مقاله پژوهشی، صفحات۱۹۸-۱۸۳

القاء نوساقه‌زایی درون شیشه‌ای در خربزه (*Cucumis melo* L.)

ولی فرضی‌فرد کامبلاش[۱]، احمد معینی[۱*]، راحله کریمی آشتیانی[۲*] و محمد صادق ثابت[۱]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، پردیس کشاورزی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی**

[۲] **ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، پردیس کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

چکیده

توانایی باززایی گیاه یکی از مراحل اصلی دستورزی‌های ژنتیکی گیاهان است، به طوری که تولید گیاهان تراریخت بدون داشتن یک دستورالعمل مناسب باززایی امکان‌پذیر نیست. در این تحقیق، اثرات سن ریزنمونه (لپه‌ای) و ترکیب هورمونی روی باززایی نوساقه در خربزه رقم Minoo 095p بررسی شدند. برای این منظور، ابتدا بذرهای بدون پوسته سترون شده و سپس در محیط کشت جامد MS ½ رشد داده شدند. از لپه دانه رست‌های دو، چهار و هشت روزه برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. همه ریزنمونه‌ها در ترکیب هورمونی مبتنی بر BAP (۶- بنزیل آمینو پورین) با چهار سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۱ $mg\ l^{-1}$) و IAA (ایندول-۳-استیک اسید) با دو سطح (۰ و ۰/۰۱ $mg\ l^{-1}$) کشت شدند. صفات تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه بعد از شش هفته بررسی شدند. نتایج نشان داد که اثر متقابل سن لپه و ترکیب هورمونی، تاثیر معنی‌داری روی صفات تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه داشت. همچنین مقایسه میانگین نشان داد که ترکیب تیماری K3 (کشت ریزنمونه دو روزه در ترکیب هورمونی BAP ۰/۵ $mg\ l^{-1}$ و IAA ۰/۰۱ $mg\ l^{-1}$) بهترین نتیجه را برای صفات تعداد پریموردیوم نوساقه (۶/۲ پریموردیوم در هر ریزنمونه) و تعداد نوساقه (۳/۸۷ نوساقه در هر ریزنمونه) داشت. نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند گام موثری در راستای دست‌ورزی ژنتیکی خربزه رقم Minoo 095p باشد.

واژه‌های کلیدی: ۶-بنزیل آمینو پورین، ایندول-۳-استیک اسید، باززایی گیاه، پریموردیوم نوساقه، ریزنمونه لپه‌ای

* نویسندگان مسئول، پست الکترونیکی: moieni_a@modares.ac.ir و r.karimi@modares.ac.ir

مقدمه

کدوییان (Cucurbitaceae) شامل ۱۱۸ جنس و ۸۲۵ گونه است که عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری پراکنده می‌باشند (۱۴ و ۲۵). گیاهان تیره مذکور از نظر ریخت‌شناسی مشابه یکدیگر بوده که می‌تواند بیانگر قرابت‌های ژنتیکی بین گیاهان این تیره باشد (۱۸). برخی از با ارزش‌ترین محصولات جهان از جمله ملون (*Cucumis melo* L.)، خیار (*Cucumis sativus* L.)، هندوانه (*Citrullus lanatus* Thunb) و انواع کدوها (zucchini) به این تیره تعلق دارند.

ملون (خربزه، طالبی، گرمک، دستنبو) گیاهی یک‌ساله، دگرگشن (Cross-pollinated) و دیپلوئید بوده و دارای ۲۷۴۲۷ ژن می‌باشد (۱۰). این گونه داری دو زیرگونه melo (*Cucumis melo* subsp. melo) و agrestis (*Cucumis melo* subsp. agrestis) و شامل ۱۹ گروه است (۲۱). بیشتر ارقام تجاری ملون در ایران به دو گروه Inodorus و Cantalupensis تعلق دارند (۱۹). ملون دارای سه نوع گل شامل گل نر، گل ماده و گل کامل بوده که هر سه نوع ممکن است روی یک گیاه وجود داشته باشند. ملون‌های ایرانی به نوع andromonoecious تعلق داشته به این معنی که در آن‌ها گل نر و گل کامل روی یک بوته قرار دارند.. منشأ ملون آفریقا است و امروزه اجداد وحشی

این گیاه هنوز در همان قاره حضور دارند (۱۵). ترکیه، آسیای جنوب غربی و استرالیا مراکز تنوع ثانویه این گیاه هستند (۲۴). در سال ۱۳۹۹، سطح زیر کشت ملون و میزان تولید آن در ایران به ترتیب برابر با ۷۰۰۰۰ هکتار و ۱/۷۱ میلیون تن بوده است (۳).

