دانشکده علوم کشاورزی

گروه علوم باغبانی

(گرایش سبزیکاری)

عنوان:

مطالعه‌ی القای پلی‌پلوئیدی هندوانه در شرایط درون‌شیشه‌ای

از:

سعیده فتحی مغانلو

استادان راهنما:

دکتر جمالعلی الفتی

دکتر یوسف حمیداوغلی

استاد مشاور:

دکتر هدایت زکی‌زاده

مهر ۱۳۹۲

تقدیم به قلب مهربان پدرم و چشمان پر محبت مادرم

سپاس بی‌پایان عظمتت را و چه لذت‌بخش است گذر نسیم یاد تو بر دل‌ها و چه شیرین است بیمودن اندیشه در جاده‌ی غیب‌ها به سوی تو. چه روح می‌بخشد گام زدن در مسیر عرفان تو و چه جان می‌دهد ایمان به غیب تو. نه تنها مرا از خویش مران که در کنارم گیر و دامنت را پناه جاودانه من ساز.

نمی‌توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم، کم گفته‌ام. از استادان راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر جمال‌العلی الفتی و دکتر یوسف حمیداوغلی که همواره از راهنمایی‌های ارزنده و حمایت‌های بی‌دریغشان بهره‌مند بوده‌ام، صمیمانه سپاسگزارم و آرزوی اوج کمال و سعادت را برایشان دارم. از زحمات بی‌دریغ استاد مشاور گرامی‌ام جناب آقای دکتر هدایت زکی‌زاده که در طی این پژوهش مرا راهنمون بودند، نهایت تشکر را می‌نمایم. از داوران ارجمند، جناب آقای دکتر رضا فتوحی قزوینی و دکتر محمد مهدی سوهانی که زحمت بازخوانی این پایان‌نامه را بر عهده داشتند، تقدیر و تشکر می‌نمایم. از دیگر اساتید گروه علوم باغبانی که افتخار کسب علم در محضرشان را داشتم، کمال تشکر را دارم. از مدیر گروه محترم باغبانی سرکار خانم دکتر معظم حسن‌پور و گروه زراعت دکتر علی اعلمی به خاطر حمایت‌های ارزشمندشان قدردانی می‌نمایم. از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مجید وظیفه‌دوست به خاطر مدیریت جلسه صمیمانه تشکر می‌کنم.

بر خود لازم می‌دانم تا مراتب تجلیل خالصانه خود را از زحمات جناب آقای مهندس مرتضی قربانزاده، علیرضا رمضانی و میثم شیخ‌پور به جا آورم. آنان که همچون معلمی دلسوز تمامی تجربیات ارزشمند خود را در اختیار بنده گذاشتند و از خداوند متعال آرزوی زندگی سعادتمند همراه با سلامتی را برایشان خواستارم. از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌ها خانم‌ها مهندس تقی‌دوست و سلیقه‌دار و آقایان مهندس حسینی، ناصرانی، رضادوست و علیجانی که با وجود مشکلات فراوان، کمک‌های بی‌دریغشان امید بخش ادامه راهم بود، بی‌نهایت سپاسگزارم. از تمامی دوستان و هم کلاسی‌های عزیزم، به‌ویژه آقایان مهدی شهریاری و مجید فلاحت‌پیشه و خانم‌ها محدثه کنعان‌رو به پاس کمک‌های بی‌دریغشان کمال تشکر را داشته و آرزومند بهترین‌ها در زندگی برایشان، هستم.

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مهر آسمانی‌شان آرام‌بخش آلام زمینی‌ام است. به استوارترین تکیه‌گاهم، دستان پر مهر پدرم و به سبزترین نگاه زندگی‌ام، چشمان پربرکت مادرم.

چکیده فارسی ..... د
Abstract ..... ه
مقدمه ۲
فصل اول ۴
۱- کلیات و مرور منابع ۵
۱-۱- خاستگاه هندوانه ۵
۱-۲- گیاهشناسی ۵
۱-۳- ارزش غذایی و اهمیت اقتصادی ۷
۱-۴- دلایل تولید هندوانه‌ی تریپلوئید ۷
۱-۵- مشکلات تولید هندوانه‌ی تریپلوئید ۸
۱-۶- روش‌های تولید هندوانه‌ی بدون بذر ۸
۱-۷- کلشی‌سین ۹
۱-۸- روش‌های تیمار با کلشی‌سین ۱۰
۱-۹- اثرات بارز کلشی‌سین ۱۰
۱-۱۰- درصد گیاهان تتراپلوئید القاء شده ۱۰
۱-۱۱- راه‌های تشخیص گیاهان تتراپلوئید ۱۱
۱-۱۱-۱- محتوی DNA ۱۱
۱-۱۱-۲- سایتومتری ۱۱
۱-۱۱-۳- شمارش تعداد کروموزوم ۱۱
۱-۱۱-۴- اندازه‌گیری روزنه ۱۲
۱-۱۱-۵- شمارش کلروپلاست ۱۲
۱-۱۱-۶- مشاهدات فیزیولوژیکی ۱۲
۱-۱۱-۷- مشاهدات مورفولوژیکی ۱۳
۱-۱۲- شاخه‌زایی و ریشه‌زایی ۱۳
۲- مواد و روش‌ها ۱۵
۲-۱- مواد گیاهی ۱۵
۲-۲- مواد شیمیایی ۱۵
۲-۳- تهیه محلول‌های غذایی پایه ۱۵
۲-۳-۱- تهیه محلول‌های غذایی پایه عناصر پرمصرف ۱۵
۲-۳-۲- تهیه محلول‌های غذایی پایه عناصر کم‌مصرف ۱۶
۲-۳-۳- تهیه محلول غذایی پایه آهن ۱۶
۲-۳-۴- تهیه محلول غذایی پایه ویتامین‌ها ۱۶
۲-۵- وسایل و تجهیزات مورد استفاده ۱۸
۲-۶- گندزدایی محیط کشت و ابزار و وسایل ۱۸
۲-۷- شرایط اتاقک رشد ۱۸
۲-۸- گندزدایی بذور ۱۸
۲-۸-۱- قبل از جوانه‌زنی ۱۸
۲-۸-۲- بعد از تیمار با محلول کلشی‌سین ۱۸
۲-۹- جوانه‌زنی بذور ۱۹
۲-۱۰- تیمار با کلشی‌سین ۱۹
۲-۱۰-۱- بررسی مدت زمان تیمار با محلول کلشی‌سین ۱۹

