



Effect of Trichostatin A Seed Pretreatment on Androgenic Response and Expression of Embryogenesis- and Histone Deacetylase-Related Genes in Anther Cultures of *Camelina sativa* L.

Zahra Behzadfar | Mohammad Reza Abdollahi* | Asghar Mirzaie Asl

Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

*Corresponding author ✉: m.abdollahi@basu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: April 03, 2025;
Received in revised form: June 16, 2025;
Accepted: June 22, 2025;
Available online: June 30, 2025

Keywords:

Epigenetic,
Gene expression,
Embryogenesis related genes,
Anther culture,
Histone deacetylase

ABSTRACT

The production of doubled haploid plants through *in vitro* techniques is considered an effective tool to accelerate plant breeding programs and the development of new cultivars. In this regard, Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, has been reported to enhance androgenesis efficiency in some plant species. This study aimed to investigate the effect of TSA on androgenesis response and the expression of certain genes associated with embryogenesis and histone deacetylases in anther culture of *Camelina sativa* L. To this end, flower buds from seed-grown plants were primed with different concentrations of TSA (0, 0.2, 0.5, 1, and 2 μ M), collected at the stage when the anthers contained mid- to late- uninucleate microspores, and then cultured. Subsequently, the relative expression levels of key embryogenesis and HDAC -related genes were evaluated in the resulting calli. Analysis of variance revealed that different TSA treatments significantly ($p \leq 0.05$) affected the mean number of embryos per anther, with the highest number of embryos observed at 0.5 and 1 μ M TSA treatments (0.417 and 0.483, respectively). Moreover, the relative expression of *LEC1*, *WUS*, *SERK*, *BBM*, and *AGL15* genes increased at these concentrations. In contrast, treatments with 2 μ M TSA led to a reduction in the expression level of embryogenesis-related genes and upregulation of *HDAC6* and *HDAC19* genes. Overall, these findings advance our understanding of complex interaction between chromatin modification and embryogenesis while opening new avenues for exploring epigenetic strategies in plant tissue culture.



Cite this article: Behzadfar, Z., Abdollahi, M.R. and Mirzaie Asl, A. (2025). Effect of trichostatin A seed pretreatment on androgenic response and expression of embryogenesis- and histone deacetylase-related genes in anther cultures of *Camelina sativa* L.. *Plant Genetic Research*, 12(1): 21-36.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2065406.1005>



Introduction

Doubled haploid (DH) production through anther or microspore culture is a powerful technique in plant breeding. However, its broader application is limited by factors such as low tissue culture responsiveness and strong genotype dependency. Histone deacetylation, which suppresses the expression of key morphogenetic genes, is considered one of the underlying contributors to these limitations. In *Camelina sativa*, a valuable oilseed crop, challenges such as low embryogenesis rates, incomplete diploidization, and high production costs hinder the routine use of DH technology. Recent studies suggest that Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, may enhance DH production and reduce breeding time by promoting histone acetylation. TSA, an antifungal compound derived from *Streptomyces hygroscopicus*, significantly influences gene expression, including genes critical to embryogenesis such as *LEC1*, *BBM*, *AGL15*, and *WUS*, whose upregulation has been linked to increased embryogenic efficiency. Given the role of histone acetylation in chromatin remodeling and transcriptional activation, TSA may modulate gene expression and facilitate cell differentiation. This study investigates the expression patterns of embryogenesis-related genes (*LEC1*, *BBM*, *AGL15*, *WUS*, *SERK*) and histone deacetylase genes (*HDAC6*, *HDAC19*) in *Camelina* anther cultures treated with TSA. The aim is to evaluate the relationship between androgenic responses and the expression of these genes during gametic embryogenesis.

Materials and Methods

To assess the effect of TSA on androgenic response and gene expression in *Camelina sativa* (Soheil cultivar), seeds were pretreated with 0, 0.2, 0.5, 1, and 2 μM TSA for 48 hours at 4°C. Plants were then grown in pots under a 16/8 h light/dark cycle in a completely randomized design (CRD) with three replications. Suitable anthers were cultured on B₅ medium (Gamborg *et al.*, 1968) supplemented with NLN vitamins (Fletcher *et al.*, 1998), 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BAP, and 20 g/L sucrose. Each replicate included 20 anthers per petri dish. Cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 16/8 h light/dark cycle and 50% relative humidity. Androgenic response was evaluated based on the percentage of callus-forming anthers (C%) and the mean number of embryos per anther (ME/A). Gametic embryos were harvested for gene expression analysis. Gene expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), where $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{target gene}) - \text{Ct}(\text{reference gene})$. Data were analyzed using one-way ANOVA in SPSS 16.0 and MINITAB 14.0 after confirming the normality of residuals. Means were compared using Duncan's multiple range test at the 5% significance level. Two biological and two technical replicates were used in qRT-PCR assays.

Results and Discussion

ANOVA results showed significant differences ($p < 0.05$) in the mean number of embryos per anther across the various TSA pre-treatment concentrations. Duncan's test revealed that the highest ME/A values were obtained with 0.5 μM (0.417) and 1 μM (0.483) TSA treatments. Significant differences ($p < 0.01$) were also observed in the relative expression levels of embryogenesis-related and HDAC genes across treatments. The highest expression levels of *LEC1*, *WUS*, and *SERK* were associated with 0.5 μM and 1 μM TSA, while *BBM* and *AGL15* showed peak expression at 1 μM . In contrast, the 2 μM TSA treatment downregulated the expression of embryogenesis-related genes and upregulated HDAC genes. Notably, *HDAC6*

and *HDAC19* expression reached their highest levels (2.5-fold and 8.49-fold, respectively) in plants treated with 2 μ M TSA.

Conclusion

The results of present study underscores the complex interaction between chromatin modifications and embryogenesis, providing new insights into the epigenetic regulation of somatic and gametic embryogenesis. The findings highlight the role of histone acetylation and deacetylation in regulating gene expression and indicate that HDAC inhibitors such as TSA can promote embryogenic responses. These insights support the use of epigenetic modulators to overcome recalcitrance in plant tissue culture and to advance crop improvement through biotechnological approaches.