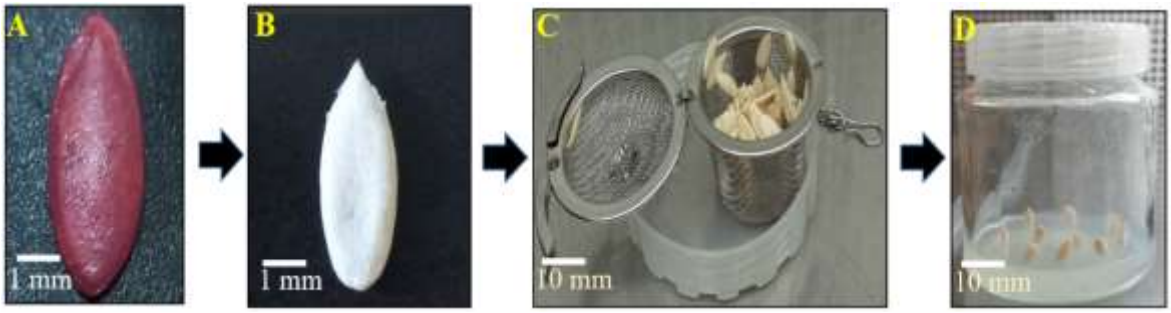
ملون علاوه بر اهمیت کشاورزی، به دلیل مدت زمان کوتاه تولید و تنوع فنوتیپی بسیار بالا به ویژه در خصوصیات میوه (از جمله اندازه، رنگ، شکل، طعم و بافت)، یک گونه مناسب برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی محسوب می‌شود (۹ و ۳۰). از طرف دیگر، افزایش تقاضا برای این محصول مستلزم بهبود ویژگی‌هایی از جمله مقاومت به آفات و بیماری‌های گیاهی، رسیدگی هم‌زمان میوه، زودرسی و درصد قند بالا در میوه است. دستیابی به صفات مذکور از طریق روش‌های مختلف اصلاحی مانند روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات و همچنین مهندسی ژنتیک امکان‌پذیر است. استفاده از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و بین‌جنسی به منظور افزایش تنوع ژنتیکی و بهره‌وری از آن در اصلاح کلاسیک ملون، محدودیت‌های زیادی دارد (۲۰). مهندسی ژنتیک می‌تواند برای تولید سریع و کارآمد ویژگی‌های ذکر شده مورد استفاده قرار گیرد. بهره‌برداری از روش‌های دستورزی ژنتیکی نیازمند توانایی باززایی گیاهان از ریزنمونه‌های تلقیح شده که این مهم با استفاده از فنون کشت بافت امکان‌پذیر است.

یکی از موانع استفاده از ملون به عنوان گیاه مدل برای مطالعات ژنتیکی، فقدان روش‌های باززایی کارآمد و پایدار گیاه است (۲۷). کارایی باززایی در ملون به میزان زیادی تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ، منبع ریزنمونه، عامل ژلی محیط کشت، نوع هورمون و غلظت آن‌ها است (۲۸). با افزودن تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، سلول‌های سوماتیک دوباره برنامه‌ریزی کرده و بافت‌ها و اندام‌های جدید را به وجود می‌آورند. تغییر نسبت سیتوکینین به اکسین خارجی می‌تواند به نفع یک الگوی رشدی (ریشه‌زایی، نوساقه‌زایی و کالوس‌زایی) باشد. هورمون سیتوکینین BAP (6-benzylaminopurine) و اکسین IAA (Indole-3-acetic acid) رایج‌ترین ترکیب هورمونی مورد استفاده در باززایی ملون بوده‌اند (۸ و ۱۲). در این بررسی‌ها، سطح بهینه نوساقه‌زایی در حضور BAP $mg\ l^{-1}$ ۰/۵ و IAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۰۱ به‌دست آمد. باززایی نوساقه از ریزنمونه‌های لپه، هیپوکوتیل، پروتوپلاست و ریشه یا برگ در طیف وسیعی از گونه‌های ملون گزارش شده است (۲، ۶، ۷، ۱۲، ۱۵، ۲۷ و ۳۳). معمولاً در مطالعات باززایی و انتقال ژن در ملون از ریزنمونه‌های لپه‌ای استفاده می‌کنند (۸ و ۱۲). با این حال، نرخ باززایی نوساقه در ملون پایین بوده که نیازمند بهینه‌سازی است. علاوه بر نرخ پایین باززایی نوساقه، ایجاد گیاهان تتراپلوییید از باززایی ریزنمونه‌های دیپلوییید، باززایی گیاهان غیرتراریخت به دلیل پدیده فرار و ایجاد تنوع سوماکلونال از مهم‌ترین عوامل محدودکننده دستورزی ژنتیکی ملون هستند (۵، ۱۱، ۲۱ و ۲۳). جهت بهینه‌سازی باززایی در ملون، استفاده از ریزنمونه لپه‌ای (ترجیحا قسمت پایین لپه) در سنین پایین و ترکیب هورمونی BAP و IAA پیشنهاد شده است (۵، ۸ و ۱۲). پژوهش حاضر، با هدف بررسی اثرات سن ریزنمونه لپه‌ای و ترکیب هورمونی روی بهینه‌سازی نوساقه‌زایی در گیاه خربزه رقم Minoo 095p، انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه: در این تحقیق، از بذور خربزه رقم Minoo 095p (*Cucumis melo* subsp. melo Group inodorus var.) تهیه شده از شرکت زیست فناور سبز، استفاده شد (شکل ۱، A). ابتدا پوسته بذر حذف شده (شکل ۱، B) و سپس بذور بدون پوسته در شرایط لامینار ایرفلو سترون شدند. برای سترون کردن، ابتدا از الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سه مرحله آبشویی با آب مقطر سترون و سپس از محلول وایتکس (هیپوکلریت سدیم) ۲۰٪ (حجمی/حجمی) به مدت ۱۰ دقیقه و چهار

