اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی گیاهچه از پینه دو رقم خربزه (*Cucumis melo* L.) ایرانی به روش درون شیشه‌ای

سیده مهدیه کبیرهاشمی[۱]، علیرضا قنبری[۲*] و عبدالکریم کاشی[۱و۳]

[۱] کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه علوم باغبانی

[۲] اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه علوم باغبانی

[۳] کرج، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۵

چکیده

خربزه یکی از گونه‌های مهم خانواده کدوئیان است که نسبت به سایر گونه‌های این خانواده، در زمینه انتقال ژن و مطالعه باززایی در شرایط درون شیشه‌ای بیشتر استفاده می‌شود. در این پژوهش نحوه تولید پینه و بعد باززایی گیاهچه‌ها، در دو رقم خربزه ایرانی شامل ایوانکی و زردجلالی مورد مطالعه قرار گرفت. ریزنمونه‌هایی از لپه‌های دو رقم تهیه و در محیط‌های القای پینه‌زایی که شامل محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) (۱۹۶۲) با ترکیب‌های مختلفی از اسید ایندول استیک (IAA) و بنزیل آدنین (BA) بودند، کشت شدند. یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها، از پینه‌های تولید شده ریخت‌زا (مورفوژن) برای باززایی استفاده شد. حدود یک گرم از پینه‌های ریخت‌زا به محیط‌های باززایی شامل محیط MS با سه غلظت BA (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت IAA (۰-۰/۰۵-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. دو ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها، درصد باززایی در محیط‌های مختلف کشت ارزیابی شد. نتایج نشان داد که اثرات عوامل مختلف از جمله: نوع رقم، غلظت‌های IAA و BA و اثرات متقابل آنها در سطح ۱٪ برای باززایی پینه‌ها معنی‌دار می‌باشند. مستقل از نوع و غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد، رقم ایوانکی با میانگین ۴۰٪ نسبت به رقم زردجلالی با میانگین ۳۱٪، باززایی بهتری داشت. همچنین، بدون در نظر گرفتن نوع رقم، غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین ۷۰٪ بیشترین باززایی و بعد ترکیب (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA) با میانگین ۶۲٪ بهترین نتیجه را داد.

واژه‌های کلیدی: خربزه (*Cucumis melo* L.)، باززایی، پینه ریخت‌زا، IAA، BA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۴۷۹۲۳۳ ، پست الکترونیکی: ghanbari66@yahoo.com

مقدمه

خربزه (*Cucumis melo* L.) یکی از مهمترین محصولات اقتصادی تیره کدوئیان است. این محصول به بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی حساسیت زیادی دارد. یکی از مشکل اصلی تولید ملون‌ها در بسیاری از کشورهای تولیدکننده، آلودگی‌های ویروسی از جمله ویروس موزائیک خیار، ویروس موزائیک هندوانه، ویروس موزائیک زرد کدو و ویروس لکه حلقوی پاپایا می‌باشد و شته پنبه (*Aphis gossypii*) یکی از ناقلان مهم انتقال و پخش ویروس‌های کدوئیان است (۲۶). بنابراین، تکنیک‌های بیوتکنولوژی از جمله انتقال ژن برای استفاده از ژن‌های مقاوم به ویروس‌ها، در خربزه می‌تواند به عنوان یک روش اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. امروزه در برخی از گونه‌های تیره کدوئیان از جمله در کدوی مسمائی (*Cucurbita pepo* L.) (۳۱)؛ و خربزه (*Cucumis melo*

(.L (۷)، با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های جدید مقاوم به ویروس‌ها، اصلاح و بهبودی حاصل شده است. اصلاح ژنتیکی گیاهان از جمله ملون‌ها با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت و بیوتکنولوژی، پتانسیل خوبی را برای تولید میوه‌های با کیفیت بالا، میوه‌های بدون بذر، باززایی گیاهان جهش یافته بدنی (واریانت‌های سوماکلونال)، ایجاد ارقام مقاوم به تنش‌های محیطی و زیستی ایجاد کرده است (۳ و ۴).

