



Paper Type: Original Article



Effects of Exogenous Gibberellic Acid and Naphthalene Acetic Acid on the Anatomical Structure of Vegetative Organs and the Development of Male Reproductive Organs in Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Supernia F1)

Parissa Jonoubi^{*1} , Masoumeh Arang¹

¹Plant Sciences Department, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran;

^{*}(Associate Professor: Corresponding author: jonoubi@khu.ac.ir).

Citation:

Jonoubi, P. & Arang, M. (2025). Effects of exogenous gibberellic acid and naphthalene acetic acid on the anatomical structure of vegetative organs and the development of male reproductive organs in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Supernia F1). *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 38 (Issue No. 1), PP. 1-18.

Received: 2024.01.20

Accepted: 2024.06.22

Abstract

Introduction: Plant growth regulators exert significant effects on the anatomical structure, differentiation of floral primordia, and development of reproductive organs in plants. This experiment investigated the impacts of auxin and gibberellin on the vegetative and reproductive development of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Supernia F1).

Methods: A factorial experiment was conducted as the basis of a randomized complete block design with three replications. The treatments included naphthalene acetic acid at concentrations of 0, 50, and 100 mg l⁻¹, and gibberellic acid at concentrations of 0, 25, and 50 mg l⁻¹, which were sprayed on the plants every ten days until the end of flowering.

Results: Anatomical studies had significant impacts on the thickness of the cortex layers, the phloem and xylem regions, the diameter of the xylem opening of the root, stem, and leaf, the thickness of the petiole and pith of the stem and leaf trichome at various hormonal levels. The investigation of male reproductive organs revealed that at high concentrations of both hormones, earlier nuclear division occurred during the microspore mother cell and tetrad stages. Additionally, callose walls were observed not only surrounding the tetrad cells and microspores but also around the mature pollen grains, exhibiting high persistence that prevented their separation.

Conclusion: It can be concluded that high concentrations of the two hormones inhibited the production of normal pollen grains and anther dehiscence, whereas intermediate concentrations of both hormones accelerated pollen development.

Keywords: Anther, Bicollateral vascular bundle, Development, Pollen grain

اثر محلول‌پاشی با هورمونهای جیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید بر ساختار تشریحی

اندامهای رویشی و مراحل نموی اندام زایشی نر خیار

(*Cucumis sativus* L.cv. supernia F1)

پریسا جنوبی^{۱*}، معصومه آرنک^۲

^۱دانشیار، گروه علوم گیاهی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

^۲دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و تکوینی، گروه علوم گیاهی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

(*)نویسنده مسئول: jonoubi@khu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

چکیده

مقدمه: هورمون‌ها تقریباً در تمام جنبه‌های رشد و نمو و تمایز گیاهان نقش دارند. از اینرو در پژوهش حاضر اثر هورمون‌های اکسین و جیبرلین بر ساختار تشریحی اندام‌های رویشی و نمو اندام‌های زایشی در گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.cv. supernia F1) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: این پژوهش در قالب طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی به صورت فاکتوریل در ۹ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل اکسین به فرم نفتالین استیک اسید (NAA) در غلظت‌های (۱۰۰-۵۰-۰ mg l⁻¹) و جیبرلیک اسید (GA₃) در غلظت‌های (۲۵-۵۰-۰ mg l⁻¹) هر ده روز یکبار تا پایان گلدهی روی بوته‌ها محلول‌پاشی گردید. از اندام‌های رویشی برش دستی و از اندام‌های زایشی برش‌گیری میکروتومی انجام شد.

یافته‌ها: اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر روی ضخامت لایه‌های پوست، منطقه آوند آبکش و چوبی، قطر دهانه آوند چوبی ریشه، ساقه و برگ، ضخامت پهنک برگ، و همچنین بر طول کرک‌های دمبرگ و برگ معنی‌دار بود. نتایج بررسی اندام زایشی نر نشان داد که در غلظت‌های بالای هر دو هورمون، تقسیم زود هنگام هسته در مرحله مادر میکروسپور و تتراد مشاهده شد. همچنین دیواره کالوزی نه تنها در اطراف سلول‌های تتراد و میکروسپورها بلکه در اطراف گرده‌های بالغ نیز دیده شد و پایداری زیادی پیدا کرده بود که از جداسازی آن‌ها ممانعت بعمل آورد.

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بالای دو هورمون در تولید دانه‌های گرده طبیعی و شکوفایی بساک نقش بازدارندگی نشان داد در حالیکه غلظت‌های میانی، نمو دانه‌های گرده را تسریع نمود.

کلیدواژه‌ها: بساک، تکوین، دانه گرده، دسته آوندی دوجانبه

مقدمه

خیار (*Cucumis sativus* L.) مهمترین عضو تیره *Cucurbitaceae* است و در رتبه سوم محبوب ترین سبزیجات در جهان قرار دارد. در حدود ۲/۲ میلیون هکتار کشت می شود و کل تولید آن ۹۳ میلیون تن است [1]. خیار گیاهی تک پایه است که گل های نر و ماده روی یک گیاه به طور جداگانه قرار دارند. ابتدا گل های نر ظاهر شده و به فاصله کوتاهی بعد از آن گل های ماده به وجود می آید [2].

جیبرلین ها هورمون های دی ترپنی هستند که از طریق یک مسیر پیچیده سنتز می شوند و جنبه های مختلف رشد و نمو گیاهان را به طور دقیق کنترل می کنند. در خیار، جیبرلیک اسید نمو گل های نر را بیشتر کرده و بر تشکیل گل ماده تأثیر منفی می گذارد [3]. جیبرلیک اسید در بساک های در حال نمو تولید شده و برای نمو جام گل ضروری بوده و نقش اساسی در نمو دانه گرده داشته و در رشد لوله گرده نقش فیزیولوژیکی ایفا می کند. کمبود جیبرلیک اسید بعلت نمو غیر عادی بساک منجر به عقیم شدن اندام نر می شود. جیبرلین ها همچنین نقش مهمی در تنظیم شکوفایی بساک و شروع نمو میوه دارند [4].

هورمون اکسین نیز برای نمو پرچم و گرده پس از تقسیم میوز ضروری است. از دست دادن عملکرد در دو ژن سنتز اکسین (*AtYUC2* و *AtYUC6*)، پیشرفت میتوز، گرده را مسدود می کند [5]. کمبود دو فاکتور پاسخ دهنده به اکسین *ARF6* و *ARF8*، در مراحل آخر، نمو پرچم را متوقف می کند و مانع شکوفایی بساک و طولی شدن میله پرچم می شود و در نهایت موجب تشکیل گرده ای می شود که جوانه نمی زند. از سوی دیگر، کاهش در سنتز یا حساسیت به اکسین برای باز شدن پرچم و تسریع بلوغ گرده لازم است [6]. ژن دی اکسی ناز ۲- اکسولوتارات وابسته به *Fe (II) DAO* منجر به اکسیداسیون اکسین شده که برای شکوفایی بساک و باروری گرده ضروری است. آبشار اکسین ناشی از گرده افشانی و لقاح متعاقب آن در تخمک های بارور شده یا تخمدان، دستگاه تخریب *Aux/IAA* را از طریق برهمکنش با گیرنده اکسین- *TIR1* مرتبط با مسیر یوپی کوئیتین- پروتئازوم فعال می کند که ژن های پاسخ دهنده لازم برای شروع میوه را القا می نماید [4]. خیار معمولاً در محیط های گلخانه ای کشت می شود که گرده افشانی آن توسط گرده افشان های طبیعی محدود می شود. بنابراین، هورمون های گیاهی مانند سیتوکینین، ایندول استیک اسید و جیبرلیک اسید برای القای تشکیل میوه استفاده می شود [7]. از این رو در این پژوهش به اثر اکسین بر نمو بساک و تشکیل دانه گرده پرداخته شده است.

جیبرلیک اسید در بسیاری از فرآیندهای نمو گیاه شامل: طولی شدن ساقه و برگ، تمایز بافت های آوندی، تشکیل کرک، القای گلدهی، تکوین اندام های زایشی، نمو میوه و رویش دانه نقش دارد. گزارشات بیانگر آن هستند که سطوح درونزا و برونزای جیبرلین ها طول میان گره گیاه را تغییر می دهد. جیبرلین ها همچنین با تحریک تقسیم و تمایز سلول های کامبیوم، گسترش شعاعی ساقه ها را تحریک می کند. تیمار با جیبرلین ها، به ویژه زمانی که با اکسین ترکیب شود، تقسیم کامبیوم را افزایش می دهد. جیبرلین ها تمایز کامبیوم به سمت آوند چوبی را القا می کند. *Rab-GTPase* ها در تنظیم تمایز آوند چوبی دخیل هستند. بیان بیش از حد ژن های هومئوباکس مرتبط با *WUSCHEL (WOX)* ارتفاع گیاه را از طریق تسهیل تجمع جیبرلین ها افزایش می دهد. گزارش شده است که *WOX* نقشی در تنظیم تقسیم و تمایز کامبیوم دارد و بر توسعه مرستم انتهایی شاخه تأثیر می گذارد و رشد شعاعی ثانویه همراه با تشکیل چوب را موجب می شود [8].

