تأثیر پیش تیمار دمایی و نور بر القاء جنین و کالوس در کشت بساک خیار

سمانه قنبری[۱] و مریم گل‌آبادی[۱،۲*]

[۱] ایران، اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[۲] ایران، اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

باهدف بررسی تأثیر ترکیب‌ها و غلظت‌های مختلف هورمونی و همچنین تأثیر پیش‌تیمار دمایی و نور بر تغییر مسیر بیولوژیکی و حرکت به سمت کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی در ریزنمونه‌های بساک خیار، پژوهشی به صورت دو آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی رقم بومی فضای باز خیار اصفهانی و لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای اجرا گردید. فاکتورها شامل پیش تیمار دمایی (سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بدون پیش‌تیمار سرمایی (گل تازه))، تیمار نوری پس از کشت (نور و تاریکی) و غلظت‌های مختلف هورمونی شامل KIN (۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم/لیتر)، 2,4-D (۱ تا ۳/۵ میلی-گرم/لیتر) و BAP (۰/۱ تا ۳/۵ میلی‌گرم/لیتر) بودند. نتایج حاکی از برتری پیش‌تیمار بدون سرما (گل تازه) نسبت به پیش‌تیمار سرما در جنین‌زایی و کالوس‌زایی در لاین اصلاحی و کالوس‌زایی در رقم بومی بود. تیمار تاریکی باعث افزایش معنی‌دار درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس لاین اصلاحی شد، اما تأثیر معنی‌داری بر روی صفات مورد بررسی در رقم بومی نداشت. ترکیب هورمونی BAP و 2,4-D (۳/۵+۱ میلی‌گرم/لیتر)در هر دو ژنوتیپ باعث بیشترین القای جنین‌زایی و کالوس‌زایی شد. جنین‌زایی در لاین اصلاحی تحت تأثیر فاکتورهای مورد مطالعه قرارگرفت اما این فاکتورها تأثیر معنی‌داری بر جنین‌زایی رقم بومی نداشتند. اثرمتقابل سه‌گانه پیش‌تیمار دمایی، تیمار نوری و هورمونی محیط کشت نشان داد که به‌منظور بیشترین جنین‌زایی، کالوس‌زایی و قطر کالوس در کشت بساک خیار، استفاده از گل تازه و محیط کشت 2,4-D+BAP (۳/۵+۱ میلی‌گرم/لیتر) باعث حاصل شدن بهترین نتیجه خواهد شد و شرایط نور و تاریکی نقش چندانی در جنین‌زایی ندارد.

واژه‌های کلیدی: بساک، پیش‌تیمار دمایی، نور، هورمون.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۰۲۶۸۳۷، پست الکترونیکی: golabadim@gmail.com

مقدمه

اگرچه مدت طولانی است که سودمندی هاپلوئیدی در زمینه‌های ژنتیک و اصلاح نباتات شناخته شده است، ولی بهره‌برداری از آن با محدودیت‌هایی مواجه بوده است، زیرا پدیده ایجاد گیاه هاپلوئید در طبیعت با فراوانی بسیار اندک رخ‌داده و ضمناً جداسازی و شناسایی این‌گونه گیاهان طبیعی نیز مشکل می‌باشد. ولی در صورتی که سلول‌های جنسی یا گامت‌ها در گیاهان بتوانند بدون انجام لقاح و به‌طور مصنوعی به یک گیاه کامل تبدیل شوند، گیاه حاصل هاپلوئید خواهد بود که سلول‌های آن‌ها حاوی n کروموزوم می‌باشد و دراین صورت قابلیت کاربرد در اهداف مختلف را خواهند داشت (۴). محققین در دهه ۱۹۵۰ موفق به تولید اولین گیاه هاپلوئید در خانواده کدوئیان شدند (۱۲ و ۱۳).

روش‌های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از این روش‌ها آندروژنز، می‌باشد. تکنیک آندروژنز به دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌شود. کشت

بساک در برنامه‌های به نژادی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است که محققین زیادی با به کارگیری این روش، موفق به تولید گیاهان هاپلوئید در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شده‌اند (۳۷). کشت بساک به عنوان ساده‌ترین و مؤثرترین روش القای گیاهان هاپلوئید شناخته شده است. کشت بساک عبارت است از کاشت بساک‌های دارای دانه گرده در مراحل به‌خصوصی از رشد که به‌منظور تولید آندروژنز در شیشه می‌باشد (۵). مطالعات اولیه در ارتباط با تولید گیاهان دابل هاپلوئید از طریق روش کشت بساک در خانواده کدوئیان در گیاهانی مانند کدوی پوست کاغذی (۲۴)، خربزه (۱۱) و خیار (۱۸و ۳۲) انجام شده است که نتایج آن محدود به تولید کالوس و تعداد اندکی گیاه هاپلوئید بوده است (۱۹). در گیاهان دیگری مانند یولاف نیز کشت بساک اجرا گردیده است (۱۷) که در آن جنین‌زایی بطور موفق اما باززایی تنها در برخی ژنوتیپها رخ داده است.

اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌طور وسیعی در کشت بساک مورد بررسی قرارگرفته است. اگرچه تعداد محدودی از گونه‌های گیاهی مدل (اعضای خانواده سیب زمینی‌ان) به‌اضافه کردن اکسین در محیط کشت بساک نیاز ندارند، با این وجود حضور تنظیم کننده‌های رشد از قبیل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها یا ترکیبی از این دو برای تولید جنین حاصل از میکروسپور در کشت بساک بسیاری از گونه‌های گیاهی ضروری می‌باشد (۲۲). اکسین‌ها باعث تقسیم سلولی و تمایز سلولی می‌گردند و مقدار کمی سیتوکینین به‌علاوه اکسین جهت ادامه رشد بساک لازم است. از طرف دیگر توفوردی (2,4-D) باعث تسریع در تکثیر سلولی و القاء کالوس می‌شود. سیتوکنین‌ها باعث تسریع تقسیم سلولی و تشکیل اندام هوایی و ریخت‌زایی می‌شوند. تی-دیازورون (TDZ) دارای فعالیت سیتوکینینی بوده و در غلظت‌های کم برای تحریک تشکیل اندام هوایی مؤثر است (۲۷). از طرف دیگر به‌منظور القاء تنش‌زایی در آندروژنز و تغییر مسیر آندروژنز از گامتوفیتی به سمت اسپروفیتی از تیمارهای تنشی (مواد غذایی، دمای بالا و پایین) به‌طور گسترده استفاده می‌گردد. گزارش‌های محدودی در خصوص کشت بساک خیار در ایران وجود دارد. حمیدوند و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی تأثیر پیش تیمار سرمایی بر روی کشت بساک خیار مشاهده کردند که استفاده از پیش تیمار دمایی ۴° به مدت ۴ روز بیشترین میزان کالوس‌زایی و بیشترین تعداد رویان را در کشت بساک خیار اصفهانی و خیار آلفا ایجاد کرده‌است (۶). نجفی و همکاران (۱۳۹۴) در ۴ رقم خیار فضای باز اقدام به کشت بساک نموده و فاکتورهای ژنوتیپ، نوع محیط کشت جامد و مایع و تعداد تخمدان در کشت بساک را مورد مطالعه قراردادند (۷). در مطالعه آنها پاسخگویی ژنوتیپ برای فاکتورهای مختلف، متفاوت گزارش شد. ارمیون و همکاران (۱۳۹۴) نیز به مطالعه تأثیر ژنوتیپ و ترکیبات هورمونی برکشت بساک خیار پرداختند و مشخص نمودند که رقم خیار فضای باز باسمنج در حضور 2,4-D بیشترین کالوس‌زایی را داشته است (۱). همچنین تیمار هورمونی NAA و BA بیشترین رویانزایی را داشتند. رویان‌ها دراین آزمایش نمو پیدا نکردند. عبدالهی و همکاران (۲۰۱۶) به مطالعه تأثیر غلظت درشت مغذی‌ها و غلظت آگار در محیط کشت بر روی کشت بساک خیار پرداختند و پاسخ متفاوتی را از ارقام خیار بومی و اصلاحی فضای باز به این فاکتورها مشاهده کردند (۸).