باززایی شاخساره‌های نابجا در شرایط درون شیشه‌ای یکی از مشکل‌ترین مرحله مهندسی ژنتیک می‌باشد (۲۸). از طرفی، اندام‌زایی یک فرایندی است که در آن شاخساره‌های جدید در شرایط درون شیشه‌ای از طریق تقسیم سلولی و تمایزیابی بوجود می‌آید و به تدریج مریستم انتهایی جدید در شاخساره تولید و نهایتاً طویل شدن شاخساره اتفاق می‌افتد. فرایند انتقال ژن در گیاهان به مسیر باززایی از بافت‌های مختلف (غیرمستقیم، از طریق تولید پینه و مستقیم، از طریق بافت کشت شده) بستگی دارد (۸).

خربزه از گونه‌های مورد استفاده در مطالعه باززایی و انتقال ژن در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. شاخساره‌های خربزه در شرایط درون شیشه‌ای به طور مستقیم از لپه‌ها (۶، ۲۰) و برگ‌های معمولی خربزه (۱۳، ۳۲) و به طور غیرمستقیم از طریق پینه‌های حاصل از لپه‌ها (۲، ۱۸، ۱۹، ۲۲) و محور زیر لپه (هیپوکوتیل) (۱۲، ۱۸) به دست آمدند. همچنین، باززایی خربزه از طریق اندام‌زایی (۱، ۱۶، ۲۰، ۳۰) و جنین‌زایی سوماتیکی (۱، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۵، ۳۰) گزارش شده است. با وجود این، هنوز در باززایی گیاهان خربزه مشکلاتی وجود دارد که این مشکلات اساساً به نوع ژنوتیپ گیاه برمی‌گردد (۲۴).

Melara و همکاران (۲۰۰۹) روشی را برای اندام‌زایی شاخساره و باززایی از طریق پینه در ۷ ژنوتیپ از خربزه‌های منطقه کریولو (Criollo) با استفاده از ترکیب‌های مختلفی از مواد تنظیم کننده رشد بنزیل آمینوپورین (BAP) و IAA ارائه کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین باززایی شاخساره در ژنوتیپ EM-1 به ترتیب با ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و بعد یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به دست آمد. در ژنوتیپ‌های OSO-1، OSO-2 و OSO-3 بهترین نتیجه با ۰/۵ و یا یک میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. در ژنوتیپ PQRG-1 بیشترین میانگین شاخساره با استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به دست آمد. در ژنوتیپ‌های PQRG-2 و PQRG-3 اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد؛ با وجود این بهترین نتیجه با استفاده از ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با صفر و ۰/۵ حاصل شد (۱۷). ریخت‌زایی درون شیشه‌ای خربزه از طریق تولید جوانه‌های نابجا توسط Strip و همکاران (۲۰۰۱) مورد بررسی قرار گرفت و اندام‌زایی از قطعات لپه‌ها و برگ‌ها در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (۲۹).

Gaba و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که در طالبی رقم (*Galia var. reticulates*) نمو جوانه‌ها و شاخساره‌های نابجا ضعیف می‌باشد. این حالت غیر عادی می‌تواند واکنش این رقم را برای تولید گیاهچه کاهش دهد (۸). یک روش جدید باززایی مستقیم شاخساره از ناحیه نزدیک به هیپوکوتیل نیز در خربزه گزارش شده است (۴). در دو نوع هیبرید تریپلوئید هندوانه روشی برای ریزازدیادی درون شیشه‌ای با استفاده از دو نوع ریزنمونه‌ی لپه‌ای و نوک شاخساره‌ای در محیط‌های حاوی BA گزارش شده است. در این گزارش عنوان شده که اندام‌زایی شاخساره‌های نابجا در غلظت‌های مختلف BA اختلاف معنی‌داری نشان دادند (۲۷).

در یک رقم خربزه اسپانیایی، پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های لپه‌ای و هیپوکوتیلی در محیط‌هایی با

غلظت‌های مختلف اسید ایندول استیک و کینتین کشت شد تا پتانسیل رشد و ریخت‌زایی آنها بررسی گردد (۱۹). باززایی گیاهچه‌های دو رقم کدوی زمستانه (*Cucurbita maxima* Duch.) از طریق اندام‌زایی بررسی شد (۱۵). همچنین، اندام‌زایی غیرمستقیم در کدوی تابستانه (*Cucurbita pepo* L.) مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی و لپه‌ای استفاده شد. بیشترین درصد باززایی شاخساره‌ها (۸۵٪) و بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۶/۹۷) در هر کشت به دست آمد (۲۳).

