# بررسی مقایسه ای اثر هورمونی BA،Kin، NAA و IBA بر باززایی مستقیم *Citrullus lanatus* L. (cv. Crismon sweet) درشرایط In Vitro

مریم عامری[۱*]، مهرداد لاهوتی[۲]، عبدالرضا باقری[۳]، احمد شریفی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- عضو هیئت علمی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد
۳- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضو هیئت علمی گروه فناوری کشت بافت و ازدیاد گیاهان جهاد دانشگاهی مشهد
ma.ameri65@gmail.com

## چکیده

سالانه میلیون‌ها تن هندوانه (*Citrullus lanatus*) در اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی در مزارع از بین می روند. بهره گیری از مهندسی ژنتیک در ارقام هندوانه جهت کسب صفات مطلوبی مثل مقاومت به بیماری از ارزش بالایی برخوردار است و تراریزش گیاهان این امکان را به وجود می آورد تا بتوان صفات مفید را به این گیاه انتقال داد. آزمایشی به منظور تهیه محیط کشت مناسب باززایی مستقیم هندوانه انجام شد. بدین منظور پس از تهیه ریزنمونه گره از گیاهچه‌های استریل، در محیط کشت MS حاوی BA و Kin با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر قرار داده و پس از یک ماه ارزیابی رشد صورت گرفت. نتایج پژوهش نشان داد که شرایط هورمونی مختلف اثر معنی‌داری بر باززایی مستقیم هندوانه داشته است. بطوریکه BA اثر بهتری در افزایش تعداد ساقه نسبت به Kin نشان داد و افزایش غلظت BA نیز تا ۱/۵ میلی گرم در لیتر باعث افزایش ساقه زایی بیشتری شد. از طرفی Kin اثر بارزی در طویل سازی میان گره‌ها داشت($P\leq ۰/۰۱$). بیشینه ساقه زایی در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و بهینه رشد میان گره‌ها نیز در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر Kin صورت گرفت.

**کلمات کلیدی:** باززایی مستقیم، کشت بافت، *هندوانه*، BA و Kin .

## مقدمه

هندوانه (*Citrullus lanatus*) یک محصول زراعی مهم است که به خانواده Cucurbitaceae یا کدوئیان تعلق دارد. میوه این گیاه با داشتن مقادیر بالایی از لیکوپن، یک آنتی اکسیدان، می تواند در کاهش سرطان پروستات، پانکراس و معده مفید باشد و دانه آن با داشتن مقادیر زیادی روغن و پروتئین ارزش غذایی بالایی دارد (پرینک و همکاران، ۲۰۰۳). از مهم ترین ارقام تجاری هندوانه بذری کریسمون سوئیت، چارلستون گری و شوگر بی بی هستند و می توان به تری ایکس ۳۱۳، سوپر سوئیت و کریسمون تریوبعنوان ارقام تجاری بدون بذر یا تریپلوئید هندوانه اشاره کرد(خادمیان، ۲۰۰۵). ویروس‌ها از جمله پاتوژن‌های مهم این گیاه هستند که سالانه خسارات زیادی را به تولید جهانی وارد می کنند. بهبود ژنتیکی از طریق کشت بافت و بیوتکنولوژی با ارائه محصولات باکیفیت تری مثل میوه‌های بی دانه، معرفی ژن‌های نوترکیب و تولید واریانت‌های سوماکلونال با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پتانسیلی را برای بهبود عملکرد این گیاه فراهم می کند(کامپتون، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت بهینه شدن فرآیند کشت بافت هندوانه به عنوان گام موثر در انجام پروژه‌های مهندسی ژنتیک برای این گیاه در کشور، در تحقیق حاضر بهینه سازی شرایط کشت برای باززایی مستقیم آن در محیط این ویترو مورد بررسی قرار گرفت.

