مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۷ شماره ۴ صفحه‌های ۳۸۹ تا ۴۰۰ (۱۳۹۵)

تولید رویان و گیاهان نیم‌گان از گرده پرتو دیده با گاما در خربزه ایرانی[1]

Embryos and haploid plants produced via Gamma irradiated pollen in Iranian melon

لیلا باقری*، محمود لطفی، رحیم امیری خواه، منصور نوری[2]

چکیده

روش گرده پرتوتابی شده موفق‌ترین روش تولید نیم‌گان (هاپلوئید) در گیاهان جالیزی می‌باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی اثر شدت‌های مختلف پرتو گاما، نژادگان و مرحله نموی رویان حاصل از روش گرده پرتوتابی شده، بر انگیزش رویان‌های نیم‌گان در چند توده بومی خربزه و دورگه این توده‌ها با رقم‌های خارجی انجام شد. گل‌های ماده گیاهان مادری با گرده‌های پرتوتابی شده گرده‌افشانی شدند. ۲۱ تا ۲۵ روز پس از باروری، رویان‌هایی که در مرحله‌های مختلف نموی بودند، از بذرهای حاصل خارج و روی محیط کشت E20A کشت شدند. برای تشخیص و جداسازی رویان‌های انگیزش شده، از روش‌های کشت مستقیم، کشت مایع و روش تلفیقی (کشت مستقیم جنین و کشت مایع) استفاده شد. روش‌های کشت مایع و تلفیقی در افزایش کارایی تولید گیاهان نیم‌گان اثر بسزایی داشتند. نتیجه‌های حاصل از تعیین شدت کارا، نشان داد که در انگیزش بکرزایی و نمو میوه، شدت ۵۵۰ گری کاراترین شدت پرتو گاما بود، درحالی که شدت‌های پایین‌تر در انگیزش رویان نیم‌گان کارا نبودند. از بین نژادگان‌های مختلف، توده طالبی سمسوری (۱/۲٪) و طالبی ساوه (۱/۱٪) بالاترین درصد نمو رویان به بذر را نشان دادند. برخی از رویان‌هایی که در مرحله نموی قلبی شکل و لپه‌ای بودند، قادر به باززایی گیاهچه شدند. در کل از ۲۷۴ رویان به‌دست آمده از گرده‌افشانی با گرده پرتودیده، ۵۲ گیاهچه بکرزای خربزه باززایی شدند. با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده از این بررسی، رویان و گیاهان نیم‌گان در خربزه به مقدار زیادی زیر اثر شدت پرتو، مرحله رویانی و نژادگان قرار می‌گیرد. با استفاده از روش غیر مستقیم و روش شمارش کروموزمی، نیم‌گان بودن گیاهان به‌دست آمده (n=x=۱۲) تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: بکرزا، پرتو گاما، توده بومی خربزه، گرده پرتوتابی شده.

مقدمه

نژادگان‌های بومی خربزه و طالبی ایرانی که در سال‌های بسیاری کشت و کار شده‌اند، ویژگی‌های با ارزش فراوانی دارند، اما به‌دلیل گرده‌افشانی آزاد و بذرگیری سنتی، یکنواختی و پایداری کامل برای معرفی به‌عنوان رگه[3] به‌نژادی ندارند. در حالی که انجام هر گونه برنامه به‌نژادی و بررسی و انتقال ویژگی‌های مقاومت به بیماری‌ها و تولید بذر دورگه به وجود رگه‌های خالص بستگی دارد. با توجه به این که تولید رگه‌های خالص از راه خودگشنی پی‌درپی زمان زیادی نیاز دارد و به‌طور معمول گیاهان حاصل، صد در صد خالص[4] نمی‌باشند، از این رو روش

۱- تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۳

۲- به‌ترتیب پژوهشگر پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج، دانشیار گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و کارشناسان پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج.

* نویسنده مسئول، ایمیل: (lbagheri@nrcam.org).

۳- Line

۴- Homozygous

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

نیم‌گانی و نیم‌گانی دوگانه[1]با کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای دست‌یابی به گیاه خالص، نقش مهمی در برنامه‌های به‌نژادی گونه‌های مختلف زراعی دارد. گیاهان نیم‌گان می‌توانند از روش‌های نرزایی درون شیشه‌ای[2] (کشت درون شیشه‌ای دانه گرده و بساک)، ماده زایی درون شیشه‌ای[3] (کشت درون شیشه‌ای تخمک و تخمدان) و بکرزایی[4] (تحریک به رشد یاخته تخم‌زا در کیسه رویانی بیشتر با گرده‌افشانی با گرده پرتو دیده) به‌دست آیند (۸).

