علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۵ (ص ۳۹۵-۳۸۳)
DOI: 10.22059/ijhs.2016.59802

بررسی تأثیر تنش‌های دمایی و گرسنگی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای در کشت میکروسپورهای رز (*Rosa hybrida* L.)

مریم دهستانی اردکانی[۱]، محسن کافی[۲]، مهران عنایتی شریعت پناهی[۳*]، مریم جعفرخانی کرمانی[۳] و محمدرضا فتاحی مقدم[۴]
۱. استادیار، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان
۲ و ۴. استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار، بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکدۀ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵)

چکیده

در این پژوهش نظام کشت میکروسپورهای (Microspore culture) جداشده در پانزده رقم رز بررسی شد. در آزمایش نخست تأثیر رقم‌های رز بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که میکروسپورهای ‘Apollo’، ‘Amarosa’، ‘Majic’، ‘Candy’، ‘Exotic’ و ‘Velvet’ در میان رقم‌های مورد بررسی بیشترین تقسیم‌های یاخته‌ای را انجام دادند. در آزمایش دوم تأثیر محیط‌های کشت TMG و AT3 با منابع قندی متفاوت (مالتوز، گلوکز و ساکارز) با یا بدون آمینواسید لاکتوالبومین هیدرولیزات بر القای جنین‌زایی میکروسپورهای رز آزمایش شد. بالاترین میزان زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورها در محیط کشت AT3 حاوی قند گلوکز و لاکتوالبومین هیدرولیزات به دست آمد. در آزمایش سوم اثر تنش‌های دمایی (۲۵°C، ۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به مدت هفت روز) بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها بررسی شد. اگرچه بالاترین درصد زنده‌مانی میکروسپورها در دمای ۲۵°C به‌دست آمد، ولی میکروسپورها بیشترین تقسیم‌های یاخته‌ای خود را در تیمارهای تنشی نشان دادند. در آزمایش چهارم تأثیر تنش گرسنگی بر القای جنین در میکروسپورها آزمایش شد. در رقم Amarosa، تیمار گرسنگی به مدت سه روز در دمای ۴°C باعث القای جنین شد. این نخستین گزارش القای جنین در میکروسپورهای رز است که باززایی جنین‌های به‌دست‌آمده مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: تنش، ساختارهای چند، گرسنگی یاخته‌ای، محیط کشت.

Investigation the effects of cold and starvation stresses on viability and cell division of microspores in *Rosa hybrida* L.

Maryam Dehestani Ardakani[1], Mohsen Kafi[2], Mehran Enayat Shariatpanahi[3*], Maryam Jafarkhani-Kermani[3] and Mohammad-Reza Fattahi Moghadam[4]
1. Assistant Professor, Faculty of Agricultural Science & Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Ardakan, Iran
2, 4. Professor and Assocaite Professor, Faculty of Agricultural Science & Engineering, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587, Iran
3. Assocaite Professor, Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Mahdasht Road, P.O. Box 31535-1897 Karaj, Iran
(Received: Jan. 9, 2013 - Accepted: Mar. 16, 2015)

ABSTRACT

In this research, the isolated microspore culture system in 15 rose cultivars was tested. In the first experiment, the effect of rose cultivars on microspore viability and multicellular formation was examined. Results showed that the most multicellular structures obtained in ‘Apollo’, ‘Amarosa’, ‘Majic’, ‘Candy’, ‘Exotic’ and ‘Velvet’ varieties. In the second experiment, the effect of various induction media i. e. TMG and AT3 with different carbohydrate sources (maltose, glucose and sucrose) with or without lactalbumin hydrolysate on microspore embryogenesis was tested. The highest percent of microspore viability and multicellular formed in AT3 medium contained glucose and lactalbumin hydrolysate. In the third experiment, the effect of temperature stresses (25 °C, 4 °C for 14 days and 30 °C for 7 days) on microspore viability and multicellular formation was tested. The most microspore viability obtained at 25 °C treatment, but the highest microspore multicellular formed in stress treatments. In the fourth experiment, the effect of sugar starvation on microspore embryogenesis was assessed. Starvation treatment in ‘Amarosa’ for 3 days at 4 °C caused to microspore embryogenesis. This is the first report of microspore embryogenesis in rose, however, embryos could not regenerate.

Keyworlds: induction media, multi-cellular structures, stress, starvation.

* Corresponding author E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir Tel: +98 26 32703536

مقدمه

رزها (*Rosa* sp.)، گیاهان زینتی جذابی‌اند که به تیغ مسلح شده‌اند، از مهم‌ترین محصولات گلکاری هستند. رزها طی ۵۰۰۰ سال در زمان تمدن چین باستان، آسیای شرقی و شمال آفریقا (Gudin, 2000) کشت و کار شده‌اند، که این امر ایجاد تنوع در آن‌ها را امکان‌پذیر و آسان کرده است. برنامه‌های اصلاحی رز بر بهبود ویژگی‌های متفاوتی متمرکز شده‌اند تا ارزش زینتی آن شامل رنگ، اندازه، ریخت و کیفیت نگهداری گل‌ها و واکنش‌های گیاه به محیط پیرامون را افزایش دهند. اگرچه ویژگی‌های شرح داده شده با اصلاح سنتی به گیاه وارد شده بودند، در این روش محدودیت‌هایی از جمله ذخیرهٔ ژنی محدود، تفاوت در سطح گانی (پلوییدی) والدین و چندژنی (پلی‌ژنیک) بودن ویژگی‌هایی مانند رشد یکنواخت و گلدهی همزمان، وجود داشت که بهنژادگران را به‌سوی استفاده از رقم‌هایی که اغلب وحشی هستند، سوق داد. چهارگانی (تتراپلوییدی) در رقم‌های مهم رز، تجزیهٔ ژنتیکی و انتقال ژن را به آن‌ها به‌ویژه از گونه‌های دوگان (دیپلویید) دشوار کرده است (Meynet *et al*., 1996). هنگامی‌که تلاقی بین‌گونه‌ای در رز موفقیت‌آمیز نشد، محققان بر آن شدند تا نسبت به ایجاد گیاه نیمگان یا تک‌لاد (Haploid) از گیاه چهارگان اقدام کنند و آنگاه از نیمگان به‌دست‌آمده که دو نیمگان هستند در تلاقی با رقم‌های وحشی دوگان استفاده کنند و از گونه‌های دوگان به رقم‌های چهارگان ژن را انتقال دهند (Meynet *et al*., 1996). این روش موجب کم کردن دورهٔ اصلاحی برای ایجاد رگه (لاین)های خالص (هموزیگوت) در گیاهان دگرگشن (مانند رز) که به‌عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های بعدی استفاده می‌شوند، می‌شود. همچنین، می‌توان با کاهش سطح گانی در یک گیاه خودچندگان (Autotetraploid)، تأثیر سطوح مختلف گانی را بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و فیزیولوژیکی رزها بررسی کرد (Meynet *et al*., 1996).

