Crop Biotechnology Open Access

Spring (2025) 14 (3): 13-30
DOI: 10.30473/cb.2025.72510.1984

ORIGINAL ARTICLE

Optimization of androgenesis in cucumber through anther culture by applying electric shock, centrifugation, and magnetic field treatments on anthers and induced calluses

Zahra Shafaee[1], Mohammad Reza Abdollahi[2], Sayyed Saeed Moosavi[3], Hassan Sarikhani[4]

1. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
4. Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Correspondence:
Mohammad Reza Abdollahi
Email: m.abdollahi@basu.ac.ir

Received: 15, Oct. 2024
Accepted: 5, Apr. 2025

How to cite:
Shafaee, Z., Abdollahi, M. R., Moosavi, S.S., & Sarikhani, H. (2025). Optimization of androgenesis in cucumber through anther culture by applying electric shock, centrifugation, and magnetic field treatments on anthers and induced calluses. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 13-30. (DOI: 10.30473/cb.2025.72510.1984

ABSTRACT

The induction of androgenesis in cucumber plays a significant role in accelerating breeding programs and improving desirable traits by producing doubled haploid plants. In the present study, the effects of different genotypes, different heat pretreatments, different levels of electric shock, different centrifugation speeds and different magnetic treatments on the androgenesis induction in cucumber anther cultures were investigated in 5 separate experiments based on completely randomized design with three replications. The results showed that the highest percentage of androgenesis induction and embryogenesis was related to the beta-alpha genotype. The effect of applying heat pretreatment in liquid culture medium on embryogenesis and plant regeneration was significant, so that the control treatment in liquid culture medium with an average of 4.36 plants per anther and then the 30°C treatment in liquid culture medium with an average of 1.4 plants per anther were the best treatments. The liquid medium was also very effective for embryogenesis, and a large number of plants were regenerated in this method. 100 V electric shock treatment showed the highest percentage of callus formation with 90% and the highest average number of embryos per anther with 0.16 embryos. Centrifuge treatment (150 g) produced the highest percentage of callus formation (73.33%) and the highest average number of embryos per anther (0.2). Magnetic water passage treatment with an average of 0.2 embryo per anther was more suitable than other magnetic treatments. The results of this research can be used in the production of pure cucumber lines in order to produce hybrid seeds.

KEYWORDS

androgenesis, heat treatment, cucumber, centrifuge, electric shock

© 2025, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره سوم، پیاپی ۴۹، بهار ۱۴۰۴ (۳۰-۱۳)

DOI: 10.30473/cb.2025.72510.1984

«مقاله پژوهشی»

بهینه‌سازی آندروژنز در خیار از طریق کشت بساک با اعمال تیمارهای شوک الکتریکی، دور سانتریفیوژ و میدان مغناطیسی روی بساک‌ها و کالوس‌های حاصل

زهرا شفایی[۱]، محمدرضا عبداللهی[۲]، سید سعید موسوی[۳]، حسن ساریخانی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بو علی سینا، همدان، ایران.

۴. استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

نویسنده مسئول:
محمدرضا عبداللهی
رایانامه: m.abdollahi@basu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶

استناد به این مقاله:
شفایی، زهرا؛ عبداللهی، محمدرضا؛ موسوی، سیدسعید و ساریخانی، حسن (۱۴۰۴). بهینه‌سازی آندروژنز در خیار از طریق کشت بساک با اعمال تیمارهای شوک الکتریکی، دور سانتریفیوژ و میدان مغناطیسی روی بساک‌ها و کالوس‌های حاصل، *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۴ (۳)، ۳۰-۱۳.
(DOI: 10.30473/cb.2025.72510.1984)

چکیده

القای آندروژنزدر گیاه خیار به منظور تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف، نقش مهمی در تسریع برنامه های بهنـژادی و بهبود صفات مطلوب دارد. در پژوهش حاضر اثر ژنوتیپهای مختلف، پیشتیمارهای گرمایی مختلف، سطوح مختلـف شوک الکتریکی، دور های مختلف سانتریفیوژ و تیمار های مختلف مغناطیسی به صورت ۵ آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، بر القاء آندروژنز در کشت بسـاک خیـار بررسـی گردیدنـد. نتـایج نشـان داد کـه بیشترین درصد القا آندروژنز و رویان‌زایی مربوط به ژنوتیپ بتا آلفا می‌باشد. اثر اعمال پیشتیمار گرمـایی در محـیط کشت مایع بر رویان‌زایی و باززایی گیاه معنی‌دار گردید به طوری که تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میـانگین ۴/۳۶ گیاه به ازای هر بساک و پس از آن تیمار ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط کشت مایع با میانگین۱/۴ گیـاه بـه ازای هر بساک مطلوب‌ترین تیمارها بودند. محیط کشت مایع برای رویان‌زایی نیز بسیار موثر بود و در نتیجه تعـداد زیادی گیاه از این طریق باززایی شد. تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بیشترین درصد کالوس‌زایی را بـا میـزان ۹۰ درصد و بالاترین میانگین رویان به ازای هـر بسـاک را بـا میـزان ۰/۱۶ رویـان نشـان داد. دور ۱۵۰g سـانتریفیوژ بیشترین درصد کالوس زایی (۷۳/۳۳ درصد) و بالاترین میانگین تعداد رویان بـه ازای هـر بسـاک (۰/۲) را ایجـاد کرد. تیمار عبور از آب مغناطیسی با میانگین ۰/۲ رویان زایی در هر بساک نسبت بـه سـایر تیمارهـای مغناطیسـی مناسب‌تر بود. نتایج این تحقیق می تواند در تولید لاین‌های خالص خیار به منظور تولید بذور هیبرید مورد اسـتفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آندروژنز، تیمار حرارتی، خیار، سانتریفیوژ، شوک الکتریکی.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است ۱۴۰۴ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.

(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

مقدمه

خیار با نام علمی (*Cucumis sativus* L.) گیاهی دیپلوئید (2x=2n=14)، یکساله، دولپه و از خانواده کدوئیان است. این گیاه، علفی و دارای ساقه خزنده و پوشیده از خارهای نازک و خشن است. خیار گیاهی دگرگشن و گلهای آن دارای کاسبرگ و گلبرگ می باشد و با توجه به نوع ژنوتیپ از نظر جنسیت به صورت تک جنسه، دو جنسه، تکپایه و دوپایه متفاوتند. جنس Cucumis حدود ۳۰ گونه داردکه خیار مهمترین گونه میباشد (حسن دخت، ۲۰۰۶). خیار با توجه به دارا بودن خواص دارویی از قبیل تنظیم قند خون، رفع اختلالات رماتیسمی، بهبوددهنده‌ی عملکرد دستگاه گوارش و...، در میان سبزی‌ها و میوه ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (تونسر و بازتوک، ۱۹۹۱). یکی از مهم‌ترین اهداف برنامه اصلاحی خیار، تولید بذور هیبرید در این گیاه است. برای تسریع تولید بذور هیبرید لازم است از روش هاپلوییدی استفاده شود تا علاوه بر صرفه جویی در وقت و هزینه تولید لاین خالص، باعث خودکفایی کشور و نیز عدم وابستگی به کشورهای خارجی گردد (سیدهو و همکاران، ۲۰۰۵). هر چند هزینه تولید بذر هیبرید نسبت به بذر غیر هیبرید بیشتر است ولی بذور هیبرید به خاطر قدرت رویشی بیشتر، یکنواختی بالاتر، مقاومت در برابر برخی آفات و بیماری ها و نیز داشتن صفات مطلوب از اهمیت و کیفیت بیشتری برخوردار هستند. بذور هیبرید از تلاقی دو لاین خالص به دست می آیند و این گیاهان هیبرید به منظور استفاده از هتروزیس یا قدرت دو رگه تولید می‌شوند (پرساث و همکاران، ۱۹۹۸). دستیابی به لاین خالص یکی از اساسی‌ترین مراحل در تولید بذر هیبرید است. جهت تولید لاین خالص، می‌توان از روش کشت بساک و کشت میکروسپور استفاده کرد. در روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات، دستیابی به لاین خالص از طریق خویش آمیزی و تلاقی‌های برگشتی متعدد در حدود شش تا هشت نسل امکان‌پذیر است در حالیکه با استفاده از هاپلوییدی می‌توان این مدت را به شش ماه تا حداکثر یک سال کاهش داد . چندین روش جهت دستیابی به گیاهان هاپلوییدوجود دارد، ولی استفاده از آندروژنز نسبت به سایر روش ها موثرتر و عمومی تر است. میکروسپورها قادر هستند که در شرایط مناسب درون شیشه‌ای از مسیر گامتوفیتیک به سمت مسیر اسپوروفیتیک تغییر مسیر داده و رویان یا کالوس تولید کنند که به این پدیده آندروژنز می گویند (چوپو و کابوچ ، ۱۹۹۸). در حقیقت به فرآیند القا و باززایی گیاه هاپلویید با استفاده از سلول های گامتی نر، آندروژنز گفته می شود. با توجه به اهمیت بسیار زیاد گیاهان هاپلوییدمضاعف و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، انجام مجموعه‌ای از تحقیقات در راستای دستیابی به گیاه هاپلویید در گیاه خیار ضروری است. یکی از مشکلات موجود در این مسیر، تعداد رویان و گیاهان باززایی شده ناکافی است که ضروری است تحقیقاتی در زمینه بهینه سازی آن‌ها انجام شود لذا پژوهش حاضر در زمینه بهینه سازی کشت بساک گیاه خیار با اعمال تیمارهای فیزیکی انجام می‌شود.