۲-۱۰-۲- بررسی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین روی سه رقم هندوانه ۱۹
۲-۱۱- کشت بذور تیمار شده در محیط کشت ۱۹
۲-۱۱-۱- محیط حفظ و نگهداری ۱۹
۲-۱۱-۲- محیط شاخه‌زایی ۱۹
۲-۱۱-۳- محیط ریشه‌زایی ۲۰
۲-۱۲- اندازه‌گیری شاخص‌های تتراپلوئیدی ۲۰
۲-۱۲-۱- طول و قطر شاخساره و طول ریشه ۲۰
۲-۱۲-۲- کلروپلاست ۲۰
۲-۱۲-۳- تعداد و طول و عرض روزنه ۲۰
۲-۱۲-۴- صفات فیزیولوژیکی: اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کارتنوئید ۲۱
۲-۱۳- تجزیه و تحلیل آماری ۲۱
۳- نتایج و بحث ۲۳
۳-۱- گندزدایی بذور قبل از تیمار با کلشی‌سین ۲۳
۳-۲- جوانه‌زنی بذر ۲۳
۳-۳- مرحله‌ی تیمار با کلشی‌سین ۲۴
۳-۴- بررسی مدت زمان تیمار با کلشی‌سین ۲۴
۳-۴- کشت در محیط باززایی ۲۶
۳-۵- بررسی گیاهان باززایی شده از نظر سطح پلوئیدی ۲۷
۳-۶- اثر ژنوتیپ و غلظت کلشی‌سین بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ۲۹
۳-۶-۱- ارتفاع گیاه، قطر ساقه و طول ریشه ۲۹
۳-۶-۲- تراکم روزنه ۳۲
۳-۶-۳- سلامت گیاهچه پس از تیمار با محلول کلشی‌سین ۳۴
۳-۶-۴- کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل و کارتنوئید ۳۵
۳-۷- نتیجه‌گیری کلی ۳۶
۳-۸- پیشنهادات ۳۷
۴- فهرست منابع ۳۹
۵- ضمایم ۴۵

جدول ۱-۱: تولید هندوانه در سال ۲۰۰۵ و ۱۹۹۰ ۵
جدول ۱-۲: مواد غذایی در هندوانه (گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) ۷
جدول ۱-۳: املاح معدنی و ویتامین‌های موجود در هندوانه (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) ۷
جدول ۲-۱: مقدار مواد مورد نیاز برای تهیه‌ی محیط کشت MS ۱۷
جدول ۳-۱: گیاهان تتراپلوئید تولید شده (٪) با استفاده از چند غلظت کلشی‌سین به مدت ۱۲ ساعت ۲۹
جدول ۵-۱: تجزیه واریانس اثر نوع ژنوتیپ و غلظت کلشی‌سین روی میزان القای تتراپلوئیدی در هندوانه ۴۵
جدول ۵-۲: گیاهان تتراپلوئید تولید شده (٪) با استفاده از چند غلظت کلشی‌سین به مدت ۱۲ ساعت ۴۶

شکل ۳-۱: اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم روی درصد جوانه‌زنی بذور هندوانه..... ۲۳
شکل ۳-۲: مراحل مختلف تیمار با کلشی‌سین..... ۲۴
شکل ۳-۳: بررسی اثر مدت زمان تیمار با محلول کلشی‌سین و آب مقطر استریل روی سلامت گیاهچه‌ها (٪)..... ۲۵
شکل ۳-۴: بررسی اثر مدت زمان تیمار بذور جوانه‌زده شده با محلول کلشی‌سین روی میزان زنده‌مانی بذور..... ۲۶
شکل ۳-۵: مقایسه گیاهان رشد کرده در محیط MS و گیاهان باززایی شده در محیط MS به همراه 2ip و BA..... ۲۷
شکل ۳-۶: مقایسه گیاهان باززایی شده..... ۲۷
شکل ۳-۷: تعداد کلروپلاست‌های گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۲۸
شکل ۳-۸: مقایسه ابعاد (طول و عرض) روزنه در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۲۸
شکل ۳-۹: مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت محلول کلشی‌سین و رقم روی ارتفاع گیاه..... ۳۰
شکل ۳-۱۰: مقایسه میانگین اثر ساده غلظت کلشی‌سین و رقم روی صفت قطر ساقه (میلی‌متر)..... ۳۱
شکل ۳-۱۱: مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت محلول کلشی‌سین و رقم روی طول ریشه..... ۳۱
شکل ۳-۱۲: مقایسه طول ساقه و قطر آن و طول ریشه در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۳۲
شکل ۳-۱۳: مقایسه میانگین اثر ساده غلظت کلشی‌سین و رقم روی صفت تعداد روزنه در یک میلی‌متر مربع..... ۳۳
شکل ۳-۱۴: تراکم سلول‌های روزنه در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید در هندوانه..... ۳۴
شکل ۳-۱۵: مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت محلول کلشی‌سین و رقم روی صفت سلامت گیاهچه پس از تیمار..... ۳۴
شکل ۳-۱۶: سلامت گیاهان پس از تیمار..... ۳۵

