Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحه ۱۶-۵

میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات

مهران عنایتی شریعت پناهی[1]*، داوود امامی میبدی[2]

۱و۲- به ترتیب استادیار و محقق پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۱۶)

چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید/دابلد هاپلوئید باعث سرعت بخشیدن به برنامه‌های به نژادی، بهبود کارآیی انتخاب، شناسایی همبستگی و اثرات متقابل ژنی، تخمین واریانس ژنتیکی و تعداد ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، تولید جابجایی‌های ژنتیکی و تسهیل انتقال ژن می‌گردد. کشت میکروسپور در برنامه‌های به نژادی، علاوه بر مزایای فوق دارای کاربردهای دیگری از قبیل ایجاد و حفظ گیاهان نرعقیم از طریق جنین‌زایی میکروسپور، امکان برگرداندن نر باروری از طریق بلوغ درون شیشه‌ای میکروسپور، غلبه بر خودناسازگاری و القا و انتخاب جهیده‌ها می‌باشد. در برنامه‌های مهندسی ژنتیک، سیستم انتقال ژن به لاین جنسی نر که شامل انتقال ژن به میکروسپور، بلوغ درون شیشه‌ای آن و سپس گرده‌افشانی دانه‌های گرده تراریخته است، بسیار کارآمد می‌باشد. در مطالعات پایه امکان بررسی نمو دانه گرده و گرده‌افشانی، جنین‌زایی، توتی پوتنسی، چرخه سلولی، تغییر فاز و نقش تنش در نمو از طریق کشت میکروسپور امکان پذیر است. در این مقاله جنبه‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای میکروسپور بررسی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی

میکروسپور، جنین‌زایی، هاپلوئید، اصلاح نباتات، ژنتیک

مقدمه

گیاهان هاپلوئید به گیاهانی که تعداد کروموزوم‌های آنها برابر با کروموزوم‌های گامتی باشند، اطلاق می‌شود. در گونه‌های دیپلوئید اسپوروفیتی (۲n)، هاپلوئیدها همچنین می‌توانند به دلیل دارا بودن فقط کروموزم‌های یک ژنوم، مونوپلوییید (x) نامیده شوند. در گونه‌های پلی‌پلوییید، هاپلوئیدها به دلیل داشتن بیش از یک ژنوم، پلی هاپلوئید نامیده می‌شوند. گیاه هاپلوئید حاصل از یک اوتوتراپلوییید (۴x) با چهار سری از یک ژنوم اصولا یک دای هاپلوئید نامیده می‌شود (زیرا۲x=n). ذکر این نکته ضروری است که وقتی تعداد کروموزم‌های یک هاپلوئید دوبرابر می‌شود، آن را باید دابلد هاپلوئید (DH) بنامیم نه یک دای هاپلوئید.

www.SID.ir

Archive of SID

یک دای هاپلوئید، به خاطر تظاهر دو سری کروموزم از چهار سری در اتوتتراپلوییدخالص نیست، در حالی که یک دابلد هاپلوئید حاصل از یک مونوپلوییدیا آلوپلوییدکاملا خالص می‌باشد (۲۲).

هاپلوئیدها در گیاهان برای اولین بار در *Datura stramonium* L. تشخیص داده شدند که به وسیله بلکسلی و همکاران گزارش گردید (۴). تولید جنین و گیاه هاپلوئید به وسیله کشت بساک، اولین بار در سال ۱۹۶۶ و ۱۹۶۴ Datura گزارش شده است (۱۱ و ۱۲). Kasha و Kao در سال ۱۹۷۰ تولید هاپلوئید در جو به روش حذف کروموزومی را که شامل دورگ گیری جو زراعی با گونه وحشی و سپس حذف ترجیحی کروموزم‌های گونه وحشی در طول جنین زایی اولیه می‌باشد، گزارش کردند (۲۱).

گیاهان هاپلوئید/دابلد هاپلوئید در اصلاح نباتات، ژنتیک و مهندسی ژنتیک دارای کاربردهای فراوانی از قبیل تولید لاین‌های کاملاً خالص پس از دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌های گیاهان هاپلوئید (۲۰)، وجود تفرق ژنتیکی و نسبت‌های ژنتیکی ساده‌تر در گیاهان هاپلوئید و در نتیجه نیاز به جمعیت‌های کوچک جهت مطالعات ژنتیکی (۳۱)، برطرف نمودن محدودیت تهیه لاین خالص در گیاهان دو پایه و خود ناسازگار (۲۴)، تسهیل مطالعات موتاسیون (۳۱)، تأسیس بانک ژرم‌پلاسم به دلیل پایداری ژنتیکی جنین‌های آندوژنی و مریستم‌های انتهایی هاپلوئیدها (۳۱)، استفاده از هاپلوئیدها در مطالعات سیتوژنتیکی برای تولید و دستیابی به مونوسومی‌ها، نولی سومی‌ها، و آنیوپلوئیدها (۳۵)، استفاده از هاپلوئیدها در امتزاج سوماتیکی برای تولید هیبریدهای بین گونه‌ای (۱۹)، استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده برای شناسایی هیبریدهای برتر در برنامه‌های اصلاحی (۳۴)، استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده جهت محاسبه مقادیر نوترکیبی بین ژن‌های پیوسته (۳۴) و استفاده از هاپلوئیدها در بررسی پلی‌مورفیسم و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی بر اساس RFLPs در گونه‌های مختلف گیاهی (۳۱) می‌باشند.

بر اساس آخرین آمار منتشره تا سال ۲۰۰۳، بیش از ۲۰۰ واریته با استفاده از روش‌های مختلف دابلد هاپلوئیدی تولید شده که بیشترین واریته‌ها به ترتیب در گیاهان جو (۹۶ واریته)، کلزا (۴۷ واریته) و گندم (۲۰ واریته)گزارش شده است (۵۳).

سیستم هاپلوئیدی مزایای زیادی در عملکرد روش‌های موتاسیونی در اصلاح گیاه و بهبود ژرم پلاسم ایجاد می‌کند (۵۰). خیلی از این مزایا بر پایه این حقیقت است که ژنوتیپ‌ها و نسبت‌های تفرق ژنتیکی در یک جمعیت دابلد هاپلوئیدی معادل گامتها می‌باشد. کاربرد دابلد هاپلوئیدها برای القا و انتخاب موتانت‌ها دارای مزایایی مانند امکان جداسازی موتانت‌های مغلوب در اولین نسل پس از تیمار جهش‌زایی، تثبیت سریع ژنوتیپ‌های موتانت شده که باعث کاهش زمان در تولید لاین‌های موتانت خالص می‌شود، افزایش کارایی انتخاب موتانت‌های مطلوب به دلیل تفرق گامتی (۱:۱) در برابر تفرق زیگوتی(۳:۱) و امکان کاربرد انتخاب درون شیشه می‌باشد (۵۰).

