Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 467-479
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۴۷۹-۴۶۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

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

مائده عقدایی[۱]- سید حسین نعمتی[۲*]- لیلا سمیعی[۳]- احمد شریفی شریف آباد[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۳۱

چکیده

پپینو یک سبزی میوه‌ای متعلق به خانواده سولاناسه بوده که مشکل اساسی در توسعه‌ی کشت این گیاه تکثیر آن می‌باشد که از طریق بذر موفقیت اندکی دارد. از این‌رو این پژوهش با هدف تکثیر انبوه از طریق کشت بافت انجام گردید. به‌منظور دستیابی به بهترین نوع محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از ریزنمونه تک گره پپینو استفاده گردید. این تحقیق در قالب سه آزمایش جداگانه با استفاده از چهار نوع محیط کشت (MS، ½ MS، SH و B_5)، دو نوع سیتوکنین (بنزیل آدنین (BA) و کینتین (Kin)) و دو نوع اکسین (ایندول بوتریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA)) برای تعیین بهترین محیط کشت و دستیابی به ترکیب مناسبی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک گره پپینو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS بود. در آزمایش پرآوری شاخه، بیش‌ترین تعداد شاخساره، تعداد برگ، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره القا شده در اثر کاربرد محیط کشت MS غنی شده با دو میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد. همچنین بیش‌ترین میزان طول شاخساره و طول برگ به‌ترتیب با کاربرد محیط کشت MS غنی شده با یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با دو میلی‌گرم در لیتر Kin و تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. در آزمایش ریشه‌زایی، بیش‌ترین میانگین تعداد ریشه و کیفیت ریشه با استفاده از IBA با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد، در حالی که بیش‌ترین میانگین طول ریشه با کاربرد IBA با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در مجموع بهترین نتایج با محیط کشت MS، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin جهت پرآوری و همچنین غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پپینو به‌دست آمد.

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

مقدمه

پپینو (*Solanum muricatum* Aiton) گیاهی علفی و دیپلوئید (2n=24) متعلق به خانواده سولاناسه[۵] و منشأ گرفته از کوه‌های آند بوده، که در مناطق مختلف دارای نام‌های مختلفی از جمله پپینو، خربزه‌ی گلابی، گلابی خربزه، شاه کیوی و توما می‌باشد (۳، ۵، ۷، ۱۶ و ۳۰). پپینو به‌عنوان یک سبزی میوه‌ای تقریباً ناشناخته به‌صورت میوه تازه، سبزی پخته شده، یخ‌زده، سالاد میوه، آب‌میوه، شربت، ژله، خشک شده و کنسرو شده مصرف می‌شود (۱۶، ۱۷ و ۴۰). داشتن میوه‌های خوراکی آبدار، معطر و شیرین، تنوع زیاد در رنگ و شکل میوه و همچنین مصارف مختلف این محصول منجر به پرورش تجاری آن در کشورهای آمریکای جنوبی از جمله بولیوی، کلمبیا، اکوادر و پرو و همچنین کشورهایی نظیر نیوزیلند و استرالیا شده است(۳۰). این گیاه به‌دلیل داشتن ویژگی‌های خاص برای نخستین بار در سال ۱۳۸۲ در ایران معرفی و جهت بومی‌سازی مورد توجه قرار گرفت (۱۹).

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

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته دکتری و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: Nemati@um.ac.ir)
۳ - استادیار گروه گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.76833