کومار و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی باززایی کشت بساک خیار را مورد بررسی قراردادند. آنها از محیط پایه B_5 استفاده کردند و با غلظت ۲ میکرومول 2,4-D و ۱ میکرومول BAP بهترین جنین‌زایی را داشتند. پیش تیمار سرما (۴درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ روز نیز بهترین پاسخ را در جنین‌زایی نشان داد (۱۸). در برخی بررسی‌ها پیش تیمار دمایی در موفقیت کشت اندام‌های زایشی مؤثر بوده است. مطالعات در گیاه گوجه‌فرنگی نشان داده‌اند که پس از تیمار سرمایی، بیان ژن‌های کد کننده شوک گرمایی (Heat shock proteins) افزایش می‌یابد (۲۸). چنین به نظر

می‌رسد که افزایش بیان ژن‌های کد کننده شوک گرمایی موجب توقف مسیر تکاملی میکروسپورها به سمت تشکیل دانه گرده بالغ می‌شود (۴۱). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های کد کننده شوک گرمایی موجب تخریب دوک تقسیم و میکروتوبول‌ها شده و به این ترتیب موجب بازآرایی اسکلت سلولی و درنتیجه تغییر در چرخه سلولی میکرسپورها به سمت فرایند رویانزایی می‌شوند (۳۱).

باززایی گیاه هاپلوئید مضاعف از کشت بساک خیار توسط سانگ و همکاران (۲۰۰۷) مورد بررسی قرارگرفت. آنها بیان کردند که خیار مناطق سرد به شوک سرما و خیار مناطق گرم به شوک گرمایی پاسخ خوبی نشان می‌دهند (۳۱). این محققین برای القای کالوس از محیط پایه MS به‌اضافه ۴/۴۴ میکرومول BAP، ۲/۲۶ میکرومول 2,4-D، ۴/۶۴ میکرومول KIN، ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار، و برای القای جنین از محیط پایه MS به‌اضافه ۰/۵۴ میکرومول NAA، ۱۳/۳۲ میکرومول BAP، ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار استفاده کردند و به کمک این پروتکل ۹۳ درصد باززایی گیاه دابل‌هاپلوئید مشاهده شد. بنابراین روش کشت بساک برای هر ژنوتیپ باید بهینه‌سازی گردد (۹).

باتوجه به اینکه تیمارهای مختلف کشت بافت در شرایط مختلف آزمایشگاهی و محیطی و همچنین شرایط فیزیولوژیکی و ژنوتیپ گیاه، پاسخ‌های بسیار متفاوتی را نشان می‌دهند، جهت تولید گیاه هاپلویید در هر برنامه اصلاحی بایستی این فرایند در شرایط موجود به‌روز رسانی شود. از طرف دیگر مطالعه اثر فاکتورهای مختلف بر کشت بساک خیار در مقایسه با کشت تخمدان در رسیدن به موفقیت و حصول گیاه هاپلویید محدودتر بوده و اغلب بر روی خیار فضای باز انجام شده است. همچنین تعداد گزارش‌های کشت بساک خیار در ایران بسیار محدود بوده و تمرکز اصلی آنها بر نوع و ترکیبات محیط کشت و اثر ژنوتیپ بوده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ترکیب‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون و همچنین تأثیر پیش تیمار دمایی و نور بر تغییر مسیر بیولوژیکی بساک و حرکت به سمت کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی در یک رقم بومی فضای باز و یک لاین اصلاح شده خیار گلخانه‌ای در شرایط آزمایشگاهی مرکز تحقیقات بذر دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان بوده است.

مواد و روشها

برای اجرای این تحقیق، کشت بذور خیارهای فضای باز و گلخانه‌ای درون گلخانه با دمای روز بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شب ۱۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد و درصد رطوبت گلخانه حدود ۶۰ درصد انجام شد. آبیاری به‌صورت قطره‌ای و هر ۲–۳ روز یکبار اجرا گردید. عملیات داشت بوته‌ها نیز مطابق با نیاز آن‌ها صورت گرفت. بوته‌ها ۳۰ تا ۴۵ روز پس از کشت، شروع به گلدهی کردند. ریز نمونه‌های مورد نظر، اندام جنسی نر بوته خیار بودند. بیشترین گل‌های چیده شده از روی گره‌های اولیه ساقه بودند (۲۹). گل‌های نر با اندازه ۲ تا ۵ میلی‌متر که حاوی میکروسپور جنین‌زا (اواسط تا اواخر مرحله تک هسته‌ای) بودند، بین ساعت ۹:۰۰ تا ۱۰:۰۰ صبح از بوته جدا شده و در ظرفی روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند (۱۸) (شکل ۱، a, b,c).

برای زدودن غبار سطحی ریز نمونه‌ها از آب مقطر همراه با مایع ظرفشویی به مدت سه دقیقه استفاده شد. ضدعفونی کامل گل‌ها در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ده دقیقه انجام شد. پس از آن با آب مقطر استریل و سرد، سه تا چهار بار شستشو شده و در آخر از محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت پنج دقیقه استفاده شد. بعد از جدا کردن بساک‌ها از گل‌های نر در محیط استریل، ده عدد بساک در هر پتری‌دیش قرارگرفتند و به اتاقک رشد با شرایط بدون هوای آزاد و میزان نور ۳۰۰۰ لوکس، رطوبت ۵۰ درصد و شرایط دمایی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور منتقل شدند. برای محیط کشت از محیط موراشیگ و

اسکوگ (MS) حاوی ۸ گرم بر لیتر آگار و ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز استفاده شد و هورمون‌های رشد براساس تیمارهای مورد استفاده به شیشه‌ها اضافه شدند و PH محیط کشت بر روی ۵/۸ تنظیم شد. هورمون‌های مورد استفاده شامل بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، کینتین (Kin) و 2,4-D بودند.

به دلیل بررسی ۴ فاکتور مختلف شامل ژنوتیپ، غلظت و ترکیب هورمونی، پیش تیمار دمایی و تیمار نوری در این آزمایش و پیچیدگی اثرات متقابل، این آزمایش بر روی رقم بومی خیار اصفهانی و لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای (۱۵/۲۴۳۵*۲۰) به‌طور جداگانه انجام شد. رقم بومی خیار اصفهانی از شرکت‌های فروشنده بذر در اصفهان تهیه شد و لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان تهیه گردید. در هر آزمایش فاکتور اول شامل پیش تیمار دمایی در دو سطح (سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و بدون پیش تیمار سرما به‌صورت گل تازه چیده شده از بوته)، فاکتور دوم تیمار نوری پس از کشت در دو سطح (نور و تاریکی) و فاکتور سوم غلظت-های مختلف هورمونی KIN, BAP, 2,4-D در پنج سطح (M1-M5) بودند. برای اعمال تیمار نور، نیمی از شیشه‌های کشت شده حاوی غلظت‌ها و ترکیبات هورمونی مختلف و همچنین بساک‌های پیش تیمار شده و نشده (گل تازه) با فویل آلومینیومی (برای اعمال تاریکی) و نیمی دیگر بدون فویل، در اتاق رشد قرار داده شدند.

