

Production of Cucumber Doubled Haploid Plants via Ovule Culture

Abouzar Asadi¹, Alireza Zebarjadi^{2*} and Mohammad Reza Abdollahi³

- 1- Ph.D. of Plant Breeding, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran (Zebarjadiali@yahoo.com)
- 3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

Received: 18 September, 2017

Accepted: 25 April, 2018

Abstract

Background and Objectives

Production of pure lines is one of the most important tools due to production of high-yield seeds. Pure lines can be produced in a short time using in vitro techniques and therefore, reduce several years in required time for conventional plant breeding programs. The purpose of this study was investigation of different concentrations of TDZ on production of haploid plants in cucumber ovule culture.

Materials and Methods

The experimental layout was conducted in factorial arrangement in randomized complete design with three replications in greenhouse and laboratory of Razi university during 2015-2017. Factors were two cucumber genotypes (Esfahani and Beit Alfa) and different concentrations of TDZ (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 mg/l). Unfertilized ovaries were harvested 1 day before anthesis and they were sliced into 1 mm cross sections under sterile conditions and placed on solid MS medium. Immediately after placing the unfertilized ovary slices of each genotype on induction medium, they were exposed to a thermal shock pretreatment at $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 3 days. The first visual structures formed after 3 days in culture. After two weeks of culture, the frequency of embryo formation was recorded. After embryogenesis, the embryos were sub-cultured in medium containing 1.5 mg/L^{-1} GA3 and finally cultured in medium containing 0.05 mg/L^{-1} NAA and 1.5 mg/L^{-1} BAP for organogenesis.

Results

Results indicated a statistically significant effect at 1% among TDZ concentrations. Genotypes and interaction between genotype and TDZ concentration did not have a significant effect on embryo induction. According to the results of means comparison, M8 medium with the average of 23.33 for Esfahani genotype and 20.66 for Beta Alfa genotype had the highest embryo induction and M1 showed the lowest embryo induction for both genotypes. Ploidy level of calli and embryos were identified by Fluorescence assay. Haploid embryos were transferred to the regenerative medium. The chromosome content of haploid plants was doubled spontaneously in all regenerated plants.

Double haploid plants originated from megaspore and they were equivalent to haploid, which relates to homozygosity and can be used directly in breeding program.

Discussion

The high number of embryos was obtained in high concentration of TDZ (0.08 mg/l). Flucytometry assay is a way to recognizing ploidy level in plant tissues; thus it could be useful in choosing haploid tissue. Spontaneous chromosome doubling may occur via somatic cell fusion, endoreduplication, endomitosis and possibly many other mechanisms. In conclusion, the higher rates of embryo formation frequency achieved and doubled haploids obtained in the present study are promising for future work.

Keywords: Gynogenesis, Ovary slice, TDZ

تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده خیار از طریق کشت تخمک

ابوذر اسدی^۱، علیرضا زبرجدی^{۲*} و محمدرضا عبدالمهی^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: ۱۳۹۶/۰۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۵

چکیده

تولید لاین‌های خالص یکی از مهم‌ترین ابزارها جهت تولید بذور 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 ۹۶-۱۳۹۴ 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 تکمیل شده با غلظت‌های مختلف TDZ (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷ و ۰/۰۸ میلی گرم بر لیتر) کشت شدند. پیش تیمار گرمایی ۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز روی کشت‌ها اعمال شد. تعداد جنین‌های که به طور 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 میلی گرم 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 ۲۰/۶۶ در محیط ۰/۰۸ میلی گرم بر لیتر به دست آمد و کمترین میانگین تعداد جنین نیز در محیط ۰/۰۱ میلی گرم 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 بازرایی منتقل شدند. در نهایت گیاهان بازرایی شده دابلد هاپلوئید شدند و می‌توان آن‌ها را به عنوان لاین خالص در برنامه‌های اصلاحی بکار گرفت.