روش بکرزایی شکلی از افزایش غیرجنسی است که در آن یاخته تخم‌زای بارور نشده به رویان تبدیل می‌شود. چنین رویانی تنها منشأ مادری دارد. روش‌های رایج نیم‌گانی مانند کشت بساک، تخمک و تخمدان بارور نشده برای تولید نیم‌گان در گیاهان جالیزی گوناگون موفقیت چندانی ندارد و موفق‌ترین روش در این تیره، انگیزش رویان‌های بکرزا با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات رویان‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد (۱). در حال حاضر، بررسی‌های مختلف، روش گرده‌های پرتو دیده (پرتو گاما، پرتو ایکس و فرابنفش) را به‌عنوان روشی کارا در تولید گیاهان نیم‌گان معرفی می‌کنند (۱، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰). پرتو گاما به خاطر کاربرد آسان، قدرت نفوذ بالا، اثربخشی مطلوب و خطرهای کمتر، در برنامه‌های تولید گیاهان نیم‌گان به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. گرده پرتو دیده می‌تواند روی کلاله جوانه بزند و لوله گرده در داخل خامه گل رشد کند، اما توانایی بارور کردن یاخته تخم‌زا و هسته‌های قطبی داخل کیسه رویانی را ندارد. غیرفعال بودن ژنتیکی و قدرت جوانه‌زنی گرده‌های پرتو دیده، می‌تواند باعث تحریک تقسیم یاخته‌ای در یاخته تخم‌زا و بنابراین باعث انگیزش بکرزایی یا نمو میوه بکربار شود (۲). تولید رویان نیم‌گان و به‌دست آوردن گیاه به کمک روش گرده پرتودیده در گیاهان جالیزی از جمله خربزه (۱، ۱۴)، خیار (۷، ۵)، هندوانه (۱۰، ۱۸) و کدو (۱۱، ۱۲) بررسی و مشاهده شده که موفقیت این روش به عامل‌های زیادی بستگی دارد. گزینش شدت مناسب پرتو، شرایط رشد گیاهان مادری، بهینه سازی روش گرده‌افشانی، زمان برداشت میوه، روش تشخیص و جداسازی رویان، مرحله نموی رویان، محیط کشت و شرایط کاشت از جمله مهم‌ترین عامل‌های اثرگذار در موفقیت روش گرده پرتودیده و شمار رویان و گیاه نیم‌گان نجات یافته هستند. این پژوهش به منظور دست‌یابی به روش جامع و کارا برای تولید گیاهان نیم‌گان برای تولید رگه خالص در توده‌های بومی خربزه ایرانی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ برای تولید گیاهان نیم‌گان در توده‌های بومی خربزه در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی بود و آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. شش رقم خربزه و طالبی بومی (خربزه خاتونی مشهد، سوسکی زرد ایوانکی، سوسکی سبز ایوانکی، طالبی سمسوری ورامین، طالبی ساوه و گرمک اصفهان)، دو رقم وارداتی (آناناسی و زرد قناری) و ۶ دورگه حاصل از دورگ‌گیری توده‌های ایرانی با رقم‌های خارجی (خاتونی (♀) × هانی دیو (♂)، سوسکی زرد (♀) × آناناسی (♂)، آناناسی (♀) × ساوه (♂)، گرمک (♀) × آناناسی (♂)، آناناسی (♀) × سمسوری (♂) و سوسکی زرد (♀) × هانی دیو (♂)) انتخاب شدند (جدول ۳). پس از تهیه بذرهای این توده‌ها ، بذرها در سینی کاشت پر شده با پیت و پرلایت (۱:۱) در روزهای آغازین فروردین ماه کشت ودر اتاقک کشت با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نورگاه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از دو هفته نشاهایی که به خوبی رشد کرده بودند به بستر پیت و پرلایت (۱:۱) بستر آبکشت[5] و مزرعه پژوهشی انتقال یافتند. روند نگهداری شامل آبیاری، کوددهی و مبارزه با آفت‌ها و بیماری‌ها همچون روش‌های رایج صورت گرفت.

۱- Doubled haploid ۲- *In vitro* androgenesis ۳- *In vitro* gynogenesis ۴- Parthenogenesis ۵- Hydroponic

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

تولید گیاهان نیم‌گان از رویان‌های بکرزا

پرتوتابی و گرده‌افشانی

زمانی که به اندازه کافی گل‌های نر و ماده ظاهر شدند، گل‌های نر در چند نوبت در روز پیش از شکفتن (گلبرگ‌های سبز مایل به زرد) در ساعت‌های نخستین صبح جمع آوری و پس از جداسازی گلبرگ‌ها و قراردادن آن‌ها در پتری‌دیش، با شدت‌های مختلف پرتو گاما (۲۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰ و ۵۵۰ گری) حاصل از چشمه کبالت ۶۰ با شدت ۵ گری در دقیقه پرتودهی شدند. شدت‌های پرتوتابی براساس شدت‌های به‌کار رفته در بررسی‌های گذشته در گیاه خربزه گزینش شدند. پس از پرتودهی تا صبح روز بعد در دمای محیط نگهداری شدند. برای جلوگیری از گرده‌افشانی ناخواسته، گل‌ها پس از اخته‌سازی در صورت نیاز با کپسول ژلاتینی به طور کامل پوشانده شدند. در صبح روز بعد، گرده‌افشانی با گرده‌های پرتودیده به صورت دستی روی گل‌های پوشیده شده انجام شد. هر گل ماده با استفاده از ۲ تا ۳ عدد گل نر پرتوتابی شده، گرده‌افشانی و با کپسول‌های ژلاتینی دوباره پوشانده شد.

پیش تیمار جیبرلین

به‌منظور بررسی اثر هورمون جیبرلیک اسید بر تشکیل میوه و انگیزش رویان بکرزا، پس از باروری، شماری از گل‌های گرده‌افشانی شده با غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید محلول‌پاشی شدند.

روش تشخیص و جداسازی رویان

میوه‌های تشکیل شده ۲۱ تا ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل ۲ A و B) (۱۴). میوه‌های برداشت شده با آب شسته ، با اتانول ۷۰٪ گندزدایی سطحی و سپس برش داده و بذرها از داخل آن‌ها خارج شدند. بذرهای خارج شده به‌طور کامل با آب شسته شدند و در پتری‌دیش قرار گرفتند.

