مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی گیاه خیار (Cucumis Sativus L.) با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ

مریم عبدلی نسب[1]*

[1]استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان. کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۱

چکیده

رقم سوپرنیا خیار یکی از ارقام مهم هیبرید وارداتی با عملکرد بالا می‌باشد. به منظور بهینه کردن تکثیر غیرجنسی این رقم از طریق کشت درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های مختلف کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ در محیط پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) تحت أثر غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون ۱- نفتالن استیک اسید (NAA) در ترکیب با غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP) قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و تعداد پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس‌های رویان‌زا و فراوانی تولید نوساقه در ریزنمونه‌های کشت شده مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین میزان کالوس‌زایی (۸۶/۶ درصد) در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار هورمونی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا (۶۱/۶ درصد) در ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین تعداد نوساقه (۲۰/۰۸) در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار هورمونی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. نوساقه‌های باززا شده جهت القا و تشکیل ریشه به محیط MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA منتقل و سپس گیاهچه‌های رشدیافته به محیط خارج آزمایشگاه سازگار گردیدند. بر اساس نتایج این مطالعه، استفاده از ریزنمونه کوتیلدون جهت ریزازدیادی و باززایی این ژنوتیپ به‌خصوص در مطالعات انتقال ژن توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *ریزازدیادی، کشت درون شیشه‌ای، خیار، NAA، BAP.*

* نویسنده مسئول: مریم عبدلی نسب تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱ Email : m.abdolinasab@kgut.ac.ir

مقدمه

کدوئیان[۱] یکی از مهمترین خانواده‌های گیاهی (Rajagopalan *et al*., 2005) و هندوانه، کدو، خربزه و خیار چهار محصول اقتصادی مهم این خانواده می‌باشند (Lebeda *et al*., 2007). خیار (Cucumis Sativus) به عنوان یکی از محصولات مهم این خانواده، اولین گیاه اهلی شده آسیای مرکزی Abu-Romman *et al*. (2013) و چهارمین محصول سبزی مهم در جهان بعد از گوجه فرنگی، کلم و پیاز می‌باشد (Lv *et al*., 2011). این سبزی با وجودی که دارای مقادیر ناچیزی انرژی، مواد معدنی و پروتئین است، به دلیل وجود مواد معطر و مؤثر و اثرات مفیدی که در تغذیه دارد از زمان‌های بسیار قدیم مورد توجه مردمان و اقوام دیارهای مختلف از جمله هندوستان، مصر و یونان بوده است (Milnear, 2000). از چالش‌های مطرح در تکثیر این گیاه، دستیابی و فراهم آوردن بذور یکنواخت هیبرید با عمکرد بالا می‌باشد که حدود ۳۰ درصد هزینه تولید این محصول را در بر می‌گیرد (Ugandhar *et al*., 2011). استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی به دلیل انتقال صفات گیاهان مادری به طور کامل به نسل بعد جهت تکثیر گیاهان مطلوب مورد انتخاب موردتوجه است. از مهم‌ترین روش‌های تکثیر غیرجنسی گیاه خیار، بالاخص جهت تکثیر گیاهان هیبرید مطلوب و قطع وابستگی به واردات بذور هیبرید، روش تکثیر درون شیشه‌ای[۲] است (Ahmad & Anis, 2005). افزون بر این، استفاده از روش‌های کشت بافت و پرورش ریزنمونه گیاهان در محیط کشت مصنوعی، جهت انجام مطالعات بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن و دستکاری‌های ژنتیکی Jesmin & Mian (2016) و دستیابی به تنوع سوماکلونال Jeyakumar & Kamaraj (2015) اجتناب ناپذیر است. یافتن رقم، نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت که منجر به بهترین عملکرد در شرایط کشت بافت شود در ریزازدیادی گیاه خیار بسیار حائز اهمیت است (Abu-Romman *et al*., 2013). مطالعات نشان می‌دهد برهمکنش هورمون‌های گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکنین نقش مهمی در موفقیت باززایی ریزنمونه‌ها در شرایط کشت بافت دارند (Custers & Verstappen, 1989). در بررسی اثر هورمون‌های 2,4,D، هورمون ۱- نفتالن استیک اسید[۳] (NAA)، ۶- بنزیل آمینوپورین[۴] (BAP) و کینتین[۵] (KIN) بر باززایی ریزنمونه کوتیلدونی تعدادی رقم خیار، بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمار هورمونی ۵ µM BAP + ۰/۵ µM 2,4,D و بیشترین میزان تولید نوساقه در