امروزه از دابلد هاپلوئیدها برای تهیه نقشه ژنتیکی استفاده می‌شود(۹). توانایی تولید دابلد هاپلوئیدها پس از یک مرحله نوترکیبی (بعنوان مثال از نسل F1) امکان مقایسه جمعیت‌های دابلد هاپلوئید را با سایر جمعیت‌های خالص تصادفی منتج از روش‌های کلاسیک شجره‌ای یا انتخاب تک بذر (single seed descent) مهیا می‌نماید. در صورت وجود لینکاژ، میزان تنوع ژنتیکی صفات مرتبط با ژن‌های اصلی پس از هر مرحله نوترکیبی کاهش می‌یابد (۴۸). روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA) مبتنی بر تطابق فنوتیپی دقیق می‌باشد و در این رابطه جمعیت‌های دابلد هاپلوئید دارای مزایای ویژه‌ای از جمله تکرار پذیری آزمایشها می‌باشند و بعلاوه داده‌های ژنتیکی بر مبنای لاین‌های مطلوب دابلد هاپلوئید ایجاد می‌شوند(۹). جمعیت‌های دابلد هاپلوئید همچنین می‌توانند جهت تهیه نقشه ژنتیکی صفت و نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. اگر نشانگرهای مکان‌های ژنی شناخته شده مورد استفاده قرار گیرند، مکان‌های ژنی سریعتر شناخته می‌شوند. دابلد هاپلوئیدی سریعترین مسیر هموزیگوتی می‌باشد و همچنین امکان تولید جمعیت دابلد هاپلوئید، استخراج DNA، غربال توسط نشانگرها و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی بعد از دو سال از تلاقی اولیه و بدون در نظر گرفتن گونه گیاهی، مقدور می‌باشد (۹).

Archive of SID

روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید

هاپلوئیدها بر اساس مسیری که از آن منشا می‌گیرند به هاپلوئیدهای خود بخودی (۱۶)، هاپلوئیدهای ایجاد شده از سلول تخمزا یا گامتوفیت ماده (۵۵)، هاپلوئیدهای حاصل از کشت جنین و تلاقی‌های دور (۲۱، ۲۶، ۳۰ و ۳۹)، هاپلوئیدهای ایجاد شده از گرده‌افشانی با دانه‌های گرده پرتوتابی شده (۴۳) و هاپلوئیدهای حاصل از میکروسپور یا دانه‌های گرده نارس (۵۵ و ۵۷) تقسیم می‌شوند.

کشت بساک و میکروسپور

کشت بساک روشی ساده است و در برنامه‌های اصلاحی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است و محققین زیادی با به کارگیری این روش موفق به تولید گیاهان هاپلوئید در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شده‌اند (۵۵). اولین بار در گیاه *Datura innoxia* با کشت بساک در شرایط درون شیشه گیاه هاپلوئید تولید شد (۱۱ و ۱۲). در این تکنیک، بساک‌ها در یک مرحله حساس و کوتاه از گیاه جدا شده و روی یک محیط کشت مناسب قرار می‌گیرند. در کشت بساک، میکروسپورهای داخل بساک به جای تولید گامت نر تغییر مسیر داده و تولید کالوس یا جنین می‌نمایند. کالوس‌ها به دو طریق اندام زایی یا جنین زایی به گیاهان هاپلوئید تبدیل می‌شوند (۲۴). مرحله زمانی برداشتن بساک‌ها برای القای هاپلوئیدی بسیار حساس است و یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده در تعیین میزان موفقیت در تولید جنین از کشت بساک می‌باشد و بر اساس اظهارات بعضی محققین، مناسب ترین بساک‌ها آنهایی هستند که هنگام برداشت حاوی میکروسپورهای تک هسته‌ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه گرده) باشند (۷).

کشت بساک با وجود کاربردهای فراوان، مشکلاتی نیز دارد. بافت دیواره اسپروفیتی بساک در روند جنین زایی به صورت مفید و یا بازدارنده اثرگذار است و در نهایت مطالعات را روی مکانیزم القاء جنین زایی میکروسپور مشکل می‌سازد (۱۴). وجود اثرهای ژنوتیپی قوی و تغییرات گامتوکلونی در کشت‌های بساک تهدیدی عملی برای این روش می باشد (۸ و ۲۸). جذب مواد غذایی به وسیله میکروسپور در بساک‌های کشت شده بستگی به موقعیت آنها در بساک‌ها دارد که در نتیجه یک انتخاب نامطلوب را بین میکروسپورها باعث می‌شود (۴۹). موادی که به وسیله دیواره بساک آزاد می‌شود ممکن است باعث بازدارندگی یا پشتیبانی جنین زایی شود (۱۵). بافت دیواره بساک هاپلوئید نبوده و گاهی که از دیواره بساک تولید می‌شود هاپلوئید نخواهد بود و گاهی اوقات نیز کروموزم‌های گیاهان هاپلوئید حاصل از کشت بساک به طور خود به خودی مضاعف می‌شوند و تولید هاپلوئید مضاعف (دابلد هاپلوئید) می‌نمایند که آنها را نمی‌توان به سهولت از گیاهان حاصل از دیواره بساک تشخیص داد. این مورد در جو بسیار مشاهده می‌گردد (۳۱).

می‌توان بر بسیاری از مشکلاتی که در بالا ذکر شد به وسیله کشت میکروسپورهای ایزوله شده غلبه کرد (۵۵). کشت میکروسپور، روشی است که به لحاظ مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است. در این روش امکان بازیافت تعداد زیادی گیاهان هاپلوئید وجود دارد (۵۵ و ۷).

علیرغم پیچیدگی تکنیکی که روش کشت میکروسپور دارد، این روش در مقایسه با کشت بساک دارای مزایای متعددی می‌باشد (۵۵) که اهم آنها عبارتند از: ۱- شانس باززایی گیاهان دیپلوئید اسپوروفیتی به دلیل حذف بافت‌های دیپلوئیدی مانند دیواره بساک و آوندها، محدود می‌شود، ۲- استفاده یکسان تمام میکروسپورها از مواد غذایی به علت آزاد بودن آنها و نیز رفع مشکل رقابت میکروسپورها، ۳- دیواره بساک بعنوان مانعی در برابر انتقال مواد غذایی از محیط کشت به میکروسپورها عمل نمی‌کند، ۴- برطرف نمودن مشکل ترشحات حاصل از دیواره بساک همانند آبسیزیک اسید و مواد سمی که اثر بازدارندگی بر روی رشد میکروسپورها دارند، ۵- امکان پذیر بودن مشاهده دقیق تمام مراحل آندروژنز، ۶- سهولت انجام بررسی اثرات عوامل گوناگون بر روی میکروسپورها به علت جدا بودن میکروسپورها از همدیگر و مشاهده راحت آنها، ۷- ایده‌آل بودن میکروسپورها برای اعمال تیمارهای موتاژن و بررسی موتاسیون‌ها، ۸- استفاده از روش‌های انتقال ژن بطور مستقیم بر روی میکروسپورها، ۹- در کشت میکروسپور، اغلب تبدیل مستقیم میکروسپور به جنین اتفاق می‌افتد لذا تنوع گامتوکلونی صورت نمی‌گیرد و ۱۰- میسر

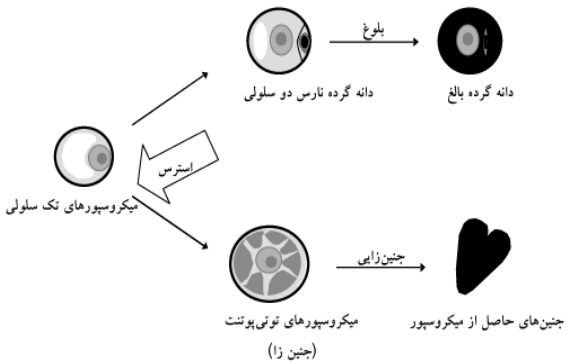
www.SID.ir

Archive of SID

بودن جداسازی سلول‌های مرده و زنده به وسیله دور سانتریفیوژ. کشت میکروسپور بهترین سیستم برای بررسی کاربرد جهش درون شیشه‌ای و انتخاب آنها است (۵۰). به دلیل کشت تک سلول میکروسپور، امکان تولید گیاهان تراریخته با کارایی بیشتری وجود دارد (۵۵). گیاهان تراریخته حاصل از انتقال ژن به میکروسپور، پس از دو برابر شدن کروموزوم‌هایشان (به طور طبیعی یا مصنوعی) دابلد هاپلوئید هموزیگوت بوده و از همی‌زیگوتی رهایی می‌یابند (۵۵).