چکیده فارسی

مطالعه ی القاء پلی‌پلوئیدی هندوانه در شرایط درون شیشه‌ای

سعیده فتحی

امروزه تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی برای بهبود گیاهان، در برنامه‌های اصلاحی قرار گرفته است. از سوی دیگر، درخواست جهانی هندوانه بدون بذر روز به روز در حال افزایش است و لازمه تولید و اصلاح چنین هندوانه‌هایی در اختیار داشتن لاین‌های تتراپلوئید هندوانه است. در این تحقیق بذور سه رقم هندوانه با غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم (۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) گندزدایی شدند و سپس در محیط کشت MS با میزان ساکارز مختلف (۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر) و روی کاغذ صافی قرار گرفتند و به دنبال آن در مراحل مختلف جوانه‌زنی، داخل محلول کلشی‌سین غوطه‌ور شدند. در نهایت مشخص شد که غلظت ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم میزان آلودگی پایین و درصد جوانه‌زنی بالایی دارد. همچنین مشخص شد که بذور روی کاغذ صافی بیشترین جوانه‌زنی را داشته و مرحله‌ی جوانه‌زنی کامل، مناسب‌ترین مرحله برای تیمار با کلشی‌سین بوده و بالاترین میزان زنده‌مانی را داشتند. پس از آماده شدن ماده‌ی آزمایشی، بذور در مدت زمان‌های مختلف (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) درون محلول کلشی‌سین با غلظت ۰/۲ درصد غوطه‌ور شدند. مشخص شد که مدت زمان ۱۲ ساعت با دارا بودن بالاترین درصد زنده‌مانی و رشد مناسب بعدی، برای تیمار با کلشی‌سین مناسب می‌باشد. سپس بذور در محلول کلشی‌سین با غلظت‌های مختلف (۰/۴ و ۰/۶ درصد) با مدت زمان ۱۲ ساعت قرار داده شدند. در روند کار گیاهان به منظور باززایی در محیط کشت MS به همراه BA و ترکیب BA و 2ip با غلظت‌های مختلف قرار داده شدند که محیط کشت حاوی ترکیب BA و 2ip (هر کدام ۳ میکرومول) درصد باززایی و تعداد شاخه‌های نابجای بالایی داشتند. با شاخص شمارش تعداد کلروپلاست‌های درون سلول روزنه مشخص گردید که بیشترین درصد القاء تتراپلوئیدی در ارقام چارلستون‌ان۷۶، کریمسون‌سوئیت و چارلستون‌گری از تیمار ۰/۶ درصد کلشی‌سین بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: تتراپلوئیدی، کلشی‌سین، باززایی، کلروپلاست و هیپوکلریت سدیم.

Abstract

A study on *In vitro* induction of polyploidy in watermelon (*Citrulus lanatus* L.)

Saideh Fathi

Today plants breeding via polyploidy plants have been considered. On the other hand, world demand for seedless watermelon is increasing and to reach this goal breeder needs tetraploids watermelons. In this study, seeds of three watermelon cultivars disinfected with different concentrations of sodium hypochlorite (1.5, 2, 2.5 and 3%) then cultured on MS medium containing different concentration of sucrose (20 and 30 grams per liter) and filter papers. Seeds in different stages of germination were treated with colchicines. Finally, it was found that 1.5 percent of sodium hypochlorite lead to the highest germination rate and the lowest pollution. It was also shown that seeds on filter paper have the highest germination rate and completely germinated seeds are more appropriate for treatment with colchicines and lead to the highest survival rate. After preparation of the test material, seeds at different times (12, 24, and 48 h) exposure to 0.2 percent colchicines solution. It was found that 12 hours exposure to colchicines lead to the highest survival percent and suitable growth. Then the seeds were placed in different concentrations of colchicines (0.4% and 0.6%) for 12-hours. Regeneration MS medium was contained different concentration of BA alone or in combination with 2ip. Medium containing BA (3µmol) and 2ip (3µmol) leads to the highest percent of regeneration and highest number of branches. It was determined that by counting the chloroplast number index of stomata cells the highest percent of induced tetraploidy in Charleston-N-76, Crimson sweet and Charleston gray were obtained from 0.6% colchicines.

Key words: Tetraploidy, Cochicine, Regeneration, Chloroplast and Sodium hypochlorite.

