



## Investigating the genetic stability of clones obtained from the micropropagation of lateral buds of watermelon under in vitro culture conditions

Mazandarani SH, Garoosi GH<sup>\*</sup>, Haddad R

<sup>a</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, ImamKhomeini Internatunal University (IKIU), Qazvin, 3414896818, I.R.Iran.

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Mazandarani SH, Garoosi GH, Haddad R. Investigating the genetic stability of clones obtained from the micropropagation of lateral buds of watermelon under in vitro culture conditions. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(2):200-227.

<https://doi.org/10.61882/JCT.200>

### KEYWORDS

Primer  
Growth regulators  
Polymorphism  
Genetic similarity  
ISSR marker

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** The construction of synthetic pathways within the framework of metabolic engineering is considered a modern approach in biotechnology, enabling the production of valuable compounds from natural biological resources. This strategy focuses on utilizing abundant biomaterials—particularly carbohydrates—for the industrial production of chemical compounds by modifying metabolic pathways in microorganisms. These processes can convert biomass derived from biological sources into fuels, chemicals, and polymers, thereby opening new opportunities for the sustainable production of chemical substances from renewable resources.

**Aim:** This study specifically focuses on the enzymatic production of benzoylformate decarboxylase (BFD) with the overarching goal of completing the enzymatic pathway for the biosynthesis of BT. This intricate pathway initiates with xylose as the primary carbon source and proceeds through a cascade of four distinct enzymatic reactions. Notably, *Escherichia coli* (*E. coli*), possessing two endogenous enzymes integral to this pathway, holds the potential for complete BT biosynthesis upon the introduction of the remaining two requisite genes. This research thus seeks to engineer *E. coli* as a robust biocatalyst for sustainable BT production. The strategic implementation of a fully functional enzymatic pathway within a well-characterized microbial host, such as *E. coli*, promises a more environmentally benign and potentially more

\* Corresponding author. Tel +982833901239 Fax: +982833780074

E-mail address: [garoosi@eng.ikiu.ac.ir](mailto:garoosi@eng.ikiu.ac.ir)

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.200>

Received: 22 Sep. 2024.; Received in revised form: 22 May. 2025; Accepted: 7 Jun. 2025

Article Type:

©Author



efficient route to BT synthesis compared to traditional chemical methods. Furthermore, the ability to manipulate and optimize the expression of these key enzymatic components within *E. coli* offers opportunities to enhance the overall yield and productivity of the bioproduction process. The successful establishment of such a system could pave the way for large-scale, cost-effective, and sustainable production of this valuable chemical intermediate.

**Materials and Methods:** To construct an *E. coli* strain capable of expressing the benzoylformate decarboxylase enzyme, the *mdlC* gene originating from *Pseudomonas putida* was amplified and subsequently cloned into both pBAD and pET28 expression vectors. Following the confirmation of successful cloning through rigorous confirmatory assays, protein expression was evaluated using Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), and the enzymatic activity was assessed.

**Results:** Benzoylformate decarboxylase (BFD) is a pivotal enzyme within the engineered metabolic pathway for producing 1,2,4-butanetriol (BT) in *E. coli*. In this study, the *mdlC* gene, encoding BFD from *Pseudomonas putida*, was successfully amplified and cloned into the versatile pBAD and the robust pET28 expression vectors. The pET28 system was preferred due to its ease of use and established track record in protein production, while the pBAD vector was strategically employed for its inducible expression capabilities, allowing for controlled protein synthesis. The expression of the 56 kDa target protein was confirmed through SDS-PAGE analysis, and the enzymatic function in the production of BT was subsequently verified using the sensitive and accurate HPLC method. This work lays a crucial foundation for the further optimization and development of a fully functional and efficient microbial cell factory for the sustainable production of this valuable chemical.

**Conclusion:** The successful transfer of the expression construct into an appropriate *E. coli* host strain was confirmed by the presence of a distinct protein band at approximately 56 kDa on the SDS-PAGE gel, unequivocally verifying the expression of the *mdlC* gene. To evaluate the functional capacity of the expressed enzyme, the recombinant vector pBAD.*mdlC* was transformed into the *E. coli* TOP10 strain. The subsequent production of BT in the culture medium was meticulously analyzed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).



## بررسی ثبات ژنتیکی کلون‌های حاصل از ریزازدیادی جوانه‌های جانبی هندوانه در شرایط کشت درون‌شیشه

شب‌نم مازندرانی<sup>۱</sup>، قاسمعلی گروسی<sup>۲\*</sup>، رحیم حداد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران، shabnam.mazandarani@yahoo.com  
<sup>۲</sup> استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران، garoosi@eng.ikiu.ac.ir  
<sup>۳</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران، r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
آغازگر چند شکلی شباهت ژنتیکی نشانهگر ISSR هورمون	<p><b>هدف:</b> هدف این پژوهش ریزازدیادی رقم جانبی هندوانه از طریق کشت جوانه جانبی و بررسی تغییرات ژنتیکی احتمالی گیاهچه‌ها پس از چهار نسل باززایی است. <b>مواد و روش‌ها:</b> در این تحقیق، جوانه‌های جانبی پس از رشد گیاه مادری، در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف IAA، BAP و TDZ منتقل و ریزازدیادی به مدت چهار نسل ادامه یافت. در ادامه تاثیر غلظت‌های منتخب هورمونی و نسل‌های مختلف واکشت روی شباهت/تفاوت ژنتیکی گیاهچه‌های انتخابی با گیاه شاهد (مادری) توسط نشانهگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت.</p> <p><b>نتایج:</b> نتایج حاصل از بررسی تاثیر هورمون‌ها روی افزایش تعداد جوانه جانبی در نسل‌های مختلف نشان داد که به‌طور کلی سه غلظت ۰ mg/L IAA و ۱ mg/L BAP و ۱ mg/L IAA و ۲ mg/L BAP و ۲ mg/L IAA و ۲ mg/L BAP به ترتیب با ۲/۳۳، ۳/۸۳ و ۲/۱۷ نوساچه در هر ریزنمونه بیشترین تاثیر را روی ازدیاد تعداد جوانه‌های جانبی بعد از چهار نسل داشتند. در بررسی تغییرات ژنتیکی با استفاده از ۵ نشانهگر ISSR، ۶۰ باند تولید شد که ۴۳/۳ درصد آن‌ها چندشکلی بودند. بیشترین تعداد باند (۱۷ باند) مربوط به آغازگر UBC-864 و کمترین (۹ باند) مربوط به P2 بود. بیشترین جایگاه‌های چندشکلی در آغازگر UBC-808 مشاهده شد. در میان تیمارها مورد بررسی، تیمار ۱ mg/L IAA و ۲ mg/L BAP در نسل ۳ ریزازدیادی با ۹ جایگاه چندشکلی بیشترین و تیمار ۰ mg/L IAA و ۱ mg/L BAP در نسل ۱ ریزازدیادی با ۲ جایگاه چندشکلی کمترین تعداد چندشکلی را نشان دادند. <b>نتیجه‌گیری:</b> یافته‌های مطالعه کنونی نشان داد که نشانهگرهای ISSR به‌طور موثری می‌توانند برای بررسی ثبات یا تنوع ژنتیکی ایجادشده در هندوانه پس از چند نسل واکشت در شرایط درون شیشه استفاده شوند.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۷	

### ۱- مقدمه

هندوانه با نام علمی *Citrullus lanatus* گیاهی علفی، یک‌ساله و رونده از خانواده Cucurbitaceae است. خانواده Cucurbitaceae شامل ۱۲۰ جنس و ۸۲۵ گونه است که در مناطق گرمسیری و معتدل در سراسر جهان رشد می‌کنند (۱). هندوانه به‌طور عمده از طریق بذر تکثیر می‌شود. ارقام هندوانه شامل ارقام دانه‌دار (دیپلوئید) و ارقام هیبرید بی‌دانه (تریپلوئید) می‌باشند (۲).

هیبریدهای تریپلوئید هندوانه اولین بار در سال ۱۹۴۷ در ژاپن گزارش شدند (۳). هیبریدها در اکثر محصولات کشاورزی باعث افزایش عملکرد، افزایش پایداری عملکرد و بهبود مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی و زیستی می‌شوند. ارقام هیبرید بدون دانه به دلیل عدم وجود دانه، بازاریابی بیشتر و همچنین ارزش اقتصادی بیشتر برای کشاورزان نسبت به ارقام دانه‌دار محبوبیت بیشتری دارند و به‌طور گسترده‌ای در دسترس هستند (۴).

با وجود عدم تولید بذر در ارقام هیبرید تریپلوئید، تولید این ارقام نیازمند گرده‌افشانی می‌باشد، زیرا تشکیل میوه و کیفیت آن به هورمون‌های رشد آزاد شده در هنگام رشد لوله‌گرده و لقاح تخمک وابسته است (۵). نکته حائز اهمیت این است که گرده‌افشانی در هندوانه‌های هیبرید نیازمند انتقال دانه‌گرده از ارقام دانه‌دار می‌باشد زیرا گرده خود این ارقام زنده نمی‌باشند (۶). بنابراین گل‌های نر در ارقام تریپلوئید سهم بسیار محدودی در تولید گرده و گرده‌افشانی دارند. از این‌رو، گرده‌افشانی در ارقام هندوانه بی‌دانه بسیار چالش‌برانگیزتر از ارقام دانه‌دار است (۲). علاوه بر این، با وجود هزینه‌های زیاد، بذرها تریپلوئید به‌خوبی جوانه نمی‌زنند. بنابراین روش‌های مبتنی بر کشت بافت گیاهی به‌منظور تولید گیاهانی با ثبات از نظر ژنتیکی در ارقام هیبرید و تریپلوئید از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا می‌تواند گامی مهمی در کاهش وابستگی به واردات بذر این گونه ارقام باشد (۷). در سال‌های اخیر روش کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک فناوری نوین، پتانسیل زیادی برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون جهانی در زمینه توسعه کشاورزی پایدار دارد. کشت بافت گیاهی کمک‌های قابل توجهی برای بهبود علوم کشاورزی ارائه کرده و امروزه به‌عنوان یک ابزار ضروری در کشاورزی نوین مشارکت می‌کند. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در کشت بافت گیاهی، امروزه می‌توانیم تعداد زیادی گیاه را از یک بذر یا ریزنمونه با صفات موردنظر تکثیر کنیم. علاوه بر این، استفاده از کشت بافت گیاهی فضای موردنیاز برای آزمایش‌های مزرعه‌ای را کاهش می‌دهد و می‌توان تعداد زیادی از گیاهان عاری از بیماری را از طریق انتخاب دقیق و فن‌های استریل تولید کرد (۸). روش ریزازادایی، تکثیر سریع گیاهان موردنظر را از ریزنمونه‌های محدود تسهیل می‌کند و همچنین از نیاز به تولید بذر در هر فصل جلوگیری می‌کند. علاوه بر این استفاده از این تکنیک، مشکلاتی همانند عملکرد پایین بذر، هزینه بالای تولید بذر، جوانه‌زنی ضعیف، قوه نامیه پایین و نهال‌های ضعیف را نیز نسبت به تکثیر با استفاده از بذر بر طرف می‌کند (۷).

هر چند ریزازادایی در شرایط درون شیشه روشی مهم برای تولید گیاهچه‌های یکسان از نظر ژنتیکی می‌باشد، ولی ریزازادایی در شرایط آزمایشگاهی ممکن است موجب ایجاد تغییرات نامطلوب و تنوع سوماکلونال شود (۹). کشت سلول و بافت گیاهی در شرایط درون شیشه، به‌طور سنتی برای تولید، حفاظت و بهبود منابع گیاهی استفاده می‌شود که در این روش انتظار می‌رود که تکثیر کلونال، گیاهانی با یکنواختی ژنتیکی تولید کند (۱۰). با این حال براون اولین مشاهدات را از تنوع ناشی از کشت‌های سلول و بافت در شرایط درون شیشه که امروزه به‌عنوان تنوع سوماکلونال شناخته می‌شود را گزارش کرد (۱۱). بنابراین حفظ ثبات ژنتیکی گیاهان پس از چند نسل واکشت در شرایط درون شیشه یکی از بزرگ‌ترین مشکلات استفاده از این تکنیک به‌منظور تولید گیاهان یکنواخت می‌باشد (۱۰). با این حال، لارکین و اسکوکرافت تنوع سوماکلونال را به‌عنوان روشی جدید برای تولید گیاهانی با ویژگی‌های عملکردی بهبود یافته معرفی کردند و این موضوع در سال‌های بعد توسط سایر محققان نیز مستند شده است (۱۲). از آن زمان تاکنون با استفاده از این روش گیاهان جدیدی دارای ویژگی‌هایی همانند مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، متحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و همچنین گیاهانی با میزان بهره‌وری بسیار بالاتر نسبت به گیاه اولیه تولیدشده‌اند (۱۰). در هر صورت این موضوع که تحت شرایط درون شیشه کلون‌های حاصل از گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی، پس از بازیابی، فنوتیپ‌های متفاوتی را نشان می‌دهند، در بسیاری از ریزنمونه‌های تحت تاثیر ریز ازادایی مشاهده می‌شود. تنوع سوماکلونال ممکن است در سطح فنوتیپی بیان شود و ممکن است منها ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی داشته باشد (۱۳). از جمله مهم‌ترین عوامل

موثر بر ایجاد تنوع سوماکلونال در شرایط کشت بافت را می‌توان ژنوتیپ گیاهی، انحرافات کروموزومی، منبع ریزنمونه، اثرات هورمون رشد، دوزهای موادی که در محیط کشت استفاده می‌شود، مدت‌زمان کشت سلولی، نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه، ماهیت ژنوتیپ گیاهان، مدت‌زمان کشت و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توان نام برد (۱۴، ۱۵).

