

ارزیابی تأثیر رقم، تنظیم کننده‌های رشد و نور در زمان انکوبه کردن بر القای هاپلوئیدی لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* از طریق کشت میکروسپور

محمد مهدی فخرائی^{۱*}، مصطفی عرب^۲ و مهران عنایتی شریعت پناهی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۷)

چکیده

لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* گل نسبتاً جدیدی است که به سرعت در رده ده گل برتر شاخه بریده در دنیا قرار گرفته است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد. در این پژوهش میزان پاسخ به آندروژن در هفت رقم لیسیانتوس به کشت میکروسپور در شرایط کاملاً یکسان کشت بررسی شد. در آزمون مجزا نیز تأثیر تنظیم کننده‌های رشد را در القای هاپلوئیدی لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور، مورد بررسی قرار دادیم. اثر متقابل 2,4-D با سه سطح غلظت ۱ و ۲ mg/l و ۰/۵ و کیتین با سه میزان ۱ و ۰/۵ و ۰/۱ mg/l مورد مطالعه قرار گرفت؛ هم‌چنین اثر متقابل NAA با دو سطح غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و کیتین با غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای ۲×۳ و ۲×۲ هر یک با سه تکرار بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده تمام ارقام به آندروژن پاسخ مثبت دادند، اما بیشترین تغییرات مربوط به دو رقم 'ماریاچی پیور وایت' و 'ماریاچی بلو پیکوتی ایمپروود' بود. در تیمار ۰/۵ mg/l NAA با ۱ mg/l کیتین سوسپانسیون تشکیل شد. در تیمار ۰/۵ mg/l 2,4-D همراه ۰/۱ mg/l کیتین و تیمار ۰/۵ mg/l 2,4-D با ۰/۵ mg/l کیتین تقسیم سلولی صورت گرفت و ساختار چند سلولی دیده شد، هم‌چنین در تیمار ۲ mg/l 2,4-D همراه ۱ mg/l کیتین میکروسپورها شروع به تقسیم سلولی کردند. در آزمایشی دیگر، اثر نور در زمان انکوبه کردن، با ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی بررسی شد. در این آزمایش مشخص گردید که نور سفید، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در میکروسپورها ایجاد نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: آندروژن، کیتین، گل لیسیانتوس، نور سفید، 2,4-D، NAA

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شیراز

۲. گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳. بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmfakhraei@yahoo.com

مقدمه

گل لیسیانтус (*Eustoma grandiflorum*) از خانواده جتیناناسه (Gentianaceae)، در بیشتر نقاط دنیا کشت می شود و از اهمیت بالایی در بازارهای جهانی برخوردار است (۱۱، ۱۳ و ۱۶). گیاهان هاپلوئید را که حاوی نیمی از مجموعه کروموزوم ها می باشند، می توان از طریق کشت بساک و میکروسپور که در وضعیت رسیدگی خاصی هستند به دست آورد (۱۲). گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه به نژادی و تحقیقات ژنتیک بنیادی در گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار است. کشت میکروسپور یکی از تکنیک های مؤثر و مطمئن برای تولید تعداد زیادی از گیاهان هموزایگوس به شمار می رود. در این روش بازیافت تعداد زیادی از گیاهان هاپلوئید به علت دارا بودن تعداد زیادی میکروسپور روشی است که اخیراً به علت مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است. پتانسیل تولید گیاهان هاپلوئید در کشت میکروسپور بالا بوده و تولید سریع لاین های خالص از میکروسپورهای ایزوله، مهم ترین ویژگی آن در برنامه های اصلاحی می باشد (۱).