در این پژوهش برای تشخیص و نجات رویان از سه روش کشت مستقیم (۶)، کشت مایع (۱۴) و روش تلفیقی استفاده و کارایی هر سه روش ارزیابی شد. در روش کشت مستقیم، بذرهای خارج شده از میوه‌ها به‌طور کامل با آب شسته و در پتری‌دیش درون آب و سپس روی صفحه نوری برای تشخیص رویان قرار گرفتند. بذرهایی که رویان داشتند، رویان‌های آن‌ها به صورت لکه‌های تیره بر روی صفحه نوری قابل تشخیص بود. بذرهای بدون رویان به صورت شفاف دیده شدند. پس از شناسایی بذرهایی که رویان داشتند، این بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود لامینار گندزدایی شدند. پس از این مدت محلول شیمیایی دور ریخته شد و بذرها ۳ بار با آب مقطر شسته شدند. پس از گندزدایی، بذرها شکافته شدند و رویان از داخل آن خارج و در پتری دارای محیط کشت جامد E20A قرار داده شد. اما در روش کشت مایع، بذرها پس از خارج شدن از میوه و شستشو در محیط سترون به‌صورت شناور در محیط کشت مایع E20A قرار گرفتند و به‌طور ملایم در زیر نور در اتاق رشد با دست تکان داده شدند (شکل ۲ C). رویان‌های موجود شروع به رشد کردند که در زیر صفحه نور قابل تشخیص بودند. بذرهای دارای رویان، جدا و پس از گندزدایی سطحی، رویان جداسازی و بر روی محیط کشت جامد E20A کشت شد. در روش تلفیقی پس از یک دور باروری، برای تشخیص و جداسازی رویان در بذرها از هر دو روش کشت مایع و کشت مستقیم به‌طور هم‌زمان استفاده شد. برای این منظور، پس از بازبینی بذرها به روش کشت مستقیم، بذرهایی که رویان داشتند در پتری‌های محیط کشت جامد E20A کشت شدند و از محیط کشت مایع برای دیگر بذرها، که دارای رویان‌های احتمالی بودند، استفاده شد. پتری‌دیش‌های کشت هر سه روش در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نورگاه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری شدند.

رویان‌هایی که توانایی نمو و باززایی داشتند، چند روز پس از کشت، شروع به رشد کردند و به‌دنبال آن برگ‌های لپه‌ای باز شدند. با تولید ریشه‌های فرعی و ساقه‌ها، گیاهچه‌ها بزرگ‌تر شدند و زمانی که گیاهان به اندازه کافی رشد کردند و تا بالای شیشه‌های کشت رسیدند، دوباره در محیط کشت جامد ریزافزایی و در همان شرایط در اتاقک رشد نگهداری شدند. افزایش گیاهان نیم‌گان در چند مرحله و در حدود یک بار در ماه تکرار شد تا جمعیت

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

آن‌ها برای تیمار با کلشی‌سین (غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت)، افزایش یابد. ریزافزایی گیاهان با قرار دادن ۲ تا ۴ عدد شاخساره تک گره[۱]دارای یک جوانه در شیشه‌های کشت انجام شد.

گیاهچه‌های نمو یافته (با طول حدود ۱۵ سانتی‌متر) از شیشه‌های کشت خارج و با آب مقطر گندزدایی شده شسته شدند. سپس به گلدان‌های دارای پیت و پرلایت (۱:۱) منتقل و در اتاقک رشد در ۲۵ درجه سلسیوس، ۶۰٪ رطوبت با ۱۶ ساعت نورگاه نگهداری شدند. پس از سازگاری، گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ‌تر (با همان آمیخته خاکی) و به گلخانه منتقل شدند.

تعیین سطح چندگانی

برای تعیین سطح چندگانی گیاهچه‌های حاصل، از دو روش مستقیم و غیر مستقیم استفاده گردید. در روش غیرمستقیم، بر اساس ریخت‌شناسی (ارتفاع گیاه، اندازه برگ و ریخت‌شناسی گل)، قدرت رشد و باروری گیاهان حاصل با گیاهان مادری مقایسه شد. در روش مستقیم از روش سیتولوژی[۲] شمارش کروموزومی یاخته‌های نوک ریشه بر اساس روش فولگن (۱۴) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتیجه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده با شدت‌های مختلف پرتو گاما نشان داد که با افزایش مقدار شدت پرتو گاما، مقدار تشکیل میوه کاهش و مقدار میوه‌های بدون بذر (پوک) افزایش یافت. در شدت ۲۵۰ گری اگرچه مقدار تشکیل میوه نسبت به شدت‌های بالاتر پرتو بیشتر بود، اما بیشتر این میوه‌های تولید شده بذر پر داشتند (۸۱٪) که برای سترون سازی دانه گرده و تولید رویان بکرزا در خربزه کافی نبود. با افزایش شدت پرتو تا ۴۵۰ گری، تولید میوه با بذر پر تولید شد، اگرچه روند کاهشی نشان داد. تمام بذرهای میوه‌های حاصل از گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده با شدت ۵۵۰ گری (۵۵۰۰۰ راد) پوک بودند. با توجه به این نتیجه‌ها، شدت ۵۵۰ گری پرتو گاما به عنوان شدت کارا برای بکرزایی موفق در توده‌های خربزه ایرانی مشخص شد و شدت‌های پایین‌تر برای تحریک رویان و تولید میوه‌های با بذر پوک کارا نبودند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر گرده پرتوتابی شده با شدت‌های مختلف پرتو گاما بر تشکیل میوه و رویان در توده‌های خربزه ایرانی.