جدول ۱- خلاصه‌ای از فاکتورهای مورد بررسی بر روی دو ژنوتیپ مختلف خیار

ترکیب و غلظت هورمونی	خیار بومی فضای باز اصفهانی				لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای			
	۴ درجه سانتی‌گراد پیش تیمار سرما		بدون پیش تیمار سرما (گل تازه)		۴ درجه سانتی‌گراد پیش تیمار سرما		بدون پیش تیمار سرما (گل تازه)	
	نور	تاریکی	نور	تاریکی	نور	تاریکی	نور	تاریکی
M1		✓		✓		✓		✓
M2		✓		✓		✓		✓
M3		✓		✓		✓		✓
M4		✓		✓		✓		✓
M5		✓		✓		✓		✓

M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر

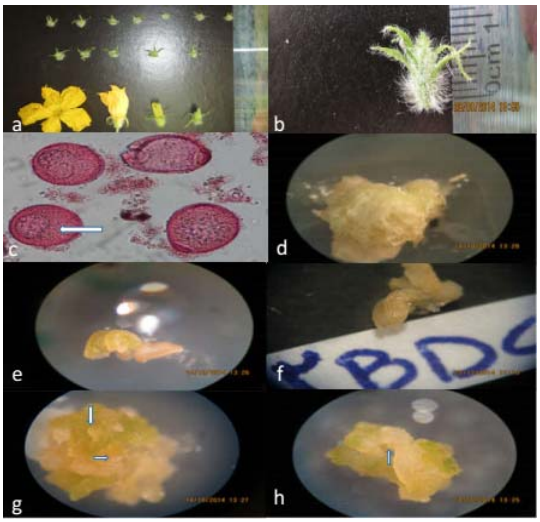
چهار هفته پس از کشت درصد جنین‌زایی، درصد کالوس-زایی و قطر کالوس (با استفاده از کولیس دیجیتال) اندازه-گیری شد (شکل‌های ۱، d, e, f, g, h). به این منظور تعداد بساک‌هایی که جنین یا کالوس تولید کرده بودند یادداشت شدند. از تقسیم کردن تعداد بساک‌های دارای جنین یا کالوس به تعداد اولیه بساک، درصدهای مختلف جنین‌زایی و کالوس‌زایی به دست آمدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و براساس طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار اجرا شد. برای داده‌هایی که نرمال نبودند از تبدیل داده‌ها استفاده گردید. تجزیه واریانس با استفاده از دستور ANOVA در نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی-دار LSD در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

دراین بررسی اثر پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در مقابل گل‌هایی که پیش‌تیمار نداشتند، تیمار نور و تاریکی و ترکیبات هورمونی مختلف برکشت بساک خیار در یک لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و خیار بومی اصفهان بررسی شد که نتایج تجزیه واریانس در جدول ۲ آورده شده است. هردو ژنوتیپ خیار شامل لاین اصلاحی و رقم

بومی روند مشابهی را در مقابل پیش تیمار سرما از خود نشان دادند و بیشترین کالوس‌زایی در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما به دست آمد و رقم بومی خیار درصد کالوس‌زایی بیشتری نسبت به لاین اصلاحی نشان داد (۳۶ درصد در مقابل ۲۶ درصد).



شکل ۱- القاء کالوس و جنین در کشت بساک خیار. (a,b) اندازه و شکل مناسب گل‌های نر خیار در کشت بساک، (c) مرحله تک هسته‌ای میکروسپور در گل نر با اندازه مناسب، (d) کالوس‌های القا شده روی بساک، (e , f) کالوس‌های رویان‌زا، (g, h) رویان‌های القاء شده در مراحل رشد و نموی مختلف روی کالوس‌ها

اگرچه خیار گلخانه‌ای جنین‌زایی بیشتری را در شرایط بدون سرما نشان داد (۷/۷۵ درصد در مقابل ۰/۷۲ درصد)، اما رقم بومی فضای باز تفاوتی ازنظر جنین‌زایی در دو شرایط دمایی نداشت (جدول ۳).

تیمار تاریکی اثر معنی‌داری بر درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای داشت و باعث افزایش معنی‌دار کالوس‌زایی و قطر کالوس در این ژنوتیپ شد، اما تأثیر معنی‌داری بر روی صفات مورد بررسی در رقم بومی نداشت (جداول ۲ و۴).

در این بررسی محیط کشت‌های مختلف بر هر سه صفت مورد بررسی به‌جز درصد جنین‌زایی در رقم بومی دارای اثر معنی‌داری بودند (جدول ۲).

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و رقم بومی در کشت بساک

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای			میانگین مربعات در رقم بومی		
		جنین‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس (mm)	جنین‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس (mm)
پیش‌تیمار دما (P)	۱	۰/۰۳۱۲**	۰/۱۰۴۷**	۰/۰۵۰۷ $^{n.s}$	۰/۰۰۷۱ $^{n.s}$	۰/۰۷۷۹*	۰/۱۸۵ $^{n.s}$
نور(T)	۱	۰/۰۰۰۰۲$^{n.s}$	۰/۱۳۶۸**	۰/۲۳۴*	۰/۰۰۰۱$^{n.s}$	۰/۰۵۶۱$^{n.s}$	۰/۰۰۱$^{n.s}$
غلظت هورمون (M)	۴	۰/۰۰۵۱**	۰/۰۵۷۱**	۰/۱۵۸*	۰/۰۰۳$^{n.s}$	۰/۶۱۴*	۰/۵۵۹**
P*T	۱	۰/۰۰۱$^{n.s}$	۰/۱۰۵**	۰/۲۵۸*	۰/۰۰۴۵$^{n.s}$	۰/۱۵۸**	۰/۰۳۱$^{n.s}$
P*M	۴	۰/۰۰۵۸**	۰/۰۴۶۲**	۰/۱۵۶*	۰/۰۱۴۷ $^{n.s}$	۰/۱۱۴ **	۰/۴۴۳**
T*M	۴	۰/۰۰۱۴$^{n.s}$	۰/۰۸۴**	۰/۱۵۴$^{n.s}$	۰/۰۱۰۴ $^{n.s}$	۰/۰۱۴۸$^{n.s}$	۰/۰۱۵$^{n.s}$
P*T*M	۴	۰/۰۰۳*	۰/۱۰۱**	۰/۳۶۲**	۰/۰۰۷۳$^{n.s}$	۰/۰۳۹۶$^{n.s}$	۰/۲۱۳*
خطا	۴۰	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۹۱	۰/۰۵۵	۰/۰۰۲۱	۰/۰۱۸۵	۰/۰۸
ضریب تغییرات	۰	۵/۷۲	۱۱/۷۲	۱۵/۷۶	۷/۶۴	۱۴/۵	۱۶/۶۴

** و * و nsبه ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد، و فاقد تفاوت معنی‌دار

جدول۳- مقایسه میانگین درصد جنین زایی و کالوس زایی در پیش‌تیمارهای دمایی مختلف در دو ژنوتیپ لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و بومی

پیش تیمار	لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای		رقم بومی
	جنین‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)
سرما	۰/۷۲^{b}	۱۸/۱۷^{b}	۳۲/۱۵^{b}
بدون سرما	۷/۷۵^{a}	۲۶/۰۸^{a}	۳۶/۸۷^{a}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

جدول۴- مقایسه میانگین صفات درصد جنین زایی و کالوس زایی در تیمار نوری پس از کشت در کشت بساک خیار

تیمار	صفات در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای	
	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)
نور	۱۶/۶۶^{b}	۱/۴۱^{b}
تاریکی	۲۸/۲^{a}	۲/۰۵^{a}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

محیط کشت شماره ۴ با ترکیب BAP و 2,4-D (به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) دارای بیشترین درصد جنین‌زایی و کالوس‌زایی و بیشترین قطر کالوس در هر دو ژنوتیپ بود (جدول ۵). اگرچه اختلاف این تیمار با سایر تیمارهای هورمونی در همه صفات به‌جز میزان کالوس‌زایی در رقم بومی ازنظر آماری معنی‌دار بود و تأثیر غلظت‌های مختلف هورمونی بر جنین‌زایی و کالوس‌زایی خیار گلخانه‌ای بیشتر از خیار بومی مشاهده گردید.

