مطالعه اثر جهت قرار دادن بساک، نوع و ترکیب محیط‌کشت و کشت توأم بساک با تخمدان روی القاء کالوس در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. Styriaca)

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)

ژاله محسنی عراقی[۱]، محمدرضا عبداللهی[۲*]، اصغر میرزایی‌اصل[۳]، جواد حمزه‌ئی[۲] و سیدسعید موسوی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۸

چکیده

در این تحقیق، کشت بساک گیاه کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) به‌منظور تولید کالوس و جنین هاپلوئید بررسی شد. آزمایشات سیتوژنتیکی نشان داد که غنچه‌های ۱/۵ سانتی‌متری حاوی بساک‌های ۱۰-۹ میلی‌متری و میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ای میانی تا انتهایی برای کشت بساک مناسب بودند. سه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. در آزمایش اول، اثر جهت قرار دادن بساک بر روی محیط‌کشت و نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA (صفر، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (صفر، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) روی صفت درصد کالوس‌زایی بررسی شد. در این آزمایش کشت بساک‌ها از جهت محدب در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرد. در آزمایش دوم، اثرات متقابل نوع محیط‌کشت (E_{20} و B_5) و ترکیب تیمارهای هورمونی 2,4-D (صفر، ۲/۵، ۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر صفت درصد کالوس‌زایی کدو مورد مطالعه قرار گرفت که محیط‌کشت E_{20} حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را در مقایسه با تیمارهای دیگر ایجاد کرد. در آزمایش سوم اثر کشت توأم بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی با تخمدان گندم و تخمدان کدو بر درصد کالوس‌زایی بساک کدو در دو نوع محیط‌کشت جامد و مایع E_{20} بررسی شد. در این آزمایش کشت توأم بساک کدو و تخمدان گندم در محیط‌کشت جامد، نسبت به بقیه تیمارها بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کشت بساک، کالوس‌زایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کشت توأم تخمدان، هاپلوئید

۱، ۲ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
*: نویسنده مسوول Email: m.abdollahi@basu.ac.ir

مقدمه

کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo* var. Styriaca)، گیاهی یک‌ساله و دگرگشن از تیره Cucurbitaceae است. این گیاه بومی آمریکا بوده و نام انگلیسی آن Medicinal pumpkin-naked pumpkin می‌باشد. این گیاه اولین‌بار در نیمه اول قرن نوزدهم در کشور اتریش بر اثر یک جهش خود به خودی ظاهر شده است. این جهش منجر به نازک شدن پوسته دانه و در نتیجه تسهیل استحصال روغن سبز رنگ دانه‌های این گیاه شده است. قسمت مورد استفاده این گیاه دانه‌های آن بوده که حاوی ۳۵ تا ۵۵ درصد روغن می‌باشد. روغن به‌دست آمده از این گیاه حاوی ترکیبات بسیار ارزشمندی است که اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین A، ویتامین E، مقدار زیادی روی، مواد معدنی، فیتواسترول‌ها، کاروتنوئیدها و پروتوکلروفیل‌ها ازجمله آن هستند. مطالعات نشان داده است که روغن دانه و فراورده‌های حاصل از آن در درمان بیماری‌های مختلفی نظیر هیپرپلازی پروستات، کاهش کلسترول و اسیدهای چرب اشباع خون، کاربرد دارد و نیز دافع کرم کدو، ضدانگل و قارچ و پوکی استخوان بوده و در دفع سنگ کلیه و مثانه مؤثر می‌باشند (جهان و همکاران، ۱۳۸۹). کدوی تخم پوست‌کاغذی به علت داشتن خواص دارویی ذکر شده جزء گیاهان مهم دارویی محسوب می‌شود، ولی تاکنون کارهای اصلاحی بسیار کمی بر روی این گیاه صورت گرفته است. یکی از بهترین روش‌های اصلاحی جهت همگن کردن ماده مؤثره در گیاهان دارویی و هم‌چنین تولید واریته‌های جدید و بذر هیبرید در این گیاهان تولید لاین‌های خالص می‌باشد، که بهترین راه دستیابی به این لاین‌ها، تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن هاپلوئید مضاعف می‌باشد.

در برنامه‌های اصلاحی، هاپلوئیدها به‌عنوان منابع تولید لاین‌های هموزیگوت، بسیار مفید هستند. مزیت اصلی استفاده از آن‌ها، کاهش مدت زمان لازم برای تولید واریته‌های جدید است. مدت زمان لازم برای تولید لاین‌های هموزیگوت از طریق کشت بساک یا دانه گرده، از حدود ۸-۶ سال در برنامه‌های اصلاحی موجود، به چند ماه یا حداکثر یک سال کاهش می‌یابد. لاین‌های هموزیگوس خالص می‌توانند در تولید هیبریدهای F_1 خالص استفاده شوند *جاین* و همکاران (Jaine *et al.*, 1996).

اولین گیاهان هاپلوئید در خانواده کدوئیان در دهه۱۹۵۰ تولید شدند *گاتازکا* (Gatazka, 2013). *آلدرز* (Alders, 1958) از بذور طبیعی خیار جنین‌های هاپلوئید به‌دست آورد و *سوامیناتان و سین* (Swaminathan and Singh, 1958) در هندوانه‌ی دیپلوئیدی که بذور آن با اشعه تیمار شده بود، ساقه‌های هاپلوئید را مشاهده کردند. *هایس* (Hayase, 1954) یک گیاه هاپلوئید کدو (*Cucurbita maxim*a Duch. ex Lam) را از طریق گرده‌افشانی با گونه دیگر کدو (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir) به‌دست آورد. در روشی مشابه نیز *دوماس د-والکس* (Dumas de Vaulx, 1979)، اولین گیاه هاپلوئید را از خربزه به‌دست آورد. اولین گیاهان هاپلوئید *Cucurbita pepo* L. توسط *دوماس د-والکس* و *چامبونت* (Dumas de Vaulx and Chambonnet, 1986) از کشت تخمک لقاح نیافته تولید شدند. *زاگورچوا* و همکاران (Zagorcheva *et al.*, 1987) از طریق آپومیکسی تخمک لقاح نیافته در شرایط ایزولاسیون گل‌های ماده یک گیاه هاپلوئید از گونه‌ی *C. ficifolius* به‌دست آوردند.