[۱] Cucurbitaceae

[۲] In vitro propagation

[۳] 1-Naphthaleneacetic acid

[۴] 6-Benzylaminopurine

[۵] Kinetin

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تیمار هورمونی ۰/۵ µM NAA + ۵ µM BAP گزارش گردید (Kim *et al*., 2011). در بررسی غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP، KIN، IAA+BAP و IAA+KIN در باززایی ریزنمونه-های کوتیلدون و هیپوکوتیل گیاه خیار، بیشترین درصد تولید نوساقه در تیمار هورمونی IAA mg/L ۰/۵ + mg/L BAP ۳ مشاهده گردید (Ugandhar *et al*., 2011). در مطالعه دیگری، باززایی ریزنمونه گره گیاه خیار رقم دستگردی تحت اثر غلظت‌های مختلف IBA به همراه KIN مورد بررسی قرار گرفته و بیشترین درصد باززایی در تیمار mg/L KIN ۱/۵ و بیشترین طول نوساقه در تیمار mg/L IBA ۰/۰۲۵+ mg/L KIN ۱ گزارش گردید (Otroshy & Mokhtari, 2014). Hassan Pour *et al*. (1996) ضمن مقایسه روش‌های جنین‌زایی رویشی، اندام‌زایی و کشت تک جوانه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ Murashige & Skoog (1962) به همراه هورمون‌های NAA و KIN، روش کشت تک جوانه را برای تکثیر سریع خیار پیشنهاد نمود. Khoshbakht *et al*. (1995) گزارش کرد ریزنمونه جوانه‌های جانبی خیار رقم طاها و نبیل در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[1] (MS) حاوی mg/L NAA ۰/۱ + mg/L KIN ۰/۱ ریشه‌دار شده و تولید گیاهچه می‌نمایند، ضمن اینکه رقم طاها نسبت به رقم نبیل عکس‌العمل بهتری نشان می‌دهد. Hajibabaei *et al*. (2010) در بررسی اثر هورمون‌های NAA، BAP و GA_3 در غلظت‌های مختلف بر مراحل پرآوری شاخه و ریشه‌زایی خیار گلخانه‌ای رقم سلطانی از ریزنمونه های جوانه جانبی و جوانه انتهایی استفاده نمودند. نتایج نشان داد در ریزنمونه جوانه جانبی، حداکثر تعداد گره، طول شاخه و طول ریشه و حداقل قطر کالوس تحتانی در محیط کشت فاقد هورمون، حداکثر تعداد ریشه در محیط کشت دارای NAA و حداکثر وزن تر شاخساره در محیط کشت فاقد هورمون و محیط حاوی mg/L GA_3 ۰/۵به دست آمد. در باززایی از ریزنمونه جوانه انتهایی، حداکثر تعداد گره در محیط کشت فاقد GA_3 با و یا بدون BAP و همچنین محیط کشت دارای BAP و GA_3 mg/L ۰/۵ حاصل گردید. همچنین در بررسی تاثیر اندازه ریزنمونه‌های میانگره، جوانه انتهایی و همچنین شرایط کشت در باززایی گیاه خیار، مشخص گردید ریزنمونه‌های بزرگ‌تر و با زاویه کشت مناسب و همچنین ظروف کشت با امکان هوادهی بهتر تاثیر مثبتی در باززایی این گیاه دارند (Custers & Verstappen, 1989). علیرغم گزارشات متعدد از کشت درون شیشه ای گیاه خیار، فراوانی باززایی ریزنمونه‌ها بسیار پایین می باشد. مطالعات دقیق‌تر نشان می‌دهد که موفقیت باززایی از ریزنمونه‌های مختلف این گیاه به میزان زیادی به نوع ژنوتیپ وابسته است (Wehner & Locy, 1981; Kim *et al*., 2011; Abu-Romman

[1] Murashige and Skoog

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

et al., 2013). رقم سوپرنیا (گریفاتون)، رقم زودرس، مقاوم به ویروس موزاییک خیار و ویروس موزاییک خربزه، یکی از ارقام پر محصول وارداتی خیار می‌باشد. با توجه به اهمیت کشت درون شیشه‌ای خیار در ازدیاد ارقام پر محصول، در این مطالعه اثر ترکیبات هورمونی NAA و BAP که از پرکاربردترین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌باشند، بر کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه های مختلف رقم سوپرنیا بررسی می‌گردد تا ضمن تعیین بهترین محیط هورمونی در تقابل با ریزنمونه، شرایط تکثیر آن در شرایط کشت بافت فراهم گردد. به طوری که مشکلات تولید و تکثیر این گیاه به شیوه مرسوم را حل نموده و ضمن تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری ازعوامل بیماریزا، با تولید انبوه آن با هزینه‌ای پایین، از خروج ارز از کشور جهت واردات سالانه بذور هیبرید این رقم پر محصول نیز جلوگیری گردد. همچنین با بهینه‌سازی تولید کالوس از ریزنمونه‌های مختلف می‌توان از آن در جهت برنامه‌هایی مانند انتقال ژن و کشت پروتوپلاست استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

بذور خیار رقم تجاری سوپرنیا از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذور به مدت ۲ ساعت تحت آب روان قرار گرفته و سپس به صورت سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از خشک کردن بذور بر روی کاغذ صافی استریل، به محیط جوانه‌زنی MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار منتقل‌شدند. بذور کشت شده، بر روی محیط جوانه‌زنی در دمای۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز تحت رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ جهت باززایی مورد استفاده قرار گرفتند. سه روز پس از کشت، بذور جوانه زدند. پس از گذشت ۶ روز از زمان جوانه‌زنی بذور، کوتیلدون‌ها به صورت انحنادار از محل اتصال به ساقه به نحوی جدا شدند که هیچ بخشی از جوانه همراه آن نباشد. ریزنمونه‌های کوتیلدونی به قطعات $5\times5mm^2$ و هیپوکوتیل به قطعات mm ۶–۸ تقسیم شدند. برگ گیاهچه‌های ۱۶ روزه برداشت و به قطعات $5\times5mm^2$ تقسیم گردید. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی NAA و BAP (Duchefa, Netherland) (جدول ۱) کشت شدند. این آزمایش با ۲۰ ترکیب هورمونی و سه ریزنمونه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و تعداد پنج ریزنمونه در هر تکرار اجرا گردید. سپس نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای حدود ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت

تاریکی تحت نور فلورسنت سفید نگهداری شده و هر سه هفته یک‌بار واکشت گردیدند.

