پشت صحنه‌ی توسعه‌ی دابل هاپلوئیدی بر پایه‌ی میکروسپور در *Brassica napus* (بخش دوم)

Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus* (part 2)

رضا وجدان

عوامل تاثیر گذار در باززایی میکروسپور

غلظت میکروسپور

غلظت میکروسپور در محیط مایع برای رشد طبیعی جنین مهم است. تراکم میکروسپور در محلول (خالص سازی میکروسپور) توسط مطالعات هموسیتومتر با غلظت‌های متفاوت میکروسپور توسط محققان مختلف برای رسیدن به عملکرد مطلوب جنین ارزیابی شده است (Coventy *et al*., 1988، Polsoni *et al*., 1988، Takahira *et al*., 2011). تراکم مورد توصیه میکروسپور در *B. napus* برای باززایی $۸-۴ \times ۱۰^{۴}$ در میلی لیتر بدست آمده است (Coventy *et al*., 1988).

عامل مضاعف کننده‌ی کروموزوم

در گونه‌های دیپلوئید (2n)، در انتهای مرحله‌ی اسپوروفیتی در فرایند میوز سلول‌های هاپلوئیدی به نام میکروسپور بوجود می‌آیند. گیاهان هاپلوئید حاصله از میکروسپور، عقیم هستند، زیرا فرایند باروری جنسی نیازمند تقسیم میوزی کروموزوم دیپلوئید می‌باشد. بنابراین مضاعف کردن کروموزوم‌ها منجر به تولید گیاهان بارور خواهد شد. روش‌های گوناگونی برای این منظور در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Soriano *et al*., 2007، Ouyang *et al*., 1994).

کلشی‌سین ترکیب آلکالوئیدی سمی می‌باشد که از نوعی گیاه دارویی بنام "meadow saffron" بدست می‌آید که تحت عنوان کروکوس پائیزی (*Colchicum autumnale*) نیز شناخته می‌شود، این گیاه برای مدت‌ها برای درمان نقرس و تب مدیترانه‌ای مورد استفاده قرار می‌گرفت (Schlesinger, 1983). در ۱۹۳۴ در آزمایشگاه داستین در شهر بروسلز، نقش کلشی‌سین بعنوان سم میتوزی کشف شد (Elgsti and Dustin, 1955). اما Ludford (۱۹۳۶) شخصی بود که دریافت این ماده از طریق ممانعت از تشکیل رشته‌های دوک میتوزی، توانایی مهار تقسیم میتوز را دارد. نحوه‌ی عمل این ماده بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شده است که طی تیمار این ماده کمپلکس توبولین-کلشی‌سین شکل می‌گیرد، که با حمله به انتهای رشته‌های میکروتوبول، بطور فیزیکی از پلیمریزه شدن آنها جلوگیری می‌کند (Niel E and Scherrmann, 2006). در مورد *B. napus* کلشی‌سین را می‌توان در محیط کشت میکروسپور (Zhao, 1996) و یا در مرحله‌ی ۶-۵ برگی با استفاده از پنبه آغشته شده در نوک ساقه بکار برد (Malek *et al*., 2012). میزان استفاده از کلشی سین ممکن است در نرخ دیپلوئیدی شدن کشت میکروسپور تاثیر بگذارد. در آزمایشی به منظور ایجاد جنین دیپلوئید با استفاده از کلشی سین، درصد بالایی (۸۰-۹۰٪) از جنین دیپلوئید با دوز 50 mg/L کلشی سین برای ۲۴ ساعت یا دوز 10 mg/L برای ۷۲ ساعت بدست آمد، اما نرخ پائین‌تری (۷۰-۸۰٪) از دیپلوئیدی شدن با غلظت 10 mg/L برای ۲۴ ساعت در کشت میکروسپور حاصل گردید (Möllers *et al*., 1994). در آزمایشی بر روی *B. napus* غلظت‌های متفاوتی از کلشی‌سین (0.10-0.15-0.20 درصد) مورد استفاده قرار گرفت و ۱۵٪ از نمونه‌ها درصد بالایی از دوبرابر شدن را نشان دادند (Malek *et al*., 2012).

