تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف‌شده خیار از طریق کشت تخمک

ابوذر اسدی[۱]، علیرضا زبرجدی[۲]* و محمدرضا عبدالهی[۳]

۱- دکتری اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲-***نویسنده مسئول**: دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (Zebarjadiali@yahoo.com)

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۰/۰۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۰/۰۰

چکیده

تولید لاین‌های خالص یکی از مهم‌ترین ابزارها جهت تولید بذر پر عملکرد می‌باشد. با توجه به پیشرفت‌های اخیر روش‌های آزمایشگاهی می‌توان لاین‌های خالص را در زمان کوتاهی تولید کرد. در مطالعه حاضر، به منظور تولید لاین‌های خالص از طریق کشت تخمک آزمایش فاکتوریلی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه و آزمایشگاه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه در طی سال‌های ۹۶-۱۳۹٤ اجرا شد. فاکتورها شامل سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بیت‌آلفا بودند. تخمک‌ها یک روز قبل از گرده‌افشانی برداشت شدند و بر روی محیط MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف TDZ (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰٤، ۰/۰۵، ۰/۰٦، ۰/۰۷ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. پیش تیمار گرمایی ۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز روی کشت‌ها اعمال شد. تعداد جنین‌های که به‌طور مستقیم القاء شدند شمارش شد. طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشخص شد که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ در محیط القاء جنین نیز افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میانگین تعداد جنین در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش به دست آمد. بر این اساس بیشترین میانگین تعداد جنین برای ژنوتیپ اصفهانی ۲۳/۳۳ و برای ژنوتیپ بیت‌آلفا ۲۰/٦٦ در محیط ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد و کمترین میانگین تعداد جنین نیز در محیط ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر برای هر دو ژنوتیپ مورد بررسی به دست آمد. سطوح پلوئیدی بافت‌های تولید شده با فلوسایتومتری مشخص شد و بافت‌های هاپلوئید به محیط باززایی منتقل شدند. درنهایت گیاهان باززایی شده دابلد هاپلوئید شدند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان لاین خالص در برنامه‌های اصلاحی بکار گرفت.

کلید واژه‌ها: جنین، TDZ، کشت اندام جنسی ماده، هاپلوئید

مقدمه

خیار یکی از مهم‌ترین صیفی‌جات تحت کشت در ایران است که سطح زیرکشت قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. طبق آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد (فائو) (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Organization, 2015)، ایران با ۶۶۱۴۶ هکتار سطح زیرکشت بعد از چین، کامرون و روسیه چهارمین سطح زیرکشت دنیا را برای این محصول از آن خود کرده است. بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ایران (Jihad, 2016) خیار گلخانه‌ای با مساحت ۲۸۳۲ هکتار و با میانگین تولید ۲۲۱ تن در هکتار، بالاترین سطح زیرکشت را در بین تولیدات گلخانه‌ای ایران به خود اختصاص داده است. فائو در آخرین گزارش خود (Organization, 2015) ایران را با

تولید بیش از ۱/۵ میلیون تن خیار بعد از کشورهای چین و ترکیه سومین تولیدکننده عمده خیار در دنیا معرفی کرده است. بر اساس گزارش فائو سطح زیرکشت و نیز میزان تولید خیار در ایران از سال ۱۹۶۱ تا سال ۲۰۱۳ روندی افزایشی داشته است. با این حال تمامی بذرهای مورد استفاده به جز ارقام محلی، وارداتی می‌باشند که باعث خروج ارز از کشور می‌شود. این در حالی است که پتانسیل تولید بذر در داخل کشور وجود دارد و تولید پایه‌های هاپلوئید مضاعف‌شده اولین و مهم‌ترین گام جهت تولید بذر می‌باشد.

خیار گیاهی دیپلوئید (2n=2x=14) و دگرگشن بوده و گل‌های آن با توجه به نوع ژنوتیپ از تک جنسه، دو جنسه، تک پایه و دو پایه متفاوتند، با این حال جنسیت خیار تحت تأثیر هورمون‌های مثل GA3 نیز قرار می‌گیرد. جنس Cucumis حدود ۳۰ گونه دارد که خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. مهم‌ترین گونه آن‌ها می‌باشد (Hasandokht, 2006).

یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌های بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات در سال‌های اخیر، توسعه تکنیک‌های درون شیشه‌ای به منظور تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد که می‌تواند برای تولید لاین‌های خالص مورد استفاده قرار بگیرد (Shalaby, 2007). لاین‌های خالص می‌توانند فواید ارزشمندی از جمله استفاده به عنوان واریته جدید در گیاهان خودگشن و استفاده به منظور تولید هیبریدهای پر عملکرد در گیاهان دگرگشن داشته باشند (Veilleux, 1994). تولید لاین‌های خالص در گیاهان مختلف مخصوصاً گیاهان با گرده‌افشانی باز مثل خیار نیازمند زمان و امکانات کافی می‌باشد. با پیشرفت‌های اخیر در کشت درون شیشه‌ای، می‌توان لاین‌های خالص را در زمان کوتاه‌تری نسبت به روش‌های سنتی تولید کرد (Bajaj, 1990).

به‌طورکلی روش‌هایی که برای القاء هاپلوئید درکدوئیان وجود دارند عبارتند از پارتنوژنز (Parthenogenesis) (در درجه اول گرده‌افشانی با دانه گرده پرتو تابیده‌شده)، ماده‌زایی درون شیشه‌ای (*In Vitro* Gynogenesis) شامل (کشت درون شیشه‌ای تخمدان (Ovaries) و تخمک‌ها (Ovules)) و نززایی درون شیشه‌ای (*In Vitro* Androgenesis) شامل (کشت درون شیشه‌ای میکروسپورها (Microspores) و بساک‌ها (Anthers)) (Gałązka and Niemirowicz-Szczytt, 2013؛ Najafi *et al.*, 2015). چندین مطالعه به منظور تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف‌شده از طریق کشت تخمدان و تخمک در خیار انجام شده است (Gemes-Juhasz *et al.*, 2002؛ Diao *et al.*, 2009؛ Plapung *et al.*, 2014؛ Moqbeli *et al.*, 2013؛ Suprunova *et al.*, 2008).

یکی از عوامل محدودکننده تولید گیاهان هاپلوئید در خیار فقدان یک روش برای تولید در مقیاس وسیع می‌باشد. فاکتورهای زیادی بر موفقیت در کشت بساک، میکروسپور و یا تخمک در اکثر گیاهان از جمله کدوئیان مؤثر می‌باشند. از جمله این عوامل می‌توان به ژنوتیپ گیاه، شرایط رشدی گیاه بخشنده، مرحله رشد و توسعه میکروسپور، پیش تیمار جوانه گل و شرایط محیطی کشت اشاره کرد (Bajaj, 1990). ترکیبات محیط کشت عامل کلیدی مؤثر در القاء جنین یا کالوس و متعاقب آن باززایی گیاه می‌باشد (Maheshwari *et al.*, 1982).

Gemes-Juhasz *et al.* (2002) تأثیر مرحله مناسب گامتوفیت ماده و پیش تیمار گرمایی را بر القای درون شیشه‌ای تخمک پنج لاین پارتنوکارپ خیار مورد مطالعه قرار دادند. محیط مورد استفاده (Cucumber Basal Medium) CBM تکمیل‌شده با TDZ ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۴ درصد ساکاروز بود. بعد از کشت پتری‌دیش‌ها به مدت ۵-۱ روز در دماهای ۲۴، ۲۸ یا ۳۵ سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند. جنین‌های القاءشده به محیط باززایی CBM تکمیل‌شده با NAA ۰/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، BA ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۳ درصد ساکاروز منتقل شدند. نتیجه این مطالعه نشان داد که گرما باعث افزایش القای جنین و باززایی در کشت تخمک شده است و بیشترین تعداد جنین در دمای ۳۵ سانتی‌گراد برای ۴-۲ روز به دست آمد.

Diao *et al.* (2009) شش هیبرید F_1 خیار را با کاربرد تیمارهای مختلف جهت کشت تخمک مورد مطالعه قرار دادند. تیمارهای مورد بررسی عبارت بودند

از: تیمار گرمایی (۳۵ سانتی‌گراد به مدت ۴-۲ روز)، تیمار هورمونی TDZ (۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر) و نیترات نقره (صفر و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر). نتایج این مطالعه نشان داد که شوک گرمایی ۳۵ سانتی‌گراد به مدت ۳ روز و غلظت TDZ ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین فراونی تشکیل جنین را داشتند در صورتی که نیترات نقره تأثیر معنی‌داری بر فراوانی تشکیل جنین نداشت اما دوره ظهور جنین را کوتاه‌تر کرد و نیز تعداد جنین در هر قاچ از تخمدان را بیشتر کرد.