کاربرد موفقیت آمیز آندروژنز (کشت بساک و میکروسپور) در اصلاح محصولات زراعی به وجود دستورالعمل قابل قبولی برای کشت بستگی دارد که بتوان آنها را برای ژنوتیپ های مهم اقتصادی استفاده نمود و مطالعات بیوتکنولوژی بایستی با بهترین ژنوتیپ های موجود شروع شود (۱۷). همان طور که مشخص است ارقام هیبرید منحصر به فرد اشتقاقی از تلاقی بین والدین هتروزیگوس با استفاده از یک هیبرید F_1 حقیقی می توان یکنواختی و کیفیت محصولات را بهبود بخشید، که گام اول به سوی اصلاح لاین های خالص، القای آندروژنز در ارقام برگزیده است (۱۴)، پس بهتر است آزمایش های مربوط به آندروژنز با برترین ژنوتیپ های تجاری آغاز شود، که در این پژوهش نیز از برترین و پرتعدادترین ژنوتیپ های لیسیانтус در دنیا و ایران استفاده شد.

کشت میکروسپور در گل لیسیانтус برای اولین بار در دنیا،

در طی این پژوهش انجام شد و به موفقیت های امیدوار کننده ای دست یافتیم. لازم به ذکر است، گل لیسیانтус یکی از معدود گل های با ارزش و تجاری شاخه بریده ای است که از طریق تکثیر جنسی (بذر) تکثیر می گردد و کشورمان سالانه اقدام به واردات مستقیم میلیون ها بذر F_1 یا نشاء حاصل از بذر آن نموده و با توجه به این که هاپلوئیدی اولین گام در رسیدن به تولید بذر هیبرید F_1 با ایجاد لاین های اینبرد می باشد (مخصوصاً آندروژنز که توجه پذیرترین، سریع ترین و پربازده ترین و کامل ترین روش هاپلوئیدی است). این پژوهش اولین حلقه در دستیابی به بذر F_1 این گل با ارزش و تجاری از طریق فناوری های نوین و روش های بیوتکنولوژی در دنیا محسوب می گردد. هدف از این پژوهش بررسی اثر متقابل سه سطح 2,4-D با میزان های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر با، سه سطح کیتین با مقادیر ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر و همچنین اثر متقابل دو سطح غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کیتین و NAA با غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، که در این آزمون مطالعه شد. اهداف دیگر این پژوهش ارزیابی تأثیر هفت نوع رقم و همچنین ارزیابی اثر نور در زمان انکوبه کردن روی کشت میکروسپور بود، که برای اولین بار در دنیا انجام گرفت.

مواد و روش ها

آزمایش ۱: بررسی اثر نوع ژنوتیپ و رقم

در این آزمایش میزان پاسخ به آندروژنز در ۷ رقم از گل لیسیانтус (که این ارقام همگی از سری ماریاچی بودند، تنها سری که در ایران کشت می شود و جزء پرتعدادترین سری های لیسیانтус در دنیاست) مورد بررسی قرار گرفت. هفت رقم مورد بررسی، ارقام 'ماریاچی پیور وایت' (Mariachi Pure White)، 'ماریاچی بلو' (Mariachi Blue)، 'ماریاچی یلو پیکوتی ایمپروود' (Mariachi Blue Picotee Improved)، 'ماریاچی کارمین' (Mariachi Carmine)، 'ماریاچی پینک' (Mariachi Pink)، 'ماریاچی پینک پیکوتی' (Mariachi Pink Picotee) و 'ماریاچی یلو ایمپروود' (Mariachi Yellow)

Improved) بودند (شکل ۱). نشاء تمامی این ارقام در شرایط کاملاً مشابهی (دمای ۲۴ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ - ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب و در pH خاک با حدود ۶/۵) در گلخانه‌ای در شهرستان پاکدشت کشت شده بودند و تا زمان گلدهی در این شرایط نگهداری شدند. کشت میکروسپور تمام این ارقام در شرایط کاملاً یکسان به منظور بررسی میزان پاسخگویی هر یک از آنها به القای آندورژنز صورت گرفت.

آزمون‌های سیتولوژیکی به منظور تشخیص بهترین مرحله تکامل دانه گرده (میکروسپورورژنز) و بهترین رابطه مورفولوژیکی با این مرحله، در آزمایشگاه سیتوژنتیک و اصلاح گروه باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام گرفت. با انجام آزمایشی پاسخگوترین مرحله تکاملی دانه گرده به القای آندورژنز، برای کشت میکروسپور گل لیسیانتوس شناسایی شد و با آزمون‌های سیتوژنتیکی اندازه غنچه این گل در این مرحله تعیین گردید.

