اثر محیط کشت حاوی تخمدان روی کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک ارقام مختلف خیار (*Cucumis Sativus* L.)

سامره نجفی[1]، محمدرضا عبداللهی[2]*، حسن ساری خانی[3] و سید سعید موسوی[4]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲*- **نویسنده مسئول:** دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران (m.abdollahi@basu.ac.ir)

۳- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۴- استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۱۵

چکیده

در این آزمایش، اثر کشت توأم بساک با تخمدان خیار روی کارایی آندروژنز در کشت بساک ٤ رقم خیار مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. ارقام خیار (بتا آلفا، اصفهانی، باسمنج، کرکی) ، محیط‌های کشت (مایع، جامد) و تعداد تخمدان در محیط کشت (۰، ۱۰، ۲۰) عوامل مورد مطالعه در این آزمایش بودند. نتایج اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ بین ارقام خیار، محیط‌های کشت، تعداد تخمدان در محیط کشت، اثرات متقابل دوگانه و اثر سه‌گانه رقم در محیط کشت در تعداد تخمدان برای صفات درصد کالوس زایی (به جز اثر متقابل محیط کشت در تخمدان) و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۰۱ نشان داد. استفاده از محیط کشت مایع بدون تخمدان در رقم اصفهانی (۹۰٪) و محیط‌های کشت جامد حاوی ۱۰ تخمدان در رقم کرکی (۸٦/٦٦٪) و ۲۰ تخمدان در رقم باسمنج (۷٦/٦٦٪) بیشترین درصد کالوس زایی را به دنبال داشت. بیشترین درصد کالوس‌های رویان زا در ارقام کرکی (٦۰٪) و اصفهانی (٥٦/٦٦٪) در محیط کشت جامد حاوی ۱۰تخمدان به دست آمد. بیشترین تعداد رویان، با اضافه کردن ۱۰ تخمدان به محیط کشت جامد در ارقام کرکی و اصفهانی با میانگین ۰/۷٦ رویان به ازای هر بساک کشت شده به دست آمد. به‌طور کلی استفاده از ۱۰ تخمدان در محیط کشت جامد در ارقام بتا آلفا، اصفهانی، کرکی و هم‌چنین ۲۰ تخمدان در محیط کشت جامد در رقم باسمنج باعث افزایش تولید رویان در کشت بساک خیار گردید.

کلید واژه‌ها: آندروژنز، خیار، رویان‌زایی، کشت توأم، هاپلوئید.

مقدمه

خیار با نام علمی(*Cucumis sativus* L.) گیاهی از خانواده کدوئیان می‌باشد. خیار یک گیاه مهم از گروه سبزیجات می‌باشد و حداقل به مدت ۳۰۰۰ سال در سراسر جهان جهت استفاده غذایی کشت می‌گردد (آشوک کومار و مورثی[1]، ۲۰۰۴). طبق آمار منتشر شده توسط فائو[2] (۲۰۱۲) سطح زیر کشت جهانی این محصول، ۲۱۰۹٦٥۱ هکتار، و تولید جهانی آن ٦٥۱۳٤۰۷۸ تن در هکتار می‌باشد. کشور چین، بالاترین میزان تولید جهانی خیار را به خود اختصاص داده است. سطح زیر کشت خیار در ایران ۷۰۰۰۰ هکتار و میزان تولید این محصول ۱٦۰۰۰۰۰ تن می‌باشد. بیشترین سطح

1- Ashok kumar & Murthy

2- Food & Agriculture organization

زیر کشت خیار در ایران، متعلق به منطقه جیرفت و کهنوج بوده که حدود ۲۰٪ از سطح زیر کشت خیار در کل کشور را شامل می‌شود. هم‌چنین خیار در میان تولیدات گلخانه‌ای در ایران، بالاترین سطح زیر کشت را داراست (نصوحی[1]، ۲۰۰۱). خیار با توجه به دارا بودن خواص دارویی از قبیل تنظیم قند خون، رفع اختلالات رماتیسمی، بهبود دهنده‌ی عملکرد دستگاه گوارش و...، در میان سبزی‌های میوه‌ای، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (تونسر و بزتوک[2]، ۱۹۹۱). با توجه به توانایی رشد خیار در گستره‌ی وسیعی از شرایط محیطی، مشکلاتی مانند بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی، حمله آفات و حشرات، سبب کاهش قابل توجه میزان عملکرد این محصول شده که همین امر منجر به استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی به‌منظور تولید هاپلوئیدهای مضاعف جهت اصلاح ژنتیکی صفات خاص در خیار شده است (مالپزی[3]، ۱۹۸۸). تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف[4] در کشاورزی و بخصوص به نژادی گیاهی از جایگاه و اهمیت بالایی برخوردار است. هاپلوئیدها و هاپلوئیدهای مضاعف نقش مهمی را در اصلاح گیاهان دارند. در نتیجه القاء هاپلوئیدی و به دنبال آن دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در هاپلوئیدهای حاصل، امکان رسیدن سریع به هموزیگوسیتی ۱۰۰ درصد وجود دارد که در نتیجه، انجام تحقیقات ژنتیکی و اصلاحی را آسان‌تر و سریع‌تر می‌کند. روش‌های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از این روش‌ها، آندروژنز[5] می‌باشد. تکنیک آندروژنز به دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌شود. کشت بساک در برنامه‌های به‌نژادی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است که محققین زیادی با به کارگیری این روش، موفق به تولید گیاهان هاپلوئید در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شده‌اند (توراو[6]، ۲۰۰۱). اولین گیاهان هاپلوئید در خانواده کدوئیان در سال ۱۹۵۰ تولید شدند (گالازکا[7]، ۲۰۱۳). هایاز[8] (۱۹۵۴) تولید گیاه هاپلوئید از گیاه *Cucurbita maxima* را از طریق گرده‌افشانی با *Cucurbita moschata* گزارش کرد. آلدرز[9] (۱۹۵۸) رویان‌های‌هاپلوئید را از بذرهای طبیعی خیار به‌دست آورد، در همین زمان سوامیناتان و ساین[10] (۱۹۵۸) ساقه‌های هاپلوئید را از یک هندوانه دیپلوئید تیمار شده با اشعه ایکس به دست آوردند. کلاوریا[11]و همکاران (۲۰۰۵) و دولست[12] و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از تکنیک گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده در ارقام لهستانی خیار، گیاه هاپلوئید تولید کردند و سرعت برنامه‌های اصلاحی در خیار و هم‌چنین سرعت رسیدن به هموزیگوسیتی را افزایش دادند، گرچه تعداد گیاهان هاپلوئید مضاعف به‌دست‌آمده با این روش کم بودند. بر اساس مطالعات انجام شده، رایج‌ترین و بهترین روش شناخته شده برای به دست آوردن گیاهان هاپلوئید در انواع کدو، استفاده از روش گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده می‌باشد (گالازکا، ۲۰۱۳).کشت بساک روشی آسان و کم هزینه است که در بسیاری از گیاهان از جمله خانواده کدوئیان مانند کدوی پوست کاغذی (متوالی و همکاران[13]، ۱۹۹۸)، خربزه (دیانووسکا[14]، ۱۹۸۵)، و خیار (آشوک‌کومار، ۲۰۰۲؛ آشوک‌کومار و کورثی، ۲۰۰۴؛ سونگ و همکاران[15]، ۲۰۰۷)، به کار گرفته شده است. نتایج حاصل از مطالعات اولیه روی القاء آندروژنز در گیاهان خانواده کدوئیان، در مقیاس

