Plant Production and Genetics
Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 173-188

تولید و ژنتیک گیاهی
جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۱۸۸-۱۷۳

DOI: 10.34785/J020.2022.006

مقاله پژوهشی

اثر پیش‌تیمار دمایی، نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القاء کالوس در کشت بساک کدوی پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. Styriaca)

ژاله محسنی عراقی[۱]، محمدرضا عبداللهی*[۲]، اصغر میرزایی اصل[۳]، سید سعید موسوی[۲]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر القاء کالوس و تولید رویان هاپلوئید در کشت بساک گیاه دارویی کدوی پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) انجام شد. برای انجام آزمایشات، بذور کدوی پوست‌کاغذی در گلخانه کشت و در زمان گلدهی، غنچه‌های نر با اندازه ۱/۵ سانتی‌متر انتخاب و برای استفاده در مراحل بعدی استریل شدند. آزمایشات به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردیدند. آزمایش اول اثر پیش تیمار سرمایی در سه سطح پیش تیمار سرمایی غنچه، پیش تیمار سرمایی بساک و بدون پیش تیمار سرمایی (شاهد) و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفت میزان کالوس‌زایی در کشت بساک مورد مطالعه قرار گرفت . پیش تیمار سرمایی غنچه‌ها و کشت بساک‌ها در محیط کشت حاوی NAA ۱mgl^{-1} و 2,4-D ۲ mgl^{-1} بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرد. در آزمایش دوم، اثر پیش تیمار حرارتی بر صفت درصد کالوس‌زایی بررسی شد. در این آزمایش بهترین جواب مربوط به تیمار ۳۲°C به مدت ۷ روز بود. آزمایش سوم شامل اثر تیمار نوری و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفت کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی پوست‌کاغذی بود، بساک‌هایی که در شرایط نور با غلظت هورمونی BAP ۱ mgl^{-1} + 2,4-D ۲/۵ mgl^{-1} کشت شد، بالاترین درصد کالوس‌زایی را نشان داد. در آزمایش چهارم آندروژنز از طریق کشت میکروسپور در محیط کشت E20 اعمال گردید که منجر به رشد تعدادی از میکروسپورها شد و در بررسی‌های سیتولوژیکی تقسیمات قرینه مشاهده شد.

کلیدواژگان: تیمار حرارتی، کالوس‌زایی، کشت بساک، میکروسپور

* ایمیل نویسنده مسئول: m.abdollahi@basu.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع دارویی می‌باشند که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003). با توجه به قدمت گیاهان دارویی تاکنون در مورد اصلاح آن‌ها پیشرفت قابل‌ملاحظه‌ای صورت نگرفته و طی سال‌های گذشته مواد اولیه‌ی گیاهی موردنیاز صنایع دارویی از طبیعت برداشت شده است. به همین دلیل کشت و اهلی کردن گیاهان دارویی به‌منظور ارتقاء صفات کمی و کیفی، فرآورده‌های گیاهی و ایجاد ژنوتیپ‌هایی با صفات مطلوب از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. styriaca) جزء گیاهان مهم دارویی محسوب می‌شود که به علت داشتن خواص دارویی باارزش موردتوجه می‌باشد (Jahan *et al.*, 2010). ولی مشابه با سایر گیاهان دارویی، تحقیقات اصلاح نژادی بسیار کمی بر روی این گیاه صورت گرفته است. تولید لاین‌های خالص اغلب به‌عنوان اولین مرحله در بهبود ژنتیکی سبزی و صیفی‌جات قابل‌توجه می‌باشند. لاین‌های خالص با سه هدف تولید هیبریدهای برتر، تولید واریته‌های سنتتیک و تولید واریته‌های جدید می‌توانند استفاده گردند. تولید لاین‌های خالص(گیاهان هاپلوئید مضاعف) در گیاهان زراعی مختلف به‌خصوص گیاهان دارای گرده‌افشانی آزاد از قبیل کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) نیازمند زمان و تسهیلات مناسب می‌باشد. این لاین‌ها می‌توانند در مدت‌زمان کوتاهی (چند ماه الی یک سال) با استفاده از کشت درون شیشه‌ای بساک یا تخمک به دست بیایند (Metwally *et al.*, 1998). درحالی‌که مدت‌زمان لازم برای تولید لاین‌های هموزیگوت از طریق روش‌های سنتی اصلاح نباتات، حدود ۸-۶ سال می‌باشد (Farsi and Zol Ali, 2008). رویان‌زایی در گرده (آندروژنز) به‌طور رایج از طریق کشت بساک یا کشت میکروسپورهای ایزوله القاء می‌گردد (Germana, 2011). کشت بساک به دلیل سادگی، به‌عنوان یک روش انتخابی در تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف در بسیاری از گیاهان زراعی استفاده شده است. در این روش امکان کشت بساک در مقیاس زیاد برای دامنه وسیعی از ژنوتیپ‌ها امکان‌پذیر می‌باشد (Sopory and Munshi, 1996). عوامل متعددی از قبیل فاکتورهای درون‌زاد و برون‌زاد پاسخ به رویان‌زایی گامتی را در بساک‌های کشت‌شده تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wang *et al.*, 2000; Datta, 2005). ژنوتیپ، وضعیت فیزیولوژیکی و شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله رشد و نموی دانه گرده پیش تیمار غنچه‌ها یا بساک‌های کشت‌شده، محیط کشت درون شیشه‌ای و تنظیم‌کننده‌های رشد به‌طور جداگانه یا در ترکیب باهم از عواملی هستند که بر پاسخ بساک‌ها به کشت درون شیشه‌ای تأثیر قابل‌توجه‌ای می‌گذارند (Germana, 2011). در بسیاری از گونه‌های گیاهی مشاهده شده است که اعمال پیش‌تیمارهای فیزیکی یا شیمیایی روی غنچه‌های گل نر جداشده از گیاه، کل خوشه گل‌دهنده یا روی بساک‌های کشت‌شده به‌عنوان یک کلید القاء کننده رشد و نمو اسپروفیتیکی و همچنین بازدارنده مسیر گامتوفیتیکی (تولید دانه گرده بالغ) عمل می‌کند. پیش‌تیمارهای مختلفی از قبیل سرمادهی، دمای بالا، رطوبت بالا، تنش خشکی، شرایط بی‌هوازی، سانتریفیوژ، تنش گرسنگی ساکاروز و نیتروژن، اتانول، پرتوتابی با اشعه گاما، مواد تخریب‌کننده میکروتوبول‌های سلولی، شوک الکتریکی درگونه‌های گیاهی مختلف به‌منظور القاء نرزایی استفاده شده‌اند (Shariatpanahi *et al.*, 2006). شوک‌های دمایی (پیش‌تیمارهای سرمایی و گرمایی) به‌عنوان مؤثرترین پیش‌تیمارها در القاء رویان‌زایی گامتی شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. میزان بهینه‌شده پیش‌تیمار دمایی و مدت‌زمان اعمال آن در ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به گونه‌های گیاهی متفاوت می‌باشد (Germana, 2011).

