بررسی اثر رقم و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی کشت بساک خیار(*Cucumis sativus* L.)

الهه آرمیون[1*]، محمود لطفی[2]، سیدمحمد مهدی مرتضویان[3]، علیرضا پویش[1]، حسین کریمی‌فر[1]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغبانی، دانشگاه تهران. ۲- دانشیار گروه باغبانی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران ۳- استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ا بوریحان، دانشگاه تهران، تهران.

*نویسنده مسئول:elahe.armiyoun@gmail.com

چکیده

در سال های اخیر کشت بساک به منظور دستیابی به تولید گیاهان هاپلوئید در بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار-گرفته است. با تولید گیاهان هاپلوئید و دابل‌هاپلوئید در مدت کوتاه‌تری نسبت به روش‌های سنتی می‌توان به لاین خالص دست پیدا کرد. در این تحقیق تأثیر ژنوتیپ و اثر تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در القای کالوس و تشکیل ساختارهای جنینی از طریق کشت بساک خیار در دو رقم تبریز و سوپر دامینوس مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت MS حاوی ساکارز سه درصد و آگار ۰/۸ درصد همراه با تیمارهای مختلف هورمونی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت. نتایج حاصل از کشت بساک و القای کالوس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو ژنوتیپ وجود دارد. رقم تبریز با تیمار هورمونی دو میکرومولار 2,4-D ، دو میکرومولار BAP و دو میکرومولار Kin بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد. همچنین تیمار هورمونی ۰/۶ میکرومولار NAA به همراه ۱۰ میکرومولار BA بیشترین میزان تولید ساختارهای جنینی بر روی کالوس‌ها و تیمار هورمونی ۰/۳ میکرومولار NAA به همراه ۱ میکرومولار BA بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان زا را ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: کشت بساک، ژنوتیپ، تنظیم کننده های رشد گیاهی، کالوس‌زایی

مقدمه

در میان سبزی‌های میوه‌ای، خیار[1] از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است که پس از هندوانه بیشترین میزان تولید را در بین گیاهان این خانواده به خود اختصاص داده است (Wehner, 2000). به منظور تأمین نیاز به سبزی‌ها، در درجه اول نیاز به تولید بذور مناسب احساس می‌شود. بدین منظور تولید بذور هیبرید در سال‌های گذشته در جهان صورت گرفته است. اولین قدم در تولید بذور هیبرید تولید لاین‌های خالص والدینی با صفات مطلوب است. با توجه به اینکه دستیابی به لاین‌های خالص از طریق روش‌های اصلاحی رایج زمان‌بر بوده و هزینه زیادی را تحمیل می‌کند از روش جایگزین تولید لاین‌های دابل‌هاپلوئید که کم‌هزینه‌تر و سریع‌تر از روش‌های معمول است استفاده می‌شود. (George et al., 2008).

در گیاهان تولید هاپلوئیدی به روش‌های مختلفی چون حذف کروموزومی، پارتنوژنز، ژینوژنز و آندروژنز (کشت بساک و میکروسپور) صورت می‌پذیرد (عنایتی‌شریعت‌پناهی و امامی‌میبدی، ۱۳۸۸). بهترین راه برای رسیدن به این مقصود که در سال‌های اخیر به صورت گسترده در اکثر نقاط جهان در مقیاس بالا و در سطح تجاری مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد استفاده از تکنیک‌های حذف کروموزومی و آندروژنز می‌باشد (Lantos et al., 2009; Kasha et al., 1974). آندروژنز سریع‌ترین و مؤثرترین روش جهت تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئیدهای مضاعف به منظور تولید رقم جدید و بذور هیبرید محسوب می‌شود (کهریزی و همکاران، ۱۳۷۹; عنایتی‌شریعت‌پناهی و امامی‌میبدی، ۱۳۸۸; Shariatpanahi et al.,2006).

1- Cucumber (*Cucumis sativus*)

Kumar و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از پیش تیمار هورمونی و پیش تیمار سرمایی موفق به تولید کالوس از بساک خیار و گیاه هاپلوئید شدند. سپس song و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از ترکیب تیمار هورمونی BA و 2,4-D موفق به کالوس‌زایی و تولید گیاه هاپلوئید از کشت بساک خیار شدند، هرچند که در این تحقیق بعضی از رقم‌ها هیچ گیاه هاپلوئیدی تولید نکردند. هدف از این آزمایش بررسی پیش تیمارهای هورمونی جهت افزایش راندمان کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جمع آوری داده‌ها