Moqbeli *et al.* (2013) تولید دورن شیشه‌ای گیاه هاپلوئید خیار را با استفاده از کشت تخمک در شش هیبرید F_1 خیار تحت تیمارهای TDZ (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر) و پیش تیمار ۱±۳۵ سانتی‌گراد (برای صفر، ۲، ۳ و ۴ روز) مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین موفقیت در جنین‌زایی در غلظت TDZ ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد و بهترین پیش تیمار گرمایی نیز ۳۵ سانتی‌گراد برای ۳ روز گزارش شد.

Plapung *et al.* (2014) به منظور شناسایی لاین‌های مقاوم به ویروس موزائیک خیار قطعات تخمدان را به مدت یک ماه در محیط CBM حاوی ۵ ppm نیترات نقره کشت دادند. سپس جنین‌ها را به محیط MS تکمیل‌شده با 6-(Gamma, Gamma-Dimethylallylamino))KIN/BAP, 2ip:IAA Purine (2ip)) به مدت دو ماه منتقل کردند. جنین‌های سبز رنگ به محیط MS تکمیل‌شده با BA/2ip: IAA منتقل شدند. ترکیب BAP:IAA ۲:۱ به عنوان بهترین ترکیب در القای جنین‌زایی در اکثر لاین‌های مورد آزمایش معرفی شد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌ای رشد گیاهی TDZ بر تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بیت‌آلف بود.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی و اجرای آزمایش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق دو ژنوتیپ خیار شامل توده بومی اصفهانی و رقم هیبرید بیت‌آلف تهیه‌شده از شرکت پاکان بذر اصفهان بودند. توده اصفهانی دارای طعم و مزه خیلی خوب و عملکرد بالایی می‌باشد اما نسبت به بیماری‌های و آفات حساس می‌باشد. رقم بیت‌آلف، داری رنگ و بازرپسندی مناسب و مقاومت‌های نسبتاً خوبی می‌باشد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در گلخانه آموزشی و پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه کشت شدند. مراقبت‌های زراعی در گلخانه، شامل آبیاری، سم‌پاشی، کودپاشی و محلول‌پاشی با روش مناسب انجام گرفت. خیارهای که در مزرعه کشت شدند بر حسب نیاز آبی خیار هر سه روز یک بار با استفاده از سیستم آبیاری قطره آبیاری شدند و در فاصله ۳۰ روز بعد از کشت اقدام به جمع‌آوری گل‌ها جهت کشت تخمک شد. بر اساس مطالعه Gemes-Juhasz *et al.* (2002) بهترین زمان برداشت جوانه‌های گل جهت کشت تخمک یک روز قبل از گرده‌افشانی (گل‌های ماده که گلبرگ‌های آن‌ها باز نشده باشند) می‌باشد.

ضدعفونی کردن گل‌ها قبل از کشت

جوانه‌های گل برداشت‌شده، درون شیشه‌های که قبلاً با فویل آلومینیومی پوشیده شده بودند و روی یخ قرار داشتند منتقل شدند. به منظور ضدعفونی کردن جوانه‌های گل از آب‌مقطر استریل جهت زدودن خاک استفاده شد، سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. گل‌ها در پایان ۳ مرتبه با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند.

انجام کشت و پیش تیمار

مادگی‌ها تحت شرایط استریل شکافته شدند، تخمک‌ها به همراه بافت بین آن‌ها به تکه‌های ۱ میلی‌متری تقسیم شدند و بر روی میحط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) تکمیل‌شده با سطوح مختلف هورمون TDZ (Thidiazuron) (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. پتری‌دیش‌های حاوی تخمک‌های کشت‌شده جهت پیش تیمار به مدت سه روز در دمای ۱±۳۵ سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند و بعد از این

مدت به اتاقک رشد با دمای معمولی منتقل شدند. بعد از دو هفته از کشت ریزنمونه‌ها به محیط MS تکمیل‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر GA3 منتقل شدند. ریزنمونه‌ها یک هفته در این محیط ماندند و سپس به محیط MS تکمیل‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA منتقل شدند. در نهایت ریزنمونه‌ها به محیط MS بدون تنظیم کننده رشد گیاهی منتقل شدند. محیط مورد استفاده در تمام مراحل با ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۸درصد تکمیل و میزان اسدیته آن نیز بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شده بود.

