مطالعه روند رویان زایی میکروسپورهای کلزا رقم پی اف (PF_{704}) در شرایط درون شیشه ای با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

محمد رضا عبداللهی

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۷

چکیده

در این تحقیق، ساختار سلولی میکروسپور های کلزا رقم پی اف (PF_{704})، در مسیر های رشد و نموی گامتوفیتی و رویان زایی در شرایط درون شیشه ای (*in vitro*) با رشد و نمو گامتوفیتی میکروسپورها در شرایط برون شیشه ای (*in vivo*) از طریق مشاهدات میکروسکوپ الکترونی مقایسه می گردند. برنامه ریزی مجدد میکروسپور ها به طرف رویان زایی شامل یک سری تغییرات مشخص است که فعالیتهای سلول و سازماندهی ساختاری آن را تحت تأثیر قرار می دهد و این تغییرات می توانند به عنوان نشانگرهایی برای مسیر رشد ونموی رویان زایی میکروسپورهای کلزا در نظر گرفته شوند. در این تحقیق میکروسپور های کلزا رقم پی اف در روز های مختلف پس از کشت در شرایط درون شیشه ای استخراج و برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی نمونه هایی تهیه گردید. در مراحل مختلف رشد و نمو میکروسپورها، تفاوت در صفات سلولی خاصی از قبیل شکل و اندازه سلولی، معماری هسته سلول، تجمع نشاسته و حضور واکوئلها، جهت شناسایی مراحل متوالی رویان زایی میکروسپورها و مسیر های رشد و نموی دیگر در شرایط درون شیشه ای مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور فراوان دانه های نشاسته در یک ناحیه خاص از سیتوپلاسم می تواند صفت ویژه رشد و نمو گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای و همچنین میکروسپور های غیر القاء شده در شرایط القاء رویان زایی باشد.

واژه های کلیدی: کلزا، کشت میکروسپور، رویان زایی، رشد و نمو گامتوفیتی

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۱۷۷۳۸۵، پست الکترونیکی: m.abdollahi@basu.ac.ir

مقدمه

سیتوکینز غیر قرینه میکروسپورهای کلزا پس از اولین تقسیم میتوز دانه گرده، یک سلول رویشی بزرگ با یک هسته حاوی کروماتین پراکنده و یک سلول زایشی کوچک با کروماتین فشرده ایجاد می کند. سلول زایشی سپس تقسیم شده و دو سلول اسپرماتوزوئید را در دانه گرده سه سلولی ایجاد می کند (۲۲ و ۲۴). میکروسپور تحت استرس دمایی در شرایط درون شیشه ای می تواند برنامه رشد و نموی خود را به طرف رویان زایی تغییر داده و تولید رویانهای هاپلوئید نماید (۵). در بیشتر گونه های گیاهی تغییر برنامه میکروسپور برای رویان زایی تنها در مراحل رشد و نمو خاصی ممکن است (۱۰ و ۱۱). محققین (۲۲) نشان داده اند که در کشتهای میکروسپوری که تقریباً ۲۰ درصد از میکروسپورها به طرف رویان رشد و نمو پیدا می کنند، نسبت بالایی از میکروسپورها در مرحله تک هسته ای انتهایی یا در حال تقسیم و یا ابتدای دو هسته ای می باشند. گزارشات متفاوتی در مورد مورفولوژی میکروسپورهای مرحله تک هسته انتهایی در واریته های مختلف کلزا وجود دارند. میکروسپورهای تک هسته ای انتهایی کلزا در واریته وستار (Westar) حاوی ذرات نشاسته و تعداد زیادی واکوئل خیلی کوچک بود

(۱۶)، در حالی که میکروسپورهای واریته تاور (Tower) (۱۲) و واریته توپاس (Topaz) (۲۲) در این مرحله رشد و نمو فاقد هر گونه نشاسته و واکوئل کوچکی بودند. مطالعات دیگر با واریته توپاس (۲۴) نشان دادند که یک واکوئل بزرگ، بلافاصله قبل از اولین تقسیم میتوز گرده از نظر اندازه کوچک شد و این واکوئل در میکروسپور های دو هسته ای نیز حضور داشت. همچنین این محققین در سالهای ۱۹۹۰ (۲۴) و ۱۹۹۱ (۲۵) با مطالعه بر روی رقم توپاس نشان دادند که رویانهای میکروسپوری از میکروسپورهای مرحله تک هسته ای انتهایی واکوئل دار منشاء گرفته اند. در کلزا، که به عنوان یک گیاه مدل در القای رویان زایی میکروسپور مطرح می باشد، حداقل ۸ ساعت تیمار دمایی در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد لازم است تا مسیر رشد و نموی میکروسپورها به طرف رویان زایی تغییر نماید (۷). این تغییر برنامه میکروسپورها با یک سری تغییرات مشخص همراه است که فعالیتهای مختلف سلولی و سازماندهی ساختاری اجزای داخل سلول را تحت تأثیر قرار می دهد و این تغییرات می توانند به عنوان نشانگرهایی برای فرآیند رویان زایی میکروسپور در نظر گرفته شوند (۴، ۱۹ و ۲۳). بعد از اعمال استرس القایی در شرایط درون شیشه ای، بعضی از میکروسپورها به طرف مسیر رویان زایی می روند در حالی که بعضی دیگر به تیمار استرس القایی حساس نبوده و مسیر های رشد و نموی مختلفی را در پیش می گیرند. اگر کشت میکروسپورها در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد انجام شود میکروسپورها مسیر رشد و نموی گامتوفیتی را در پیش می گیرند (۷). چندین مطالعه، جنبه های مختلف مسیر رشد و نمو رویان زای میکروسپورها را در شرایط استرس مورد بررسی قرار داده اند (۱۹، ۲۰ و ۲۱)، اما توجه کمی به دیگر مسیر های رشد و نموی میکروسپورها در شرایط درون شیشه ای، تحت هر دو شرایط القایی و غیر القایی شده است. در تحقیق حاضر، تغییرات ساختاری میکروسپورهایی که به طرف مسیر رویان زایی کلید می خورند و همچنین دیگر مسیرهای رشد و نموی میکروسپورها در شرایط درون شیشه ای با مسیر رشد و نموی گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای و برون شیشه ای (*in vivo*) با استفاده از مشاهدات میکروسکوپ الکترونی مقایسه شده و تفاوتهای موجود در اندازه و شکل سلولی، معماری هسته، تجمع نشاسته و حضور واکوئلها جهت شناسایی مراحل متوالی مسیر رویان زایی میکروسپورها و مسیر های رشد و نموی دیگر مورد بررسی قرار می گیرند.

