Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Cultivation of anthers of cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.) in a greenhouse for callus induction

Rashtbar Astmal F[a*], Haddad R[b*], Garoosi GA[b]

[a] Master's student in Biotechnology at Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

[b] Associate Professor of Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Rashtbar Astmal F, Haddad Raheem, Garoosi GA. Cultivation of anthers of cucumber cultivars (Cucumis sativus L.) in a greenhouse for callus induction. Journal of Cell and Tissue . 2024; 15(1):45-57.

https://10.52547/JCT/15.1. 45

KEYWORDS

anther cultivation, plant growth regulators, callus formation

ABSTRACT

Aim: The aim of this research was to investigate the effects of different plant growth regulators and MS culture medium on the characteristics of callus weight, percentage of callus formation and embryogenesis in anther culture of two cultivars of Sina and Negin cucumbers (*Cucumis sativus* L.).

Materials and methods: The experiment was conducted as a factorial in a completely randomized design with three replications. In this research, to determine the stage of growth and development of microspores, male flower buds in the sizes of 0.5 to 2.2 cm were taken from mother plants. For dyeing, the anthers were separated from the buds and placed in stocarman dye solution containing one gram of carmen powder and one hundred milliliters of 45% acetic acid for one day. Then the anthers were crushed on the laboratory slide and the microspores inside them were observed under a light microscope. In the callus induction test, the factors include two cucumber cultivars (Sina and Negin), the combination of different concentrations of BAP (0, 0.7, 0.9 and 1.1 mg/liter) and 2,4-D (0, 0.75, 1 and 1.25 mg/liter). 4 anthers were cultured in each petri dish. After placing the anthers in the culture medium, the lids of the petri dishes were closed and sealed with parafilm, and then they were covered with aluminum foil and placed in the growth chamber at a temperature of 25 ± 2 degrees Celsius in the

* Corresponding author. Tel.: 02833901224, Fax: 02122431664
E-mail address: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir
* Corresponding author. Tel.: 02146867292, Fax: 02122431664
E-mail address: Fatemeh.rashtbar86@gmail.com,
DOI: : https://10.52547/JCT/15.1.31
Received: 30 Dec. 2023; Received in revised form: 19 May. 2024; Accepted: 21 Mar. 2024
Original Article
© Author

dark for 2 weeks and the environments They were cultivated once every 2 or 3 weeks.

Results: Cytogenetic experiments showed that 1.5 cm buds containing anthers and microspores in the mononuclear stage are suitable for anther culture. The results of the analysis of the variance of the data showed a statistically significant difference at the level of 0.01 between the interaction effects of genotype and culture medium. Anthers cultured in MS base medium and media prepared with different concentrations of BAP did not show a response and were destroyed after one month of cultivation. The average main effect of cultivars on callus fresh weight after several weeks of cultivation showed that the highest callus fresh weight was obtained in Sina variety. The comparison of the average triple interaction effects of cultivar × BAP × 2,4-D for callus fresh weight in this research has shown that Sina cultivar in MS culture medium contains the growth regulator compound 0.7 mg/liter BAP and 1 mg/liter 2,4 -D has the highest callus fresh weight. By examining the interaction effect of cultivar, auxin and cytokinin, it was found that the highest percentage of callus formation was 100% in both cultivars in environments with the combination of BAP (0.7 and 0.9 mg/liter) with 2,4-D (0.75, 1 and 1.25 mg/L) and in Sina cultivar BAP (1.1 mg/L) with 2,4-D (0.75, 1.1 and 1.25 mg/L). However, the lowest percentage of callus formation was observed in Nagin cultivar in the presence of 2,4-D hormone with a concentration of 1 mg/liter with an average of 33.333%.

Conclusion: In general, the use of growth regulator BAP and 2,4-D in MS culture medium induced callus in anther culture of both cucumber cultivars.

سلول و بافت، دوره ۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۴۵ تا ۵۷

سلول و بافت

کشت بساک ارقام خیار (*Cucumis sativus* L.) گلخانه‌ای جهت القای کالوس

فاطمه رشتبر آستمال*[۱]، رحیم حداد*[۲]، قاسمعلی گروسی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

واژگان کلیدی

کشت بساک
تنظیم‌کننده های رشد گیاهی کلید کالوس‌زایی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۱

چکیده

هدف: هدف این تحقیق، اثر مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و همچنین محیط کشت MS روی صفات وزن کالوس، درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در کشت بساک دو رقم خیار سینا و نگین (*Cucumis sativus* L.) مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در آزمایش القای کالوس، فاکتورها شامل دو رقم خیار (سینا و نگین)، ترکیب غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۷، ۰/۹و ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. **نتایج:** نتایج حاصل از کشت بساک و القای کالوس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو ژنوتیپ وجود دارد. بساک‌های کشت شده در محیط پایه MS و محیط‌های تهیه شده با غلظت‌های مختلف BAP پاسخی نشان ندادند و بعد از یک ماه از کشت از بین رفتند. بیشترین درصد کالوس‌زایی در هر دو رقم فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. با بررسی اثر متقابل رقم، اکسین و سیتوکنین مشخص شد که بیشترین درصد کالوس‌زایی ۱۰۰٪ در هر دو رقم در محیط‌ها با ترکیب BAP (۰/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) با 2,4-D (۰/۷۵، ۱ و۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و در رقم سینا BAP (۱/۱ میلی‌گرم در لیتر) با 2,4-D (۰/۷۵، ۱ و۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. ولیکن کمترین درصد کالوس‌زایی در رقم نگین در حضور هورمون 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۳۳/۳۳۳ درصد مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی استفاده از تنظیم‌کننده رشد BAP و 2,4-D در محیط کشت MS باعث القای کالوس در کشت بساک هر دو رقم خیار شد.