فراوانی کالوس تولید شده با شمارش تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کردند به تعداد ریزنمونه اولیه به صورت درصد محاسبه گردید. حجم کالوس بر مبنای میزان سطحی که توسط کالوس پوشیده شده بر اساس شاخص هوکر و نی برز Hooker & Nabors (1977) تعیین و درصد کالوس‌های رویان‌زا در مقایسه با سطح کالوس اولیه به‌دست آمد. فراوانی نوساقه‌ها، با محاسبه میانگین تعداد نوساقه تولید شده در هر تیمار هورمونی به تعداد کل نوساقه‌ها به‌دست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین بر اساس روش استیودنت- نیومن- کلز[۱] به کمک نرم افزار V. 9.2 SAS انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه واریانس، تست نرمالیته توزیع اشتباهات آزمایشی با محاسبه چولگی[۲]، کشیدگی[۳] داده‌ها و آزمون‌های کلموگروف-اسمیرنوف[۴]، شاپیرو ویلک[۵] و اندرسون دارلینگ[۶] به کمک نرم افزار SAS V. 9.2 انجام و در صورت لزوم تبدیل داده انجام گرفت.

جهت ریشه‌دار کردن نوساقه های تولید شده، محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA استفاده گردید. پس از ریشه‌زایی، جهت سازگاری گیاهان با شرایط خارج آزمایشگاه، پس از حذف محیط کشت و شستشو ملایم ریشه-ها، گیاهان ابتدا به پرلیت استریل منتقل و به منظور حفظ رطوبت با سرپوش شفاف پوشانده شدند. پس از یک هفته، سرپوش حذف و گیاهان به گلدان حاوی یک سوم خاک مزرعه، یک سوم ماسه شسته و یک سوم خاکبرگ منتقل گردیدند.

نتایج و بحث

بذور سه روز پس از کشت در محیط MS، جوانه زده و شروع به رشد کردند. کالوس‌زایی، ده روز پس از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها بر روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی شروع شد. پس از دو دور واکشت کالوس‌ها بر روی محیط هورمونی، نوساقه‌ها القا گردیدند (شکل۱، ۲ و ۳). نوساقه‌های رشد یافته جهت ریشه دهی به محیط MS ½ حاوی هورمون NAA منتقل شدند (شکل۴).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در مورد درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس‌های رویان‌زا و تعداد نوساقه در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف هورمونی نشان داد که از لحاظ صفت کالوس‌زایی در سطح احتمال ۵٪ بین اثر متقابل

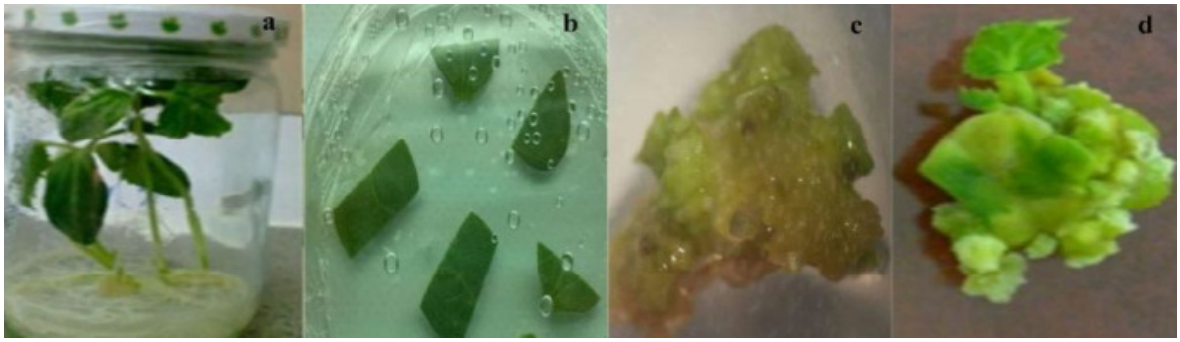
[۱] Student–Newman–Keuls (SNK)
[۲] Kurtosis
[۳] Skewness
[۴] Kolmogotov-Smirnov
[۵] Shapiro-Wilk
[۶] Anderson- Darling

ریزنمونه‌های مختلف با تیمارهای هورمونی NAA و BAP استفاده شده اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در بررسی درصد کالوس‌های رویان‌زا و تعداد نوساقه، اثر متقابل ریزنمونه و هورمون NAA در سطح احتمال ۵٪ و مابقی در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی دار نشان دادند (جدول۲).

به منظور برآورد بهتر اثرات عوامل هورمونی مورد مطالعه، مقایسه میانگین داده‌ها برای "درصد کالوس‌زایی"، "درصد کالوس‌های رویان‌زا" و "فراوانی نوساقه" به روش استیودنت-نیومن-کلز انجام گرفت (جدول ۳). بیشترین درصد کالوس-زایی هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید.

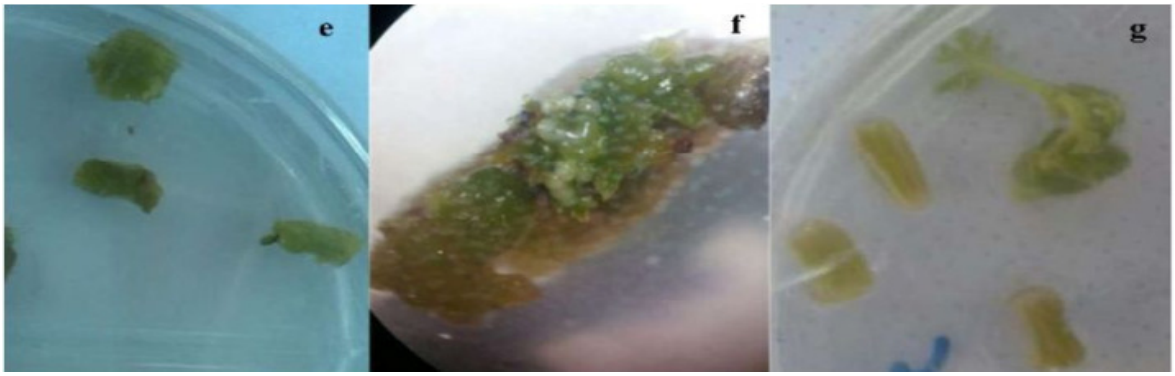
در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین درصد با میانگین ۸۶/۶ درصد در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار کالوس‌زایی در تیمار هورمونی NAA (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۷۰ درصد و در ریزنمونه برگ با میانگین ۵۸/۳۳ درصد در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید. در بررسی اثر تیمارهای هورمونی استفاده شده بر روی رویان‌زایی کالوس-ها، بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا با میانگین ۶۱/۶ درصد در ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار هورمونی NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید. در ریزنمونه کوتیلدون، بیشترین درصد در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۴ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۵۴/۳ درصد و در ریزنمونه برگ با میانگین ۵۵ درصد در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید. اثر تیمارهای هورمونی استفاده شده بر روی باززایی نشان داد که بیشترین تعداد نوساقه با میانگین ۲۰/۰۸ در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید. در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین میزان در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۳/۵ و در ریزنمونه برگ با میانگین ۳/۷۶ درصد در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید.