پیشینه پژوهش

در القای هاپلوییدی، شاید کلیدی‌ترین عامل موثر بر آندروژنز، استفاده از مرحله مناسب رشد و نموی میکروسپور است. بسیاری از محصولات ژنی ویژه مرحله اسپوروفیتی، قبل از میوز از سیتوپلاسم حذف می شوند و این موضوع باعث می شود که سلول در مرحله تک هسته ای، از لحاظ تمایز آزادانه عمل کند. در حالی که ژن های ویژه مرحله گامتوفیتی، معمولا بعد از میتوز دانه گرده رونویسی می شوند. بعد از تقسیم میتوز، سیتوپلاسم دارای اطلاعات گامتوفیتی شده، تا در نهایت گامتوفیت نر تشکیل شود. بر اساس مطالعات انجام شده، این مرحله طی ۲۴ ساعت بعد از میتوز دانه گرده اتفاق می‌افتد. وجود برخی از عوامل از جمله بعضی از تنش‌ها در این مراحل می‌توانند برنامه گامتوفیتی را متوقف کرده و سبب تظاهر ژن های ویژه اسپوروفیتی شوند که نتیجه آن تغییر مسیر سلول از گامتوفیتی به اسپوروفیتی است (بوجوانی و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طور کلی، برای تغییر مسیر سلول ازگامتوفیتیک به اسپوروفیتیک به یک محرک موثر خارجی ضروری نیاز است. از جمله این محرک‌ها می‌توان به پیش تیمارهای مختلف مانند شوک گرمایی یا سرمایی،

اشعه گاما، سانتریفیوژ، گرسنگی ساکارز و نیتروژن، تنش آب یا pH بالای محیط کشت اشاره کرد. در این بین، تیمار دمایی در اکثر گیاهان عالی، بیش ترین تاثیر را در القاء رویان‌زایی داشته است (میشرا و گوسوامی ، ۲۰۱۴).

سیستم‌های تولید گیاهان هاپلوییـد معمولا در کشت بساک و گرده به وسیله عوامل ژنتیکی کنترل می‌شوند، تحت تاثیر ژنوتیپ والدین قرار دارد و بنابراین این موضوع اغلب سبب محدودیت سیستم شده و تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها را می‌توان از این طریق اصلاح نمود (برقت و جونز، ۲۰۱۲). در این خصوص عبداللهی و همکاران (۱۴۰۳)، در آزمایشی ۷ ژنوتیپ مختلف خیار از کشورهای مختلف را از نظر پاسخ به آندروژنز در کشت بساک با هم مقایسه کردند و گزارش نمودند که تفاوتهای معنی‌داری از نظر پاسخ به آندروژنز و بیان ژنهای مخصوص رویان زایی بین این ژنوتیپها وجود داشت. در تحقیق دیگری، اسدی و همکاران (۲۰۱۸)، پروتکل های مختلف کشت بساک در خیار را در دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بتا آلفا مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که اندام زایی فقط برای ژنوتیپ بتا آلفا، با ترکیبی از قرار دادن کالوسهای حاصل از کشت بساک در محیط مایع و تاریکی، و سپس انتقال آنها به محیط جامد و نور القاء گردید. در تحقیق دیگری اثر پیش تیمار دمایی (۴ درجه سانتی گراد برای۱۰-۰ روز و ۳۰ درجه سانتی گراد برای ۱ روز) و هورمون ها(IAA، IBA،۲،۴-D ، NAA، BAP، KN و TDZ با غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکرومولار و ترکیب۲میکرومولار-D-۲،۴ با BAP/KN/TDZ ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار) در محیط کشت B5 بر رویان‌زایی و باززایی کشت بساک دو رقم خیار مورد بررسی قرار گرفت و ترکیب ۲ میکرومولار-۲،۴D و ۱ میکرومولار BAP به عنوان بهترین ترکیب هورمونی و پیش تیمار ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز بهترین پیش تیمار معرفی گردید (کومار و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهشی عبداللهی و همکاران (۲۰۱۶) غلظت های مختلف آگار(صفر، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ گرم در لیتر)و عناصر پرمصرف (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر) را بر کشت بساک و القای کالوس و رویان گامتی ۴ رقم خیار(بتاآلفا، باسمنج، اصفهانی و کرکی) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف آگار و نیز عناصر پرمصرف از نظر میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک ۴ رقم خیار وجود دارد. دو برابر کردن عناصر پرمصرف در محیط کشت باعث افزایش ۱۰۰ درصدی کالوس های رویان زا در رقم اصفهانی شد. در حالی که سایر ارقام در مقدار یک برابر، بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا را نشان دادند. بیش‌ترین درصد کالوس‌های رویان‌زا در محیط حاوی آگار ۷ میلی گرم بر لیتر به‌دست آمد. اشوک کومار و مورذی (۲۰۰۴) اثر قندهای (ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ و ۰/۵ مولار به طور جداگانه) و اسید آمینه های (گلوتامین، گلایسین، آرژنین، اسپاراژین و سیستئین با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲و ۵ میلی مولار به طور جداگانه و نیز با ترکیب هورمونی ۱میکرومولار BAP و۲میکرومولارD-۲،۴ بررسی کردند و ارزیابی‌ها نشان داد که بهترین قند از بین قندهای مطالعه شده ساکارز با غلظت ۰/۲۵مولار و نیز ترکیبی از همه اسیدهای آمینه مورد استفاده با غلظت۱میلی مولار از هر کدام برای القای رویان بهترین پاسخ را ایجاد می‌کنند. در فرآیند القای هاپلوییدی، عوامل مختلفی از جمله شرایط فیزیولوژیک گیاه دهنده و ژنوتیپ آن، مرحله مناسب میکروسپور، اعمال پیش تیمارهای مختلف، ترکیبات موجود در محیط کشت و عوامل فیزیکی در طول مدت کشت بافت (دما و نور) بسیار تاثیرگذار است (فری و کاسول، ۲۰۱۱).

روش شناسی پژوهش

مواد گیاهی

ارقام مورد استفاده در این پژوهش شامل چهار رقم بذور هیبرید (F1) خیار به‌نام‌های بتاآلفا، ارشیا، سوپرسهیل و ماجد می‌باشند که در گلدان هایی با قطر ۱۵*۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک مناسب (۱ قسمت خاک زراعی، ۱ قسمت ماسه و ۱ قسمت کود دامی پوسیده) کشت شدند و در اتاق رشدی با شدت نور حدود ۱۰۰۰۰ لوکس (تأمین شده توسط پرژکتورهای مخصوص رشد گیاه) با شرایط دمایی روز ۲۲ و شب ۱۶ درجه سلسیوس و دوره نوری

۱۶:۸قرار گرفتند. مراقبت‌های زراعی شامل آبیاری، کوددهی، سم‌پاشی با روش مناسب انجام گرفت. این پژوهش درسال‌های ۱۳۹۸و ۱۳۹۹ در دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد.

