

Effect of Trichostatin A and 5-azacytidine on Viability and Embryogenesis of Red Cabbage Isolated Microspores

Ahmadi^{1*}, B.

Received Date: 14 November 2023

Accepted Date: 28 December 2023

(Research Article)

Abstract

Red cabbage is one of the most important members of the *Brassicaceae* family, which its hybrids are cultivated globally. The production of inbred lines is a prerequisite for hybrid breeding programs and genetic studies in this cross-pollinated species which their production *via* conventional approaches tend to be time-consuming. Although shortening the breeding processes through the isolated microspore culture technique has been optimized to some extent in *Brassicaceae*, the efficiency of this process in red cabbage is still low. In this research, the effects of epigenetic modifiers, including trichostatin A (at concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 μ M for 30 and 60 min) and 5-azacytidine (at concentrations of 0, 1.25, 2.5, 5, and 10 μ M for 48 and 96 hours), were investigated to optimize the survival and subsequent embryogenesis of red cabbage microspores. Trichostatin A at concentrations of 0.2 and 0.5 μ M for 30 min and also 0.2 μ M for 60 min increased embryogenesis by 2.9-3.1 times, compared to the control. In contrast, treatment with 5-azacytidine at concentrations of 1.25 and 2.5 μ M did not have a significant impact on embryogenesis efficiency at probability level of 5%. Higher concentrations of 5-azacytidine exerted negative effect on viability and embryogenesis so that the least number of embryos were observed at concentrations of 5 and 10 μ M. The results of this study indicated that the optimal concentration of trichostatin A is associated with increased microspore survival post-stress, leading to enhanced production of haploid embryos.

Keywords: Epigenetic, Star-like structures, Doubled haploid, Microspore culture

1. Assistant Professor of Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research and Education Organization (AREEO), Karaj, Iran

✉: Corresponding author Email: Behzad.ahmadi1987@gmail.com

تأثیر تریکوستاتین A و ۵-آزاسیتیدین بر زنده‌مانی و رویان‌زایی جدایه‌های میکروسپور کلم قرمز

Effect of Trichostatin A and 5-azacytidine on Viability and Embryogenesis of Red Cabbage Isolated Microspores

بهزاد احمدی^{*۱}

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

(مقاله پژوهشی)

چکیده

کلم قرمز یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده چلیپائی‌ان است که ارقام هیبرید آن در سطح جهانی کشت می‌شود. تولید لاین‌های خالص پیش‌نیاز برنامه‌های اصلاح هیبرید و مطالعات ژنتیکی در این گیاه دگرگشن است که تولید آن‌ها به روش‌های سنتی بسیار زمان‌بر می‌باشد. اگرچه امروزه کوتاه نمودن فرآیند اصلاحی از طریق تولید لاین‌های خالص به روش کشت جدایه‌های میکروسپور در برخی گونه‌های خانواده چلیپائی‌ان تا حدودی بهینه شده است، ولی کارایی این روش در کلم قرمز هنوز بسیار پایین می‌باشد. در این تحقیق، اثر تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیک از جمله تریکوستاتین A (در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱/۰ میکرومولار به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه) و ۵-آزاسیتیدین (در غلظت‌های صفر، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت) بر زنده‌مانی و متعاقباً بهینه‌سازی کارایی رویان‌زایی میکروسپور در کلم قرمز بررسی گردید. تریکوستاتین A در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه و همچنین غلظت ۰/۲ میکرومولار به مدت ۶۰ دقیقه رویان‌زایی را ۲/۹-۳/۱ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند. در مقابل، تیمار با ۵-آزاسیتیدین در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۲/۵ میکرومولار تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر افزایش زنده‌مانی و کارایی رویان‌زایی میکروسپورها نداشت. غلظت‌های بالاتر ۵-آزاسیتیدین تأثیر منفی بر زنده‌مانی و رویان‌زایی نشان داد به‌طوری‌که کم‌ترین تعداد رویان‌ها در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار مشاهده شدند. نتایج این تحقیق نشان دادند که غلظت و زمان تیمار بهینه تریکوستاتین A با افزایش زنده‌مانی میکروسپورها پس از اعمال تنش و افزایش تولید رویان‌های هاپلوئید همراه است.

واژه‌های کلیدی: اپی‌ژنتیک، ساختارهای شبه ستاره‌ای، هاپلوئید مضاعف شده، کشت میکروسپور

۱. استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (SPII)، سازمان آموزش، تحقیق و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران

Email: Behzad.ahmadi1987@gmail.com

*: نویسنده مسؤول

مقدمه

سبزیجات به‌عنوان یکی از ارکان اصلی یک رژیم غذایی متعادل و سالم، نقش به‌سزایی در تأمین امنیت غذایی و ارتقای سلامت جامعه ایفا می‌کنند. کارکرد این گروه غذایی فراتر از تأمین انرژی بوده و عمدتاً به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از ترکیبات زیست‌فعال با خواص محافظتی و سلامتی‌بخش موردتوجه قرار می‌گیرند. در میان گونه‌های متعدد گیاهی موجود در سبذ غذایی، خانواده چلیپانیان (*Brassicaceae*) به لحاظ زراعی و تغذیه‌ای از جایگاهی ممتاز و جهانی برخوردار است. این خانواده با بهره‌مندی از تنوع مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی بالا، مجموعه گسترده و ارزشمندی از محصولات کشاورزی مهم از جمله کلم پیچ، کلم بروکلی، گل کلم، کلم قمری و کلم بروکسل را در بر می‌گیرد (Zhang et al., 2025).

در کانون این تنوع، کلم قرمز (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) به‌عنوان یک محصول خاص و برجسته شناخته می‌شود. مشخصه بارز این گیاه، وجود رنگدانه‌های بنفش تا قرمز آنتوسیانین است که به‌واسطه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی قدرتمند خود، موضوع مطالعات گسترده‌ای در حوزه تغذیه و پزشکی بوده‌اند. به‌علاوه، کلم قرمز منبعی غنی از گلوکوزینولات‌ها و دیگر ترکیبات حاوی گوگرد محسوب می‌شود که قادرند از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ سلولی، در پیشگیری از سرطان نقش مؤثری ایفا کنند (Sharma et al., 2023).

کلم قرمز، به دلیل دگرگشتن بودن، از پتانسیل هتروزیس بالایی در صفات زراعی ازجمله عملکرد، زودرسی، یکنواختی بوته‌ها و مقاومت به آفات و بیماری‌ها برخوردار است به‌طوری‌که امروزه ارقام هیبرید F_1 بخش عمده‌ای از کشت تجاری آن را تشکیل می‌دهند (Singh et al., 2009; Bhatia et al., 2018). با این حال، تولید لاین‌های خالص والدینی موردنیاز برای ایجاد هیبرید، به دلیل دوساله بودن چرخه زندگی و وجود سیستم پیچیده خودناسازگاری اسپوروفیتی (کنترل شده توسط مکان ژنی چندآلی S)، با استفاده از روش‌های سنتی خودگشتی، فرآیندی بسیار زمان‌بر و دشوار است که دستیابی به آن ممکن است تا ۱۲ تا ۱۴ سال به طول بیانجامد (Parmar et al., 2023; Mineykina et al., 2025).

