بررسی پایداری ژنتیکی گیاهان حاصل از جنین زایی سوماتیکی خربزه (*Cucumis melo* L.) با استفاده از فلوسایتومتری

محمدرضا راجی[۱و*]، محمود لطفی[۲]، مسعود توحیدفر[۳]، فرانچسکو کریمی[۴]، لردانا آبت[۵]، آنجلا کارا[۵]

[۱]دانشجوی دکترای علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[۲]دانشیار و عضو هیئت‌علمی گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[۳]دانشیار و عضو هیئت‌علمی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی تهران

[۴]رئیس و عضو هیئت‌علمی موسسه تحقیقاتی CNR ایتالیا واحد پالرمو

[۵]استاد و عضو هیئت‌علمی موسسه تحقیقاتی CNR ایتالیا واحد پالرمو

*نویسنده مسئول: r.raji@ut.ac.ir

چکیده

پایداری ژنتیکی (تفاوت اندازه ژنوم و تغییرات کروموزومی) گیاهان حاصل از فرآیند جنین زایی نسبت به گیاه مادری (به‌عنوان گیاه استاندارد) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری دردو رقم خربزه (‘خاتونی’ و ‘سوسکی سبز’) مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای نخستین بار جنین زایی ریزنمونه‌های لپه بذری خربزه درون محیط کشتی پایه MS حاوی ترکیب هورمونی NoA (۴۰۰ میکروگرم در لیتر) و BAP (۲۰۰ میکروگرم) انجام و اثرات این ترکیب هورمونی در جنین زایی سوماتیکی و در پی آن ایجاد تغییرات پلوییدی در زمان جنین‌زایی، مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیب هورمونی باعث جنین زایی مطلوبی در دو رقم ‘سوسکی سبز’ (۶۵٪) و ‘خاتونی’ (۴۳٪) شد. ۱۵ گیاه باززا شده به‌صورت تصادفی انتخاب و سطوح پلوییدی آن‌ها در دو روز متفاوت و هر بار در سه تکرار با استفاده از فلوسایتومتری مورد مقایسه قرار گرفت. پایداری ژنتیکی بالایی در گیاهان باززا شده نسبت به گیاه مادری (دیپلویید) مشاهده شد و تنها ۷٪ گیاهان بدست آمده از رقم ‘سوسکی سبز’ حالت تتراپلوییدی نشان داد و رقم ‘خاتونی’ به‌طور کامل شبیه گیاه مادری بود که این ثبات نشان می‌داد این روش جنین‌زایی روشی مناسب برای باززایی خربزه می‌باشد.

کلمات کلیدی: **باززایی گیاهان، ترکیب هورمونی، گیاه مادری، گیاه استاندارد، تغییرات کروموزومی، سطح پلوییدی**

کلمات مخفف: MS: موراشیک و سگوک، NoA: بتانفتوکسی استیک اسید (بدون اسید)، BAP: بنزیل آمینوپورین

مقدمه

ملون (*Cucunis melo* L) یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین سبزی‌های میوه‌ای است که به علت تنوع بالا در هشت زیرگونه تقسیم می‌شود. از مهم‌ترین ملون‌ها خربزه می‌باشد که در زیرگونه *reticulatus* قرار گرفته است (Sebastiani and Nadia Ficcadenti, 2016). چن (۲۰۰۲) منشأ خربزه را ایران معرفی نموده و مقاومت نسبی به شوری و خشکی یکی از دلایل اصلی کشت گسترده ملون در ایران می‌باشد (Sohrabikertabad *et al*., 2013). ایران با تولید ۱۴۵۰ میلیون تن رتبه سوم تولید دنیا را به خود اختصاص داده است (FAO 2012). ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی با وجود طعم و مزه مطلوب نسبت ارقام دیگر دنیا نسبت به استرس‌های زیستی مانند بیماری‌های قارچی دارای حساسیت بالا می‌باشد (Feyzian *et al*., 2009). خربزه‌های سوسکی سبز و خاتونی از ارقامی است که سطح کشت بالایی در ایران دارند. سوسکی سبز دارای قند و نسبت گوشت بالایی است و بیشتر در ایوانکی سمنان کشت می‌شود و خاتونی نیز که دارای قند بالایی است بیشتر در نواحی خراسان و اصفهان کشت می‌شود. استفاده سموم شیمیایی به دلیل آلودگی زیست‌محیطی و روش‌های کلاسیک نیز به علت ناسازگاری درون و بین‌گونه‌ای راهکارهایی نامناسب برای کنترل بیماری‌ها می‌باشند (Bezirganoglu *et al*., 2013) و لذا باعث روی