1- Nosoohi
2- Tuncer & Boztok
3- Malepszy
4- Doubled Haploids
5- Androgenesis
6- Touraev
7- Galazka
8- Hayase
9- Aalders
10- Swaminathan & Singh
11- Claveria *et al.*
12- Dolcet *et al.*
13- Metwally *et al.*
14- Dryanovska
15- Song *et al.*

محدودی در خیار، هندوانه، خربزه، و کدو بررسی شده است که نتایج آن محدود به تولید کالوس و تعداد اندکی گیاه هاپلوئید بوده است (لازارت و ساسر[1]، ۱۹۸۲؛ دریانووسکا و ایلیوا[2]، ۱۹۸۳؛ زو و همکاران[3]، ۱۹۸۳؛ شیل و رابینسون[4]، ۱۹۸۷). اخیراً محققین با مطالعه اثر عوامل مختلف از قبیل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، پیش تیمارهای گرمایی و سرمایی، منابع تأمین‌کننده کربن، اسیدهای آمینه و پلی آمین‌ها روی کارایی کشت بساک خیار موفق به تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف با فراوانی بالا در خیار شده‌اند (آشوک‌کومار ، ۲۰۰۲؛ آشوک‌کومار و مورثی، ۲۰۰۳؛ سونگ و همکاران، ۲۰۰۷). براساس گزارش بروقتون[5] (۲۰۰۸) کشت توأم بساک با تخمدان، یک عامل کلیدی در بهبود موفقیت کشت بساک است. کشت توأم بساک با تخمدان اثر تحریک‌کننده‌ای را بر رویان‌زایی میکروسپورها در گندم نشان داده است (داتا و ونزل[6]، ۱۹۸۷). همچنین در تعدادی از گونه‌ها مانند گندم (مجزا و همکاران[7]، ۱۹۹۳)، گندم دوروم (سیستو و همکاران[8]، ۲۰۰۶)، و تریتیکاله (یودس و آموندسن[9]، ۲۰۰۵)، حضور تخمدان باعث افزایش کارایی کشت میکروسپور جهت تولید رویان و به دنبال آن گیاهچه گردید. وجود تخمدان در محیط کشت ممکن است موادی مثل اکسین، فنیل استیک اسید[10] یا آنالوگ‌های آن و یا ترکیبی از این عوامل را آزاد کند (ژنگ[11]، ۲۰۰۲). اخیراً لیتارت و همکاران[12] (۲۰۰۶) پیشنهاد کرده‌اند که ممکن است، پروتئین آرابینوگالاکتان[13] توسط تخمدان گندم ترشح شود. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر کشت توأم بساک با تخمدان خیار روی کاررایی آندروژنز در ارقام مختلف خیار در محیط‌های کشت مایع و جامد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور خیار مورد استفاده در این تحقیق، شامل بذور سه توده بومی خیار اصفهانی، خیار باسمنج و خیار کرکی (کرمانشاهی) و هم‌چنین یک رقم خارجی به نام سوپر بتا آلفا می‌باشد. رقم خیار اصفهانی از رقم‌های ایرانی است که دارای عملکرد قابل قبولی در مناطق مختلف ایران به‌خصوص اصفهان می‌باشد و بذور آن از شرکت پارسا گستر اصفهان تهیه شد. رقم سوپر بتا آلفا در کشور ایتالیا تولید شده و در سایر کشورها از جمله ایران کشت می‌شود. بذور رقم سوپر بتا آلفا از شرکت دلتای سبز جنوب تهیه شد. رقم کرکی یک رقم وحشی خیار است که در استان کرمانشاه و استان‌های اطراف دو بار در سال کشت می‌شود. رقم کرکی از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه تهیه شد. رقم باسمنج نیز از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی تهیه شد. توده‌های بومی ذکر شده به‌خصوص ارقام اصفهانی و باسمنج به دلیل کشت گسترده در مناطق ایران و هم‌چنین داشتن خصوصیات کیفی بالا به عنوان مواد گیاهی جهت انجام این آزمایش انتخاب گردیدند.

شرایط رشد گیاهان مادری

بذور گیاهان مادری ابتدا به مدت ۲۴ ساعت جهت تسریع جوانه‌زنی در آب خیسانده شدند، سپس در گلدان‌هایی با قطر ۵ سانتی‌متری با عمق کاشت ۲ سانتی‌متر در گلخانه گروه زراعت دانشکده کشاورزی بوعلی سینا در یک بستر مناسب کشت گردیدند. جهت نشاء کاری گیاهان از مخلوط کوکوپیت و پرلیت استفاده گردید، که در داخل هر گلدان دو بذر کشت گردید. پس از گذشت ۱۰ روز و پس از این‌که گیاهان مادری به مرحله ۴ برگی رسیدند، به درون گلدان‌هایی با قطر ۳۰

1- Lazarte and Sasser
2- Dryanovska and Ilieva
3- Xue *et al*.
4- Shail & Robinson
5- Broughton
6- Datta and Wenzel
7- Mejza *et al.*
8- Cistue *et al.*
9- Eudes & Amundsen
10- Phenylacetic acid
11- Zheng
12- Letarte *et al.*
13- Arabinogalactan

سانتی‌متر حاوی خاک با نسبت‌های یک قسمت کود دامی پوسیده و دو قسمت خاک مزرعه منتقل شدند. در داخل هر گلدان ۳ گیاهچه خیار کشت شد. مراقبت‌های زراعی در گلخانه، شامل آبیاری، سم‌پاشی، کودپاشی و محلول‌پاشی با روش مناسب انجام گرفت. برای تأمین تعداد کافی از گلدان‌های مادری هر ۲۰ روز تعدادی گلدان به همین صورت کشت می‌شد.