پیش‌تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ هفته به‌طور رایج در کشت بساک بسیاری از گیاهان زراعی استفاده شده است و اثرات آن به نوع ژنوتیپ گیاه مادری بستگی دارد (Osolnik *et al.*, 1993). پیش‌تیمار سرمایی باعث افزایش فراوانی همانندسازی داخلی[1] شده که منجر به افزایش هاپلوئید مضاعف خود به‌خودی در گیاهان می‌گردد (Amssa *et al.*, 1980). پیش‌تیمار گرمایی معمولاً روی بساک‌های کشت شده و در محدوده دمایی ۳۷- ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چند ساعت تا چند روز اعمال می‌شود. جوانه‌های گل یا گیاهان کامل در بعضی گونه‌ها هنگامی‌که تحت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و یا ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار

[1] endoreduplication

می‌گیرند، رویان‌زایی در آن‌ها القاء می‌شود. به نظر می‌رسد که تیمار حرارتی، میکروتوبول‌ها را تجزیه نموده و رشته‌های دوک را از جای خود تغییر می‌دهد. این فرآیندها به تقسیم غیرعادی هسته میکروسپور و رشد و نمو اسپوروفیتیکی منجر می‌شود (Pierik, 1987).

نور یکی از عوامل مؤثر بر القای آندروژنز می‌باشد. برای کشت گیاه تاتوره (*Datura innoxia*) (Sangwan-Norreel 1977)، توتون (*Nicotiana tabacum*) (Sunderland and Roberts, 1977) و قشطه صدفی (*Annona squamosa*) (Nair *et al.*, 1983) تیمار اولیه تاریکی و سپس کاربرد نور پراکنده برای القاء آندروژنز، مناسب گزارش گردیده است. کشت‌های میکروسپور ایزوله نسبت به کشت‌های بساک به نور حساس‌تر می‌باشند (Nitsch, 1977). در گونه‌های گیاهی خردل چینی (*Brassica juncea*) (Sharma and Bhojwani, 1989) و جو (*vulgare Hordeum*) (Xu, 1990) استفاده از نور در کشت‌های بساک، مضر گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که کالوس‌دهی میکروسپورها در کشت بساک گیاه چریش (*Azadirachta indica*) به تاریکی ممتد نیاز دارد (Chaturvedi *et al.*, 2003).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از عوامل دیگری می‌باشد که کارایی آندروژنز را در گونه‌های مختلف گیاهی تحت تأثیر قرار می‌دهند. تنظیم‌کننده‌های رشد از عوامل درونی در رشد گیاهان می‌باشد که با تأثیر بر فعالیت‌های طبیعی گیاه، رشد و نمو آن‌ها را کنترل می‌کند (Maheshwari *et al.*, 1982). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از قبیل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها یا ترکیبی از آن‌ها برای القاء آندروژنز، ضروری گزارش شده است (Maheshwari *et al.*, 1982). در پژوهشی، اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و هورمون 2,4-D بر تولید گیاهان هاپلوئید کدوی تخم کاغذی از طریق کشت پرچم بررسی شد؛ در این تحقیق، بیشترین گیاه هاپلوئید از کشت پرچم حاوی میکروسپورهای مرحله تک‌هسته‌ای میانی تا انتهایی در محیط‌های کشت حاوی ۱۵۰ mgl^{-1} ساکارز و ۵ mgl^{-1} هورمون 2,4-D به دست آمد (Metwally *et al.*, 1998). نتایج Song و همکاران (2007) نشان داد که پیش‌تیمار گرمایی و محیط کشت القاء رویان، بر درصد کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار اثر معنی‌داری داشت. در سال‌های اخیر، Abdollahi و همکاران (2015) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (اکسین و سیتوکنین)، پیش‌تیمارهای سرمایی و گرمایی و کشت توأم تخمدان گندم را روی کارایی آندروژنز در کشت بساک هندوانه مورد بررسی قرار دادند و موفق به تولید کالوس و رویان گامتی و همچنین باززایی گیاهان هاپلوئید گردیدند. در تحقیق حاضر، اثر عوامل مختلف شامل پیش‌تیمارهای سرمایی و گرمایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نور بر کارایی آندروژنز از کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در بخش دوم این تحقیق اثر پیش‌تیمارهای گرمایی روی القاء آندروژنز از طریق کشت میکروسپور بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد گیاهان مادری

بذور کدوی تخم پوست‌کاغذی از مؤسسه‌ی پاکان بذر اصفهان تهیه شد. این واریته بومی اتریش بوده و در سال‌های اخیر کشت آن در ایران رایج شده است. جهت انجام آزمایشات، بذور در شاسی‌های پلاستیکی با بستر کوکوپیت و پرلیت در گلخانه کشت گردید و در مرحله ۴ برگی محلول نیترات نقره با غلظت ppm ۵۰۰ روی مریستم انتهایی جهت نرزایی گیاه اسپری (Den Nijs and Visser, 1980) و سپس به گلدان‌های بزرگ منتقل شد. گلدان‌ها در شرایط فتوپریود ۱۶/۸ ساعت (شب/روز) و دمای ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس غنچه‌ها با اندازه‌های مختلف چیده و جهت آزمایشات و بررسی آزمون سیتولوژیکی تعیین مرحله رشد و نموی دانه گرده به آزمایشگاه منتقل شدند.

محیط کشت القاء کالوس و رویان

محیط کشت القاء کالوس در هر یک از آزمایشات به‌صورت جداگانه و بسته به نوع آزمایش تهیه شد. در هر یک از محیط‌های کشت بسته به نوع تیمار اعمال‌شده از هورمون‌های مناسب استفاده گردید. جهت القاء کالوس و رویان در آزمایشات از محیط کشت پایه B5 و E20 با سطوح مختلف ترکیب‌های هورمونی 2,4-D+NAA، یا 2,4-D+BAP جهت القاء کالوس و ترکیب هورمونی Kinetin +NAA یا NAA + BAP جهت القای رویان استفاده شد.

آزمون سیتولوژیکی جهت شمارش تعداد کروموزوم‌های کالوس‌ها و رویان‌های القاءشده

برای انجام این کار، ابتدا بذور کدوی دیپلوئید را به‌طور جداگانه در ظرفی خیسانده تا ریشه‌زایی کنند، هنگامی‌که ریشه‌ها به اندازه cm ۲-۱ رسیدند، به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر از آن‌ها را بریده و در ظرف جدا قرار داده شد. در ظرفی دیگر، تعدادی از کالوس‌ها و رویان‌های القاءشده را انتخاب و هر دو نمونه به‌طور جداگانه به مدت ۳ ساعت در محلول کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول کارنوی نگه‌داری و در پایان، با استوکارمن یک درصد رنگ‌آمیزی شدند (Darlington and Lacour, 1976). پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها روی لام آزمایشگاهی له شده و بعد از قرار دادن لامل روی آن‌ها، زیر میکروسکوپ، تعداد کروموزوم‌ها در کالوس‌ها و ریشه‌چه‌ها مورد شمارش قرار گرفتند.