آزمایش‌های مربوط به کشت میکروسپور گل لیسیانتوس در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. گندزدایی وسایل و ظروف حاوی آب مقطر و محیط استخراج با دمای $^{\circ}\text{C} 21$ و فشار $1/2$ کیلوگرم بر سانتی متر مربع (Kg/cm^2) در اتوکلاو و برخی از وسایل در آون انجام گرفت؛ اما با توجه به حساس بودن بعضی ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه به حرارت اتوکلاو، محیط کشت با فیلتر سرسرنگی (Syringe filter) $0/2$ میکرونی گندزدایی شد. ضدعفونی و گندزدایی غنچه‌ها در زیر هود لامینار (Air laminar flow hood) در داخل فالكون 50 میلی‌لیتری حاوی $30-40$ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم $3/5$ درصد با تکان دادن (درون یخ و شیکر)، به مدت 15 دقیقه انجام گرفت و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر شستشو شد. لازم به ذکر است که به‌منظور از بین رفتن احتمال مرگ میکروسپورها تمام محلول‌های گندزدایی، آب مقطر، محیط استخراج (جداسازی) میکروسپور و محیط کشت قبل از استفاده در یخچال $^{\circ}\text{C} 4$ نگهداری شد.

برای استخراج و جداسازی میکروسپورها از بساک گل لیسیانتوس با توجه به ارزیابی‌هایی که انجام دادیم، محیط B₅-13 با 13 درصد ساکارز و با $\text{pH}=6$ به عنوان بهترین محیط جداسازی شناخته شد. بهترین روش جداسازی میکروسپورها گل لیسیانتوس جداسازی با کمک مگنتی که توسط هیتراستیر درون ظروف شیشه‌ای می‌گردید، بود. سپس دو بار سانتریفیوژ به مدت 5 دقیقه با دور 1400 rpm، بر اساس بررسی‌های انجام شده و به منظور جداسازی، پاک‌سازی و رسوب میکروسپورها انجام شد (۷).

پس از جداسازی بساک‌ها از غنچه‌ها با پنس در شرایط گندزدایی شده، به کمک مگنتی که توسط هیتراستیر درون ظروف شیشه‌ای می‌گردید، میکروسپورها را از بساک‌ها، ایزوله و جدا شدند. درون هر ظرف شیشه‌ای 25 تا 30 بساک قرار گرفت. پس از جداسازی (ایزوله کردن) میکروسپورها، سوسپانسیونی از میکروسپورهای جدا شده در محیط جداسازی به‌دست آمد. این سوسپانسیون را در شرایط کاملاً گندزدایی شده از الک آزمایشگاهی 58 میکرومتری عبور داده و در ارلن گندزدایی شده قرار گرفت؛ سپس هر 30 میلی‌لیتر از آن را در یک فالكون 50 میلی‌لیتر ریخته و فالكون‌ها را در سانتریفیوژ قرار دادیم. دور و مدت زمان سانتریفیوژ با توجه به آزمایش انجام شده تعیین و دو بار با این دور و مدت زمان، به منظور جداسازی، پاک‌سازی و رسوب میکروسپورها سانتریفیوژ انجام شد. در ادامه $5-4$ میلی‌لیتر محیط مایع NLN با 13 درصد ساکارز و $\text{pH}=5/8$ به رسوب میکروسپور ته فالكون اضافه کردیم و چند بار به هم زدیم تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت گردد.

آزمایش ۲: مطالعه تأثیر میزان و انواع تنظیم کننده‌های رشد

در آزمونی جداگانه تأثیر تنظیم کننده‌های رشد را در القای هاپلوئیدی لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور مورد بررسی قرار دادیم. در این آزمایش اثر متقابل سه سطح 2,4-D با میزان‌های $0/5$ میلی‌گرم بر لیتر، 1 میلی‌گرم بر لیتر (4 و 10)،

نوع و میزان کربوهیدرات در کشت میکروسپور لیسپانتوس، محیط مایع NLN با ۱۳ درصد ساکارز انتخاب شد (۸).

