Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 99-108

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۱۰۸-۹۹)

تولید گیاهان هاپلوئید *Cucurbita pepo* L. از طریق القای بکرزایی توسط گرده‌های پرتوتابی شده با اشعه گاما

حامد ابراهیم زاده[۱]*، محمود لطفی[۲]، شیوا عزیزی‌نیا[۳] و فرنگیس قنواتی[۴]
۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ۲، ۳، دانشیار و استادیار، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۴، استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۵ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Production of Haploids in *Cucurbita pepo* L. through Parthenogenesis Induced by Gamma-Irradiated Pollen

H. EBRAHIMZADEH[1]*, M. LOTFI[2], SH. AZIZINIA[3] AND F. GHANAVATI[4]
1, M.Sc., Abouraihan Campus, Tehran University, Pakdasht, Iran; 2, 3, Associate Professor, and Assistant Professor Abouraihan Campus, Tehran University, Pakdasht, Iran; 4, Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
(Received: May 26, 2013- Accepted: August 26, 2013)

چکیده

در پژوهش حاضر تولید گیاهان هاپلوئید در کدو از طریق القای رویان‌های بکرزا مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور گل‌های ماده توسط بساک‌های پرتوتابی‌شده با دزهای مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری) اشعه گاما گرده‌افشانی شدند. جنین‌های القاءشده سه تا پنج هفته پس از گرده‌افشانی نجات داده شده و در محیط اختصاصی E20 کشت شدند. طبق نتایج تحقیق بیشترین تعداد جنین از دزهای ۵۰ و ۷۵ گری اشعه گاما به‌دست آمد که ۸۲٪ از کل جنین‌های حاصله را در بر می‌گرفت و این درحالی بود که هیچ جنینی در دز ۲۰۰ گری به‌دست نیامد. باززایی و تولید گیاهان هاپلوئید به‌شدت تحت تأثیر شدت دز اشعه گاما، تیپ و مرحله جنینی بود. بیشترین باززایی و تولید گیاه هاپلوئید مربوط به دز ۵۰ گری بود که با ۲۷ گیاه باززا شده و تولید ۱۱ گیاه هاپلوئید اختلاف معنی‌داری را با سایر دزها درسطح ۵٪ از خود نشان داد. جنین‌های بی‌شکل فقط گیاه دیپلوئید تولید کردند؛ درحالی‌که به‌ترتیب ۲۹/۱۷، ۳۳/۳۳، ۵۷/۱۴، ۶۶/۶۷، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد از گیاهان به‌دست‌آمده از جنین‌های لپه‌ای، قلبی، اژدری، نوک‌پیکانی، نوک‌اژدری و کروی هاپلوئید بودند. به‌طور کلی در طول مطالعه از ۷۷۴۴ بذر استخراجی، ۱۲۷ جنین و ۴۴ گیاه کامل به‌دست آمد؛ که از این میان هاپلوئیدی ۱۷ گیاه توسط فلوسایتومتری و شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه و همچنین بررسی خصوصیات موفولوژیکی تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: شمارش کلروپلاست، مراحل جنینی، لاین، *Cucurbita pepo* L.

Abstract

Production of haploid plants was studied in summer squash *via* induction of parthenogenic embryos. Female flowers were pollinated with anthers irradiated by different doses of gamma ray (25, 50, 75, 100 and 200 Gray) and induced embryos were rescued and cultured in specific medium. The results achieved showed that the highest number of embryos was obtained in 50 and 75 Gray doses (82%), however, no embryo was produced at 200 Gray. Gamma ray doses and embryo stage had significant effect on frequency of embryo and plant regeneration. Highest embryo regeneration and haploid formation (27 plant regeneration and 11 haploids formation, respectively) were recorded at 50 Gray. All amorphous embryos produced only diploid plant, though 29.17, 33.33, 57.14, 66.67, 100 and 100 percent of plants derived from cotyledon, heart, torpedo, arrow-tip, torpedo-tip and globular embryos respectively, were haploid. Based on this study, out of the 7744 extracted seeds, 127 embryos and 44 plants were regenerated; among those 17 plants were identified as haploid plants using chloroplast counting, Flow-Cytometry technique and morphologic traits evaluations.

Keywords: Chloroplast counting, Embryo stage, Line, *Cucurbita pepo* L.

نویسنده مسئول: حامد ابراهیم‌زاده
E-mail: ebrahimzadeh.h@ut.ac.ir

مقدمه

کدو با نام علمی *Cucurbita pepo* L. متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) می‌باشد. گیاهان این خانواده از نظر ترکیبات شیمیایی دارای تری‌ترپن‌های تتراسیکلیک، ساپونین‌ها، پروتئین‌ها، فیبرها، پلی‌ساکاریدها و موادمعدنی (آهن، روی، منگنز، مس و ...) هستند (Lazos. 1986). تاکنون آثار فارماکولوژیکی زیادی از قبیل ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان، پایین‌آورنده چربی خون، ضدسنگ مثانه و ضد دیابتی در مورد گونه‌های مختلف کدو گزارش شده است (Caili *et al.*, 2006; Xia and Wang. 2006). کدو و دانه آن حاوی درصد زیادی چربی‌های غیراشباع، پروتئین و همچنین ویتامین‌های A، E، تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌ها مثل توکوفرول‌های چربی‌دوست و ترکیبات قطبی می‌باشند (Fruhwirth and Hermetter. 2007). دانه‌های این گیاه علاوه بر اسیدهای چرب (شامل لینولئیک اسید، اولئیک اسید، پالمیتیک اسید و استئاریک اسید) حاوی ترکیبات فنولی نیز می‌باشند (Xanthopoulou *et al.*, 2009).