امروزه تکنیک تولید هاپلوئید مضاعف‌شده (Doubled haploid) از طریق کشت جدایه‌های میکروسپور به‌عنوان یک روش کارآمد، امکان دستیابی به لاین‌های خالص را از یک جمعیت ناهمگن در یک نسل فراهم می‌سازد. مزیت دیگر لاین‌های تولیدشده به این روش، خلوص ژنتیکی بالا می‌باشد

که نه تنها دقت و قدرت مطالعات و نقشه‌برداری ژنتیکی را افزایش می‌دهد، بلکه پایه‌ای ایده‌آل برای تولید بذر هیبرید F_1 تجاری با حداکثر یکنواختی فنوتیپی فراهم می‌کند. چنین یکنواختی در مزرعه، منجر به هم‌زمانی در رشد و رسیدگی محصول می‌گردد که از پیش‌نیازهای اساسی برای برداشت مکانیزه و کارآمد به شمار می‌رود (Shariatpanahi & Ahmadi, 2016).

تاکنون، روش کشت جدایه‌های میکروسپور در بسیاری از گونه‌های مهم زراعی از خانواده چلیپانیان، به‌ویژه در کلزای پاییزه و بهاره (*B. napus* L.) و همچنین خردل هندی (*B. juncea* L.) با موفقیت و به‌صورت گسترده به کار گرفته می‌شود (Dong et al., 2021). با این حال، کاربرد این فناوری در برخی گونه‌ها و ارقام خاص، همچنان با چالش‌های فنی و کارآیی متفاوت ژنوتیپی مواجه است. ازجمله این موارد، گیاه کلم و به‌طور مشخص کلم قرمز است. اگرچه گیاه کلم به‌طور کلی مستعد کشت بافت است، اما برخی واریته‌های آن مانند کلم قرمز اغلب پاسخ‌دهی بسیار ضعیف در کشت میکروسپور نشان می‌دهند. به همین دلیل، گزارش‌های موفق از تولید لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده و متعاقباً تولید هیبریدهای F_1 تجاری از این روش در کلم قرمز، تا به امروز بسیار محدود و نادر بوده است (Mineykina et al., 2025).

اساساً، موفقیت در تکنیک کشت میکروسپور بستگی به ژنوتیپ، شرایط فیزیولوژیکی گیاه، محیط رشد، مرحله تکاملی میکروسپورهای کشت شده، ترکیبات محیط کشت، تراکم کشت میکروسپورها و تیمارهای مورد استفاده برای القای رویان‌زایی دارد (Ferrie & Caswell, 2011). پژوهش‌های اخیر همچنین نقش مهم تغییرات اپی‌ژنتیک را در هدایت فرآیند رویان‌زایی میکروسپورها آشکار ساخته‌اند. نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که تغییرات پویا در الگوی استیلایسیون هیستون‌ها (به‌ویژه در هیستون‌های H3 و H4) و همچنین متیلایسیون DNA نقش کلیدی در آغاز و پیشبرد مسیر رویان‌زایی میکروسپورها ایفا می‌نمایند (Jiang et al., 2017; Liu et al., 2022). القای موفقیت‌آمیز رویان‌زایی عموماً با یک افزایش در سطح استیلایسیون هیستون‌ها، که نشانگر وضعیت فعال رونویسی ژن‌هاست، و هم‌زمان با کاهش قابل‌توجه در سطح متیلایسیون DNA عمدتاً در نواحی راه‌انداز ژن‌هایی که مرتبط با رویان‌زایی هستند، همراه است (Ahmadi et al., 2018). این بازآرایی اپی‌ژنتیکی، به منزله یک سازوکار مولکولی عمل کرده که بیان شبکه‌ژنی لازم برای بازبرنامه‌ریزی میکروسپور به سلول رویانی را ممکن می‌سازد. بنابراین، درک جامع این سازوکارهای

میکرومولار به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت) بر درصد زنده ماندی میکروسپورهای کلم قرمز پس از اعمال تنش گرمایی و همچنین بر کارایی رویان‌زایی آن‌ها ارزیابی گردید. این مطالعه گامی مهم در بررسی کاربرد این تنظیم‌گران اپی‌ژنتیک در بهینه‌سازی کشت میکروسپور گیاه کلم قرمز محسوب می‌شود و می‌تواند افق‌های جدیدی را در جهت تسریع برنامه‌های اصلاحی، تولید لاین‌های خالص والدینی با کارایی بالا و در نهایت توسعه هیبریدهای F₁ در این محصول بگشاید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از هیبرید Rzwaan برای کشت جدایه‌های میکروسپور استفاده گردید. گیاهان مادری ابتدا در اتاق رشدی با دمای ثابت ۱۸°C، شدت نور $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. سپس گیاهان در مرحله ۸-۶ برگی جهت انجام ورنالیزاسیون به اتاق رشدی با دمای ثابت ۴°C و به مدت ۳ ماه در تاریکی منتقل شدند. بعد از ورنالیزاسیون، گیاهان به اتاق رشد اولیه برگردانده شدند تا وارد مرحله گل‌دهی شوند.

تعیین مرحله تکاملی میکروسپورها

برای تعیین مرحله تکاملی میکروسپورها، از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی هسته با استفاده از رنگ فلورسنت ۴، ۶-دی‌آمیدینو-۲-فنیل‌اندول (DAPI) استفاده گردید (Vergne *et al.*, 1987). برای این منظور، ابتدا غنچه‌های جمع‌آوری شده در محلولی شامل آب و ساکارز (۱۳ درصد) توسط هاون کوبیده شدند. سپس، سوسپانسیون حاصل از یک فیلتر نایلونی با اندازه منافذ ۴۰ میکرومتری عبور داده شد تا باقیمانده بافت‌های گیاهی جدا شده و سوسپانسیون نسبتاً خالص میکروسپور در لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردد. سپس، نمونه‌ها با دور ۱۰۰g و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دورریختن مایع فوقانی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DAPI با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به رسوب میکروسپور اضافه گردید. سلول‌ها به مدت یک ساعت در تاریکی و در دمای محیط (۲۵°C) تیمار و سپس نمونه‌ها مجدداً سانتریفیوژ شدند. مشاهده نهایی و تعیین مرحله تکاملی میکروسپورها با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال (Nikon, model ECLIPSE Ti2-E) و در طول موج ۴۲۵-۴۷۵ نانومتر انجام گرفت.