Author Contributions

All authors contributed to the conceptualization of the article and to the writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Data are available from the authors upon request.

Acknowledgements

The authors would like to thank the anonymous reviewers for their valuable suggestions in revising the manuscript.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and any form of research misconduct.




Funding

This research was financially supported by Bu-Ali Sina University, Hamedan, for covering the experimental costs. No additional funding was received from public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

اثر پیش تیمار بذر با تریکواستاتین A بر پاسخ به آندروژنز و بیان برخی ژن‌های مرتبط با رویان‌زایی و هیستون‌داستیلاز در کشت بساک گیاه کاملینای زراعی (*Camelina sativa* L.)

زهرا بهزادفر  | محمدرضا عبداللهی*  | اصغر میرزایی اصل 

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف از طریق روش‌های درون‌شیشه‌ای، ابزاری مؤثر برای تسریع برنامه‌های به‌نژادی و تولید ارقام جدید محسوب می‌شود. در این راستا، تریکواستاتین A (TSA) به‌عنوان بازدارنده آنزیم‌های هیستون‌داستیلاز (HDAC)، در برخی گیاهان موجب افزایش کارایی آندروژنز شده است. این پژوهش با هدف بررسی اثر TSA بر پاسخ آندروژنز و بیان برخی ژن‌های مرتبط با رویان‌زایی و هیستون‌داستیلاز در کشت بساک گیاه کاملینای زراعی انجام شد. بدین منظور، غنچه‌های گیاهان حاصل از بذور تیمار شده با غلظت‌های مختلف TSA (صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومول) در مرحله‌ای که بساک‌ها حاوی میکروسپورهای تک‌هسته‌ای میانی تا انتهایی بودند، برداشت و کشت شدند. در ادامه، بیان نسبی ژن‌های کلیدی رویان‌زایی و HDAC در کالوس‌های حاصل ارزیابی شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که تیمارهای مختلف TSA در سطح ۰/۰۵ اثر معنی‌داری بر میانگین تعداد رویان به‌زای هر بساک داشتند، به‌طوری‌که بیشترین تعداد رویان در تیمارهای ۱ و ۰/۵ میکرومول (به‌ترتیب ۰/۴۸۳ و ۰/۴۱۷) مشاهده شد. همچنین، بیان نسبی ژن‌های *LEC1*، *WUS*، *SERK*، *BBM* و *AGL15* در غلظت‌های مذکور افزایش یافت. در مقابل، تیمار ۲ میکرومول TSA باعث کاهش بیان ژن‌های رویان‌زایی و افزایش بیان ژن‌های *HDAC6* و *HDAC19* شد. به‌طور کلی یافته‌های این پژوهش، اطلاعات و شناخت محققین از برهم‌کنش پیچیده بین تغییر ساختار کروماتین و فرآیندهای رویان‌زایی را افزایش می‌دهد و فرصت‌های جدیدی برای مطالعه استراتژی‌های اپی‌ژنتیکی در کشت‌بافت گیاهی فراهم می‌کند.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

اپی‌ژنتیک،

بیان ژن،

ژن‌های مرتبط با رویان‌زایی،

کشت بساک،

هیستون‌داستیلاز

مقدمه

گیاهچه می‌شود. این مسائل می‌توانند کاربرد گسترده این فناوری را به‌عنوان ابزار معمول برای بهبود برنامه‌های اصلاحی کاملینا (یک گیاه روغنی با ارزش و کم‌نهاد) محدود کنند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تریکواستاتین A (TSA)، به‌عنوان مهارکننده هیستون‌داستیلازها، می‌تواند تولید هاپلوئیدهای مضاعف را در سیستم‌های گیاهی افزایش دهد (Li et al., 2014) و باعث کوتاه‌تر شدن مدت‌زمان اصلاح ارقام و لاین‌های جدید برای رسیدن به هموزیگوسیتی گردد. مهارکننده هیستون‌داستیلاز همچنین می‌توانند به افزایش کارایی انتخاب در برنامه‌های اصلاحی کمک کنند. استیلاسیون هیستون در گیاهان در در فعال‌سازی ژن‌های کلیدی دخیل در رویان‌زایی (Xu et al., 2017)، پاسخ به تنش‌های محیطی (مانند شوری، خشکی، سرما و گرما) و تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. گیاهان از طریق تغییرات در استیلاسیون هیستون به تنش‌های محیطی پاسخ می‌دهند. این مکانیسم به تنظیم بیان ژن‌هایی کمک می‌کند که در سازگاری و مقاومت گیاه نقش دارند (Feng et al., 2017). تریکواستاتین A (Trichostatin A)، یک آنتی‌بیوتیک ضد قارچ است که از باکتری *Streptomyces hygroscopicus* استخراج می‌شود و فعالیت دی‌استیلاسیون هیستون‌ها را مهار می‌کند. استفاده از مهارکننده‌های هیستون‌داستیلاز به‌صورت کنترل شیمیایی، سبب بهبود راندمان کشت‌بافت می‌شود. تیمار با TSA موجب تغییر در میزان استیلاسیون هیستون و تجمع مولکول‌های هیستون استیل‌شده در سلول‌ها می‌شود. محققان بسیاری گزارش کرده‌اند که استفاده از تیمار TSA در حیوانات و گیاهان تأثیر قابل‌توجهی بر بیان ژن دارد (Görisch et al., 2005; Chang and Pikaard, 2005; Inoue et al., 2015). چونگ و همکاران (Jeong et al., 2024) به بررسی نقش تریکواستاتین A در تحریک باززایی جوانه از کالوس گیاه آراییدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) پرداختند. نتایج تحقیق این محققین نشان داد که تریکواستاتین A به‌طور قابل‌توجهی کارایی باززایی جوانه را بهبود می‌بخشد. همچنین مطالعات اخیر در زمینه ماده تریکواستاتین A، که به‌عنوان یک مهارکننده آنزیم هیستون‌داستیلاز عمل می‌کند، نشان‌دهنده نقش بالقوه آن در تولید گیاهان هاپلوئید است. در سال ۲۰۱۴، لی و همکاران (Li et al., 2014) در پژوهشی بر روی گیاه