مواد و روشها

شرایط رشد گیاهان مادری: این آزمایش در مؤسسه **حفاظت و بهبود کشت و تنوع زیستی دانشگاه پلی تکنیک والنسیا در کشور اسپانیا** انجام گردید. رقم کلزای بهاره پی اف (*Brassica napus* L. cv. PF_{704}) که در آزمایشات رویان زایی میکروسپور نتایج بسیار خوبی نشان داده بود (۱و ۲)، در بررسی مکانیسم رویان زایی میکروسپورهای کلزا با میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان مادری در اتاق رشدی با ۵۵۰۰ لوکس ($۳۰۰\ \mu Em^{-۲}S^{-۱}$) نور و فتوپریود ۱۶ / ۸ h (تاریکی/ روشنایی) با دمای ۱۰ / ۱۵ درجه سانتی گراد (شب / روز)رشد کردند.

کشت میکروسپور : کشت میکروسپور با روش عبداللهی و همکاران (۱و ۲) انجام گردید. بدین ترتیب که ۱۰۰ عدد غنچه با اندازه ۳/۵ـ۲/۵ میلی‌متری، حاوی میکروسپورهای رویان زا ، از گیاهان کشت شده در اتاق رشد *in vivo* انتخاب گردیدند. این غنچه ها با سدیم هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد (وایتکس) به مدت ۱۰ دقیقه، ضد عفونی شدند و سپس دو مرتبه با آب مقطر سترون و سرد شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد ، هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، شستشو داده شد. غنچه‌های سترون شده توسط یک آسیاب حاوی ml ۳۰ محیط جداسازی میکروسپورها (۸) طی ۳ مرتبهٔ ۱۰ ثانیه‌ای آسیاب شد. سوسپانسیون حاصل از آسیاب کردن

غنچه‌ها، به ترتیب از دو الک آزمایشگاهی با سوراخهایی به قطر ۱۰۶ و ۵۳ میکرومتر که بر روی هم قرار داشتند، عبور داده شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون میکروسپورها به وسیله پیپتور و پیپت برداشته شد و به لوله‌های سانتریفیوژ سترون (۲۵ ml در هر لوله) منتقل شدند. سپس این لوله‌ها به سانتریفیوژ منتقل گردیدند. دستگاه سانتریفیوژ روی ۱۲۷۰ rpm دور در دقیقه یا ۲۰۰ g تنظیم گردید و زمان آن روی ۴ دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام ۴ دقیقهٔ اول، لوله های سانتریفیوژ از دستگاه خارج گردیدند و به زیر لامینار ایرفلو منتقل شدند. میکروسپورها در ته لوله‌ها رسوب کردند و محلول جداسازی به همراه مواد زائد در بالا قرار گرفت که این محلول به وسیله پیپت حذف شد و مجدداً به هر لوله، ۲۵ ml محلول جداسازی جدید اضافه گردید. این عمل ۳ مرتبه تکرار گردید. سپس تراکم میکروسپورها روی ۴۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی لیتر محیط کشت تنظیم گردید و سوسپانسیون حاوی میکروسپورها، با محیط کشت NLN-13 (۱۳) به حجم جدید رسانده شد و سوسپانسیون حاصل در داخل پتری دیش های شیشه ای به ابعاد ۱۵×۱۰۰ mm، به مقدار ۱۲/۵ ml، توزیع گردید و دور آنها دو لایه پارا فیلم بسته شد و به انکوباتوری با دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و تاریکی به مدت ۲ روز منتقل شدند. بعد از ۲ روز کشتها به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تاریکی منتقل شدند.

آماده سازی میکروسپورها و رویانهای میکروسپوری برای عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی: به منظور مطالعات فراساختاری میکروسپور های کلزا با میکروسکوپ الکترونی، نمونه های میکروسپوری به روش زیر تهیه شدند:

۱- تثبیت (Fixation) میکروسپورها و رویانهای حاصل از کشت میکروسپور در مراحل مختلف رشد و نمو

در این مرحله میکروسپورهای کشت شده در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ روز بعد از کشت میکروسپور با استفاده از سانتریفیوژ از محیط کشت مربوطه استخراج گردیدند و سپس میکروسپورهای استخراج شده و رویانهای حاصل از کشت میکروسپور در مراحل مختلف رشد و نمو در محلول تثبیت کننده کارنووسکی (Karnovsky fixative)شامل پارافرمالدهید (paraformaldehyde) ۴ درصد و گلوتارالدهید (glutaraldehyde) ۵ درصد در محلول کاکودیلیت (cacodylate) ۰/۰۲۵ مولار با اسیدیته ۷/۳ به مدت ۲ ساعت تثبیت گردیدند. سپس نمونه های میکروسپوری به مدت ۱ ساعت دوباره در محلول ۱ درصد اسمیوم تتروکسید(osmium tetroxide) تثبیت شدند.

۲- آبگیری نمونه های میکروسپوری و رویانها (Dehydration) در اولین روز با استفاده از سریهای استون به صورت زیر انجام شد.

