



Investigation of the Effect of Centrifugation and Electrical Shock Pretreatments on the Androgenesis Efficiency in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Anther Culture

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rashidi Sh.¹ MSc,
Abdollahi M.R.*¹ PhD,
Sarikhani H.² PhD,
Moosavi S.S.¹ PhD

How to cite this article

Rashidi Sh, Abdollahi M.R, Sarikhani H, Moosavi S.S. Investigation of the Effect of Centrifugation and Electrical Shock Pretreatments on the Androgenesis Efficiency in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Anther Culture Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 173-181.

¹Agronomy & Plant Breeding Department, Agriculture Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
²Horticultural Sciences Department, Agriculture Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

*Correspondence

Address: Agronomy & Plant Breeding Department, Agriculture Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. Postal Code: 657833131
Phone: +98 (81) 34425403
Fax: +98 (81) 34424090
m.abdollahi@basu.ac.ir

Article History

Received: September 4, 2017
Accepted: February 17, 2018
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

The production of double haploid plants can be used as an effective method for plant breeding. In this research, in order to produce chickpea haploid plants, 1mm-long anthers of Bivani cultivar containing the microspores at uni-nucleate stage were isolated from suitable buds (3mm in length) and exposed to different centrifuge (150g, 300g and 600g each for 3, 6 and 10 minutes) and electrical shock pretreatments (0, 100, 150 and 200V) in the 2ml microtubes containing 1.5ml of RM-IK medium. The treated anthers were then cultured in an EDM culture medium containing 10mg/l 2, 4-D and 10mg/l silver nitrate to induce callus and embryos. Results showed significant differences between different levels of centrifugation, different levels of electric shock and their interactions for the studied traits. The highest percentage of embryogenesis was observed in centrifuge pretreatments of 150g for 6 minutes, 300g for 3 minutes, 150g for 3 minutes in combination with 150V electrical shock, 300g for 6 and 10 minutes and combination of 150g centrifuge pretreatment for 3 minutes with electric shock of 200V, while the highest percentage of plant regeneration was obtained from centrifuge pretreatment of 300g for 6 minutes and also the combination of centrifuge pretreatment of 150g for 3 minutes with electric shock of 150V.

Keywords Anther Culture; Chickpea; Centrifugation; Embryogenesis; Electrical Shock

CITATION LINKS

[1] Pulse crops [2] The state of food and agriculture [Internet]. Rome: FAO; 2016 [cited 2016 Jan 10] [3] Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Role of stress treatments [4] Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes [5] Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems [6] An introduction to plant tissue culture. Kolkata: New Central Book LTD; 1995 [7] In vitro haploid production in higher plants, volume 4: Cereals [8] In vitro culture of higher plants [9] Haploids in higher plants: Advances and potential: Proceedings of the first international symposium, Guelph, Ontario, Canada June 10 to 14, 1974 [10] Toward doubled haploid production in the fabaceae: Progress, constraints, and opportunities [11] Isolated pea anther culture [12] Obtaining calli and regenerated plants in anther cultures of pea [13] Anther culture for haploid and doubled haploid production [14] Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis [15] Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae) [16] The effect of centrifugal treatment on the emergence of plantlet from cultured anther of tobacco [17] Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* mill [18] Androgenesis in chickpea: Anther culture and expressed sequence tags derived annotation [19] Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media [20] pea guide (Planting, growing, harvesting) [21] Chromosome techniques: Theory and practice [22] Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells [23] Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from colt cherry (*Prunus avium* × *pseudocerasus*) protoplasts [24] Electroporation modulates the embryogenic responses of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) microspores [25] In vitro haploid production in higher plants: Volume 5 - oil, ornamental and miscellaneous plants

بررسی اثر پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی بر کارایی آندروژنز در کشت بساک نخود (*Cicer arietinum* L.)

شیرین رشیدی MSc

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

محمدرضا عبداللهی PhD

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

حسن ساری‌خانی PhD

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

سیدسعید موسوی PhD

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

چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد در اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق به‌منظور تولید گیاهان هاپلوئید نخود، بساک‌های رقم بیونچ به طول یک میلی‌متر و حاوی میکروسپورهای مرحله تک‌هسته‌ای، از غنچه‌های ۳ میلی‌متری جدا شده و درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر محیط RM-1K در معرض پیش‌تیمارهای مختلف سانتریفیوژ (۱۵۰g، ۳۰۰g و ۶۰۰g هر کدام به مدت ۳، ۶ و ۱۰ دقیقه) و شوک الکتریکی (صفر، ۱۵۰، ۲۰۰ ولت) قرار گرفتند. بساک‌های تیمار شده در محیط کشت EDM حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات‌نقره به‌منظور القای کالوس و رویان کشت شدند. نتایج به‌دست‌آمده، اختلاف آماری معنی‌داری را بین سطوح مختلف سانتریفیوژ، سطوح مختلف شوک الکتریکی و اثرات متقابل آنها از نظر صفات مورد مطالعه نشان داد. بیشترین درصد رویان‌زایی در پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۶ دقیقه و ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه، ترکیب پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک الکتریکی ۱۵۰ ولت، پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۶ دقیقه، پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و ترکیب پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه و شوک الکتریکی ۲۰۰ مشاهده شد در حالی که بیشترین درصد باززایی گیاهچه از پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۶ دقیقه و همچنین ترکیب پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک الکتریکی ۱۵۰ ولت به دست آمد.

کلیدواژه‌ها: رویان‌زایی، سانتریفیوژ، شوک الکتریکی، کشت بساک، نخود

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸

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

مقدمه

پس از غلات، حبوبات دومین منبع مهم غذایی بشر هستند. نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات خوراکی است، این گیاه متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) و زیرخانواده پروانه‌آسایان (Papilionoideae) است [1]. نخود دومین محصول جهانی از حبوبات است که در ۴۸ کشور جهان با سطحی بیش از ۱۲ میلیون هکتار و تولیدی بیش از ۱۲ میلیون تن کشت می‌شود [2]. نخود هر ساله متحمل خسارات زیادی توسط بیماری‌های قارچی و آفات نباتی مانند برقرزدگی (بلاست ناشی از آسکوئیتا) و کرم پیله‌خوار می‌شود. اگرچه نخود دارای گونه‌های وحشی زیادی است که دارای صفات مطلوبی هستند، اما تلاقی آنها با گونه زراعی توسط روش‌های مرسوم اصلاح نباتات موفقیت‌آمیز نبوده است. از طرفی استفاده از روش‌های سنتی اصلاح نباتات برای تولید واریته‌های جدید بعد از دورگه‌گیری بسیار وقت‌گیر است [3]. برای همین امروزه نیاز به استفاده از تکنیک‌های جدید مانند مهندسی

ژنتیک، برای انتقال ژن‌های ایجادکننده مقاومت به آفات و بیماری‌ها [4] و تولید لاین‌های خالص از طریق روش‌های درون‌شیشه‌ای به‌منظور استفاده در پروژه‌ای اصلاحی این گیاه احساس می‌شود.