www.SID.ir

Archive of SID

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

کشت درون شیشه‌ای، به‌عنوان یک روش جایگزین برای ازدیاد گیاهان، منجر به ایجاد تحولی عظیم در تکثیر گیاهان شده است (۲۶). با توجه به مشکلات بیان شده در مورد تکثیر پیپنو از طریق بذر و قلمه، از تکنیک‌های مختلف کشت بافت می‌توان در جهت تکثیر و تولید انبوه پیپنو، تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری‌زا استفاده نمود. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه‌ی ریزازدیادی پیپنو با استفاده از ریزنمونه‌های کشت تک گره و نوک شاخه (۶ و ۲۷)، پروتوپلاست (۳۳) و باززایی شاخه از کالوس (۳۴) انجام شده است. آتکینسون و گاردنر (۲) بذور گیاه پیپنو را پس از استریل کردن (به‌مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم)، بر روی محیط کشت پایه MS (حاوی ویتامین‌های B_5، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار) پرورش دادند. جهت پرآوری شاخه و ایجاد شاخه‌های جانبی ریزنمونه‌های تک گره و نوک شاخه گیاهچه‌های پیپنو حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه‌ای، از محیط MS غنی‌شده با سه درصد ساکاروز، ویتامین‌ها، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA3 استفاده کردند (۲، ۱۳ و ۲۵). همچنین کاووسوگلو و سولوسگلو (۶) محیط MS غنی‌شده با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP را به‌عنوان بهترین محیط جهت پرآوری شاخه در هر ریزنمونه تک گره و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر NAA را به‌عنوان بهترین محیط ریشه‌زایی معرفی کردند. در مطالعه‌ای دیگر، پریک (۲۷) شاخچه‌های پیپنو را در محیط کشت MS غنی‌شده با دو درصد ساکارز و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ریشه‌دار کرد. با وجود تحقیقات محدود انجام گرفته بر روی گیاه پیپنو، هنوز مشکل تکثیر این گیاه به‌قوت خود باقی‌مانده است و نیازمند انجام تحقیقاتی بیش‌تر و دقیق‌تر در این راستا می‌باشد. ازاینرو پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی جهت ریزازدیادی پیپنو انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و نحوه‌ی تهیه ریزنمونه

این پژوهش در قالب سه آزمایش جداگانه در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۵ انجام پذیرفت. بدین‌منظور بذور پیپنو از شرکت Plant World Seed انگلستان خریداری گردید. به‌منظور گندزدایی سطحی، بذور به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به‌مدت چهار دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند و نهایتاً به‌مدت ۴/۵ دقیقه سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور گندزدایی شده جهت جوانه‌زنی، در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ[1]) استریل شده (به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) کشت گردیدند. ظروف کشت در اتاقک رشد و تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذور به‌عنوان مواد مادری برای تأمین ریزنمونه تک گره به‌کار گرفته شدند.

تعیین بهترین محیط کشت

به‌منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت جهت ریزازدیادی گیاه پیپنو، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل (با آرایش ۴×۲) شامل دو فاکتور محیط کشت و زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و پنج تکرار (هر تکرار حاوی ۴ ریزنمونه) طراحی گردید. بدین‌منظور در زیر هود استریل ریزنمونه‌های تک گره به‌طول ۱۰ میلی‌متر حاوی جوانه از گیاهان مادری جدا شده و بر روی محیط کشت‌ها مختلف (MS، ½ MS، SH (شنک و هیلدبرانت[2]) و B_5 گامبورگ[3]) کشت گردید. ارزیابی اثر محیط کشت بر تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ در طی زمان‌های دو و چهار هفته پس از کشت ریز نمونه‌ها بررسی شد.

مرحله پرآوری

جهت بررسی تأثیر بنزیل آدنین (BA)[4] و کینتین (Kin)[5] بر پرآوری شاخساره در محیط پایه‌ی MS، BA با غلظت‌های نیم، یک و دو میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت‌های نیم، یک و دو میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین BA به تنهایی با غلظت‌های دو، چهار و شش میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. قبل از اتوکلاو کردن pH محیط کشت بر روی ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های حاوی تک گره در زیر هود استریل به محیط کشت انتقال یافتند. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سیزده تیمار و پنج تکرار که تعداد مشاهده در هر تکرار ۴ ریزنمونه بود انجام گردید. شاخص های کمی ازجمله تعداد شاخساره القا شده، طول شاخساره، تعداد برگ، طول برگ) و

1- Murashige and Skoog
2- Schenk and Hildebrandt (SH)
3- Gamborg (B5)
4- Benzyl adenine (BA)
5- Kinetin (Kin)