مرتبه آبشویی استفاده شد (شکل ۱، C). بذور بدون پوسته در محیط کشت MS ½ (۱۶) حاوی ۱۵ g l^{-1} شکر و ۷ g l^{-1} آگار-آگار کشت شدند (شکل ۱، D). تمام محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس با فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. pH محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو، روی ۵/۷ تنظیم شد. کشت‌ها در اتاق رشد کنترل شده با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس کشت‌ها تا روز هشتم به شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.



شکل ۱. مراحل آماده‌سازی بذور، سترون کردن و رشد در محیط کشت MS ½ جهت تهیه ریزنمونه لپه‌ای. A) بذر کامل، B) بذر بدون پوسته، C) ضدعفونی کردن بذور بدون پوسته، D) کشت بذرها در محیط کشت MS ½

کشت ریزنمونه‌ها: در مرحله اول آزمایش، از ریزنمونه‌های لپه‌ای دو روزه، در مرحله دوم از لپه‌هایی با سن چهار روز و در مرحله سوم از لپه‌هایی با سن هشت روز استفاده شد (شکل ۲، A-C). برای تهیه ریزنمونه‌های لپه‌ای، ابتدا اطراف لپه‌ها با استفاده از تیغ مخصوص (اسکالپل) بریده و سپس یک سوم ابتدای برگ لپه‌ای (بخش I) به عنوان ریزنمونه استفاده شد. در هر سه سن لپه، لپه‌ها از هم جدا بوده و از هر بذر دو ریزنمونه از یک سوم بخش ابتدای هر لپه تهیه شد. ریزنمونه‌ها در ۱۲ ترکیب تیماری (جدول ۱) در محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ g l^{-1} شکر، ۷ g l^{-1} آگار-آگار با pH =۵/۷ کشت شده و سپس در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. زیرکشت کردن ریزنمونه‌ها به فواصل هر دو هفته در محیط کشت جدید با همان ترکیب تیماری انجام شد. در هر ظرف شیشه مربا (به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر، با قطر ۹ و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر) و حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، پنج ریزنمونه کشت شدند.

صفات مورد مطالعه: بعد از شش هفته از زمان کشت، داده‌برداری برای دو صفت تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه‌ها در هر ریزنمونه انجام شد. پریموردیوم، گروهی از سلول‌ها با سازمان خاصی که قادر به تولید کل اندام می‌باشد. منشاء پریموردیوم نوساقه از مریستم انتهای ساقه بوده و اندازه آن ۳-۱ میلی‌متر است (۱۷). نوساقه‌هایی که در اندازه ۵ میلی‌متر و بیشتر بودند، از ریزنمونه مادری جدا شده و در محیط کشت جامد E20A (۲۷) جهت تکثیر و ریشه‌دار شدن کشت شدند (شکل ۲، G). برای سازگاری گیاهان ریشه‌دار شده، پس از شستشو و حذف آگار اضافی از روی ریشه، آنها را به گلدان‌های پلاستیکی شماره ۱۰ حاوی پرلیت-پیت ماس (۱:۱) انتقال داده و جهت حفظ رطوبت با پلاستیک شفاف پوشانده شدند. رطوبت گیاهچه‌ها به تدریج در طی دو هفته به شرایط محیطی رسانده شد. (شکل ۲، I).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) حاصل از بررسی نوساقه‌زایی مستقیم در

آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور سن ریزنمونه در سه سطح (دو، چهار و هشت روزه) و ترکیب هورمونی BAP و IAA در چهار سطح در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. هر ظرف کشت (شیشه مربا) حاوی پنج عدد ریزنمونه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمـون LSD در سطح احتمال معنی داری ۱٪ مقایسه شدند.

نتایج

کشت ریزنمونه و نوساقه‌زایی: در این تحقیق اثر ترکیب هورمونی مبتنی بر BAP و IAA روی نوساقه‌زایی ریزنمونه‌های لپه‌ای دو، چهار و هشت روزه بررسی شد (جدول ۱، شکل ۲). ظهور پریموردیوم‌های نوساقه از هفته سوم تا چهارم صورت گرفت (شکل ۱، D). نوساقه‌ها بعد از چهار هفته از زمان کشت در محیط باززایی القاء شدند (شکل ۲، E و F).