جنین‌زایی میکروسپور

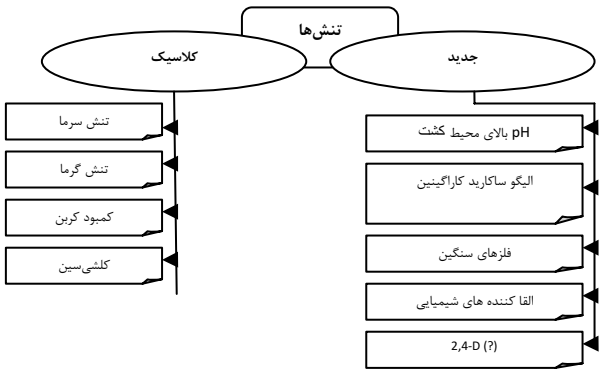
اگرچه نتیجه نمو میکروسپور در گیاه به طور طبیعی تمایز آن به دانه گرده و انجام باروری است اما میکروسپورهای ایزوله و کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای می‌توانند، از یک طرف، در صورت عدم اعمال تنش و کشت در یک محیط غنی از نظر مواد غذایی به دانه گرده رسیده تکامل نمایند و از طرف دیگر، با اعمال تنش بطور مکرر تقسیم شده و به جنین نمو یابند (شکل۱) (۲۵). بعبارتی میکروسپورها چه در محیط طبیعی (داخل بساک‌ها) و چه در صورت ایزوله شدن و کشت درون شیشه (بدون اعمال تنش)، مسیر طبیعی تکاملی خود را طی کرده و با انجام اولین تقسیم میتوزی، دانه گرده نارس را تولید می‌نمایند که طی یک مجموعه تغییرات فیزیولوژیکی (ازقبیل تجمع دانه‌های نشاسته و غیره) متورم شده و تشکیل دانه گرده رسیده را می‌دهد ولی در صورت تغییر برنامه میکروسپورهای جدا شده توسط تنش می‌توانیم تولید جنین نماییم که قابل باززایی به گیاه هاپلوئید می‌باشد.



شکل ۱- مسیرهای گامتوفیتی و اسپروفیتی در میکروسپور

نقش تنش در جنین‌زایی میکروسپور

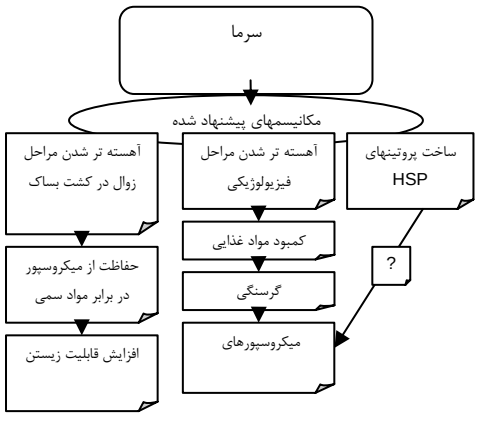
جنین‌زایی میکروسپور به توانایی سلول‌های منفرد هاپلوئید، میکروسپور، در جهت تمایز و باززایی به یک گیاه کامل بعد از قرار گرفتن در معرض تنش اطلاق می‌شود. یک عامل جرقه‌ای که تنش می‌باشد برای القاء جنین‌زایی در میکروسپور لازم است (۴۵). استفاده از تنش در شکل پیش تیمار سرمایی اولین بار روی کشت بساک‌های داتوره گزارش شده است (۴۵). شریعت پناهی و همکاران (2006a) تنش‌ها را به سه دسته مختلف تقسیم کردند (شکل۲) که شامل ۱- تنش‌هایی که به فراوانی برای القاء جنین زایی در میکروسپور مورد استفاده قرار می‌گیرند و شامل سرما، حرارتی، کمبود مواد غذایی و کلشی سین می‌باشند، ۲- تنش‌هایی که کمتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند که اشعه گاما، تنش اتانول، تیمار سانتریفیوژ، کاهش فشار اتمسفر، عامل‌های ماده‌زایی، آبسزیک اسید جزء این دسته بندی تنش‌ها می‌باشند. این تنش‌ها در تعداد کمی از گونه‌ها استفاده شده است. این تنش‌ها ممکن است برای القاء جنین‌زایی در گونه‌هایی که سخت پاسخ ده هستند، موثر باشد و ۳- تنش‌هایی که جدیداً مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل pH بالای محیط، الیگوساکارید کاراگینن (carrageenan oligosaccharides)، تنش‌های فلزهای سنگین و القاء کننده‌های شیمیایی می‌باشند. در زیر به نقش تعدادی از مهمترین تنش‌های به کار گرفته شده برای جنین‌زایی میکروسپور اشاره می‌شود.



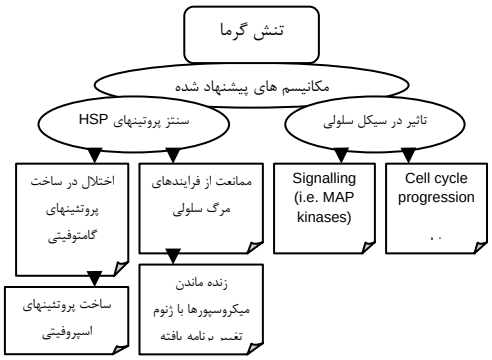
شکل۲- تنش‌های القا کننده جنین‌زایی در میکروسپور

Archive of SID

تنش سرما: گیاهان دارای جوانه، غنچه گل و سنبله می‌توانند تحت تاثیر پیش تیمار سرمایی به منظور القای جنین‌زایی میکروسپور قرار گیرند (شکل۳). در معرض قرار گرفتن سنبله‌های جدا شده و غنچه‌های گل در دمای پایین باعث القای جنین‌زایی در جو، برنج، گندم نان، گندم دوروم، تریتیکاله و مرکبات (۴۵) شده است. پیش تیمار سرما باعث کندی فرآیندهای تجزیه بافت‌های سوماتیک بساک و متعاقباً حفاظت میکروسپور در برابر ترکیبات سمی رها شده از زوال بساک می‌شود. پیش تیمار سرما همچنین باعث افزایش فراوانی مضاعف شدگی مجدد داخلی (endo-reduplication) می‌شود که طی آن هسته هاپلوئید G2 (دیپلویید) بدون انجام میتوز وارد G1 و سپس بدون توقف در G1 وارد فاز S چرخه سلولی شده و افزایش دابلد هاپلوئیدهای خودبخودی را منجر می‌شود (۳ و ۴۵). در تیمارهای سرمایی محتوای آمینو اسید آزاد بساک افزایش پیدا می‌کند که باعث سازگار شدن میکروسپور به تغییرات متابولیکی القای جنین‌زایی می‌شود (۵۸). در طول تیمار سرمایی، دو پروتین تنش گرمایی (HSP=Heat-Shock Protein)، tom66 و tom111 ممکن است برای محافظت سلول‌ها در برابر صدمات سرمایی بیان شوند (۴۰). در گندم دوروم پیش تیمار سنبله‌ها با سرما، که ممکن است منجر به تاخیر در پیری پلاستیدها گردد، باعث افزایش تولید گیاهان سبز می‌شود (۲۵).