بهترین مناطق برای تولید میوه با کیفیت در خربزه، مناطقی است که دارای آب و هوای گرم و خشک بوده و فصل رشد طولانی داشته باشد. در چنین شرایطی تنش‌های محیطی از جمله تنش‌های خشکی و شوری یکی از مهمترین مشکل تولید محصول خربزه محسوب می‌شود. با توجه به افزایش روزافزون تقاضا برای محصولات کشاورزی از جمله خربزه و کمبود منابع آبی در کشور، تولید ارقام مقاوم به کم‌آبی، شوری، آفات و بیماریها ضرورت دارد. در این راستا استفاده از تکنیک‌های زیست‌فناوری از جمله مهندسی ژنتیک و کشت بافت و سلول گیاهی، برای ایجاد مقاومت در ارقام محلی خربزه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از آن جایی که تولید پینه و باززایی گیاهچه یکی از مهمترین مرحله تکنیک‌های زیست‌فناوری است، بنابراین هدف این تحقیق باززایی گیاهچه از پینه دو رقم خربزه ایرانی شامل ایوانکی و زردجلالی در محیط کشت MS با ترکیب غلظت‌های مختلفی از IAA و BA می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای دو رقم خربزه ایرانی شامل ایوانکی و زردجلالی پس از ضدعفونی بر روی محیط MS و MS ½ کشت شدند. برای ضدعفونی، ابتدا بذرها با آب و صابون شستشو و به مدت دو ساعت در زیر جریان آب شیر قرار گرفتند. سپس با محلول قارچ‌کش (بنومیل) یک در هزار به مدت ۳۰ دقیقه و در مرحله بعد زیر دستگاه لامینار، با اتانول ۷۰ درجه به مدت ۱ تا ۲ دقیقه و بعد با هیپوکلریت سدیم ۴٪ به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه و در نهایت در مواردی که آلودگی درونی نشان می‌دادند با کلرور جیوه ۰/۱ ٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از بکارگیری هر ماده ضدعفونی کننده، بذرها با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها در شرایط درون‌شیشه‌ای، لپه‌ها (برگ‌های لپه) از گیاهچه‌های سالم به عنوان ریزنمونه جهت پینه‌زایی و باززایی جدا شدند. ریزنمونه‌ها (لپه‌ها) از گیاهچه‌های ۷ تا ۱۰ روزه تهیه و در شرایط ضدعفونی شده، جدا و بطور عرضی به قطعات تقریبی یک سانتیمتر مربع بریده شده و به محیط‌های تیمار پینه‌زایی انتقال داده شدند. پینه‌زایی در محیط MS، با ترکیب‌های مختلفی از غلظت‌های متفاوت BA و IAA انجام شد. هر تیمار پینه‌زایی دارای سه تکرار و هر تکرار بین ۲ تا ۴ ریزنمونه بود. یادداشت‌برداری از پینه‌های تشکیل شده بر حسب گرم در هر ریزنمونه انجام گردید.

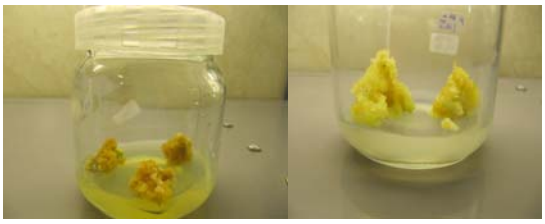
برای باززایی از پینه‌های حاصل از لپه‌ها استفاده گردید. در این مرحله ریزنمونه‌ها از پینه‌های ریخت‌زا که دارای پتانسیل باززایی بودند، انتخاب شدند. برای باززایی از نمک‌های معدنی و ویتامین‌های محیط MS، با ترکیبی از سه غلظت BA (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت IAA (۰، ۰/۰۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، در نه تیمار مختلف با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، و ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. کشت‌ها در شرایط طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. برای هر یک از تیمارهای باززایی از سه تکرار استفاده و در هر تکرار ۷ ریزنمونه کشت گردید. معمولاً برای هر ریزنمونه حدود یک گرم پینه ریخت‌زا استفاده شد. پس از دو ماه داده‌ها برحسب درصد باززایی یادداشت شدند. ریزنمونه‌ها هر ۲۰ روز یکبار واکشت شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه

تکرار انجام شد. عامل اصلی شامل رقم و عامل‌های فرعی شامل غلظت‌های مختلف دو نوع مواد تنظیم کننده رشد IAA و BA بودند. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از One-way ANOVA با برنامه رایانه‌ای MSTAT-C استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی آنها با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح ۱٪ و ۵٪ انجام شد.