آزمایش ۱: بررسی تأثیر رقم و ژنوتیپ

هفت رقم مورد آزمون، همگی به آندروژنز پاسخ مثبت دادند؛ اما بیشترین تغییرات مربوط به دو رقم 'ماریاچی پیور وایت' و 'ماریاچی بلو پیکوتی ایمپرو' بود؛ که به فراوانی تمام مراحل متورم شدن، تشکیل سوسپانسون، شروع تقسیم چند سلولی و ساختار چند سلولی در کشت میکروسپور این دو رقم مشاهده شد (شکل ۲). لازم به ذکر است که رقم 'ماریاچی پیور وایت' از پر طرفدارترین ارقام لیسپانتوس در دنیا و ایران به شمار می‌رود و با توجه به این آزمایش، خوشبختانه این رقم از پاسخگوترین ارقام به آندروژنز بود.

آزمایش ۲: مطالعه تأثیر میزان و انواع تنظیم کننده‌های رشد

تمام تیمارهای هورمونی 2,4-D با کیتین و NAA همراه با کیتین به مرحله متورم شده میکروسپور (که اولین مرحله تغییر مسیر گاموفیتی به اسپروفیتی است) رسیدند (شکل ۳ و ۴)؛ اما تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کیتین در این مرحله متوقف شد. در همه تیمارها به جز تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کیتین، علاوه بر تورم میکروسپور، دیواره میکروسپور ترکید و سلول‌های میکروسپورهای شروع به خارج شدن از دیواره میکروسپور کردند (شکل ۵ و ۶). در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA با ۱ میلی گرم بر لیتر کیتین سوسپانسون تشکیل شد (شکل ۷). در تیمارهای مشابه، بال (Bal) و اباک (Abak) در سال ۲۰۰۵ با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در کشت میکروسپور گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) به ساختار چند سلولی رسیده بودند (۲) و همچنین در سال ۲۰۰۶ سیستو و همکاران در کشت میکروسپور گندم (*Triticum turgidum* L.) با ۱ میلی گرم بر لیتر کیتین به گیاهچه‌های هاپلوئید و سپس گیاهان هاپلوئید مضاعف دست یافته بودند (۴).

۲ میلی گرم بر لیتر (۱۵) و سه سطح کیتین با مقادیر ۰/۱ میلی گرم بر لیتر (۱۰)، ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (۱۵)، ۱ میلی گرم بر لیتر (۴) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر متقابل کیتین با دو سطح غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر و NAA با غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (۲، ۳ و ۱۵) در این آزمون به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای ۲×۲ و ۲×۳ هر یک با سه تکرار، مطالعه شد.

در ادامه ۶ میلی لیتر از محیط مایع NLN در پتری‌های ۶ سانتی متر ریختیم و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی میکروسپور به پتری‌ها اضافه و هر پتری را با دو دور پارافilm درزگیری کردیم. در نهایت پتری‌ها را پس از اعمال پیش تیمارها، در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی انکوبه شدند.

آزمایش ۳: تأثیر نور در زمان انکوبه کردن

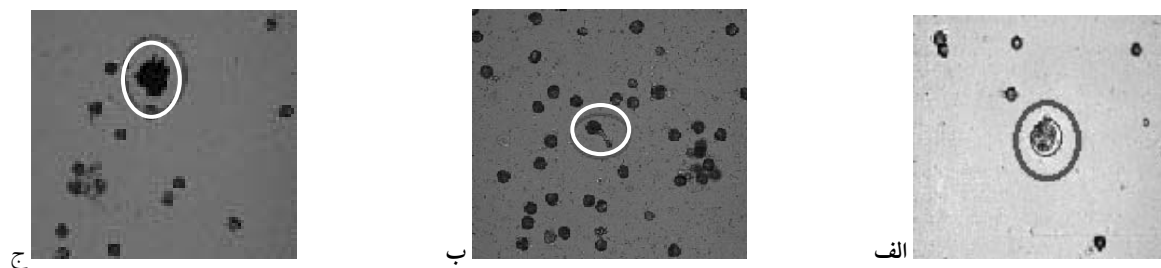
در قسمت دیگر این پژوهش اثر نور در زمان انکوبه کردن نیز در آزمایشی جداگانه بررسی شد و به این منظور پتری‌ها در اتاقک رشد (Growth chamber) با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. تحول و تغییرات میکروسپورها پس از کشت و انکوبه کردن، با میکروسکوپ اینورس (microscope Inversion) موجود در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ساخت ژاپن - شرکت نیکون NIKON) دیده شود.