یکی از روش‌های مؤثر در تولید گیاهان دابل هاپلوئید نرزایی است که با دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌گیرد *فری* و همکاران (Ferrie *et al.*, 1995). مطالعات اولیه در ارتباط با تولید گیاهان دابل هاپلوئید از طریق روش کشت بساک در خانواده کدوئیان در گیاهانی مثل خیار، خربزه، هندوانه و کدوی مسمایی انجام شده است که در اکثر این مطالعات فقط کالوس تولید شده یا تعداد بسیار محدودی گیاه هاپلوئید ایجاد شده است *لازارت* و *ساسر*؛ *دریانوسکا و ایلیوا*؛ *شیل و راینسون*؛ *متوالی* و همکاران (Lazarte and Sasser, 1982; Dryanovska and Ilieva, 1983; Shail and Robinson, 1987; Metwally *et al.*, 1998). در دهه‌ی ۱۹۸۰ تلاش‌هایی جهت تولید گیاهان هاپلوئید از کشت بساک‌های *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *Luffa cylindrical Roxb* توسط *کومار* (Kumar, 1984) صورت گرفت، که در کل نتایج محدودی به‌دست آمد. اخیراً چندین محقق با مطالعه بر روی روش کشت بساک خیار موفق به تولید گیاهان دابل هاپلوید با فراوانی بالا در این گیاه شده اند *آشوک کومار و مورثی*؛ *سونگ* و همکاران (Ashok Kumar and Murthy, 2003, 2004; Song *et al.*, 2007).

فاکتورهای زیادی از قبیل ژنوتیپ گیاه مادری، شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله رشد و نمو میکروسپور، پیش‌تیمارهای دمایی و شیمیایی، نوع و ترکیب محیط‌کشت بر میزان پاسخ کشت‌های بساک موثر می‌باشند *بجاج* (Bajaj, 1990). یکی از فاکتورهایی که به‌طور رایج در مطالعات کشت بساک اکثر گیاهان مورد بررسی قرار می گیرد نوع محیط‌کشت و کاربرد

تنظیم‌کننده رشد گیاهی مختلف جهت القاء کالوس و جنین هاپلوئید می‌باشد.

جهتی که بساک‌ها در روی محیط‌کشت قرار می‌گیرند نیز می‌تواند اثر قابل توجهی روی تولید کالوس و جنین داشته باشد. اثر جهت بساک روی تولید جنین‌های حاصل از میکروسپور به‌طور دقیقی توسط محققین *هانتر* (Hanter, 1985)، *شانون* و همکاران (Shannon *et al.*, 1985) در تعدادی از گونه‌های زراعی بررسی شده است.

ترکیب محیط‌کشت نقش موثری در القاء جین‌زایی میکروسپور بازی می‌کند. ژنوتیپ‌های مختلف نیازهای متفاوتی از نظر محیط‌کشت پایه برای تشکیل گیاه هاپلوئید حاصل از گرده نشان می‌دهند. نیازهای غذایی بساک‌های کشت شده نسبت به میکروسپورهای ایزوله شده بسیار ساده‌تر است (*بجاج*، 1990). رایج‌ترین محیط‌های کشت پایه استفاده شده برای کشت بساک عبارتند از: محیط‌کشت N6 *چو* (Chu, 1978)، محیط‌کشت تغییر یافته MS *موراشیگ* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962)، محیط‌کشت Nitsch *نیچ* و *نیچ* (Nitsch and Nitsch, 1969)، محیط‌کشت B5 *گامبورگ* و همکاران (Gamborg *et al.*, 1968) و محیط‌کشت E_{20} *ساتون* و همکاران (Sauton *et al.*, 1987). مخلوطی از نمک‌های MS با نصف غلظت برای خانواده سیب‌زمینیان توصیه می‌گردد. محیط‌کشت N6 برای غلات پیشنهاد شده است (چو، 1978) و محیط‌کشت E_{20} محیط تخصصی برای خانواده کدوئیان می‌باشد (*ساتون* و همکاران، 1987).

اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز به‌طور وسیعی در کشت بساک بررسی شده است. اگرچه تعداد محدودی از گونه‌های گیاهی مدل (اعضای خانواده سیب‌زمینیان) به اضافه کردن اکسین در محیط‌کشت بساک نیاز ندارند ولی حضور تنظیم‌کننده‌های رشد از قبیل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها یا ترکیبی از این دو برای تولید جنین حاصل از میکروسپور در کشت بساک بسیاری از گونه‌های گیاهی ضروری می‌باشد *ماهشواری* و همکاران (Maheshwari *et al.*, 1982). به نظر می‌رسد که نوع و غلظت اکسین‌ها تعیین‌کننده مسیر رشد و نمو میکروسپورها باشد *بال* و همکاران (Ball *et al.*, 1993). هورمون توفوردی (2,4-D) معمولاً برای القاء کالوس و هورمون‌های ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالین استیک اسید (NAA) برای تحریک جنین‌زایی مستقیم استفاده می‌گردند *آرمسترانگ* و همکاران (Armstrong *et al.*, 1987).

در ارتباط با تولید گیاه هاپلوئید از طریق کشت بساک تاکنون مطالعه‌ای در گیاه کدوی پوست‌کاغذی صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق، مطالعه اثر عوامل مختلف از قبیل جهت قرار دادن بساک در محیط‌کشت، نوع محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و هم‌چنین اثر کشت توأم بساک کدوی پوست‌کاغذی با تخمدان گندم و کدو بر روی میزان کالوس‌زایی از کشت‌های بساک کدوی پوست‌کاغذی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و کشت گیاهان مادری

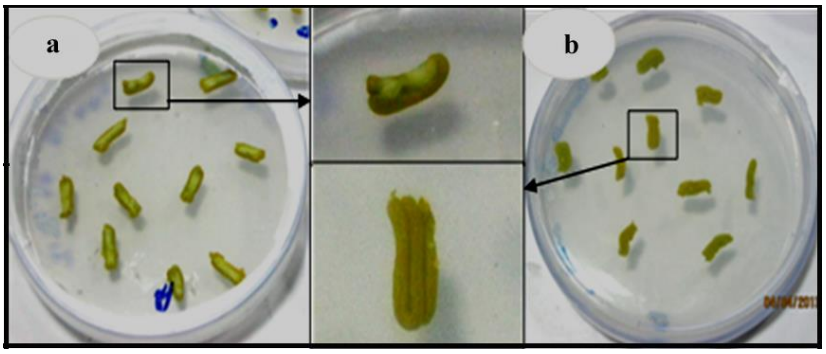
در این تحقیق از بذور کدوی تخم پوست‌کاغذی استفاده گردید. بذور این گیاه از مؤسسه‌ی پاکان بذر اصفهان تهیه شد. این واریته بومی اتریش بوده و در چند سال اخیر کشت آن در مناطقی از ایران نیز رایج شده است. بذور گیاهان مادری در شاسی‌های پلاستیکی با بستر کوکوپیت و پرلیت در عمق دو سانتی‌متر خاک در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان کشت گردیدند. گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به گلدان‌هایی با قطر ۳۰ سانتی‌متر منتقل شدند. برای تأمین نور در روزهای کوتاه سال از سه لامپ ۳۰۰ وات استفاده شد که این لامپ‌ها در ارتفاع ۱۴۰ سانتی‌متری از سطح گلدان‌ها قرار گرفتند. شرایط نوری و دمایی گلخانه شامل ۱۶/۸ ساعت (شب/ روز) با دامنه دمایی ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد در طول شب و روز بود.