تشخیص سطوح پلوئیدی

تشخیص سطوح پلوئیدی روی کالوس‌ها و جنین‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمایش فلوسایتومتری و با رنگ‌آمیزی DAPI انجام شد. کالوس‌ها و جنین‌های هاپلوئید جهت باززایی به محیط‌های باززا منتقل شدند.

طرح مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر پتری‌دیش به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده است) برای این آزمایش در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش قطعات بافت حاوی تخمک کشت شدند. فاکتورهای آزمایش شامل ژنوتیپ (در دو سطح) و غلظت‌های مختلف TDZ (در هشت سطح) بودند. بعد از دو هفته از کشت صفات تعداد کالوس و جنین‌های القاءشده شمارش و یاداشت شدند. آزمون نرمال بودن داده ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab روی باقی‌مانده‌ها انجام گرفت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفتند.

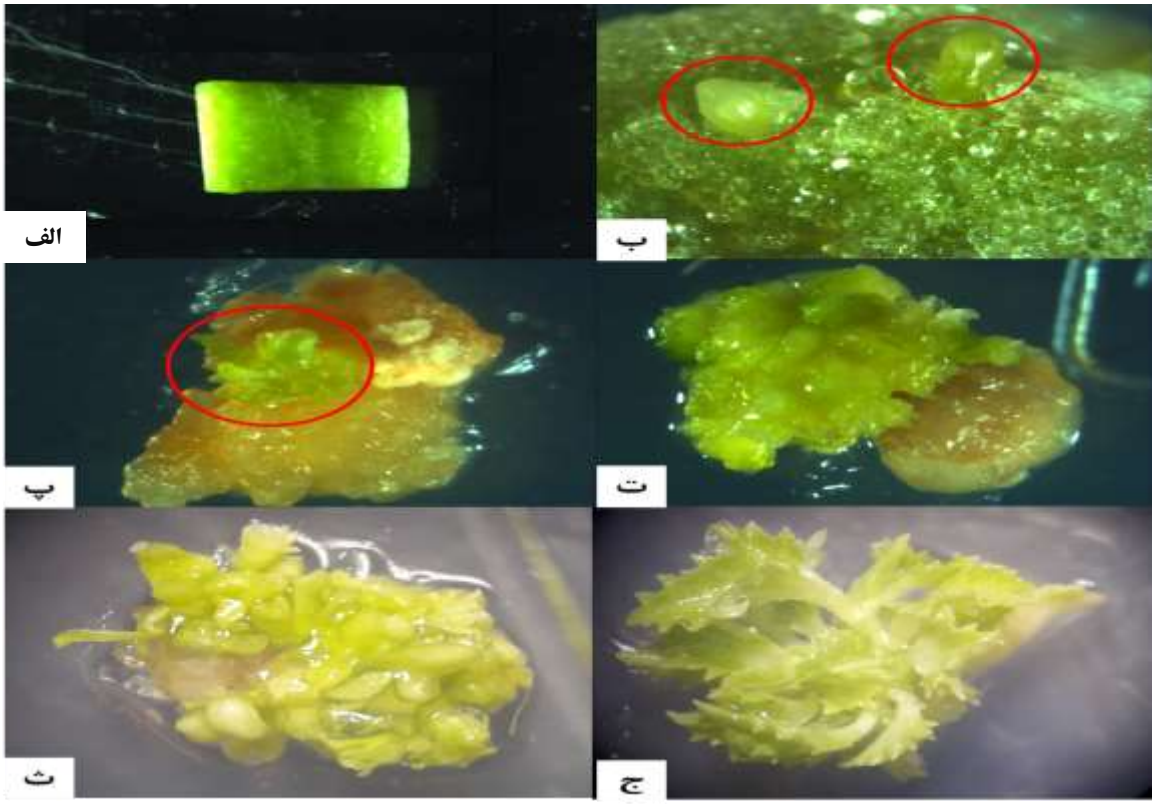
نتایج و بحث

قطعات یک میلی‌متری بافت تخمدان همراه با تخمک‌های نارس (شکل ۱- الف) روی محیط کشت قرار گرفتند. ریزنمونه‌های کشت‌شده به همراه محیط به مدت سه روز در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اولین تغییرات بعد از اعمال تنش گرمایی روی ریزنمونه‌ها به‌صورت جنین‌های گلبولی شکل مشخص شد (شکل ۱-ب). در تحقیق مشابهی که Diao *et al.* (2009) روی چند رقم خیار انجام دادند، توانستند با افزودن نیترات نقره به محیط کشت زمان مشاهده اولین تغییرات را به چهار تا پنج روز بعد از کشت کاهش دهند. آن‌ها گزارش دادند که اولین تغییرات در شاهد حدود هشت روز بعد از کشت مشاهده شد. در مطالعه حاضر اولین تغییرات در غلظت‌های بالاتر TDZ سه تا چهار روز بعد از کشت مشاهده شد، بنابراین به نظر می‌رسد با افزایش غلظت TDZ جنین‌ها سریعتر القاء می‌شوند.

ریزنمونه‌ها بعد از تنش گرمایی و بدون تغییر محیط کشت در اتاقک رشد معمولی قرار گرفتند. تمامی ریزنمونه‌های کشت‌شده متورم شدند. بعد از دو هفته ریزنمونه‌ها به محیط حاوی GA3 منتقل شدند. ریزنمونه‌ها یک هفته در این محیط نگهداری شدند و سپس به محیط باززایی منتقل شدند. بعد از انتقال جنین‌های القاءشده به محیط باززایی، رشد آن‌ها ادامه پیدا کرد. رشد کالوس در برخی از ریزنمونه‌ها متوقف شد، این کالوس‌ها زرد رنگ شدند و از بین رفتند (شکل ۲- الف)، رشد کالوس در برخی دیگر از ریزنمونه‌ها ادامه پیدا کرد و کالوس‌ها به بافت‌های سفت و سبزرنگی تبدیل شدند (شکل ۲-ب). تجزیه و تحلیل‌های فلوسایتومتری روی این بافت‌ها نشان داد که همه این بافت‌ها دارای سطوح پلوئیدی، دیپلوئید و تتراپلوئیدی می‌باشند، پس می‌توان گفت که همه این بافت‌ها از بخش‌های دیپلوئید ریزنمونه‌ها تولید شدند، بنابراین همه این بافت‌ها حذف شدند.