گیاهان هاپلوئید گیاهانی هستند که تعداد کروموزوم‌های سلول‌های‌شان در مرحله اسپروفیتی برابر با تعداد کروموزوم‌ها در مرحله گامتوفیتی باشد. تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف یکی از سریع‌ترین راه‌ها برای تولید گیاهان هموزیگوت است [5].

روش‌های کشت بساک و میکروسپور، روش‌هایی سریع برای دستیابی به گیاهان هاپلوئید هستند. کاربرد این روش‌ها، این امکان را می‌دهند که لاین‌های خالص هموزیگوس طی یک نسل در آزمایشگاه ایجاد شوند و برنامه‌های اصلاحی گیاهان را سرعت بخشند [3]. از دیگر کاربردهای گیاهان هاپلوئید می‌توان به برطرف‌نمودن محدودیت تولید لاین خالص در گیاهان دوپایه و خودناسازگار [6]، تسهیل مطالعات موتاسیون [7]، استفاده در مطالعات سیتوژنتیکی به‌منظور دستیابی به مونوسومی‌ها، نولی‌سومی‌ها و آنیوپلوئیدها [8] و غیره و استفاده از هاپلوئیدها در امتزاج سوماتیکی برای تولید هیبریدهای بین‌گونه‌ای [9] اشاره کرد. به هر جهت القای هاپلوئیدی در دانه گرده و باززایی گیاه و تولید گیاهان هاپلوئید در خانواده بقولات در گونه‌های کمی از قبیل نخود کفتری (*Cajanus cajan* L.) و یونجه (*Medicago spp*) [10] و نخود فرنگی [11، 12] انجام شده است. به هر جهت گیاهان این خانواده به‌شدت در مقابل روش‌های درون‌شیشه‌ای به‌ویژه آندروژنز سرخست هستند [3].

عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ گیاه مادری، شرایط فیزیولوژیکی گیاه مادری، مرحله رشدنموی دانه گرده، نوع و ترکیب محیط کشت، نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و پیش‌تیمار بر کارایی آندروژنز از طریق کشت بساک و میکروسپور اثر می‌گذارند [13].

پیش‌تیمار به‌عنوان یک عامل مهم القاکننده آندروژنز، برای هدایت میکروسپورها از مسیر گامتوفیت به سمت مسیر اسپروفیت عمل می‌کند و از توسعه میکروسپورها به سمت دانه گرده بالغ جلوگیری می‌کند [13]. پیش‌تیمارهای مختلفی از قبیل سرما، دماهای بالا، کمبود نیتروژن یا ساکاروز، مواد شیمیایی تخریب‌کننده میکروتوبول‌ها از قبیل کلشی‌سین، به‌طور شایع و پیش‌تیمارهای فیزیکی از قبیل سانتریفیوژ و اعمال شوک الکتریکی به‌طور نادر روی گل‌های نر یا بساک‌های کشت‌شده در گیاهان مختلف اعمال شده‌اند [14]. به‌کاربردن پیش‌تیمارهای فیزیکی مانند سانتریفیوژ و الکتروپوریشن القای آندروژنز را در کشت بساک گونه‌های مختلف از قبیل تاتوره، توتون، نخود و نخودفرنگی افزایش داده است [3، 15، 17].

محققین [18] در کشت بساک چهار ژنوتیپ نخود، تاثیر عواملی مانند ژنوتیپ، پیش‌تیمار سرمایی، سانتریفیوژ و فشار اسمزی و تنظیم‌کننده‌های رشد روی کارایی آندروژنز را بررسی کردند. در آزمایش این محققین میکروسپورها نتوانستند از مرحله گامتوفیتی به اسپروفیتی عبور کنند و تنها ساختارهای چندهسته‌ای مشاهده شد. تولید گیاهان هاپلوئید نخود از طریق کشت بساک از رقم کانادایی CDC Xena و رقم استرالیایی Sonali توسط محققین [3] با استفاده از برخی پیش‌تیمارهای فیزیکی از قبیل سانتریفیوژ و شوک الکتریکی به دست آمده است. همچنین اخیراً محققین دیگر با استفاده از سطوح بالای توفوردی و نیترات‌نقره در محیط کشت نیز موفق به تولید گیاهان هاپلوئید در نخود گشته‌اند [19]. علی‌رغم، اهمیت نخود در ایران تاکنون تحقیق جامعی در مورد تولید گیاهان

بالا (RM-İK) [3] حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کاینیتین و ۱۲۰ گرم در لیتر ساکاروز با pH=۶/۶ به‌عنوان محیط مایع در تیمار سانتریفیوژ و شوک الکتریکی استفاده شد.

روش کشت بساتک

غنچه‌های گل با اندازه‌های مناسب از گیاه مادری جدا شده و برای جلوگیری از مرگ میکروسپوره‌های داخل بساتک، با استفاده از فلاکس یخ از گلخانه به آزمایشگاه منتقل شدند. برای ضدعفونی سطحی غنچه‌های نخود، ابتدا غنچه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ (حجمی-حجمی) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس سه مرتبه، هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، با آب مقطر استریل و سرد شده شست‌وشو داده شدند و پس از طی این مراحل، تا زمان کشت، بساتک‌ها در داخل آب مقطر استریل سرد باقی ماندند.

به‌منظور اعمال تیمار سانتریفیوژ، ابتدا در زیر هود لامینار، تعداد ۱۰۰ بساتک از غنچه‌های مناسب ضدعفونی‌شده، به‌وسیله پنس و سوزن با دقت جدا شدند و در داخل میکروتیوب دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت RM-İK قرار گرفتند. این میکروتیوب‌ها سپس به‌وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴°C با دورهای مختلف در زمان‌های متفاوت (بسته به نوع تیمار) سانتریفیوژ شدند. به‌منظور اعمال تیمار شوک الکتریکی، الکتروُد دستگاه الکتروپوریشن به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ (حجمی-حجمی) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس با آب مقطر استریل آبکشی شد. ۱۰۰ بساتک از غنچه‌ها جداسازی شده و در داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت RM-İK قرار گرفتند. الکتروُد دستگاه در داخل این میکروتیوب‌ها قرار گرفت و ولتاژهای مختلف الکتریکی به‌صورت ۳ مرتبه پالس روی بساتک‌ها اعمال شد.