اثر متقابل پیش‌تیمار دمایی و تیمار پس از کشت (نور و تاریکی) برای صفات درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و برای صفت درصد کالوس‌زایی در رقم بومی معنی‌دار بو (جدول ۲). بیشترین کالوس‌زایی در پیش‌تیمار بدون سرما (گل تازه) و شرایط تاریکی پس از کشت مشاهده شد. اما در رقم بومی بیشترین کالوس‌زایی در پیش تیمار بدون سرما و شرایط نور حاصل شد (جدول ۶). در هر دو مورد اختلاف تیمارهای ذکرشده با سایر تیمارها ازنظر آماری معنی‌دار بود. ازنظر قدرت کالوس‌زایی در تیمارهای نوری و دمایی تفاوت قابل‌توجهی بین رقم بومی و لاین اصلاحی وجود داشت بطوریکه لاین اصلاحی در تیمار بدون سرما و تاریکی بیشترین کالوس‌زایی و جنین‌زایی را نشان داد، اما رقم بومی در تیمار بدون سرما و نور بیشترین کالوس‌زایی را بروز داد.

جدول۵- مقایسه میانگین صفات در غلظت‌ها و ترکیبات هورمونی مختلف در کشت بساک دو ژنوتیپ لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و رقم بومی

تیمار محیط کشت	صفات مورد بررسی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای			صفات مورد بررسی در رقم بومی	
	جنین‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)
M_1	۱/۳۸^{b}	۱۶/۶۲^{bc}	۱/۴۸^{b}	۲۴/۹۸^{b}	۱/۸۷ ^{bc}
M_2	۳/۲^{b}	۱۶/۹^{c}	۱/۶۲^{b}	۳۷/۴۵^{a}	۱/۵^{c}
M_3	۳/۱^{b}	۲۱/۶۷^{ab}	۱/۸۹^{b}	۳۷/۰۲^{a}	۱/۸۶^{bc}
M_4	۱۰/۵۷^{a}	۳۰/۲۶^{a}	۱/۵۷^{a}	۴۱/۶۴^{a}	۲/۵^{ab}
M_5	۴/۱۵^{b}	۲۶/۳۵^{a}	۱/۵۵^{ab}	۳۱/۹۱^{ab}	۲/۷۷^{a}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر

جدول۶- مقایسه میانگین صفات در بررسی اثر متقابل پیش تیمار دمایی و تیمار نوری در کشت بساک خیار

اثر متقابل	لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای		رقم بومی
	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)	کالوس‌زایی(٪)
P_1*T_1	۱۶/۷^{b}	۱/۴۸^{ab}	۳۲/۲ ^{b}
P_1*T_2	۱۹/۰۵^{b}	۲/۰۲^{ab}	۳۲/۱ ^{b}
P_2*T_1	۱۶/۶۵^{b}	۱/۳۶^{b}	۴۴/۰۲ ^{a}
P_2*T_2	۲۰/۷۷^{a}	۲/۰۸^{a}	۲۹/۷۳ ^{c}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

P_1: پیش‌تیمار سرما و P_2: پیش‌تیمار بدون سرما. T_1: تیمار نور و T_2: تیمار تاریکی.

در شرایط پیش تیمار بدون سرما و محیط کشت M4(BAP و 2,4-D به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین درصد جنین‌زایی، کالوس‌زایی و قطر کالوس در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای مشاهده شد (جدول ۷). به‌ویژه درصد جنین‌زایی در این تیمار اختلاف زیادی را با سایر تیمارها نشان داد (۱۹/۳۸ درصد). در ارقام بومی بیشترین کالوس‌زایی و قطر کالوس در شرایط پیش تیمار بدون سرما و محیط کشت M4 (BAP و 2,4-D به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین محیط کشت M3 (2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱+۲/۵+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با پیش تیمار سرما مشاهده شد. این در حالی است که در رقم بومی نوع و غلظت هورمون در حضور یا عدم حضور پیش تیمار دمایی تأثیر متفاوتی بر کالوس‌زایی داشته است.

باتوجه به شکل دو مشخص می‌شود که بیشترین کالوس-زایی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای در شرایط تاریکی پس از کشت و محیط کشت شماره ۴ (BAP و 2,4-D به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) به دست آمد. کمترین کالوس‌زایی نیز در شرایط نور پس از کشت و محیط کشت شماره ۱ (2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر)به دست آمد (شکل ۲). در محیط کشت‌های شماره ۱، ۳ و ۴ درصد کالوس‌زایی در تاریکی بیش از نور بود، اما در دو محیط کشت دیگر (۲ و۵) برعکس این حالت دیده شد، هرچند همچنان بالاترین کالوس‌زایی در تیمار تاریکی به دست آمد. نتایج حاضر نشان می‌دهد در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای شرایط نور و حضور غلظت بالای 2,4-D می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار کالوس‌زایی شود. در مقابل حضور غلظت بالای BAP در تاریکی کالوس‌زایی را افزایش داده است. اثر متقابل تیمار نوری و ترکیب هورمونی در رقم بومی خیار تفاوت معنی‌داری برای صفات مورد بررسی نشان نداد (جدول ۲).

جدول۷- مقایسه میانگین صفات در اثر متقابل پیش تیمار دمایی و ترکیب و غلظت هورمونی در کشت بساک خیار

اثر متقابل	لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای			ارقام بومی	
	جنین‌زایی(٪)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)	کالوس‌زایی(٪)	قطر کالوس(mm)
P_1*M_1	۰^{b}	۲۲/۱۸^{bc}	۱/۴۳^{ab}	۱۹/۴۱^{c}	۱/۲۶ ^{cde}
P_1*M_2	۰/۴^{b}	۱۰/۵۸^{d}	۱/۰۵^{b}	۳۸/۸۵^{ab}	۱/۱۹^{de}
P_1*M_3	۰/۲^{b}	۱۴/۳۶^{bcd}	۱/۴۳^{ab}	۵۰^{a}	۱/۶۹^{abc}
P_1*M_4	۰^{b}	۱۹/۹۶^{bc}	۱/۳۹^{ab}	۳۳/۳۱^{bc}	۱/۳۸^{bcde}
P_1*M_5	۲/۷۶^{b}	۲۲/۱۸^{bcd}	۱/۲۸^{b}	۲۲/۱۸^{bc}	۱/۶۸^{abcd}
P_2*M_1	۲/۷۶^{b}	۱۱/۰۶^{cd}	۱/۲۳^{b}	۳۰/۵۵^{bc}	۱/۶۳^{abcd}
P_2*M_2	۵/۵۳^{b}	۲۲/۱۸^{bc}	۱/۳۲^{ab}	۳۶/۰۶^{abc}	۱/۰۶^{e}
P_2*M_3	۵/۵۳^{b}	۲۷/۷۶^{ab}	۱/۱۴^{b}	۲۰/۸^{bc}	۱/۲۵^{cde}
P_2*M_4	۱۹/۳۸^{a}	۳۸/۸۵^{a}	۲/۰۵^{a}	۴۹/۹۶^{a}	۲/۰۷^{a}
P_2*M_5	۵/۵۳^{b}	۳۰/۵۳^{ab}	۱/۴۵^{ab}	۴۱/۶۵^{ab}	۱/۷۹^{ab}