چه ترکیباتی را می‌توان بعنوان جایگزین کلشی‌سین مورد استفاده قرار داد؟ Hansen and Andersen (1996) پتانسیل کلشی سین و سه علف کش عامل تخریب رشته‌های میکروتوبول بنام‌های تریفلورالین، اوریزالین و آمی پروفسفمتیل (APM) برای دوبرابر کردن کروموزوم در کشت میکروسپور *B. napus* مورد بررسی قرار دارد. در این مطالعه بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت 1mM کلشی سین، ۹۴٪ دوبرابر شدن کروموزوم مشاهده شد. سه علف کش مورد استفاده مشابه کلشی سین عمل کردند ولی با 100x غلظت کمتر. APM در مقایسه با سایر علف کش‌ها سمیت کمتری را نشان داد و آن را به عامل دوبرابر کننده‌ی مطلوب در این آزمایش تبدیل کرد. Zhao and Simmonds (2006) نیز تری فلورالین را بعنوان تیمار جایگزین کلشی سین پیشنهاد کرد. تری فلورالین در مقایسه با کلشی سین، سریعتر عمل می‌کند (۳۰ دقیقه در مقابل ۸-۳ ساعت تیمار کلشی سین). نتایج مشاهدات، هنگامی که از تری فلورالین استفاده شد، موفقیت ۶۰ درصدی در تولید گیاهان بارور طبیعی را نشان

دادند. Zhao and Simmonds (2006) تیمار 1-10 uM تری فلورالین طی ۱۸ ساعت آغازین کشت میکروسپور را بعنوان روشی برتر برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید معرفی کرد.

شوک حرارتی

تیمار دمای بالا (۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۱-۲ روز) معمولاً برای رشد جنین‌های برگرفته از میکروسپور هم در کشت بساک و هم در کشت میکروسپور استفاده می‌شود (Charne and Beversdorf, 1988; Ferrie and Caswell, 2011). در *B. napus* تغییرات معماری سلولی از مسیر گامتوفیتی به جنینی توسط شوک حرارتی توسط تعدادی از پژوهشگران گزارش شده است (Testillano and Risueño, 2009; Zaki and Dickinson, 1990). تیمار حرارتی ۳۵-۳۲ درجه سانتیگراد برای ۴-۳ روز در کشت میکروسپور گونه‌های آمفی‌دیلوئید جنس براسیکا نظیر *B. napus*، *B. carinata*، *B.juncea* جنین‌های فعالی را بوجود آورده است.

تنظیم کننده‌های رشدی

برای بهبود شرایط کشت بافت، نظیر: تکثیر بافت کالوس، تشکیل ریشه و ساقه، تنظیم کننده‌های رشدی مورد نیاز هستند. اکسین، سیتوکنین و جیبرلیک اسید از تنظیم کننده‌های اصلی هستند. اکسین‌هایی نظیر IAA (Indoleacetic acid)، IBA (Indolebutyric acid)، NAA (Naphthaleneacetic acid)، 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)، در محیط کشت ریشه‌زایی، رشد سلول‌ها و ریشه را تحریک می‌کنند (Rück *et al.*, 1993). سایتوکنین‌ها شامل BAP (benzylaminopurine)، zeatin و kinetin در محیط کشت ساقه‌زایی، موجب افزایش تقسیم سلولی و رشد ساقه می‌شود (Loh *et al.*, 1983). جیبرلیک اسید (GA) رشد طولی سلول را تحریک می‌کند. برخی دیگر از هورمون‌ها نظیر: آبسزیک اسید، سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید نیز نقش مهمی را در القای جنین‌زایی سوماتیکی و بهبود کیفیت جنین ایفا می‌کنند (Ahmed *et al.*, 2014). استفاده از ذغال چوب فعال (Activated charcoal)هم در کشت میکروسپور و هم در کشت بساک *B. napus* در رشد و نمو بهتر جنین تاثیر مثبتی دارد (Gland *et al.*, 1988; Johansson, 1983). البته نقش این ماده در القای جنین‌زایی میکروسپور ناشناخته است (Charne and Beversdorf, 1988; Gland *et al.*, 1988).

تائید سطح پلوئیدی دابل هاپلوئید

در سطح کروموزوم، گیاهی که از باززایی میکروسپور بوجود می‌آید، می‌تواند هاپلوئید، دیپلوئید یا پلی پلوئید باشد. بمنظور تائید سطح پلوئیدی گیاهان مشتق شده از میکروسپور می توان از ریخت شناسی، تجزیه و تحلیل سیتوژنتیکی و فلوسیتومتری استفاده نمود.