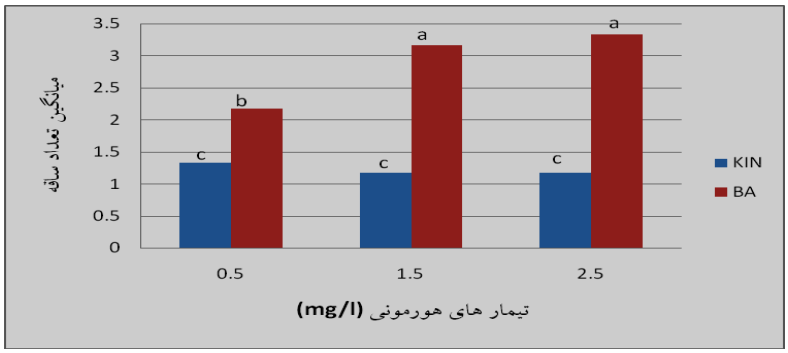
## مواد و روش‌ها

هندوانه را می توان بطور مشابه با سایر گیاهان به روش باززایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه‌های راس ساقه و گره و باززایی غیر مستقیم با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات لپه، برگ و هیپوکوتیل تکثیر کرد. در این آزمایش به منظور باززایی مستقیم از ریز نمونه‌های گره استفاده شد. ابتدا بذور هندوانه رقم کریسمون سوئیت پس از شستشو به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و زیر هود لامینار تحت شرایط استریل سه بار آب شویی شده و در پتری دیش به مدت ۴۸ ساعت به منظور جوانه زنی ابتدایی قرار گرفتند، سپس در محیط کشت MS بدون هورمون ودر ویال کشت شده و در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت نگهداری شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها از آنها ریز نمونه تک گره استریل تهیه و در محیط کشت MS حاوی BA و Kin با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر کشت شده و در اتاق رشد قرار گرفتند. پس از یک ماه ارزیابی رشد برحسب طول شاخه، تعداد شاخه صورت گرفت. برای ریشه زایی شاخه‌های تولید شده از محیط کشت MS با سطوح ۰ و ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و IBA استفاده شد. این بررسی به صورت آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی

با ۵ تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن صورت پذیرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودارها از نرم افزارهای MSTAT-C و Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

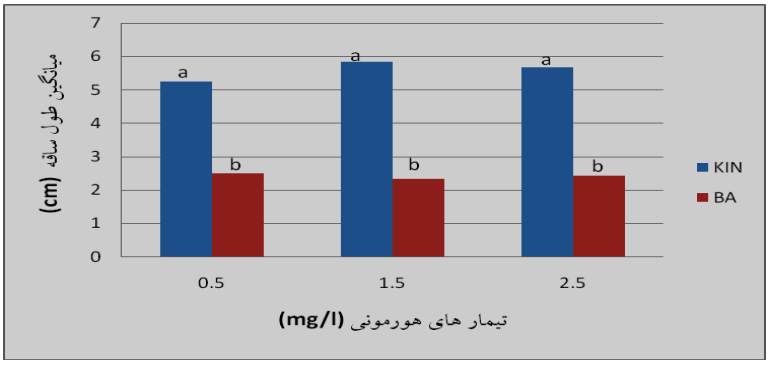
نتایج این پژوهش نشان داد که شرایط هورمونی مختلف اثر معنی‌داری بر باززایی مستقیم هندوانه داشته است ($P\leq ۰/۰۱$). بطوریکه با قرار گرفتن تک گره‌ها در غلظت‌های مختلف BA و Kin پاسخ‌های متفاوتی مشاهده گردید. . سریواستاوا و همکاران (۱۹۸۹) و کامپتون و همکاران (۱۹۹۳) گزارش دادند که هورمون BA در اندام زایی خانواده کدوئیان بسیار موثر است. کاربرد BA سبب افزایش ساقه دهی نسبت به Kin شده بود و غلظت‌های متفاوت آن هم اثر معنی داری بر تعداد شاخه نشان داده بودند اما غلظت‌های ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر آن تفاوت معنی داری نشان ندادند(نمودار۱). بطور مشابه سریواستاوا و همکاران (۱۹۸۹)، کامپتون و گری (۱۹۹۳)، چویی و همکاران (۱۹۹۴)، جاوسکی و کامپتون (۱۹۹۷) و کامپتون (۱۹۹۹) بهترین محیط ساقه زایی را محیط MS حاوی BA $1- 2\ mgl^{-1}$ گزارش دادند در حالیکه دانگ و جیا (۱۹۹۱) بیان کردند، اضافه کردن IAA $0.5\ mgl^{-1}$ تعداد ساقه در هر ریز نمونه را افزایش می دهد. البته هم کامپتون و گری (۱۹۹۳) و هم سریواستاوا و همکاران (۱۹۸۹) مهار اندام زایی ساقه را هنگام اضافه کردن NAA یا IAA به محیط کشت گزارش کردند. پرینک و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی اثر BA و Kin $0.5-4\ mgl^{-1}$ بهترین محیط ساقه زایی لپه‌های هندوانه را BA $0.5-1\ mgl^{-1}$ گزارش دادند. آنها بیان کردند که غلظت‌های بالای BA و Kin سبب تولید ساقه‌های بد شکل و پدیده شیشه ای شدن شده است. همچنین هوک و همکاران (۱۹۹۵) محیط MS حاوی BA $1.5\ mgl^{-1}$ را در ترکیب با NAA $0.1\ mgl^{-1}$ بهترین محیط برای تشکیل ساقه معرفی کردند. در بررسی اثر BA بر ریزازدیادی دو هیبرید تریپلوئید هندوانه با استفاده از ریزنمونه‌های لپه و راس ساقه، شالابی و همکاران بیان کردند که غلظت $2.25\ mgl^{-1}$ BA برای ریزنمونه‌های لپه و غلظت BA $0.9, 2.25\ mgl^{-1}$ برای ریزنمونه‌های راس ساقه ارقام تریپلوئید، بهترین غلظت‌ها هستند. کراگ و همکاران (۲۰۰۵) برای اندام زایی از BA $1\ mgl^{-1}$ در ترکیب با ۱۰ درصد شیر نارگیل استفاده کردند. آنها بیان کردند از آنجا که بین سطوح BA $1.2\ mgl^{-1}$ تفاوت معناداری وجود ندارد، به منظور ممانعت از تنوع سوماکلونال در غلظت‌های بالایی، غلظت‌های پایینی پیشنهاد می شود.