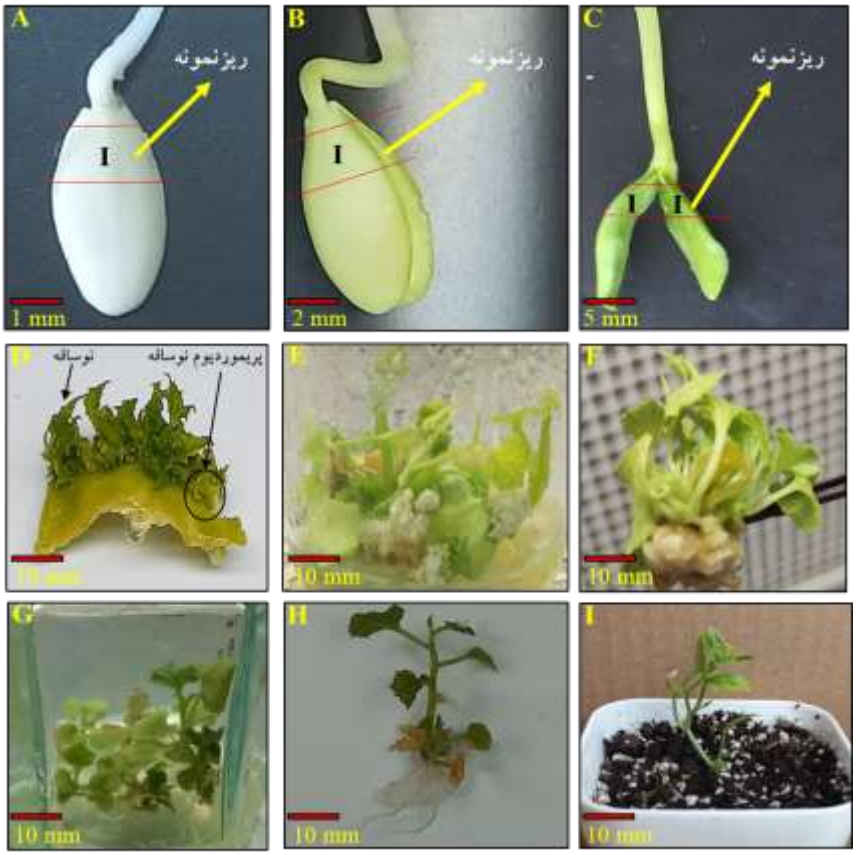
نوساقه‌های القاء شده جهت تکثیر و ریشه‌دار شدن از ریزنمونه مادری با کمک اسکالپل جدا شده و در محیط کشت E20A کشت شدند (شکل ۲، F و G). بعد از دو هفته از زمان کشت در محیط E20A، نوساقه‌ها ریشه دار شدند (شکل ۲، H) و سازگاری گیاهچه ها در بستر پرلیت-پیت‌ماس (۱:۱) به طور موفقیت‌آمیزی انجام شد (شکل ۱، I).

جدول ۱. ترکیب‌های تیماری مورد استفاده در بررسی نوساقه‌زایی در ریزنمونه لپه‌ای خربزه رقم Minoo 095p

کد	سن لپه (روز)	BAP (mg l^{-1})	IAA (mg l^{-1})
K1	۲	۰ /۰۰	۰/۰۰
K2		۰/۲۵	۰/۰۱
K3		۰/۵۰	۰/۰۱
K4		۱/۰۰	۰/۰۱
K5	۴	۰ /۰۰	۰/۰۰
K6		۰/۲۵	۰/۰۱
K7		۰/۵۰	۰/۰۱
K8		۱/۰۰	۰/۰۱
K9	۸	۰ /۰۰	۰/۰۰
K10		۰/۲۵	۰/۰۱
K11		۰/۵۰	۰/۰۱
K12		۱/۰۰	۰/۰۱

تجزیه آماری داده‌ها: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سن ریزنمونه لپه‌ای و ترکیب هورمونی، تاثیر معنی‌داری (در سطح ۱٪) روی صفات تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه داشت (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین تعداد پریموردیوم نوساقه نشان داد که ترکیب تیماری K3 (اثر ترکیب هورمونی BAP mg l^{-1} ۰/۵ و IAA mg l^{-1} ۰/۰۱ با ریزنمونه لپه‌ای دو روزه) بیشترین تعداد پریموردیوم نوساقه (۶/۲ پریموردیوم در هر ریزنمونه) را القاء کرد و اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیب‌های تیماری مورد بررسی نشان داد (شکل ۳). کمترین تعداد پریموردیوم نوساقه مربوط به ترکیب‌های تیماری K1، K5 و K9 بود که هیچگونه پریموردیوم نوساقه تولید نکردند (شکل ۳).



