

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

### نباتات

مهران عنایتی شریعت پناهی<sup>۱</sup>، داود امامی میبدی<sup>۲</sup>

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج

\*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

( ) - تاریخ پذیرش: ( ) - تاریخ دریافت:

### چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید/دابلد هاپلوئید باعث سرعت بخشیدن به برنامه‌های به نژادی، بهبود کارآبی انتخاب، شناسایی همیستگی 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 فرعی از طریق جنین‌زایی میکروسپور، امکان برگرداندن نرباروری 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 تاریخته 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 اسپوروفتی ( $n=2$ )، هاپلوئیدها همچنین می‌توانند به دلیل دارا بودن فقط کروموزم‌های یک ژنوم، مونوپلوئید ( $X$ ) نامیده شوند. در گونه‌های پلی‌پلوئید، هاپلوئیدها به دلیل داشتن بیش از یک ژنوم، پلی هاپلوئید نامیده می‌شوند. گیاه هاپلوئید حاصل از یک اتوترپلوئید ( $X^4$ ) با چهار سری از یک ژنوم اصولاً یک دای هاپلوئید نامیده می‌شود (زیرا  $n=2X$ ). ذکر این نکته ضروری است که وقتی تعداد کروموزوم‌های یک هاپلوئید دو برابر می‌شود، آن را باید دابلد هاپلوئید (DH) بنامیم نه یک دای هاپلوئید.

بیشترین واریته‌ها به ترتیب در گیاهان جو (۹۶ واریته)، کلزا (۴۷ واریته) و گندم (۲۰ واریته) گزارش شده است (۵۳).

سیستم هاپلوئیدی مزایای زیادی برای عملکرد تکنیک‌های موتاسیونی در اصلاح گیاه و بهبود ژرم پلاسم ایجاد می‌کند (۵۰). خیلی از این مزایا بر پایه این حقیقت است که ژنتیک پهنه‌ای از نسبت‌های تفرق ژنتیکی در یک جمعیت دابلد هاپلوئیدی معادل گامتها می‌باشد. کاربرد دابلد هاپلوئیدها برای القا و انتخاب چهیده‌ها (موتانت‌ها) دارای مزایایی مانند امکان جداسازی چهیده‌های مغلوب در اولین نسل پس از تیمار جهش‌زنی، تشییت سریع ژنتیک‌های چهیده شده که باعث کاهش زمان در تولید لاین‌های چهیده خالص می‌شود، افزایش کارایی انتخاب چهیده‌های مطلوب به دلیل تفرق گامتی (۱:۱) دربرابر 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) می‌تواند 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 شده دابلد هاپلوئیدی سریعترین مسیر هموزیگوتی می‌باشد و همچنین امکان تولید جمعیت دابلد هاپلوئید، استخراج DNA، غربال توسط نشانگرهای ایجاد نقشه‌های ژنتیکی بعد از دو سال از تلاقی اولیه و بدون در نظر گرفتن گونه گیاهی، مقدور می‌باشد (۹).

یک دای هاپلوئید، به خاطر ظاهر دو سری کروموزم از چهار سری در اتوترتاپلوئید خالص نیست، در حالی که یک دابلد هاپلوئید حاصل از یک مونوپلوئید یا آلوپلوئید کاملاً خالص می‌باشد (۲۲).

Datura stramonium هاپلوئیدها در گیاهان برای اولین بار در L تشخیص داده شدند که به وسیله بلکسلی و همکاران گزارش گردید (۴). تولید جنین و گیاه هاپلوئید به وسیله کشت ساک، اولین بار در سال ۱۹۶۶ و ۱۹۶۴ Datura گزارش شده است (۱۱) 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 کروموزوم‌های 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 آندوزنی 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) می‌باشد.