مقدمه

امروزه تولید گیاهان پلی‌پلوئید برای بهبود گیاهان، در برنامه‌های اصلاحی قرار گرفته است. از سوی دیگر درخواست جهانی هندوانه بی‌بذر روز به روز در حال افزایش است و لازمه تولید و اصلاح چنین هندوانه‌هایی در اختیار داشتن لاین‌های تتراپلوئید هندوانه است تا به عنوان لاین‌های مادری در تلاقی با لاین‌های دیپلوئید پدری استفاده گردند.

تولید بذور تتراپلوئید مهم‌ترین و مشکل‌ترین مرحله‌ی تولید هندوانه‌ی بدون بذر می‌باشد و همچنین مدت زمان زیادی نیاز دارد و سبب افزایش قیمت بذور تریپلوئید شده است. از این رو می‌توان با تولید درون‌شیشه‌ای بذور هندوانه تریپلوئید، مدت زمان تولید این محصول را به کمتر از ۲ سال کاهش داد.

در شرایط درون‌شیشه‌ای، امکان تشخیص سریع‌تر گیاهان وجود دارد. در نتیجه می‌توان گیاهانی که تحت تأثیر تیمار کلشی‌سین قرار نگرفته‌اند، حذف کرد. همچنین می‌توان با داشتن شرایط کنترل شده‌ی آزمایشگاهی، گیاهان تتراپلوئید را حفظ و نگهداری کرد. تولید انبوه گیاهان تتراپلوئید از طریق ریزازدیادی، یکی دیگر از مواردی است که شرایط درون‌شیشه‌ای آن را فراهم ساخته است.

القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریانت‌های جدید با کیفیت متمایز می‌شود و از سوی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده‌ی ترکیبات مواد موثره و افزایش اندام رویشی گیاه، موجب بیشتر شدن ترکیبات ثانویه و مواد دارویی آن می‌شود [Tao et al., 2003].

دو برابر کردن کروموزوم می‌تواند به وسیله‌ی چندین عامل آنتی‌میتوزی[1] اتفاق بیافتد که موادی از قبیل کلشی‌سین، اریزالین[2] و تریفلورالین[3] رایج‌ترین این عوامل هستند. فرایند دو برابر کردن کروموزوم در شرایط درون‌شیشه‌ای شامل مراحل مختلفی است که در ابتدا بایستی القاء اتفاق بیافتد سپس تشخیص داده می‌شود که چند درصد موفقیت حاصل شده است. مرحله‌ی القاء به متغیرهای زیادی ازجمله محیط کشت، عامل آنتی‌میتوزی، نوع نمونه‌ی گیاهی، مدت زمان تیمار و غلظت ماده‌ی کاربردی بستگی دارد.

فلوسایتومتری روش بسیار قوی برای تشخیص سطح پلوئیدی است. با این حال، روش‌های دیگری مانند شمارش کروموزوم‌ها و مشاهدات مورفولوژیکی نیز می‌توانند شاخص مناسبی برای تشخیص باشند.

از آنجایی که پلی‌پلوئیدی روی رشد و توسعه‌ی گیاهان تأثیر به سزایی دارد، بنابراین سال‌هاست که در این زمینه مطالعات زیادی انجام شده است و مشخص شده است که این تکنیک می‌تواند کاربردهای زیادی در اصلاح گیاهان مختلف داشته باشد [Dhooghe et al., 2011].

[1] .Antimitotic

[2] .Oryzalin

[3] .Trifluralin

استفاده از هندوانه‌های تریپلوئید به دلیل بدون بذر بودن،کیفیت بالای میوه، مقاومت به بیماری بلاچ و نماتد و همچنین مقاومت به آفتاب سوختگی در بین مصرف‌کنندگان رو به افزایش بوده و حتی دو برابر هزینه را برای خرید آن پرداخت می‌کنند. بنابراین تقاضا برای بذور و گیاهان تتراپلوئید به عنوان یکی از والدین تولید کننده‌ی میوه تریپلوئید بسیار بالا است. به طوری که کشور ایران هزینه‌ی گزافی برای وارد کردن بذور تتریپلوئید متحمل می‌شود. در نتیجه تولید نشاء تتراپلوئید می‌تواند گامی بزرگ در جهت پیشرفت کشور بردارد. هدف از این تحقیق، القاء درون‌شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی در هندوانه است که با توجه به دیگر مزیت‌هایی که شرایط آزمایشگاهی دارد، میزان کلشی‌سین کمتری مصرف می‌شود و زمان کمتری نیز صرف می‌گردد. در این تحقیق سعی شده روش القاء تتراپلوئیدی در سه رقم هندوانه بهینه گردد تا امکان استفاده از آنها در برنامه‌های آتی برای تولید هندوانه بدون بذر فراهم گردد.