نتایج

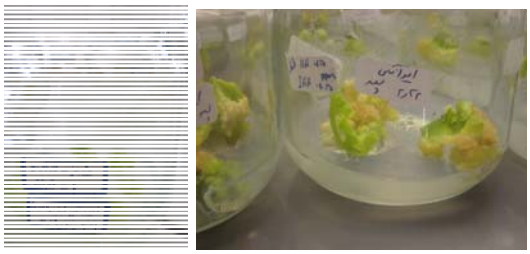
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در باززایی گیاهچه از پینه دو رقم خربزه ایرانی، همه فاکتورها از جمله نوع رقم، غلظت‌های IAA، غلظت‌های BA، اثر متقابل رقم در IAA، اثر متقابل رقم در BA، اثر متقابل IAA در BA و همچنین اثر متقابل رقم در IAA و BA در سطح ۱٪ اثر معنی‌داری داشتند. تولید پینه از ریزنمونه‌های لپه‌ای در ارقام خربزه زردجلالی (شکل۱) و ایوانکی (شکل۲) و همچنین باززایی شاخساره‌ها از این پینه‌ها در رقم زردجلالی (شکل۳) و ایوانکی (شکل۴) در غلظت‌های مختلفی از IAA و BA نشان داده شده است.

شکل ۱- تولید پینه از ریزنمونه‌های لپه‌ای در خربزه رقم زردجلالی پس از یک ماه در غلظت مختلفی از IAA و BA



شکل ۲- تولید پینه از ریزنمونه‌های لپه‌ای در خربزه رقم ایوانکی پس از یک ماه در غلظت مختلفی از IAA و BA

شکل ۳- باززایی شاخساره در خربزه رقم زردجلالی پس از دو ماه در غلظت مختلفی از IAA و BA

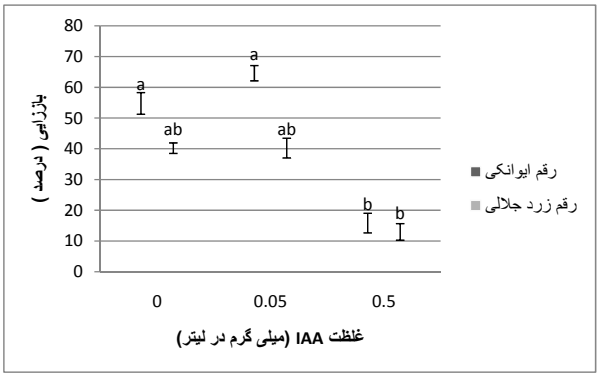


شکل ۴- باززایی شاخساره در خربزه رقم ایوانکی پس از دو ماه در غلظت مختلفی از IAA و BA

درصد باززایی در پینه‌های حاصل از لپه‌های دو رقم خربزه ایوانکی و زردجلالی در ترکیب‌های مختلفی از IAA و BA اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ داشتند. به طور کلی، بدون توجه به نوع و غلظت مواد تنظیم کننده رشد، باززایی در رقم ایوانکی نسبت به رقم زردجلالی بیشتر بود. به طوری که مقایسه میانگین‌های اثر متقابل IAA و ارقام خربزه‌های ایرانی (نمودار۱) نشان داد که در کل در هر سه غلظت بکار رفته از IAA، درصد باززایی رقم ایوانکی در مقایسه با رقم زردجلالی بهتر بوده و هر دو رقم در غلظت‌های صفر و ۰/۰۵ نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از IAA، بیشترین درصد باززایی را داشتند. در هر دو رقم بیشترین درصد باززایی (با میانگین ۶۴/۵۸٪ برای رقم ایوانکی و ۴۰/۲۵٪ برای رقم زردجلالی) در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر از IAA، و کمترین درصد باززایی (با میانگین ۱۵/۸۷٪ برای رقم ایوانکی و ۱۲/۹۸٪ برای رقم زردجلالی) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.