شکل۳- تنش سرمایی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

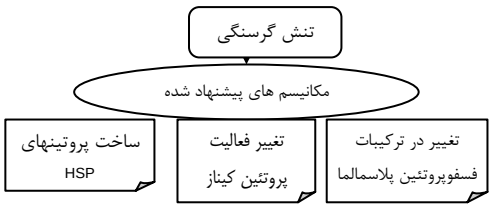


شکل۴- تنش گرمایی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

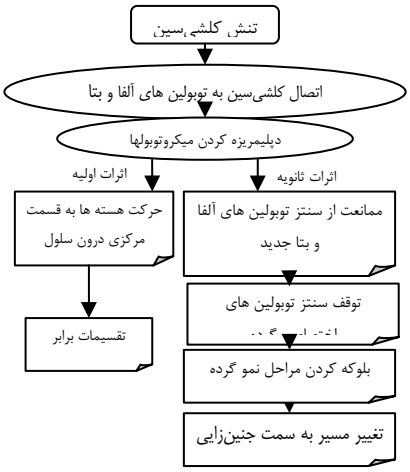
تنش گرما: پیش تیمار گرمایی معمولا در ۳۳°C تا۳۷°C برای دوره‌های زمانی متفاوت از چند ساعت تا چندین روز اعمال می‌شود (۴۶). تنش گرمایی برای القای جنین‌زایی میکروسپور در کلزا، گندم، تنباکو و بادمجان استفاده شده است (شکل۴) (۴۵). گزارش شده است تنش گرمایی باعث ایجاد تغییرات میکروتوبول و اسکلت سلولی در میکروسپورهای کشت شده کلزا می‌شود (۴۷). همانطور که انتظار می‌رود چندین پروتئین شوک گرمایی در تنش گرما ساخته می‌شوند (۴۲). در میکروسپور کلزا، تنش گرمایی منجر به مضاعف شدگی مجدد داخلی شده که باعث ورود هسته‌های هاپلوئید مرحله G2 به G1 (دیپلوئید) بدون انجام تقسیم میتوز می‌شود (۳).

تنش کمبود کربن (گرسنگی): قرار دادن میکروسپورها در محیطی که منابع کربن قابل تجزیه سریع را ندارد، به عنوان مثال محیط شامل مانیتول، همچنین با موفقیت استفاده شده است (۴۵). کمبود کربن یکی از موثرترین القا کننده‌های جنین‌زایی میکروسپور در بسیاری از گیاهان مهم مانند تنباکو، گندم، برنج، جو و سیب است (شکل۵) (۴۵). تغییرات هسته‌ای و سیتوپلاسمی در تنش کمبود کربن دیده شده، که باعث القای تمایز پلاستیدها، تاخیر در ایجاد دیواره سلول‌های رویشی، ظهور واکوئلهای بزرگ، کوچک شدن هسته‌های قطبی در سلول‌های رویشی، تغییر در کروماتین، ساختار هسته، ترکیبات فسفولیپید پلاسمالما و کاهش در اندازه هستک‌ها می‌شود (۱۰ و ۵۵). کاهش سنتز RNA و فعالیت پروتئین کیناز از مشخصه‌های کمبود کربن درکشت میکروسپور تنباکو است (۵۹).

www.SID.ir



شکل۵- تنش گرسنگی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده



شکل۶- تنش کلشی‌سین و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

تنش کلشی‌سین: کلشی سین، یک عامل دپلیمریزه کننده میکرو توبول، به عنوان یک پیش تیمار تنش استفاده شده است (۶۰). تیمار میکروسپورها با کلشی‌سین در غلظت ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۱۵ ساعت باعث القای جنین‌زایی و تولید تعداد زیادی جنین سالم با کارایی بالای تولید گیاهان دابلد هاپلوئید (۸۳ تا ۹۱درصد) می‌شود (شکل۶) (۶۱). کلشی‌سین باعث تخریب رشته‌های دوک در طی تقسیم سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد پاسخ میکروسپور به کلشی‌سین به مرحله تکوینی میکروسپور بستگی دارد بطوری‌که در کلزا بیشترین فراوانی جنین‌زایی از میکروسپورهای تک سلولی صورت می‌گیرد (۶۰). کلشی سین نشان داده است که باعث تحریک جنین‌زایی در میکروسپورهای کشت شده *B. napus*، قهوه و بساک‌های کشت شده ذرت می‌شود (۴۵). در گندم گزارش شده که تیمار میکروسپورها با کلشی‌سین باعث افزایش درصد باززایی گیاهان بارور از ۱۵ به ۵۳ درصد می‌شود (۱۳). در *B.napus* مشخص شده است که افزودن کلشیسین باعث تحریک تکامل اسپروفیتی می‌شود. با توجه به اینکه سیستم رشته‌های دوکی در اولین تقسیمات نامتقارن میتوز در میکروسپور، دخالت دارد لذا تیمار میکروسپور با کلشیسین قبل از تقسیم در محیط درون شیشه‌ای در برخی از گیاهان زراعی موجب افزایش جنین‌زایی و گیاه هاپلوئید گردیده است (۴۵). کلشی سین با اتصال به توبولین‌های الفا و بتا، باعث دیپلیمریزاسین میکروتوبول‌ها شده و متعاقبا باعث تغییر مکان هسته میکروسپورها از گوشه به وسط و القای تقسیمات متقارن و نهایتا فعال سازی مسیر اسپوروفیتی به جای مسیر گامتوفیتی می‌گردد (۴۵).

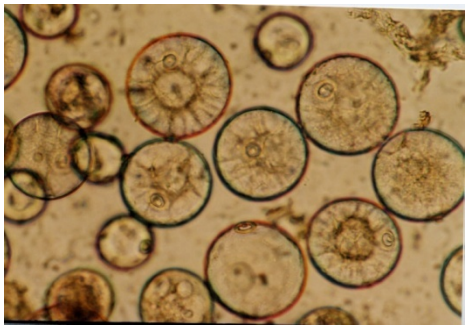
اشعه گاما اولین بار برای القاء موتانت در سلول‌های هاپلوئید (به عنوان مثال میکروسپورها) استفاده شده است، همچنین برای افزایش کارایی جنین‌زایی میکروسپور در بساک‌های کشت شده کلزا، گوجه فرنگی، داتوره و تنباکو به کار برده شده است (۴۵). اتانول به عنوان تنش القاء کننده جنین‌زایی در *B.napus* گزارش شده است (۳۳). سانتریفیوژ کردن در سرعت‌های بالا و زمان‌های طولانی به عنوان یک پیش تیمار، به طور مثال 10000-11000g در ۳۰ دقیقه، اعمال شده است (۴۵).