پس از اعمال تیمارهای مختلف، بساتک‌ها روی محیط کشت جامد EDM قرار گرفتند و پس از درگیری با پارافیلیم به اتاقک رشد با دمای ۲۴°C و شرایط تاریکی منتقل شدند. بساتک‌های کشت‌شده در شرایط مذکور به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. پس از گذشت ۳۰ روز تعداد کالوس‌ها و رویان‌های القاشده شمارش شده و سپس کالوس‌های رویان‌زا به‌منظور بلوغ رویان‌ها به محیط کشت EMM منتقل شدند. کالوس‌ها و رویان‌های منتقل‌شده به محیط EMM نیز تا زمان بالغ‌شدن رویان‌ها به مدت ۲۰ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲۴°C نگهداری شدند. سپس رویان‌های بالغ‌شده شمارش شده و به محیط کشت PRM به‌منظور باززایی منتقل شدند. در این مرحله رویان‌های بالغ کشت‌شده در اتاقک رشد با دمای ۲۴°C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی و همچنین رطوبت ۵۰٪ نگهداری شدند. رویان‌های بالغ هر ۲۵-۳۰ روز یک‌بار تا رسیدن به مرحله باززایی گیاه روی محیط کشت PRM واکشت شدند.

شمارش کروموزوم‌ها در گیاهان باززایی‌شده

برای مشاهده کروموزوم در گیاهان دیپلوئید مادری به‌عنوان شاهد و گیاهان هاپلوئید باززایی‌شده، از رنگ‌آمیزی با استفاده از استوکارمن استفاده شد. نوک ریشه حاصل از جوانه‌زنی بذور خود دیپلوئید و همچنین گیاهان باززایی‌شده از کشت بساتک، ابتدا در داخل محلول آلفابروموناتالین استیک‌اسید برای ۳ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و بعد از خارج‌شدن از محلول فوق، ۳ مرتبه با آب مقطر آب‌کشی شدند. بعد از طی این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت به محلول تثبیت‌کننده کارنوی شامل الکل ۹۶٪ و اسیداستیک با نسبت ۳ به ۱ (حجمی-حجمی) انتقال یافته و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر شست‌وشو شدند. مرحله هیدرولیز در محلول اسیدهیدروکلریدیک یک‌نرمال و در دمای ۶۰°C و به مدت

هاپلوئید از طریق روش‌های بیوتکنولوژی مثل آندروژن انجام نشده است. در این تحقیق اثر سطوح مختلف اعمال پیش‌تیمارهای فیزیکی از قبیل سانتریفیوژ و شوک الکتریکی روی پاسخ بساتک‌های رقم بیونیک نخود نسبت به آندروژن مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده و مراقبت‌های زراعی

این آزمایش در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا با ارتفاع ۱۷۴/۵ متر از سطح دریا و مختصات عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۵۲ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۳۲ درجه و ۴۸ دقیقه شرقی انجام شد. مواد گیاهی به‌کاررفته در این آزمایش گیاه نخود رقم بیونیک بود که از گروه نخودهای کابلی بوده و از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی کرمانشاه تهیه شد و در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی سینا کشت شد. مبدا این رقم کرمانشاه و نواحی اطراف آن است. بیونیک دارای تیپ بوته نیمه‌ایستاده، رنگ گل سفید، طول دوره رشد ۱۱۰ روز، وزن صد دانه ۳۶ گرم و رنگ بذر کرم است [20]. بذور گیاهان مادری به فاصله ۱۰ سانتی‌متری روی پشته‌های آماده‌شده با بافت خاک کلی (clay) - لوم (Loam) کشت شدند. مراقبت‌های زراعی گیاه مادری نخود شامل آبیاری و وجین علف‌های هرز بود. آبیاری به‌صورت غرقابی هر هفته یک‌بار صورت گرفت و کود مایع (N:P:K: 20:20:20؛ آوان ژل؛ اسپانیا) هر دو هفته یک‌بار به گیاهان داده شد. وجین علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. برای دسترسی مداوم به گل‌های نخود برای کشت بساتک، مراحل کشت هر دو هفته یک‌بار تکرار شد.

تشخیص مرحله رشدنوموی میکروسپورها با روش سیتولوژی

با فرارسیدن فصل گلدهی، غنچه‌های گل در اندازه‌های مختلف ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ میلی‌متری، از گیاهان مادری دوماهه نخود برداشت شدند و بساتک‌های مربوط به هر غنچه، به‌منظور تعیین مرحله رشدنومو میکروسپورها، از داخل غنچه‌ها جدا شدند. به‌منظور رنگ‌آمیزی، بساتک‌ها یک روز در محلول رنگ استوکارمن (یک‌گرم پودر کارمن در ۱۰۰ سی‌سی استیک‌اسید گلاسیال ۴۵٪)، قرار داده شدند [21]. سپس بساتک‌ها روی لام آزمایشگاهی له‌شده و میکروسپورهای درون آنها زیر میکروسپور مشاهده شدند. آن دسته از غنچه‌های گل و بساتک‌هایی که میکروسپورهای آنها در مرحله تک‌هسته‌ای بود برای انجام آزمایش استفاده شدند.

محیط‌های کشت القای رویان، بلوغ رویان و باززایی گیاهچه

در این آزمایش به‌منظور القای کالوس و رویان در بساتک‌های نخود از محیط کشت القای رویان (EDM) [3] حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات‌نقره، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی، ۴۰ گرم بر لیتر ساکاروز، ۴۰ گرم بر لیتر مالتوز و ۱۲ گرم بر لیتر آگار با pH=۵/۸ استفاده شد. برای بلوغ رویان‌ها از محیط کشت بلوغ رویان (EMM) [3] حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین (GA₃)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، ۴ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌استیک‌اسید (IAA) و یک میلی‌گرم در لیتر آبسزیک‌اسید (ABA) همراه با ۴۰ گرم بر لیتر ساکاروز، ۴۰ گرم بر لیتر مالتوز و ۱۲ گرم بر لیتر آگار با pH=۵/۸ استفاده شد و به‌منظور باززایی رویان‌ها از محیط کشت باززایی (PRM) [3] حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA)، ۳۵ گرم بر لیتر ساکاروز، ۳۵ گرم بر لیتر مالتوز و ۷ گرم بر لیتر آگار با pH=۵/۸ استفاده شد. همچنین از محیط کشت با فشار اسمزی

۶ دقیقه صورت گرفت. به منظور توقف هیدرولیز، نمونه‌های تیمارشده ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه در آب یخ صفر درجه سانتی‌گراد شست‌وشو داده شدند. پس از خشک‌کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی، برای رنگ‌آمیزی به محلول استوک‌کارمن ۱٪ به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شدند. پس از طی این مرحله، نمونه‌ها همراه با استیک‌اسید ۴۵٪ روی لام له شده و کروموزوم‌ها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ مشاهده شدند.