در فرآیند تشکیل آوند چوبی، مجموعه ای از رویدادهای متوالی شامل تقسیم سلولی، تعیین سرنوشت سلولی و تمایز سلولی، از طریق مجموعه ای پیچیده از شبکه های علامت دهی (*Signaling*) درگیر هستند. اکسین در تنظیم فعالیت کامبیوم آوندی و رشد ثانویه ساقه دخالت دارد. نقش اکسین را می توان به انتقال قطبی اکسین، هموستاز درون سلولی اکسین و فرآیندهای متابولیکی نسبت داد [9]. *PIN5* در شبکه آندوپلاسمی قرار دارد و گفته می شود که با انتقال اکسین از سیتوزول به لومن *ER*، هموستاز اکسین سلولی را کنترل می کند و سطح *IAA* آزاد درون سلولی را کاهش می دهد. دو ژن *MADS-box* با نام های *VCM1* و *VCM2* به طور خاص در کامبیوم آوندی بیان می شود و هموستاز سلولی اکسین را تنظیم می کند. کاهش همزمان هر دو ژن باعث افزایش فعالیت تکثیر کامبیوم آوندی و تمایز بعدی آوندهای چوبی می شود. بیان بیش از حد *VCM1* فعالیت کامبیوم آوندی و تشکیل چوب را با تنظیم بیان *PIN5* که غلظت اکسین محلول در ناحیه کامبیوم آوندی را تنظیم می کند، سرکوب می نماید. [10] تیمار با

جیبرلین، شیب اکسین را از سمت آوند چوبی کامبیوم به سمت آبکش هدایت می‌کند. در نتیجه، سلول بنیادی دختری سمت آوند چوبی به طور ترجیحی به آوند چوبی تمایز می‌یابد، در حالی که سلول بنیادی دختری سمت آبکش، هویت سلول بنیادی را حفظ می‌کند. گاهی اوقات، این گسترش منجر به تعیین مستقیم هر دو دختر به عنوان آوند چوبی می‌شود [11]. در پژوهش حاضر در نظر است اثر هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA) و جیبرلیک اسید (GA_3) در غلظت‌های مختلف به صورت مجزا و اثر متقابل آن دو، به صورت محلول‌پاشی بر روی گیاه، بر ساختار تشریحی اندام‌های رویشی، تمایز بافت‌های آوندی و تکوین اندام زایشی نر گیاه خیار مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر اکسین و جیبرلین بر رشد رویشی و زایشی خیار (*Cucumis sativus* L.) رقم Supernia F1، پژوهشی در قالب طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی به صورت فاکتوریل در ۹ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. بذور در سینی‌های نشاء و در پیت‌ماس در داخل گلخانه با رطوبت حدود ۳۰ درصد، دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و شدت روشنایی ۳۰۰۰ لوکس کشت شدند. ۱۵ روز بعد از کاشت، نشاءها به گلدان منتقل شدند. به مدت ۲ هفته آبیاری هر ۵ روز یک‌بار صورت گرفت. ۳ هفته بعد از کاشت نشاءها گیاهان ۴ برگی شدند و آبیاری هر سه روز یک‌بار صورت گرفت و مواد غذایی هفته‌ای یک‌بار به گیاه داده شد. یک هفته بعد، اولین محلول‌پاشی با اکسین و جیبرلیک اسید انجام گرفت. محلول‌پاشی با استفاده از آب‌پاش دستی و عصرها (برای جلوگیری از تبخیر هورمون‌ها) صورت گرفت. تیمارها شامل اکسین به فرم نفتالین استیک اسید (NAA) در غلظت‌های (۰-۵۰-۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و جیبرلیک اسید (GA_3) در غلظت‌های (۰-۲۵-۵۰ میلی گرم در لیتر) بودند، که از مرحله ۴ الی ۶ برگی هر ده روز یک‌بار تا پایان گلدهی روی بوته‌ها بصورت محلول‌پاشی انجام شد (جدول ۱). بمنظور بررسی ساختار تشریحی نمونه برداری اندام‌های رویشی ۷ روز پس از آخرین تیمار از ریشه، ساقه و دمبرگ انجام شد. برای بررسی مراحل نمو زایشی از غنچه‌های گل در اندازه‌های متفاوت پس از ۴ دوره تیماردهی تا قبل از اتمام گل‌دهی نمونه‌برداری دوره‌ای انجام شد.

جدول ۱- تیمارهای مختلف هورمون GA_3 و NAA در محلول‌پاشی خیار
Table 1- Foliar treatments of GA_3 and NAA hormones in cucumber

mg l ⁻¹	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
NAA	0	0	0	50	50	50	100	100	100
GA_3	0	25	50	0	25	50	0	25	50

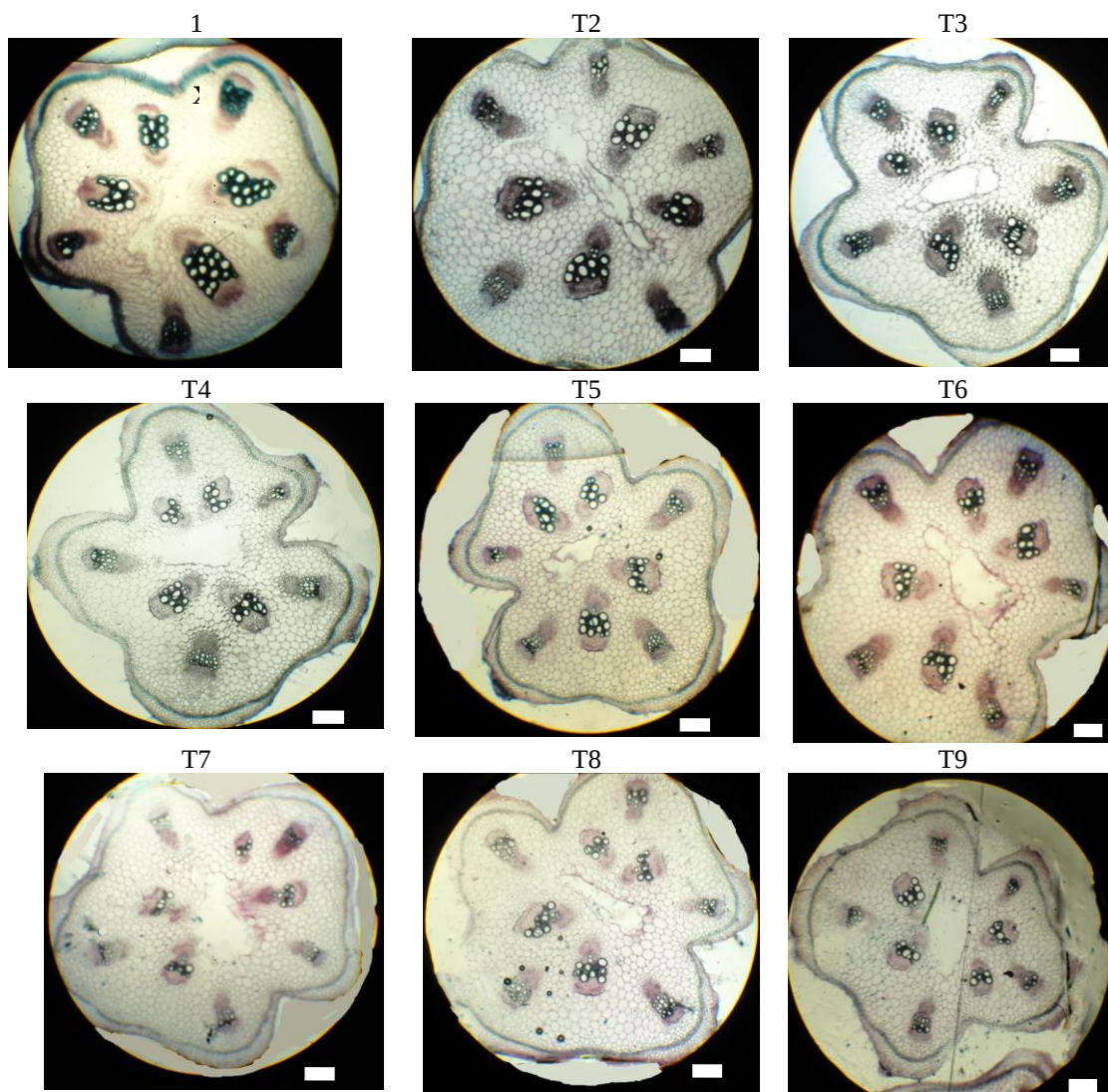
برای تهیه محلول هورمون اکسینی، ۱۰۰ میلی گرم از پودر NAA را وزن کرده و در ۱۰ میلی لیتر NaOH ۱ نرمال حل کرده و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد و برای تهیه محلول هورمون جیبرلینی، ۱۰۰ میلی گرم GA_3 را وزن کرده و در لوله فالکن ریخته و روی ورتکس گذاشته و قطره قطره اتانل ۵۰ درصد به آن اضافه شد تا حل گردد. هنگامی که شفاف شد با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. به منظور تبخیر اتانل در ظرف مدتی باز ماند. سپس از محلول استفاده گردید.

بخش‌های رویشی (ریشه، ساقه، برگ و دمبرگ) و اندام‌های زایشی گیاه *C. sativus* چهار روز بعد از پنجمین مرحله محلول‌پاشی با جیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید در ساعات اولیه صبح جمع‌آوری گردید. به منظور بررسی ساختار مقایسه‌ای بافت‌ها ابتدا از بخش‌های مختلف گیاه یعنی ساقه، دمبرگ، ریشه و برگ تیمارهای مختلف قطعاتی برداشته و پس از شستشو با آب در مخلوط الکلی گلیسرین تثبیت شد. پس از سپری شدن مدت زمان لازم با استفاده از یونولیت و تیغ از برگ، دمبرگ، ساقه و ریشه به روش دستی برش‌های نازکی تهیه شد. رنگ‌آمیزی مضاعف با کارمن زاجی و آبی‌متیلن انجام گرفت.

برای بررسی مراحل نمو اندام‌های زایشی نر، ۴ روز پس از پنجمین مرحله محلول‌پاشی، از گلها در اندازه‌های مختلف و در مراحل نمو متفاوت نمونه‌برداری انجام شد. برای تهیه برش‌های میکروتومی، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در محلول فیکساتور FAA (۱۷ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد، ۲ میلی لیتر فرمالدئید و ۱ میلی لیتر استیک اسید خالص) تثبیت شدند و مراحل آماده‌سازی و قالب‌گیری در پارافین بر اساس روش‌های معمول سلول و بافت‌شناختی انجام شد [12]. با دستگاه میکروتوم چرخنده از بلوک‌های پارافینی برش‌های پیاپی تهیه شد. برای برش‌های عرضی ضخامت ۱۰-۱۲ میکرومتر و برای برش‌های طولی ضخامت ۸-۱۰ میکرومتر

Figure 1- Anatomical structure of cucumber vegetative organs. Transverse section of: (a) stem; (b) petiole; (c) young root; (d) leaf blade from main vein area. Epi: Epidermis, Col: Collenchyma, Com: Cambium; Len: Lenticel; Par: Parenchyma; Phl: Phloem; In Phl: Internal Phloem; Ex Phl: External Phloem; Pith: Pith; Scl: Sclerenchyma; Sub: Suberin; Xyl: Xylem. Bars=200µm