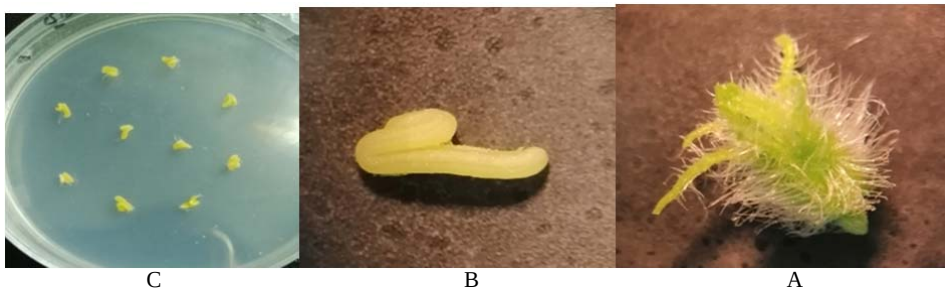
کشت بساک

در تحقیقات پیشین (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶)، بهترین مرحله رشد و نمو برای کشت بساک را اواخر تک هسته‌ای تا اوایل دو هسته‌ای اعلام کردند که غنچه گل خیار در این مرحله اندازه‌ای حدود ۵-۳ میلی‌متر دارد (سوپرونوا و شمیکوا ، ۲۰۰۸). غنچه‌های دارای این مشخصات از گیاهان مادری برداشت شدند. شکل ۱ گلهای نر با ابعاد مختلف را نشان می دهد که از گیاهان مادری خیاربرداشت شده اند. گلهای نر مناسب کشت بساک هنوز باز نشده اند و ابعادی حدود ۵ میلیمتر دارند (شکل ۱).

غنچه‌های مناسب برداشت شده ابتدا به مدت ۵ دقیقه توسط آب شهری (غیر استریل) شسته و پس از آن یکبار با آب مقطر شستشو داده شدند، سپس غنچه‌ها درون یک ظرف قرار گرفتند و این ظرف به مدت دو روز در دمای ۴درجه سانتی گراد به منظور اعمال پیش تیمار سرمایی در یخچال نگهداری شد. پس از گذشت دو روز جهت انجام مراحل استریل، غنچه‌ها زیر هودلامینار قرار داده شدند و به مدت ۱ دقیقه داخل ظرف حاوی اتانول ۷۰ درصد، یک دقیقه در آب مقطراستریل، ۱۰ دقیقه درون ظرف حاوی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و پس از آن غنچه‌ها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بعد از این مراحل جهت جداسازی بساک ها، غنچه ها از داخل آب مقطر استریل برداشته شدند(شکل۲. A) . بساک‌ها به نحوی که به بافت سوماتیکی دیواره بساک آسیبی نرسد از میله پرچم جداسازی(شکل۲. B) و به آرامی در محیط کشت MS قرار گرفتند و هر سه هفته یک بار واکشت شدند (شکل۲. C).

شکل ۱. گل‌های نر خیار با اندازه‌های مختلف

Figure 1. Male cucumber flowers of various sizes



C B A

شکل ۲. کشت بساک خیار. A: غنچه نر مناسب جهت کشت بساک خیار، B: بساک جدا شده از غنچه و C: بساک‌های کشت‌شده در محیط کشت کالوس‌زایی

Figure 2. Cucumber anther culture. A: Male bud suitable for cucumber anther culture, B: Anther separated from the bud, and C: Anthers cultivated in callogenesis culture medium.

نکته: به دلیل اینکه در گیاه خیار آزمایشات اولیه شامل اندازه مناسب غنچه‌ها، محیط کشت مناسب، نوع و میزان هورمون‌های مناسب جهت کالوس زایی و رویان زایی و پیش تیمار دمایی مناسب غنچه ها، از قبل توسط اسدی و همکاران (۲۰۱۸)، حمیدوندو عبداللهی (۱۳۹۴) انجام شده ونتایج آن‌ها گزارش شده است. در پژوهش حاضر از این نتایج بهره برده و در تمامی آزمایشات از بهترین تیمارهای گزارش شده، استفاده گردید. به این صورت که غنچه های ۵-۳ میلی متری انتخاب شدند. محیط کشت مورد استفاده محیط MS بود و در تمامی آزمایشات ۰/۹۱ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP و۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر هورمون ۲،۴-D جهت کالوس زایی استفاده گردید (جدول ۱) و محیط مورد استفاده جهت رویان زایی، شامل محیط MS مایع حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر ۲،۴-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۱). همچنین در تمامی آزمایشات ابتدا بساک‌ها در محیط MS کالوس زایی حاوی ۰/۹۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر ۲،۴-D کشت شدند. پس از گذشت ۶-۵ هفته از کشت بساک‌ها، کالوس‌هایی با اندازه‌های مناسب جهت اعمال تیمارها به‌وجود آمدند. سپس جهت القای رویان، کالوس ها در محیط مایع با میزان ۴ میلی گرم بر لیترهورمون ۲،۴-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP به مدت سه هفته بر روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. در نهایت جهت باززایی رویان‌های حاصل از مرحله قبل، کالوس‌های رویان‌زا به محیط MS حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BAP منتقل شدند (جدول ۱). در تمامی محیط های کشت از ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز استفاده گردید. برای محیط های کشت جامد ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد و اسیدیته همه محیطهای کشت روی ۵/۸ تنظیم گردید. لازم به ذکر است که همه‌ی پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه در اتاق رشد با شرایط نور، دما و رطوبت مناسب نگهداری شدند.

آنالیز سیتولوژیکی گیاهان دیپلوییدمادری و گیاهان هاپلوییدد، از طریق روش شمارش کروموزومی

جهت مشاهده‌ی کروموزوم ها از روش سهرابی و همکاران (۲۰۲۱) با برخی تغییرات استفاده گردید. بدین منظور از ریشه های گیاهان دیپلوییدد (۱/۵ تا ۲ سانتی متری حاصل از بذور جوانه زده خیار) و همچنین از رویان‌های القاء شده روی کالوس‌ها یا از مریستم انتهایی ساقه گیاهان باززایی شده هاپلوییدی استفاده شد. نمونه‌ها درون شیشه ای حاوی آب و یخ درون یخچال قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت در محلول کارنوی I حاوی اتانول ۹۶ درصد و استیک اسیدگلایسیال با نسبت ۳ به ۱ (v/v) به مدت یک روز در یخچال نگهداری شدند.

برای انجام هیدرولیز نمونه‌ها در محلول HCl یک مولار در مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. برای توقف هیدرولیز نمونه ها از حمام آب گرم خارج و سه مرتبه با آب سرد (آب صفر درجه سانتی گراد) شستشو داده شدند. پس از خشک کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی، جهت رنگ آمیزی درون محلول استوکارمن ۱ درصد قرار گرفتند و بعد از گذشت یک هفته، این نمونه‌ها برای مشاهده کروموزوم‌ها استفاده شدند و کروموزوم ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ قابل رویت شدند.

جدول ۱. محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی مناسب جهت القاء کالوس و رویان و باززایی گیاه در کشت بساک خیار

Table 1. Culture media containing suitable hormonal compounds for callus and embryo induction and plant regeneration in cucumber anther culture

BAP (mgl^{-1})	2,4-D (mgl^{-1})	نوع محیط کشت Culture medium type	هدف کشت بافت Purpose of tissue culture
0.91	0.25	Solid MS	القاء کالوس Callus induction
0.1	4	Liquid MS	القاء رویان Embryo induction
3	–	Solid MS	باززایی گیاه Plant regeneration

اثر ژنوتیپ در القای کالوس، رویان زایی و باززایی گیاه در کشت بساک خیار

در این آزمایش بساک های چهار رقم(ژنوتیپ) خیار بتاآلفا، ماجد، ارشیا و سوپرسهیل در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی ذکر شده کشت گردیدند. سپس بساک‌های آن‌ها در محیط کشت MS کالوس‌زایی که در بالا شرح داده شد، قرار گرفتند و در اتاق رشد نگهداری شدند. ۵-۴ روز پس از کشت بساک‌ها متورم شدند و پس از ۶-۵ هفته کالوس‌ها به اندازه مناسبی رسیدند و به منظور القای رویان در محیط مایع تکمیل شده با هورمون‌های2,4-D و BAP، به مدت سه هفته روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت سه هفته به جهت باززایی رویان‌های القا شده، کالوس‌های رویان‌زا به مدت سه هفته در محیط MS حاوی سیتوکینن قرار داده شدند. و در نهایت رویان های باززا شده برای رشد و نمو در محیط کشت MS فاقد هورمون قرار گرفتند.

بررسی اثر پیشتیمارهای گرمایی اعمال شده روی کالوس‌ها، بر روند رویان‌زایی و باززایی گیاه در کشت بساک خیار

در این آزمایش تیمارهای مختلف گرمایی شامل: ۳۰ درجه سلسیوس به مدت یک روز، ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت، ۳۸ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت، بدون تیمار حرارتی (شاهد) در محیط کشت مایع و بدون تیمار حرارتی (شاهد) در محیط کشت جامد بر روی کالوس‌های رقم بتاآلفا خیار اعمال گردیدند. ابتدا بساک‌های رقم بتاآلفا را درون محیط کشت MS جامد با ترکیبات هورمونی مناسب جهت کالوس‌زایی، قرار داده شدند. پس از گذشت ۶-۵ هفته کالوس‌ها به اندازه مناسب رسیدند و جهت اعمال تیمار حرارتی درون انکوباتور قرار گرفتند. سپس به محیط کشت مایع منتقل شدند و روی شیکر و با شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس ازگذشت سه هفته کالوس‌های رویان‌زا به محیط جامد باززایی انتقال یافتند.