اپی‌ژنتیک می‌تواند راهبردی مؤثر برای غلبه بر محدودیت‌های ژنوتیپی و افزایش کارایی این تکنیک ارزشمند در گونه‌های گیاهی مختلف باشد.

تری‌کوستاتین A (Trichostatin A, TSA) به‌عنوان یک مهارکننده قدرتمند و انتخابی آنزیم‌های هیستون داستیلاز (HDACs)، از مشتقات هیدروکسامیک اسید است که به‌صورت طبیعی از باکتری‌های جنس استرپتومایسس جداسازی شده است. عملکرد اصلی این ترکیب، مهار فعالیت آنزیم‌های HDAC و در نتیجه افزایش سطح استیلاسیون کروماتین، به‌ویژه در نواحی هیستون‌های H3 و H4 است. در مطالعات گیاهی، تیمار با TSA تأثیر چشمگیری در بهبود کارایی رویان‌زایی میکروسپورها در گونه‌های مختلف مانند کلا (Li *et al.*, 2014)، گندم (Jiang *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2020) و گل کلم زینتی (Liu *et al.*, 2022) نشان داده است. اگرچه TSA به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اپی‌ژنتیک قادر است فرآیندهای رشد و نمو را در سلول‌های سوماتیکی و گامتیکی گیاهان تحت تأثیر قرار دهد، لیکن سازوکارهای دقیق مولکولی و مسیرهای سیگنالی این اثرات، به‌ویژه در بافت‌های گیاهی، هنوز به طور کامل شناخته نشده است.

۵-آزاسیتیدین (5-Azacytidine, 5-Aza) نیز به‌عنوان یک آنالوگ نوکلئوزیدی سیتیدین، از دیگر تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی می‌باشد که عمده‌تاً به‌عنوان مهارکننده قوی آنزیم‌های متیل‌ترانسفراز DNA (DNMTs) شناخته می‌شود و موجب کاهش گسترده و برگشت‌پذیر متیلاسیون ژنومی می‌گردد (Kordella *et al.*, 2021). در کشت بافت گیاهی، 5-Aza از طریق کاهش متیلاسیون راه‌انداز ژن‌های کلیدی دخیل در رویان‌زایی و در نتیجه رفع خاموشی اپی‌ژنتیکی آن‌ها برای القای بازبرنامه‌ریزی سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تیمار با غلظت‌های مناسب 5-Aza می‌تواند کارایی فرآیندهای کلیدی مانند رویان‌زایی سوماتیک، باززایی و تشکیل کالوس را به‌ویژه در گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مقاوم به کشت بافت به‌طور چشمگیری افزایش دهد (Carneros *et al.*, 2024; Yuan *et al.*, 2025).

اگرچه تأثیرات مثبت تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیک بر بهبود فرآیند رویان‌زایی میکروسپور در برخی گونه‌های گیاهی گزارش شده است، با این وجود، تأثیر 5-Aza و TSA بر رویان‌زایی میکروسپور در گیاه کلم قرمز تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این پژوهش، تأثیر تیمارهای TSA (در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، و ۱/۰ میکرومولار به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه) و 5-Aza (در غلظت‌های صفر، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰

جداسازی میکروسپورها برای کشت

غنچه‌های ۵-۴ میلی‌متری حاوی میکروسپورهای واکنش‌پذیر مرحله تکاملی اواسط تا اواخر تک‌هسته‌ای (Mineykina et al., 2021) برداشت و توسط هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس توسط آب مقطر استریل ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. غنچه‌های ضدعفونی شده توسط هاون و در محیط کشت NLN (Lichter, 1982) حاوی ۱۳۰ گرم ساکارز در لیتر (NLN-13) تحت شرایط استریل با استفاده از هاون کوبیده شدند تا میکروسپورها آزاد گردند. سوسپانسیون میکروسپورها از فیلتر ۴۰ میکرومتر عبور داده و در فالكون ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. سپس فالكون‌ها با دور ۱۰۰g به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. مایع بالای رسوب میکروسپورها دور ریخته شد و میکروسپورها با تراکم 2×10^4 در هر میلی‌لیتر (شمارش توسط لام هموسیتمومتر انجام گرفت) در محیط کشت NLN-13 کشت شدند. سپس کشت‌ها برای القای رویان‌زایی، به انکوباتور با دمای ۳۲°C به مدت ۳ روز در تاریکی منتقل شدند. کشت‌ها بعد از تیمار گرمایی به انکوباتوری با دمای ۲۵°C و تاریکی انتقال داده شدند.

تیمار TSA و 5-Aza

برای این منظور، ابتدا TSA (Sigma Aldrich) و 5-Aza (MedChem) هر کدام جداگانه در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل شدند. سپس TSA در غلظت‌های نهایی صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، و ۱/۰ میکرومولار (به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه) و 5-Aza نیز در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، و ۱۰ میکرومولار (به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت) به محیط کشت اضافه گردیدند. پس از اتمام دوره تیمار، نمونه‌ها سانتریفیوژ و میکروسپورها مجدداً با تراکم 2×10^4 در هر میلی‌لیتر در محیط کشت NLN-13 کشت شدند. هر دو آزمایش به در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار (هر پتری‌دیش معادل یک تکرار) اجرا گردیدند. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ver. 16) تجزیه شده و میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر مقایسه شدند.

باززایی گیاهچه‌ها

رویانه‌های بالغ بعد از گذشت ۴ هفته ابتدا به محیط کشت B5 (Gamborg et al., 1968) حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید (GA_3) در تاریکی به مدت ۲ هفته منتقل شدند. سپس رویانه‌های جوانه‌زده به شیشه‌های

حاوی محیط کشت B5 بدون هورمون منتقل شدند. گیاهچه‌های باززایی شد بعد از ۱ ماه به گلدان‌های حاوی پیت و پرلیت با نسبت برابر کشت و به گلخانه‌ای با شرایط دمایی ثابت ۴°C به مدت ۱ ماه جهت ورنالیزاسیون و سپس به گلخانه‌ای با دمای ثابت ۱۸°C منتقل شدند.

تعیین زنده‌مانی میکروسپورها

برای ارزیابی کمی زنده‌مانی میکروسپورها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف TSA (به مدت ۶۰ دقیقه) و 5-Aza (به مدت ۹۶ ساعت)، از دو روش رنگ‌آمیزی فلورسنت FDA-PI و ایمپدانس فلوسیتومتری (IFC) استفاده شد. نمونه‌ها ۴ روز بعد از کشت (۱ روز بعد از تیمار گرمایی) مورد بررسی قرار گرفتند. در روش DAPI-PI، ابتدا سوسپانسیون میکروسپورها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و با دور ۱۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع فوقانی رسوب میکروسپور دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت NLN-13 حاوی ۲ میکرولیتر از رنگ‌های فلورسنتین دی‌استات (FDA) و یدید پروپیدوم (PI) با غلظت‌های نهایی ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به رسوب میکروسپورها افزوده گردید. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، نمونه‌ها مجدداً سانتریفیوژ شده و میکروسپورها با میکروسکوپ کانفوکال (Nikon, ECLIPSE Ti2-E) در محدوده طول موج ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند.