www.SID.ir

Archive of SID

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

مرحله ریشه‌زایی

جهت تعیین بهترین ترکیب و مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده‌های رشدی گیاهی جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پیپینو، شاخساره هایی با طول پنج سانتی‌متر از محیط پرآوری شاخه جدا شده و به ظروف مربایی حاوی ۳۵ میلی‌لیتری از محیط MS فاقد هورمون (به‌عنوان شاهد) و محیط MS غنی شده با ایندول بوتریک اسید[1] (۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) یا نفتالین استیک اسید[2] (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. چهار شاخچه در هر شیشه مربایی (به‌عنوان یک تکرار) کشت گردید. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید و شاخص‌های رشدی مرتبط با ریشه‌زایی از جمله تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه و همچنین کیفیت ریشه در زمان چهار هفته پس از کشت ارزیابی شد. گیاهچه های ریشه‌دار شده که دارای وضعیت رشدی مناسبی بودند از محیط کشت خارج و پس از شستن ملایم ریشه‌ها با آب مقطر و حذف کامل آگار از محیط اطراف ریشه، برای گذراندن مرحله سازگاری به سه نوع محیط کشت پیت + ماسه (با نسبت مساوی)، پیت + پرلایت (با نسبت مساوی) و یا پیت خالص منتقل شدند (شکل ۵)و پس از گذشت دو هفته به مرور پلاستیک های کشیده شده بر روی آن ها قیچی شد تا کم کم با هوای گلخانه گیاهان سازگار شوند. درنهایت بعد از یک ماه به گلدان های بزرگتر بدون روکش مطابق شکل ۶ منتقل شدند و درصد سازگاری گیاهان بعد از دوماه محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

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

نتایج و بحث

بررسی محیط کشت‌ها

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

براساس نتایج، نوع محیط کشت در میزان موفقیت تکثیر کشت بافت پیپینو نقش مهمی داشت و همه‌ی فاکتورهای مورد بررسی تحت تأثیر نوع محیط کشت قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ریزنمونه‌ها از نظر تعداد شاخساره در محیط کشت MS نسبت به سه محیط کشت دیگر واکنش بهتری نشان دادند و بیش‌ترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS به‌دست آمد، در حالی‌که بیش‌ترین طول شاخساره مربوط به محیط MS ½ بود که تفاوت معنی‌داری را نسبت به محیط B5[3] نشان داد (جدول ۲). همچنین بیش‌ترین تعداد ریشه و طول ریشه به‌ترتیب مربوط به محیط کشت های MS و MS ½ بود. از نظر تعداد برگ بین محیط کشت‌های MS، MS ½ و B5 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تنها کاهش معنی‌داری در محیط SH[4] مشاهده شد، در حالی‌که بیش‌ترین طول برگ در محیط کشت MS حاصل گردید که منجر به بروز اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط کشت‌های دیگر گردید (جدول ۲). درمجموع نتایج این آزمایش نشان داد که در بین محیط کشت‌های مورد بررسی، بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک گره پیپینو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS می‌باشد (جدول ۲).

هرچند مطالعات زیادی در مورد ریزازدیادی و به‌ویژه در مورد تأثیر و مقایسه‌ی محیط کشت های مختلف بر کشت درون شیشه‌ای پیپینو وجود ندارد، با این وجود در بیش‌تر پژوهش‌های انجام گرفته بر روی پیپینو (۲، ۶، ۱۳، ۲۵ و ۲۷) همواره محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده در این آزمایش مبنی بر برتری محیط کشت MS در مقایسه با دیگر محیط کشت‌های با نتایج هدایت و خوشخوی (۱۱) روی گیاه پیپتروم مطابقت دارد؛ این محققین با بررسی محیط کشت‌های مختلف (MS، SH و B5) بر ریزافزایی گیاه پیپتروم[5] بیان کردند که بیش‌ترین تعداد، طول و وزن تر شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاصل گردیده که منجر به برتری این محیط کشت در مقایسه با محیط کشت‌های SH و B5 شده است، و دلیل این امر را بهینه‌تر بودن محیط کشت MS و به‌عبارتی مناسب‌تر بودن نمک‌های تشکیل دهنده‌ی محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر ذکر کردند (۱۱). محیط کشت

1- Indole-3-butyric acid (IBA)
2- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

3- Gamborg et al.
4- Schenk and Hilderbrandt
5- *Tanacetum cinerariaefolium*

www.SID.ir

Archive of SID

MS از نظر چندین نمک معدنی پرمصرف از جمله نیترات و آمونیوم غنی‌تر می‌باشد. بنابراین مناسب‌تر بودن و رشد بیش‌تر ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS نسبت به سایر محیط کشت ها احتمالاً ناشی از نیاز بیش‌تر پرآوری شاخه و رشد شاخه پیینو به غلظت بالاتر نمک‌ها در این محیط کشت MS می‌باشد (۸ و ۱۸).

جدول ۱- تأثیر زمان نمونه‌برداری بر برخی شاخص‌های مختلف رشدی پیینو در شرایط درون شیشه‌ای
Table 1- Effect of sampling time on some growth parameters of pepino *in vitro*

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

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p\leq0.05$.