بررسی اثر تیمارهای مختلف شوک الکتریکی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

در این آزمایش تیمارهای مختلف شوک الکتریکی شامل: ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ولت به همراه شاهد هم بر روی بساک ها و هم بر روی کالوس‌های حاصل از کشت بساک رقم بتاآلفا به‌صورت پالس در قالب دو آزمایش مجزا اعمال شدند. جهت بررسی این تیمار روی بساک‌ها ابتدا بساک‌های رقم بتاآلفا از درون غنچه گل خیار جدا شدند و سپس درون میکروتیوب های حاوی محیط MS مایع با ساکارز ۱۰۰ گرم بر لیتر (برای زنده مانی بساک‌ها) قرار داده شدند و توسط دستگاه الکتروپوریشن شوک های الکتریکی شامل: ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ولت و هر کدام به صورت سه پالس انجام شد. پس از اعمال شوک‌های الکتریکی، بساک‌ها از درون میکروتیوب‌ها خارج و جهت خشک شدن روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. بساک‌ها به آرامی با استفاده از پنس از روی کاغذصافی برداشته شدند و درون پتری‌دیش‌های حاوی محیطMS جامد قرار گرفتند و جهت نگهداری به اتاق رشد منتقل شدند. ۶-۵ هفته در این محیط باقی ماندند و بساک‌ها به کالوس‌هایی بزرگ تبدیل شدند، سپس کالوس ها درون ارلن حاوی محیط MS مایع قرار گرفتند و روی شیکر در تاریکی و با دور ۱۰۰ به مدت سه هفته نگهداری شدند و پس از آن به محیط MS جامد با میزان هورمون ذکر شده، به منظور باززایی رویان‌ها انتقال یافتند. این تیمار بر روی کالوس‌ها به همین صورت مورد بررسی قرار گرفت با این تفاوت که به جای بساک از کالوس‌های رویان‌زا استفاده شد.

بررسی اثر تیمار دور سانتریفیوژ برکالوس زایی و رویان‌زایی درکشت بساک خیار

در این آزمایش دورهای مختلف سانتریفیوژ شامل: ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰g به مدت ۳ دقیقه و با دمای ۴ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. به منظور اعمال تیمارها بر روی بساک‌ها از میکروتیوب‌هایی که حاوی محیط MS مایع بدون هورمون و با میزان ساکارز ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بودند، استفاده شد. ابتدا بساک ها در داخل این محیط قرار داده شدند و پس از اعمال تیمار دور سانتریفیوژ، بساک‌ها به محیط جامد کالوس‌زایی منتقل وسپس در اتاق

رشد نگهداری شدند. کالوس‌های تشکیل شده به درون ارلن حاوی محیط MS مایع منتقل شدند و به مدت سه هفته بر روی شیکر با شرایط تاریکی و شدت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از گذشت سه هفته کالوس‌های رویان‌زا به منظور باززایی به محیط MS جامد تکمیل شده با میزان ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP قرار داده شدند.

بررسی اثر میدان مغناطیسی بر کالوس زایی و رویان زایی در کشت بساک خیار

بساک‌هایی که در محیط کشت مناسب کشت شدند و پتری دیش‌های حاوی بساک‌ها در اتاق رشد و در معرض میدان مغناطیسی با شدت بالا قرار گرفتند. تیمارهای دیگر با استفاده از دستگاه مخصوص آب مغناطیسی اعمال گردید و برای درست نمودن محیط کشت MS این آب مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور اعمال تیمارهای آب مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت، ۱ساعت و صفر ساعت (عبور از دستگاه) صورت پذیرفت. بساک‌ها در زیر هود لامینار از غنچه‌ها خارج گردیدند و در محیط کشت MS حاوی آب مغناطیسی کشت شدند. در نهایت پتری دیش ها به اتاق رشد با شرایط نوری و دمایی مناسب انتقال یافتند. پس از ۶-۵ هفته ، کالوس های تشکیل شده به محیط کشت MS مایع منتقل شدند و روی شیکر گرفتند. پس از گذشت سه هفته به محیط MS جامد جهت باززایی منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شدند. هر تکرار شامل یک پتری دیش بود که در آن ۱۰ بساک خیار کشت گردید. آزمون نرمالیته با استفاده از نرم افزار MINITAB و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته‌های پژوهش

مشاهده و بررسی کالوس ها و رویان های القاء شده در کشت بساک خیار

در تمامی آزمایش‌های صورت گرفته گیاهان مادری خیار (شکل۳. A) شروع به غنچه دهی کردند و غنچه های نر با اندازه مناسب (شکل۳. B) که دارای بساک‌های حاوی میکروسپور هایی که در مرحله تک هسته ای میانی و انتهایی بودند به عنوان ریز نمونه استفاده شد. بساکهای جدا شده از این غنچه ها در محیط کشت MS جهت القاء کالوس کشت شدند (شکل۳. C). ۴ الی ۵ روز پس از کشت، بساک‌ها شروع به متورم شدن نمودند و کالوس‌زایی در آن‌ها اتفاق افتاد و ۶-۵ هفته پس از کشت، بساک‌ها به کالوس‌هایی با اندازه مناسب جهت اعمال تیمارها تبدیل گشتند (شکل۳. D). تیمارها بر روی کالوس‌ها اعمال شدند و در محیط مناسب جهت رویان‌زایی قرار گرفتند. به تدریج رویان‌ها بر روی کالوس‌های رویان‌زا القاء شدند و تشکیل رویانهای کروی، قلبی و اژدری شکل (شکل۳. E) و همچنین رویانهای بالغ لپه ای شکل (شکل ۳. F) را دادند. در نهایت کالوسهای حاوی این ساختارهای رویانی به محیط کشت باززایی انتقال یافتند و مراحل اولیه باززایی در آنها مشاهده شد (شکل ۳. G و H) به طوری که گیاهچه هاپلویید از آن‌ها به دست آمد (شکل۳. I).

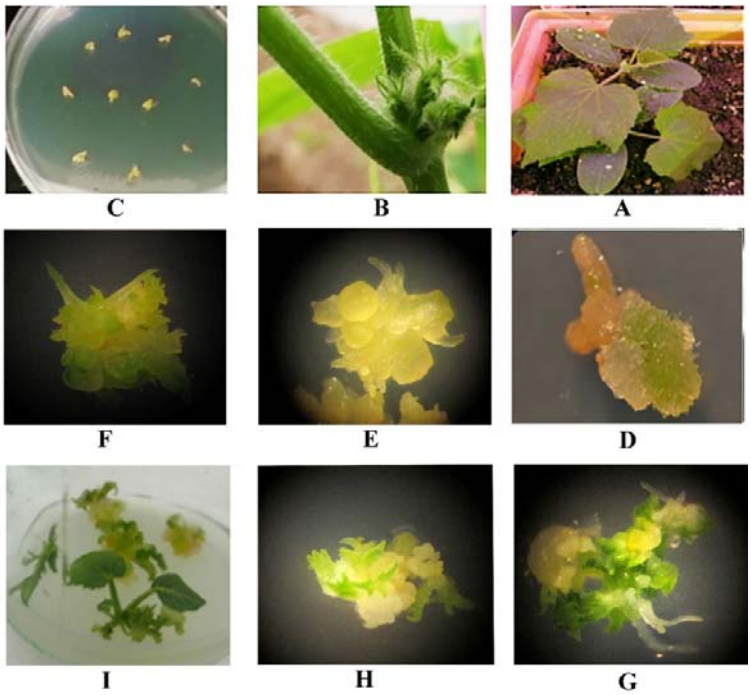
مشاهده و شمارش کروموزوم های ریشه گیاه دیپلویید (مادری) و رویان‌های القاء شده در خیار

به منظور تعیین سطح پلوئیدی رویان های القاء شده از کشت بساک خیار، مطالعات سیتولوژیکی با روش اسکواش بر روی نوک ریشه‌های گیاهان دهنده (مادری) و رویان های القاء شده انجام شد و نتایج نشان داد که گیاهان مادری دیپلویید و دارای 2n=2x=14 کروموزوم هستند (شکل۴. A). در حالی که، رویان‌های القاء شده ماهیت هاپلوییدی داشته و حاوی n=x=7 کروموزوم می‌باشند (شکل۴. B).