الف- استون ۳۰ درصد به مدت ۲ ساعت، ب- استون ۵۰ درصد به مدت ۳ ساعت، ج- استون ۷۰ درصد به مدت ۲/۵ ساعت و د- در نهایت استون ۱۰۰ درصد در سراسر شب

۳- تیمار نمونه ها با سریهای استون و اپون در روز دوم به شرح زیر انجام گرفت:

الف- استون ۱۰۰ درصد به مدت ۴ ساعت، ب- تیمار نمونه ها با محلول استون- پروپیلن اکسید (۵۰ -۵۰ درصد) به مدت ۵ دقیقه، ج- تیمار با پروپیلن اکسید ۱۰۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و د- تیمار با استون ۱۰۰٪ (سه بار هر دفعه ۵ دقیقه)، ذ- تیمار نمونه ها با محلول استون- اپون (۹۰ -۱۰ درصد) به مدت ۶ ساعت، ر- تیمار با محلول استون-اپون (۷۵-۲۵ درصد) در سراسر شب

۴- در روز سوم نمونه های میکروسپوری و رویانها در سریهای اپون به ترتیب زیر تیمار گردیدند:

الف- اپون ۵۰ درصد به مدت ۴ ساعت، ب- اپون ۷۵ درصد به مدت ۴/۵ ساعت و ج- اپون ۱۰۰ درصد در سراسر طول شب

۵- در چهارمین روز نمونه ها به مدت ۸/۵ ساعت در اپون (یک نوع رزین) ۱۰۰ درصد و سپس در طول شب در محلول اپون ۱۰۰ درصد و سرعت دهنده (Accelerator) قرار گرفتند.

۶- در روز پنجم نمونه ها به مدت ۷/۵ ساعت در محلول اپون ۱۰۰ درصد حاوی سرعت دهنده (Accelerator) قرار گرفتند.

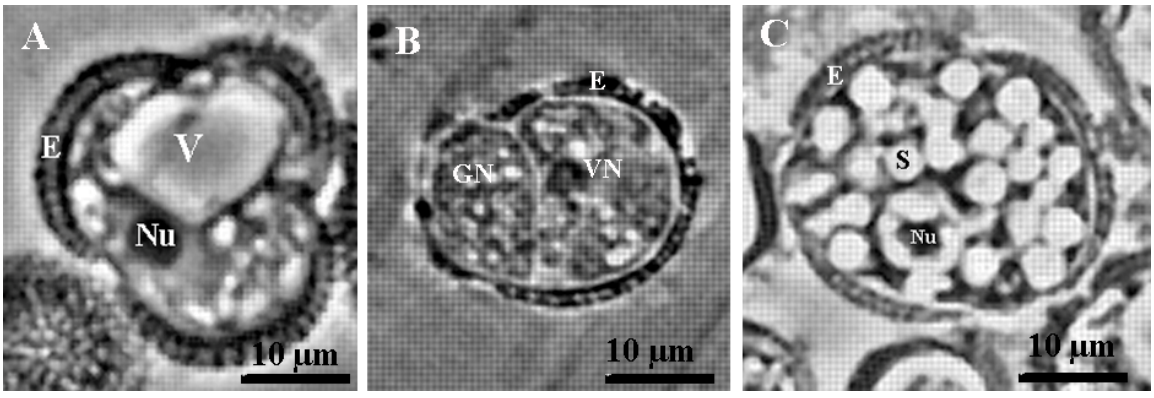
۷- پس از انجام عمل آبگیری با سریهای استون و اپون نمونه ها در داخل کپسولهایی از جنس پلی اتیلن گلیکول قرار گرفتند (Encapsulation) و به مدت ۳ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به منظور عمل پلیمریزاسیون قرار گرفتند.

۸- از نمونه های پلیمریزه شده، برشهایی به ضخامت ۰/۵ میکرومتر تهیه گردید(Cutting).

۹- در نهایت عکس برداری از برشهای تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی مدل Jeol 1010 EM در ۸۰ KV انجام گردید.

نتایج

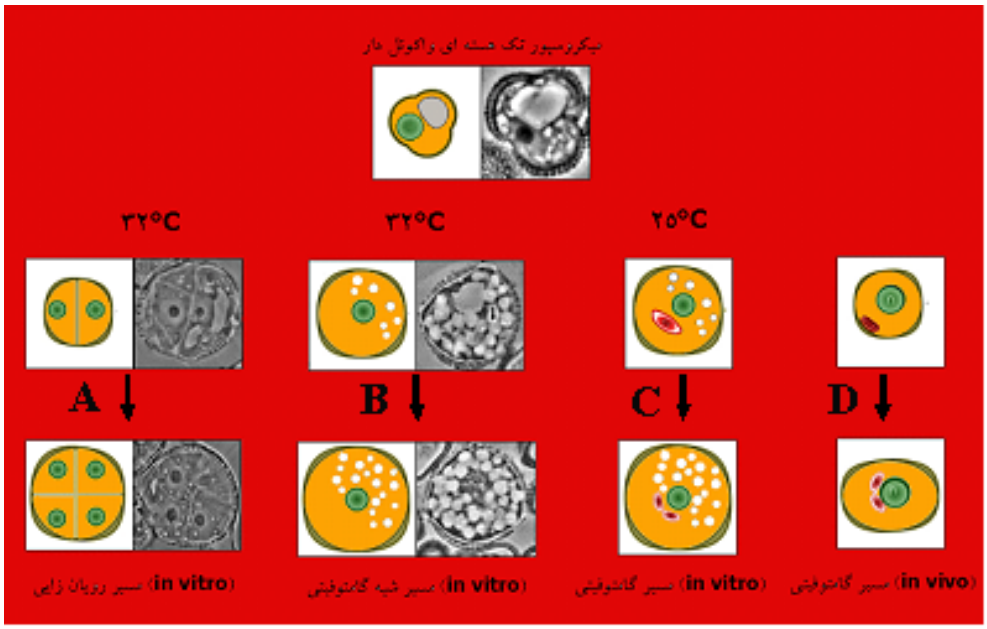
رشد و نمو گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای: کشت میکروسپورها در مرحله تک هسته ای انتهایی واکوئل دار (شکل A ۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد منجر به رشد و نمو آنها به صورت گامتوفیتی گردید، به طوریکه دو و سه روز بعد از کشت میکروسپور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ، میکروسپورها به طرف ساختار هایی مشابه با دانه گرده دو سلولی (شکل۱B) و سه سلولی رشد و نمو پیدا کردند. این ساختارهای مشابه دانه گرده، حاوی هسته رویشی، زایشی، اسپرماتوزوئید ها و سیتوپلاسم متراکم بودند. ساختارهای چند سلولی یا رویانها در این کشتها مشاهده نشدند. در نواحی خاصی از سیتوپلاسم این دانه های گرده کشت شده، تجمعی از دانه های نشاسته مشاهده گردید (شکل ۱C). در سطح فراساختاری، تعداد بی شماری آمیلوپلاست بزرگ حاوی دانه های نشاسته (شکل ۱C) در سیتوپلاسم این گرده های رشد و نمو پیدا کرده درشرایط درون شیشه ای مشاهده گردید.