تعیین مرحله رشد و نمو دانه گرده

حدود ۳۰ روز پس از کشت، گیاهان مادری به تدریج شروع به گلدهی کردند. در این زمان جهت تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورها، غنچه‌های گل نر در اندازه‌های مختلف برداشت شدند و بساک‌های مربوط به هر غنچه جدا گردید و به‌طور جداگانه جهت رنگ‌آمیزی هسته میکروسپورها استفاده شدند. جهت تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورها از روش اسکواش استفاده شد. به این منظور بساک‌ها به مدت ۴۰ الی ۴۵ دقیقه در محلول استوکارمن[1] (یک گرم پودر کارمن+ ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک[2] ۴۵ درصد) گذاشته شدند (واسیل[3]، ۱۹۶۷؛ جوهر[4]، ۲۰۰۰). بعد از رنگ‌آمیزی، بساک‌ها روی لام آزمایشگاهی له شدند و در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ×۴۰، مراحل مختلف رشد و نموی میکروسپورها شامل مراحل تتراد، تک هسته‌ای میانی، تک‌هسته‌ای انتهایی و ابتدای دو هسته‌ای مشاهده گردیدند و از بین این مراحل رشد و نموی مرحله مناسب میکروسپورهای خیار برای رویان‌زایی گامتی تعیین گردید.

ضدعفونی ریز نمونه‌ها

جهت شستشو، ابتدا بساک‌ها پس از شستشو در آب، در الکل ۷۰٪ جهت تأثیر بهتر مواد ضدعفونی‌کننده، غوطه‌ور گردیده، سپس ریز نمونه‌ها (غنچه‌های حاوی بساک) در هیپوکلرید سدیم[5] ۲/۵ ٪ به مدت ۵ دقیقه (تخمدان‌ها به مدت ۶ دقیقه) غوطه‌ور شدند و درنهایت بساک‌ها در ۳ نوبت ۵ دقیقه‌ای با آب مقطر استریل آبکشی گردید.

روش کشت بساک و آزمایش کشت توأم بساک با تخمدان

در این آزمایش اثر کشت توأم بساک با تخمدان خیار روی کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی از کشت بساک ارقام مختلف خیار در محیط‌های کشت مایع و جامد مطالعه گردید. جهت القاء کالوس در بساک‌های خیار از محیط‌های کشتMS (موراشیگ و اسکوگ[6]، ۱۹۶۲) مایع و جامد حاوی ترکیب هورمونی توفوردی[7] (۲/۲۶ میکرومول در لیتر)، بنزیل آمینو پورین[8] (۴/۴۴ میکرومول در لیتر) و کینیتین[9] (۴/۶۴ میکرومول در لیتر)، حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۷ گرم در لیتر آگار و نیزpH=۵/۷ قرار گرفتند. به‌منظور القاء رویان در کالوس‌های القاء شده از محیط کشت MSاستفاده شد که در همه تیمارها از ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید[10] (۰/۵۴ میکرومول در لیتر) و بنزیل آمینو پورین (۱۳/۳۲ میکرومول در لیتر)، ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر، آگار به میزان ۸ گرم در لیتر وpH=۵/۷ استفاده شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد که فاکتور اول رقم خیار در ۴ سطح (بتا آلفا[11]، باسمنج، اصفهانی و کرکی) و فاکتور دوم نوع محیط کشت در ۲ سطح (مایع و جامد) و فاکتور سوم تعداد تخمدان استفاده شده در ۳ سطح (۰، ۱۰، ۲۰ تخمدان) بود. تخمدان‌های خیار، از گل‌های ماده زمانی که هنوز باز نشده بودند برداشت گردیدند. به عبارتی تخمدان‌ها از گل‌های ماده همزمان با برداشت گل‌های نر برداشت گردیدند. تخمدان‌ها در مرحله

1- Acetocarmine
2- Acetic acid
3- Vasil
4- Jauhar
5- Sodium hypochlorite

6- Morashige & Skoog
7- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
8- 6-benzyloaminopuryna
9- Kinetin
10- 1-Naphthaleneacetic acid
11- Beta Alpha

مناسب از گل‌های ماده سترون شده در زیر بینی کولار جدا شده و در تیمارهای مختلف در محیط کشت بساک قرار گرفتند. در این آزمایش هر تکرار شامل یک پتری‌دیش حاوی ۱۰ عدد بساک بود. دو هفته بعد از کشت، بساک‌ها شروع به کالوس زایی نمودند و بعد از حدود ۵-۴ هفته از زمان کشت بساک‌ها، کالوسهای تشکیل شده به محیط رویان‌زایی منتقل شدند. ۳۰ الی ۳۵ روز پس از انتقال کالوس‌ها به محیط رویان‌زایی، رویان‌ها القاء شدند و در این زمان داده‌های مربوط به رویان‌زایی اندازه‌گیری شدند. درنهایت شمارش تعداد کروموزوم‌ها در گیاهان دیپلوئید و مواد هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک انجام گرفت.

آزمایش سیتولوژیکی برای شمارش تعداد کروموزوم‌ها در رویان‌های القاء شده

شمارش تعداد کروموزوم‌ها در گیاهان دیپلوئید و مواد هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک به روش لاکور و دارلینگتون[1] (۱۹۷۶) صورت گرفت. بدین منظور نوک ریشه گیاهچه‌های دیپلوئید (۱ سانتیمتر) و هم‌چنین ۱۰ رویان انتخاب شده به‌صورت تصادفی، به مدت ۳ ساعت در محلول کلشیسین[2] با غلظت ۰/۰۵ درصد قرار داده شدند، سپس ۳ بار با آب مقطر و هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. پس از آن به مدت ۲۴ ساعت در محلول کارنوی حاوی اتانول و استیک اسید گلایسیال[3] (با نسبت ۱:۳) در یخچال تثبیت شدند و در نهایت به مدت ۴۵ دقیقه جهت رنگ‌آمیزی در محلول استوکارمن یک درصد قرار داده شدند. در آخرین مرحله پس از له کردن نمونه‌ها روی لام، کروموزوم‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر قابل مشاهده بودند.