اثر ژنوتیپ بر کالوس‌زایی و رویان زایی در کشت بساک خیار

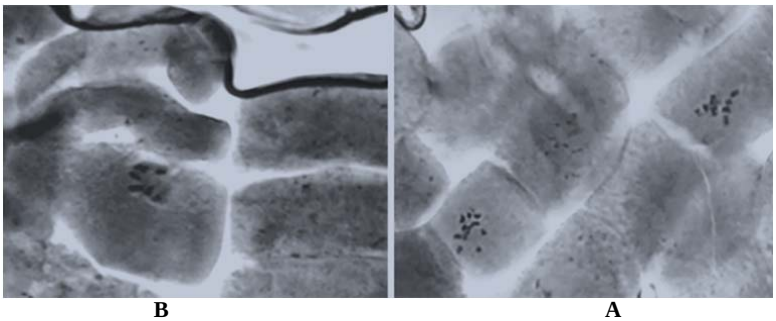
نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر صفات مختلف مطالعه شده در کشت بساک خیار (جدول۲) نشان داد بین

ژنوتیپ‌ها از نظر صفت درصد کالوس‌زایی، تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود داشت. بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفت تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ وجود داشت.



شکل ۳. مراحل باززایی گیاه از طریق کشت بساک در خیار . A: گیاه مادری(دیپلوییید)، B: غنچه‌های مناسب جهت کشت بساک خیار، C: بساک‌های کشت شده در محیط کشت القاء کالوس، D: کالوس القا شده روی بساک، E: رویانهای تشکیل شده روی کالوس در مراحل مختلف کروی شکل، قلبی شکل و اژدری شکل، F: رویانهای بالغ شده در مرحله لپه ای، G و H: مراحل اولیه باززایی رویانها، I: گیاهچه های باززایی شده در داخل شیشه مربایی.

Figure 3. Stages of plant regeneration through anther culture in cucumber. A: Mother plant (diploid), B: Buds suitable for cucumber anther culture, C: Anthers cultured in callus induction medium, D: Callus induced on anthers, E: Embryos formed on callus at different stages of globular, heart-shaped and torpedo-shaped, F: Mature embryos at the cotyledon stage, G and H: Early stages of embryo regeneration, I: Regenerated plantlets inside a jar.



شکل ۴. سلول‌های دیپلوییید و هاپلوییید در خیار. A: سلول دیپلوییید به دست آمده از آزمون سیتولوژیکی نوک ریشه گیاه مادری با ۱۴کروموزوم. B: سلول‌های هاپلوییید به دست آمده از آزمون سیتولوژیکی نوک ریشه گیاه باززا شده با ۷ کروموزوم

Figure 4. Diploid and haploid cells in cucumber. A: Diploid cell obtained from cytological examination of the root tip of the mother plant with 14 chromosomes. B: Haploid cells obtained from cytological examination of the root tip of the regenerated plant with 7 chromosomes.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 2. Analysis of variance of genotype effect on studied traits in cucumber anther culture

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	
		درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther
ژنوتیپ (Genotype)	3	7.22*	0.02496**
خطای آزمایشی (Experimental error)	8	1.11	0.00257
ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)		14.21%	5.95%

* و ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ را نشان می دهند. * and ** indicate significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر درصد کالوس زایی (شکل ۵) نشان داد که بالاترین درصد کالوس زایی در ژنوتیپ های سوپرسهیل، ارشیا و بتاآلفا اتفاق افتاد. کمترین درصد کالوس زایی مربوط به ژنوتیپ ماجد با میزان ۲۶/۶۶ درصد بود. بهترین ژنوتیپ جهت رویان‌زایی، ژنوتیپ بتاآلفا (با میانگین ۰/۳۶رویان به ازای هر بساک) بود و ژنوتیپی که کمترین میزان رویان زایی را داشت، ژنوتیپ ماجد با میانگین۰/۰۳ رویان به ازای هر بساک بود (شکل۶).

براساس مطالعات صورت گرفته، محققین ژنوتیپ را یک عامل موثر در پاسخ به آندروژنز خیار معرفی کرده‌اند (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶). نتایج آزمایشات صورت گرفته نشان داد ژنوتیپ گیاه مادری بر پاسخ به آندروژنز تاثیرگذار است. از نظر آماری مشخص شد که ژنوتیپ‌ها از نظر پاسخ به کالوس‌زایی و رویان‌زایی تفاوت آماری معنی‌داری داشته‌اند. بهترین ژنوتیپ از نظر درصد کالوس زایی سوپرسهیل و پس از آن ژنوتیپ های بتاآلفا و ارشیا بود. البته با توجه به اینکه در آندروژنز، رویان زایی از اهمیت بیشتری برخوردار است، در نتیجه بتاآلفا که هم از نظر کالوس‌زایی و هم رویان‌زایی ژنوتیپ مطلوبی بود، به عنوان بهترین ژنوتیپ برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردید. بر اساس مشاهدات محققین، ژنوتیپ بر درصد بساک های پاسخ دهنده ، درصد تشکیل کالوس و تعداد رویان در هر بساک در آندروژنز خیار تاثیر داشته است (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۳؛ سانگ و همکاران، ۲۰۰۷)که این نتایج با نتایج آزمایش حاضر همخوانی دارد.

اثر پیشتیمارهای گرمایی اعمال شده روی کالوس‌ها بر روند رویان‌زایی و باززایی گیاه در کشت بساک خیار

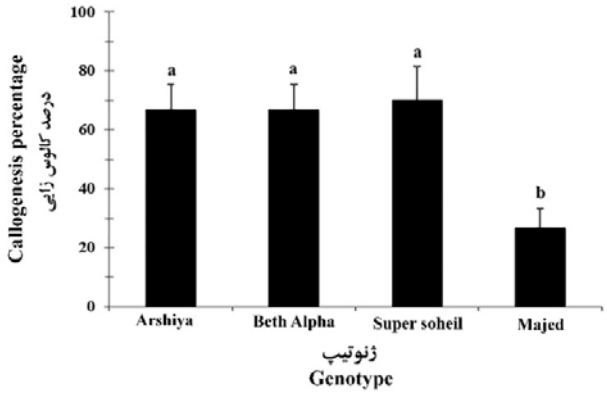
نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار حرارتی و نوع کشت برصفات مختلف مطالعه شده در کشت بساک خیار (جدول۳) نشان داد که بین تیمار حرارتی و نوع کشت با میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد گیاه به ازای هربساک تفاوت معنی دار آماری در سطح ۰/۰۰۱ وجود دارد.

نتایج نشان داد که بیشترین تعداد رویان به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میانگین ۶/۴۶ رویان بود و کمترین میزان تعداد رویان با میانگین ۰/۲۳۳ در تیمار شاهد و در محیط کشت جامد مشاهده شد (شکل۷).

با توجه به شکل ۸ بیشترین تعداد گیاه به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میانگین ۴/۳۶ و پس از آن در تیمار ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت ودر محیط کشت مایع با میانگین ۱/۴ گیاه به ازای هر بساک مشاهده گردید.

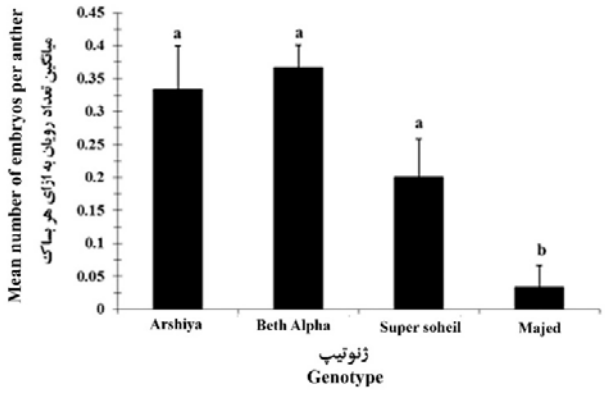
تنش‌های گرمایی و سرمایی از جمله تنش‌هایی هستند که عمدتا به منظور القای مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورها استفاده می شوند (شریعت پناهی و همکاران، ۲۰۰۶). تاثیر تیمار گرمایی نیز بر بازآرایی اسکلت سلولی میکروسپورها گزارش شده است. از جمله پیش تیمارهای متداول و مؤثر بر مقدار کالوس‌زایی و رویان‌زایی، پیش تیمار سرمایی و گرمایی می‌باشد (تووراییو و همکاران، ۲۰۰۱). تنش گرمایی برای انگیزش رویان‌زایی میکروسپورهای درون بساک در بسیاری از گیاهان از جمله تیره کدوییان استفاده شده است(ژانگ و همکاران، ۲۰۱۱). در آزمایش حاضر اثر تیمارهای مختلف گرمایی شامل: ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت یک روز، ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت و ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت همراه با شاهد