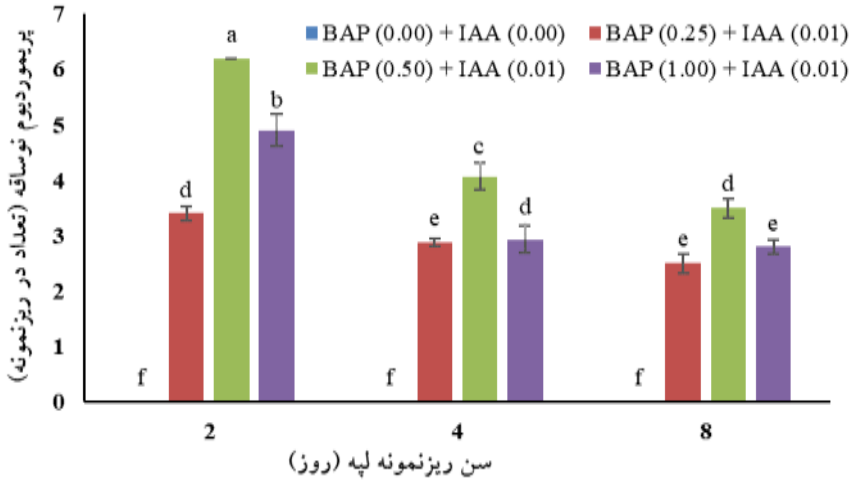
شکل ۲. مراحل تهیه و کشت ریزنمونه لپه‌ای در ۱۲ ترکیب تیماری تا سازگاری گیاهچه‌های به دست آمده در خربزه رقم Minoo 095p. A) لپه دو روزه، B) لپه چهار روزه، C) لپه هشت روزه، D) ظهور پریموردیوم نوساقه (چهار هفته بعد از کشت)، E) رشد پریموردیوم نوساقه و باززایی نوساقه (شش هفته بعد از کشت)، F) نوساقه‌های بدست آمده (شش هفته بعد از کشت)، G) کشت نوساقه‌ها در محیط کشت E20A جامد (هفت هفته بعد از کشت)، H) نوساقه ریشه‌دار (هشت هفته بعد از کشت) و I) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سازگار شده (ده هفته بعد از کشت).

جدول ۲. تجزیه واریانس برای صفات تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه‌ها در بررسی نوساقه‌زایی مستقیم در خربزه رقم Minoo 095p

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد پریموردیوم نوساقه	تعداد نوساقه
سن ریزنمونه لپه‌ای (A)	۲	۶/۸۸**	۲/۶۵**
ترکیب هورمونی (B)	۳	۳۴/۸۱**	۱۴/۰۵**
اثر متقابل (AB)	۶	۱/۳۲**	۰/۵۴**
خطا	۲۴	۰/۰۷	۰/۳۵
C.V. (%)	-	۹/۷۴	۱۱/۴۵

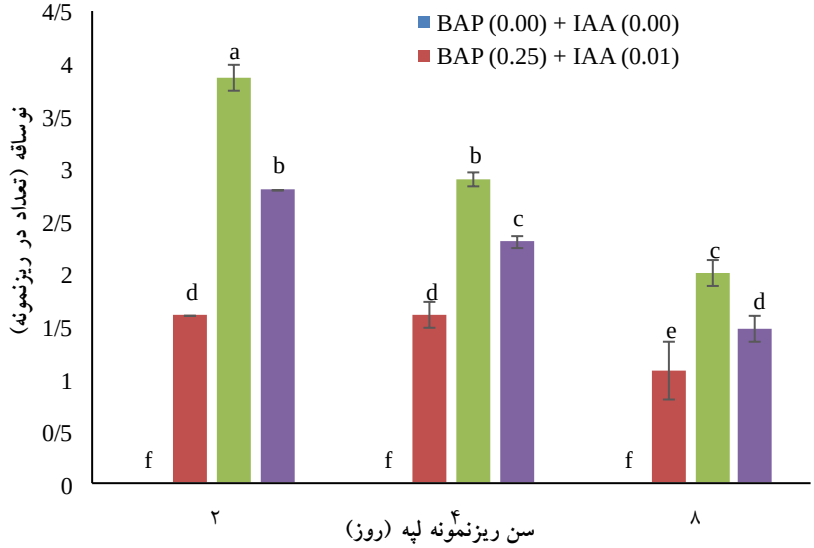
** معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

بیش‌ترین تعداد پریموردیوم نوساقه در همه سنین ریزنمونه در حضور ۰/۵ mg l^{-1} BAP و ۰/۰۱ mg l^{-1} IAA به دست آمد و با کاهش و افزایش غلظت ترکیب هورمونی، این تعداد کاهش یافت. همچنین، با افزایش سن لپه، تعداد پریموردیوم نوساقه کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار مقایسه میانگین صفت تعداد پریموردیوم نوساقه در هر ریزنمونه در بررسی نوساقه‌زایی مستقیم در خربزه رقم Minoo 095p.- میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ همان ستون ندارند.