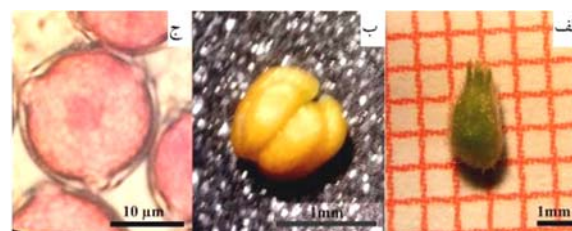
نوع تیمارها و آنالیز داده‌ها

در این تحقیق اثر دوره‌های مختلف سانتریفیوژ و ولتاژهای متفاوت شوک الکتریکی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک ژنوتیپ بیونچ بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. دوره‌های مختلف سانتریفیوژ (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰g هر کدام به مدت ۳، ۶ و ۱۰ دقیقه) به عنوان فاکتور اول و ولتاژهای مختلف شوک الکتریکی (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ولت) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. آزمایش شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل یک عدد پتری‌دیش حاوی ۳۰ عدد بساک بود. برای هر آزمایش ۹۰ بساک کشت شد. در هر پتری‌دیش (تکرار) صفات درصد کالوس‌زایی، میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس و درصد باززایی گیاهچه محاسبه شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مینی‌ت‌ب ۱۴/۰ و SPSS 16.0 انجام شد. همچنین به منظور رسم نمودارها نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ به کار رفت. به منظور نرمال‌سازی داده‌های درصدی از تبدیل $\sqrt{X} + 0.5$ استفاده شد.

یافته‌ها

تعیین مرحله رشدونموی میکروسپورها

مطالعات سیتولوژیکی در نخود نشان داد که بساک‌های جداشده از غنچه‌های ۳ میلی‌متری (شکل ۱-الف)، از نظر اندازه یک میلی‌متر طول داشتند (شکل ۱-ب) و حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی (شکل ۱-ج) بودند که مناسب‌ترین غنچه‌ها برای کشت بساک و رویان‌زایی گامتی در گیاه نخود بودند.



شکل ۱) تعیین سیتولوژیکی مرحله مناسب میکروسپورها به منظور رویان‌زایی گامتی در کشت بساک نخود؛ الف) غنچه ۳ میلی‌متری در مرحله مناسب برای جداسازی بساک‌ها، ب) یک بساک یک میلی‌متری مناسب برای کشت، ج) یک میکروسپور نخود در مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی مناسب برای القای آندروژنز

مراحل کالوس‌زایی، رویان‌زایی و باززایی گیاهچه در کشت بساک نخود

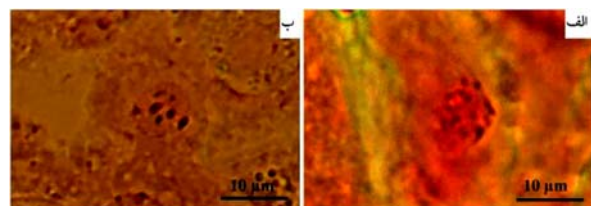
در آزمایش‌های انجام‌شده روی گیاه نخود، بساک‌های کشت‌شده (شکل ۲-الف) بعد از گذشت یک هفته شروع به متورم‌شدن در محیط کشت EDM نموده (شکل ۲-ب)، به طوری که پس از گذشت ۱۴ تا ۲۰ روز از کشت بساک در محیط کشت، کالوس‌زایی را آغاز کردند (شکل‌های ۲-ج و د). بعد از سپری‌شدن ۳۰ روز از

کشت بساک، رویان‌ها در مراحل مختلف رشدونموی (قلبی‌شکل، اژدری‌شکل و دولپه‌ای)، در تیمارهای مختلف سانتریفیوژ و شوک الکتریکی قابل مشاهده بودند (فلش‌های سیاه‌رنگ در شکل ۲-مرحله ذ و ر). در این مرحله کالوس‌های رویان‌زا به محیط بلوغ رویان‌ها (EMM) انتقال یافتند و پس از گذشت ۶-۱۰ روز از انتقال کالوس‌ها به این محیط کشت، رویان‌های القاشده شروع به رشد نمودند (شکل ۲-ز). سپس رویان‌های رشدیافته به محیط باززایی (PRM) انتقال یافتند. چند روز پس از انتقال به این محیط شروع به باززایی نمودند (شکل ۲-س) و حدود ۳۰ الی ۶۰ روز پس از انتقال رویان‌ها به محیط کشت باززایی گیاهچه‌های هاپلوئید پس از چند مرتبه واگشت به دست آمدند (شکل ۲-ش).

نتایج سیتولوژیکی نشان داد که اکثر گیاهچه‌های باززایی‌شده از کشت بساک نخود هاپلوئید بوده و سلول‌های نوک ریشه‌شان دارای $n=x=7$ کروموزوم بودند. شکل ۳ تعداد ۱۴ کروموزوم موجود در سلول نوک ریشه گیاهچه بذری نخود دیپلوئید (شکل ۳-الف) و تعداد ۷ کروموزوم موجود در یک سلول هاپلوئید مربوط به گیاهچه باززایی‌شده از کشت بساک نخود (شکل ۳-ب) را نشان می‌دهد.



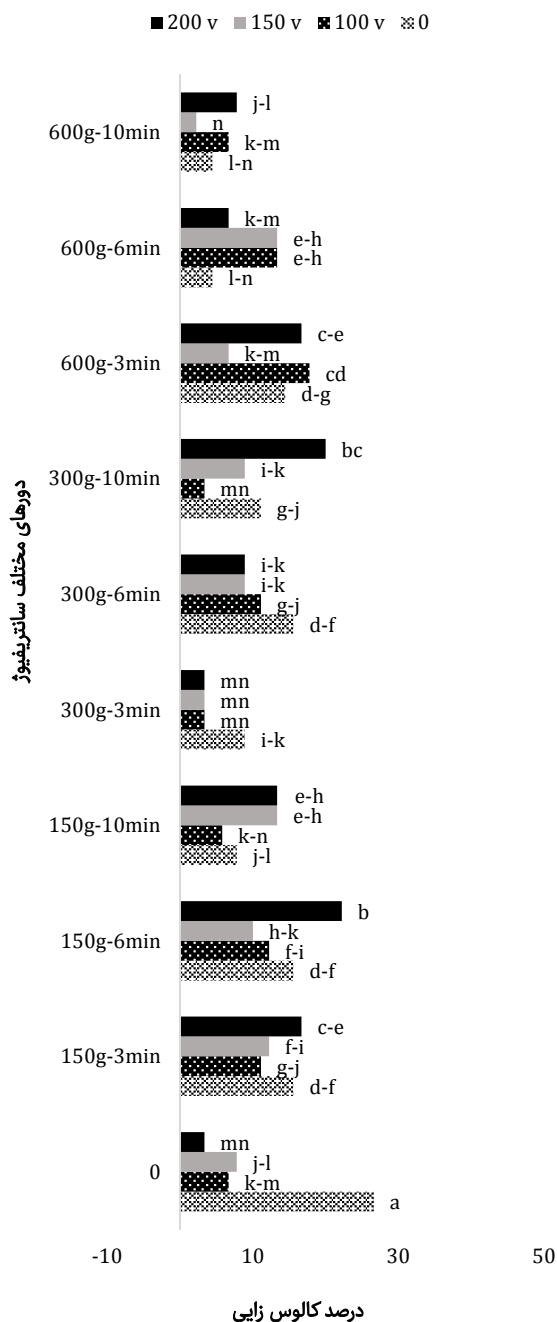
شکل ۲) مراحل القای کالوس، رویان و باززایی گیاهچه در کشت بساک نخود رقم بیونچ؛ الف) بساک‌های کشت‌شده نخود روی محیط کشت EDM، ب) یک بساک متورم‌شده نخود، یک هفته بعد از کشت روی محیط کشت، ج و د) القای کالوس در بساک‌های نخود، ۱۴ الی ۲۰ روز پس از کشت، ذ و ر) رویان‌های القاشده در مراحل مختلف رشدونموی (قلبی، اژدری و لپه‌ای) روی کالوس ۳۰ روز بعد از کشت بساک (فلش‌های سیاه‌رنگ)، ز) بلوغ رویان‌ها روی محیط کشت EDM، ۶ الی ۱۰ روز بعد از انتقال کالوس‌های حاوی رویان، س) باززایی رویان‌ها روی محیط کشت باززایی PRM، ش) یک گیاهچه هاپلوئید باززایی‌شده ۶۰ روز پس از انتقال رویان‌ها به محیط باززایی