کلید واژه‌ها: تید بازورون، جنین، کشت اندام جنسی ماده

مقدمه

خیار یکی از مهم‌ترین صیفی‌جات تحت کشت در ایران است که سطح زیر کشت 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 زیر کشت بعد از چین، کامرون و

روسیه چهارمین سطح زیر کشت 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 زیر کشت 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 زیر کشت و نیز میزان تولید خیار در ایران از سال ۱۹۶۱ تا سال ۲۰۱۳ روندی افزایشی داشته است. با این حال تمامی بذره‌های 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 مضاعف شده 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 خود گشن 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).

به‌طور کلی روش‌هایی که برای القاء هاپلوئید در کدوئیان وجود دارند عبارتند از پارتنوژنز (Parthenogenesis) (در درجه اول گرده‌افشانی با دانه گرده پرتو تابیده شده)، ماده‌زایی درون شیشه‌ای (*In Vitro* Gynogenesis) شامل (کشت درون شیشه‌ای تخمدان (Ovaries) و تخمک‌ها

(Ovules)) و نزایی درون شیشه‌ای (*In Vitro* Androgenesis) شامل (کشت درون شیشه‌ای میکروسپورها (Microspores) و بساک‌ها (Anthers)) (Galazka and Niemirowicz-) (Szczytt, 2013; Najafi et al., 2015). چندین مطالعه به منظور تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده از طریق کشت تخمدان و تخمک در خیار انجام شده است (Diao et al., 2009; Gemes-Juhasz et al., 2002; Moqbeli et al., 2013; Plapung et al., 2014; 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 تکمیل شده با ۰/۰۲ TDZ میلی گرم بر لیتر و ۴ درصد ساکاروز بود. بعد از کشت پتری‌دیش‌ها به مدت ۵-۱ روز در دماهای ۲۴، ۲۸ یا ۳۵ سانتی گراد و در تاریکی قرار گرفتند. جنین‌های القاء شده به محیط باززایی CBM تکمیل شده با ۰/۵۰ NAA میلی گرم بر لیتر، ۰/۲ BA میلی گرم 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 سانتی گراد 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

اصفهان دارای طعم و مزه خیلی خوب و عملکرد بالایی می باشد اما نسبت به بیماری های و آفات حساس می باشد. رقم بیت آلف، دارای رنگ و بازرپسندی مناسب و مقاومت های نسبتاً خوبی می باشد. ژنوتیپ های مورد مطالعه، در گلخانه آموزشی و پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه کشت شدند. مراقبت های زراعی در گلخانه، شامل آبیاری، سم پاشی، کودپاشی و محلول پاشی 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 جمع آوری گل ها جهت کشت تخمک شد. بر اساس مطالعه Gemes-Juhasz *et al.* (2002) بهترین زمان برداشت جوانه های گل جهت کشت تخمک یک روز قبل از گرده افشانی (گل های ماده که گلبرگ های آن ها باز نشده باشند) می باشد.

ضد عفونی کردن گل ها قبل از کشت

جوانه های گل برداشت شده، درون شیشه های که قبلاً با فویل آلومینیومی پوشیده شده بودند و روی یخ قرار داشتند منتقل شدند. به منظور ضد عفونی کردن جوانه های گل از آب مقطر 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 ضد عفونی شدند. گل ها در پایان ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

انجام کشت و پیش تیمار

مادگی ها تحت شرایط استریل شکافته شدند، تخمک ها به همراه بافت بین آن ها به تکه های ۱ میلی متری تقسیم شدند و بر روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) تکمیل شده با سطوح مختلف هورمون TDZ (Thidiazuron) (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷ و ۰/۰۸ میلی گرم بر لیتر) قرار گرفتند. پتری دیش های حاوی تخمک های کشت شده جهت پیش تیمار به مدت سه روز در دمای 25 ± 1 سانتی گراد در تاریکی قرار گرفتند و بعد از این

از: تیمار گرمایی (۳۵ سانتی گراد به مدت ۴-۲ روز)، تیمار هورمونی TDZ (۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر) و نیترات نقره (صفر و ۱۰ میلی گرم بر لیتر). نتایج این مطالعه نشان داد که شوک گرمایی ۳۵ سانتی گراد به مدت ۳ روز و غلظت TDZ ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر بیشترین فراوانی تشکیل جنین را داشتند در صورتی که نیترات نقره تأثیر معنی داری بر فراوانی تشکیل جنین نداشت اما دوره ظهور جنین را کوتاه تر کرد و نیز تعداد جنین در هر قاج از تخمدان را بیشتر کرد.

