Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (859-868)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.230756.1223

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۸۶۸-۸۵۹)

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای کالوس و جنین در کشت بساک خیار (*Cucumis sativus* L.)

ابوذر اسدی[۱]، علیرضا زبرجدی[۲*] و محمدرضا عبدالهی[۳]
۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
۳. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی، همدان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٤/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۸/۷)

چکیده

در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای کالوس و جنین در کشت بساک خیار، ۲۵ محیط مختلف برای القای کالوس و چهار مسیر مختلف برای القای جنین در نظر گرفته شد. دو آزمایش جداگانه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار و سه تکرار، به‌ترتیب برای القای کالوس و جنین انجام شد. در آزمایش القای کالوس، فاکتورها شامل دو ژنوتیپ خیار (اصفهانی و بتا آلفا)، و ترکیب غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۲۲۵، ۰/٤٥، ۰/٦۸ و ۰/۹۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده و در آزمایش القای جنین نیز فاکتورها شامل ترکیب غلظت‌های مختلف BAP (۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین انواع محیط مایع و جامد بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح یک درصد بین محیط‌های کشت و در سطح پنج درصد بین اثرهای متقابل ژنوتیپ و محیط کشت نشان داد. بساک‌های کشت‌شده در محیط پایه MS و محیط‌های تهیه‌شده با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، در حالت جداگانه پاسخی نشان ندادند و بعد از ٤ هفته از کشت از بین رفتند، اما ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد اثرات مختلفی بر القای کالوس داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، محیط‌های M24، M22 و M15 به‌ترتیب با میانگین‌های ۹۸، ۹۷/۷۵ و ۷۵/۹٦ درصد در بین ۲۵ محیط مورد آزمایش، بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۷۷/۵ درصد نیز کمترین کالوس را برای ژنوتیپ اصفهانی داشتند. محیط M22 با میانگین ۹۸/٤٥ درصد در رقم بتا آلفا، بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۵۹/۷ درصد، کمترین میزان کالوس را برای این رقم داشت. در القای جنین نیز در هیچ‌کدام از سه مسیر جامد- جامد، جامد-مایع و مایع-مایع جنینی مشاهده نشد؛ اما در مسیر مایع- جامد نرخ بالایی از جنین‌زایی مشاهده شد و تفاوت آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد، در بین محیط‌های آزمایش‌شده مشاهده شد. مقایسه میانگین محیط‌های مورد استفاده برای جنین‌زایی نیز نشان داد که محیط M6 با میانگین ٦۰/۵۸ درصد، بیشترین درصد جنین‌زایی و محیط M4 نیز با میانگین ۲۰ درصد کمترین درصد جنین‌زایی را داشتند.

واژه‌های کلیدی: خیار، کشت اندام جنسی نر، BAP، 2,4-D.

The influence of plant regulators on callus and embryo induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) anther culture

Abouzar Asadi1[1], Alireza Zebarjadi[2*] and Mohammad Reza Abdollahi[3]
1, 2. Former Ph.D. Student and Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Associate Professor of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
(Received: Jul. 3, 2017- Accepted: Oct. 29, 2017)

ABSTRACT

In order to investigate effects of plant regulators on callus and embryo induction in cucumber anther culture, 25 media for callus induction and 4 methods for embryo induction were tested. The experimental layout was conducted in factorial arrangement in randomized completely design with four and three replications for callus and embryo induction, respectively. Factors for callus induction were two cucumber genotypes (Esfahani and Beta Alfa) and different concentrations of BAP (0, 0.225, 0.45, 0.68 and 0.91 mg/l) and 2, 4-D (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/l). Also factors for embryo induction were different concentration of BAP (2, 3 and 4 mg/l) and NAA (0.05 and 0.1 mg/l) and different solid and liquid media. Results indicated that there are statistical significant effect at 1% among PGR concentrations and 5% among interaction between genotype and PGR concentrations. The anthers, which were cultured on basal MS medium and media supplemented with individual concentration of plant regulators did not show any response and they became necrotic after 4 weeks of culture, but combination of plant regulators had different effect on callus induction. According to results of means comparison M24, M22 and M15 media with average of 98, 97.75 and 96.75 percent and M10 medium with average of 77.5 percent had highest and lowest callus induction for Esfahani genotype, respectively. The highest and lowest callus induction for Beta Alfa cultivar obtained in M13 (98.45%) and M1 (59.7%) media, respectively. There was no response for embryo induction in Solid-Solid, Solid-Liquid and Liquid-Liquid methods, but high rate of embryo induction obtained in Liquid-Solid method. Results indicated that there was statistical significant effect at 5% among media. Means comparison for tested media showed that M6 (60.58%) and M4 (20%) medium had highest and lowest embryo induction, respectively.

Keywords: Androgenesis, BAP, cucumber, 2, 4-D.