در بسیاری از گیاهان، تولید هاپلوئید مضاعف (Doubled Haploid: DH) از طریق روش‌های درون‌شیشه‌ای از قبیل کشت بساک یا میکروسپور انجام می‌شود (Azizian Mosleh et al., 2023). با این حال، پاسخ ضعیف به کشت‌بافت و ویژگی‌های ژنوتیپی دو محدودیت اصلی در پیشبرد این تکنیک‌ها محسوب می‌شود؛ به‌ویژه، سرکوب ژن‌هایی که برای مورفوژن سلولی ضروری هستند از طریق استیلاسیون هیستون‌ها ممکن است نقش مهمی در این فرآیند ایفا کنند. گیاه کاملینای زراعی با نام علمی *Camelina sativa* که یک گیاه روغنی دولپه‌ای و یک‌ساله از خانواده شب‌بوئیان (Brassicaceae) است. دانه کاملینا سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، به‌ویژه اسید آلفا-لینولنیک از خانواده امگا-۳ است که برای سلامت انسان و حیوان ضروری است (Han et al., 2022; Arshad et al., 2022). این گیاه مقاومت قابل‌توجهی در برابر خشکی و شرایط کم‌آبی از خود نشان می‌دهد و می‌تواند در خاک‌های حاشیه‌ای و با حداقل نهاده‌ها کشت شود، که این امر آن را به محصولی ایده‌آل برای سیستم‌های کشاورزی پایدار تبدیل می‌کند (Ahmad et al., 2022). تحقیقات اخیر نیز بر پتانسیل گیاه کاملینا در مهندسی متابولیک برای تولید روغن‌های خاص با ارزش افزوده بالا تأکید دارند (Fallah et al., 2020; Yuan and Li, 2020). کاربردهای صنعتی کاملینا نیز فراتر از مصارف خوراکی است و شامل تولید سوخت‌های زیستی (بیودیزل)، روان‌کننده‌های زیستی، و مواد اولیه شیمیایی سبز می‌شود که همگی به کاهش وابستگی به منابع فسیلی و توسعه اقتصاد سبز کمک شایانی می‌کنند (Arshad et al., 2022). بررسی‌های ژنتیکی جدید در حال روشن ساختن ساختار ژنومی کاملینا و باز کردن مسیرهای جدید برای بهبود ارقام آن از طریق هیبریداسیون بین‌گونه‌ای و هاپلوئید مضاعف هستند (Chaudhary et al., 2020; Blume et al., 2023; Kagale et al., 2012). البته علی‌رغم موفقیت‌های قابل‌توجه در استفاده از فناوری هاپلوئید مضاعف، همچنان چالش‌هایی وجود دارد. این چالش‌ها شامل مشکلات رویان‌زایی میکروسپور، مانند میزان باززایی پایین با وابستگی شدید به ژنوتیپ، مشکلات دیپلوئیداسیون ناقص و ناکافی و هزینه‌های بالای باززایی

کذا، تأثیر تریکواستاتین A را بر روی میکروسپورها بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که این ماده می‌تواند مسیر رشد سلولی را تغییر دهد و به جای تولید گرده، رویان‌زایی را در میکروسپور القا کند.

از جمله ژن‌های مرتبط با رویان‌زایی که اهداف TSA می‌باشند می‌توان به ژن‌های *LECI* (*LEAFY*)، *AGL15*، *BBM* (*BABY BOOM*)، *COTYLEDON1*، *AGAMOUS LIKE15* (*AGAMOUS LIKE15*) و *WUSCHEL* (*WUSCHEL*) اشاره کرد. این ژن‌ها تنظیم‌کننده فرآیند رویان‌زایی گامتیک هستند و افزایش بیان آن‌ها موجب بالا رفتن کارایی رویان‌زایی می‌شود (*Tsuwamoto et al., 2010; Wang et al., 2009; Boutilier et al., 2002*). همچنین، تحقیقات نشان داده است که استیل‌سیون هیستون با ساختار کروماتین و فعال‌سازی ژن مرتبط است (*Feng and Michaels, 2015*). بر این اساس، TSA می‌تواند با القای تمایز سلولی و آپوپتوز، رونویسی ژن را تعدیل کند (*Marks et al., 2000*). به دلیل نقش TSA در القای تمایز سلولی و مورفولوژی معکوس سلولی، این آنتی‌بیوتیک و دیگر مهارکننده‌های استیل‌ترانسفراز می‌توانند در پروتکل‌های القایی برای رویان‌زایی هاپلوئید مورد استفاده قرار گیرند.

پژوهش حاضر با هدف بررسی بیان برخی از ژن‌های مسئول رویان‌زایی شامل *LECI*، *BBM*، *AGL15*، *WUS* و *SERK* و ژن‌های هیستون‌داستیلاز شامل *HDAC6* و *HDAC19* در کشت بساک گیاه کاملینا تحت تأثیر تریکواستاتین A انجام شد و ارتباط پاسخ‌های آندروژنیک با بیان ژن‌های درگیر در رویان‌زایی گامتی و داستیلاسیون هیستون‌ها در گیاه مذکور ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

اعمال پیش تیمار بذور با TSA و کشت گیاه: به منظور پیش تیمار بذور گیاه کاملینا با ماده تریکواستاتین A، ابتدا محلول مادری ۴ میلی‌مولاری از این ماده از طریق حل کردن یک میلی‌گرم از TSA (شرکت Cell Signaling) در ۸۲۶ میکرولیتر DMSO به دست آمد و با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانده شد.