شکل ۳) شمارش کروموزوم‌ها در سلول‌های نوک ریشه نخود دیپلوئید و سلول‌های نوک ریشه یک گیاه باززایی‌شده از کشت بساک نخود رقم بیونچ؛ الف) یک سلول دیپلوئید حاصل از نوک ریشه گیاهچه بذری نخود با ۱۴ کروموزوم ($2n=2x=14$)، ب) یک سلول هاپلوئید تهیه‌شده از نوک ریشه گیاهچه حاصل از کشت بساک نخود با ۷ کروموزوم ($n=x=7$)

میانگین رویان به ازای هر کالوس نشان داد که تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه با میانگین تعداد ۴/۲۷۶۷ رویان به ازای هر کالوس، بیشترین تاثیر را روی این صفت داشته است (نمودار ۳).

میانگین تعداد گیاه باززایی شده به ازای هر بساک: نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای مختلف شوک الکتریکی و دوره های مختلف سانتریفیوژ برای صفت میانگین گیاه باززایی شده به ازای هر بساک نشان دادند که تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه با میانگین ۰/۰۶۷ گیاه باززایی شده به ازای هر بساک و همچنین ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک الکتریکی ۱۵۰ ولت با میانگین ۰/۰۵۵۷ گیاه باززایی شده به ازای هر بساک، بیشترین فراوانی باززایی گیاه را ایجاد کردند (نمودار ۴).



نمودار ۱) مقایسه میانگین اثرات متقابل پیش تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی برای صفت درصد کالوس زایی بساک ها در کشت پساک نخود رقم بیونج

اثر پیش تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای فیزیکی سانتریفیوژ و شوک الکتریکی بر کارایی آندروژن در کشت پساک نخود در جدول ۱ نشان داده شده است. سطوح مختلف شوک الکتریکی، دوره های مختلف سانتریفیوژ و اثرات متقابل شوک الکتریکی و سانتریفیوژ اختلاف آماری معنی داری در سطح ۰/۰۰۱ برای صفات درصد کالوس زایی، میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس نشان دادند. برای صفت درصد باززایی گیاه شوک های مختلف الکتریکی و تیمارهای مختلف سانتریفیوژ در سطح ۰/۰۱ ولی اثرات متقابل شوک الکتریکی و تیمارهای سانتریفیوژ در سطح ۰/۰۰۱ اختلاف آماری معنی دار نشان دادند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها برای صفات درصد کالوس زایی، میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک، میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس و درصد باززایی گیاه به شرح زیر است:

جدول ۱) تجزیه واریانس اثر پیش تیمارهای مختلف سانتریفیوژ و شوک الکتریکی بر صفات مختلف در کشت پساک نخود رقم بیونج

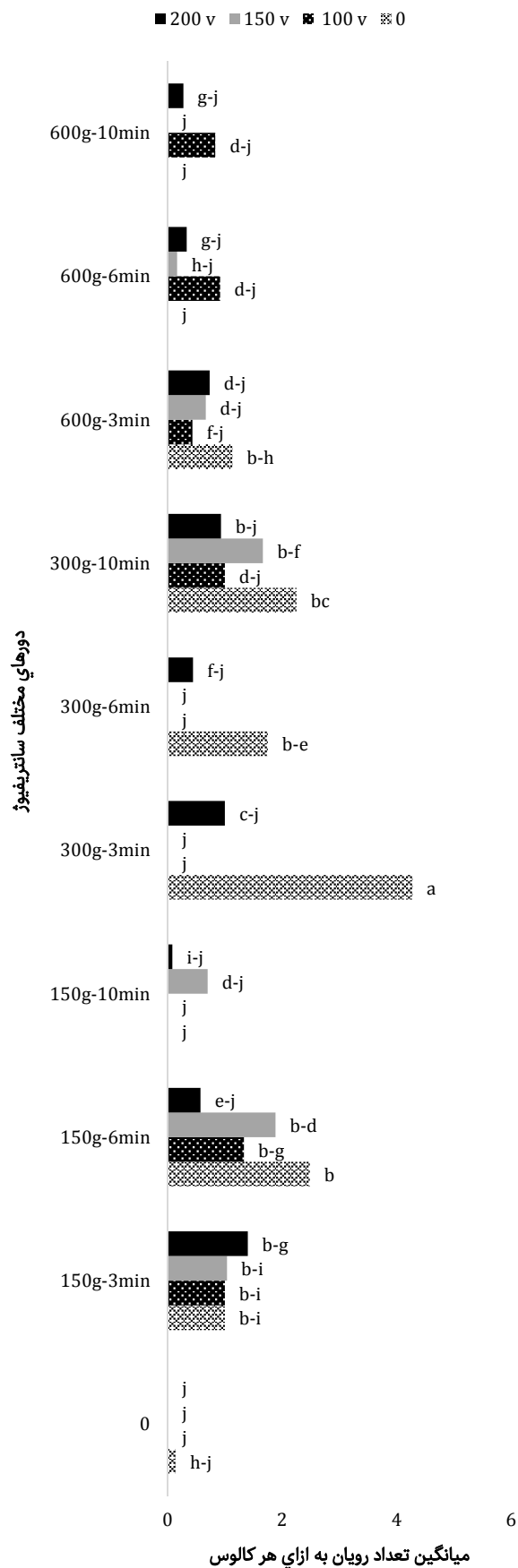
منبع تغییرات	میانگین مربعات صفات مختلف آندروژن			
	درصد کالوس زایی	تعداد رویان به ازای هر بساک	تعداد رویان به ازای هر کالوس	درصد گیاه باززایی شده
شوک الکتریکی	۱۰۹/۲۸***	۰/۰۲۸***	۰/۴۶۹***	۰/۰۰۰۳***
سانتریفیوژ	۱۴۱/۳۰***	۰/۰۲۳***	۰/۶۶۳***	۰/۰۰۰۴۱***
شوک الکتریکی * سانتریفیوژ	۸۰/۸۴۴***	۰/۰۰۸***	۰/۲۳۵***	۰/۰۰۰۳***
خطای آزمایشی	۵	۰/۰۰۳	۰/۰۶۴	۰/۰۰۰۶۵۸
ضریب تغییرات (%)	۲۱/۲۳	۶/۵۳	۲۴/۰۳	۱/۱۴