تشریح مقایسه‌ای گیاهان شاهد با گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف NAA و GA₃ نشان داد که تفاوت‌هایی در ساختار ساقه گیاهان تحت تیمار مشاهده می‌شود (شکل ۲). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۲) که کاربرد سطوح اثر اصلی NAA و اثر متقابل دو عامل NAA و GA₃ بر ضخامت پارانشیم پوست ساقه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که کمترین ضخامت پارانشیم پوست مربوط به تیمار T8 با ۲۴۰/۱۷ میکرومتر و بیشترین ضخامت مربوط به تیمار T2 با ۴۳۴/۷۷ میکرومتر بود (جدول ۲). کاربرد سطوح مختلف NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت کلانشیم ساقه معنی‌دار بود. اما کاربرد سطوح مختلف GA₃ بر این صفت معنی‌دار نبود. کمترین ضخامت کلانشیم مربوط به T5 با ۲۲۳/۷۷ میکرومتر و بیشترین ضخامت مربوط به شاهد با ۴۶۱/۷۳ میکرومتر بود. در تمامی تیمارها کاربرد هورمون‌ها سبب کاهش در ضخامت ناحیه کلانشیم ساقه شد. کاربرد سطوح مختلف GA₃ و NAA و نیز اثر متقابل دو عامل بر ضخامت پارانشیم ساقه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان‌دهنده کمترین ضخامت پارانشیم در تیمار T8 با ۶۱۵/۴۶ میکرومتر و بیشترین ضخامت در تیمار T2 با ۱۳۷۸/۸۵ میکرومتر بود (جدول ۲). کاربرد GA₃ به تنهایی موجب افزایش لایه‌های سلولی پارانشیم شد. کاربرد سطوح مختلف GA₃ و NAA و نیز اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت اسکلرانسیم ساقه معنی‌دار بود. از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید کمترین ضخامت اسکلرانسیم مربوط به T5 با ۱۲۴/۸۸ میکرومتر و بیشترین ضخامت مربوط به شاهد با ۲۹۰/۷۲ میکرومتر بود. اعمال NAA و GA₃ سبب کاهش شدید در ضخامت اسکلرانسیم نسبت به شاهد شد (شکل ۲).



شکل ۲- ساختار تشریحی ساقه در گیاهان شاهد و تحت تیمار هورمونی NAA, GA₃. pith: مغز؛ Phl: آبکش؛ Xyl: آوندچوبی.

Bars=200µm

Figure 2- Anatomical structure of stems in control plants and treated with NAA and GA₃ hormones. pith: pith; Phl: phloem; Xyl: Xylem. Bars=200µm

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات تشریحی ساقه پس از تیمار با غلظتهای مختلف هورمون های GA_3 و NAA ($n=3$)

Table 2- The mean of stem anatomical traits in control and treated plants with different concentrations of GA_3 and NAA hormones. Comparisons of means were performed using the Duncan's Test ($n=3$)

Treatments	Thickness (μm)						
	Xylem	Innerphloem	Outerphloem	Sclerenchyma	Parenchyma	Hypodermis	Phelloderm
T1	283.27ab	275.52ab	965.16a	290.72a	941.64d	461.73a	284.62bcd
T2	195.37d	822.76a	725.82b	175.55cd	1378.85a	329.44c	434.77a
T3	231.32cd	698.89ab	630.02b	1577.96d	1041.46c	353.30bc	317.82b
T4	246.17abc	646.64b	688.09b	160.84d	748.71e	281.53cd	292.15bcd
T5	268.28abc	613.57bc	645.88b	124.88e	1221.35b	223.77d	262.05de
T6	296.58a	690.75ab	633.46b	212.44b	708.31ef	372.07abc	309.08bc
T7	250.13bc	644/86b	550.78b	160.19d	737.13e	340.77bc	279.59bcde
T8	275.57ab	598.81bc	660.11b	185.87c	615.46f	432.55ab	240.17e
T9	291.47ab	469.51c	585.63b	158.21d	690.12ef	331.37bc	273.63cde

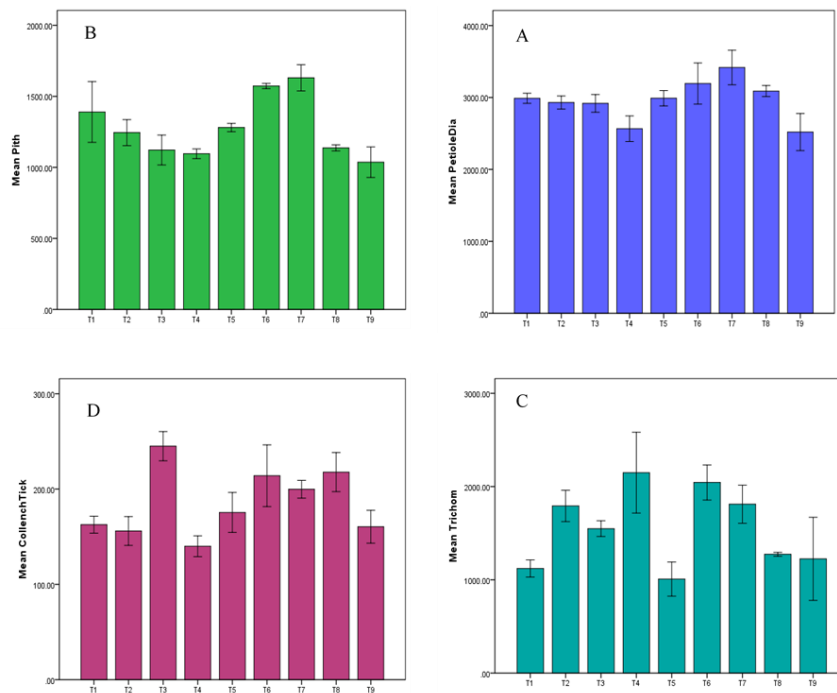
اثر کاربرد سطوح مختلف NAA و اثر متقابل دو عامل بر ضخامت آبکش بیرونی ساقه معنی دار بود. کمترین ضخامت آبکش بیرونی مربوط به تیمار T7 با $550/78$ میکرومتر و بیشترین ضخامت مربوط به شاهد با $965/16$ میکرومتر بود. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و NAA سبب کاهش در ضخامت منطقه آبکش بیرونی ساقه شده بود. این کاهش با اعمال 100 mg l^{-1} NAA بسیار شدیدتر بود. کاربرد سطوح مختلف NAA برصفت ضخامت آبکش درونی ساقه معنی دار بود. اما کاربرد سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل دو عامل براین صفت معنی دار نبود. کمترین ضخامت آبکش درونی مربوط به T9 با $469/52$ میکرومتر و بیشترین ضخامت مربوط به T2 با $822/76$ میکرومتر بود. 25 mg l^{-1} GA_3 سبب افزایش ناحیه آبکش شد و تقسیم سلولی را در این ناحیه بیشتر کرد. اثر کاربرد سطوح مختلف GA_3 و کاربرد سطوح مختلف NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت دهانه آوند چوب معنی دار بود. کمترین قطر دهانه آوند چوب مربوط به T2 با $195/37$ میکرومتر و بیشترین قطر مربوط به T6 با $296/58$ میکرومتر بود. به نحوی که کاربرد 100 mg l^{-1} GA_3 سبب کاهش در قطر دهانه آوند چوب نسبت به شاهد شد اما اثر متقابل هورمون ها افزایش قطر دهانه آوند چوبی را به دنبال داشت.

ساختار تشریحی دمبرگ

در ساختار تشریحی دمبرگ خیار از خارج به داخل اپیدرم یک لایه ای که از کرک های چند سلولی یک ردیفی غیر منشعب پوشانده شده است، مشاهده شد (شکل ۱b). در زیر اپیدرم، چند ردیف سلول های کلانشیمی گوشه دار دیده شد. منطقه پوست محدود به چند لایه سلول پارانشیمی بود. استوانه آوندی از نوع یوستل با ۹ دستجات آوندی از نوع از نوع دو جانبه بود که هر کدام از دستجات توسط سلول های اسکلرانشیمی پوشیده شده بودند. اندازه دستجات به گونه ای بود که هر چه به سمت رگبرگ اصلی نزدیکتر می شدند اندازه دستجات بزرگ تر می شد. منطقه مغز گسترده و از سلول های پارانشیمی پر شده بود.

در مقایسه ساختار تشریحی دمبرگ گیاهان شاهد با گیاهان تحت تیمار هورمونی مشخص گردید که کاربرد سطوح مختلف NAA و GA_3 بر قطر دمبرگ معنی دار نبود، اما اثر متقابل دو عامل بر این صفت درصد معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین ها (شکل ۳) حاکی از آن بود که بیشترین قطر دمبرگ در تیمار T7 با 3417 میکرومتر و کمترین قطر در تیمار T9 با $2518/75$ میکرومتر مشاهده شد. این نتایج با یافته های مربوط به ضخامت مغز دمبرگ هماهنگی داشت بنحوی که هرچه سلول های مغز بیشتر شدند قطر دمبرگ نیز افزایش یافت. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت کلانشیم معنی دار بود. بیشترین ضخامت مربوط به تیمار T9 با $245/02$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به شاهد با 140 میکرومتر بود. اعمال NAA و GA_3 چه به صورت تنها و چه در ترکیب با یکدیگر ضخامت کلانشیم را افزایش داد که می تواند نشان دهنده افزایش در تقسیمات سلولی در ناحیه توسط تیمارهای هورمونی باشد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و NAA و اثر متقابل دو عامل برصفت ضخامت مغز دمبرگ معنی دار بود. بیشترین ضخامت مغز دمبرگ مربوط به تیمار T7 با $1630/39$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار هورمونی با بیشترین غلظت هورمون (T9) با $1036/62$ میکرومتر بود. NAA به تنهایی پارانشیم مغز را افزایش داد اما در ترکیب با جبریلین سبب کاهش در ضخامت این منطقه شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل دو عامل بر صفت طول کرک در سطح ۱ درصد و کاربرد NAA در سطح ۵ درصد معنی دار بود. بیشترین طول مربوط به تیمار T4 با $2199/50$ میکرومتر و کمترین طول مربوط به

تیمار T5 با ۱۰۰۸/۲۲ میکرومتر بود. در تمام تیمارها به جز تیمار T5 افزایش تقسیم سلولی در کرک و در نتیجه طول شدن آنرا نسبت به شاهد مشاهده شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین صفات تشریحی دم‌برگ گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف هورمون‌های GA_3 و NAA با آزمون دانکن ($n=3$). A: قطر، B: ضخامت مغز، C: طول کرک، D: کلانشیم. واحدها بر حسب میکرومتر ارائه شده است.

Figure 3- The mean of petiole anatomical traits in control and treated plants with different concentrations of GA_3 and NAA hormones. Comparisons of means were performed using the Duncan's Test ($n=3$). A: Thickness of petiole, B: Thickness of petiole, C: Length of trichome, D: Thickness of collenchyma. All units are in micrometers.