اثر متقابل BA در رقم (نمودار ۲) نشان داد که در هر سه غلظت BA، درصد باززایی رقم ایوانکی در مقایسه با زردجلالی بهتر بوده و هر دو رقم در غلظت‌های ۱ و ۰/۵

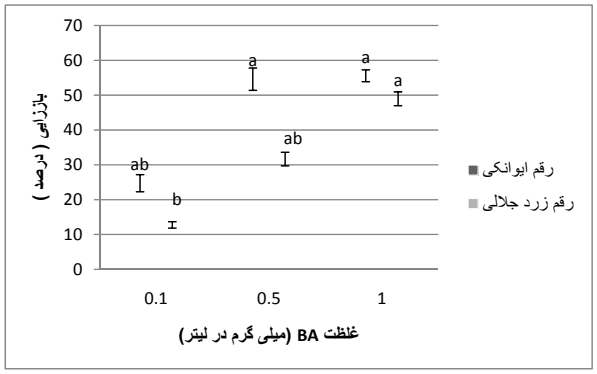
نسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از BA، بیشترین درصد بازززایی را داشتند.



نمودار ۱- اثر متقابل ارقام خربزه و غلظت‌های مختلف IAA بر بازززایی پس از دو ماه

- ستونهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

در هر دو رقم بیشترین درصد بازززایی (با میانگین ۵۵/۵۸٪ برای رقم ایوانکی و ۴۸/۹۸٪ برای رقم زردجلالی) در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و کمترین درصد بازززایی (با میانگین ۲۴/۷۸٪ برای رقم ایوانکی و ۱۲/۷۸٪ برای رقم زردجلالی) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد.



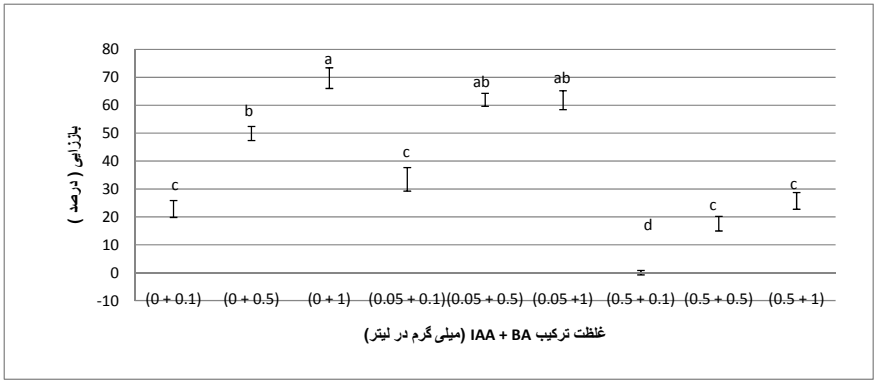
نمودار ۲- اثر متقابل ارقام خربزه و غلظت‌های مختلف BA بر بازززایی پس از دو ماه

- ستونهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

همچنین، مقایسه میانگین‌ها در نمودار ۳ نشان داد که اثر متقابل IAA و BA در بازززایی دو رقم خربزه از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند. استفاده از ترکیبات مختلف IAA و BA، بدون در نظر گرفتن نوع رقم، واکنش‌های متفاوتی در بازززایی نشان دادند. به طوری که بالاترین درصد بازززایی به ترتیب در ترکیب (۰mg/l IAA +۱ mg/l BA) با میانگین ۶۹/۷۴ ٪، سپس در (۰/۰۵ mg/l IAA + ۰/۵mg/l BA) با میانگین ۶۱/۹۷ ٪ و (۰/۰۵ mg/l IAA + ۱ mg/l BA) با میانگین ۶۱/۸۱٪ به دست آمد و کمترین میزان بازززایی نیز در ترکیب (۰/۵ mg/l IAA + ۰/۱ mg/l BA) به دست آمد. در این ترکیب هورمونی ریزنمونه‌ها بدون تولید شاخساره‌های نابجا، مستقیماً ریشه‌زایی کردند.

مقایسه میانگین‌ها در نمودار ۴ نشان داد که اثر متقابل ارقام در IAA و BA در بازززایی خربزه از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ دارند. در نسبت‌های مختلف IAA و BA، دو رقم خربزه ایوانکی و زردجلالی در مواردی واکنش‌های متفاوتی را در بازززایی نشان دادند. .به طور

کلی، باززایی رقم ایوانکی نسبت به رقم زردجلالی بیشتر بود.