یکی از روش‌های تولید گیاهان نیمگان کشت میکروسپورهای جدا شده است. در این روش امکان تولید شمار زیادی گیاه نیمگان وجود دارد. تولید سریع رگه‌های خالص از میکروسپورهای جداشده، مهم‌ترین ویژگی این روش در برنامه‌های اصلاحی است. همچنین با توجه به فراوانی بالای تولید گیاه از کشت میکروسپور و نیز آسان بودن انتقال ژن، کشت میکروسپور، کارآمدترین و بهترین اندام هدف در انتقال ژن به شمار می‌رود (Touraev *et al*., 2001). اگرچه نتیجهٔ نمو میکروسپور در گیاه به‌طور طبیعی تمایز آن به دانهٔ گرده و انجام باروری است اما میکروسپورهای ایزوله و کشت‌شده در شرایط درون شیشه‌ای می‌توانند، از یکسو، در صورت اعمال نکردن تنش و کشت در یک محیط غنی از نظر مواد غذایی به دانهٔ گرده رسیده و بارور تمایز پیدا کنند و از سوی دیگر، با اعمال تنش به‌طور پی‌درپی تقسیم شده و به جنین نمو یابند (Shariatpanahi *et al*., 2006). سرما، گرما، گرسنگی کربنی و کلشی‌سین از جمله تنش‌های پرمصرف برای القای جنین‌زایی میکروسپور هستند.

Guha & Maheshwari (1964) برای نخستین بار جنین‌زایی دانهٔ گرده در *Datura innoxia* را گزارش کردند. کشت بساک در بسیاری از گونه‌های گیاهان زینتی مانند *Lilium longiflorum* (Sharp *et al*., 1972)، *Pelargonium hortorum* (Abo El-Nil & Hildebrandt, 1973)، *Saintpaulia ionantha* (Weatherhead *et al*., 1982) و *Tradescantia bracteata* (Sunderland, 1977) منجر به تولید گیاهان نیمگان شده است، اما در اغلب موارد شمار آن‌ها اندک بوده است. اگرچه بسیاری از گونه‌ها پاسخ خوبی به کشت بساک می‌دهند و جنین‌زایی میکروسپور به‌طور گسترده استفاده شده است، اما بسیاری از آن‌ها همچنان سخت پاسخ‌ده و کم‌عمر (Recalcitrant) هستند. تاکنون کشت بساک با موفقیت در دو جنس از خانوادهٔ وردسانان (رزاسه) شامل توت‌فرنگی و سیب انجام شده است (Hennry *et al*., 1996; Hofer *et al*., 1999; 2004) اما در رز کشت بساک و میکروسپور موفقیت‌آمیز نبوده است. Tabaiizadeh & Khosh-Khui (1981) برای نخستین بار القای پینه (کالوس) از بساک‌های دو گونه رز چهارگان (4n=28) را گزارش کردند، اما موفق به

باززایی پینه‌ها نشدند. Ahmadi (2009) جنین‌زایی میکروسپور را در رز رقم Apollo بررسی کردند. نتایج نشان داد که تیمارهای گرسنگی (محیط B) به مدت چهار روز در ۴°C بالاترین درصد زنده‌مانی میکروسپورها را داشته است. متأسفانه هیچ گزارش موفقی درزمینهٔ کشت میکروسپورهای جداشدهٔ رز موجود نیست. اما با توجه به برتری‌های پرشمار کشت میکروسپورهای جداشده در این تحقیق روش جنین‌زایی میکروسپور رز پژوهش شد. شناسایی عامل‌های مؤثر بر القای میکروسپورهای جنین‌زا، بررسی پاسخ‌پذیری رقم‌های چهارگان تجاری رز به کشت میکروسپور و دستیابی به شیوهٔ جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان نیمگان در اصلاح رز از جمله هدف‌های این پژوهش بودند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی این تحقیق شامل شماری از رقم‌های رزهای دورگ (هیبرید) تجاری (*R. hybrida* L.) شامل رقم‌های ‘Apollo’، ‘Royal Class’، ‘Dr. Bernando’، ‘Leady Emma Hamilton’، ‘Molineux’، ‘Utopia’، ‘Path Astin’، ‘Dolce Vita’،‘Amarosa’ و ‘Maurasia’ بود که از کلکسیون ذخایر ژنتیکی رز پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) در شهر کرج و رقم‌های ‘Exotic’، ‘Majic’، ‘Elegant’، ‘Candy’ و ‘Velvet’ که از گلخانه‌ای واقع در هشتگرد کرج تهیه شدند. هنگامی‌که میکروسپورها در مرحلهٔ میانی تا انتهای تک‌یاخته‌ای بودند، غنچه‌ها برداشت شدند. تعیین مرحلهٔ مناسب میکروسپورها با رنگ‌آمیزی با ۰/۱ mg/l مادهٔ ۴، ۶- دی آمینو-۲-فنیل ایندول (4', 6-diamidino-2- phenylindole) (DAPI) صورت پذیرفت (Vergne *et al*., 1987). غنچه‌ها با هیپوکلریت ۳/۵ درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شدند و آنگاه سه مرتبه با آب مقطر سترون (استریل) شستشو داده شدند.

جداسازی و کشت میکروسپورها

بساک‌ها و محیط شستشو (B) (سولفات منیزیم ۲۵۰mg/l، کلرید کلسیم ۱۴۷ mg/l، کلرید پتاسیم ۱۴۹۰ mg/l، مانیتول ۵۴۷۰۰ mg/l) (Touraev *et al*., 1996) در یک شیشهٔ ۵ میلی‌لیتری حاوی یک مگنت کوچک ریخته و شیشه به مدت ۳-۲ دقیقه روی همزن الکتریکی با ۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از جداسازی میکروسپورها از بساک، به‌منظور شفاف‌سازی مایع کدر به‌دست‌آمده از اضافه‌های دیواره‌های یاخته‌ای بساک و میکروسپورها، مایع از پالایشگر با قطر منافذ ۵۸ µm عبور داده شد. مایع پالایش‌شده در فالکون‌های سانتریفوژ ریخته و به مدت پنج دقیقه در ۱۲۰۰ rpm در دمای ۴°C (Beckman GS-6R USA) سانتریفوژ شد. عملیات سانتریفیوژ دو مرتبه صورت گرفت. مایع رویی دور ریخته و پلیت‌های ته‌نشین‌شده درنهایت با اضافه کردن محیط کشت دوباره تعلیق شده و به پتری‌دیش‌هایی با قطر ۶ سانتی‌متر منتقل شدند. بی‌درنگ پس از کشت، با رنگ‌آمیزی میکروسپورها توسط FDA (Fluorecein diacetate) و مشاهدهٔ آن‌ها با میکروسکوپ فلورسنت زنده‌مانی میکروسپورها محاسبه شد (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970).

در قالب چهار آزمایش تأثیر عامل‌های مختلف بر تقسیم یاخته‌ای و تولید جنین در میکروسپورهای رز بررسی شد.

آزمایش اول: بررسی پاسخ‌پذیری رقم‌های مختلف رز به کشت میکروسپور

در این آزمایش تأثیر پانزده رقم مختلف رز شامل ‘Apollo’، ‘Royal Class’، ‘Dr. Bernando’، ‘Leady Emma Hamilton’، ‘Molineux’، ‘Utopia’، ‘Amarosa’، ‘Dolce Vita’، ‘Path Astin’، ‘Maurasia’، ‘Exotic’، ‘Majic’، ‘Elegant’، ‘Candy’ و ‘Velvet’ بر زنده‌مانی و تقسیم یاخته‌ای میکروسپورها ارزیابی شد. پس از جداسازی، میکروسپورها در محیط AT3 کشت و پس از بیست روز میزان زنده‌مانی و تقسیم یاخته‌ای آن‌ها محاسبه شد.

