریک ساقه‌زایی، تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون BAP روی ساقه‌زایی ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای، برگ حقیقی و محور زیرلپه بررسی گردید. جهت باززایی ساقه، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت هورمونی از BAP (۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند.

نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های مختلف هورمونی از لحاظ درصد باززایی ساقه در سطح احتمال یک در صد متفاوت بود. بیشترین درصد باززایی ساقه در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. سپس به ترتیب در محیط‌های حاوی ۰/۷۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ساقه‌زایی دیده شد. کمترین درصد ساقه‌زایی مربوط به محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (شکل ۳).

در مجموع نتایج این آزمایشات نشان داد که در میان انواع ریزنمونه‌های مورد مطالعه، ریزنمونه برگ لپه‌ای به دلیل دارا بودن بالاترین درصد باززایی در بین سایر ریزنمونه‌ها به عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه جهت باززایی انتخاب گردید. همچنین در بین غلظت‌های مختلف هورمونی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد باززایی را سبب شد. بنابراین می توان انتخاب ریزنمونه برگ لپه ای و سطح هورمونی یک میلی گرم در لیتر BAP را برای مراحل باززایی گیاه خربزه رقم خاتونی توصیه نمود. در تیماری که حاوی مقادیر کمی از هورمون NAA در ترکیب با هورمون BAP بود اندام‌زایی در هر سه ریزنمونه برگ لپه‌ای، برگ حقیقی و محور زیرلپه به صورت رشد و توسعه ریشه نمایان شد (شکل۴). در این تیمار هر سه ریزنمونه تنها ریشه‌زایی نمودند و ساقه‌زایی مشاهده نشد. این نتایج حاکی از آن بود که مقادیر اندکی از هورمون NAA از باززائی مستقیم ریز نمونه‌ها جلوگیری نموده و به عبارتی مهار ساقه‌زایی و در نتیجه ریشه‌زائی را در هر سه ریزنمونه مورد استفاده القاء می نماید.

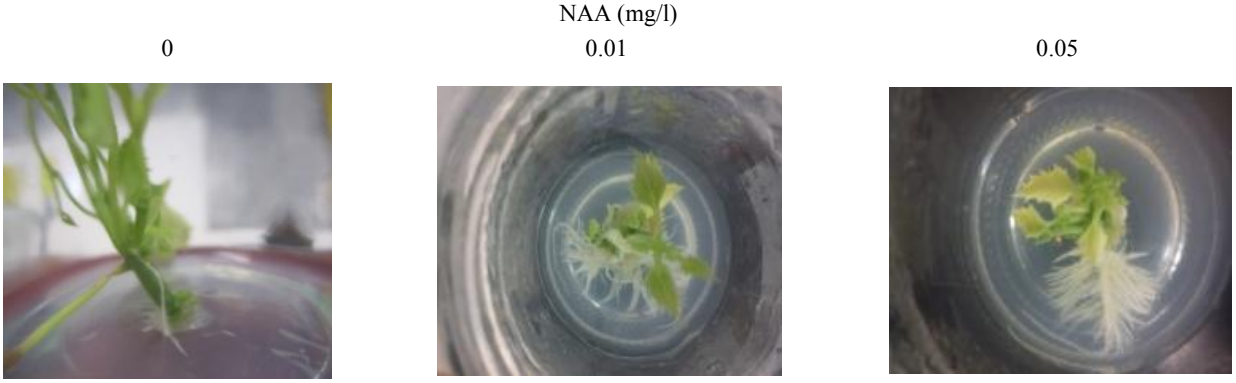


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف BAP بر درصد ساقه‌زایی خربزه رقم "محلی خاتونی" . بر مبنای آزمون LSD، در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 3- The effect of different concentrations of BAP on shoot regeneration of *Cucumis melo* L. cv. *khatooni*. Means in each treatment, followed by the same letter are not significantly different at LSD ($P \leq 0.01$) of probability

شکل ٤- تاثیر هورمون NAA بر اندام‌زایی ریزنمونه‌های مختلف خربزه رقم' محلی خاتونی'. در تیمار ترکیبی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر NAA هر سه ریزنمونه برگ حقیقی، برگ لپه ای و محور زیرلپه پس از گذشت ۲۰ روز از کشت تنها ریشه زایی نموده و هیچ ساقه‌ای تشکیل نشد

