Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
PSI
Phycological Society of Iran

Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) through induced parthenogenesis with gamma-irradiated pollen

Ahmad Mokari Khajehdizaj[1], Alireza Motellebi Azar[2*], Jaber Panahandeh Yengejeh [3]

[1]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: ahmadmokari@gmail.com
[2]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: motallebiazar@gmail.com
[3]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Emai: panahandeh@tabrizu.ac.ir

Article type:
Research article

Article history
Received: 02.12.2023
Revised:09.05.2024
Accepted: 14.06.2024
Published:21.12.2024

Keywords
Callus
Cucumis melo L.
Embryo rescue
Gamma radiation
Haploid
Parthenogenesis
Regeneration

Abstract

The production of doubled plants is an effective method for obtaining superior parent plants to produce F1 hybrid seeds. The first and most crucial step in this process is the production of haploid plants. Haploid plants can be generated using various techniques, including androgenesis, gynogenesis, and interspecific crosses. However, in cucurbits, parthenogenesis using pollen from irradiated sources has proven to be the most successful approach. In this study, we examined the effects of four doses of gamma irradiation and three pollination dates (June, July, and August 2021) on several factors, including pollen viability, successful pollination, callusing, regeneration, and the percentage of haploid plants in hybrid melon (Samsuri × Honeydew). Initially, hermaphrodite flowers were emasculated before anthesis and bagged to prevent unwanted pollination. Male flowers were collected shortly before anthesis and irradiated with gamma radiation at doses of 100, 200, 300, and 400 Gy. The irradiated pollens were then cultured in a liquid medium to assess pollen viability. Once the emasculated flowers were pollinated with the irradiated pollen, the resulting fruits were collected 3 to 5 weeks after pollination. Immature embryos from these fruits were rescued via *in vitro* culture. The explants produced callus and subsequently regenerated into full plantlets. When the new plantlets were obtained, root tips were used for chromosome counting. The results indicated that both the irradiation dose and pollination date significantly affected all parameters studied. The highest pollen viability, successful pollination, fruit set, and *in vitro* regeneration occurred at a gamma dose of 100 Gy and in June. As the gamma dose increased, the rates of these parameters decreased. However, the highest rate of callusing was observed at 200 Gy and in June. Chromosome counting revealed that some of the obtained plantlets were haploid, with the largest percentage of haploid plants produced at the 200 Gy dose.

Cite this article as: Mokari Khajehdizaj, A., Motellebi Azar, A.R., Panahandeh Yengejeh, J., (2023). Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) through induced parthenogenesis with gamma-irradiated pollen. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 19(4): 1-16.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: https://doi.org/10.71890/iper.2024.984484

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

تولید گیاهان هاپلوئید طالبی (*Cucumis melo* L.) از طریق بکرزایی تحریک شده با گرده پرتوتابی شده با اشعه گاما

احمد مکاری خواجه دیزج[۱]، علیرضا مطلبی آذر[۲*]، جابر پناهنده ینگجه[۳]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: ahmadmokari@gmail.com
[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: motallebiazar@gmail.com
[۳] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: panahandeh@tabrizu.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۵
تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۱۰/۰۱

واژه‌های کلیدی:
Cucumis melo L.
باززایی
بکرزایی
پرتو گاما
کالوس
نجات جنین
هاپلوئید

چکیده

تولید گیاهان دابل هاپلوئید یکی از مهم‌ترین ابزارها جهت به دست آوردن والدین برتر برای تولید بذر هیبرید F1 می‌باشد. روش گرده پرتوتابی شده موفق‌ترین روش تولید گیاهان هاپلوئید به منظور تولید گیاهان دابلدهاپلوئید در کدوئیان است. در این مطالعه، تاثیر مقدار پرتوتابی با گاما (٤ مقدار) و تاریخ گرده افشانی (تیر، مرداد و شهریور سال ۱٤۰۰) روی زیستایی گرده، موفقیت گرده‌افشانی، تشکیل میوه، کالوس‌زایی و باززایی و درصد تولید گیاهان هاپلوئید در هیبرید طالبی هانی دیو× سمسوری، از طریق گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده بررسی شد. ابتدا گل‌های دوجنسه قبل از باز شدن، اخته شده و کیسه گذاری شدند. گل‌های نر درست در مرحله قبل از باز شدن جمع‌آوری شدند و با چهار مقدار ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ گری اشعه گاما پرتوتابی شدند. از هر مقدار، نمونه گرده تهیه و در محیط مایع کشت شدند تا زیستایی دانه‌های گرده پرتوتابی بررسی شود. گل‌های اخته شده با گرده‌های پرتوتابی شده گرده‌افشانی و مجدداً کیسه‌گذاری شدند. میوه‌های به دست آمده، ۳ تا ۵ هفته بعد از گرده‌افشانی، برای هر مقدار شمارش و برداشت شدند. جنین‌های نارس داخل میوه‌ها با کشت درون شیشه‌ای نجات داده شدند. بعد از تولید کالوس، باززایی از کالوس انجام شد. از نوک ریشه گیاهچه‌های رشد یافته برای شمارش کروموزوم استفاده شد. نتایج نشان داد مقدار پرتوتابی و تاریخ گرده‌افشانی و اثر متقابل آنها تاثیر معنی‌داری روی زیستایی گرده، موفقیت گرده‌افشانی، تشکیل میوه، کالوس‌زایی و باززایی داشتند و ۱۰۰ گری بهترین مقدار و تیرماه بهترین زمان برای زیستایی گرده، موفقیت گرده‌افشانی و تشکیل میوه بودند؛ اما بیشترین کالوس‌زایی در ۲۰۰ گری و در تیرماه به دست آمد. مقدار پرتوتابی روی باززایی موثر بود و بیشترین باززایی در مقدار ۱۰۰ گری به دست آمد. هاپلوئید بودن گیاهچه‌ها،توسط شمارش کروموزوم تایید شد و درصد گیاهچه‌های هاپلوئید نشان داد که مقدار ۲۰۰ گری و تیرماه برای تولید گیاهان هاپلوئید بهترین بود.

استناد: مکاری خواجه دیزج، احمد؛ مطلبی آذر ، علیرضا؛ پناهنده ینگجه، جابر. (۱٤۰۳). تولید گیاهان هاپلوئید طالبی (*Cucumis melo* L.) از طریق بکرزایی تحریک شده با گرده پرتوتابی شده با اشعه گاما. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۹(٤)، ۱٦-۱.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
Doi: https://doi.org/10.71890/iper.2024.984484
© نویسندگان.