آزمایش دوم: بررسی تأثیر محیط کشت بر زنده‌مانی و تقسیم یاخته‌ای میکروسپورها

به‌منظور القای جنین‌زایی میکروسپورهای رز، محیط پایهٔ

AT3 (Touraev *et al*., 1996) (جدول ۱) با سه منبع مختلف کربوهیدرات شامل مالتوز (۹۰ گرم بر لیتر)، گلوکز (۴۵ گرم بر لیتر) یا ساکارز (۸۵ گرم بر لیتر) با یا بدون آمینواسید لاکتوالبومین هیدرولیزات (lactalbumin hydrolysate) استفاده شدند. محیط‌های القایی مورد آزمایش شامل AT3 (حاوی مالتوز)، AT3 همراه با ۱۰ گرم بر لیتر لاکتوالبومین هیدرولیزات (AT3-L)، AT3 با گلوکز (AT3-G)، AT3-G با ۱۰ گرم بر لیتر لاکتوالبومین هیدرولیزات (AT3-LG)، AT3 با ساکارز (AT3-S) و AT3-S با ۱۰ گرم بر لیتر لاکتوالبومین هیدرولیزات (AT3-LS) بودند که pH محیط‌ها روی ۶/۲ تنظیم شد. دیگر محیط کشت مورد استفاده TMG (Touraev *et al*., 1996) با pH برابر ۶ بود. پس از تهیهٔ محیط کشت به دلیل واکنش بعضی مواد و حساس بودن برخی ویتامین‌ها به گرمای اتوکلاو، ضدعفونی محیط کشت با دستگاه پالایشگر سترون‌ساز (فیلتر استریلیزاسیون) انجام گرفت. در این آزمایش زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها در ده رقم ‘Apollo’، ‘Royal Class’، ‘Dr. Bernando’، ‘Leady Emma’، ‘Hamilton’، ‘Molineux’، ‘Utopia’، ‘Amarosa’، ‘Dolce Vita’، ‘Path Astin’ و ‘Maurasia’ پس از کشت بررسی شد. میکروسپورها پس از کشت به انکوباتور با دمای ۲۵°C منتقل و در تاریکی نگهداری شدند.

آزمایش سوم: بررسی تأثیر تنش دمایی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها

در پنج رقم ‘Apollo’، ‘Royal Class’، ‘Velvet’، ‘Exotic’ و‘Majic’ از تنش‌های ۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به‌مدت هفت روز استفاده شد، دمای ۲۵°C به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و تأثیر تنش‌های دمایی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها بررسی شد.

جدول ۱. ترکیب محیط‌های القای جنین‌زایی میکروسپورها ($mg.L^{-1}$)

Table 1. Media culture composition for microspore embryogenesis ($mg.L^{-1}$)

Composition of media culture / Media culture	AT_3	TMG
Macroelements		
KNO_3	1950	1001
$MgSO_4,7H_2O$	185	247
$CaCl_2,2H_2O$	166	-
$CaCl_2,4H_2O$	-	236
KH_2PO_4	400	-
$(NH_4)_2SO_4$	277	-
Microelements		
NaFe(III)EDTA	36.70	36.70
MnSo4. H2O	16.90	-
H_3BO_3	2-Jun	10
$ZnSO_4,7H_2O$	6-Aug	-
$CuSO_4,5H_2O$	0.025	-
$Na_2MoO_4,2H_2O$	0.25	-
$CoCl_2,6H_2O$	0.25	-
KI	0.83	-
Uridine	-	244
Cytidin	-	127
Lactalbumin hydrolysate	-	10000
Vitamins		
myo-inositol	100	100
Nicotinic acid	1	1
Thiamine HCl	10	10
Pyridoxine HCl	1	1
MES (2-(N-morpholino)-ethonesulfonic acid)	1950	-
L.Glutamine	1256	438
Carbohydrate		
Glucose	-	91000
Maltose	90000	-

آزمایش چهارم: تأثیر تنش گرسنگی قندی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها

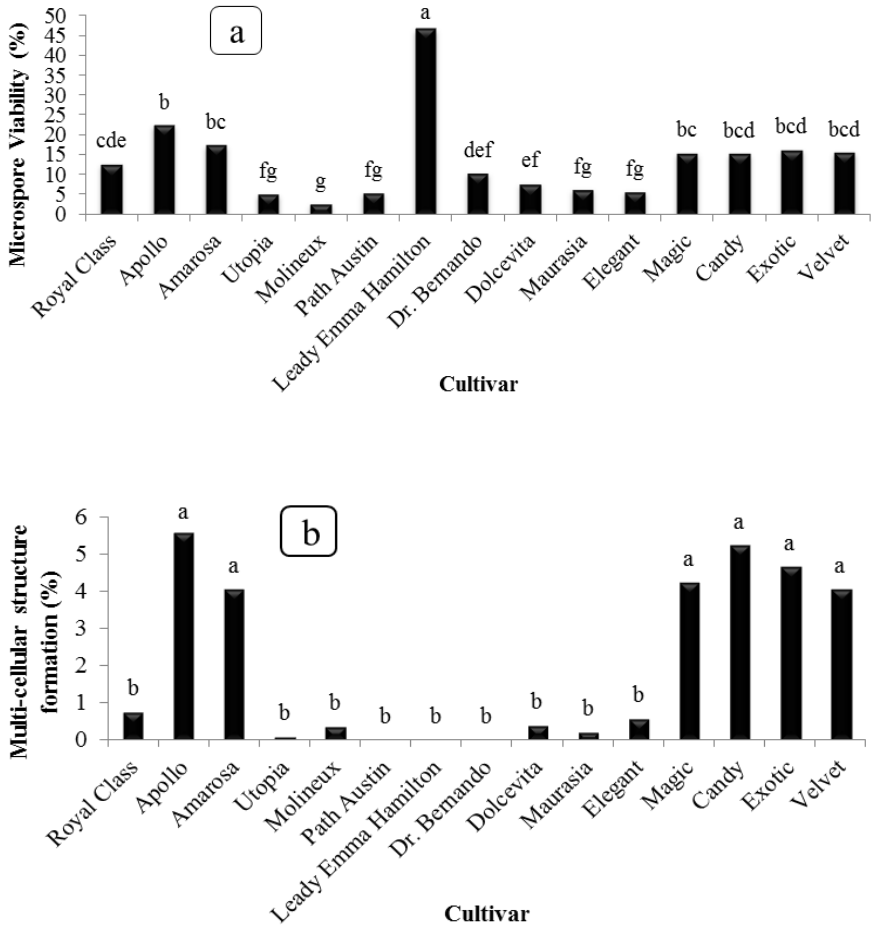
میکروسپورهای جداشده به مدت سه روز در محیط B که محیطی بدون کربوهیدرات و نیتروژن بود کشت و در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از پایان مدت‌زمان اعمال تنش، میکروسپورها به محیط کشت AT3 منتقل شدند. در همهٔ مراحل رطوبت محل نگهداری پتری‌دیش‌ها ثابت نگه داشته شد (حدود ۷۰درصد). در این آزمایش رقم‌های ‘Dolce Vita’، ‘Amarosa’، ‘Maurasia’، ‘Molineux’، ‘Apollo’، ‘Majic’، ‘Candy’ و ‘Velvet’ استفاده شدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیهٔ آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون LSD صورت گرفت.