فصل اول

کلیات و بررسی منابع

۱ـ کلیات و مرور منابع

۱ـ۱ـ خاستگاه هندوانه

هندوانه از آفریقای مرکزی منشاء گرفته است [Jeffrey, 2001] و در آفریقا و خاورمیانه سابقه‌ی کشت و کار طولانی دارد. چندین نوع بذر هندوانه حدود ۵۰۰۰ سال پیش در آفریقای شمالی کشف گردید [Wasylikowa and Van Der Veen, 2004]. بنابراین آفریقای شمالی یا مرکزی به عنوان منشاء پیدایش هندوانه هنوز قطعی نشده‌اند. در قرن ۱۰ پس از میلاد، در چین و جنوب روسیه گسترش پیدا کرد. در قرن ۱۳ در اروپا مورد کشت و کار قرار گرفت و از آنجا در قرن ۱۶ از طریق اسپانیا به آمریکای شمالی معرفی گردید [Jeffrey, 1975; Robinson and Decker Walters, 1997]. هندوانه در مناطق با دمای بالاتر از ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد می‌کند. در مناطق با اقلیم مناسب، سیستم ریشه‌ای هندوانه می‌تواند بیش از ۲ متر در زمین نفوذ کند [Jeffrey, 2001]. در ایالت متحده، هندوانه عمدتاً در مناطق جنوبی و غربی رشد می‌کند. مانند: فلوریدا، جورجیا، کالیفرنیا و تگزاس [Wehner and Maynard, 2003]. مناطق اصلی کشت و کار هندوانه در لیست زیر آمده است (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱- تولید هندوانه در سال ۲۰۰۵ و ۱۹۹۰.

کشور	سطح زیر کشت (هکتار)		تولید (تن)	
	۲۰۰۵	۱۹۹۰	۲۰۰۵	۱۹۹۰
چین	۲۰۱۴۵۰۰	۵۷۴۰۴۵	۶۹۳۱۵۰۰۰	۱۰۹۵۵۳۷۱
ترکیه	۱۳۷۰۰۰	۱۰۲۸۴۵	۳۸۰۰۰۰۰	۳۳۰۰۰۰۰
ایران	۱۰۰۰۰۰	۱۳۶۲۷۵	۲۱۵۰۰۰۰	۲۶۴۵۹۸۹
برزیل	۸۲۰۰۰	۶۷۹۸۶	۱۸۵۰۰۰۰	۴۳۷۲۰۲
ایالت متحده آمریکا	۵۵۲۰۰	۸۲۰۰۰	۱۷۱۸۹۲۰	۱۱۰۰۰۰۰
مصر	۶۲۰۰۰	۴۹۱۵۰	۱۵۰۰۰۰۰	۱۰۰۷۰۰۰
مکزیک	۴۲۹۷۹	۲۹۷۰۵	۹۷۰۰۵۵	۴۰۴۰۷۷
کره جنوبی	۲۳۰۰۰	۲۵۶۸۱	۸۵۰۰۰۰	۵۹۳۲۲۸
جورجیا	۴۳۰۰۰	Na	۶۶۰۰۰۰	Na
سوریه	۲۵۰۰۰	۲۸۸۰۰	۶۲۰۰۰۰	۲۴۹۷۰۰

منبع: FAO, 2006

۱ـ۲ـ گیاه‌شناسی

هندوانه (*Citrullus lanatus*) متعلق به خانواده‌ی کدوییان[1] است که در گروه گیاهان گلدار قرار دارد. گیاهی یکساله با ساقه‌ی رونده به طول بزرگتر از ۱۰ متر که دارای پیچک مجعد در هر گره می‌باشد. ساقه‌ای نازک، کرک‌دار، زاویه‌دار و با

[1] .Cucurbitaceae

شاخه‌های زیاد دارد. برگ‌ها کرک‌دار و دارای ۵-۳ لب[1] عمیق در انتهای برگ و همچنین دارای دمبرگ طویل می‌باشد [Jeffrey, 1978]. اکثر گیاهان هندوانه گل‌های نر و ماده‌ی جداگانه‌ای تولید می‌کنند که به دلیل داشتن تخمدان شبیه شکل میوه‌ی آن، قابل تمایز می‌باشند. یکپایگی[2] هندوانه به وسیله‌ی یک ژن غالب کنترل می‌شود [Poole and Grimball, 1945]. گیاهان نر-یکپایه[3] هم دارای گل‌های نر و هم گل‌های دوجنسی[4] می‌باشد که کشت و کار آن رایج نیست. جدا بودن اندام نر و ماده، وسیله‌ی مناسبی برای داشتن گرده‌افشانی مناسب توسط حشرات بخصوص زنبور عسل می‌باشد [Feher, 1993]. گل‌های نر زودتر از گل‌های ماده ظاهر می‌گردد. نسبت گل‌های نر به ماده در شرایط مزرعه ۴:۱ تا ۱۵:۱ می‌باشد که اکثر واریته‌ها[5] نسبت ۷:۱ دارند [Feher, 1993; Wehner et al., 2001]. میوه‌ی هندوانه دارای ۳ بخش خارجی (اگزوکارپ[6])، میانی (مزوکارپ[7]) و داخلی (اندوکارپ[8]) است که به ترتیب به بخش‌های دارای پوست سبز، بخش سفید زیر پوست و قسمت گوشتی احاطه‌کننده‌ی بذر اتلاق می‌گردد [Gusmini, 2004]. میوه‌ی آن گرد تا کشیده است که بیش از ۶۰۰ میلی‌متر طول داشته و ضخامت پوست آن به ۴۰-۱۰ میلی‌متر می‌رسد [Wehner and Maynard, 2003]. وزن میوه‌ی آن بین ۱۰-۱ گیلوگرم متغیر است که بستگی به نوع رقم و شرایط محیطی دارد [Gusmini and Wehner, 2007]. بسته به نوع رقم، میوه‌های هندوانه ممکن است از نظر اندازه، شکل، الگوی پوست و رنگ گوشت میوه متفاوت باشند. همچنین در دو نوع بذردار و بدون‌بذر تولید می‌شوند که به صورت تجاری محبوبیت ارقام بذردار دارای گوشت قرمز، شکل مکعبی و اندازه‌ی بزرگ مانند رقم Allsweet و برای ارقام بدون بذر، محبوبیت ارقام با گوشت قرمز، شکل بیضی و اندازه‌ی متوسط مانند رقم Tri-x-313 بیشتر می‌باشد [Wehner and Maynard, 2003]. هندوانه معمولا دیپلوئید بوده و ۱۱ جفت کروموزوم (2n=22, x=11) دارد [Feher, 1993; Wehner et al., 2001]. به دلیل اندازه‌ی کوچک ژنوم هندوانه، کروموزوم‌های آن کوچک بوده و برای مطالعات سیتولوژیکی[9]، رنگ‌گیری ضعیفی دارند [Skorupska and Allgood, 1990]. سطوح پلوئیدی مهم هندوانه شامل: دیپلوئید[10]، تریپلوئید[11] و تتراپلوئید[12] است که اهمیت تجاری بسیار زیادی دارند [Feher, 1993].