Moqbeli *et al.* (2013) تولید دورن شیشه ای گیاه هاپلوئید خیار را با استفاده از کشت تخمک در شش هیبرید F₁ خیار تحت تیمارهای TDZ (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر) و پیش تیمار 35 ± 1 سانتی گراد (برای صفر، ۲، ۳ و ۴ روز) مورد بررسی قرار دادند. بیشترین موفقیت در جنین زایی در غلظت TDZ ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر به دست آمد و بهترین پیش تیمار گرمایی نیز ۳۵ سانتی گراد برای ۳ روز گزارش شد.

Plapung *et al.* (2014) به منظور شناسایی لاین های مقاوم به ویروس موزائیک خیار قطعات تخمدان را به مدت یک ماه در محیط CBM حاوی ۵ ppm نیترات نقره کشت دادند. سپس جنین ها را به محیط MS تکمیل شده با KIN/BAP, 2ip:IAA (Gamma, Gamma-Dimethylallylamino) 6-Purine (2ip) به مدت دو ماه منتقل کردند. جنین های سبز رنگ به محیط MS تکمیل شده با BA/2ip: IAA منتقل شدند. ترکیب ۲:۱ BAP:IAA به عنوان بهترین ترکیب در القای جنین زایی در اکثر لاین های مورد آزمایش معرفی شد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سطوح مختلف تنظیم کننده ای رشد گیاهی TDZ بر تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بیت آلف بود.

مواد و روش ها

مواد ژنتیکی و اجرای آزمایش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق دو ژنوتیپ خیار شامل توده بومی اصفهانی و رقم هیبرید بیت آلف تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان بودند. توده

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 کشت شده 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 القاء شده 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 القاء شده از تخمک‌ها شمارش شدند و مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول تجزیه واریانس حاصل از داده‌های به‌دست آمده از جنین‌های القاء شده (جدول ۱)، تنها اثر TDZ معنی‌دار شد و تفاوت معنی‌داری در پاسخ دو ژنوتیپ خیار به کشت تخمک بر اساس سطوح هورمونی آزمایش شده 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

مدت به اتاقک رشد با دمای معمولی منتقل شدند. بعد از دو هفته از کشت ریزنمونه‌ها به محیط MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی گرم بر لیتر GA3 منتقل شدند. ریزنمونه‌ها یک هفته در این محیط ماندند و سپس به محیط MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی گرم 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 ۰/۸ درصد 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 رنگ آمیزی DAPI انجام شد. کالوس‌ها و جنین‌های هاپلوئید جهت باززایی به محیط‌های باززا منتقل شدند.