Table 1. Effect of pollens irradiated with different doses of gamma ray on fruit set and seed set in Iranian melons.

شدت پرتو گاما Doses of irradiation (Gy)	شمار گل گرده‌افشانی شده Number of pollinated flowers	درصد تشکیل میوه Fruit set (%)	درصد میوه با بذر پر Seeded fruit (%)	درصد میوه با بذر پوک Seedless fruit (%)
250	86†	68 (58) a	81 (47) a	19 (11) c
350	29	66 (19) a	58 (11) ab	42 (8) bc
450	17	59 (10) a	30 (3) b	7 (70) b
550	123	58 (68) a	0 c	100 (68) a
Total	255	61 (155)	39 (61)	61 (94)

† Means followed by the same letters are not significantly different using Duncan test ($P \leq 0.05$). The parentheses represent the number of fruits.

† میانگین‌هایی که دست‌کم یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ اختلاف معنی‌داری ندارند. عددهای داخل پرانتز نشان دهنده شمار میوه می‌باشد.

گزارش شده است که تولید رویان و گیاه نیمگان از شدت‌های پایین‌تر پرتو (۲۵ و ۵۰ گری) در کدو تابستانه (۱۲)، کدو تنبل (۵۰ و ۱۰۰ گری) (۱۱) و کدو تلخ (۲۵۰ گری) (۹) با موفقیت همراه بود، در حالی که در هندوانه (۱۰،

۱- Nodal cutting ۲- Cytology

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

۱۸)، خربزه (۱۴) و خیار (۵) شدت‌های بالاتر پرتو ضروری بود. بررسی حاضر نشان داد که شدت بالای پرتو (۵۵۰ گری) برای ایجاد رویان‌های بکرزا در توده‌های بومی خربزه موثر بود.

کاربرد هورمون جیبرلین نشان داد که با پاشیدن جیبرلیک اسید با غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از گرده‌افشانی روی تخمدان و کلاله گل ماده، هیچ‌گونه افزایش در درصد رویان حاصل نشد (جدول ۲). البته در مواردی باعث بزرگ‌تر شدن میوه گردید و در برخی از بذرها پدیده داندرون دروغین رخ داد (۱۳) براساس گزارش Thiebaut *et al.* (۱۹) جیبرلین بر انگیزش رویان‌های نیم‌گان جو مفید بود، در حالی که در بررسی حاضر اثر جیبرلین بر انگیزش رویان در خربزه مشهود نبود و درصد رویان به بذر نسبت به شاهد اختلاف چندانی نداشت.

جدول ۲- اثر تیمار جیبرلیک اسید بر تشکیل میوه و انگیزش رویان در گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده پرتوتابی شده با گاما.

Table 2. Effect of gibberellic acid treatment on fruit set and induced-embryo in pollenated flowers with pollens irradiated by gamma ray.

تیمار Treatment	شمار میوه Number of fruit	شمار بذر Number of seed	شمار رویان Number of embryo	درصد رویان به بذر Embryos per seed (%)
جیبرلیک اسید Gibberellic acid ($750\ mg\ L^{-1}$)	41	10380	105	1.01
شاهد Control	54	13836	125	0.94

قدرت رشد و شرایط فیزیولوژیکی گیاهان مادری، از جمله عامل‌هایی است که ممکن است در موفقیت انگیزشی رویان نیم‌گان اثرگذار باشد. به‌منظور تعیین روشی مناسب برای پرورش گیاهان مادری، سه بستر متفاوت آبکشت، بستر خاکی گلخانه و مزرعه‌ای ارزیابی شدند. با وجود این‌که سیستم آبکشت مزایایی ازجمله کاهش بیماری‌های خاک‌زاد، بهبود شرایط رشدی بوته‌ها و نگهداری آسان‌تر گیاهان نسبت به کشت خاکی دارد، اما مشاهده گردید که توده‌های خربزه به این سیستم کشت پاسخ مناسبی نسبت به بستر خاکی نشان ندادند که به‌احتمال به‌دلیل تمایل گیاه خربزه به‌ویژه توده‌های بومی به شرایط طبیعی باشد. نتیجه‌ها نشان داد که در شرایط گلخانه با بستر خاکی، ۶۵٪ از گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتو دیده با شدت‌های مختلف تشکیل میوه دادند. اما این مقدار در کشت مزرعه‌ای به ۵۰٪ کاهش یافت که به احتمال به دلیل دشواری گرده‌افشانی دستی و وجود تنش‌های زنده و غیرزنده در شرایط مزرعه می‌باشد (شکل ۱). بنابراین به خاطر درصد پایین‌تر تشکیل میوه و احتمال انتقال بیماری‌های بذرزاد به رویان‌های حاصل در روش کشت مزرعه‌ای، این روش کشت برای گیاهان مادری توصیه نمی‌شود. این نتیجه با یافته لطفی و همکاران (۱) هم‌خوانی دارد. بنابراین، قدرت رشد و وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان مادری برای تولید گیاهان نیم‌گان خربزه مهم می‌باشد، به‌طوری که در دیگر بررسی‌ها این نتیجه‌ها مشاهده شد (۴، ۱۲).