1 .Lobe
2 .Monoecious
3 .Andro-monoecious
4 .Perfect flowers
5 .Varieties
6 .Exocaro
7 .Mezocarp
8 .Enocarp
9 .Cytological
10. Diploid
11. Triploid
12. Tetraploid

۱-۳- ارزش غذایی و اهمیت اقتصادی

هندوانه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله لیکوپن، فلاونوئیدها[1]، آمینواسیدها، آسکوربیک اسید و توکوفرول[2] می‌باشد. میزان لیکوپن هندوانه از ۸/۱-۷/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تازه متغیر است [Oms-Oliu et al., 2009]. لیکوپن ممکن است احتمال ابتلا به سرطان‌هایی مانند پروستات، لوزالمعده و معده را کاهش دهد [Wehner and Maynard, 2003]. مقدار آب و قند هندوانه همانند سایر گیاهان خانواده‌ی کدوئیان بالا بوده و به ترتیب ۹۳/۲ درصد و ۷/۷ گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر است. مقدار انرژی آن به طور متوسط ۱۰۰ کیلوژول در ۱۰۰ گرم وزن تر است. جداول زیر مواد غذایی موجود در هندوانه را نشان می‌دهد (جدول ۰-۱ و جدول ۰-۲). هندوانه با تولید سالانه ۳۰ تن در جهان پس از گوجه‌فرنگی و کلم‌پیچ در بین سایر سبزی‌ها، مقام سوم را دارا است [پیوست، ۱۳۸۸]. هندوانه ۶/۸ درصد از سطح زیر کشت اختصاص داده شده به سبزیجات را شامل می‌گردد [Guner and Wehner, 2004; FAO, 2007]. ایران از نظر سطح زیر کشت و مقدار تولید در جهان مقام سوم را بعد از چین و ترکیه به خود اختصاص داده است [پیوست، ۱۳۸۸].

جدول ۱-۲- مواد غذایی در هندوانه (گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر)

آب	کربوهیدرات	چربی	پروتئین	مواد سلولزی
۲/۹۳	۷/۷	۰/۲	۶/۶	۰/۲

جدول ۱-۳- املاح معدنی و ویتامین های موجود در هندوانه (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر)

کلسیم	فسفر	آهن	منیزیم	پتاسیم	ویتامینA	ویتامینC	ویتامین B1	ویتامین B2	ویتامین B6
۱۰/۰	۱۱/۰	۰/۴	۳/۰	۱۶۰/۰	۲۰/۰	۶/۰	۴/۰	۵/۰	۱۵/۰

۱-۴- دلایل تولید هندوانه‌ی تریپلوئید

یکی از دلایل اصلی تولید هندوانه‌ی تریپلوئید و محبوبیت آن در بین مصرف‌کنندگان، نداشتن بذر در میوه‌ی آن می‌باشد [Kapiel et al., 2004]. همچنین در مقابل بیماری بلاچ[3] و نماتد مقاومت دارد. با این حال، در هندوانه تریپلوئید در موقع رسیدن میوه، رنگ نارنجی گوشت به نارنجی تیره تبدیل می‌شود و طعم آن حتی پس از برداشت نیز بهبود پیدا می‌کند. پوست آن در مقابل آفتاب سوختگی مقاوم شده و برای انتقال به مسیرهای طولانی، مقاومت پیدا می‌کند [Raza et al., 2003]. القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریانت‌های[4] جدید با کیفیت متمایز می‌شود. از طرفی، از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده‌ی ترکیبات مواد مؤثره و همچنین اندازه‌ی اندام رویشی گیاه افزایش یافته و

[1] .Flovnoids
[2] .Tocofrol
[3] .Blotch (*Acidivorax avenae* subsp. *citrulli*)
[4] .Variant

موجب بیشتر شدن ترکیبات ثانویه و مواد دارویی آن می‌گردد [Tao et al., 2003].