نمودار ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف IAA و BA بر باززایی ارقام خربزه پس از دو ماه

- ستونهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

هر دو رقم در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از BA (بدون حضور IAA) بیشترین باززایی را داشتند. رقم ایوانکی در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ نسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از BA، بیشترین درصد باززایی را نشان داد که از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار بود ولی در رقم زردجلالی اختلاف معنی‌دار فقط بین غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از BA مشاهده شد. برای رقم ایوانکی بیشترین درصد باززایی در ترکیب (۰ mg/l IAA+۱ mg/l BA) با میانگین 72/61 ٪، و کمترین نیز در ترکیب (۰IAA mg/l + ۰/۱ mg/l BA) با میانگین ۲۹/۸۱٪ به دست آمد. همچنین در عدم حضور IAA، رقم زردجلالی بیشترین درصد باززایی را در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۶۶/۸۶ ٪، و کمترین را در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از BA با میانگین ۱۵/۸۷٪ داشت.

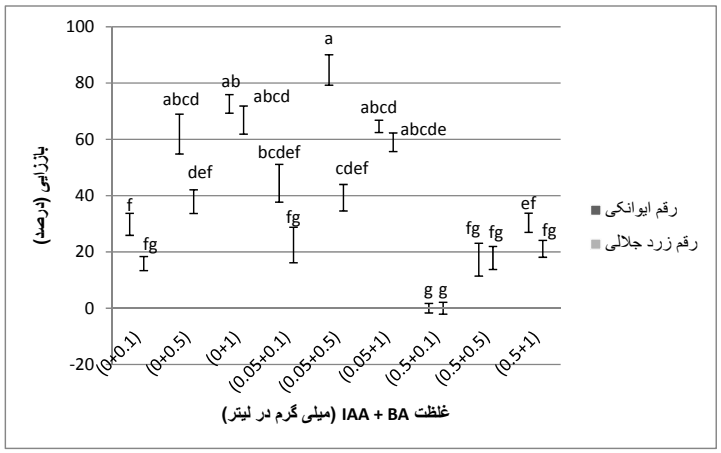
در ترکیب غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با سه غلظت متفاوت BA (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، میزان باززایی رقم ایوانکی بهتر بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد هر دو رقم در ترکیب (۰/۰۵ IAA mg/l + ۱ mg/l BA) باززایی بهتری داشتند، با وجود این رقم ایوانکی در ترکیب (۰/۰۵ IAA mg/l + ۰/۵ mg/l BA) نیز بیشترین باززایی را نشان داد. کمترین میزان باززایی نیز در ترکیب (۰/۰۵ IAA mg/l + ۰/۱ mg/l BA) برای هر دو رقم به‌دست آمد.

با افزایش غلظت IAA به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با سه غلظت مختلف BA، میزان باززایی در هر دو رقم بشدت کاهش یافت، به طوری که در نسبت‌هایی که غلظت IAA بیشتر از BA بود هیچ گونه باززایی حاصل نشد. در کل برای رقم ایوانکی بهترین ترکیب برای باززایی نسبت‌های ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر فقط BA (بدون IAA) به دست آمد. رقم زرد جلالی نیز نسبت‌های ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با یک میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین در یک میلی‌گرم در لیتر فقط BA (بدون IAA) بیشترین باززایی را داشت.

بحث

خربزه یکی از گونه‌های معمول برای مطالعه پینه‌زایی، باززایی و انتقال ژن در شرایط درون‌شیشه‌ای است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ریزنمونه‌های حاصل از لپه‌های دو رقم خربزه ایرانی ایوانکی و زردجلالی یکی از مؤثرترین راه‌های تولید پینه و باززایی غیرمستقیم می‌باشد. پژوهش‌های انجام شده در این زمینه نشان داده که

جوانه‌ها و شاخساره‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به طور غیرمستقیم از پینه‌های حاصل از لپه‌ها (۱، ۲، ۴، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۲ و ۲۹) به دست می‌آیند.