در این مطالعه از بذور گیاه کاملینا رقم سهیل استفاده شد. این رقم به عنوان یک گیاه مقاوم به خشکی و سرما شناخته شده و

مقاومت بالایی نیز نسبت به آفات دارد. پس از شستشوی سطحی بذور با آب مقطر، در ظروف پتری دیش حاوی غلظت‌های مختلف محلول TSA شامل صفر (شاهد، محلول DMSO)، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومول به مدت ۴۸ ساعت در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار داده شدند. سپس بذور تیمار شده در گلدان‌هایی با قطر ۲۵ سانتی-متر و ارتفاع ۲۸ سانتی‌متر که حاوی سه قسمت خاک مزرعه و ماسه و کود دامی پوسیده بود، در عمق ۱ تا ۲ سانتی‌متری کاشته و در اتاقک رشد گیاهی گروه اصلاح نباتات دانشگاه بوعلی سینا، با دوره نوری ۸/۱۶ (روز/شب) و دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و دمای ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد در شب نگهداری شدند. در داخل هر گلدان ۴ تا ۶ عدد بذور کشت گردید. دو هفته پس از سبز شدن بذور و اطمینان از رشد مطلوب گیاه، در هر گلدان ۴ بوته حفظ و بقیه حذف شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. هر گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان‌ها بنا به طول روز و میزان رشد گیاه هر ۲ روز یکبار انجام گرفت.

کشت بساک کاملینا در شرایط درون‌شیشه‌ای: به منظور بررسی اثر TSA بر روی پاسخ آندروژنی و بیان ژن‌های مسئول رویان‌زایی و هیستون داستیلاز گیاه کاملینا از طریق کشت بساک، حدود ۶۰-۵۰ روز پس از کشت بذور تیمار شده، غنچه‌های مناسب برداشت شدند. در این تحقیق، تعیین مرحله رشد و نمودی مناسب میکروسپورها برای کشت بساک توسط رنگ‌آمیزی به روش استوکارمن ۲ درصد و سپس استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر انجام شد. غنچه‌های مورد نظر با استفاده از محلول هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه ۵ دقیقه‌ای در ظروف حاوی آب مقطر استریل سرد شستشو شدند. پس از آن ریزنمونه‌های بساک زیر هود لامینار در شرایط استریل از گلچه‌ها جدا شده و در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت تشکیل شده از نمک‌های محیط B₅ (*Gamborg et al., 1968*) به همراه ویتامین‌های مربوط به محیط کشت NLN (*Fletcher et al., 1998*) حاوی مقادیر ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً

نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۷) طراحی شده بودند، استفاده گردید. همچنین آغازگر ژن خانه‌دار *RUB* نیز به‌عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

واکنش Real-time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر طبق شیوه‌نامه کیت Sina Green HS-qPCR Mix, 5X (no ROX) (سیناکلون، ایران) انجام شد. چرخه زمانی-حرارتی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر، با توجه به توالی آغازگر و اندازه محصول حاصل از تکثیر تعیین شد. به این ترتیب که در یک چرخه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲ دقیقه، جهت فعال‌سازی اولیه آنزیم استفاده شد. سپس ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت‌سازی، ۲۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر آغازگر (۵۹-۵۷ درجه سانتی‌گراد) جهت اتصال آغازگر به رشته الگو و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر محصول انجام گردید. در این پژوهش برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها از دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار فنی استفاده و بیان نسبی ژن‌ها به کمک روش $2^{-\Delta Ct}$ (ژن مرجع Ct - ژن مورد نظر $\Delta Ct = Ct$) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). تجزیه واریانس داده‌ها با روش ANOVA یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS (نسخه ۱۶) و MINITAB (نسخه ۱۴) پس از آزمون فرض نرمال بودن توزیع باقی‌مانده داده‌ها انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر به‌منظور القاء آندروژنز در گیاه کاملینا، غنچه‌های حدود ۲ میلی‌متری (شکل ۱A) که بساک‌های آن‌ها حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ای میانی و انتهایی (شکل ۱B) برداشت و کشت شدند. بساک‌های کشت شده پس از گذشت ۱۴ تا ۱۸ روز، کالوس‌زایی را آغاز کردند (شکل ۱C) و تقریباً ۳ هفته پس از القای کالوس، ساختارهای رویان مانند بر روی کالوس‌های رویان‌زا القا شد (شکل ۱D). هر ۲۵ الی ۳۰ روز کالوس‌های رویان‌زا در محیط‌کشت باززایی B₅ بدون هورمون واکنش شدند و رویان‌های القاء شده به‌تدریج به رویان‌های بالغ تبدیل گردیدند (شکل ۱E).

تصادفی در سه تکرار انجام شد که هر تکرار شامل یک پتری‌دیش حاوی ۲۰ عدد بساک بود. سپس پتری‌های حاوی بساک‌های کشت شده به اتفاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و ۸ ساعت تاریکی با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد منتقل شدند.

ارزیابی پاسخ آندروژنیک گیاه کاملینا به پیش‌تیمار بذور با TSA: برای بررسی پاسخ آندروژنیک گیاه کاملینا به پیش‌تیمار بذور با TSA، دو صفت درصد کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور محاسبه درصد کالوس‌زایی، در هر تکرار، تعداد کالوس‌های القا شده بر تعداد بساک‌های کشت شده تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد و نتایج به‌صورت درصد کالوس‌زایی بیان گردید. به‌منظور محاسبه میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک نیز تعداد رویان هر تکرار شمارش و بر تعداد بساک‌های آن تکرار تقسیم گردید (Ferrie and Caswell, 2011; Custers, 2003).