۱-۵- مشکلات تولید هندوانه‌ی تریپلوئید

بذور هنداونه‌ی تریپلوئید و تتراپلوئید جوانه‌زنی خیلی ضعیفی دارند [Aragao et al., 2006]. تولید هندوانه‌ی تریپلوئید به دلیل هزینه‌ی بالای بذور (هر ۱۰۰۰ بذر حدود ۲۰۰-۱۵۰ دلار) و جوانه‌زنی ضعیف بذر، بسیار سخت است [Raza et al., 2003; Wehner et al, 2001]. هزینه‌ی بالای بذر ناشی از تعداد اندک گیاهان تتراپلوئید است. به این دلیل که باروری پایینی داشته و گاهی میوه‌های با شکل غیریکنواخت تولید می‌کنند [Tricoli et al., 2008]. معمولاً حداقل ۱۰-۸ سال نیاز است تا گیاهان کافی برای تولید تجاری میوه‌ی تریپلوئید به دست آید [Compton and Gray, 1992]. هندوانه‌ی تریپلوئید دوره‌ی رشد طولانی داشته و خیلی با تأخیر به مرحله‌ی بلوغ می‌رسد [Kihara, 1958, 1951]. پس از تیمار با کلشی‌سین به منظور تولید گیاهان تتراپلوئید، ترکیبی از جمعیت‌های دیپلوئید، تتراپلوئید، آنئوپلوئید[1] و شیمرهای[2] پری‌کلینیکال[3] و شعاعی[4] تولید می‌گردد [Tricoli et al., 2008]. انتخاب والدین مناسب بسیار حائز اهمیت می‌باشد. چون هیبریدهای تریپلوئید تولید شده ممکن است بهتر یا بدتر از والدین خود باشند. هیبریدهای تریپلوئید دارای مادگی نازا و گرده‌های عقیم هستند. همچنین گیاهان تتراپلوئید هم گرده‌های نرعقیم تولید می‌کنند. بنابراین نیاز به واریته‌ی دیپلوئید برای تأمین دانه‌ی گرده دارند [Wehner et al, 2001].

۱-۶- روش‌های تولید هندوانه‌ی بدون بذر

روش‌های تولید هندوانه‌ی بدون بذر شامل: استفاده از عامل تنظیم‌کننده‌ی رشد مانند GA_3 [Mesejo et al., 2010]، کشت بافت[5]، شوک دمایی و اشعه‌ی ایکس[6] (X) [Wehner et al., 2001] است. اگرچه هندوانه‌ی بدون بذر به وسیله‌ی گرده‌افشانی با گرده‌های پرتودهی شده با اشعه‌ی ایکس تولید می‌شوند [Sugiyama et al., 2002; Sugiyama and Morishita, 1999] اما با این حال، روش عملی برای تولید هندوانه‌ی بدون بذر از طریق هیبریدهای تریپلوئید می‌باشد. هیبریداسیون[7] بین گیاهان تتراپلوئید به عنوان والد مادری (x=11, 4n=44) و دیپلوئید به عنوان والد پدری (x=11, 2n=22) روش مؤثری برای دستیابی به گیاهان تریپلوئید (x=11, 3n=33) است. لاین تتراپلوئید به وسیله‌ی عامل دوبرابرکننده‌ی کروموزوم مانند کلشی‌سین تولید می‌گردد [Zhang et al., 1995; Wehner, 1999; Wehner et al.,

---

[1] .Aneuploid
[2] .Chimeras
[3] .Periclinal
[4] .Sectoral
[5] .Tissue cultute
[6] .Soft-X-irradiated pollen
[7] .Hybridization

2001; Raza et al., 2003]. تولید هندوانه‌ی تتراپلوئید از طریق تیمار جوانه‌ی انتهایی با کلشی‌سین امکان‌پذیر است [Kihara, 1951]. القای درون‌شیشه‌ای تتراپلوئیدی یک روش متناوبی برای تولید گیاهان تتراپلوئید است تا تعداد گیاهان نامطلوب[۱] تولید شده و زمان لازم برای تولید بذور تریپلوئید از ۱۰ سال به تقریباً ۱-۲ سال کاهش یابد. همچنین این امکان را ایجاد می‌کند که از لاین نرعقیم[۲] تتراپلوئید بدون نیاز به حذف دانه‌ی گرده استفاده کنیم [Compton and Gray, 1992; Compton et al., 1993]. تولید هندوانه‌ی پلی‌پلوئید[۳] درون‌شیشه‌ای[۴] به وسیله‌ی محلول کلشی‌سین برای اکثر گونه‌های گیاهی گزارش شده است [Jaskani et al., 2005]. تیمار بذرهای جوانه‌زده هندوانه با ۱۲ میلی‌گرم در لیتر دی‌نیتروانیلین[۵] به مدت ۲۴ ساعت و ۰/۴ گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۳۶ ساعت، برای تولید لاین‌های تتراپلوئید هندوانه توصیه نمودند [Omran et al., 2003]. غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین برای القاء تتراپلوئیدی در ارقام مختلف متفاوت است و برای هر رقم باید غلظت و مدت زمان مناسب مشخص گردد [Jaskani et al., 2005]. امکان القاء پلی‌پلوئیدی در هندوانه از طریق کشت بذور در محیط کشت‌های حاوی کلشی‌سین وجود دارد. نمونه‌ی کوتیلدون[۶] کشت شده در بستر حاوی ۰/۱۰ درصد کلشی‌سین به مدت ۴ روز بیشترین تتراپلوئیدی را در مقایسه با نمونه‌های اپی‌کوتیل[۷] و هیپوکوتیل[۸] نشان داد [Raza et al., 2003].