۱- مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L متعلق به تیره *Cucurbitaceae* یا کدوئیان است (۱). خیار گیاهی عموما یک پایه است و گل‌های نر و ماده آن از هم جدا هستند. گل‌های نر معمولا به‌صورت مجتمع ولی گل‌های ماده به‌طورمنفرد ظاهر می‌شوند و بعضی از ارقام خیار گل‌های دو جنسی دارند (۲). به‌کار بردن تنش‌های فیزیکی مانند سانتریفیوژ و شوک الکتریکی، القای آندروژنز را در گونه‌های مختلف بهبود می‌بخشد. شوک الکتریکی در تبادل مواد محیط کشت به‌داخل سلول و همچنین موجب

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۲۲۴، فکس: ۰۲۱۲۲۴۳۱۶۶۴

آدرس پست الکترونیک: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

رشد پرتوپلاست می‌شود و توانایی باززایی گیاه را افزایش می‌دهد (۳). بر اساس آزمایشی دلیترا و همکاران دریافتند که استفاده از میدان الکتریکی در کشت میکروسپور مارچوبه باعث افزایش باززایی گیاه می‌شود، اما پارامترهای الکتریکی و پیش تیمارهای دیگر بستگی به گونه و ژنوتیپ مورد استفاده دارد و ارقام مختلف واکنش متفاوتی به تیمار شوک الکتریکی دارند (۴). به‌طور کلی، توجه فراوانی به روش‌هایی که برای القای هاپلوئید درکدوئیان که عبارتند از پارتنوژنز (در درجه اول گرده‌افشانی با دانه گرده پرتوتابی شده) و مادەزایی (Gynogenesis) درون شیشه‌ی (کشت درون شیشه تخمدان و تخمک) و نرزایی‌ها درون شیشه (کشت درون شیشه میکروسپور و بساک) شده است (۵). کشت بساک شامل کشت بساک در محیط جامد یا نیمه جامد است (۶). در پژوهش آرمسترانگ و همکاران تنظیم‌کننده رشد گیاهی D-2,4 تولید کالوس را القا می کند و هورمون IAA و NAA جنین‌زایی مستقیم را القا می‌کنند (۷). کومار و همکاران تاثیر پیش تیمار دمایی (۴ درجه سانتی‌گراد در بازده زمانی ۱۰-۰ روز و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ روز) و تنظیم‌کننده‌های رشد (IAA، IBA، D-2,4، NAA، BAP، KN و TDZ با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار و ترکیب ۲ میکرومولار D-2,4 با ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار TDZ، KN و BAP) بر جنین‌زایی و باززایی کشت بساک دو ژنوتیپ خیار در محیط کشت B5 مورد بررسی قرار دادند و ترکیب ۲ میکرومولار D-2,4 و ۱میکرومولار BAP را بهترین ترکیب و نیز پیش تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ روز بهترین پیش تیمار دمایی گزارش کردند (۸). کومارا و همکاران اثر قندهای مختلف ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ و ۰/۵ مولار به‌طور جداگانه و اسید آمینه‌های مختلف (گلوتامین، گلایسین، آرژنین، اسپارژین و سیستئین با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میکرومولار به‌طور جداگانه و نیز با ترکیب‌های ۱ و ۲ میکرومولار) را برای جنین‌زایی و باززایی گیاهان حاصل از کشت بساک دو رقم خیار، در محیط کشت B5 کامل شده با ترکیب تنظیم‌کننده رشد BA و D-2,4 به‌ترتیب با غلظت ۱ و ۲ میکرومولار مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که ساکارز با غلظت ۰/۲۵ مولار، بهترین قند در بین قندهای مطالعه شده و نیز ترکیبی از همه اسیدهای آمینه مورد استفاده با غلظت ۱ میکرومولار از هر کدام بهترین پاسخ را برای القا جنین ایجاد می‌کند (۹). سونگ و همکاران (۱۰) در شش آزمایش شامل پیش تیمارهای دمایی، محیط القای کالوس جنین‌زا، شرایط پیش کشت، محیط القای جنین، محیط جوانه‌زنی جنین و اثرات ژنوتیپ باززایی گیاهان دابل‌هاپلوئید خیار به‌وسیله آندروژنز در محیط کشت MS را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، بهترین محیط برای کالوس جنین‌زا، محیط MS تکمیل شده با ۴/۴۴ میلی‌مولار BA، ۲/۲۶ میلی‌مولار D-2,4 ۴/۶۴ میلی‌مولار کینتین، ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار معرفی شد. برای القای جنین، محیط کشت MS به همراه ۰/۵۴ میلی‌مولار NAA، ۱۳/۳۲ میلی‌مولار BA، ۳ درصد ساکارز و ۱/۲ درصد آگار گزارش شد. سه جنین در هر بساک و ۴۲ دیپلوئید در هر ۴۵ بساک (۹۳ درصد موفقیت) برای ضریب تغییرات به‌دست آمد. سوپرونوا و همکاران (۱۱) به‌منظور افزایش عملکرد گیاهان هاپلوئید خیار حاصل از کشت آزمایشگاهی، تخمک‌های گرده‌افشانی نشده، بساک و میکروسپور، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، ژنوتیپ ها، طول جوانه گل و مراحل رشد میکروسپورها را مورد مطالعه قرار دادند. در تحقیق آرمیون تاثیر ژنوتیپ و اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در القای‌کالوس و تشکیل ساختارهای جنینی از طریق کشت بساک خیار در دو رقم تبریز و سوپردامینوس مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت MS حاوی ساکارز سه درصد و آگار ۰/۸ درصد همراه با تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. رقم تبریز با تیمار تنظیم‌کننده رشد ۲ میکرومولار D-2,4، ۲ میکرومولار BAP و ۲ میکرومولار کینتین بیشترین میزان کالوس‌زایی را از خود نشان داد. همچنین تیمار تنظیم‌کننده رشد ۰/۶ میکرومولار NAA به‌همراه ۱۰ میکرومولار BA بیشترین میزان ساختارهای جنینی بر روی کالوس‌ها و تیمار هورمونی ۰/۳ میکرومولار NAA به‌همراه ۱ میکرومولار BA بیشترین میانگین تعداد جنین به‌ازای هر کالوس جنین‌زا را ایجاد کرد (۱۲). حمیدوند و همکاران (۱۳) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد ۲۰ و ۵ میکرمولار D-2,4 و NAA به‌صورت جداگانه و۰/۵، ۱و ۱/۵ میکرومولار BAP و KIN در ترکیب با ۲ میکرومولار D-2,4 را برای جنین‌زایی حاصل از کشت بساک دو ژنوتیپ

