



دانشگاه گورگان
فصلنامه علمی کشاورزی و منابع طبیعی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و ششم، شماره اول، ۱۳۹۸

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2019.12699.2145

۲۱-۳۴

القای جنین‌های پارتنوژنز و تولید گیاهان هاپلوئید خیار (*Cucumis sativus* L.)

حامد ابراهیم‌زاده^۱، حسن سلطانیلو^۲، *مهران عنایتی شریعت‌پناهی^۳

علی اسکندری^۴ و سیده ساناز رمضانپور^۲

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی کشاورزی هسته‌ای، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۳ دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران، ^۴ استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: هدف اصلی از تولید گیاهان هاپلوئید رسیدن به لاین‌های دابل‌هاپلوئید مطلوب جهت پیشبرد برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. با استفاده از ارقام هیبرید F_1 حاصل از تلاقی لاین‌های خالص با صفات مطلوب، بهره‌وری محصول را تا حد زیادی می‌توان افزایش داد. بنابراین لاین‌های خالص در برنامه‌های اصلاحی و تحقیقات ژنتیکی بسیار ارزشمند هستند. تولید لاین‌های خالص در روش‌های کلاسیک و با استفاده از خودگشنی نیازمند زمان و هزینه بسیار زیادی می‌باشد و به هیچ وجه امکان ندارد که این لاین‌ها صد درصد خالص باشند. بنابراین روش‌های پیشرفته و جدید جایگزین کارآمدتر و پایدارتر از روش‌های سنتی هستند. پرتوتابی دانه‌گرده عمده‌ترین روش مورد استفاده برای القای بکرزایی در گیاهان خانواده کدوئیان است. بر اساس آزمایش‌های قبلی، پژوهشگران بر سر برتری دزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ گری پرتو گاما اختلاف نظر دارند. با این وجود در هیچ پژوهش جامع منتشر شده‌ای این دو دز پرتو به‌طور هم‌زمان با هم مقایسه نشده‌اند. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی امکان القای جنین‌های هاپلوئید در ارقام مختلف خیار از طریق گرده‌افشانی با دانه‌های گرده پرتوتابی شده توسط دزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ گری پرتو گاما و تعیین مناسب‌ترین دز پرتوتابی جهت تولید گیاهان هاپلوئید در ژنوتیپ‌های مختلف خیار انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه اثر دزهای مختلف پرتوتابی و ژنوتیپ گیاهان مادری بر تشکیل میوه، تولید دانه، القای جنین‌های پارتنوژنز پس از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده و تولید گیاهان هاپلوئید مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل (دز پرتو گاما و ژنوتیپ گیاه) بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار اجرا گردید. هفت ژنوتیپ مختلف خیار شامل ارقام نگین، اکسترم، کریم و سوپر دامینوس (F_1)، بیت آلفا (OP)، باسمنج تبریز و دستجرد اصفهان توسط گرده‌های پرتوتابی شده با دزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ گری پرتو گاما گرده‌افشانی شدند. رنگ‌آمیزی دانه‌گرده و رفتار لوله‌گرده یک روز بعد از پرتوتابی مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌های استخراج شده از میوه‌ها از طریق کشت جنین در شرایط آزمایشگاهی نجات داده شدند و سطح پلوئیدی گیاهچه‌های به‌دست آمده توسط دستگاه فلوسایتومتری تعیین شد.

* مسئول مکاتبه: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

یافته‌ها: اثر دز پرتو گاما، ژنوتیپ و همچنین برهمکنش دز و ژنوتیپ بر تعداد دانه معنی‌دار بود. بیش‌ترین میزان جنین پارتنوژنیک از پرتوتابی ژنوتیپ اکسترم با دز ۳۰۰ گری (۲/۲۵) و ژنوتیپ کریم (۱/۷۵) با دز ۵۰۰ گری مشاهده گردید. از ژنوتیپ‌های نگین، اکسترم و آلفا بیت گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده توسط دز ۵۰۰ گری هیچ جنین و هیچ گیاهی به‌دست نیامد. دزهای پرتوتابی به‌کار رفته اثر معنی‌داری بر روی تولید گیاه هاپلوئید نداشتند اما ژنوتیپ و به‌خصوص برهمکنش دز و ژنوتیپ تأثیر معنی‌داری بر تولید گیاهان هاپلوئید خیار داشت. گرده‌افشانی ژنوتیپ اکسترم با گرده‌های پرتوتابی شده توسط دز ۳۰۰ گری سبب تولید بیش‌ترین گیاه هاپلوئید (۱/۲۵) در هر میوه) در این آزمایش شد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش همانند پژوهش‌های قبل تولید گیاهان هاپلوئید خیار با استفاده از گرده‌های پرتوتابی شده به‌عنوان روشی کارآمد و مفید در جهت تولید لاین‌های اینبرد تأیید شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش ژنوتیپ‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به دزهای مختلف پرتوتابی نشان می‌دهند و با تعیین شدت تابش مناسب پرتو گاما در هر ژنوتیپ می‌توان جنین‌زایی پارتنوژنیک را القا نمود.

واژه‌های کلیدی: بکرزایی، پرتوتابی، خیار، نجات جنین، هاپلوئید

مقدمه

است. اما تولید لاین‌های خالص در روش‌های کلاسیک و با استفاده از خودگشایی نیازمند زمان و هزینه بسیار زیادی می‌باشد (۹). این در حالی است که به هیچ وجه امکان ندارد که این لاین‌ها صد درصد هموزیگوت باشند (۱۷). بنابراین ایجاد فن‌آوری‌های پیشرفته و جدید مانند تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید می‌تواند یک راه‌حل کارآمد و سریع برای تهیه لاین‌های خالص باشد.

هاپلوئیدها بر اساس مسیری که از آن منشاء می‌گیرند به هاپلوئیدهای خودبخودی (۱۴)، هاپلوئیدهای حاصل از سلول تخمزا یا گامتوفیت ماده (۴۳)، هاپلوئیدهای حاصل از کشت جنین و تلاقی‌های دور (۲۱، ۲۵ و ۳۵)، هاپلوئیدهای حاصل از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده (۳۹) و هاپلوئیدهای حاصل از میکروسپور (۴۰) تقسیم می‌شوند.