به‌منظور بررسی وجود تنوع در گیاهان علاوه بر نشانگرهای مورفولوژیکی، می‌توان از نشانگرهای مولکولی نیز استفاده کرد. نشانگرهای مبتنی بر DNA تحت تاثیر شرایط محیطی یا مراحل رشد گیاه قرار نمی‌گیرند و این ویژگی برتر آن‌ها در ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد (۱۶). از جمله نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان AFLP، SSR، ISSR، RAPD و RFLP را نام برد (۱۷). نشانگر ISSR نوعی نشانگر نیمه تصادفی است که دارای بخش‌های دارای نوکلئوتیدهای تکراری مانند AC، GT و AG می‌باشد (۱۸). از جمله مزایای استفاده از تکنیک ISSR می‌توان به این موارد اشاره کرد که نیاز به آگاهی قبلی در مورد توالی ژنوم ندارد و الگوهای چندشکلی و چندمکانی ایجاد می‌کند. هر باند تولیدشده مربوط به قسمتی از توالی DNA می‌باشد که با دو ریز ماهواره‌ی معکوس شده پوشیده شده است. محصولات تکثیرشده معمولاً ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز طول دارند و با روش‌های الکتروفورز آگارز و اکریل‌امید قابل بررسی می‌باشند و نیاز به استفاده از مواد رادیواکتیو ندارند (۱۹). به‌علت استفاده از آغازگرهای بلند (۱۶ تا ۲۵ مری) در مقایسه با آغازگرهای RAPD (۱۰ مری) تکرارپذیری ISSR بسیار بالاست (۲۰).

در پژوهش‌های قبلی ترکیب سیتوکینین و اکسین روی باززایی شاخساره‌ها توضیح داده‌شده است. در مطالعات مختلف به‌خوبی نشان داده‌شده است که سیتوکینین‌ها تقسیم سلولی را تحریک می‌کنند و در از بین بردن خواب جوانه‌های جانبی، القای تشکیل جوانه‌های نابجا، رشد جوانه‌های جانبی و کنترل چرخه سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، در حالی که اکسین‌ها در شروع تقسیم سلولی، سازماندهی سلول‌های مریستمی که باعث ایجاد بافت تمایزنیافته (کالوس) یا اندام‌های معین (شاخه‌ها)، گسترش سلولی، اسیدی شدن دیواره سلولی، غالبیت راسی و تشکیل ریشه می‌شوند. از این نظر، دستکاری تعادل سیتوکینین: اکسین برون‌زا می‌تواند به نفع یک الگوی رشدی یا جهت‌دهی به یک برنامه اندام‌زایی باشد (۲۱). در مطالعه‌ای محققین تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ روی صفات طول ساقه، تعداد برگ و تعداد شاخه را در گیاه هندوانه بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها آشکار کرد که هر سه صفت طول ساقه، تعداد برگ و تعداد شاخه با افزایش غلظت TDZ از ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۴ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۲۲). در پژوهشی پستلین سولانو و همکاران (۲۳)، اثر واکشت‌های پشت سر هم را روی تنوع سوماکلونال در گیاه *Vanilla planifolia* با استفاده از نشانگر ISSR بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش تعداد نسل‌های واکشت در شرایط درون شیشه (۵ واکشت پشت سرهم) درصد پلی‌مورفیسم مشاهده‌شده نیز افزایش یافت (۲۳). با توجه به اهمیت هندوانه در بین محصولات کشاورزی ایران و اهمیت استفاده از روش‌های نوین به‌منظور تکثیر این گیاه همانند روش ریزازدیادی و همچنین عدم بررسی میزان تنوع ژنتیکی ایجادشده در اثر هورمون‌های استفاده‌شده در محیط کشت و نسل‌های پشت سر هم واکشت، در این پژوهش با استفاده از کشت جوانه‌های جانبی، ریزازدیادی رقم جابانی هندوانه در چند نسل تحت تاثیر هورمون‌های رشد در شرایط درون‌شیشه مورد بررسی قرار گرفت و ضمن بهینه نمودن نرخ پرآوری، میزان تنوع سوماتیکی احتمالی گیاهان ازدیاد شده در نسل‌های تکثیر با والدین آن‌ها به‌وسیله نشانگر ISSR مقایسه شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**ضدعفونی و کشت بذرها:** به‌منظور ضدعفونی، ابتدا بذرها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آب خیسانده شدند. پس از جدا کردن پوسته‌ی چوبی، بذرها حاصل ابتدا با آب شهری و مایع ظرفشویی شسته شد و پس از آن سه بار با آب مقطر آبکشی شدند (۲۴). بذرها در هود لامینار ایرفلو با الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و سپس با هیپوکلریت (W/V) ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از هر مرحله ضدعفونی بذرها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی

شدند. بذرها پس از برطرف کردن رطوبت سطحی توسط کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت MS ۱/۸ حاوی ۶/۵ گرم در لیتر آگار کشت شدند (۲۴). بذره‌های کشت شده در اتاقک رشد با دوره‌ی نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته بذره‌های جوانه‌زده به شیشه‌های ۹۰۰ میلی‌لیتر حاوی محیط کشت MS کامل منتقل شده و به مدت ۳ هفته تحت شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و طول دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا گیاهان به اندازه کافی رشد کرده و جوانه جانبی مناسبی به‌عنوان ریزنمونه تهیه شود (۲۵). ریزازدیادی با استفاده از جوانه‌های جانبی و در ۴ نسل در روی محیط کشت MS با تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد انجام شد. پس از واکشت سوم از هر نسل صفات تعداد جوانه جانبی، طول نوساقه، تعداد برگ در نوساقه یادداشت‌برداری و در تجزیه آماری استفاده شد. مناسب‌ترین تیمارهای تنظیم‌کننده رشد مشخص شده و به‌عنوان تیمارهای تنظیم‌کننده رشد نسل بعد انتخاب شد.

**تیمارهای هورمونی:** نسل اول ریزازدیادی: به‌منظور ریزازدیادی سه هفته پس از رشد گیاه در شرایط درون‌شیشه و افزایش اندازه گیاه به‌حد مطلوب (دارا بودن بیش از سه جوانه جانبی در هر گیاه‌چه)، جوانه‌های جانبی جدا شده و در هر شیشه تعداد سه ریزنمونه در دو نوع تیمار هورمونی شامل سه غلظت از هورمون IAA (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و سه غلظت از هورمون BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و هم‌چنین سه غلظت از هورمون IAA (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و سه غلظت از هورمون TDZ (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در سه تکرار و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار داده شد. ریزنمونه‌ها به فاصله ۲۱ روز سه بار در محیط کشت مشابه واکشت شدند. در انتهای واکشت سوم این نسل از ریزازدیادی داده‌های حاصل از بررسی صفات مورد بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ آنالیز شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

**نسل دوم ریزازدیادی:** در نسل دوم ریزازدیادی بر مبنای نتایج نسل قبل ترکیب‌های هورمون TDZ حذف و جوانه‌های جانبی تشکیل شده روی ساقه‌های حاصل از واکشت سوم آن نسل جدا شده و به تعداد سه ریزنمونه در هر شیشه با ترکیب‌های هورمونی شامل سه غلظت از هورمون IAA (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و چهار غلظت از هورمون BAP (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) در پنج تکرار و به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار داده شد. ریزنمونه‌ها به فاصله ۲۱ روز سه بار در محیط کشت مشابه واکشت شدند. در انتهای واکشت سوم این نسل از ریزازدیادی داده‌های حاصل از بررسی صفات تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ آنالیز شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. سپس بهترین تیمارهای هورمونی برای استفاده در نسل سوم ریزازدیادی انتخاب شدند.

**نسل سوم ریزازدیادی:** در نسل سوم ریزازدیادی با توجه به نتایج نسل قبل از غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP در ۶ تکرار به عنوان تیمارهای منتخب استفاده شد. بدین‌منظور، جوانه‌های جانبی گیاه‌چه‌های حاصل از واکشت سوم نسل دوم ریزازدیادی بریده شده و در تیمارهای هورمونی منتخب به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار گرفتند. در این نسل نیز سه واکشت با فاصله زمانی ۲۱ روز در محیط کشت حاوی تیمارهای منتخب انجام شد. و همانند نسل‌های قبل ریزازدیادی پس از یادداشت صفات رشدی آنالیز داده، مقایسه میانگین و انتخاب بهترین تیمارها برای ادامه نسل ۴ ریزازدیادی انجام شد.

**نسل چهارم ریزازدیادی:** برای انجام نسل چهارم ریزازدیادی بر اساس داده‌های حاصل از واکشت سوم نسل قبل ریزازدیادی

جوانه‌های جانبی سه تیمار هورمونی شامل صفر میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP انتخاب شدند. سپس جوانه‌های جانبی حاصل از گیاهان رشد یافته در نسل قبل از گیاهچه‌ها جدا شده و جهت بررسی غلظت تاثیر غلظت‌های هورمونی منتخب در نسل ۴ ریز ازدیادی به محیط کشت MS حاوی تیمار هورمونی منتخب به صورت طرح کاملا تصادفی متعادل منتقل شدند. سپس همانند نسل‌های قبل ریز ازدیادی ریزنمونه‌ها سه مرتبه با فاصله ۲۱ روز در محیط کشت حاوی هورمون‌های منتخب واگشت شدند. داده‌های حاصل از بررسی صفات تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ آنالیز و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

**نمونه‌برداری جهت استخراج DNA و بررسی مولکولی:** بدین منظور برگ گیاهان حاصل از واگشت سوم هر نسل از ریزازدیادی (سه نمونه از هر تیمار) برداشت و سپس نمونه‌های با هم مخلوط شدند و بلافاصله در ازت مایع تثبیت گردیدند تا نمونه‌های انتخاب شده برای استخراج DNA نماینده تمامی گیاهچه‌های موجود در واگشت سوم هر نسل از ریزازدیادی باشد. ریزنمونه‌های برداشت شده تا زمان انتخاب تیمارهای منتخب در نسل چهارم ریزازدیادی، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه:** به منظور تعیین بهترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌های کاملا رشد یافته حاصل از نسل چهارم ریزازدیادی به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۲۶) و همچنین محیط کشت MS عاری از هورمون منتقل شد. سپس ظروف کشت شده به اتاقک رشد منتقل و پس از سه هفته از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای سازگاری استفاده شد.

**سازگاری گیاهچه رشد یافته در شرایط گلخانه‌ای:** گیاهچه‌های کامل به آرامی از آگار جدا شده و پس از شستشوی ریشه آن‌ها با آب مقطر، در گلدان‌های کوچکی که با ترکیبی از کوکوپیت، پرلیت، پیت ماس و خاک مزرعه استریل با نسب ۱:۱:۱:۱ پر شده بود قرار داده شدند. گلدان‌ها با مقدار کمی آب مقطر مه‌پاش شده و برای حفظ حداکثر رطوبت، با درب پلاستیکی شفاف پوشانده شده و به ژرمیناتور تحت شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و طول دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. جهت انجام سازگاری تدریجی و تهویه بهتر هر روز یک سوراخ تا سازگاری کامل به شرایط طبیعی (حداکثر ۱۴ روز) در درب پلاستیکی ایجاد شد و آبیاری هر ۲۴ ساعت انجام گرفت (۲۷). در دوره آبیاری ۲۴ ساعته گیاهان دچار تجمع آب در بافت شدند بنابراین مدت زمان آبیاری به ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تغییر کرد، همچنین به منظور بهینه‌سازی روش سازگاری تعداد سوراخ‌های روی درپوش در طول زمان تغییر یافت. در آخرین آزمایش، آبیاری با محلول حاوی عناصر درشت مغذی، ریز مغذی و آهن انجام شد که متاسفانه گیاهی به سازگاری نرسید.

**استخراج DNA ژنومی و بررسی کیفیت نمونه استخراج شده:** استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش حیدری جاپلاقی و همکاران (۲۸) انجام شد. سنجش کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و جذب در طیف‌های مختلف نوری نمونه (A260/A230 و A260/A280) و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و نشانگرهای مولکولی:** در این پژوهش، به منظور مطالعه تغییرات ژنتیکی احتمالی در نسل‌های ریزازدیادی، از ۵ نشانگر مولکولی ISSR به‌عنوان آغازگر استفاده شد (۲۹ و ۳۰). در این واکنش از مسترمیکس (شرکت آمپلی‌کون، دانمارک) بهره گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲.۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر DNA الگو (رقیق شده با غلظت ۵۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر و آب دیونیزه تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر، انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل واسرشته‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه،

واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت ۷۰ ثانیه (دمای اتصال آغازگرها بین ۴۵ تا ۴۹ درجه سانتی‌گراد و متناسب با هر آغازگر متغیر بود)، گسترش رشته جدید ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه (تعداد ۳۵ چرخه) و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه، قرارگیری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. توالی و دمای اتصال آغازگرها در جدول ۱ شرح داده شده است (۳۰).

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی

نام آغازگر	توالی آغازگر (3'→5')	دمای اتصال
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۴۹
UBC-825	ACACACACACACACT	۴۷
UBC-826	ACACACACACACACC	۴۹
UBC-864	ATGATGATGATGATGATG	۴۵
P2	AGAGAGAGAGAGAGAGT	۴۷

**الکتروفورز فرآورده‌های تکثیرشده و امتیازدهی الگوهای باندهی نشانگر:** مشاهده محصولات تکثیر شده به وسیله PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. پنج میکرولیتر از هر محصول PCR در چاهک‌ها ریخته شد. تانک الکتروفورز به منبع تامین برق با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت متصل و الکتروفورز به مدت یک ساعت انجام شد. سپس رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم-بروماید انجام و ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک (شرکت UVP BioImaging System، مدل CA91789، آمریکا) عکس برداری شدند.