نتایج و بحث

آزمایش اول: بررسی پاسخ‌پذیری رقم‌های مختلف رز به کشت میکروسپور

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که رقم‌های رز در سطح احتمال ۱درصد بر زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورها تأثیرداشتند. در میان رقم‌های مورد بررسی ‘Leady Emma Hamilton’ بالاترین میزان زنده‌مانی را نشان داد، درحالی‌که ساختارهای چندیاخته‌ای در این رقم تشکیل نشد (شکل۱).



شکل۱. تأثیر رقم بر میزان زنده‌مانی (a) و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای (b) میکروسپورهای رز

Figure 1. Effect of cultivar on rose microspore (a) viability and (b) multicellular structural formation

اگرچه افزایش درصد زنده‌مانی عاملی مهم در انتخاب رقم‌های مناسب برای تولید گیاهان نیمگان است، میزان تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای نیز عاملی مؤثر است. بنابراین در رقم‌هایی که زنده‌مانی و

تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای به‌طور نسبی بالاتر باشد، احتمال تشکیل جنین از میکروسپورها و در نتیجه تولید گیاه نیمگان نیز بالاتر است. در میان رقم‌های مورد بررسی ‘Apollo’، ‘Amarosa’، ‘Majic’، ‘Candy’، ‘Exotic’ و ‘Velvet’ این ویژگی‌های (افزایش نسبی زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای) را داشتند. همان‌طور که توسط بیشتر محققان جنین‌زایی گرده گزارش شده است، ژنوتیپ نقش مهمی در بین عامل‌های خارجی ایفا می‌کند. اغلب، پاسخ به درونزایی (آندروژنز) در شرایط درون شیشه وابسته به ژنوتیپ است و باید شرایط کشت در هر ژنوتیپ بهینه شود. به‌طور مکرر گزارش شده است که رقم‌های مختلف یک‌گونه پاسخ‌های متفاوتی به کشت بساک داده‌اند (Germana, 2011). در بسیاری از گونه‌ها، برای مثال *Brassica carinata* (Barro & Martin, 1999)، *B. oleracea* (Ferrie *et al*., 1995)، *Phleum pretense* L. (Guo & Pulli, 2000) و *Malus domestica* (Hofer, 2004) تفاوت ژنوتیپی در جنین‌زایی میکروسپورها مشاهده شده است و نتایج به‌دست‌آمده در رزهای دورگ هم تحت تأثیر رقم‌های مختلف قرار گرفت.

آزمایش دوم: بررسی تأثیر محیط کشت بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها

زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای در رقم‌های مختلف رز در سطح احتمال ۱درصد تفاوت معنی‌دار نشان دادند. به‌طوری‌که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بالاترین درصد زنده‌مانی میکروسپورها در سه رقم ‘Royal Class’ و محیط کشت AT3-LG به دست آمد. همین‌طور بیشترین ساختارهای چندیاخته‌ای در رقم‌های ‘Candy’ و محیط‌های کشت AT3-G و AT3-LG تشکیل شد (شکل ۲). در این آزمایش نیز نشان داده شد موفقیت در کشت میکروسپور تحت تأثیر ژنوتیپ قرار می‌گیرد. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در برخی رقم‌ها میکروسپورها حتی قادر به انجام تقسیم‌های یاخته‌ای نبودند و از ادامهٔ مسیر گیاهاگی (sporophytic) باز ماندند.

بالاترین میزان زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورها در محیط کشت AT3 حاوی قند گلوکز و آمینواسید لاکتوالبومین هیدرولیزات (AT3-LG) به دست آمد (جدول ۳). در میان محیط‌های مورد بررسی کمترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها در محیط‌های حاوی ساکارز و محیط TMG به دست آمد. همان‌طور که مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که افزودن لاکتوآلبومین هیدرولیزات تأثیر مثبتی بر درصد تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای داشته و باعث تغییر مسیر رشد میکروسپورها به سمت گیاهاگی یا به عبارتی القای جنین‌زایی داشته است (جدول ۳) اما پس از چهار هفته رشد ساختارهای پیش‌جنین متوقف شد. به نظر می‌رسد که لاکتوآلبومین هیدرولیزات به دلیل داشتن منابع غنی اسیدهای آمینه، برای آغاز تقسیم‌های یاخته‌ای مؤثر بوده و باعث افزایش آن شده است. ترکیب محیط کشت نقش اساسی در القای جنین‌زایی میکروسپور بازی می‌کند. ژنوتیپ‌های مختلف برای تولید گیاه مشتق‌شده از دانهٔ گرده نیاز به محیط‌های پایهٔ متفاوتی دارند. منبع کربوهیدرات به علت اثرگذاری اسمزی و تغذیه‌ای، برای تولید جنین در کشت میکروسپور ضروری است. تأثیر غلظت کربوهیدرات ممکن است مربوط به تنظیم فشار اسمزی در حالت القایی باشد (Sunderland & Dunwell, 1977). همان‌طور که به نظر می‌رسد پس از طی دورهٔ کشت، غلظت‌های بالای منبع کربنی تخریب‌کننده است. در جو و توتون مشخص شده است که ساکارز به سرعت سوخت‌وساز (متابولیزه)شده و با تجمع میزان زیادی نشاسته از تکوین جنین جلوگیری می‌کند، درحالی‌که مالتوز به کندی تجزیه‌شده و منجر به جنین‌زایی میکروسپور می‌شود (Shariatpanahi *et al*., 2006). ثابت شده است که در چاودار گلوکز بیش از ساکارز تحریک‌کننده است (Wenzel *et al*., 1977) که با نتایج به‌دست‌آمده همخوانی داشت. در کشت میکروسپور سیب بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط حاوی مالتوز و کمترین میزان در محیط حاوی ساکارز مشاهده شد (Hofer *et al*., 1999). اگرچه بیشترین موفقیت در محیط‌های القایی حاوی ساکارز یا مالتوز

گزارش شده است، نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که گلوکز می‌تواند منبع کربنی مناسبی در کشت میکروسپورهای رز باشد. در حقیقت، در میان قندها، گلوکز به‌آسانی توسط یاخته‌های گیاهی جذب می‌شود و مهم‌ترین منبع تولید انرژی است. ساکارز از نظر ویژگی‌های فیزیکو-شیمیایی همانند گلوکز است لیکن واکنش‌پذیری کمتری دارد. یک محیط اسیدی (pH برابر ۵/۸) این قند را آبکافت (هیدرولیز) کرده و به گلوکز و فروکتوز که به‌آسانی توسط یاخته‌های گیاهی جذب می‌شوند تبدیل می‌کند. ممکن است به علت رقابت این دو قند برای جذب توسط یاختهٔ گیاهی، ساکارز غیرفعال شود و در نتیجه نقش کمتری در القای ساختارهای چندیاخته‌ای و در نتیجه تولید جنین داشته باشد (Shariatpanahi *et al*., 2006).