مقدمه

خانواده کدوئیان از مهم‌ترین منابع غذایی انسان بوده و از لحاظ اهمیت اقتصادی، پس از خانواده Solanaceae در رتبه دوم قرار دارد. از اقتصادی‌ترین محصولات این خانواده می‌توان به انواع طالبی (*Cucumis melo* L.) اشاره کرد؛ بنابراین اصلاح و بهبود آن همیشه مورد توجه اصلاحگران بوده است (Lebeda et al., 2007). امروزه، از واریته‌های هیبرید F_1 به دلیل مزایای برتر و عالی زراعی (بازده و کیفیت بالا، مقاوم یا متحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و سازگاری بالا) در تولید سبزی‌ها، در مقیاس گسترده‌ای استفاده می‌شود (Kesh and Kaushik, 2021). تولید سبزی‌های هیبرید، بدون استفاده از لاین‌های والدی هموزیگوت خالص (اینبرد) با صفات مشخص و ترکیب‌پذیری بالا غیرممکن است. این در حالی است که تولید لاین‌های اینبرد از طریق روش‌های سنتی، به زمان طولانی، زحمت زیاد و هزینه بالا نیاز دارد. رسیدن به واریته هیبرید F_1 از طریق روش‌های سنتی به‌ویژه در گیاهانی مانند کدوئیان که دارای دگرگرده‌افشانی بالایی هستند، به ۸ تا ۱۰ سال زمان نیاز دارد. تولید دابلدهاپلوئید[۱] یا هاپلوئید مضاعف شده از طریق پارتنوژنز، آندروژنز و ژینوژنز به روش‌های جایگزین برای روش‌های سنتی تبدیل شده‌اند و با استفاده از این روش‌ها می‌توان در عرض یک تا دو سال به لاین‌های اینبرد دست یافت (Kurtar et al., 2020).

از بین روش‌های تولید گیاهان دابلد هاپلوئید، کشت بساک، تخمک و تخمدان تلقیح نشده برای تولید گیاهان هاپلوئید در انواع محصولات جالیزی از جمله کدوئیان، موفقیت چندانی نداشته و موفق‌ترین روش در این خانواده‌ها، القاء جنین‌های پارتنوژنیک[۲] با استفاده از گرده‌های پرتوتابی شده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد (Gałązka and Niemirowicz-Szczytt, 2013). در حال حاضر، بررسی‌های مختلف، نشان داده‌اند که تکنیک گرده‌های پرتوتابی شده (با اشعه گاما، اشعه ایکس و یا فرابنفش) تکنیک موثری در تولید گیاهان هاپلوئید است (Baktemur et al., 2014).

از تکنیک گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده، در بسیاری از گونه‌های کدوئیان از جمله هندوانه، کدو، خیار و طالبی استفاده شده است. عوامل بسیاری روی درصد موفقیت این روش تاثیر دارند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: منبع پرتوتابی، مقدار پرتوتابی، ژنوتیپ گیاه دهنده و شرایط محیطی رشد آن، زمان و تکنیک‌های نجات جنین و محیط کشت باززایی گیاه از جنین. در طالبی از اشعه گاما، پرتو ایکس و سزیوم ۱۳۷(137Cs) استفاده می‌شود که طبق گزارش‌های انجام شده، اشعه گاما مناسب‌تر از بقیه بوده است (Dong, Zhao et al., 2016). اشعه گاما به خاطر کاربرد راحت، نفوذ خوب، اثربخشی بالا و خطرات کمتر در برنامه‌های تولید گیاهان هاپلوئید به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. گرده پرتوتابی شده از لحاظ ژنتیکی غیرفعال بوده و قادر به باروری سلول تخم نیست اما در سطح کلاله جوانه می‌زند که باعث تحریک تقسیم سلولی در سلول تخم می‌گردد و بنابراین باعث القا پارتنوژنز یا نمو میوه پارتنوکارپ می‌گردد (Baktemur et al., 2014). مقدار مناسب بسته به گونه متفاوت است. مقدار مناسب در خیار بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ گری، در طالبی بین ۱۵۰ تا ۲۵۰۰ گری، در کدوتنبل ۵۰ تا ۱۰۰ گری، کدو مسمایی ۲۵ تا ۱۵۰ گری و در هندوانه ۲۰۰ تا ۳۰۰ گری و در کدو زمستانه ۵۰ تا ۱۰۰ گری بسته به زمان انجام آزمایش و نوع رقم متفاوت بوده است (Dong et al., 2016). ژنوتیپ، تاثیر زیادی در تولید گیاهان هاپلوئید دارد.

۱- Doubled haploid

۲- Parthenogenetic embryos

گزارش شده است که گیاهان هیبرید در مقایسه با لاین‌های اینبرد، نتیجه بهتری در تولید گیاهان هاپلوئید به همراه داشته است. فصل انجام گرده‌افشانی نیز موثر بوده است؛ به‌طوری که در خیار، تعداد گیاهان هاپلوئید به دست آمده در گرده‌افشانی در تابستان بالاتر از زمستان و بهار بود. در کدوی مسمایی تعداد جنین هاپلوئید در میوه در ماه‌های شهریور و تیرماه بالاتر از سایر ماه‌ها بود. در کدوئیان، بهترین زمان برای نجات جنین، ۳ تا ۵ هفته بعد از گرده‌افشانی است و چنانچه جنین‌ها در مرحله قلبی شکل یا لپه‌ای باشند، نجات جنین موفق‌تر خواهد بود. برای نجات جنین از سه نوع محیط کشت MS، CP و E20A استفاده شده است که محیط E20A متداول‌ترین محیط است؛ اما در یک مطالعه، هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری بین این سه محیط مشاهده نشده است (Asadi et al., 2019). همچنین هرچه تعداد گرده مورد استفاده در گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی بیشتر باشد، امکان تحریک و تشکیل جنین هاپلوئید بیشتر می‌گردد (Dong Zhao et al., 2016).

براساس اطلاعات موجود، بیشتر آزمایش‌هایی که در کشور ما در این زمینه انجام شده، روی خربزه بوده و کمتر از طالبی استفاده شده است. ازآنجا که رقم هانی دیو دارای عمر انبارداری بالا و رقم سمسوری دارای قند و طعم مناسب است، بنابراین هیبرید آن‌ها می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی مفید باشد.. در این تحقیق با هدف تعیین بهترین مقدار و بهترین زمان گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده در شرایط آب‌وهوای تبریز روی تولید گیاهان هاپلوئید از هیبرید هانی دیو × سمسوری انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این آزمایش، بذرهای هیبرید هانی دیو × سمسوری از بانک بذر گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شد. بذرها در اردیبهشت‌ماه سال ۱۴۰۰در گلدان نشایی کاشته شده و در گلخانه نگهداری شدند. وقتی که گیاهان به مرحله ٤ برگی رسیدند، نشاها در مزرعه آزمایشی در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان، دانشگاه تبریز کاشته شدند. آبیاری، کوددهی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها مطابق روش‌های مرسوم صورت گرفت.

پرتوتابی و گرده‌افشانی: یک روز قبل از باز شدن گل‌های نر (گلبرگ‌های سبز مایل به زرد) (شکل ۱، A) اقدام به جمع‌آوری گل‌های نر شد و عصر همان روز و روز بعد گل‌های هرمافرودیت (شکل ۱، B) اخته شده و با کیسه پوشانده شدند تا از گرده‌افشانی ناخواسته جلوگیری شود. گل‌های نر در جعبه حاوی یخ خشک به پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، واقع در کرج منتقل شدند و با چهار مقدار پرتو گاما (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ گری) حاصل از چشمه کبالت ٦۰ پرتوتابی شدند. بعد از پرتوتابی، گل‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند.