جنین‌های القاءشده از تخمک‌ها شمارش شدند و مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. بر اساس نتایج ارائه‌شده در جدول تجزیه واریانس حاصل از داده‌های به‌دست آمده از جنین‌های القاءشده (جدول ۱)، تنها اثر TDZ معنی‌دار شد و تفاوت معنی‌داری در پاسخ دو ژنوتیپ خیار به کشت تخمک بر اساس سطوح هورمونی آزمایش‌شده مشاهده نشد. اثر متقابل هورمون در گیاه نیز معنی‌دار نشد. مقایسه میانگین برای هر گیاه در سطوح مختلف TDZ انجام شد. طبق جدول مقایسه میانگین

جنین‌های القاءشده از کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بیت‌آلف (جدول ۲)، مشخص شد که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ در محیط القاء جنین نیز افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میانگین تعداد جنین در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش به‌دست آمد. بر این اساس بیشترین میانگین تعداد جنین برای ژنوتیپ اصفهانی ۲۳/۳۳ و برای ژنوتیپ بیت‌آلف ۲۰/۶۶ به‌دست آمد و کمترین میانگین تعداد جنین نیز در محیط ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر برای هر دو ژنوتیپ مورد بررسی به‌دست آمد (جدول ۲). نتایج Moqbeli *et al.* (2013) که به منظور تولید گیاهان هاپلوئید از کشت تخمک خیار مطالعه بر روی شش رقم هیبرید خیار انجام دادند نیز با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد. در مطالعه مذکور آن‌ها سطوح ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر TDZ را آزمایش کردند و گزارش دادند که غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر مؤثرتر بود. سایر محققین نیز این نتیجه را تأیید کرده‌اند (Gemes-Juhasz *et al.*, 2002؛ Diao *et al.*, 2009؛ Plapung e*t al.*, 2014؛ Suprunova *et al.*, 2008). جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲)، نشان داد که القاء جنین در ژنوتیپ محلی اصفهانی نسبت به رقم تجاری بیت‌آلف بیشتر انجام شد هر چند که این اختلاف معنی‌دار نشد (جدول ۱). تعداد جنین‌های القاءشده در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش در غلظت‌های بالاتر به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر بیشتر بود.