گالسکا و نیه‌میرویچ (۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند که بهترین و شناخته شده‌ترین روش دستیابی به گیاهان هاپلوئید در خانواده کدوئیان از طریق گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده می‌باشد که موجب القای توسعه پارتنوژنیک جنین‌های هاپلوئید می‌گردد. در

خیار (*Cucumis sativus* L.) یکی از سبزی‌های اقتصادی مهم است که به‌طور گسترده در دنیا کشت و کار می‌شود و سطح زیر کشت آن در سال ۲۰۱۶ بیش از دو میلیون هکتار برآورد شده است. طبق آمار سازمان خواروبار جهانی (FAO) خیار رتبه چهارم تولید را در بین سبزیجات دارد و ایران با تولید ۱/۵۷۰/۰۸۷ تن، رتبه سوم را در جهان پس از کشور چین و ترکیه دارا بوده است (۱۴).

توسعه فنون آزمایشگاهی برای تولید گیاهان هاپلوئید در کدوئیان یک دستاورد خاص و نسبتاً جدید در زمینه ریست‌فناوری و اصلاح نباتات می‌باشد. هدف اصلی از تحقیقات هاپلوئیدی رسیدن به لاین‌های دابل‌هاپلوئید مطلوب جهت پیشبرد برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. تولید بذور هیبرید F_1 به‌دلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد، قیمت بالا و امکان محافظت از حقوق اصلاحگر، کارآمدترین و جذاب‌ترین فن‌آوری برای شرکت‌های تولید بذر می‌باشد. اصلاح بذور هیبرید، به دسترسی تجاری به گیاهان خالص از نظر ژنتیکی (لاین‌های اینبرد) وابسته

بکرزایی از طریق گرده‌های پرتوتابی شده، هفت رقم خیار مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار انجام شد. پرتو گاما به‌عنوان عامل اول در دو دز ۳۰۰ و ۵۰۰ گری و ژنوتیپ (۷ رقم) نیز به‌عنوان عامل دوم مورد بررسی قرار گرفتند. تیمار شاهد نیز برای مقایسه با سایر تیمارها در نظر گرفته شد. سه رقم خیار هیبرید گلخانه‌ای شامل نگین (Negin F₁)، اکسترم (Extreme F₁) و کریم (Karim F₁) به‌عنوان پایه مادری و دو رقم خیار هیبرید سوپر دامینوس (Super Dominus F₁) و آزادگرده‌افشان بیت آلفا (Beith Alpha OP) و نیز دو رقم خیار بومی باسمنج تبریز و دستجرد اصفهان به‌عنوان والد پدری و مادری استفاده شدند. بذر گیاهان نیمه دوم اسفندماه در سینی‌های کشت حاوی مخلوطی از پیت و پرلیت به نسبت ۶۰:۴۰ کشت شدند. پس از رشد گیاهچه‌های بذری و رسیدن به مرحله دو تا چهار برگ حقیقی، نشاءها به گلخانه پیشرفته پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران با سامانه کشت هیدروپونیک انتقال یافته و کشت شدند. گل‌های نر یک روز قبل از باز شدن جمع‌آوری شده و جهت پرتوتابی با پرتو گاما به پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای منتقل شدند. بساک‌ها پس از جدا کردن گلبرگ و کاسبرگ گل‌ها همراه با میله جدا شده و به‌طور مساوی برای هر دز در پتری دیش‌های شیشه‌ای (به قطر ۱۰ و ارتفاع ۲ سانتی‌متر) قرار گرفتند. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه گاماسل در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای - کرج با دزهای ۳۰۰ (۳۴) و ۵۰۰ (۵) گری پرتو گاما توسط منبع کبالت ⁶⁰Co با قدرت اکتیویته ۱۸۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲ گری در ثانیه پرتوتابی شدند. هم‌زمان با جمع‌آوری گل‌های نر، جوانه‌های گل‌های ماده نیز حداکثر تا غروب همان روز برای جلوگیری از دریافت گرده‌های ناخواسته

گزارش این پژوهش آمده است که روش کشت تخمدان و تخمک جهت تولید گیاهان هاپلوئید از کارایی کم‌تری برخوردار است و اخیراً توجه‌های بیشتر به روش کشت بساک یا کشت میکروسپور می‌شود که شاید این روش قابل مقایسه با روش گرده‌های پرتو دیده باشد (۱۶).

دانه گرده پرتو دیده می‌تواند روی کلالة جوانه زده، به درون خامه نفوذ کرده و به کیسه جنینی برسد، اما نمی‌تواند تخمک سلول و هسته‌های قطبی را بارور کند (۶) و در نتیجه باعث تحریک بکرزایی یا توسعه میوه‌های پارتنوکارپ می‌گردد. دانه‌های حاصل جهت نجات جنین‌های هاپلوئید مورد بازبینی قرار می‌گیرند. تأیید هاپلوئید بودن گیاهان حاصل و منشاء ژنتیکی آن‌ها باید با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد (۲۲ و ۳۸).

با توجه به گزارش‌های مختلف پری‌بروسکی و نیمه‌میروویچ (۱۹۹۴) دز ۳۰۰ گری (۳۴) و کلوریا و همکاران (۲۰۰۵) دز ۵۰۰ گری (۵) را به‌عنوان بهترین شدت تابش پرتو گاما برای القای جنین‌زایی پارتنوژنیک در خیار معرفی کرده‌اند. علی‌رغم رتبه مناسب جهانی در زمینه تولید و مصرف خیار در ایران متأسفانه تاکنون اقدام جدی در خصوص خالص‌سازی یا تولید بذر هیبرید این گیاه در کشور صورت نگرفته و تقریباً تمام بذور هیبرید مورد نیاز کشاورزان با هزینه بسیار زیاد از خارج از کشور تهیه می‌شوند که سبب خروج ارز از کشور می‌گردد. با توجه به این‌که دزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ گری پرتو گاما هیچ‌گاه به‌طور هم‌زمان مورد بررسی قرار نگرفته‌اند؛ در این پژوهش اثر این دو دز پرتو گاما در ۷ ژنوتیپ مختلف خیار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و گرده‌افشانی توسط گرده‌های پرتوتابی شده: به‌منظور مطالعه واکنش ارقام مختلف به القای

مصرف استریل (۱۰۰×۲۰ mm) ریخته شد و روی آن‌ها در حدود ۲۵ ml محیط کشت مایع E۲۰ (۳۸) همراه با ۳ درصد ساکارز و ۰/۰۲ mg/l ایندول استیک اسید (IAA)، به طوری که بذور در آن غوطه‌ور شوند اضافه گردید. پتری‌های حاوی جنین نابالغ با نوار پارافیلیم بسته شده و به اتاق رشد منتقل شدند. این پتری‌ها چند بار در طول هفته به منظور هوادهی تکان داده شد و پس از گذشت ۲۰-۱۰ روز با استفاده از یک منبع نوری مورد بررسی و نجات جنین قرار گرفتند. جنین‌های نجات داده شده در اتاق رشد با دمای 2 ± 28 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت دوره نوری (۳۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند. یک تا سه هفته پس از کشت، جنین‌های (گیاهچه‌های) رشد کرده به صورت جداگانه برای رشد بیشتر به شیشه استوانه‌ای (جار) با درب‌های شفاف (به قطر ۷ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت تازه ۱/۲MS (۳۰) انتقال یافتند.