آموردن اصلاح گران به روش‌های بیوتکنولوژی به‌ویژه تراریختی که از روش‌های مؤثر و کوتاه‌مدت می‌باشد شده است (Vengadesan *et al*., 2004). یکی از عوامل موفقیت در بدست آوردن گیاه تراریخت، روش‌های باززایی کارآمد در سیستم کشت بافتی است. یکی از روش‌های باززایی مناسب که فاقد اثرات منفی تولید شیمر و تنوع سوماکلونال در روش‌های باززایی مستقیم می‌باشد، جنین زایی است. هکتور و همکاران (۲۰۰۶) افزایش سطح پلوییدی ملون‌ها را طی جنین زایی گزارش و ترکیبات هورمونی را عامل مهمی در این تغییرات معرفی نموده‌اند. محتوای DNA و سطوح پلوییدی در گیاهان مختلفی مانند خیار(Plader *et al*., 1998)، گیلاس (Vujovic *et al*., 2012) و آرابیدوپسیس (Orzechowska *et al*., 2016) با استفاده از فلوسایتومتری اندازه‌گیری شده است. مطالعات کمی در مورد استفاده از فلوسایتومتری جهت بررسی پایداری ژنتیکی خربزه و دیگر زیرگونه‌های ملون مانند *inodorus* (Ren *et al*., 2013) و *cantaloupensis* (Lotfi *et al*., 2003, Sebastiani and Ficcadenti., 2016) وجود دارد. لذا تحقیق حاضر به بررسی اثرات ترکیب هورمونی جدید بر روی ثبات ژنتیکی دو رقم خربزه ایرانی طی فرآیند جنین زایی سوماتیکی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جنین زایی ریز نمونه‌های بذر لپه خربزه در محیط کشتی پایه MS حاوی ترکیب هورمونی NoA (۴۰۰ میکروگرم در لیتر) و BAP (۲۰۰ میکروگرم) انجام شد و اثرات این ترکیب هورمونی بر تغییرات پلوییدی گیاهان حاصل از جنین زایی، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از سیستم فلوسایتومتری (FCM) محتوای نسبی DNA سلول‌های برگی ۱۵ گیاه باززا شده از دو رقم خربزه 'سوسکی سبز' و 'خاتونی' با گیاه مادری آن‌ها به‌عنوان گیاه استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. آنالیز با استفاده از فلوسایتومتری Partec PAS (Partec, http://www.partec.de/) مجهز شده به لامپ جیوه ای HBO 100-W و یک آینه (TK420) انجام شد. نمونه‌های برگی در ۴۰۰µl محلول استخراج DNA (Partec solution CyStain® UV Precise P, 250 tests) خرد و سپس توسط فیلترهای ۳۰ µm (Partec) مورد تصفیه قرار گرفت. در ادامه ۱/۴ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی حاوی دای 4,6-diamidino-2-phenylindole به آن اضافه و نمودار میزان DNA هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار Partec (FloMax®) محاسبه و رسم شد. آنالیز FCM هر نمونه آزمایشی در سه تکرار در دو روز متفاوت انجام شد.

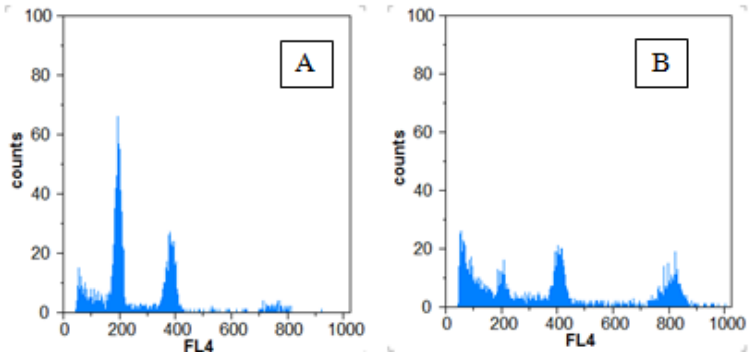
نتایج و بحث

با وجودیکه میزان جنین زایی رقم سوسکی به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم 'خاتونی' است ولی درمجموع ترکیب هورمونی مورد استفاده تأثیرات مطلوب و مناسبی بر جنین زایی خربزه نشان دادند.

جدول- درصد جنین زایی در محیط MS پایه حاوی ترکیب هورمونی NoA و BA

	درصد جنین زایی(%)
'خاتونی'	۴۳ b
'سوسکی سبز'	۶۵ a

پیک‌های بدست آمده از کانال ۲۰۰ فلوسایتومتری نشان داد به‌استثنای یک گیاه باززا شده از رقم 'سوسکی سبز' (شکل B) تمام گیاهان حاصل از جنین زایی در دو رقم خربزه همپوشانی کاملی با گیاه مادری خود دارند (شکل A). افزایش سطح دیپلوییدی به تتراپلوییدی (۷٪) در رقم 'سوسکی سبز' مشابه تحقیقات هکتور و همکاران (۲۰۰۶) می‌باشد که بر روی ملون‌ها انجام داده بودند. با وجود این افزایش، روش جنین زایی مورد استفاده پایداری ژنتیکی بالایی برای خربزه نشان می‌دهد و آن را برای کارهای کاربردی و تحقیقاتی آینده مناسب می‌داند.