اصفهانی و بتا آلفا خیار مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی در ژنوتیپ اصفهانی، ترکیب ۲ میکرومولار D-2,4 و ۱/۵ میکرومولار KIN و در ژنوتیپ آلفابتا ترکیب ۲ میکرومولار D-2,4 و ۱/۵ میکرومولار KIN به‌همراه ۲ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP را نشان داد. بیشترین تعداد جنین در بساک در ترکیب ۲ میکرومولار D-2,4 و ۱ میکرومولار BAP به‌دست آمد. عبدالهی و همکاران (۱۴) تاثیر غلظت‌های مختلف آگار (۰، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ گرم در لیتر) با عناصر درشت مغذی تغییر یافته (نیمه، کامل، یک ونیم برابر و دو برابر) را بر کشت بساک و القای کالوس و جنین روی چهار ژنوتیپ خیار مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های مختلف آگار و عناصر پرمصرف، از نظر میزان کالوس‌زایی و جنین‌زایی گامتی، در کشت بساک چهار رقم خیار وجود دارد. دو برابر کردن عناصر پرمصرف در محیط کشت، باعث افزایش ۱۰۰ درصدی کالوس‌های جنین‌زا در ژنوتیپ اصفهانی شد. در حالی که سایر ارقام در مقدار یک برابر، بیشترین درصد کالوس‌های جنین‌زا را نشان دادند. بیش‌ترین درصد کالوس‌های جنین‌زا در محیط حاوی آگار ۷ گرم بر لیتر به‌دست آمد. اسدی و همکاران (۱۵) اثر تنظیم کننده‌های رشد (BAP با غلظت‌های ۰ ، ۰/۲۲۵، ۰/۴۵، ۰/۶۸ و ۰/۹۱ میلی‌گرم در لیتر همراه با D-2,4, ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر جنین‌زایی و باززایی کشت بساک دو ژنوتیپ خیار در محیط کشت جامد و مایع MS مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، محیط‌های کشت M24، M22 و M15 به ترتیب با میانگین‌های ۹۸، ۹۷/۷۵ و ۹۶/۷۵ درصد در بین ۲۵ محیط کشت مورد آزمایش، بیش‌ترین کالوس در محیط کشت M10 با میانگین ۷۷/۵ درصد و نیز کمترین کالوس را برای ژنوتیپ اصفهانی داشتند. محیط کشت M22 با میانگین ۹۸/۴۵ درصد در رقم بتاآلفا، بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۵۹/۷ درصد کم‌ترین میزان کالوس را برای این رقم داشت.. کشت بافت خیار باهدف کالوس‌زایی به‌عنوان گام اول به‌نژادی و یا بیوتکنولوژی مطالعه‌ای ضروری می‌باشد. لذا در تحقیق حاضر به عنوان مرحله‌ای اساسی بررسی هورمون‌های رشد برای القای کالوس‌زایی در دو رقم خیار گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان مورد نیاز برای تهیه ریزنمونه برای کشت بافت در بهار ۱۴۰۰ در دانشکده کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) انجام شد. بذور خیار مورد استفاده در این تحقیق شامل دو ژنوتیپ سینا ۱۸۹ و نگین می‌باشد. بذور گیاهان مادری در گلدان‌هایی پلاستیکی با سایز ۲۵ ×۲۰ سانتی‌متری در عمق دو سانتی‌متری در گلخانه کشت شد. جهت کشت بذور از مخلوط ۲۰ درصدکوکوپیت، ۴۰ درصد پیت ماس، ۲۰ درصد خاک مزرعه، ۲۰ درصد پرلیت استفاده شد و داخل هر گلدان یک بذر کشت شد و مراقبت‌های زراعی در گلخانه شامل آبیاری، سم‌پاشی و کودپاشی با روش مناسب انجام گرفت. حدود ۴۰ روز بعد از کشت، گیاهان مادری به تدریج شروع به گل‌دهی کردند و اقدام به جمع آوری گل‌ها جهت کشت بساک شد. بهترین زمان برداشت جوانه‌های گل جهت کشت بساک زمانی می باشد که میکروسپورها در اواسط تا اواخر مرحله تک هسته‌ای هستند (۸). به‌منظور تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپورها، غنچه‌های گل نر در اندازه‌های ۰/۵ تا ۲/۲ سانتی‌متر (شکل ۱ الف) از گیاهان مادری برداشت شدند. جهت رنگ آمیزی، بساک‌ها از داخل غنچه‌ها جدا و به‌مدت یک روز در محلول رنگ استوکارمن که حاوی یک گرم پودر کارمن همراه با صد میلی‌لیتر اسیداستیک ۴۵ درصد بود، قرار داده شدند. سپس بساک‌ها روی لام آزمایشگاهی له شده و میکروسپورهای درون آن‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند (۱۴).