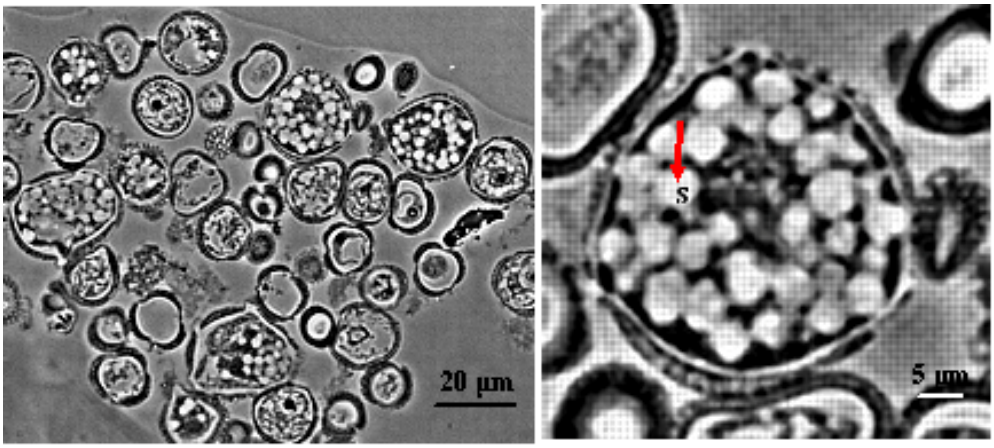
شکل ۱- کشت میکروسپورهای کلزا در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد که منجر به رشد و نمو آنها به صورت گامتوفیتی گردید، A) یک میکروسپور مناسب برای رویان زایی که در مرحله تک هسته ای انتهایی حاوی یک واکوئل بزرگ است، B) رشد و نمو گامتوفیتی یک میکروسپور دوسلولی با تقسیم غیر قرینه حاوی سلول رویشی و زایشی که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد (شرایط غیر رویان زا) کشت شده است، C) رشد و نمو شبه گامتوفیتی یک میکروسپور غیر رویان زای کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد که با تجمع نشاسته در سیتوپلاسم همراه است. (V) واکوئل بزرگ، (Nu) هستک بزرگ، (E) اگزین، (VN) هسته رویشی، (GN) هسته زایشی، (S) نشاسته

رشد و نمو میکروسپورها در شرایط درون شیشه ای تحت استرس دمایی: در کشتهای میکروسپور انکوبه شده در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد (حداقل به مدت ۸ ساعت)، مخلوطی از مسیر های رشد و نموی متفاوت مشاهده

گردید (شکل 2A-C). تعداد زیادی از میکروسپورها یک برنامه رشد و نموی رویان زای را آغاز کردند اما این میکروسپور ها علی رغم داشتن یک سازماندهی ساختاری، شباهتهایی با رشد و نمو گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای نشان دادند. این میکروسپورها حاوی دانه های نشاسته فراوان بودند (شکل ۳) و از این جنبه مشابه میکروسپورهای توسعه یافته در شرایط ۲۵ درجه سانتی گراد بودند. در این کشتها هیچ دانه گرده دو سلولی یا سه سلولی در میان ساختارهای غیر رویان زا مشاهده نگردید و این پدیده نشان دهنده این است که تقسیم میتوز گرده در بیشتر موارد، بعد از تیمار گرمایی متوقف گشته است.

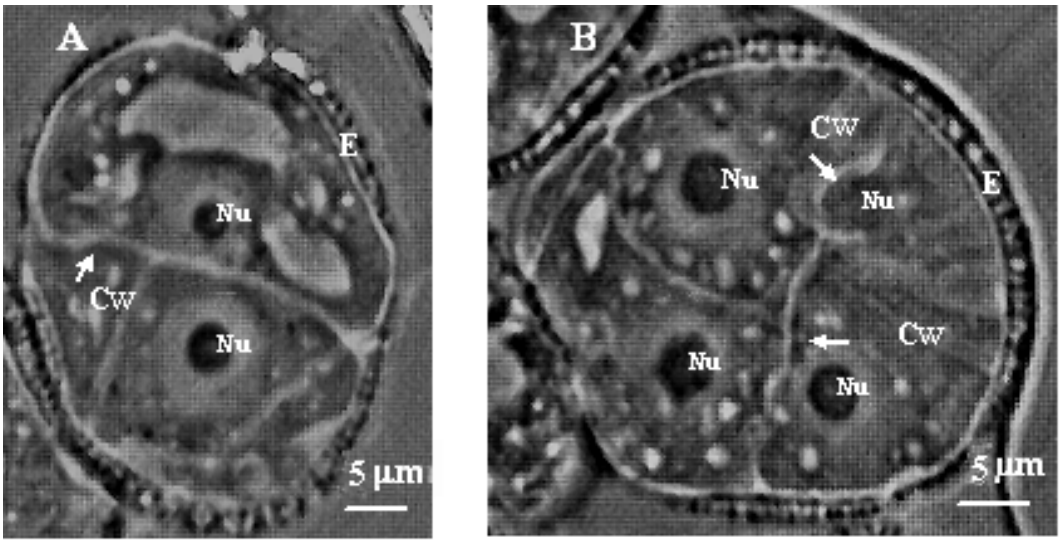


شکل ۲- مسیر های مختلف رشد و نموی میکروسپورهای کلزا رقم پی اف در شرایط درون شیشه ای. (A) مسیر رویان زایی در شرایط درون شیشه ای، (B) مسیر شبه گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای، (C) مسیر گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای، (D) مسیر گامتوفیتی در شرایط طبیعی (*in vivo*)