آزمایش اول: اثر پیش‌تیمار سرمایی و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

جهت انجام این آزمایش، غنچه‌هایی با اندازه‌ی مناسب برداشت شد، سپس محیط کشت پایه B_5 حاوی gl^{-1} ۹۰ ساکارز، gl^{-1} ۸ آگار و ۹ تیمار هورمونی شامل (2,4-D در ۳ سطح (mgl^{-1} ۰- ۱- ۲) و NAA در ۳ سطح (mgl^{-1} ۰- ۰/۵- ۱)) با pH= ۵/۷ تهیه گردید و در ۳ گروه جهت اعمال پیش‌تیمار سرمایی جداسازی شدند. گروه اول، غنچه‌ها ابتدا به مدت ۴ روز در پیش‌تیمار سرمایی ۴°C قرار گرفت. غنچه‌های سرمادیده ضدعفونی شد و بساک‌های آن‌ها روی محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مختلف هورمونی کشت شد. در گروه دوم غنچه‌ها ابتدا ضدعفونی و سپس بساک‌ها روی محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مختلف هورمونی کشت و در پیش‌تیمار سرمایی ۴°C به مدت ۴ روز قرار داده شد. گروه سوم، غنچه‌ها، استریل و بدون اعمال پیش‌تیمار سرمایی (به‌عنوان شاهد)، بساک‌ها روی محیط‌های کشت قرار گرفته و به اتاق رشد انتقال داده شدند. حدود ۴ هفته بعد، روی بساک‌ها کالوس القاء گردید. سپس کالوس‌های القاءشده در محیط کشت باززایی B_5 با ترکیب هورمونی mgl^{-1} Kinetin ۲mgl^{-1} + NAA ۰/۲ قرار داده شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۹×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. پیش‌تیمار سرمایی به‌عنوان فاکتور اول در ۳ سطح (پیش‌تیمار سرمایی غنچه‌ها، پیش‌تیمار سرمایی بساک‌ها و بدون پیش‌تیمار سرمایی) و سطوح مختلف هورمونی به‌عنوان فاکتور دوم (در ۹ سطح) در نظر گرفته شد.

آزمایش دوم: اثر تیمار گرمایی بر درصد کالوس‌زایی

ابتدا بساک‌ها روی محیط کشت پایه B_5 با ترکیب هورمونی 2,4-D (mgl^{-1} ۲) و NAA (mgl^{-1} ۱)(بهترین تیمار هورمونی در آزمایشات قبلی) و حاوی gl^{-1} ۹۰ ساکارز و gl^{-1} ۸ آگار با pH=۵/۷ قرار داده شد و به مدت ۴ روز در دمای ۴°C نگهداری گردید. سپس در ۳ انکوباتور مجزا با درجه‌حرارت‌های مختلف (۳۰°C- ۳۲°C- ۳۵°C) به مدت ۷ روز نگهداری شد و پس از آن به اتاق کشت منتقل شد. یک تیمار هم بدون اعمال پیش‌تیمار گرمایی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. سه پیش‌تیمار حرارتی (۳۰°C- ۳۲°C- ۳۵°C) به همراه شاهد، تیمارهای این آزمایش را تشکیل دادند.

آزمایش سوم: اثر متقابل تیمار نوری و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

در این آزمایش از محیط کشت پایه B_5 حاوی gl^{-1}۹۰ ساکارز، gl^{-1} ۸ آگار با pH ۵/۷ استفاده شد. ابتدا غنچه‌ها به مدت ۴ روز در پیش‌تیمار سرمایی ۴°C قرار گرفت. سپس بساک‌ها در محیط‌های کشت حاوی ۹ تیمار هورمونی مختلف کشت شده و به مدت ۷ روز در انکوباتور ۳۲ °C قرار گرفت و سپس به اتاق کشت منتقل شد؛ با این تفاوت که گروه اول در تاریکی (در فویل) و گروه دوم در روشنایی نگهداری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳*۲*۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمار نوری به‌عنوان فاکتور اول در ۲ سطح (تاریکی و روشنایی)، غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D در سه سطح (۰، ۲/۵ و ۵) به‌عنوان فاکتور دوم و غلظت‌های مختلف BAP در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱) به‌عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شد.

آزمایش چهارم: مطالعه کشت میکروسپور

مطالعه کشت میکروسپور در کدوی تخم پوست‌کاغذی در این آزمایش انجام شد. ابتدا حدود ۵۰ غنچه با اندازه مناسب از بوته‌های کدو جدا و با فلاسک حاوی یخ، به آزمایشگاه

منتقل شد. غنچه‌ها ضدعفونی و به‌سرعت بساک‌های آن‌ها جدا و در ظرف حاوی محیط جداسازی میکروسپور با دمای ۴°C له شد. پس از آسیاب کامل، مقدار بیشتری محلول جداسازی به محیط اضافه و سپس با الک ۲۵۰ µm صاف شد. سوسپانسیون حاصل در ۲ فالکون ۵۰ cc با حجم مساوی تقسیم و در سانتریفیوژ با دور ۱۲۷۰ rpm به مدت ۲ دقیقه، قرار داده شد. پس از هر بار سانتریفیوژ، مایع رویی جدا و میکروسپورهای جمع‌شده در ته ظرف با مقداری محلول ایزولاسیون تازه مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ شد. این عمل ۳ مرتبه تکرار گردید. ۲ ml محیط کشت E_{20} به میکروسپورها اضافه و با لام هماسیتومتر غلظت میکروسپورها روی ۴۰۰۰۰ میکروسپور در هر ml محیط کشت تنظیم گردید. برای رسیدن به این غلظت حدود ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت E_{20} به میکروسپورها اضافه شد و محیط کشت حاوی میکروسپورها به مقدار ۱۵ سی‌سی در داخل هر پتری‌دیش توزیع گردید. پس از کشت، پتری-دیش‌ها در دماهای ۳۰°C به مدت ۷ و ۱۴ روز یا در دمای ۳۲°C به مدت ۷ روز قرار داده شدند. در این آزمایش از هورمون 2,4-D با غلظت ۲/۵ mgl^{-1} و هورمون BAP با غلظت ۰/۵ mgl^{-1} و پیش‌تیمارهای گرمایی در ۳ سطح به شرح جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای گرمایی و مدت‌زمان‌های مورداستفاده در کشت میکروسپور

تیمار	مدت‌زمان (روز)	دما	
		۳۰°C	۳۲°C
۱	۷	-	-
۲	۷	-	+
۳	۱۴	+	-

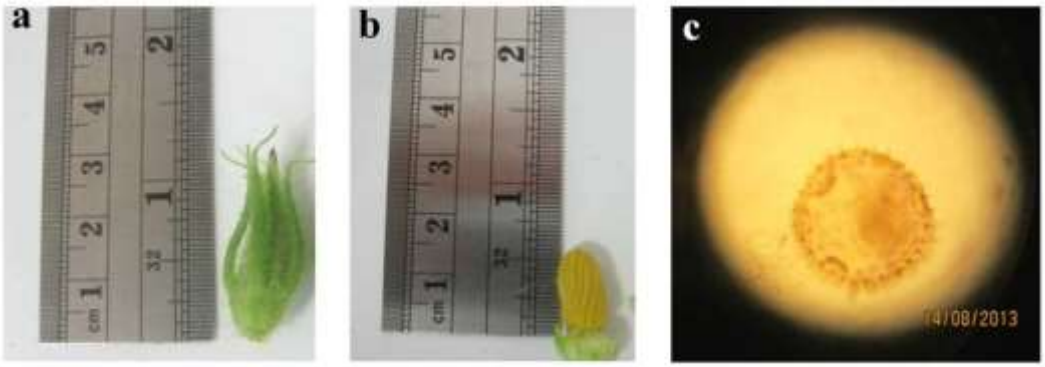
تجزیه آماری

آزمایشات به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab و SPSS انجام شد. درصد بساک‌های دارای کالوس به ازای ۱۰ بساک کشت‌شده در هر پتری ارزیابی شد. آزمون نرمال‌بودن روی باقیمانده داده‌ها انجام گرفت. جهت نرمال‌کردن داده‌های درصدی از تبدیل جذر داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