در صبح روز بعد، گرده‌افشانی گل‌های اخته شده با گرده‌های پرتوتابی شده به‌صورت دستی انجام شد. هر گل ماده با استفاده از ۲ تا ۳ گل نر پرتوتابی شده، گرده‌افشانی شده و با کیسه پوشانده شد. از روز سوم بعد از گرده‌افشانی، گل‌ها از نظر موفقیت گرده‌افشانی و تشکیل میوه بررسی شدند (شکل ۱، C). تورم تخمدان به عنوان نشانه موفقیت گرده‌افشانی در نظر گرفته شد. در طی سه هفته تعداد میوه‌های رشد یافته در هر چهار تیمار پرتوتابی یادداشت‌برداری شد.

درصد زیستایی گرده: به‌منظور بررسی زیستایی گرده‌های پرتوتابی شده، از محیط کشت مایع با ۱۰۰ پی پی ام اسید بوریک، ۳۰۰ پی پی ام نیترات کلسیم و ۲ درصد ساکاروز استفاده شد (Brewbaker and Kwack, 1963). گرده‌ها در روی محیط کشت پخش شدند و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شد و پس از ٢٤ ساعت درصد زیستایی در هر مقدار پرتوتابی، بر اساس رشد لوله گرده، بررسی شد.

تشکیل میوه و نجات جنین: پس از گذشت ۳ تا ۵ هفته از گرده‌افشانی (Dong Zhao et al., 2016)، میوه‌های تشکیل شده (شکل ۱، D) جمع‌آوری شدند. میوه‌های برداشت شده در آزمایشگاه با آب شسته شده و با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شد. سپس جنین‌های نارس در زیر هود لامینار و با استفاده از بینکولار نجات داده شده و در داخل پتریدیش‌های حاوی محیط کشت جامد E20A (Sauton and Vaulx, 1987) با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر ٢،٤-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2،4-D) کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی مداوم به مدت دو ماه نگهداری شدند. پس از دو ماه تعداد جنین‌های پاسخ داد (مشاهده علائم اولیه کالوس) یادداشت‌برداری شد.

شکل ۱: گل نر در زمان برداشت برای انجام پرتوتابی (A)، گل هرمافرودیت (B)، گل‌های گرده‌افشانی شده با پرتوگاما (C) و میوه به‌دست آمده با سه مقدار مختلف (D).

باززایی شاخساره: از محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) دارای سه ترکیب هورمونی استفاده شد: الف- یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ب- ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ج- محیط کشت بدون هورمون. نمونه‌هایی که در مرحله قبل کالوس داده بودند، در این محیط‌های کشت بازکشت شدند و پتریدیش در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت روشنایی µmol m^{-2} s^{-1} ۵۰ به مدت یک ماه نگهداری شدند. بعد از یک ماه، درصد باززایی شاخساره از کالوس‌های رشد کرده ثبت گردید. شاخسارهای تولیدی به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال داده شد.

شمارش کروموزوم‌ها: شمارش کروموزوم‌ها طبق روش (Mujeeb-Kazi and JL 1985) انجام شد. نوک ریشه‌چه‌های در حال رشد جدا شده و به مدت ۲/۵ تا ۳/۵ ساعت در آلفابرومونفتالین قرار داده شدند. سپس، نمونه‌ها با آب مقطر شسته شده و داخل ماده فیکساتیو فارمر (محلول ۱ به ۳ اسید استیک گلاسیال و اتانول) قرار داده شدند. برای شمارش کروموزوم‌ها، ریشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در اسیدکلریدریک یک نرمال با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا هیدرولیز گردند. سپس، هماتوکسیلین به نمونه‌ها اضافه شد تا رنگ‌آمیزی شوند. نمونه‌ها بین لام و لامل قرار داده شدند و با فشار ملایم له شدند. شمارش کروموزومی و عکس‌برداری، توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. همه مراحل در سه تاریخ به فاصله حدود ۴۰ روز، اول تیرماه، ۱۰ مرداد و ۲۰ شهریور تکرار شد.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها: در این تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار، برای بررسی اثر مقدار پرتوتابی و تاریخ گرده‌افشانی روی زیستایی گرده، تشکیل میوه و پاسخ جنین‌های نارس از طریق پارتنوژنز انجام شد. هر تکرار شامل ۴۰ گل گرده‌افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده بود. در بررسی اثر محیط کشت و مقدار پرتوتابی روی شاخه زایی و باززایی از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار استفاده شد که هر واحد آزمایش شامل یک پتری دیش با ۱۰ جنین پاسخ داده، بود. درنهایت برای بررسی درصد تولید گیاهان هاپلوئید در چهار ذر پرتوتابی از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شد.

نتایج

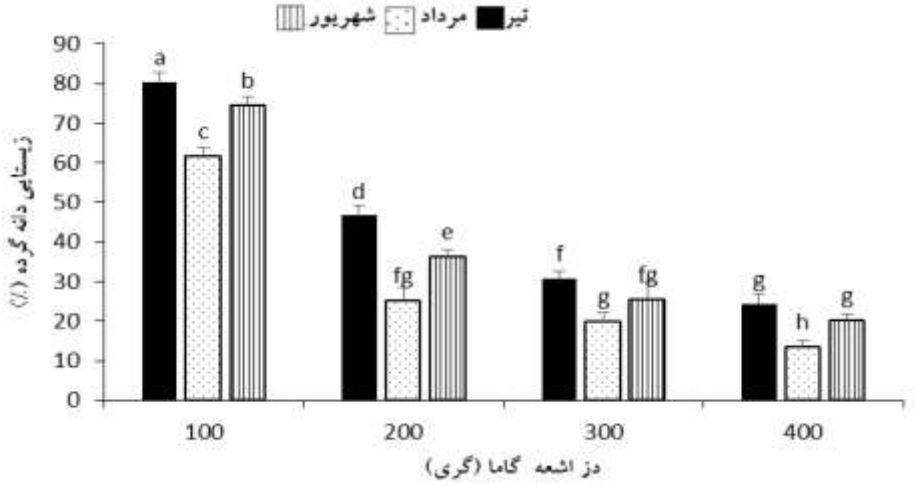
زیستایی دانه گرده: بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت گرده‌های پرتوتابی شده در محیط کشت مایع، زیستایی گرده‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شد و رشد لوله گرده به عنوان نشانه زیستایی تلقی گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که درصد زیستایی دانه گرده به طور معنی‌داری تحت تاثیر مقدار پرتو گاما و تاریخ گرده‌افشانی و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت. مقایسه میانگین درصد زیستایی دانه گرده نشان داد که با افزایش مقدار اشعه گاما، درصد زیستایی کاهش معنی‌داری را نشان داد به‌طوری که حداکثر درصد زیستایی در مقدار ۱۰۰ گری و حداقل آن در مقدار ۴۰۰ مشاهده گردید. از طرف دیگر در هر مقدار پرتوتابی، درصد زیستایی دانه گرده در گرده‌افشانی تیر و شهریور به‌طور معنی‌داری بالا و برابر بوده و اختلاف معنی‌داری با گرده‌افشانی در مردادماه داشت (شکل ۲).