ساختار تشریحی ریشه

در برش عرضی ریشه خیار از خارج به داخل مشاهده می‌شود که از زودرم از چند لایه سلول‌های چوب پنبه‌ای تشکیل شده که به دلیل فراوانی پلی‌فنل‌ها در دیواره رنگ آبی متیل را به خود گرفته و بسیار مشخص هستند (شکل ۱c). پارانشیم پوست از چندین ردیف لایه سلولی بدون فضای بین‌سلولی تشکیل شده است. اندودرم بصورت یک لایه سلولی در داخلی‌ترین لایه پوست قرار گرفته و دایره محیطیه بصورت یک لایه سلول پارانشیمی در زیر اندودرم قابل مشاهده بود. در استوانه آوندی دور تا دور دستجات آوند چوب را آبکش فرا گرفته است و دستجات آوندی به صورت آمفی‌کریبال بودند (شکل ۱c). از آنجا که در مناطق مختلف ریشه تعداد دستجات آوندی متفاوت بود می‌آید، با افزایش سن و قطر ریشه در تعداد دستجات آوندی نیز افزایش مشاهده شد. در ریشه‌های بالغ در بالای آبکش بیرونی ناحیه فیبری توسعه می‌یابد. با رشد و تمایز بافت‌های آوندی در ریشه مغز به تدریج از بین می‌رود. در نهایت ۶ دسته آوندی در قطورترین قسمت ریشه وجود داشت، که شامل آبکش بیرونی و درونی و چوب در مرکز می‌باشد. دو دسته آوند میانی از دستجات حاشیه‌ای گسترش یافته‌تر است. علاوه بر افزایش تعداد دستجات آوندی در مناطق ضخیم‌تر دستجات فیبر نیز در بالای آبکش مشاهده شد. پارانشیم مغزی بسیار حجیم‌تر از سلول‌های پارانشیم پوست است و دیواره نازکی دارند. با رشد بافت‌های آوندی در ریشه مغز به تدریج از بین می‌رود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمار گیاهان با سطوح مختلف هورمونی نشان داد که کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت هیپودرم معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین ضخامت هیپودرم مربوط به تیمار T2 با $288/01$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T7 با $158/98$ میکرومتر بود. با اعمال 100 mg l^{-1} NAA افزایش تقسیم سلولی در هیپودرم ریشه مشاهده شد. در تیمار T7 یعنی در غیاب جیبرلین و بالاترین سطح اکسین سلول‌های هیپودرمی به میزان کمتری کلانشیمی شد. مقایسه گیاهان شاهد و تحت تیمار هورمونی GA_3 و NAA نشان داد که تاثیر کاربرد GA_3 و NAA بر ضخامت فلودرم معنی‌دار نبود، اما اثر متقابل دو عامل بر این صفت معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن است که بیشترین ضخامت فلودرم ریشه مربوط به تیمار T9 با $413/85$ میکرومتر بود که بیشترین سطح هورمون‌های خارجی را دریافت کرده بودند و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T4 با $300/96$ میکرومتر که فاقد هورمون جیبرلیک اسید بود. NAA به تنهایی کاهش در این منطقه را در پی داشت اما زمانی که در ترکیب با GA_3 بکار برده شد سبب افزایش شدید در ضخامت فلودرم شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت فیبر ریشه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها بیشترین ضخامت فیبر را در گیاهان شاهد با $823/60$ میکرومتر نشان داد و کمترین ضخامت را در تیمار T7 با $560/58$ میکرومتر به دنبال داشت. اعمال تیمارهای هورمونی مختلف سبب کاهش در ناحیه فیبری ریشه شد. در تیمار T8 ناحیه فیبری بسیار گسترش یافته بود و این گسترش در تیمار T3 کمتر مشاهده شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل دو عامل بر ضخامت آبکش بیرونی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان‌دهنده بیشترین ضخامت در تیمار T5 با $846/61$ میکرومتر و کمترین ضخامت در تیمار T4 با $408/81$ میکرومتر بود. در تیمارهای هورمونی که 25 mg l^{-1} GA_3 بکار رفته بود افزایش شدید در ناحیه آبکش مشاهده شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 بر ضخامت آبکش بیرونی معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که بیشترین ضخامت مربوط به تیمار T5 با $672/52$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T4 با $446/96$ میکرومتر بود. نتایج در این ناحیه با نتایج مربوط به آبکش بیرونی هماهنگ و مشابه است. کاربرد سطوح مختلف NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت قطر دهانه آوند چوب درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین‌ها بیشترین قطر مربوط به شاهد با $408/81$ میکرومتر و کمترین قطر مربوط به تیمار T9 با $232/65$ میکرومتر بود. با اعمال 50 mg l^{-1} NAA شاهد کاهش شدید در قطر دهانه آوند چوب رخ داد. البته در تمامی تیمارها نسبت به شاهد این روند کاهشی مشاهده شد. ناحیه آوند چوب به شدت تحت تاثیر تیمار هورمونی قرار گرفته است. در تیمار T5 این ناحیه گسترش زیادی یافته بود و در تعداد آوندهای چوبی افزایش مشاهده شد. تعداد آوند چوبی در تیمار T9 و T4 بسیار کم بود. در غیاب GA_3 و با حضور NAA در تیمار T4 قطر دهانه آوند چوبی افزایش یافت. کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت مغز ریشه معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین ضخامت مغز در تیمار T5 با $4768/40$ میکرومتر و کمترین ضخامت مغز در تیمار T2 با $2326/65$ میکرومتر وجود داشت. بیشتر تیمارها نسبت به شاهد کاهش در ناحیه مغز را در پی داشتند اما در تیمار T5 افزایش در این ناحیه مشاهده شد.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات تشریحی ریشه پس از تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون‌های GA_3 و NAA با آزمون دانکن ($n=3$)

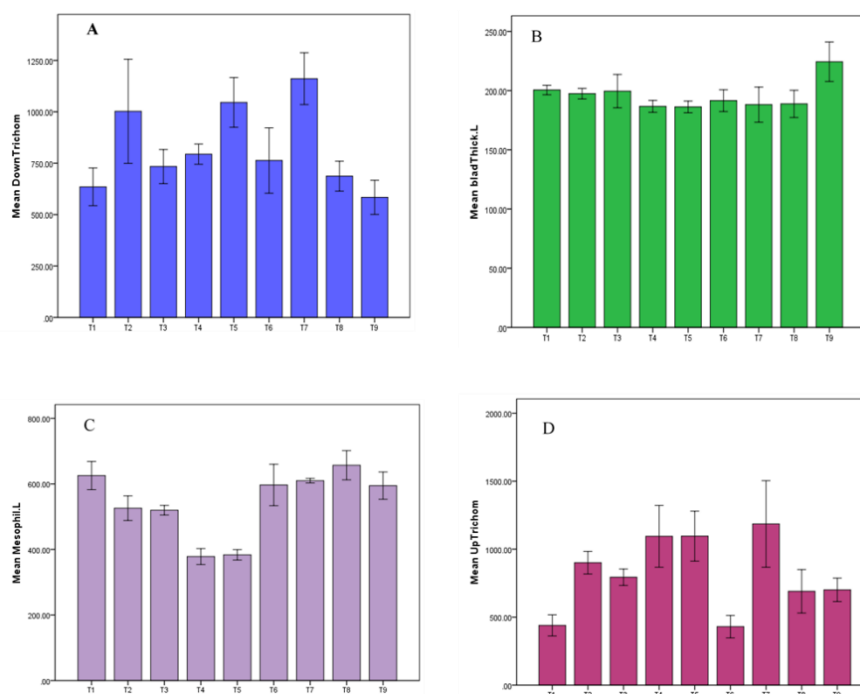
Table 3- The mean of root anatomical traits in control and treated plants with different concentrations of GA_3 and NAA hormones. Comparisons of means were performed using the Duncan's Test ($n=3$)

Treatments	Thickness (μm)						
	Pith	Xylem	Inner phloem	Outer phloem	Fiber	Phelloderm	Hypodermis
T1	3724.01b	408.81a	568.70abc	567.33bc	823.60a	392.54ab	233.95bc
T2	2326.65f	358.98b	622.73ab	417.76c	686.69b	310.04c	288.01a
T3	3509.28b	287.49de	542.17bc	594.64bc	650.07bc	332.91bc	167.43d
T4	3511.09b	242.57e	446.96c	407.91c	681.08b	300.96c	186.95cd
T5	4768.40a	252.54e	676.52a	846.61a	806.34a	348.00bc	189.54cd
T6	3022.14d	329.41bcd	462.12c	506.25c	793.42a	306.47c	160.53d
T7	2660.94e	304.28cd	534.23bc	575.97bc	560.58c	308.32c	158.98d
T8	3248.98c	344.55bc	646.60ab	735.27ab	817.29a	322.51c	266.65ab
T9	2766.97e	278.35de	559.07abc	417.67c	646.14bc	413.85a	249.25ab