در روش IFC، یک میلی‌لیتر از میکروسپورهای کشت شده برداشته و از یک صافی ۷۰ میکرومتری عبور داده شد و سپس در کووت‌های ۴ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردیدند. به هر نمونه، ۲ میلی‌لیتر بافر اختصاصی IFC اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه، با استفاده از تراشه کانال ۱۲۰ میکرومتری در دستگاه "Ampha-Z40" و با فرکانس ۱۲ مگاهرتز مورد سنجش قرار گرفتند (Canonge et al., 2020).

تعیین سطح پلوئیدی

برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان باززا شده، از روش فلوسیتومتری استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها (با ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر مربع) از نوک برگ‌های جوان گیاهان برداشت و پس از خرد شدن در ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Ho et al., 2025)، هسته‌های آن‌ها جداسازی گردیدند. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته (PI با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه گردید. در نهایت، نمونه‌ها از

نشان‌دهنده سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی، به‌ویژه میکروتوبول‌ها و رشته‌های اکتین است که تقسیم متقارن هسته را تسهیل می‌کند (Yang *et al.*, 2024). این بازآرایی ساختاری همچنین با تغییرات مولکولی، از جمله الگوی بیان ژن‌ها و هورمون‌ها همراه است که در مجموع شرایط را برای رویان‌زایی میکروسپورها ایجاد می‌کند. در نتیجه، ظهور و فراوانی ساختارهای شبه ستاره‌ای به طور بالقوه پیش‌بینی‌کننده کارآیی رویان‌زایی میکروسپورها می‌باشد و این مرحله را به یک نشانگر زیستی قابل رویت برای بهینه‌سازی شرایط کشت و ارزیابی قابلیت القای رویان‌زایی تبدیل می‌کند.

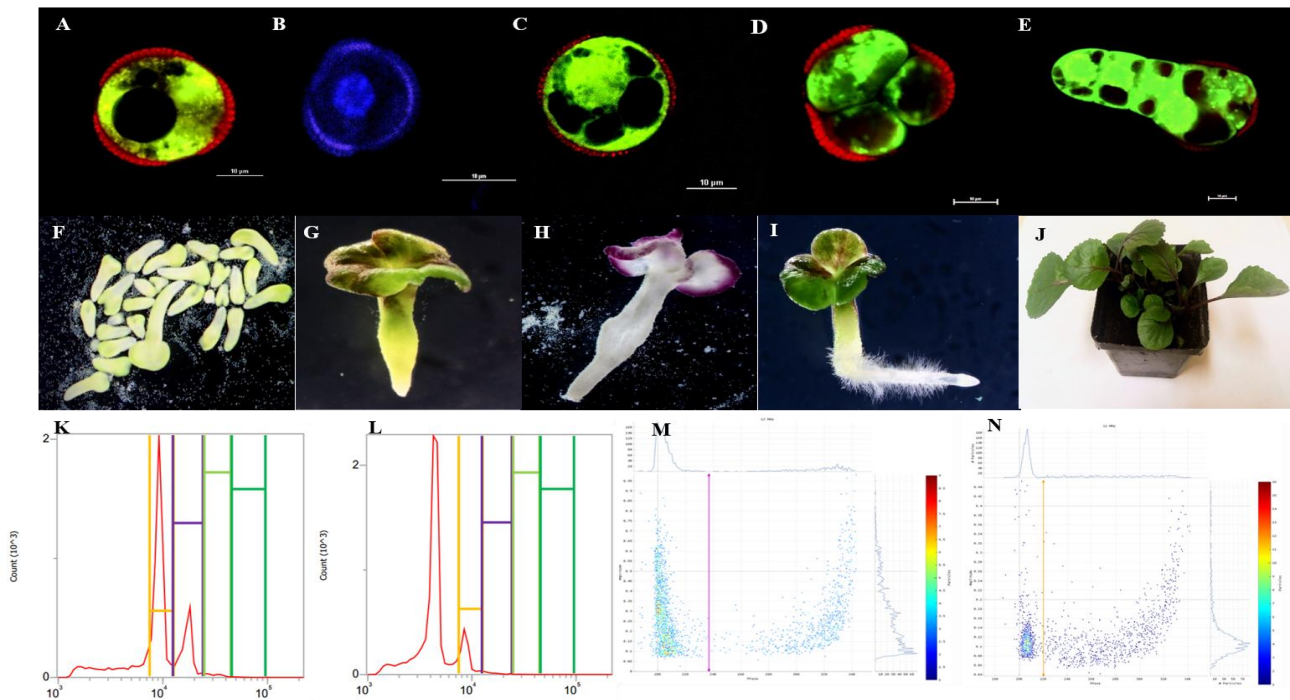
پس از گذشت ۳-۴ روز، ساختارهای شبه ستاره‌ای وارد مرحله تقسیمات اسپوروفیتی شده (شکل D-۱ و E) و پس از ۴ هفته رویان‌ها با چشم غیرمسلح رویت گردیدند (شکل F-۱ و G). در بین رویان‌های باززا شده، تعدادی آلبینو هم مشاهده گردید (شکل H-۱) که به دلیل عدم توانایی در سنتز کلروفیل قادر به باززایی نیستند. رویان‌های بالغ پس از ریشه‌دار شدن (شکل I-۱) در محیط کشت B₅ حاوی جبرلیک اسید (۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) به محیط باززایی و پس از ۳-۲ هفته گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند (شکل J-۱). آنالیز سطح پلوئیدی به روش فلوسیتومتری و مقایسه آن با گیاه استاندارد (گیاه دهنده میکروسپور) (شکل K-۱) نشان داد که گیاهان باززا شده هاپلوئید می‌باشند (شکل L-۱). این یافته از چند جنبه حائز اهمیت می‌باشد. نخست آنکه، از آنجایی که میکروسپورها سلول‌های هاپلوئید در چرخه زندگی گیاهان می‌باشند، هاپلوئید بودن گیاهان باززا شده نشان می‌دهد که این گیاهان از سلول‌های دیپلوئید مانند بافت‌های سوماتیکی منشاء نگرفته‌اند. ثانیاً، عدم مشاهده گیاهان دیپلوئید یا میکس-پلوئید در جمعیت باززا شده حاکی از آن است که طی فرآیند رویان‌زایی و باززایی، پدیده دو برابر شدن خودبه‌خودی کروموزوم‌ها رخ نداده است.