آزمون سیتولوژیکی تعیین مرحله رشد و نمو دانه گرده (میکروسپور)

در آزمایش دیگری که پیش‌تر توسط گروه تحقیقاتی مقاله حاضر انجام شد، در آزمون سیتولوژیکی مشخص گردید که غنچه‌هایی با اندازه ۴-۳ cm دارای بساک‌هایی به اندازه ۱۰-۹mm می‌باشند و این بساک‌ها حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک‌هسته‌ای میانی تا انتهایی هستند (Mohseni Araghi *et al.*, 2017). این مرحله مناسب‌ترین مرحله میکروسپور جهت کشت و القای کالوس در اکثر گیاهان می‌باشد (شکل ۱).

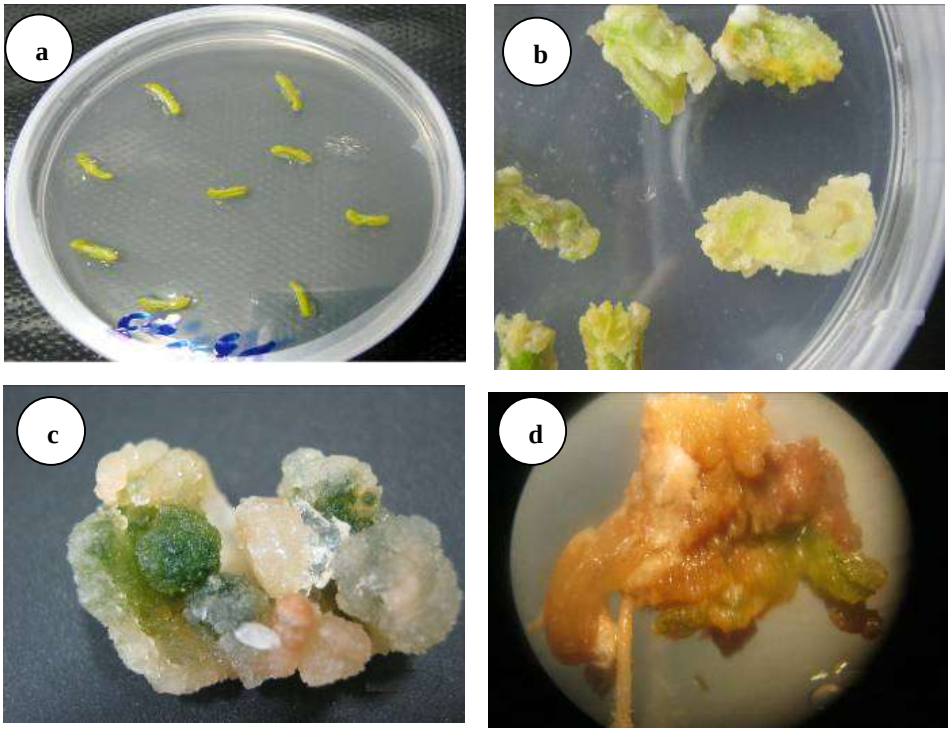


شکل ۱- آزمون سیتولوژیکی جهت تعیین اندازه مناسب غنچه نر و بساک و همچنین مرحله رشد و نموی مناسب میکروسپور جهت کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

a- اندازه مناسب غنچه‌ها جهت جداسازی بساک، b- بساک‌های حاوی میکروسپور در مرحله مناسب برای القاء آندروژنز، c- یک میکروسپور کدوی تخم پوست‌کاغذی در مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی مناسب برای کشت بساک (بزرگ‌نمایی ۱۰۰برابر)

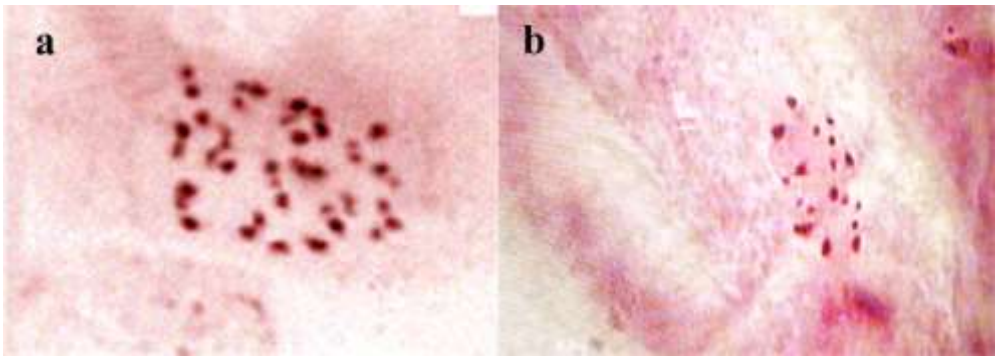
القای کالوس و رویان حاصل از کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی و آنالیز سطح پلوئیدی آن‌ها با شمارش کروموزومی

یک هفته پس از کشت (شکل 2a)، بساک‌های کشت‌شده به‌تدریج متورم شدند. اولین کالوس‌ها پس از ۱۵ روز مشاهده شد. کالوس‌های ۴ هفته‌ای (شکل 2b) جهت القای رویان به محیط جدید رویان‌زایی منتقل شد. تعدادی از تیمارها ساختار رویان مانندی را روی کالوس‌های خود نشان دادند ولی در اکثر تیمارها، کالوس‌ها به سمت ساقه‌زایی (شکل 2c) و ریشه‌زایی (شکل2d) رشد و نمو کردند. حدود ۸ هفته پس از کشت، کالوس‌های رویان‌زا و کالوس‌های دارای اندام ریشه و ساقه‌مانند، به محیط کشت باززایی انتقال داده شد. در نهایت آزمون سیتولوژیکی جهت شمارش کروموزوم‌ها به روش محققین قبلی (Darlington and Lacour ۱۹۷۶)، بر روی ساختارهای اندام‌مانند انجام گردید. تعداد کروموزم‌ها در کدوی تخم پوست‌کاغذی دیپلوئید ۴۰ عدد بود (2n = 2x = 40)، در حالی که در اکثر کالوس‌ها، رویان‌ها یا اندام‌های به وجود آمده از کشت بساک، هاپلوئید بوده و تعداد کروموزوم‌های آن‌ها ۲۰ عدد بود (شکل ۳).