* Corresponding author E-mail: zebarjadiali@yahoo.com

مقدمه

محدودیت شرایط جغرافیایی و منابع آبی و خاکی و ازدیاد جمعیت، همواره دانشمندان را به این فکر مشغول نموده تا راه‌حلی برای این معضل جهانی به بشریت عرضه نمایند. استفاده از علوم مختلف بیوتکنولوژی کشاورزی و کاربرد آن به‌عنوان یک راه‌حل، از جمله مباحثی است که اخیراً در کشورهای در حال توسعه، مورد توجه، مطالعه، پژوهش و کاربرد قرار گرفته است (Hasandokht, 2006). خیار، یکی از مهم‌ترین صیفی‌جات تحت کشت در ایران است که سطح زیرکشت قابل‌توجهی را به خود اختصاص داده است. طبق آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد (فائو)[1] (Organization, 2015)، ایران با ۶۶۱۴۶ هکتار سطح زیر کشت بعد از چین، کامرون و روسیه، چهارمین سطح زیر کشت دنیا را برای این محصول از آن خود کرده است. بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ایران (Jihad, 2016) خیار گلخانه‌ای با مساحت ۲۸۳۲ هکتار و با میانگین تولید ۲۲۱ تن در هکتار، بالاترین سطح زیر کشت را در بین تولیدات گلخانه‌ای ایران به خود اختصاص داده است. فائو در آخرین گزارش خود (Organization, 2015)، ایران را با تولید بیش از ۱/۵ میلیون تن خیار بعد از کشورهای چین و ترکیه، سومین تولیدکننده خیار در دنیا معرفی کرده است. بر اساس گزارش فائو، سطح زیر کشت و نیز میزان تولید خیار در ایران از سال ۱۹۶۱ تا سال ۲۰۱۳ روندی افزایشی داشته است.

خیار گیاهی دیپلوئید (2n=2x=14) یکساله، دولپه و از تیره کدوئیان[2] می‌باشد. این گیاه، علفی و دارای ساقه خزنده و پوشیده از خارهای نازک و خشن است. برگ‌های آن بزرگ و دارای زاویه و دندانه‌دار می‌باشد. خیار گیاهی دگرگشن و گل‌های آن دارای کاسبرگ و گلبرگ و با توجه به نوع ژنوتیپ از تک‌جنسه، دو جنسه، تک‌پایه و دوپایه متفاوتند. جنس Cucumis حدود ۳۰ گونه دارد که خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. مهم‌ترین گونه می‌باشد (Hasandokht, 2006). خیار از سبزی‌های اقتصادی مهم در سراسر جهان و سیستم مناسبی برای مطالعه بسیاری از فرآیندهای مهم بیولوژیکی مانند تعیین جنسیت (Jihad, 2016)، انتقال ژن به هسته و ژنوم اندامک‌ها (Alverson *et al.*, 2011) و فیزیولوژی آبکش (Zhang *et al.*, 2010) می‌باشد.

هاپلوئیدی، موضوع مهمی در مطالعات پایه و علوم کاربردی می‌باشد. به‌طور کلی، گیاهان هاپلوئید[3] و هاپلوئید مضاعف‌شده[4] دارای کاربردهای متنوعی بوده که می‌توان به تولید لاین‌های هموزیگوس (و هموزیگوت‌های انفرادی)، مطالعات ژنتیکی، القا جهش، نقشه‌یابی ژنوم و انتقال ژن اشاره نمود (Chu *et al.*, 1990). مهمترین فاکتوری که استفاده از هاپلوئیدی را در برنامه‌های اصلاحی خیار محدود کرده است، فقدان یک روش مؤثر برای تولید در مقیاس وسیع می‌باشد. توسعه یک سیستم مؤثر برای تولید هاپلوئید مضاعف و کاربرد بیشتر آن در برنامه‌های اصلاحی گیاهان خانواده کدوئیان، می‌تواند زمان مورد نیاز برای توسعه رقم را کاهش دهد (Sauton& Dumas de Vaulx, 1988). به‌طور کلی، روش‌هایی که برای القای هاپلوئید درکدوئیان وجود دارند عبارتند از پارتنوژنز (در درجه اول گرده‌افشانی با دانه گرده پرتوتابی‌شده)، ماده‌زایی درون‌شیشه‌ی[5] (کشت درون‌شیشه تخمدان[6] و تخمک‌ها[7]) و نززایی درون‌شیشه[8] (کشت درون‌شیشه میکروسپورها[9] و بساک‌ها[10]) (Gałązka& Niemirowicz-Szczytt, 2013).

کشت بساک یکی از روش‌های مهم تولید گیاه هاپلوئید در خیار می‌باشد. فاکتورهای زیادی بر موفقیت در کشت بساک، در اکثر گیاهان از جمله کدوئیان مؤثر می‌باشد. از جمله این عوامل می‌توان به ژنوتیپ گیاه، شرایط رشدی گیاه بخشنده، مرحله میکروسپور، پیش‌تیمار جوانه گل، شرایط محیط کشت

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
2. Cucurbitaceae
3. Haploid
4. Doubled haploid
5. *In Vitro* Gynogenesis
6. Ovaries
7. Ovules
8. In Vitro Androgenesis
9. Microspores
10. Anthers

و کشت اشاره کرد (Bajaj, 1990). ترکیبات محیط کشت، عامل کلیدی مؤثر در القای جنین یا کالوس و متعاقب آن باززایی گیاه می‌باشد. مشخص‌شده که نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر نرزایی[1] مؤثر می‌باشد. اگر چه تعداد کمی از گونه‌ها (اکثر اعضای خانواده سولاناسه[2]) به افزودن اکسین در محیط القا نیازی ندارند و القا در محیط ساده اتفاق می‌افتد، حضور تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین، سیتوکنین و یا ترکیبی از این‌ها) برای تولید جنین مشتق‌شده از میکروسپور، در اکثر گونه‌های گیاهی مخصوصاً برای نوع ریکالسیترنت‌ها[3] ضروری می‌باشد (Maheshwari *et al.*, 1982). به‌نظر می‌رسد نوع و غلظت اکسین‌ها، تعیین‌کننده مسیر توسعه میکروسپور می‌باشد (Ball *et al.*, 1993). تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D[4] تولید کالوس را القا می‌کند و هورمون‌های IAA[5] و NAA[6]، جنین‌زایی مستقیم را القا می‌کنند (Armstrong *et al.*, 1987).