این گیاهچه‌ها پس از سازگاری در اتاق رشد فیتوترون برای سازگار شدن به محیط طبیعی، به گلخانه منتقل شدند. حدود ۹۵ درصد از گیاهچه-های تولید شده در شرایط کشت بافت مورد اشاره، در شرایط گلخانه نیز زنده ماندند و رشد مطلوبی از خود نشان دادند.



شکل۱- مراحل مختلف باززایی گیاه خیار از ریزنمونه کوتیلدون بر روی محیط کشت MS به همراه غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP a: کشت بذور در شرایط درون شیشه‌ای جهت تهیه ریزنمونه b: کشت قطعات ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP، c: کالوس‌دهی ریزنمونه کوتیلدون d: تشکیل نوساقه پنج هفته پس از کشت ریزنمونه بر روی محیط.

Fig1: Different stages of cucumber plant regeneration from cotyledon explant on the MS medium supplemented with different concentrations of NAA and BAP hormones a: The seed cultivation in vitro condition to prepare explant b: The culturing of the cotyledon explant segments on the MS medium containing different concentrations of NAA and BAP hormones c: The callus production from the cotyledon explant d: The shoot formation after five weeks of explant culture on the medium.



شکل۲- مراحل مختلف باززایی گیاه خیار از ریزنمونه هیپوکوتیل بر روی محیط کشت MS به همراه غلظت های مختلف هورمون‌های NAA و BAP e: تشکیل کالوس از قطعات ریزنمونه هیپوکوتیل کشت شده بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP f: کالوس‌های رویانزا حاصل از قطعات هیپوکوتیل کشت شده g: تشکیل نوساقه بر روی قطعات هیپوکوتیل کشت شده.

Fig2: Different stages of cucumber plant regeneration from hypocotyl explant on the MS medium supplemented with different concentrations of NAA and BAP hormones. e: The callus production of the hypocotyl explant segments on the MS medium containing different concentrations of NAA and BAP hormones f: The embryonic calli derived of hypocotyl explant segments g: The shoot formation on the cultured hypocotyl fragments.

شکل۳-: مراحل مختلف باززایی گیاه خیار از ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS همراه با غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP h: کشت قطعات ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف هورمون‌های NAA و BAP i: تشکیل کالوس بر روی قطعات برگی کشت شده بر روی محیط j: باززایی قطعات برگی کشت شده.

Fig.3: Different stages of cucumber plant regeneration from hypocotyl explant on the MS medium supplemented with different concentrations of NAA and BAP hormones. h: The culturing of the leaf explant segments on the MS medium containing different concentrations of NAA and BAP hormones i: The callus production from the cultured leaf explant segments on the mediumj: The regeneration of cultured leaf segments.

شکل۴- القای ریشه‌زایی در نوساقه‌های رشد یافته و سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط برون شیشه‌ای k: تشکیل ریشه در نوساقه‌های انتقال یافته به محیط کشت MS حاوی هورمون اکسین، l: گیاه کامل رشد یافته در شرایط درون شیشه، m: سازگاری گیاهان حاصل از باززایی به شرایط برون شیشه.

Fig.4: Root induction of the grown shoots and adaptation of seedlings to the in vivo conditions. k: Root formation in the transferred shoots to the MS medium containing auxin hormone, l: Full grown plant in vitro condition, m: Adaption of the regenerated plants to in vivo.

جدول۱- غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP جهت کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ گیاه خیار.

Table 1- Different cocentrations of NAA and BAP hormones for callogenesis and regeneration of cotyledon, hypocotyl and leaf explants in cucumber.

کد تیمار Treatment code	BAP میلی‌گرم بر لیتر (mg/L)	NAA میلی‌گرم بر لیتر (mg/L)	کد تیمار Treatment code	BAP میلی‌گرم بر لیتر (mg/L)	NAA میلی‌گرم بر لیتر (mg/L)
K	3	0.2	A	1	0
L	4	0.2	B	2	0
M	1	0.3	C	3	0
N	2	0.3	D	4	0
O	3	0.3	E	1	0.1
P	4	0.3	F	2	0.1
Q	1	0.4	G	3	0.1
R	2	0.4	H	4	0.1
S	3	0.4	I	1	0.2
T	4	0.4	J	2	0.2

کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان به میزان زیادی به القای کالوس و به دنبال آن باززایی گیاه وابسته است (Murphy, 2003). القای کالوس و سپس باززایی مزیت بیشتری نسبت به باززایی مستقیم در انتقال ژن دارد از آنجا که انتخاب مؤثر کالوس‌ها منجر به دستیابی به ترانس‌ژن های مطلوب می‌گردد (Radhakrishnan *et al*., 2007). القای کالوس موفق تحت تاثیر نوع ریزنمونه و شرایط کشت بافت می‌باشد (Ozgen *et al*., 1998). گونه‌های مختلف خانواده کدوییان در ریزازدیادی رفتار متفاوتی دارند، این تفاوت به میزان زیادی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از جمله، نوع ژنوتیپ، ترکیبات محیط کشت به‌خصوص نوع و غلظت هورمون‌ها، شرایط فیزیکی رشد مانند نور، دما و رطوبت می‌باشد (Kathal *et al*., 1988). اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها از معمول‌ترین هورمون‌های گیاهی در کشت بافت انواع ریزنمونه‌های گیاهی هستند.