نمودار ۴- اثر متقابل ارقام خربزه در غلظت‌های مختلف IAA و BA بر باززایی پس از دو ماه

- ستونهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

نتایج آزمایش حاضر مشخص کرد که ژنوتیپ ارقام در واکنش به تشکیل شاخساره‌های نابجا، رفتارهای متفاوتی از خود نشان دادند. به طوری که بدون توجه به نوع و غلظت مواد تنظیم کننده رشد، رقم ایوانکی در تشکیل جوانه و شاخساره‌های نابجا در مقایسه با رقم زردجلالی باززایی بهتری داشت. نتایج این تحقیق، مشاهدات قبلی را مبنی بر باززایی گیاهان خربزه از طریق اندام‌زایی که به نوع ژنوتیپ بستگی دارد، تایید کرد (۵، ۶، ۱۷، ۱۸، ۲۲). همچنین نتایج حاصل از این آزمایش با گزارش Merla و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. آنها برای باززایی هفت رقم خربزه کاستاریکایی از مواد تنظیم‌کننده رشد، BA و IAA استفاده و باززایی از طریق اندام‌زایی را در همه ژنوتیپ‌ها گزارش کردند. نتیجه تحقیق آنان نشان داد که درصد باززایی تحت تأثیر ژنوتیپ بوده و از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت می‌باشد (۱۷).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مواد تنظیم کننده رشد BA و IAA نقش مهمی در تولید پینه و شاخساره‌های نابجا در ژنوتیپ‌های خربزه ایرانی داشتند. به طوری که مستقل از نوع رقم خربزه، مواد تنظیم کننده رشد BA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بیشترین باززایی را با میانگین ۷۰٪ نشان داد. سپس ترکیب‌های ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر از IAA با یک یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین۶۲٪ بهترین نتیجه را دادند. نتایج این بررسی با بسیاری از نتایج محققان قبلی مطابقت دارد. در این خصوص ریخت‌زایی درون شیشه‌ای خربزه از ریزنمونه‌های لپه و برگی (۶، ۱۳) در محیط‌های القای حاوی سایتوکنین‌ها (۲، ۱۳)، اکسین‌ها (۳۰)، یا ترکیبی از یک سایتوکنین و یک اکسین (۱۰، ۱۹) به دست آمده است.

Melara و همکاران (۲۰۰۹) در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ترکیب‌های مختلف از مواد تنظیم کننده رشد BAP و IAA موفق به اندام‌زایی شاخساره و باززایی گیاهچه در خربزه شدند. در این گزارش، پینه‌های زرد رنگ و تعدادی شاخساره کوچک در انتهای ریزنمونه‌ها که پس از ۳ هفته قابل رؤیت بود به دست آمد. به طوری که این پینه‌ها جنین‌زا نبودند ولی باعث تشکیل شاخساره شدند. نتایج گزارش آنان نشان داد که این روش یک مسیر باززایی غیرمستقیم می‌باشد (۱۷). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که استفاده از مواد IAA و BA در اندام‌زایی

ژنوتیپ‌های خربزه ایرانی مؤثر می‌باشد. 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 حالی‌که اکسین‌ها تأثیر شدیدی در شروع تقسیم سلول داشته و باعث تشکیل بافت‌های سازمان نیافته (پینه) از مریستم‌های سازمان یافته می‌شوند، به طوری که با اسیدی کردن دیواره سلولی باعث بزرگ شدن سلول، تمایز یابی بافت‌های آوندی، و تشکیل ریشه‌ها می‌شوند. دستکاری نسبت سایتوکنین به اکسین بیرونی می‌تواند در الگوی نموی یا جهت‌دهی برنامه‌های اندام‌زایی مناسب باشد (۹). به طور کلی این مطالعه نشان داد که ریزنمونه‌های حاصل از لپه‌های دو رقم خربزه ایرانی ایوانکی و زردجلالی یکی از اندام‌های مؤثر برای تولید پینه و باززایی غیرمستقیم می‌باشد و ترکیب غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین نیز این پدیده را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

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- Chee, P. P. 1991. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. HortScience, 26: 908–910.

3- 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.

4- 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.

5- Debeaujon, I. and Branchard, M. 1992. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledons and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports, 12 (1): 37-40.

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

7- Fuchs, M., McFerson, J. R., Tricoli, D. M., McMaster, J. R., Deng, R. Z., Boeshore, M. L., Reynolds, J. F., Russel, P. F., Quemada, H. D. and Gonzalves, D. 1997. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of cucumber mosaic virus, zucchini yellow mosaic virus, and watermelon mosaic virus-2 is resistant to these three viruses in the field. Molecular. Breeding, 3: 279–290.

8- Gaba, V., Elman, E., Perl Treves, R. and Gray, D. J. 1996a. A theoretical investigation of the genetic variability in the ability of Agrobacterium to transform Cucumis melo. L. In: Gomez-Guillamon M. L. Soria C. Cuartero J. and Fernandez-Munoz R eds. Cucurbits Towards. 2000. Proc. 6th Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Malaga, Spain, 172–178.