جدول ۲- اثر محیط کشت‌های مختلف بر برخی شاخص‌های رشدی پیینو در شرایط درون شیشه‌ای
Table 2- Effect of different tissue cultures on some growth parameters of pepino *in vitro*

محیط کشت Tissue culture medium	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (mm)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (mm)
MS	1.35[a]	6.41[ab]	2.49[a]	18.84 [a]	4.03[a]	14.99[a]
½ MS	1.16[b]	7.84[a]	1.96[b]	20.35[a]	3.96[a]	11.42[b]
SH	1.05[bc]	6.22[ab]	1.59[bc]	13.15[ab]	2.33[b]	6.39 [c]
B5	0.92[c]	5.45[b]	1.21[c]	7. 01[b]	4.10[a]	10.93[b]

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p\leq0.05$.

تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون سیتوکنین جهت پرآوری ریزنمونه

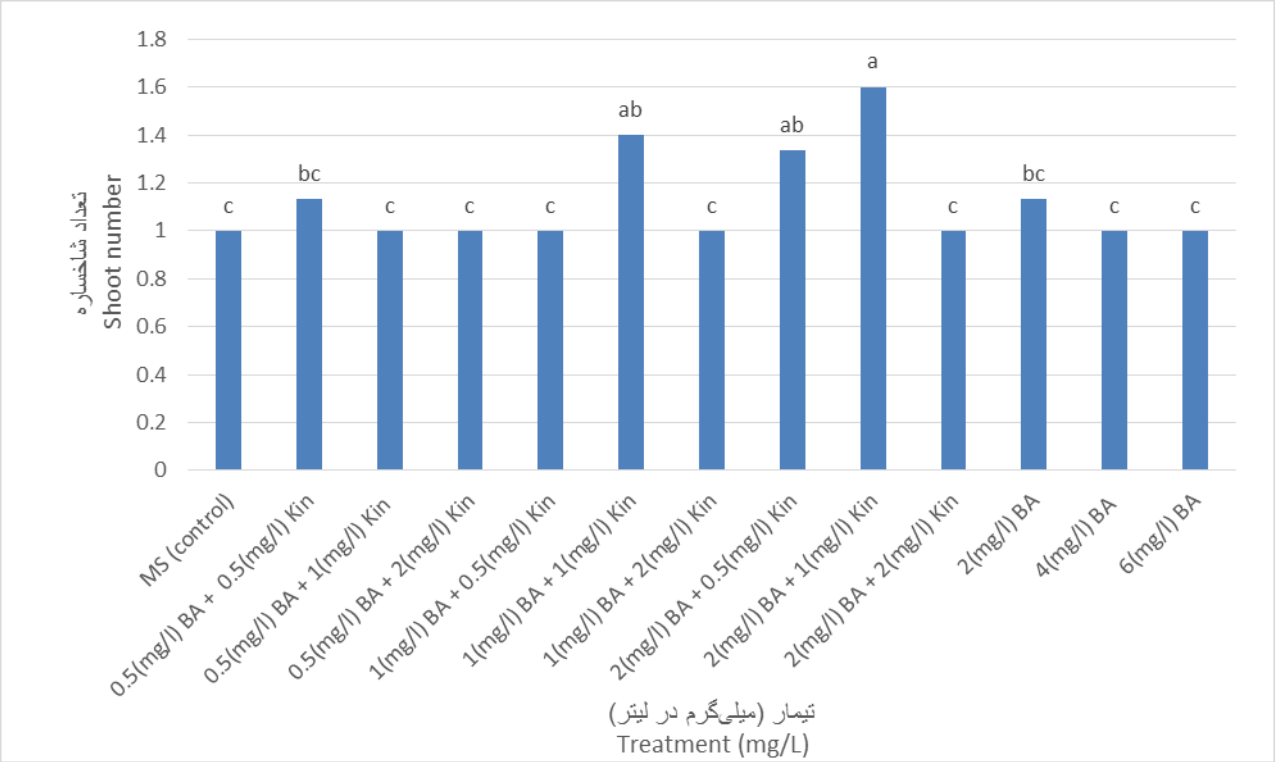
بررسی نوع هورمون سیتوکنین بر میزان پرآوری ریزنمونه تک گره پیینو نشان داد که شاخص‌های مختلف رشدی تحت تأثیر نوع هورمون سیتوکنین قرار گرفت و غلظت بهینه‌ی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای تولید شاخساره‌های نابه‌جا بین تیمارها متفاوت بود. بهترین ترکیب جهت باززایی شاخساره، محیط کشت MS غنی‌شده با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin بود (1Kin+2BA)، هر چند از نظر آماری با دو تیمار (2BA+0.5Kin) و (1BA+1Kin) تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱).