الف) ریزنمونه: گیاهان مادری شامل دو رقم تبریز و دامینوس در گلخانه دانشگاه ابوریحان در بستری از کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱ پرورش یافتند. حدود ۴۰ روز بعد از کشت بذور، غنچه های گل نر در ساعات اولیه صبح برداشت شدند. بدین منظور غنچه‌هایی در اندازه ۱۲-۸ میلی‌متری در مرحله میکروسپورهای تک هسته‌ای میانی تا اوایل دو هسته‌ای شدن (شکل ۱) برداشت و استفاده گردید. پس از انتقال مواد گیاهی به آزمایشگاه، نمونه‌ها در انکوباتور در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت دو روز قرار داده شدند. ضدعفونی گلچه‌ها به روش معمول انجام شد (Kumar et al 2002). پس از ضدعفونی کردن، نمونه‌ها در زیر هود لامینار با آب مقطر استریل شده، سه بار به مدت پنج دقیقه شستشو داده شدند. سپس غنچه‌های گل نر در زیر هود لامینار شکافته شده و بساک‌ها به آرامی بر روی محیط کشت حاوی تیمارهای هورمونی مختلف در پتریدیش قرار داده شد. از محیط کشت MS، حاوی سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار جهت کشت بساک استفاده شد.

ب) تنظیم کننده های رشد گیاهی: هورمون‌های مورد استفاده برای القاء کالوس شامل 2,4-D در یک سطح (دو میکرومولار) در ترکیب با BAP در سه سطح (یک، دو و چهار میکرومولار) و همچنین Kin در سه سطح (صفر، دو و چهار میکرومولار) در نظر گرفته شد. حدود ۶-۵ هفته بعد از کشت، کالوس های تشکیل شده به محیط القای رویان‌زایی منتقل شدند (شکل ۱). محیط القای جنین شامل BA در سه سطح (یک، پنج و ۱۰ میکرومولار) و NAA در دو سطح (۰/۳ و ۰/۶ میکرومولار) در نظر گرفته شد. ۶-۵ هفته پس از کشت کالوس‌های القاء شده، جنین‌ها بر روی کالوس‌های رویان‌زا تشکیل شدند.

تجزیه و تحلیل آماری و ژنتیکی

صفات مورد ارزیابی در این تحقیق شامل اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر میزان کالوس‌زایی و اندازه کالوس در دو رقم خیار تبریز و سوپر دامینوس، میانگین کالوس‌های رویان‌زا و میانگین تعداد جنین به ازای هر کالوس رویان‌زا می‌باشد. تجزیه واریانس، تجزیه میانگین و تحلیل‌ها بر اساس طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

شکل ۱- مراحل مختلف رویان‌زایی. الف) میکروسپور تک هسته‌ای تا اوایل دو هسته‌ای شدن.
ب) بساک‌های کشت شده روی محیط القای کالوس. ج) جنین‌های القا شده روی کالوس. ج) جنین در مرحله قلبی

نتایج و بحث

بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر کالوس‌زایی: نتایج به دست آمده از تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و ژنوتیپ (به عنوان مهم-ترین عوامل مؤثر در کالوس‌زایی) در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس اثر رقم و تیمار هورمونی بر صفات مختلف مورد مطالعه در کشت بساک خیار مشاهده شد که اثر رقم برای صفات کالوس‌زایی، اندازه کالوس و میانگین کالوس های رویان زا به ترتیب در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ تفاوت معنی‌داری دارد. همچنین اثر تیمار هورمونی برای صفات صفات کالوس‌زایی، اندازه کالوس و تعداد جنین به ازای هر کالوس رویان‌زا تفاوت معنی‌داری دارند. همچنین اثر متقابل رقم و تیمار هورمونی در سطح ۰/۰۱ برای صفت کالوس‌زایی معنی‌دار شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر رقم و تیمار هورمونی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

منابع تغییر	درجه آزادی				میانگین مربعات			
	کالوس‌زایی	اندازه کالوس	کالوس رویان زا	تعداد جنین به ازای هر کالوس رویان زا	کالوس‌زایی	اندازه کالوس	کالوس رویان زا	تعداد جنین به ازای هر کالوس رویان زا
رقم	۱			۱	۰/۰۳۹*	۱/۵۵*	۰/۰۹۳**	۰/۰۱۵^{ns}
تیمار هورمونی	۸			۵	۰/۰۳۴**	۰/۸۴*	۰/۰۱۲^{ns}	۰/۰۱۵*
رقم× تیمار هورمونی	۸			۵	۰/۰۲۷**	۰/۶۵^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}
خطای آزمایشی	۵۴			۳۶	۰/۰۰۷	۰/۳۹	۰/۰۰۷	۰/۰۷
ضریب تغییرات (C.V)					۱۰/۳۳	۳۴/۷۸	۹/۴	۹/۰۵

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح آماری ۰/۰۱، ۰/۰۵ و غیر معنی‌داری می باشد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و تیمار هورمونی برای صفت کالوس‌زایی در ذیل آورده شده است (جدول ۲). بر این اساس بیشترین میزان کالوس‌زایی رقم تبریز در تیمار هورمونی هفت و هشت مشاهده شد. در رقم سوپر دامینوس بیشترین میزان کالوس-زایی مربوط به تیمار هورمونی پنج بود.