فلوسایتومتری: تجزیه و تحلیل سطح پلوئیدی گیاهان به دست آمده با تعیین اندازه ژنوم توسط دستگاه فلوسایتومتری ساخت شرکت پارتک آلمان (Partec, Munster, Germany) انجام شد. به منظور تهیه نمونه برای تجزیه سطوح پلوئیدی با روش سوسپانسیون هسته‌ای، به مقدار مساوی از برگ‌های کوچک قسمت‌های جوان گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید به اندازه تقریبی یک سانتی‌متر مربع برداشته شد. ۴۰۰ μl بافر استخراج به برگ‌ها افزوده شده و سپس برگ‌ها با استفاده از یک تیغ تیز خرد شدند. پس از این مرحله ۱۶۰۰ μl ترکیب مخصوص تجزیه فلوسایتومتری PI اضافه شد. سپس نمونه از فیلترهای مخصوص دستگاه عبور داده شد تا تجمعات سلولی و قطعات درشت حذف شوند. نمونه صاف شده به دستگاه تزریق شد و پس از انجام فرایند تجزیه، هیستوگرام DNA به دست آمد. مقدار DNA هر نمونه با بررسی

توسط سنجاق بسته شدند. ساعت ۸-۱۰ صبح روز بعد عمل گرده‌افشانی با بساک‌های پرتوتابی شده و بساک‌های پرتوتابی نشده (شاهد) که به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شده بودند، به وسیله دست انجام شد (هر گل ماده توسط ۳ بساک گرده‌افشانی شد). سپس گل‌های ماده مجدداً توسط سنجاق بسته شدند. همچنین در هر تکرار یک گل ماده از هر ژنوتیپ بدون انجام گرده‌افشانی ایزوله شد. سنجاق‌های ایزوله ۳-۴ روز پس از گرده‌افشانی حذف شدند (۱۳).

آزمایش جوانه‌زنی دانه گرده: هم‌زمان با انجام گرده‌افشانی، جوانه‌زنی دانه‌های گرده پرتوتابی شده در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. گرده‌های پرتوتابی شده با پرتو گاما بر روی محیط کشت گرده خیار شامل ۱۵ (w/v) درصد ساکارز، ۰/۰۱ (w/v) درصد اسید بوریک، ۱mM نیترات کلسیم و ۰/۳ درصد فیتازل (Sigma) با pH=۶ پخش شدند (۴). شش ساعت پس از کشت، میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده با میکروسکوپ Olympus BX53 مورد بررسی قرار گرفتند.

نجات جنین‌های القایی در شرایط آزمایشگاهی: میوه‌های رشد کرده ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده، برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشو میوه‌ها شکافته شده و دانه‌های آن در زیر جریان آب شیر لوله‌کشی استخراج و تمیز شدند. علاوه بر این پس از شکافتن میوه، دانه‌ها مجدداً جهت ضدعفونی به مدت ۱۲ دقیقه در محلول حاوی ۱ درصد هیپوکلریت سدیم قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰-۵ دقیقه در آب مقطر استریل غوطه‌ور شده و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند (۲۹). برای سهولت شناسایی و استخراج جنین‌ها از روش کشت مایع (۲۷) استفاده شد. تقریباً ۲۰-۴۰ دانه ضدعفونی شده در پتری‌دیش‌های یک بار

حداقل ۱۰۰۰۰ سلول مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به این که نمونه تهیه شده تزریقی به دستگاه به صورت جدا و نیز مخلوطی از عصاره گیاه هاپلوئید و دیپلوئید بود با داشتن محل پیک ثابت گیاه، سطح پلوئیدی نمونه تعیین شد (۳۲).

آزمایش زنده‌مانی دانه گرده گیاهان حاصل از القای جنین: گل‌های نر گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید از نمونه‌هایی که در گلخانه سازگار شده و رشد کافی داشتند جدا شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. گلبرگ گل‌ها حذف و گرده گیاهان روی لام پخش شدند. سپس یک قطره از محلول فلوروسئین دای استات (FDA) روی آن‌ها اضافه شد. پس از چند ثانیه لامل را روی لام قرار داده و با میکروسکوپ فلوروسنت بررسی شدند.

آزمایش زنده‌مانی دانه گرده گیاهان حاصل از القای جنین: گل‌های نر گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید از نمونه‌هایی که در گلخانه سازگار شده و رشد کافی داشتند جدا شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. گلبرگ گل‌ها حذف و گرده گیاهان روی لام پخش شدند. سپس یک قطره از محلول فلوروسئین دای استات (FDA) روی آن‌ها اضافه شد. پس از چند ثانیه لامل را روی لام قرار داده و با میکروسکوپ فلوروسنت بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت و برای تبدیل و نرمال‌سازی توزیع داده‌های مربوط به صفات تعداد دانه، تعداد جنین، تعداد گیاه باززا شده و تعداد گیاه هاپلوئید از تبدیل جذری استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید. تمام تجزیه‌های آماری توسط نرم‌افزار SAS (Ver 9.4) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به تولید دانه، القای جنین، باززایی گیاه و تولید گیاهان هاپلوئید در جدول ۱ آورده شده است. اثر دز پرتو گاما، ژنوتیپ و همچنین برهمکنش دز و ژنوتیپ بر تعداد دانه در میوه معنی‌دار ($P > 0/01$) بود. بیش‌ترین تعداد دانه در هر میوه از پرتوتابی ژنوتیپ‌های باسمنج تبریز (۳۵۰/۸۸)، آلفا بیت

اگرچه تفاوت دزهای پرتو گاما بر روی شاخص القای جنین اثر معنی‌داری نداشت اما ژنوتیپ و برهمکنش دز پرتوتابی و ژنوتیپ بر این صفت تأثیر معنی‌داری داشتند ($P > 0/01$). بیش‌ترین میزان جنین پارتنوژنیک به ترتیب در پرتوتابی ژنوتیپ‌های اکسترم (۲/۲۵) و کریم (۱/۷۵) با دزهای ۳۰۰ گری و ۵۰۰ گری پرتو گاما مشاهده گردید. در حالی که از پرتوتابی ژنوتیپ‌های نگین، اکسترم و آلفا بیت با دز ۵۰۰ گری هیچ جنینی به دست نیامد (جدول ۲).