شواهد ریخت شناسی Morphological clues

هم گیاهان هاپلوئید و هم گیاهان دابل هاپلوئید به غنچه و گل می‌روند، ولی تفاوت در باروری آنهاست. در واقع گیاهان دابل هاپلوئید دارای گل‌های بارور ولی گیاهان هاپلوئید دارای گل‌های عقیم هستند. تفاوت‌های ظاهری نیز میان آنها وجود دارد. گروهی از محققان تفاوت‌های ظاهری مشخص را در *Chrysanthemum morifolium* میان این دو گزارش نمود، بطوریکه گیاهان هاپلوئید در مقایسه با دابل هاپلوئیدها کوتاه‌تر، دارای برگ‌ها، گل‌ها و روزنه‌های کوچکتر بودند (Wang *et al.*, 2014) . بعلاوه در گیاهان هاپلوئید *B. napus* برگرفته از کشت میکروسپور غنچه و گل‌ها بنیه ضعیف و لاغر نشان دادند.

تجزیه و تحلیل سیتولوژیکی

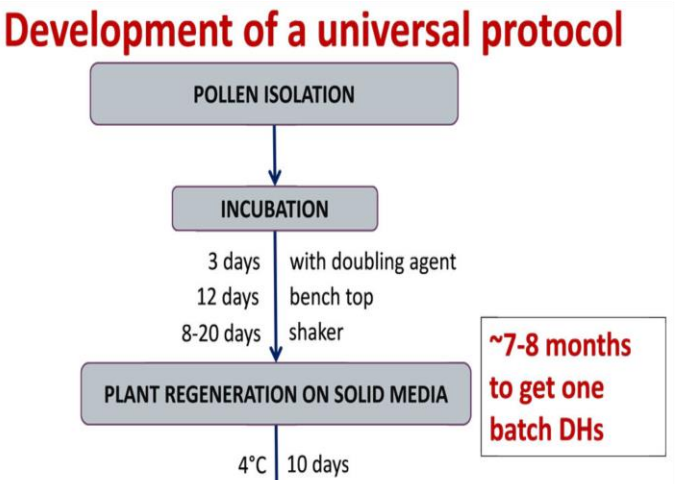
روش دقیق برای تعیین سطح پلوئیدی از طریق شمارش تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های میتوزی، بهترین روش برای تائید عدد کروموزومی دیپلوئیدی می‌باشد (Maluszynska, 2003). ولی کروموزوم‌های *B. napus* کوچک و نا مشخص هستند و شمارش آنها در زیر میکروسکوپ طی مراحل تقسیم میتوزی پیچیده، چالش برانگیز و زمان بر است (Snowdon, 2007).

فلو سیتومتری

فلوسیتومتری در گونه‌های گیاهی بطور معمول بمنظور تعیین محتوای DNA هسته سلول استفاده می‌شود. در روش سنتی، تعیین سطح پلوئیدی گیاهان دابل هاپلوئیدهای برگرفته از میکروسپور نیازمند رشد کامل تا مرحله‌ی گلدهی، بدون اطلاع از سطح پلوئیدی یا باروری می‌باشد. در روش فلوسیتومتری برای تعیین سطح پلوئیدی دابل هاپلوئید برگرفته از میکروسپور، ارزیابی در مراحل ابتدایی رشد گیاهچه انجام می‌شود و می‌توان تنها به دابل هاپلوئیدهای بالقوه اجازه‌ی رشد داده شود (Takahira, 2011). روش کار بسیار آسان است و آگاهی از تعداد DNA در سلول، در زمانی کمتر فراهم می‌شود. در این فرایند عامل رنگ آمیزی هسته، پروپیدیوم آیودید propidium iodide (PI)، مورد استفاده قرار می‌گیرد که به DNA دو رشته‌ای (بین جفت بازها) متصل می‌شود. درجه فلورسانس PI که از هسته‌ی سلول ساطع می‌شود، با تعداد DNA سلول همبستگی دارد (Rahman *et al*., 2015).