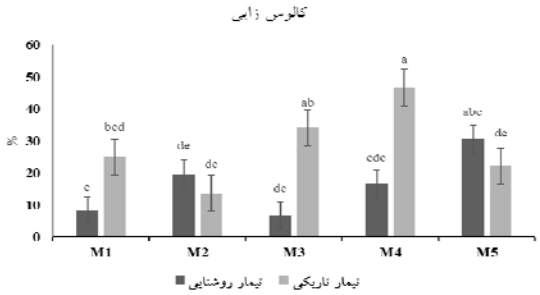
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

P_1: پیش‌تیمار سرما و P_2: پیش‌تیمار بدون سرما. M1-5: (ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون

M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۱+۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر

M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱+۲/۵+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر،M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_5

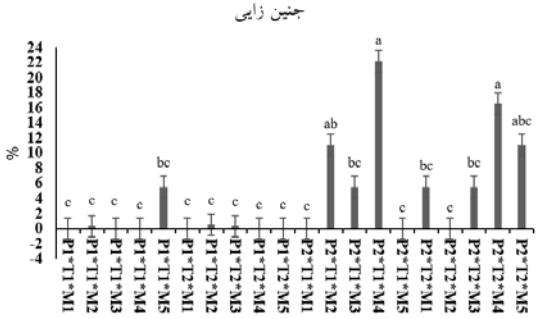
: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۱+۱+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر



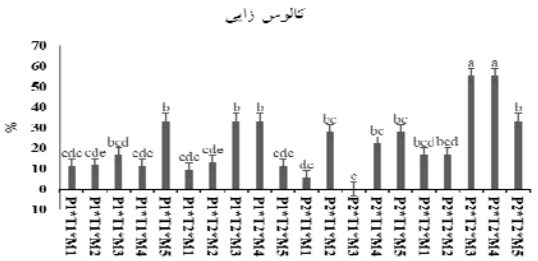
شکل ۲- اثر متقابل تیمار نور و ترکیب و غلظت هورمونی محیط کشت بر روی صفت کالوس زایی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای
M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم برلیتر

اثر متقابل سه‌گانه پیش تیمار دمایی، تیمار نوری و ترکیب هورمونی محیط کشت برای سه صفت اندازه‌گیری شده در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای و قطر کالوس در رقم بومی معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین جنین‌زایی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای (شکل ۳) را پیش تیمار بدون سرما و شرایط نور و محیط کشت شماره ۴ (BAP و 2,4-D به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر) و پیش‌تیمار بدون سرما و شرایط تاریکی و محیط کشت شماره ۴ (BAP و 2,4-D به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر) به خود اختصاص داد. بیشترین کالوس‌زایی نیز در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای مربوط به اثر متقابل پیش تیمار بدون سرما و تیمار تاریکی و تیمار محیط کشت شماره ۳و ۴ بود (شکل ۴) و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. قطر کالوس در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای در اثر متقابل پیش‌تیمار بدون سرما و تیمار نور و تیمار محیط کشت شماره ۴ بالاترین مقدار را نشان داد (شکل ۵).

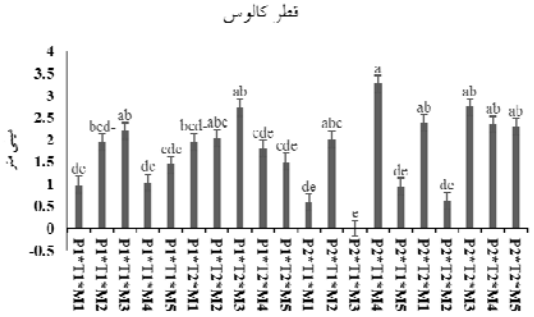
نتایج حاضر نشان داد به‌منظور حاصل شدن بیشترین جنین زایی، کالوس‌زایی و قطر کالوس در کشت بساک خیار استفاده از گل تازه بدون پیش تیمار سرمایی و محیط کشت شماره ۴ حاوی هورمون‌های توفوردی و بنزیل آمینو پورین باعث حاصل شدن بهترین نتیجه خواهد شد و شرایط نور و تاریکی نقش چندانی در جنین‌زایی ندارد. بیشترین قطر کالوس در ارقام بومی نیز در شرایط پیش تیمار بدون سرما، تیمار تاریکی و ترکیب هورمونی محیط کشت شماره ۴ (BAP و 2,4-D به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد (شکل ۶). نتایج بررسی اثر متقابل سه‌گانه در دو ژنوتیپ مورد بررسی نشان داد که هر دو ژنوتیپ تقریباً واکنش مشابهی به شرایط موجود در این آزمایش نشان داده‌اند.



شکل ۳-اثر متقابل پیش تیمار دما، تیمار نور و ترکیب محیط کشت بر روی صفت جنین زایی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای
M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر

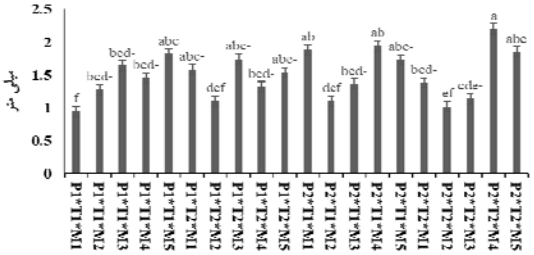


شکل ۴- اثر متقابل پیش تیمار دما، تیمار نور و ترکیب محیط کشت بر روی صفت کالوس زایی در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای
M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۵- اثر متقابل پیش تیمار دما، تیمار نور و ترکیب محیط کشت بر روی صفت قطر کالوس در لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای

M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۶-اثر متقابل پیش تیمار دمایی، تیمار تاریکی و محیط کشت بر روی صفت قطر کالوس در ارقام بومی

M_1: 2,4-D+KIN به میزان ۳/۵+۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، M_2: 2,4-D+BAP به میزان ۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_3: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۳/۵+۲/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_4: 2,4-D+BAP به میزان ۳/۵+۱ میلی‌گرم بر لیتر، M_5: 2,4-D+BAP+KIN به میزان ۱/۵+۱+۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از فاکتورهای مورد بررسی در این مطالعه پیش تیمار سرما در کشت بساک بود. انتظار می‌رود پیش تیمار سرما باعث کندی فرآیندهای تجزیه بافت‌های سوماتیک بساک و متعاقباً حفاظت میکروسپور در برابر ترکیبات سمی رهاشده از زوال بساک شود. پیش تیمار سرما همچنین می‌تواند باعث افزایش فراوانی مضاعف شدگی مجدد داخلی (endo-reduplication) می‌شود (۳۰). در تیمارهای سرمایی محتوای آمینواسید آزاد بساک افزایش پیدا می‌کند که باعث سازگارشدن میکروسپور به تغییرات متابولیکی القای جنین زایی می‌شود (۳۹).