نتایج به دست آمده نشان داد که دز پرتوتابی ($P > 0/05$)، ژنوتیپ و همچنین برهمکنش آن‌ها ($P > 0/01$) روی باززایی گیاه (هاپلوئید و دیپلوئید) مؤثر است. بیش‌ترین گیاه به دست آمده از دز ۳۰۰ گری و ژنوتیپ اکسترم بود که تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها از خود نشان داد. از ژنوتیپ‌های نگین، اکسترم و آلفا بیت که با دز ۵۰۰ گری پرتوتابی شده بودند هیچ جنین و هیچ گیاهی به دست نیامد (جدول ۲). گونزالو و همکاران (۲۰۱۱) نتایج مشابهی را در فرایند تولید گیاهان هاپلوئید خربزه گزارش کردند (۱۸). به طور معمول با افزایش دز پرتوتابی درصد جنین‌های القایی و نیز توانایی باززایی آن‌ها کاهش می‌یابد و این در حالی است که هرچه دز پرتوتابی زیادتر شود احتمال زنده ماندن گرده و انجام لقاح طبیعی کاهش یافته اما درصد هاپلوئید بودن جنین‌های القایی نسبت به دزهای پایین‌تر افزایش خواهد یافت.

که واکنش ژنوتیپ‌های مختلف خیار در مراحل مختلف تولید گیاهان هاپلوئید و موارد محدودکننده برای هر ژنوتیپ متفاوت است. از آنجا که شرایط آزمایش برای همه ژنوتیپ‌ها مشابه و یکسان بود، تفاوت در واکنش‌ها بیانگر تأثیر قوی ژنوتیپ بر تولید گیاهان هاپلوئید در خیار می‌باشد که پیش از این نیز توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (۱، ۱۰، ۲۲، ۲۶، ۲۸، ۳۱، ۳۴، ۳۶ و ۳۷). بنابراین به نظر می‌رسد ژنوتیپ و سلامت گیاه نقش مهمی در القای جنین‌های هاپلوئید پارتنوژنز بازی می‌کند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت دزهای پرتوتابی به کار رفته اثر معنی‌داری بر روی تولید گیاه هاپلوئید نداشت اما ژنوتیپ ($P > 0.05$) و به‌خصوص برهمکنش دز در ژنوتیپ ($P > 0.01$) تأثیر معنی‌داری بر تولید گیاهان هاپلوئید خیار داشت. بیش‌ترین گیاه هاپلوئید از پرتوتابی ژنوتیپ اکسترم با دز ۳۰۰ گری (۱/۲۵) و پرتوتابی ژنوتیپ سوپر دامینوس (۰/۷۵) با دز ۵۰۰ گری به دست آمد. این در حالی است که هر یک از این ژنوتیپ‌ها در دز متفاوت نتوانستند هیچ گیاهی تولید کنند (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر دز پرتو گاما و ژنوتیپ بر روی تعداد دانه، جنین، باززایی گیاه و تولید گیاه هاپلوئید.

Table 1. Analysis of variance of the effect of Gamma-irradiation doses and different cucumber genotypes on seed number (S), embryo number (E), plant number (P) and haploid plant number (H).

میانگین مربعات Mean Squares				درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
گیاه هاپلوئید H	گیاه باززا شده P	جنین E	دانه S		
0.06 ^{ns}	0.30*	0.06 ^{ns}	93.16**	1	دز پرتو Irradiation doses
0.11*	0.22**	0.51**	84.66**	6	ژنوتیپ genotypes
0.37**	0.43**	0.99**	30.54**	6	دز پرتو × ژنوتیپ Irradiation doses * genotypes
0.05	0.06	0.07	7.52	98	خطا Error
26.16	27.43	25.71	18.61	-	ضریب تغییرات (درصد) CV%

**، * و ^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیرمعنی‌دار.

**، * and ^{ns} are significant at the 1% and 5% probability levels and non-significant respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش دز پرتو گاما و ژنوتیپ‌های مختلف خیار برای صفات تولید دانه، القای جنین هاپلوئید، بازایی گیاه و تولید گیاه هاپلوئید.

Table 2. Mean comparison interaction of Gamma-irradiation doses and different cucumber genotypes for mean seed number (MS), mean embryo number (ME), mean plant number (MP), mean haploid number (MH).

میانگین هاپلوئید MH	میانگین گیاه باززا شده MP	میانگین جنین ME	میانگین دانه MS	ژنوتیپ Genotype	دز پرتو گاما Gamma-irradiation doses
0.50 ^{bc}	0.50 ^{bcd}	0.75 ^c	265.25 ^{bcd}	نگین Negin	300 Gray
1.25 ^a	1.75 ^a	2.25 ^a	253.75 ^{cd}	اکسترم Extreme	
0.00 ^d	0.25 ^{bcd}	0.25 ^{cd}	132.25 ^{fg}	کریم Karim	
0.00 ^d	0.50 ^{bcd}	0.75 ^c	288.00 ^{abc}	سوپر دامینوس Super Daminus	
0.13 ^{cd}	0.13 ^{cd}	0.13 ^d	342.50 ^{ab}	آلفا بیت Beith Alpha	
0.38 ^{bcd}	0.38 ^{bcd}	0.38 ^{cd}	350.88 ^a	باسمنج تبریز Basmenj Tabriz	
0.25 ^{cd}	0.25 ^{bcd}	0.25 ^{cd}	169.00 ^{ef}	دستجرد اصفهان Dasgerdi Isfahan	
0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	298.25 ^{abc}	نگین Negin	500 Gray
0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	245.75 ^{cde}	اکسترم Extreme	
0.25 ^{cd}	0.63 ^{bc}	1.75 ^{ab}	82.88 ^g	کریم Karim	
0.75 ^b	0.75 ^b	1.38 ^b	244.00 ^{cde}	سوپر دامینوس Super Daminus	
0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	161.50 ^{fg}	آلفا بیت Beith Alpha	
0.25 ^{cd}	0.25 ^{bcd}	0.50 ^{cd}	201.50 ^{def}	باسمنج تبریز Basmenj Tabriz	
0.50 ^{bc}	0.50 ^{bcd}	0.50 ^{cd}	192.75 ^{def}	دستجرد اصفهان Dasgerdi Isfahan	