بر اساس آخرین آمار منتشره تا سال ۲۰۰۳، بیش از ۲۰۰ واریته با استفاده از روش‌های مختلف دابلد هاپلوئیدی تولید شده که

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 هاپلوبیوت نخواهد بود و گاهی که از دیواره بساک تولید می‌شود هاپلوبیوت نخواهد بود و گاهی اوقات نیز کروموزم‌های گیاهان هاپلوبیوت حاصل از کشت بساک به طور خود به خودی مضاعف می‌شوند و تولید هاپلوبیوت مضاعف (دابلد هاپلوبیوت) 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 میکروسپورها 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 هاپلوبیوت 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- شناس باززایی گیاهان دیپلوبیوت اسپوروفیتی به دلیل حذف بافت‌های دیپلوبیوتی 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 آنдрوزن، 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 موتازن و بررسی موتاسیون‌ها، ۸- استفاده از روش‌های انتقال ژن بطور مستقیم بر روی میکروسپورها، ۹- در کشت میکروسپور، اغلب تبدیل مستقیم میکروسپور به جنین

روش‌های تولید گیاهان هاپلوبیوت هاپلوبیوت‌ها بر اساس مسیری که از آن منشا می‌گیرند به هاپلوبیوت‌های خود بخودی (۱۶)، هاپلوبیوت‌های ایجاد شده از سلول تخمرا یا گامتوفیت ماده (۵۵)، هاپلوبیوت‌های حاصل از کشت جنین و تلاقي‌های دور (۲۱، ۲۶، ۳۰ و ۳۹)، هاپلوبیوت‌های ایجاد شده از گرده‌افشانی با دانه‌های گرده پرتوتابی شده (۴۳) و هاپلوبیوت‌های حاصل از میکروسپور یا دانه‌های گرده نارس (۵۵ و ۵۷) تقسیم می‌شوند.

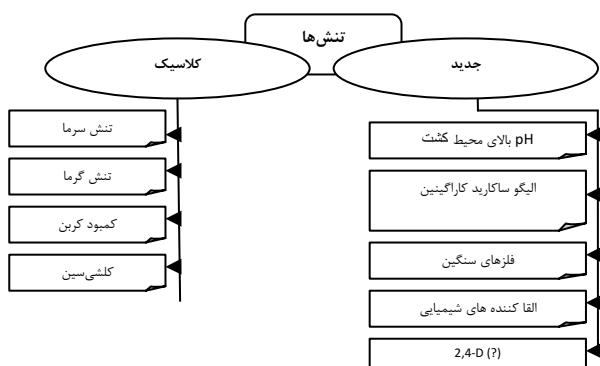
### کشت بساک و میکروسپور

کشت بساک از نظر تکنیکی ساده است و در برنامه‌های اصلاحی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است و محققین زیادی با به کارگیری این روش موفق به تولید گیاهان هاپلوبیوت در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شده‌اند (۵۵). اولین بار در گیاه *Datura innoxia* با کشت بساک در شرایط درون شیشه گیاه هاپلوبیوت 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 هاپلوبیوت تبدیل می‌شوند (۲۴). مرحله زمانی برداشتن بساک‌ها برای القای هاپلوبیوتی 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 میتوуз 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 ژنتیکی قوی و تغییرات گامتولکلولی در کشت‌های بساک تهدیدی عملی برای این روش می‌باشد (۸ و ۲۸). جذب مواد غذایی به

### 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 بساق‌های داتوره گزارش شده است (۴۵). شریعت پناهی و همکاران (2006a) تنش‌ها را به سه دسته مختلف تقسیم کردند (شکل ۲) 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، آبزیک 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 کشت، الیگوساکارید کاراگین (carrageenan oligosaccharides)، تنش‌های فلزهای سنگین و القاء کننده‌های شیمیایی می‌باشند. در زیر به نقش تعدادی از مهمترین تنش‌هایی به کار گرفته شده برای جنین‌زایی میکروسپور اشاره می‌شود.