تولید لاین‌های هموزیگوت اغلب به‌عنوان اولین گام در بهبود ژنتیکی محصولات گیاهی در نظر گرفته می‌شود و می‌توان از آن‌ها به‌طور مستقیم برای تولید هیبرید، ارقام مصنوعی و ارقام جدید استفاده نمود. در یک برنامه اصلاحی لاین‌های خالص پس از چندین نسل خودگشنی به‌دست می‌آیند که باز هم صد در صد هموزیگوت نخواهند بود (Germana. 2006). هاپلوئید و هاپلوئیدهای دوبرابر شده (دابل‌هاپلوئیدها) نقش مهمی را در اصلاح گیاهان از طریق کوتاه‌کردن زمان مورد نیاز برای تولید گیاهان هموزیگوت بازی می‌کنند. این هاپلوئیدها را می‌توان از طریق روش‌های آندروژنز، ژینوژنز یا پارتنوژنز به‌دست آورد (Germana. 2011; Chen *et al.*, 2011).

پرتوتابی دانه گرده (اشعه ماورای بنفش UV، اشعه گاما γ و اشعه ایکس X) گسترده‌ترین روش مورد استفاده برای القای بکرزایی در گیاهان هاپلوئید می‌باشد. اشعه گاما به‌دلیل کاربرد آسان، نفوذ خوب، تکرارپذیری، فراوانی بالای جهش و پایین‌بودن مشکلات مخرب آن به‌طور معمول در برنامه‌های هاپلوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chahal and Gosal. 2002). بکرزایی از طریق گرده‌افشانی با دانه‌گرده پرتودیده برای اولین بار با کشت‌جنین در گونه‌های مختلف توتون مورد استفاده قرار گرفت (Pandey and Phung. 1982).

گرده پرتودیده می‌تواند روی کلاله جوانه زده، به درون خامه نفوذ کرده و به کیسه جنینی برسد، اما نمی‌تواند تخمک سلول و هسته‌های قطبی را بارور کند (Cuny. 1992) و در نتیجه باعث تحریک بکرزایی یا توسعه میوه‌های پارتنوکارپ می‌گردد. بذرهای حاصله جهت نجات جنین‌های هاپلوئید مورد بازبینی قرار می‌گیرند. تأیید هاپلوئیدبودن گیاهان حاصله و منشاء ژنتیکی آن‌ها می‌باید با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد (Sauton and Dumas de Vaulx. 1987; Kurtar and Balkaya. 2010).

تکنیک پرتوتابی گرده، روشی مؤثر برای القای جنین‌های هاپلوئید در *Cucurbita pepo* L. است (Kurtar and Balkaya. 2010). القای جنین و تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از این روش توسط محققان دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته و موفقیت‌آمیز بودن آن در هندوانه (Gursoz *et al.*, 1991; Sari *et al.*, 1994)، خربزه (Sauton and Dumas de Vaulx. 1987; Sari *et al.*, 1992; Sauton. 1989; Lotfi *et al.*, 2003)، خیار (Lotfi *et al.*, 1999; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2006)، کدو خورشتی (Kurtar *et al.*, 2002)، کدو حلوایی (Kurtar *et al.*, 2009)، کدو تنبل (Kurtar and Balkaya. 2010) و اسپ ملون (Godbole and Murthy. 2012) و بسیاری از محصولات دیگر گزارش شده است.

در این تحقیق از روش القای بکرزایی برای به‌دست‌آوردن لاین‌های خالص *Cucurbita pepo* L. استفاده گردید. این روش دارای مزایایی از جمله عدم‌نیاز به پیش تیمارهای مختلف، پایداری کروموزومی بالاتر، عدم تولید آلبینو نسبت به کشت بساک و میکروسپور است. این تحقیق با هدف بررسی امکان القای تولید جنین‌های هاپلوئید در کدو از طریق گرده‌افشانی با دانه‌های گرده پرتوتابی‌شده توسط اشعه گاما، بررسی مراحل مختلف جنینی و تعیین دز مناسب پرتوتابی جهت تولید گیاهان هاپلوئید به‌عنوان دست‌مایه خالص‌سازی و اصلاح سریع کدو انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور کدوی هیبرید EZRA تهیه‌شده از شرکت نیکرسون[1] هلند نیمه اول فروردین ماه ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و در سینی‌های کشت حاوی مخلوطی از پیت و پرلیت به نسبت ۶۰:۴۰ کشت شدند. پس از رشد گیاهچه‌های بذری و رسیدن

1. Nickerson-Zwaan

به مرحله دو تا چهار برگ حقیقی در اوایل اردیبهشت ماه، نشاءها به گلخانه انتقال یافته و با فاصله ۱۵۰×۴۰ سانتی‌متر به‌صورت ردیفی در زمین کشت شدند. گیاهان یک روز در میان از طریق آبیاری قطره‌ای سیراب می‌شدند و موادغذایی به‌صورت محلول هر دو هفته یک بار همراه با آب آبیاری در اختیارشان قرار می‌گرفت. محافظت گیاهان با استفاده از کاربرد حشره‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها به‌صورت منظم در طول فصل رشد انجام گرفت.