شکل ۲- کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

a- بساک‌های تازه کشت‌شده، b- بساک‌های تورم‌یافته یک هفته پس از کشت، c- کالوس‌های القاءشده در بساک‌های کشت‌شده (۴ هفته پس از کشت)، d- ساختارهای ریشه مانند بر روی کالوس (۸ هفته پس از کشت)



شکل ۳- تعیین تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های نوک ریشه و همچنین رویان‌ها و کالوس‌های حاصل از کشت بساک در کدوی تخم پوست‌کاغذی

a- سلول‌های نوک ریشه با ماهیت دیپلوئید (2n=40)، b- سلول‌های مربوط به کالوس‌ها و رویان‌های حاصل از کشت بساک (n=20)

آزمایش اول

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها، اثر پیش‌تیمار سرمایی و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ بود (جدول ۲). از طرفی، اثرات متقابل پیش‌تیمارهای سرمایی با ترکیبات هورمونی برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل پیش‌تیمار سرمایی در غلظت ترکیبات هورمونی برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی NAA ۱ mgl^{-1} و 2,4-D ۲ mgl^{-1} در هر دو حالت پیش‌تیمار سرمایی غنچه‌ها و پیش‌تیمار سرمایی بساک‌ها به ترتیب با ۹۶/۶۷٪ و ۸۶/۶۷٪ کالوس-زایی، بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرده است (جدول ۳). همچنین پیش‌تیمارهای سرمایی غنچه و بساک در محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی (NAA۱ mgl^{-1}+ 2,4-D ۱mgl^{-1}) به ترتیب با ۸۳/۳۳ ٪ و ۸۰/۰۰ ٪ کالوس-زایی بدون اختلاف معنی‌دار آماری با دو تیمار اول بیشترین درصد کالوس‌زایی را نشان داد و کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت‌های بدون هورمون در هرکدام از پیش تیمارهای سرمایی بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع پیش‌تیمار سرمایی و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
پیش‌تیمار سرمایی	۲	۴۰/۶۵***
تیمار هورمونی	۸	۴۹/۶۱***
پیش‌تیمار سرمایی × تیمار هورمونی	۱۶	۱/۷۸*
خطای آزمایشی	۵۴	۰/۸۴۲
ضریب تغییرات		۱۶/۱۸٪

* و*** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع پیش‌تیمار سرمایی و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد کالوس زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

2,4-D (mgl^{-1})	NAA (mgl^{-1})	تیمار هورمونی	بدون پیش‌تیمار سرمایی	پیش‌تیمار سرمایی غنچه‌ها	پیش‌تیمار سرمایی بساک‌ها
	۰	T1	۳/۳۳^{j}	۳/۳۳^{j}	۳/۳۳^{j}
۰	۰/۵	T2	۱۶/۶۷^{gh}	۲۶/۶۷^{defg}	۲۰/۰۰ ^{fgh}
	۱	T3	۲۳/۳۳^{efgh}	۳۶/۶۷^{def}	۳۰/۰۰^{defg}
	۰	T4	۶/۶۷^{ij}	۴۰/۰۰^{de}	۲۶/۶۷ ^{defg}
۱	۰/۵	T5	۲۶/۶۷^{defg}	۶۳/۳۳^{bc}	۳۶/۶۷^{def}
	۱	T6	۳۶/۶۷^{def}	۸۰/۰۰^{ab}	۷۳/۳۳ ^{ab}
۲	۰	T7	۱۰/۰۰^{hi}	۴۰/۰۰^{def}	۲۳/۳۳ ^{efgh}
	۰/۵	T8	۳۳/۳۳^{defg}	۸۳/۳۳^{ab}	۸۰/۰۰ ^{ab}
	۱	T9	۴۶/۶۷^{cd}	۹۶/۶۷^{a}	۸۶/۶۷ ^{ab}

*اعداد ستون‌ها و ردیف‌ها با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشند.

اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه به‌طور گسترده در کشت بساک مورد بررسی قرار گرفته است. اگرچه تعداد کمی از گونه‌های مدل (به‌عنوان مثال، اکثر اعضای خانواده Solanaceae) نیازی به افزودن اکسین به محیط القایی ندارند و القاء در محیط‌های ساده رخ می‌دهد، وجود تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها یا ترکیبی از آن‌ها) برای تولید جنین مشتق‌شده از میکروسپور در اکثر گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گونه‌های سخت پاسخ‌ده، مناسب می‌باشد (Maheshwari *et al.*, 1982). به نظر می‌رسد نوع و غلظت اکسین‌ها مسیر توسعه میکروسپور را تعیین می‌کند (Ball *et al.*, 1993). دی‌کلرو فنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D) باعث ایجاد کالوس می‌گردد و ایندول استیک‌اسید (IAA) و همچنین آلفا نفتالین استیک‌اسید (NAA) جنین‌زایی مستقیم را تحریک می‌کنند (Armstrong *et al.*, 1987; Liang *et al.*, 1987). پیش‌تیمار سرمایی، به‌طور موفقیت‌آمیزی در گیاهان مختلف استفاده شده است (Indrianto *et al.*, 1999). پژوهشگران، اثر پیش‌تیمار سرمایی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک خیار را بررسی کردند، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد استفاده از پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز، بیشترین میزان درصد کالوس‌زایی و بیشترین تعداد رویان را به ازای هر بساک ایجاد کرد (Hamidvand *et al.*, 2012). سایر محققان، اثر پیش‌تیمار سرمایی ۴C° روی بساک‌های سه واریته خیار را در مدت‌زمان‌های یک روز، دو روز و چهار روز مطالعه کردند که بیشترین میزان رویان‌زایی در پیش‌تیمار سرمایی ۴C° به مدت ۲ روز، برای تمامی واریته‌ها مشاهده شد (Song *et al.*, 2007). همچنین در بررسی اثر پیش‌تیمار سرمایی ۴C° بر غنچه‌های گل ماده در کدو، تیمار ۴C° به مدت ۴ روز، بیشترین درصد کالوس و رویان را القاء کرد (Metwally *et al.*, 1998). در بررسی انجام‌شده توسط محققین دیگر (Rakha *et al.*, 2012) روی ۶ گونه کدو، مشخص شد ترکیب پیش‌تیمار سرمایی (۴°C به مدت ۴ روز) و استفاده از هورمون 2,4-D در محیط کشت، بر ژینوژنز و آندروژنز همه گونه‌ها به‌شدت معنی‌دار است. همچنین محققین (Kiani *et al.*, 2013) نشان دادند اثر پیش‌تیمار سرمایی بر تولید کالوس حاصل از کشت بساک گل‌محمدی مؤثر بوده و بیشترین تولید کالوس در شرایطی به دست آمد که بساک‌ها ابتدا در محیط کشت پایه (H_1)، کشت شد و سپس پیش‌تیمار روی آن‌ها اعمال شد. با مروری بر نتایج آزمایشات سایر محققان، تاکنون اثر پیش‌تیمار سرمایی و تنظیم‌کننده بر درصد کالوس‌زایی معنی‌دار بوده است که با نتایج حاصل از این آزمایش هم‌خوانی دارد.