Abdollahi *et al.* (2016) در پژوهشی، غلظت‌های مختلف آگار (۰، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ گرم در لیتر) و عناصر پرمصرف (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر) را بر کشت بساک و القای کالوس و رویان گامتی چهار رقم خیار مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های مختلف آگار و عناصر پرمصرف، از نظر میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی، در کشت بساک چهار رقم خیار وجود دارد. دو برابر کردن عناصر پرمصرف در محیط کشت، باعث افزایش ۱۰۰ درصدی کالوس‌های جنین‌زا در ژنوتیپ اصفهانی شد. در حالی‌که سایر ارقام در مقدار یک برابر، بیشترین درصد کالوس‌های جنین‌زا را نشان دادند. بیش‌ترین درصد کالوس‌های جنین‌زا در محیط حاوی آگار ۷ گرم بر لیتر به‌دست آمد. Hamidvand *et al.* (2013) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه (۲ و ۵ میکرومول 2,4-D و NAA به‌صورت تکی و ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکرومول BAP و KIN در ترکیب با ۲ میکرومول 2,4-D) را بر جنین‌زایی حاصل از کشت بساک دو ژنوتیپ اصفهانی و بتا آلفا خیار مورد بررسی قرار دادند و گزارش دادند که تفاوت بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و هورمون‌های مختلف، معنی‌دار بود. ترکیب ۱/۵ µM KIN/۲2,4-D µM بیشترین درصد کالوس‌زایی را در ژنوتیپ اصفهانی و ۱/۵ µM KIN/۲2,4-D µM به‌همراه ۱ µM BAP/۲2,4-D µM بیشترین درصد کالوس‌زایی را در رقم بتا آلفا نشان داد. بیشترین تعداد جنین در بساک با استفاده از ترکیب ۲2,4-D µM /µM ۱ BAP به‌دست آمد.

Suprunova *et al.* (2008) به‌منظور افزایش نرخ تولید گیاهان هاپلوئید خیار حاصل از کشت درون‌شیشه تخمک، بساک و میکروسپور، چند عامل به قرار زیر را مورد بررسی قرار دادند: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (۰/۴، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌ترتیب در ترکیب با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA) برای کشت بساک، (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ، به‌ترتیب در ترکیب با ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA، به‌همراه ساکاروز ۵ درصد برای کشت تخمک)، اثر ژنوتیپ (۱۰ ژنوتیپ)، طول گل و مرحله توسعه میکروسپور. از بین هورمون‌های مختلف ۰/۲ $mg.L^{-1}$ TDZ بهترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای القا ماده‌زایی، ۱ $mg.L^{-1}$BA/۲ $mg.L^{-1}$ 2,4-D بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای نرزایی و نیز اواخر تک‌هسته‌ای و اوایل دو هسته‌ی توسعه میکروسپور، بهترین مرحله برای کشت بساک گزارش شدند. Song *et al.* (2007) در شش آزمایش (شامل پیش‌تیمارهای دمایی، محیط القای کالوس جنین‌زا، شرایط پیش‌کشت، محیط القای جنین، محیط جوانه‌زنی جنین و اثرات ژنوتیپ) باززایی گیاهان دابل‌هاپلوئید خیار به‌وسیله آندروژنز را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، بهترین محیط برای القای کالوس جنین‌زا، محیط MS تکمیل‌شده با µM BA ۴/۴۴، µM 2,4-D ۲/۲۶، µM KIN ۴/۶۴، ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار معرفی شد. برای القای جنین، محیط MS به‌همراه µM NAA ۰/۵۴، µMBA ۱۳/۳۲، ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار به‌عنوان محیط بهینه معرفی شد. برای جوانه‌زنی جنین، محیط

1. Androgenesis
2. Solanaceae
3. Recalcitrant
4. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
5. Indole-3-Acetic Acid
6. A-Naphthaleneacetic Acid

MS کامل‌شده با BA µM ۲/۲۲، ۶ درصد ساکاروز و ۱/۲ درصد آگار گزارش شد. در این مطالعه، سه جنین در بساک و ۴۲ گیاه هاپلوئید مضاعف‌شده در ۴۵ بساک (۹۳ درصد موفقیت) گزارش شد.