آزمون سیتولوژیکی تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورها

جهت تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورهای کدوی پوست‌کاغذی ابتدا غنچه‌هایی با اندازه‌های مختلف قبل از باز شدن برداشت و جهت رنگ‌آمیزی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه، بساک‌های مربوط به هر اندازه غنچه زیر میکروسکوپ بینی‌کولار از داخل غنچه‌ها بیرون آورده شدند. رنگ‌آمیزی میکروسپورها با روش اسکواش با استفاده از استوکارمین یک درصد انجام شد و مرحله رشد و نموی مربوط به میکروسپورهای هر اندازه غنچه در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش اول: اثر جهت قرار دادن بساک بر روی محیط‌کشت و هم‌چنین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و NAA روی صفت درصد کالوس‌زایی

در این آزمایش اثر جهت قرار دادن بساک بر روی محیط‌کشت و هم‌چنین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (2,4-D و NAA) روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی بررسی شد. به‌منظور انجام این آزمایش، ابتدا محیط‌کشت پایه B_5 حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار و نه ترکیب هورمونی شامل 2,4-D در سه سطح (صفر، یک، دو میلی‌گرم در لیتر) و NAA در سه سطح (صفر، ۰/۵، یک میلی‌گرم در لیتر) با pH= ۵/۷ تهیه گردید. سپس بساک‌ها در دوگروه مجزا از نظر طرز قرار گرفتن بر روی محیط‌کشت، کشت شدند. در گروه اول بساک‌ها به سمت محدب و در گروه دوم به سمت مقعر بر روی محیط‌کشت قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱: نحوه قرار دادن بساک‌ها بر روی محیط‌کشت در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی. a): بساک‌های کشت شده از سمت محدب، b): بساک‌های کشت شده از سمت مقعر

Fig. 1: The manner of anther displacement on culture medium in anther culture of of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). a): The cultured anthers from convex side, b): The cultured anthers from concave side

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (سه پتری‌دیش، هرکدام حاوی ۱۰ بساک) انجام شد. جهت کشت بساک (محدب و مقعر) به‌عنوان فاکتور اول، غلظت هورمون NAA (صفر، ۰/۵، یک میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم و غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (صفر، یک، دو میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شدند. ابتدا بساک‌های کشت شده به‌مدت چهار روز در پیش‌تیمار سرمایی چهار درجه سانتی‌گراد و سپس به‌مدت چهار هفته در اتاق رشد با دمای ۲۵°C قرار گرفتند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها به محیط‌کشت رویان‌زایی انتقال داده شدند.

آزمایش دوم: اثر نوع محیط‌کشت و ترکیب تیمارهای هورمونی اکسین (2,4-D) و سیتوکینین (BAP) بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

در این آزمایش دو نوع محیط‌کشت (B_5 و E_{20}) حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار با pH مناسب برای هرکدام از محیط‌ها (۵/۷ برای B_5 و ۵/۹ برای E20) و نه ترکیب مختلف هورمونی ساخته شد. غنچه‌های برداشت شده به‌مدت چهار روز در پیش‌تیمار سرمایی چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند سپس بساک‌ها در تیمارهای هورمونی مختلف کشت شدند و به‌مدت هفت روز در انکوباتور ۳۲°C (مؤثرترین تیمار گرمایی بر کالوس‌زایی، در آزمایشات قبلی) قرار داده شدند، پس از آن، نمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵°C منتقل شدند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها به محیط‌کشت رویان‌زایی انتقال داده شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نوع محیط‌کشت به‌عنوان فاکتور اول در دو سطح (محیط‌کشت B_5 و E_{20})، غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D در سه سطح (صفر، ۲/۵، پنج میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم و هم‌چنین غلظت‌های مختلف هورمون BAP در سه سطح (صفر، ۰/۵، یک میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شدند.

آزمایش سوم: اثر کشت توأم بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی با تخمدان گندم و تخمدان خود گیاه بر صفت درصد کالوس‌زایی

در این آزمایش، ابتدا غنچه‌های نر با اندازه مناسب، غنچه‌های ماده کدو (یک روز قبل از باز شدگی) و تخمدان‌های گندم در مرحله‌ی آبستنی (Booting) انتخاب و پس از ضدعفونی کردن در تیمارهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

۱. محیط‌کشت جامد E_{20} بدون تخمدان، ۲. محیط‌کشت جامد E_{20} حاوی ۲۰ تخمدان کدو، ۳. محیط‌کشت جامد E_{20} حاوی ۲۰ تخمدان گندم، ۴. محیط‌کشت مایع E_{20} بدون تخمدان، ۵. محیط‌کشت مایع E_{20} حاوی ۲۰ تخمدان کدو، ۶. محیط‌کشت مایع E_{20} حاوی ۲۰ تخمدان گندم

در این آزمایش از محیط‌کشت E_{20} حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۹ و ترکیب هورمونی BAP (۱ mgl^{-1}) و2,4-D (۲/۵ mgl^{-1}) استفاده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ بساک کشت شده) انجام گرفت. نوع محیط‌کشت در دو سطح (جامد و مایع) به‌عنوان فاکتور اول و نوع تخمدان در سه سطح (بدون تخمدان، ۲۰ تخمدان کدو و ۲۰ تخمدان گندم) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. تمامی کشت‌های بساک، در تیمار سرمایی چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار روز نگهداری و به اتاق رشد با دمای ۲۵°C منتقل شدند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها به محیط‌کشت رویان‌زایی انتقال داده شدند.

در تمامی آزمایشات بالا، چهار هفته بعد از کشت بساک، به‌منظور القاء رویان در کالوس‌های القاء شده از محیط‌کشت B_5 حاوی ترکیب هورمونی NAA با غلظت ۰/۵۴ میکرومول در لیتر و BAP با غلظت ۱۳/۳۲ میکرومول در لیتر، ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر، آگار به میزان هشت گرم در لیتر و pH= ۵/۷ استفاده شد. چهار هفته بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط رویان‌زایی، این کالوس‌ها به محیط‌کشت باززایی (محیط B_5 حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم آگار با pH= ۵/۷ و ترکیب هورمونی NAA (۰/۲ mgl^{-1}) و Kin (۲ mgl^{-1}) منتقل شدند. در تمامی مراحل کشت‌ها در اتاق رشدی با دمای ۲۵°C قرار گرفتند.