آزمایش دوم

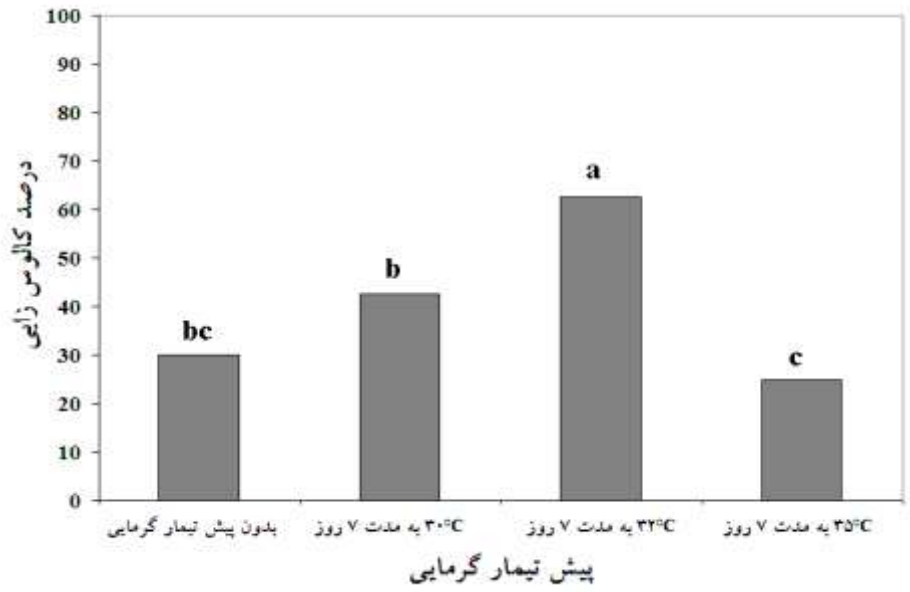
نتایج تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار گرمایی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی نشان داد که بین پیش‌تیمارهای گرمایی بساک برای صفت درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال ۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

همان‌طور که در نمودار مقایسه میانگین (شکل ۴) ملاحظه می‌شود، پیش‌تیمار گرمایی ۳۲°C به مدت ۷ روز، با ۶۵٪ کالوس‌زایی بیشترین، و پیش‌تیمار گرمایی ۳۵°C به مدت ۷ روز، با ۱۵٪ کالوس‌زایی کمترین درصد کالوس‌زایی در کشت بساک را نشان دادند. ملاحظه می‌شود دما تا ۳۲°C باعث افزایش کالوس‌زایی شده است اما بالا رفتن بیشتر دما (تا ۳۵°C)، اثر کاهشی بر میزان درصد کالوس‌زایی داشته است.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار گرمایی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار گرمایی	۳	۱۱۱۶/۶۷***
خطای آزمایشی	۱۲	۱۰۴/۱۷
ضریب تغییرات		٪۲۵/۵۱

***: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار گرمایی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی
(حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد)

در خیار نیز اعمال تیمار ۳۲°C، بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا را به دنبال داشته است (Song *et al.*, 2007). محققین دیگر نیز مطالعه‌ای مبنی بر اثر پیش‌تیمار گرمایی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک دو واریته خیار انجام دادند؛ در پژوهش آن‌ها، بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار گرمایی ۳۰°C به مدت ۲ روز و کمترین درصد (صفر درصد) کالوس‌زایی مربوط به تیمار گرمایی ۳۵°C به مدت ۴ روز بود (Hamidvand *et al.*, 2012). سایر محققان، اثر پیش‌تیمار گرمایی را بر کشت بساک خیار بررسی و مشاهده کردند که پیش‌تیمار گرمایی و محیط کشت القاء رویان، فاکتورهای کلیدی برای موفقیت در کشت بساک خیار به‌شمار می‌آیند (Song *et al.*, 2007). نتایج آزمایشات محققان دیگر نیز نشان می‌دهد که پیش‌تیمار حرارتی یک فاکتور مهم در آندروژنز در گونه‌های گیاهی مختلف می‌باشد که با نتایج آزمایش حاضر هم‌خوانی دارد.

آزمایش سوم

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار نوری و همچنین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی در جدول ۵ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار تاریکی و روشنایی (فتوپریود ۸/۱۶ روشنایی/تاریکی) برای صفت درصد کالوس‌زایی وجود ندارد. غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل آمینو پورین تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین اثر متقابل تیمار نوری با هورمون BAP در سطح ۰/۰۱ مشاهده شد ولی اثر متقابل تیمار نوری با هورمون 2,4-D اختلاف معنی‌داری نشان نداد. اثرات متقابل BAP و 2,4-D اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۰/۰۰۱ نشان دادند. همچنین اثرات متقابل سه‌گانه تیمار نوری با BAP با 2,4-D اختلافی معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ برای صفت درصد کالوس‌زایی از بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی نشان دادند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمار نوری و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار نوری	۱	۱/۴۲^{ns}
2,4-D	۲	۷۴/۰۲***
BAP	۲	۱/۷۳*
تیمار نوری × 2,4-D	۲	۰/۷۲^{ns}
تیمار نوری × BAP	۲	۵/۱۴**
BAP × 2,4-D	۴	۲۰/۲۰***
تیمار نوری × BAP × 2,4-D	۴	۱/۹۶*
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۶۰
ضریب تغییرات		۱۲/۰۷

*، ** ،*** وns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ ، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و غیر معنی‌دار

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه تیمار نوری×2,4-D×BAP برای صفت درصد کالوس‌زایی در جدول ۶ نشان داده شده است. کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در تیمار نوری حاوی ترکیب هورمونی mgl^{-1} BAP ۰ و mgl^{-1} 2,4-D ۵ در هر دو حالت روشنایی و تاریکی به ترتیب با ۸۶/۶ ٪ و ۷۶/۶ ٪ کالوس‌زایی، بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کردند. همچنین کشت بساک‌ها تحت تیمار تاریکی در محیط‌های کشت حاوی ترکیب هورمونی (2,4-D ۵ mgl^{-1} + BAP ۰ mgl^{-1}) و تیمار روشنایی با ترکیب هورمونی (2,4-D ۲/۵ mgl^{-1} + BAP ۰ mgl^{-1}) و (2,4-D ۲/۵ mgl^{-1} + BAP ۰/۵ mgl^{-1}) به ترتیب با ۷۶/۶، ۷۳/۳ و ۶۳/۳ درصد کالوس‌زایی بدون اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار اول بیشترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند. کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به بساک‌های کشت‌شده در تیمار تاریکی و روشنایی در محیط کشت بدون ترکیب هورمونی، به ترتیب با صفر و ۶/۶ درصد بودند. همان‌طور که از نتایج پیداست، بالارفتن غلظت هورمون در تاریکی باعث کاهش بیشتر کالوس‌زایی، در مقایسه با روشنایی شده است. همچنین درصد کالوس‌زایی در بالاترین سطوح دو هورمون استفاده‌شده در تیمار روشنایی بیشتر از تیمار تاریکی بوده است.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمار نوری و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