امتیازدهی الگوهای باندهی نشانگرها به صورت دستی به صورت کدهای صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام و داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار اکسل شدند. درصد چندشکلی (Percentage of Polymorphism) برای هر کدام از آغازگرها به صورت نسبت تعداد باندهای چندشکل به تعداد کل باندهای تولید شده توسط هر آغازگر و با استفاده از فرمول  $PIC = 1 - \sum p_i^2$  محاسبه شد (۳۱). همچنین شاخص نشانگری (Marker Index) با استفاده از معادله  $MI = PIC \times (np + \beta)$  برای همه نشانگرها محاسبه شد که در آن PIC محتوای اطلاعات چندشکلی، np تعداد کل جایگاه‌های ژنی چندشکل و  $\beta$  نیز از فرمول  $\beta = np / (np + nnp)$  می‌آید که در آن np تعداد باندهای تک شکل و nnp تعداد باندهای یک شکل می‌باشد (۳۲). مشاهده فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA و نرم افزار NTSYS-pc 2.02 تعیین شد (۳۳). علاوه بر این، از نرم افزار GeneAlex 6.501 برای تخمین معیارهای آماری تنوع ژنتیکی، شاخص اطلاعات شانون و درصد چندشکلی مکان‌ها، تجزیه واریانس مولکولی واریانس بین و درون تیمارها برای نمونه‌ها استفاده شد (۳۴).

## ۲- آنالیز آماری

برای انجام مطالعه از آزمایش‌های فاکتوریل بر مبنای طرح کامل تصادفی و برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اشتباه ۵ درصد انجام شد.

### ۳- نتایج

#### تاثیر IAA، BAP و TDZ روی صفات ریخت‌شناختی گیاه در نسل اول ریزازدیادی

با انجام آنالیز واریانس مشخص شد که غلظت‌های مختلف IAA و BAP و اثر متقابل آن‌ها و همچنین غلظت‌های مختلف IAA و TDZ و اثر متقابل آن‌ها اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد روی تعداد برگ، طول ساقه و تعداد جوانه جانبی در محیط کشت MS داشتند (جدول ۲). همان‌طور که در شکل‌های ۱ الف و ب مشاهده می‌شود بیشترین تعداد برگ و جوانه جانبی در بین غلظت‌های مختلف IAA در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و بیشترین تعداد برگ و جوانه جانبی در بین غلظت‌های مختلف BAP در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تولید شده است (شکل ۱ ت و ث). نتایج حاصل از بررسی تعداد برگ و تعداد جوانه‌های جانبی تحت تاثیر برهم‌کنش غلظت‌های مختلف IAA و BAP نشان داد که بیشترین تعداد برگ (با میانگین ۳۴ عدد در ریز نمونه) و جوانه جانبی (با میانگین ۱۰/۶۶ عدد در ریز نمونه) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شده است که این نتایج تاثیر مثبت برهم‌کنش دو هورمون IAA و BAP را در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هر هورمون را نشان می‌دهد (جدول ۳).

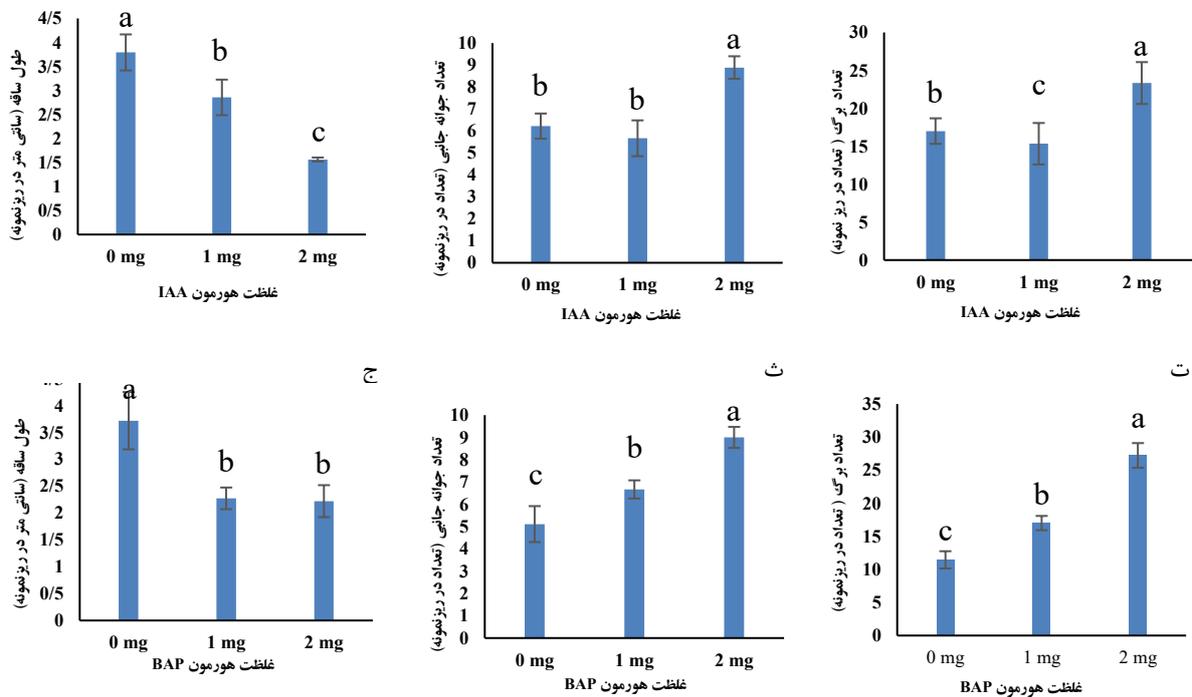
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IAA، BAP و TDZ بر تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در نسل اول ریزازدیادی

میانگین مربعات		تعداد برگ	درجه آزادی	منبع تغییرات
تعداد جوانه جانبی	طول ساقه			
۲۶/۷۰۳۷ **	۱۱/۲۹۶۱ **	۱۶۰/۳۳۳۳ **	۲	IAA
۳۴/۴۸۱۴ **	۶/۴۹۳۷ **	۵۷۶/۴۴۴۴ **	۲	TDZ
۲/۸۷۰۳ **	۱/۶۳۷۱ **	۲۴/۴۴۴۴ **	۴	TDZ × IAA
۰/۵۵۵۵	۰/۰۳۳۳	۲/۱۸۵۱	۱۸	خطا
۱۰/۷۶	۶/۶۷	۷/۹۷		ضریب تغییرات (درصد)
۱/۷۷۷۷ **	۴/۱۴۸۷ **	۱۴/۹۲۵۹ **	۲	IAA
۲/۷۷۷۷ **	۱/۴۳۳۱ **	۱۳/۴۸۱۴ **	۲	BAP
۱/۲۲۲۲ **	۱/۶۷۴۱ **	۹/۷۰۳۷ **	۴	IAA × BAP
۰/۲۲۲۲	۰/۰۱۹۰	۱/۱۴۸۱	۱۸	خطا
۲۸/۲۸	۱۲/۴۸	۲۳/۱۴		ضریب تغییرات (درصد)

در بین غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بیشترین طول ساقه با میانگین ۳/۷۹ سانتی‌متر مربوط به تیمار شاهد بود که نسبت به تیمار ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱ پ). در بین غلظت‌های مختلف BAP نیز بیشترین طول ساقه در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۲ ج). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل بین غلظت‌های مختلف IAA و BAP نشان داد که بیشترین طول ساقه با میانگین ۵/۲۳ سانتی‌متر در ریز نمونه مربوط به تیمار شاهد است (جدول ۳).

جدول ۳: اثر متقابل غلظت‌های مختلف IAA و BAP روی صفت تعداد جوانه‌ی جانبی، تعداد برگ و طول ساقه در نسل اول ریزازدیادی (SE ± میانگین)

غلظت IAA (mg/l)	غلظت BAP (mg/l)	تعداد برگ (تعداد در ریزنمونه)	تعداد جوانه جانبی (تعداد در ریزنمونه)	طول ساقه (سانتی‌متر در ریزنمونه)
صفر	صفر	11 ± 0.57 <sup>f</sup>	4.66 ± 0.33 <sup>d</sup>	5.23 ± 0.145 <sup>a</sup>
۱	۱	18 ± 0.57 <sup>de</sup>	5.66 ± 0.33 <sup>cd</sup>	2.75 ± 0.087 <sup>d</sup>
۲	۲	22 ± 1.52 <sup>c</sup>	8.33 ± 0.33 <sup>b</sup>	3.39 ± 0.35 <sup>c</sup>
صفر	۱	7.33 ± 0.88 <sup>g</sup>	2.66 ± 0.33 <sup>e</sup>	4.23 ± 0.176 <sup>b</sup>
۱	۱	13 ± 0.57 <sup>f</sup>	6.33 ± 0.33 <sup>c</sup>	2.56 ± 0.145 <sup>d</sup>
۲	۲	25.66 ± 0.66 <sup>b</sup>	8 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.088 <sup>e</sup>
صفر	۲	16 ± 0.57 <sup>e</sup>	8 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.06 <sup>e</sup>
۱	۱	20 ± 0.57 <sup>cd</sup>	8 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.058 <sup>e</sup>
۲	۲	34 ± 1.15 <sup>a</sup>	10.66 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.058 <sup>e</sup>

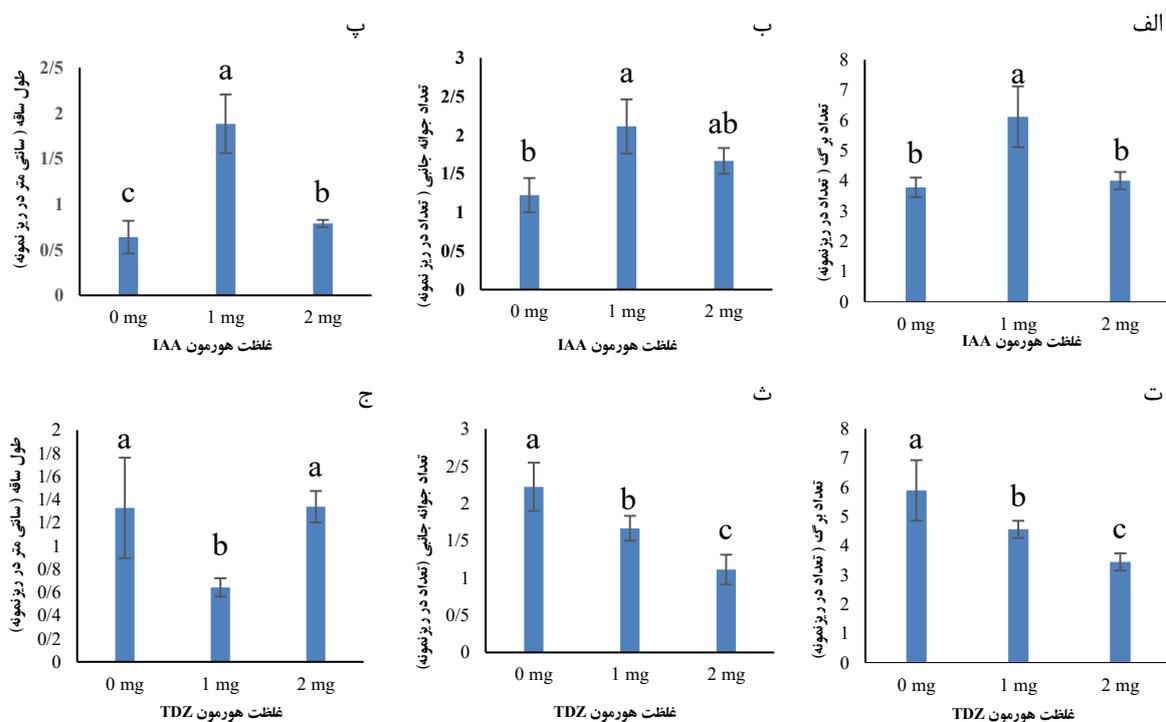


شکل ۱: مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA روی صفات الف) تعداد برگ ب) تعداد جوانه‌ی جانبی و پ) طول ساقه و اثر اصلی غلظت‌های مختلف BAP روی صفات ت) تعداد برگ، ث) تعداد جوانه‌ی جانبی و ج) طول ساقه

نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی IAA نشان داد که بیشترین تعداد برگ با میانگین ۶/۱۱ عدد در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA تولید شد که در مقایسه با شاهد و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA به ترتیب ۶۲/۰۷ و ۵۲/۷۵ درصد افزایش نشان می‌دهد. (شکل ۲ الف). همچنین بیشترین تعداد برگ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ در تیمار شاهد تشکیل شد (شکل ۲ ت). اثرات متقابل بین غلظت‌های مختلف IAA و TDZ نشان داد که بیشترین تشکیل برگ مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و صفر TDZ می‌باشد که این مقدار نسبت به شاهد ۱۴۱/۰۵ درصد افزایش نشان داد (جدول ۴).  
بیشترین تعداد جوانه جانبی تحت اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA و TDZ به ترتیب در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و

تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۲ ب و ث). مطالعه نتایج حاصل از اثرات متقابل IAA و TDZ روی تشکیل تعداد جوانه جانبی نشان داد که بیشترین تعداد جوانه جانبی با میانگین ۳/۳۳ عدد در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و صفر TDZ مشاهده گردید و کم‌ترین تعداد جوانه جانبی نیز در تیمار صفر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ مشاهده شد که این نشان می‌دهد با افزایش غلظت هورمون TDZ تعداد جوانه جانبی کاهش می‌یابد (جدول ۴).

بررسی نتایج شکل ۲ پ نشان می‌دهد که در بین غلظت‌های مختلف IAA بیشترین طول ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA ایجاد گردید که تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌ها نشان داد و بیشترین طول ساقه نیز در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ مشاهده گردید (شکل ۲ ج). بررسی مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و TDZ نشان داد که بیشترین طول ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و صفر TDZ ایجاد شد که با سایر تیمارهای آماری تفاوت معنی‌داری نشان داد، (جدول ۴).