جدول ۳، شمار رویان‌های نجات یافته، درصد نسبت رویان به بذر و شمار گیاه حاصل در توده‌ها و دورگه‌های مختلف را نشان می‌دهد. مشاهده شد که درصد بسیار کمی از بذرهای پوک رویان داشتند و رویان‌هایی که جداسازی شدند و نجات یافتند از دید نموی در مرحله‌های مختلفی از مرحله کروی، قلبی شکل و لپه‌ای قرار داشتند، که بر اساس مرحله نموی برای هر والد مادری دسته بندی شدند. به طور کلی ۲۷۴ رویان نجات یافتند که بیشتر آن‌ها در مرحله کروی (۴۳/۸٪) و قلبی شکل (۲۷/۳۸٪) بودند که مشاهده شد به ویژه در روش کشت مستقیم سقط و رنگ آن‌ها قهوه‌ای شد و اگر هم نجات داده شدند، رشد نکردند و یا وارد پینه‌زایی شدند. حتی همه رویان‌هایی که در

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

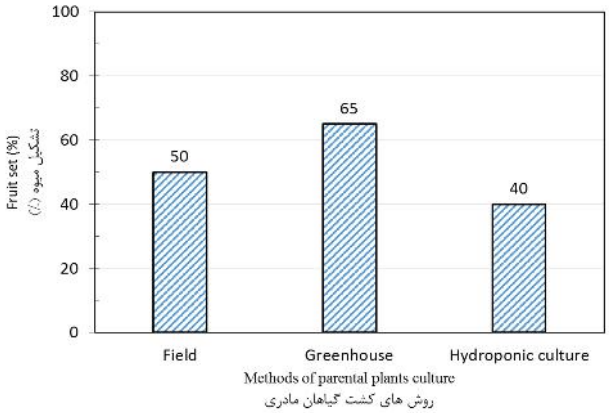


Fig. 1. Influence of methods of planting on fruit set in flowers pollinated with pollens irradiated by gamma ray.

شکل ۱- اثر روش کشت گیاه مادری بر تشکیل میوه در گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده پرتوتابی شده در توده‌های خربزه ایرانی.

مرحله لپه‌ای بودند توانایی باززایی به گیاه را نداشتند (جدول ۳). بر اساس گزارش‌های پیشین، مقدار باززایی زیر اثر مرحله نموی رویان‌ها قرار می‌گیرد و مرحله لپه‌ای بالاترین مقدار باززایی را دارد که با نتیجه‌های حاضر همسویی دارد. بالاترین درصد نمو رویان به بذر در طالبی رقم سمسوری (۱/۲٪) و طالبی رقم ساوه (۱/۱٪) به‌دست آمد و کم‌ترین درصد در دورگه آناناسی × سمسوری بود. بیشترین درصد نسبت گیاه به بذر در طالبی ساوه (۰/۲۶٪) و کم‌ترین در دورگه‌ها مشاهده شد و در دو دورگه سوسکی زرد × آناناسی و خاتونی × هانی دیو گیاهی به‌دست نیامد. نتیجه‌های حاصل برای توده طالبی سمسوری با یافته‌های لطفی و همکاران (۱) همسویی دارد. آن‌ها مشاهده کردند که بیشترین درصد تولید رویان در این توده و گروه کانتالوپنسیس[۱] نسبت به گروه اینودروس[۲] می‌باشد. بالاترین نسبت رویان به میوه در توده طالبی سمسوری (۲/۸۵) و سپس در توده طالبی ساوه مشاهده شد. همچنین نتیجه‌ها نشان داد که توده‌های بومی در تولید رویان نیمگان نسبت به رقم‌های خارجی و گیاهان دورگه، کارایی بالاتری داشتند. دیگر بررسی‌های صورت گرفته روی خربزه نشان از پایین بودن نسبت رویان به میوه دارند به‌طوری که Sari *et al.* (۱۸) نسبت ۰/۷ رویان به میوه را در خربزه به‌دست آوردند در حالی که در دیگر جالیزی‌ها ازجمله خیار (نسبت ۴)، کدو تابستانه (نسبت ۷/۵) و کدو زمستانه (نسبت ۱۳/۷) این نسبت بالاتر بود (۱۱، ۱۲، ۱۵).

با توجه به نتیجه‌های حاصل، کارایی تولید رویان و گیاه نیمگان به شدت زیر اثر نژادگان بود. در طول کشت‌های مختلف، ۱۳۴ میوه از ۱۴ نوع گیاه مادری به‌دست آمد و از شکافتن این شمار میوه ۴۰۶۲۳ بذر حاصل شد، که ۰/۷۵٪ از بذرها رویان سالم داشتند و به محیط کشت منتقل شدند. در مجموع ۱۸٪ رویان‌های سالم به گیاه تبدیل شدند و از کل بذرهای جداسازی شده تنها ۰/۱۴٪ از آن‌ها به گیاه نمو یافتند. در نهایت، ۵۲ گیاه به‌دست آمده از شاخساره تک گره، در شرایط درون شیشه‌ای ریزافزایی شدند. گیاهان به‌دست آمده پس از سازگاری و مقاوم‌سازی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. برای تعیین سطح چندگانی گیاهچه‌های حاصل از دو روش مستقیم و غیر مستقیم استفاده شد. در روش غیر مستقیم با بررسی ریخت‌شناسی، مشاهده گردید که گیاهان نیمگان ضعیف‌تر هستند و برگ‌ها و گل‌های کوچک‌تر با شمار خیلی کمی دانه گرده نسبت به گیاهان دوگان دارند. گلبرگ‌ها در این گیاهان مانند نمونه‌های دوگان پیوسته نبود و بریدگی‌های عمیق‌تری داشت. اگرچه از روی این ویژگی‌های ظاهری می‌توان به سطح چندگانی گیاهان حاصل پی برد اما برای اطمینان لازم بود که با روش‌های مطمئن‌تری این موضوع تأیید

۱- Cantalopensis ۲- Inodorous

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

شود. در روش مستقیم از روش شمارش کروموزومی یاخته‌های مریستمی نوک ریشه استفاده شد که از این راه نیم‌گان بودن گیاهان حاصل (n=x=۱۲) تأیید شد و با شمار کروموزوم‌های گیاهان دوگان (۲x=۲n=۲۴) مقایسه شدند (شکل ۲ G و H).