Ashok Kumar & Mrthy (2004) اثر قندهای مختلف (ساکارر، مالتوز، گلوکر و فروکتوز با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ و ۰/۵M به‌طور جداگانه) و اسید آمینه‌های مختلف (گلوتامین، گلایسین، آرژنین، اسپاراژین و سیستئین با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵mM به‌طور جداگانه و نیز با ترکیب‌های ۱ و ۲mM) را بر جنین‌زایی و باززایی گیاهان حاصل از کشت بساک دو رقم خیار، در محیط B5 کامل‌شده با ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی ۲µM 2,4-D /۱µMBA مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که ساکارز با غلظت ۰/۲۵M، بهترین قند در بین قندهای مطالعه‌شده و نیز ترکیبی از همه اسیدهای آمینه مورد استفاده با غلظت ۱mM از هرکدام، بهترین پاسخ را برای القای جنین ایجاد می‌کند. Ashok Kumar *et al.* (2003) جنین‌زایی و بازایی کشت بساک دو رقم خیار را تحت تأثیر پیش‌تیمار دمایی (۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰-۰ روز و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ روز) و هورمون‌ها (IAA، IBA، 2,4-D، NAA، BAP، KN و TDZ با غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکرومولار و ترکیب 2,4-D ۲ میکرومولار با TDZ/KN/BAP ۲، ۱ و ۰/۵ میکرومولار) در محیط کشت B5 مورد بررسی قرار دادند و ترکیب ۲ میکرومول 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP را به‌عنوان بهترین ترکیب و نیز پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ روز را به‌عنوان بهترین پیش‌تیمار گزارش کردند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات تکی و ترکیب سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP، 2,4-D، NAA و نیز محیط‌های مختلف جامد و مایع بر نرزایی در کشت بساک خیار بود.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی و اجرای آزمایش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، دو ژنوتیپ خیار شامل توده بومی اصفهانی و رقم هیبرید بتا آلفا تهیه‌شده از شرکت پاکان‌بذر اصفهان بودند. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در گلخانه آموزشی و پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه کشت شدند. مراقبت‌های زراعی در گلخانه، شامل آبیاری، سم‌پاشی، کودپاشی و محلول‌پاشی با روش مناسب انجام گرفت و در فاصله ۴۰ روز بعد از کشت، اقدام به جمع‌آوری گل‌ها جهت کشت بساک شد. بهترین زمان برداشت جوانه‌های گل، جهت کشت بساک، زمانی می‌باشد که میکروسپورها در اواسط تا اواخر مرحله تک هسته‌ای هستند (Ashok Kumar& Murthy, 2004; Ashok Kumar *et al.*, 2003). گل‌های با مراحل مختلف رشد، جمع‌آوری شد (شکل a-۱)، یک عدد بساک از هر گل جداسازی و بر روی لام میکروسکوپی قرار گرفت. ده میکرولیتر مایع رنگ‌آمیزی DAPI روی آن قرار گرفت. میکروسپورهای آن با استفاده از برش به‌وسیله اسکالپل در محلول آزاد شدند. لامل رو آن قرار داده شد، به‌منظور جلوگیری از خشک‌شدن آن، با استفاده از لاک ناخن، درزگیری بین لام و لامل انجام گرفت و در تاریکی قرار گرفت. بعد از نیم ساعت، با استفاده از میکروسکوپ مطالعه گردید.

اعمال پیش‌تیمار دمایی

جوانه‌های گل برداشت‌شده، درون شیشه‌هایی که قبلاً با فویل آلومینیومی پوشیده شده بودند و روی یخ قرار داشتند، منتقل شدند. شیشه‌های حاوی گل به‌مدت دو روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (Ashok Kumar *et al.*, 2003) به‌منظور اعمال پیش‌تیمار سرمایی منتقل شدند.

ضدعفونی کردن گل‌ها قبل از کشت

برای ضدعفونی سطحی غنچه‌ها، از آب مقطر استریل جهت زدودن خاک استفاده شد، سپس با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه، با محلول ۰/۵ درصد قارچ‌کش ترکیبی رورال‌تی‌سی به‌مدت ۵ دقیقه، و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. گل‌ها در پایان، ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

آماده‌سازی محیط‌ها جهت کشت بساک‌ها

در این آزمایش پاسخ بساک‌های خیار به القای کالوس در ۲۵ محیط کشت MS تکمیل‌شده با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. طرح آزمایشی مورد استفاده در این بخش، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی بود. تعداد چهار تکرار (پتری‌دیش‌های با قطر ۱۲ سانتی‌متر) برای هر محیط کشت در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش ۲۰ بساک کشت شد.

آزمایش اول: پیدا کردن بهترین محیط القای کالوس در کشت بساک‌ها

جهت کشت بساک‌ها، ابتدا گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌های غنچه‌های استریل شده توسط اسکالپل و پنس استریل جدا شدند، سپس بساک‌ها از میله پرچم جدا گردید، به‌نحوی‌که به بافت سوماتیکی بساک آسیبی نرسد. با یک پنس استریل، بساک‌ها با آرامی بر روی محیط کشت قرار گرفتند. بعد از کشت، پتری‌دیش‌ها با سلفون درزگیری شدند و به اتاقک رشد انتقال داده شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام گرفت. در نهایت تعداد کالوس‌های القاشده شمارش و یاداشت شد.

آزمایش دوم: پیداکردن بهترین محیط جهت القای جنین

در این بخش، ابتدا شش محیط کشت شامل MS تکمیل‌شده با شش ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی، گزارش شده در جدول ۲، در دو حالت جامد و مایع جهت القای جنین و یا باززایی کالوس‌ها آماده شد. ظروف کشت‌شده برای هر ترکیب تیماری، به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از آن، به اتاقک رشد با دمای معمولی منتقل شدند. شیشه‌های حاوی محیط مایع نیز روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از گذشت سه هفته، تمامی ریزنمونه‌ها به‌طور جداگانه به شیب غلظت ۱۰، ۵ و ۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در دو محیط مایع و جامد منتقل شدند. نمونه‌های رشدکرده در محیط مایع، به دو محیط جامد و مایع و نمونه‌های رشدکرده در محیط جامد نیز به دو محیط جامد و مایع حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی منتقل شدند. به‌طوری‌که ریزنمونه‌ها چهار مسیر جامد-جامد، جامد-مایع، مایع-جامد و مایع-مایع را به‌منظور القای جنین طی کردند. در پایان، تعداد جنین‌های القاشده شمارش شد. طرح آزمایشی در این بخش اجرای آزمایش، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود؛ ولی با توجه به ازبین‌رفتن برخی از نمونه‌ها و نیز صفر بودن تعدادی از تیمارها، داده‌های حاصل از این بخش، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، برای ژنوتیپ اصفهانی تجزیه و تحلیل آماری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این آزمایش، صفات درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس و درصد کالوس‌های تولیدکننده جنین محاسبه شد. آزمون نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab روی باقیمانده‌ها انجام گرفت و تبدیل داده برای داده‌هایی که توزیع نرمال نداشتند انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. در جدول مقایسه میانگین‌ها، از حروف‌بندی داده‌های نرمال‌شده و میانگین‌های داده‌های اصلی استفاده شده است.