نتایج مقایسه میانگین تعداد نوساقه نیز نشان داد که ترکیب تیماری K3 (اثر ترکیب هورمونی ۰/۵ mg l^{-1} BAP و ۰/۰۱ mg l^{-1} IAA با ریزنمونه لپه‌ای دو روزه) بیشترین تعداد نوساقه (۳/۸۷ نوساقه در هر ریزنمونه) را القاء کرد و اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیب‌های تیماری مورد بررسی داشت (شکل ۴). همچنین، بیشترین تعداد نوساقه در حضور ۰/۵ mg l^{-1} BAP و ۰/۰۱ mg l^{-1} IAA به دست آمد و با کاهش و افزایش غلظت ترکیب هورمونی، تعداد نوساقه کاهش یافت. از طرف دیگر، با افزایش سن ریزنمونه لپه‌ای تعداد نوساقه کاهش یافت (شکل ۴). کم ترین تعداد نوساقه مربوط به ترکیب‌های تیماری K1، K5 و K9 بود که هیچگونه نوساقه‌ای تولید نکردند (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه میانگین صفت تعداد نوساقه در هر ریزنمونه در بررسی نوساقه‌زایی مستقیم در خربزه رقم Minoo 095p.- میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ همان ستون ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، عوامل مختلف کشت بافتی از جمله محیط کشت پایه، سن گیاه مادری، موقعیت منبع ریزنمونه روی گیاه، جهت قرار گرفتن ریزنمونه روی محیط کشت، تراکم ریزنمونه در هر ظرف کشت نقش مهمی در توانایی باززایی نوساقه دارند. با این حال، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مهم‌ترین عامل موثر بر ظرفیت باززایی نوساقه در ریزنمونه‌های مختلف بوده و تمایززدایی و تمایززایی را در مطالعات کشت بافت گیاهی کنترل می‌کنند (۱۳). براساس نتایج به دست آمده از آزمایش‌های مقدماتی نویسندگان، ترکیب هورمونی BAP با IAA موثرترین ترکیب هورمونی قابل استفاده جهت باززایی مستقیم نوساقه در ملون بود (نتایج نشان داده نشده‌اند). این ترکیب هورمونی، در گزارش های قبلی در خصوص باززایی ملون استفاده شده است (۲، ۸ و ۱۲). لذا براساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی و نیز بررسی منابع، در این تحقیق از سطوح مختلف ترکیب هورمون‌های مذکور در سه سن لپه استفاده گردید. نتایج نشان داد که ترکیب هورمونی K3، بیشترین تعداد پریموردیوم نوساقه و تعداد نوساقه را القاء کرده است که با نتایج سایر پژوهشگران تطابق داشت (۸ و ۱۲). با این وجود، در آزمایشی، Zhang و همکاران (۲۰۱۱) دستیابی به بالاترین میزان القاء نوساقه در ملون را با استفاده از ۱/۵ mg l^{-1} BAP و mg l^{-1} IAA ۰/۱ گزارش کردند (۳۴). کارایی نوساقه‌زایی به ژنوتیپ وابسته است، چنانچه نتایج آزمایش بررسی نوساقه‌زایی از ریزنمونه لپه‌ای، در ارقام طالبی سمسوری و ملون جانا، نشان داد که سطح غلظت بهینه هورمون BAP برای ارقام مذکور به ترتیب ۱ mg l^{-1} و ۰/۵ mg l^{-1} بود (نتایج نشان داده نشده است). در تحقیقی، اثرات سه نوع محیط کشت A) ۱ mg l^{-1} BAP)، B) ۰/۰۱ mg l^{-1} IAA و mg l^{-1} BAP) و C) ۰/۰۱۲ mg l^{-1} IAA و ۱/۲ mg l^{-1} BAP) و ۰/۰۱۳ mg l^{-1} IAA) روی نوساقه‌زایی لپه‌های شش روزه سه رقم (Charenteis-T، Vedrantais و Isabelle) و سه لاین دابلد هاپلوییید (NAD، DH-L2 و DH-L6) در ملون بررسی شد (۲۸). این نتایج نیز نشان داد که نرخ باززایی بین ژنوتیپ های مختلف ملون متفاوت بوده ، به طوری که رقم Charentais-T بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را در محیط کشت‌های B و A (به ترتیب ۴/۴ و ۴/۱) تولید کرده، درحالی که رقم Vedrantais بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه (۲/۴) را در محیط کشت C تولید کرده است که قابل مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق (۳/۸۷ نوساقه در هر ریزنمونه) بود. به طور کلی، نرخ باززایی در گروه *inodorus* و*Cantalupensis* نسب به سایر گروه‌های ملون از جمله *reticulatus* پایین‌تر گزارش شده است (۴ و ۲۰).

علاوه بر ژنوتیپ، دو عامل نوع و سن ریزنمونه نیز در کارایی باززایی نوساقه در ملون تأثیر می‌گذارد. در آزمایش مقدماتی انجام گرفته در پژوهش حاضر (نتایج نشان داده نشده‌اند)، اثرات قسمت‌های مختلف لپه و برگ و نیز سن آن‌ها روی باززایی مستقیم نوساقه بررسی شدند. نتایج نشان داد که ریزنمونه لپه‌ای در سنین پایین‌تر (۶-۱ روزه)، بیشترین تعداد نوساقه را القاء می‌کند. ریزنمونه‌های برگی قدرت باززایی مستقیم کمی دارند و می‌توان از روش غیر مستقیم اقدام به باززایی گیاه در آن ها کرد، اگرچه در بررسی‌های انجام شده، باززایی غیرمستقیم نوساقه باعث ایجاد گیاهان تتراپلوییید از ریزنمونه دیپلوییید شده است (۱، ۵، ۱۲، ۲۰ و ۲۳). در تحقیق دیگری، Almodóvar و همکاران (۲۰۱۷)، سطح بهینه نوساقه‌زایی را از ریزنمونه‌های لپه‌ای دو و سه روزه در ملون به دست آوردند (۸). همچنین در گزارشی که توسط Souza و همکاران (۲۰۰۶) منتشر شده، اثرات ریزنمونه‌های مختلف و سن ریزنمونه در ملون مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این مطالعه نیز نشان داد ریزنمونه لپه‌ای در سن هفت روزه بیش ترین پاسخ به اندام‌زایی را در مقایسه با سنین ۱، ۳ و ۵ روزه داشته است که مخالف با یافته‌های تحقیق حاضر