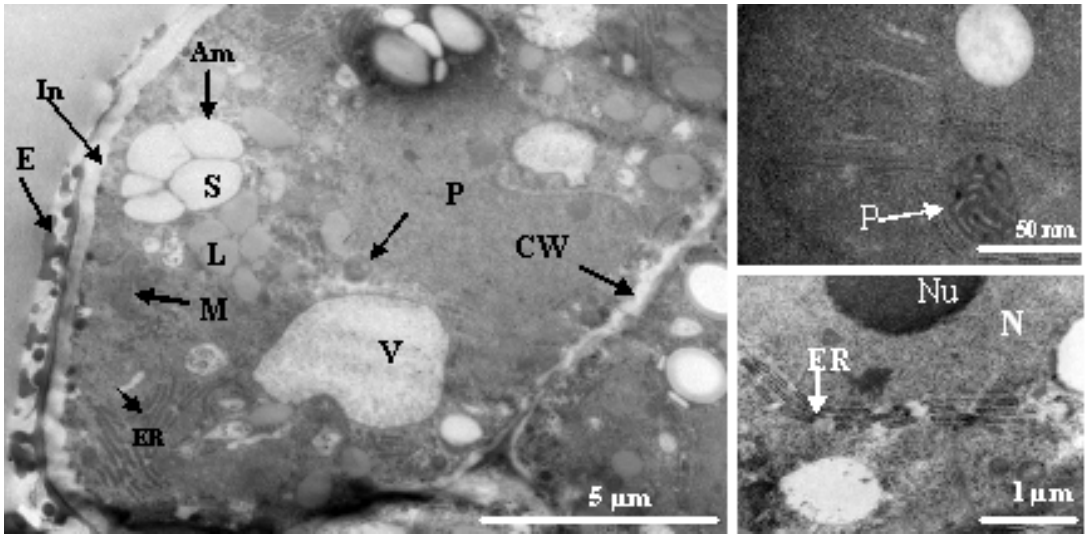


شکل ۳- توده های غیر جنین زا با مسیر رشد و نموی شبه گامتوفیتی که با تجمع نشاسته در داخل سیتوپلاسم همراه است، (S) دانه نشاسته.

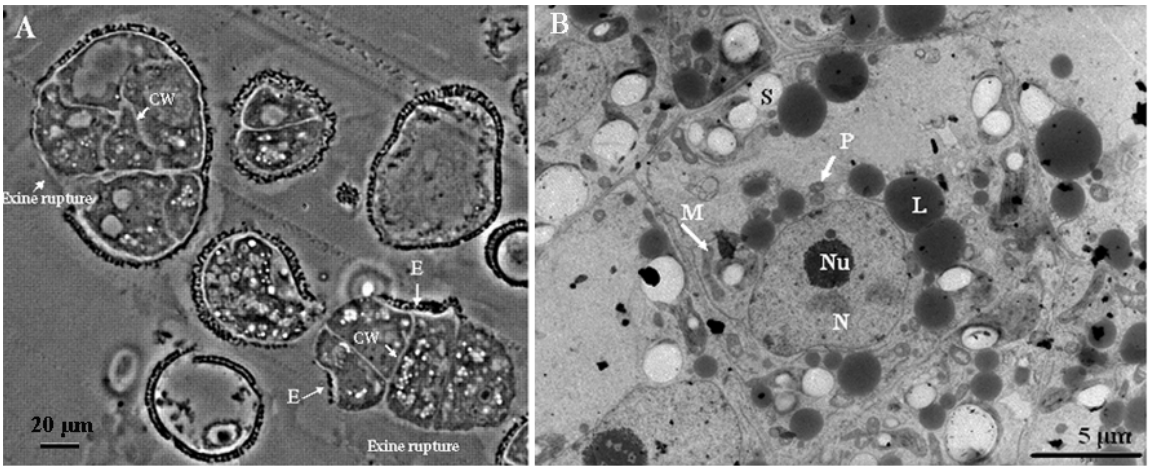
میکروسپورهای پاسخ دهنده به رویان زایی، مسیر رویان زایی را با یک تقسیم سلولی قرینه آغاز کردند (شکل 4A) که منجر به تشکیل یک ساختار دوسلولی قرینه، یک روز بعد از انکوباسیون میکروسپورها در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد گردید. دو سلول حاصل و هسته مربوط به آنها بر خلاف گرده های دوسلولی حاصل از رشد و نمو گامتوفیتی، از نظر اندازه، شکل و سازماندهی با هم مشابه بودند. سیتوپلاسم آنها متراکم ولی فاقد واکوئل بزرگ بودند. هیچ یا تعداد کمی دانه نشاسته در این ساختارهای رویان زای دو سلولی قابل مشاهده بود. پس از این مرحله، تقسیمات بعدی، منجر به ایجاد ساختارهای چند سلولی گردید که همچنان توسط اگزین احاطه شده بودند (شکل 4B). سلولها، در این ساختارهای چند سلولی حاوی تعداد کمی دانه های نشاسته بودند که در داخل سیتوپلاسم پراکنده بودند. دیواره های سلولی جدا کننده سلولها به خوبی در این ساختارهای چند سلولی قابل مشاهده هستند. این ساختارهای چند سلولی همچنان توسط اگزین احاطه شده اند. آنالیز فراساختاری نشان داد که سیتوپلاسم این سلولها غنی از اندامکها، وزیکولها و شبکه آندوپلاسمی می باشد (شکل ۵). آمیلوپلاستهای حاوی تعداد کمی دانه های نشاسته و همچنین واکوئل های کوچک به طور یکنواخت در سراسر سیتوپلاسم این سلولها پراکنده شده اند (شکل ۵). در مراحل بعدی رشد و نمو پارگی اگزین در اطراف ساختارهای چند سلولی مشاهده گردید و تعداد بی شماری از سلولهای در حال تقسیم، در حالی که هنوز بعضی از بقایای اگزین در اطراف قابل مشاهده بود، ساختارهای کروی یا پیش رویانها را تشکیل دادند (شکل 6A). ویژگی فراساختاری سلول های این ساختارهای کروی و پیش رویانها شبیه به وضعیت سلول ها قبل از پارگی اگزین بود (شکل 6B). در مراحل رشد و نموی پیشرفته تر، رویانهای کروی (شکل7A, B) به وجود آمدند و در ادامه سلولها در بعضی نواحی دراز شده و رویانهای قلبی شکل (شکل ۷C) را تشکیل دادند. یک لایه بیرونی حاوی سلولهای کوچک، به ردیف شده و هم اندازه مشابه سلولهای اپیدرمی (protodermis) در اکثر این رویانها به چشم می خورد.