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

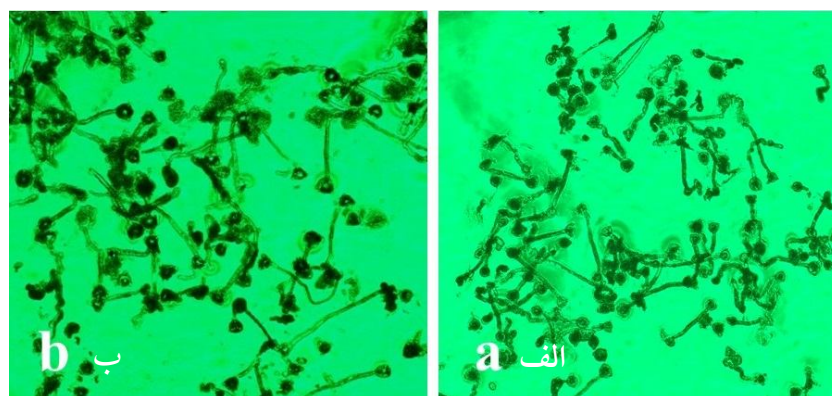
* Means with the same letters in each column are not significantly different at the %1 probability level.

می‌رسد گیاه خیار که دارای دانه گرده کوچک‌تری ($65\mu\text{m}$) نسبت به سایر گونه‌های کدوئیان است دارای مقاومت بیشتری نسبت به دزهای بالای پرتو می‌باشد و به همین دلیل است که موفقیت القای جنین و تولید گیاهان هاپلوئید در انواع کدو که دارای گرده بزرگ‌تری ($180\mu\text{m}$) هستند با دزهای پایین‌تر گزارش شده است؛ به طوری که مناسب‌ترین دز پرتوتابی کدو تنبل ۵۰ و ۱۰۰ گری (۲۲) و در کدو طیبی ۱۰۰ گری (۱۲) گزارش شده است. علاوه بر این گرده خیار و خربزه دارای ۳ منفذ است، در حالی که گرده‌های انواع کدو ۱۲ منفذ دارند. بنابراین توانایی زنده‌مانی و جوانه‌زنی دانه گرده در خیار و خربزه

به طور کلی در این پژوهش از دو دز پرتوتابی با شدت ۳۰۰ و ۵۰۰ گری برای القای جنین‌زایی پارتنوژنیک استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین این دو دز بر فراوانی القای جنین هاپلوئید بود. طیف وسیعی از شدت تابش گاما برای القای جنین‌زایی در خانواده کدوئیان استفاده می‌گردد به طوری که بیش‌ترین شدت تابش در گیاه خیار و کم‌ترین شدت تابش در گیاه کدو خورشتی (۲۵ گری) گزارش گردیده است (۲۴). یک همبستگی منفی بین قطر دانه گرده و مقاومت در برابر پرتو وجود دارد که آن هم تابعی از مقدار DNA در هسته می‌باشد (۲، ۲۰ و ۴۱). در نتیجه به نظر

بیش‌تر از کدوها می‌باشد. بنابراین اندازه، سن و خصوصیات ریخت‌شناسی دانه گرده در تعیین دز پرتوتابی بسیار مهم و تعیین‌کننده می‌باشد. **آزمایش جوانه‌زنی دانه گرده:** نتایج جوانه‌زنی دانه‌های گرده پرتوتابی شده و پرتوتابی نشده (شاهد) از نظر توانایی زنده‌مانی دانه‌گرده (شکل ۱) نشان داد که جوانه‌زنی و رشد لوله دانه‌های گرده شاهد (۹۶ درصد جوانه‌زنی) از گرده‌های پرتوتابی شده (۶۰۰ گری پرتو گاما) با گرده‌های شاهد برابر بود (۳).

بیش‌تر از کدوها می‌باشد. بنابراین اندازه، سن و خصوصیات ریخت‌شناسی دانه گرده در تعیین دز پرتوتابی بسیار مهم و تعیین‌کننده می‌باشد. **آزمایش جوانه‌زنی دانه گرده:** نتایج جوانه‌زنی دانه‌های گرده پرتوتابی شده و پرتوتابی نشده (شاهد) از نظر توانایی زنده‌مانی دانه‌گرده (شکل ۱) نشان داد که جوانه‌زنی و رشد لوله دانه‌های گرده شاهد (۹۶ درصد جوانه‌زنی) از گرده‌های پرتوتابی شده (۶۰۰ گری پرتو گاما) با گرده‌های شاهد برابر بود (۳).



شکل ۱- جوانه‌زنی دانه‌های گرده شاهد (الف) و گرده‌های پرتوتابی شده (ب).

Fig. 1. Pollen germination. Control (a) and irradiated pollen (b).

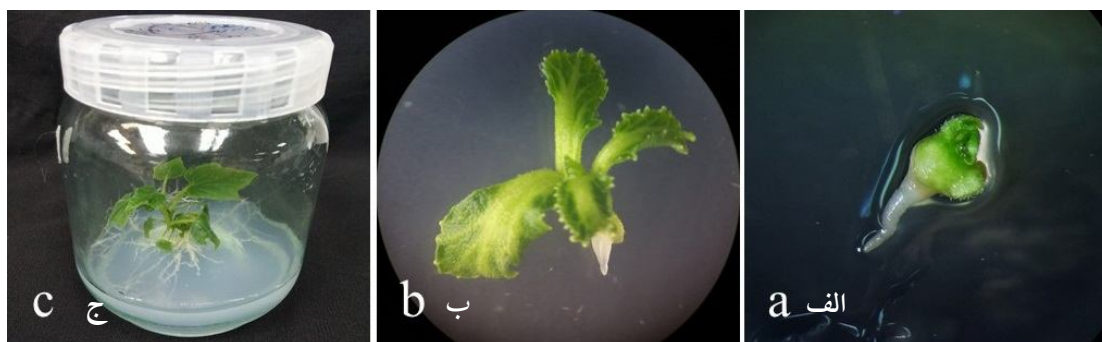
به‌طوری‌که سه هفته پس از گرده‌افشانی همه میوه‌ها دارای ۹۹ درصد دانه پر حاوی جنین طبیعی با لپه بودند. در حالی‌که میوه‌های حاصل از گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده حاوی تعداد بسیار محدودی دانه حاوی جنین بودند و اکثر دانه‌ها پوک بودند که نشان‌دهنده صحت انجام آزمایش در طول مراحل پرتوتابی و گرده‌افشانی می‌باشد و با نتایج لطفی و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد (۲۷). نکته قابل‌توجه این بود که در بیش‌تر میوه‌های گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده، دانه‌ها (حتی دانه‌های پوک) در نوک میوه تشکیل شده بودند و دانه‌های قسمت دم میوه غالباً پوک و کوچک بودند که این موضوع می‌تواند به‌دلیل تأثیر دز پرتو بر رشد لوله گرده بوده باشد. همچنین گل‌های ماده‌ای که