صافی ۵۰ میکرولیتری عبور داده شدند و سطح پلوئیدی آن‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری (CyFlow-6) سنجیده شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، غنچه‌های با طول ۴-۵ میلی‌متر که حاوی میکروسپورهای واکئولی (شکل A-۱) در مرحله تک‌هسته‌ای (شکل B-۱) می‌باشند برای القای رویان‌زایی برداشت گردیدند. در کلم قرمز و همچنین اکثر گیاهان، این مرحله مناسب‌ترین مرحله تکاملی میکروسپور برای القای رویان‌زایی می‌باشد (Ferrie & Caswell, 2011; Mineykina *et al.*, 2021). مرحله تکاملی میکروسپور در زمان القای تنش، یکی از عوامل تعیین‌کننده کارایی رویان‌زایی میکروسپور می‌باشد. پاسخ بهینه معمولاً به یک بازه زمانی محدود می‌شود، که اغلب از مراحل انتهایی تک‌هسته‌ای تا مراحل ابتدایی دوهسته‌ای است و هم‌زمان با دوره‌ای است که میکروسپور میوز را تکمیل کرده اما هنوز به‌طور کامل به دانه گرده تبدیل نشده است. میکروسپورها در این مرحله تکاملی خاص دارای انعطاف‌پذیری سلولی منحصر به فردی هستند که می‌توانند تحت تنش مناسب، مانند گرما، سرما یا گرسنگی مواد مغذی، از مسیر گامتوفیتی به مسیر اسپوروفیتی هدایت شوند. استفاده از میکروسپورهای خارج از این بازه بهینه پاسخ جنین‌زایی را به شدت کاهش می‌دهد و منجر به کاهش کارایی رویان‌زایی و یا رشد کالوس می‌شود (Seguí-Simarro & Nuez, 2006). بنابراین، هماهنگ‌سازی دقیق جمعیت میکروسپورها از نظر مرحله تکاملی پیش‌نیاز هر پروتکل برای به حداکثر رساندن کارایی رویان‌زایی است.

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در حین اعمال تنش گرمایی، هسته به سمت مرکز میکروسپور منتقل و واکئول میکروسپورها قطعه قطعه شده که اصلاً به آن "ساختار شبه ستاره‌ای" گفته می‌شود (شکل C-۱). تشکیل این ساختار



شکل ۱: رویان‌زایی جدایه‌های میکروسپور کلم قرمز. A: میکروسپور واکتولی، B: میکروسپور تک‌هسته‌ای، C: ساختار شبه ستاره‌ای، D و E: القای تقسیمات اسپوروفیتی، F و G: رویان‌های تشکیل شده بعد از گذشت ۴ هفته، H: رویان آلبینو، I: رویان ریشه‌دار شده در محیط حاوی جیبرلیک اسید، J: گیاه باززا شده، K: گیاه دیپلوئید استاندارد (والد دهنده میکروسپور)، L: گیاه هاپلوئید (حاصل از کشت میکروسپور)، M و N: به ترتیب، نتایج حاصل از سنجش زنده‌مانی میکروسپورها توسط ایمپدانس فلوسیتومتری در تیمار شاهد و تیمار TSA (۰/۲ میکرومولار به مدت ۶۰ دقیقه، ۴ روز بعد از کشت)

Fig. 1: Isolated microspore culture in red cabbage. A: vacuolated microspore, B: uninucleate microspore, C: star-like structure, D and E: induction of sporophytic divisions, F and G: formation of embryos after four weeks, H: albino embryo, I: rooted embryo on gibberellic acid-supplemented medium, J: regenerated plant, K: standard diploid plant (microspore donor plant), L: haploid plant (derived from microspore culture), M and N: microspore viability obtained via impedance flow cytometry are presented, comparing the control group with a treatment of 0.2 μ M trichostatin A (TSA) for 60 minutes, assessed four days post-culture

غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲ میکرومولار به ترتیب با تولید ۲۸/۲ و ۲۶/۷ رویان در هر پتری‌دیش بیشترین تأثیر را بر رویان‌زایی میکروسپورها گذاشتند. تأثیر مثبت تیمار TSA بر افزایش کارایی رویان‌زایی میکروسپورهای سایر گیاهان خانواده چلیپائی‌ان و همچنین غلات هم گزارش شده است (Solís *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022).

تحقیقات نشان داده‌اند که TSA با مهار آنزیم‌های HDAC، تعادل اپی‌ژنتیکی را به‌سوی افزایش استیل‌اسیون هیستون‌ها تغییر می‌دهد. این امر سبب بازشدن ساختار کروماتین در ناحیه راه‌انداز ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده رویان‌زایی (مانند *WUS* و *BBM*، *LEC*) می‌شود و دسترسی فاکتورهای رونویسی به این مکان‌های ژنی را تسهیل می‌کند. در نتیجه، بیان این ژن‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و میکروسپورها تحت یک بازبرنامه‌ریزی اپی‌ژنتیکی قرار می‌گیرند که آن‌ها را برای خروج از حالت تمایز یافته و ورود به مسیر تشکیل رویان مستعد می‌سازد. به‌علاوه، TSA مسیرهای سیگنالینگ هورمونی (مانند

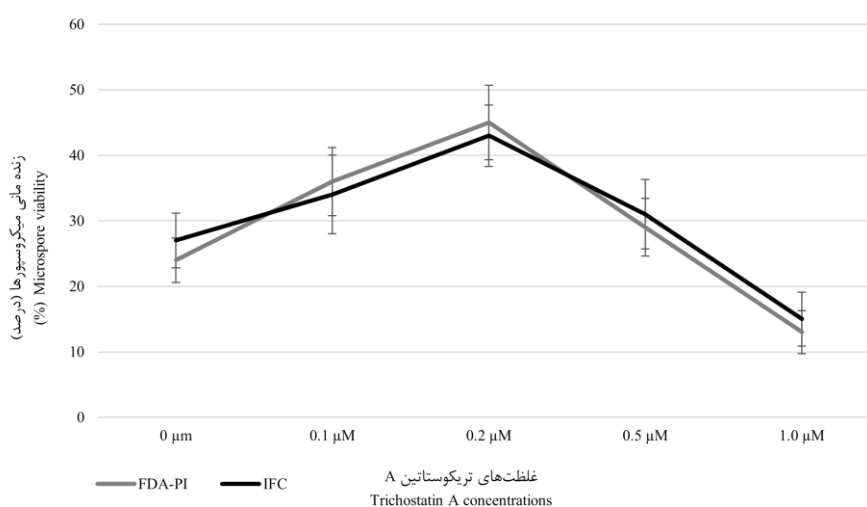
تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که اگرچه تشکیل ساختارهای شبه ستاره‌ای یک نشانگر مورفولوژیکی برای برنامه‌ریزی مجدد ناشی از تنش و تغییر اولیه از مسیر گامتوفیتی به مسیر اسپوروفیتی می‌باشد، اما این ساختار به تنهایی تضمین‌کننده رویان‌زایی نمی‌باشد (Dubas *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). تکامل این ساختارها به سمت رویان به عواملی زیادی از جمله ترکیبات محیط‌کشت وابسته است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیک مانند TSA و 5-Aza نیز می‌توانند نقش مهمی در افزایش کارایی و هدایت میکروسپورها به سمت رویان‌زایی ایفا کنند (Zhang *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2020).