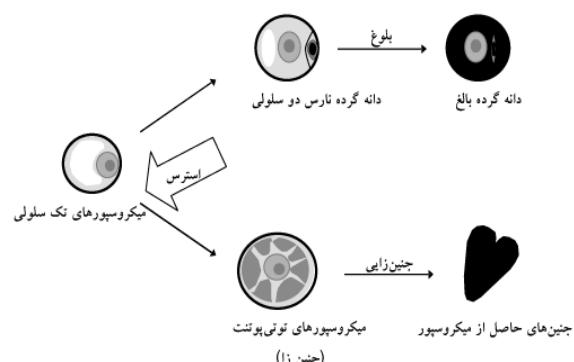


شکل ۲- تنش‌های القاء کننده جنین‌زایی در میکروسپور

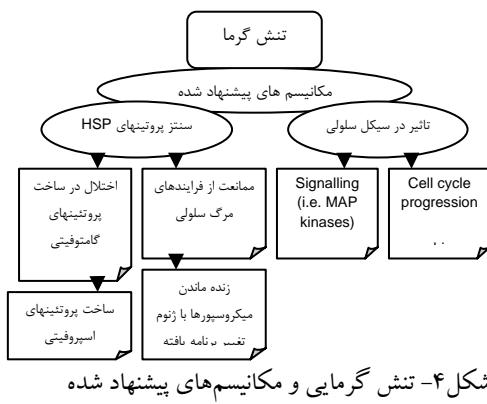
اتفاق می‌افتد لذا تنوع گامتوکلونی صورت نمی‌گیرد و ۱۰- میسر بودن جداسازی سلول‌های مرده و زنده به وسیله دور سانتریفیوژ. کشت میکروسپور بهترین سیستم برای بررسی کاربرد جهش درون شیشه‌ای و انتخاب آنها است (۵۰). به دلیل کشت تک سلول میکروسپور، امکان تولید گیاهان تاریخته با کارایی بیشتری وجود دارد (۵۵). گیاهان تاریخته حاصل از انتقال ژن به میکروسپور، پس از دوباره 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 (شکل ۱). عبارتی میکروسپورها چه در محیط طبیعی (داخل بساق‌ها) 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 (از قبیل 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 گامتوفتی و اسپروفیتی در میکروسپور

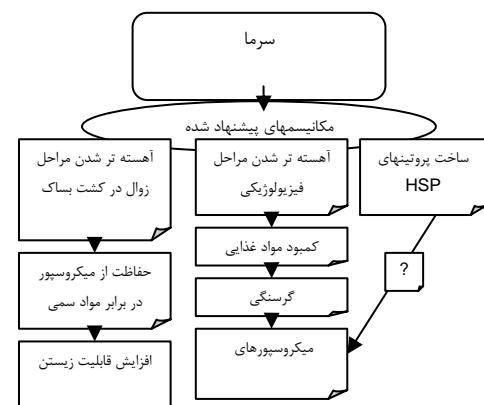


شکل ۴- تنش گرمایی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

تشن گرمایی: پیش تیمار گرمایی معمولاً در  $33^{\circ}\text{C}$  برای دوره‌های زمانی متفاوت از چند ساعت تا چندین روز اعمال می‌شود (۴۶). تنش گرمایی برای القای جنین زایی میکروسپور در کلزا، گندم، تنباقو و بادمجان استفاده شده است (شکل ۴) (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 گرمایی منجر به مضاعف شدگی مجدد داخلی شده است که باعث ورود هسته‌های هاپلوئید مرحله G1 به G2 (دیپلولید) بدون انجام تقسیم می‌شود (۳).

تشن کمبود کربن (گرسنگی): قرار دادن میکروسپورها در محیط 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 جنین زایی میکروسپور در بسیاری از گیاهان مهم مانند تنباقو، گندم، برنج، جو و سیب است (شکل ۵) (۴۵). تغییرات هسته‌ای و سیتوپلاسمی در تشن کمبود کربن دیده شده، که باعث القای تمایز پلاستیدها، تاخیر در ایجاد دیواره سلولی روشی، ظهور واکوئلهای بزرگ، کوچک شدن هسته‌های قطبی در سلول‌های روشی، 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 در کشت میکروسپور تنباقو است (۵۹).

تشن سرما: گیاهان دارای جوانه، غنچه گل و سنبله می‌توانند تحت تاثیر پیش تیمار سرمایی به منظور القای جنین زایی میکروسپور قرار گیرند (شکل ۳). در معرض قرار گرفتن سنبله‌های جدا شده و غنچه‌های گل در دمای پایین باعث القای جنین زایی در جو، برنج، گندم نان، گندم دوروم، تریتیکاله و مرکبات 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 (دیپلولید) 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 جنین زایی می‌شود (۵۸). در طول تیمار سرمایی، دو پروتئین تشن گرمایی (HSP=Heat-Shock Protein) 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).