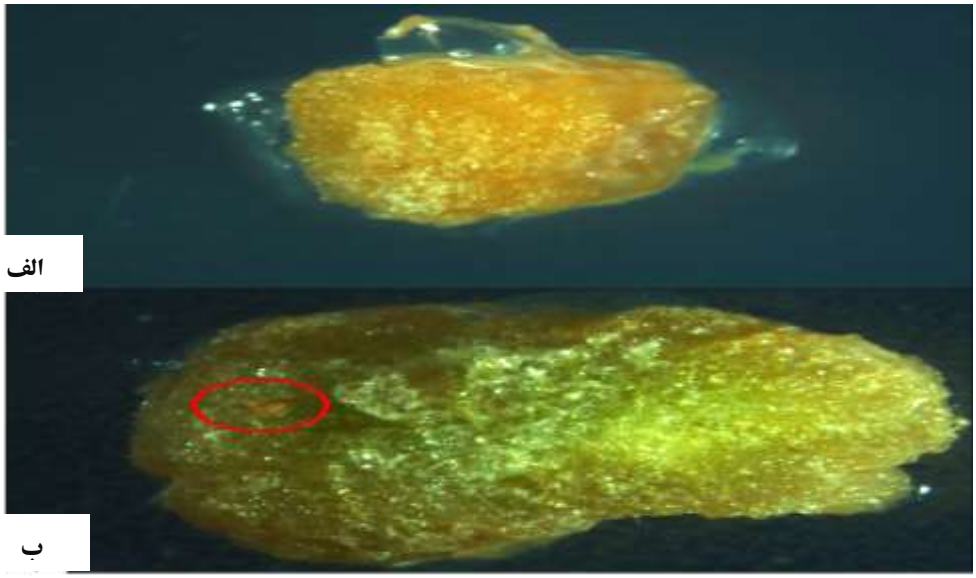


شکل ۱- مراحل مختلف تولید گیاه هاپلوئید مضاعف‌شده خیار از طریق کشت تخمک

الف- قطعات یک میلی‌متری تخمدان حاوی تخمک‌های نارس؛ ب- جنین‌های القاشده بعد از اعمال پیش تیمار گرمایی (جنین‌ها با دایره‌های قرمز رنگ مشخص شدند)؛ پ-جنین‌های در حال رشد؛ ت- ادامه رشد جنین و توقف رشد بافت تخمدان؛ ث- تشکیل ساختارهای اولیه برگ و ساقه مانند؛ ج- ظهور گیاه هاپلوئید مضاعف

Figure 1. Cucumber ovule embryogenesis and regeneration of double haploid plantlets derived from them

(A): Ovary slices containing immature ovules; (B): Induced embryos; (C): Sprouting embryo; (D): Continued growth of the embryo and stop ovarian tissue growth; (E): Shoot-like organogenesis; (F): Elongated shoots (E and regenerated plantlets)



شکل ۲- رشد بافت دیپلوئید تخمدان

الف- توقف رشد و زرد شدن ریزنمونه کشت‌شده بعد از سه تا چهار هفته از کشت؛ ب- بافت سفت و سبز رنگ رشد کرده از بافت دیپلوئید (جنین‌های از بین رفته با دایره قرمز مشخص‌شده است)

Figure 2. Ovarian diploid tissue growth

(A): Stopping growth and yellowing slices after three to four weeks of culture; (B): Rigid and green tissue grew out from diploid tissue (marked with circle red)