نتایج و بحث

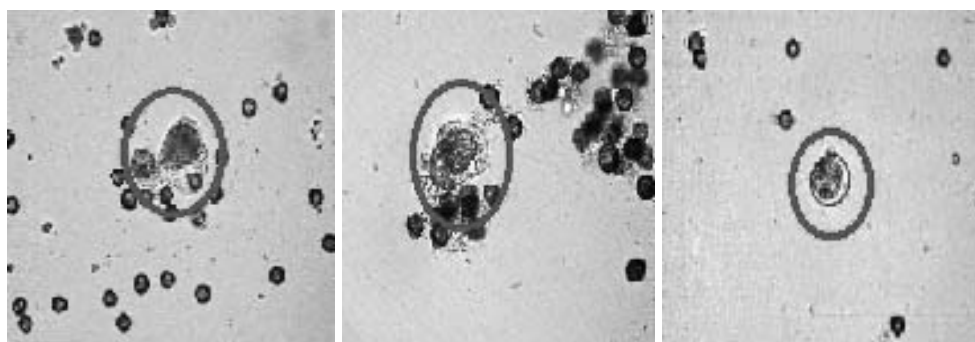
با انجام آزمایشی پاسخگوترین مرحله به القای آندروژنز و به عبارتی بهترین مرحله تکاملی دانه گرده برای کشت میکروسپور در گل لیسپانتوس مرحله تک هسته‌ای شناخته شد (۹) و با آزمون‌های سیتولوژیکی و سیتوژنتیکی اندازه غنچه این گل در مرحله تک هسته‌ای، ۳/۵ - ۲/۵ سانتی متر تعیین شد (۵) و ۶. با توجه به انجام آزمون‌های صورت گرفته به منظور تعیین برترین و پاسخگوترین محیط کشت و همچنین بهترین



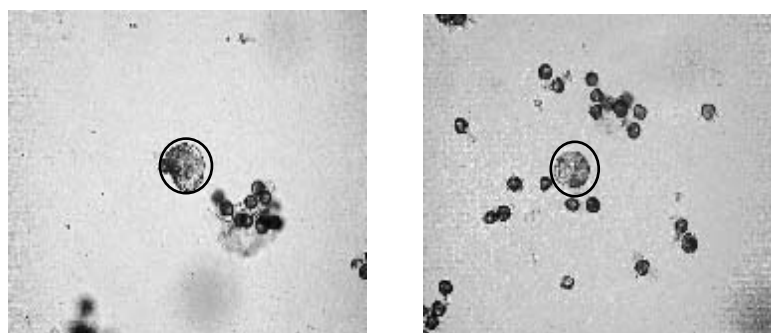
شکل ۱. ارقام لیسیانتوس



شکل ۲. رقم 'ماریاچی پیور وایت' در مراحل: الف) متورم شدن، ب) تشکیل سوسپانسیون، ج) ساختار چند سلولی