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA (روی صفات الف) تعداد برگ (ب) تعداد جوانه‌ی جانبی و (پ) طول ساقه و اثر اصلی غلظت‌های مختلف TDZ (روی صفات ت) تعداد برگ، (ث) تعداد جوانه‌ی جانبی و (ج) طول ساقه

جدول ۴: اثر متقابل غلظت‌های مختلف IAA و TDZ روی صفت تعداد جوانه‌ی جانبی، تعداد برگ و طول ساقه در نسل اول ریزازدیادی (SE) ± میانگین)

طول ساقه (سانتی‌متر در ریزنمونه)	تعداد جوانه جانبی (تعداد در ریزنمونه)	تعداد برگ (تعداد در ریزنمونه)	غلظت TDZ (mg/l)	غلظت IAA (mg/l)
۰/۲۳ ± ۰/۰۶۷ <sup>c</sup>	۱/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>bcd</sup>	۴ ± ۰/۵۷۷ <sup>bc</sup>	صفر	صفر
۰/۳۶ ± ۰/۰۳۲ <sup>c</sup>	۱/۶۶ ± ۰/۳۳ <sup>bc</sup>	۴/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>bc</sup>	۱	
۱/۳۳ ± ۰/۱۲۰ <sup>c</sup>	۰/۶۶ ± ۰/۳۳ <sup>d</sup>	۳ ± ۰/۵۷۷ <sup>c</sup>	۲	
۳/۰۳ ± ۰/۰۸۸ <sup>a</sup>	۳/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>a</sup>	۹/۶۶ ± ۱/۲۰ <sup>a</sup>	صفر	۱
۰/۸۳ ± ۰/۰۷۳ <sup>d</sup>	۲ ± ۰ <sup>b</sup>	۵/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>b</sup>	۱	
۱/۷۸ ± ۰/۱۱۹ <sup>b</sup>	۱ ± ۰ <sup>cd</sup>	۳/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>bc</sup>	۲	
۰/۷۲ ± ۰/۰۶۳ <sup>d</sup>	۲ ± ۰ <sup>b</sup>	۴ ± ۰/۵۷۷ <sup>bc</sup>	صفر	۲
۰/۷۴ ± ۰/۰۷۳ <sup>d</sup>	۱/۳۳ ± ۰/۳۳ <sup>bcd</sup>	۴ ± ۰/۵۷۷ <sup>bc</sup>	۱	
۰/۹۰ ± ۰/۰۲۰ <sup>d</sup>	۱/۶۶ ± ۰/۳۳ <sup>bc</sup>	۴ ± ۰/۵۷۷ <sup>bc</sup>	۲	

**اثر غلظت‌های مختلف IAA و BAP روی صفات ریخت‌شناختی در نسل‌های دوم تا چهارم ریزازدیادی**

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های IAA و BAP روی صفات تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در نسل دوم و سوم ریزازدیادی نشان داد که غلظت‌های مختلف BAP و همچنین برهم‌کنش IAA و BAP تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد روی این صفات دارند، درحالی‌که اعمال غلظت‌های مختلف IAA در این دو نسل تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد روی تعداد برگ و تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد روی صفات تعداد جوانه جانبی و طول ساقه نشان دادند (جدول ۵ و ۶).

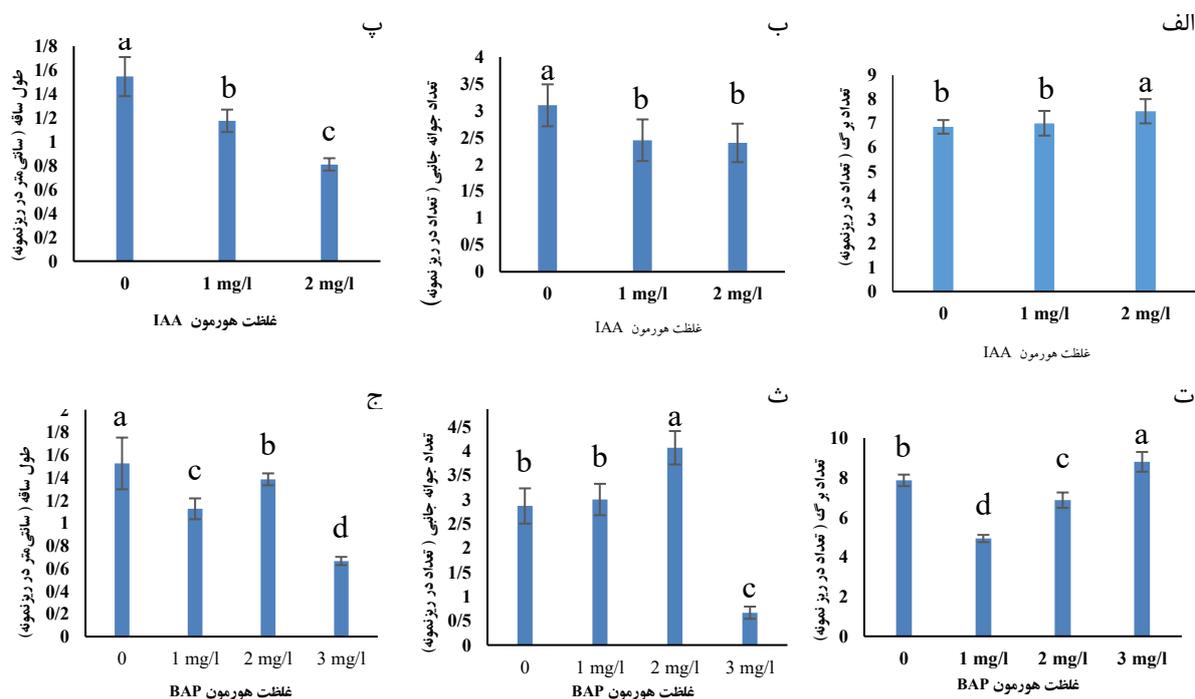
جدول ۵: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IAA و BAP بر تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در نسل دوم ریزازدیادی

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
طول ساقه	تعداد جوانه جانبی		
۲/۷۰۱**	۲/۷۰۱**	۳/۰۵۰ *	۲ IAA
۲/۱۴۶**	۳۰/۵۵**	۴۱/۱۲۷ **	۳ BAP
۱/۰۸۳**	۷/۵۱**	۱۲/۶۲۷ **	۶ BAP × IAA
۰/۰۳۳	۰/۵۵۸	۰/۵۹۱	۴۸ خطا
۱۵/۵۳	۲۸/۱۹	۱۰/۸۰	ضریب تغییرات ( درصد)

جدول ۶: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IAA و BAP بر تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در نسل سوم ریزازدیادی

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
طول ساقه	تعداد جوانه جانبی		
۳/۵۷۵**	۴/۶۹۴۴**	۱۰۹/۳۶۱۱ *	۲ IAA
۱/۵۵۸**	۱۷/۳۶۱۱**	۱۴۰/۰۲۷۸ **	۱ BAP
۰/۶۶۰**	۳۵/۱۹۴۴**	۵۰۵/۰۲۷۸ **	۲ BAP × IAA
۰/۰۹۲	۱/۲۶۱۱	۱۹/۱۳۸۹	۳۰ خطا
۱۲/۹۵	۲۵/۱۱	۲۲/۴۰	ضریب تغییرات ( درصد)

بررسی نتایج نشان داد که بیشترین تعداد برگ در نسل دوم ریزازدیادی تحت تاثیر اثر اصلی IAA در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و تحت تاثیر اثر اصلی ۳ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد (شکل ۳ الف و ت). نتایج اعمال غلظت‌های مختلف IAA روی تشکیل تعداد جوانه جانبی و طول ساقه نشان داد که بیشترین تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳ ب و ت) در حالی که غلظت‌های مختلف BAP بیشترین تعداد جوانه جانبی در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر و بیشترین طول ساقه نیز در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳ ث و ج). نتایج برهم‌کنش حاصل از اثر متقابل هورمون‌های IAA و BAP در نسل دوم ریزازدیادی نشان داد که بیشترین تعداد برگ در تیمار ۳ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شده است که با تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۷). بیشترین تعداد جوانه جانبی نیز در غلظت صفر IAA و به ترتیب غلظت‌های صفر و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری را با هم نشان ندادند (جدول ۶). بیشترین طول ساقه نیز در نسل دوم ریزازدیادی تحت تاثیر برهم‌کنش غلظت‌های مختلف هورمون‌های IAA و BAP در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۷).



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA (روی صفات الف) تعداد برگ (ب) تعداد جوانه‌ی جانبی و (پ) طول ساقه و اثر اصلی غلظت‌های مختلف BAP (روی صفات ت) تعداد برگ، (ث) تعداد جوانه‌ی جانبی و (ج) طول ساقه در نسل دوم ریزازدیادی

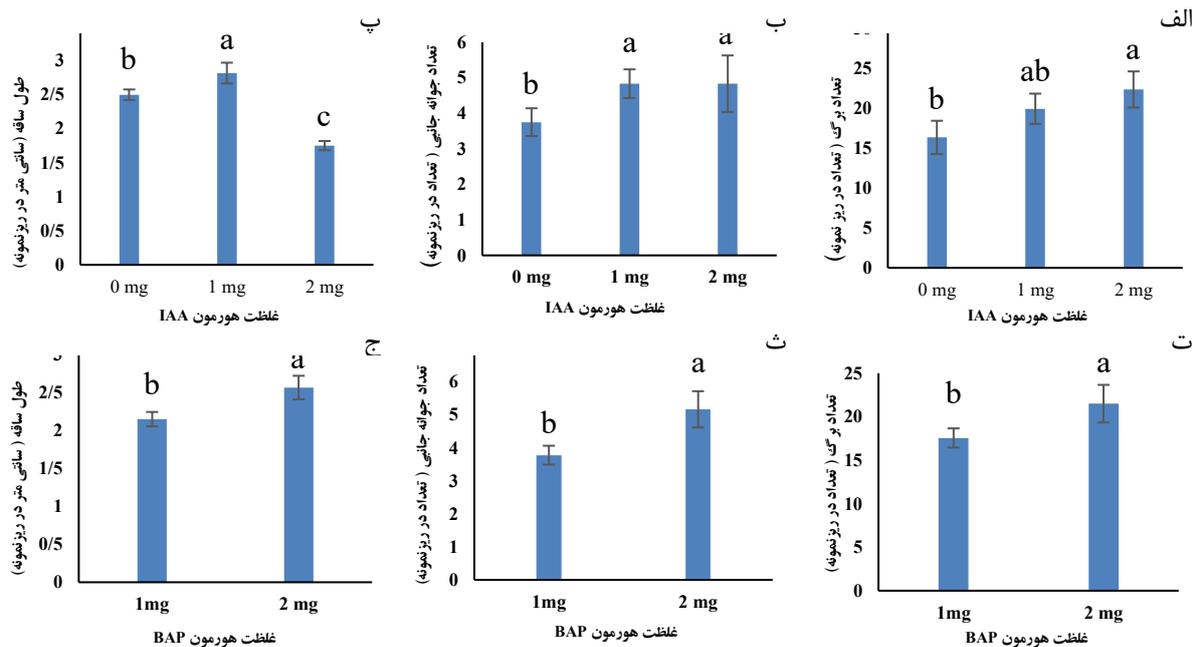
جدول ۷: اثر متقابل غلظت‌های مختلف IAA و BAP روی صفت تعداد جوانه‌ی جانبی، تعداد برگ و طول ساقه در نسل دوم ریزازدیادی (SE)± میانگین)

طول ساقه (سانتی‌متر در ریزنمونه)	تعداد جوانه جانبی (تعداد در ریزنمونه)	تعداد برگ (تعداد در ریزنمونه)	غلظت BAP (mg/l)	غلظت IAA (mg/l)
۲/۶ ± ۰/۲۴۵ <sup>a</sup>	۴/۶ ± ۰/۲۴۵ <sup>a</sup>	۸/۲ ± ۰/۴۳۸ <sup>b</sup>	صفر	
۱/۴۴ ± ۰/۰۴ <sup>bc</sup>	۴/۴ ± ۰/۲۴۵ <sup>a</sup>	۵/۶ ± ۰/۰۳۱۶ <sup>ef</sup>	۱	صفر
۱/۳۸ ± ۰/۰۵۸ <sup>bcd</sup>	۲/۸ ± ۰/۳۷۴ <sup>b</sup>	۷/۲ ± ۰/۴۳۸ <sup>cd</sup>	۲	
۰/۷۶ ± ۰/۰۵۱ <sup>c</sup>	۰/۶ ± ۰/۲۴۵ <sup>c</sup>	۶/۴ ± ۰/۶۵۸ <sup>de</sup>	۳	
۱/۳ ± ۰/۰۵۵ <sup>cd</sup>	۲ ± ۰/۳۱۶ <sup>b</sup>	۸/۶ ± ۰/۵۱۶ <sup>b</sup>	صفر	
۱/۲۸ ± ۰/۰۳۷ <sup>cd</sup>	۲ ± ۰/۳۱۶ <sup>b</sup>	۴/۶ ± ۰/۳۱۶ <sup>f</sup>	۱	۱
۱/۶ ± ۰/۰۴۵ <sup>b</sup>	۵ ± ۰/۴۴۷ <sup>a</sup>	۵/۲ ± ۰/۴۸۳ <sup>f</sup>	۲	
۰/۵۲ ± ۰/۰۳۷ <sup>c</sup>	۰/۸ ± ۰/۲۰۰ <sup>c</sup>	۹/۶ ± ۰/۳۱۶ <sup>a</sup>	۳	
۰/۶۸ ± ۰/۰۳۷ <sup>c</sup>	۲ ± ۰/۳۱۶ <sup>b</sup>	۶/۸ ± ۰/۴۸۳ <sup>d</sup>	صفر	
۰/۶۶ ± ۰/۲۴ <sup>e</sup>	۲/۶ ± ۰/۴ <sup>b</sup>	۴/۶ ± ۰/۳۱۶ <sup>f</sup>	۱	۱
۱/۱۸ ± ۰/۰۳۷ <sup>d</sup>	۴/۴ ± ۰/۵۱۰ <sup>a</sup>	۸/۲ ± ۰/۴۸۳ <sup>bc</sup>	۲	
۰/۷۲ ± ۰/۰۳۷ <sup>c</sup>	۰/۶ ± ۰/۲۴۵ <sup>c</sup>	۱۰/۴ ± ۰/۳۱۶ <sup>a</sup>	۳	

در بررسی نتایج حاصل از ریزازدیادی نسل سوم، مطالعه تاثیر اثر اصلی هورمون‌های IAA و BAP روی تعداد برگ و تعداد جوانه جانبی نشان داد که بیشترین تعداد برگ و جوانه جانبی تحت تاثیر این دو هورمون به ترتیب در غلظت ۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA (شکل ۴ الف و ب) و ۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شده است (شکل ۴ ت و ث). در بین غلظت‌های مختلف IAA بیشترین طول ساقه با میانگین ۲/۸۱ سانتی‌متر در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و برای BAP در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۴ پ و ج). نتایج برهم‌کنش حاصل از اثر متقابل هورمون‌های IAA و BAP در نسل سوم ریزازدیادی نشان داد که بیشترین تعداد برگ بدون تفاوت معنی‌دار به ترتیب در تیمارهای ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، بیشترین تعداد جوانه جانبی در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و بیشترین طول ساقه نیز در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شده است (جدول ۸).