اعمال پیش تیمار دمایی: جوانه‌های گل برداشت شده را درون شیشه‌هایی که قبلا با فویل آلومینیومی پوشانده شده ریخته و شیشه‌ها رو داخل جعبه حاوی یخ قرار دادند و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. شیشه‌های حاوی گل به‌مدت دو روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌منظور اعمال پیش تیماری سرمایی در یخچال قرار می گیرند (۸ و ۱۶).

ضد عفونی کردن گل‌ها قبل از کشت: برای سترون سازی سطحی غنچه‌ها، با مایع شوینده (مایع ظرفشویی) و آب شهری (به‌مدت ۳ ساعت) جهت زدودن خاک استفاده شد و ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. پس از آن گل‌ها در هود در داخل تیوب فالکون اتوکلاو شده (مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار۱/۲ بار) ریخته و با آب مقطر استریل شده ۳ مرتبه شستشو داده شدند و متعاقبا ریزنمونه در هیپوکلریت سدیم ۵٪ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و مجددا آن‌ها با آب مقطر استریل ۳ مرتبه شسته شدند. پس از طی این مراحل تا زمان کشت، بساک‌ها در داخل آب مقطر استریل سرد قرار گرفتند (۱۷).
بررسی اثر ترکیبات مختلف 2,4-D و BAP بر القای کالوس از کشت بساک: در این آزمایش برای القای کالوس از کشت بساک از ۱۶ محیط کشت MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D با غلظت‌های ۰، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت‌های ۰، ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تعداد ۴ بساک در هر پتری دیش کشت شد (۱۵ و ۱۸). جهت کشت بساک، در محیطی کاملا سترون، بساک‌ها به نحوی که بافت رویشی دیواره بساک آسیبی نبیند، به‌وسیله پنس و اسکالپل از گل جدا شده و روی محیط کشت جامد برای انجام تیمارهای مختلف قرارگرفتند. پس از قرار گرفتن بساک‌ها در محیط کشت(شکل ۲ ب) ، درب پتری دیش‌های را بسته و با استفاده از پارافیلم درزگیری شدند و سپس با فویل آلومینیومی پوشیده شده و در اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به‌مدت ۲ هفته قرار گرفتند و محیط‌ها هر ۲ یا ۳ هفته یک‌بار واکشت گردیدند.

۳- آنالیز آماری

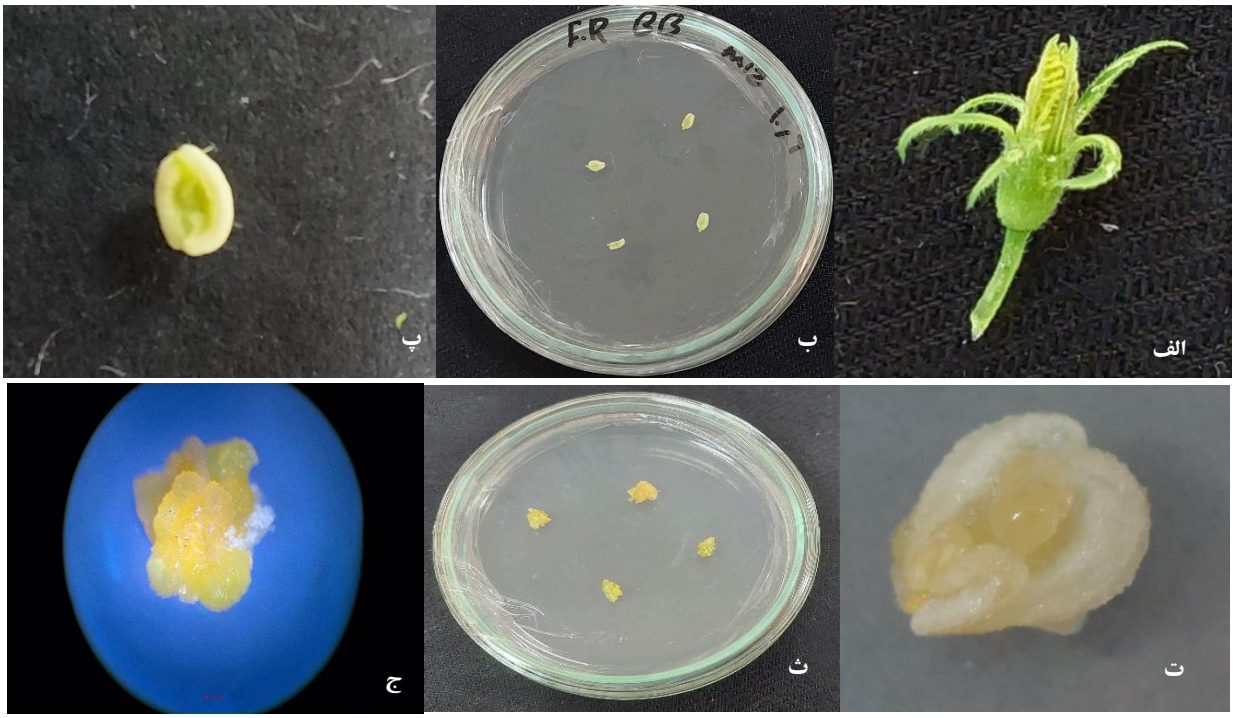
این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیزتجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و همچنین جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

۴- نتایج

نتایج نشان داد ضدعفونی بساک‌ها با روش گفته شده باعث آلودگی به صفر درصد برسد و همچنین در آزمایش سیتولوژیکی روی غنچه‌های نر نتایج نشان داد که غنچه‌های ۱/۵ سانتی‌متری (شکل ۱ ب و شکل ۲ الف) حاوی میکروسپورهایی تک هسته‌ای میانی تا اواخر مرحله تک هسته (شکل ۱ ت)، بهترین مرحله میکروسپورهای جهت کشت بساک (شکل ۱ پ و شکل ۲ پ) در خیار می‌باشند.