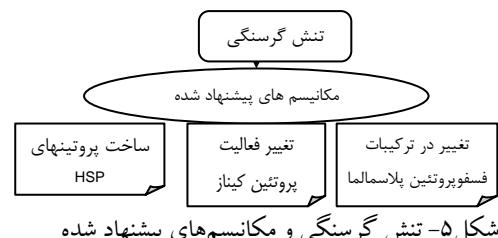
شکل ۳- تنش سرمایی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

در میکروسپور، دخالت دارد لذا تیمار میکروسپور با کلشیسین قبل از تقسیم در محیط درون شیشه‌ای در برخی از گیاهان زراعی موجب افزایش جنین‌زاوی و گیاه هاپلولید گردیده است (۴۵). کلشی سین با اتصال به توبولین‌های الفا و بتا، باعث دیپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها شده و متعاقباً باعث تغییر مکان هسته میکروسپورها از گوشه به وسط و القای تقسیمات متقارن و نهایتاً فعال سازی مسیر اسپوروفیتی به جای مسیر گامتوفیتی می‌گردد (۴۵).

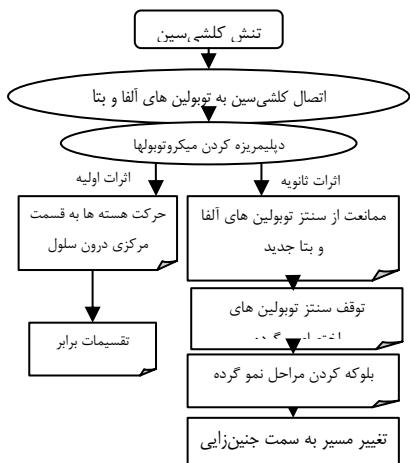
اشعه گاما اولین بار برای القاء موتانت در سلول‌های هاپلولید (به عنوان مثال میکروسپورها) استفاده شده است، همچنین برای افزایش کارایی جنین‌زاوی میکروسپور در بساک‌های کشت شده کلزا، گوجه فرنگی، داتوره و تنباقو به کار برده شده است (۴۵). اتانول به عنوان تنش القاء کننده جنین‌زاوی در *B.napus* گزارش شده است (۳۳). سانتریفیوژ کردن در سرعت‌های بالا و زمان‌های طولانی به عنوان یک پیش تیمار، به طور مثال ۱۱۰۰۰-۱۰۰۰۰ g در ۳۰ دقیقه، اعمال شده است (۴۵).

### شناسایی میکروسپورهای جنین‌زا

تعدادی نشانگر برای تشخیص میکروسپورهای جنین‌زا وجود دارند. برخی از این نشانگرهای که در گونه‌های مختلف 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 لیزوژوم، 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



شکل ۵- تنش گرسنگی و مکانیسم‌های پیشنهاد شده



شکل ۶- تنش کلشی سین و مکانیسم‌های پیشنهاد شده

**تشن کلشی سین:** کلشی سین، یک عامل دیپلیمریزه کننده میکروتوبول، به عنوان یک پیش تیمار تنش استفاده شده است (۶۰). تیمار میکروسپورها با کلشی سین در غلظت ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۱۵ ساعت باعث القای جنین‌زاوی و تولید تعداد زیادی جنین سالم با کارایی بالای تولید گیاهان دابلد هاپلولید (۸۳ تا ۹۱ درصد) می‌شود (شکل ۶) (۶۱). کلشی سین باعث تخریب رشته‌های دوک در طی تقسیم سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد پاسخ میکروسپور به کلشی سین به مرحله تکوینی میکروسپور بستگی دارد بطوری که در کلزا بیشترین فراوانی جنین‌زاوی از میکروسپورهای تک سلولی صورت می‌گیرد (۶۰). کلشی سین نشان داده است که باعث تحریک جنین‌زاوی در میکروسپورهای کشت شده *B.napus*، قهوه و بساک‌های کشت شده ذرت می‌شود (۴۵). در گندم گزارش شده که تیمار میکروسپورها با کلشی سین 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 اسپوروفیتی می‌شود. با توجه به اینکه سیستم رشته‌های دوکی در اولین تقسیمات نامتقارن میتوز

ممکن است باعث عدم ایجاد گیاهان آلبینو شود بعنوان مثال در گندم با به حداقل رساندن تیمار تنش و بهبود محیط القای جنین زایی 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).