جدول ۲. اثر متقابل رقم و محیط کشت بر میزان زنده‌مانی میکروسپورهای رز

Table 2. The interaction between cultivar and media culture for rose microspore viability

Cultivr	AT3	AT3-L	AT3-G	Media Culture AT3-LG	AT3-S	AT3-LS	TMG
Royal Class	6.04rsyuvwxy	5.27stuvwxy	25.93abcd	33.50a	11.33jklmnop	12.80jklmnop	2.00z
Apollo	9.40klmnopq	16.22fghijkl	53.17efghij	23.77bcdef	22.97bcdefg	9.03lmnopqrstu	14.47ghijklm
Amarosa	4.51wxyz	26.37abcd	12.83ijklmnop	10.50jklmnopqr	3.43yz	4.43yz	0.40z
Maulinex	11.03jklmnop	24.83abcde	5.17tuvwxyz	4.37xy	0.47z	6.83opqrstuvw	0.30z
Dolcevita	0.73z	1.87/yz	5.03uvwxyz	8.27mnopqrstu	11.33jklmnop	3.57yz	14.60fghijkl
Maurasia	5.73rstuvwxy	6.23qrstuv	4.33xyz	6.50pqrstuvwx	4.23xyz	4.97vwxyz	30.30abc
Majic	27.10abcd	14.67fghijkl	10.33jklmnopqr	14.40fghijkl	11.67jklmnop	13.77hijklmn	12.93ijklmno
Candy	12.43ijklmno	26.57abcd	21.30cdefgh	28.20abcd	4.80wxyz[/	20.33defghi	10.83jklmnop
Exotic	8.47mnopqrst	5.67rstuvw	11.17jklmnopqr	16.27fghijk	5.67rstuvwxy	10.87jklmnopq	4.47xyz
Velvet	6.30rstuvwxy	3.30z[/	3.30yz	7.43nopqrstuv	31.30ab	6.70opqrstuvw	3.8yz

* حروف همسان در هر ستون گروه تیمار نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵درصد بر پایهٔ آزمون LSD است.

In each column of treatment group, means followed by the same letters are not significantly different ($p \leq 0.05$) based on LSD Test.

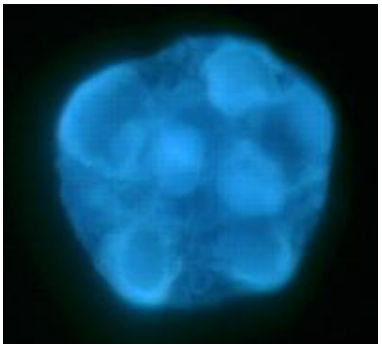
جدول ۳. اثر متقابل رقم و محیط کشت بر درصد تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز

Table 3. The interaction between cultivar and media culture for rose multicellular structure formation

Cultivar	AT3	AT3-L	AT3-G	Media culture AT3-LG	AT3-S	AT3-LS	TMG
Royal Class	0.07j	0.13ij	1.00fghij	3.90bc	0.53ghij	1.29defg	0.00j
Apollo	0.17hij	2.13de	0.30ghij	0.29hij	0.50ghij	0.32ghij	0.17hij
Amarosa	0.00j	3.30c	0.27hij	0.40ghij	0.00j	0.00j	0.00j
Maulinex	0.00j	0.00j	0.53ghij	0.00j	0.17hij	0.00j	0.00j
Dolcevita	0.40ghij	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j
Maurasia	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j
Majic	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j	0.00j
Candy	1.63def	0.23hij	5.07a	5.30a	0.00j	2.23d	0.43ghij
Exotic	0.20hij	0.83fghij	0.23hij	0.60fghij	0.00j	4.57ab	0.60fghij
Velvet	1.10fghi	0.00j	0.00j	1.17efgh	4.03bc	1.17efgh	0.23hij

* حروف همسان در هر ستون گروه تیمار نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵درصد بر پایهٔ آزمون LSD است.

In each column of treatment group, means followed by the same letters are not significantly different ($p \leq 0.05$) based on LSD Test.



شکل ۲. ساختار چندیاخته‌ای میکروسپور رز رنگ‌آمیزی‌شده با مادهٔ رنگ‌آمیزی DAPI

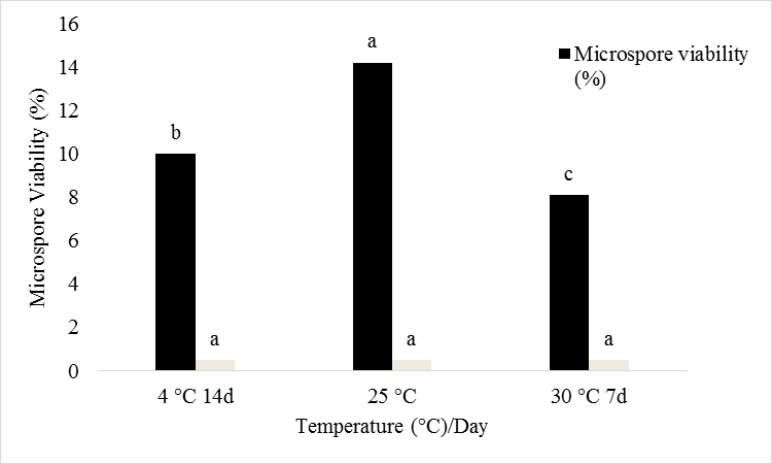
Figure 2. Multicellular structure of rose microspore colored by DAPI

آزمایش سوم: بررسی تأثیر تنش دمایی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها

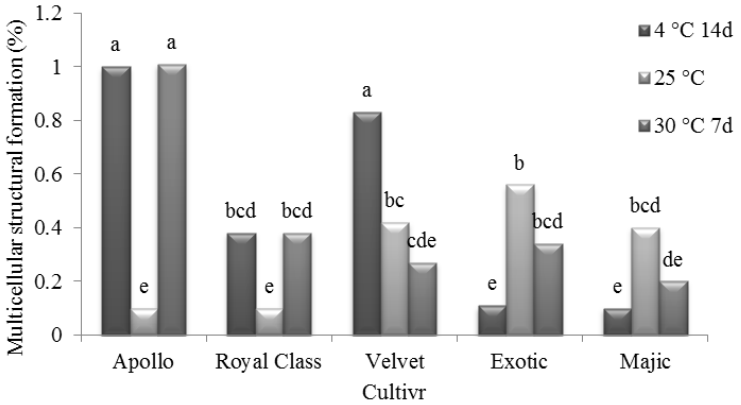
بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که اگرچه بالاترین درصد زنده‌مانی میکروسپورها در دمای ۲۵°C (شاهد) بوده است، بیشترین تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها در تیمارهای تنشی (۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به مدت هفت روز) صورت گرفته است (شکل ۳).