Figure 4- The effect of NAA on the different explants organogenesis of *Cucumis melo* L. cv. *khatooni*. In all three explants (true leaves, cotyledon and hypocotyls) rooting was observed in a treatment combination including 0.5 mg/l BAP and 0.01 mg/l NAA, 20 days after cultivation while no stem was formed at the same time



شکل ٥- گیاهان ریشه‌دار شده در غلظت‌های مختلف NAA در خربزه رقم' محلی خاتونی' در محیط MS عاری از هورمون، سیستم ریشه‌ای ضعیفی بعد از گذشت ۳ هفته از قرار گرفتن روی محیط ریشه‌زایی شکل گرفت. در محیط MS غنی شده با ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA سیستم ریشه‌ای مناسبی بعد از گذشت ۸ تا ۱۰ روز تشکیل شد

Figure 5- Rooted plants of *Cucumis melo* L. cv. *khatooni* in the different concentrations of NAA. In MS medium without hormone, a weak root system was formed three weeks after exposure on the rooting medium. In MS medium enriched with 0.01 and 0.05 mg/l NAA an appropriate root system was formed after 8 to 10 days

اثر هورمون BAP در طویل شدن ساقه‌های باززاشده

به منظور افزایش طول ساقه‌ها و به وجود آمدن ساقه‌های طبیعی‌تر و مناسب، ساقه‌های تولیدی که به خوبی از محل میانگره قابل جداسازی بود، پس از گذشت ۱۰ روز پس از باززایی به محیط مناسب جهت طویل شدن منتقل شدند. در محیط ME_1 که غلظت هورمون BAP نسبت به محیط باززایی یک سطح کاهش پیدا کرد بعد از گذشت ۱۴-۱۰ روز ساقه‌ها به طول مناسب جهت انتقال به محیط ریشه‌زایی رسیدند. در محیط ME_2 که غلظت هورمون BAP مشابه غلظت هورمون در محیط باززایی بود، فقط باززایی و تکثیر ساقه‌های جدید اتفاق افتاد.

نتایج اثر هورمون NAA در ریشه‌زایی و سازگاری گیاهان

القای ریشه جهت به دست آوردن گیاهان کامل با تاثیر سه غلظت هورمون NAA مورد بررسی قرار گرفت. ساقه‌های طویل شده جهت تشکیل سیستم ریشه‌ای به محیط‌های مختلف که برای ریشه‌زایی ارزیابی گردیده بودند منتقل شدند. برای ریشه‌زایی ساقه‌های طویل شده از محیط کشت MS حاوی NAA با سطوح ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ۸ تا ۱۰ روز پس از کشت، در محیط القای ریشه، ساقه‌ها بر اساس ریشه‌زایی بررسی شدند. در محیط MS عاری از هورمون، سیستم ریشه‌ای ضعیفی بعد از گذشت ۳ هفته از قرار گرفتن روی محیط ریشه‌زایی شکل گرفت. در محیط MS غنی شده با ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA سیستم ریشه‌ای مناسبی بعد از گذشت ۸ تا ۱۰ روز تشکیل شد (شکل ۵). در

مورد ساقه‌های قرار داده شده در محیط‌های مختلف ریشه‌زایی، در تمام سطوح هورمونی مورد استفاده، ریشه‌زایی رخ داد. نتایج نشان داد که هورمون NAA در هر دو سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، تولید ریشه را باعث می‌شود و در سطح بالاتر افزایش تحریک در تولید ریشه فرعی و افزایش طول ریشه اصلی و فرعی اتفاق می‌افتد. در مجموع مشاهدات نشان داد که محیط ریشه‌زایی حاوی NAA محیط مناسب‌تری نسبت به محیط جامد MS جهت ریشه‌زایی ساقه‌های باززاشده از ریزنمونه‌ها می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