بیش‌ترین طول شاخساره القا شده در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با دو میلی‌گرم در لیتر Kin (1BA+2Kin) به‌دست آمد که منجر به بروز اختلاف معنی‌داری نسبت به بقیه تیمارها گردید، در حالی که کم‌ترین طول شاخساره مربوط به تیمار شاهد (MS؛ بدون کاربرد هورمون BA و Kin) بود (شکل ۲). به‌طور کلی نتایج نشان داد که برای القای شاخه‌زایی در ریزنمونه تک گره پیینو و همچنین افزایش طول شاخه القا شده به دو نوع هورمون BA و Kin نیاز می‌باشد که براساس نتایج با افزایش غلظت BA تا سطح دو میلی‌گرم در لیتر روند افزایشی در پرآوری ریزنمونه مشاهده شد.

براساس نتایج، بیش‌ترین تعداد برگ در ریزنمونه، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره در محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin) به‌دست آمد، در حالی‌که بیش‌ترین میزان طول برگ مربوط به تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin (1BA+1Kin) بود که موجب بروز اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر تیمارهای اعمال شده گردید (جدول ۳). در مجموع، بهترین ترکیب سایتوکنین جهت پرآوری شاخه پیینو در محیط کشت MS، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin بود که منجر به بروز اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها شد.

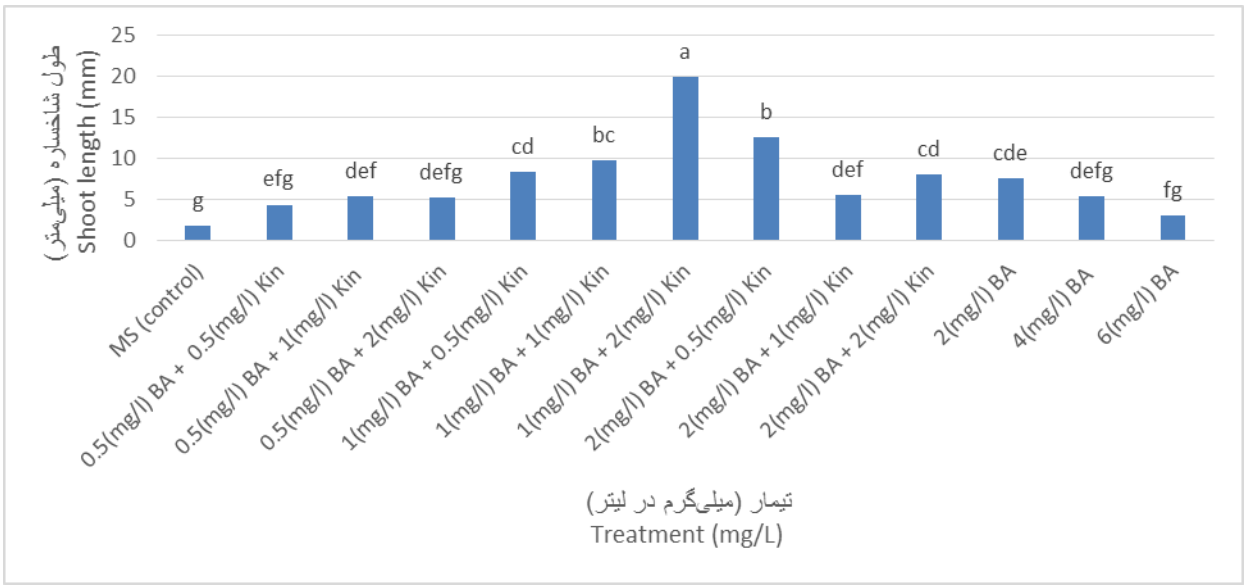
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر تعداد شاخساره در هر ریزنمونه پپینو در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 1- Effect of different treatments of BA and Kin on number of shoots per explant of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر طول شاخساره پپینو در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 2- Effect of different treatments of BA and Kin on shoot length of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p\leq 0.05$.