۱-۷- کلشی‌سین

کلشی‌سین ترکیب آلکالوئیدی است که برای اولین بار توسط Zeisle در سال ۱۸۸۳ از بذر و غده‌ی گل حسرت پاییزه[۹] استخراج شد. این ترکیب دارای ساختار شیمیایی سه حلقه‌ای با فرمول $C_{22}H_{25}O_6N$ می‌باشد [Sharma et al., 1990]. این ترکیب مانع از تشکیل دوک در هنگام تقسیم سلولی شده و از جدا شدن کروموزوم‌ها در مرحله‌ی متافاز جلوگیری می‌کند. بنابراین مانع از وقوع آنافاز شده و در نتیجه منجر به دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود. تیمار با کلشی‌سین یکی از رایج‌ترین روش‌هایی است که اغلب برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان از آن استفاده می‌شود و نسبت به مواد جهش‌زای[۱۰] دیگر، تغییرات مورفولوژیک بیشتر و موتاسیون[۱۱] بالاتری ایجاد می‌کند [Mensha et al., 2007; Wehner et al, 2001]. در بیشتر گیاهان اغلب با افزایش اندازه‌ی سلول، موجب افزایش اندازه‌ی اندام‌های رویشی و زایشی می‌شود

---

[1] .Off- type
[2] .Male sterillity
[3] .Polyploid
[4] .In vitro
[5] .Dinitoaniline
[6] .Cotyledon
[7] .Epicotyl
[8] .Hypocotyle
[9] .*Colchicum autumnale*
[10]. Mutagen
[11] .Mutation

.[Adaniya et al., 2001]

۱-۸- روش‌های تیمار با کلشی‌سین

القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان به وسیله‌ی کلشی‌سین به روش‌های مختلفی مانند تیمار بذر [Quan et al., 2004]، تیمار جوانه‌ی گل [Wu et al., 2007]، تیمار مریستم انتهایی [سحرخیز، ۱۳۸۵] و تکنیک‌های کشت بافت [Adaniya et al., 2001; Gao et al., 2002] انجام می‌شود. در گیاه ریحان زمانی که بذور جوانه‌زده‌شده در محلول کلشی‌سین غوطه‌ور شدند، همه‌ی گیاهان از بین رفتند. اما با تیمار نوک مریستم انتهایی به وسیله‌ی پنبه‌ی آغشته به محلول کلشی‌سین، درصدی از گیاهان سالم ماندند [ملک زاده و همکاران، ۱۳۹۰]. می‌توان نوک مریستم نشاء را در مرحله‌ی ظهور برگ حقیقی با ۳-۲ قطره (یک میلی‌لیتر) از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های مختلف به مدت ۳ روز متوالی و ۲ بار در روز تیمار کرد [Jaskani et al., 2005]. القاء تتراپلوئیدی از طریق کشت ریزنمونه‌های[1] هندوانه در محیط کشت حاوی کلشی‌سین نیز امکان‌پذیر است .[Raza et al., 2003]

۱-۹- اثرات بارز کلشی‌سین

غلظت کلشی‌سین، مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها بر درصد زنده‌مانی گیاه ریحان مؤثر بود. طوری که بعد از تیمار بیشترین زنده‌مانی مربوط به غلظت ۰/۰۵ (۴۷/۴٪) و در میان زمان‌های مختلف تیمار، تیمار مربوط به ۱۲ ساعت (۶۰/۵٪) بود [ملک زاده و همکاران، ۱۳۹۰]. در نتیجه‌ی تیمار با کلشی‌سین، تعداد کمی از گیاهان، تتراپلوئید و بیشتر گیاهان شیمر بودند که آنئوپلوئید شده بودند [Compton et al., 1994; Jaskani et al., 2004]. گیاهان هندوانه‌ی تیمار شده با کلشی‌سین فقط 4-6% تتراپلوئید خالص تولید می‌نمایند [Jaskani et al., 2004]. گیاهان القایی سرعت رشد پایین و تأخیر در ظهور ریشه را نشان دادند. همچنین کاربرد غلظت‌های بالای آن سبب ظهور اولین برگ در حالت رزت شده و در همان زمان سرعت مرگ و میر افزایش پیدا می‌کند [Jaskani et al., 2005]. امران و همکاران [Omran et al., 2008] بیان کردند که القاء تتراپلوئید در هندوانه به وسیله‌ی کلشی‌سین کمتر از ۵٪ می‌باشد.

۱-۱۰- درصد گیاهان تتراپلوئید القاء شده

امران و همکاران [Omran et al., 2008] بالاترین درصد گیاهان تتراپلوئید را در گیاه هندوانه با شاخص شمارش تعداد کلروپلاست روزنه، بین ۲۲/۰ الی ۲۷/۳ درصد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین و با مدت زمان تیمار ۳۶ ساعت معرفی کردند. در مطالعه‌ای که توسط Dutt و همکاران (۲۰۱۰) در نارنگی (*Citrus reticulata*) انجام شد، از روش تیمار در

[1] .Explant