شکل ۱: آزمایش سیتولوژیکی جهت تعیین اندازه مناسب غنچه نر و بساک و مرحله مناسب میکروسپورها جهت در کشت بساک خیار. الف- گل‌های نر خیار در اندازه‌های مختلف، ب- اندازه‌ی مناسب گل خیار حاوی میکروسپورهای مناسب در مرحله‌ی تک هسته‌ای، پ- بساک جدا شده از گل آماده برای رنگ آمیزی، ت- میکروسپور خیار در مرحله تک هسته‌ای با بزرگنمایی(×۴۰)،

نتایج این تحقیق مشاهده شد که محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط کشت حاوی سطوح مختلف BAP، منجر به القای کالوس در کشت بساک خیار نمی‌شوند و بساک‌ها در این محیط‌های کشت در اوایل کشت دارای رشدی طبیعی می‌باشند، ولی بعد از گذشت حدود چهار هفته از بین می‌روند. در این آزمایش‌های مشاهده شد بساک‌های که در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D با غلظت‌های (۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و همراه BAP با غلظت‌های (۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر) بعد از گذشت یک هفته شروع به متورم شدن (شکل ۲ ت و ث)، به‌طوری‌که پس از گذشت ۱۴ تا ۲۰ روز از کشت، بساک‌ها شروع به کالوس‌زایی کردند (شکل ۲ ج). در این تیمار پس از گذشت زمان فقط وزن کالوس‌ها افزایش یافت (شکل ۲ چ) و جنین‌های القا شده به‌سمت ریشه‌زایی رفته و با گذشت زمان از بین رفتند (شکل ۲ ح و خ).



شکل ۲: مراحل القای کالوس و ریشه‌زایی از کشت بساک خیار. الف- غنچه گیاه خیار مناسب برای کشت بساک، ب- بساک‌های تازه کشت شده در محیط القای کالوس پ- بساک خیار حاوی میکروسپور مناسب در مرحله‌ی تک هسته‌ای، ت-پاسخ بساک به القای کالوس، ث-کالوس‌ها القا شده از طریق کشت بساک خیار، ج- کالوس مشاهده شده در زیر میکروسکوپ، چ-کالوس‌های به‌دست آمده دو ماه پس از کشت،ح- ریشه القا شده روی کالوس، خ- کالوس ریشه‌دار شده در حال نکروز.

طبق جدول ۱ تجزیه واریانس اثر تیمارهای رقم، سیتوکنین و اکسین بر وزن تر کالوس اختلاف آماری معنی‌داری در سطح یک درصد نشان دادند.

جدول ۱: جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای رقم، سیتوکنین و اکسین بر وزن تر کالوس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر کالوس ۳ هفته پس از کشت	وزن تر کالوس ۶ هفته پس از کشت	وزن ترکالوس ۹ هفته پس از کشت	وزن تر کالوس ۱۲ هفته پس از کشت	وزن تر کالوس ۱۵ هفته پس از کشت
رقم	۱	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۳ **	۰/۰۷ **
سیتوکنین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۱ **	۰/۰۱ **	۰/۰۴ **	۰/۱۰ **
اکسین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۱ **	۰/۰۷ **	۰/۲۴ **	۰/۵۳ **
رقم × سیتوکنین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ *	۰/۰۱ **	۰/۰۱ **
رقم × اکسین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۱ **	۰/۰۱ **	۰/۰۱ **
سیتوکنین × اکسین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۱ **	۰/۰۳ **	۰/۰۶ **
رقم × اکسین × سیتوکینین	۳	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۱ **	۰/۰۲ **	۰/۰۴ **
خطا	۶۴	۰/۰۰	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۹
ضریب تغییرات	-	۸/۶۸ %	۱۳/۸۱ %	۲۳/۵۸ %	۱۷/۹۳ %	۱۴/۱۰ %