جدول۲- تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات ارزیابی شده در کشت درون شیشه ای خیار.

Table 2- Analysis of variance for evaluated traits in vitro culture of cucumber.

فراوانی نوساقه **Shoot frequency**	کالوس رویانزا **Embryonc calli**	کالوس‌زایی **Callogenesis**	منابع تغییرات **Source of variation**
0.456	1.645	0.488	ریزنمونه Explant
0.203	0.518	1.275	NAA
3.192	0.283	0.758	BAP
**1.364	**0.964	**0.508	NAA*BAP
*0.211	*0.067	**.4821	ریزنمونه* NAA Explant*NAA
**0.387	**0.921	**1.575	ریزنمونه* BAP Explant*BAP
**0.314	**0096	**0.0756	ریزنمونه*NAA*BAP Explant*NAA*BAP
0.134	0.033	0.267	خطا Error
9.88	10.62	9.25	ضریب تغییرات (CV٪)

* و** به ترتیب اختلاف آماری معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

* and* * Statistically significant difference of 0.05 and 0.01 respectively.

جدول۳- مقایسه میانگین داده‌های درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس‌های رویان‌زا و فراوانی نوساقه حاصل از کشت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ خیار تحت تاثیر تیمارهای هورمونی مختلف.

Table 3- The comparing means analysis of the percentage of callogenesis, embryonic calli and shoot frequency resulting of hypocotyl, cotyledon and leaf explant cultures under the effect of different hormone treatments.

برگ Leaf			هیپوکوتیل Hypocotyl			کوتیلدون Cotyledon			
فراوانی نوساقه Frequency of shoot	کالوس رویان‌زا Embryonic calli	کالوس زایی Callogenesis	فراوانی نوساقه Frequency of shoot	کالوس رویان زا Embryonic calli	کالوس زایی Callogenesis	فراوانی نوساقه Frequency of shoot	کالوس رویان‌زا Embryonic	کالوس زایی Callogenesis	تیمار Treatment
0.2 ^{h}	5.66 ^{f}	15.33 ^{gh}	0.27^{ij}	13^{i}	19 ^{h}	0.16 ^{f}	5.6 ^{e}	16.6 ^{gh}	**A**
0.26 ^{h}	15 ^{bc}	13.33^{h}	0.27^{j}	17h^{i}	20 ^{h}	0.33^{ef}	15 ^{bcd}	12.3 ^{h}	**B**
0.533^{gh}	12.33^{cde}	19 ^{fg}	0.45^{hi}	19^{gh}	20 ^{h}	0.33 ^{ef}	12.3^{cde}	26.6 ^{fg}	**C**
0.666^{fgh}	10 ^{de}	21.3 ^{f}	0.54 ^{gh}	15^{hi}	21.6 ^{h}	0.58 ^{ef}	10 ^{de}	16.3 ^{gh}	**D**
0.35^{h}	11.66^{de}	39.33 ^{de}	0.33 ^{ij}	20^{gh}	33.3 ^{fg}	0.33 ^{ef}	11.6 ^{de}	56.6 ^{bc}	**E**
0.333^{h}	9.3 ^{de}	38.33 ^{e}	0.23 ^{j}	16.6^{hi}	21.3^{h}	0.5 ^{ef}	9.3^{de}	41.6 ^{de}	**F**
1.016^{efg}	14.6 ^{bc}	54.33 ^{b}	0.66 ^{g}	24.3^{fg}	48.3^{cde}	0.91 ^{ef}	14.6 ^{bcd}	36.6 ^{ef}	**G**
0.25^{h}	10 ^{de}	43.33 ^{d}	0.45 ^{hi}	33.3^{c}	40 ^{ef}	0.45 ^{ef}	10 ^{de}	38.3 ^{ef}	**H**
0.4^{h}	9 ^{de}	37.33 ^{e}	0.55 ^{gh}	49.3^{b}	34 ^{fg}	1^{e}	9 ^{e}	39.6 ^{ef}	**I**
0.4^{h}	10 ^{de}	37.33 ^{e}	0.53 ^{gh}	61.6^{a}	26.6 ^{gh}	0.88 ^{e}	10 ^{de}	35 ^{ef}	**J**
0.93^{efg}	11.6 ^{de}	44.33 ^{d}	1.13 ^{de}	48.3^{b}	34.3^{fg}	0.75 ^{e}	11.6^{de}	42.6 ^{de}	**K**
0.66^{fgh}	9.6 ^{de}	35.66 ^{d}	1.08 ^{ef}	31.6^{cd}	47.6^{cde}	0.66 ^{e}	9.6^{de}	31 ^{ef}	**L**
1.98^{bc}	18.3^{bc}	58.33 ^{ab}	0.88 ^{fg}	27.6^{cdef}	60 ^{b}	12.5^{bc}	18.3^{bc}	52.6 ^{cd}	**M**
1.8^{bcd}	19 ^{b}	55 ^{ab}	3.5 ^{a}	30.6^{cde}	55 ^{bc}	12.4 ^{bc}	19 ^{b}	60 ^{b}	**N**
3.76^{a}	55 ^{a}	63.33 ^{a}	2.8 ^{b}	31.6^{cd}	55 ^{bc}	20.08^{a}	50 ^{a}	86.6 ^{a}	**O**
2.16^{b}	54.3^{a}	56.66 ^{ab}	1.3 ^{cd}	28.6^{cdef}	48.3^{cde}	14.8^{b}	54.3 ^{a}	76.6 ^{a}	**P**
1.38^{de}	11de	41.66 ^{de}	1.4 ^{c}	256.6^{ef}	70 ^{a}	2.75^{d}	11de	28.3 ^{fg}	**Q**
1.66^{cd}	10de	38 ^{e}	1.33 ^{cd}	26.3^{def}	37.3^{f}	3.08^{d}	10de	38.3 ^{ef}	**R**
1.75^{bcd}	11.6^{de}	51.66 ^{bc}	1.21 ^{de}	24.3^{fg}	42^{def}	15.6^{b}	11.6^{de}	55 ^{bc}	**S**
0.2^{ef}	13.3^{cd}	56.66 ^{ab}	1.03 ^{ef}	25.6^{ef}	50 ^{cd}	9.5^{c}	13.3^{bcd}	61.6 ^{b}	**T**