جدول ۸: اثر متقابل غلظت‌های مختلف IAA و BAP روی صفت تعداد جوانه‌ی جانبی، تعداد برگ و طول ساقه در نسل سوم ریزازدیادی (SE)± میانگین)

طول ساقه (سانتی‌متر در ریزنمونه)	تعداد جوانه جانبی (تعداد در ریزنمونه)	تعداد برگ (تعداد در ریزنمونه)	غلظت BAP (mg/l)	غلظت IAA (mg/l)
۲/۴۰ ± ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۴/۸۳ ± ۰/۳۰ <sup>bc</sup>	۲۱/۸۳ ± ۱/۵۷ <sup>b</sup>	۱	صفر
۲/۵۸ ± ۰/۱۳ <sup>b</sup>	۲/۶۶ ± ۰/۳۳ <sup>d</sup>	۱۰/۸۳ ± ۲/۱۰ <sup>c</sup>	۲	
۲/۳۳ ± ۰/۰۹ <sup>b</sup>	۴ ± ۰/۳۶ <sup>c</sup>	۱۴/۶۶ ± ۱/۶۴ <sup>c</sup>	۱	۱
۳/۲۹ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۵/۶۶ ± ۰/۵۵ <sup>b</sup>	۲۵/۱۶ ± ۱/۴۴ <sup>ab</sup>	۲	
۱/۶۹ ± ۰/۱۲ <sup>c</sup>	۲/۵۰ ± ۰/۲۲ <sup>d</sup>	۱۶/۱۶ ± ۱/۲۴ <sup>c</sup>	۱	۲
۱/۸۰ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۷/۱۶ ± ۰/۷۴ <sup>a</sup>	۲۸/۵۰ ± ۲/۴۰ <sup>a</sup>	۲	

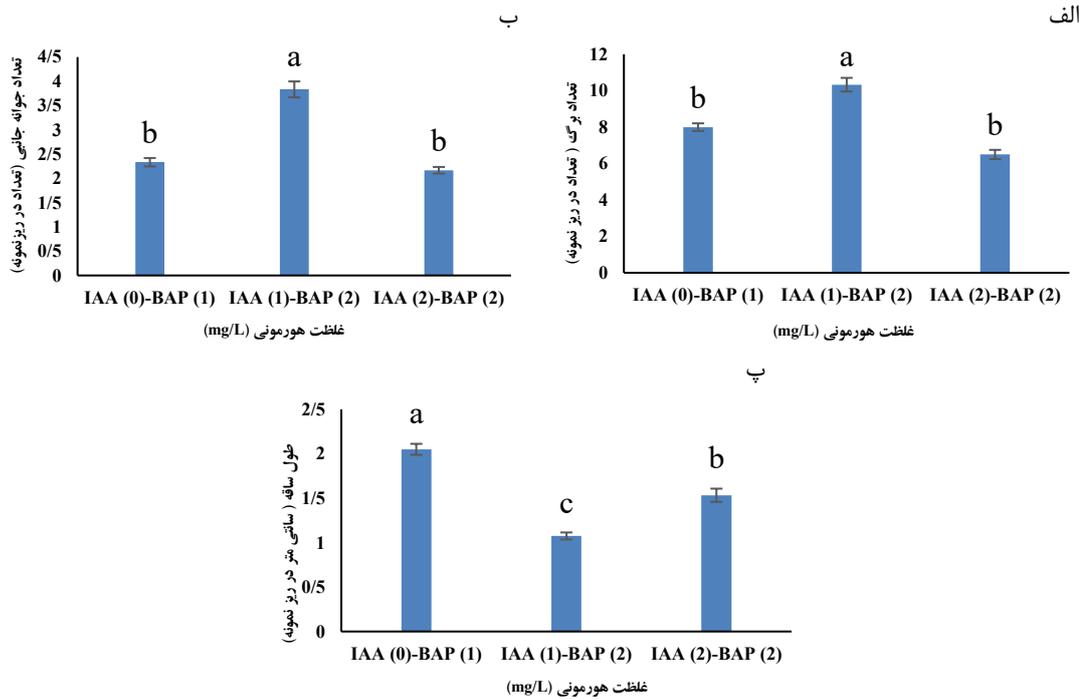


شکل ۴: مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA روی صفات الف) تعداد برگ (ب) تعداد جوانه‌ی جانبی و پ) طول ساقه و اثر اصلی غلظت‌های مختلف BAP روی صفات ت) تعداد برگ، ث) تعداد جوانه‌ی جانبی و ج) طول ساقه در نسل سوم ریزازدیادی

مطالعه آنالیز واریانس تاثیر تیمارهای اعمال شده روی تعداد برگ در نسل چهارم ریزازدیادی نشان داد که هر سه تیمار اعمال شده اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد روی تشکیل برگ، تشکیل جوانه جانبی و طول ساقه دارند (جدول ۹). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین تعداد برگ، جوانه جانبی در نسل چهارم ریزازدیادی در تیمار میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شد (شکل ۵ الف و ب). مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف استفاده شده در نسل چهارم ریزازدیادی به‌منظور بررسی طول ساقه تشکیل شده نشان داد که بیشترین طول ساقه در تیمار صفر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده می‌شود (شکل ۵ پ).

جدول ۹: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IAA و BAP بر تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی، طول ساقه، در نسل چهارم ریزازدیادی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد جوانه جانبی	تعداد برگ	طول ساقه
تیمار	۲	۵/۰۵۵ **	۱/۴۲۸ **	۲۲/۳۸۸ **
خطا	۱۵	۰/۴۶۶	۰/۱۳۱	۲/۹۸۸
ضریب تغییرات (درصد)		۲۴/۵۹	۲۳/۳۲	۲۰/۸۸



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر اصلی غلظت‌های مختلف IAA و غلظت‌های مختلف BAP بر صفت الف) تعداد برگ، ب) تعداد جوانه‌های جانبی و پ) طول ساقه در نسل چهارم ریزازدیادی (اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده غلظت‌های هورمونی مورد استفاده در آن تیمار می‌باشد)

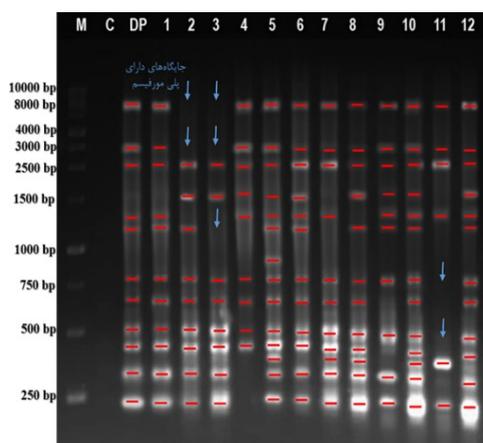
### نشانه‌های ISSR

در این مطالعه UBC-864 و UBC-808 به ترتیب با ۱۷ و ۱۴ باند بیشترین تعداد باند را نشان دادند. در استفاده از آغازگرها در مجموع تعداد ۶۰ باند مشاهده شد. ۲۶ مورد (۴۳/۳ درصد) از باندهای مشاهده شده چندشکلی نشان دادند (جدول ۱۰). در میان تیمارهای مورد بررسی در نسل ۳ ریزازدیادی تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ۹ جایگاه، بیشترین تعداد جایگاه پلی‌مورفیسم را نشان داد. درحالی‌که کمترین جایگاه پلی‌مورفیسم مربوط به نسل ۱ ریزازدیادی و تیمار صفر میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP با دو جایگاه پلی‌مورفیسم بود (جدول ۱۱). بیشترین تعداد باند مشاهده شده مربوط به آغازگر UBC-864 با ۱۷ باند (تعداد باندهای کلی برای هر آغازگر شمارش شده است) و کمترین تعداد مربوط به آغازگر P2 با ۹ باند مشاهده شده بود. متوسط تعداد باندهای به دست آمده با استفاده از آغازگرها ۱۲ باند بود. بیشترین تعداد باندهای دارای چندشکلی به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC-808 (۱۳ باند) (شکل ۶)، UBC-864 (۶ باند)، UBC-825 (۴ باند) و P2 (۳ باند) بودند. در میان آغازگرهای مورد بررسی UBC-826 هیچ چندشکلی را در میان جایگاه‌های مشاهده شده نشان نداد. در میان آغازگرهای مورد استفاده UBC-808 با شاخص نشانگری ۸/۱۵ به عنوان مناسب‌ترین آغازگر و UBC-826 با شاخص نشانگری صفر کمترین مقدار اطلاعات را در این مطالعه در اختیار قرار می‌دهد (جدول ۱۰). بررسی درصد چندشکلی در نسل‌های مختلف نشان داد که بیشترین درصد چندشکلی مربوط به نسل ۳ تحت تیمار با ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP می‌باشد (جدول ۱۱).

جدول ۱۰: درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های تکثیر شده چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکل و شاخص نشانگری در مطالعه حاضر

آغازگر	تعداد مکان	تعداد	درصد	ضریب جاकारد
--------	------------	-------	------	-------------

(MI)	(PIC)	Mean	Max	Min	چندشکلی	مکان چند شکل	تکثیر شده	
۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱۰	UBC-826
۱/۵۹	۰/۲۵	۰/۱۹	۰/۹۴	۰/۸۷	۳۵/۳	۶	۱۷	UBC-864
۲/۶۵	۰/۱۶	۰/۱۹	۱	۰/۸	۴۰	۴	۱۰	UBC-825
۲/۰۵	۰/۶۲	۰/۹۶	۱	۰/۸۸	۳۳/۳	۳	۹	P2
۸/۱۵	۰/۵۸	۰/۷۷	۱	۰/۴۲	۹۲/۸۶	۱۳	۱۴	UBC-808
-	-	-	-	-	-	۲۶	۶۰	مجموع
۲/۸۹	۰/۴۱	-	-	-	۴۳/۳۳	۵/۲	۱۲	میانگین



شکل ۶: باندهای مشاهده شده در نمونه‌های تحت تیمار در نسل‌های مختلف ریزازدیادی با استفاده از آغازگر **UBC-808**. پیکان‌ها: جایگاه‌های پلی مورفیسم مربوط به آغازگر **UBC-808**; **M**: خط‌کش مولکولی **1Kb**; **C**: کنترل منفی، **DP** = Donor Plant؛ شاهد، **۱** الی **۴**: نسل ۱ تا ۴ ریزازدیادی تیمار صفر میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۱** میلی گرم بر لیتر **BAP**، **۵** الی **۸**: نسل ۱ تا ۴ ریزازدیادی تیمار **۱** میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۲** میلی گرم بر لیتر **BAP**، **۹** الی **۱۲**: نسل ۱ تا ۴ ریزازدیادی تیمار **۲** میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۲** میلی گرم بر لیتر **BAP** (بیشترین تعداد جوانه در تیمار **۲** میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۲** میلی گرم بر لیتر **BAP** با میانگین **۱۰/۶۶** جوانه جانبی در هر ریزنمونه، با **۳** جایگاه چندشکلی مربوط به آغازگر **UBC-808** و **۱۰** مکان تکثیر).