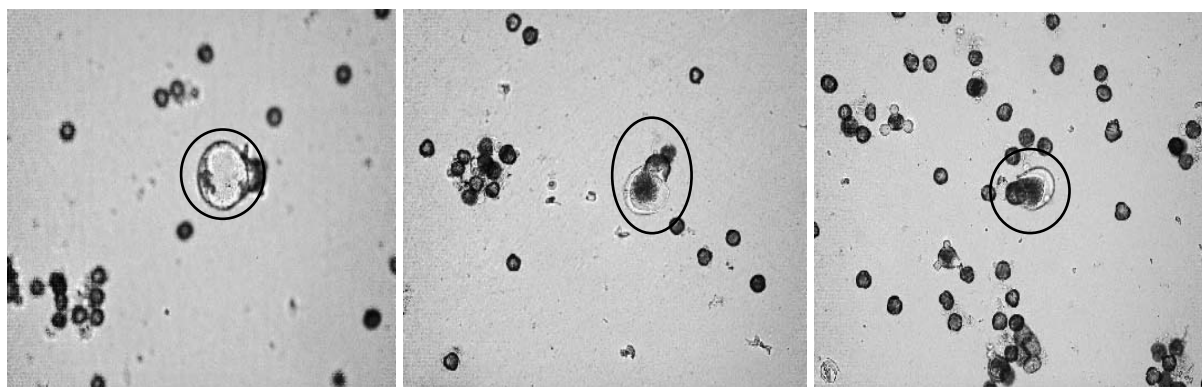
شکل ۳. میکروسپور متورم در تیمارهای هورمونی 2,4-D با کیتین



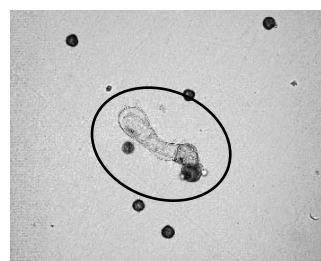
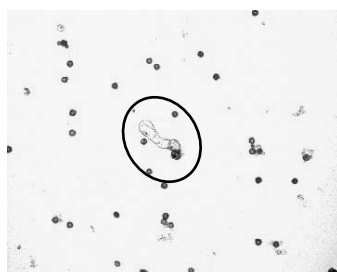
شکل ۴. میکروسپور متورم در تیمارهای هورمونی NAA همراه با کیتین



شکل ۵. ترکیدن دیواره میکروسپور، در تیمارهای 2,4-D با کیتین



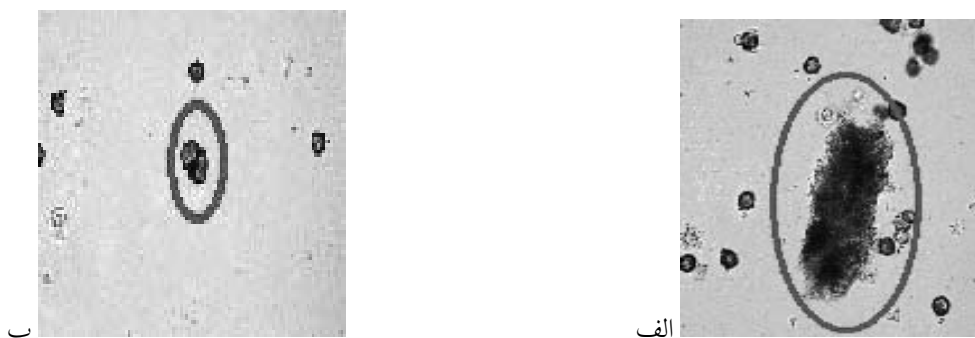
شکل ۶. ترکیدن دیواره میکروسپور، در تیمارهای NAA همراه با کیتین



شکل ۷. تشکیل سوسپانسیون در تیمار ۵/۰ میلی گرم بر لیتر NAA با ۱ میلی گرم بر لیتر کیتین

(شکل ۸). تیمارهای تنظیم کننده رشد مورد استفاده توسط اولسزکزیوک و همکاران در سال ۲۰۰۴ با برترین تیمارهای این پژوهش تطابق داشت، آنها با ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و هم چنین ۵/۰ میلی گرم بر لیتر کیتین در کشت میکروسپور تریتیکاله هگزاپلوئید (*hexaploid tritcale* × *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo به بیشترین میزان جنین زایی و گیاهچه هاپلوئید (نسبت به سایر

در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D همراه ۱ میلی گرم بر لیتر کیتین میکروسپورها شروع به تقسیم سلولی کردند. تنها در تیمار ۵/۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با ۵/۰ میلی گرم بر لیتر کیتین تقسیم سلولی صورت گرفت و ساختار چند سلولی دیده شد. به دلیل تقسیم سلولی و مشاهده ساختار چند سلولی این دو تیمار به عنوان بهترین تیمارهای تنظیم کننده رشدی در کشت میکروسپور گل لیسیانئوس ارزیابی شدند