جدول ۱. غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده برای کشت بساک

Table 1. Plant regulators concentration for anther culture

Medium	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Medium	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)
M1	0	0	M14	0.45	0.25
M2	0.225	0	M15	0.45	0.5
M3	0.45	0	M16	0.45	0.75
M4	0.68	0	M17	0.45	1
M5	0.91	0	M18	0.68	0.25
M6	0	0.25	M19	0.68	0.5
M7	0	0.5	M20	0.68	0.75
M8	0	0.75	M21	0.68	1
M9	0	1	M22	0.91	0.25
M10	0.225	0.25	M23	0.91	0.5
M11	0.225	0.5	M24	0.91	0.75
M12	0.225	0.75	M25	0.91	1
M13	0.225	1			

جدول ۲. غلظت ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی مورد استفاده برای جنین‌زایی

Table 2. Plant regulators concentration for embryo induction

Medium	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Temperature shock (^{0}C)	Agar (g/l)
M1	0.05	2		
M2	0.05	3		0
M3	0.05	4	35	
M4	0.1	2		8
M5	0.1	3		
M6	0.1	4		

نتایج و بحث

در ابتدا به‌منظور تعیین مرحله رشد میکروسپور، جوانه‌های گل در سن‌های مختلف برداشت شدند (شکل a-۱) و با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI، جوانه‌های گل با میکروسپور در مرحله تک‌هسته میانی تا اواخر مرحله تک‌هسته‌ای شناسایی شدند و برای کشت بساک مورد استفاده قرار گرفتند. سایر محققین، بهترین مرحله رشد میکرسپور جهت کشت بساک خیار را تک‌هسته‌ای میانی تا اواخر تک‌هسته‌ای معرفی کردند (Ashok Kumar *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007; Germanà, 2010; Abdollahi *et al.*, 2016).

بر اساس نتایج مشاهده‌شده برای ۲۵ محیط کشت پایه MS تکمیل‌شده با سطوح مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌صورت تکی و ترکیبی، مشخص شد که ۴ محیط تکمیل‌شده با سطوح مختلف BAP، ۴ محیط تکمیل‌شده با سطوح مختلف 2,4-D و محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی، باعث القای کالوس در کشت بساک خیار نشدند. بساک‌های کشت‌شده در این محیط‌ها (شکل b-۱) در اوایل رشد طبیعی بودند، ولی بعد از گذشت ۱۴ روز، رشدی مشاهده نشد و نمونه‌ها زرد شدند و بعد از گذشت حدود چهار هفته از بین رفتند (شکل e-۱). Ashok Kumar *et al.* (2003) نیز القای کالوس در کشت بساک دو رقم خیار را در پاسخ به اثرات تکی و ترکیبی تنظیم‌کنندهای مختلف رشد گیاهی مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن‌ها نیز هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های مورد استفاده، پاسخی به اثرات تکی تنظیم‌کننده‌های رشد IAA، IBA، BAP، KN و TDZ نشان ندادند. به‌منظور کاهش اریبی و کاهش اثر دادهای صفر بر روی نتایج، داده‌های این محیط‌ها از سایر داده‌ها جدا شدند و داده‌های ۱۶ محیط باقیمانده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. بساک‌های کشت‌شده در ۱۶ محیط تکمیل‌شده با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی مختلف، بعد از گذشت سه روز، متورم شدند و روند کالوس‌زایی شروع شد. بعد از گذشت دو هفته کالوس‌ها تولید شدند (شکل c-۱). اندازه کالوس‌ها، بعد از گذشت چهار هفته، بزرگتر شد (شکل d-۱). در این مرحله تعداد کالوس‌های القاشده، شمارش و یاداشت شد و درصد القای کالوس محاسبه گردید.

نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیبات سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر پاسخ دو ژنوتیپ اصفهانی و بتا آلفا خیار به کشت بساک، در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۳، تفاوت معنی‌داری بین دو رقم مورد آزمایش مشاهده نشد؛ در حالی‌که بین محیط‌های کشت، اختلاف بسیار معنی‌دار آماری مشاهده شد. اثر متقابل رقم در محیط کشت نیز در سطح پنج درصد، معنی‌دار شد. با توجه به معنی‌دار نبودن اختلاف بین ژنوتیپ‌ها، معنی‌دارشدن اثر متقابل، ناشی از تفاوت بین محیط‌ها است. معنی‌دار بودن اثرات متقابل محیط کشت و رقم، نشان می‌دهد که با تغییر سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی، واکنش ارقام متفاوت می‌گردد. هر چند که به‌طور کلی اثر ژنوتیپ معنی‌دار نشد؛ اما در یک سطح ترکیب هورمونی مشخص، میزان کالوس تولیدشده توسط ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. ضمن اینکه بساک‌های القاشده در ژنوتیپ اصفهانی، دارای اندازه بزرگتری از بساک‌های القاشده حاصل از رقم بتا آلفا بودند (داده‌های نشان داده‌نشده). بنابراین بساک‌های کشت‌شده پاسخ متفاوتی به سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان دادند. به‌عبارت دیگر میزان تولید کالوس، توسط ژنوتیپ‌ها تغییر می‌کند و اینکه در یک ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی مشخص، چه میزان کالوس تولید می‌شود، به نوع ژنوتیپ بستگی دارد. بر اساس مطالعات انجام‌شده، سایر محققین نیز، ژنوتیپ را یک عامل تأثیرگذار در پاسخ به کشت بساک معرفی کرده‌اند (Ashok Kumar *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007; Abdollahi *et al.*,