پاسخ مورفوژنیک ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر اجزای مختلف محیط کشت از جمله غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی قرار می‌گیرد (۱۰). نتایج پژوهش حاضر در مورد غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که افزایش غلظت BA در سطح بالاتر از دو میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS منجر به کاهش پرآوری شاخه پپینو نسبت به غلظت دو میلی‌گرم در لیتر می‌شود، که این امر می‌تواند به‌دلیل مضر بودن مقادیر بیش از اندازه BA برای رشد شاخساره‌ها و همچنین نامناسب شدن شرایط کشت باشد (۲۰)، که نهایتاً سبب کاهش میزان پرآوری و میزان رشد شاخساره‌های القا شده می‌شود. براساس نتایج، میزان رشد شاخساره القا شده در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin)؛ به‌عنوان بهترین تیمار از نظر تعداد شاخساره) به‌میزان بسیار کم بود (شکل ۳). به‌عبارتی دیگر، طول شاخساره در این تیمار تنها از شاخساره‌های تیمار شاهد بیش‌تر بود، که این کاهش میزان رشد می‌تواند به‌دلیل تعداد زیاد شاخساره تولید شده باشد که سبب کاهش طول شاخساره شده است. مشخص شده است که در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های باززایی شده افزایش می یابد به دلیل استفاده آن‌ها از هورمون‌ها و موادغذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های باززایی شده در این محیط‌ها از رشد کم‌تر برخوردار می‌باشند (۱۴).

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

تیکلت و همکاران (۳۸) با کاربرد سیتوکنین‌های مختلف به تنهایی یا در ترکیب با هم در محیط کشت MS بیان کردند که بیش‌ترین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه و بلندترین طول شاخه مربوط به محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA بوده است. هورمون BA برای تکثیر گونه‌های مختلف گیاهی از طریق کشت بافت به‌کار می‌رود و در برخی از مطالعات در اثر کاربرد BA نتایج مطلوب‌تری نسبت به سایر سایتوکنین‌ها حاصل شده است؛ از جمله گزارش شده است که تأثیر BA بر رشد توت فرنگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به Kin و TDZ بهتر بوده است (۹). از طرف دیگر نیز گزارش‌هایی مبنی بر کارایی بهتر Kin در مقایسه با سیتوکنین‌های دیگر نیز در دسترس می‌باشد، که در این مورد می‌توان به نتایج بررسی ریزنمونه‌های تک گره تاجریزی[1] روی محیط MS غنی شده با غلظت‌های مختلف Kin و BAP اشاره کرد که در این پژوهش مشخص شده است Kin در پرآوری شاخه و همچنین افزایش تعداد شاخه در هر ریزنمونه مؤثرتر از BAP بوده است (۲۳).

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبنی بر تأثیر مثبت کاربرد ترکیب دو سیتوکنین (BA و Kin) در پرآوری شاخه با نتایج گزارش شده در استویا[2] (۱) و توت فرنگی (۳۳) مطابقت دارد. به‌طوری‌که بیش‌ترین القای شاخه ریزنمونه استویا در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمده است (۱). همچنین ساکیلا و همکاران (۳۳) جهت تکثیر درون شیشه‌ای توت فرنگی از قطعات گره ساقه به‌منظور پرآوری شاخه بر روی محیط کشت MS غنی شده با غلظت‌های مختلف BA به همراه Kin یا در ترکیب با GA_3 استفاده کردند و بیان کردند که بیش‌ترین پرآوری شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شده است. درمجموع تأثیر مثبت سایتوکینین‌ها در پرآوری ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای می‌تواند به‌دلیل نقش مثبت سایتوکینین‌ها در اندام‌زایی و تسریع در تقسیم سلولی باشد. همچنین افزایش تعداد شاخساره درنتیجه کاربرد BA می‌تواند به‌دلیل کاهش چیرگی انتهایی در اثر کاربرد BA باشد که نهایتا منجر به افزایش تعداد شاخساره شده است (۱۴).

تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون اکسین جهت ریشه‌زایی ریزنمونه