پرتوتابی و گرده‌افشانی: گل‌های نر یک روز قبل از بازشدن در ساعات ۸–۷ صبح با توجه به رنگ سبز مایل به زردشان شناسایی و جمع‌آوری شدند. بساک‌ها پس از جداکردن گلبرگ و کاسبرگ گل‌ها همراه با میله جدا شده و به‌طور مساوی برای هر دز در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای (به قطر ۱۰ و ارتفاع ۲ سانتی‌متر) قرار گرفتند. نمونه‌ها با دزهای ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری اشعه گاما توسط منبع کبالت ۶۰ با قدرت اکتیویته ۱۸۰۰ کوری و نرخ دز ۲/. گری در ثانیه در پژوهشکده کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج پرتوتابی شدند. همزمان با جمع‌آوری گل‌های نر، جوانه‌های گل‌های ماده نیز حداکثر تا غروب همان روز برای جلوگیری از دریافت گرده‌های ناخواسته با پاکت‌های کاغذی مخصوص (۱۵×۱۰ cm) پوشانده شدند. ساعت ۱۰–۸ صبح روز بعد که کلاله‌ها آمادگی کافی برای پذیرش دانه‌گرده را داشتند عمل گرده‌افشانی با بساک‌های پرتوتابی‌شده که به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شده بودند، انجام شد. گل‌های ماده سپس مجدداً توسط پاکت‌های ایزوله پوشانده شدند تا از گرده‌افشانی ناخواسته آن‌ها توسط حشرات و باد ممانعت شود. پاکت‌های ایزوله ۴–۳ روز پس از گرده‌افشانی حذف شدند (Ebrahimzadeh *et al.*, 2013).

نجات جنین: میوه‌های رشد کرده ۵–۳ هفته پس از گرده‌افشانی برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی میوه‌ها، ضدعفونی آن‌ها با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه و سپس با آتش اتانول انجام گرفت (Kurtar and Balkaya. 2010). علاوه بر این پس از شکافتن میوه، بذرها مجدداً جهت ضدعفونی به‌مدت ۱۲ دقیقه در محلول حاوی ۵٪ هیپوکلریت‌سدیم قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰–۵ دقیقه در آب‌مقطر استریل غوطه‌ور شده و در نهایت سه مرتبه با آب‌مقطر استریل شسته شدند (Lotfi and Salehi. 2008). جنین‌های استخراج‌شده در محیط اختصاصی E20، (Sauton and Dumas de Vaulx. 1987)، همراه با ۲٪ ساکارز و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک‌اسید (IAA) کشت داده شدند. جنین‌ها با توجه به شکل و مرحله تکامل طبقه‌بندی شدند (Godbole and Murthy. 2012; Kurtar and Balkaya. 2010; Raghavan. 1989) و پس از آن در اتاق رشد با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت دوره نوری (۳۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند. یک تا سه هفته پس از کشت، جنین‌های (گیاهچه‌های) رشد کرده به‌صورت جداگانه برای رشد بیشتر به ظروف کشت مخصوص با درب‌های شفاف (به قطر ۷ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت تازه E20 انتقال یافتند.

سازگارکردن گیاهان: گیاهچه‌های به‌دست‌آمده با توجه به سرعت رشدشان ۵۰–۳۰ روز بعد از کشت در محیط کشت تازه، به‌تدریج تحت فرآیند سازگاری قرار گرفتند. گیاهچه‌های رشدکرده از محیط کشت خارج شدند و ریشه‌های آن‌ها به‌طور کامل در زیر آب شسته شده، به لیوان‌های حاوی مخلوطی از ورمیکولیت، پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ منتقل شدند و برای چند روز در شرایط قبلی اتاق رشد نگهداری شدند. جهت حفظ رطوبت یک لیوان شفاف بر روی هر کدام از لیوان‌هایی که گیاهان در آن‌ها کشت شده بودند قرار گرفت. سپس گیاهان به یکی از گلخانه‌های تحقیقاتی پردیس ابوریحان با دمای ۵±۲۸ و دوره نوری ۱۶ ساعت (۶۰۰۰ لوکس) منتقل شدند. لیوان‌های شفاف به تدریج سوراخ می‌شدند و در طول ۱۰ روز به‌طور کامل برداشته شدند. ۴–۳ هفته پس از سازگاری و رشد مناسب، گیاهان به گلدان حاوی خاک باغچه، پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ انتقال داده شدند تا بیشتر با شرایط واقعی رشد تطبیق پیدا کنند. همچنین پس از رشد و گلدهی، گیاهان هاپلوئید سازگار شده و گیاهان دیپلوئید بذری به‌صورت مصنوعی گرده‌افشانی شدند.

تعیین سطح پلوئیدی: تعیین سطح پلوئیدی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده با تعیین اندازه ژنوم با استفاده از فلوسایتومتری و شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه و برخی خصوصیات مورفولوژیکی دیگر انجام شد. برای شمارش سلول‌های نگهبان روزنه، قطعه‌ای کوچک از اپیدرم سطح زیرین برگ‌های تازه و طبیعی هر لاین به‌وسیله تیغه اسکالپل جدا شده و پس از قرارگرفتن بر روی لام به‌وسیله لوگول رنگ‌آمیزی شد. سپس لامل را بر روی آن قرار داده و در زیر میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل X21 با بزرگنمایی ۴۰X و ۱۰۰X، تعداد کلروپلاست‌ها شمارش و میانگین آن‌ها در ۲۰ جفت سلول نگهبان روزنه برای هر لاین تعیین شد (Ghanavati *et al.*, 2011).