نسبت اکسین به سیتوکنین مسیر تقسیم سلولی و باززایی گیاه را تعیین می‌کند (Davis, 1995). گزارشاتی از باززایی ریزنمونه کوتیلدون (Halder *et al*., 1982; Gambley & Dodd, 1990; 1991; Singh *et al*., 1990)، برگ (Burza *et al*., 1995; Seo *et al*., 2000; Mishra & Bhatnagar, 1995)، هیپوکوتیل (Nishibayashi; Raharjo *et al*., 1996 *et al*., 1996) و گره

Ahmad & Anis (2005) گیاه خیار تحت تاثیر انواع هورمون‌ها وجود دارد اما فراوانی باززایی اغلب پایین می‌باشد. مطالعات دقیق‌تر نشان داده است که نوع ژنوتیپ نقش بسیاری مهمی در باززایی گیاه خیار داشته است لذا تلاش‌هایی به منظور بهبود شرایط باززایی از انواع ژنوتیپ ها صورت گرفته است (Abu-Romman *et al*., 2013). در این مطالعه از رقم پرمحصول وارداتی سوپرنیا استفاده شده و اثر هورمون BAP به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون NAA در کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های مختلف این ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد هورمون BAP به تنهایی قادر به القای کالوس می‌باشد اما در ترکیب با هورمون NAA کالوس-دهی بیشتری دارد که این نتیجه با گزارش Shrivastara & Roy (2012) مطابقت دارد. با افزایش میزان هورمون اکسین میزان کالوس‌دهی افزایش یافت، نتایج حاصل در تطابق با نتایج Lou & Kako (1994) و Ladyzynski *et al*. (2001) می‌باشد. با آگاهی از نقش اکسین در تقسیمات مکرر میوزی و رشد سلول Ahsan *et al*. (2014) نتیجه موردنظر دور از انتظار نیست. بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و سپس در ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ مشاهده گردید. مطالعات قبلی هم نشان می‌دهد که کالوس‌های به وجود آمده از کوتیلدون که معمولا دارای جوانه‌های باززا شده هستند در پاسخ به سطوح بالای اکسین به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکنین (معمولا BAP) نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشتر تولید می‌شوند (Stripichitt *et al*., 2005). در ریزنمونه هیپوکوتیل حداکثر درصد کالوس‌زایی در تیمار NAA (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش میزان BAP میزان کالوس‌زایی در برخی ریزنمونه‌ها کاهش یافت. در بررسی اثر هورمون‌های گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه خیار Abu-Romman *et al*. (2013) عنوان کردند که افزایش میزان هورمون سیتوکینین نسبت به اکسین در کالوس‌دهی تاثیر کاهشی دارد. بیشترین میزان باززایی در ریزنمونه کوتیلدونی در تیمار هورمونی NAA (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) به-دست آمد. به عنوان یک نتیجه مهم در این آزمایش مشخص شد که هورمون BAP نقش بسزائی در باززائی دارد که با نتایج Ugandhar *et al*. (2011) که بیشترین میزان باززایی را در محیط حاوی غلظت های مختلف هورمون BAP در ترکیب با غلظت بسیار پایین هورمون اکسین بدست آوردند مطابقت دارد. اثرات چشمگیر این هورمون شاید با تغییرات بافت‌شناسی در بافت‌های القا شده مرتبط باشد (Neibaur *et al*., 2008). بررسی‌ها نشان