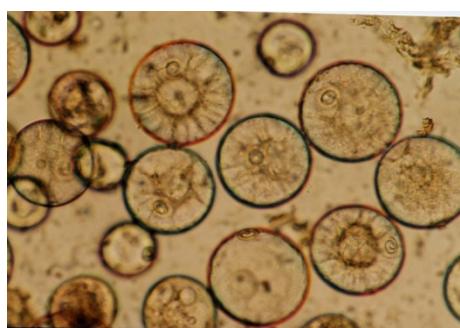
### بيان ژنی در طی جنین زایی میکروسپور

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

### کاربردهای جنین زایی و بلوغ درون شیشه‌ای میکروسپور

کشت میکروسپور علاوه بر نقش بر جسته‌اش به عنوان یکی از کارآمدترین روش تولید گیاهان دابلد هاپلوفید، 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 جنین زایی میکروسپور و امکان برگرداندن نر

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



شکل ۷- میکروسپور جنین زا (ستاره‌ای شکل) در گندم

### گیاهان فاقد کلروفیل (آلbinو) ناشی از میکروسپور

در غلات، استفاده از گیاهان دابلد هاپلوفید ناشی از میکروسپور به دلیل تولید گیاهان آلبینو جهت برنامه‌های اصلاحی دارای محدودیت است. گیاهان آلبینو فاقد کلروفیل و ناتوان در انجام فتوستز می‌باشند. آلبینوهای ایجاد شده به کرات در گونه‌های غلات مانند گندم (*Triticum durum*, *Triticum aestivum*), برجی (*Oryza sativa*) و گیاهان علفی مانند *Hordeum vulgare* (جو)، *Festuca* (فستوکا) دیده شده است در حالی که با فراوانی کمتری در ذرت مشاهده شده و در گیاهان دولپه مشکلی ایجاد نمی‌کند. بیان فتوستز گیاهان آلبینو ناشی از میکروسپور بستگی به فاکتورهای گوناگونی نظری فاکتورهای ژنتیک و محیط دارد که برخی از این فاکتورها عبارتند از (۵۵): الف- فقدان ژن‌های مورد نیاز برای تمايز کلروپلاست و ساخت کلروفیل، ب- عدم حضور پروتئین‌های کد کننده پلاستید و ج- عدم کارایی ترجمه پلاستید در دمای بالا. دست کاری در شرایط محیط کشت میکروسپور

قرار گرفته است (۶). اخیرا ميکروسيپورها بعنوان سلولهای پرستار در باززایی گیاهان گندم بارور از زیگوت‌های جدا شده نقش موثر و کلیدی ایفا کرده‌اند (۲).