جدول ۱- تجزیه واریانس جنین‌های القاءشده از کشت تخمک خیار

Table 1. Analysis of variance of induced Cucumber ovule embryos

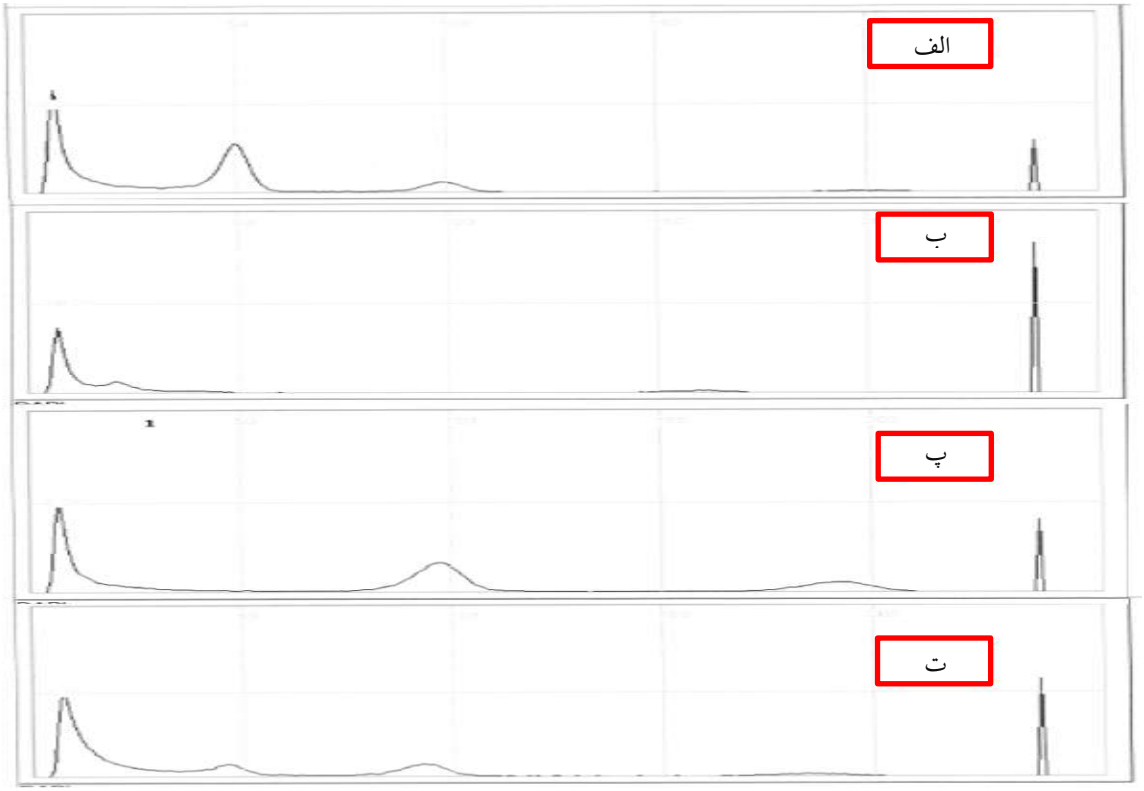
منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of square
ژنوتیپ Genotype	1	22.65^{ns}
TDZ	7	212.31^{**}
اثر متقابل Interactiong × TDZ	7	2.79^{ns}
خطا Error	32	9
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	22.26	

جدول ۱- مقایسه میانگین جنین‌های القاء از کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار بیت‌آلف و اصفهانی

Table 2. Mean comparison of induced embryos from Esfahani and Beit Alpha ovule culture

TDZ	اصفهانی Esfahani	بیت‌آلفا Beit Alpha
0.01	6.33^{d}	5^{e}
0.02	7.66^{d}	6.33^{de}
0.03	11^{c}	9.66^{cd}
0.04	11.66^{c}	13^{bc}
0.05	14.66^{b}	13.33^{bc}
0.06	16^{b}	15^{b}
0.07	22.66^{a}	19.33^{a}
0.08	23.33^{a}	20.66^{a}

سطح پلوئیدی کالوس‌ها و جنین‌های القاشده با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مشخص شد. بخشی از بافت‌های تولیدشده برای انجام آزمایش فلوسایتومتری استفاده شد. سطوح مختلف پلوئیدی شامل هاپلوئید (شکل ۳-ب)، تتراپلوئید (شکل ۳-پ) و دیپلوئید (شکل ۳-ت) در کالوس‌ها و جنین‌های القاءشده مشاهده شد. بافت‌های هاپلوئید واکشت شدند و بقیه بافت‌ها حذف شدند. کشت‌ها هر سه تا چهار هفته یک بار در محیط باززایی واکشت شدند تا ساختار اولیه برگ مانند تشکیل شد. سپس به محیط پایه MS بدون هورمون و تکمیل‌شده با ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار و اسیدیته ۵/۷۵ منتقل شدند. بعد از دو هفته گیاهچه‌ها رشد کردند. به منظور ریشه‌زایی، گیاهان تولیدشده به مدت دو هفته در محیط MS تکمیل‌شده با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA کشت شدند. سطوح پلوئیدی گیاهای تولیدشده با فلوسایتومتری مشخص شد. بر اساس نتایج فلوسایتومتری تمامی گیاهان تولیدشده به‌طور خودبخودی مضاعف شدند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان لاین خالص به‌طور مستقیم در برنامه‌های اصلاحی بکار گرفت (شکل ۴). گیاه کامل منتقل‌شده به گلدان در شکل (۵) نشان داده شده است. در تولید لاین‌های خالص از طریق کشت تخمک باشد، با توجه به سمی بودن کلشی‌سین جهت دو برابر کردن کروموزم‌های گیاهان هاپلوئید، حذف این مرحله می‌تواند سودمند باشد. با توجه به مطالعات انجام‌شده به نظر می‌رسد که درصد بسیار زیادی از گیاهان تولیدشده از ماده‌زایی و نرزایی در خیار دیپلوئید یا پلی‌پلوئید می‌باشند. در مطالعه Diao *et al.* (2009) فقط دو گیاه از ۴۰ گیاه تولیدشده از کشت تخمک خیار هاپلوئید بودند. نتایج این مطالعه را نیز مطالعات محققان دیگر روی گیاهان دیگر تأیید کردند (Germana and Chiancone, 2003؛ Chani *et al.*, 2000).