در میان غلظت‌ها و دوره‌های مختلف TSA آزمایش شده در این تحقیق (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، و ۱/۰ میکرومولار به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه)، بیشترین تعداد رویان‌ها در تیمار زمانی ۶۰ دقیقه و غلظت ۰/۲ میکرومولار (۲۹/۵ رویان در هر پتری‌دیش) به‌دست آمد (جدول ۱). در تیمار زمانی ۳۰ دقیقه نیز،

تصور می‌شود که احتمالاً غلظت و زمان بهینه تیمار TSA از طریق سازوکارهای مقابله با تنش اکسیداتیو (Bouyahya *et al.*, 2022) منجر به افزایش زنده‌مانی میکروسپورها پس از اعمال تنش گرمایی و بهبود کارایی رویان‌زایی گردد. با این وجود، نتایج نشان دادند کارایی TSA وابسته به غلظت می‌باشد به‌طوری‌که با افزایش غلظت به ۰/۵ و ۱/۰ میکرومولار، زنده‌مانی میکروسپورها کاهش معنی‌داری پیدا کرد. تأثیر تیمار 5-Aza در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۲/۵ میکرومولار بر افزایش رویان‌زایی میکروسپورها در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۱).

پاسخ به اکسین و سیتوکینین) را نیز تغییر داده و درنهایت کارایی و هماهنگی فرآیند رویان‌زایی را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد (Wójcikowska *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2020). با وجود تأثیر مثبت TSA، کارایی رویان‌زایی میکروسپور با افزایش غلظت آن به ۱/۰ میکرومولار (در هر دو تیمار زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه) نسب به شاهد کاهش معنی‌داری پیدا نمود که نشان‌دهنده تأثیر وابسته غلظت تیمار TSA می‌باشد.

در این تحقیق، همچنین مشاهده شد که TSA در غلظت ۰/۲ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی میکروسپورها پس از تنش گرمایی در مقایسه با شاهد شد (شکل ۲). بنابراین،



شکل ۲: سنجش زنده‌مانی میکروسپورها در غلظت‌های مختلف تریکوستاتین A (TSA) چهار روز پس از کشت توسط روش DAPI-PI و ایپمدانس فلوسیتومتری (IFC)

Fig. 2: Assessment of microspore viability at different concentrations of trichostatin A (TSA) four days after culture, using the DAPI-PI staining method and impedance flow cytometry (IFC).

جدول ۱: مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف تریکوستاتین A (TSA) و ۵-آزاسیتیدین (5-Aza) بر رویان‌زایی جدایه‌های میکروسپور کلم قرمز

Table 1: Comparison of the effects of different concentrations of trichostatin A (TSA) and 5-azacitidine (5-Aza) on the embryogenesis of isolated microspore of red cabbage

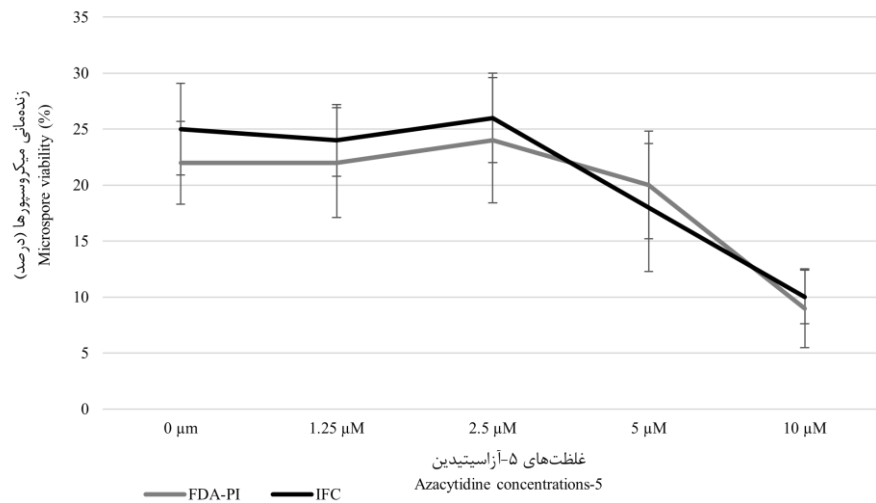
تیمار Treatment	دوره Duration	غلظت Concentration				
		0 μM	0.1 μM	0.2 μM	0.5 μM	1.0 μM
تریکوستاتین TSA	30 min	9.2 ± 2.1 ^{a*}	14.5 ± 1.8 ^b	26.7 ± 3.7 ^a	28.2 ± 3.1 ^a	11.0 ± 2.2 ^{bc}
	60 min	10.2 ± 2.6 ^c	18.0 ± 2.7 ^b	29.5 ± 5.4 ^a	11.3 ± 1.9 ^c	6.5 ± 2.5 ^c
۵-آزاسیتیدین 5-Aza	48 h	11.5 ± 2.3 ^{ab}	13.5 ± 4.1 ^a	10.0 ± 1.9 ^b	4.0 ± 2.7 ^c	2.2 ± 1.8 ^c
	96 h	10.0 ± 2.5 ^a	12.5 ± 3.3 ^a	11.7 ± 2.1 ^a	4.7 ± 2.3 ^b	1.5 ± 0.9 ^c

* اعداد (± انحراف معیار) ردیف‌ها با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشند

* Means (± SD) in each row followed by the same letters are not significantly different at the 0.05 level, according to the Duncan's Multiple Range Test

درصد افزایش داد (Solís *et al.*, 2015). در تریپتیکاله، تیمار 5-Aza تأثیر وابسته به ژنوتیپی بر کارایی رویان‌زایی میکروسپور از طریق تغییر در بیان ژن‌های دخیل در رویان‌زایی مانند *SERK2* و *GSTA2*، *GSTF2*، *TaTPD1-like* (Nowicka *et al.*, 2019). با این وجود، در این تحقیق، تیمار با 5-Aza تأثیر مثبتی بر افزایش کارایی رویان‌زایی میکروسپورها کلم قرمز نشان نداد. نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی هم نشان دادند که در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۲/۵ میکرومولار (به مدت ۹۶ ساعت) تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی نداشت ولی با افزایش غلظت به ۱۰ میکرومولار زنده‌مانی و رویان‌زایی میکروسپورها کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳).