می‌دهد حذف اکسین از محیط کشت، پیش‌نیاز خاموش شدن چند ژن و یا سنتز محصولات جدید ژنی می‌باشد که برای نمو رویان لازم است. همچنین نوع و غلظت سیتوکینین بکار رفته به‌طور چشمگیری باززایی نوساقه را در ژنوتیپ‌های متفاوت تحت تاثیر قرار می‌دهد (Amini *et al*., 2013). از طرفی ریزنمونه کوتیلدون کالوس‌زایی و باززایی بهتری نسبت به دو ریزنمونه دیگر نشان داد. این نتیجه نیز در تطابق با یافته‌های Kumar *et al*. (2003) در استفاده ریزنمونه‌های مختلف برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون، همچنین در تطابق یافته‌های Wehner & Locy (1981) و Alsop *et al*. (1978) می‌باشد. این عکس العمل برتر ریزنمونه کوتیلدون نسبت به سایر ریزنمونه‌ها را می‌توان به غلظت‌های بالای هورمون اکسین درون‌زا در کوتیلدون و اثر متقابل آن بر ریزنمونه Gambley & Dodd (1990) و یا پتانسیل ارگانوژنیک بیشتر این ریزنمونه به دلیل وجود سلول‌های مریستمی تولید کننده ساقه در سطح رویی کوتیلدون نسبت داد (Motamedi *et al*., 2010). اما با یافته‌های Jesmin & Mian (2016) در استفاده از ریزنمونه‌های مختلف گیاه خیار جهت کالوس‌زایی که بیشترین میزان کالوس‌زایی را به ترتیب در ریزنمونه‌های ساقه، برگ و کوتیلدون گزارش کردند مغایر بود. که این نتیجه متفاوت احتمالا می‌تواند به دلیل تغییر در تعادل هورمون‌های درونی در اندام‌های مختلف گیاه بسته به ژنوتیپ باشد (Javadian *et al*., 2016). به عبارتی هر ژنوتیپ دارای مقادیر خاصی از هورمون‌های درونی بوده و غلظت‌های هورمونی استفاده شده بیشترین تاثیر را در واکنش نسبت به هورمون‌های درونی بافت دارد (Norouzi *et al*., 2018). چندین عامل بر موفقیت کالوس‌زایی و باززایی از کوتیلدون مؤثر است ازجمله ژنوتیپ Wehner & Locy (1981) سن میوه‌هایی که از آن‌ها بذر گرفته شده است و کوتیلدون‌هایی که به خوبی رشد یافته‌اند نسبت به کوتیلدون‌هایی که در مرحله رشد اولیه هستند (Lange & Juvik, 1986). نقش BAP در تحریک فاز جوانه‌زنی یا باززائی تایید شده و در این راستا نشان داده شده است که استفاده از BAP در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین تیمار جهت باززایی ژنوتیپ سوپرنیا خیار از ریزنمونه‌های کوتیلدون می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی، می‌تواند در تولید کالوس و باززایی غیر مستقیم این رقم پرمحصول با اهداف ریزازدیادی، مطالعات سوسپانسیون سلولی و تراریختی به‌خصوص در راستای تولید واکسن‌های نوترکیب خوراکی در این گیاه راه گشا باشد.

منابع

Ahmad N, Anis M (2005). In Vitro Mass Propagation of Cucumis sativus L. from Nodal Segments. Turkish Journal of Botany 29: 237-240.

Ahsan AK, Arshad NA, Azhar M, Wan MWY, Che RBC (2014). Tissue culture and some of the factors affecting them and the micropropagation of strawberry. Life Science Journal 11: 484-493.

Alsop WR, Cure WW, Evans GF, Mott RL (1978). Preliminary report on in vitro propagation of cucumber. Cucurbit Genetics Cooperative Report 1: 1- 2.

Amini F, Ganbarzade Z, Askary Mehrabadi M (2013). Optimization of Callus Production and Plant Regeneration in Salsola arbuscula pall. Journal of Cell & Tissue (JCT) 4: 129-137.

Bu-Romman S, Suwwan M, Al-Ramamneh EAD (2013). The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (Cucumis sativus L.). Advances in Environmental Biology 7: 339.

Burza W, Malepszy S, Rostek E (1995). An effect of simple and recurrent in vitro regeneration on cucumber inbred line under field cultivation. Horticultural Sciences 28: 11-13.

Custers JBM, Verstappen ECP (1989). Improvement of in vitro growth of cucumber. Report of Cucurbit Genetics Cooperative 12: 20-22.

Davies PJ (1995). The plant hormone concept: Concentration, sensitivity and transport. In: Plant. Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, London, UK, 3-38.

Gambley RL, Dodd WA (1990). An in vitro technique for the production of de novo multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (Cucumis sativus L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 20: 177-183.

Gambley RL, Dodd WA (1991). The influence of cotyledon in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of Cucumis sativus L. (Cucumber). Journal of Excremental Botany 42: 1131-1135.

Hajibabaei R, Motalebi-Azar A, Alizadeh S, Zare-Nehbandi F (2010). Effect of auxin, cytokinine and gibberellic acid on proliferation and root induction stages of greenhouse cucumber. M.Sc Thesis. Tabriz University, Iran

Halder T, Gadgil VN (1982). Morphogenesis in some species of the family cucurbitaceae. In: Rao AN (Ed.). Tissue Culture of Economically Important Plants. Singapore National University, pp. 98-103

Hassanpour A (1996). Comparison of in vitro cultured seedling and plant in greenhouse cucumber.1th National Horticultural Science Congress of Iran

Hooker MP, Nabors MW (1977). Callus initiation, growth and organogenesis in sugar beet (Beta vulgaris L.). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 84: 237-246.

Javadian N, Sharifi M, Moieni A (2016). In vitro Regeneration of White Flax (Linum album Kotschy ex Boiss) Medicinal Plant. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology) 28: 737-745.

Jesmin R, Mian MAK (2016). Callus induction and efficient plant regeneration in Cucumber (Cucumis sativus L.). Journal of Bioscience and Agriculture Research 9: 796-803.

Jeyakumar JJ, Kamaraj M (2015). Direct organogenesis of hypocotyl explants from In vitro seedlings of Cucumis Anguria L. Global Journal of Biology Agriculture and Health Science 4: 24-27.

Kathal R, Bhatnagar SP, Bhojwani SS (1988). Regeneration of plants from leaf explant of Cucumis melo cv. pusa sharbati. Plant Cell Reports 7: 449-451.

Kim SG, Chang JR, Cha H, Woonglee K (2011). Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (Cucumis sativus L.). Science Research Reporter 1: 164-169.

Khoshbakht K (1995). Investigating the effect of growth regulators on in vitro cucumber rooting using lateral bud culturing. M.Sc Thesis. Shiraz University, Iran. 45 p.

Kumar HGA, Murthy HN, Paek KY (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of Cucumis sativus L. Scientia Horticulture 98: 213-222

Ladyzynski M, Korzeniewska A, Malepszy S (2001). Recurrent regeneration through somatic embryogenesis reduces yield in cucumber. Horticultural Science 36: 987.

Lange NE, Juvik JA (1986). Age dependence for organogenesis of seed explants from four Cucurbita accessions. Cucurbit Genetics Cooperative Report 9: 93-96.