آزمون سیتولوژیکی جهت شمارش تعداد کروموزوم‌های کالوس‌ها و رویان‌های القا شده

ابتدا بذور کدوی دیپلوئید را در ظرفی خیسانده تا ریشه‌زایی کنند، هنگامی‌که ریشه‌ها به اندازه ۲-۱ سانتی‌متر رسیدند، به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر از نوک آن‌ها را بریده و در ظرف جدا قرار داده شدند. در ظرفی دیگر تعداد ۵ کالوس و ۵ ساختار رویان مانند را انتخاب و هر دو سری نمونه به‌طور جداگانه به‌مدت سه ساعت در محلول کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد پیش‌تیمار شدند سپس نمونه‌ها جهت تثبیت، به‌مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ سی‌سی محلول کارنوی (۳ اتانول: ۱ اسید استیک) قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌های ریشه، کالوس‌ها و ساختارهای رویان مانند با استوکارمن یک درصد رنگ‌آمیزی شدند *دارلینگ* و *لاکور* (Darlington and Lacour, 1976). پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها بر روی لام آزمایشگاهی له شده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ برابر، تعداد کروموزوم‌ها در کالوس‌ها و ریشه‌چه‌ها مورد شمارش قرار گرفتند.

تجزیه آماری و صفات مورد مطالعه

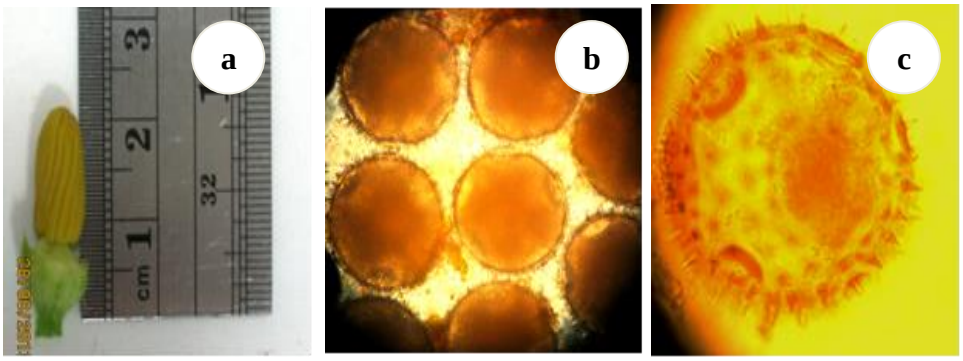
در این مطالعه بر روی بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی فقط کالوس القاء گردید و به جز چند مورد نادر که ساختارهای رویان مانند و ریشه‌چه مشاهده شد، در بقیه موارد رویانی دیده نشد. بنابراین در آزمایشات انجام شده فقط صفت درصد کالوس‌زایی مطالعه گردید. روش محاسبه بدین صورت بود که درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس به ازای ۱۰ بساک کشت شده، به‌عنوان درصد کالوس‌زایی در هر پتری‌دیش در نظر گرفته شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها و رسم نمودارها به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excel انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه دانکن انجام شد. جهت تبدیل داده‌های مربوط به صفت درصد کالوس‌زایی و نرمال‌سازی آن‌ها از تبدیل جذری استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپور

آزمون سیتولوژیکی روی غنچه‌های نر با اندازه مختلف نشان داد که غنچه‌هایی با اندازه ۴-۳ سانتی‌متر دارای بساک‌هایی به اندازه ۱۰-۹ میلی‌متر می‌باشند که این بساک‌ها حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ایی میانی تا انتهایی می‌باشند. این مرحله مناسب‌ترین مرحله میکروسپور جهت

کشت بساک و القای کالوس در گیاه کدوی تخم پوست‌کاغذی می‌باشد (*متوالی* و همکاران، 1998) (شکل ۲).

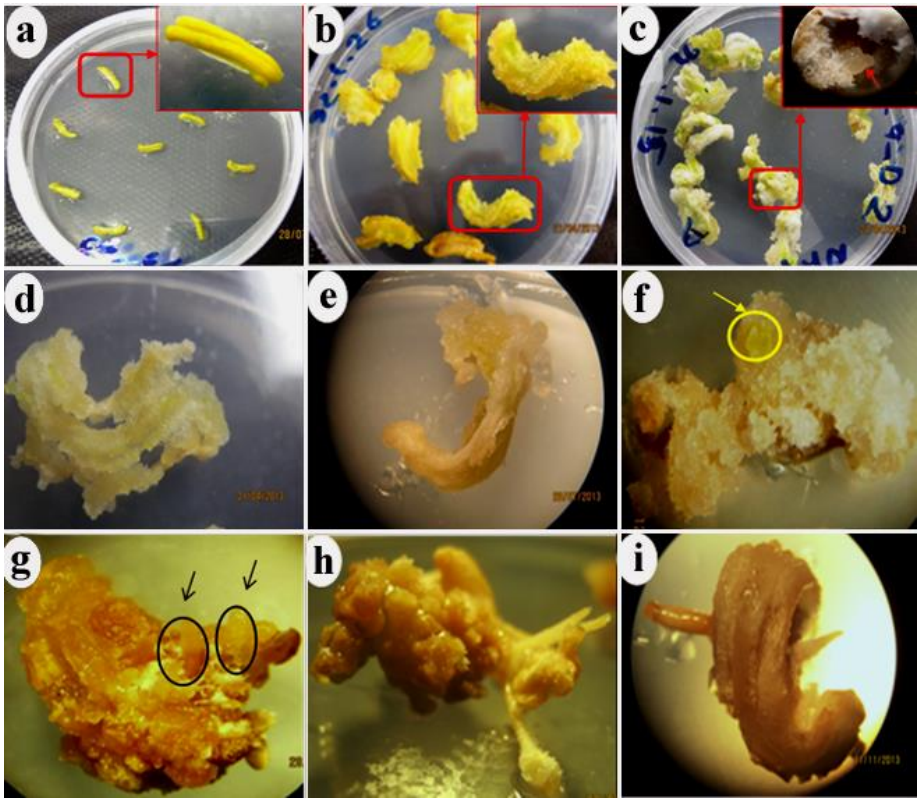


شکل ۲: آزمون سیتولوژیکی جهت تعیین اندازه مناسب غنچه نر و بساک و هم‌چنین مرحله رشد و نموی مناسب میکروسپور جهت کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی. a): اندازه مناسب غنچه‌ها و بساک‌ها جهت کشت بساک b): مرحله رشد و نموی مناسب میکروسپورها جهت کشت بساک (میکروسپورها با بزرگنمایی ۴۰ برابر)، c): یک میکروسپور کدوی تخم پوست‌کاغذی در مرحله تک هسته‌ای انتهایی مناسب برای کشت بساک (بزرگنمایی ۱۰۰برابر)

Fig. 2: Cytological experiment to identify the desirable size of bud and anther and also developmental stage of pollen for anther culture of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). a): Desirable size of bud and anthers for anther culture, b): Microspores at desirable development stage for anther culture (magnification:40x), c): A pumpkin microspore at late uni-nucleate stage, desirable for anther culture (magnification:100x)