است، اگرچه غلظت ترکیب هورمونی مورد استفاده در این تحقیق (۱ mg l^{-1} BAP و ۱/۵ mg l^{-1} IAA) متفاوت بود. همچنین، این محققین گزارش کردند که ریزنمونه‌های لپه‌ای قدرت باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه های برگی دارند (۲۹). اثر نوع برش ریزنمونه (طولی یا عرضی) در ملون در تحقیقات و آزمایش‌های مقدماتی نویسندگان (تحقیق حاضر) نیز مورد بررسی قرار گرفته بود و مشخص شد که برش عرضی ریزنمونه لپه منجر به القای بیشترین نرخ باززایی نوساقه شده است (بخش I در شکل ۱، A-C) که در تطابق با یافته‌های سایر محققین (۵، ۸، ۲۹ و ۳۱) بود. دلیل استفاده از قسمت پایین لپه به عنوان ریزنمونه، پتانسیل بالای نوساقه‌زایی این قسمت از لپه است. این بخش از لپه دارای بیشترین میزان اکسین داخلی می‌باشد (۳۲).

به طور کلی، اثر متقابل ترکیب هورمونی ۰/۵ mg l^{-1} BAP و ۰/۰۱ mg l^{-1} IAA با سن ریزنمونه لپه‌ای دو روزه، بیشترین نرخ باززایی نوساقه را در مقایسه با سایر غلظت‌های ترکیب هورمونی در سنین متفاوت ریزنمونه لپه‌ای مورد بررسی داشت. از دستورالعمل نوساقه‌زایی حاصل از این پژوهش می توان در برنامه‌های انتقال ژن در خربزه رقمMinoo 095p بهره برد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تربیت مدرس تهران در پردیس کشاورزی و حمایت‌های مالی آن انجام شده است. همچنین از تمام افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- شفائی، م.، مختاری، آ.، و ابراهیمی، ،. م، ۱۳۹۹. بررسی تأثیر نوع اکسین، جهت استقرار ریزنمونه و نور بر کالوس‌زایی و تشکیل ریشه مویین گیاه دارویی خربزه تلخ(*Momordica charantia*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۱ ، جلد، شماره ۳۳، صفحات ۱۰۶-۹۵.

۲- کبیر هاشمی، س، م.، قنبری، ع.، و کاشی، ع.، ۱۳۹۵. اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی گیاهچه از پینه دو رقم خربزه (*Cucumis melo* L.) ایرانی به روش درون شیشه‌ای مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۱، شماره ۲۹، صفحات ۱۶۸-۱۵۹.

3- https://www.maj.ir/page-amar/FA/65/form/pId3352

4- Chovelon, V., Restier, V., Giovinazzo, N., Dogimont, C. and Aarrouf, J. 2011. Histological study of organogenesis in *Cucumis melo* L. after genetic transformation: why is it difficult to obtain transgenic plants? Plant Cell Reports, 30(11): 2001-2011.

5- Curuk, S., Elman, C., Schlarman, E., Sagee, O., Shomer, I., Cetiner, S. and Gaba, V. 2002. A novel pathway for rapid shoot regeneration from the proximal zone of the inpocotyl of melon (*Cucumis melo* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 260-267.

6- Dirks, R. and van Buggenum, M. 1989. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. Plant Cell Reports, 7: 626-627.

7- Ficcadenti, N. and Rotino, G. L. 1995. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. Plant cell, tissue and organ culture, 40: 293-295.

8- García-Almodóvar, R. C., Gosalvez, B., Aranda, M. A. and Burgos, L. 2017. Production of transgenic diploid *Cucumis melo* plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 130: 323-333.

9- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M. and Puigdomènech, P. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(29): 11872-11877.

10- Guis, M., Amor, M. B., Latché, A., Pech, J. C. and Roustan, J. P. 2000. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. cantalupensis) leading to a majority of diploid regenerants. Scientia Horticulturae, 84(1-2): 91-99.

11- Guis, M., Roustan, J. P., Dogimont, C., Pitrat, M. and Pech, J. C. 1998. Melon biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 15(1): 289-312.

12- Hooghvorst, I., López-Cristoffanini, C. and Nogués, S. 2019. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon. Scientific Reports, 9(1): 1-7.

13- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular mechanisms of plant regeneration. Annual Review of Plant Biology, 70: 377-406.

14- Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. Botanical Journal of the Linnean society, 81(3): 233-247.

15- Kathal, R., Bhatnagar, S. P. and Bhojwani, S. S. 1994. Plant regeneration from the callus derived from root explants of Cucumis melo L. cv. Pusa sharbati. Plant Science, 96(1-2): 137-142.