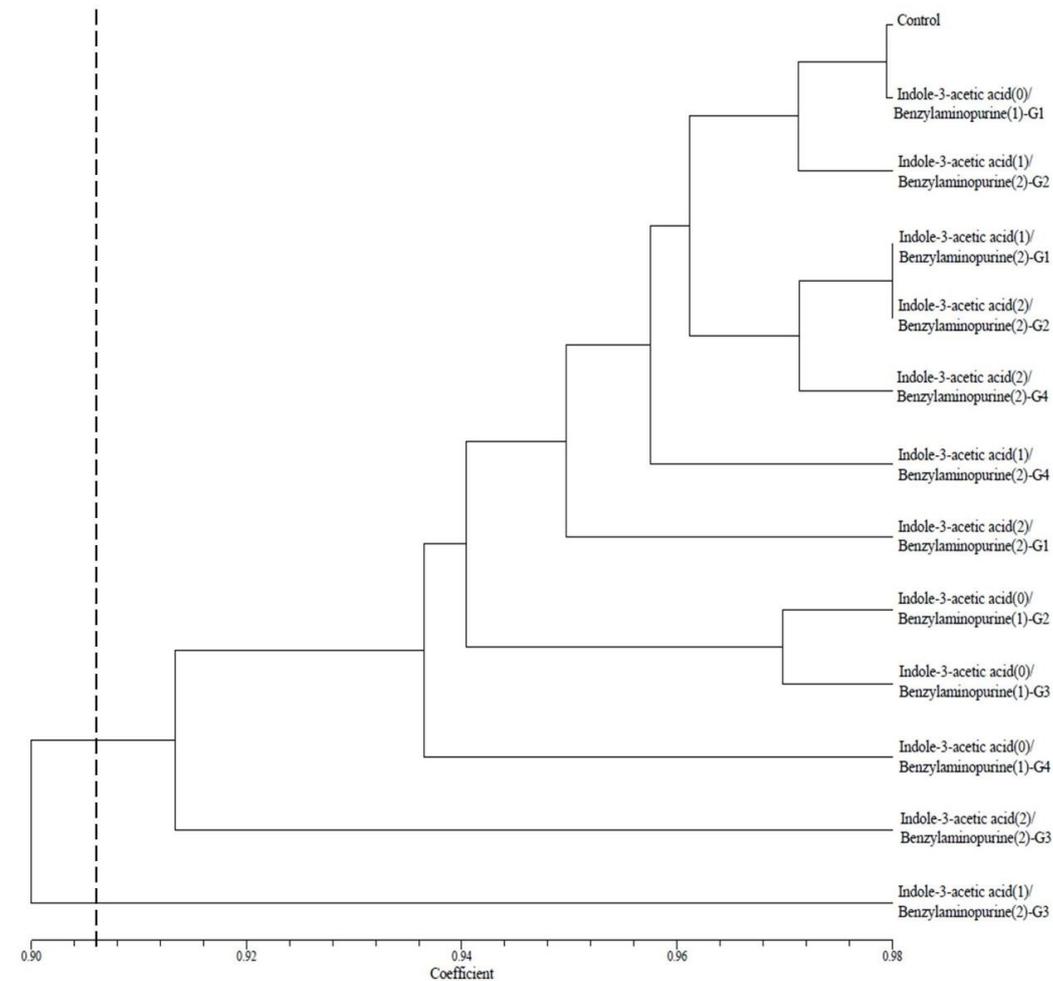
با توجه به تعداد باندهای مربوط به چندشکلی می‌توان دریافت که **UBC-808**، **UBC-864**، **UBC-825** و **P2** آغازگرهای مناسب‌تری جهت بررسی تنوع ژنتیکی هندوانه‌ها هستند. در این مطالعه، آغازگر **UBC-826** با کمترین تعداد چندشکلی مشاهده شده، آغازگر مناسبی جهت جداسازی جمعیت‌ها شناخته نشد. در میان آغازگرهای مورد استفاده **UBC-808** با شاخص نشانگری **۸/۱۵** به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگر و **UBC-826** با شاخص نشانگری صفر کمترین مقدار اطلاعات را در این مطالعه در اختیار قرار می‌دهد (جدول ۹). بررسی درصد چندشکلی در نسل‌های مختلف نشان داد که بیشترین درصد چندشکلی مربوط به نسل ۳ ریزازدیادی تحت تیمار با **۲** میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۲** میلی گرم بر لیتر **BAP** می‌باشد (جدول ۱۱).

بر مبنای داده‌های آغازگرهای مورد بررسی، دندروگرام مربوط به نسل‌های مختلف تحت تیمار رسم شد (شکل ۷). بر اساس دندروگرام رسم شده، بیشترین تشابه به نمونه شاهد در نسل ۱ ریزازدیادی و تیمار صفر میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۱** میلی گرم بر لیتر **BAP** مشاهده شد و بیشترین فاصله از نمونه شاهد نیز در نسل ریزازدیادی و تیمار **۱** میلی گرم بر لیتر **IAA** و **۲** میلی گرم بر لیتر **BAP** مشاهده شد که این نتایج با کم‌ترین و بیشترین جایگاه‌های چند شکل به‌دست‌آمده با آغازگرهای مختلف که پیش از این اشاره شد، مطابقت دارد. بر اساس دندروگرام، نسل‌های **۱** و **۲** شباهت بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشته و به آن

نزدیک‌تر هستند. شاخص جاکارد شاخصی است که میزان تشابه بین دو مجموعه مختلف را اندازه‌گیری کند. در زمینه چندشکلی ژنتیکی، این شاخص به‌عنوان یکی از روش‌های محاسبه تفاوت‌ها و تشابه‌های میان مجموعه‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقادیر بالای شاخص جاکارد نشان‌دهنده تشابه بیشتر بین دو مجموعه است یعنی عناصر مشترک زیادی بین دو مجموعه وجود دارند و این مجموعه‌ها به هم شباهت بیشتری دارند. مقدار پایین شاخص جاکارد نشان‌دهنده تفاوت بیشتر بین دو مجموعه است. بررسی مجموع ضرایب جاکارد به‌دست‌آمده برای تیمارهای مختلف نیز نشان داد که در نسل اول ریزادیدادی تیمار صفر میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین مقدار ضریب جاکارد مربوط به ۵ آغازگر را داشته (مجموع ضرایب جاکارد ۵ آغازگر برابر ۴/۸۴) و کم‌ترین مقدار ضریب جاکارد (مجموع ضرایب جاکارد ۵ آغازگر برابر ۴/۳۲) نیز در نسل سوم ریزادیدادی و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۷). با بررسی نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار GenALEX، شاخص تنوع ژنتیکی Nei بین صفر تا ۰/۰۹۷ به دست آمد. همچنین درصد واریانس مولکولی بر اساس آنالیز AMOVA در جمعیت ۸۹ درصد و در بین جمعیت ۱۱ درصد محاسبه شد.

جدول ۱۱: درصد چندشکلی‌های مربوط به نسل‌های مختلف تحت تیمار با هورمون‌ها (اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده غلظت‌های هورمونی مورد استفاده در آن تیمار می‌باشد)

نسل‌های ریزادیدادی	نوع تیمار	نوع آغازگر			
		UBC-808	P2	UBC-864	UBC-826
	IAA (35)/BAP (35)			۱۰ درصد	۶/۲۵ درصد
نسل اول	IAA (35)/BAP (2)			۱۰ درصد	۶/۲۵ درصد
ریزادیدادی	IAA (2)/BAP (2)	۱۸/۱۸ درصد	۱۱/۱ درصد	۲۰ درصد	۶/۲۵ درصد
	IAA (35)/BAP (35)			۱۰ درصد	۶/۲۵ درصد
نسل دوم	IAA (35)/BAP (2)				۱۲/۵ درصد
ریزادیدادی	IAA (2)/BAP (2)	۱۸/۱۸ درصد		۲۰ درصد	۶/۲۵ درصد
	IAA (35)/BAP (35)				۶/۲۵ درصد
نسل سوم	IAA (35)/BAP (2)			۲۰ درصد	۳۱/۲۵ درصد
ریزادیدادی	IAA (2)/BAP (2)	۱۸/۱۸ درصد			۶/۲۵ درصد
	IAA (35)/BAP (35)			۱۰ درصد	۶/۲۵ درصد
	IAA (35)/BAP (2)				۶/۲۵ درصد
نسل چهارم	IAA (35)/BAP (2)	۲۷/۲۷ درصد	۱۱/۱ درصد		۶/۲۵ درصد
ریزادیدادی	IAA (2)/BAP (2)	۹/۱ درصد		۲۰ درصد	۱۲/۵ درصد



شکل ۷: دندروگرام ۱۳ هندوانه مورد بررسی در پژوهش حاضر با استفاده از الگوریتم UPGMA (اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده غلظت‌های هورمونی مورد استفاده در آن تیمار می‌باشد).

#### ۴- بحث

در پژوهش وانگ و همکاران (۲۴)، گزارش کردند که مدت‌زمان مورد نیاز برای این‌که جوانه‌های جداسده در کشت درون‌شیشه هندوانه بتوانند به‌صورت طبیعی رشد کنند به‌صورت تقریبی ۲۰ روز است که با یافته‌های تحقیق کنونی مطابقت دارد. نتایج بررسی ازدیاد طول ساقه و بهترین زمان مورد نیاز برای واکشت گیاه در مطالعه کنونی نیز نشان داد که واکشت گیاهان پس از گذشت ۲۱ روز بهترین نتیجه را از نظر رشد گیاه در بردارد. گیاهچه‌های ایجادشده پس از گذشت مدت‌زمان مشخص باید به محیط کشت جدید منتقل شوند، در غیر این‌صورت گیاهچه‌ها به‌سرعت زرد شده یا می‌میرند. با این‌حال قضاوت در مورد بهترین زمان قطع گیاهچه و انتقال آن به محیط کشت جدید به کمی تجربه نیاز دارد، زیرا فقط جوانه‌هایی که کاملاً تمایز یافته‌اند می‌توانند در محیط کشت رشد کنند. اگر قطعه جداسده به‌منظور واکشت زودتر از زمان مقرر از گیاهچه جدا شود به‌کندی رشد می‌کند و یا می‌میرد و اگر قطعه جداسده به‌منظور واکشت خیلی دیرتر از زمان مقرر از گیاهچه جدا شود، قادر به جذب مواد مغذی از محیط کشت نخواهد بود (۲۴).

نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ روی صفات مورد بررسی نشان داد که با افزایش غلظت TDZ در محیط کشت سه

صفت تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ساقه کاهش یافت، به طوری که با افزایش غلظت TDZ از صفر به ۲ میلی گرم بر لیتر همه صفات یادشده کاهش نشان دادند. بدرالدین و همکاران (۲۲)، تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ روی صفات طول ساقه، تعداد برگ و تعداد شاخه را در گیاه هندوانه بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر سه صفت طول ساقه، تعداد برگ و تعداد شاخه با افزایش غلظت TDZ از ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر به ۴ میلی گرم بر لیتر به طور چشم‌گیری کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. در پژوهشی دیگر نتایج مشابهی از اثر منفی TDZ روی رشد طول ساقه و طول شاخه در غلظت‌های بالای این هورمون روی دو رقم خیار "چای لای" و "بیگ سی" توسط محققین گزارش شده است (۳۵). علاوه بر این، برخی از پژوهش‌گران گزارش کردند که گیاه‌چه‌های گونه‌های مختلف از جمله حبوبات و کدوتنبل در حضور TDZ در محیط کشت، رشد خود را متوقف کردند (۳۶). یکی از دلایل کاهش صفات مورد بررسی در پژوهش حاضر احتمالاً عدم تجزیه TDZ در محیط کشت و در نتیجه تجمع و افزایش غلظت این هورمون در محیط کشت باشد، زیرا در مطالعه کنونی واکشت ریزنمونه‌ها هر ۲۱ روز (سه واکشت در هر نسل ریزازدیادی) در محیط کشت حاوی مقادیر هورمونی مشابه با واکشت قبل انجام می‌گرفت، بنابراین احتمال دارد با توجه به عدم تجزیه TDZ در ریزنمونه‌ها مقدار این هورمون برای رشد گیاه از حد مجاز به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر آن فراتر رفته باشد و این افزایش غلظت TDZ در گیاه و محیط کشت تاثیر منفی در رشد گیاه و صفات مورد بررسی در پژوهش حاضر داشته است (۳۷). گوویندراج (۳۸)، نیز در مطالعه ای گزارش کرد که افزایش مقدار TDZ در گیاه می‌تواند از طریق کاهش رشد مرستم انتهایی منجر به کاهش طول ساقه شود، همچنین افزایش TDZ ممکن است از طریق تغییر مسیر تمایز سلولی به سمت تشکیل کالوس یا شاخه زایی غیر طبیعی از رشد جوانه‌های جانبی جلوگیری کند.

همان‌طور که در نتایج ذکر شد با توجه به این که در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر BAP در نسل اول ریزازدیادی نتایج بسیار مطلوبی روی صفات مورد بررسی نشان داد در نسل دوم ریزازدیادی به‌منظور بررسی تاثیر غلظت‌های بالاتر BAP روی این صفات، غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر BAP در محیط کشت اعمال شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت BAP در نسل دوم ریزازدیادی منجر به افزایش صفات مورد بررسی نسبت به ۲ میلی گرم بر لیتر در این نسل نشد. علاوه بر این نتایج برهم‌کنش غلظت‌های مختلف IAA با غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر BAP نشان داد که افزایش غلظت BAP در محیط کشت نه تنها منجر به افزایش معنی‌داری در تعداد جوانه جانبی و طول ساقه در حضور غلظت‌های مختلف IAA نشده است، بلکه این صفات نسبت به کاربرد ۲ میلی گرم بر لیتر BAP در حضور غلظت‌های مختلف IAA کاهش نیز نشان می‌دهند. در پژوهشی، عزیزان و زکریا (۳۹)، تاثیر غلظت‌های NAA و BAP را روی تکثیر هیبرید خیار ژاپنی با استفاده از ریزنمونه‌ی نوک شاخه بررسی کردند. نتایج آن‌ها آشکار کرد که با افزایش غلظت BAP تکثیر اندام‌های هوایی افزایش یافت و سپس افزایش غلظت BAP از یک حد بهینه منجر به کاهش تکثیر اندام‌های هوایی شد، به طوری که آن‌ها غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA به‌عنوان بهترین تیمار به‌منظور تکثیر اندام‌های هوایی گزارش کردند. در پژوهشی جورج و شرینگتون (۴۰)، غلظت مناسب BAP برای تکثیر اندام هوایی را در محدوده غلظت ۱ تا ۳ میلی گرم بر لیتر گزارش کردند. این تفاوت در غلظت بهینه BAP جهت رشد گیاه‌چه در بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که گیاهان مختلف و همچنین نوع بافت مورد استفاده در گیاه مشابه به غلظت‌های متفاوتی از این هورمون برای رشد مطلوب نیاز دارند (۳۹) و غلظت‌های بالاتر هورمون BAP در محیط کشت می‌تواند برای گیاه سمی باشد که این سمیت ممکن است منجر به جلوگیری از رشد اندام‌های هوایی گیاه شود (۴۰). در مطالعات مختلف دلایل متعددی برای تاثیر منفی غلظت‌های بالای BAP روی رشد و نمو گیاه گزارش شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به چند مورد همانند برهم خوردن تعادل غلظت‌های اکسین و سیتوکنین در گیاه که این امر می‌تواند منجر به مهار رشد ریشه به دلیل کاهش انتقال

اکسین و همچنین ایجاد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی مانند ضخیم شدن برگ و کوتاه شدن میانگره‌ها شود (۴۱). از طرفی غلظت‌های بالای BAP می‌تواند تولید گونه‌های اکسیژن فعال مانند سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن را در گیاه افزایش دهد که این امر باعث آسیب به غشاهای سلولی و پروتئین‌ها می‌شود (۴۲). از دیگر دلایل کاهش شاخص‌های رشدی در اثر افزایش غلظت BAP در تحقیق حاضر می‌توان به این نکته اشاره کرد که هورمون BAP در غلظت‌های بالا می‌تواند در سیگنال‌دهی سلول‌ها تداخل ایجاد کرده و تقسیم سلولی را مختل کند و در نتیجه از این طریق منجر به کاهش شاخه زایی و توقف رشد در کشت بافت شود (۴۳).