گرده‌افشانی موفق: سه روز بعد از گرده‌افشانی، گل‌های گرده‌افشانی شده بررسی شدند و میوه‌هایی که تخمدان آن‌ها متورم شده بودند، به عنوان گرده‌افشانی موفق ثبت گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقدار پرتوتابی، تاریخ گرده‌افشانی و اثر متقابل آن‌ها تاثیر معنی‌داری روی موفقیت گرده‌افشانی داشتند (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در کل، مقدار ۱۰۰ گری و ٤۰۰ گری به ترتیب، بیشترین و کمترین درصد موفقیت گرده‌افشانی را در سه تاریخ گرده‌افشانی برخوردار بودند. در هر مقدار گرده‌افشانی، درصد گرده‌افشانی موفق در ماه‌های تیر و شهریور بیشتر از مردادماه بود. بر این اساس بالاترین درصد گرده‌افشانی موفق در مقدار ۱۰۰ گری و در گرده‌افشانی تیرماه و پایین‌ترین موفقیت، در مقادیر ۳۰۰ و ٤۰۰ گری در مردادماه مشاهده شد (شکل ۳).

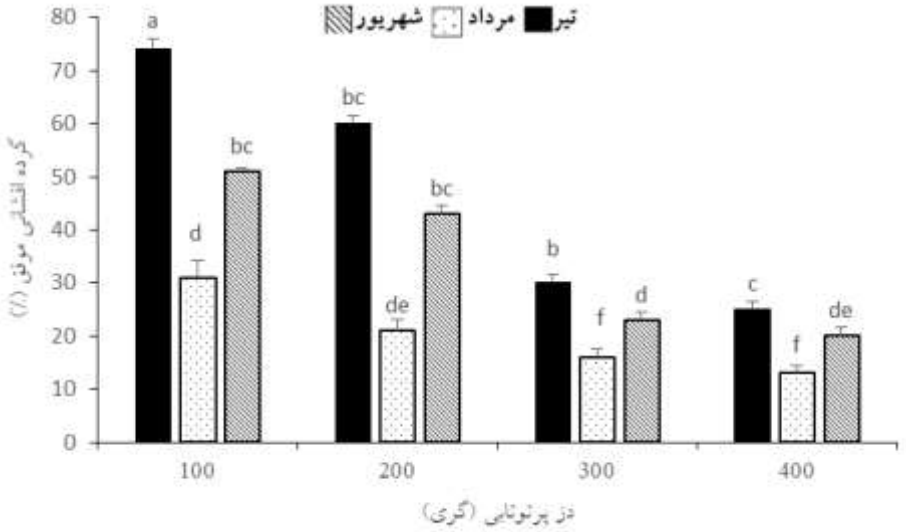
جدول ۱: تجزیه واریانس تاثیر مقدار پرتوگاما و تاریخ گرده‌افشانی روی زیستایی دانه گرده، گرده‌افشانی موفق، تشکیل میوه و کالوس زایی در هیبرید هانی دیو با طالبی سمسوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		زیستایی گرده	گرده‌افشانی موفق	تشکیل میوه	کالوس زایی
مقدار پرتوتابی	۳	٤۷۸۸/۲۹**	۲۱٤۱/۵۸ **	۱۸۹۳/۱۱**	۱٦۹۳/٤۱**
تاریخ گرده‌افشانی	۲	۵٦۹/۳۳**	۲۱۸۸ **	۹۳/۵۲**	۱٤۸٦/٤۲**
مقدار پرتوتابی× تاریخ گرده‌افشانی	٦	۱۳/۲۹**	۲۰/۳۳**	۱٤/۱۹**	۲۳۵/۳۹**
اشتباه آزمایشی	۲٤	۲/۲۸	۸/۹۱	۳/۱۱	۱۵/۵۱
ضریب تغییرات (٪)		۱۰/۲۸	۱٤/۱۲	۱۱/۳۷	۱٤/۳۲

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

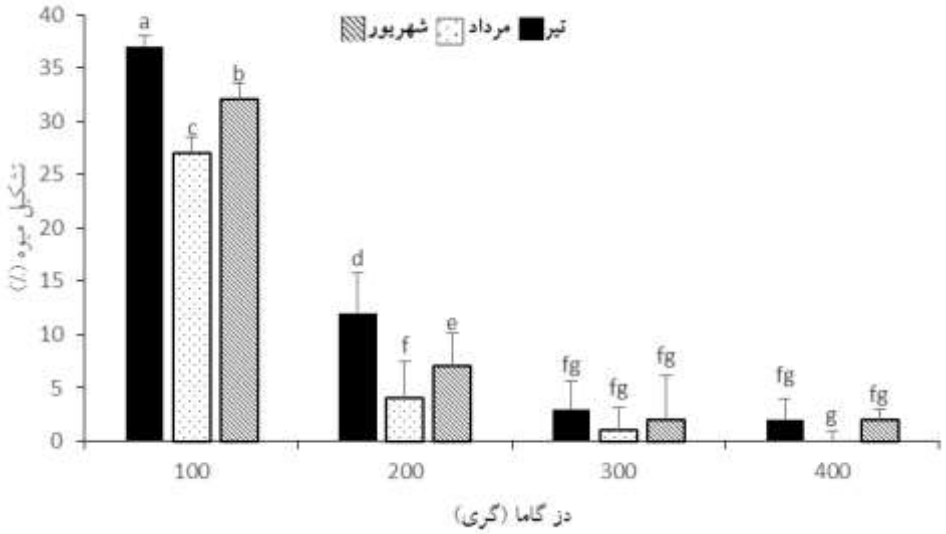


شکل ۲: متوسط درصد زیستایی گرده در چهار مقدار پرتو گاما و سه تاریخ گرده‌افشانی در هیبرید هانی دیو×سمسوری طالبی.
حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.
بار روی ستونها انحراف معیار می‌باشد.