**: نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.

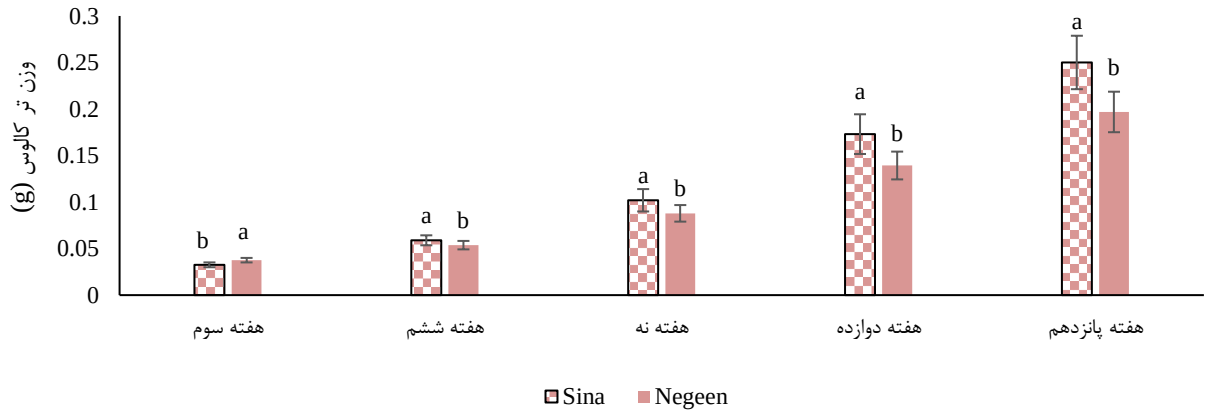
براساس نتایج جدول ۲ تجزیه واریانس اثر تیمارهای رقم، سیتوکنین و اکسین بر درصد کالوس اختلاف آماری معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان دادند. اثرات اصلی اکسین و سیتوکنین و همچنین اثر متقابل سیتوکنین در اکسین برای صفات درصد کالوس‌های جنین‌زا، درصد کالوس‌های جنین‌داده در سطح یک درصد معنی‌دار گردید در حالی که اثرات دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند و اثر تیمارهای رقم، سیتوکنین و اکسین بر درصد ریشه‌زایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای رقم، سیتوکنین و اکسین بر درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس‌های جنین‌زا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد کالوس‌زایی	درصد کالوس‌های جنین‌زا	درصد کالوس‌های جنین‌داده	درصد ریشه‌زایی
رقم	۱	۱۸۸/۵۱ **	۴۶/۳۰ ns	۱۸/۰۸ ns	۲۶/۰۴ ns
سیتوکینین	۳	۱۹۳/۵۹ **	۴۴۸/۴۹ **	۲۵۶/۷۰ **	۸/۶۸ ns
اکسین	۳	۴۹۶/۳۰ **	۲۶۷/۴۹ **	۱۰۳/۸۲ **	۸/۶۸ ns
رقم × سیتوکنین	۳	۶۳۱/۵۱ **	۶۳/۶۶ ns	۱۲/۳۰ ns	۸/۶۸ ns
رقم × اکسین	۳	۲۸۴/۲۹ **	۵۲/۰۸ ns	۱۸/۰۸ ns	۸/۶۸ ns
سیتوکنین × اکسین	۹	۵۴۴/۷۰ **	۴۶۹/۷۱ **	۸۸۶/۱۴ **	۱۴/۴۷ ns
رقم × اکسین × سیتوکینین	۹	۱۴۵/۴۰ **	۶۱/۷۲۸ ns	۵۸/۵۹ ns	۱۴/۴۷ ns
خطا	۶۴	۴۵/۵۷	۵۴/۹۸	۵۳/۵۳	۱۳/۰۲
ضریب تغییرات	-	۹/۹۳ %	۱۴/۸۸ %	۸۰/۲۷ %	۶۹۲/۸۲ %

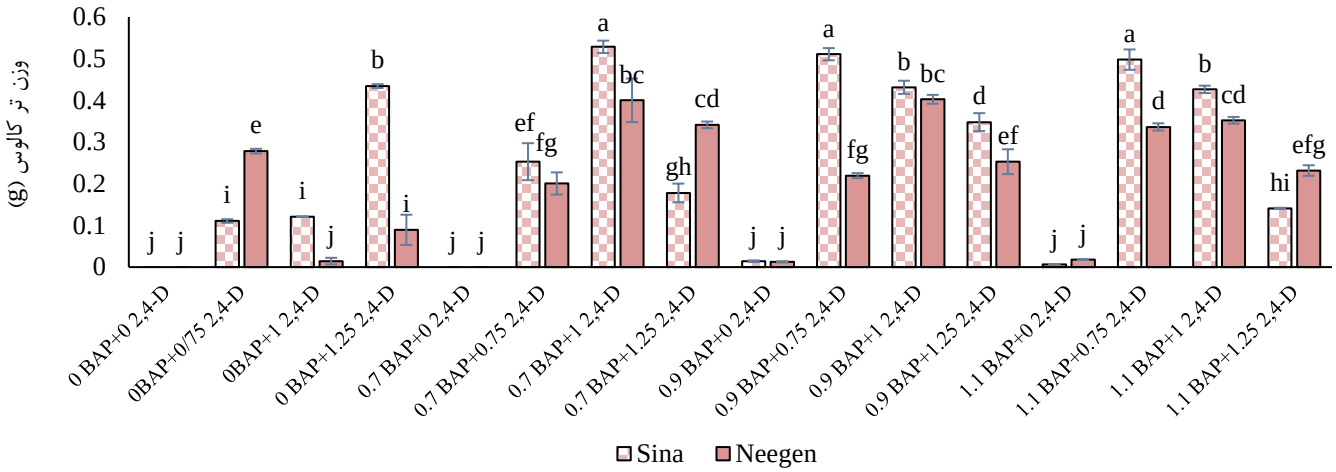
*: نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار درسطح۰/۰۵ می‌باشد و **ns** نشان دهنده‌ی عدم اختلاف آماری معنی‌دار

طبق شکل ۳ مقایسه میانگین اثر اصلی رقم ها بر وزن تر کالوس در ابتدا اختلاف آماری چندانی ندارد ولی پس ازگذشت چندین هفته ازکشت نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس در رقم سینا به‌دست آمده است.