در این مطالعه افزایش غلظت BAP در محیط کشت منجر به کاهش طول ساقه گردید. روستیکاواتی و همکاران (۴۴)، نشان دادند که غلظت بالای سیتوکینین می‌تواند از کشیدگی سلول جلوگیری کند، به نحوی که در غلظت‌های بالای سیتوکینین در محیط کشت ریزنمونه‌ها به سختی طولشان افزایش می‌یابد. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که هر چند با افزایش غلظت BAP طول ساقه کاهش می‌یابد، ولی تعداد جوانه جانبی تا غلظت مشخصی از BAP (۲ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش یافت و سپس تعداد جوانه جانبی نیز با افزایش غلظت BAP (۳ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت BAP تا غلظت بهینه برای هر گیاه باعث افزایش تعداد شاخه‌ها می‌شود و این افزایش در تعداد شاخه‌های جدید تشکیل شده، افزایش طول ساقه را مهار می‌کند (۴۵).

در مطالعه کنونی با وجود استفاده از غلظت‌های هورمونی مشابه در نسل‌های مختلف ریزازدیادی، تفاوت‌هایی در صفات مورد مطالعه با وجود شرایط یکسان برای رشد مشاهده گردید که احتمالاً به این دلیل است که اندازه ریزنمونه‌های اولیه در هنگام واگشت (تک جوانه جانبی) در هر نسل ریزازدیادی متفاوت بوده است و بنابراین ترکیب محیط کشت مورد نیاز برای رشد این ریزنمونه‌ها به صورت برابر نیز متفاوت است (۴۶). روستیکاواتی و همکاران (۴۴)، در مطالعه‌ای گزارش کردند که هرچه اندازه ریزنمونه کوچک‌تر باشد، توانایی باززایی آن نیز کاهش می‌یابد، اما از طرف دیگر احتمال ایجاد آلودگی در محیط کشت نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر این، این تفاوت در صفات مورد بررسی می‌تواند به علت تفاوت در حضور هورمون‌های درونی موجود در ریزنمونه‌ها باشد (۴۶). کاهیاتی و همکاران (۴۶)، گزارش کردند که هر ریزنمونه می‌تواند دارای مقادیر متفاوتی از مواد مغذی و هورمون باشد که این امر باعث ایجاد تفاوت در رشد مشاهده شده در گیاه‌چه‌های درون شیشه تحت تاثیر هورمون‌های خارجی اضافه شده به محیط کشت می‌شوند. محققین در پژوهشی دیگر روی گیاه *Curcuma angustifolia* گزارش کردند که اندازه مناسب ریزنمونه‌ها برای باززایی در شرایط آزمایشگاهی ۲ تا ۳ سانتی‌متر می‌باشد. در این اندازه، در دسترس بودن ذخایر غذایی و هورمون برای رشد این گیاه کافی بود به طوری که ریزنمونه‌ها قادر به تکثیر شاخساره‌های زیادی در شرایط درون شیشه بودند (۴۷).

بررسی نتایج حاصل از تاثیر برهم کنش غلظت‌های مختلف IAA و BAP نشان داد که در تیمارهای حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه غلظت‌های ۲، ۱ و ۰ میلی‌گرم بر لیتر IAA به ترتیب در نسل‌های اول، دوم و سوم ریزازدیادی بیشترین تعداد جوانه جانبی را تشکیل شد. بنابراین می‌توان اظهار داشت که برهم کنش غلظت‌های بهینه هورمون‌های BAP و IAA در شرایط درون شیشه نقش مهمی در القای شاخساره‌ها در نسل‌های مختلف ریزازدیادی هندوانه دارند. در مطالعات مختلف به خوبی نشان داده شده است که سیتوکینین‌ها تقسیم سلولی را تحریک می‌کنند و در از بین بردن خواب جوانه‌های جانبی، القای تشکیل جوانه‌های نابه‌جا، رشد جوانه‌های جانبی و کنترل چرخه سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، در حالی که اکسین‌ها در شروع تقسیم سلولی، سازماندهی سلول‌های مریستمی که باعث ایجاد بافت تمایز نیافته (کالوس) یا اندام‌های معین (شاخه‌ها)، گسترش

سلولی، اسیدی شدن دیواره سلولی، غالبیت راسی و تشکیل ریشه می‌شوند از این نظر، دستکاری تعادل سیتوکینین: اکسین برون‌زا می‌تواند به نفع یک الگوی رشدی یا جهت‌دهی به یک برنامه اندام‌زایی باشد (۲۱).

در مطالعه کنونی برهم‌کنش هورمون‌های IAA و BAP و TDZ روی ریزازدیادی هندوانه مورد بررسی قرار گرفت. در میان دو سیتوکینین مورد استفاده برهم‌کنش IAA و BAP نتایج بهتری از برهم‌کنش IAA و TDZ روی صفات مورد بررسی نشان داد. این یافته‌ها با نتایج بررسی داساری و همکاران (۱۸)، همخوانی نداشت. در پژوهشی داساری و همکاران (۱۸)، گزارش کردند که در بین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (BAP, TDZ, IAA, NAA, IBA) بیشترین میزان باززایی شاخساره در گیاه *Citrullus colocynthis* (L.) در اثر برهم‌کنش بین TDZ و IAA ایجاد گردید که این یافته‌ها با نتایج بررسی حاضر همخوانی نداشت. که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت‌هایی همانند نوع رقم هندوانه مورد بررسی، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده و نوع ریزنمونه استفاده‌شده باشد. از طرفی در مطالعات مختلف گزارش شده است که تاثیر بیشتر برخی از هورمون‌ها روی افزایش صفاتی همانند طول ساقه، یا تعداد جوانه جانبی نسبت برخی دیگر از هورمون‌ها می‌تواند به دلایلی همانند تفاوت در ساختار شیمیایی و پایداری آن‌ها، نحوه تعامل هر هورمون با گیرنده‌های مخصوص به خود در سلول گیاهی، تفاوت در متابولیسم و نوع انتقال هورمون در گیاه، مسیرهای سیگنال‌دهی که یک هورمون برای رسیدن به هدف خود در گیاه باید طی کند و همچنین وجود گیرنده‌های اختصاصی بر روی گیاهان برای برخی از هورمون‌ها باشد (۴۱، ۴۷).

تنوع سوماکلونال به تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در گیاهان باززایی شده گفته می‌شود که با وجود مزیت آن در ایجاد تنوعی از گیاهان پر محصول و مقاوم در برابر بیماری و استرس‌های محیطی، به دلیل ایجاد بی ثباتی ژنتیکی ممکن است مشکلاتی را به همراه داشته باشد. بررسی این تغییرات همواره یکی از دغدغه‌های محققان در حوزه کشاورزی است. کشت بافت از جمله مواردی است که موجب ایجاد تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی شده می‌شود. این تنوع در برخی موارد می‌تواند حتی در فنوتیپ گیاهان ایجادشده نسبت به گیاه پایه مادری ظاهر شود. تاکنون عوامل مختلفی در رابطه با ایجاد تنوع سوماکلونال مطرح شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به نوع کشت بافت، نوع ژنوتیپ گیاه، استفاده از هورمون‌های گیاهی و زمان کشت اشاره کرد (۴۸، ۴۹). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که استفاده از اکسین و سیتوکینین‌ها به‌عنوان هورمون‌های رشد می‌تواند موجب ایجاد جهش و در نتیجه تنوع سوماکلونال در گیاهان مورد استفاده در کشت بافت شود (۵۱). علاوه بر این مطالعات نشان داده‌اند کشت درون شیشه خود به‌عنوان عاملی در ایجاد جهش‌های ژنتیکی و در نتیجه تنوع سوماکلونال نقش دارد (۵۲). با توجه به موارد اشاره‌شده می‌توان بیان کرد که باززایی غیرجنسی نیز می‌تواند موجب ایجاد تنوع سوماکلونال شود (۵۳). بررسی دندروگرام رسم شده و ضریب جاکارد برای نسل‌های مختلف تحت تیمار با IAA و BAP نشان‌دهنده این مورد است که با افزایش نسل‌های ریزازدیادی، گیاهان حاصل فاصله ژنتیکی بیشتری را از گیاه پایه مادری نشان می‌دهند که این نتیجه می‌تواند به اثر واکنش‌های پشت سرهم در ایجاد جهش‌های ژنتیکی و تنوع سوماکلونال اشاره داشته باشد (۵۲). پستلین سولانو و همکاران (۲۳)، اثر کشت‌های دوره‌ای بر تنوع سوماکلونال گیاه *Vanilla planifolia* را با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR بررسی کردند. نتایج این گروه نشان داد که کشت‌های دوره‌ای تا واکنش پنجم باعث افزایش نرخ رشد گیاه می‌شود و پس از آن میزان رشد گیاه کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج آنالیز نشانگر ISSR در پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش تعداد نسل‌های واکنش در شرایط درون شیشه (۵ واکنش پشت سرهم) درصد پلی‌مورفیسم مشاهده‌شده نیز افزایش یافت (۲۳)، که مطابق با نتایج مطالعه حاضر است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد جایگاه‌های چندشکل مشاهده‌شده در نسل‌های ۳ و ۴ بسیار بیشتر از نسل اولیه بود. بنابراین می‌توان گفت که واکنش‌های پشت سر هم و همچنین افزایش تعداد نسل واکنش می‌تواند یکی از عوامل ایجاد تنوع سوماکلونال

در گیاهان و همچنین افزایش چندشکلی مشاهده شده توسط نشانگر ISSR در شرایط درون شیشه باشد. نتایج مطالعه آرجیموس گنزالز و همکاران (۵۳)، نشان داد که بازسازی غیرمستقیم ساقه باعث ایجاد تنوع سوماکلونال، در حضور 2,4-D در ترکیب با Kin و BAP می‌شود. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که BAP در ترکیب با NAA یا IBA ریزنمونه‌هایی با ثبات ژنتیکی تولید می‌کند که این امر نشان می‌دهد که نوع هورمون و غلظت هورمونی مورد استفاده نیز تاثیر بسزایی در ایجاد تنوع سوماکلونال و افزایش مشاهده تعداد باندهای چندشکل توسط نشانگر ISSR در شرایط درون شیشه دارد. در مطالعه پیش‌رو نیز مشاهده شد که در میان تیمارهای هورمونی مورد استفاده تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP در نسل ۳ ریزازدیادی با ۹ جایگاه چندشکلی بیشترین و تیمار صفر میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP در نسل ۱ ریزازدیادی با ۲ جایگاه چندشکل کمترین تعداد جایگاه پلی‌مورفیسم را دارند. با این حال هرچند نحت تاثیر نوع و همچنین غلظت‌های مختلف هورمون‌های مورد استفاده در تحقیق کنونی چندشکلی مشاهده گردید اما الگوی منظمی از تاثیر کاهش و افزایش این فاکتورها در کاهش و افزایش ایجاد جهش و تنوع سوماکلونال در شرایط درون شیشه مشاهده نشد. درصد چندشکلی، نسبت تعداد ژنوتیپ‌های مختلف یا نسبت تنوع ژنتیکی در یک جمعیت را نشان می‌دهد (۵۴). اگر درصد چندشکلی برابر با صفر باشد، این نشانگر ناچند شکل یا تقریباً همگن است، یعنی همه یا بیشتر ژنوتیپ‌ها یکسان هستند و اگر درصد چندشکلی برابر با ۱۰۰ باشد، این نشانگر کاملاً چندشکل است، یعنی همه ژنوتیپ‌ها مختلف هستند (۵۵). درصد چندشکلی به‌عنوان یک معیار مهم در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، مطالعات اکولوژیکی و ژنتیک جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این معیار نشان می‌دهد که چقدر یک جمعیت یا گونه از نظر ژنتیکی متنوع است (۵۶). در پژوهش‌های مختلفی گزارش شده است که نشانگری که PIC بیشتری را نشان دهد، گزینه مناسب‌تری جهت بررسی چندشکلی‌هاست. آغازگر P2 با بیشترین مقدار PIC (۰/۶۲) و پس از آن آغازگر UBC-825 با PIC برابر با ۰/۶ بالاترین میزان PIC را در پژوهش حاضر را به‌خود اختصاص دادند. از آنجایی که هر چه مقدار PIC به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، فراوانی بیشتری از چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد، این نتایج نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها برای مطالعه کنونی می‌باشد. در مطالعه نهتانی و همکاران (۳۲)، که به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ جمعیت بومی هندوانه ایران و یک رقم خارجی با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR پرداختند، مشخص شد آغازگر UBC-864 بیشترین مقدار PIC (۰/۹۱) و بیشترین تعداد باند (۱۵ باند) را تولید کردند. علاوه بر این، آن‌ها گزارش کردند که در مجموع ۷۵ مکان چندشکلی با متوسط تعداد باند ۸/۷ به ازای هر آغازگر تولید شد. نتایج آن‌ها نشان داد که آغازگر UBC-864 بیشترین مقدار PIC و بعد از آن آغازگرهای UBC-810، UBC-825 و P2 بودند. بر اساس گزارش این گروه، این آغازگرها را می‌توان در تحلیل ژنتیکی مجموعه‌های دیگر ژرم پلاسماهای هندوانه در پژوهش‌های دیگر استفاده کرد.