نتایج این قسمت بیانگر ترکیب مناسب یک اکسین قوی (2,4-D) با دو سیتوکینین (Kin, BAP) و اثر مثبت آن‌ها بر افزایش تحریک کالوس‌زایی و اندازه کالوس‌های ایجاد شده است، زیرا که هورمون‌ها در مقادیر مختلف نقش متفاوتی در رشد و نمو گیاه دارند. 2,4-D باعث تسریع در تکثیر سلولی و القاء کالوس می‌شود در حالی که اسید نفتالین استیک (NAA) در کشت بساک باعث کمک درالقاء رویان‌زایی مستقیم می‌شود (Ball et al, 1993).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و تیمار هورمونی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

رقم	تیمار هورمونی (µM)	شماره تیمار	کالوس‌زایی
تبریز	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP	۱	۰/۸۱۸ bc
	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP+ 2 (µM)Kin	۲	۰/۷۳۴ c
	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۳	۰/۷۵c c
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP	۴	۰/۷۴۶ c
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP+ 2 (µM)Kin	۵	۰/۸۱۸ bc
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۶	۰/۸۲۷ bc
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP	۷	۱/۰۴۱ a
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP+ 2(µM)Kin	۸	۱/۰۲۴a
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۹	۰/۹۶۷ ab
سوپر دامینوس	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP	۱	۰/۷۵۴ b
	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP+ 2 (µM)Kin	۲	۰/۷۷ b
	2 (µM) 2,4-D + 1 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۳	۰/۷۷۷ b
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP	۴	۰/۸۱۷ ab
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP+ 2 (µM)Kin	۵	۰/۹۱ a
	2 (µM) 2,4-D + 2 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۶	۰/۸۱۵ ab
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP	۷	۰/۷۹۴b
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP+ 2(µM)Kin	۸	۰/۸۰۹ ab
	2 (µM) 2,4-D + 4 (µM) BAP+ 4(µM)Kin	۹	۰/۸۶۲ab

در هر ستون حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح ۰/۰۱ براساس آزمون دانکن می باشد.

منابع

۱. عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸. میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. مجله ژنتیک نوین. ۴(۳): ۵-۱۶.

2. Ball . S.T.H Zhou , and C.F.konzak . 1993 . Influence of 2,4-D , IAA ,and duration of callus induction in another cultures of spring wheat .plant sci 90,195-200

3. George, E.F. Hall, M.A. Klerk, G.J.D. 2008. "Plant Propagation by Tissue Culture". Third Edition. Dordrecht, the Netherlands, Springer, 504p

4. Kasha, K. J. (1974). Haploids in higher plants: advances and potential. University of Guelph.

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

6. Lantos, C. Gemes Juhasz, A. Somogyi, G. Otvos, K. Vagi, P. Mihaly, R. 2009. "Improvement of isolated microspore culture of pepper (Capsicum annuum L.) Via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat". Plant Cell Tissue Organ Culture, 97:285-293

7. Lazarte, J. E., & Sasser, C. C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of Cucumis sativus L.[Cucumber, regeneration, tissue culture]. HortScience

8. 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.

9. 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

10. Wehner T.C and R.W Rabinson. 2000. A brief history of the development of cucumber in US., Cucurbet Gent. Rep. 14, 1.

Effects of genotype and plant growth regulators on callus and embryogenesis induction in anther culture of cucumbers (*Cucumis sativus* L.)

E. Armiyoun[1]*, M. Lotfi[2], S. M. M. Mortazavian[3], A. Pouyesh[1], H. Karimifar[1]

1- M.Sc. student of horticultural plant breeing, Aburaihan Campus, University of Tehran, Tehran 2- Associate professor department of horticulture, Aburaihan Campus, University of Tehran, Tehran 3- Assistant professor, department of agronomy and plant breeding sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Tehran.

*Corresponding author: elahe.armiyoun@gmail.com

Abstract

Nowadays, anther culture is widely used in many plant speciesfor generation of haploid plants . Using haploid and doubled haploid plants, we are able to achieve homozygous lines in a shorter time than traditional methods. In this study, The effect of genotype and plant growth regulator were investigated on induction of embryonic callus and embryogenesis by anther culture in cucumber cultivars(Tabriz and Super Daminus). MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.8% agar were evaluated with different hormonal treatments. The experiments were conducted based on factorial experiments in a completely randomized design with four replications. The results of anther culture and induction of callus showed significant differences between genotypes. The highest callus induction was observed in Tabriz cultivar in medium supplemented with 2 µM 2,4-D,2 µM BAP and 2 µM Kin. Compared to other hormonal treatments, medium supplemented with 0.6 µM NAA and 10 µM BA resulted in highest embryo induction. The highest number of embryo per embryogenic callus was observed in the medium supplemented with 0.3 µM NAA and 1 µM BA.

Keywords: anther culture, genotype, plant growth regulators, callus