(بدون تیمار حرارتی) در محیط کشت مایع و (شاهد در محیط کشت جامد) بر روی کالوس های رقم بتاآلفا خیار بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار شاهد در محیط کشت مایع بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و همچنین بیشترین میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک را ایجاد کرد.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 5. Mean comparison of the effect of genotype on the percentage of callogenesis in cucumber anther culture



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 6. Mean comparison of the effect of genotype on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

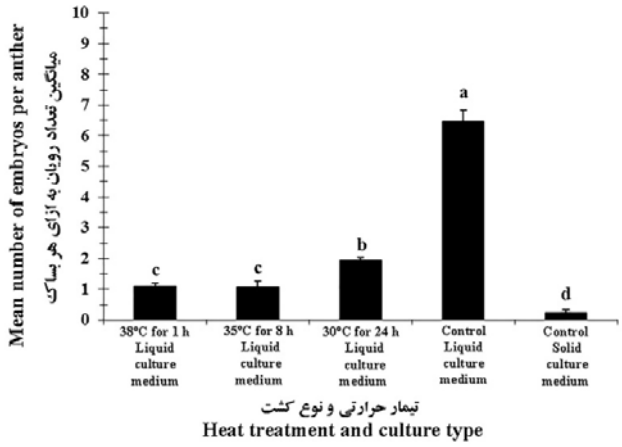
جدول ۳. تجزیه واریانس اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 3. Analysis of variance of the effect of heat treatment and culture type on the studied traits in cucumber anther culture

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	
		میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک Mean number of embryos per anther	میانگین تعداد گیاه باززایی‌شده به ازای هر بساک Mean number of regenerated plants per anther
تیمار گرمایی Heat treatment	4	18.472***	1.3006***
خطای آزمایشی Experimental error	10	0.123	0.0161
ضریب تغییرات (C.V.) Coefficient of variation		16.24%	11.15%

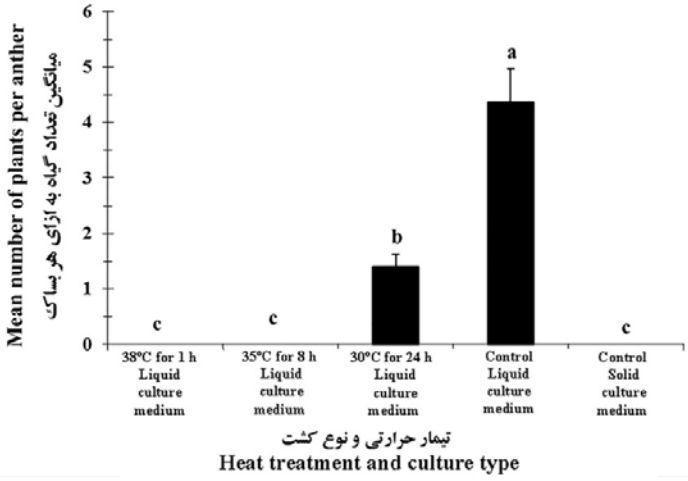
*** تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ را نشان می دهد.

*** indicates a significant difference at the 0.001 level



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 7. Mean comparison of the effect of heat treatment and culture type on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر میانگین تعداد گیاه باززایی شده به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 8. Mean ccomparison of the effect of heat treatment and culture type on the mean number of regenerated plants per anther in cucumber anther culture

در این پژوهش مشخص شد بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و بیشترین میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد درمحیط کشت مایع بود و تیمار ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع نیز تیمار مطلوبی از نظر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک بود. در سایر تیمارهای دمایی ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت، ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت و شاهد در محیط کشت جامد رویانی القا نشد. در این آزمایش دو بحث مطرح می گردد، اولا محیط کشت مورد استفاده و ثانیا دمای انتخاب شده جهت اعمال تیمارها و تاثیری که بر رویان‌زایی می‌گذارند.

به نظر می‌رسد در این آزمایش محیط کشت مایع تاثیر بسزایی در القای رویان داشته است که این نتیجه با انتخاب شدن بهترین تیمارکه همان تیمار شاهد و کشت در محیط کشت مایع است به وضوح مشخص گردیده است و همچنین تیمار دمایی با دمای پایین (۳۰ درجه سانتی گراد) نسبت به تیمار دمایی با دمای بالا (۳۵ و ۳۸

درجه سانتی گراد) برای رویان‌زایی و در نهایت باززایی گیاه مطلوب‌تر بوده است.

در این آزمایش پس از خارج شدن کالوس‌ها از محیط کشت مایع و قرار گرفتن آن‌ها در محیط جامد جهت القای رویان، کالوس‌های جدیدی روی کالوس‌های قبلی تشکیل شد و سپس در دو تیمار شاهد کشت در محیط کشت مایع و تیمار ۳۰ درجه سانتی گراد روی کالوس های جدید رویان القا شد. همچنین در تیمارهای دمایی ۳۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی کالوس‌های قبلی، کالوس‌های جدید شکل گرفت و حتی ساختارهای رویان مانند روی آن ها تشکیل شد اما پس از گذشت دو هفته ساختارهای رویان مانند در همان حالت باقی ماندند و به رویان تبدیل نشدند. احتمال داده می‌شود که دمای بسیار بالا به کالوس آسیب وارد کرده و مانع از رویان‌زایی آن‌ها شده است.

اثر تیمارهای مختلف شوک الکتریکی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

با توجه به جدول۴ تیمارهای مختلف شوک الکتریکی برای صفت درصد کالوس زایی در سطح ۰/۰۱ و برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار آماری را نشان دادند.

مقایسه میانگین اثرات شوک الکتریکی بر درصد کالوس‌زایی نشان داد که تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بیشترین تعداد کالوس‌زایی (۹۰ درصد) را به خود اختصاص داد. کمترین درصد کالوس زایی مربوط به تیمار شاهد با میزان ۴۶/۶۶ درصد بود (شکل۹).

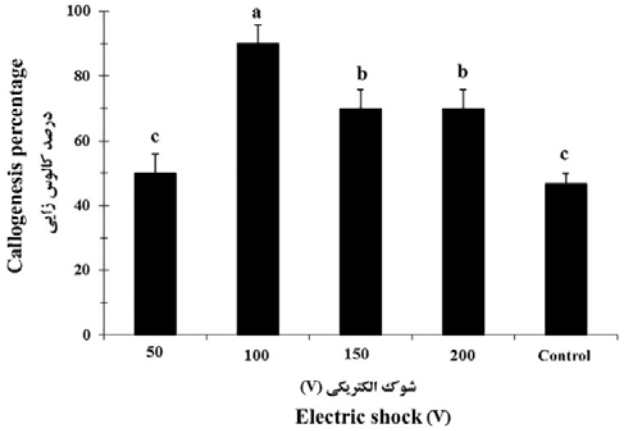
با توجه به شکل ۱۰، بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک ۰/۱۶ رویان، متعلق به تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بود.

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر شوک الکتریکی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 4. Analysis of variance of the effect of electric shock on the studied traits in cucumber anther culture

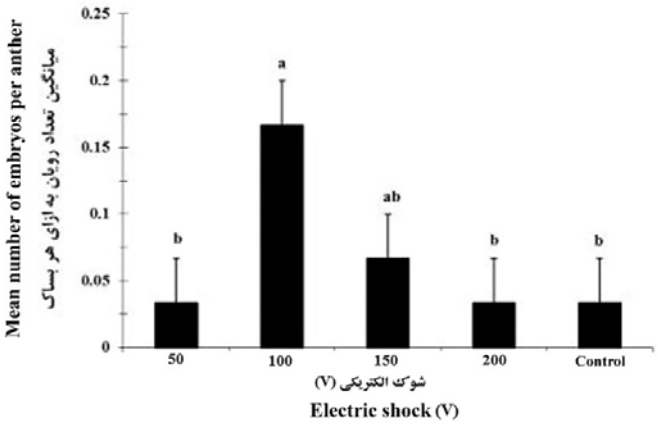
منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	
		درصد کالوس زایی Callogenesis percentage	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther
شوک الکتریکی (Electric shock)	4	926.7**	0.00420*
خطای آزمایشی (Experimental error)	10	86.7	0.00147
ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)		14.25%	5.1%

* و ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ را نشان می دهند. * and ** indicate significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر شوک الکتریکی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 9. Mean comparison of the effect of electric shock on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۰. مقایسه میانگین اثر شوک الکتریکی بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 10. Mean comparison of the effect of electric shock on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

شوک الکتریکی موجب ایجاد منافذی در غشای سلول شده و ورود مواد مورد نیاز جهت رشد سلول را تسهیل می‌کند (ریچ و همکاران، ۱۹۸۷). در این آزمایش اثر شوک الکتریکی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار بررسی شد. مقایسه ولتاژهای مختلف شوک الکتریکی نشان داد که ۱۰۰ ولت بیشترین درصد کالوس زایی و بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را ایجاد می‌کند.