تجزیه داده‌ها

در این آزمایش صفاتی از قبیل درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس، درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس رویان‌زا، میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا محاسبه گردید. آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab روی باقیمانده‌ها انجام گرفت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید. برای تبدیل داده‌های درصدی از روش جذری استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت. در برخی داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی نامتعادل نیز استفاده شد.

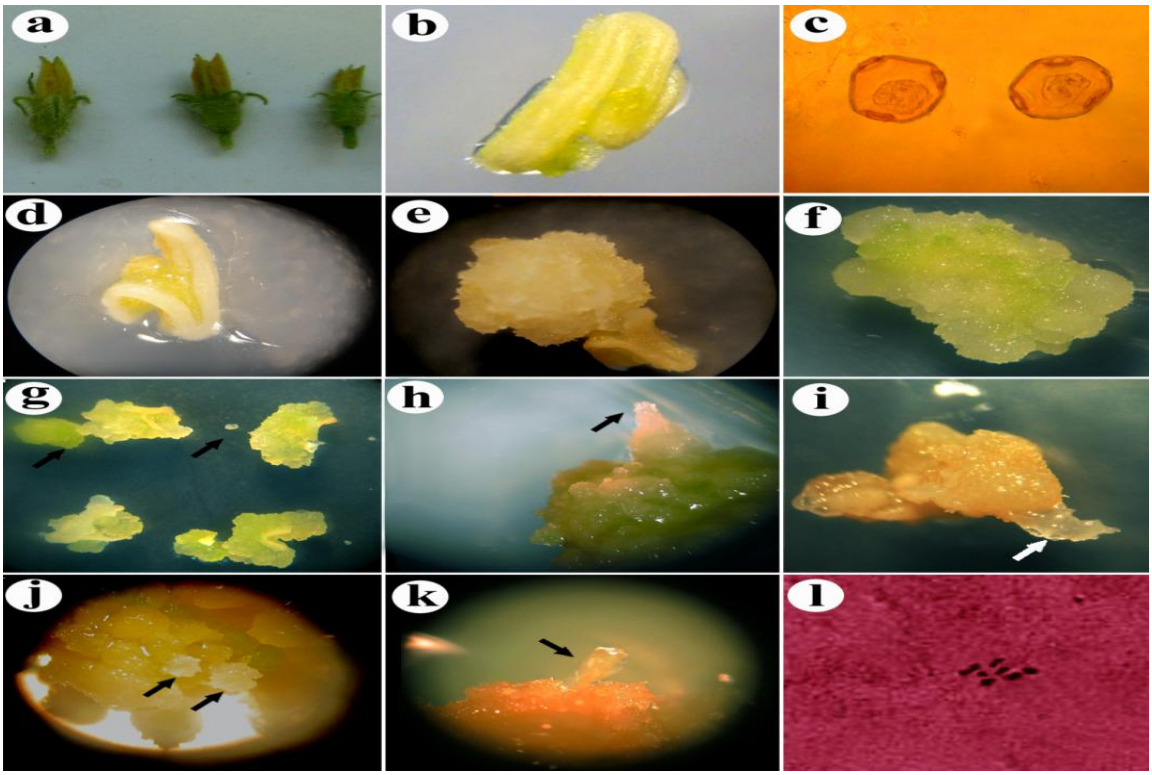
نتایج

نتایج آزمایش تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورهای خیار نشان داد که غنچه‌های ۱۷-۱۵ میلی‌متری (شکل a-۱) حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ای میانی، بهترین مرحله میکروسپورها جهت رویان‌زایی گامتی در خیار می‌باشند (شکل b، c-۱). در آزمایش‌های انجام شده در گیاه خیار، ریز نمونه‌های بساک (شکل b-۱) بعد از گذشت چند روز در محیط کشت متورم شده، به‌طوری که بعد از گذشت ۱۰ الی ۱۵ روز کالوس‌زایی را آغاز نمودند (شکل d، e، f، g-۱). بعد از سپری شدن ۴ تا ۵ هفته، کالوس‌های القاء شده در تیمارهای مختلف، پس از یادداشت‌برداری صفات مربوط به کالوس‌زایی به محیط مناسب جهت رویان‌زایی انتقال داده شدند. با گذشت ۳۰ الی ۳۵ روز پس از انتقال کالوس‌ها به محیط رویان‌زایی، رویان‌ها بر روی کالوس‌ها القاء شدند که مراحل رشد و نمو رویان‌ها در (شکل h، i، j، k-۱) نشان داده شدند. در آزمایش سیتولوژیکی تعیین تعداد کروموزوم‌ها در رویان‌های القاء شده، مشخص گردید که تمام ۱۰ رویان بررسی شده، ماهیت هاپلوئید داشتند و دارای تعداد کروموزوم‌های n=x=۷ (شکل l-۱) بودند. درصورتی‌که تعداد کروموزوم‌ها در گیاه خیار دیپلوئید ۲n=۲x=۱۴ می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر کشت توأم بساک با تخمدان در ارقام مختلف خیار در محیط‌های کشت

1- Lacour & Darlington
2- Colchicine
3- Glacial acetic acid

جامد و مایع برای صفات مختلف مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. ارقام مختلف خیار، محیط‌های کشت مختلف (جامد و مایع) اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ برای تمام صفات مورد مطالعه نشان دادند (جدول ۱). هم‌چنین تعداد مختلف تخمدان در محیط کشت برای صفات درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس‌های رویان‌زا و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار شد درحالی‌که برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا در هیچ‌کدام از سطوح آماری معنی‌دار نشد. اثرات متقابل رقم در محیط کشت به جز برای صفت درصد کالوس‌های رویان‌زا، برای تمامی صفات اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ نشان دادند. اثرات متقابل رقم در تعداد تخمدان نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ برای تمامی صفات مورد مطالعه نشان دادند. اثرات متقابل محیط کشت در تعداد تخمدان اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ برای صفت درصد کالوس‌های رویان‌زا و در سطح ۰/۰۰۱ برای صفات میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا نشان دادند. بین اثرات متقابل محیط کشت در تعداد تخمدان برای صفت درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اثرات متقابل سه‌گانه رقم در محیط کشت در تعداد تخمدان برای صفات درصد کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۰۱، برای صفت درصد کالوس‌های رویان‌زا در سطح ۰/۰۱ و برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری نشان دادند.