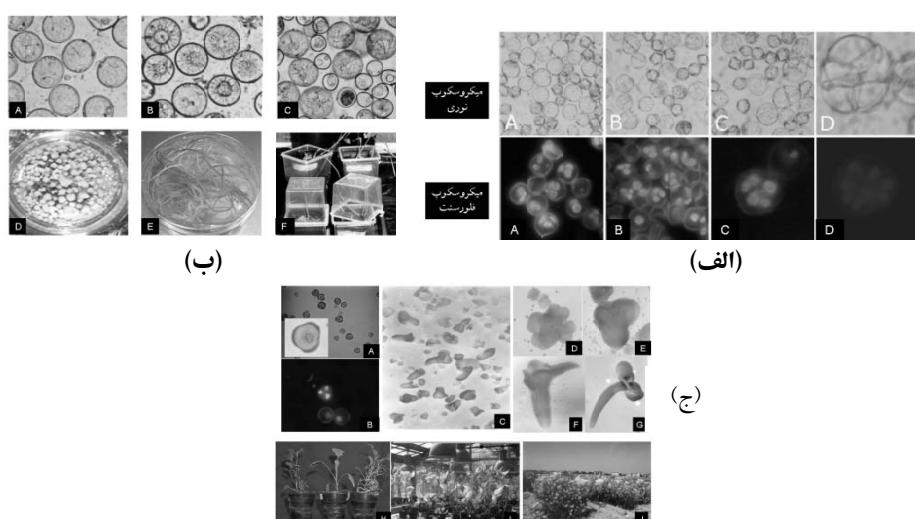
دانشمندان با استفاده توام از فناوری‌های تصویر برداری زیستی ميکروسكوبی کنفوکال و جنين‌زايى ميکروسيپور موفق به شناسایي تعداد زيادی از پروتئين‌های دخیل در فرآيند جنين‌زايى در مراحل مختلف سنی جنين از قبیل بروز پروتئین‌های مرتبط با تنش شامل HSP90 و HSP70 بالاچاله پس از القاء جنين‌زايى (۴۲)، بروز ژن‌های اختصاصی اندوسپرم در فرآيند جنين‌زايى ميکروسيپور از قبیل ژن‌های ZmAE3، ZmAE1، Esr، مشابه جنين‌زايى زیگوتی (۵۲)، تغييرات ايجاد شده در تركيب ديواره سلولی و پكتين شده‌اند که اين يافته‌ها قابل استفاده در فرآيند جنين‌زايى سوماتيکی و زیگوتی نيز می‌باشند (۵۲).

كاربرد کشت ميکروسيپور در رفع موانع خودناسازگاري درختان میوه: در درختان میوه که اغلب از نظر ژنتيکي هتروزیگوت (ناخالص) بوده و خود ناسازگاري بالايي دارند، تنها راه ممکن برای توليد گیاهان خالص روش هاپلوييدی و بویژه کشت بساک و ميکروسيپور می‌باشد (۵۵). گزارشات متعددی در زمينه انجام موقعيت آميز کشت ميکروسيپور در سيب، مرکبات و زيتون وجود دارد و پروژه‌های در حال انجام بر روی ساير درختان میوه (از قبیل گیلاس، هلوا) نيز نتایج اميدوار کننده‌ای از نظر شروع تقسيمات اسپوروفيتی نشان می‌دهد (۵۵).

باروري از طریق بلوغ درون شیشه‌ای ميکروسيپور، انتقال ژن به ميکروسيپور با استفاده از سیستم‌های اختصاصی، امكان انجام نوترکیبی مبتنی بر تشابه (Homologous Recombination)، امكان بررسی نمو گرده و گرده‌افشانی، جنين‌زايى، توئی پوتنسی، چرخه سلولی، تغيير فاز و نقش تنش در نمو می‌باشد (۳۸ و ۵۵). در ادامه به برخی از کاربردهای کشت ميکروسيپور بطور تفصيلي اشاره می‌گردد.

كاربرد کشت ميکروسيپور در توليد گیاهان دابلد هاپلوييد: با توجه به تعداد زياد ميکروسيپورها در هر غنچه و امكان کشت دهها هزار ميکروسيپور در هر پتری ديش، کشت ميکروسيپور به طور بالقوه توانايي توليد هزاران لain دابلد هاپلوييد از يك غنچه را دارد و از اين نظر در مقاييسه با ساير روش‌های توليد هاپلوييدی کارآمد ترین است، هر چند هنوز کارآيی بالقوه آن به بالفعل تبديل نشده و مشكلاتي نيز از نظر ظهور گیاهان آلينو در غلات دارد و در پارهای از گونه‌ها نيز هنوز دستورالعمل جنين‌زايى ميکروسيپور شناسایي نشده است. در اشكال ۹، ۸ و ۱۰، نمونه‌هایی از جنين‌زايى ميکروسيپور و باززایي گیاهان هاپلوييد/دابلد هاپلوييد در گندم، گوجه فرنگی و كلزا ارایه شده است (۱۰ و ۴۴).