جدول ۳- انگیزش رویان و شمار گیاهان نیم‌گان بکرزا که از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در توده‌های بومی خربزه ایرانی به‌دست آمدند.

Table 3. Induction of parthenogenic embryos and number of haploid plants obtained by pollination with irradiated-pollen in Iranian melons.

گیاهان مادری Parental plants	شمار میوه Fruit number	شمار بذر سالم Seed number	شمار رویان Embryo number	رویان به صد بذر Embryo/100 seed	مرحله رویانی Embryo stage			شمار گیاهچه Plantlet number	نسبت رویان به میوه Embryo/fruit
					کروی Global	قلبی Heart shaped	لپه ای Cotyledon		
خاتونی مشهد Khatoni Mashhad	19	4913	39	0.79	15	10	14	8	2.05
سوسکی زرد ایوانکی Soski Zard Ivanake	9	2437	21	0.86	13	4	4	3	2.33
سوسکی سبز ایوانکی Soski Sabz Ivanake	12	3175	27	0.85	15	7	8	5	2.25
طالبی سمسوری Samsoori	13	3095	37	1.20	16	9	11	7	2.85
طالبی ساوه Saveh	16	3892	43	1.10	14	14	13	10	2.69
گرمک اصفهان GarmakEsfahan	17	4691	45	0.96	20	14	12	7	2.65
آناناسی Ananasi	4	1218	9	0.74	2	2	5	3	2.25
زرد قناری Yellow Canary	2	678	3	0.44	0	1	2	1	1.50
آناناسی× گرمک Ananasi× Garmak	9	2054	16	0.78	4	7	4	5	1.78
آناناسی × سمسوری Ananasi× Samsoori	11	2200	7	0.32	3	2	2	1	0.64
آناناسی × ساوه Ananasi× Saveh	6	1200	7	0.58	5	1	1	1	1.16
سوسکی زرد× آناناسی Soski Zard Ivanake ×Ananasi	7	1400	8	0.57	6	2	0	0	1.14
سوسکی زرد × هانی دیو Soski Zard Ivanake ×Honeydew	5	1000	8	0.80	4	2	2	1	1.60
خاتونی × هانی دیو Khatoni Mashhad× Honeydew	4	800	4	0.50	2	1	1	0	1
میانگین/کل Total/Mean	134	32754	274	0.75	120	75	79	52	2.04

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

روش کشت مایع برای نخستین بار در سال، ۲۰۰۳ توسط لطفی و همکاران (۱۴) برای بازبینی بذرهای خربزه گزارش شد. آسانی در تشخیص و جداسازی رویان، کاهش زمان و شمار بذر برای بازبینی، کاهش هزینه و خطر کمتر نسبت به دیگر روش‌های تشخیصی مثل پرتونگاری با پرتو ایکس و روش مستقیم، ازمزایای روش کشت مایع در جداسازی و نجات رویان بکرزا بیان شده است(۱، ۱۴).

در این بررسی، در روش کشت مایع، شمار ۱۵۴۵۵ بذر (حاصل ۲ دوره باروری و ۵۹ میوه) در ۲۸۳ پتری دارای محیط مایع E20A کشت شدند (شکل ۲ C) که پس از بازبینی بذرها، ۱۳۷ رویان به‌دست آمد (جدول ۴). در روش کشت مایع در مقایسه با روش مستقیم، شمار بیشتری رویان به‌دست آمد. به‌تقریب مقدار رویان به‌دست آمده چهار برابر بود و درصد بالایی از این رویان‌ها در مرحله نموی لپه‌ای قرار داشتند که احتمال باززایی گیاه را افزایش داد (جدول ۴).

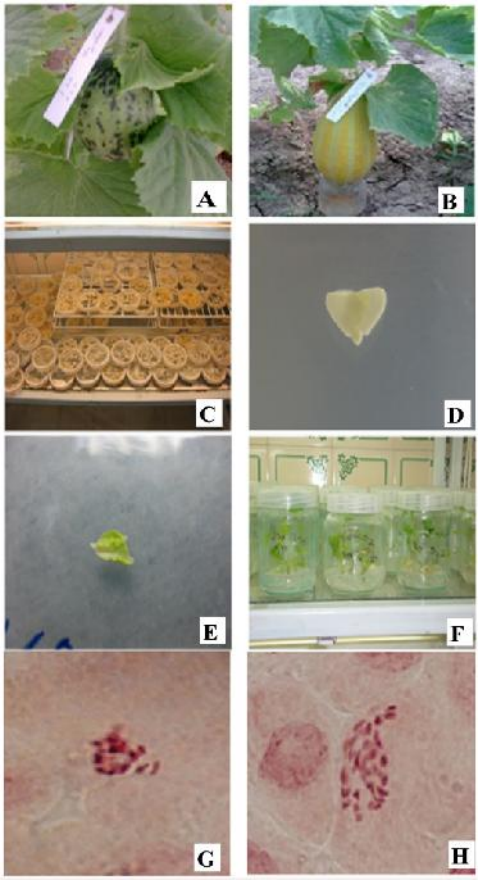


Fig. 2. Induction of haploid plants obtained from pollination with irradiated-pollen in Iranian melons. (A, B) obtained parthenocarpic fruits after pollination by pollen irradiated with 550 Gy dose of Gamma ray in Soski Sabz Ivanake (A) and Khatoni Mashhad (B) melons. C) Detection and extraction of melons parthenogenic haploid embryos by liquid medium technique. D) Heart-shaped embryo dissected from the parthenogenic seed E) Germination of the Heart-shaped embryo on E20A medium. F) Micro propagation of obtained-parthenogenic plant using nodal micro cutting. G, H) chromosome number of root tips of haploid plant (n=x=12) (G) compared to control (2n=2x=24) (H) in Samsoori melon.