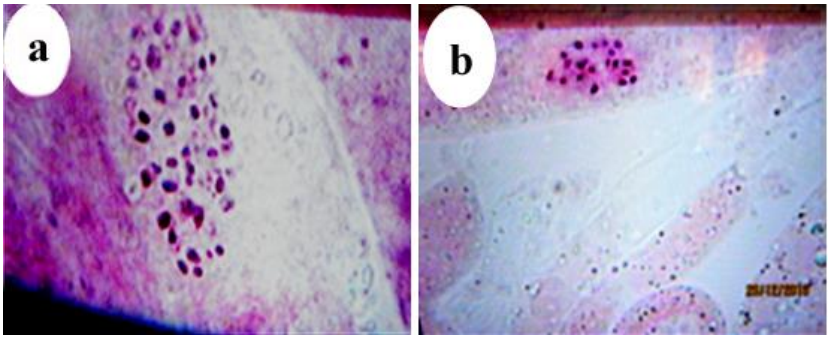
القای کالوس و ساختارهای رویان مانند در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

در تمامی آزمایشات، بساک‌های کشت شده (شکل ۳a)، طی یک هفته پس از کشت، به‌تدریج متورم شدند (شکل ۳b) و پس از ۱۵ روز شروع به کالوس‌زایی (شکل ۳c, d, e) نمودند. چهار هفته پس از کشت، کالوس‌های القاء شده، جهت القای رویان، به محیط جدید رویان‌زایی انتقال داده شدند. در برخی از تیمارها ساختار رویان مانند بر روی کالوس‌ها مشاهده شد (شکل ۳c, f) ولی در اکثر تیمارها، کالوس‌ها به‌سمت ساختارهای ساقه مانند (شکل ۳g) و ریشه‌مانند (شکل ۳i, h) رشد ونمو کردند. حدود هشت هفته پس از کشت، کالوس‌های رویان‌زا و کالوس‌های دارای اندام ریشه و ساقه مانند، به محیط‌کشت باززایی انتقال داده شدند ولی هیچ گیاهچه‌ای باززایی نشد. نتایج آزمایش سیتولوژیکی جهت شمارش کروموزوم‌ها نشان داد که تعداد کروموزم‌ها در کدوی تخم پوست‌کاغذی دیپلوئید ۴۰ عدد بود (2n= 2x = 40)، درحالی‌که چهار کالوس (۸۰ درصد) و سه ساختار رویان مانند (۶۰ درصد) از کالوس‌ها و ساختارهای رویان مانند بررسی شده در آزمایش شمارش کروموزومی، ماهیت هاپلوئید با تعداد کروموزوم ۲۰ نشان دادند (n= x = 20) (شکل ۴).



شکل۳: کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی. a): بساک‌های تازه کشت شده، b): .بساک‌های تورم یافته، یک هفته پس از کشت، c-f): کالوس‌های القاء شده در بساک‌های کشت شده چهار هفته پس از کشت. در بعضی از کالوس‌ها ساختارهای رویان مانند مشاهده می‌شود (فلش‌ها در شکل‌های c و f)، g): اندام‌های ساقه مانند بر روی کالوس، هشت هفته بعد از کشت بساک (فلش‌های سیاه‌رنگ)، h و i): ساختارهای ریشه مانند بر روی کالوس، هشت هفته بعد از کشت بساک

Fig. 3: Anther culture of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). a): Fresh cultured anthers, b): Turgid anthers, one week after culture, c-f), Induced calli,4 weeks after anther culture, embryo like structures were observed in some calli (arrows in c and f), g): Shoot like structures on callus, 8 weeks after anther culture (black arrows), h and i): Root like structure on callus, 8 weeks after anther culture



شکل ۴: تعیین تعداد کروموزوم ها در ریشه گیاهان دیپلوئید و هم‌چنین کالوس‌ها و ساختارهای رویان مانند حاصل از کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی. a): هسته سلول دیپلوئید با عدد کروموزومی 2n=40، حاصل از سلول نوک ریشه گیاه دیپلوئید، b): هسته سلول هاپلوئید با عدد کروموزومی n=20، حاصل از بافت کالوس، هشت هفته بعد از کشت بساک

Fig. 4: Identification of chromosome number in root of diploid plants and also, calli and embryo like structures derived from anther culture of in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca). a): Nuclear od diploid cell with 40 chromosomes (2n=2x=40), b): Nuclear of haploid cell with 20 chromosomes (n=x=20), derived from callus tissue, 8 weeks after anther culture

آزمایش اول

در این آزمایش اثر جهت قرار دادن بساک بر روی محیط‌کشت و هم‌چنین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و NAA روی صفت درصد کالوس‌زایی از کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس اثر جهت قرار دادن بساک بر روی محیط‌کشت و هم‌چنین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و NAA بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ بین دو جهت قرار گرفتن بساک برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد. غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید و هورمون 2,4-D تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین اثرات متقابل جهت قرار گرفتن بساک با هورمون‌های NAA و 2,4-D مشاهده نشد. اثرات متقابل NAA و 2,4-D اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۱ نشان دادند. هم‌چنین اثرات متقابل سه‌گانه جهت بساک × NAA × 2,4-D اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ برای صفت درصد کالوس‌زایی از بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر جهت بساک، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و NAA بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

Table 1: Analysis of variation for the effect of anther orientation, type and concentration of plant growth regulator of 2,4-D and NAA on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) cultured anthers

منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares
جهت بساک (A) Anther orientation (A)	1	474.07*
هورمون نفتالین استیک اسید (B) Naphthalene acetic acid (B)	2	9112.96***
هورمون توفوردی (C) 2, 4-D (C)	2	10012.96***
جهت بساک × هورمون نفتالین استیک اسید A×B	2	90.74ns
جهت بساک × هورمون توفوردی A×C	2	79.63ns
هورمون نفتالین استیک اسید × هورمون توفوردی B×C	4	987.96***
جهت بساک × هورمون نفتالین استیک اسید × هورمون توفوردی A×B×C	4	204.63*
خطای آزمایشی Error	36	75.93
درصد ضریب تغییرات CV (%)	-	22.19

*، **، *** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و غیرمعنی‌دار

*, **, *** and ns: Significant at 0.05, 0.01, 0.001 and non significant respectively

مقایسه میانگین اثر جهت قرار گرفتن بساک بر روی محیط‌کشت، بر صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد که قرار گرفتن بساک‌ها به سمت مقعر با ۸۵ درصد کالوس‌زایی نسبت به قرار گرفتن پرچم‌ها به سمت محدب، درصد کالوس‌زایی بیشتری را ایجاد کردند.