نتایج به‌دست‌آمده در مورد اثر متقابل تنش دمایی و رقم‌های رز نشان داد که در رقم‌های 'Apollo' و

'Royal Class' اعمال تنش (۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به مدت هفت روز) موجب افزایش تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها شده است، درحالی‌که در رقم‌های 'Exotic' و 'Majic' این تنش‌ها نسبت به شاهد (۲۵°C) باعث افزایش تقسیم‌های یاخته‌ای نشد. در 'Velvet' تیمار سرمایی (۴°C به مدت چهارده روز) بیش از شاهد و تیمار گرمایی (۳۰°C به مدت هفت روز) منجر به تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای در میکروسپورها شد (شکل ۴). به‌طورکلی تنش دمایی برای القای جنین‌زایی دانهٔ گرده مؤثر است. Germana (2011) اظهار داشت که دما و مدت‌زمان تیمار مطلوب بسته به ژنوتیپ بسیار متفاوت است. نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش به‌خوبی بیانگر این مطلب است. به‌طوری‌که نتایج نشان می‌دهد مدت‌زمان و دمای مناسب برای انجام تقسیم‌های یاخته‌ای در رقم‌های مختلف رز بسیار متفاوت است.



شکل ۳. تأثیر تنش دمایی بر میزان زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز
Figure 3. Effect of temperature stress on microspore viability and multicellular structure formation in rose



شکل ۴. اثر متقابل رقم و تنش دمایی بر میزان تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز
Figure 4. The interaction between cultivar and temperature stress on microspore multicellular structure formation in rose

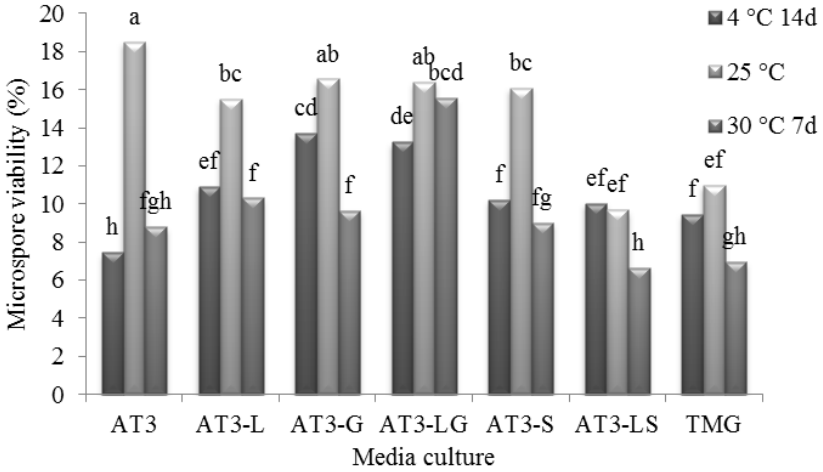
تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از بررسی اثر متقابل محیط کشت و تنش دمایی تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد در زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز نشان داد. به‌طورکلی زنده‌مانی میکروسپورهای رز در تیمار شاهد (۲۵°C) نسبت به تیمارهای تنش دمایی (۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به مدت هفت روز) در محیط‌های مختلف کشت بالاتر بود (شکل ۵). نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که زنده‌مانی میکروسپورها در محیط‌های AT3 حاوی گلوکز (AT3-G و AT3-LG)

در هر سه تیمار دمایی نسبت به دیگر محیط‌های کشت بالاتر بوده است. بررسی مقایسهٔ میانگین تأثیر تنش‌های دمایی (۴°C به مدت چهارده روز و ۳۰°C به مدت هفت روز) بر زنده‌مانی میکروسپورها در محیط‌های کشت متفاوت نشان داد که در زنده‌مانی میکروسپورها در ۴°C بیش از ۳۰°C بوده است (شکل۵). نتایج به‌دست‌آمده با بررسی‌های مقایسه‌ای Bayliss *et al.* (2004) که نشان دادند در *Lupinus* sp. تنش دماهای پائین در مقایسه با دماهای بالا نتایج بهتری می‌دهد، همخوانی داشت.

بررسی اثر متقابل محیط کشت و تنش دمایی بر تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها، نشان داد که بیشترین تقسیم در محیط AT3 و در تیمار ۳۰ °C به مدت هفت روز رخ داده است (شکل ۶). در محیط AT3-G بیشترین تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها در ۴°C به مدت چهارده روز به دست آمد. به‌طور میانگین در محیط‌های کشت AT3-LS، AT3-S، AT3-LG و AT3 میکروسپورها بهتر از دیگر محیط‌ها موفق به اعمال تقسیم‌های یاخته‌ای شده‌اند.

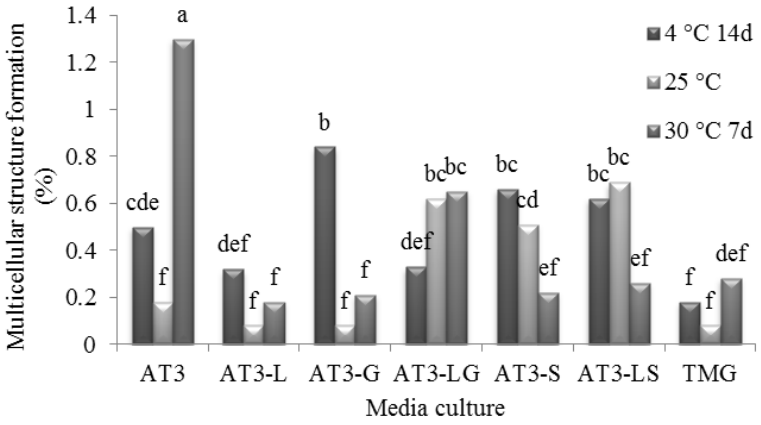
در این آزمایش برای نخستین بار در رز تولید جنین از میکروسپورهای رز با موفقیت انجام شد. جنین‌ها در رقم 'Exotic'، محیط AT3 و تنش دمای بالا (۳۰°C ۷d) تشکیل شدند (شکل ۷-B). متأسفانه در این پژوهش باززایی جنین‌ها از میکروسپورهای رز موفقیت‌آمیز نبود.

کاربرد پیش‌تیمار دمای پایین در القای درونزایی در درختان بلوط (*Quercus* sp.) (Raminez *et al.*, 2004)، سیب (*Malus* sp.) (Hofer, 2004) و صنوبر (*Populus nigra*) (Deutsch *et al.*, 2004) مناسب بوده است که نتایج به‌دست‌آمده در رز با آن‌ها همخوانی دارد. یک صفت مشخص تیمارهای تنشی که قادر به القای جنین‌زایی میکروسپور هستند این است که آن‌ها می‌توانند یک پاسخ تحمل به دما یا ساخت (سنتز) پروتئین‌های تکانهٔ (شوک) دمایی در مو۴جودهای یوکاریوت را القا کنند. افزون بر بعضی از پروتئین‌های القاشده، پروتئین‌های تکانهٔ گرمایی یا HSP (Heat Shock Proteins) نامیده می‌شوند (Cordwener *et al.*, 1994). پروتئین‌های تکانهٔ گرمایی می‌توانند اعمال مهمی در افزایش یاخته در شرایط غیر تنشی داشته باشند. ریخت‌شناختی میکروسپورهایی که در دمای ۳۲/۵ºC قرار می‌گیرند، تغییر می‌کند. اگرچه چندین تغییر ریخت‌شناختی در رقم (واریتهٔ) Topas از گونهٔ *B. napus* از جمله ظهور دانه‌های سیتوپلاسمی، نواحی بدون اندامک سیتوپلاسم و سازماندهی میکروتوبول‌ها مشخص شده است، اما مهم‌ترین تغییر، تغییر موقعیت هسته به‌سوی مرکز یاخته است. میکروسپورهایی که در دمای ۲۵ºC کشت می‌شوند، به‌صورت طبیعی به رشد و نمو خود ادامه می‌دهند و ساختار میکروتوبول‌ها به همان صورتی است که در شرایط *in vivo* سازماندهی می‌شوند (Simmonds & Keller, 1999).