برای اطمینان از هاپلوئیدبودن گیاهان به‌دست‌آمده از

جنین‌های القاءشده و همچنین تأیید روش شمارش کلروپلاست سلول‌های نگهبان روزنه در برآورد سطح پلوئیدی گیاهان، نمونه‌هایی از گیاهان هاپلوئید احتمالی و نیز گیاهان حاصل از رشد بذور دیپلوئید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مدل PA-1 ساخت شرکت پارتک آلمان مورد بررسی قرار گرفتند. استفاده از فلوسایتومتری جهت تعیین سطح پلوئیدی به‌عنوان یک روش سریع و مطمئن گزارش شده است (Dolezˇel *et al.*, 2007; Grewal *et al.*, 2009; Ochatt *et al.*, 2011).

همچنین در طول مراحل مختلف رشد و نمو، طول و عرض برگ اندازه‌گیری شد و تفاوت گل‌ها و بساک‌های گیاهان هاپلوئید با گیاهان دیپلوئید شاهد مورد بررسی قرار گرفت (Kurtar *et al.*, 2002).

طرح آماری

تجزیه داده‌های آزمایش با استفاده نرم‌افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین‌ها براساس روش چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

القای جنین: در مجموع از ۱۰ میوه، ۷۷۴۴ بذر و ۱۲۷ جنین به‌دست آمد. بالاترین تعداد جنین به‌دست‌آمده مربوط به دزهای ۵۰ و ۷۵ گری اشعه گاما بود که ۸۲٪ از کل جنین‌های حاصله را در بر می‌گرفتند و این درحالی بود که هیچ جنینی در دز ۲۰۰ گری به‌دست نیامد (جدول ۱). از سوی دیگر القای جنین هاپلوئید در گیاهان مختلف مانند هندوانه (Sari *et al.*, 1994)، خربزه (Sauton and Dumas, de Vaulx 1987; Sari *et al.*, 1992; Abak *et al* 1996; Lotfi *et al.*, 2003)، خیار (Sauton 1989; Lotfi *et al.*, 1999; Dolcet-Sanjuan *et al.*,2006; Lotfi and Salehi, 2008) و اسپ ملون (Godbole and Murthy. 2012) با دزهای بالاتر در حدود ۳۰۰-۲۰۰ گری اشعه گاما گزارش شده است. البته در گزارشات قبلی از همین گیاه دزهای ۲۵ و ۵۰ گری برای کدو خورشتی (Kurtar *et al.*, 2002)، دز ۵۰ و ۱۰۰ گری برای کدو حلوایی (Kurtar *et al.*, 2009) و کدوی تنبل (Kurtar and Balkaya. 2010) و دز ۱۵۰ گری برای کدوی تخمه کاغذی (Berber *et al.*, 2010) گزارش شده است که تا حد زیادی به نتایج حاضر نزدیک می‌باشند. به گزارش Shridhar (1992)، Jain *et al.*, (1996) یک رابطه خطی منفی بین قطر دانه گرده و مقاومت در برابر اشعه وجود دارد که تابعی از مقدار DNA در هسته می‌باشد. در نتیجه به‌نظر می‌رسد گیاه کدو که دارای بزرگترین دانه‌گرده در گونه سبزیجات است (قطر متوسط ۱۸۰µm) دارای مقاومت کمتری نسبت به دزهای بالای اشعه می‌باشد.

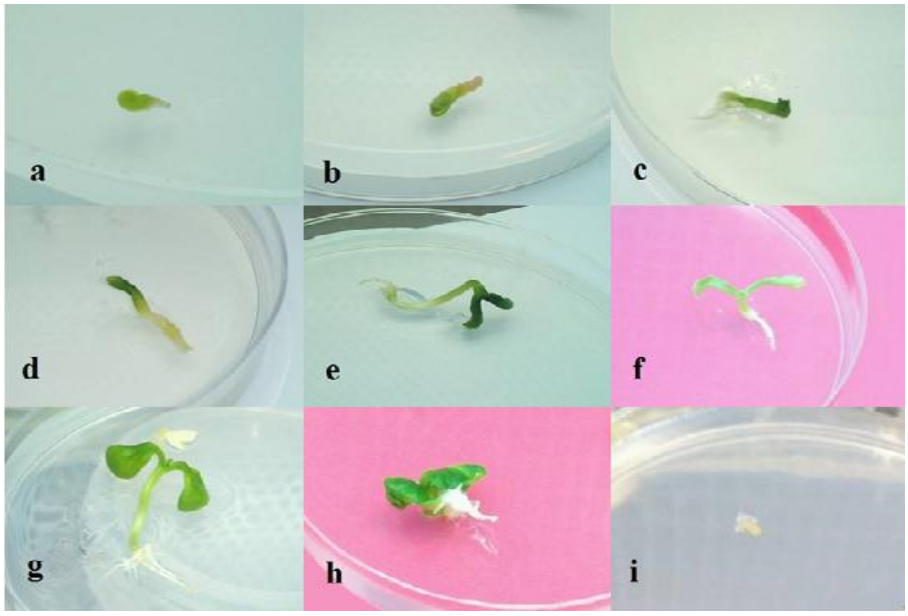
جدول ۱- تعداد بذر و جنین حاصل از کدوی خورشتی گرده‌افشانی‌شده با گرده‌های پرتوتابی‌شده با دزهای مختلف