دستورالعمل آزمایشگاهی برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید

دستورالعمل تولید گیاه دابل هاپلوئید برگرفته از میکروسپور در *B. napus* در شکل۱ توضیح داده شده است و بشرح زیر می‌باشد:



شکل۱: فلوچارت دستورالعمل تولید گیاه دابل هاپلوئید

شرایط رشد گیاه بخشنده [1]

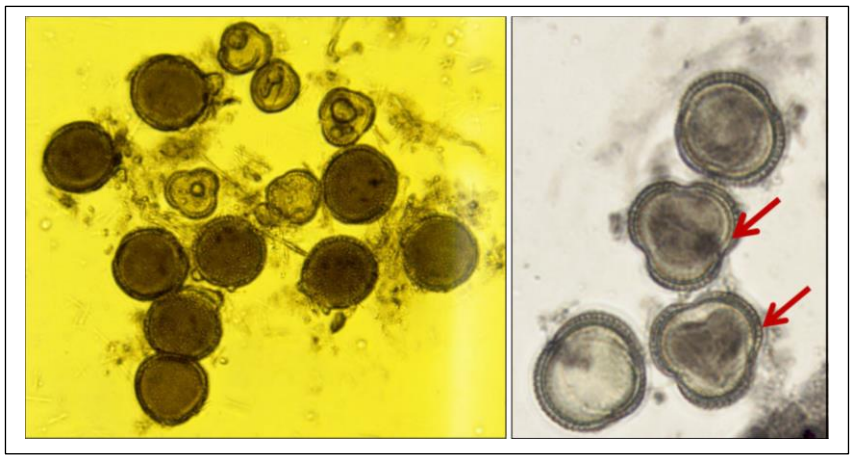
شرایط ایده‌آل رشد گیاه برای دستیابی به گیاهان سالم که فرایند جنین‌زایی را سرعت می‌بخشند، بسیار مهم هستند. نور، درجه حرارت، کود و رطوبت از عوامل حیاتی در سلامت گیاه بشمار می‌روند. گیاه بخشنده‌ای که در فضای گلخانه با فتوپریود ۱۶ ساعته و دمای روز/شب ۲۴/۱۸ درجه سانتیگراد رشد یافته‌اند، یک هفته قبل از خالص سازی میکروسپور (در مرحله‌ی گلدهی)، به اتاقک رشد با فتوپریود ۱۶ ساعته، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتیگراد دمای روز و شب منتقل می‌شوند. گزارش شده است تیمار سرمایی طی زمان گلدهی سبب افزایش جنین‌زایی می‌شود. گیاه بخشنده پرورش یافته طی زمستان در گلخانه در مقایسه با گیاه بخشنده‌ای که طی فصل تابستان در گلخانه پرورش داده می‌شود، نسبت به کشت جنین پاسخ بهتری می‌دهند و تعداد جنین

1. Donor plant

بیشتری را تولید می‌کنند. بنابراین بهتر است گیاهان بخشنده طی فصل تابستان، در شرایط کنترل شده پرورش یابند (Li *et al.*, 2011).

انتخاب و ضدعفونی غنچه

رابطه‌ی میان اندازه‌ی غنچه و مرحله‌ی میوزی میکروسپورها از طریق تقسیم‌بندی غنچه‌ها در ۵ کلاس بر حسب اندازه توصیف می‌شود. دو بساک از یک غنچه بروی اسلاید حاوی رنگ استوکارمین منتقل شد و با اعمال فشار با استفاده از سوزن میکروسپورها از بساک خارج شدند، بافت بساک کنار زده شد، با استفاده از شعله بمدت ۴-۳ ثانیه اسلاید حرارت دید و بروی آن cover slip قرار گرفت. اندازه‌ی بذر مرتبط با بیشترین تعداد میکروسپور در مرحله‌ی تک هسته‌ای برای جداسازی میکروسپورها انتخاب می‌شوند (شکل۲). اندازه‌ی بذر و مرحله‌ی نموی میکروسپور به ژنوتیپ گیاه بخشنده و شرایط رشدی گیاه بستگی دارد.