*** به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ هستند.

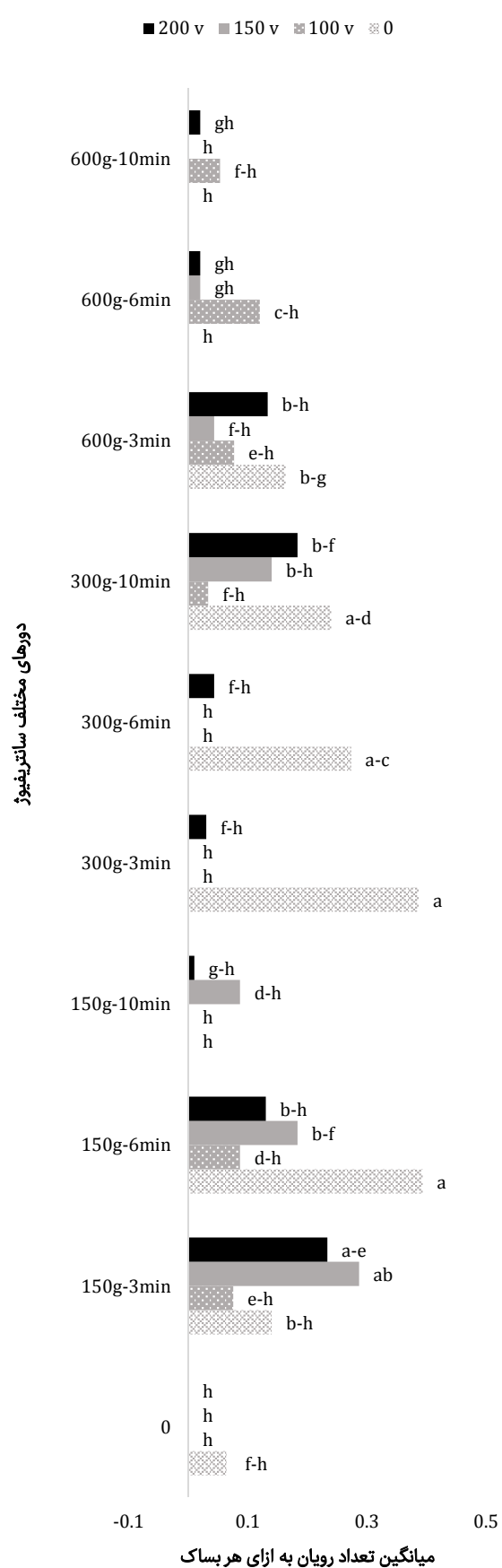
درصد کالوس زایی: مقایسه میانگین اثرات متقابل شوک الکتریکی و تیمار سانتریفیوژ برای صفت درصد کالوس زایی نشان داد که در شرایط شاهد، بیشترین درصد کالوس زایی (۲۶/۶۴٪) از بساک های کشت شده به دست آمد. پس از شاهد، ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک الکتریکی ۲۰۰ ولت و همچنین ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه با شوک الکتریکی ۲۰۰ ولت به ترتیب ۲۲/۲۲ و ۲۰٪ کالوس زایی، بیشترین درصد کالوس زایی را نشان دادند. همچنین کمترین درصد کالوس زایی مربوط به تیمار ۶۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و شوک الکتریکی ۱۵۰ ولت بود، که در این تیمار میزان کالوس زایی ۲/۲۶۷٪ بود (نمودار ۱).

میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک: بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک، در تیمارهای سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه، تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه، ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک الکتریکی ۱۵۰ ولت، پیش تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه، تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه و شوک الکتریکی ۲۰۰ ولت به ترتیب با میانگین تعداد ۰/۳۹۳۳، ۰/۳۸۶۷، ۰/۲۸۶۷، ۰/۲۷۳۳، ۰/۲۴ و ۰/۲۳۳۳ رویان به ازای هر بساک مشاهده شد و کمترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در تیمار شاهد و ترکیب تیمار سانتریفیوژ ۶۰۰g با سطوح مختلف شوک الکتریکی مشاهده شد (نمودار ۲).

میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس: مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای مختلف شوک الکتریکی و سانتریفیوژ برای صفت



نمودار ۳) مقایسه میانگین اثرات متقابل پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی برای صفت میانگین تعداد رویان به‌ازای هر کالوس در کشت بساک نخود رقم بیونج



نمودار ۲) مقایسه میانگین اثرات متقابل پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی برای صفت میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک در کشت بساک نخود رقم بیونج