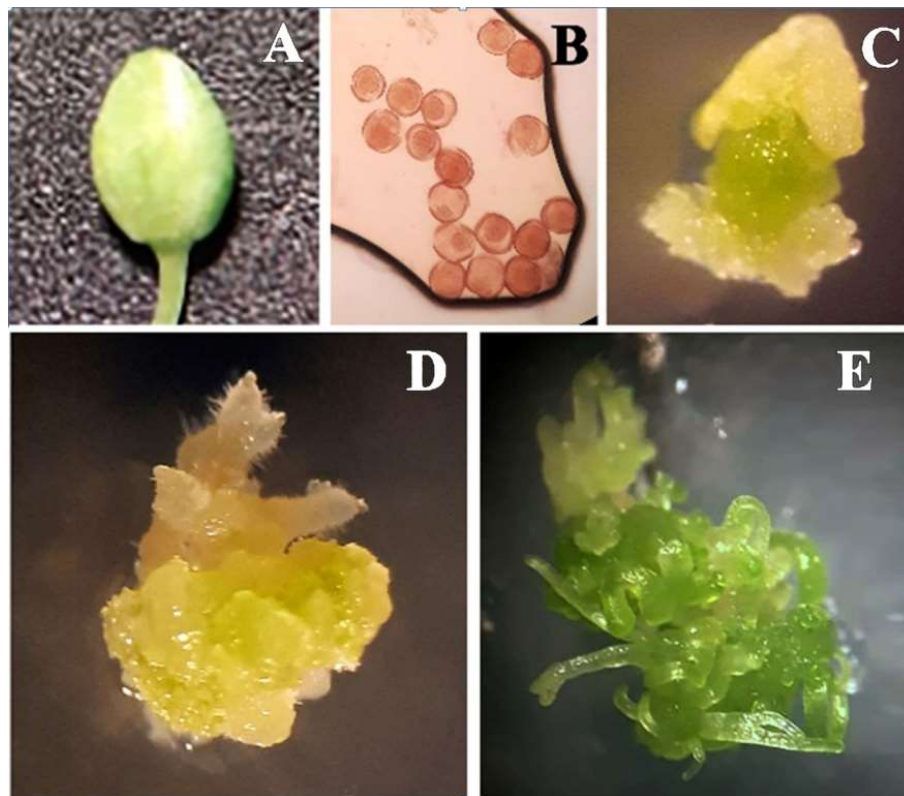
استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مسئول رویان‌زایی و ژن‌های هیستون‌داستیلاز در گیاه کاملینا تحت تأثیر تریکواستاتین A، سه هفته پس از القای کالوس، کالوس‌های رویان‌زا حاوی رویان‌های کروی برای آزمایش‌های استخراج و ارزیابی بیان ژن برداشت شدند و در نیتروژن مایع قرار گرفتند. برای استخراج RNA از ریزنمونه-های پودر شده در نیتروژن مایع از کیت RNX Plus مطابق شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سیناکلون استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و الکتروفورز-ژل آگارز یک درصد بررسی شد. جهت خالص سازی RNA و حذف آلودگی‌های ژنومی، RNAهای استخراج شده با استفاده از آنزیم *DNase I* تیمار شدند. ساخت cDNA به کمک کیت سنتز cDNA (شرکت سیناکلون) مطابق شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد و کمیت و کیفیت آن نیز با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آغازگر و واکنش Real-time PCR: به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *WUS*, *AGL15*, *BBM*, *LEC1* و *SERK* و ژن‌های هیستون‌داستیلاز شامل *HDAC6* و *HDAC19* با روش Real-time PCR از آغازگرهای اختصاصی که با استفاده از

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-time PCR

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in real-time PCR reactions

ژن	شماره دستیابی	توالی آغازگر	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
Gene	Accession number	Primer sequence	Annealing temperature (°C)
RUB	(Chao <i>et al.</i> 2019)	F: 5' CGCGTTCCTTTCGAGCATTAA3' R: 5' AACAAGGCAAGTAAGACGCG3'	57.30
WUS	LOC104747625	F: 5' GTGGTGGCGATGCTTATCTG3' R: 5' CATGACAATCACGACCGTCC3'	59.35
SERK	LOC104712757	F: 5' GCGACGAAGAAAGCCACTAG3' R: 5' CCACCTCTCCCCAGAATGTT 3'	59.35
AGL15	LOC104705639	F: 5' GAAGCTTTCTCCCGTCGTTCC3' R: 5' CTGTCGTCCAAGCATCCATG3'	59.35
BBM	LOC104770045	F: 5' CCGTTTGTGGGAATGTCGTT3' R: 5' TGGTTTCTTGC GTTGTAGGC3'	57.30
LEC1	LOC104740895	F: 5' ATCAGCTACCCAGACCCAAC3' R: 5' GTTCTTGTCACTGGTGCCAC3'	59.35
HDAC6	LOC104726917	F: 5' TGTGGGGCTGACTCCTTAAG3' R: 5' ACCACCCAAGACCATGAGAG3'	59.35
HDAC19	LOC104720725	F: 5' CCAGCAAGATCAGATTCGCC3' R: 5' TTGACAGAGCCACCAACAGA3'	57.30



شکل ۱- مراحل رویان زایی گامتی در کشت بساک گیاه کاملینا. A: غنچه حدود ۲ میلیمتری مناسب برای برداشت در کشت بساک، B: میکروسپورهای مناسب کشت بساک در مرحله تک هسته ای میانی تا تک هسته ای انتهایی، C: القاء رویان در بساک‌های کشت شده، D: القاء رویان بر روی کالوسهای رویان‌زا، E: انبوه رویان‌های القاء شده در مراحل مختلف رشد نموی تحت تیمار تریکواستاتین A که برخی از آنها شروع به باززایی نموده اند.

Figure 1. Stages of gametophytic embryogenesis in anther culture of *Camelina*. A: Floral bud approximately 2 mm in length, suitable for anther isolation and culture; B: Microspores at the mid to late uninucleate stage, appropriate for anther culture; C: Embryo induction in cultured anthers; D: Initiation of embryogenesis on embryogenic calli; E: Proliferation of induced embryos at various developmental stages under Trichostatin A treatment, with some initiating regeneration.