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه جهت بساک × NAA × 2,4-D برای صفت درصد کالوس‌زایی در جدول ۲ نشان داده است. کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط‌کشت حاوی ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم NAA و دو میلی‌گرم 2,4-D در هر دو حالت محدب و مقعر به‌ترتیب با ۸۶/۶ درصد و ۸۳/۳ درصد کالوس‌زایی، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کردند. هم‌چنین کشت بساک‌ها به‌صورت مقعر در محیط‌های کشت حاوی ترکیب هورمونی (یک میلی‌گرم NAA + یک میلی‌گرم 2,4-D) و (۰/۵ میلی‌گرم NAA + دو میلی‌گرم 2,4-D) به‌ترتیب با ۸۰ درصد و ۷۳/۳ درصد کالوس‌زایی بدون اختلاف معنی‌دار آماری با دو تیمار اول بیش‌ترین درصد

کالوس‌زایی را نشان دادند. کم‌ترین درصد کالوس‌زایی مربوط به بساک‌های کشت (محدب و مقعر) در محیط‌کشت بدون هورمون بود (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل جهت قرار گرفتن بساک و تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و NAA بر صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

Table 2: Mean comparison of the interaction effect of anther orientation and plant growth regulator of 2,4-D and NAA on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca)

جهت قرار گرفتن بساک Anther orientation		توفوردی (میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D (mgl^{-1})	نفتالین استیک اسید (میلی‌گرم در لیتر) NAA (mgl^{-1})
مقعر Concave	محدب Convex		
3.3hi	0.0i	0	
20.0fg	16.6fgh	1	0
30.0ef	16.6fgh	2	
26.6efg	13.3ghi	0	
36.6e	53.3d	1	0.5
73.3abc	66.6bcd	2	
23.3efg	13.3ghi	0	
80.0ab	63.3cd	1	1
83.3a	86.6a*	2	

*: اعداد ستون‌ها و ردیف‌ها با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each column and row are not significantly different at the 0.05 level, according to the Duncan's Multiple Range Test

بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی، در هنگام جداسازی دارای انحناء می‌باشند، که پس از قرار گرفتن بر روی محیط‌کشت و جذب مواد غذایی، متورم شده و این تورم باعث بیشتر شدن انحنا و فاصله گرفتن از سطح محیط‌کشت می‌شود. بنابراین اگر بساک‌ها از سمت مقعر خود بر روی محیط‌کشت قرار گیرند، جذب مواد غذایی از طریق آوندها باعث ایجاد تورم در بساک‌های کشت شده گردیده و به علت وسعت و انعطاف‌پذیری بیشتر سطح رویی بساک، انحنا بیشتر شده و در نتیجه باعث فاصله گرفتن و حتی جدا شدن بساک از سطح محیط‌کشت می‌گردد. درحالی‌که اگر بساک‌ها از قسمت محدب خود روی محیط‌کشت قرار بگیرند، میکروسپورهای موجود در کیسه‌ی گرده شانس بیشتری برای جذب مواد غذایی از محیط‌کشت خواهند داشت، به همین دلیل در مطالعه حاضر درصد کالوس‌زایی در حالت قرار گرفتن بساک‌ها از سمت محدب خود بر روی محیط‌کشت نسبت به حالت مقعر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

مطالعات زیادی توسط *شانون* و همکاران (1985)، *هانتر* (1985) و *پاول* و همکاران (Powell *et al.*, 1988) بر روی گیاه جو انجام شد که در آن‌ها، جهت قرار گرفتن بساک بر روی محیط‌کشت، به دو جهت خوابیده (Flat) و ایستاده (Up) بررسی شد. در مطالعات این محققین بیشتر گیاهان سبز به‌وجود آمده از بساک‌های کشت شده به‌صورت ایستاده کشت شده بودند. هم‌چنین مطالعات مشابهی توسط *ساندرلند* (Sanderland, 1971) و میسو و همکاران (Misoo *et al.*, 1981) بر روی گیاه توتون انجام شد، که قرار گرفتن بساک‌ها بر روی محیط‌کشت به‌صورت ایستاده درصد کالوس‌زایی و رویان-زایی بیشتری در مقایسه با قرار گرفتن به‌صورت خوابیده ایجاد کرد، که با نتایج این تحقیق مبنی بر اثر متفاوت جهت قرار گرفتن بساک بر روی پاسخ بساک‌ها به آندروژنز مطابقت دارد.

هم‌چنین خاوری خراسانی و همکاران (۱۳۹۰) آزمایشی مبنی بر اثر جهت قرار گرفتن بساک روی محیط‌کشت شامل (کشت بساک‌ها از جهت لبه روی محیط‌کشت، کشت از جهت پهنای بساک‌ها و کشت به‌صورت تصادفی) بر میزان القای جنین حاصل از کشت بساک ذرت انجام دادند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که با وجود برتری تیمار نحوه قرارگیری بساک‌ها از جهت لبه بر روی محیط‌کشت، بین تیمارهای اعمال شده تفاوت معنی‌داری از نظر القای جنین‌زایی وجود ندارد.

فاکتور دیگر مورد مطالعه در این آزمایش، اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و 2,4-D بر صفت کالوس‌زایی از کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی می‌باشد. همان‌گونه که در جدول مقایسه میانگین نشان داده شد (جدول ۲)، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار دو میلی‌گرم

هورمون 2,4-D و یک میلی‌گرم هورمون NAA و کم‌ترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد (بدون ترکیب هورمونی) بود که هیچ کالوسی مشاهده نشد. در این آزمایش، تیمارهایی که دارای مقدار بیشتری هورمون 2,4-D بودند (حتی بدون هورمون NAA) درصد بالاتری از کالوس‌زایی را نشان دادند (شکل ۸).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش مهمی در القای کالوس و رویان دارند. رایج‌ترین هورمون استفاده شده جهت القای کالوس در کشت بساک 2,4-D می‌باشد *جرمانا* (Germana, 2011). در آزمایشی، *متوالی* و همکاران (1998) اثر غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D را بر تولید گیاهان هاپلوئید کدو از طریق کشت پرچم بررسی کردند، که بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی در آزمایش این محققین مربوط به تیمار پنج میلی‌گرم هورمون 2,4-D بود.

نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نیز نشان داد، که استفاده از تیمارهای هورمونی نسبت به تیمار شاهد، به‌طور چشمگیری منجر به القاء کالوس گردید.