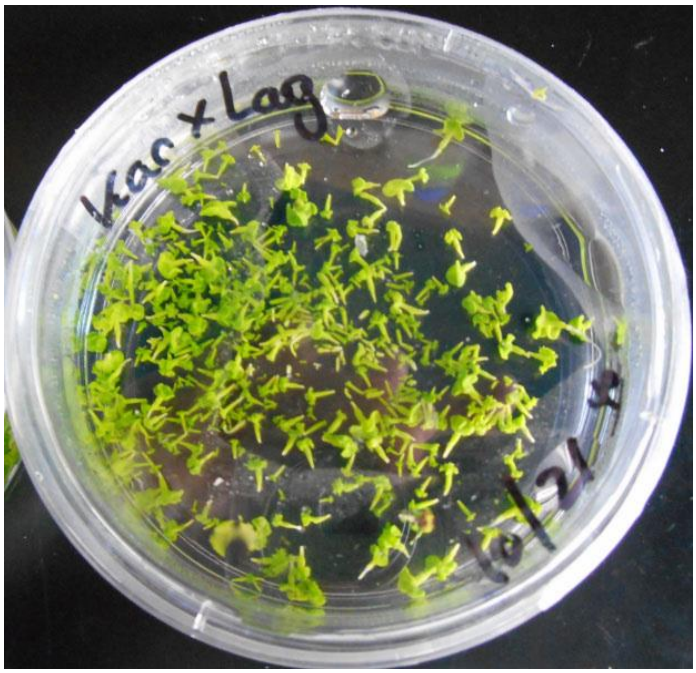


شکل۲: میکروسپورهای کلزا در مراحل مختلف نمو. میکروسپورهای علامت دار با فلش قرمز در مرحله‌ی تک هسته‌ای که در پروسه‌ی تولید دابل هاپلوئیدی استفاده می‌شوند.

جدا سازی و کشت میکروسپور

غنچه‌های حاوی میکروسپورهای تک هسته‌ای که در مایع سفید کننده‌ی تجاری استریل شده اند، برای ۱۰ دقیقه، ۵-۴ مرتبه با آب مقطر استریل سرد شستشو می‌شوند. غنچه‌ها در هاون استریل و سرد خرد می‌شوند. غنچه‌هایی که با محیط کشت یک-دوم B5 (Gamborg media) با ۱۳۰ گرم در لیتر ساکاز، PH ۵/۸ اتوکلاو شده) (Gamborg, 1968) سرد آبکشی شده، سپس در B5 یک-دوم تازه برای حدوداً ۱۵ ثانیه خیسانده می‌شوند . سوسپانسیون از فیلتر ۴۰ میکرونی عبور داده شد و در فالکون 50 ml انتقال می‌یابد . هاون و صافی با محیط کشت B5 یک-دوم شسته شده تا حجم تیوب به 30 ml رسانده شود. فالکون تیوب حاوی سوسپانسیون میکروسپور به مدت سه دقیقه در 700 rpm و دمای ^{0}C 4 سانتریفیوژ می‌شود. مایع بالایی دور ریخته شده و پلت ته نشین شده مجدداً در 10 ml محیط کشت B5 یک-دوم و سرد بصورت محلول در می‌آید و سانتریفیوژ (همانند مرحله قبل) می‌شود. فرایند شستن میکروسپور دو مرتبه دیگر تکرار خواهد شد. مایع بالایی دور ریخته شده و پلت نهایی این بار در محیط کشت NLN-13 (NLN-13 با 13 g/l ساکارز، PH= 6.0، استریل شده با فیلتر) (Loh *et al.*, 1983) با تراکم $5*10^5$4 میکروسپور در میلی لیتر سوسپانسیون می‌شود. از پتری دیش‌های سایز بزرگ برای کشت میکروسپور استفاده می‌گردد. به ازای هر 10 ml از محلول میکروسپور، مقدار 12.5 ul کلشی سین (200 uM) اضافه می‌شود. پتری دیش‌ها برای ۴۸ ساعت در ^{0}C 32 و در تاریکی قرار می‌گیرند. بعد از تیمار کلشی سین و شوک حرارتی (incubation) حدود 20 ml از سوسپانسیون میکروسپور به فالکون 50 ml جدید منتقل شده و سانتریفیوژ در 700 rpm برای ۳ دقیقه انجام می شود. محلول بالایی برداشته شده و پلت مجدد در همان اندازه از NLN-13 تازه، محلول می‌شود. پتری‌ها برای ۱۱ روز دیگر در دمای اتاق ^{0}C 22 و در تاریکی قرار داده می‌شوند. میکروسپورها در مرحله‌ی تک هسته‌ای بیشترین پاسخ را به تولید دابل هاپلوئیدی