**نمودار ۱- ساقه زایی ریز نمونه‌های هندوانه در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA و Kin**

Kin توانسته بود طول ساقه‌ها را نسبت به BA افزایش دهد اما غلظت‌های متفاوت آن تفاوت معنی داری بر طول ساقه نگذاشته بودند(نمودار۲). بطور مشابه کراگ و همکاران نیز برای طویلسازی جوانه‌های نمو یافته از لپه‌های هندوانه از محیط Kin $0.2\ mgl^{-1}$ استفاده کردند. کامپتون و گری (۱۹۹۳) محیط کشت فاقد سیتوکینین و دانگ و جیا (۱۹۹۱) محیط کشت حاوی Kin $0.2\ mgl^{-1}$ را بعنوان محیط طویل سازی هندوانه معرفی کرده اند.

بنابراین پیشنهاد می شود برای ساقه دهی هندوانه از غلظت BA $1.5\ mgl^{-1}$ با توجه به اثر بیشتر، مقرون به صرفه بودن، کاهش تنوع سوماکلونال و شیشه ای شدن و برای طویل سازی نیز به همین دلایل از $mgl^{-1}$ 0.5 Kin استفاده شود.




**نمودار۲ - تغییرات طول بخش هوایی در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA و Kin در گیاه هندوانه**

برای ریشه زایی ساقه‌های طویل شده شده از محیط کشت MS با سطوح ۰ و ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAAو IBA استفاده شد. نتایج نشان داد هورمون IBA در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر با بیشترین تحریک در تولید ریشه فرعی و افزایش طول ریشه‌های اصلی و فرعی یک اکسین مناسب می باشد (شکل ۱). کامپتون و گری (۱۹۹۳) از محیط MS حاوی IBA $0.2\ mgl^{-1}$ و دانگ و جیا (۱۹۹۱) از محیط حاوی NAA $0.1\ mgl^{-1}$ جهت ریشه زایی استفاده کردند.

## منابع

Choi et al. (1994). Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell Reports. **13**: 344–348.

Compton M. E. and Gray D. J. 1993a. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. Journal of the American Society for Horticultural Science. **118**: 151–157.

Compton, M. E. 1999. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **58**: 185–188.

Compton et al. (1993). A simple protocol for microproprgating diploid and tetraploid watermelon using shoot-tip explants. Plant cell, Tissue and Organ Culture. **33**: 211-217.

Compton et al. (2004). Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **77**: 231–243.

Dong, J. and Jia, S. 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Reports. **9**: 559-562.

Hoque et al. (1995). In vitro plantlets differentiation in kakrol (Momordica dioica). Plant Tissue Culture. **5**: 119-124.

Jaworski, J. M. and Compton, M. E. 1997. Plant regeneration from cotyledons of five watermelon cultivars. HortScience. **32**: 469.

Khademian, H., 2005. Comercial Watermelon, Sepehr Publishers, Tehran, p. 208.

Krug et al. (2005). In vitro organogenesis in watermelon cotyledons. Brasilia. **40**: 861-865.

Pirinc et al. (2003). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. surme). Turky Journal of Biology. **27**: 101-105.

Srivastava et al. (1989). Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). Plant Cell Reports. **8**: 300- 302 .