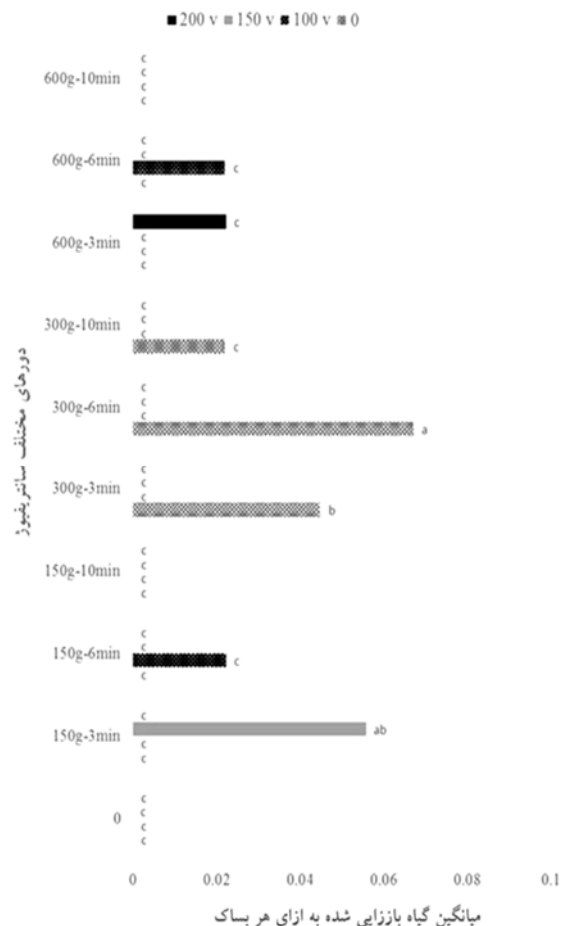
همچنین گرو/ و همکاران^[3] برای اولین بار بساک‌های دو رقم نخود (Sonali و CDC Xena) را با دوره‌های مختلف سانتریفیوژ تیمار کردند. این محققین بیشترین نرخ رویان‌زایی در رقم Sonali با اعمال پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۶۷۱g به مدت ۳ دقیقه به دست آوردند در حالی که بیشترین نرخ رویان‌زایی در رقم CDC Xena با استفاده از دور ۱۶۸g به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد. در تحقیق حاضر بیشترین نرخ رویان‌زایی بساک‌های رقم بیونج، با تیمارهای سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۶ دقیقه و ۳۰۰g به مدت ۳ دقیقه به دست آمد. نتایج این تحقیق و محققین قبلی^[3] نشان می‌دهد که ارقام مختلف نخود به پیش‌تیمار سانتریفیوژ واکنش متفاوتی دارند و هر رقم دور سانتریفیوژ و زمان مخصوص خود را برای ایجاد بیشترین نرخ آندروژن نیاز دارد.

همچنین در این تحقیق مشاهده شد که پیش‌تیمار سانتریفیوژ موجب کاهش نرخ کالوس‌زایی در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود که این نتایج با نتایج آزمایش گرو/ و همکاران^[3] روی کشت بساک نخود تطابق دارد. این محققین بیان کردند که تیمار سانتریفیوژ باعث کاهش درصد کالوس‌زایی تا ۹۰٪ نسبت به تیمار شاهد می‌شود.

در این تحقیق مشاهده شد که ترکیب پیش‌تیمار سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۳ دقیقه با شوک‌های الکتریکی ۱۵۰ و ۲۰۰ ولت به ترتیب موجب افزایش نرخ رویان‌زایی بساک‌های کشت‌شده در مقایسه با شاهد و سایر ترکیبات تیماری شد. در تطابق با این نتایج، گرو/ و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند بهترین دامنه ولتاژ الکتریکی برای تیمار بساک‌های نخود (ارقام Sonali و CDC Xena) بین ۱۲۵ تا ۲۰۰ ولت است و وقتی جریان الکتریکی بیش از ۲۵۰ ولت بود درصد کالوس‌زایی افزایش پیدا کرد ولی جینی مشاهده نشد. همچنین نتایج این تحقیق و تحقیقات گذشته^[3] نشان داد که استفاده از شوک الکتریکی در کشت بساک موجب افزایش تشکیل ریشه در گیاه باززایی‌شده می‌شود که اغلب یک مانع بزرگ در باززایی حبوبات در شرایط درون‌شیشه‌ای است^[10].

شوگ الکتریکی در تبادل مواد محیط کشت به داخل سلول نقش دارد، همچنین شوگ الکتریکی موجب رشد پرتوپلاست شده و توانایی باززایی گیاه را افزایش می‌دهد^[22, 23]. برای اولین بار ریچ و همکاران^[22] به فکر استفاده از شوگ الکتریکی در مدت زمان کم و ولتاژ بالا برای بهبود باززایی گیاه افتادند. جریان الکتریکی موجب تولید منفذ در غشای سلول می‌شوند، در نتیجه باعث تسهیل ورود مواد مورد نیاز برای رشد سلول به داخل سلول می‌شوند. براساس آزمایش‌های صورت‌گرفته، دلیتر و همکاران^[24] دریافتند که استفاده از میدان الکتریکی در کشت میکروسپور مارچوبه موجب افزایش باززایی گیاه می‌شود، اما پارامترهای الکتریکی، مانند دیگر پیش‌تیمارها به گونه و ژنوتیپ مورد استفاده بستگی دارد و ارقام مختلف واکنش متفاوتی به تیمار شوگ الکتریکی دارند^[24]. نتایج حاصل از کشت بساک نخود در تحقیق حاضر و آزمایش‌های قبلی روی نخود^[3] نیز نشان داد که پاسخ به شوگ الکتریکی به ژنوتیپ وابسته است و هر ژنوتیپ پاسخ متفاوتی به شوگ الکتریکی از نظر القای آندروژن می‌دهد.

نتایج آزمایش سیتولوژی برای شمارش کروموزوم‌ها نشان داد که اکثر گیاهان باززایی‌شده از کشت بساک نخود هاپلوئید بودند و تعداد ۷ کروموزوم در سلول‌های ریشه خود داشتند. تعداد کمی از گیاهان باززایی‌شده دیپلوئید بودند که می‌تواند ناشی از باززایی سلول‌های دیپلوئید دیواره بساک یا هاپلوئید مضاعف خودبه‌خودی باشد که در اثر امتزاج هسته میکروسپورها یا مکانیزم‌های دیگر به



نمودار ۴) مقایسه میانگین اثرات متقابل پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ و شوگ الکتریکی برای صفت میانگین تعداد گیاه باززایی‌شده به ازای هر بساک، در کشت بساک نخود رقم بیونج

بحث

در تحقیق حاضر تولید گیاهان هاپلوئید نخود با اعمال پیش‌تیمارهای فیزیکی سانتریفیوژ و شوگ الکتریکی روی بساک‌ها به صورت موفقیت‌آمیز حاصل شد. در قسمت اول این تحقیق براساس نتایج آزمایش سیتولوژی مشخص شد که غنچه‌های ۳ میلی‌متری نخود حاوی بساک‌های یک میلی‌متری با میکروسپورهایی در مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی، بهترین مرحله برای رویان‌زایی گامتی در کشت بساک نخود بودند که این نتایج با یافته‌های محققین قبلی^[3] در کشت بساک نخود تطابق دارد.

در تحقیق حاضر استفاده از پیش‌تیمار سانتریفیوژ منجر به بهبود صفات آندروژنیک در رقم بیونج نخود شد. در تطابق با نتایج این تحقیق، اثر مثبت پیش‌تیمار سانتریفیوژ روی القای آندروژن برای اولین بار در سال ۱۹۷۳ در کشت بساک توتون^[16] و در سال ۱۹۷۷ روی کشت بساک تاتوره^[17] گزارش شد. تاکاتا و همکاران در سال ۱۹۷۳ نشان دادند که وقتی بساک حاوی میکروسپورها در مرحله تک‌هسته‌ای یا مراحل اولیه دوهسته‌ای در معرض نیروی گریز از مرکز ۱۰۰۰۰g تا ۱۱۰۰۰g برای ۳۰ دقیقه قرار گیرند درصد باززایی گیاهچه هاپلوئید چهار برابر می‌شود. این محققین نتیجه گرفتند که تیمار سانتریفیوژ نسبت اکسین به سیتوکینین را تغییر می‌دهد و در نتیجه باعث تسهیل القای جنین از میکروسپور می‌شود. پیش‌تیمار سانتریفیوژ القای آندروژن را در کشت بساک تاتوره نیز افزایش داده است.