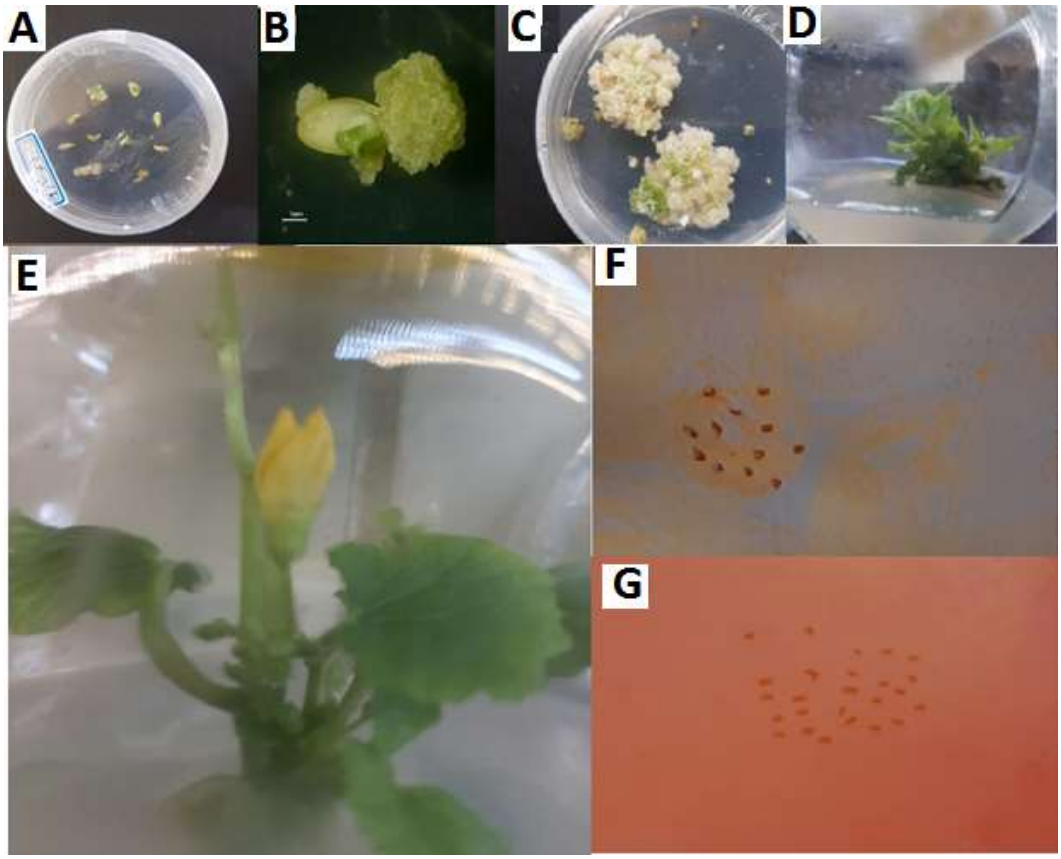
شکل ۳: متوسط درصد گرده‌افشانی موفق در مقادیر مختلف و تاریخ‌های مختلف گرده‌افشانی در هیبرید هانی دیو× سمسوری طالبی. حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد. بار روی ستونها انحراف معیار می باشد.

تشکیل میوه: میوه‌هایی که بعد از تورم تخمدان رشد کردند، ثبت گردید. نتایج نشان داد که تاریخ گرده‌افشانی و مقدار پرتوتابی و اثر متقابل آن‌ها، اثر معنی‌داری روی درصد تشکیل میوه داشت (جدول ۱). بیشترین و کمترین درصد تشکیل میوه به ترتیب در مقدار ۱۰۰ گری در تیرماه (۳۶ درصد) و ۴۰۰ گری در شهریورماه (صفر درصد) به دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار پرتوتابی در هر سه ماه، درصد تشکیل میوه کاهش معنی‌داری نشان داد و این کاهش در تاریخ گرده‌افشانی مردادماه بیشتر از گرده‌افشانی تیر و شهریور بود.

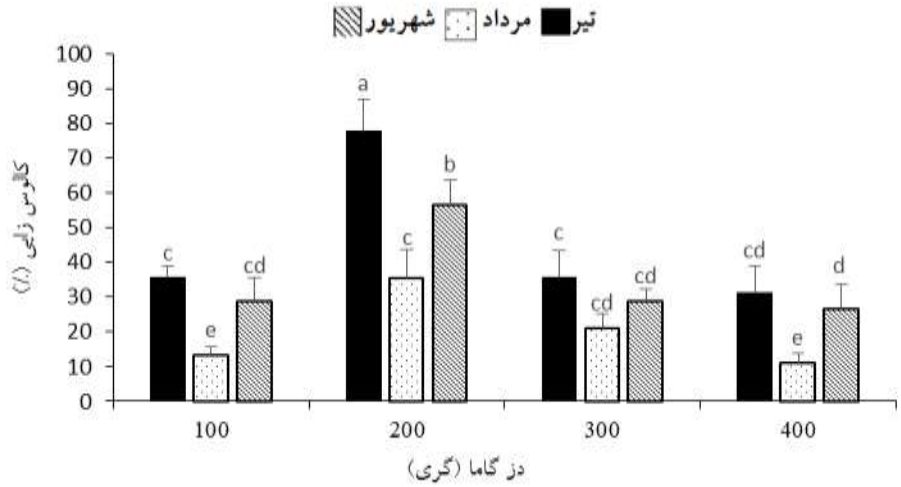


شکل ٤: متوسط درصد تشکیل میوه در مقادیر مختلف و تاریخ‌های مختلف گرده‌افشانی در هیبرید هانی دیو× سمسوری طالبی. حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد. بار روی ستونها انحراف معیار می باشد.

درصد کالوس زایی: دو ماه بعد از کشت جنین‌های در محیط کشت، کشت‌ها بررسی شده و اولین نشانه ظهور کالوس (شکل ۵، B)، به عنوان پاسخ‌دهی جنین و کالوس زایی در نظر گرفته شد. کالوس‌ها به رشد خود ادامه دادند (شکل ۵، C)، در فواصل یک ماه بازکشت شدند. در روی بعضی از کالوس‌ها گره نیز مشاهده شد. جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که درصد کالوس زایی بطور معنی‌داری تحت تاثیر مقدار پرتوتابی و تاریخ گرده‌افشانی و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت. بیشترین درصد کالوس زایی در مقدار ۲۰۰ گری در تیرماه و کمترین در مقدار ٤٠٠ گری در شهریورماه مشاهده گردید. این در حالی است که درصد کالوس زایی در هر سه مقدار اشعه گاما در گرده‌افشانی مردادماه بطور معنی‌داری کمتر از گرده‌افشانی تیر و شهریور بود (شکل ٦).



شکل ۵: مراحل تولید گیاه هاپلوئید. کشت جنین‌های نارس (A)، کالوس زایی (B)، پرآوری کالوس (C) باززایی (D)، رشد گیاهچه (E)، کروموزوم‌های گیاه هاپلوئید (n=12) (F) و کروموزوم‌های گیاه دیپلوئید (2n=24) (G).



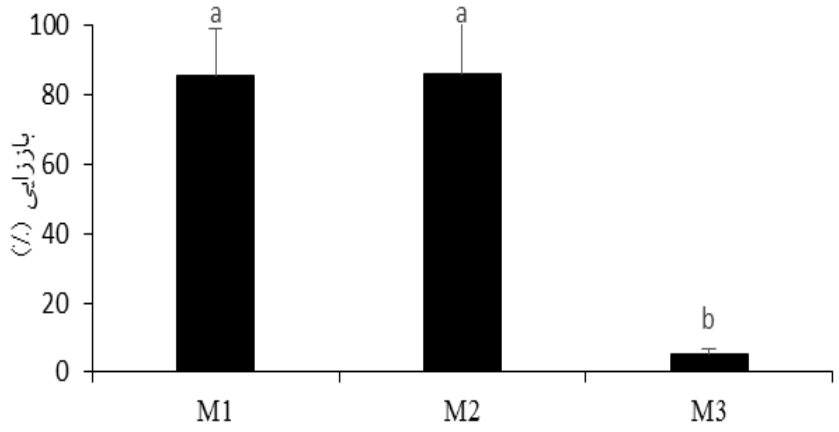
شکل ٦: درصد کالوس زایی در مقادیر مختلف و تاریخ‌های مختلف گرده‌افشانی در نجات جنین هیبرید هـانی دیـو× سمسـوری طالبی. حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد مـی باشـد. بـار روی سـتونها انحراف معیار می باشد.