دز	تعداد میوه	تعداد دانه	تعداد جنین	میانگین جنین*	فراوانی جنین در هر دز
۲۵	۲	۱۶۶۳	۱۸	۹[b]	٪۱۴/۱۷
۵۰	۲	۱۱۴۵	۵۴	۲۷[a]	٪۴۲/۵۲
۷۵	۲	۱۳۸۹	۵۱	۲۵/۵[a]	٪۴۰/۱۶
۱۰۰	۲	۱۷۹۸	۴	۲[b]	٪۳/۱۵
۲۰۰	۲	۱۷۴۹	۰	۰[b]	٪۰/۰۰
کل	۱۰	۷۷۴۴	۱۲۷	۱۲/۷	٪۱۰۰

* حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

باززایی گیاهان: به‌طور کلی ۴۴ گیاه از ۱۲۷ جنین با فراوانی ۳۴/۶۴٪ باززایی شد (شکل ۱). بیشترین باززایی مربوط به دز ۵۰ گری بود که با ۲۷ گیاه باززا شده نسبت به سایر دزها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ از خود نشان داد. تعداد جنین‌های نکروزه بسیار محدود و کمتر از ۵٪ بود که با توجه به بررسی Kurtar and Balkaya (2010) که از مجموع ۶۸۶ جنین نجات داده شده، ۳۷۹ جنین نکروزه بوده و علت آن تأخیر در زمان برداشت (۶-۵ هفته پس از گرده‌افشانی) اعلام شده بود، دلیل درصد بالای باززایی در آزمایش حاضر می‌تواند به‌دلیل زمان مناسب گرده‌افشانی در خرداد ماه و برداشت به موقع پس از ۵-۳ هفته باشد. باززایی گیاهان همچنین به‌شدت تحت تأثیر تیپ و مرحله رشدی جنین‌ها قرار داشت (جدول ۲). در بسیاری از گزارشات بیشترین میزان باززایی گیاه در کدو تنبل (Kurtar & Balkaya. 2010؛ ۶۶/۷۵٪)، خیار (Caglar and Abak. 1999، ۸۱/۸٪) و اسپ ملون (Godbole and Murthy.

2012؛ ۱۱/۷۵٪) مربوط به جنین‌های لپه‌ای بوده است. در این تحقیق نیز جنین‌های لپه‌ای، قلبی و اژدری به‌ترتیب با ۶۰٪، ۴۲/۸۶٪ و ۳۶/۸۴٪ بیشترین میزان باززایی را به خود اختصاص دادند و جنین‌های نکروزه و شلاقی موفق به هیچ‌گونه باززایی نشدند. در اولین مطالعه‌ای که در رابطه با کدو خورشتی انجام شده، بیشترین میزان باززایی با اندکی اختلاف مربوط به جنین‌های قلبی (۴۴/۴٪)، لپه‌ای (۳۱/۳٪) و اژدری (۳۱/۳٪) بوده است (Kurtar *et al.*, 2002). در گزارشات مربوط به کدو تنبل میزان کل باززایی ۱۵٪ و در مراحل مختلف جنینی ۵۸/۹٪ در لپه، ۳۱/۳٪ در نوک پیکانی، ۲۸/۶٪ در اژدر و ۱۶٪ در پیش لپه گزارش شده است و این در حالی است که از جنین‌های کروی و قلبی هیچ باززایی گزارش نشده است (Kurtar and Balkaya. 2010). بنابراین موفقیت نجات جنین بستگی به مرحله رشدی جنین و نوع محیط کشت دارد که توسط Jaskani *et al.*, (2005) نیز تأیید شده است.



شکل ۱- جنین‌های باززا شده از مراحل مختلف جنینی

a. کروی b. نوک پیکانی c. نوک اژدری d. شلاقی e. قلبی f. اژدری g. لپه‌ای h. بی‌شکل i. نکروزه

جدول ۲- تعداد گیاهان باززایی شده در دزها و مراحل مختلف جنینی *Cucurbita pepo* L.

دز اشعه گاما	۲۵		۵۰		۷۵		۱۰۰		۲۰۰		کل	
مراحل جنینی	جنین	گیاه	جنین	گیاه	جنین	گیاه	جنین	گیاه	جنین	گیاه	جنین	گیاه	نسبت گیاه به جنین
کروی	۲	۱	۷	۰	۸	۰	۲	۰	۰	۰	۱۹	۱	٪۵/۲۶
نوک‌پیکانی	۰	۰	۱	۳	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	۳	٪۳۰/۰۰
نوک‌اژدری	۰	۰	۳	۱	۶	۰	۰	۰	۰	۰	۹	۱	٪۱۱/۱۱
شلاقی	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	٪۰/۰۰
قلبی	۰	۰	۹	۵	۵	۱	۰	۰	۰	۰	۱۴	۶	٪۴۲/۸۶
اژدری	۰	۰	۱۱	۲	۸	۵	۰	۰	۰	۰	۱۹	۷	٪۳۶/۸۴
لپه	۱۶	۸	۱۶	۱۴	۶	۲	۲	۰	۰	۰	۴۰	۲۴	٪۶۰/۰۰
بی‌شکل	۰	۰	۶	۲	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۹	۲	٪۲۲/۲۲
نکروزه	۰	۰	۰	۰	۶	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۰	٪۰/۰۰
کل	۱۸	۹	۵۴	۲۷	۵۱	۸	۴	۰	۰	۰	۱۲۷	۴۴	٪۳۴/۶۵

فراوانی گیاهان هاپلوئید: فراوانی گیاهان هاپلوئید نیز تحت تأثیر تیپ و مرحله جنینی قرار داشت. در مجموع ۱۷ گیاه هاپلوئید از مجموع کل گیاهان باززایی‌شده از دزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ گری اشعه گاما به‌دست آمد که بیشترین آن‌ها مربوط به دز ۵۰ گری بود که ۶۴/۷۱ درصد از کل هاپلوئیدهای به‌دست آمده را به خود اختصاص داد (جدول ۳).