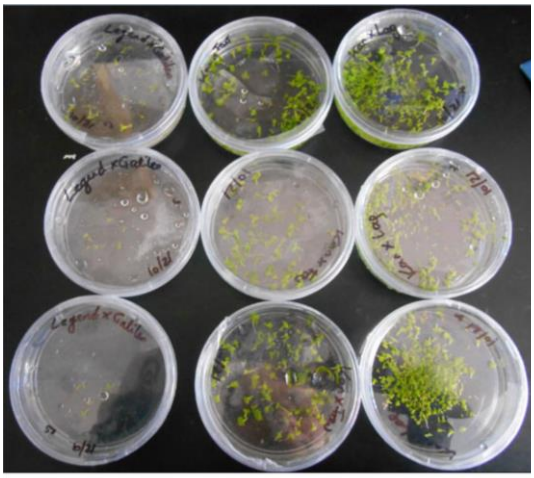
نشان می‌دهند. بعلاوه رشد افتراقی جنین‌ها با خطر آلوگی بالاتری همراه است و جنین‌های ۴۰-۳۵ روزه نرخ بقای کمتری دارند (شکل ۳).



باززایی گیاه به جنین‌ها

بعد از ۱۱ روز در تاریکی، پتری دیش‌ها در فویل آلومینیوم پیچیده می‌شوند و بروی شیکر افقی (60 rpm) در دمای اتاق ^{o}C 22 قرار می‌گیرند. این صفحات بمدت ۲۰-۸ روز و یا تا زمانیکه جنین سبز رنگ شود و کولئوپتیل‌ها به موازات ساقه رشد نمایند، در این وضعیت باق می‌مانند. محیط کشت NLN هر دو هفته یکبار تعویض می‌شود. رشد جنین برای ژنوتیپ‌های گوناگون متغیر است (شکل۴). در هر پتری دیش (به ابعاد 100*20 mm) که حاوی محیط کشت جامد B5 (20 g/L ساکارز، 5.8 PH، gellan gum 2.8 g، یک پلی ساکارید آنیونی محلول در آب که توسط باکتری *Sphingomonas elodea* تولید می شود و اتوکلاو شده است) حدود ۱۰ جنین قرار داده می‌شود. بعد از اتوکلاو و وقتیکه دمای محیط کشت به ۵۰ درجه سانتی گراد برسد، GA3 (250 UL/L) و مخلوط نگهدارنده‌ی گیاهی Plant Preservative Mixture (PPM) (1 ml/L) به محیط کشت اضافه می‌شوند. جنین‌ها در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعته رشد می‌کنند. سن جنین حداقل باید ۲۰روزه (از زمان استخراج میکروسپور) باشند و جنین‌های جوان‌تر یا به گیاهچه تبدیل نمی‌شوند و یا زمان زیادی را برای آن سپری می‌کنند. آبسزیک اسید (ABA) را می‌توان بمنظور همگام سازی رشد جنین و ممانعت از تجزیه‌ی جنین، به محیط کشت اضافه نمود (Belmonte *et al.*, 2006). شوک سرمایی ^{o}C 4 تحت فتوپریود ۸ ساعته برای ۱۰ روز از فاکتورهای تاثیر گذار در باززایی گیاه می‌باشد. پتری دیش‌های حاوی گیاهچه‌ها برای رشد کامل ریشه و برگ‌های سالم به روشنایی و دمای ^{o}C 27 منتقل می‌شوند، اما گیاهچه‌های فاقد ریشه به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی همان ترکیب ذکر شده برای محیط کشت B5 جامد و اکسین انتقال می‌یابند. از دیگر فاکتورهای بسیار تاثیر گذار و مهم در باززایی موفق گیاهان دابل هاپلوئید سن محیط کشت میکروسپور و اندازه‌ی جنین‌ها برای انتقال به محیط کشت جامد می‌باشد. جنین‌های جوان‌تر از ۲۱ روز به گیاه کامل تبدیل نمی‌شوند و

همچنین جنین‌های با کولئوپتیل کوچک و باز نشده در سایر مراحل کشت، رشد نخواهند نمود. تنها جنین‌های مسن‌تر از ۲۱ روز با کولئوپتیل بازشده بصورت عمودی و به موازات ساقه، گزینه‌های مناسبی برای تولید دابل هاپلوئید هستند. مسئله‌ی آلودگی یک مشکل جدی در کشت میکروسپور می‌باشد و موجب شکست‌های زیادی در کسب موفقیت نتایج مطلوب شده است. می‌توان تعداد زیادی از این آلودگی‌ها را با استفاده از مواد ضد میکروبی نظیر PPM در محیط کشت کاهش داد. PPM از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری بعمل می‌آورد، بدون آنکه اختلالی در رشد جنین و باززایی جنین به گیاهچه بوجود بیاورد.