شناسایی میکروسپورهای جنین‌زا

تعدادی نشانگر برای تشخیص میکروسپورهای جنین‌زا وجود دارند. برخی از این نشانگرها که در گونه‌های متفاوت گیاهی شناسایی شده‌اند، عبارتند از الف- تکه تکه شدن واکوئل با تشکیل رشته‌های سیتوپلاسمی و تغییر مکان هسته از گوشه به سمت مرکز میکروسپور ب- افزایش اندازه سلول، ج- تشکیل دیواره جدید سلولی زیر دیواره سلولی میکروسپور (اگزین)، د- کاهش اندازه هسته، ه- فشردگی کروماتین، و- ظاهر شدن اجزای چند حفره‌ای، شبه لیزوزوم، ز- کاهش اندازه دانه‌های نشاسته، ح- نداشتن علائم تغییر ساختار میتوکندریایی و ط- تقسیمات برابر با دیوار مسطح به جای تقسیمات نابرابر تقسیم سلولی در میکروسپورهای گامتوفیتی (۴۵). اما هیچ کدام از این علائم به صورت یک نشانه یکسان در تمامی گونه‌ها یافت نمی‌شود. در میان این علائم ساختار ستاره‌ای شکل میکروسپور پس از اعمال تنش (۵۴) و نمایش مرکزی شدن هسته احاطه شده با ساختار ستاره‌ای رشته‌های سیتوپلاسمی (شکل ۷)، به عنوان یکی از

Archive of SID

علائم جنین‌زایی میکروسپور در گونه‌های متفاوتی مانند گندم، تنباکو، سیب و برنج دیده شده است (۴۵). بعلاوه تحقیقات اخیر با استفاده از مستندسازی کل مراحل جنین‌زایی از تک میکروسپورهای جدا شده گندم مشخص کرد که میکروسپورها با ساختارهای درونی ستاره‌ای شکلی و تقسیمات برابر سلولی، برای گسترش شروع جنین‌زایی میکروسپورهای ایزوله شده لازم می‌باشند (۱۸). در سایر گونه‌ها تنها فراوانی میکروسپورهای با تقسیمات سلولی برابر به عنوان نشانگر در نظر گرفته می‌شود (۵۱)، اگرچه نشان داده شده است که میکروسپورهای با دو سلول و اندازه یکسان می‌توانند گامتوفیتی رشد کنند (۵۶).



شکل ۷- میکروسپور جنین‌زا (ستاره‌ای شکل) در گندم

گیاهان فاقد کلروفیل (آلبینو) ناشی از میکروسپور

در غلات، استفاده از گیاهان دابلد هاپلوئید ناشی از میکروسپور به دلیل تولید گیاهان آلبینو جهت برنامه‌های اصلاحی دارای محدودیت است. گیاهان آلبینو فاقد کلروفیل و ناتوان در انجام فتوسنتز می‌باشند. آلبینوهای ایجاد شده به کرات در گونه‌های غلات مانند گندم (*Triticum aestivum*، *Triticum durum*)، برنج (*Oryza sativa*)، جو(*Hordeum vulgare*) و گیاهان علفی مانند فستوکا دیده شده است در حالی‌که با فراوانی کمتری در ذرت مشاهده شده و در گیاهان دولپه مشکلی ایجاد نمی‌کند. بیان فنوتیپی گیاهان آلبینوی ناشی از میکروسپور بستگی به عوامل گوناگونی نظیر عوامل ژنتیک و محیط دارد که برخی از آنها عبارتند از (۵۵): الف- فقدان ژن‌های مورد نیاز برای تمایز کلروپلاست و ساخت کلروفیل، ب- عدم حضور پروتین‌های کد کننده پلاستید و ج- عدم کارایی ترجمه پلاستید در دمای بالا. دست کاری در شرایط محیط کشت میکروسپور ممکن است باعث عدم ایجاد گیاهان آلبینو شود بعنوان مثال در گندم با به حداقل رساندن تیمار تنش و بهبود محیط القای جنین‌زایی می‌توان درصد گیاهان آلبینو را کاهش داد (۴۶) و همچنین در باز زایی کشت بساک‌هایی که کالوس تولید نکردند، تعداد کمی گیاه آلبینو ایجاد شد (۲۷).

بیان ژنی در طی جنین‌زایی میکروسپور

بیان ژن‌ها به طور اختصاصی در طی جنین‌زایی میکروسپور به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۷). ژن *BABY BOOM* یکی از ژن‌هایی می‌باشد که در آغاز بیان تمایز در جنین‌زایی میکروسپور نقش دارد. BBM به عنوان یکی از عوامل جدید کدکننده عامل رونویسی خانواده AP2/ERF می‌باشد که منجر به تشکیل ساختار جنین‌زایی در آرابیدوپسیس می‌شود، اما نقش این ژن در جنین‌زایی میکروسپور مشخص نیست. در طی القای تنش گرمایی در جنین‌زایی میکروسپور در کلزا، mRNA و چندین پروتئین مخصوص در پاسخ به تیمار تنش ساخته می‌شوند. چندین ژن فعال شده در طی جنین‌زایی به عنوان ژن‌های اعضای خانواده‌های متفاوت شوک حرارتی شناخته شده‌اند. تحقیقات نشان داده که سطوح بالایی از پروتئین‌های کوچک شوک گرمایی در جنین‌زایی دانه گرده تنباکو، زمانی که شوک گرمایی به کار نرفته بود، وجود داشت. سه فسفوپروتئین- b3 و NtEPb1 ,-b2 به فراوانی در جنین‌زایی میکروسپور تنباکو شناسایی شده‌اند. تغییر مسیر میکروسپور به سمت جنین‌زایی باعث تغییرات پیچیده‌ای در تنظیم ژن، ترارسانی و متابولیسم می‌شود که به نوع تنش به کار رفته بستگی دارد (۴۵).

کاربردهای جنین‌زایی و بلوغ درون شیشه‌ای میکروسپور

کشت میکروسپور علاوه بر نقش برجسته‌اش به عنوان یکی از کارآمدترین روش تولید گیاهان دابلد هاپلوئید، دارای کاربردهای زیادی از قبیل غلبه بر موانع تلاقی (نرعقیمی و خودناسازگاری)، ایجاد گیاهان نرعقیم از طریق غیر فعال کردن یا کم توان کردن آنزیم‌های دخیل در مرحله تکامل میکروسپور به دانه گرده، حفظ گیاه نر عقیم از طریق جنین‌زایی میکروسپور و امکان برگرداندن نر

www.SID.ir

Archive of SID

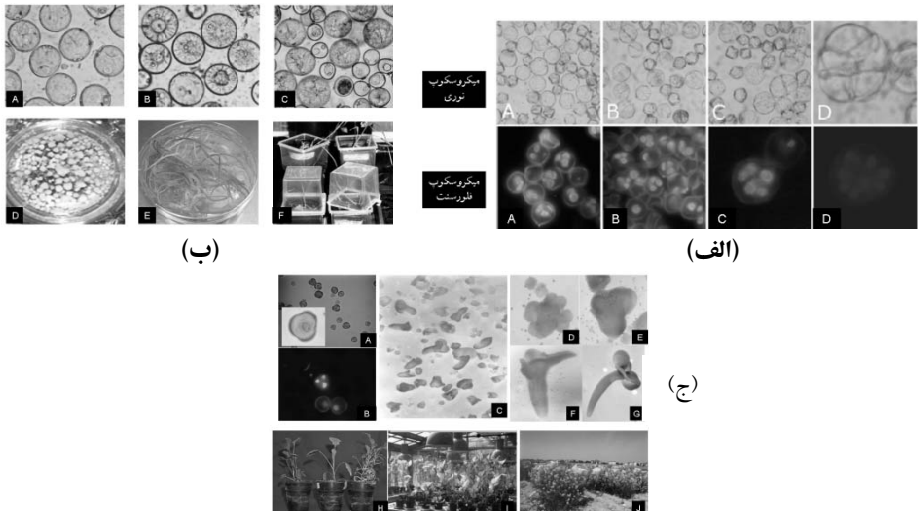
باروری از طریق بلوغ درون شیشه‌ای میکروسپور، انتقال ژن به میکروسپور با استفاده از سیستم‌های اختصاصی، امکان انجام نوترکیبی مبتنی بر تشابه (Homologous Recombination)، امکان بررسی نمو گرده و گرده‌افشانی، جنین‌زایی، توتی پوتنسی، چرخه سلولی، تغییر فاز و نقش تنش در نمو می‌باشد (۳۸و۵۵). در ادامه به برخی ازکاربردهای کشت میکروسپور بطور تفصیلی اشاره می‌گردد.