دو مکانیسم پیشنهادی برای اثر سرما در القای آندروژنز در کشت میکروسپور وجود دارد. یکی ساخته شدن دو پروتئین از نوع پروتئین‌های حرارتی (Heat shock proteins) که برای محافظت از سلول‌ها در برابر سرما ساخته می‌شوند که با مکانیسمی سبب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی می‌شود. مکانسیم دیگر آهسته‌تر شدن مراحل رشد فیزیولوژیکی است که موجب کمبود مواد غذایی و گرسنگی می‌شود و گرسنگی موجب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی می‌گردد (۳۰). پیش تیمار سرما باعث تغییر روند رشد میکروسپور از تولید دانه گرده به سمت فرآیند آندورژنز خواهد شد (۱۰). نتایج مقایسه میانگین این مطالعه نشان داد در هر دو ژنوتیپ خیار شامل لاین اصلاحی و رقم بومی بیشترین جنین‌زایی و کالوس-زایی در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما حاصل شده است. احتمالاً باتوجه به اینکه ژنوتیپ‌های بکار رفته در این مطالعه ماهیت گرمادوست داشته‌اند (سازگار به شرایط گرم و خشک اصفهان برای رقم بومی و سازگار به شرایط گرم و مرطوب گلخانه‌ای برای لاین اصلاحی)، پاسخگویی آنها به‌پیش تیمار سرما قابل‌مشاهده نبوده است. از طرف دیگر با توجه به اینکه پیش‌تیمار سرما منجر به تغییر فاز گامتوفیتی به اسپروفیتی می‌شود، امکان وقوع این حالت در کالوس‌ها و جنین‌های ایجاد شده در این مطالعه وجود دارد که نیازمند بررسی‌های سلولی و شمارش تعداد کروموزوم-ها در ادامه روند مطالعه است. لازاریدو و همکاران (۲۰۰۵) دلیل کم‌پاسخ‌ده بودن گیاهان به کشت بساک و باززایی گیاهچه سبز را تفاوت در ژنوتیپ‌ها بیان کردند (۲۰). سوپرونووا و شمیکووا (۲۰۰۸) در بررسی امکان تولید هاپلوییدی از کشت بساک، تخمدان و میکروسپور

خیار بر روی ۱۰ ژنوتیپ مختلف، مشخص نمودند که تنها یک ژنوتیپ توانست گیاهچه هاپلویید تولید نماید و در کشت بساک، جنین‌ها از بافت سوماتیکی بساک حاصل شدند (۳۳). در مطالعه سانگ و همکاران (۲۰۰۷) در آزمایشی اعمال پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۰ تا ۴ روز، بر روی سه ژنوتیپ خیار مورد بررسی قراردادند. نتایج آن‌ها نشان داد که در دو ژنوتیپ پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز باعث افزایش تولید کالوس جنین‌زا شد، ولی یک ژنوتیپ بدون اعمال پیش‌تیمار سرما بیشترین القای کالوس و جنین را داشت (۳۲)، که در یکی از ژنوتیپ‌های مطالعه این محققان، نتایجی مشابه بامطالعه حاضر به دست آمد که نشان‌دهنده تأثیر بسیار شدید ژنوتیپ بر مؤثر بودن پیش تیمار سرما در جنین‌زایی و کالوس‌زایی است. مکانیسم‌های سلولی رخ‌داده در اثر پیش تیمار سرما توسط کومار و همکاران (۲۰۰۲) بررسی شد (۱۸). این محققین از دو ژنوتیپ خیار، غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین و اعمال پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک تا ده روز استفاده کردند. نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که در هر دو ژنوتیپ، اعمال سرما به مدت ۲ روز بیشترین القای جنین را داشت. بنابراین درمجموع بهترین تنش دمایی بستگی به نوع ژنوتیپ و منشأ آن دارد، بطوریکه در یک سری ژنوتیپ‌ها پیش تیمار سرمایی۴ روز، در ژنوتیپ‌های دیگر پیش‌تیمار سرمایی ۲ روز و در برخی ژنوتیپ‌ها حتی تیمار عدم سرما در پاسخ گیاه به کشت بافت تأثیر داشته است.به‌طور مثال ژنوتیپ‌هایی که منشأ آنها مناطق سردسیر باشد به تنش‌های سرمایی پاسخ مناسبتری می‌دهند، در مقابل ژنوتیپ‌های با منشأ مناطق گرمسیر پاسخ بهتری به تنش‌های گرما می‌دهند (۳۲). در مطالعه حاضر نیز رقم بومی اصفهان و لاین اصلاحی باتوجه به سازگاری به شرایط آب و هوایی گرم، به تنش سرما پاسخ کمتری نشان دادند.

دراین بررسی تیمار تاریکی باعث افزایش معنی‌دار کالوس-زایی و قطر کالوس لاین اصلاحی خیار گلخانه‌ای شد، اما تأثیر معنی‌داری بر روی صفات مورد بررسی در رقم بومی نداشت. زی و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی کشت بساک خیار بهترین شرایط کالوس‌زایی را در شرایط تاریکی و پیش تیمار دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت مشاهده کردند (۳۹). شدت نور، دوره نوری و کیفیت نور از مهمترین عوامل فیزیکی مؤثر در رشد و نمو، مورفوژنزیز، فتوتروپیسم، فتوسنتز و متابولیسم گیاه هستند (۲۵). باتوجه به پاسخ متفاوت دو ژنوتیپ به تیمار نوری و باتوجه به مکانیسم‌های متفاوت فعال‌شده در حضور یا عدم حضور نور از قبیل تغییر در سطح تنظیم کننده‌های رشد از قبیل اکسین و سیتوکنین و تغییر در سطح آنزیم‌هایی مانند پلی فنل اکسیداز (۳۴و ۲۵)، می‌توان نتیجه گرفت که سطح تحریک این‌گونه متابولیسم‌ها در دو ژنوتیپ متفاوت بوده و برای یافتن تفاوت آنها بایستی ارزیابی‌های بیوشیمیایی در سطح سلولی صورت پذیرد. همچنین باتوجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مشخص می‌شود که پاسخ به تیمار نوری همانند تیمار دمایی به‌شدت وابسته به ژنوتیپ است و مکانیسم‌های بسیار پیچیده در ژنوتیپ‌های مختلف می‌توانند تحت تأثیر این‌گونه تیمارها فعال یا غیرفعال شوند. محققان زیادی به تأثیر ژنوتیپ بر پاسخگویی بساک در کشت بافت گیاه اشاره کرده‌اند (۱۴، ۱۵و ۲۶). در بررسی کشت بساک خیار توسط کومار و همکاران (۲۰۰۲) نیز به پاسخ متفاوت دو رقم مورد بررسی به جنین‌زایی اشاره شده است (۱۸). در مطالعه حاضر نیز باتوجه به ماهیت متفاوت دو ژنوتیپ به کاررفته ازنظر فضای باز و گلخانه‌ای بودن و همچنین بومی و اصلاحی بودن آنها، انتظار پاسخ‌های متفاوت چندان دور از انتظار نیست. درمجموع پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌ها به کشت بافت می‌تواند به تفاوت ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های داخلی گیاه و تفاوت‌های حساسیت به تنظیم کننده‌های رشد مصنوعی مورد استفاده و شرایط محیطی گیاه مرتبط باشد (۲۱، ۲۳و ۳۶).