شکل ۴ – مسیر رشد و نمو رویان زای در کشت میکروسپور کلزا رقم پی اف ۷۰۴. A) یک میکروسپور پاسخ دهنده به رویان زایی، که مسیر رویان زایی را با یک تقسیم سلولی قرینه آغاز کرده و منجر به تشکیل یک ساختار دوسلولی، یک روز بعد از انکوباسیون در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد گردیده است. یک دیواره سلولی نازک دو سلول را به صورت قرینه از هم جدا کرده است، B) یک ساختار چهار سلولی قرینه که در ادامه رشد و نمو رویان زایی به دست آمده است و همچنان توسط اگزین احاطه شده است.. دیواره های سلولی جدا کننده سلولها به خوبی در این ساختار چند سلولی قابل مشاهده هستند. (Nu) هستک، (E) اگزین، (CW) دیواره سلولی.



شکل ۵ – یک میکروسپور رویان زا بعد از تقسیم قرینه. سیتوپلاسم سلولهای این ساختار سلولی غنی از اندامکها، وزیکولها و شبکه آندوپلاسمی می باشد و همچنین آمیلوپلاستهای حاوی تعداد کمی دانه های نشاسته و همچنین واکوئلهای کوچک به طور یکنواخت در سراسر سیتوپلاسم این سلولها پراکنده شده اند (P) پروپلاستید، (M) میتو کندری، (L) لیپید، (CW) دیواره سلولی جدید، (E) اگزین، (In) اینتین، (ER) شبکه آندوپلاسمی، (Am) آمیلوپلاست، (V) واکوئل کوچک

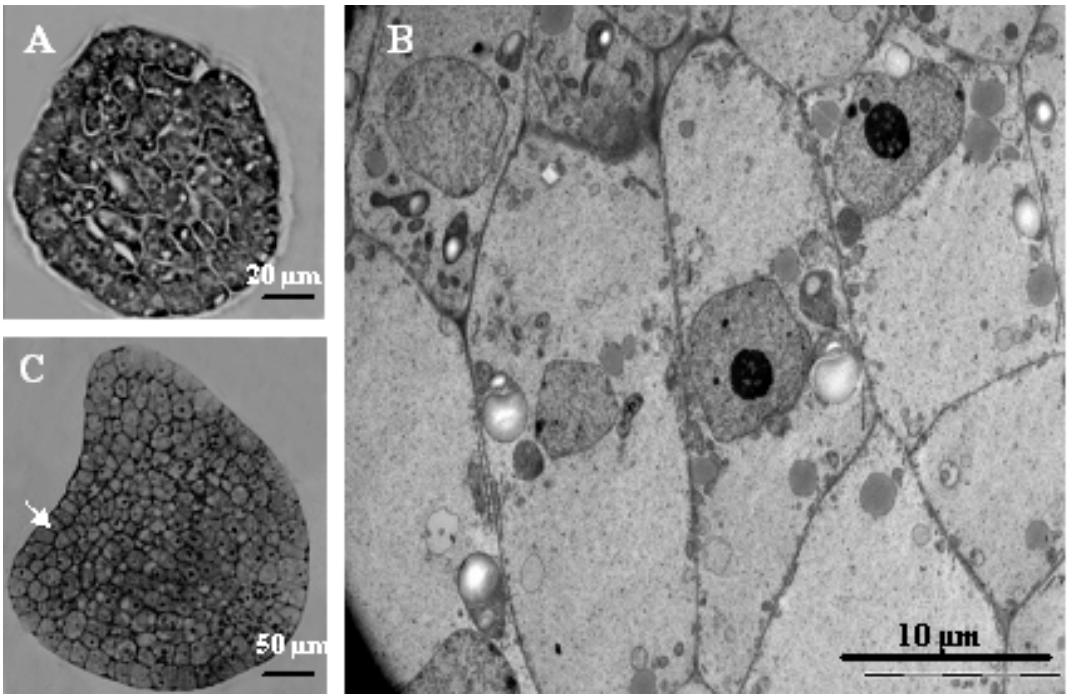


شکل ۶– سلولهای در حال تقسیم، که هنوز بعضی از بقایای اگزین در اطراف آنها قابل مشاهده است و ساختارهای کروی یا پیش رویانها را تشکیل دادنده اند (A)، ویژگی فراساختاری سلولهای موجود در ساختارهای کروی و پیش رویانها که شبیه به وضعیت سلولها قبل از پارگی اگزین است (B). (N) هسته، (Nu) هستک، (P) پروپلاستید، (M) میتو کندری، (L) لیپید، (CW) دیواره سلولی جدید، (E) اگزین، (S) نشاسته.