2016). به‌همین دلیل، برش‌دهی اثر متقابل برای ژنوتیپ‌ها انجام گرفت و بر اساس نتایج مقایسه میانگین جداگانه، مشخص شد که بیشترین و کم‌ترین مقدار تولید کالوس در سطوح مختلف ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی مطابق جدول ۴ می‌باشد.

بر اساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۴)، محیط‌های M24، M22 و M15 با ۹۸، ۹۷/۷۵ و ۹۶/۷۵ درصد در بین ۲۵ محیط مورد آزمایش، بیشترین القای کالوس را برای ژنوتیپ اصفهانی داشتند؛ ولی با هم به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. محیط M10 نیز با ۷۷/۵ درصد کمتر از بقیه محیط‌ها، باعث القای کالوس در ژنوتیپ اصفهانی شده است. محیط M22 با ۹۸/۴۵ درصد در رقم بتا آلفا، بیشترین القای کالوس و محیط M10 نیز با ۵۹/۷ درصد، کمترین میزان القای کالوس را برای این رقم داشت.

در مطالعه‌ای Ashok Kumar *et al.* (2003) محیط کشت B5 تکمیل‌شده با ترکیب 2µM 2,4-D و 1µM BAP را بهترین محیط جهت القای کالوس در خیار معرفی کردند. در مطالعه دیگری Song *et al.* (2007) بهترین محیط را برای القای کالوس در خیار، محیط MS تکمیل‌شده با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی 4µM BAP، 2.26 µM 2,4-D و 4.64 KIN µM معرفی کردند. در مطالعه دیگری که Hamidvand *et al.* (2013) بر روی دو رقم خیار انجام دادند، محیط کشت MS تکمیل‌شده با ترکیب 2,4-D 2µM و 1µM KIN را بهترین محیط جهت القای کالوس در خیار ژنوتیپ اصفهانی معرفی کردند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط M24، بیشترین القای کالوس را در ژنوتیپ اصفهانی داشت و محیط M22 نیز بالاترین القای کالوس برای رقم بتا آلفا نشان داد. به‌طور کلی در هر دو رقم مورد آزمایش در این تحقیق، ترکیب غلظت‌های بیشتر از BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف 2,4-D، تولید کالوس را در بساک‌های بیشتری القا کرد. ترکیب غلظت‌های بیشتر BAP با غلظت‌های کمتر 2,4-D نسبت به ترکیب غلظت‌های کمتر BAP با غلظت‌های بیشتر 2,4-D نیز باعث القای بیشتر کالوس در کشت بساک خیار شد. ژنوتیپ اصفهانی در دو سطح کمتر BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف 2,4-D نسبت به رقم بتا آلفا، پاسخ بهتری برای القای کالوس نشان داد.

جدول ۳. تجزیه واریانس القای کالوس کشت بساک ژنوتیپ‌های خیار در پاسخ به سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

Table 3. Analysis of variance of cucumber's anther culture induction in response to different levels of plant regulators

S.O.V	df	M.S.
Genotype(g)	1	29.24^{ns}
Medium(M)	15	42.24^{**}
Interaction G*M	15	31.09^{*}
Error	96	9.48
C.V. (%)		18.06

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: significant at 5 and 1% of probability levels, and non-significant, respectively.

کالوس‌های القاشده به‌منظور القای جنین یا باززایی، به محیط‌های جنین‌زا، به شرح زیر منتقل شدند. چهار مسیر متفاوت برای القای جنین مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌ها به ۶ محیط مایع و ۶ محیط جامد تکمیل‌شده با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گزارش‌شده در جدول ۲ منتقل شدند. بعد از ۳ تا ۴ هفته، همه کالوس‌ها به شیب غلظت 2,4-D منتقل شدند. بدین‌صورت که کالوس‌های که در محیط جامد بودند به دو محیط جامد و مایع و کالوس‌های که در محیط مایع بودند نیز به دو محیط جامد و مایع منتقل شدند. بعد از گذشت دو هفته، تعداد کالوس‌های جنین‌زا شمارش شد و داده‌های حاصل یاداشت گردید. در هیچ‌کدام از سه مسیر جامد- جامد، جامد- مایع و مایع- مایع جنینی مشاهده نشد. در این سه مسیر، کالوس‌ها بزرگتر شده و در محیط‌های حاوی ترکیبات با BAP بالا، کالوس‌های سبزرنگ سفت تشکیل شد (شکل f-۱). در محیط‌های تکمیل‌شده با BAP کمتر نیز کالوس‌های رشدکرده زردرنگ و اسفنجی بودند (شکل g-۱). مسیر مایع-جامد پاسخ مناسبی به القای جنین داد. در تمامی محیط‌های مورد استفاده برای القای جنین، در این مسیر جنین مشاهده شد (شکل h-۱). تعداد جنین‌های القاشده شمارش و درصد کالوس‌های جنین‌زا محاسبه شد.