تمام جنین‌های بی‌شکل به گیاهان دیپلوئید تبدیل شدند. جنین‌های لپه‌ای، قلبی، اژدری، نوک پیکانی، نوک اژدری و کروی به‌ترتیب ۲۹/۱۷، ۳۳/۳۳، ۵۷/۱۴، ۶۶/۶۷، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد هاپلوئیدی را از خود نشان دادند.

به‌طورکلی فراوانی گیاهان هاپلوئید در هر میوه، ۱۰۰ دانه، ۱۰۰ جنین و ۱۰۰ گیاه به‌ترتیب ۱/۷، ۰/۲۲، ۱۳/۳۹ و ۳۸/۶۴ عدد تعیین شد (جدول ۴). فراوانی گیاهان هاپلوئید به‌دست‌آمده از کدو تنبل نیز در هر میوه، ۱۰۰ دانه، ۱۰۰جنین و ۱۰۰ گیاه به‌ترتیب ۰/۲۸، ۰/۱۱، ۱/۱۷ و ۱۰/۹۶ (Kurtar and Balkaya. 2010) گزارش شده است.

جدول ۳- فراوانی گیاهان هاپلوئید *Cucurbita pepo* L. در مراحل مختلف جنینی

مراحل جنینی	جنین	گیاهان باززا شده	گیاه هاپلوئید	فراوانی هاپلوئیدی
کروی	۱۹	۱	۱	٪۱۰۰
نوک‌پیکانی	۱۰	۳	۲	٪۶۶/۶۷
نوک‌اژدری	۹	۱	۱	٪۱۰۰
شلاقی	۱	۰	۰	٪۰/۰۰
قلبی	۱۴	۶	۲	٪۳۳/۳۳
اژدری	۱۹	۷	۴	٪۵۷/۱۴
لپه	۴۰	۲۴	۷	٪۲۹/۱۷
بی‌شکل	۹	۲	۰	٪۰/۰۰
نکروزه	۶	۰	۰	٪۰/۰۰
کل	۱۲۷	۴۴	۱۷	٪۳۸/۶۴

جدول ۴- فراوانی گیاهان هاپلوئید *Cucurbita pepo* L. در دزهای مختلف پرتوتابی

دز	میوه	دانه	جنین**	گیاه	گیاه هاپلوئید	هر میوه	۱۰۰ دانه	۱۰۰ جنین	۱۰۰ گیاه
۲۵	۲	۱۶۶۳	۱۸^{b}	۹^{b}	۳^{b}	۱/۵۰	۰/۱۸	۱۶/۶۷	۳۳/۳۳
۵۰	۲	۱۱۴۵	۵۴^{a}	۲۷^{a}	۱۱^{a}	۵/۵۰	۰/۹۶	۲۰/۳۷	۴۰/۷۴
۷۵	۲	۱۳۸۹	۵۱^{a}	۸^{b}	۳^{b}	۱/۵۰	۰/۲۲	۵/۸۸	۳۷/۵۰
۱۰۰	۲	۱۷۹۸	۴^{b}	۰^{b}	۰^{b}	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۲۰۰	۲	۱۷۴۹	۰^{b}	۰^{b}	۰^{b}	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
کل	۱۰	۷۷۴۴	۱۲۷	۴۴	۱۷	۱/۷۰	۰/۲۲	۱۳/۳۹	۳۸/۶۴

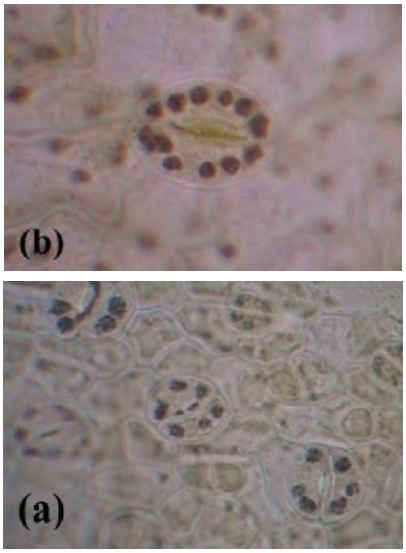
* حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین ها در سطح ۵ درصد می باشد.

** با توجه به اهمیت تعداد کل داده‌های به‌دست آمده نسبت به میانگین آن‌ها، در این جدول از جمع کل داده‌ها استفاده شده است.

تعیین سطح پلوئیدی

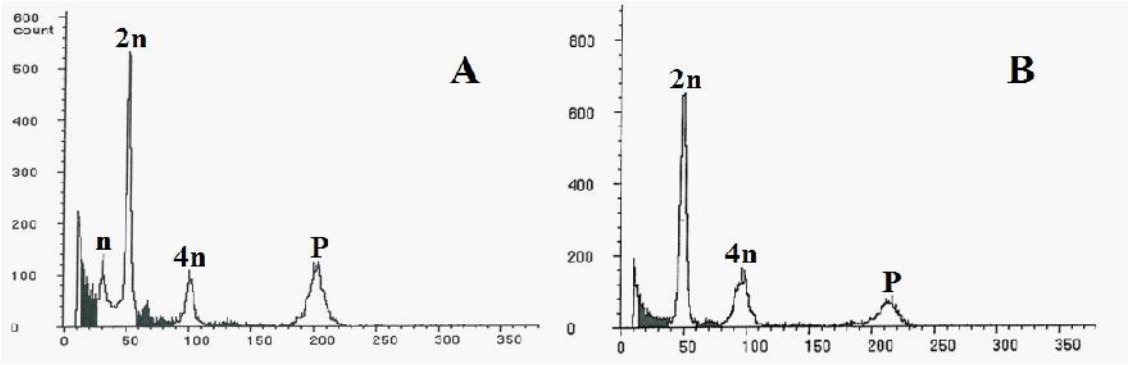
شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان

روزنه: شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه یک روش عملی و قابل اعتماد در تعیین سطح پلوئیدی کدو است (GUO Yong *et al.*, 2004). میانگین تعداد کلروپلاست‌های دو سلول نگهبان روزنه که روبروی هم قرار گرفته‌اند در گیاهان هاپلوئید ۶/۵۳ و در گیاهان دیپلوئید ۱۱/۱۶ بود که در گیاهان دیپلوئید حدوداً دو برابر گیاهان هاپلوئید می‌باشد. تحقیقات Yuan *et al.*, (2009) در کلم گودبال و مورسی در اسپ ملون Kurtar *et al.*, (2012) در کدو (2002 2009; 2010) نیز نتایج مشابهی را در برداشته است. به این ترتیب روش شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه می‌تواند روش جایگزین مناسبی برای تعیین سطح پلوئیدی کدو باشد (شکل ۲، جدول ۵).



شکل ۲- تعداد کلروپلاست‌های موجود در سلول‌های نگهبان روزنه (a) هاپلوئید (b) دیپلوئید

فلوسایتومتری: نتایج تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری، گیاهان هاپلوئید را براساس غلظت DNA نسبت به گیاهان دیپلوئید متمایز کرد (شکل ۳). در یک دهه اخیر استفاده از فلوسایتومتری به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی گیاهان به‌دست آمده از آزمایشات هاپلوئیدی و پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک روش قابل اعتماد گزارش شده است (Dolezˇel *et al.*, 2007; Grewal *et al.*, 2009; Godbole and Murthy. 2012; Ochatt *et al.*, 2011).



شکل ۳- هیستوگرام فلوسایتومتری بافت برگ کدو به همراه گیاه استاندارد جعفری (P). (A) هاپلوئید (B) دیپلوئید

خصوصیات مورفولوژیکی: مقایسه برخی خصوصیات مورفولوژیکی در جدول ۵ ارائه شده است. در گیاهان هاپلوئید گل‌های نر و ماده بسیار کوچکتر از گیاهان دیپلوئید بوده و گل‌های نر هیچ گرده‌ای تولید نکردند. همچنین گلبرگ‌های آن‌ها در انتهای جام به یکدیگر چسبیده نبودند که این شواهد با نتایج مطالعات Sauton (1989) کاملاً مطابقت دارد (شکل ۴). گل‌های ماده گیاهان هاپلوئید با وجود انجام گرده‌افشانی توسط گرده گیاهان طبیعی هیچ میوه‌ای تشکیل ندادند. ابعاد برگ‌ها نیز در گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.

جدول ۵- مشخصات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاهان

خصوصیات	سطح پلوئیدی	
	هاپلوئید (n)	دیپلوئید (۲n)
گرده	ندارد	دارد
میوه‌دهی	ندارد	دارد
کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان	۶/۵۳[a]	۱۱/۱۶[b]
طول برگ (سانتی‌متر)	۱۹/۳۳[a]	۳۸/۱۶[b]
عرض برگ (سانتی‌متر)	۱۸/۹[a]	۳۶/۸۲[b]
شاخص برگ	۱/۰۲	۱/۰۳

* حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

شکل ۴- مقایسه گیاهان هاپلوئید (سمت راست) و دیپلوئید (سمت چپ) به‌دست‌آمده از جنین‌های القایی در شرایط گلخانه‌ای و گل‌های آن‌ها یک روز قبل از شکوفایی

نتیجه‌گیری کلی

تولید هاپلوئید کدوی خورشتی با استفاده از تکنیک گرده‌های پرتوتابی‌شده برای دومین بار در جهان و اولین بار در ایران طی این پژوهش انجام شد که خود می‌تواند در بومی‌سازی این فناوری مخصوصاً برای گیاهان زراعی و باغی کشور مفید واقع شود. مناسب‌ترین دز برای القای هاپلوئید در کدوی خورشتی شدت دز ۵۰ گری می‌باشد. همچنین از آن‌جایی‌که دز ۲۰۰ گری تقریباً هیچ بذر پری تولید نکرد؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که این دز بسیار بالاتر از دز مناسب برای القای هاپلوئیدی بوده و به احتمال زیاد دز کشنده یا نزدیک به آن می‌باشد. بیشترین درصد هاپلوئیدی از مراحل اولیه جنینی، یعنی اشکال کروی، نوک‌پیکانی و نوک‌اژدری به‌دست می‌آید که غالباً دارای کمترین باززایی می‌باشند؛ لذا در صورت یافتن پروتوکل مناسب جهت افزایش قدرت باززایی این جنین‌ها، می‌توان فراوانی تولید گیاهان هاپلوئید به‌دست‌آمده را به میزان چشمگیری افزایش داد. روش شمارش کلروپلاست‌های نگهبان روزنه، روشی مطمئن، ساده و کم‌هزینه نسبت به سایر روش‌ها می‌باشد و می‌توان جهت تعیین سطح پلوئیدی کدو از آن استفاده کرد.