طرح مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

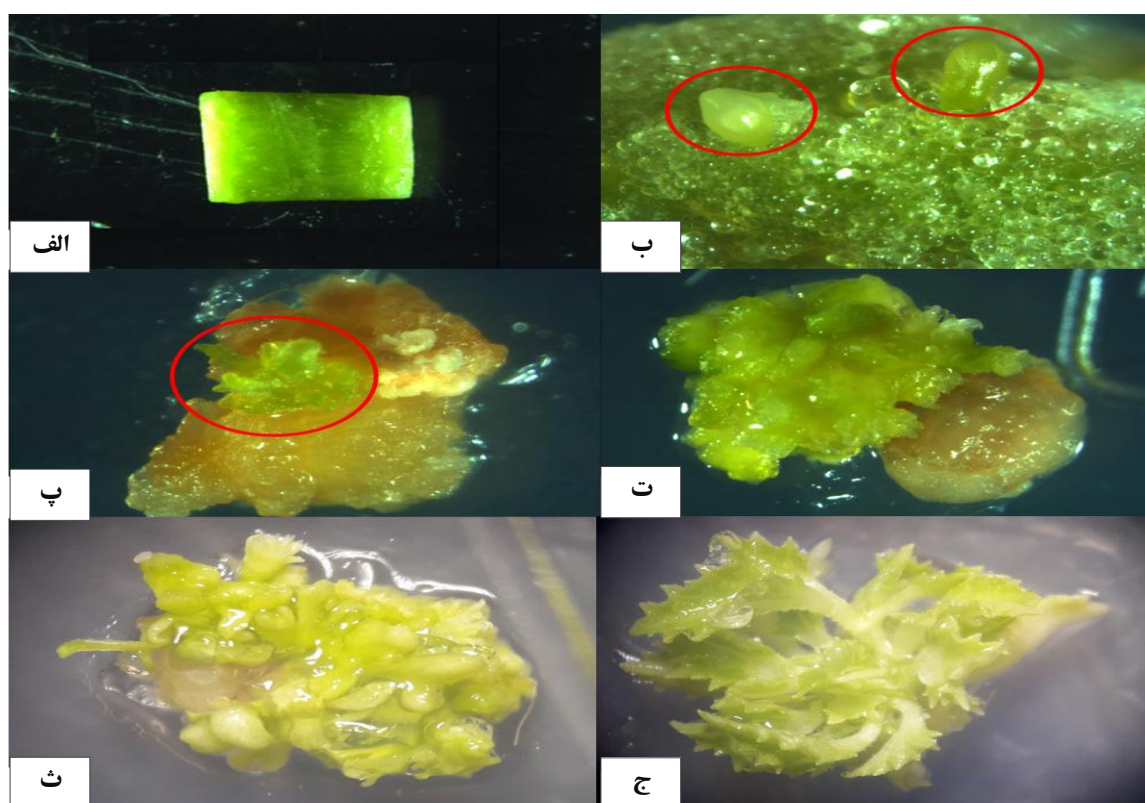
آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر پتری‌دیش به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده است) برای این آزمایش در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش قطعات بافت حاوی تخمک کشت شدند. فاکتورهای آزمایش شامل ژنوتیپ (در دو سطح) و غلظت‌های مختلف TDZ (در هشت سطح) بودند. بعد از دو هفته از کشت صفات تعداد کالوس و جنین‌های القاء شده شمارش و یادداشت شدند. آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab روی باقی مانده‌ها 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 میلی متری بافت تخمدان همراه با تخمک‌های نارس (شکل ۱-الف) روی محیط کشت قرار گرفتند. ریزنمونه‌های کشت شده به همراه محیط به مدت سه روز در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. اولین تغییرات بعد از اعمال تنش گرمایی روی ریزنمونه‌ها به صورت جنین‌های گلوبولی شکل مشخص شد (شکل

این مطالعه همخوانی دارد. در مطالعه مذکور آن‌ها سطوح ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر TDZ را آزمایش کردند و گزارش دادند که غلظت ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر مؤثرتر بود. سایر محققین نیز این نتیجه را تأیید کرده‌اند (Diao *et al.*, 2009; Gemes-Juhasz *et al.*, 2002; Plapung *et al.*, 2014; Suprunova *et al.*, 2008). جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲)، نشان داد که القاء جنین در ژنوتیپ محلی اصفهانی نسبت به رقم تجاری بیت آلف بیشتر انجام شد هر چند که این اختلاف معنی دار نشد (جدول ۱). تعداد جنین‌های القاء شده در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش در غلظت‌های بالاتر به‌طور معنی داری نسبت به غلظت‌های پایین تر بیشتر بود.

جنین‌های القاء شده از کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بیت آلف (جدول ۲)، مشخص شد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی TDZ در محیط القاء جنین نیز افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۸ میلی گرم 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 بیت آلف ۲۰/۶۶ به‌دست آمد و کمترین میانگین تعداد جنین نیز در محیط ۰/۰۱ میلی گرم 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