شکل ۱- مراحل القاء کالوس رویان‌زا و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک خیار. (a) اندازه مناسب گل‌های نر خیار جهت استفاده در کشت بساک، (b) بساک خیار با اندازه مناسب، حاوی میکروسپورهای تک هسته‌ای میانی، (c) میکروسپورهای خیار در مرحله تک هسته‌ای میانی با بزرگ‌نمایی (×۴۰)، (d) شروع القاء کالوس رویان‌زا روی یک بساک خیار کشت شده، (e و f) کالوس‌های رویان‌زا القاء شده روی بساک‌های خیار، (g) کالوس‌های القاء شده روی بساک‌ها در کشت توأم بساک خیار با تخمدان خیار. فلش سیاه رنگ سمت راست یک تخمدان رشد نکرده و فلش سمت چپ یک تخمدان رشد کرده خیار را نشان می‌دهد. (h تا k) رویان‌های القاء شده در مراحل رشد و نموی مختلف روی کالوس‌ها (فلش‌های سیاه رنگ رویان‌های القاء شده در کشت بساک خیار را نشان می‌دهند)، (l). تعداد کروموزوم‌های یک سلول هاپلوئید حاصل از آزمون سیتولوژیکی رویان‌های القاء شده در خیار با (n=x=۷).

جدول ۱-تجزیه واریانس اثر رقم، محیط کشت و تعداد تخمدان بر روی صفات کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک خیار

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات			
		درصد کالوس‌زایی	درصد کالوس‌های رویان‌زا	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک	میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا
رقم	۳	۶۲۱۳/۵۸***	۲۹۴۳/۵۳***	۰/۶۱***	۰/۷۶***
محیط	۱	۳۷۳۸/۴۶***	۳۶۶۹/۵۵***	۰/۹۸***	۲/۶۳***
تخمدان	۲	۱۵۴۶/۷۱***	۱۲۷۸/۱۷***	۰/۱۳***	۰/۰۵ns
رقم ×محیط	۳	۸۱۴/۴۴***	۷۷/۴ns	۰/۱۸***	۲/۹۵***
رقم×تخمدان	۶	۸۸۷/۲۶***	۴۶۱/۷۵***	۰/۰۶***	۰/۳۴***
محیط ×تخمدان	۲	۱۸۶/۲۴ns	۲۳۲/۱۹**	۰/۰۹***	۰/۹۸***
رقم× محیط× تخمدان	۶	۸۰۳/۲۵***	۱۹۸/۵۹**	۰/۰۳***	۰/۱۹*
خطای آزمایشی	۴۴	۸۷/۸۸	۴۲/۰۴	۰/۰۰۶	۰/۰۶
ضریب تغییرات (C.V.)		۲۰/۱۷	۲۲/۶۱	۱۴/۳۲	۲۳/۳۱

*،**،*** و ns، به ترتیب اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و عدم اختلاف معنی‌دار آماری را نشان می‌دهند.

بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا مربوط به ارقام خیار کرکی و اصفهانی در محیط کشت جامد حاوی ۱۰ تخمدان مشاهده شد، درحالی‌که کشت بساک رقم بتا آلفا در محیط کشت مایع بدون تخمدان و همراه با ۱۰ و ۲۰ تخمدان هیچ کالوس رویان‌زایی ایجاد نکرد. بر طبق مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه رقم در محیط کشت در تعداد تخمدان برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک، اضافه کردن ۱۰ تخمدان به محیط کشت جامد در ارقام کرکی و اصفهانی بیشترین تعداد رویان به ازای هر بساک را تولید کردند درحالی‌که کمترین تعداد رویان (۰) به ازای هر بساک مربوط به رقم بتا آلفا در محیط کشت مایع بدون تخمدان، کشت مایع حاوی ۱۰ تخمدان و کشت مایع حاوی ۲۰ تخمدان بود. بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا در محیط کشت جامد حاوی ۲۰ تخمدان در رقم بتا آلفا و در محیط کشت مایع بدون تخمدان در رقم باسمنج مشاهده شد درحالی‌که کمترین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا در محیط‌های کشت مایع بدون تخمدان، حاوی ۱۰ و حاوی ۲۰ تخمدان در رقم بتا آلفا (۰ رویان) مشاهده شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه رقم در محیط کشت در تعداد تخمدان برای صفت درصد کالوس‌زایی در جدول ۲ نشان داده شده است. محیط کشت مایع بدون تخمدان در رقم اصفهانی و محیط کشت جامد حاوی ۱۰ تخمدان در رقم کرکی و همچنین محیط کشت جامد حاوی ۲۰ تخمدان در رقم باسمنج بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کردند. درحالی‌که محیط کشت مایع در رقم بتا آلفا در حالت بدون تخمدان یا همراه با ۱۰ و ۲۰ تخمدان کمترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کردند.

بحث

در آزمایش حاضر مشخص گردید که میکروسپورهای خیار در مرحله تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی مناسب‌ترین مرحله برای رشد و نمو اسپوروفیتیکی و کشت بساک در خیار می‌باشند این نتیجه با نتایج سونگ و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. این محققین نشان دادند که مراحل رشد و نموی مناسب برای آندروژنز در خانواده کدوئیان مراحل تک هسته‌ای میانی تا انتهایی می‌باشد. نتایج پژوهشگران دیگر نیز نشان داده است که مناسب‌ترین مرحله میکروسپوری جهت کشت بساک خیار، مراحل تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی می‌باشد (آشوک‌کومار و همکاران، ۲۰۰۲؛ عبداللهی و همکاران[1]، ۲۰۱۵a).

1- Abdollahi *et al.*

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر رقم،کشت توأم بساک با تخمدان و محیط کشت روی صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار
حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P>۰/۰۵ است.