سپاسگزاری

از گروه باغبانی پردیس ابوریحان (دانشگاه تهران)، پژوهشکده کشاورزی و پزشکی هسته‌ای و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به‌دلیل فراهم‌آوردن امکانات این پروژه و همچنین از همکاری و راهنمایی جناب آقای دکتر مهران عنایتی شریعت‌پناهی و آقای هادی فتح‌الهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abak K, Sari N, Paksoy M, Yılmaz H, Aktas H, Tunalı C (1996) Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollen in melon, obtaining of dihaploid lines, determination of haploid plants by different techniques. Turk. J. Agric. For. 20: 425-430.

Berber M, Yildiz M, Abak K (2010) Effects of irradiation doses on haploid embryo and plant production in naked and shelled seed pumpkins. International Symposium on Genomics and Genetic Transformation of Horticultural Crops. Lisbon, Portugal. pp. 381-384.

Caglar G, Abak K (1999) Progress in the production of haploid embryos, plants and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen, in Turkey. Acta Hortic. 492: 317-320.

Caili F, Huan S, Quanhong L (2006) A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plants Food Hum. Nutr. 61(8): 73-80.

Chahal GS, Gosal SS (2002) Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science, Oxford.

Chen JF, Cui L, Malik AA, Mbira KG (2011) *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 104: 311-319

Cuny F (1992) Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradie´ chez le melon (*Cucumis melo* L.) responses du pollen a` l'irradiation gamma. The`se de Docteur, Universite´ d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.

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

Dolezˇel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezˇel J, Greilhuber J, Suda J (eds) Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley, Weinheim. pp 41-65.

Ebrahimzadeh H, Mirzabe AH, Lotfi M, Azizinia S (2013) Gamma irradiation effects on physical properties of squash seeds. Agric Eng Int: CIGR Journal, 15(1): 131−138.

Fruhwirth GO, Hermetter A (2007) Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: components and biological activities. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109: 1128-1140.

Germana MA (2006) Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86: 131–146.

Germana MA (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 104:283-300.

Ghanavati F, Eskandari H, Bakhshi Khaniki G, Sorkhi B, Amirabadizadeh H (2011) Relationship Between the Chloroplast Number in Stomatal Guard Cells, Flow Cytometry and Ploidy Level in *Onobrychis spp*. Seed and Plant Improvement Journal. 27: 427- 439

Godbole M, Murthy HN (2012) Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. momordica). Plant Cell Tissue Organ Cult. 109: 167-170.

Grewal RK, Lulsdorf M, Croser J, Ochatt S, Vandenberg A, Warkentin TD (2009) Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments. Plant Cell Rep. 28: 1289-1299.

Gursoz N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas de Vaulx R (1991) Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetic Coop. 14: 109-110.

Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (1996) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer, Dordrecht.

Jaskani MJ, Khan IA, Khan MM (2005) Fruit set, seed development and embryo germination in interploid crosses of citrus. Sci. Hortic. 107: 51-57.

Kurtar ES, Balkaya A (2010) Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. Plant Cell Tissue Organ Cult. 102: 267-277.

Kurtar ES, Balkaya A, O¨zbakır M, Ofluoglu T (2009) Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). Afr. J. Bio. 8: 5944-5951.

Kurtar ES, Sari N, Abak K (2002) Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica. 127: 335-344.

Lazos ES (1986) Nutritional, Fatty acids and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. J. Food Sci. 51(5): 1382-1383.

Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED (2003) Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep. 21:1121-1128.

Lotfi M, Kashi A, Onsinejad R (1999) Induction of parthenogenetic embryos by irradiated pollen in cucumber. Acta Hort. 492: 323-328.

Lotfi M, Salehi S (2008) Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon, France.

Ochatt S, Patat-Ochatt EM, Moessner A (2011) Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104: 329-341.

Pandey KK, Phung M (1982) 'Hertwig Effect' in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. TAG Theoretical and Applied Genetics. 62(4): 295-300.

Raghavan V (1986) Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. Cambridge University Press, Cambridge.

Sari N, Abak K, Pitrat M, Dumas de Vaulx R (1992) Induction of parthenogenetic haploid embryos and plant obtention in melon (*Cucumis melo* L. var. inodorus Naud ve *C. melo* L. var. reticulatus Naud). Trans J. Agric. For. 16: 302-314.

Sari N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas de Vaulx R (1994) Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. Hort. Science. 29:1189-1190.

Sauton A (1989) Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetics Coop. 12: 22-23.

Sauton A, Dumas de Vaulx R (1987) Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogénèse induite par du pollen irradié. Agronomie. 7: 141-148.

Shridhar (1992) Pollen grains of cultivated Cucurbits. In: Proceedings of the 5th Eucarpia Cucurbitaceae Symp, July 27-31, Warsaw, Poland. pp 28–33.

Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S (2009) Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. Food Res. Int. 42: 641-646.

Xia T, Wang Q (2006) Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Fitoterapia. 77(7-8): 530-533.

Yong-qiang G, Jian-she W, Hui-ling Z, Cai-xiang W, Hai-zhen L, Min-hua C (2004) Study on Methods for Ploidy Determination in Regenerated Plant from Unpollinated Ovules of *Cucurbita pepo*. Acta Agriculturae Boreali-Sinica. HBNB.0.2004-03-020.

Yuan S, Liu Y, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Sun P (2009) Study on the Relationship Between the Ploidy Level of Microspore-Derived Plants and the Number of Chloroplast in Stomatal Guard Cells in *Brassica oleracea*. Agricultural Sciences in China. 8(8): 939-946.