را در میکروسپوره‌های کشت شده کلزا بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، تحقیقات آن‌ها نشان داد که تیمار با TSA باعث گذار از گامتوفیت‌های نر به رویان‌زایی در گیاه آراییدوپسیس می‌شود. **بررسی اثر پیش‌تیمار بذور کاملینا با TSA بر سطوح بیان ژن‌های مسئول رویان‌زایی و هیستون‌داستیلاز:** تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن‌های *BBM*، *LECI*، *AGL15*، *WUS* و *SERK* و ژن‌های هیستون‌داستیلاز شامل *HDAC6* و *HDAC19* در گیاه کاملینا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تریکواستاتین نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر میزان بیان نسبی ژن‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ وجود دارد (جدول ۴).

بیان نسبی ژن‌های مسئول رویان‌زایی: نتایج حاصل از مقایسه میانگین بیان نسبی ژن‌های مسئول رویان‌زایی در تیمارهای مختلف TSA نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن‌های *LECI*، *WUS* و *SERK* مربوط به تیمارهای ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA و بالاترین میزان بیان ژن‌های *BBM* و *AGL15* مربوط به کاربرد تیمار ۱ میکرومول TSA می‌باشد (شکل ۲). با افزایش غلظت TSA به ۲ میکرومولار میزان بیان ژن‌های مسئول رویان‌زایی به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. بالاترین میزان بیان رونوشت ژن *LECI* در پیش‌تیمار بذور کاملینا با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA (به‌ترتیب ۱۵۴/۶۹ و ۱۳۹/۸۱) مشاهده شد. تیمار ۰/۲ میکرومول از نظر میزان بیان ژن *LECI* تفاوت آماری معنی‌داری با شاهد نشان نداد اما کاربرد غلظت ۲ میکرومول TSA برای پیش‌تیمار بذور، میزان بیان نسبی این ژن را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین اثر TSA بر بیان ژن *WUS* نیز نشان داد که بیشترین میزان بیان نسبی این ژن مربوط به کاربرد غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA (به‌ترتیب ۱۵/۸۸ و ۱۲/۷۱) برای پیش‌تیمار بذور کاملینا است. کاربرد تیمارهای ۰/۲ و ۲ میکرومول TSA نیز میزان بیان نسبی ژن *WUS* را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۲).

بیشترین میزان بیان نسبی ژن *SERK* نیز از کاربرد تیمارهای ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA (به‌ترتیب ۱۰۰/۱۶ و ۱۰۵/۴۴) به‌دست آمد. استفاده از سایر تیمارها بیان ژن

بررسی اثر پیش‌تیمار بذور با TSA بر پاسخ آندروژنیک گیاه کاملینا: نتایج تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار بذور با TSA بر صفات مورد بررسی در کشت بساک گیاه کاملینا (جدول ۲) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری بین غلظت‌های مختلف TSA برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. سطوح مختلف پیش‌تیمار TSA برای صفت درصد کالوس‌زایی اختلاف آماری معنی‌دار نشان ندادند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک مربوط به کاربرد تیمارهای ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA بود (به‌ترتیب ۰/۴۲ و ۰/۴۸).

نتایج مطالعه ما نشان داد که پیش‌تیمار بذور با اصلاح‌کننده‌های کروماتین، مانند TSA، پاسخ‌های رویان‌زایی را در کشت بساک *C. sativa* به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌دهد. به‌طور خاص، TSA پتانسیل امیدوارکننده‌ای را به عنوان یک ابزار اپی‌ژنتیکی جدید و مؤثر برای افزایش پاسخ‌های آندروژنی در کاملینا نشان داد. مطالعات مختلفی نیز نشان می‌دهند که تیمار با TSA پاسخ‌های آندروژنی را در گونه‌های مختلف گیاهی غلات، دولپه‌ها و مخروطی‌ها افزایش می‌دهد (Abrahamsson et al., 2017; Wang et al., 2019; Martinez et al., 2021). نتایج پژوهش‌های بی و همکاران (Bie et al., 2020) در گیاه گندم نشان داد که کاربرد ۰/۵ میکرومول TSA به‌طور قابل‌توجهی میزان القای کالوس-های رویان‌زا در گندم را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌دهد. آبراهامسون و همکاران (Abrahamsson et al., 2017) نیز نشان دادند که تیمار با TSA، تشکیل رویان‌های سوماتیکی را در جوانه‌های *Picea* و *Pinus*، که به‌طور طبیعی پتانسیل رویان‌زایی پایینی دارند، تسهیل می‌کند. TSA همچنین برای افزایش کارایی رویان‌زایی گامتی در گندم (Jiang et al., 2017; Wang et al., 2019)، آراییدوپسیس و کلزا (Li et al., 2014) استفاده شده است. لی و همکاران (Li et al., 2014) افزایش قابل‌توجهی را در میزان رویان‌زایی در سیستم‌های گیاهی مختلف پس از تیمار با تریکواستاتین A گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که TSA فعالیت هیستون‌داستیلاز را مهار می‌کند و در نتیجه رویان‌زایی گامتی

حالی که کاربرد این تیمار میزان بیان ژن *BBM* را نسبت به شاهد افزایش نداد. پیش تیمار بذور کاملینا با سایر غلظت-های تریکواستاتین (۰/۲ و ۲ میکرومول) نیز سبب کاهش قابل توجهی در میزان بیان هر دو ژن *BBM* و *AGL15* گردید به طوری که تفاوت آماری معنی داری با گیاهان شاهد نشان ندادند (شکل ۲).

SERK را کاهش داد و از نظر آماری اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۲). بالاترین میزان بیان رونوشت ژن های *BBM* (۲۴۰/۶۱) و *AGL15* (۵۰/۴۴) در گیاهان تحت تیمار با ۱ میکرومول TSA مشاهده شد. کاربرد تیمار ۰/۵ میکرومول TSA افزایش معنی داری از لحاظ میزان بیان ژن *AGL15* نسبت به شاهد ایجاد کرد در

جدول ۲ - تجزیه واریانس اثر غلظت های مختلف TSA بر صفات درصد کالوس زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک

Table 2. Analysis of variance for the effect of different TSA concentrations on the percentage of anthers producing calli and the mean number of embryos obtained per anther

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Means of square	
		درصد کالوس زایی The percentage of anthers producing calli	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک The mean number of embryos obtained per anther
تیمار تریکواستاتین A TSA treatment	4	193.333 ^{ns}	0.044*
خطای آزمایشی Error	10	115.000	0.009
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		15.61	29.05

* و ^{ns}: به ترتیب اختلاف آماری معنی دار در سطح ۰/۰۵ و عدم اختلاف آماری معنی دار را نشان می دهند.