باززایی شاخساره: نمونه‌هایی که برای باززایی به سـه محیط کشت منتقل شده بودنـد، بـه‌تـدریج شـروع بـه باززایی نمودند (شکل ۵، D). تولید شـاخه بـه عنـوان موفقیت باززایی تلقی شـد. جـدول تجزیـه واریـانس (جدول ۲) نشان داد که اثر مقدار پرتوتـابی در سـطح احتمال ۵ درصد و اثر محیط کشت در سـطح احتمـال یک درصد معنی‌دار شد اما اثـر متقابـل ایـن دو تیمـار معنی‌دار نبود. بالاترین درصد باززایی در محیط کشت الف و ب (دارای هورمون) مشاهده شـد امـا اخـتلاف معنی‌داری بین این دو محیط کشت مشـاهده نگردیـد. این در حالی است که باززایی شاخسـاره در محـیط ج (بدون هورمون) اتفـاق نیفتـاد و کـالوس‌هـا، قهـوه‌ای شدند (شکل ۷). بیشترین درصد باززایی نیز در مقـدار پرتوتابی ۱۰۰ گری (٦٧ درصد) مشاهده گردید (شکل ۸).

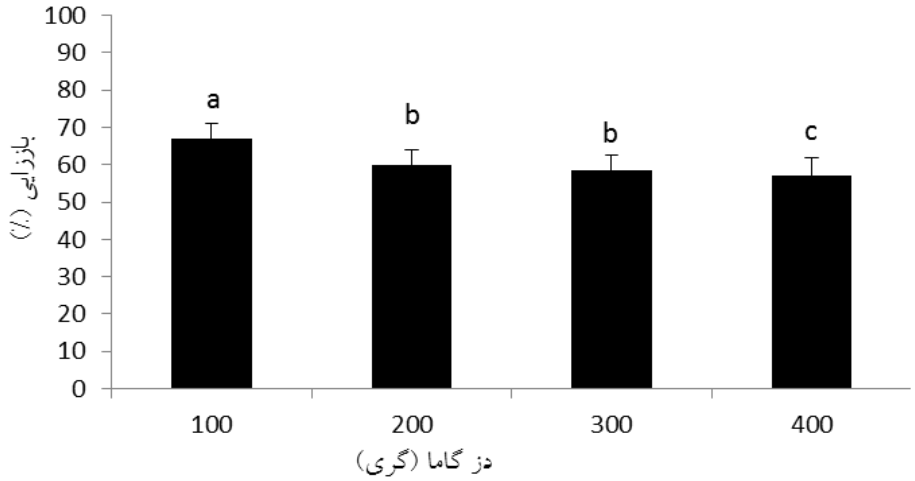
جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر مقدار پرتوگاما و محیط کشت روی باززایی شاخساره

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
مقدار پرتوتابی	۳	۱٤/٦٩*
محیط کشت	۲	۲۵۸٤۱/۵۸**
مقدار پرتوتابی× محیط کشت	٦	٦/۱۳ns
اشتباه آزمایشی	۲٤	۵/۷۸
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۷

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.



شکل ۷: متوسط درصد باززایی گیاهچه‌ها در محیط‌های کشت مختلف. M1 (یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP)، M2 (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) و M3 (محیط بدون هورمون). حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد. بار روی ستونها انحراف معیار می باشد.



شکل ۸: متوسط درصد باززایی گیاهچه در مقادیر مختلف پرتوتابی.
حروف مشابه روی ستونها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد.
بار روی ستونها انحراف معیار می باشد.

درصد گیاهان هاپلوئید: با استفاده از نمونه نوک ریشه‌چه گیاهچه‌های رشد یافته (شکل ۵، E)، شمارش و عکس‌برداری از کروموزوم‌ها انجام شد. نتایج نشان دادند که در تمام مقادیر پرتوتابی دانه گرده، گیاهان هاپلوئید تولید شده‌اند و این نتیجه به‌وضوح نشان داد که پرتوتابی، در کل موثر بوده است (شکل ۵، F و G). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر مقدار پرتوتابی در تولید گیاهان هاپلوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳) بطوری که اختلاف معنی‌داری بین هر چهار مقدار پرتوتابی مشاهده شد و بیشترین و کمترین درصد گیاهان هاپلوئید به ترتیب در مقادیر ۲۰۰ گری (٥٤٪) و ۱۰۰ گری (١٦/٦٦) مشاهده شد.

جدول ۳: تعداد و درصد گیاهان هاپلوئید در مقادیر مختلف پرتوتابی

مقدار پرتو گاما (گری)	تعداد گیاهچه	تعداد گیاهان هاپلوئید	درصد گیاهان هاپلوئید
۱۰۰	۳۰	۵	۱۶/۶۶[d]
۲۰۰	۵٤	۲٦	۵٤/۱٤[a]
۳۰۰	۳۵	۱۳	۳۷/۱٤ [b]
٤۰۰	۱۵	٤	۲٦/٦٦ [c]

بحث

نتایج نشان داد که هر دو فاکتور مقدار پرتوتابی و تاریخ گرده‌افشانی و اثر متقابل آنها تاثیر معنی‌داری روی زیستایی دانه گرده داشتند (شکل ۲) و با افزایش مقدار، درصد زیستایی دانه گرده کاهش یافت و رابطه معکوسی بین این دو مشاهده گردید؛ به‌طوری که در مقدار ۱۰۰ گری بیشترین و ٤۰۰ گری کمترین درصد زیستایی مشاهده گردید. زیستایی دانه گرده در مقدار ۱۰۰ گری تقریبا مشابه زیستایی دانه‌های گرده پرتوتابی نشده بود. بعبارت دیگر، مقدار ۱۰۰ گری احتمالا در غیر فعال کردن دانه گرده نسبت به مقادیر بالاتر، کمتر موثر بوده است. از طرف دیگر وجود زیستایی دانه گرده در مقدار ٤۰۰ گری نشانگر این امر است که این مقدار باعث غیر فعال شدن کامل دانه گرده نگردیده و می تواند در بکرزایی نقش داشته باشد. مقدار ۲۰۰ گری باعث کاهش ۵۰ درصدی زیستایی دانه گرده شده و می توان این مقدار را LD50 اشعه گاما در نظر گرفت. نتایج این مطالعه با نتایج مشاهده شده در سیب (Yiğit et al. 2009)، شاهدانه (Zottini et al. 1997) و خیار (Van Den Boom and Den Nijs 1983) مطابقت دارد. در این تحقیقات، با افزایش مقدار پرتو گاما، زیستایی و درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده کاهش یافت. به طور کلی پرتوهای یونیزه کننده تاثیر منفی روی زیستایی و جوانه‌زنی دانه گرده دارد. این واقعیت با تحقیقات انجام شده در سایت انفجار هسته‌ای چرنوبیل در اوکراین تایید شده است. گزارش شده است که پرتوهای یونیزه کننده می‌تواند حتی روی جوانه‌زنی و وزن بذر نیز تاثیر گذار باشد که به‌نوبه خود روی تولیدمثل گیاهان تاثیر منفی می‌گذارد (Møller and Mousseau 2017). همچنین بیشترین و کمترین درصد زیستایی گرده به ترتیب در تیرماه و مرداد ماه مشاهده گردید. این تفاوت را می‌توان به تغییرات دما در طول تابستان نسبت داد. معمولا در تبریز دما تا اواسط مردادماه افزایش می‌یابد که این امر موجب کاهش زیستایی مرداد نسبت به تیرماه شده است اما در شهریورماه دمای کاهش نسبی می‌یابد و این می‌تواند دلیل افزایش زیستایی در شهریورماه نسبت به مردادماه باشد. در پیاز مشاهده گردیده است که افزایش دما، باعث کاهش چشمگیرجوانه‌زنی گرده می شود (Chang and Struckmeyer 1976). دما می‌تواند از طریق افزایش از دست دادن آب گرده موثر باشد. از طرف دیگر پرتوتابی دانه‌های گرده با رطوبت بالا موفق‌تر دانه‌های گرده دارای رطوبت پایین است (Dong, Zhao et al. 2016).