ساختار تشریحی برگ

در ساختار تشریحی برگ خیار در منطقه رگبرگ اصلی پهنک بخش‌های زیر مشاهده گردید (شکل ۱d): اپیدرم که شامل اپیدرم زیرین و اپیدرم زیرین است و بافت مزوفیلی را به طور کامل در بر می‌گیرد. در اپیدرم روزنه‌های آنموسستیک دیده می‌شود که تعداد این روزنه‌ها در اپیدرم زیرین بیشتر بود. در هردو اپیدرم کرک‌های ترش‌خ و غیر ترش‌خ دیده می‌شود. تراکم این کرک‌ها در اپیدرم زیرین بیشتر بود. مزوفیل از نوع پارانشیم نردبانی و پارانشیم اسفنجی بود که پارانشیم اسفنجی در زیر پارانشیم نردبانی به طرف اپیدرم زیرین قرار دارد. در زیر اپیدرم زیرین و اپیدرم زیرین سلول‌های کلانشیم زاویه‌دار دیده شد و سلول‌های پارانشیم کورتکس در حد واسط این سلول‌ها و رگبرگ اصلی قرار داشت. رگبرگ اصلی برجسته و شامل دسته آوند چوب و آبکش است. طرز قرارگیری به این صورت است که از اپیدرم زیرین به زیرین آبکش زیرین، کامبیوم زیرین، چوب، کامبیوم زیرین و آبکش زیرین دیده می‌شود. دستجات آوندی دوجانبه در رگبرگ اصلی و فرعی دیده شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر ضخامت پهنک معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌ها بیشترین ضخامت پهنک مربوط به تیمار T9 با بیشترین غلظت هورمونی با $224/39$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T5 با $186/23$ میکرومتر بود (شکل ۴). تمامی تیمارها بجز تیمار T9 سبب کاهش در ضخامت پهنک برگ نسبت به شاهد شد. تعداد لایه‌های مزوفیل نردبانی کاهش نیافت اما سایز سلول‌ها کوچکتر شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر ضخامت مزوفیل معنی‌دار بود. بیشترین ضخامت مزوفیل در تیمار T8 با $657/12$ میکرومتر و کمترین ضخامت در تیمار T4 با $378/26$ میکرومتر بود. تمامی تیمارها بجز تیمار T8 در جهت کاهش ضخامت مزوفیل برگ عمل کردند. مشابه مزوفیل نردبانی پهنک اندازه سلول‌ها در تیمارهای هورمونی کاهش یافت. کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت کلانشیم معنی‌دار نبود. با مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که بیشترین ضخامت مغز مربوط به شاهد با $143/47$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T4 با $115/41$ میکرومتر بود. اعمال GA_3 25 mg l^{-1} کاهش شدیدی را در ضخامت کلانشیم رگبرگ اصلی ایجاد کرد. مشاهده شد که در رگبرگ اصلی تمامی تیمارها سلول‌های کلانشیمی به درون پایه‌ی کرک‌ها نیز گسترش یافته بودند. این گسترش در تیمار T4 و T3 به خوبی مشاهده شد. در تیمار T4 رگبرگ اصلی کوچک تر شده بود. کاربرد سطوح مختلف NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت منطقه آبکش برگ معنی‌دار بود. بیشترین ضخامت مربوط به شاهد با $177/76$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T5 با $141/10$ میکرومتر بود. اعمال تیمارها به علت برهم زدن توازن هورمونی موجب کاهش در ضخامت منطقه آبکش برگ شدند. کاربرد سطوح مختلف GA_3 ، NAA و اثر متقابل دو عامل بر صفت ضخامت منطقه آوند چوب معنی‌دار بود. بیشترین ضخامت در T9 با $163/08$ میکرومتر و کمترین ضخامت مربوط به تیمار T4 با $95/43$ میکرومتر بود. با اعمال 100 mg l^{-1} NAA و کاربرد 50 mg l^{-1} GA_3 بیشترین رشد و نمو در منطقه آوند چوب مشاهده شد. NAA به تنهایی سبب کاهش در ضخامت این ناحیه شد. اما در تیمار T5 نیز کاهش شدیدی در این ناحیه مشاهده شد. کاربرد سطوح مختلف NAA، GA_3 و اثر متقابل دو عامل بر بر طول کرک معنی‌دار بودند. با مقایسه میانگین‌ها بیشترین طول کرک مربوط به تیمار T7 با $1185/67$ میکرومتر و کمترین طول زیرین مربوط به تیمار T6 با $430/35$ میکرومتر بود. بیشتر تیمارها در جهت افزایش تقسیم سلولی و در نتیجه طولی شدن طول کرک زیرین نسبت به شاهد عمل کردند. در تیمار T2 تراکم کرک‌ها در سطح زیرین نسبت به شاهد بسیار افزایش یافته بود. در تیمارهای T8 و T3 تراکم کمتری مشاهده شد. کاربرد سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل دو عامل بر صفت طول کرک زیرین برگ معنی‌دار بود. بیشترین طول در تیمار T7 با $1161/19$ میکرومتر و کمترین طول در تیمار T9 با $584/12$ میکرومتر دیده شد. همانطور که در کرک زیرین مشاهده شد. در اینجا نیز افزایش طول کرک زیرین برگ با اعمال اثر تیمارها نسبت به شاهد مشاهده شد. در تیمار T2 تراکم کرک سطح زیرین نسبت به شاهد بیشتر شده بود.

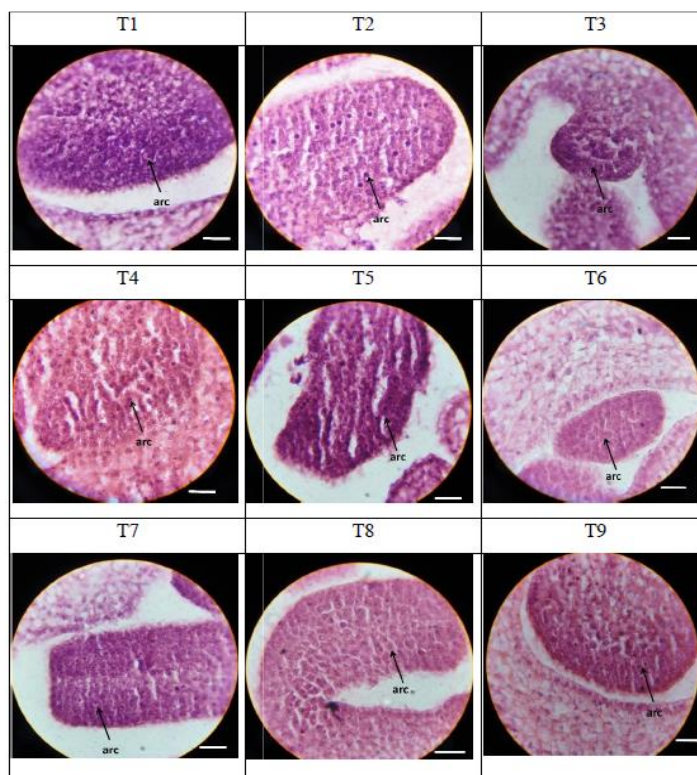


شکل ۴- مقایسه میانگین صفات تشریحی برگ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون‌های GA_3 و NAA با آزمون دانکن (n=3). A: طول کرک زیرین، B: ضخامت پهنک، C: ضخامت مزوفیل، D: طول کرک زبرین. واحدها بر حسب میکرومتر ارائه شده است.

Figure 4- The mean of leaf blade anatomical traits in control and treated plants with different concentrations of GA_3 and NAA hormones. Comparisons of means were performed using the Duncan's Test (n=3). A: Length of under Trichome, B: Thickness of Leaf blade, C: Thickness of Mesophyll, D: Length of upper Trichome. All units are in micrometers.

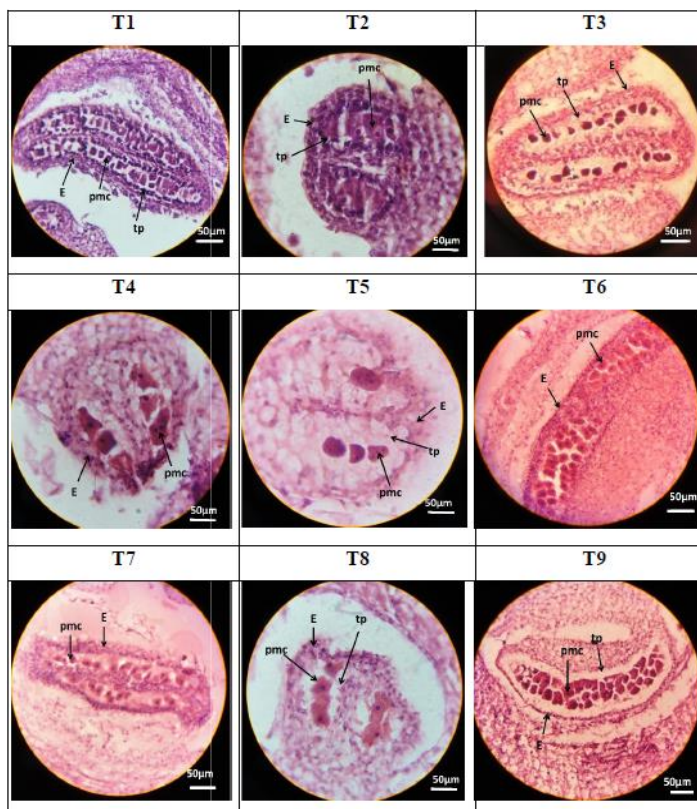
بررسی مراحل نمو اندام‌های زایشی

بمنظور بررسی اثر هورمون‌های خارجی و بر نمو بساک و دانه‌های گرده، از غنچه‌های بسیار کوچک تا گل‌های رسیده خیار نمونه‌برداری، تثبیت و رنگ‌آمیزی گردید. برای مشاهده آرکتوسپور ها (arc) از گل‌هایی با اندازه کمتر از ۱ میلی‌متر (۰/۸ mm) برش طولی تهیه شد. با مقایسه اندام‌های زایشی در گیاهان شاهد و تیمار، تفاوت بارزی در مرحله آرکتوسپوری بین تیمارهای مختلف دیده نشد (شکل ۵). در تمام تیمارها در مرحله آرکتوسپوری، لایه تاپی هنوز تشکیل نشده بود ولی سلول‌ها این لایه بهم چسبیده بوده و از یکدیگر جدا نشده بودند اما از دیگر سلول‌های دیواره بساک به علت داشتن هسته درشت قابل تشخیص بودند. شکل سلول‌های آرکتوسپوری در این لایه به صورت چند وجهی بود. این سلول‌ها اندازه ای کوچک داشتند و تمام فضای داخل بساک را به صورت یکنواخت پر کرده بودند. این سلول‌ها با تقسیمات میتوزی خود، سلول‌های مادر گرده را تولید می‌کنند (شکل ۵). مرحله تشکیل مادر میکروسپور (pmc) در گل‌هایی با اندازه ۱/۵ میلی متری مشاهده شد. در گیاهان شاهد لایه‌های بساک تقریباً مشخص بودند و سلول‌های تاپی (tp) که دارای هسته درشت بودند، بصورت لایه تیره رنگ در داخل بساک قابل تشخیص بود. لایه مکانیکی (E) که هنوز دیواره ضخیمی نداشت نیز در حال شکل‌گیری بود (شکل ۶). در بقیه تیمارها بجز T2 لایه‌های دیواره بساک نامنظم شده و سلول‌های لایه تاپی واکوئله شد. در تیمارهای T4 و T5 سلول‌های مادر میکروسپور چند هسته‌ای شده و تعداد این سلول‌ها در داخل بساک کاهش یافت. در T3 و T7 سلول‌های مادر میکروسپور شکل غیرطبیعی داشتند. در T6 لایه تاپی اصلاً مشخص نبود. با بررسی تعداد سلول‌های مادر میکروسپور در تیمارهای مختلف مشاهده شد که تعداد آنها در بعضی تیمارها مانند T9 که بیشترین غلظت هر دو هورمون در آن اعمال شده بود، بسیار زیاد بود، اما در تیمار T5 بسیار کم بوده است. GA_3 و NAA در بالاترین غلظت سبب افزایش تقسیم میتوزی در سلول‌های آرکتوسپور و در نتیجه ایجاد تعداد بیشتری سلول مادر میکروسپور شدند (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵- مقایسه مرحله آرکتوسپوری در گیاهان شاهد (T1) و تیمارهای هورمونی NAA و GA₃ در گل‌های با اندازه ۰/۸ mm: arc: سلول آرکتوسپوری. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر

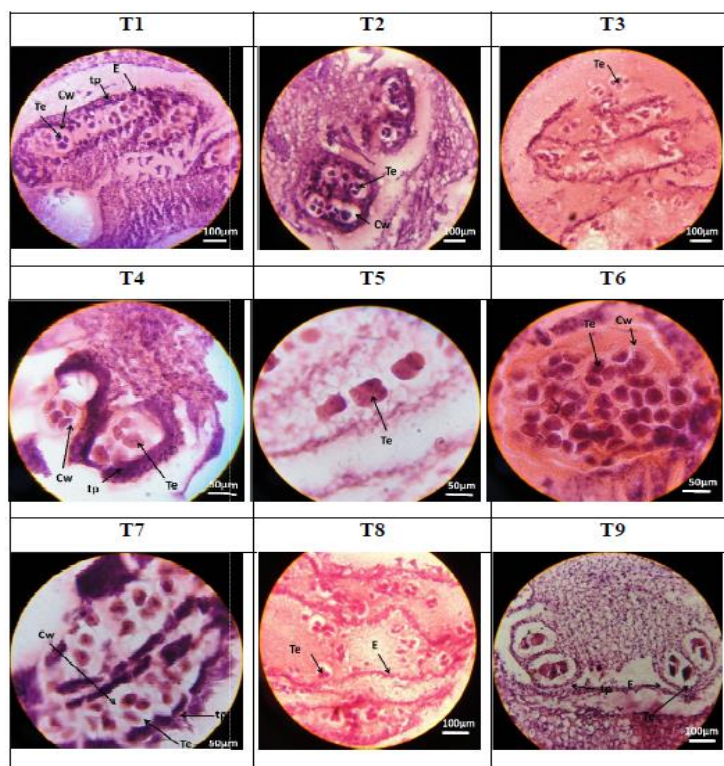
Figure 5- Comparison of the archesporial stage in flowers with a size of 0.8 mm in control plants (T1) and plants treated with NAA and GA₃ hormones. arc: Archesporial cell. Scale bar: 50 μm



شکل ۶- مقایسه مرحله تشکیل مادر میکروسپور در در گل‌های با اندازه ۱/۵mm در گیاهان شاهد (T1) و تیمارهای هورمونی NAA و GA₃. E: اندوتسیوم؛ pmc: مادر میکروسپور؛ tp: لایه مغذی. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر

Figure 6- Comparison of the microspore mother cell formation in flowers with a size of 1.5 mm in control plants (T1) and plants treated with NAA and GA₃ hormones. E.: Endothecium; pmc: Pollen mother cell; tp: Tapetum layer. Scale bar: 50 μm

در گل‌های با اندازه ۲/۵ میلی‌متری مشاهده گردید که در گیاه شاهد لایه تاپی کاملاً تمایز یافته و تمامی سلول‌ها در مرحله تتراد بودند و دیواره ویژه کالوزی در اطراف تترادها قابل مشاهده بود (شکل ۷). گیاهان تیمار شده T2، T4 و T7 لایه تاپی دیده شد. در T3، T8 تترادها به صورت بسیار پراکنده دیده شد. علاوه بر اینکه دیواره تاپی وجود نداشت و دیواره بساک نیز بسیار نازک شده بود، در T4 و T5 عده ای از سلول‌ها دو هسته‌ای شده بودند و تعداد تترادها کاهش یافته بود. در تیمار T6 تعداد تترادها بسیار زیاد و متراکم بود.

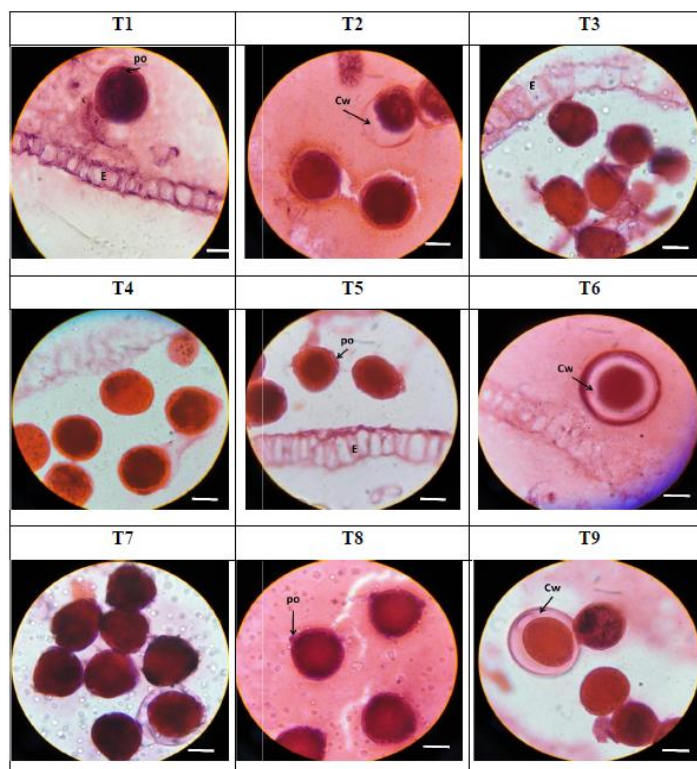


شکل ۷- مقایسه تتراد در گل‌هایی با اندازه ۲/۵ mm در گیاهان شاهد (T1) و تیمارهای هورمونی NAA و GA₃: E: اندوتسیوم؛ Te: تتراد؛ T_p: تپتوم. خط مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر

Figure 7- Comparison of the tetrad formation in flowers with a size of 2.5 mm in control plants (T1) and plants treated with NAA and GA₃ hormones. Cw: Special Cell wall; E.: Endothecium; pmc: Pollen mother cell; Te: Tetrad; tp: Tapetum layer. Scale bar: 100 μ m

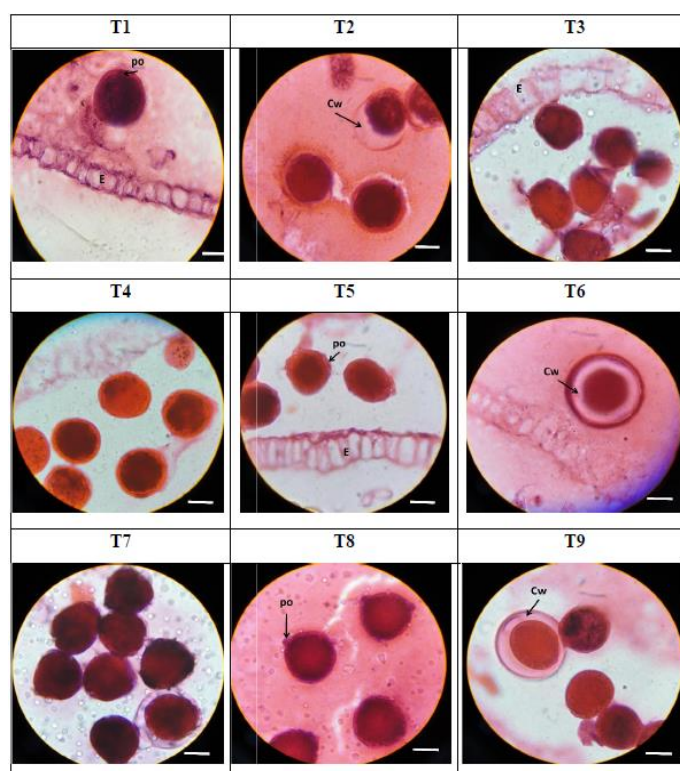
مرحله میکروسپورهای آزاد (mic) در گل‌هایی با اندازه ۴ میلی‌متر مشاهده شد (شکل ۸). با مقایسه میکروسپور در گیاهان شاهد (T1) و تیمارها، مشخص گردید که در گیاهان شاهد اندوتسیوم یا لایه مکانیکی به صورت یک لایه قابل تشخیص بود. تاپتوم در گیاه خیار از نوع ترشخی بوده و میکروسپورها در مجاورت لایه تاپی در حال تغذیه مشاهده شدند. با تغذیه میکروسپورها از لایه تاپی، این لایه در حال تحلیل رفتن بود. به علت تراکم بالای سیتوپلاسم، میکروسپورها تیره رنگ دیده می‌شد. در T2 سیتوپلاسم واکوئله شده و هسته به گوشه رفته بود و تعداد زیادی میکروسپور به صورت بهم فشرده کنار هم قرار گرفته بود. در T3، T7 و T9 اندوتسیوم بسیار نامرتب بوده و میکروسپورها بادکنکی شکل شده بودند. در T4 و T5 هسته‌ها در حال دژنره شدن و قطعه قطعه شدن بودند و سیتوپلاسم واکوئله شده بود. در T6 دیواره کالوزی در اطراف میکروسپورها بطور غیرعادی تجمع یافته بود. لایه اندوتسیوم در این مرحله بسیار ضخیم شده و تمایز یافته شده بود. در T8 دیواره ویژه (CW) فراوانی در اطراف میکروسپورها تجمع یافته بود که باعث گردید میکروسپورها بصورت بهم فشرده قرار گرفته و از یکدیگر جدا نشوند.

در گل‌های رسیده با طول ۱۲ میلی‌متر دانه‌های گرد رسیده در گیاهان شاهد (T1) و تحت تیمار مشاهده شدند (شکل ۹). در گیاه شاهد لایه تاپی به کلی از بین رفته است و لایه مکانیکی کاملاً تمایز یافته بود. گرده‌های بالغ دو هسته‌ای بود و اگزین نازکی در اطراف آن تشکیل شده بود. دانه‌های گرد کروی شکل با ۳ منفذ تشکیل شده بود. در T2، T6، T7 و T9 در اطراف دانه‌های گرد هنوز دیواره‌های ویژه کالوزی بصورت غیرعادی قابل تشخیص بود. در T3، T4 و T5 سائز گرده‌ها کوچک شده بودند و اگزین مشخصی قابل تشخیص نبود. در T8 مواد سیتوپلاسمی از منافذ گرده‌ای بیرون زده بود.