* and ^{ns}: Show significant differences at 0.05 and non-significant levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت های مختلف تریکواستاتین بر صفات آندروژنز در کشت بساک کاملینا

Table 3. Mean comparison of the effect of different TSA concentrations on androgenic traits in *Camelina* anther culture

TSA treatment	بساک های کشت شده Cultured anthers	درصد کالوس زایی Percentage of anthers producing calli	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos obtained per anther
شاهد (Control)	60	73.33a	0.25bc
0.2 μM	60	68.33a	0.18c
0.5 μM	60	75.00a	0.42ab
1 μM	60	71.67a	0.48a
2 μM	60	55.00a	0.30bc

میانگین هایی که دارای حروف متفاوت هستند، در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن دارای تفاوت معنی دار می باشند.
Means denoted by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at the 0.05 probability level

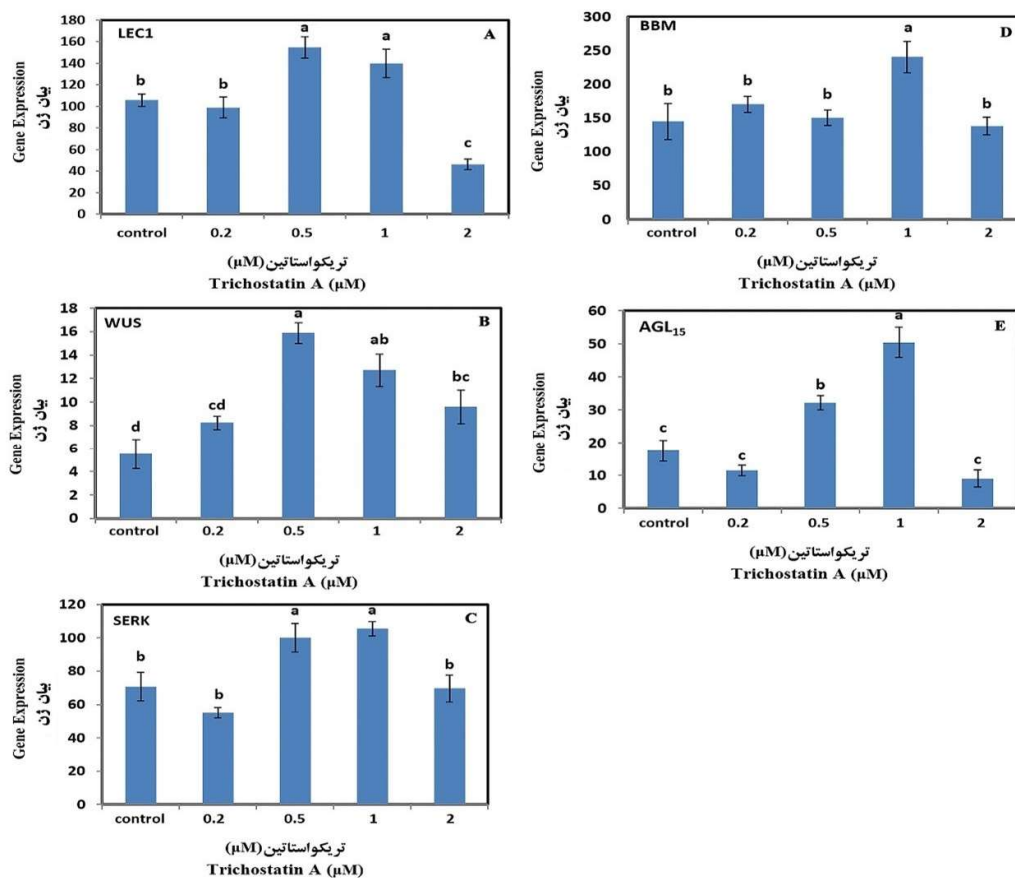
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف TSA بر بیان نسبی ژن‌های درگیر در رویان زایی و هیستون‌داستیلاز در کشت بساک گیاه کاملینا

Table 4. Analysis of variance for the effect of different TSA pretreatments on relative expression of genes associated with embryogenesis and encoding histone deacetylases in camelina anther culture

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Means of square						
		LEC ₁	BBM	AGL ₁₅	WUS	SERK	HDAC ₆	HDAC ₁₉
تیمار تریکواستاتین TSA treatment	4	7097.2**	6982.21**	1189.18**	64.46**	1866.8**	1.91**	18.24**
خطای آزمایشی Error	15	334.43	1351.81	35.91	5.78	179.35	0.13	1.4
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		16.77	21.75	24.84	23.16	16.69	22.41	23.24

** اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ را نشان می‌دهند.

** : Shows a statistically significant difference at the 0.01 level.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف تریکواستاتین A بر بیان پنج ژن مرتبط با رویان‌زایی، شامل A: LEC₁, B: SERK, C: BBM, D: WUS و E: AGL₁₅