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

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

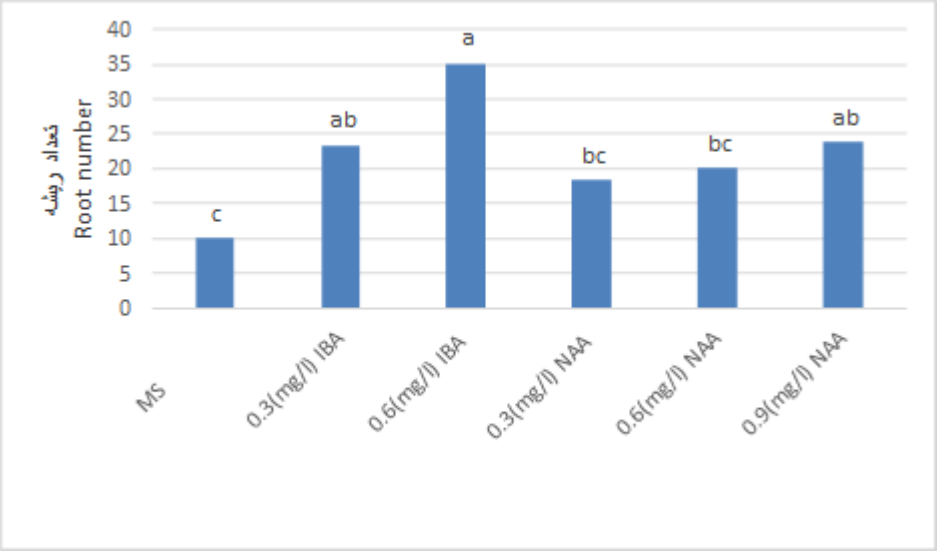
1- *Solanum nigrum*
2- *Stevia rebaudiana* Bertoni

www.SID.ir

Archive of SID

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

به‌خوبی مشخص شده است که نوع و غلظت اکسین مورد استفاده، به‌طور قابل ملاحظه‌ای درصد ریشه‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با بررسی ریزازدیادی فلفل دلمه‌ای بیان شده است که نوع هورمون و غلظت‌های مختلف آن تأثیرات متفاوتی بر پارامترهای رشدی مختلف از جمله تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده داشته است (۲۲). مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش آتکینسونوگاردنر (۲) شاخه‌های حاصل از ریزازدیادی جوانه انتهایی پیینو را پس از انتقال به محیط کشت MS غنی شده با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار نمودند.



شکل ٤- تأثیر تیمارهای مختلف اکسین بر تعداد ریشه در هر ریزنمونه پیینو

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

شکل ٥- ریزنمونه‌ی ریشه‌دار شده پیینو در تیمار ۰/٦ میلی‌گرم بر لیتر IBA

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- تأثیر تیمارهای مختلف بر طول بلندترین ریشه و کیفیت ریشه پیپینو

Table 4- Effect of different treatments on the longest root length and root quality of pepino

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

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p\leq 0.05$.

همچنین پادماپیرا و همکاران (۲۳) با بررسی غلظت‌های مختلف IBA و 2-4-D بر ریشه‌دهی تاجریزی[1] بیان کردند که هر چند هر دو نوع اکسین تأثیر مثبتی در القا ریشه داشتند ولی با این وجود IBA نسبت به 2-4-D بر ریشه‌زایی مؤثرتر بوده و بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی IBA تولید شده است.

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

افزایش تعداد ریشه در اثر کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در توت فرنگی (۳۳) و همچنین افزایش طول ریشه در نتیجه کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در فلفل دلمه‌ای (۲۲) مطابقت دارد. IBA برای تحریک آغازش ریشه در کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۲۴). به‌طوری‌که نتایج مطلوبی در نتیجه کاربرد IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌های فلفل در محیط کشت پایه MS گزارش شده است (۱۵ و۳۵). نتایج نشان داد که NAA تأثیر معنی‌داری بر کیفیت ریشه نداشته است که با نتایج گزارش شده در پیپینو (۶) مبنی بر تولید با کیفیت‌ترین ریشه‌ها در اثر کاربرد غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA مطابقت ندارد.

در محیط MS تجهیز شده با سطوح مختلف NAA اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از صفات سرعت پرآوری، تعداد شاخه‌ها، طول شاخه، میزان ریشه‌دهی و کالوس‌دهی ریزنمونه پیپینو مشاهده نشد و تنها غلظت دو میلی‌گرم در لیتر NAA موجب بیش‌ترین طول ریشه در هر ریزنمونه شده است (۶). ساباتینی و همکاران (۳۱) گزارش کردند که تمایز آغازه‌های ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده بستگی دارد. همچنین مشخص شده که سلول‌های تمایزیافته جهت پاسخ‌دهی به علایم و سیگنال‌های ارگانوژنیک به نوع و غلظت مناسبی از اکسین نیاز دارند (۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که واکنش ریزنمونه‌های پیپینو به کاربرد IBA نسبت NAA بیش‌تر بوده است. تجزیه نوری تنظیم کننده‌های رشد گیاهی یکی از فاکتورهای مهم در کشت بافت می‌باشد؛ تجزیه نوری IBA بسیار کندتر از اکسین‌های دیگر از جمله IAA می‌باشد. حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیرهنگام آن را به‌عنوان دلایل اصلی کارایی بهتر IBA نسبت به دو اکسین NAA و IAA ذکر کرده‌اند (۴۱). همچنین تأثیرگذاری بیش‌تر IBA نسبت به NAA می‌تواند ناشی از تفاوت در حساسیت بافت گیاهی به نوع تنظیم کننده‌ی رشد باشد (۳۹). نتایج حاصل از سازگاری گیاهان نیز نشان داد که گیاهان کشت شده در سه محیط پیت+ماسه، پیت+پرلایت و پیت خالص به ترتیب درصد سازگاری ۹۱/۶۶، ۴۲/۸۶ و ۸۴/۳۷ درصدی نشان دادند که بیانگر برتری محیط کشت پیت+ماسه جهت سازگاری گیاهچه‌های پیپینو نسبت به محیط‌های دیگر بوده است (شکل ۶).