شکل ۲- انگیزش گیاهان نیمگان پس از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در توده‌های بومی خربزه. (A و B). میوه بکربار نمو یافته پس از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده با شدت ۵۵۰ گری پرتو گاما در خربزه سو سکی سبز (A) و خربزه خاتونی مشهد (B). (C) جداسازی و نجات رویان به روش کشت مایع. (D) رویان قلبی شکل به‌دست آمده از بذر بکرزا. (E) رویان در حال رشد بر روی محیط کشت E20A. (F) ریزافزایی گیاهان باززایی شده از شاخساره تک گره در شرایط درون شیشه‌ای (G). شمار کروموزوم‌های یاخته نوک ریشه در گیاه نیمگان باززایی شده از طالبی سمسوری (n=x=۱۲). (H) شمار کروموزوم‌های یاخته نوک ریشه در گیاه دوگان طالبی سمسوری (2n=2x=24).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

عامل‌هایی چون کاهش شمار بذرهای مورد نیاز برای بازبینی، مشاهده رویان موجود در بذر به کمک منبع نوری پیش از شکافتن بذر، رشد رویان و کمک به قابل مشاهده شدن رویان، برتری‌های این روش را نسبت به روش مستقیم تأیید می‌کند. با این وجود، یکی از ایرادهای بزرگ این روش وقت‌گیر بودن و پرزحمت بودن آن می‌باشد. به‌طوری که در این روش باید تمام بذرها به دقت شسته و بافت جفت و ماده‌های لزج از آن‌ها زدوده شود، که این کار به‌ویژه در توده‌های طالبی بسیار وقت‌گیر بود. همچنین در کشت مایع مقدار آلودگی به‌طور چشمگیری بیشتر بود و حدود ۵۰٪ رویان‌های حاصل در این روش آلوده شدند. در این بررسی افزون بر دو روش یادشده، روش تلفیقی نیز ارزیابی شد. در روش تلفیقی پس از بازبینی مستقیم برای تشخیص رویان نیم‌گان، از کشت مایع برای رشد بیشتر رویان‌های باقی‌مانده احتمالی در دیگر بذرها استفاده گردید. در روش تلفیقی از ۸۷۷۱ بذر (حاصل از یک دوره باروری و ۳۴ میوه) در نژادگان‌های مختلف، ۹۷ رویان (۱/۱٪) به‌دست آمد (جدول ۴). با توجه به نتیجه‌های حاصل، مشاهده شد که تلفیق این دو روش در خربزه کاراتر بود و مقدار رویان به بذر بالاتری به‌دست آمد که درصد بالایی از رویان‌ها به گیاه‌چه باززایی شدند. بدین ترتیب اگرچه نقش کشت مایع در افزایش کارایی تولید گیاهان نیم‌گان تأیید گردید، ولی کشت تلفیقی این روش با روش مستقیم در جداسازی رویان به‌منظور تولید گیاهان نیم‌گان از توده‌های بومی خربزه کارایی بالاتری نشان داد، به‌طوری‌که در برنامه‌های به‌نژادی می‌توان به آسانی به شمار کافی گیاه نیم‌گان دست یافت.

جدول۴- مقایسه روش‌های جداسازی و نجات رویان در تولید رویان و گیاهان نیم‌گان در توده‌های خربزه ایرانی.

Table 4. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen in Iranian melons.

روش نجات رویان Method of embryo rescue	نوع رویان Type of embryo	شمار رویان Embryo number	باززایی Regeneration (%)	گیاه‌چه‌های باززایی شده Regenerated plantlet
کشت مستقیم Direct culture	کروی Global	15	5.47	0
	قلبی شکل Heart shape	18	6.57	5
	لپه‌ای Cotyledon	7	2.55	4
	کل Total	40	14.59	9
کشت مایع Liquid medium	کروی Global	43	15.69	0
	قلبی شکل Heart shape	40	14.60	6
	لپه‌ای Cotyledon	54	19.71	19
	کل Total	137	50	25
کشت تلفیقی Integrated culture	کروی Global	62	22.63	0
	قلبی شکل Heart shape	17	6.21	5
	لپه‌ای Cotyledon	18	6.57	13
	کل Total	97	35.41	18
مجموع/میانگین Total/mean		274	100	52

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

نتیجه گیری

به‌طور کلی، نتیجه‌های حاصل از این بررسی نشان داد که روش نجات رویان‌های انگیزش شده به‌وسیله پرتو گاما، روشی مطلوب برای تولید گیاهان نیم‌گان بکرزا در توده‌های بومی خربزه می‌باشد. با توجه به نتیجه‌های حاصل، بهترین کارایی پرتوتابی دانه‌های گرده برای انگیزش نیم‌گانی شدت ۵۵۰ گری بود. همچنین مشخص شد که مناسب‌ترین زمان برای نجات رویان، سه هفته پس از باروری می‌باشد. به‌کارگیری روش تلفیقی کشت مایع و کشت مستقیم برای تشخیص، جداسازی و نجات رویان اثر بسیار زیادی در افزایش کارایی تولید رویان و گیاهان نیم‌گان در توده‌های خربزه ایرانی داشت.