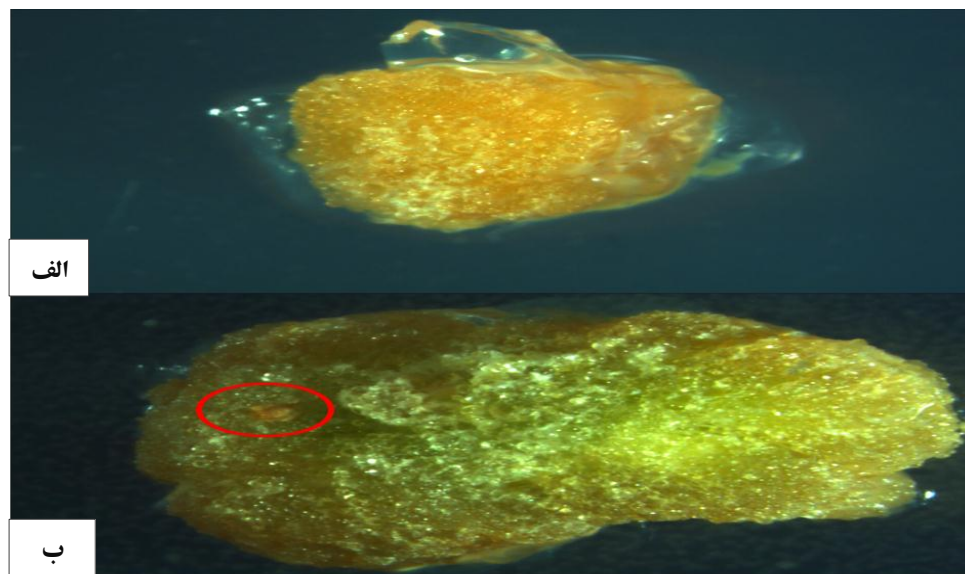


شکل ۱- مراحل مختلف تولید گیاه هاپلوئید مضاعف شده خیار از طریق کشت تخمک

الف- قطعات یک میلی متری تخمدان حاوی تخمک‌های نارس؛ ب- جنین‌های القاشده بعد از اعمال پیش تیمار گرمایی (جنین‌ها با دایره‌های قرمز 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 کشت شده 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 مشخص شده 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)

جدول ۱- تجزیه واریانس جنین‌های القاء شده از کشت تخمک خیار

Table 1. Analysis of variance of induced Cucumber ovule embryos

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

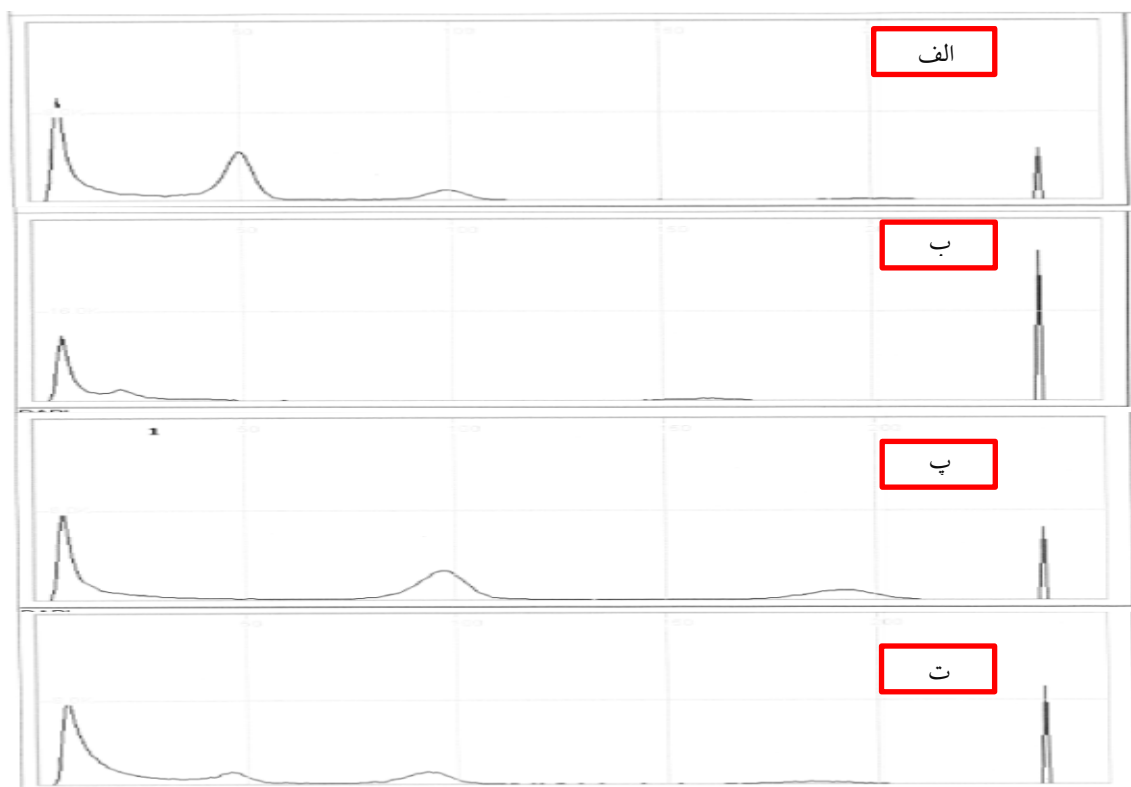
جدول ۱- مقایسه میانگین جنین‌های القاء از کشت تخمک دو ژنوتیپ خیار بیت آلف و اصفهانی