با افزایش غلظت 5-Aza رویان‌زایی میکروسپورها به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد به‌طوری‌که کمترین تعداد رویان‌ها به ترتیب در ۵ و ۱۰ میکرومولار مشاهده گردیدند. 5-Aza، یک آنالوگ سیتیدین و مهارکننده قوی آنزیم‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs)، نیز از جمله تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیک می‌باشد که می‌تواند با القای هایپومتیلاسیون DNA در سطح ژنوم، از طریق ادغام در DNA و ایجاد پیوندهای کووالانسی پایدار با این آنزیم‌ها، بر کارایی رویان‌زایی تأثیر بگذارد. در مقایسه با TSA، اطلاعات در رابطه با تأثیر 5-Aza بر رویان‌زایی میکروسپورها بسیار محدود می‌باشد. در کلزا و جو تیمار با ۲/۵ میکرومولار 5-Aza رویان‌زایی میکروسپورها را تا حدود ۵۰



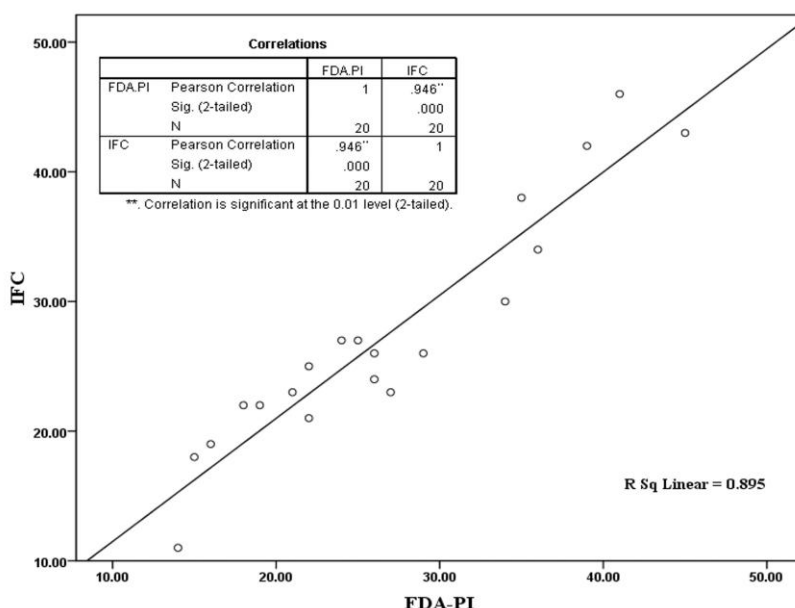
شکل ۳: سنجش زنده‌مانی میکروسپورها در غلظت‌های مختلف 5-آزاسیتیدین (5-Aza) چهار روز پس از کشت توسط روش DAPI-PI و ایپمدانس فلوسیتومتری (IFC)

Fig. 3: Assessment of microspore viability at different concentrations of 5-azacytidine (5-Aza) four days after culture, using the DAPI-PI staining method and impedance flow cytometry (IFC)

سالم و سیتوپلاسم فعال، نمایه ایپمدانس مشخص یا «اثر انگشت الکتریکی» را نشان می‌دهد، که متمایز از یک سلول غیرزنده با غشای آسیب‌دیده است. سیستم IFC این مشخصات را در زمان واقعی (Real-time) تجزیه و تحلیل می‌کند و امکان طبقه‌بندی تک سلولی با توان بالا را بر اساس وضعیت زنده بودن بدون نیاز به رنگ‌های فلورسنت فراهم می‌کند. این روش به‌ویژه برای ردیابی تغییرات پویا در سلامت کشت در طول زمان مفید است، زیرا امکان تجزیه و تحلیل مکرر همان نمونه را بدون رنگ‌آمیزی مصرفی فراهم می‌کند، نتایج فوری را ارائه می‌دهد و سمیت بالقوه ناشی از رنگ یا نور را حذف می‌کند. روش IFC برای اولین بار در کشت میکروسپور گیاه گندم به‌کار گرفته شد و به‌عنوان یک روش مطمئن و سریع با قابلیت بالا معرفی گردید (Canonge *et al.*, 2020). نتایج تحقیق حاضر که

در این تحقیق، برای اولین بار از روش IFC در کنار روش مرسوم رنگ‌آمیزی DAPI-PI برای بررسی زنده‌مانی میکروسپورهای گیاه کلم قرمز استفاده گردید. همبستگی معنی‌داری در سطح ۱ درصد ($r = 0.946$) بین دو روش مشاهده گردید (شکل ۴) که نشان‌دهنده دقت بالا و قابل‌اعتماد بودن روش IFC می‌باشد. IFC یک روش بدون برچسب و غیراینتیکال برای ارزیابی سریع و کمی زنده‌مانی سلولی در جمعیت‌های ناهمگن، مانند مواردی که در کشت میکروسپور مشاهده می‌شود، می‌باشد. این روش بر خواص الکتریکی دیفرانسیل سلول‌های زنده، به‌ویژه ظرفیت و رسانایی آن‌ها استوار است. هنگامی که یک سلول منفرد از ناحیه اندازه‌گیری تراشه میکروسیال عبور می‌کند، یک میدان الکتریکی چند فرکانسی اعمال می‌شود. یک سلول زنده با غشای پلاسمایی

بر روی کشت جدایه‌های میکروسپور کلم قرمز انجام گرفت، بهینه‌سازی شرایط کشت و نظارت بر پاسخ‌های تنش در نشان داد که IFC می‌تواند یک ابزار قوی و عینی برای سیستم‌های کشت میکروسپور باشد.



شکل ۴: همبستگی بین زنده‌مانی میکروسپورها اندازه‌گیری شده توسط DAPI-PI و ایمپدانس فلوسیتومتری (IFC) ۴ روز بعد از کشت

Fig. 4: Correlation between microspore viability measured by DAPI-PI staining and impedance flow cytometry (IFC) 4 days after culture

نتیجه‌گیری

و ۱۰ میکرومولار موجب کاهش معنی‌دار رویان‌زایی در مقایسه با شاهد گردید. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که استفاده از روش IFC می‌تواند یک جایگزین مطمئن، سریع و بدون تخریب روش‌های مرسوم رنگ‌آمیزی سلولی مانند روش DAPI-PI جهت تجزیه و تحلیل زنده‌مانی میکروسپورها در زمان واقعی (Real-time) و بهینه‌سازی رویان‌زایی میکروسپورهای کلم قرمز باشد.