رقم	محیط کشت	تعداد تخمدان	صفات مورد مطالعه			
			درصد کالوس‌های رویان‌زا	درصد کالوس‌زایی	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک	میانگین تعداد رویان به ازای هر کالوس رویان‌زا
بتا آلفا	مایع	۰	۰۰/۰^{h}	۰^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{e}
		۱۰	۰۰/۰^{h}	۳۳/۳^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{e}
		۲۰	۰۰/۰^{h}	۰^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{j}	۰/۰۰±۰/۰۰^{e}
	جامد	۰	۳۳/۱۳^{g}	۳۳/۴۳^{fgh}	۰/۱۳±۰/۰۳^{i}	۱±۰^{bcd}
		۱۰	۳۳/۳۳^{cd}	۴۰^{fghi}	۰/۴۶±۰/۰۸^{bcdef}	۱/۴۱±۰/۳۳^{b}
		۲۰	۳۳/۱۳^{g}	۳۳/۲۳^{i}	۰/۳±۰/۰۵^{fg}	۲/۳۳±۰/۳۳^{a}
باسمنج	مایع	۰	۶۶/۱۶^{fg}	۳۳/۵۳^{defg}	۰/۳۳±۰/۰۸^{efg}	۲±۰/۲۸^{a}
		۱۰	۳۳/۳۳ ^{cd}	۶۶/۵۶^{def}	۰/۴۶±۰/۰۶^{bcdef}	۱/۳۸±۰/۰۵^{bc}
		۲۰	۲۰^{efg}	^{i}۳۵^{gh}	۰/۱۵±۰/۰۵^{hi}	۰/۸۳±۰/۱۶^{d}
	جامد	۰	۶۶/۲۶^{def}	۳۳/۴۳^{fgh}	۰/۲۶±۰/۰۳^{gh}	۱±۰^{bcd}
		۱۰	۳۰^{de}	۳۳/۴۳^{fgh}	۰/۵۶±۰/۰۳^{gh}	۰/۹۷±۰/۲۶^{bcd}
		۲۰	^{bc}۳۳/۴۳	۶۶/۷۶^{abc}	۰/۵±۰/۰۵^{bcde}	۱/۳۱±۰/۰۹^{bcd}
اصفهانی	مایع	۰	^{bc}۳۳/۴۳	۹۰^{a}	۰/۳±۰/۰۵^{fg}	۱/۱۵±۰/۰۷^{bcd}
		۱۰	۶۶/۲۶^{def}	۳۳/۵۳^{defg}	۰/۱۵±۰/۰۵^{hi}	۱/۱۱±۰/۱۱^{bcd}
		۲۰	۱۵^{fg}	۲۵^{hi}	۰/۶۶±۰/۰۸^{ab}	۱±۰^{bcd}
	جامد	۰	۳۳/۴۳^{bc}	۶۶/۶۶^{cd}	۰/۷۶±۰/۱۳^{a}	۱/۲۶±۰/۰۷^{bcd}
		۱۰	۶۶/۵۶^{a}	۷۰^{bcd}	۰/۴±۰/۰۵^{defg}	۱/۳۳±۰/۱۶^{bcd}
		۲۰	۳۳/۳۳^{cd}	۶۶/۴۶^{efg}	۰/۶۳±۰/۰۳^{ab}	۱/۱۹±۰/۰۹^{bcd}
کرکی	مایع	۰	۳۳/۴۳^{bc}	۴۰^{fghi}	۰/۳۶±۰/۰۳^{defg}	۱/۴۶±۰/۰۳^{b}
		۱۰	۳۳/۴۳^{bc}	۳۳/۶۳^{cde}	۰/۱±۰^{fg}	۰/۸۶±۰/۰۶^{cd}
		۲۰	۱۰^{gh}	۴۵^{fg}	۰/۶±۰/۱^{hi}	۱±۰^{bcd}
	جامد	۰	۵۰^{ab}	۶۵^{cd}	۰/۷۶±۰/۰۸^{abc}	۱/۲±۰/۲^{bcd}
		۱۰	۶۰^{a}	۶۶/۸۶^{ab}	۰/۳±۰/۰۵^{a}	۱/۲۸±۰/۱۱^{bcd}
		۲۰	۶۶/۲۶^{def}	۴۰^{fghi}	۰/۳۳±۰/۰۳^{efg}	۱/۲۷±۰/۱۱^{bcd}

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار میانگین تیمارها می‌باشد.

هم‌چنین در این آزمایش ارقام یا توده‌های بومی مختلف خیار واکنش‌های متفاوتی به آندروژنز در کشت توأم با تخمدان خیار نشان دادند. گزارشات محققین نشان می‌دهند که صفات آندروژنی، توارثی هستند (مجزا و همکاران، ۱۹۹۳). هم‌چنین بر طبق مشاهدات محققین دیگر ژنوتیپ تأثیر زیادی بر کارایی آندروژنز در خیار، خربزه و کدو نشان داده است (ساتون[1]، ۱۹۸۸ و ۱۹۸۹؛ کونی و همکاران[2]، ۱۹۹۳؛ پرزیبرووسکی و نیمروویچ[3]، ۱۹۹۴؛ نیمروویچ و همکاران[4]، ۱۹۹۵؛ کورتار و همکاران[5]، ۲۰۰۲؛ عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۵a). نتایج حاصل از آزمایش حاضر نیز با نتایج این محققین در ارتباط با اثر رقم و ژنوتیپ بر پاسخ بساک‌ها به آندروژنز

1- Sauton

2- Cunny *et al.*
3- Przyborowski & Niemirowicz
4- Niemirowicz *et al.*
5- Kurtar *et al.*