مکانیزم کامل بهبود اندام‌زایی در شرایط تاریکی هنوز به‌صورت کامل روشن نشده است، اما محققان اظهار داشتند که انکوباسیون بافت‌های گیاهی در تاریکی ممکن است باعث محافظت تنظیم کننده‌های رشد و دیگر ترکیبات حساس به نور شود (۴۰). تانگ و همکاران (۲۰۰۹) نیز برای القای کالوس در کشت بساک گیاه نخود از تیمار تاریکی استفاده کردند (۳۵). در مطالعه بر روی کشت بساک خیار توسط سانگ و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری بین تیمار نور و تاریکی پس از کشت وجود نداشت (۳۲). نتایج مطالعه رضا نژاد و طراحی (۱۳۹۲) در کشت ریز نمونه‌های دمبرگ، برگ، ساقه، بساک، مادگی و گلبرگ رز گالیکا تحت تیمار نوری و تنظیم کننده‌های رشد نشان داد که غلظت ۳-۲ میلی‌گرم در لیتر D-۲،۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تحریک تولید کالوس در جداکشتهای مختلف بهینه بودند. همچنین در مطالعه این محققان مشخص شد که تیمارهای نوری و تاریکی، اثر معنی‌داری برکالوس‌زایی نشان ندادند، اما نور با شدت ۲۰۰۰ لوکس تا حدودی سبب بازدارندگی کالوس‌زایی در جداکشتهای رویشی و بساک شد (۳).

تنظیم کننده‌های رشد بخصوص اکسین‌ها به‌طور گسترده‌ای به‌منظور القاء آندروژنز استفاده می‌شوند و غلظت مناسب آنها از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (۱۶). غلظت بالای اکسین می‌تواند مانع ریخت‌زایی گردد. دراین بررسی محیط کشت شماره ۴ با ترکیب BAP و 2,4-D (به میزان ۱+۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) دارای بیشترین درصد جنین‌زایی و کالوس‌زایی و بیشترین قطر کالوس بود. در مطالعه جوادیان و همکاران (۱۳۹۴) بیشترین باززایی در کشت نوساقه کتان سفید در تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. کومار و همکاران (۲۰۰۲) اثر 2,4-D را با BAP، KIN و TDZ بررسی کردند و با ترکیب 2,4-D+BAP بیشترین جنین‌زایی و کالوس‌زایی را به دست آوردند (۱۸)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در اکثر محیط‌های استفاده شده در تحقیق حاضر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP وجود داشت و این نتایج مطابق با داده‌های به دست آمده از پژوهش تانگ و همکاران (۲۰۰۹) مبنی بر وجود 2,4-D و BAP جهت القای جنین و گیاهچه در کشت بساک بود (۳۵). توفوردی نه‌تنها اثر هورمون رشدی دارد، بلکه اگر در غلظت‌های بالا استفاده شود می‌تواند به‌عنوان یک تیمار تنش‌زا در القای آندروژنز کشت میکروسپور به کار رود (۱۴). توفوردی با تغییرات در فیزیولوژی و بیان ژن سلول، می‌تواند نقش احتمالی در ایجاد تنش برای تولید رویان‌های هاپلوئید داشته باشد (۱۲).

درمجموع نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد و تأثیر تیمارهای مختلف دمایی، نوری و هورمون‌های توفوردی، بنزیل آمینوپورین و کینتین در غلظت‌های مختلف وابستگی زیادی به ژنوتیپ داشته و بایستی برای ژنوتیپ‌های مختلف بخصوص با ماهیت متفاوت، مورد آزمون قرارگیرد. از طرف دیگر مشخص شد که اثرات متقابل قابل‌توجهی بین این سه فاکتور وجود داشته و امکان تصمیم قاطع در انتخاب سطوح فاکتور مطلوب برای همه شرایط اعم از محیط و ژنوتیپ وجود ندارد. اگرچه وجود هورمون‌های توفوردی و بنزل آمینوپورین به‌صورت ترکیبی پاسخگویی بهتری را در کالوس‌زایی و جنین‌زایی نشان دادند. پاسخ متفاوت رقم بومی و لاین اصلاحی در برخی فاکتورها نیز قابل‌توجه بود که نشان‌دهنده وجود تفاوت ژنتیکی بین آنها است. جنین‌زایی در لاین اصلاحی تحت تأثیر فاکتورهای مختلف قرارگرفت اما فاکتورهای مورد بررسی تأثیر معنی‌داری بر جنین‌زایی رقم بومی نداشتند. نیاز به بررسی‌های مولکولی و سلولی جهت مطالعه تأثیر پیش تیمار دمایی و نور بر تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی در کالوس و جنین‌های بدست آمده و بررسی تفاوت متابولیسمی دو ژنوتیپ مورد بررسی در تشخیص تفاوت‌های آنها برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

منابع

۱- آرمیون، ا.، لطفی، م.، مرتضویان، س. م. م.، پویش، ع.، و کریمی فر، ح.، ۱۳۹۴. بررسی اثر رقم و تنظیم‌کننده های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و رویانزایی کشت بساک خیار (*Cucumis sativus L*) ، نهمین کنگره علوم باغبانی، ۵ تا ۸ بهمن ۱۳۹۴. اهواز، ایران.

۲- جوادیان، ن.، کریم‌زاده، ق.، شریفی، م.، و معینی، ا.، ۱۳۹۴. باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی کتان سفید (*Linum album Kotschy ex Boiss*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۴)، صفحات ۷۳۷-۷۴۵.

۳- رضا نژاد، ف.، و طراحی، ر.، ۱۳۹۲. اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوسهای حاصل از جداکشتهای مختلف در رز گالیکا (*Rosa gallica L.*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۲۶(۲)، صفحات ۱۸۴-۱۹۵.

۴- عرشی، ی.، ۱۳۷۹. اصلاح ژنتیکی سبزیهای زراعی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۷۳۵ صفحه.

۵- فرشاد فر، م.، و بخشی خانیکی، غ.، ۱۳۸۵. مبانی بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی، انتشارات دانشگاه پیام نور، تهران، ۲۴۹ صفحه.

۶- حمیدوند، ی.، عبداللهی، م.، چایچی، م.، و موسوی، ۱۳۹۲. بررسی اثر تنظیم‌کننده های رشد (اکسین و سیتوکینین) و اثرات متقابل آنها بر میزان کالوسزایی و رویانزابیگامتی از کشت بساک دو واریتهی خیار(*Cucumis sativus L.*)، هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی.

۷- نجفی، س.، عبداللهی، م. ر.، ساری خانی، ح.، و موسوی س. س.، ۱۳۹۴. اثر محیط کشت حاوی تخمدان روی کالوس زایی و رویان‌زایی گامتی درکشت بساک ارقام مختلف خیار (*Cucumis Sativus L.*) ، تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۸۳، شماره ۴، صفحات ۱۰۵-۱۱۶

8- Abdollahi, M. R., Najafi, S., Sarikhani, H., and 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 culturemedium, Turkish Journal of Biology 40 (3), PP: 571-579.

9- Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., and Djilianov, D., 1995. In vitro production of haploid plants, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, PP: 400–408.

10- Chen, Y., and Dribnenki, P., 2002. Effect of genotype and medium composition on *flax Linumusitatissimum L.*, Anther culture. Plant Cell Reports, 21, PP: 204–207.

11- Dryanovska, O. A., 1985. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of spicies from the Cucurbitaceae family. Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences, 38, PP: 1243-1244.

12- Feher, A., Pasternak, T. P., and Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74b, PP: 201–228.

13- Gałązka, J., and Niemirowicz-Szczytt, K., 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits, Folia Horticulturae 25, PP: 67-78.