دستیابی به دستورالعمل انتقال ژن به گیاه تا حد زیادی تحت تاثیر روش باززایی مستقیم گیاه در شرایط آزمایشگاهی می باشد. در این مطالعه با هدف بهینه سازی شرایط باززایی مستقیم اثر فاکتورهای مختلفی از جمله نوع ریز قلمه و سطوح هورمونی مختلف در مراحل پرافزایی، طویل شدن ساقه، ریشه دار شدن ساقه، توسعه ریشه‌ها و در نهایت مراحل سازگاری گیاهچه و انتقال به شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر برگ لپه‌ای راندمان باززایی مستقیم بالاتری نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها را دارا بود. نتایج مشابه دیگری از اندام‌زایی مستقیم برگ‌های لپه‌ای سایر ارقام خربزه گزارش شده است. دریکس و وان بگنوم (۶) از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای ارقام مختلف خربزه روی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیش‌ترین باززایی را به دست آوردند. سینگ و همکاران (۲۳) بیش‌ترین باززایی مستقیم را روی محیط کشت حاوی ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در گیاه خریزه به‌دست آوردند. در رقم خربزه ی آماریلو (Amarilo) بیشترین باززایی از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای حاصل شد (۱۶). سوزا و همکاران (۲۵) با استفاده از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای خربزه ۴۲ درصد راندمان باززایی مستقیم داشتند. البته محیط باززایی آن‌ها علاوه بر ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA نیز بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مواد تنظیم کننده رشد BAP با غلظت یک میلی گرم در لیتر بیشترین باززایی را نشان داد. نتایج این بررسی با بسیاری از نتایج محققان قبلی مطابقت دارد. در این خصوص باززایی درون شیشه ای خربزه از ریزنمونه‌های برگ کونیلدونی و برگ حقیقی (۶ و۱۲) در محیط‌های باززایی حاوی سایتوکینین‌ها (۳ و ۱۲)، اکسین‌ها (۱۰ و ۱۶) به دست آمده است.

امروزه کاملاً مشخص شده است که سایتوکینین‌ها در تقسیم سلولی، آزاد شدن جوانه‌های جانبی از رکود، در تشکیل و رشد جوانه‌های جانبی و همچنین در کنترل چرخه سلولی نقش دارند. در حالی که اکسین‌ها تاثیر شدیدی در شروع تقسیم سلول داشته و باعث تشکیل بافت‌های سازمان نیافته (کالوس) از مریستم‌های سازمان یافته می شوند، به طوری که با اسیدی کردن دیواره سلولی باعث بزرگ شدن سلول، تمایزیابی بافت آوندی و تشکیل ریشه‌ها می‌شوند. دستکاری نسبت سایتوکینین به اکسین در محیط کشت می تواند در الگوی نمو یا جهت دهی برنامه اندام زایی مناسب باشد (۹).

به طور کلی این مطالعه نشان داد که ریزنمونه برگ لپه‌ای بیشترین درصد باززایی ساقه را دارد ($P\leq$ ۰/۰۱). علاوه بر آن افزایش غلظت BAP سبب افزایش ساقه‌زایی در خربزه شد و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین ساقه‌زایی را دارد ولی افزایش هورمون BAP سبب کاهش ارتفاع ساقه شده و بنابراین کاهش غلظت هورمون BAP به یک سطح نسبت به غلظت هورمون در محیط باززایی باعث طویل شدن ساقه باززایی شده می‌شود. در آزمایشی که به منظور القای ریشه بر روی ساقه‌های باززایی شده انجام شد مشاهده شد که محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA محیط مناسب‌تری جهت ریشه‌زایی می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم را جهت اجرای این تحقیق مهیا نمودند صمیمانه تشکر می نمائیم.

منابع

1. Abrie A. L., and Van Staden J. 2001. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars. Plant Growth Regulation, 35: 263-267.
2. Blackmon W. J., Reynolds B. D., and Postek C. E. 1981. Production of somatic embryos from callused cantaloupe hypocotyl explants. Horticulture Science, 16: 451-451.
3. Chee P. P. 1991. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. Horticulture Science, 26: 908–910.
4. Compton M. E., Gray D. J., and Gaba V. P. 2004. Use of tissue culture and biotechnology the genetic improvement of watermelon. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 77: 231-243.
5. Curuk S., Elman C., Schlarman E., Sagef O., Shomer I., Cetiner S., Gray D. J., and Gaba V. 2002. A novel pathway for rapid shoot regeneration from the proximal zone of the hypocotyl of melon (*Cucumis melo* L.). In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 38: 260– 267.