آزمایش دوم

در این آزمایش اثرات متقابل نوع محیط‌کشت و تیمارهای هورمونی اکسین و سیتوکینین بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم کاغذی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تجزیه واریانس اثر نوع محیط‌کشت و هم‌چنین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی صفت در صد کالوس‌زایی در کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ بین دو نوع محیط‌کشت E_{20} و B_5 برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد. غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید و هورمون 2,4-D تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ نشان دادند. اثرات متقابل نوع محیط‌کشت با هورمون‌های BAP و 2,4-D اختلاف معنی‌داری را در سطح آماری ۰/۰۱ نشان دادند. اثرات متقابل BAP و 2,4-D اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۱ نشان دادند. هم‌چنین اثرات متقابل سه‌گانه نوع محیط‌کشت × BAP × 2,4-D اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ برای صفت درصد کالوس‌زایی از بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی نشان دادند. مقایسه میانگین اثر نوع محیط‌کشت، بر صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد که محیط‌کشت E_{20} با ۵۵ درصد کالوس‌زایی نسبت به محیط‌کشت B_5 برتری معنی‌داری دارد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه نوع محیط‌کشت × BAP × 2,4-D برای صفت درصد کالوس‌زایی در جدول ۴ نشان داده شده است. کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی در محیط‌کشت E_{20} حاوی ترکیب هورمونی (یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) با ۹۰درصد کالوس‌زایی، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرد. هم‌چنین کشت بساک‌ها در محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D)، (صفر میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و (یک میلی‌گرم در لیتر BAP+ پنج میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) در محیط‌کشت E20 و ترکیب هورمونی (صفر میلی‌گرم در لیتر BAP + پنج میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) در هر دو محیط‌کشت B_5 و E_{20} به‌ترتیب با ۷۳/۳۳٪، ۶۶/۶٪، ۷۳/۳٪، ۷۶/۶۷٪ و ۶۶/۶٪ کالوس‌زایی بدون اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار اول بیش‌ترین درصدهای کالوس‌زایی را نشان دادند. کم‌ترین درصد کالوس‌زایی مربوط به بساک‌های کشت شده در محیط شاهد (بدون هورمون) در هر دو نوع محیط‌کشت بود.

کالوس‌های به‌وجود آمده از بساک‌های کشت شده در دو نوع محیط‌کشت از لحاظ کیفی، تفاوت قابل توجهی باهم داشتند. سرعت کالوس‌زایی در محیط‌کشت E_{20} بیشتر، کالوس‌ها سبزتر و کروی‌تر بودند.

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر محیط‌کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BAP بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

Table 3: Analysis of variation for the effect of culture medium, type and concentration of plant growth regulator of 2,4-D and BAP on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) cultured anthers

منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares
محیط‌کشت (A) Culture medium (A)	1	2.89*
توفوردی (B) 2,4-D (B)	2	98.48***
بنزیل آمینوپورین (C) BAP (C)	2	10.92***
محیط‌کشت × توفوردی B × A	2	4.98**
محیط‌کشت × بنزیل آمینوپورین C × A	2	3.65**
توفوردی × بنزیل آمینوپورین C × B	4	19.25***
محیط‌کشت × توفوردی × بنزیل آمینوپورین C × B × A	4	1.99*
خطای آزمایشی Error	36	0.636
درصد ضریب تغییرات CV (%)	-	12.25

*، ** و ***: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱

*, ** and ***: Significant at 0.05, 0.01 and 0.001, respectively

جدول ۴: مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BAP بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

Table 4: Mean comparison of the interaction effect of culture medium and plant growth regulator of 2,4-D and BAP on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) cultured anthers

توفوردی (میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D (mgl^{-1})	بنزیل آمینوپورین (میلی‌گرم در لیتر) BAP (mgl^{-1})	محیط‌کشت Culture medium	
		B5	E20
	0.0	0.00f	0.00f
0.0	0.5	43.33cd	30.00de
	1.0	26.67de	20.00e
	0.0	53.33bc	66.67ab
2.5	0.5	56.67bc	73.33ab
	1.0	53.33bc	90.00a*
	0.0	76.67ab	66.67ab
5.0	0.5	56.67bc	53.33bc
	1.0	30.00de	73.33ab

*: اعداد ستون‌ها و ردیف‌ها با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each column and row are not significantly different at the 0.05 level, according to the Duncan's Multiple Range Test

هم‌چنین نتایج نشان داد، افزایش غلظت هر دو هورمون در هر دو محیط‌کشت، باعث کاهش میزان القای کالوس شده است که می‌تواند به این دلیل باشد که افزایش غلظت هورمون‌ها (ترکیب اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها)، موجب بالارفتن سوخت و ساز وکاهش مواد غذایی در محیط‌کشت می‌گردد (باقری، ۱۳۷۶).

در تحقیقی مشابهی *سونگ* و همکاران (2007) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین را بر کشت بساک خیار بررسی کردند که در آزمایش این محققین بهترین

محیط‌کشت برای القای کالوس رویان‌زا، محیط‌کشت MS غنی شده با ۴/۴۴ میکرومول بنزیل‌آمینوپورین و ۲/۲۶ میکرومول 2,4-D و ۴/۶۴ میکرومول کینیتین بود. این محققین برای القای مستقیم رویان، محیط‌کشت MS غنی‌شده با ۰/۵۴ میکرومول نفتالین استیک اسید و ۱۳/۳۲ میکرومول بنزیل‌آمینوپورین را استفاده کردند و بهترین باززایی رویان در محیط‌کشت MS حاوی ۲/۲۲ میکرومول بنزیل‌آمینوپورین، شش درصد ساکارز و ۱/۲ درصد آگار به‌دست آوردند. این محققین با استفاده از این روش از ۱۶ ژنوتیپ خیار کالوس تولید کردند و سه رویان هاپلوئید به ازای هر بساک و ۴۲ گیاه هاپلوئید مضاعف از حدود ۴۵ بساک در واریته نینجیا به‌دست آوردند.

در تحقیقی *اوگار* و همکاران (Ugur *et al.*, 2003) تأثیر محیط‌کشت E_{20} و MS را بر روی کشت بافت خربزه بررسی کردند که نتایج این محققین، اثر مثبت معنی‌داری استفاده از محیط‌کشت E_{20} نسبت به MS را برای صفت کالوس‌زایی نشان داد. هم‌چنین مطالعاتی توسط *شریعت‌پناهی* و *توراو* (Shariatpanahi and Touraev, 2010) انجام شد که محیط‌کشت E_{20} را به‌عنوان محیط اختصاصی برای خانواده کدوئیان، معرفی کرد. نتایج این محققین اثر معنی‌دار نوع محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را بر درصد القای کالوس و رویان ا در کشت بساک نشان می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر اثرات نوع محیط‌کشت و تیمارهای هورمونی اکسین و سیتوکنین بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک مطابقت دارد.

آزمایش سوم

در این آزمایش اثر کشت توأم بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی با تخمدان گندم و تخمدان خود گیاه در محیط‌های کشت جامد، مایع و دولایه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمار کشت توأم بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی با تخمدان گندم و تخمدان خود گیاه در دو محیط‌کشت جامد و مایع بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۱ بین دو محیط‌کشت جامد و مایع و هم‌چنین دو نوع تخمدان برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد. اثرات متقابل محیط‌کشت و نوع تخمدان نیز اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان دادند (جدول ۵).

مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط‌کشت و نوع تخمدان بر روی درصد کالوس‌زایی بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی در نمودار ۱ نشان داده شده است. کشت بساک‌ها در محیط‌کشت جامد بدون تخمدان با ۸۵ درصد کالوس‌زایی بیش‌ترین کالوس‌زایی را ایجاد کرد، درحالی‌که کشت تؤام بساک‌ها با تخمدان گندم و کدو در محیط‌کشت جامد باعث کاهش درصد کالوس‌زایی نسبت به شاهد گردید. که البته این کاهش در مورد کشت توأم بساک با تخمدان گندم کمتر بود. در محیط‌کشت مایع فقط کشت توأم بساک‌ها با تخمدان گندم منجر به درصد کالوس‌زایی بسیار کمی (۱۰ درصد) گردید. مشاهده می‌گردد که در محیط جامد کشت توأم اثر کاهشی بر میزان درصد کالوس‌زایی داشته است که آن را می‌توان نتیجه اثر رقابتی بساک‌ها و تخمدان‌ها در جذب مواد غذایی دانست.

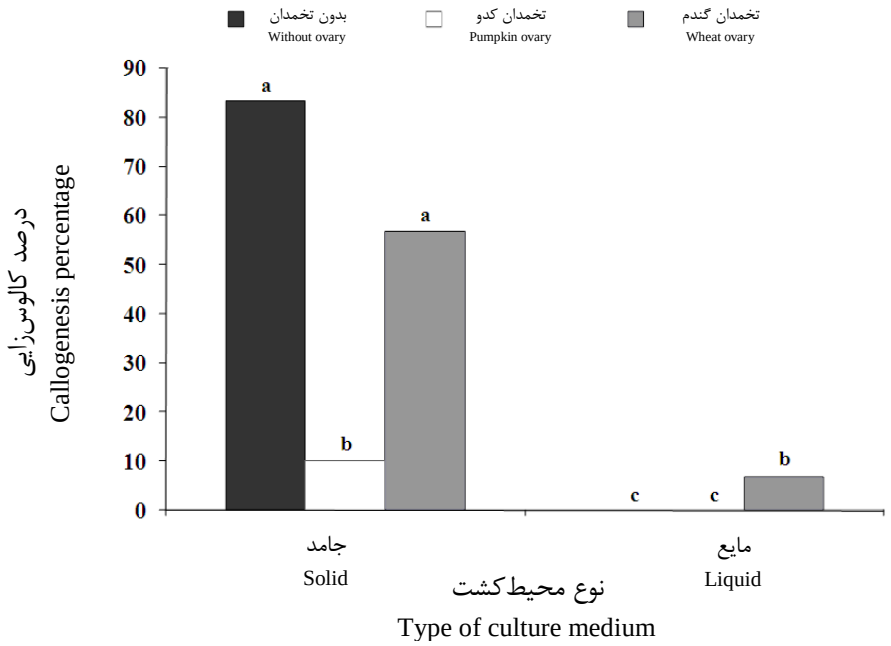
جدول ۵: تجزیه واریانس اثر محیط‌کشت حاوی تخمدان گندم یا تخمدان کدو بر روی صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی

Table 5: Analysis of variation for the effect of wheat or pumpkin ovary conditioned medium on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. Styriaca) cultured anthers

منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares
محیط‌کشت (A) Culture medium (A)	1	123.25***
نوع تخمدان (B) Type of ovary (B)	2	20.24***
محیط‌کشت × نوع تخمدان B × A	2	14.92*
خطای آزمایشی Error	12	1.12
درصد ضریب تغییرات CV (%)	-	27.26

* و ***: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱

* and ***: Significant at 0.05 and 0.001, respectively



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌کشت و نوع تخمدان در کشت توأم بر صفت درصد کالوس‌زایی در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشند

Fig. 5: Mean comparison of the interaction effect of culture medium and type of ovary in co-culture medium on the callogenesis percentage in pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) cultured anthers. Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level, according to the Duncan's Multiple Range Test

براوتون و همکاران (Broughton *et al.*, 2008) در آزمایشی اثر کشت توأم بساک با تخمدان گندم را بر تولید جنین و گیاه سبز در کشت بساک گندم بهاره استرالیایی مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش اضافه کردن تخمدان به محیط‌کشت القا، کالوس تأثیر قابل توجهی بر عملکرد بساک‌ها داشت. هنگامی‌که پنج تخمدان به محیط‌کشت بساک افزوده شد، متوسط جنین و گیاه سبز، افزایش یافت. ولی با افزایش تعداد تخمدان (تا ۱۰ عدد)، تغییری در عملکرد بساک‌ها حاصل نشد. با اضافه شدن

تخمدان به محیط‌کشت، نرخ تولید جنین و گیاه سبز ۲۰-۱۵ درصد افزایش یافت.

لانتوس و همکاران (Lantos *et al.*, 2009) نیز مطالعه‌ای بر روی کشت توأم میکروسپور گیاه فلفل با تخمدان گندم انجام دادند که در این آزمایش ۳ رقم فلفل اسپانیایی موردآزمایش قرارگرفتند. در آزمایش این محققین مشاهده شد که کشت توأم میکروسپورها با هردو نوع تخمدان گندم و فلفل منجر به افزایش جین‌زایی میکروسپورها گردید ولی این افزایش در کشت توأم میکروسپورها با تخمدان گندم بیشتر بود.

نتایج حاصل از مطالعات *لیتارت* و همکاران (Letarte *et al.*, 2006) نشان داد که پروتئین‌های آرابینوگالاکتان که از تخمدان‌های گندم ترشح می‌شوند نقش کلیدی را در القای نرزایی در میکروسپورهای گندم ایفا می‌کند، هم‌چنین نتایج این مطالعه بیانگر این بود که به‌وسیله‌ی جایگزینی پروتئین‌های آرابینوگالاکتان به‌جای تخمدان در کشت میکروسپور گندم، می‌توان میزان القای نرزایی را در این گیاه بهبود بخشید، البته کارآیی این روش در مقایسه با استفاده مستقیم از تخمدان پایین‌تر است.

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که کشت بساک‌های کدوی تخم پوست‌کاغذی از جهت محدب بر روی محیط‌کشت E_{20} (محیط‌کشت اختصاصی خانواده کدوئیان)، حاوی ترکیب هورمونی (یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد می‌کند. هم‌چنین نتایج نشان داد که محیط‌کشت مایع محیط مناسبی برای کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی نمی‌باشد و فقط در محیط‌کشت مایع، کشت توأم بساک‌های کدو با تخمدان گندم منجر به بهبود اندک کالوس‌زایی گردید. نتایج این تحقیق فقط منجر به القاء کالوس و ساختارهای رویان مانند هاپلوئید در کشت بساک کدوی تخم پوست‌کاغذی گردید و جهت باززایی کالوس‌ها و تولید گیاهان هاپلوئید در گیاه دارویی کدوی تخم پوست کاغذی مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۷-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.