14- Habibzadeh, S., Shariatpanahi, M. E., Amiri, R., Emamifar, M., Oroojloo, M., Nematzadeh, G., Sadat Noori, S. A., and Heberle-Bors, E., 2011. Effect of 2,4-D as a Novel Inducer of Embryogenesis in Microspores of *Brassica napus L.* Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47(3), PP: 114–122.

15- Jaiti, F. J., Benlhabib, O., Sharma, H. C., EI Jaafari, S., and EI Hadrami, I., 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary coculture in durum wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59, PP: 71–76.

16- Kasha, K. J., Ziauddin, A., and Cho, U. H., 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. In: Gustafson, J. P., (Ed.), Gene Manipulation in Plant Improvement, Vol, II., Plenum Press, New York, PP: 213–235.

17- Kiviharju, E., Puolimatka, M., and Saastamoinen, M., 1998. The effect of genotype on anther culture response of cultivated and wild oats. Agricultural and Food Science, 7(3), PP: 409-422.

18- Kumar, H. G. A., Murthy, H. N., and Paek, K. Y., 2003. Embryogenesis and plant regeneration

from anther cultures of *Cucumis sativus* L., Scientia Horticulturae, 98, PP: 213-222.

19- Lazarte, J. E., and Sasser, C. C., 1982. Asexual embryogenesis plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus L*., Hort Science, 17, 88 p.

20- Lazaridou, T. B., Lithourgidis, A. S., Kotzamanidis, S. T., and Roupakias, D. G., 2005. Another culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. Russian Journal of Plant Physiology, 52, PP: 696-699.

21- Luica, A., Felix, F. I., Federizzi, L. C., Lange, C. E., and Handel, L., 1997. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Brazilian Journal of Genetics, 15, PP: 473-479.

22- Maheshwari, S. C., Rashid, A., and Tyagy, A. K., 1982. Haploid from pollen grains-retrospect and prospect, American Journal of Botany, 69, PP: 865–879.

23- Mendoza, M. G., And Kaeppler, H. F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.), In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 38, PP: 39-45.

24- Metwally, E., Moustafa, S. A., El-Sawy, B. I., Harun, S. A., and Shalab, Y. T. A., 1998. A Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, PP: 117-121.

25- Mitsukuri, K., Arita, T., Johkan, M., Yamasaki, S., Mishiba, K. I., and Oda, M., 2009. Effects of type of explant and dark preconditioning on bud formation in *Habenaria radiata* (Thunb.) in vitro. Hort Science, 44(2), PP: 523-525.

26- Murigneux, A., Bentolila, S., Hardy, T., Baud, S., Guitton, C., Jullien, H., Ben Tahar, S., Freyssinet, G., and Beckert, M., 1994. Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize, Genome 37, PP: 970–976.

27- Murthy, B. N. S., Murch, S. J., and Saxena, P., 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 34, PP: 267-275.

28- Sabehat, A., Lurie, S., and Weiss, D., 1998. Expression of small heat shock proteins at low temperatures. Plant Physiology, 117(2), PP: 651-658.

29- Shalaby, T. A., 2007. Factor affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash *(Cucurbita pepo L.),* Scientia Hort culturae, 115, PP: 1-6.

30- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., and Touraev, A., 2006. stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis, Physiol Plantarum, 127, PP: 519–534

31- Simmonds, D. H., and Keller, W. A., 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis in Brassica napus. Planta, 208, PP: 383-391.

32- Song, H., Lou, Q. F., and Luo, X. D., 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber *(Cucumis sativue L.),* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90, PP: 245-254.

33- Suprunova, T., and Shmykova, N., 2008. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of Cucumis sativus .Proceedings of the ixth Eucarpia meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. Avignon, FRANCE, MAY 21-27, PP: 371-374.

34- Suzuki, R. M., Kerbauy, G. B., Pescador, R., Purgatto, E., Ceccantini, G. C., and Ferreira, W. D. M., 2010. Dark-induced hormone changes coincide with the resumption of light-inhibited shoot growth in Catasetum fimbriatum (Orchidaceae). Journal of Plant Physiology, 167(5), PP: 375-381.

35- Tang, Y., Li, H., Liu, J., Liu, B., and Lou, H., 2009. Callus formation from anther culture in baldam pear (Momordica charantia L.). Agriculture and Environmental Science, 6(3), PP: 308-312.

36- Tarinejad, A., Toorchi, M., Habashi, A., and Pellegrineschi, A., 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food Agriculture and Environment, 5(3&4), PP: 237-241.

37- Touraev, A., Pfosser, M., and Heberle-Bors, E., 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, 35, PP: 53-109.

38- Xie, J. H., Gao, M. W., Liang, Z. Q., Shu, Q. Y., Cheng, X. Y., and Xue, Q. Z., 1997. The effect of cool-pretreatment on the isolated microspore culture and the free amino acid change of

anthers in *japonica* rice (*Oryza sativa* L.), Journal of Plant Physiology, 151, PP: 79–82.

39- Xie, M., Qin, L. Y., Pan, J. S., HE, H. L., Wu, A. Z., and Cai, R., 2005. Flower morphogenesis and microspore development versus anther culture of cucumber. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. Available online. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL DNYX200506005.htm; cited on 10 Dec 2012.

40- Yalcin, M. Y., Comlekcioglu, N., Ipek, M., Kocaman, E., Izgu, T., Tekdal, D., And Curuk, P., 2010. The effect of different hormone concentrations and dark pretreatment on adventitious shoot regeneration in snake melon (Cucumis melo var. Flexousus). Romanian Biotechnological, Letters, 15, PP: 5392-5395.

41- Zhao, J. P., Newcomb, W., and Simmonds, D., 2003. Heat-Shock proteins 70 kDa and 19 kDa are not required for induction of embryogenesis of Brassica napus L. Cv. Topas microspores, Plant and Cell Physiology, 44(12), PP: 1417-1421.

Effect of Temperature Pre-Treatment and Light on Embryogenesis and Callus Induction in Anther Culture of Cucumber

Ghanbari S.[1] and Golabadi M.[1,2]

[1] Dept. of Production Engineering and Plant Genetics, Collage of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I.R. of Iran.

[2] Seed and Plant Improvement Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of hormonal compositions and concentrations, temperature and light pre-treatments in changing the biological pathways and moving toward callugenesis, embryogenesis and regeneration in cucumber anther explants. Two seperate factorial experiments were conducted in completely randomized design with three replications on open pollination Isfahan native cucumber and greenhouse inbred line. Factors consisted of tempreture (4°C cold and without cold pretreatment (fresh flower)), Light treatment (brightness and darkness) and different hormone compositions and concentrations including KIN (1 to 2.5 mg/L), BAP (0.1 to 3.5 mg/L) and 2.4-D (1 to 3.5 mg/L) at five levels. The results showed the superiority of the fresh flower in cold pre-treatment for embrygenesis and callugenesis in inbred line, and for callugenesis in native cultivar. Darkness treatment caused a significant increasing in callugenesis and callus diameter of inbred line, however did not significant effects on native cultivar. The combination of BAP and 2,4-D hormones at a rate of 3.5+1mg/L (in both genotypes) caused the highest induction of embryogenesis and callugenesis. Embryogenesis was affected by studied factors in inbred line, however these factors did not have significant effects on embryogenesis in native cucumber. Triple interaction of temperature, light and hormonal compositions in culture media showed that in order to obtain the highest embryogenesis, callus induction and callus diameter, use of fresh flowers and 2,4-D+BAP hormones (3.5+1 mg/L) are suitable in anther culture of cucumber. The conditions of lightness and darkness did not play important role in embryogenesis.

Key words: Anther, temperature pre-treatment, lightness, Hormones