همان‌طور که دانگ و همکاران (۲۰۱۶) نیز اشاره کرده‌اند، دز پرتوتابی نباید آن‌قدر بالا باشد که از جوانه‌زنی لوله گرده ممانعت کند، بلکه باید تا حدی باشد که از انجام لقاح طبیعی و تولید جنین دیپلوئید جلوگیری کند (۹). پیکس و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که سطح پایین پرتوتابی ممکن است تنها به بخشی از هسته‌زایی آسیب برساند، به‌طوری‌که هسته‌زایی توانایی لقاح کامل را از دست داده و تنها توانایی القای جنین‌های هاپلوئید را داشته باشد که ممکن است دلیلی بر رشد گیاهان هاپلوئید از برخی جنین‌های استخراج شده از میوه‌ها پس از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده باشد (۳۳). **تشکیل میوه:** میوه گل‌های تیمار شده با گرده‌های پرتوتابی نشده (شاهد) به‌صورت طبیعی رشد کردند.

زده شد. در تمامی گیاهان مورد آزمایش در صورت دیپلوئید بودن گیاه، پیک‌های شاخص محتوای DNA آنها در محدوده ۸۵ و ۱۷۰ بود و پیک‌ها بر نمونه شاهد منطبق شد. در حالی‌که در گیاهان هاپلوئید تقریباً نصف مد نمونه‌های دیپلوئید در حدود ۴۲ و ۸۵ بود و تشکیل پیک‌هایی متفاوت از نمونه شاهد داد. در هیستوگرام DNA برخی از گیاهان علاوه بر پیک اول که حاصل خطای دستگاه^۱ است دو پیک دیگر وجود خواهد داشت؛ یک پیک بلند (پیک ۲) که مرحله G_1 تقسیم سلولی را نشان می‌دهد و پیک دیگر (پیک ۳) که نشان دهنده مرحله G_2/M چرخه سلولی است و محل قرارگیری آن در محور افقی دو برابر پیک قبلی خواهد بود (۳۲). از ۴۷ گیاه به‌دست آمده ۳۴ گیاه هاپلوئید بودند. از زمان گزارش استفاده از فلوسایتومتری جهت تعیین سطح پلوئیدی توسط دلالت و همکاران (۱۹۸۷)، کاربرد این روش روز به روز در حال گسترش است. از آن زمان به بعد بیش‌تر پژوهشگران استفاده از فلوسایتومتری را جهت تعیین سطح پلوئیدی گیاهان به‌خصوص در آزمایش‌های تولید گیاهان هاپلوئید به‌عنوان یک روش سریع و مطمئن گزارش کرده‌اند (۷، ۸، ۱۹ و ۳۲).

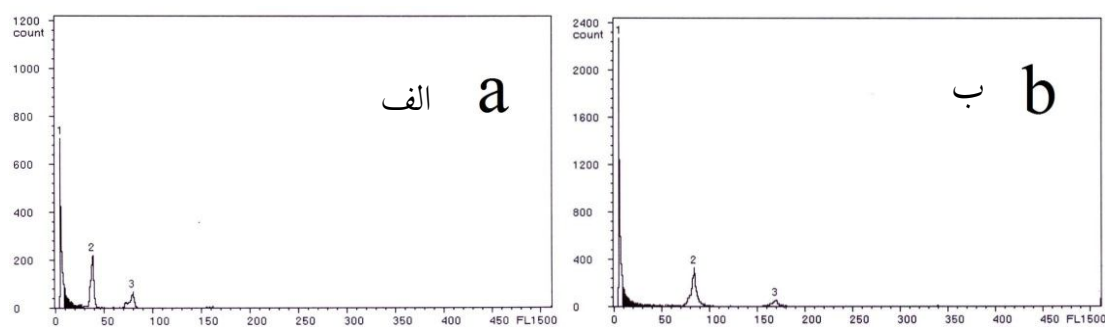
از گرده‌افشانی آنها جلوگیری شده بود در ارقام پارتنوکارپ بدون تشکیل دانه رشد کردند ولی ارقام مزرعه‌ای و بومی قادر به تشکیل میوه نشدند.

رشد گیاهچه و تجزیه و تحلیل پلوئیدی: جنین‌های نجات داده شده پس از گذشت در حدود پنج هفته به گیاهچه تبدیل شدند (شکل ۲). یک برگ از هر گیاهچه جهت تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری استفاده شد. شکل ۳ هیستوگرام مربوط به تعیین سطح پلوئیدی رسم شده توسط دستگاه فلوسایتومتری را نشان می‌دهد که سبب شناسایی گیاهان هاپلوئید از دیپلوئید گردید (شکل ۳). در این شکل محور افقی (محور X)، سطح پلوئیدی سلول‌ها و محور عمودی (محور Y)، تعداد سلول‌های شمارش شده برای هر نمونه را نشان می‌دهد. برای مطالعه محتوای DNA گیاهان به‌دست آمده از برگ خیار ژنوتیپ مادری به‌عنوان شاهد استفاده شد. این نمونه چندین بار مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که دستگاه فلوسایتومتری، پیک‌های شاخص محتوای DNA (Mode) را برای گیاه دیپلوئید شاهد به‌طور متوسط ۸۵ و ۱۷۰ نشان می‌دهد. بنابراین شاخص محتوای DNA مورد انتظار برای گیاه خیار هاپلوئید در محدوده ۴۵-۴۰ تخمین



شکل ۲- مراحل رشد جنین پارتنوژنیک درون‌شیشه‌ای و تشکیل گیاهچه هاپلوئید.

Fig. 2. *In vitro* rescued parthenogenic embryo and plant regeneration.