بحث

کشت میکروسپور کلزا، یک سیستم مناسب برای القای مسیر رشد و نموی رویان زایی و همچنین گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای شناخته شده است (۷، ۱۵ و ۲۲). در این تحقیق مسیر های رشد و نموی میکروسپور های کلزا رقم PF_{704} پس از کشت در شرایط درون شیشه ای تحت شرایط القائی (استرس دمایی ۳۲ درجه سانتی گراد) و غیر القایی (۲۵ درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشتر صفات سلولی میکروسپورهای کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد مشابه مسیر رشد و نموی میکروسپورها در شرایط برون شیشه ای (*in vivo*) می باشد. این صفات عبارتند از جذب

ثانویه واکوئل بزرگ، اولین و دومین تقسیم میتوز گرده، ترکیب سیتوپلاسم، اندازه و شکل سلولی و الگوی انقباض کروماتین در هسته های رویشی، زایشی و اسپرماتوزوئید ها (۱۸).



شکل ۷- مراحل کروی و قلبی شکل رویانهای حاصل از کشت میکروسپور کلزا رقم پی اف ۷۰۴، A) یک جنین کروی کلزا، ۸ روز بعد از کشت میکروسپور، B) فراساختار سلولهای سطحی یک رویان کروی، C) یک جنین قلبی شکل کلزا ۱۱ روز بعد از کشت میکروسپور کلزا. فلش سفید رنگ سلولهای اپیدرمی (Protodermis) به ردیف شده را در سطح یک رویان قلبی شکل نشان می دهد.

نتایج ارائه شده در این تحقیق مشخص گردید که مهم ترین تفاوت بین رشد و نمو گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای و برون شیشه ای (*in vivo*)، تجمع دانه های نشاسته به میزان زیاد و به صورت غیر قرینه در داخل سیتوپلاسم است که این وضعیت انحصاراً در مسیر رشد و نمو گامتوفیتی میکروسپورها در شرایط درون شیشه ای مشاهده گردید. توسعه پلاستید ها و تجمع نشاسته یک ویژگی شناخته شده و متمایز در طول تشکیل گرده در بسیاری از گونه های گیاهی محسوب می گردد (۹). در چندین گونه گیاهی، ذخایر کربوهیدراتها در گرده بالغ به شکل گرانولهای نشاسته نمی باشد بلکه به صورت پلی ساکاریدهای سیتوپلاسمی، به ویژه ساکاروز می باشد (۹ و ۱۴). در کشت میکروسپور کلزا، تحت شرایط غیر القایی، تجمع نشاسته با پیشرفت مسیر گامتوفیتی و تقسیمات گرده ای همراه است که منجر به ایجاد گرده های دو سلولی و سه سلولی محتوی مقدار زیادی نشاسته می گردد. در مقابل رشد و نمو گرده ها، در شرایط برون شیشه ای (*in vivo*) با تجمع نشاسته همراه نمی باشد(۱۸) بعد از تیمار استرس دمایی، تغییراتی در بیان پروتئینهای مربوط به شوک دمایی و MAPKinase ها، در کشت میکروسپورهای کلزا گزارش شده است (۶، ۲۰ و ۲۱). این تغییرات در میکروسپورهای غیر رویان زا هم با سطحی متفاوت مشاهده شده است. این یافته ها بیان کننده نقش این مولکولها نه تنها در پاسخ به استرس دمایی، بلکه در شروع مسیر رویان زایی می باشند (۲۰ و ۲۱). مسیر غیر رویان زا در کشتهای میکروسپور انکوبه شده در دمای بالا، شباهتهایی با مسیر رشد و نموی شبه گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای غیر القایی نشان داد با این تفاوت که میتوز دانه گرده در این کشتها به

ندرت مشاهده گردید. نتایج این تحقیق بیان گر این مطلب است که برنامه گامتوفیتی در میکروسپورهای انکوبه شده در دمای بالا به طور کامل متوقف نمی گردد و میکروسپورهای تیمار شده با استرس دمایی که به طرف مسیر رویان زایی کلید نخورده اند، می توانند به طور محدودی، بعضی از حوادث ساختاری و متابولیکی مربوط به تمایز گرده ای را به استثنای تقسیم غیر قرینه نشان دهند. تجمع فراوان دانه های نشاسته در یک نیمه سیتوپلاسم، بین هسته و اگزین به نظر می رسد که یک ویژگی شاخص رشد و نمو غیر رویان زای میکروسپور در شرایط درون شیشه ای باشد چون این پدیده هم در شرایط القایی و هم در شرایط غیرالقایی رویان زایی اتفاق می افتد. این پدیده همچنین می تواند به عنوان یک اثر ذاتی شرایط کشت تعبیر گردد که یک محیط غنی از قندها را درگیر می کند. مطالعات بیشتر با مقایسه کردن شرایط کشت مختلف در چندین سیستم این سؤال را روشن خواهد ساخت.

تمایل قطبی، ویژگی ذاتی بیشتر سلولهای یوکاریوتی است که تشکیل و مکانیسمهای کنترل کننده آن در دست بررسی است (۳ و ۱۷). مسیرهای درون شیشه ای غیر رویان زا در میکروسپورهای که نشاسته در بخشهای سیتوپلاسمی خاصی تجمع می یابد، می تواند یک سیستم ساده ای را برای آنالیز سؤالهای مربوط به رشد و تشکیل قطبیت سلولی ایجاد نماید. در این تحقیق معماری سلولی میکروسپورهایی که به طرف مسیر رویان زایی کلید خورده اند بررسی گردید و همچنین مسیرهای رشد و نموی میکروسپور های کلزا رقم PF_{704} در شرایط درون شیشه ای با مسیر رشد و نموی گامتوفیتی در شرایط درون شیشه ای و برون شیشه ای مقایسه گردیدند. تفاوتها در اندازه و شکل سلول، معماری هسته، تجمع نشاسته و حضور یا عدم حضور واکوئلها جهت شناسایی مراحل مختلف رویان زایی میکروسپور و مسیر های رشد و نموی دیگر در شرایط درون شیشه ای مطالعه گردیدند.