میوه‌هایی که بعد از روز سوم شروع به تورم کردند، به عنوان، گرده‌افشانی موفق تلقی شد. نتایج نشان داد که مقدار پرتوتابی، تاریخ گرده افشانی و اثر متقابل آنها، تاثیر معنی‌داری روی موفقیت گرده‌افشانی و تشکیل میوه داشتند. بیشترین درصد موفقیت گرده‌افشانی در مقدار ۱۰۰ گری در تیرماه و کمترین در مقدار ٤۰۰ گری در تاریخ گرده افشانی مرداد ماه مشاهده گردید. از طرف دیگر، تشکیل میوه در مقدار

٤٠٠ گری و گرده افشانی مرداد ماه مشاهده نشد که نشان دهنده تاثیر منفی دمای بالای هوا روی موفقیت گرده افشانی و تشکیل میوه بود. در همه مقادیر پرتوتابی، تیرماه بهترین زمان برای گرده‌افشانی بود که این نتیجه با نتایج Sauton (۱۹۸۸) کاملا مطابقت دارد. وی گزارش کرد بیشترین تشکیل میوه در گرده‌افشانی در طالبی ١٦ ژوئن تا ١٥ جولای می‌باشد. علت اختلاف بین تاریخ‌های گرده افشانی، ممکن است به علت شیوع آفت و بیماری ها باشد. با گذشت زمان گیاهان مزرعه به بیماریها و آفات مبتلا می شوند و این تنش‌ها روی میزان تشکیل میوه تاثیر منفی دارند (Lotfi et al., 2003).

ازآنجا که گرده‌افشانی نتیجه جوانه‌زنی و رشد لوله گرده است، بنابراین هر عاملی که روی زیستایی و جوانه‌زنی گرده موثر باشد، روی درصد موفقیت گرده‌افشانی و تشکیل میوه نیز موثر خواهد بود. هرچه تعداد لوله گرده رشد کرده بیشتر باشد، احتمال موفقیت گرده‌افشانی و در نتیجه تشکیل میوه به‌ویژه در گرده‌های پرتوتابی شده بیشتر خواهد بود (Dong, Zhao et al. 2016). با افزایش مقدار پرتوتابی، درصد گرده افشانی موفق و تشکیل میوه بطور معنی داری کاهش یافت و این امر بوضوح نشان داد که مقادیر بالاتر از ۲۰۰ گری می تواند باعث غیر فعال شدن دانه گرده شده و تعداد گلهای ماده تحریک شده، رشد یافته و تولید میوه را کاهش داده و احتمالا باعث افزایش بکرزایی و تولید جنین‌های هاپلویید در داخل میوه شود. در این صفات نیز مقدار ۲۰۰ گری به مقدار LD50 نزدیک بوده است و این امر همبستگی مثبت بین صفات گرده افشانی را نشان می دهد.

بیشترین درصد کالوس‌زایی در مقدار ۲۰۰ گری در تیرماه و کمترین در مقدار ٤٠٠ گری در شهریورماه مشاهده گردید. این در حالی است که درصد کالوس زایی در هر سه مقدار اشعه گاما در گرده‌افشانی مردادماه بطور معنی‌داری کمتر از گرده‌افشانی تیر و شهریور بود (شکل ٦).

در تمامی مقادیر پرتوتابی دانه گرده و تاریخ های گرده افشانی، نجات جنین با موفقیت انجام شد؛ با این حال موفقیت در تولید کالوس از جنین های نجات یافته در مقدار ۲۰۰ گری در تیرماه بیشتر از سایر تیمارها بود و در مقادیر پایین و بالاتر از ۲۰۰ گری پاسخ جنین ها کاهش نشان داد بطوری که کمترین درصد کالوس زایی در ٤٠٠ گری مشاهده شد. به نظر می رسد که شرایط رشدی جنین های نارس در تیمار ۲۰۰ گری باعث پاسخ بهتر این جنین ها به محیط کشت شده است. قبلا Tütüncü و Mendi (۲۰۲۲) گزارش کردند که تولید کالوس از گلهای سیکلامن گرده‌افشانی شده با گرده پرتوتابی شده با گاما، با افزایش مقدار پرتوتابی، کاهش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند که گرده‌افشانی دستی با دانه گرده پرتوتابی شده، روی شرایط بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و در نتیجه واکنش به کشت بافت و تولید کالوس و باززایی تاثیر گذار بود. از طرف دیگر تاریخ گرده افشانی نیز روی خصوصیات رشد جنین تاثیر گذار بوده و تاریخ گرده افشانی تیر ماه به دلیل شرایط فصلی بهتر، نسبت به مرداد و شهریور، اثر بهتری روی کالوس زایی داشته است. در کل بیشترین درصد کالوس زایی در تیرماه مشاهده شد که با نتایج Sauton (۱۹۸۸) مطابقت دارد. وی نتیجه گرفت که موفقیت در گرده افشانی در ١٦ ژوئن تا ١٥ جولای از نظر تعداد جنین‌های زنده بالاتر از سایر تاریخ ها بود.

شکل ۷ نشان می‌دهد که بین محیط‌های «الف» و «ب» از نظر تاثیر روی باززایی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و فقط محیط «ج» که فاقد هورمون بودن در باززایی کالوس بی تاثیر بود. لذا با توجه نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در باززایی و رشد درون شیشه‌ای، کاملا طبیعی و قابل‌انتظار است. ذر پرتوتابی

تاثیر معنی‌داری روی باززایی داشته است و با افزایش ذر، درصد باززایی کاهش یافت که با یافته‌های Tütüncü و Mendi (۲۰۲۲) مطابقت دارد. آنان دریافتند که با افزایش مقدار پرتوتابی گرده‌های سیکلامن، باززایی از کالوس حاصل از تخمک کاهش می‌یابد. پرتوتابی روی شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نمونه تاثیر گذار است و درنهایت روی تولید کالوس و باززایی موثر است (Tütüncü and Mendi 2022).