با بررسی‌های صورت گرفته در این آزمایش مشخص شد که تیمار ۵۰ و ۲۰۰ ولت از نظر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک با تیمار شاهد (بدون اعمال شوک الکتریکی) در یک سطح هستند. به نظر می رسد که ۵۰ ولت تاثیر چندانی روی میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک نداشت و این می‌تواند به علت پایین بودن ولتاژ باشد. جریان‌های الکتریکی بالاتر، چون منجر به زخمی شدن بساک ها و کاهش یا عدم تولید رویان می شوند مضر هستند و تیمار ۲۰۰ ولت در این آزمایش رویان زایی پایینی را نشان داد. شوک الکتریکی در تبادل مواد محیط کشت به داخل سلول نقش دارد، همچنین شوک الکتریکی موجب رشد پرتوپلاست شده و توانایی باززایی گیاه را افزایش میدهد (ریچ و همکاران، ۱۹۸۷).

در بخش دیگر این آزمایش، اعمال تیمارهای الکتریکی بر روی کالوس های حاصل از کشت بساک انجام گردید، اما این کالوس ها به القای آندروژنز پاسخی نشان ندادند و کالوس‌ها از حالت عادی که بافتی اسفنجی داشتند به کالوس‌های آبکی تبدیل شدند و در نهایت در این آزمایش رویانی القا نشد و کالوس‌ها در همین مرحله متوقف شدند و به همین دلیل، نتایج قابل قبولی از این آزمایش بدست نیامد.

اثر تیمار دور سانتریفیوژ برکالوس‌زایی و رویان‌زایی درکشت بساک خیار

نتایج تجزیه واریانس (جدول۵) حاصل از دور اعمال شده توسط سانتریفیوژ با دورهای مختلف در کشت بساک خیار نشان داد که بین تیمارهای مختلف برای صفت درصد کالوس زایی و صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود دارد.

با توجه به نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱۱)، بیشترین درصد کالوس زایی (۷۳/۳۳ درصد) مربوط به دور ۱۵۰g سانتریفیوژ بود. دور ۶۰۰g سانتریفیوژ با میزان ۴۶/۶۶ درصد کمترین درصد کالوس‌زایی را به خود اختصاص داد.

طبق شکل ۱۲، بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک (۰/۲ رویان) متعلق به دور ۱۵۰g سانتریفیوژ بود.

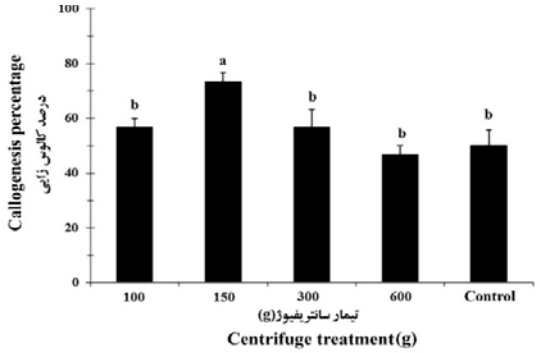
استفاده از پیش تیمارهای فیزیکی مانند دور سانتریفیوژ و الکتروپوریشن القای آندروژنز را در کشت بساک گونه‌های مختلف از قبیل نخود، گل گاوزبان، تاتوره، توتون، و نخودفرنگی افزایش داده است (رشیدی و همکاران، ۱۳۹۸؛ سنایی هویدا و همکاران ۲۰۱۷، گریوال و همکاران، ۲۰۰۹؛ سانگوان، ۱۹۷۷).

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر دور سانتریفیوژ بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 5. Analysis of variance of the effect of centrifuge speed on the studied traits in cucumber anther culture

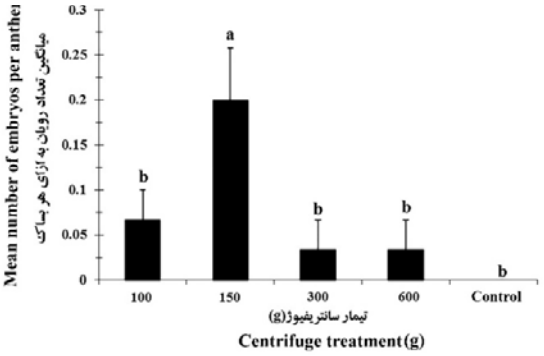
منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	
		درصد کالوس زایی Callogenesis percentage	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther
دور سانتریفیوژ (Centrifuge speed)	4	316.7*	0.00745*
خطای آزمایشی (Experimental error)	10	66.7	0.00163
ضریب تغییرات (.C.V) (Coefficient of variation)		14.41%	5.38%

* تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد. * Indicates a significant difference at the 0.05 level.



شکل ۱۱. مقایسه میانگین اثر دور سانتریفیوژ بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 11. Mean comparison of the effect of centrifugation speed on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۲. مقایسه میانگین اثر دور سانتریفیوژ بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 12. Mean comparison of the effect of centrifugation speed on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

در آزمایش حاضر مقایسه دورهای مختلف سانتریفیوژ نشان داد که دور ۱۵۰g به‌مدت سه دقیقه بیشترین درصد کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک را به‌همراه داشت. تیمار دور سانتریفیوژ بر القای رویان در گیاه خیار موثر است اما به‌نظر می‌رسد که تیمارهایی با دور متوسط مانند ۱۵۰g نتیجه مطلوب‌تری را ایجاد می‌کند. از نظر ظاهری کالوس‌های این آزمایش قبل از قرار گیری در محیط کشت رویان‌زایی زائده‌های ریشه‌مانندی بر روی خود ایجاد کردند. رشیدی و همکاران (۱۳۹۸) اثر دورهای مختلف سانتریفیوژ و شوک الکتریکی را بر کارآیی آندروژنز در کشت بساک نخود بررسی کردند. نتایج نشان داد بیشترین درصد رویان‌زایی گامتی از بساک‌های تیمار شده نخود با دور سانتریفیوژ g ۱۵۰ به مدت ۶ دقیقه به‌دست آمد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

اثر میدان مغناطیسی بر کالوس زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۶) حاصل از تیمار

میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی برصفات مختلف مورد مطالعه در کشت بساک خیار نشان داد که بین تیمارهای مختلف برای صفات درصد کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری معنی دار در سطح ۰/۰۱ وجود دارد.

بالاترین درصد کالوس زایی (۶۰ درصد) به تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس تعلق گرفت. کمترین درصد کالوس زایی (۲۳/۳۳ درصد) مربوط به تیمار قرار گرفتن بساک ها به مدت سه هفته در میدان مغناطیسی با شدت بالا بود (شکل۱۳).

با توجه به شکل۱۴، بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک (۰/۲ رویان زایی) مربوط به تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس بود ولی از تیمار آب مغناطیس شده به مدت ۲۴ ساعت و تیمار سه هفته در معرض میدان مغناطیسی با شدت بالا هیچ رویانی حاصل نگشت.

این آزمایش به منظور بررسی اثر میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی برکالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس نسبت به سایر تیمارها بالاترین درصد کالوس زایی و بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را داشت. میدان مغناطیسی روی آنزیم‌ها و ترکیبات پروتئینی تاثیر می‌گذارد و باعث تغییر شکل پروتئین‌ها می‌شود (واشیت و ناگاراجان، ۲۰۱۰). همچنین در آزمایشی آیرو و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از تیمارهای مغناطیسی ضعیف باعث بهبود تکثیر درون شیشه ای و ریشه زایی در گونه گیاهی *Genista aetnensis* (Raf. Ex Biv.) Dc می گردد.