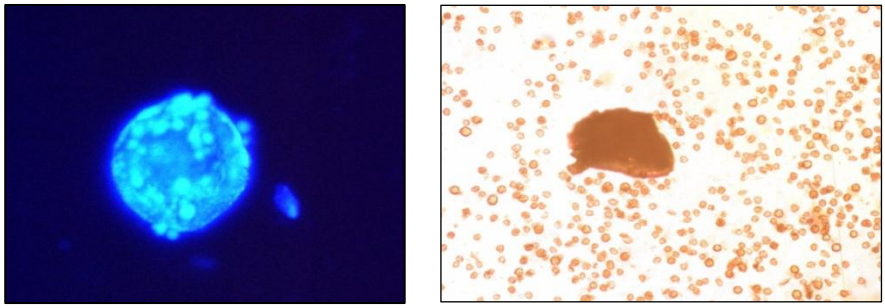
شکل ۵. اثر متقابل محیط کشت و تنش دمایی بر درصد زنده‌مانی میکروسپورهای رز

Figure 5. The interaction between media culture and temperature stress on microspore viability in rose



شکل ۶. اثر متقابل محیط کشت و تنش دمایی بر میزان تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز

Figure 6. The interaction between media culture and temperature stress on microspore multicellular structure formation in rose



A **B**

شکل ۷. A) تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای در میکروسپورهای رز (رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با رنگ DAPI) و مشاهده توسط میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی X ۲۰؛ B) جنین به‌دست‌آمده از میکروسپورهای رز، مشاهده توسط میکروسکوپ اینورت

Figure 7. A) Multicellular structures formation in rose microspores (colored by DAPI) and observed by florescent microscope by 20x; B) Embryo obtained by rose microscope, observed by invert microscope

آزمایش چهارم: تأثیر تنش گرسنگی قندی بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها

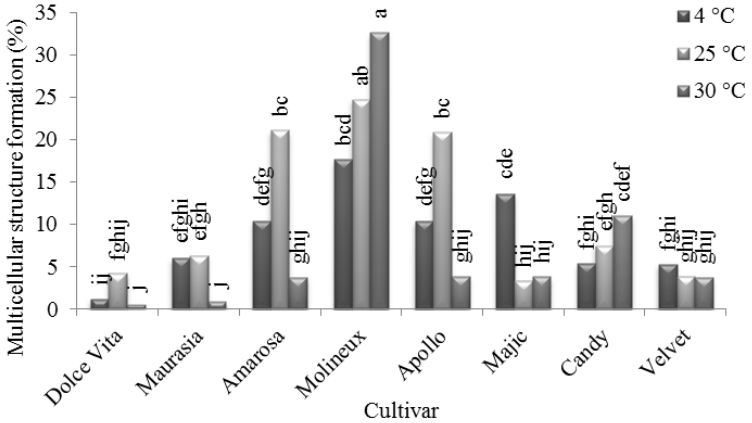
در آزمایش چهارم، تأثیر رقم بر زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود. در رقم‌های ‘Molineux’، ‘Amarosa’ و ‘Apollo’ به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی میکروسپورها نسبت به دیگر رقم‌های بالاتر بود. بیشترین تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها در ‘Amarosa’ به دست آمد.

بررسی اثر متقابل دما و رقم بر میزان زنده‌مانی میکروسپورهای رز نشان داد که میکروسپورها در رقم ‘Molineux’ و در دمای ۳۰ °C به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی بیشتری داشته‌اند (شکل ۸). در رقم ‘Dolce Vita’ و تنش‌های دمایی ۴ °C و ۳۰ °C کمترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها مشاهده شد (هرچند با ۲۵ °C تفاوت معنی‌دار نشان ندادند) (شکل ۸) که این ممکن است به دلیل مناسب نبودن مدت‌زمان اعمال تنش در این رقم و یا حساسیت بالاتر رقم در برابر تنش‌ها باشد.

بیشترین ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورها در رقم ‘Amarosa’ و در دمای ۲۵ °C تشکیل شد (شکل ۹). همچنین در این رقم در دمای ۳۰ °C نسبت به ۴ °C میکروسپورها تقسیم‌های بیشتری انجام داده‌اند. در رقم‌های ‘Apollo’ و ‘Majic’ میکروسپورها در دمای ۴ °C نسبت به ۳۰ °C تقسیم‌های بیشتری انجام داده‌اند. در رقم ‘Candy’ میکروسپورها هیچ‌گونه تقسیم یاخته‌ای انجام ندادند (شکل ۹). نتایج به‌دست‌آمده به‌خوبی بیانگر تأثیر ژنوتیپ بر میزان زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها است، این نتایج نشان می‌دهد که دمای

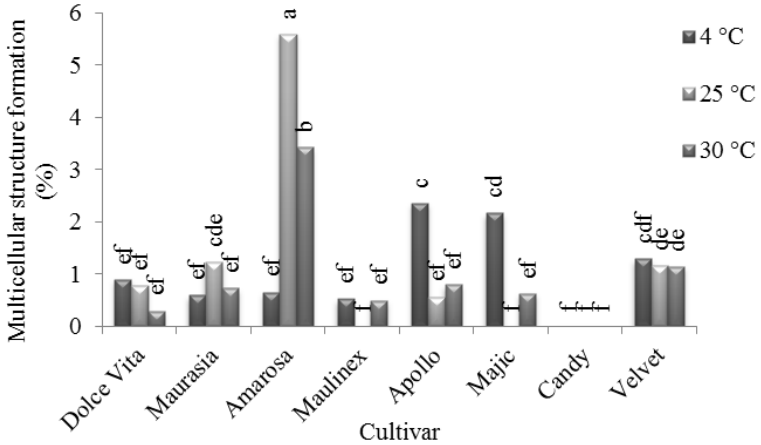
مناسب اعمال تنش در هر رقم متفاوت است و این نکته‌ای است که باید در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد. تغییرپذیری سیتوپلاسمی و هسته‌ای شامل تمایزیابی دوبارهٔ پلاستیدها، حذف دیوارهٔ یاختهٔ زایشی، ظهور ریزکیسه (vesicle) بزرگ، کاهش سوراخ‌های هسته در هسته‌های رویشی، تغییر در کروماتین و ساختار هسته، ترکیب فسفولیپیدی پلاسمالما و کاهش اندازهٔ هسته‌ها (Garrido *et al.*, 1995) در میکروسپورهای گرسنه مشاهده شده است.