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

1- *Solanum nigrum*

www.SID.ir

Archive of SID

زدن توصیه می‌گردد.

A B

شکل ٦- انتقال گیاهان ریشه‌دار شده در محیط کشت بافت به مخلوط‌های خاکی (A)، گیاهان سازگار شده در گلدان‌های حاوی پیت و ماسه (B)

Figure 6- (A)Transferring *in vitro* rooted plants to the soil mixures, (B)Acclimatized plants in pots were filling with pit and sand

منابع

1- Ahmed M.B., Salahin M., Karim R., Razvy M.A., Hannan M.M., Sultana R., Hossain M., and Islam R. 2007. An efficient method for in vitro clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2: 121-125.

2- Atkinson R.G., and Gardner R.C. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 10: 208-212.

3- Bermejo J.E.H., and León J. 1994. Neglected crops: 1492 from a different perspective (No. 26). Food and Agriculture Org.

4- Blakesley D., and Chaldecott M.A. 1997. The role of endogenous auxin in root initiation. Plant Growth Regulation 13: 77-84.

5- Blanca J.M., Prohens J., Anderson G.J., Zuriaga E., Cañizares J., and Nuez F. 2007. AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): implications for evolution and domestication. American Journal of Botany 94: 1219-1229.

6- Cavusoglu A., and Sulusoglu M. 2013. In vitro propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). Journal of Food Agriculture Environment 11:410-415.

7- Contreras C., González-Agüero M., and Defilippi B.G. 2016. A review of pepino (*Solanum muricatum* Aiton) fruit: a quality perspective. HortScience 51: 1127-1133.

8- Devi C.S., and Srinivasan V.M. 2008. In vitro propagation of Gymnema sylvestre. Asian Journal of Plant Sciences 7: 660-665.

9- Emarah 2008. Factors affecting propagation of strawberry (Fragaria spp.) through tissue cultures. International Journal of Product Development 13: 191-212.

10- Gamburg K.Z., and Semenova L.A. 1977. Clonal propagation, flowering and fruiting of tomato in vitro. Acta Horticulture 447: 147-148.

11- Hadayat M., and Khoushkhoui M. 2006. Effects of culture media and growth regulators on micropropagation of pyrethrum [*Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir) Schultz–Bip.]. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 4: 171-182. (In Persian).

12- Hrbans L., Hankins A., Mebrahtu T., Mullins J., and Rangappa M. 1996. Alternative crops research in Virginia, Progress in new crops. ASHS press, P: 87-96.

13- Jordan M., Obando M., Iturriaga L., Goreux A., and Velozo J. 1993. Organogenesis and regeneration of some Andean fruit species. Acta Horticulturae 336: 279-283.

14- Kojori F., Kiani G., Nematzadeh G.A., and Ghasemi Y. 2015. Effects of different growth regulators on in vitro direct shoot regeneration of strawberry cv. diamante (*Fragaria x ananassa* Duch.). Journal of Crop Breeding 7: 68-75.

15- Mohamed M.H., and Alsadon A.A. 2011. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. Biologia Plantarum, *55*, p. 370.

16- Mohan L., Paranidharan V., and Murugesan R. 2000. New records - on pepino (*Solanum muricatum*). Indian Phytopathology 53: 495-497.

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 467-479
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۴۷۹-۴۶۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

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

M. Aghdaei[1]- S.H. Nemati[2*]- L. Samiei[3]- A. Sharifi[4]

Received: 09-12-2018
Accepted: 22-09-2019

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

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

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

1 and 2- Ph.D. Graduate and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: Nemati@um.ac.ir)
3- Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Assistant Professor, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

www.SID.ir