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

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

فلوسایتومتری مشخص شد. بر اساس نتایج فلوسایتومتری تمامی گیاهان تولید شده به طور خودبخودی مضاعف شدند و می توان آن ها را به عنوان لاین خالص به طور مستقیم در برنامه های اصلاحی بکار گرفت (شکل ۴). گیاه کامل منتقل شده به گلدان در شکل (۵) نشان داده شده است. در تولید لاین های خالص از طریق کشت تخمک باشد، با توجه به سمی بودن کلشی سین جهت دو برابر کردن کروموزم های گیاهان هاپلوئید، حذف این مرحله می تواند سودمند باشد. با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می رسد که درصد بسیار زیادی از گیاهان تولید شده از ماده زایی و نرزاری در خیار دیپلوئید یا پلی پلوئید می باشند. در مطالعه (Diao et al., 2009) فقط دو گیاه از ۴۰ گیاه تولید شده از کشت تخمک خیار هاپلوئید بودند. نتایج این مطالعه را نیز مطالعات محققان دیگر روی گیاهان دیگر تأیید کردند (Chani et al., 2000; Germana and Chiancone, 2003).

سطح پلوئیدی کالوس ها و جنین های القاشده با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مشخص شد. بخشی از بافت های تولید شده برای انجام آزمایش فلوسایتومتری استفاده شد. سطوح مختلف پلوئیدی شامل هاپلوئید (شکل ۳-ب)، تتراپلوئید (شکل ۳-پ) و دیپلوئید (شکل ۳-ت) در کالوس ها و جنین های القاء شده مشاهده شد. بافت های هاپلوئید واکشت شدند و بقیه بافت ها حذف شدند. کشت ها 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 تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار و اسیدیته ۵/۷۵ منتقل شدند. بعد از دو هفته گیاهچه ها رشد کردند. به منظور ریشه زایی، گیاهان تولید شده به مدت دو هفته در محیط MS تکمیل شده با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IAA کشت شدند. سطوح پلوئیدی گیاه های تولید شده با



شکل ۳- سطوح پلوئیدی به دست آمده با استفاده از فلوسایتومتری
الف- دیپلوئید به دست 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 ۴- گیاهان هاپلوئید مضاعف شده حاصل از کشت تخمک خیار
Figure 4. Doubled haploid plants regenerated from ovule culture



شکل ۵- گیاه کامل هاپلوئید مضاعف شده حاصل از کشت تخمک خیار
Figure 5. Double haploid plant from cucumber ovule culture

آزمایش های فلوسایتومتری تمامی گیاهان تولید شده به طور خودبخودی مضاعف شدند و می توان آن ها را به عنوان لاین خالص به طور مستقیم در برنامه های اصلاحی بکار گرفت. به طور کلی می توان گفت که کشت تخمک روشی مؤثر در تولید گیاهان هاپلوئید در خیار می باشد.

نتیجه گیری

طبق نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت TDZ تخمک های خیار پاسخ بهتر و سریع تری به کشت نشان دادند. اولین واکنش تخمک ها به القاء جنین، بعد از سه روز به صورت جنین های گلبولی شکل در محیط های دارای غلظت TDZ بالا قابل مشاهده بود. بر اساس

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 regenerants 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/>.
- 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.
- 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.). *Plant Productions*, 38(4), 105-116.
- 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, 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/>)