كاربرد کشت ميکروسيپور در مطالعات علوم پايه: جنين‌زايى ميکروسيپور در كلزا بعنوان يك سیستم مدل برای مطالعه شروع فرآيند جنين‌زايى در گیاه مورد بهره برداری متخصصین علوم پايه



اشکال ۸، ۹ و ۱۰ مراحل مختلف جنين‌زايى ميکروسيپور و باززایي گیاهان هاپلوييد در گندم(الف)، گوجه فرنگی(ب) و كلزا(ج) (۱۰ و ۴۴)

کاربرد کشت میکروسپور در ایجاد نر عقیمی و تولید بذور هیبرید F1: بذور هیبرید F1 بدلیل افزایش معنی دار در عملکرد و قیمت بالا از اهمیت ویژه ای در برنامه های بهزادی برخوردار هستند. برای ایجاد بذور هیبرید F1 می باشد دو لاین اینبرد با یکدیگر تلاقی داده شوند که برای این منظور استفاده از سیستم نر عقیمی باعث کاهش قابل ملاحظه هزینه ها در تولید بذور هیبرید می شود، اگرچه کمبود تکنولوژی های عمومی در جهت ایجاد نر عقیمی و برگشت پذیری نرباروری بزرگترین مانع برای استفاده از مزایای تولید بذور هیبرید F1 در تعداد زیادی از گونه های گیاهی می باشد. بیشترین نر عقیمی مورد استفاده نر عقیمی سیتوپلاسمی است اگرچه در بسیاری از گیاهان در دسترس نبوده و نیازمند مراحل اصلاحی مکرر می باشد. حال آنکه در برنامه تولید بذور هیبرید، گیاهان نر عقیم می توانند از طریق غیر فعال کردن یا کم توان کردن آنزیم های دخیل در مرحله تکامل میکروسپور به دانه گرده (از قبیل گلوتامین سنتتاز) ایجاد گردند. حفظ گیاهان نر عقیم از طریق جنین زایی میکروسپور امکان پذیر است و نیازی به یافتن والد نگهدارنده نر عقیمی نیست. بعلاوه امکان برگرداندن نرباروری از طریق بلوغ درون شیشه ای میکروسپور (in vitro maturation) و در نهایت گرده افشاری آنها بطور برون شیشه ای (in vivo pollination) وجود دارد (۳۸).

کاربرد کشت میکروسپور در ردیابی ژنی: ردیابی ژنی (Gene targeting) بویله نوترکیبی مبتنی بر تشابه (Homologous targeting) از ابزارهای ژنتیکی جدید است که امکان الحاق ژن خارجی در مکان های ژنومی از پیش تعیین شده را در انتقال ژن میسر می سازد (۳۶). ردیابی ژنی بطور کارآمد و موفقیت آمیزی در باکتری ها و مخمر اتفاق می افتد و در یوکاریوت های پیشرفتی نیز از قبیل مگس سرکه (*Drosophila*), موش و سلول های سوماتیکی انسان به عنوان ابزاری توانمند قابل دسترس و بهره برداری 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 میزان اتفاق افتاده است (۳۷). هرچند گزارشات موفقی نیز از ردیابی ژنی (Gene targeting) در گزارش شده بطوریکه ژن *Physcomitrella* بطور کارآمدی در

کاربرد کشت میکروسپور در تسهیل مطالعات موتاسیون: تکنیک کشت میکروسپور (چنانچه موجود باشد)، بهترین سیستم جهت کاربرد موتانت زایی درون شیشه ای (in vitro mutagenesis) و گرینش می باشد (۲۹). موارد موفقیت آمیز این روش به ویژه در ارتباط با کلزا و دیگر اعضاء خانواده چلیپائیان که در آنها موتانت های مهم متعددی از طریق تکنولوژی میکروسپور ایجاد شده اند، معرفی گردیده است (۲۳). از جنین های حاصل از میکروسپورهای تیمار شده با اشعه UV و موتاذن شیمیایی MNU لاین های کلزا مقاوم به علف کش گلایفوسیت و کلروسولغوران تولید شده است (۵). در ارتباط با تیمار میکروسپورها، هر دو نوع موتاذن فیزیکی و شیمیایی موفقیت آمیز گزارش شده اند هرچند که با توجه به سختی کار با موتاذن های شیمیایی به عنوان مثال در لزوم انجام مرحله شیستشو میکروسپورها پس از اعمال موتاذن جهت از بین بردن بقایای موتاذن، استفاده از موتاذن های فیزیکی معمول تر است (۲۹).