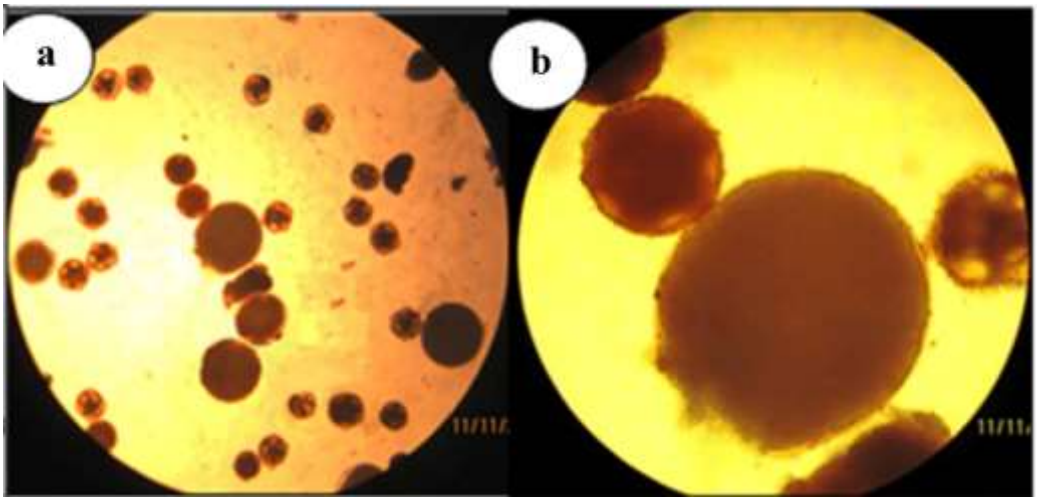
هورمون 2-4-D (mgl^{-1})	هورمون BAP (mgl^{-1})	تیمار نوری تاریکی (۴ هفته)	نور
	۰	۰ g	۶/۶ i
۰	۰/۵	۴۳/۳۳ def	۱۶/۶ h
	۱	۲۶/۶ gh	۳۳/۳efg
	۰	۵۳/۳۳bcd	۷۳/۳ abc
۲/۵	۰/۵	۵۶/۶۷ bcd	۶۳/۳ a-d
	۱	۵۳/۳۳ bcd	۵۶/۶ bcd
	۰	۷۶/۶۷ab	۸۶/۶a*
۵	۰/۵	۵۶/۶۷ bcd	۵۰/۰ cde
	۱	۳۰/۰۰ef	۵۶/۶ def

* حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

پژوهشگران، اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس‌های حاصل از جدا کشت‌های مختلف در رز گالیکا را بررسی کرده و نتیجه گرفتند غلظت ۳-۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D +۱ میلی‌گرم BAP برای تحریک تولید کالوس در کشت‌های مختلف (رویشی و بساک) مناسب است (Reza Nejad and Tarahi, 2011). محققان دیگر نیز اثر شدت‌های مختلف نوری را بر میزان رنگیزه کالوس‌ها در جداکشت‌های گلی (بساک و مادگی) و رویشی (برگ، دمبرگ و ساقه) گل محمدی و گل سرخ مینیاتوری بررسی کرده‌اند (Abdi Rad *et al.*, 2012). نتایج تحقیقات نشان داده است بهترین نتایج مربوط به اثر نور و تیمار سرمایی، زمانی حاصل می‌شود که غنچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض تیمار سرمایی $4^{o}C$ بوده و سپس بساک‌های کشت‌شده، در حضور تاریکی و ترکیب هورمونی 2,4-D ۰/۵ mgl^{-1} و BAP ۲ mgl^{-1} قرار گیرند (Tang *et al.*, 2012). در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین و سیتوکینین) و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی از کشت بساک دو واریته‌ی خیار (*Cucumis sativus* L.)، کاربرد اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها نسبت به تیمار شاهد (بدون هورمون) تأثیر معنی‌داری نشان داد؛ همچنین، در مورد صفت درصد کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی از بساک‌های کشت‌شده نیز همین نتیجه ملاحظه شد (Hamidvand *et al.*, 2012). در آزمایش حاضر نیز تأثیر نور بر کالوس‌زایی و اثر متقابل آن با تیمار هورمونی معنی‌دار شد و نتایج آزمایشات صورت‌گرفته توسط محققین قبلی را تأیید می‌کند.

آزمایش چهارم

کشت میکروسپورهای ایزوله‌شده‌ی کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط کشت مایع E_{20} نشان داد تیمارهای حرارتی اعمال‌شده منجر به رشد بعضی از میکروسپورها و تقسیمات قرینه اولیه بعد از گذشت مدت‌زمان ۴ هفته در تعدادی از آن‌ها گردید. به‌منظور تشخیص میکروسپورهای رشدکرده در محیط کشت، از رنگ‌آمیزی محلول استوکارمن استفاده شد (شکل ۵).



شکل ۵- میکروسپورهای کشت‌شده کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط کشت مایع
a- میکروسپورهای متورم شده، b- یک میکروسپور تورم‌یافته چهار هفته پس از کشت (بزرگ‌نمایی100X)

بر اساس نتایج بررسی محققان در تولید گیاه هاپلوئید از طریق بساک و میکروسپور در ۱۰ ژنوتیپ خیار، کشت بساک و میکروسپور از لحاظ القای کالوس و جنین باهم متفاوت‌اند (Supronova and Shamykova, 2008). همچنین عوامل محیطی و ژنوتیپ بر درصد القای کالوس و جنین‌زایی مؤثر می‌باشد (Gatazka and Niemirowicz-Szczytt, 2013). با این وجود، تاکنون مطالعات اندکی در زمینه‌ی کشت میکروسپور کدوئیان انجام شده است و امید است در آینده، در این راستا تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی mgl^{-1} ۱ NAA و mgl^{-1} ۲ 2,4-D بعد از اعمال پیش‌تیمار سرمایی غنچه‌ها منجر به بالاترین میزان تشکیل کالوس گردید. همچنین اعمال پیش‌تیمار گرمایی ۳۲°C به مدت ۷ روز روی بساک‌های کشت‌شده منجر به بالاترین میزان کالوس‌زایی گردید. کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در تیمار حاوی ترکیب هورمونی mgl^{-1} BAP ۰ و mgl^{-1} ۵ 2,4-D و قراردادن آن‌ها تحت شرایط روشنایی بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرد.

آزمایش کشت میکروسپورهای ایزوله‌شده‌ی کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط کشت مایع E_{20} منجر به تولید رویان نگردید ولی تیمارهای حرارتی استفاده‌شده باعث رشد بعضی از میکروسپورها و ایجاد تقسیمات قرینه اولیه در برخی از آن‌ها گردید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه بوعلی‌سینا همدان به‌جهت حمایت‌های مالی از این پژوهش و همچنین ارائه خدمات پژوهشی قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdi Rad, S., Rezanejad, F. and Manouchehri Kalantari, K. 2012. Effect of different light intensities on callus formation and callus pigmentation in flower and vegetative isolates of *Rosa damascena* Miller and *Rosa miniature*. Agricultural Biotechnology, 3: 43-65.

Abdollahi, M.R., Darbandi, M., Hamidvand, Y. and Majdi, M. 2015. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Brazilian Journal of Botany, 38: 447-456.