کاربرد کشت میکروسپور در تولید گیاهان دابلد هاپلوئید: با توجه به تعداد زیاد میکروسپورها در هر غنچه و امکان کشت ده‌ها هزار میکروسپور در هر پتری دیش، کشت میکروسپور به طور بالقوه توانایی تولید هزاران لاین دابلد هاپلوئید از یک غنچه را دارد و از این نظر در مقایسه با سایر روش‌های تولید هاپلوئیدی کارآمد ترین است، هر چند هنوز کارآیی بالقوه آن بالفعل نشده و مشکلاتی نیز از نظر ظهور گیاهان آلبینو در غلات دارد و در پاره‌ای از گونه‌ها نیز هنوز دستورالعمل جنین‌زایی میکروسپور شناسایی نشده است. در اشکال ۸، ۹ و ۱۰، نمونه‌هایی از جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید/دابلد هاپلوئید در گندم، گوجه فرنگی و کلزا ارایه شده است (۱و ۴۴).

کاربرد کشت میکروسپور در مطالعات علوم پایه: جنین‌زایی میکروسپور در کلزا بعنوان یک سیستم مدل برای مطالعه شروع فرآیند جنین‌زایی در گیاه مورد بهره برداری متخصصین علوم پایه قرار گرفته است (۶). اخیرا میکروسپورها بعنوان سلول‌های پرستار در باززایی گیاهان گندم بارور از زیگوت‌های جدا شده نقش موثر و کلیدی ایفا کرده‌اند (۲).

دانشمندان با استفاده توام از فناوری‌های تصویر برداری زیستی میکروسکوپی کنفوکال و جنین‌زایی میکروسپور موفق به شناسایی تعداد زیادی از پروتئین‌های دخیل در فرآیند جنین‌زایی در مراحل مختلف سنی جنین از قبیل بروز پروتئین‌های مرتبط با تنش شامل HSP90 و HSP70 بلافاصله پس از القاء جنین زایی (۴۲)، بروز ژن‌های اختصاصی اندوسپرم در فرآیند جنین‌زایی میکروسپور از قبیل ژن‌های *Esr*، *ZmAE1*، *ZmAE3* مشابه جنین‌زایی زیگوتی (۵۲)، تغییرات ایجاد شده در ترکیب دیواره سلولی و پکتین شده‌اند که این یافته‌ها قابل استفاده در فرآیند جنین‌زایی سوماتیکی و زیگوتی نیز می‌باشند (۵۲).

کاربرد کشت میکروسپور در رفع موانع خودناسازگاری درختان میوه: در درختان میوه که اغلب از نظر ژنتیکی هتروزیگوت (نا خالص) بوده و خود ناسازگاری بالایی دارند، تنها راه ممکن برای تولید گیاهان خالص روش هاپلوئیدی و بویژه کشت بساک و میکروسپور می‌باشد (۵۵). گزارشات متعددی در زمینه انجام موفقیت آمیز کشت میکروسپور در سیب، مرکبات و زیتون وجود دارد و پروژه‌های در حال انجام بر روی سایر درختان میوه (از قبیل گیلاس، هلو) نیز نتایج امیدوار کننده‌ای از نظر شروع تقسیمات اسپوروفیتی نشان می‌دهد (۵۵).



اشکال ۸، ۹ و ۱۰- مراحل مختلف جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید در گندم(الف)،گوجه فرنگی(ب) و کلزا (ج) (۱ و ۴۴)

Archive of SID

کاربرد کشت میکروسپور در تسهیل مطالعات موتاسیون: تکنیک کشت میکروسپور (چنانچه موجود باشد)، بهترین سیستم جهت کاربرد موتانت‌زایی درون شیشه‌ای (in vitro mutagenesis) و گزینش می‌باشد (۲۹). موارد موفقیت آمیز این روش به ویژه در ارتباط با کلزا و دیگر اعضاء خانواده چلیپائیان که در آنها موتانت‌های مهم متعددی از طریق تکنولوژی میکروسپور ایجاد شده‌اند، معرفی گردیده است (۲۳). از جنین‌های حاصل از میکروسپورهای تیمار شده با اشعه UV و موتاژن شیمیایی MNU لاین‌های کلزای مقاوم به علف کش گلایفوسیت و کلروسولفوران تولید شده است (۵). در ارتباط با تیمار میکروسپورها، هر دو نوع موتاژن فیزیکی و شیمیایی موفقیت آمیز گزارش شده‌اند هرچند که با توجه به سختی کار با موتاژن‌های شیمیایی به عنوان مثال در لزوم انجام مرحله شستشو میکروسپورها پس از اعمال موتاژن جهت از بین بردن بقایای موتاژن، استفاده از موتاژن‌های فیزیکی معمول‌تر است (۲۹).

کاربرد کشت میکروسپور در انتقال ژن: میکروسپور یک سلول منفرد و در دسترس در بسیاری از گونه‌ها می‌باشد که توانایی تولید گیاهان تراریخته را در دو مسیر گامتوفیتی و اسپروفیتی داراست (۵۵). گیاهان باززا شده اولیه ممکن است هاپلوئید بوده و یا اینکه پس از دو برابر کردن کروموزوم‌ها گیاه دیپلوئید خالص بدست آیند. تکنیک‌هایی که در آن انتقال ژن به میکروسپور یا دانه گرده انجام می‌شود عبارتند از: الف- انتقال بر مبنای گرده بالغ که در آن DNA قبل از گرده‌افشانی وارد دانه گرده می‌شود و قبل یا بعد از گرده‌افشانی به کلاله منتقل می‌گردد (مسیر لوله گرده)، ب- انتقال DNA از طریق تفنگ پرتاب ذره (بیولیستیک) به درون میکروسپورهای تک سلولی در فاز G1 سیکل سلولی و سپس کشت درون شیشه‌ای میکروسپورها به منظور تشکیل دانه گرده بارور و سپس گرده‌افشانی طبیعی (برون شیشه‌ای) و جمع آوری بذور تراریخته و ج- انتقال ژن به میکروسپور یا دانه‌های گرده نابالغ جنین‌زا که به وسیله تنش القا شده‌اند که در آن جنین‌زایی در میکروسپور صورت گرفته و باعث رشد جنین‌ها و گیاهان هاپلوئید تحت شرایط بهینه می‌شود.

کاربرد کشت میکروسپوردر ایجاد نرعقیمی و تولید بذور هیبرید F1: بذور هیبرید F1 بدلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد و قیمت بالا از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار هستند. برای ایجاد بذور هیبرید F1 می‌بایست دو لاین اینبرد با یکدیگر تلاقی داده شوند که برای این منظور استفاده از سیستم نرعقیمی باعث کاهش قابل ملاحظه هزینه‌ها در تولید بذور هیبرید می‌شود، اگرچه کمبود تکنولوژی‌های عمومی در جهت ایجاد نرعقیمی و برگشت پذیری نرباروری بزرگترین مانع برای استفاده از مزایای تولید بذور هیبرید F1 در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی می‌باشد. بیشترین نرعقیمی مورد استفاده نرعقیمی سیتوپلاسمی است اگرچه در بسیاری از گیاهان در دسترس نبوده و نیازمند مراحل اصلاحی مکرر می‌باشد. حال آنکه در برنامه تولید بذور هیبرید، گیاهان نرعقیم می‌توانند از طریق غیر فعال کردن یا کم توان کردن آنزیم‌های دخیل در مرحله تکامل میکروسپور به دانه گرده (ازقبیل گلوتامین سنتتاز) ایجاد گردند. حفظ گیاهان نرعقیم از طریق جنین‌زایی میکروسپور امکان پذیر است و نیازی به یافتن والد نگهدارنده نرعقیمی نیست. بعلاوه امکان برگرداندن نرباروری از طریق بلوغ درون شیشه‌ای میکروسپور(in vitro maturation) و در نهایت گرده‌افشانی آنها بطور برون شیشه‌ای (in vivo pollination) وجود دارد (۳۸).