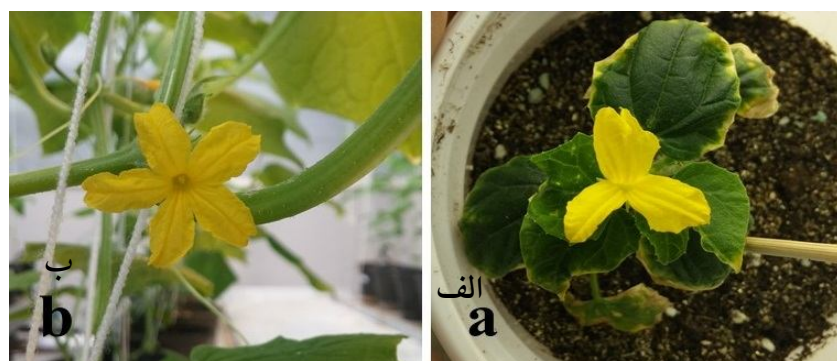


شکل ۳- تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از فلوسایتمتری. (الف) گیاه هاپلوئید (ب) گیاه دیپلوئید.

Fig. 3. Ploidy determination by flow cytometry analysis. (a) haploid plants of cucumber; (b) diploid plants as control.

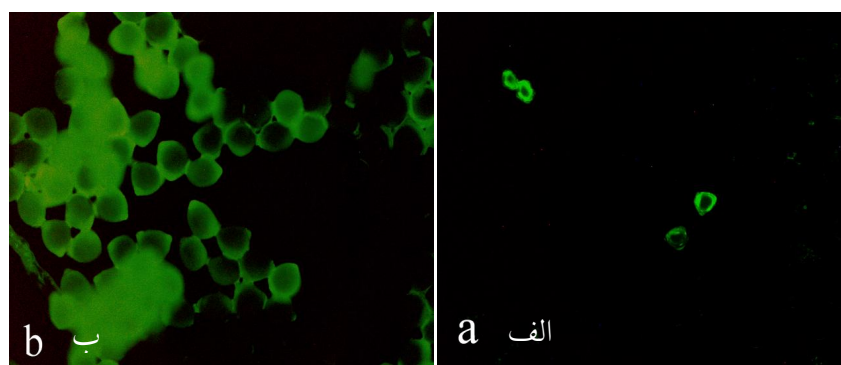
وجود گرده‌های احتمالی هم تعداد بسیار کمی گرده با شکل غیرطبیعی مشاهده شد (شکل ۵). در بیشتر گیاهان هاپلوئید گل‌ها به صورت دسته‌جمعی در هر گره تشکیل می‌شدند ولی در گیاهان دیپلوئید معمولاً بیش‌تر از ۲ گل در هر گره تشکیل نمی‌شد. گل‌های ماده گیاهان هاپلوئید با وجود انجام گرده‌افشانی توسط گرده گیاهان دیپلوئید هیچ میوه‌ای تشکیل ندادند. تفاوت ابعاد و شکل برگ‌ها نیز در گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید کاملاً واضح بود. بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی پیش از این نیز جهت تشخیص گیاهان هاپلوئید از دیپلوئید در خیار، هندوانه، خربزه و کدو (۳ و ۲۲) استفاده شده است.

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی: گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید را می‌توان با استفاده از مشاهدات ریخت‌شناسی از هم تشخیص داد. گیاهان هاپلوئید رشد کم‌تری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند. در گیاهان هاپلوئید گل‌های نر و ماده کوچک‌تر از گیاهان دیپلوئید بوده (شکل ۴) و گل‌های آن‌ها غالباً ۳ و ۴ گلبرگی بودند؛ در حالی‌که گلبرگ گیاهان دیپلوئید خیار به‌طور معمول ۵ گلبرگی هستند. همچنین گلبرگ‌های آن‌ها در انتهای جام به یکدیگر چسبیده نبودند که این مشاهدات با نتایج ساتن (۱۹۸۹) و ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۳۹۲) کاملاً مطابقت دارد (۱۱ و ۳۷). گل‌های نر گیاهان هاپلوئید به‌طور معمول هیچ گرده‌ای تولید نمی‌کردند (۲۳) و در صورت



شکل ۴- تفاوت ظاهری گل‌های ماده در گیاهان هاپلوئید (الف) و دیپلوئید (ب).

Fig. 4. Differences between the haploid plant (a) and diploid plant flowers (b).



شکل ۵- رنگ آمیزی فلورسین دای استات (FDA) گردهای گیاهان هاپلوئید (الف) و دیپلوئید (ب).

Fig. 5. Fluorescein diacetate (FDA) staining of the haploid (a) and diploid (b) pollen.

نتیجه گیری کلی

تولید گیاهان هاپلوئید خیار با استفاده از گردهای پرتوتابی شده یک روش کارآمد و مفید می باشد. هدف اصلی از تحقیقات هاپلوئیدی رسیدن به لاین های دابل هاپلوئید مطلوب جهت پیشبرد برنامه های اصلاحی می باشد. در این آزمایش از دو دز پرتو گاما جهت القای جنین پارتنوژنیک در ۷ ژنوتیپ خیار استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس بیانگر معنی دار بودن برهمکنش دز پرتو گاما در ژنوتیپ بود. بیشترین فراوانی گیاه هاپلوئید از پرتوتابی ژنوتیپ اکسترم با دز ۳۰۰ گری (۱/۲۵) و پرتوتابی ژنوتیپ سوپر دامینوس (۰/۷۵) با دز ۵۰۰ گری به دست آمد. می توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ های مختلف پاسخ های متفاوتی را نسبت به دزهای مختلف پرتوتابی نشان می دهند و با تعیین شدت تابش مناسب اشعه گاما در هر ژنوتیپ می توان جنین زایی پارتنوژنیک را القاء نمود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از پایان نامه دکتری گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان است که تحت حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در قالب پروژه شماره ۹۴۰۰۱-۹۴۵۱-۰۵-۰۵-۱۲ انجام شد. بنابراین از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و پژوهشکده کشاورزی هسته ای (پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای) که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از همکاری آقای مهندس هادی فتح اللهی (مسئول فیزیک بهداشت پژوهشکده کشاورزی) و خانم مهندس مهناز عروجلو و خانم مهندس فرزانه فرحزادی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Baktemur, G., Yucel, N.K., Taskin, H., Comlekcioglu, S. and Buyukalaca, S. 2014. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. Turk. J. Biol. 38: 3. 318-327.
2. Brewbaker, J.L. and Emery, G.C. 1962. Pollen radiobotany. Radiat. Bot. 1: 101-154.
3. Caglar, G. and Abak, K. 1999. Progress in the production of haploid embryos, plants and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen, in Turkey. Acta. Hort. 492: 317-320.
4. Cheng, J., Wang, Z., Yao, F., Gao, L., Ma, S., Sui, X. and Zhang, Z. 2015. Down-regulating CsHT1, a cucumber pollen-specific hexose transporter,