شکل (A وB) تعیین سطح پلوییدی گیاهان حاصل از جنین زایی خربزه با مقایسه هم‌زمان DNA برگی گیاه باززا شده و گیاه مادری با استفاده از فلورسنس نسبی (FL4) بدست آمده از فلوسایتومتری A- همسان بودن گیاه باززا شده و گیاه مادری B- متفاوت بودن گیاه باززا شده و گیاه مادری

منابع

Bezirganoglu, I., Hwang, S.Y., Shaw J.F., Fang T.J. 2014. Efficient production of transgenic melon via *Agrobacterium*-mediated transformation. Genet Mol Res; 13:3218–3227.

FAO State; **2012.**

Feyzian, E., Dehghani, H., Rezai, A.M., Javaran, M.J. 2009. Diallel cross analysis for maturity and yield-related traits in melon (*Cucumis melo* L.). Euphytica; 168:215–223.

Hector, G.N.P., Daniel, J.C., Don, J.H., Ciardi, J., Harry, J.K. 2006. Transformation of a muskmelon 'Galia' hybrid parental line (*Cucumis melo*L. var.*reticulatus* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. Plant Cell Rep; 25: 198–205.

Lotfi, M., Alan, A.R., Henning, M.J., Jahn, M., Earle, E.D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep; 21: 1121-1128.

Orzechowska, M., Gurdek, S., Siwinska, D., Piekarska-Stachowiak., A. 2016. Cytogenetic characterization of the *Arabidopsis thalianana*tural tetraploid ecotype Warschau stability during in vitro regeneration. Plant Cell Tiss Organ Cult; 126:553–560.

Plader, W., Malepszy, S., Burza, W., Rusinowski, Z. 1998. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica; 103: 9–15.

Ren, Y., Bang, H., Lee, E.J., Gould, J., Rathore, K.S., Patil, B.S., Crosby, K.M. 2013. Levels of phytoene and b-carotene in transgenic honeydew melon (*Cucumis melo* L.inodorus). Plant Cell Tiss Organ Cult; 113:291–301.

Sebastiani MS, Ficcadenti N (2016) In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var.cantalupensisand genetic stability evaluation using RAPD analysis. Plant Cell Tiss Organ Cult; 124:69–79

Sohrabikertabad, S., Ghanbari, A., Mohassel, H.R., Mahalati, M.N., Gherekhloo, J. 2013. Effect of desiccation and salinity stress on seed germination and initial plant growth of *Cucumis melo*. Planta daninha; 3:833-841.

Vengadesan, G., Anand, R.P., Selvaraj, N., Perl-Treves, R., Ganapathi, A. 2004. Transfer and Expression of nptii and bargenes in cucumber (*Cucumis Sativus* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant; 41:17–21.

Vujovic, T., Cerovic, R., Ruzic., D. 2012. Ploidy level stability of adventitious shoots of sour cherry 'Cacanski Rubin' and Gisela 5 cherry rootstock. Plant Cell Tiss Organ Cult; 111:323–333.

Assessment of Genetic Stability in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Derived from Somatic Embryogenesis using Flow Cytometery

Mohammad Reza Raji[1], Mahmoud Lotfi[2*], Masoud Tohidfar[3], Francesco Carimi[4], Loredana Abbate[5], Angela carra[5]

[1]PhD Student of Horticulture Sciences, Department of Horticulture, University of Tehran
[2]Professor (Associate), of Horticulture Sciences, Department of Horticulture, University of Tehran
[3]Professor (Associate) of Plant Biotechnology, University of Shahid Beheshti
[4]Head of the Palermo Division of the IBBR/CNR
[5]Researcher of the Palermo Division of the IBBR/CNR
[*]*Corresponding Author:* mlotfi@ut.ac.ir

Abstract

Genetic stability (genome size difference and chromosome changes) of plants derived from embryogenesis phenomena of two muskmelon cultivars (Khatooni and Suski Sabz) was compared with mother plant using Flow Cytometery System. For the first time somatic embryogenesis were generated from seed explants in vitro culture medium based MS supplemented with beta-Naphthoxyacetic acid Free acid (NoA) Auxin and N6-benzylaminopurine (BAP) cytokinin and efficiency of embryogenesis measured in two muskmelon cultivars Suski Sabz (65%) and khatooni (43%), following poloidy levels were assessed. 15 derived plants were randomly selected and their poloidy changes were compared with mother plants (as standard plant) by three replications for two different days via Flow Cytometery. The high genetic fidelity of regenerants in two cultivar Suski sabz (93%) and Khatooni (100%) indicated this embryogenesis method is a suitable way for muskmelon regeneration.

***Keywords*: plants regeneration, hormone component, mother plant, standard plant, chromosome changes, poloidy levels**

***Abbreviations*: MS: Murashige and Skoog, NoA: beta-Naphthoxyacetic acid Free acid, BAP: N6-benzylaminopurine**