شکل۴: پاسخ متفاوت سه ژنوتیپ مختلف به کشت میکروسپور

کاشت دابل هاپلوئیدها

گیاهچه‌های سالم در بستر خاک به اتاقک رشد با شرایط فتوپریودی ۱۶ ساعته و دمای روز/شب ۱۸/۲۴ درجه سانتیگراد انتقال می‌یابند کشت گیاهچه ها در سینی نشاء انجام می‌گیرد و به منظور حفظ رطوبت و سازگار شدن گیاهچه‌ها با شرایط طبیعی، به مدت یک هفته با درپوشی پوشانده می‌شود. گیاهچه‌های با بنیه‌ی قوی انتخاب و در گلدان دارای خاک و کود کاشته می‌شوند. بررسی و انتخاب گیاهان دابل هاپلوئید در مرحله‌ی گلدهی انجام می‌شود.

بررسی و انتخاب گیاهان دابل هاپلوئید

تکنیک القای دابل هاپلوئید ممکن است موجب باززایی گیاهچه‌های هاپلوئید نامناسب شود، بنابراین ضروریست پتانسیل گیاهچه‌های باززایی شده بررسی و انتخاب شود. چندین روش نظیر خصوصیات ریخت‌شناسی و تعیین پلوئیدی برای تمایز گیاه هاپلوئید و دابل هاپلوئید در دسترس هستند. خصوصیات ریخت شناسی بر پایه‌ی مشخصات بین گیاه بخشنده و گیاه باززایی شده برای باروری گرده، شکل ظاهری گل، شکل برگ، ارتفاع گیاه، بنیه گیاه و غیره می‌باشد. این روش به تجهیزات خاصی نیاز ندارد، بنابراین گیاهچه‌هایی که براساس این ویژگی‌ها انتخاب شوند، برای بررسی‌های بیشتر تا زمان گلدهی، به گلدان انتقال داده می‌شوند. گیاهان با گل‌های عقیم (معمولاً گیاه ضعیف، گل‌های کوچکتر و فاقد دانه گرده) بعنوان گیاه هاپلوئید شناسایی می‌شوند و حذف خواهند شد.

نتیجه‌گیری

تولید دابل هاپلوئید، بعنوان ابزاری موثر جهت تولید لاین‌های کاملاً خالص از والدین ناخالص در طی تنها یک مرحله، از فناوری‌های در حال ظهور در تعداد زیادی از برنامه‌های بهنژادی می‌باشد. این فناوری در جنس براسیکا برای نخستین بار در سال ۱۹۷۵ بکار گرفته شد. شیوه نامه‌ی تولید دابل هاپلوئیدی در *B. napus* در دسترس قرار دارد. اگر چه آزمایشگاه‌های مختلف

از روش‌های متفاوتی استفاده می‌کنند، ولی مراحل و مواد شیمیایی اصلی در بین آنها یکسان است. این فناوری در مطالعات ژنتیکی، نقشه‌یابی ژن، توسعه‌ی مارکرهای مولکولی، مکان یابی QTL، پژوهش‌های ترانسفورماسیون ژن نیز کارایی دارد. بعلاوه قادر است، بطور موثر با سایر روش‌های زیست فناوری ادغام شود و کارایی مطالعات را ارتقاء بخشد.