در رقم "Amarosa"، تیمار گرسنگی به مدت سه روز در دمای ۴ °C باعث القای جنین شد، اما شمار جنین‌های به‌دست‌آمده اندک بود. البته در آزمایش‌های ما بازدهی تولید جنین بالا نبود که این خود می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات آینده باشد، ولی با توجه به اینکه برای نخستین بار جنین‌زایی میکروسپورها در رز گزارش می‌شود، اهمیت بالایی دارد. گرسنگی قندی یکی از القاکنندگان جنین‌زایی میکروسپورهای جداشده است که در بسیاری از محصولات مانند توتون، گندم، جو و سیب به‌کار رفته است (Shariatpanahi *et al.*, 2006). امروزه تنش اسمزی و گرسنگی در غلات همراه با تیمار دمای پائین به مدت ۵-۳ روز به کار می‌روند (Touraev *et al.*, 1996). کاهش ساخت RNA و فعالیت پروتئین کیناز از جمله ویژگی‌های میکروسپورهای گرسنهٔ توتون بود. یک ژن کوچک HSP در دانه‌های گردهٔ دو یاخته‌ای اولیهٔ گرسنه در توتون بیان شد (Zarsky *et al.*, 1995) که ممکن است از فروافت یا مرگ فیزیولوژیکی یاخته‌ها (*آپوپتوسیس*) جلوگیری کند.



شکل ۸. اثر متقابل دما و رقم بر میزان زنده‌مانی میکروسپورهای رز

Figure 8. The interaction between temperature and cultivar on rose microspore viability



شکل ۹. اثر متقابل دما و رقم بر میزان تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای میکروسپورهای رز

Figure 9. The interaction between temperature and cultivar on rose microspore multicellular structure formation

نتیجه‌گیری کلی

در همهٔ آزمایش‌ها آشکارا تأثیر رقم بر زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها معنی‌دار بود. همچنین در تیمارهای تنش دمایی و گرسنگی کربنی مدت‌زمان و نیز دمای مناسب برای تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای تحت تأثیر رقم‌های رز قرار گرفت. این امر بیانگر این است که واکنش هر رقم رز به تنش‌های دمایی، گرسنگی و... مختص به آن رقم بوده که باید در تحقیقات آینده شرایط مناسب برای جنین‌زایی در هر رقم شناسایی شود. در میان محیط‌های کشت مورد بررسی در این تحقیق میکروسپورها در محیط AT3 حاوی گلوکز و لاکتوآلبومین هیدرولیزات (AT3-LG) بیشترین زنده‌مانی و تقسیم‌های یاخته‌ای را نشان دادند. تنش دمایی منجر به افزایش تقسیم‌های یاخته‌ای میکروسپورها شد اگرچه میزان زنده‌مانی میکروسپورها در این تیمارها کاهش یافت. به نظر می‌رسد که تیمار دمایی ۳۰°C به‌مدت هفت روز مناسب‌تر است. میکروسپورهای تحت تنش گرسنگی کربنی، در دماهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر تشکیل ساختارهای چندیاخته‌ای نشان ندادند. در رقم‌های ‘Exotic’ و ‘Amarosa’ به‌ترتیب تحت تنش‌های گرمایی و گرسنگی جنین‌هایی تشکیل شدند که برای نخستین بار در رزها گزارش می‌شود.

REFERENCES

1. Abo, E. I., Nil, M. M. & Hildebrandt, A. C. (1973). Origin of androgenetic callus and haploid *Geranium* plants. *Canadian Journal of Botany*, 51, 2107-2109.
2. Ahmadi, T. (2009). *Microspore embryogenesis in Rosa hybrida cv. Apollo.* M.Sc. thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Faculty of Agriculture. (in Farsi)
3. Barro, F. & Martín, A. (1999). Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant Breeding*, 118, 79-81.
4. Bayliss, K.L., Wroth, J.M. & Cowling, W.A. (2004). Pro-embryos of *Lupinus* spp. produced from isolated microspore culture. *Australian Journal Agriculture Resources.* 55, 589-593.
5. Cordewener, J. H. G., Hause. G., Gorgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, J.J.M., Van Lammeren, A. A. M., Van Lookeren Campagne, M. M. & Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of the 70 kDa class of heat shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L microspores. *Planta*, 196, 747-755.
6. Deutsch, F., Kumlehn, J., Ziegenhangen, B. & Fladung, M. (2004). Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture. *Physioloogy Plant*, 120, 613-622.
7. Ferrie, A.M.R., Palmer, C.E. & Keller, W.A. (1995). Haploid embryogenesis. *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 20, 309-344.
8. Garrido, D., Vicente, O., Heberle-Bors, E. & Isabel Rodriguez-Garcia, M. (1995). Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, 18, 220-230.
9. Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104, 283-300.
10. Gudin, S. (2000). Rose: genetics and breeding. *Plant Breed*ing 17, 59-189.
11. Guha, S. & Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 4957, 497.
12. Guo, Y. D. & Pulli, S. (2000). An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.). *Plant Cell Reports*, 19, 761-767.
13. Hennry, R., Raymond, R. & Miller, A. (1996). Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). *Plant cell Reports*, 15, 905-909.
14. Heslop-Harrison, J. & Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluoresce indiacetate. *Stain Technology*, 45, 115-120.
15. Hofer, M. (2004). In vitro androgenesis in apple-improvement of the induction phase. *Plant Reports*, 22, 365-370.
16. Hofer, M., Touraev, A. & Heberle-Bors, E. (1999). Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Reports*, 18, 1012-1017.
17. Meynet, J., Botton, E., Eychene, J. & Aime, F. (1996). Optimization of a method for the haploidization of cultivated roses. *Acta Horticultur*ae, 424, 399-401.

18. Raminez, C., Testillano, P. S., Pinto, B., Moreno, M. A., Bueno, M. A. & Risueno, M. C. (2004). Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *European Journal of Cell Biology*, 83, 213-225.
19. Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E. & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiology Plant*, 127, 519-534.
20. Sharp, W. R., Roskin, R.S. & Sommer, H. E. (1972). Haploidy in *Lilium. Phytomorphology*, 21, 234-337.
21. Simmonds, D. H. & Keller, W. A. (1999). Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*, 208, 383-391.
22. Sunderland, N. & Dunwell, J. M. (1977). Anther and pollen culture. In: Street, H.E. (ed) *Plant tissue and cell culture*. Oxford, Blackwell, pp 223-265.
23. Sunderland, N. & Huang, B. (1987). Ultrastructural aspects of pollen dimorphism. *International Review of Cytology*, 107, 175-220.
24. Sunderland, N. (1977). Observations on anther culture of ornamental plants. In: R.J. Gautheret (Editor), *La Culture des Tissues et des Cellules des Vegetaux*. Masson, Paris, pp. 34-36.
25. Tabaiizadeh, Z. & Khosh-Khui. (1981). Anther culture of rose. *Scientia Horticulturae*, 15, 61-66.
26. Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O. & Heberle-Bors, E. (1996). Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports*, 15, 561-565.
27. Touraev, A., Pfosser, M. & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Resources*, 35, 53-109.
28. Vergne, P., Delvallee, I. & Dumas, C. (1987). Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permealization. *Stain Technol*ogy, 62, 299-304.
29. Weatherhead, M.A., Grout, B.W.W. & Short, K.C. (1982). Increased haploid production in *Saintpaulia ionantha* by anther culture. *Scientia Horticulture*, 17, 137-144.
30. Wenzel, G., Hoffmann, F. & Thomas, E. (1977). Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 51, 81-86.
31. Zarsky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schofel, F. & Heberle-Bors, E. (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell Environment*, 18, 139-147.