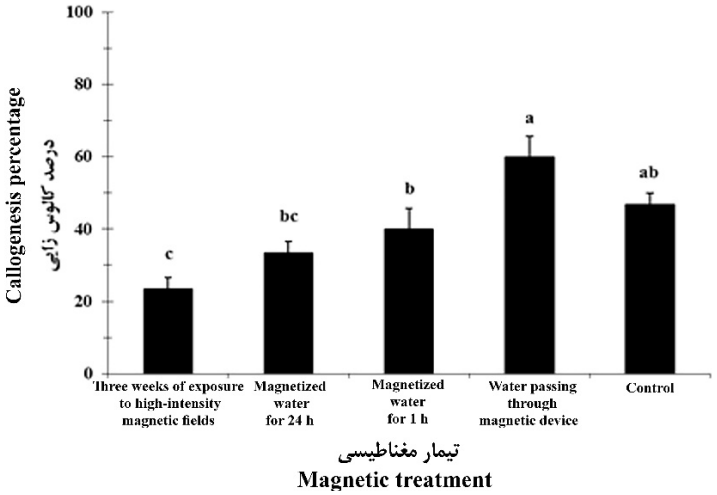
جدول ۶. تجزیه واریانس اثر میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 6. Analysis of variance of the effect of magnetic field and magnetized water on the studied traits in cucumber anther culture

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	
		درصد کالوس زایی Callogenesis percentage	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther
تیمار مغناطیسی (Magnetic treatment)	4	573.3**	0.00858**
خطای آزمایشی (Experimental error)	10	60	0.00133
ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)		19.04%	4.92%

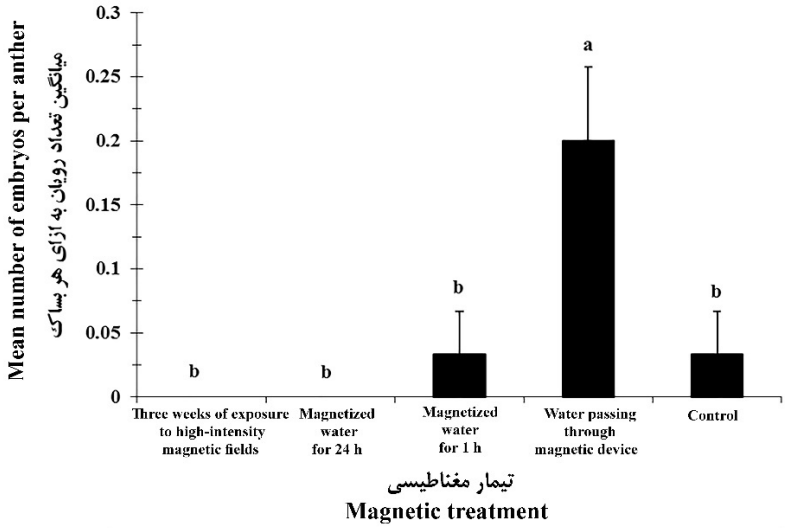
** به تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ را نشان می دهد.

** indicates a significant difference at the 0.01 level.



شکل ۱۳. مقایسه میانگین اثر تیمار مغناطیسی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 13. Mean comparison of the effect of magnetic treatment on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۴. مقایسه میانگین اثر تیمار مغناطیسی بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 14. Mean comparison of the effect of magnetic treatment on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که در گیاه خیار بالاترین میزان القـای کـالوس و رویـان از طریـق کشـت بساک مربوط به ژنوتیپ بتاآلفا بود. همچنـین بـه ترتیـب ابتدا تیمار شاهد (عدم استفاده از تیمار حرارتی) در محـیط کشت مایع و سپس ۳۰ درجه سـانتی گـراد بـه مـدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و بیشترین میانگین تعداد گیـاه بـه ازای هر بساک را به خود اختصاص دادنـد ومطـابق آزمایشـات محیط کشت مایع اثر بهتری را در مقایسه با محیط کشت جامد به همراه داشت. مقایسـه ولتاژهـای مختلـف شـوک الکتریکی نشان داد که تیمار ۱۰۰ ولـت بیشـترین درصـد کالوس‌زایی و بالاترین میانگین تعداد رویـان بـه ازای هـر بساک را دارد. اعمال شوک های الکتریکی مـورد اسـتفاده روی کالوس ها، بر القای رویان تـأثیری نشـان ندادنـد. بـا بررسی دورهـای مختلـف سـانتریفیوژ مشـخص شـد، دور ۱۵۰g به مدت سه دقیقه اثرات معنی داری را بر پاسـخ بـه آندروژنز در کشت بساک گیاه خیار به وجود آورد. همچنین تیمـار عبـور آب از دسـتگاه مغناطیسـی نسـبت بـه سـایر تیمارهای مغناطیسـی بیشـترین میـزان صـفات مـذکور را حاصل کرد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

حمیدوند، ی. عبداللهی، م،ر. (۱۳۹۴). اثر پیش تیمار دمایی بر پینه‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک خیار. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۱۶ (۱)، ۱۴۹-۱۶۰.

رشیدی، ش. عبداللهی، م ر.، ساری‌خانی، ح.، موسوی، س س. (۱۳۹۸). بررسی اثر پیش تیمارهای سانترفیوژ و شوک الکتریکی بر کارایی آندروژنز در کشت بساک نخود (*Cicer arientinum* L.). زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس، شماره ۲، ۱۷۴-۱۸۱.

عبداللهی، م ر.، خاصخیلی، ک ز.، ناظری، س. (۱۴۰۳). بررسی بیان بر خی از ژن‌های رویان‌زایی سوماتیکی در کالوس‌های حاصل از کشت بساک در ژنوتیپ‌های مختلف خیار. ششمین کنگره بین‌المللی و هجدهمین کنگره ملی ژنتیک، ۲ الی ۴ خرداد ۱۴۰۳، G-۱۱۹۷

Abdollahi, M. R., Najafi, S., Sarikhani, H., & Moosavi, S. S. (2016). Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 571-579.

Airò, M., Ala, G., Buccheri, P., Caruso, M., Fascella, G., Giovino, A. and Mammano, M.M. (2017). Effect of weak magnetic fields on the in vitro propagation of *Genista aetnensis* (Raf. Ex Biv.) Dc.. *Acta Horticulture*, 1155, 387-392.

Asadi, A., Zebarjadi, A., Abdollahi, M. R., & Seguí-Simarro, J. M. (2018). Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 214, 1-17.

Bhojwani, S. S., Pande, H., & Raina, A. (2003). Factors affecting androgenesis in indica rice, Universitätsbibliothek.

Bright, S., & Jones, M. (2012). Cereal tissue and cell culture (Vol. 15), *Springer Science & Business Media.*

Chupeau, Y., & Caboche, M. (1998). Androgenesis and haploid plants, *Springer Science & Business Media*.

Ferrie, A.,and Caswell, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 104(3), 301-309.

Grewal, R. K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A., & Warkentin, T. D. (2009). Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.), role of stress treatments. *Plant Cell Reports*, 28(8), 1289-1299.

Hasandokht, M. R. (2006). Greenhouse managing (greenhouse production technology). Tehran, Marz Danesh. 320. (in Persian)

Kumar, H. A., & Murthy, H. (2004). Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78(3), 201-208.

Kumar, H. A., Murthy, H., & Paek, K. (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia horticulturae*, 98(3), 213-222.

Mishra, V. K., & Goswami, R. (2014). Haploid production in higher plant. *International Journal* of *Chemical* and *Biological Sciences*. 1, 26-45.

Prasath, D., Natarajan, S., & Thamburaj, S. (1998). Studies on heterosis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *South indian horticulture*, 46(3/4), 247-250.

Rech, E., Ochatt, S., Chand, P., Power, J., & Davey, M. (1987). Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma*, 141(2-3), 169-176.

Hoveida, Z. S., Abdollahi, M. R., Mirzaie-Asl, A., Moosavi, S. S., & Seguí-Simarro, J. M. (2017). Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130, 369-378

Sangwan-Norreel, B.S. (1977). Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of Datura innoxia Mill. *Journal of Experimental Botany*, 28(4), 842-852.

Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519-534.

Sidhu, A., Bal, S., Behera, T., & Rani, M. (2005). An outlook in hybrid eggplant breeding. *Journal of New Seeds.* 6(2-3), 15-29.

Simmonds, D.H., & Keller, W.A. (1999). Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*, 208(3), 383-391.

Sohrabi, S.; Abdollahi, M.R.; Mirzaie-Asl, A.; Koulaei, H.E.; Aghaeezadeh, M.; and Seguí-Simarro J.M. (2021). A refined method for ovule culture in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 146, 259–267.

Song, H., Lou, Q.-F., Luo, X.-D., Wolukau, J. N., Diao, W.-P., Qian, C.-T., & Chen, J.-F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 90(3), 245-254.

Suprunova, T., & Shmykova, N. (2008). In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. Paper presented at the Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae, *Avignon. France*, 21-24 May 2008.

Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore, a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35, 53-109.

Tuncer, U.H., & Boztok, K. (1991). The effects of growing greenhouse cucumber seedling in various pot types on the yield. *Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi*, 2, 155- 158.

Vashisth, A., & Nagarajan, S. (2010). Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 149-156.

Zhang, X., Wu, Q., Li, X., Zheng, S., Wang, S., Guo, L., & Custers, J. B. (2011). Haploid plant production in *Zantedeschia aethiopica* 'Hong Gan' using anther culture. *Scientia horticulturae*, 129(2), 335-342.