کاربرد کشت میکروسپور در ردیابی ژنی: ردیابی ژنی (Gene targeting) بوسیله نوترکیبی مبتنی بر تشابه (Homologous Recombination) از ابزارهای ژنتیکی جدید است که امکان الحاق ژن خارجی در مکان‌های ژنومی از پیش تعیین شده را در انتقال ژن میسر می‌سازد (۳۶). ردیابی ژنی بطور کارآمد و موفقیت آمیزی در باکتری‌ها و مخمر اتفاق می‌افتد و در یوکاریوت‌های پیشرفته نیز از قبیل مگس سرکه (Drosophila)، موش و سلول‌های سوماتیکی انسان به عنوان ابزاری توانمند قابل دسترس و بهره‌برداری است (۳۷). نوترکیبی مبتنی بر تشابه (HR) در گیاهان گلدار تاکنون ناکارآمد بوده است و در فراوانی بسیار پایینی بین T-DNA و DNA گیاه میزبان اتفاق افتاده است (۳۷). هرچند گزارشات موفقی نیز از ردیابی ژنی (Gene targeting) در Moss گزارش شده بطوریکه ژن Physcomitrella بطور کارآمدی در

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های کلرونما جایگزین شده است که در مرحله گامتوفیتی (هاپلوئید) بوده و در فاز G2 چرخه سلولی متوقف شده‌اند(۴۱). لذا دانشمندان، گامتوفیت نر گیاهان را جهت انجام موفقیت آمیز نوترکیبی مبتنی بر تشابه (HR) پیشنهاد نموده‌اند. میکروسپورهای گیاهان عالی شباهت‌های زیادی به Moss دارند چراکه هاپلوئید بوده و سلول‌های گامتوفیتی‌اند که امکان توقف در مرحله G2 چرخه سلولی را نیز دارند. به این دلایل در سال‌های اخیر آزمایشات زیادی در این زمینه آغاز شده و اولین گزارش موفقیت آمیز نوترکیبی مبتنی بر تشابه (HR) در گیاه تنباکو با استفاده از کشت دانه گرده نارس (در مرحله ابتدای دو–هسته‌ای) معرفی گردیده است (۳۷). پیش بینی می‌شود با توسعه فن‌آوری نوترکیبی مبتنی بر تشابه (HR) به سایر گیاهان از طریق استفاده از میکروسپور بتوان کارآیی و میزان موفقیت هدفمند را در پروژه‌های انتقال ژن ارتقاء بخشید.

نتایج

با توجه به مباحث بالا، مشخص گردید که جنین‌زایی میکروسپور صرفاً یک روش تولید گیاهان دابلد هاپلوئید نبوده بلکه در مطالعات پایه نیز کاربرد فراوانی دارد. میکروسپور به عنوان یک سلول با پتانسیل توسعه محدود، می‌تواند با اعمال تنش به یک سلول جنین‌زا تغییر برنامه دهد. تجزیه‌های مولکولی، فیزیولوژیکی، بیولوژی سلولی و بیوشیمیایی باعث افزایش اطلاعات در مراحل برنامه نویسی مجدد سلولی می‌شود (۵۵).

انتخاب تنش القا کننده جنین‌زایی در میکروسپور به فراوانی میکروسپورهای جنین‌زا، توانایی همه جانبه و کاربردی بودن آنها بستگی دارد. برای مثال درصورتی‌که تیمار سرمایی دارای کارایی یکسانی نسبت به کلشی‌سین یا اشعه گاما باشد، تیمار کلاسیک سرما نسبت به دو تیمار دیگر به دلیل اینکه این تکنیک‌ها نیاز به بررسی و ابزار بیشتر دارند ترجیح داده می‌شود. بعلاوه برای کم کردن اثرات تنش بایستی از آنها در کمترین حد ممکن استفاده شود (۴۵). هنوز مشخصه‌ای که نشانگر علائم جنین‌زایی میکروسپور در تمامی گونه‌ها باشد دقیقاً معلوم نیست، با این وجود شکل ستاره‌ای میکروسپورها در گندم، تنباکو، سیب و برنج نشانه جنین‌زایی می‌باشد ولی میکروسپورهای جنین‌زای کلزا ساختار سیتوپلاسم ستاره‌ای ندارند و افزایش اندازه سلول و تقسیمات منظم را به عنوان علائم القا جنین‌زایی نشان می‌دهند (۴۵).

آخرین پیامد، بیان ژن در طی القای جنین‌زایی میکروسپور می‌باشد. بیان دقیق ژن در طول القای جنین‌زایی میکروسپور به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است، اگرچه چند ژن به عنوان تنظیم کننده جنین‌زایی میکروسپور گزارش شده اما تاکنون هیچ علائم ژنی مبنی بر تاثیر مستقیم بر جنین‌زایی و برنامه نویسی مجدد میکروسپور موجود نیست. بنابراین هنوز در سطح مولکولی برنامه نویسی مجدد میکروسپور، اطلاعات کاملی در دسترس نمی‌باشد (۳۲).

منابع

۱. عنایتی شریعت پناهی م، احمدی م، شکیب ع م، حسین پور ب، دبیر اشرافی ا (۱۳۸۶) تهیه و ارزیابی لاینهای دابلد هاپلوئید از ژنوتیپ‌های F1 در کلزا از طریق کشت میکروسپور، انتشارات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ۲۹–۳۷

2. Bakos F, Darkó É, Pónya Z and Barnabás B (2003) Regeneration of fertile wheat (Triticum aestivum L.)plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells. Plant Cell Tiss Org Cult 74:243–247

3. Binarova P, Straatman K, Hause B, Hause G and van Lammeren AMM (1993) Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of Brassica napus L. Theor Appl Genet 87: 9-16

4. Blakeselee, A F, Belling J, Farnham ME and Bergner AD (1922) A haploid mutant in the jimson weed, Datura stramonium. Science 55: 646-647

5. Conner, A.J., D.S.Abernethy, F.Dastgbeib and R.J.Field, 1995. Brassica napus mutants with increased chlorusfuron resistance .

6. Custers JBM, Cordewener JHG, Fiers MA, Massen BTH, van Lookeren Campagne MM Liu CM (2001) Androgenesis in Brassica. A model system to study the initiation of plant embryogenesis. In: Bhojwani SS, Soh WY (eds) Current Trends in the Embryology of Angiosperms. Kluwer, Dordrecht, pp 451–470

7. Dunwell JM (1996) Microspore culture. In: Mohan Jain, Sopory, S.K. and Veilleux, R.E. (eds), In vitro Haploid production in Higher plants. Vol.l.K1uwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 205-216.