شکل ۸. الف) ساختار چند سلولی در ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با ۵ میلی گرم بر لیتر کینتین، ب) شروع به تقسیم سلولی در تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D همراه ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین

باغبانی و مخصوصاً گل‌ها برای اولین بار در ایران با روش کشت میکروسپور به عنوان مناسب‌ترین و پر عملکردترین روش موجود، که به عنوان جایگزینی برای سایر روش‌های اصلاحی سنتی در دنیا شناخته شده است، انجام شد. (لازم به ذکر است که تا به حال آندروژن تنها از طریق کشت بساک در گیاهان باغی فقط در گل اطلسی، گل رز، توت فرنگی، انگور و گوجه فرنگی در ایران صورت گرفته است، که اکثر این موارد نتایج کاملاً موفقیت‌آمیزی را در پی نداشته است).

مشاهده ساختار چند سلولی در کشت میکروسپور این گل با ارزش، برای اولین بار در دنیا، نتیجه امیدوار کننده‌ای برای ادامه تحقیقات در این زمینه را فراهم آورده است و هم‌چنین می‌تواند به عنوان گامی موثر در بومی‌سازی این فناوری نوین در اصلاح و تولید بذر سایر محصولات باغی تلقی شود.

نتیجه‌گیری

دو رقم 'ماریاچی پیور وایت' و 'ماریاچی بلو پیکوتی ایمپرو' از پاسخگوترین ارقام لیسیانتوس به القای آندروژن ارزیابی شدند. تیمار هورمونی ۵ mg/l 2,4-D همراه ۱ mg/l کینتین و هم‌چنین ۵ mg/l 2,4-D با ۵ mg/l کینتین، را می‌توان به عنوان بهترین تیمارهای هورمونی در کشت میکروسپور لیسیانتوس پیشنهاد نماییم. استفاده از نور در زمان انکوبه کردن میکروسپورهای لیسیانتوس به هیچ وجه توصیه نمی‌شود.

تیمارها و تیمار شاهد) دست یافتند و در ادامه گیاهان هاپلوئید مضاعف تولید کردند (۱۵).

آزمایش ۳: تأثیر نور در زمان انکوبه کردن

عموماً کشت بساک و میکروسپور ایزوله در شرایط تاریکی نگه‌داری می‌شوند. منابع زیادی در مورد اهمیت نور و کیفیت نور بر القای آندروژن از میکروسپور در دست نیست. در پژوهشی نشان داده شد که تاریکی و نور آبی تقویت‌کننده جنین‌زایی می‌شود، در صورتی که نور سفید برای جنین‌زایی باز دارنده بود (۱۸). با این آزمایش نشان دادیم که در لیسیانتوس نیز، نور سفید در زمان انکوبه کردن با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تغییر قابل ملاحظه‌ای را در میکروسپورها ایجاد نمی‌کند.

در فرآیند القای آندروژن نیاز به تغییر مسیر میکروسپورها از گامتوفیتی به اسپروفتیتی است، که در این فرآیند ابتدا میکروسپورها متورم می‌شوند و برخی اوقات سوسپانسون تولید می‌کنند، سپس با تقسیم سلولی، ساختار چند سلولی ایجاد می‌گردد و در نهایت جنین‌های هاپلوئید از این ساختار چند سلولی پدید می‌آیند.

در این پژوهش برای اولین بار، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس در دنیا انجام شد و به نتایج امیدوار کننده‌ای در زمینه رسیدن به القای آندروژن در گل لیسیانتوس (که از محدود گل‌های شاخه بریده و با ارزشی است که با بذر تکثیر می‌گردد) دست یافتیم. هم‌چنین در این پژوهش هاپلوئیدی در گیاهان