مطابقت دارد. کشت توأم بساک با تخمدان، یک روش مؤثر در بهبود میزان القاء رویان در بسیاری از گونه های گیاهی است (لانتوس و همکاران[1]، ۲۰۰۹). در آزمایش حاضر نیز مشخص شد که کشت توأم بساک با تخمدان در محیط کشت جامد، اثر مثبتی را در بهبود میزان القاء کالوس و رویان در خیار دارد. به‌طوری‌که در ارقام بتا آلفا، اصفهانی و کرکی بالاترین درصد تولید کالوس و رویان در محیط کشت جامد با اضافه کردن ۱۰ تخمدان به محیط کشت و در رقم باسمنج با اضافه کردن ۲۰ تخمدان به محیط کشت به‌دست آمد. در این ارقام استفاده از ۱۰ و ۲۰ تخمدان در محیط کشت جامد اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند که علت آن را می‌توان این‌گونه ذکر کرد که در ارقام بتا آلفا، کرکی و اصفهانی، استفاده از ۲۰ تخمدان در محیط کشت جامد حالت رقابتی در استفاده از آب و مواد غذایی برای بساک‌ها ایجاد کرده و منجر به کاهش کالوس زایی و رویان‌زایی در بساک‌های کشت شده ارقام مذکور گردیده است. مشابه با این نتایج، محققین از طریق کشت توأم بساک‌های هندوانه رقم چارلستون گری[2] با تعداد ۱۰ تخمدان گندم کارایی آندروژنز را به‌طور چشمگیری در این گیاه نسبت به شاهد (بدون استفاده از تخمدان گندم) و استفاده از ۵ تخمدان گندم در محیط کشت بهبود بخشیدند (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۵b). هم‌چنین در پژوهشی که توسط بروقتون (۲۰۰۸) بر روی اثر کشت توأم بساک با تخمدان گندم بر روی بهبود رویان‌زایی و تولید گیاهان سبز در ارقام مختلف گندم بهاره استرالیایی انجام شد، مشخص گردید که وقتی‌که ۵ تخمدان به محیط کشت افزوده شد تعداد ساختارهای رویان مانند و گیاهچه‌های سبز نسبت به محیط کشت بدون تخمدان افزایش پیدا کرد درحالی‌که استفاده از ۱۰ تخمدان در محیط کشت تفاوت معنی‌داری در تولید ساختارهای رویان مانند نسبت به استفاده از ۵ تخمدان در محیط کشت بساک ایجاد نکرد. همچنین نتایج آزمایش این محقق نشان داد که بین ۱۰ رقم گندم از نظر پاسخ بساک‌ها به کشت توأم تفاوت معنی‌داری وجود دارد، و این حاکی از تأثیر معنی‌دار ژنوتیپ بر روی صفات مورد مطالعه بود. نتایج نشان داد که کشت توأم بساک با تخمدان تأثیر مثبت زیادی در بهبود تولید ساختارهای رویان مانند و تولید گیاه سبز در دو رقم گندم استرالیایی وستون و تومارین راک داشته است. از بین ۱۰رقم مورد مطالعه، ۹ رقم به تیمارها پاسخ دادند که رقم تومارین راک بیشترین تعداد رویان در هر سنبله را داشت. رقم ویالکاتو[3] کمترین پاسخ را داشت که هیچ رویانی و به دنبال آن گیاهچه‌ای تولید نشد. در بعضی ارقام نیز محیط کشت مایع بدون تخمدان، بهتر از محیط مایع حاوی تخمدان بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در محیط کشت مایع به علت میزان بالای در دسترس بودن بساک‌ها، جذب آسان‌تر آب و مواد غذایی و ارتباط نزدیک‌تر بساک و محیط کشت رشد و تکثیر ریز نمونه با سرعت بیشتری نسبت به محیط جامد صورت می‌گیرد (پیریک[4]، ۱۹۹۷). ولی وقتی تخمدان‌ها به محیط کشت مایع اضافه شوند ممکن است موادی را در محیط کشت آزاد کنند که یک حالت سمی و یا رقابتی برای بساک‌ها ایجاد کنند، به همین دلیل در آزمایش حاضر در محیط‌های کشت مایع، از محیط کشت مایع بدون تخمدان نسبت به سایر تیمارهای کشت توأم، کالوس و رویان بیشتری به دست آمد. بر اساس نتایج بروقتون (۲۰۰۸) کشت توأم بساک با تخمدان یک عامل کلیدی در بهبود موفقیت کشت بساک است.

در مطالعه دیگری که بر روی کشت توأم بساک با تخمدان گندم صورت گرفت، این نوع کشت روی باززایی میکروسپورهای گندم اثر تحریک‌کنندگی نشان داد (داتا و ونزل، ۱۹۸۷). همچنین در کشت توأم بساک و تخمدان گندم دوروم، میزان پاسخ‌دهی به رویان‌زایی گامتی افزایش یافت (آیتی و همکاران[5]، ۱۹۹۹). مطابق

1- Lantos *et al.*
2- Charleston Gray
3- Wyalkatcve
4- Pierik
5- Aiti *et al.*

با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، در پژوهشی که توسط لانتوس و همکاران (۲۰۰۹) روی کشت توأم میکروسپور فلفل و تخمدان فلفل و همچنین اثر کشت توأم میکروسپور فلفل با تخمدان گندم انجام شد، مشخص گردید که در کشت توأم میکروسپورهای فلفل با تخمدان فلفل و نیز کشت توأم میکروسپورهای فلفل با تخمدان گندم میزان القاء رویان به مراتب افزایش یافت، که البته این افزایش در کشت توأم میکروسپورهای فلفل با تخمدان گندم نسبت به کشت توأم میکروسپور فلفل با تخمدان خود فلفل بیشتر بود. لتارت و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که پروتئین آرابینوگالاکتان ترشح شده توسط تخمدان گندم به احتمال زیاد نقش کلیدی در القاء آندروژنز گندم دارد. مشخص شده است که مکمل‌های آرابینوگالاکتان و پروتئین‌های مربوطه اگرچه می‌توانند بر روی آندروژنز تأثیرگذار باشد اما بهره‌وری آن نسبت به خود تخمدان پایین می‌باشد (لتارت و همکاران، ۲۰۰۶).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی در این آزمایش محیط کشت جامد حاوی تخمدان خیار، اثر مثبتی را در بهبود میزان القاء کالوس و رویان در ارقام خیار نشان داد، به‌طوری‌که استفاده از ۱۰ تخمدان در محیط کشت جامد در ارقام بتا آلفا (۴۰٪ کالوس زایی و ۰/۴۶ رویان به ازای هر بساک)، اصفهانی (۷۰٪ کالوس زایی و ۰/۷۶ رویان به ازای هر بساک) و کرکی (۸۸/۶۶٪ کالوس زایی و ۰/۷۶ رویان به ازای هر بساک) و استفاده از ۲۰ تخمدان در محیط کشت جامد در رقم باسمنج با ۷۷/۶۶٪ کالوس زایی و میانگین ۰/۵۶ رویان به ازای هر بساک باعث بهبود آندروژنز در این ارقام گردید. امید است که نتایج این پژوهش در تحقیقات آتی در ارتباط با تولید لاینهای خالص و بذور هیبرید در خیار مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Aalders, L.E. 1958. Monoploidy in cucumbers. Journal of Heredity, 49: 41-44.
2. Abdollahi, M.R., Darbandi, M., Hamidvand, Y., and Majdi, M. 2015b. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on another culture response of watermelon (*Citrullus lanatus L.*). Brazilian Journal of Botany, DOI: 10.1007/s40415-015-0152-z.
3. Abdollahi, M.R., Najafi, S., Sarikhani, H., and Moosavi, S.S. 2015a. Induction and development of anther derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus L.*) by optimizing the macronutrient and agar concentration in culture medium. Turkish Journal of Biology, DOI: 10.3906/biy-1502-55.
4. Aiti, F.J., Benlhabib, O., Sharma, H.C.E.l., Jaafari, S.E.l, and Hadrami, I. 1999. Genotypic variation in another culture and effect of ovary co-culture in durum wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59: 71-76.
5. Ashok Kumar, H.G., and Murthy, H.N. 2004. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of (*Cucumis sativus L.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78: 201-208.
6. Ashok Kumar, H.G., Murthy, H.N., and Paek, K.Y. 2002. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of (*Cucumis sativus L.*) Scientia Horticulturae, 98: 213-222.
7. Broughton, S. 2008. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in another culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum L.*). Springer Science+Business Media B.V., 95: 185-195.