6. Dirks R., and Buggenum M. V. 1989. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. Plant cell reports, 7: 626-627.
7. FAO Statistics. 2010. available at http://faostat.fao.org/faostat/ (visited 20 July 2016).
8. Gaba V., Elman E., Perl Treves R., and Gray D. J. 1996. A theoretical investigation of the genetic variability in the ability of Agrobacterium to transform *Cucumis melo*. L. p. 172-178. In Gomez-Guillamon M. L., Soria C., Cuartero J., and Fernandez-Munoz R. (eds). Cucurbits Towards. 2000. Preceding of 6th Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Malaga, Spain.
9. Gaspar T. H., Kevers C., Faivre-Rampant O., Crevecoeur M., Penel C. L., Greppin H., and Dommes J. 2003. Changing concepts in plant hormone action. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 39:85-106.
10. Gray D. J., McColley D. W., and Compton M. E. 1993. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cotyledons. Journal of American Society of Horticultural Science, 118: 425–432.
11. Kathal R., Bhatnagar S. P., and Bhojwani S. S. 1986. Regeneration of shoots from hypocotyl callus of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. Journal of Plant Physiology, 126: 59–62.
12. Kathal R., Bhatnagar S. P., and Bhojwani S. S. 1988. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. Plant Cell Reports, 7: 449–451.
13. Liborio L. C., Januzzi B. M., Stefano S. M. D., and Martinelli A. P. 2001. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. inodorus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65: 81-89.
14. Melara M. V., and Arias A. M. G. 2009. Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa Rican melon genotypes. Agronomia Costarricense, 33: 125-131.
15. Molina R. V., and Nuez F. 1995. Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 249-257.
16. Moreno V., Garcia-Sogo M., Granell I., Garcia-Sogo B., and Roig L. A. 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L. cv. Amarillo Oro). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 5: 139-146.
17. Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.
18. Naddaf kheyrabadi M., Lotfi M., Tohidfar M. and Naderi D. 2010. Master thesis in horticultural sciences. Transformation of melon *Cucumis melo* L. in order to enhance resistant against fungal pathogen. Abureyhan Campus, University of Tehran. Iran. (In Persian with English abstract).
19. Niedz R. P., Smith S. S., Dunbar K. V., Stephens C. T., and Murakishi H. 1989. Factors affecting shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 18: 313–319.
20. Nunez-Palenius H. G., Gomez-Lim M., Ochoa-Alejo N., Grumet R., Lester G. and Cantliffe D. J. 2008. Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. Critical Reviews in Biotechnology, 28:13-55.
21. Pech J. C., Bernadac A., Bouzayen M., Latche A., Dogimont C. and Pitrat M. 2007. Melon. p. 209- 240. In Pua E. C., and Davey M. R. (eds). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60 Transgenic Crops V. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
22. Salehi R. and Kashi A. 2010. Leaf gas exchanges and mineral ion composition in xylem sap of Iranian melon affected by rootstocks and training methods. Horticulture Science, 45: 766-770.
23. Singh M. N., Misra A. K., and Bhatnagar S. P. 1996. In vitro production of plants from cotyledon explants of *Cucumis melo* L. and their successful transfer to field. Phytomorphology, 46: 395–402.
24. Sobhani A., Bashtini A., Rafezi R., Heydarpoor A., and Gharib M. A. 2015. Khatooni93, A new cultivar of melon for cultivation in tropical and subtropical region. Research Achievements for fields and horticulture crops, 4(1): 117-126. (In Persian with English abstract).
25. Souza F. V. D., Garcia-sogo B., Souza A. S., San-Juan A. P., and Moreno V. 2006. Morphogenetic response of cotyledon and leaf explants melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49: 21-27.
26. Tabei Y., Kanno T., and Nishio T. 1991. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. Plant Cell Reports, 10: 225-229.
27. Yadav R. C., Salah M. T., and Grumet R. 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 207–214.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 1, Spring 2018, P. 13-22
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص.۲۲-۱۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Study the Effects of Explants and Hormonal Levels onDirect Regeneration in Melon *(Cucumismelo*L.*, cv. Khatooni*)