شکل ۸- مقایسه میکروسپور در گل‌هایی با اندازه ۴ mm در گیاه شاهد (T1) و تیمارهای هورمونی NAA و GA_3 : Cw: دیواره ویژه کالوزی؛ E: اندوتسیوم؛ mic: میکروسپور. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر

Figure 8- Comparison of the microspore formation in flowers with a size of 4 mm in control plants (T1) and plants treated with NAA and GA_3 hormones. Cw: Special Cell wall; E.: Endothecium; mic: Microspore. Scale bar: 50 μ m



شکل ۹- مقایسه گرده کامل در گل‌هایی با اندازه ۱۲mm در گیاه شاهد (T1) و تیمارهای هورمونی NAA و GA_3 : Cw: دیواره ویژه کالوزی؛ E: اندوتسیوم؛ po: منفذ رویشی. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر

Figure 9- Comparison of the microspore formation in flowers with a size of 12 mm in control plants (T1) and plants treated with NAA and GA_3 hormones. Cw: Special Cell wall; E.: Endothecium; mic: Microspore; po: germ pore. Scale bar: 50 μ m

بررسی‌های تشریحی نشان داده است که در تیمارهای مختلف هورمونی بخش‌های مختلف گیاه از جمله پارانیشیم پوست، پارانیشیم مغز، بافت‌های استحکامی و سیستم آوندی گیاه خیار تحت تأثیر قرار گرفته‌اند. از جمله این تغییرات در تیمارهای مختلف کاهش بافت کلانشیم، تغییر ضخامت پارانیشیم پوستی و مغزی، افزایش دهانه عناصر آوندی چوبی و ایجاد شکل‌های غیرطبیعی در دسته‌های آوندی بود. بررسی‌ها نشان داد که GA3 سبب افزایش ضخامت بافت آبکش درونی، همچنین افزایش ضخامت فلودرم و افزایش ضخامت پارانیشیم ساقه می‌شود. کمترین ضخامت فلودرم و پارانیشیم پوستی در تیمار T8 بدست آمد که در آن GA3 و NAA را با هم بکار رفته بودند که این نتایج با گزارش‌های Iranbakhsh و همکاران (۲۰۰۷) [13] بر روی اثر هورمون‌ها بر خیار همسوئی دارد.

تشکیل سیستم‌های آوندی در گیاهان به طور شاخص تحت تأثیر غلظت هورمون‌های اکسین و مقدار ترکیبات قندی موجود در بافت‌ها است. با افزایش بازده رشد، گیاهانی که دارای رشد بیشتری هستند برای افزایش هدایت هیدرولیکی آب نیاز به سیستمی کارا از آوندهای چوبی با عناصر متاگزیلیمی دهانه باز است. از سوی دیگر، در این تیمارها توسعه سیستم آوند آبکش چه در فلوئم خارجی و چه در فلوئم داخلی مبین این نکته است که افزایش تعداد برگ‌ها و توسعه سطح برگ منجر به افزایش بازده فتوسنتزی گردیده است که هدایت این فرآورده‌ها به کانون‌های مصرف، نیاز به توسعه بافت‌های فلوئم داخلی و خارجی در این گیاه دارد [14]. در حالی که اکسین‌ها تمایز آوندهای چوبی را تسهیل می‌کنند و الاستیسیته آوندهای چوبی را حفظ یا ایجاد می‌کنند، جیبرلین‌ها آوندهای چوبی را لیگنینی می‌کنند که باعث می‌شود بافت شکننده و مستعد شکستگی شود [15].

تحقیقات نشان داده‌اند که تمایز بافت آوندی اولیه نیازمند سیگنال القایی است و تصور می‌شود که IAA این سیگنال باشد. در بافت‌های بریده شده‌ی خیار، IAA باززایی بافت‌های چوب و آبکش را القا کرده و سلول‌های پارانیشیم مغز و کورتکس به سلول‌های چوب تمایز پیدا کردند. IAA به عنوان یک سیگنال القایی عمل کرده و کانال‌های خودش را برای انتقال قطبی طی پدیده‌ای به نام Canalization ایجاد می‌کند. همچنین IAA فاکتور اصلی مسئول در فعالیت کامبیوم آوندی در پاییز است. برای تقسیم سلولی و تولید چوب و آبکش کامبیوم باید IAA را از طریق انتقال قطبی یا سنتز از نو (de novo) فراهم کند [16]. این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در تیمارهایی که میزان NAA بیشتر بکار رفته بود افزایش ناحیه آوند چوب مشاهده شد.

در بررسی ما بر روی دمبرگ مشخص شد که قطر، ضخامت کلانشیم، ضخامت مغز و همچنین طول کرک‌ها تحت تأثیر تیمارهای هورمونی قرار گرفتند. بنحوی که بیشترین قطر دمبرگ در تیمار T7 مشاهده شد که NAA در غلظت بالا در آن بکار رفته بود. همانطور که انتظار می‌رفت بیشترین ضخامت مغز نیز در T7 مشاهده شد که با افزایش قطر دمبرگ هماهنگ بود. در کشورهای آسیایی، کرک بر روی میوه خیار یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کالایی است و بر انتخاب مصرف و ماندگاری تأثیر می‌گذارد [17]. شروع تشکیل کرک‌ها در برگ، توسط جیبرلین‌ها کنترل می‌شود. یک توالی ژنتیکی در اپیدرم توسط جیبرلین‌ها فعال می‌شود تا تشکیل کرک‌ها را آغاز کند. جیبرلین و جاسمونیک اسید تخریب پروتئین‌های DELLA و JAZ را تحریک می‌کند تا فعال‌سازی کمپلکس سه‌گانه MYB-bHLH-WD40 را هماهنگ کند، که نشان می‌دهد سیگنال‌های GA و JA به صورت هماهنگ برای تنظیم توسعه تریکوم‌ها عمل می‌کند [18]. کاربرد همزمان سیتوکینین خارجی و جیبرلین در خیار تأثیری بر اندازه کرک‌های غده‌ای نداشت، هرچند که با افزایش غلظت هورمون، تعداد کرک‌های اپیدرمی افزایش یافت [17].

ژن پاسخ‌دهنده به اکسین *SIARF3* در تشکیل سلول‌های اپیدرمی و کرک‌ها دخیل است. علاوه بر این، گزارشات دیگر نیز نشان داده‌اند که نمو کرک به شدت با اکسین مرتبط است [19]، [20]. تیمار با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، جیبرلین و اسید ایندول استیک باعث افزایش قابل توجهی در تراکم دو نوع کرک غده‌ای و محافظتی می‌گردد [21]. نتایج ما حاکی از آن بود که بیشترین طول کرک در تیمار با بالاترین سطح هورمونی بدست آمد که نشان دهنده نقش NAA بر تقسیم سلولی و در نتیجه طول کرک بود. گزارشات نشان داده‌اند که هنگام مطالعه بساک گیاهان گلدار مجموع‌های از مشکلات رویان‌شناسی حل نشده، مربوط به شروع میکروسپورانژ و زمان تمایز آرکتوسپور است. مطالعه تکوین گل در گیاهان گلدار از اهمیت بسیاری برخوردار است چراکه، رویان‌زایی به دلیل ایجاد سازمان اولیه گیاه اسپوروفیت، یک مرحله مهم از زندگی گیاه محسوب می‌شود [22]. در بساک ژن‌های بیوسنتز کننده اکسین و پروموتور DR5 تا زمانی فعالند که مراحل اولیه شکوفایی، بلوغ کرده و طویل شدن پرچم کامل شود. از آنجایی که فعالیت DR5 بازتابی از فعالیت اکسین است در مراحل نمو میکروسپورها و پروکامبیوم میله پرچم اکسین نقش زیادی دارد. بعد از این که سلول‌های بساک دو سلولی شدند فعالیت پروموتور کاهش می‌یابد [23]. بیوسنتز اکسین به طور مثبت توسط فاکتورهای رونویسی SHI/STY تنظیم می‌شود، که در طول رشد بساک فعال هستند و بر الگوی اولیه بساک تأثیر می‌گذارند. نمو دیررس پرچم، با طویل شدن سریع میله پرچم که با شکوفایی بساک و بلوغ کرده و در نهایت با انتشار دانه گردیده بالغ خاتمه می‌یابد در ارتباط است [24]. بر اساس یافته‌های Yaung و همکاران (۲۰۰۷) [25] ضخیم شدن دیواره سلولی اندوتسیوم وابسته به چوبی شدن

میکرو فیبریل‌های سلولزی است که ژن‌های دخیل در این پروسه توسط اکسین تنظیم می‌شود. اکسین سبب می‌شود که تقسیم‌های میتوزی دانه‌گرده زودتر از تیپ وحشی یعنی قبل از اینکه تاپی تحلیل رفته و اندوتسیوم چوبی شود، اتفاق بیافتد. بنابراین ورود دانه‌گرده را به چرخه سلولی تنظیم کرده و سبب تسریع آن می‌شود [26].

نقش اکسین در نمو بساک و دانه‌های گرده به خوبی آشکار شده است. انسداد جریان اکسین در میله‌های پرچم منجر به تشکیل میله‌های کوتا‌هتر و گرده‌های ناقص در آرابیدوپسیس و توتون شد. در فاز گرده‌تک هسته‌ای اکسین در تاپی بساک تجمع می‌یابد و نشان‌دهنده نقش اکسین موجود در تاپی در نمو گرده است [23]. جریان قطبی اکسین در میله پرچم که برای رشد میله و نمو گرده از طریق تنظیم پروسه میتوزی ضروری است توسط Feng و همکاران (۲۰۰۶) [27] گزارش شده است. همچنین نشان دادند که علاوه بر تاپی و دانه‌گرده، سلول‌های دیگر مثل اندوتسیوم و اپیدرم بساک نیز دارای اکسین است. در بساک جهش یافته‌های *abcb1* که قادر به انتقال اکسین نبودند، سلول‌های تاپتوم تکثیر بیشتری یافت و چوبی شدن سپتوم افزایش می‌یابد. مهار جریان اکسین نشان می‌دهد که اکسین از لایه تاپتوم به لایه میانی جریان می‌یابد، جایی که حداکثر پاسخ اکسین برای بلوغ هماهنگ گرده و باز شدن بساک مهم است [28]. در بلوغ بساک و گرده، اکسین روی سطوح جیبرلیک اسید تاثیر دارد. در پایان میوز زمانی که ژن‌های گیرنده و بیوسنتزی اکسین هنوز روشن و فعال اند، اکسین باعث افزایش طول پرچم می‌شود و از باز شدن زودرس بساک و بلوغ گرده جلوگیری می‌کند. متعاقباً، کاهش فعالیت ژن‌های بیوسنتزی اکسین و/یا تغییر در حساسیت اکسین در بافت‌های درگیر در جدا شدن بساک و بلوغ گرده، این فرآیندها را آغاز می‌کند [23].