- inhibits pollen germination, tube growth and seed development. *Plant Physiol.* 168: 2. 635-647.
5. Claveria, E., Garcia-Mas, J. and Dolcet-Sanjuan, R. 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130: 4. 555-560.
 6. Cuny, F. 1992. Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.) réponses du pollen à l'irradiation gamma. The'se de Docteur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.
 7. Delaat, A.M.M., Gohde, W. and Vogelzack, M.J.D.C. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed.* 99: 4. 303-307.
 8. Dolezel, J., Greilhuber, J. and Suda, J. 2007. Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (eds) *Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes.* Wiley, Weinheim. Pp: 41-65.
 9. Dong, Y.Q., Zhao, W.X., Li, X.H., Liu, X.C., Gao, N.N., Huang, J.H., Wang, W.Y., Xu, X.L. and Tang, Z.H. 2016. Androgenesis, gynogenesis and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Rep.* 35: 10. 1991-2019.
 10. Du, S.L., Wei, H.J., Wei, A.M., Ma, D.H. and Huo, Z.R. 1999. Haploid plantlet regeneration of cucumber by pollination with irradiated pollens. *Sci. Agric. Sin.* 32: 2. 107.
 11. Ebrahimzadeh, H., Lotfi, M., Azizinia, S. and Ghanavati, F. 2013a. Production of haploids in *Cucurbita pepo* L. through parthenogenesis induced by Gamma-irradiated pollen. *Crop Biotech.* 3: 99-108. (In Persian)
 12. Ebrahimzadeh, H., Lotfi, M. and Azizinia, S. 2013b. Haploid induction in medicinal pumpkin using gamma irradiated pollen technique. 2nd National Congress on Medicinal Plants. Shahid Beheshti University International Conference Center, Tehran, Iran. 15-16 May. (In Persian)
 13. Ebrahimzadeh, H., Mirzabe, A.H., Lotfi, M. and Azizinia, S. 2013c. Gamma irradiation effects on physical properties of squash seeds. *CIGR J.* 15: 131-138.
 14. FAO. 2016. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
 15. Faris, N.M., Nikolova, V. and Niemirowicz-Szczytt, K. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. *Acta Physiol. Plant.* 21: 4. 391-396.
 16. Gałazka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K. 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Hortic.* 25: 1. 67-78.
 17. Germana, M.A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86: 131-146.
 18. Gonzalo, M.J., Claveria, E., Monforte, A.J. and Dolcet-Sanjuan, R. 2011. Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a doubled haploid line population. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 136: 2. 145-154.
 19. Grewal, R.K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A. and Warkentin, T.D. 2009. Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments. *Plant Cell Rep.* 28: 1289-1299.
 20. Jain, S.M., Sopory, S.K. and Veilleux, R.E. 1996. *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer, Dordrecht.
 21. Kasha, K.J. and Kao, K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature.* 225: 874-876.
 22. Kurtar, E.S. and Balkaya, A. 2010. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 102: 267-277.
 23. Kurtar, E.S., Balkaya, A. and Kandemir, D. 2016. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through another culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 127: 497. doi:10.1007/s11240-016-1074-6.

24. Kurtar, E.S., Sari, N. and Abak, K. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica*. 127: 335-344.
25. Laurie, D.A. and Bennett, M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76: 393-397.
26. Lei, C., Chen, J.F., Qian, C.T., Zhang, X.Q. and Zhang, Y.B. 2006. Studies on induction of haploid cucumbers by irradiated pollen pollination and their characterization. *Sci. Agric. Sin.* 39: 7. 1428-1436.
27. Lotfi, M., Alan, A.R., Henning, M.J., Jahn, M.M. and Earle, E.D. 2003. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 21: 11. 1121-1128.
28. Lotfi, M., Kashi, A. and Onsinejad, R. 1999. Induction of parthenogenetic embryos by irradiated pollen in cucumber. *Acta Hort.* 492: 323-328.
29. Lotfi, M. and Salehi, S. 2008. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium. *Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae* (Pitrat M, ed), INRA, Avignon, France.
30. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 3. 473-497.
31. Niemirowicz-Szczytt, K., Faris, N.M., Nikolova, V., Rakoczy-Troja Nowaska, M. and Malepszy, S. 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. In: Lester (ed) *Proceeding of Cucurbitaceae '94*, Pp: 169-171.
32. Ochatt, S., Patat-Ochatt, E.M. and Moessner, A. 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 329-341.
33. Peixe, A., Campos, M.D., Cavaleiro, C., Barroso, J. and Pais, M.S. 2000. Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L., cv. Rainha Claudia Verde). *Sci. Hortic.* 86: 267-278.
34. Przyborowski, J.A. and Niemirowicz-Szczytt, K. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breed.* 112: 70-75.
35. Röber, F.K., Gordillo, G.A. and Geiger, H.H. 2005. In vivo haploid induction in maize – Performance of new inducers and significance of doubled haploid line in hybrid breeding. *Maydica.* 50: 275-284.
36. Sauton, A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. *Sci. Hortic.* 35: 88. 71-75.
37. Sauton, A. 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Gen. Coop.* 12: 22-23.
38. Sauton, A. and Dumas de Vaulx, R. 1987. Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) as a result of gynogenesis induced by irradiated pollen. *Agronomie.* 7: 2. 141-147.
39. Sestili, S. and Ficcadeni, N. 1996. Irradiated pollen for haploid production. In: Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds) *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pp: 263-274.
40. Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127: 519-534.
41. Shridhar. 1992. Pollen grains of cultivated Cucurbits. In: *Proceedings of the 5th Eucarpia Cucurbitaceae Symp*, July 27-31, Warsaw, Poland. Pp: 28-33.
42. Smiech, M., Sztangret-Wisniewska, J., Galecka, T., Korzeniewska, A., Marzec, L., Kolakowska, G., Piskurewicz, U. and Niemirowicz-Szczytt, K. 2008. Potential use of RAPD markers in characteristics of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploids and double-haploids. *Acta Soc. Bot. Pol.* 77: 1. 29-34.

43. Touraev, A., Pfosser, M. and Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. *Adv. Bot. Res.* 35: 53-109.
44. Wang, S.M., Lan, H., Jia, H.H., Xie, K.D., Wu, X.M., Chen, C.L. and Guo, W.W. 2016. Induction of parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollens in 'Hirado Buntan' pummelo (*Citrus grandis* L.] Osbeck). *Sci. Hortic.* 207: 233-239.