منابع

1- Ahmed, B., Shariatpanahi, ME., and Teixeira, da Silva JA. 2014. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 116:343-351.
2- Belmonte, MF., Ambrose, SJ., Ross, AR., Abrams, SR., and Stasolla, C. 2006. Improved development of microspore-derived embryo cultures of *Brassica napus* cv. Topaz following changes in glutathione metabolism. Physiologia Plantarum. 127:690-700.
3- Charne, DG., and Beversdorf, WD. 1988. Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium. Can. J. Bot. 66:1671-1675.
4- Coventy, J., Kott, LS., and Beversdorf, WD. 1988. Manual of microspore culture technique for *Brassica napus*. Dep Crop Sci Technol Bull, OAC publication, Univ of Guelph, Guelph, Ont, Canada.
5- Elgsti, OJ., and Dustin, P. 1955. Colchicine - in agriculture, medicine, biology and chemistry. The Iowa State College Press, Ames, lowa, USA.
6- Ferrie, AMR., and Caswell, KL. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104:301-309.
7- Gamborg, OL., Miller, RA and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:151-8.
8- Gland A, Lichter R and Schweiger HG. Genetic and exoneous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *B. napus*. J. Plant Physion. 1988; 132:613-617.
9- Hansen., NJP and Andersen SB. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. Euphytica. 1996; 88:159-164.
10- Johansson L. Effects of activated charcoal in anther cultures. Plant Physiol. 1983; 59:397-403.
11- Li X, Guan C and Guan M. Microspore culture of F1 hybrid between *Brassica napus* and *Brassica juncea* is the effective way on breeding. 13th International Congress, Prague, Czech Republic. 2011; 90-91.
12- Loh CS, Ingram DS and Hanke DE. Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus* spp. Oleifera. New Phytol. 1983; 95:349-358.
13- Ludford RJ. The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells in vitro and in vivo. Arch. F. Exp. Zellf. 1936; 18:411-441.
14- Malek MA, Ismail MR, Rafii MY and Rahman M. Synthetic *Brassica napus* L.: Development and Studies on Morphological Characters, Yield Attributes, and Yield. The Scientific World Journal2012, Article ID 416901. 6.
15- Maluszynska J. Cytogenetic tests for ploidy level analyses – chromosome counting. InMaluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual,Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1544-5, Dordrecht. 2003; 391-395.
16- Möllers C, Iqbal MCM and Röbbelen G. 1994. Efficient production of double haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspores. Euphytica. 1994; 75:95-104.
17- Niel E and Scherrmann JM. Colchicine today. Joint Bone Spine. 2006; 73:672-8.
18- Ouyang JW, Liang H, Jia SE, Zhang C, Zhao TH, He LZ and Jia X. Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants. Plant Science. 1994; 98:209-214.
19- Polsoni L, Kott LS and Beversdorf WD. Large scale microspore culture technique for mutation selection in *Brassica napus*. Can. J. Bot. 1988; 66:1681-1685.
20- Rahman H, Bennett RA and Séguin-Swartz G. Broadening genetic diversity in *Brassica napus* canola: Development of canola-quality spring *B. napus* from *B. napus*, *B. oleracea* var. alboglabra interspecific crosses. Can. J. Plant Sci. 2015; 95:2941.
21- Rück A, Palme K, Venis MA, Napier RM and Felle HH. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in Zea mays protoplasts. The Plant Journal. 1993; 4:41-46.
22- Schlesinger M, Ilfeld D, Handzel ZT, Altman Y, Kuperman O, Levin S, Bibi C, Netzer L and Trainin N. Effect of colchicine on immunoregulatory abnormalities in familial Mediterranean fever. Clin Exp Immunol. 1983; 54:73-9.

23- Snowdon RJ. Cytogenetics and genome analysis in Brassica crops. Chromosome Res. 2007; 15:85-95.
24- Soriano M, Cistué L, Vallés MP and Castillo AM. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (Triticum aestivum L.). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2007; 91:225-234.
25- Takahira J, Cousin A, Nelson MN and Cowling WA. Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2011; 104:51-59.
26- Testillano PS and Risueño MC. Tracking gene and protein expression during microspore embryogenesis by Confocal Laser Scanning Microscopy. In Touraev A, Forster BP, Mohan Jain S (edt), Springer Science and Bussines Media, UK, Advances in Haploid Production in Higher Plant. 2009; 339-347.
27- Wang H, Dong B, Jiang J, Fang W, Guan Z, Liao Y, Chen S and Chen F. Characterization of in vitro haploid and doubled haploid Chrysanthemum morifolium plants via unfertilized ovule culture for phenotypical traits and DNA methylation pattern. Front Plant Sci. 2014; 5:738.
28- Zaki AM and Dickinson HG. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *B.napus*. Protoplasma. 1990; 156:149-162.
29- Zhao J and Simmonds DH. Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum. 2006; 95:304-309.
30- Zhao JP, Simmonds DH and Newcomb W. High frequency production of doubled haploid plants of *Brassica napus* cv. Topas derived from colchicine-induced microspore embryogenesis without heat shock. Plant Cell Rep. 1996; 15:668-671.