برش عرضی از بساک نشان داد که دیواره بساک از یک لایه سلول اپیدرمی، لایه مکانیکی و یک لایه سلول مغذی تشکیل شده است، که در زیر آن سلول‌های مادر گرده دیده می‌شود. این سلول‌ها دارای هسته‌ی حجیم است که این صفت موجب می‌شود که آن‌ها به راحتی از سلول‌های سازنده دیواره بساک تشخیص داده شوند. در هر خانه گرده سلول‌های مادر گرده تقریباً همزمان با یکدیگر مراحل تکوینی خود را می‌گذرانند. Zheng و همکاران در ۲۰۲۱ [29] گزارش نمودند که تمایز سلول‌های ارکتوسپوری از سلول‌های سوماتیک یک رویداد روشن/خاموش ساده نیست، بلکه یک فرآیند پیچیده است که شامل یک بازخورد پویا در رونویسی پروتئین تعیین‌کننده سلول‌های جنسی است که توسط اکسین به راه می‌افتد و منجر تفکیک سلول‌های نیایی از دیگر سلول‌ها می‌گردد. بدین صورت که یک گرادیان گریز از مرکز اکسین به تدریج به سمت چهار گوشه‌ی بساک که محل تفکیک سلول‌های نیایی است تشکیل می‌شود. بیوسنتز اکسین موضعی برای این الگوبرداری و برای تفکیک سلول‌های جنسی ضروری است. ساختمان تشریحی بساک و تکوین گرده در گیاهان مورد آزمایش مشابه با مراحل تکوین گرده در سایر نهاندانگان دو لپه است مشابهت داشت.

نتیجه‌گیری

در بررسی تاثیر تیمارهای هورمونی بر طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های ساختاری گیاه خیار مشاهده گردید که غلظت‌های میانی جیبرلین و اکسین باعث افزایش قطر ساقه، دمبرگ و ریشه گردید که از افزایش بافت‌های کلانشیم و فیبر اسکلرانشیمی، ضخامت منطقه آوندی حاصل شده بود. افزایش طول کرک‌ها و بافت‌های استحکامی موجب مقاومت بیشتر در مقابل تغییرات شرایط محیطی می‌گردد. از آنجایی که بکارگیری غلظت‌های بالای این دو هورمون موجب کاهش رشد و بافت‌های استحکامی گردید، از اینرو کاربرد غلظت‌های میانی $25 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$ و $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ برای بهبود رشد رویشی خیار توصیه می‌گردد.

در مطالعه اثر هورمون‌ها بر مراحل مختلف میکروسپوروژنز تأثیرات متفاوتی مشاهده شد. در تیمارها با اعمال بالاترین غلظت هورمون‌ها تغییر شکل در سلول‌های مادر میکروسپور پدیدار شد که می‌تواند به دلیل برهم خوردن توازن هورمونی در این سلول‌ها باشد. تترادها به صورت بسیار پراکنده دیده شد، دیواره کالوزی در اطراف تترادها و میکروسپورها تجزیه نشد، همچنین اثرات منفی بر روی اندوتسیوم و شکل نهایی دانه‌گرده داشت. در مراحل پایانی نمو دانه‌گرده دیواره کالوزی همچنان در اطراف دانه‌های گرده باقی مانده و مانع از هم جدا شدن آنها شده بود که بر میزان تولید دانه‌های گرده بالغ اثر ممانعت‌کنندگی داشت. از اینرو غلظت‌های بالای هورمون‌های جیبرلین و اکسین به علت ممانعت از تولید دانه‌های گرده طبیعی توصیه نمی‌گردد.

اعلام تعارض منافع

نگارندگان مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی و نوآوری دانشگاه خوارزمی انجام پذیرفته است که بدین وسیله از آن معاونت قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

- [1] FAO. <https://www.fao.org/land-water/land/land-governance/land-resources-planning-toolbox/category/details/fr>.
- [2] Kater, M.M., Franken, J., Carney, K.J., Colombo, L. & Angenent, G.C. (2001). Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *Plant Cell*, 13, 481-493. <https://doi.org/10.2307/3871401>
- [3] Wang, C., Xin, M., Zhou, X., Liu, W., Liu, D. & Qin, W. (2018). Transcriptome profiling reveals candidate genes associated with sex differentiation induced by night temperature in cucumber. *Scientia Horticulturae*, 232, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.018>
- [4] Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Wang, H. & Wan, J. (2013). Developmental cell a role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.005>
- [5] Amanda, D., Frey, F.P., Neumann, U., Przybyl, M., Simura, J., Zhang, Y., Chen, Z. & Acosta1, I.F. (2022). Auxin boosts energy generation pathways to fuel pollen maturation in barley. *Current Biology*, 32 (8), 1798-1811. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.02.073>
- [6] Wang, S., Zhang, Y., Fang, Z., Zhang, Y., Song, Q., Hou, Z., Sun, K., Song, Y., Li, Y. & Ma, D. (2019). Cytological and proteomic analysis of wheat pollen abortion induced by chemical hybridization agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (7), 1615. <https://doi.org/10.3390/ijms20071615>
- [7] Sharif, R., Zhu, Y., Huang, Y., Sohail, H., Li, S., Chen, X., & Qi, X. (2024). microRNA regulates cytokinin induced parthenocarp in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 212, 108681. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108681>
- [8] Du, J., Wei, H., Song, X., Zhang, L. & Hu, J. (2024). PdRabG3f interfered with gibberellin-mediated internode elongation and xylem developing in poplar. *Plant Science*, 343, 112074. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112074>
- [9] Johnsson C., Jin X., Xue W.Y., Dubreuil C., Lezhneva L. & Fischer U. (2019). The plant hormone auxin directs timing of xylem development by inhibition of secondary cell wall deposition through repression of secondary wall NAC-domain transcription factors. *Physiologia Plantarum*, 165, 673-689. <https://doi.org/10.1111/ppl.12766>
- [10] Zheng, S., He, J., Lin, Z., Zhu, Y., Sun, J. & Li, J. (2020). Two MADS-box genes regulate vascular cambium activity and secondary growth by modulating auxin homeostasis in Populus. *Plant Communications*, 2 (5), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100134>
- [11] Mäkilä, R., Wybouw, B., Smetana, O. & Mähönen, A.P. (2023). Gibberellins promote polar auxin transport to regulate stem cell fate decisions in cambium. *Nature Plants*, 9 (4), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01360-w>
- [12] Sanderson, J.B. (1994). Biological microtechnique: Garland Science Press. Santana-Buzzy. Garland Science Pub.
- [13] Iranbakhsh, A.R., Ebadi, M. & Majd, A. (2007). Investigating the effect of some growth regulators on vegetative production and crop yield of *Cucumis sativus* L parthenocarp in greenhouse conditions. *Journal of Sciences of Islamic Azad University (Biology)*, 66 (17), 101-20.
- [14] Lyndon, R.F. (2012). Plant Development: The cellular basis. Springer Press, PP. 320.
- [15] Yang, Y., Huang, Y., Ren, A., Wan, Y. & Liu, Y. (2023). Xylem development and phloem conductivity in relation to the stem mechanical strength of *Paeonia lactiflora*. *Journal of Plant Physiology*, 283, 153963. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.153963>
- [16] Aloni, R. (1995). The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. *Plant Hormones*. Kluwer, Dordrecht. PP.531-546
- [17] Yang, S., Xue, S., Shan, L., Fan, S., Sun L., Dong, Y., et al. (2024). The CsTM alters multicellular trichome morphology and enhances resistance against aphid by interacting with CsTIP1;1 in cucumber. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.04.008>
- [18] Qi, T.C., Huang, H., Wu, D.W., Yan, J.B., Qi, Y.J. & Xie, D.X. (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *The Plant Cell*, 26, 1118-1133. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121731>
- [19] Li, J.J., Tang, B., Li, Y.X., Li, C.G., Guo, M., Chen, H.Y., Han, S.C., Li, J., Lou, Q.J., Sun, W.Q., Wang, P., Guo, H. F., Zhang, L. & Li, Z.C. (2021). Rice SPL10 positively regulates trichome development through expression of HL6 and auxin-related genes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63, 1521-1537. <https://doi.org/10.1111/jipb.13140>
- [20] Chen, S.S., Liu, W., See, L., Mao, Y.H.B., Gan, C. & Yu, Y.H. (2018). OsFTIP7 determines auxin-mediated anther dehiscence in rice. *Nature Plants*, 4, 495-504. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0175-0>

- [21] Liu, J.Q., Chen, K., Zhang, Z.Z., Chen, X.L. & Wang, A.X. (2016). Effects of exogenous GA, MeJA, IAA, SA and KT on trichome formation in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 43, 2151–2060. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0407>
- [22] Basiri, E., Jafari Marandi S., Arbabian, S., Majd, A. & Malboob, M.A. (2021). The effect of fertile biofertilizer 2 and potassium phosphate on the development of vegetative and reproductive organs of *Arabidopsis thaliana* L. *The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology*, 34 (4) 70, 24-49. <https://doi.org/10.22051/jab.2021.35853.1417>
- [23] Cecchetti, V., Altamura, M.M., Falasca, G., Costantino, P. & Cardarelli, M. (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell*, 20, 1760-1774. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057570>
- [24] Cucinotta, M., Cavalleri, A., Chandler, J.W. & Colombo, L. (2021). Auxin and flower development: A blossoming field. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039974>
- [25] Yaung, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Vizcay, Barrena G. & Wilson, Z.A. (2007). *Arabidopsis* MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *Plant Cell*, 19, 534–548. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046391>
- [26] Francis, D. (2007). The plant cell cycle. *New Phytology*, 174, 261–278. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046391>
- [27] Feng, X.L., Ni1, W.M., Elge, S., Roeber, B.M., Xu, Z.H. & Xue, H.W. (2006). Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology*, 61, 215–226. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0005-z>
- [28] Cecchetti, V., Celebrin, D., Napoli, N., Ghelli, R., Brunetti, P., Costantino, P. & Cardarelli, M. (2018). An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 213 (3), 1194-1207. <https://doi.org/10.1111/nph.14207>
- [29] Zheng Y., Wang D., Ye S., Chen W., Li G., Xu Z., Bai Sh. & Zhao F. (2021). Auxin guides germ-cell specification in *Arabidopsis* anthers. *PNAS*, 118, 22, e2101492118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101492118>