شاخص نشانگری (MI) معیاری است که به‌میزان اطلاعات مورد استفاده در یک نشانگر مولکولی اشاره دارد (۵۸). این شاخص معمولاً در مطالعات ژنتیک جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و نشان می‌دهد چه میزان اطلاعات در یک نشانگر مولکولی جمع‌آوری شده است (۵۹). بر این اساس اگر MI بیشتر باشد، نشانگر مولکولی اطلاعات بیشتری ارائه می‌دهد و در تحلیل ژنتیکی جمعیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵۸). معمولاً از شاخص نشانگری برای انتخاب بهترین نشانگرها در مطالعات جمعیتی و افزایش کارایی تحلیل‌های ژنتیکی استفاده می‌شود (۶۰). مقدار شاخص نشانگری آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر در بازه ۰-۸/۱۵ محاسبه شد و آغازگرهای UBC-808 (AMI/۱۵=)، UBC-825 (MI/۶۵=۲) و P2 (MI/۰۵=۲) بیشترین شاخص نشانگری را در بین آغازگرهای مورد استفاده نشان دادند. در مطالعه نهتانی و همکاران (۳۲)، نیز شاخص نشانگری آغازگرهای ISSR بین ۰/۱۱-۱۱/۸۸ محاسبه شد. آغازگرهای UBC-864، UBC-823، UBC-826 و UBC-808 به ترتیب با میزان شاخص

نشانگری ۱۱/۸۸، ۹/۹، ۷/۷۴ و ۷/۷۴ بالاترین مقادیر MI را نسبت به دیگر آغازگرها نشان دادند. با توجه به اینکه شاخص نشانگری معیار مناسبی جهت پیش‌بینی عملکرد یک نشانگر در یک ژرم پلاسماست (۵۸). در نتیجه آغازگرهای UBC-808، UBC-825 و P2 که بیشترین شاخص نشانگری را در پژوهش حاضر داشتند می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای بررسی ژرم پلاسما هندوانه‌های بومی ایران باشند.

## ۵- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت TDZ در محیط کشت از صفر به ۲ میلی‌گرم بر لیتر مقدار صفات مورد بررسی کاهش یافت که نشان‌دهنده مناسب نبودن این هورمون به منظور ریزازدیادی هندوانه از طریق تکثیر جوانه‌های جانبی می‌باشد. در بخش مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف BAP روی تعداد جوانه جانبی مشاهده شد که هورمون BAP تا یک غلظت مشخص تاثیر معنی‌داری روی افزایش این صفت داشت ولی غلظت‌های بالاتر BAP در محیط کشت منجر به کاهش تعداد جوانه جانبی شد. در مقایسه بین تاثیر دو سیتوکینین BAP و TDZ روی تعداد جوانه جانبی نیز نتایج نشان داد که استفاده از هورمون BAP نسبت به TDZ به منظور القای جوانه‌های جانبی مناسب‌تر است. علاوه بر این هورمون BAP در مقایسه با TDZ در برهم‌کنش با IAA نیز نتایج بهتری را روی صفات مورد بررسی نشان داد. بخش دیگر نتایج این مطالعه مربوط به بررسی تاثیر نسل‌های پشت سر هم ریزازدیادی روی ایجاد تنوع ژنتیکی در گیاه هندوانه بود که نتایج حاصل از مطالعه نشانگر ISSR نشان داد که نسل‌های پشت سر هم ریزازدیادی منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی در گیاهان حاصل از والد مادری در نسل‌های بالاتر ریزازدیادی شد، به طوری که در میان نسل‌های مورد بررسی در نسل ۳ ریزازدیادی (تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP) با ۹ جایگاه، بیشترین تعداد جایگاه چندشکل مشاهده شد، در حالی که کمترین جایگاه چند شکل مربوط به نسل ۱ ریزازدیادی (تیمار صفر میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP) با ۲ جایگاه چند شکل بود و گیاهان حاصل از این نسل بیشترین تشابه را به والد مادری از خود نشان دادند. در نتیجه تعداد نسل‌های ریزازدیادی بر تنوع سوماکلونال و رشد درون شیشه گیاه هندوانه تاثیر می‌گذارد. در هر صورت اگر هدف از کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد تنوع به منظور تولید گیاهان جدید باشد تنوع ایجاد شده در نسل‌های بالاتر ریزازدیادی در کشت درون‌شیشه هندوانه می‌تواند یک برنامه اصلاحی امیدوارکننده برای اصلاح این گیاه در آینده ارائه دهد و اگر حفظ ثبات ژنتیکی و شباهت به والد مادری هدف انجام ریزازدیادی باشد پیشنهاد می‌شود که ریزنمونه‌ها حداکثر تا دو نسل ریزازدیادی از نتاج نسل‌ها قبل برای تکثیر استفاده شده و پس از آن دوباره از والد مادری شوند.

## ۶- منابع

1. Rolnik A, Olas B. Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health. *Nutrition*. 2020;78:110788.
2. Wijesinghe S, Evans L, Kirkland L, Rader R. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2020;271:109493.
3. Kihara H. Triploid watermelons. 1951.
4. Schnable PS, Springer NM. Progress toward understanding heterosis in crop plants. *Annual review of plant biology*. 2013;64(1):71-88.
5. Gillaspay G, Ben-David H, Gruissem W. Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*. 1993;5(10):1439.

6. Freeman JH, Miller G, Olson S, Stall W. Diploid watermelon pollenizer cultivars differ with respect to triploid watermelon yield. HortTechnology. 2007;17(4):518-22.
7. Kyte L, Kleyn J, Scoggins H. Plants from test tubes: An introduction to micropropagation: Hachette+ ORM; 2013.
8. Hajare ST, Chauhan NM, Kassa G. Effect of growth regulators on in vitro micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Gudiene and Belete varieties from Ethiopia. The Scientific World Journal. 2021;2021(1):5928769.
9. Zarei M, Garoosi G, Nezami E, Hosseini R, Ahmadi J. The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of gisela 6 root stock. 2013.
10. Ferreira MdS, Moura ÉRd, Lino LSM, Amorim EP, Santos-Serejo JAd, Haddad F. Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata-Anã' for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1. Revista Brasileira de Fruticultura. 2020;42:e-620.
11. Braun AC. A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1959;45(7):932-8.
12. Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation. 2011;63:147-73.
13. Imran M, Luo X, Hu S, Cao Y, Long Z. Epigenetic and somaclonal divergence in *Dendrocalamus farinosus* for physiological augmentation and lignin degradation. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2022;69(4):1545-56.
14. Duta-Cornescu G, Constantin N, Pojoga D-M, Nicuta D, Simon-Gruita A. Somaclonal variation—Advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. International journal of molecular sciences. 2023;24(1):838.
15. Rodriguez-Enriquez J, Dickinson H, Grant-Downton R. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? Trends in plant science. 2011;16(5):242-8.
16. Collard BC, Jahufer M, Brouwer J, Pang ECK. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica. 2005;142:169-96.
17. Al-Khateeb SA, Al-Khateeb AA, Sattar MN, Mohmand A, El-Beltagi HS. Assessment of somaclonal variation in salt-adapted and non-adapted regenerated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Fresen Environ Bull. 2019;28(5):3686-95.
18. Dasari R, Narra M, Ellendula R, Kota S, Taduri A S. Efficient In vitro propagation system via multiple shoot induction and assessment of clonal fidelity of regenerants in *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. 2015.
19. Chen H, Guo A, Wang J, Gao J, Zhang S, Zheng J, et al. Evaluation of genetic diversity within asparagus germplasm based on morphological traits and ISSR markers. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2020;26:305-15.
20. Wünsch A, Hormaza J. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica. 2002;125(1):59-67.
21. Melara MV, Gatica AM. Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa Rican melon genotypes. Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas. 2009;33(1):125-31.
22. Badr-Elden AM, Nower AA, Ibrahim IA, Ebrahim MK, Abd Elaziem TM. Minimizing the hyperhydricity associated with in vitro growth and development of watermelon by modifying the culture conditions. African Journal of Biotechnology. 2012;11(35):8705-17.
23. Pastelín Solano MC, Salinas Ruíz J, González Arnao MT, Castañeda Castro O, Galindo Tovar ME, Bello Bello JJ. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at

- different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2019;25:561-7.
24. Wang X, Shang L, Luan F. A highly efficient regeneration system for watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *Pak J Bot*. 2013;45(1):145-50.
25. Li J, Li X, Qin Y, Tang Y, Wang L, Ma C, et al. Optimized system for plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *African journal of Biotechnology*. 2011;10(48):9760-5.
26. Ghasemi Z, Mansoumias A, Amiri FR. Study of direct plantlet regeneration in two population of medicinal bitter melon (*Citrulus colosynthis* L.) using types of explants and plant growth regulators. 2017.
27. Islam MR, Feng B, Chen T, Tao L, Fu G. Role of abscisic acid in thermal acclimation of plants. *Journal of Plant Biology*. 2018;61:255-64.
28. Japelaghi RH, Haddad R, Garoosi G-A. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular biotechnology*. 2011;49:129-37.
29. Levi A, Thomas CE, Newman M, Reddy O, Zhang X, Xu Y. ISSR and AFLP markers differ among American watermelon cultivars with limited genetic diversity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2004;129(4):553-8.
30. Wang JauYeuh WJ, Chang YouMing CY, Shen BorKwei SB, Wang YuHua WY, Liou PanChi LP. Molecular markers derived from RAPD and ISSR analysis for identification of watermelon. 2005.
31. Anderson JA, Churchill G, Autrique J, Tanksley S, Sorrells M. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 1993;36(1):181-6.
32. Nohtani H, Masoumiasl A, Sabbagh K, Fahlani R. Genetic diversity of some populations of watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) based on morphological traits and microsatellite markers (ISSR). 2016.
33. Shuaib M, Zeb A, Ali Z, Ali W, Ahmad T, Khan I. Characterization of wheat varieties by seed storage protein electrophoresis. *African journal of biotechnology*. 2007;6(5).
34. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*. 2006;6(1):288-95.
35. Tantasawat PA, Sorntip A, Pornbungkerd P. Effects of exogenous application of plant growth regulators on growth, yield, and in vitro gynogenesis in cucumber. *HortScience*. 2015;50(3):374-82.
36. Murthy B, Murch S, Saxena PK. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 1998;34:267-75.
37. Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu L, Wei Y. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(45):8984-9000.
38. Govindaraj S. Thidiazuron: A potent Phytohormone for In vitro regeneration. *Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator*. 2018:393-418.
39. Azizan M, Zakaria N. The effect of BAP and NAA treatment on micropropagation of *Cucumis sativus* L. *International Journal of Science and Research*. 2017;6(11):270-6.
40. George, E.F. and Sherrington, P.D. (1984) *Plant Propagation by Tissue Culture: A Hand Book and Dictionary of Commercial Laboratories*. Exgetics Ltd., England. 1984.
41. Müller B, Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. 2008;453(7198):1094-7.

42. Procházková D, Wilhelmová Na. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. Nitric oxide. 2011;24(2):61-5.
43. Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*. 2003;216:413-21.
44. Rustikawati R, Herison C, Inorlah E, Dwisari V. Effect of BAP (6-Benzyl Aminopurine) on in vitro shoot growth of curcumas. *AGRITROPICA: Journal Of Agricultural Sciences*. 2021;4(1):82-92.
45. Retna B, Purnomo D. Pengaruh konsentrasi IAA dan BAP terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman kunir putih (*Kaempferia rotunda* L.) secara In vitro.
46. Cahyati S, Isda MN, Lestari W. Induksi tunas dari eksplan kotiledon dan epikotil in vitro jeruk siam (*Citrus nobilis* Lour.) asal kampar pada media MS. *Jurnal Riau Biologia*. 2016;1(1):31-8.
47. Shukla S, Shukla S, Koche V, Mishra S. In vitro propagation of tikhur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): a starch yielding plant. 2007.
48. George EF, Hall MA, De Klerk G-J. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Netherland, The Back Ground Springer. 2008:65-175.
49. Noormohammadi Z, Ghasemzadeh B, Farahani F. Somaclonal variation of tissue culture regenerated plants of *Aloe barbadensis* Mill. *Nova Biologica Reperta*. 2018;5(1):72-81.
50. Sarmast MK. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnology Reports*. 2016;10:309-25.
51. Bairu MW, Fennell CW, van Staden J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*. 2006;108(4):347-51.
52. Leva A, Petruccelli R, Rinaldi L. Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. Recent advances in plant in vitro culture: IntechOpen; 2012.
53. Armijos-González R, Espinosa-Delgado L, Cueva-Agila A. Indirect shoot regeneration using 2, 4-D induces somaclonal variations in *Cinchona officinalis*. *Floresta e Ambiente*. 2021;28(3):e20210017.
54. Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, dos Santos Rabaiolli SM, Stefanel CM. Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*. 2020;726:144175.
55. Al-Samarai FR, Al-Kazaz AA. Molecular markers: An introduction and applications. *European journal of molecular biotechnology*. 2015;9(3):118-30.
56. Khodae L, Azizinezhad R, Etminan AR, Khosroshahi M. Assessment of genetic diversity among Iranian *Aegilops triuncialis* accessions using ISSR, SCoT, and CBDP markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021;19(1):5.
57. Nohtani H, Masoumiasl A, Sabbagh K, Fahlani R. Genetic diversity of some populations of watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) based on morphological traits and microsatellite markers (ISSR). *Seed and Plant Improvement Journal*. 2016;32(4).
58. Gallucci M, Perugini M. The Marker Index: A new method of selection of marker variables in factor analysis. TPM-Testing, Psychometrics, Methodology in Applied Psychology. 2007;14(1):3-25.
59. Varshney RK, Chabane K, Hendre PS, Aggarwal RK, Graner A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*. 2007;173(6):638-49.

60. Venkatesan J, Ramu V, Sethuraman T, Sivagnanam C, Doss G. Molecular marker for characterization of traditional and hybrid derivatives of *Eleusine coracana* (L.) using ISSR marker. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2021;19(1):178.