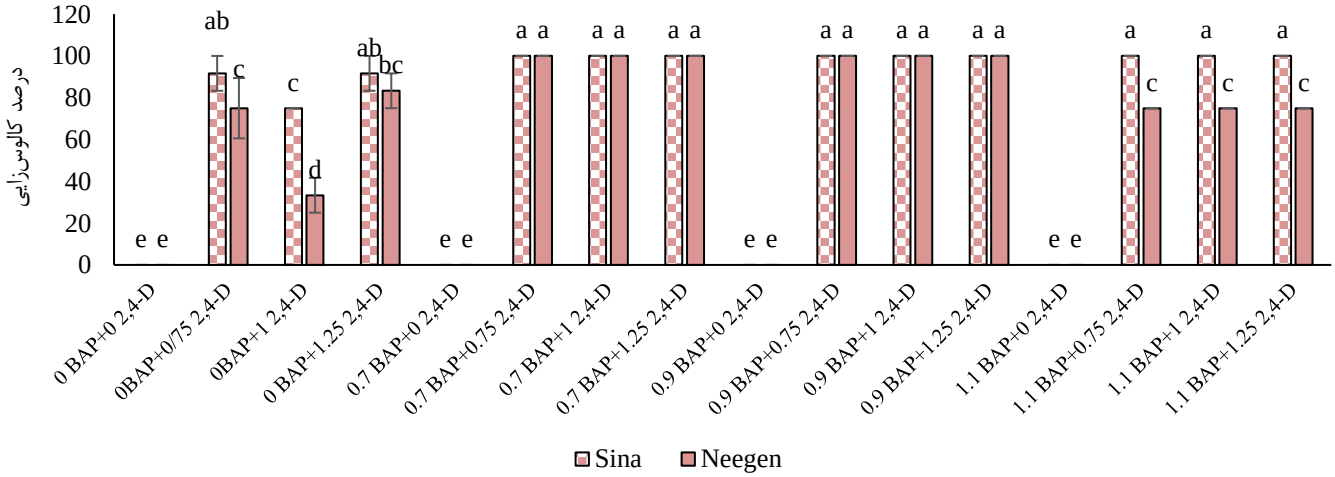
شکل ۳: مقایسه میانگین بر وزن تر کالوس در کشت بساک خیار در پاسخ اثر اصلی رقم‌ها

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه رقم × BAP × 2,4-D برای وزن تر کالوس در شکل ۴ نشان داده است که رقم سینا در محیط کشت MS حاوی ترکیب تنظیم‌کننده رشد ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین وزن تر کالوس را دارد.



شکل ۴: مقایسه میانگین بر وزن تر کالوس در کشت بساک خیار در پاسخ به محیط‌های مختلف ***MS*** حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی میانگین‌های که دارای حروف یکسان هستند اختلاف معنی‌داری با همدیگر ندارند

با بررسی اثر متقابل رقم، اکسین و سیتوکنین مشخص شد که بیشترین درصد کالوس‌زایی ۱۰۰٪ در دو هر رقم در محیط‌ها با ترکیب BAP (۰/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) با 2,4-D (۰/۷۵، ۱ و۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و در رقم سینا BAP (۱/۱ میلی‌گرم در لیتر) با 2,4-D (۰/۷۵، ۱ و۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. دراین تحقیق مشاهده شد، کم‌ترین درصد کالوس‌زایی ۳۳/۳۳٪ که مربوط به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر D-2,4 در رقم نگین بوده است (شکل ۵). همچنین نتایج نشان داد، افزایش غلظت هر دو هورمون در رقم نگین، باعث کاهش میزان القای کالوس شده است.



شکل ۵: مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار در پاسخ به محیط‌های مختلف ***MS*** حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی میانگین‌های که دارای حروف یکسان هستند اختلاف معنی‌داری با همدیگر ندارند.

۵- بحث

نتایج حاضر نشان داد غنچه‌های ۱/۵ سانتی‌متری حاوی بساک‌ها و میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ای برای کشت بساک مناسب هستند. حمیدوند و همکاران (۱۳) و عبدالهی و همکاران (۱۴) گزارش کردند که مرحله تک هسته‌ای میکروسپور در گل‌هایی خیار با اندازه‌های ۱۲ الی ۱۵ میلی‌متری در زیر میکروسپور قابل مشاهده است که این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد؛ در حالی که اسدی و همکاران (۱۵) در مطالعه خود نشان دادند که گل‌هایی با اندازه ۳ الی ۷ میلی‌متری در مرحله

تک هسته‌ای میکروسپور قرار دارند که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی ندارد. با توجه به این‌که یک عامل مهم برای دستیابی به نرزایی موفق، انتخاب غنچه‌ها و بساک‌هایی با مرحله‌ی رشد و نمو میکروسپوری مناسب می‌باشد، بنابراین تعیین مرحله‌ی تکاملی مناسب در دانه‌گرده تاثیر بسیار زیادی در موفقیت کشت بساک دارد (۱۹). نتایج این تحقیق مشاهده شد که محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط کشت حاوی سطوح مختلف BAP، منجر به القای کالوس در کشت بساک خیار نمی‌شوند و بساک‌ها در این محیط‌های کشت در اوایل کشت دارای رشدی طبیعی می‌باشند، ولی بعد از گذشت حدود چهار هفته از بین می‌روند. در مطالعه کومار و همکاران (۸) نیز هیچ کدام از رقم‌های کالیپسو و گرین خیار، پاسخی به اثرات محیط کشت پایه B5 فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد IAA، Kin، BAP، IBA و TDZ با غلظت‌های (۰/۵-۲۰) میلی‌مولار) نشان ندادند. ژنوتیپ یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار در پاسخ به آندروژنز در گوجه فرنگی است (۲۰)، به‌طوری که فقط ۳ رقم از ۴۳ رقم گوجه فرنگی مورد آزمایش موفق به تولید کالوس شدند و فقط یک رقم از آن‌ها اندام‌زایی مشاهده شد. بر اساس نتایج مشاهده شده بساک‌های القای شده در رقم سینا دارای وزن بیشتری از بساک‌های القاء شده حاصل از رقم نگین بودند. بنابراین بساک‌های کشت‌شده پاسخ متفاوتی به سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان دادند و به چه میزان کالوس تولید می‌شود به نوع ژنوتیپ بستگی دارد. در مطالعه‌ای کومار و همکاران (۸) محیط کشت B5 حاوی ۲ میکرومولار D-2,4 و ۱ میکرومولار BAP را بهترین محیط جهت القاء کالوس در خیار معرفی کردند. سونگ و همکاران (۱۰) بهترین محیط را برای القای کالوس در رقم نینجیا خیار، محیط MS تکمیل شده با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت ۴ میکرومولار، D-2,4 با غلظت ۲/۲۶ میکرومولار و کینتین با غلظت ۴/۶۴ میکرومولار گزارش کردند. نتایج حاصل از کشت بساک و القای کالوس در تحقیق آرمیون (۱۲) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو رقم تبریزی و سوپردامینوس وجود دارد و رقم تبریز با تیمار تنظیم‌کننده رشد ۲ میکرومولار D-2,4، ۲ میکرومولار BAP و ۲ میکرومولار کینتین بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد. در مطالعه حمیدوند و همکارانش (۱۳) بر دو رقم خیار انجام دادند، محیط کشت MS تکمیل شده با ترکیب D-2,4 و کینتین به ترتیب با غلظت ۲ و ۱ میکرومولار را بهترین محیط جهت القای کالوس در رقم اصفهانی خیار معرفی کردند. براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، محیط‌های کشت M24، M22 و M15 به ترتیب با میانگین‌های ۹۸، ۹۷/۷۵ و ۹۶/۷۵ درصد در بین ۲۵ محیط کشت مورد آزمایش، بیشترین کالوس در محیط کشت M10 با میانگین ۷۷/۵ درصد و نیز کم‌ترین کالوس را برای ژنوتیپ اصفهانی داشتند. محیط کشت M22 با میانگین ۹۸/۴۵ درصد در رقم بتاآلفا، بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۵۹/۷ درصد کمترین میزان کالوس را برای این رقم داشت. به‌طور کلی نتایج این تحقیق و سایر محققین نشان داد که با تغییر غلظت‌های اکسین و سیتوکنین درصد کالوس‌زایی در هر رقم با هم متفاوت می‌باشد.