Lebeda A (2007). Cucurbits, Capter 8. In: Singh. [ed], Genetics' Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement Series, Vol. 3- Vegetable Crops, pp: 271-376.

Lou H, Kako S (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration in Cucumber. Horticulture Science 8: 906-909.

Lv J, Qi J, Shi Q. *et al*. 2012. Genetic diversity and population structure of Cucumber (Cucumis sativus L.). Plos One 7 (10): e46919. doi: 10.1371/journal.pone.0046919.

Milnear JA (2000). Functional foods: US perspective. The American Journal of Clinical Nutrition 71: 16545-16595.

Mishra AK, Bhatnagar SP (1995). Direct shoot regeneration from the leaf explant of cucumber (Cucumis sativus L.). Phytomorphology 45: 47-55.

Motamedi J, Zebarjadi AR, Kahrizi D, Hatef Salmanian A, Soheilikhah Zh (2010). Study of Callus Induction and Shoot Regeneration of Safflower (Carthamus tinctorius L.) Using Hypocotyl and Cotyledon Explants Culture. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 99-111.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Murphy DJ (2003). Agricultural biotechnology and oil crops current uncertainties and future potential. Applied Biotechnology, Food Science and Policy 1: 25-38.

Neibaur I, Gallo M, Altpeter F (2008). The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (Paspalum vaginatum Swartz). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 44: 480-486.

Nishibayashi S, Kaneko H, Hayakawa T (1996). Transformation of cucumber (Cucumis sativus L.) plants using Agrobacterium tumefactions and regeneration from hypocotyl explants. Plant Cell Reports 15: 809-814.

Norouzi E, Naseri L, Najafzadeh R (2018). Effects of various concentrations of hormonal treatments on In vitro culture of red seedless grape. Journal of Agricultural Biotechnology 10: 119-138.

Otroshy M, Mokhtari A (2014). Rapid micropropagation of Cucumis sativus var. Dastgerdi (Iranian cultivar) by Node Culture Technique. British Biotechnology Journal 4: 733-739.

Ozgen M, Turet M, Altinok S, Sancak C (1998). Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (Triticum aestivum L.) genotypes. Plant Cell Reports 18: 331-335.

Radhakrishnan R, Ranjithakumari BD (2007). Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (Glycine max (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. Journal of Agricultural Technology 3: 287-297.

Raharjo SHT, Hernandez MO, Zhang YY, Punja ZK (1996). Transformation of pickling cucumber with chitinase encoding genes using Agrobacterium tumefactions. Plant Cell Reports 15: 591-596.

Rajagopalan PA, Perl-Treves R (2005). Improved cucumber transformation by a modification explant dissection and selection protocol. Horticultural science 40: 431-435.

Seo SH, Bai DG, Park HY (2000). High frequency shoot regeneration from leaf explants of cucumber. Journal of Plant Biotechnology 2: 51-54.

Shrivastava A, Roy S (2012). Callus multiplication of a medicinally important vegetable luffa: Cylindrica. International Journal of Pharmacology and Biotechnology Sciences 3: 526-531.

Singh MN, Kathal R, Bhatnagar SP (1990). Regeneration of plants from hypocotyl and cotyledon cultures of Cucumis melo cv pusa Maduras. Phytomorphology 40: 401-405.

Stripichitt P, Nawata E (1987). In vitro shoot forming capacity of cotyledon explants in red pepper (Capsicum annuum L. cv. Yatsufusa). Japanese Journal of Breeding 37: 133-142.

Ugandhar T, Venkateshwarrlu M, Begum G, Srilatha T, Jaganmohanreddy K (2011). In vitro plant regeneration of cucumber (Cucumis sativum L.) from cotyledon and hypocotyls explants. Science Research Reporter 1: 164-169.

Usman M, Hussain Z, Fatima B (2011). Somatic embryogenesis and shoot regeneration ihduced in cucumber leaves. Pakistan Journal of Botany 43: 1283-1293.

Wehner TC, Locy RD (1981). In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of Cucumis sativus L. Horticulcure Science 16: 759-760.

Optimization of Callogenesis and Regeneration of Cucumber (Cucumis Sativus L.) UtilizingCotyledon, Hypocotyl and Leaf Explants

Abdolinasab M.[1*]

[1]Assistant professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High Technology and Environmental Science, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran**.**

Abstract

Supernia is one of the most important high-yield cultivars of the imported cucumber hybrids. In order to optimize asexual propagation of this variety through in vitro culture, cotyledon, hypocotyl and leaf explants were placed in the MS basal medium containing 0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mg/l concentrations of 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with 1, 2, 3 and 4 mg/l of 6-Benzylaminopurine (BAP) hormone. The experiment was conducted as a factorial arrangement in completely randomized design at three replications and five samples in each replicate. The percentage of callogenesis, embryogenic calli and shoot frequency of the cultured explants were evaluated. The highest percentage of callogenesis (86.6%) was obtained from cotyledon explant on the MS medium supplemented with 0.3 mg/l NAA + 3 mg/l BAP hormones. The highest embryogenic calli (61.6%) were developed on the MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA + 2 mg/l BAP hormones in hypocotyl culture. Also, the maximum number of shoot (20.08) were obtained on MS medium supplemented with 0.3 mg/l NAA + 3 mg/l BAP hormones in hypocotyl explant. The regenerated shoots were transferred to half-strength MS medium supplemented with 1 mg/l NAA hormone for root induction and formation. Then, the grown seedlings were adapted to the in vivo condition. Based on the results of this study, it is recommended to use the cotyledon explant for propagation and regeneration of this genotype, especially in the gene transferring studies.

Key words: *Micro propagation, In vitro culture, Cucumber, NAA, BAP.*

[*] Corresponding Author: Abdolinasab M. Tel: 03433776611 Email: m.abdolinasab@kgut.ac.ir