منابع

۱- عبداللهی، محمد رضا: معینی، احمد: جلالی جواران، مختار: حدادی، پرهام (۱۳۸۲). رویان زایی از کشت جدایه های میکروسپوری در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش و سازندگی، شماره ۶۰، صفحه ۵۲-۴۸

2-Abdollahi, M. R., Moieni, A., Jalali Javaran, M. (2004). Interactive effects of heat shock and culture density on embryo induction in isolated microspores culture of *Brassica napus* L. cv. Global. Iranian Journal of Biotechnology, 2: 97-100.

3- Baluska, F., Wojtaszek, P., Volkmann, D., Barlow, P. (2003). The architecture of polarized cell growth: the unique status of elongating plant cells. Bioessays, 25: 569-576.

4- Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueno, M. C., Testillano, P. S. (2005). Microspore-derived embryogenesis in *Capsicum annuum* L.: sub-cellular rearrangements through development. Biology of the Cell, 97: 709-722.

5- Chupeau, Y., Caboche, M., Henry, Y. (1998). Androgenesis and haploid plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

6- Cordewener, J. H. G., Hause, G., Görgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H. J. M., van Lammeren, A., Van Lookeren-Campagne, M. M., Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta, 196: 747-755.

7- Custers, J. B. M., Cordwener, J. H. G., Nollen, Y., Dons, J. J. M. and Van Lookeren Campagne, M. M. (1994). Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Reports, 13: 267-271.

8- Fletcher, R., Coventry, J. and Kott, L. S. (1998). Double Haploid Technology for Spring and Winter *Brassica napus*, Technical Bulletin, OAC Publication, Canada

9- Franchi, G. G., Bellani, L., Nepi, M., Pacini, E. (1996). Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. Flora, 191: 143-159.

10- González-Melendi, P., Testillano, P. S., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O., Risueno,

M. C. (1995). *In situ* characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to in duce embryogenesis in *Capsicum*. Protoplasma, 187: 60-71.

11- González-Melendi, P., Testillano, P. S., Préstamo, G., Fadon, B., Risueno, M. C. (1996). Cellular characterization of key developmental stages for pollen embryogenesis induction. International Journal of Developmental Biology, 1: 127S-128S.

12- Grant, I., Beversdorf, W. D., Peterson, R. L. (1986). A comparative light and electron microscopic study of microspore and tapetal development in mate fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape *(Brassica napus)*. Canadian Journal of Botany, 64:1055-1068

13- Lichter, R. (1982). Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspore of different *Brassicacea* species. Plant Breeding, 103: 119-123

14- Pacini, E. (1996). Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. Sexual Plant Reproduction, 9: 362-366.

15- Pechan, P. M., Keller, W. A. (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus* .Physiologia Plantarum, 74: 377-384.

16- Polowick, P. I., Sawhney, V. K. (1990). Microsporogenesis in a normal line and in the *ogu* cytoplasmic male-sterile line of *Brassica napus* I. The influence of high temperature. Sexual Plant Reproduction, 3: 263- 276

17- Samaj, J., Baluska, F., Hirt, H. (2004). From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. Journal of Experimental Botany, 55: 189-198.

18- Satpute, G. K. Long, H. Segui-Simarro, J. M. Risueno, M. C. Testillano, P. S. (2005). Cell architecture during gametophytic and embryogenic microspore development in Brassica napus L. Acta Physiologiae Plantarum, 27: 665-674.

19- Seguí-Simarro, J. M. (2001). Embryogenesis induction in pollen: Cellular characterization and expression of stress proteins. PhD doctoral thesis. Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

20- Seguí-Simarro, J. M., Testillano, P. S., Jouannic, S., Henry, Y., Risueno, M. C. (2005). MAP kin ases are de vel - op men tally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. Histochemistry and Cell Biology, 123: 541-551.

21- Seguí-Simarro, J. M., Testillano, P. S., Risueno, M. C. (2003). Hsp70 and Hsp90 change their ex pres sion and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. Journal of Structural Biolology, 142: 379-391.

22- Telmer, C. A., Simmonds, D. H. and Newcomb, W. (1992). Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiology of Plant, 84: 417-424.

23- Testillano, P. S., González-Melendi, P., Coronado, M. J., Segui, J. M., Moreno, M. A., Risueno, M. C. (2005). Differentiating plant cells switched to proliferation re - model the functional organization of nuclear domains. Cytogenetic and Genome Research, 109: 166-174.

24- Zaki, M. A. M. and Dichinson, H. G. (1990). Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. Protoplasma, 156: 149-162.

25- Zaki, M. A. M. and Dichinson, H. G. (1991). Microspore- derived embryos in *Brassica:*The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development, Sexual Plant Reproduction. 4: 48-55.

Study of *In vitro* microspore embryogenesis of rapeseed (*Brassica napus* L. cv. PF_{704}) with electron microscopy

Abdollahi M.R.

Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan I.R. of Iran

Abstract

In this research, ultrastructure of rapeseed (*Brassica napus* L.cv. PF_{704}) microspores following the gametophytic and embryogenic developmental pathways *in vitro* was compared with the gametophytic development *in vivo* via electron microscopy. In reprogramming of rapeseed microspores to the embryogenesis pathway, there are some defined changes influencing the cell activities and structure. Some of these changes can be considered as microspore embryogenesis pathway in rapeseed. In this study, rapeseed microspores were isolated at different days after in vitro culture and prepared for electron microscopy studies. During the different developmental stages of rapeseed microspores, Differences in specific cellular properties such as cell size and shape, nuclear architecture, starch accumulation, presence of vacuoles were studied to characterize different stages of microspore embryogenesis and other pathways occurring *in vitro*. Results, showed the presence of abundant starch grains in a defined cytoplasmic region appeared as a specific property of the gametophytic development *in vitro*, as well as of the non-induced microspores of *in vitro* cultures under embryogenic-inductive conditions.

Key words: *Brassica napus* L. Rapeseed, Microspore culture, Embryogenesis, Gametophytic development