شکل ۳- سطوح پلوئیدی به‌دست آمده با استفاده از فلوسایتومتری

الف- دیپلوئید به‌دست آمده از کنترل؛ ب- هاپلوئید؛ ج- تتراپلوئید؛ ت- دیپلوئیدی حاصل از کالوس

Figure 3. Ploidy levels determined using a flowcytometric assay

(A) Diploid (control); (B) Haploid; (C) Tetraploid; (D) Diploid (Callus)

شکل ٤- گیاهان هاپلوئید مضاعف‌شده حاصل از کشت تخمک خیار
Figure 4. Doubled haploid plants regenerated from ovule culture

شکل ٥- گیاه کامل هاپلوئید مضاعف‌شده حاصل از کشت تخمک خیار
Figure 5. Double haploid plant from cucumber ovule culture

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت TDZ تخمک‌های خیار پاسخ بهتر و سریع‌تری به کشت نشان دادند. اولین واکنش تخمک‌ها به القاء جنین، بعد از سه روز به صورت جنین‌های گلبولی شکل در محیط‌های داری غلظت TDZ بالا قابل مشاهده بود. بر اساس آزمایش‌های فلوسایتومتری تمامی گیاهان تولیدشده به‌طور خودبخودی مضاعف شدند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان لاین خالص به‌طور مستقیم در برنامه‌های اصلاحی بکار گرفت. به‌طورکلی می‌توان گفت که کشت تخمک روشی مؤثر در تولید گیاهان هاپلوئید در خیار می‌باشد.

References

Bajaj, Y. (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Book Series (Agriculture)*, 12, 3-44.

Chani, E., Veilleux, R. E. and Boluarte-Medina, T. (2000). Improved androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(2), 101-12.

Diao, W. P., Jia, Y. Y., Song, H., Zhang, X. Q., Lou, Q. F. and Chen, J. F. (2009). Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 246-251.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2015). *Statistical Yearbook of the Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Retrieved from http//www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx//.

Gałązka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K. (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*, 25(1), 67-78.

Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A. and Kristof, Z. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *In vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 21(2), 105-111.

Germana, M. and Chiancone, B. (2003). Improvement of Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. *Plant Cell Reports*, 22(3), 181-187.

Hasandokht, M. R. (2006). *Greenhouse managing (greenhouse production technology)*. Tehran: Marz Danesh. [In Farsi]

Jihad, M. O. A. (2016). *Agricultural statistics year book*. Retrieved from http//www.Amar.maj.ir/portal//.

Najafi, S., Abdollahi, M. R. Sarikhani, H. and Moosavi, S. S. (2015). Effect of ovary conditioned medium on callogenesis and gametic embryogenesis in another culture of different cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Plant Production*, 38(4), 105-116.

Maheshwari, S., Rashid, A. and Tyagi, A. (1982). Haploids from pollen grains--retrospect and prospect. *American Journal of Botany*, 69(5), 865-879.

Moqbeli, E., Peyvast, G., Hamidoghli, Y. and Olfati, J. (2013). *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 21(1), 18-25.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.

Plapung, P., Khamsukdee, S., Potapohnand, N. and Smitamana, P. (2014). Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9(3), 261-269.

Shalaby, T. A. (2007). Factors affecting haploid induction through *In vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Horticulturae*, 115(1), 1-6.

Suprunova, T., Shmykova, N. and Pitrat, M. (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 (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th.

Veilleux, R. E. (1994). Development of new cultivars via anther culture. *Hort Science*, 29(11), 1238-1241.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)