نتایج شمارش کروموزوم نشان داد که در تمام مقادیر پرتوتابی دانه گرده با اشعه گاما، گیاهان هاپلوئید تولید می شود. نتایج (جدول ۳) نشان داد که بالاترین درصد گیاهان هاپلوئید در مقدار ۲۰۰ گری تولید شدند. کمترین درصد، در مقدار ۱۰۰ گری مشاهده گردید. این نتایج با برخی از گزارش‌های قبلی مطابقت دارد و با برخی دیگر در تضاد است. در تحقیقات قبلی مقدار بین ۵۰ تا ۲۵۰۰ گری پرتو گاما، به عنوان بهترین مقدار برای تحریک پارتنوکارپی و تولید گیاه هاپلوئید در ژنوتیپ‌های مختلف طالبی و خربزه گزارش شده است. این تضاد نتایج ما با نتایج قبلی را می‌توان به تفاوت در ژنوتیپ، شرایط رشد گیاه و زمان انجام گرده‌افشانی و شرایط فیزیولوژیکی گیاه دهنده نسبت داد (Dong, Zhao et al. 2016). به نظر می‌رسد که مقدار ۱۰۰ گری برای تاثیر مناسب روی دانه‌های گرده به‌اندازه کافی قوی نیست و مقادیر ۳۰۰ و ٤۰۰ تاثیر منفی روی شرایط فیزیولوژیکی گرده می‌گذراند. مقدار پرتوتابی نباید آن‌قدر بالا باشد که از جوانه‌زنی لوله گرده ممانعت کند یا آن را کاملا از بین ببرد؛ بلکه باید تا حدی باشد که از انجام لقاح طبیعی و تولید جنین دیپلوئید جلوگیری کند (Dong, Zhao et al., 2016).

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج این تحقیق، اشعه گاما با مقدار ۲۰۰ گری مناسب‌ترین مقدار و تیرماه بهترین زمان برای تولید گیاهان هاپلوئید در هیبرید هانی دیو×سمسوری است. در این شرایط، بالاترین درصد گیاهان هاپلوئید به دست آمد. مقدار ۱۰۰ گری، گرچه بهترین مقدار برای زیستایی گرده، گرده افشانی موفق، تشکیل میوه و باززایی بود، اما تعداد جنین هاپلوئید تولید شده کمتر از مقدار ۲۰۰ گری بود که می‌تواند به علت تاثیر پایین مقدار ۱۰۰ گری روی دانه گرده باشد. با توجه به تاثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی، تحقیقات بیشتری برای بررسی اثر عوامل موثر بر فیزیولوژی و بیوشیمی گیاه دهنده از قبیل تغذیه و شرایط گلخانه مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای با شماره طرح ۹۹/۱۰۱/۱٤٤۳ انجام شد و از زحمات کارکنان پژوهشکده کشاورزی هسته ای کرج، آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی و ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان قدردانی می‌شود.

Refrences

Asadi, A., Zebarjadi, A., and Abdollahi, M. R. (2019). Production of Cucumber Doubled Haploid Plants via Ovule Culture. Plant Productions, 42(1):77–88. https://doi.org/10.22055/ppd.2019.23322.1514

Baktemur, G., Yücel, N. K., Taşkin, H., Çömlekçioğlu, S., and Büyükalaca, S. (2014). Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using

irradiated pollen technique in squash. 327:318–327. https://doi.org/10.3906/biy-1309-5.

Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 50(9): 859-865. doi: 10.3390/ijms20020420

Chang, W. and Struckmeyer B. E. (1976). Influence of Temperature, Time of Day, and Flower Age on Pollen Germination, Stigma Receptivity, Pollen Tube Growth, and Fruit Set of *Allium cepa* L. ." Journal of the American Society for Horticultural Science 101(1): 81-83. DOI: https://doi.org/10.21273/JASHS.101.1.81

Dong, Y.-Q., Zhao, W.-X., Li, X.-H., Liu, X.-C., Gao, N.-N., Huang, J.-H., Wang, W.-Y., Xu, X.-L. and Tang, Z.-H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. Plant Cell Reports, 35:1991–2019. DOI: 10.1007/s00299-016-2018-7

Gałązka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K. (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. Folia Horticulturae 25(1): 67-78. DOI: https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0008

Kurtar, E. S., Seymen, M., and Kal, Ü. (2020). An overview of doubled haploid plant production in Cucurbita species. Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 30(3):510-520. DOI:10.29133/yyutbd.741087

Kesh, H. and Kaushik, P. (2021). Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. Scientia Horticulturae 282: 110045. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110045

Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J. and Kristkova, E. (2007). Cucurbits (*Cucurbitaceae; Cucumis spp ., Cucurbita spp ., Citrullus spp.*).In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Vegetable Crops, 3:271-376. ed. Singh, Ram J.: CRC Press. DOI:10.1201/9781420009569.ch8

Lotfi, M., Kashi, A., Zamani, Z., Tabatabaie, B. E. and Earl, E. D. (2003). Efficient haploid plant production for pure line generation in melon (*Cucumis melo* L.). Iranian Journal of Agricultural Sciences.Vol. 34, No. 1, 55-65.

Møller, A. and Mousseau, T. (2017). Radiation levels affect pollen viability and germination among sites and species at Chernobyl. International Journal of Plant Sciences, 178(7): 537-545. https://doi.org/10.1086/692763

Mujeeb-Kazi, A. and M. JL (1985). Enhanced resolution of somatic chromosome constrictions as an aid to identifying intergeneric hybrids among some Triticeae. Cytologia, 50(4): 701-709. DOI: 10.1508/cytologia.50.701

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Sauton, A. (1988). Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskemlon, *Cucumis melo* L. Scientia Horticulturae, 35(1-2):71-75. https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90038-6

Tütüncü, M. and Mendi Y. Y. (2022). Effect of pollination with gamma irradiated pollen on in vitro regeneration of ovule culture in Cyclamen. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 10(12): 2415-2420. DOI:10.24925/turjaf.v10i12.2415-2420.5409

Van Den Boom, J. and Den Nijs, A. (1983). Effects of γ-radiation on vitality and competitive ability of *Cucumis* pollen. Euphytica, 32: 677-684. DOI:10.1007/BF00042146

Yiğit, D., Güleryüz, M. and Balcı, E. (2009). The effect of gamma rays on pollen viability, germination and pollen tube length in saki apple cultivar. Erzincan University Journal of Science and Technology, 1(2): 201-210. https://doi.org/10.18185/erzifbed.80615

Zottini, M., Mandolino, G. and Ranalli, P. (1997). Effects of γ-ray treatment on *Cannabis saliva* pollen viability. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 47: 189-194. https://doi.org/10.1007/BF023