۶- نتیجه‌گیری

باتوجه به‌نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر بین دو رقم مورد بررسی، بیشترین وزن تر کالوس در رقم سینا مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که کشت بساک‌های خیار بر محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی (2,4-D با غلظت۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد می کند. نتایج این تحقیق فقط منجر به القای کالوس و ساختارهای جنین مانند در کشت بساک خیار شد جهت جنین‌زایی و باززایی کالوس‌ها و تولید گیاهان هاپلوئید در گیاه خیار مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

۷- منابع

1. Staub JE, Robbins MD, Wehner TC. Cucumber. In: Vegetables I. Springer New York; 2007. p. 241–82.

2. Bai S-N, Xu Z-H. Unisexual cucumber flowers, sex and sex differentiation. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;304:1–55.

3. Rech et al. K . J . Puite et al . (eds .), Progress in Plant Protoplast Research Kluwer Academic Publishers 1988. 1988;(8):389–90.

4. Delaitre C, Ochatt S, Deleury E. Electroporation modulates the embryogenic responses of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) microspores. Protoplasma. 2001;216(1–2):39–46.

5. Gałązka J, Niemirowicz-Szczytt K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. Folia Hortic. 2013;25(1):67–78.

6. dos Santos KCF, Silva Souza A da, Silva Ledo CA da, Costa Nobre LV, de Souza MDH, Verde D dos SV, et al. Different culture media on the induction and multiplication of calluses from citrus anthers. South African JBot[Internet].2023;155:383–92.Availablefrom: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629923000467

7. Armstrong TA, Metz SG, Mascia PN. Two regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. Plant Sci. 1987;51(2–3):231–7.

8. Ashok Kumar HG, Murthy HN, Paek KY. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. Sci Hortic (Amsterdam). 2003;98(3):213–22.

9. Ashok Kumar NMH. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. 2004;34(October 2004).

10. Hui Song, Qun-Feng Lou, Xiang-Dong Luo, Joseph N. Wolukau, Wei-Ping Diao C-TQ& J-FC. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L).

11. Suprunova T, Shmykova N. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. In: *Cucurbitaceae* 2008 Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae, Avignon, France, 21-24 May 2008. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); 2008. p. 371–4.

12. Elaha Armion, Mahmoud Lotfi SMMM. Investigating the effect of cultivar and plant growth regulators on callus formation and embryogenesis of cucumber anther culture (*Cucumis sativus* L). Journal, Iran. 2009;3(2):123–36.

13. Hamidvand Y, Abdollahi MR, Chaichi M, Moosavi SS. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (Cucumis sativus L.). Int J Agric Crop Sci. 2013;5(10):1089–95.

14. Abdollahi MR, Najafi S, Sarikhani H, Moosavi SS. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (Cucumis sativus L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. Turkish J Biol. 2016;40(3):571–9.

15. Asadi A, Zebarjadi A, Abdollahi MR, Seguí-Simarro JM. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica [Internet]. 2018;214(11). Available from: https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x

16. Cui M, Pham MD, Lee H, Lee B, Myung J, Hwang H, et al. Ultrastructural changes in developmental stages of anther and pollen grains as affected by short-term exposure to low temperatures in strawberry. Environ Exp Bot [Internet]. 2023;205:105135. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847222003574

17. Mahmood Ibrahim A, Binti Kayat F, Ermiena Surya Mat Hussin Z, Susanto D, Ariffulah M. Determination of suitable microspore stage and callus induction from anthers of Kenaf *(Hibiscus cannabinus* L.). Sci World J. 2014;2014:5–10.

18. Rahman ZA, Seman ZA, Othman AN, Ab Ghaffar MB, Razak SA, Mohd Yusof MF, et al. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2021;31:101865. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818120311178

19. Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E. The microspore: A haploid multipurpose cell. Vol. 35, Advances in Botanical Research. Academic Press Inc.; 2001. p. 53–109.

20. Gresshoff PM, Doy CH. Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum (Tomato). Planta [Internet]. 1972 Jan 5;107(2):161–70. Available from: http://www.jstor.org/stable/23369977