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- Guis, M., Latche, A., Pech, J. C. and Roustan, J. P. 1997. An efficient method for production of diploid cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) by somatic embryogenesis. Horticultural Science, 69: 199–206.

12- 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.

13- 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.

14- Kintzios, S., Sereti, E., Bluchos, P., Drossopoulos, J. B., Kitsaki, C. K. and Liopa-

Tsakalidis, A. 2002. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports, 21: 1-8.

15- Lee, Y. K., Chung, W. I. and Ezura, H. 2003. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). Plant Science, 164: 413-418.

16- 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.

17- 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(1): 125-131.

18- 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 (3): 249-257.

19- 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.

20- 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.

21- Oridate, T. and Oosawa, K. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). Japanese Journal of Breeding, 36: 424–428.

22- Orts, M. C., Garcia-Sogo, B., Roche, M. V., Roig, L. A. and Moreno, V. 1987. Morphogenetic response of calli from primary explants of diverse cultivars of melon. HortScience, 22: 666.

23- Pal, S. P., Alam. I., Anisuzzaman, M., Sarker, K. K., Sharmin, S. A. and Alam, M. F. 2007. Indirect Organogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). Turkish Journal of Agriculture, 31: 63-70.

24- Pech, J. C., Bernadac, A., Bouzayen, M., Latche, A., Dogimont, C., and Pitrat, M. 2007. Melon, pp. 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.

25- Rhimi, A., Ben Fadhel, N. and Boussaid, M. 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis from in vitro tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84: 239-243.

26- Rivera, C., Villalobos, W., Sanchez, M. V., Zumbado, C. and Rodriguez, C. M. 1993. Identification and distribution of melon infecting viruses and their vectors in two provinces of Costa Rica. Turrialba, 43: 210-215.

27- Shalaby, T. A., Omran, S. A. and Baioumil, Y. A. 2008. In vitro propagation of two triploid hybrids of watermelon through adventitious shoot organogenesis and shoot tip culture. Acta Biological Szegediensis, 52(1): 27-31.

28- 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.

29- Strip, L. C. L., Mendes, B. M. J., Piedade, S. M. D. S. and Rodriguez, A. P. M. 2001. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo var.inodorus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65: 81–89.

30- 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.

31- Tricoli, D. M., Carney, K. J., Russel, P. F., McMaster, J. R., Groff, D. W., Hadden, K. C., Himmel, P. T., Hubbard, J. P., Boeshore, M. L., Reynolds, J. F. and Quemada, H. D. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and/or zucchini yellow mosaic virus. Biotechnology, 13: 1458–1465.

32- 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.

Effect of plant growth regulators on plantlets regeneration from callus in two Iranian melons cv. (*Cucumis melo* L.*)* by *In-vitro*

Kabirhashemi S.M.[1], Ghanbari A.[2] and Kashi A.[3]

[1] Horticulture Dept., Azad University of Karaj Branch, Karaj, I.R. of Iran

[2] Horticulture Dept., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

[3] Horticulture Dept., University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Melon is one of the important species of cucurbitaceae that have been used for transgenic and studies of regeneration by in-vitro. For callus production in two Iranian melon cultivars, explants of cotyledons prepared from Eivanaky and Zard-e-jalali and had been cultured in callus induction medium, with basal MS medium that supplemented with different combination of IAA and BA. Morphogen calli production from cotyledonary explants has been used for regeneration after one month. About one gram morphogen callus transferred to regeneration media that includes, MS medium supplemented with combination of three different concentrations of IAA (0, 0.05 and 0.5 mg/l) and three different concentration of BA (0.1, 0.5 and 1 mg/l). After two months regeneration percentage was evaluated. Results showed that cultivars, IAA and BA concentrations and interaction between them had significant effects on regeneration. Also, results showed independently of cultivars and concentrations of plant growth regulators, the Eivanaki cultivar had highest regeneration with average of 40% in compared with Zard-e-Jalali with average of 31%. However, combination of 0 mg/l IAA + 1 mg/l BA with means of 70% and then 0.05mg/l IAA+ 0.5 mg/l BA with average of 62% had highest regeneration of shoots in both cultivars.

Key words: melon (*Cucumis melo* L.), regeneration , morphogen callus , IAA, BA