Z. Chenarani[1]- F. Shokouhifar[2]- M. Mamarabadi[3*]

Received: 06-07-2015
Accepted: 02-01-2018

Introduction: Iran is the third producer of Melon (*Cucumismelo* L.) after China and Turkey in the World.Melon is one of the main crops in Khorasan province in the term of cultivation area. The cultivar of *Khatooni*, among many varieties of melon, can be considered as a breeding cultivar because of its great qualitative traits including sweetness and flavor. This cultivar is also economically important and has many attractions for export. However, this cultivar is susceptible to some of plant diseases caused by different bacterial, viral and fungal pathogens which among them vascular wilt caused by *Fusariumoxysporum* f. sp. *melonis* (Leach &Currenu) Snyder & Hansen (FOM) is one of the most destructive soil-borne diseases in melon in Iran particularly in temperate and cold regions. The control of melon diseases has depended increasingly on the extensive use of toxic chemicals (pesticides). Many of these chemicals have been shown to be toxic to non-target microorganisms and animals and may be toxic to humans. Another problem with using chemicals to control plant pathogens is that a pathogen may become resistant to the chemicals.

The most promising control approaches are included conventional breeding and genetic engineering of disease-resistant plants. However, the conventional breeding method of melon is very complicated therefore; genetic engineering could be an effective and quick tool for producing new cultivars. *In vitro* direct regeneration is one of the most crucial step in gene transferring programs (20). In the present study, the effects of explant type and medium were considered in order to optimize the regeneration condition for melon (*cv. Khatooni*).

Material and Methods: The *Khatooni*cv.was provided by the Seed Bank of Plant Sciences Research Center from Ferdowsi University of Mashhad. The seeds were disinfected by NaClO in 1 % concentration, washed three times by distilled water and cultivated on MS medium (Murashigo and Skoog) for germination. The explant types were; lateral buds of cotyledon and the true leaves and hypocotyls. The selected media were: M1(0.1 $mg.l^{-1}$ BAP (6-Benzyl amino purine)), M2 (0.25 $mg.l^{-1}$ BAP), M3 (0.5 $mg.l^{-1}$ BAP), M4 (0.75 $mg.l^{-1}$ BAP),M5 (1 $mg.l^{-1}$ BAP)and M6(including 0.5 $mg.l^{-1}$ BAP and 0.01 $mg.l^{-1}$ NAA (1-Naphthalene acetic acid))The experiment was repeated three times. The experimental –was conducted factorial based on completely randomized design and statistical analysis was performed using the SAS and JMP software. The corresponded graphs were drawn by Microsoft excel 2007.

Results and Discussion: The greatest amount of shoot regeneration in cotyledons was observed in M5 with 1 $mg.l^{-1}$ BAP while minimum shoot regeneration was observed in M1with 0.1 $mg.l^{-1}$ BAP. Cotyledon leaves showed the best regeneration efficiency among the other evaluated explants as it has also been reported by many other researchers (12, 8, 20, 21, and 2). The observations showed that in all BAP concentration, hypocotyls only formed callus tissue and did not produce any stem. In all three explants (true leaves, cotyledon and hypocotyls) rooting was observed in a treatment combination including 0.5 $mg.l^{-1}$BAP and 0.01 $mg.l^{-1}$ NAA 20 days after cultivation while no stem was formed at the same time. In three weeks after exposure , a weak root system was formed on the rooting mediumin without hormonetreatment . In MS medium enriched with 0.01 and 0.05 $mg.l^{-1}$ NAA an appropriate root system was formed after 8 to 10 days. The medium containing 0.01$mg.l^{-1}$ NAA was more appropriate for root regeneration (rooting).

Conclusion: Many studies have been shown that, the manipulation of different phytohormones ratio such as auxin and cytokinin in cultural medium is a suitable strategy to manage differentiation and organogenesis programs in plant (9). In the present study, the effects of explant type and medium were investigated in order to

1- Master of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2- Assistant Professor in Molecular Genetics, Plant Sciences Research Center, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Assistant Professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: mamarabadi@um.ac.ir)

optimize the regeneration condition for melon (*cv. Khatooni*). As a result, in all BAP concentration, hypocotyls only formed callus tissue and did not produce any stem. However, by increasing of BAP hormone concentration in the cultivated media, shoot regeneration will also increase. The result of our study showed that, cotyledon leaves were more effective on shoot regeneration compared to the true leaves and hypocotyls as it has also been reported by other researchers.

Keywords: BAP, Cotyledon, Hypocotyl, Real leaf