Archive of SID

8. Ferrie AMR, Palmer CE and Keller WA (1995) Haploid embryogenesis. In: TA (ed) In vitro Embryogenesis in Plants, Vol 20, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 309-344
9. Forster BP and Thomas WTB (2003) Doubled haploids in genetic mapping and genomics. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 367-390
10. Garrido D, Vicente O, Heberle-Bors E and Isabel Rodriguez-Garcia M (1995) Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of Nicotiana tabacum. Protoplasma 186: 220-230
11. Guha S and Maheshvari SC (1964) In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature 204: 497
12. Guha S and Maheshvari SC (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura in vitro. Nature 212: 97-98
13. Hansen NJP and Andersen SB (1998) In vitro chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (Triticum aestivum L.). Euphytica 102: 101-108
14. Heberle-Bors E (1989) Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex Plant Reprod 2:1-10
15. Herberle-Bors E (1985) In vitro haploid formation from pollen: a critical review. Theor Appl Genet 71: 361-374
16. Horlow C, Hamza S, Chupeau Y and Pelletier G (1996) Conditional lethal markers: spontaneous haploid selection. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 297-316
17. Hosp J, Maraschin SF, Touraev A and Boutilier K (2006) Functional genomics of microspore embryogenesis. Euphytica 158:275-285
18. Indrianto A, Barinova J, Touraev A and Heberle-Bors E (2001) Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212: 163-174
19. Kasha kJ (1974) Haploid in Higher Plants: Advances and potential (proceedings of the 1st Internation Symposium). University of Guelph, Canada.

20. Kasha KJ and seguin-swartz G (1983) Haploidy in crop improvement. In: M.S. swaminathan, p.k. Gupta and U.Sinha (ed), Cytogentics of Crop Plants, p:591. Macmillan India Limited, New Dehli.

21. Kasha KJ and Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.). Nature 225:874-876
22. Kasha KJ and Maluszynski M (2003) Production of doubled haploids in crop plants; an introduction. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 5-14

23. Kott, LS (1998) Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed Brassica napus. AgBiotech News and Information, 10(3): 69N-74N .

24. Kumar De k (1995) An Introduction to Plant Tissue Culture. New Central Book LTD.P :185 Agency
25. Labbani Z, Richard N, De Buyser J and Picard E (2005) Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pre-treatment. C R Biol 328: 713-723
26. Laurie DA and Bennett MD (1988) The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Theor Appl Genet 76: 393-397
27. Liang GH, Xu A and Hoang T (1987) Direct generation of wheat haploids via anther culture. Crop Science 27:336-339
28. Logue SJ (1996) Genetic stability in microspore-derived doubled haploids. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-51
29. Maluszynski M (2003) Doubled Haploid Production in Crop Plants. 351- 361. IAEA. Printed in the Netherlands.

30. Matzk F and Mahu A (1994) Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. Plant Breeding, I 13 : 125 - 129
31. Mohan jain S, Sopory SK and Veilleux RE (1996) In vitro Haploid Production in Higher Plants. Voluml-4, kluwer Academic Publishers.

32. Muñoz-Amatriaín M, Svensson JT, Castillo AM, Cistué L, Close TJ and Vallés MP (2009) Expression Profiles in Barley MicrosporeEmbryogenesis(Editors: Touraev A, Froster BP and Monan Jain). Springer Publications. ISBN 978-1-4020-8853-7. pp.127-134.

33. Pechan PM, and Keller WA (1988) Identification of potentially embryogenic microspores in Brassica napus. Physiology of Plant, 74: 377-384.

34. Pickering RA, and Devaux P (1992) Haploid production approaches and use in plant breeding. In: Genetics, Biochemistrv, Molecular Biology and U.K. CAB InternationaL ed., Shewry, P.R. Barley, pp. 519-547.

35. Pierik R1M (1997) In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, P:344
36. Reiss B (2003) Homologous recombination and gene targeting in plant cells. Intern Rev Cytol 28:85–139
37. Resh T, Ankepe E, Badur R, Reiss B, Heberle-Bors E and Touraev A (2009) Immature Pollen as a Target for Gene Targeting. In: Advances in Haploid Production in Higher (Editors: Touraev A, Froster BP and Monan Jain). Springer Publications. ISBN 978-1-4020-8853-7. pp.307-317.

38. Ribarits A, Mamun ANK, Li S, Resch T, Fiers M, Heberle-Bors E, Liu CM and Touraev A (2007) Combination of reversible male sterility and doubled

www.SID.ir

haploid production by targeted inactivation of cytoplasmic glutamine synthetase in developing anthers and pollen. Plant Biotechnology Journal 5: 483-494
39. Röber FK, Gordillo GA and Geiger HH (2005) In vivo haploid induction in maize – Performance of new inducers and significance of doubled haploid line in hybrid breeding. Maydica 50:275–284
40. Sabehat A, Lurie S and Weiss D (1998) Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. Plant Pysiol 117: 651-658
41. Schaefer DG and Zryd J-P (1997) Efficient gene targeting in the moss Physcomitrella patens. Plant J11:1195–1206
42. Segui-Simarro JM, Testillano PS and Risueno MC (2003) HSP70 and HSP90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in Brassica napus L. J Struc Biol 142: 379-391
43. Sestili S and Ficcadeni N (1996) Irradiated pollen for haploid production. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 263-274
44. Shariatpanahi ME (2006) Microspore embryogenesis in wheat (Triticum estivum L), Tomato(Lyeopericon esculentum MILL) AND Arabidopsis thaliana, PhD thesis, Vienna university, p 63-81
45. Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E and Touraev A (2006a) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiol Plant 127:519-534
46. Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E and Touraev A (2006b) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (Triticum aestivum L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Rep. 25: 1294-1299.

47. Simmonds DH and Keller WA (1999) Significance of preprophase bands of microtubuls in the induction of microspore embryogenesis of Brassica napus. Planta 208: 383-391
48. Snape JW and Simpson E (1981) The genetic expectation of doubled haploid lines derived from different filial generations. Theor. Appl. Genet. 60:123-128.

49. Sunderland N and Huang B (1987) Ultrastructural aspects of pollen dimorphism. International Review of Cytology 107: 175-220.

50. Szarejko I (2003) Doubled haploid mutant production. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 351-361
51. Telmer CA, Newcom W and Simmonds DH (1993) Microspore development in Brassica napus and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. Protoplasma 172: 154-165

52. Testillano PS and Risueño MC (2009) Tracking Gene and Protein Expression During Microspore Embryogenesis by Confocal Laser Scanning Microscopy(Editors: Touraev A, Froster BP and Monan Jain). Springer Publications. ISBN 978-1-4020-8853-7. pp.339- 347.

53. Thomas WTB, Forster BP and Gertsson B (2003) Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 337-349
54. Touraev A, Ilham A, Vicente O and Heberle-Bors E (1996) Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Rep 15: 561-565
55. Touraev A, Pfosser M and Heberle-Bors E (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv Bot Res 35: 53-109
56. Touraev A, Stöger A, Voronin V and Heberle-Bors E (1995) Maintenance of gametophytic development after symmetrical development in tobacco microspore culture. Sex Plant Reprod 9: 209-215
57. Touraev A, Vicente O and Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends Plant Sci 2: 297–302
58. Xie JH, Gao MW, Liang ZQ, Shu QY, Cheng XY and Xue QZ (1997) The effect of cool-pretreatment on the isolated microspore culture and the free amino acid change of anthers in japonica rice (Oryza sativa L.). J Plant Physiol 151: 79-82
59. Zarsky V, Rihova L and Tupy J (1990) Biochemical and cytological changes in young tobacco pollen during in vitro starvation in relation to pollen embryogenesis. In: Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer,Dordrecht Boston London, pp 228-233
60. Zhao JP, Simmonds DH and Newcomb W (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of Brassica napus L. cv. Topas. Planta 198: 433-439
61. Zhou WJ, Hagbery P and Tang GX (2002) Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring Brassica napus. Euphytica 128: 27-34