8. Cistue, L., Soriano, M., Castillo, A.M., Valles, M.P., Sanz, J.M., and Echavarri, B. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum L.*) Through isolated microspore culture. Plant Cell Reports, 25: 257-264.

9. 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. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 555-560.

10. Cunny, F., Grotte, M., Dumas, D.E., Vaulx, R., and Rieu, A. 1993. Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenesis haploid production in muskmelon (*Cucumis melo L.*). Environmental and Experimental Botany, 33: 301-312.

11. Darlington, C.D., and Lacour, L.E. 1976. The Handling of Chromosomes. 6th ed. Allen and Unwind, London.

12. Datta, S.K., and Wenzel, G. 1987. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in (*Triticum aestivum L.*). Plant Science, 48: 49-54.

13. Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., and Garcia-Mas, J. 2006. Cucumber (*Cucumis sativus L.*) Dihaploid line production using in vitro rescue of in vivo induced .Parthenogenic embryos. Acta Horticulturae, 725: 837-844.

14. Dryanovska, O.A. 1985. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of spicies from the Cucurbitaceae family. Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences, 38: 1243-1244.

15. Dryanovska, O.A., and Ilieva, I.N. 1983. In vitro anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo L.*). Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences, 36: 1107-1110.

16. Eudes, F., and Amundsen, E. 2005. Isolated microspore culture of Canadian × triticale cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82: 233-241.

17. FAO. 2012. Food and Agriculture organization of the United Nation Food Outlook, Global market analysis, Statistical appendix 1.

18. Gałązka, J., and Niemirowicz-Szczytt, K. 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. Folia Horticulturae, 25: 67-78.

19. Hayase, H. 1954. Cucurbita crosses, Occurrence of a haploid twin pair from a F_1 progeny of *C. maxima* × *C. moschata*. Japanese Journal of Breeding. 4: 55.

20. Jauhar, P.P., Dogramaci-Altuntepe, M., Peterson, T.S., and Almouslem, A.B. 2000. Seedset on synthetic haploids of dumm wheat: cytological and molecular investigations. Crop Science, 40: 1742-1749.

21. 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.

22. Lantos, C., Gemes Juhasz, A., Somogyi, G., Otvos, K., Vagi, P., and Mihaly, R. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum L.*) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97: 285-293.

23. Lazarte J.E., and sasser C.C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in another culture of (*Cucumis sativus L.*). HortScience, 17: 88.

24. Letarte, J., Simion, E., Miner, M., and Kasha, K. 2006. Arabinogalactans and arabinogalacta-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum L.*) microspore culture. Plant Cell Reports, 24: 691-698.

25. Malepszy, S. 1988. Cucumber (*Cucumis sativus L.*). In: Bajaj Y.P.S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 6: 277-293.

26. Mejza, S.J., Morgant, V., Dibona, D.E., and Wong, J.R. 1993. Plant regeneration from isolated microspores of (*Triticum aestivum*). Plant Cell Reports, 12: 149-153.

27. Metwally, E., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I., Harun, S.A., and Shalab, Y.T.A. 1998. A Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 117-121.

28. Niemirowicz-Szczytt, K., Faris, N.M., Nikolova, V., Rakoczy-Trojanowska, M., and Malepszy, S. 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus L.*) haploid production and doubling. In: Cucurbitaceous. 94, Genetics. Lester (ed.): 169-171.

29. Nosoohi, G.H. 2001. Cucumber Arboreal, Senobar Publishing, Iran. Isfahan, Press, 110 P.

30. Pierik, R.L.M. 1997. In vitro culture of higher plants. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, 21-146.

31. Przyborowski, J.A., and Niemirowicz-Szczytt, K. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus L.*) haploid embryo development and haploid plant characteristics. Plant Breeding, 112: 70-75.

32. Sauton, A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, Cucumis melo L. Scientia Horticulturae, 35: 71-75.

33. Sauton, A. 1989. Haploid gynogenesis in Cucumis sativus induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetics Cooperative, 12: 22-23.

34. Shail, J.W., and Robinson, R.W. 1987. Anther and ovule culture of Cucurbita. Cucurbit Genetics Cooperative, 10: 92.

35. Song, H., Lou, Q.F., Luo, X.D., Wolukau, J.N., Diao, W.P., Qian, C.T., and Chen, J.F. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgens is of cucumber (*Cucumis sativus L.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90: 245-254.

36. Swaminathan, M.S., and Singh, M.P. 1958. X-ray induced somatic haploid in watermelon. Current Science, 27: 63-64.

37. Touraev, A., Pfosser, M., and Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, 35: 53-109.

38. Tuncer, U.H., and Boztok, K. 1991. The effects of growing greenhouse cucumber seedling in various pot types on the yield. Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi, 2: 155-158.

39. Vasil, I.K. 1967. Physiology and cytology of anther development. Biological Reviews, 42: 327-373.

40. Xue, G.R., Yu, W.Y., and Fei, K.W. 1983. Watermelon plants derived by in vitro anther culture. Plant Physiology Communications, 4: 40-42.

41. Zheng, M.Y., Weng, Y., Liu, W., and Konzack, C.F. 2002. The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports, 20: 802-807.