منابع مورد استفاده

1. Aslani, F., J. Mozaffari, M. R. Ghanadha and A. A. S. Khwaja Ahmad Attari. 1384. Microspore culture and haploid plants of different cultivars of rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science* 36(2): 331-339 (In Farsi).
2. Bal, U. and K. Abak. 2005. Induction of symmetrical nucleus division and multicellular structures from the isolated microspores of *Lycopersicon esculentum* mill. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 19: 35-42.
3. Chuong, P. V. and W. D. Beversdorf. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. Carinata* braun. *Plant Science* 39: 219-226.
4. Cistu'e, L., M. Soriano, A. M. Castillo, M. P. Vall'es, J. M. Sanz and B. Ech'avarri. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant cell reports* 25: 257-264.
5. Fakhraei, M. M., M. Arab, M. E. Shariatpanahi, M. Lotfi, SH. Azizinia and M. Younessi Hamzekhanlu. 1389. Investigation of pollen maturity stages (microsporogenesis) in Lisianthus(*Eustoma grandiflorum*) cultivars by asetocarmen. In: The 2nd National Biology Congress on Young Researchers. Tehran, Iran. (In Farsi).
6. Fakhraei, M. M., M. Arab, M. E. Shariatpanahi, M. Lotfi, SH. Azizinia and F. Zelanvar. 1390. Assessment of best method of dyeing microspore of lisianthus flower (*Eustoma grandiflorum*) (with DAPI fluorescent dye and three detector acetocarmine, aceto-orcein and fuchsin). PP. 375-378. In: 7th Iran. Cong. of Horticultural Science. Isfahan, Iran. (In Farsi).
7. Fakhraei, M. M., M. Arab, M. E. Shariatpanahi, M. Lotfi, SH. Azizinia and F. Zelanvar. 1390. Best separation of method and Isolation medium and circuit and time of centrifuge in culture of Lisianthus flower (*Eustoma grandiflorum*) microspore. In: 8th National Biotechnology Congress the of I.R. Tehran, Iran. (In Farsi).
8. Fakhraei, M. M., M. Arab, M. E. Shariatpanahi, M. Lotfi, SH. Azizinia and F. Zelanvar. 1390. Effect of different density of and kinds carbohydrates and five kind of medium on androgenesis in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) 'Mariachi Pure White' type. In: 8th National Biotechnol. Cong. the of I. R. Tehran, Iran (In Farsi).
9. Fakhraei, M. M., M. Arab, M. E. Shariatpanahi, M. Lotfi, SH. Azizinia and F. Zelanvar. 1390. Effect of cultivar, bud size and stage of pollen development (microsporogenesis) on androgenesis lisianthus flower (*Eustoma grandiflorum*) through microspore culture. PP. 133-138. In: 1th National Conference on Sustainable Agriculture. Islamic Azad University Varamin Pishva branch, Varamin, Iran. (In Farsi).
10. Guo, Y. D. and S. Pulli. 2000. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in Timothy (*Phleum pratense* L.). *Plant Cell Reports* 19: 761-767.
11. Halvy, A. H. and A. M. Kofranek. 1984. Evaluation of lisianthus as a new flower crop. *Hort Science* 19(6): 845-847.
12. Honarnejad, R. 1372. Effect of different culture media on embryo creation and formation of haploid plants from microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural Science* 24(3 & 4): 16-28 (In Farsi).
13. Ichimura, K. and M. Korenaga. 1998. Improvement of vase life and petal color expression in several cultivars of cut *Eustoma* flowers using sucrose with 8-hydroxyquinoline sulfate. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea* 13: 31-39.
14. Laura, M., G. Safaverdi and A. Allavena. 2006. Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture. *Plant Breeding* 125(6): 629-634.
15. Oleszczuk, S., S. Sowa and J. Zimny. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rreports* 22: 885-893.
16. Reid, M. S. 2001. Cut Flowers and Greens. Department of Environmental Horticulture, University of California, Davis, CA.
17. Salekdh Hosseini, S. GH., S. Abdemyshany, P. Ahmadian and M. Omid. 1377. Effects of genotypes and cold pretreatment in barley anther culture. *Journal of Agricultural Science* 29(2): 389-396 (In Farsi).
18. Taji, A., P. P. Kumar and P. Lakshmanan. 2002. *In vitro* Plant Breeding. Food Products Press, New York. 167 pp.