کاربرد کشت میکروسپور در انتقال ژن: میکروسپور یک سلول منفرد و در دسترس در بسیاری از گونه ها می باشد که توانایی تولید گیاهان تاریخته را در دو مسیر گامتوفیتی و اسپروفیتی داراست (۵۵). گیاهان باززا شده اولیه ممکن است هاپلوبیوت بوده و یا اینکه پس از دو برابر کردن کروموزوم ها گیاه دیپلوبیوت خالص بددست آیند. تکنیک هایی که در آن انتقال ژن به میکروسپور یا دانه گرده انجام می شود عبارتند از: الف- انتقال بر مبنای گرده بالغ که در آن DNA قبل از گرده افشاری وارد دانه گرده می شود و قبل یا بعد از گرده افشاری به کالله منتقل می گردد (مسیر لوله گرده)، ب- انتقال DNA از طریق تفنگ پرتتاب ذره (بیولیستیک) به درون میکروسپورهای تک سلولی در فاز G1 سیکل سلولی و سپس کشت درون شیشه ای میکروسپورها به منظور تشکیل دانه گرده بارور و سپس گرده افشاری طبیعی (برون شیشه ای) و جمع آوری بذور تاریخته و ج- انتقال ژن به میکروسپور یا دانه های گرده نبالغ جنین زا که به وسیله تنش القا شده اند که در آن جنین زایی در میکروسپور صورت گرفته و باعث رشد جنین ها و گیاهان هاپلوبیوت تحت شرایط بهینه می شود.

ساختار سیتوپلاسم ستاره‌ای ندارند و افزایش اندازه سلول و تقسیمات منظم را به عنوان علامت 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 علامت 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، احمدی، شکیب ع، حسین پور ب، دیر اشرافی ۱ (۱۳۸۶) تهیه و ارزیابی لایه‌های دابلد هاپلوئید از ژنوتیپ‌های F1 در کلزا از طریق کشت میکروسپور، انتشارات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ۳۷-۲۹
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. Blakeslee, 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 chlorofuran 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.I. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 205-216.

سلول‌های کلرونما جایگزین شده است که در مرحله گامتوفیتی (هاپلوئید) بوده و در فاز G2 چرخه سلولی متوقف شده‌اند (۴۱). لذا داشتمدنان، 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 تباکو با استفاده از کشت دانه گرده نارس (در مرحله ابتدای دو-هسته‌ای) معرفی گردیده است (۳۷). پیش‌بینی می‌شود با توسعه فناوری نوترکیبی مبتنی بر تشابه (HR) به سایر گیاهان از طریق استفاده از میکروسپور بتوان کارآمد و میزان موفقیت هدفمند را در پروژه‌های انتقال ژن ارتقاء بخشید.

### نتایج

با توجه به مباحث مطرحه در 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. آنالیزهای 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 در صورتی که 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 علامت جنین‌زایی میکروسپور در تمامی گونه‌ها باشد دقیقاً معلوم نیست، با این وجود شکل ستاره‌ای میکروسپورها در گندم، تباکو، سیب و برجسته جنین‌زایی می‌باشد ولی میکروسپورهای جنین‌زای کلزا نشانه جنین‌زایی می‌باشد.

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 Haplod 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 Haplod 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) Haplod in Higher Plants: Advances and potential (proceedings of the 1st Internation Symposium). University of Guelph, Canada.
20. Kasha KJ and seguin-swartz G (1983) Haplodity in crop improvement. In: M.S. swaminathan, p.k. Gupta and U.Sinha (ed), *Cytogenetics 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 Haplod 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 Haplod Production in Higher Plants*, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-51
29. Maluszynski M (2003) Doubled Haplod Production in Crop Plants. 351- 361. IAEA. Printed in the Netherlands.
30. Matzka F and Muñoz 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 Haplod 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) Haplod production approaches and use in plant breeding. In: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB International ed., Shewry, P.R. Barley, pp. 519-547.
35. Pierik RIM (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 Haplod 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

- 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 Physiol* 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 aestivum* L), Tomato(Lycopersicon 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 microtubules 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, Hagberg 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