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان این پژوهش، از پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای که امکان اجرای پژوهش حاضر را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع References

۱. لطفی، م.، ع. کاشی، ذ. زمانی، ب.ا. سید طباطبایی، ا. ارل. ۱۳۸۲. تولید کارآمد گیاهان هاپلوئید به منظور ایجاد لاین‌های خالص در خربزه (*Cucumis melo* L.). مجله علوم کشاورزی ایران، ۶۶-۵۵:۴۳.

2. Chahal, G. S. and S. S. Gosal. 2002. Principles and Procedures of Plant Breeding. Alpha Science, Oxford. 604 p.
3. Chen, J.F., L. Cui, A.A. Malik and K.G. Mbira. 2011. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:311-319
4. Cuny, F., M. Grotte, R. Duma s de Vaulx and A. Rieu. 1993. Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.). Environ. Exp. Bot. 33: 301-312.
5. Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria and J. Garcia-Mas. 2006. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. Acta Hort. 725: 837-844.
6. Faris, N.M. and K. Niemirowicz-Szczytt. 1999. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) embryo development *in situ* after pollination with irradiated pollen. Acta Biol. Cracov. Bot. 41: 111-118.
7. Faris, N.M., V. Nikolova and K. Niemirowicz-Szczytt. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. Acta Physiol. Plant. 21:301-396.
8. Germana, M.A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:283-300.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

9. Godbole, M. and H. N. Murthy. 2012. Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). Plant Cell Tiss. Org. 109: 167-170.
10. Gursoz, N., K. Abak, M. Pitrat, J.C. Rode and R. Dumas de Vaulx. 1991. Obtain of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Cucurbit Gen. Coop. 14: 109-110.
11. Kurtar , E.S. and A. Balkaya. 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 Tiss. Org. Cult. 102: 267-277.
12. Kurtar, E.S., N. Sarı, and K. Abak. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica, 127: 335–344.
13. Lotfi, M. and A. Kashi. 1999. Induction of parthenogenetic embryos by irradiated pollen in cucumber. Acta Hort. 492: 323-326.
14. Lim, W. and E.D. Earle. 2008. Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 95: 115–124.
15. Przyborowski, J. A., K. Niemirowicz-Szczytt. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. Plant Breed.112: 70-75.
16. Sadat Hosseini, M., K. Vahdati, M. Lotfi, D. Hassani, and N. Pirvali Biranvand. 2011. Production of haploids in Persian walnut through parthenogenesis induced by gamma-irradiated pollen. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 136: 198–204.
17. Sari, N., I. Solmaz, S. Kasap oglu, I. Gursoy, C. Szam Osi, H. Unlu. 2010. Effect of different pollination dates with irradiated pollens on fruit set, haploid embryo induction and plant obtention in Turkish (Kirkagac, Yuva and Hasanbey) melons. Acta Hort. 871: 639-648
18. Sari, N., K. Abak, M. Pitrat, J.C. Rode, and R. Dumas de Vaulx. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. HortScience, 29: 1189–1190.
19. Thiebaut, J., K. J. Kasha and A. Tsal. 1978. Influence of plant development stage, temperature, and plant hormones on chromosome doubling of barley haploids using colchicine. Can. J. Bot. 57: 480-483.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

20. Todorova, M., P. Ivanov, P. Shindrova, M. Christov and I. Ivanova. 1997. Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica, 97: 249-254.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 17 (4): 389-400 (2017)

Embryos and haploid plants produced via Gamma irradiated pollen in Iranian melon

L. Bagheri*, M. Lotfi, R. Amiri Khah, M. Noori[1]

Irradiated pollen is the most successful haploidization technique within Cucurbitaceae. The influence of gamma ray doses (250, 350, 450 and 550 Gy), genotypes, and stage of development of embryos obtained by irradiated pollen technique on the induction of haploid embryos were studied in several Iranian melon cultivars as well as their hybrids with alien cultivars. Female flowers were pollinated using pollen that had been irradiated with gamma rays. Different shapes and stages of embryos were excised 21 to 25 days after pollination and cultured on E20A medium. Direct culture, liquid culture and integrated culture methods were applied for detecting the induced embryos. Integrated and liquid cultures showed advantages in increasing the efficiency of haploid plants production in melon breeding programs. Results revealed that 550 Gy of gamma-irradiation was successful in inducing parthenogenesis and fruit development, whereas, lower irradiation doses were not effective in inducing haploid embryos. The amount of embryos per seeds were the highest in 'Samsoori' (1.2%) and 'Saveh' (1.1%) cultivars. Some of the heart- and cotyledon-shaped embryos developed to haploid plants. In total, 52 parthenogenic melon plantlet recovered from 274 obtained embryos via pollination with gamma-irradiated pollen. As a result of the present study, haploid embryos and haploid plants production strongly influenced by gamma ray doses, embryo stages and genotypes. Indirect method and chromosome counting performed on the roots of regenerated plants, showed the haploid level (n =x= 12).

Key Words: Gamma irradiation, Iranian melon, Irradiated pollen, Parthenogenesis.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1395.17.4.2.4]

1. Researcher of Nuclear Agricultural Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Associate Professor, Department of Horticulture, College of Aboureihan, University of Tehran, Tehran, Experts of Nuclear Agricultural Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, respectively.

*Corresponding Author, Email: (lbagheri@nrcam.org)