جدول ۴. مقایسه میانگین القای کالوس در کشت بساک خیار در پاسخ به محیط‌های مختلف MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح پنج درصد

Table 4. Means comparison of cucumber's anther culture induction in different MS media supplemented with plant regulators based on Duncan's new multiple range test at 5% level

Esfahani			Beta Alfa		
Medium	Mean	Percent	Medium	Mean	Percent
M24	19.60 a	98	M22	19.69 a	98.45
M22	19.55 a	97.75	M21	19.25 ab	96.25
M15	19.35 a	96.75	M20	19.06 ab	95.3
M23	19.06 ab	95.3	M19	19.06 ab	95.3
M21	19.02 ab	95.1	M24	19.06 ab	95.3
M20	19.00 ab	95	M25	18.75 ab	93.75
M19	18.50 ab	92.5	M18	18.63 ab	93.15
M25	18.25 ab	91.25	M15	17.81 abc	89.05
M16	18.00 abc	90.00	M23	17.19 bc	85.95
M12	17.75 abc	88.75	M14	16.17 cd	80.85
M11	17.50 abc	87.50	M16	16.00 cd	80.00
M18	17.50 abc	87.50	M12	15.63 cd	78.15
M14	16.88 abc	84.4	M11	14.69 d	73.45
M13	16.25 bc	81.25	M13	14.50 d	72.50
M17	16.25 bc	81.25	M17	13.94 de	69.70
M10	15.50 c	77.5	M10	11.94 e	59.70

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

In each column of treatment groups, means followed by the same letters are not significantly different.

نتایج تجزیه واریانس تعداد کالوس‌های جنین‌زا برای مسیر مایع- جامد برای ژنوتیپ اصفهانی در جدول ۵ گزارش شده است. بر اساس این نتایج، محیط تأثیر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر روی القای جنین داشت. مقایسه میانگین برای محیط‌ها (جدول ۶)، نشان داد که M6، M1، M3، M2 و M5 به‌ترتیب با میانگین‌های ۶۰/۵۸، ۵۵/۶۸، ۵۰، ۵۰ و ۵۰ درصد، بهتر از M4 با میانگین۲۰ درصد باعث القای جنین شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، به‌نظر می‌رسد که نسبت خاصی از ترکیب BAP با NAA جنین‌زایی را افزایش می‌دهد و کاهش یا افزایش هر کدام از این دو، باعث افزایش کمتری در جنین‌زایی می‌شود. مثلاً نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط M6 دو برابر محیط M1 بود و در این دو محیط، بیشترین درصد جنین‌زایی مشاهده شد، در صورتی‌که وقتی در محیط M4، مقدار BAP ثابت ماند و غلظت NAA دو برابر شد، القای جنین‌زایی بطور معنی‌داری نسبت به سایر محیط‌ها، کمتر افزایش پیدا کرد. Song *et al.* (2007) محیط MS تکمیل‌شده با BA µM ۱۳/۳۲ و NAA µM ۰/۵۴ را بهترین محیط جهت القای جنین در کشت بساک خیار معرفی کردند. Hamidvand *et al.* (2013) و Ashok Kumar & Murthy (2004) بیشترین نرخ جنین‌زایی را در محیط کشت MS تکمیل‌شده با BAP µM 1 و 2,4-D µM 2 را در کشت بساک خیار گزارش دادند. نتایج این مطالعه در سطوح مشترک تنظیم‌کننده رشد گیاهی مورد آزمایش با نتایج گزارش شده توسط Song *et al.* (2007) نیز همخوانی دارد.

جدول ۵. تجزیه واریانس القا جنین برای ژنوتیپ اصفهانی

Table 5. Analysis of variance for embryo induction in Esfahani genotype

S.O.V	df	MS
Medium	5	607.59*
Error	12	160.54
C.V. (%)		15.56

* معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد.

* Significant at 5% of probability level.

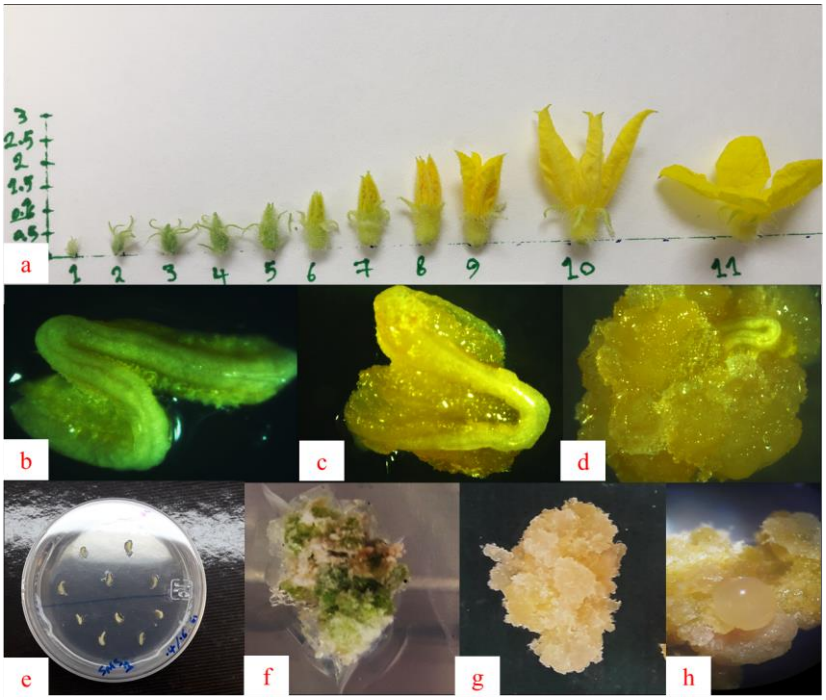
جدول ۶. مقایسه میانگین جنین‌های القاشده از کالوس‌های بساک در ژنوتیپ اصفهانی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن و در سطح پنج درصد

Table 6. Means comparison of embryo induction in Esfahani Genotype based on Duncan's new multiple range test at 5% level

Medium	Mean
M6	60.58 a
M1	55.68 a
M3	50 a
M2	50 a
M5	50 a
M4	20 b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different.