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار با تریکوستاتین A (غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه) موجب افزایش زنده‌مانی و همچنین کارایی رویان‌زایی میکروسپورهای کلم قرمز گردید. از طرفی دیگر، تیمار با ۵-آزاسیتیدین نه تنها موجب افزایش زنده‌مانی و کارایی رویان‌زایی میکروسپورها نگردید، بلکه در غلظت‌های ۵

References

- Ahmadi, B., Ahmadi, M. and Teixeira da Silva, J. A. 2018. Microspore embryogenesis in *Brassica*: calcium signaling, epigenetic modification, and programmed cell death. *Planta*, 248(6): 1339-1350.
- Bhatia, R., Dey, S. S., Parkash, C., Sharma, K., Sood, S. and Kumar, R. 2018. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India. *Scientia Horticulturae*, 233: 178-187.
- Bouyahya, A., El Omari, N., Bakha, M., Aanniz, T., El Meniy, N., El Hachlafi, N., El Baaboua, A., El-Shazly, M., Alshahrani, M. M., Al Awadh, A. A., Lee, L. H., Benali, T. and Mubarak, M. S. 2022. Pharmacological properties of trichostatin A, focusing on the anticancer potential: a comprehensive review. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(10): 1235. <https://doi.org/10.3390/ph15101235>.
- Canonge, J., Philippot, M., Leblanc, C., Potin, P. and Bodin, M. 2020. Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures. *Plant Science*, 300: 110586. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110586>.
- Carneros, E., Díaz-Luzza, E. M., Pérez-Pérez, Y., Solís, M. T. and Testillano, P. S. 2024. DNA demethylation by transitory 5-azacytidine treatment improves somatic embryogenesis yield for regeneration and breeding of cork oak. *Physiologia Plantarum*, 176(1): e14143. <https://doi.org/10.1111/ppl.14143>.
- Castillo, A. M., Valero-Rubira, I., Burrell, M. Á., Allué, S., Costar, M. A. and Vallés, M. P. 2020. Trichostatin A affects developmental reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic route. *Plants*, 9(11): 1442. <https://doi.org/10.3390/plants9111442>.

- Dong, Y. Q., Gao, Y. H., Zhao, T., Ren, G. Q., Liu, Y. L., Guan, B., Jin, R. X., Gao, F., Zhang, Y. L., Tan, X. F., Zhu, H. C., Zhang, Y. H., Zhang, J. X., Peng, D. and Yan, X. Y. 2021. Influencing factors and physiochemical changes of embryogenesis through *in vitro* isolated microspore culture in *Brassica* species. *Biologia*, 76: 2629-2654.
- Dubas, E., Krzewska, M., Surówka, E., Kopeć, P., Springer, A., Janowiak, F., Weigt, D., Mikołajczyk, S. K., Telk, A. and Żur, I. 2024. New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines. *Plants*, 13(3): 363; <https://doi.org/10.3390/plants13030363>.
- Ferrie, A. M. R. and Caswell, K. L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3): 301-309.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, L. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Ho, W. S., Eng, W. H. and Ling, K. H. 2024. Optimizing flow cytometry analysis for determining ploidy level and genome size of colchicine-induced polyploids of *Neolamarckia cadamba*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 12(1): 93-97.
- Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Hucl, P., Randhawa, H., Marillia, E. F., Foroud, N. A., Eudes, F. and Kathiria, P. 2017. Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Reports*, 36: 1701-1706.
- Kordella, C., Lamprianidou, E. and Kotsianidis, I. 2021. Mechanisms of action of hypomethylating agents: endogenous retroelements at the epicenter. *Frontiers in Oncology*, 11: 650473. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.650473>.
- Li, H., Soriano, M., Cordewener, J., Muino, J. M., Riksen, T., Fukuoka, H., Angenent, G. C. and Boutilier, K. 2014. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell*, 26: 195-209.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollens of *Brassica napus*. *Z Pflanzenphysiol*, 105: 427-434.
- Liu, C., Song, G., Zhao, Y., Fang, B., Liu, Z., Ren, J. and Feng, H. 2022. Trichostatin A induced microspore embryogenesis and promoted plantlet regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Horticulturae*, 8(9): 790. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090790>.
- Mineykina, A. I., Stebnitskaia, K. S., Fomicheva, M. G., Bondareva, L. L., Domblides, A. S. and Domblides, E. A. 2025. Optimization of technology steps for obtaining white cabbage DH-plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 29(4): 517-529.
- Nowicka, A., Juzoń, K., Krzewska, M., Dziurka, M., Dubas, E., Kopeć, P., Zieliński, K. and Żur, I. 2019. Chemically-induced DNA de-methylation alters the effectiveness of microspore embryogenesis in triticale. *Plant Science*, 287: 110189. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110189>.
- Parmar, S. S., Ravindra, I. H. and Kumar, R. 2023. Accelerated approaches for cabbage improvement. In: El-Esawi MA (ed) *Recent trends in plant breeding and genetic improvement*. Intech Open. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002526>.
- Seguí-Simarro, J. M. and Nuez, F. 2006. How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134(1): 1-12.
- Shariatpanahi, M. E. and Ahmadi, B. 2016. Isolated microspore culture and its applications in plant breeding and genetics. In: Anis M, Ahmad N (eds) *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement*. Springer Science+Business Media, Singapore, pp. 487-507.
- Sharma, S., Anand, P., Shree, B., Ramachandran, P., Kumar, V., Thakur, R. and Kumar, S. 2023. Cabbage and red cabbage sprouts: powerhouse of nutrients. In: Majid I, Kehinde BA, Dar B, Nanda V (eds) *Advances in plant sprouts*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-40916-5_15.
- Singh, B. K., Sharma, S. R. and Singh, B. 2009. Heterosis for mineral elements in single cross-hybrids of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Scientia Horticulturae*, 122(1): 32-36.
- Solis, M. T., El-Tantawy A. A., Cano, V., Risueño, M. C. and Testillano, P. S. 2015. 5-Azacytidine promoted microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barely. *Frontiers in Plant Science*, 6: 472. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>.
- Vergne, P., Delvallee, I. and Dumas, C. 1987. Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technology*, 62: 299-304.
- Wójcikowska, B., Botor, M., Morończyk, J., Wójcik, A. M., Nodzyński, T., Karcz, J. and Gaj, M. D. 2018. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in *Arabidopsis* explants *via* an auxin-related pathway. *Frontiers in Plant Science*, 13(9): 1353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01353>.
- Yang, F., Liu, X., Qiao, Y., Tang, X. and Luo P. 2024. Microspore embryogenesis: *in vitro* cultivation induced cell reprogramming for plant breeding. *Seed Biology*, 3: e021. <https://doi.org/10.48130/seedbio-0024-0019>.
- Yuan, G., Wang, D., Yu, C., Hua, J., Yin, Y. and Chen, T. 2025. 5-AzaCytidine promotes somatic embryogenesis of *Taxodium* Hybrid 'Zhongshanshan' by regulating redox homeostasis. *Plants*, 14(9): 1354. <https://doi.org/10.3390/plants14091354>.
- Zhang, L., Zhang, Y., Gao, Y., Jiang, X., Zhang, M., Wu, H., Liu, Z. and Feng, H. 2016. Effects of histone deacetylase inhibitors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.). *Scientia Horticulturae*, 209: 61-66.
- Zhang, X., Jia, Q., Jia, X., Li, J., Sun, X., Min, L., Liu, Z., Ma, W. and Zhao, J. 2025. *Brassica* vegetables—an undervalued nutritional goldmine. *Horticulture Research*, 12(2): uhae302. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae302>.