Rome: FAO; 2016 [cited 2016 Jan 10]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf>

3- Grewal RK, Lulsdorf M, Croser J, Ochatt S, Vandenberg A, Warkentin TD. Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Role of stress treatments. *Plant Cell Rep.* 2009;28(8):1289-99.

4- Krishnamurthy KV, Suhasini K, Sagare AP, Meixner M, De Kathen A, Pickardt T, et al. Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. *Plant Cell Rep.* 2000;19(3):235-40.

5- Maluszynski M, Szarejko I, Barriga P, Balcerzyk A. Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems. *Euphytica.* 2001;120(3):387-98.

6- Kumar DK. An introduction to plant tissue culture. Kolkata: New Central Book LTD; 1995. p. 185.

7- Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux R, editors. In vitro haploid production in higher plants, volume 4: Cereals. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996.

8- Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Leiden: Martinus Nijhoff Publishers; 1987.

9- University of Guelph. Haploids in higher plants: Advances and potential: Proceedings of the first international symposium, Guelph, Ontario, Canada June 10 to 14, 1974. Kasha KJ, editor. Guelph: University of Guelph; 1974. p.421.

10- Croser JS, Lulsdorf MM, Davies PA, Clarke HJ, Bayliss KL, Mallikarjuna N, et al. Toward doubled haploid production in the fabaceae: Progress, constraints, and opportunities. *Crit Rev Plant Sci.* 2006;25(2):139-57.

11- Bobkov SV. Isolated pea anther culture. *Russ Agric Sci.* 2010;36(6):413-6.

12- Bobkov S. Obtaining calli and regenerated plants in anther cultures of pea. *Czech J Genet Plant Breed.* 2014;50(2):123-29.

13- Germanà MA. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104(3):283-300.

14- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum.* 2006;127(4):519-34.

15- Ochatt S, Pech C, Grewal R, Conreux C, Lulsdorf M, Jacas L. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). *J Plant Physiol.* 2009;166(12):1314-28.

16- Tanaka M. The effect of centrifugal treatment on the emergence of plantlet from cultured anther of tobacco. *Jpn J Breed.* 1973;23(4):171-4. [Japanese]

17- Sangwan-Norreel BS. Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of datura innoxia mill. *J Exp Bot.* 1977;28(105):843-52.

18- Panchangam SS, Mallikarjuna N, Gaur PM, Suravajhala P. Androgenesis in chickpea: Anther culture and expressed sequence tags derived annotation. *Indian J Exp Biol.* 2014;52(2):181-8.

19- Abdollahi MR, Rashidi Sh. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2018;133(1):39-49.

20- Jahangiri A, Hagh Parast R, Sabagh Nia N, Moradi N, Yavari I, Sadegh Zade Ahari D, et al. pea guide (Planting, growing, harvesting). Karaj: Agricultural Research Education and Extension Organization; 2015. [Persian]

21- Sharma AK, Sharma A. Chromosome techniques: Theory and practice. London: Butterworths; 1972. p.

وجود آمده باشد. به هر جهت تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف خودبه‌خودی در آزمایش محققین قبلی نیز گزارش شده است. [3, 24, 25]

این تحقیق برای اولین بار در ایران صورت گرفت و به‌طور موفقیت‌آمیزی منجر به تولید گیاهان هاپلوئید نخود شد. با توجه به این که تاکنون تولید گیاهان هاپلوئید نخود در دنیا فقط از طریق کشت بساک به دست آمده، امید است که نتایج این تحقیق بتواند در تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف نخود در حجم زیاد برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و مطالعات انتقال ژن موثر واقع شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم دسترسی به دستگاه الکتروپوریشن با دقت بالا (شرکتی) بود به همین خاطر آزمایش‌های مربوط به اعمال تیمارهای شوک الکتریکی با دستگاه الکتروپوریشن طراحی شده در داخل آزمایشگاه انجام شد.

پیشنهاد می‌شود که ژنوتیپ‌های بیشتری از نخود از نظر پاسخ به آندروژنز مورد مقایسه قرار گیرند. ترکیب پیش‌تیمارهای دمایی با تیمارهای مختلف سانتریفیوژ و شوک الکتریکی مورد بررسی قرار گیرد. اعمال پیش‌تیمارهای سانتریفیوژ و شوک الکتریکی در آزمایش کشت میکروسپور نخود مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در این آزمایش بیشترین درصد رویان‌زایی گامتی از بساک‌های تیمار شده نخود با دور سانتریفیوژ ۱۵۰g به مدت ۶ دقیقه به دست آمد و بیشترین درصد باززایی گیاهچه از رویان‌های حاصل، مربوط به تیمار سانتریفیوژ ۳۰۰g به مدت ۶ دقیقه بود. به‌طور کلی تیمارهای شوک الکتریکی و سانتریفیوژ درصد کالوس‌زایی را نسبت به تیمار شاهد کاهش دادند ولی درصد رویان‌زایی و درصد باززایی گیاهچه را افزایش دادند.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از کلیه اساتید و پژوهشگران دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان که در تحقیق حاضر همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار است و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان‌نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده شده است، رعایت کامل امانت انجام شده و مطابق مقررات، به تمامی آنها در فهرست منابع و مآخذ مقاله اشاره شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: شیرین رشیدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ محمدرضا عبداللّهی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ حسن ساری‌خانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/روش‌شناس (۱۰٪)؛ سیدسعید موسوی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی این تحقیق توسط دانشگاه بوعلی‌سینا همدان تامین شده است.

منابع

- 1- Kochaki A, Banayan M. Pulse crops. Mashhad: Javid; 1989. [Persian]
- 2- Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food and agriculture [Internet].

24- Delaitre C, Ochatt S, Deleury E. Electroporation modulates the embryogenic responses of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) microspores. *Protoplasma*. 2001;216(1-2):39-46.

25- Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux R, editors. In vitro haploid production in higher plants: Volume 5 - oil, ornamental and miscellaneous plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 258.

575.

22- Rech EL, Ochatt SJ, Chand PK, Power JB, Davey MR. Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma*. 1987;141(2-3):169-76.

23- Ochatt SJ, Chand PK, Rech EL, Davey MR, Power JB. Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from colt cherry (*Prunus avium* × *pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Sci*. 1988;54(2):165-9.