شکل ۱. القای کالوس رویان‌زا و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک خیار. (a) اندازه‌های مختلف گل جهت انتخاب گل‌های حاوی میکروسپورهای با مرحله تک هسته‌ی تا اواخر دو هسته، (b) بساک خیار کشت‌شده در روز اول، (c) بساک رشدکرده بعد از دو هفته از کشت، (d) بساک‌های رشدکرده بعد از چهار هفته از کشت، (e) بساک‌های زردشده و نکروزه‌شده بعد از چهار هفته از کشت، (f) ریزنمونه‌های سفت و سبز رنگی که جنین در آن‌ها القا نشد، (g) ریزنمونه‌های اسفنجی که جنین در آن‌ها القا نشد، (h) جنین‌های القاشده در مسیر مایع- جامد.

Figure 1. Callogenesis and embryogenesis in anther culture of Cucumber: (a) Different size of flower buds in order to choose suitable development stage, (b) Cucumber cultured anther on the first day, (c) Grown anther after two weeks of culture, (d) Grown anther after four weeks of culture, (e) Necrotic and yellow anthers after four weeks of culture, (f) Green and stiff explants in which the embryo was not induced, (g) spongy explants in which the embryo was not induced (h) Induced embryos in Liquid-Solid method.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبی از سطوح اکسین و سیتوکنین، بر القا کالوس در کشت بساک خیار مؤثر می‌باشد و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، در حالت جداگانه، تأثیر مثبتی در این خصوص ندارند. محیط‌های M24، M22 و M15 به‌ترتیب با میانگین‌های ۹۸، ۹۷/۷۵، ۹۶/۷۵ درصد بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۷۷/۵ درصد نیز کمترین کالوس را برای ژنوتیپ اصفهانی داشتند. محیط M22 با میانگین ۹۸/۴۵ درصد در رقم بتا آلفا بیشترین کالوس و محیط M10 نیز با میانگین ۵۹/۷ درصد کمترین میزان کالوس را برای این رقم داشت. بنابراین ترکیب غلظت‌های بالاتر BAP و 2,4-D برای القای کالوس کشت بساک خیار توصیه می‌شود. مسیر مایع- جامد نرخ بالایی از جنین‌زایی را داشت و محیط M6 با میانگین ۶۰/۵۸ درصد بیشترین درصد جنین‌زایی و محیط M4 نیز با میانگین ۲۰ درصد کمترین درصد جنین‌زایی را داشتند.

REFERENCES

1. Abdollahi, M. R., Najafi, S., Sarikhani, H. & Moosavi, S. S. (2016). Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology*, 40, 571-579.
2. Alverson, A. J., Rice, D. W., Dickinson, S., Barry, K. & Palmer, J. D. (2011). Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber. *The Plant Cell*, 23, 2499-2513.

3. Armstrong, T., Metz, S. & Mascia, P. (1987). Two regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Science*, 51, 231-237.
4. Ashok Kumar, H. & Murthy, H. (2004). Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 201-208.
5. Ashok Kumar, H. G., Murthy, H. N. & Paek, K. Y. (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia horticulturae*, 98, 213-222.
6. Bajaj, Y. (1990). In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Haploids in Crop Improvement I. Springer*.
7. Ball, S. T., Zhou, H. & Konzak, C. F. (1993). Influence of 2, 4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Science*, 90, 195-200.
8. Chu, C., Hill, R. & Brule-Babel, L. (1990). High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in Triticum aestivum L. on monosaccharide containing media. *Plant Science*, 66, 255-262.
9. Gałązka, J. & Niemirowicz-Szczytt, K. (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*, 25.
10. Germanà, M. A. (2010). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104, 283-300.
11. Hamidvand, Y., Abdollahi, M. R., Chaichi, M. & Saeed, S. (2013). The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5, 1089.
12. Hasandokht, M. R. (2006). Greenhouse managing (greenhouse production technology). Ed.^Eds. Thran: Marz Danesh. 320. (in Farsi)
13. Jihad, M. O. A. (2016). *Agricultural statistics year book*. Retrieved November 6, 2016, from http://amar.maj.ir/portal.
14. Maheshwari, S., Rashid, A. & Tyagi, A. (1982). Haploids from pollen grains--retrospect and prospect. *American Journal of Botany*, 865-879.
15. Organization, F. A. A. (2015). Statistical Yearbook of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, from UN Food and Agriculture Organization: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx.
16. Sauton, A. & Dumas de Vaulx, R. (1988). Doubled haploid production in melon (Cucumis melo L.). *Proc Eucarpia Meetg on Cucurbitaceae, Avignon-Monfavet, France*, 119-128.
17. Song, H., Lou, Q.-F., Luo, X.-D., Wolukau, J. N., Diao, W.-P., Qian, C.-T. & Chen, J.-F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, 245-254.
18. Suprunova, T., Shmykova, N. & Pitrat, M. (2008). In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*.
19. Zhang, B., Tolstikov, V., Turnbull, C., Hicks, L. M. & Fiehn, O. (2010). Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 107, 13532-13537.