16- Kerje, T. and Grum, M. 2000. The origin of melon, Cucumis melo: a review of the literature. In VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, 510: 37-44.

17- Mauseth, J. D. 2004. Giant shoot apical meristems in cacti have ordinary leaf primordia but altered phyllotaxy and shoot diameter. Annals of Botany, 94(1): 145-153.

18- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

19- Nimmakayala, P., Saminathan, T., Abburi, V. L., Yadav, L. K., Tomason, Y., Levi, A. and Reddy, U. K. 2017. Comparative genomics of the Cucurbitaceae. Genetics and Genomics of Cucurbitaceae, 229-240.

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(1): 13-55.

21- Pitrat, M. 2016. Disease resistance in melon and its modification by molecular breeding techniques. Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops, 175-197.

22- Raghami, M., López-Sesé, A. I., Hasandokht, M. R., Zamani, Z., Moghadam, M. R. F. and Kashi, A. 2014. Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. Plant Systematics and Evolution, 300: 139-151.

23- Ren, Y., Bang, H., Gould, J., Rathore, K. S., Patil, B. S. and Crosby, K. M. 2013. Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 49: 223-229.

24- Sari, N. and Solmaz, I. 2005. Fruit characterization of some Turkish melon genotypes. In III International Symposium on Cucurbits 731: 103-109.

25- Sauton, A. and Vaulx, R. D. 1987. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. Agronomie, 7(2): 141-148.

26- Schaefer, H. and Renner, S. S. 2011. Cucurbitaceae. In: Kubitzki K, ed. Families and genera of flowering plants, vol. 10. Berlin, Germany: Springer Verlag, 112–174.

27- Sebastiani, M. S. and Ficcadenti, N. 2013. An efficient protocol for in vitro plant regeneration from cotyledon explants of different melon genotypes (*Cucumis melo* L. var. cantalupensis). In Abstract book: Young Researches in Life Science (YRLS) conference, Paris, May (pp. 22-24).

28- Sebastiani, M. S. and Ficcadenti, N. 2016. In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. cantalupensis and genetic stability evaluation using RAPD analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 124: 69-79.

29- Souza, F. V. D., Garcia-Sogo, B., Souza, A. D. S., San-Juán, A. P. and Moreno, V. 2006. Morphogenetic response of cotyledon and leaf explants of melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49: 21-27.

30- Tekdal, D. and Cetiner, S. 2013. The effects of different combinations and varying concentrations of growth regulators on the regeneration of selected Turkish cultivars of melon. Current Progress in Biological Research. InTech, 257-276.

31- Wu, H. W., Yu, T. A., Raja, J. A., Wang, H. C. and Yeh, S. D. 2009. Generation of transgenic oriental melon resistant to Zucchini yellow mosaic virus by an improved cotyledon-cutting method. Plant Cell Reports, 28: 1053-1064.

32- Xi, Y., Yang, Y., Yang, J., Zhang, X., Pan, Y. and Guo, H. 2021. IAA3-mediated repression of PIF proteins coordinates light and auxin signaling in *Arabidopsis*. PLoS Genetics, 17(2): e1009384.

33- Yadav, R. C., Saleh, M. T. and Grumet, R. 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 207-214.

34- Zhang, H., Peng, G. and Feishi, L. 2011. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L. African Journal of Biotechnology, 10(35): 6757-6761.

مقاله پژوهشی، صفحات۱۹۸-۱۸۳

In Vitro Shoot Induction in Persian melon (*Cucumis melo* L.)

Farzifard-Kambekash V.[1], Moieni A.[1], Karimi Ashtiani R.[2] and Sabet M.S.[1]

[1] Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Plant regeneration is one of the main stages of genetic manipulation, so that the production of transgenic plant is impossible without optimizing shoot regeneration protocol. In the present survey, the effects of the explant age (cotyledon) and hormone combination on shoot regeneration in Persian melon var. Minoo 095p were investigated. For this purpose, decoated seeds were surface sterilized and cultured in half strength of MS medium. Two-, four- and eight-days old cotyledons were used for explant preparation. All cotyledonary explants were cultured in hormonal combinations of BAP (6-benzylaminopurine) with four levels (0, 0.25, 0.50, and 1.00 mg l^{-1}) and IAA (indole-3-acetic acid) with two levels (0 and 0.01 mg l^{-1}). The number of shoot primordia and shoots was evaluated after 6 weeks. The results showed that, the interaction of cotyledon age and hormone combination was significant on the number of shoot primordia and shoots. Besides, the mean comparison showed that, the combination treatment K3 (two-days old cotyledonary explants cultured in a hormone combination of 0.5 mg l^{-1} BAP and 0.01 mg l^{-1} IAA) was the most effective treatment for shoot primordium (6.2 primordia per explant) and shoot regeneration (3.87 shoots per explant). The obtained results can be used in the genetic manipulation programs of Persian melon.

Keywords: 6-Benzylaminopurine, Cotyledonary explant, Indole-3-acetic acid, Plant regeneration, Shoot primordium.