Amssa, M., De Buyser, J. and Henry, Y. 1980. Origin of diploid plants obtained by in vitro culture of anthers of young wheat (*Triticum aestivum* L.). Cr Acad Sci D Nat, 290: 1095-1097.

Armstrong, T.A., Metz, S.G. and Mascia, P.N. 1987. Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. Plant Science, 51: 231-237.

Ball, S.T., Zhou, H.P. and Konzak, C.F. 1993. Influence of 2, 4-D, IAA and duration of callus induction in anther culture of spring wheat. Plant Science, 90: 195-200.

Darlington, C.D. and Lacour, L.E. 1976. The handling of chromosomes. 6th ed. Allen and Unwin, London.

Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: factors controlling develop-ment and its application in crop improvement. Current Science, 89: 1870-1878.

Den Nijs, A.P.M. and Visser, D.L. 1980. Induction of male flowering in gynoecious cucumbers (*Cucumis sativus* L.) by silver ions. Euphytica, 29: 273-280.

Farsi, M. and Zol Ali, J. 2008. Principles of Plant Biotechnology, Mashhad, Third Edition, University Press Ferdowsi. (In Persian).

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

Germana, M.A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 283-300.

Hamidvand, Y., Abdollahi, M.R., Mazaheri, H. and Chaichi, M. 2012. The effect of growth regulators on embryogenesis from cucumber (*Cucumis sativus* L.) anther culture. 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran.

Hu, T. and Kasha, K.J. 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) Through ovary co-culture. Plant Cell Reports, 16: 520-525.

Indrianto, A. Heberle-Bors, E. and Touraev, A. 1999. Assement of various stresses and carbohydrates for their effects on the indiction of embryogenesis in isolated microspores. Plant Science, 143: 71-79.

Jahan, M., Nassiri Mahallati, M., Salari, M.D. and Ghorbani, R. 2010. The effects of time of manure application and different biological fertilizers on quantitative and qualitative characteristics of *Cucurbita pepo* L., Journal of Iranian Field Crop Research, 8(4): 726-737. (In Persian).

Kiani, D., Moeini, A. and Jafarkhani, M. 2013. Effect of temperature and chemical pretreatments on callus formation in anther culture of *Rosa damascena* Mill and *Rosa hybrid*. Seed and Plant, 2: 143-147.

Liang, G.H., Xu, A. and Tang, H. 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture. Crop Science, 27: 336-339.

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

Metwally, E.I., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I. and Shalaby, T.A. 1998. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 171-176.

Mohseni Araghi, Z., Abdollahi, M.R., Mirzaie Asl, A. Hamzei, J. and Mousavi, SS. 2017. The Study on the Effect of Anther Orientation, Type and Composition of Culture Medium and Ovary Co-culture on Callus Induction from Cultured Anthers of Pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). Agricultural Biotechnology, 16: 19-32. (In persian).

Nair, S., Gupta, P.K. and Mascarenhhas, A.S. 1983. Haploid plants from in vitro anther culture of *Annona squamosa* L. Plant Cell Reports, 2: 198–200.

Osolnik, B., Bohanec, B. and Jelaska, S. 1993. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) anthers by low temperature and anther dissection. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 32: 241-246.

Pierik, R.L.M. 1987. The production of haploids. in: ln vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff ublishers, Dordrecht, The Netherlands, 344p.

Rakha, M.T., Metwally, E.I., Moustafa, S.A., Etman, A.A. and Dewir, Y.H. 2012. Evaluation of regenerated strains from six Cucurbita interspecific hybrids obtained through anther and ovule in vitro cultures. Australian Journal of Crop Science, 6: 23–30.

Reza Nejad, F. and Tarahi, R. 2011. Effect of light and plant growth regulators on callus formation and anthocyanin accumulation in calluses obtained from different isolated cultures in *Rosa gallica* L. Plant Research (Iranian Biology), 2: 184-195.

Sunderland, N. and Roberts, M., 1977. New approach to pollen culture. Nature, 270: 236–238.

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: 843–852.

Shalaby, T.A. 2007. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Sci Hortic-Amsterdam, 115:1-6.

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. Physiologia Plantarum, 127: 519-534.

Song, H., Lou, Q.F., Luo, X.D., Wolukau, J.N., Diao, W.P. and Qian, C.T. 2007. Regeneration of dobled haploid plant by androgenesis of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90: 245-354.

Sopory, S.K. and Munshi, M. 1996. Anther culture:145-176. In: Jain, S.M., Sopory, S.K.and Veilleux, R. (Eds.). In vitro Haploid Production in HigherPlants (Volume 1), Kluwer Academic Publishers, 356p.

Supronova, T. and Shamykova, N. 2008. In vitro induction of haploid plant in unpollinated ovules, anther and microspore culture of Cucurbitaceae. Pitrat, M. (Ed.). Proc. 1Xth Eucarpia meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. 21-24 May, Avignon, France.

Yi, T., Xiaomei, L., Juan, L., Chao, M., Jia, L. and Huanxiu, L. 2012. Effect of different pretreatment on callus formation from anther in balsam pear (*Momordica charantia* L.). Medicinal Plants Research, 6(17): 3393-3395.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.

Wang, M., van Bergen, S. and Van Duijn, B. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. Plant Physiology, 124: 523-530.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 173-188 **جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۱۸۸-۱۷۳**

Research Article DOI: 10.34785/J020.2022.006

The effect of temperature pre-treatment, light and plant growth regulators on callus induction in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) anther culture

Jaleh Mohseni Araghi[1], Mohammad Reza Abdollahi*[2], Asghar Mirzaie-Asl[3], Sayyed Saeed Moosavi[2]

1. MSc. graduate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3. Associate Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 15-05-2022

Accepted: 04-07-2022

Abstract

This study was performed to investigate the effect of various factors on callus induction and haploid embryo production in the anther culture of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). For experiments, pumpkin seeds were planted in the greenhouse and at the time of flowering, male flower buds with a size of 1.5 cm were selected and sterilized for use in later stages. The experiments were performed as a factorial experiment in a completely randomized design with 3 replications. The first experiment studied the effect of cold pretreatment on three levels of bud cold pretreatment, anther cold pretreatment and without cold pretreatment (control) and the combination of plant growth regulators on callus formation in anther culture. Cold pretreatment of buds and culture of anthers in culture medium containing 1 mgl^{-1} NAA and 2 mgl^{-1} 2,4-D produced the highest callus formation percentage. In the second experiment, the effect of heat pretreatment on the percentage of callus formation was investigated. In this experiment, the best response was related to 32°C treatment for 7 days. The third experiment consisted of the interaction effectt of light treatments and growth regulators on callus formation in anther culture of Pumpkin. Anthers that cultured in light conditions with a hormonal concentration of 2.5 mgl^{-1} 2,4-D + 1 mg /l BAP showing the highest percentage of callus formation. In the fourth experiment, androgenesis was applied by culturing microspores in E20 medium, which led to the growth of a number of microspores, and in the cytological examination, the symmetric divisions were observed.

Keywords: Heat treatment, callus formation, anther culture, microspores

*Corresponding Author Email: m.abdollahi@basu.ac.ir