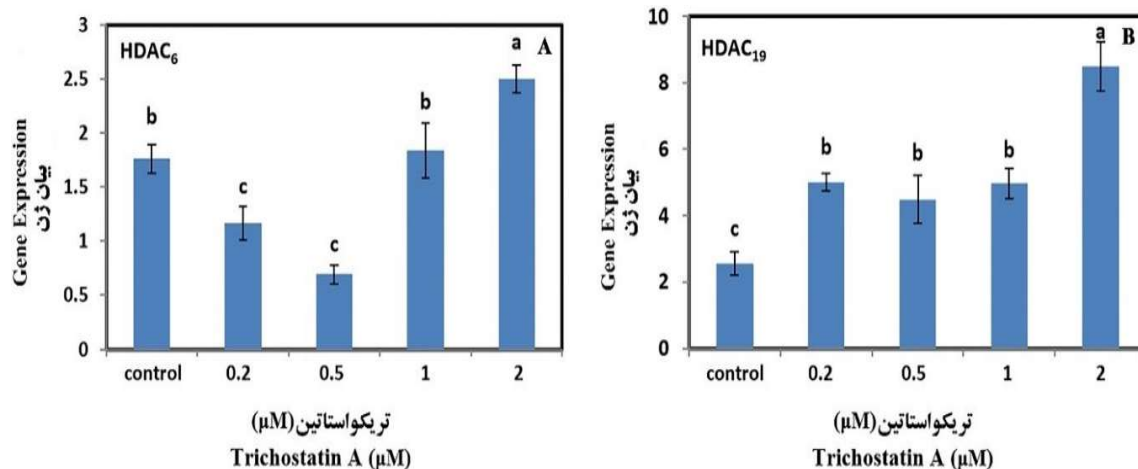
میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

Figure 2. Effect of different concentrations of Trichostatin A (TSA) on the gene expression of five genes of embryogenesis-related, including A: LEC₁, B: WUS, C: SERK, D: BBM, E: AGL₁₅. Means denoted by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at the 0.05 probability level

در این مطالعه نشان داده شد که TSA به عنوان تعدیل کننده اپی ژنتیکی، بیان ژن های کلیدی دخیل در القای رویان زایی از جمله *BBM*، *WUS*، *AGL15*، *SERK* و *LECI* را افزایش می دهد. این یافته نشان می دهد که هایپراستیلایسیون هیستون ناشی از TSA می تواند یک پاسخ مولکولی را تحریک کند که در نهایت منجر به افزایش بیان ژن های مسئول رویان زایی در گیاه کاملینا می گردد. مطابق با نتایج این مطالعه، لی و همکاران (Li et al., 2014) در تحقیقات خود به افزایش بیان ژن های *LEC1*، *LEC2* و *BBM* تحت تأثیر تیمار TSA در کشت میکروسپور کلزا اشاره کرده اند که نشان دهنده پتانسیل TSA در فعال سازی بیان ژن های مرتبط با رویان زایی است. نتایج بررسی های تاناکا و همکاران (Tanaka et al., 2008) نیز نشان داد که بیان ژن *LECI* در گیاهچه های آراییدوپسیس تیمار شده با TSA افزایش یافته است. این محققان همچنین مشاهده کردند که TSA می تواند جوانه زنی بذر آراییدوپسیس را مهار کند. مطالعه مارتینز و همکاران (Martinez et al., 2021) نشان داد که تیمار ریزنمونه های انگور با ۰/۵ میلی مولار NaB، مهار کننده هیستون داستیلایز مشابه TSA، بیان ژن های *BBM* و *SERK* را به طور معنی داری افزایش می دهد. پژوهشی که توسط چوی و همکاران (Choi et al., 2023) با هدف بررسی اثر TSA بر کشت پروتوپلاست گیاه *Nicotiana benthamiana* انجام شد، نشان داد که تریکواستاتین A می تواند بیان ژن های تنظیم کننده چرخه سلولی و ژن *WUSCHEL* (*WUS*) را در کشت پروتوپلاست *N. benthamiana* افزایش دهد. زو و همکاران (Zuo et al., 2002) نیز نقش ژن *WUS* را در القای رویان زایی گیاه آراییدوپسیس بررسی کردند و گزارش دادند که *WUS* با تسهیل گذار رویشی به رویان زایی، کارایی رویان زایی را در *Arabidopsis thaliana* افزایش می دهد. در مطالعه ای دیگر، القای رویان زایی سوماتیکی توسط TSA در گیاه آراییدوپسیس نشان داد که TSA بر سطح بیان چندین ژن کدکننده فاکتورهای رونویسی، از جمله *LEC2*، *LEC1*

BBM و ژن پاسخ به تنش *MYB118*، اثر گذاشته و بیان این ژن ها را در ریزنمونه های تیمار شده با TSA افزایش داده است (Wójcikowska et al., 2018). علاوه بر این، نوآک و همکاران (Nowak et al., 2024) تحقیقات مشابهی را در کشت های جو، صرف نظر از ژنوتیپ، انجام دادند. این محققان نشان دادند که تیمار TSA در کشت های درون شیشه ای جو منجر به افزایش قابل توجهی در سطح رونوشت ژن های فاکتور رونویسی، به ویژه *LEC1* و *BBM* می گردد.

بیان نسبی ژن های هیستون داستیلایز: مقایسه بیان نسبی ژن های کدکننده هیستون داستیلایز در تیمارهای مختلف TSA نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن های *HDAC6* و *HDAC19* از کاربرد ۲ میکرومول TSA برای پیش تیمار بذر گیاه کاملینا به دست آمد (به ترتیب ۲/۵ و ۸/۴۹) (شکل ۳). پیش تیمار بذر کاملینا با غلظت های ۰/۲ و ۰/۵ میکرومول TSA سبب کاهش میزان بیان نسبی ژن *HDAC6* نسبت به تیمار شاهد گردید. در میزان بیان رونوشت ژن *HDAC19* بین تیمارهای ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میکرومول TSA تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد، اما همه تیمارهای مذکور سبب افزایش بیان ژن *HDAC19* نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۳). مورونچیک و همکاران (Moronczyk et al., 2022) تأثیر تیمار TSA را بر رویان های زیگوتی نابالغ (IZE) گیاه آراییدوپسیس بررسی کردند. آن ها با استفاده از آنالیز RNA-Seq، کشت های القاء شده با TSA را با کشت های شاهد مقایسه کردند. نتایج نشان داد که تیمار TSA منجر به افزایش قابل توجهی در بیان اکثر ژن های هیستون داستیلایز می شود. به طور خاص، کاربرد غلظت ۲ میکرومولار TSA، پاسخ رویان زایی قوی در ریزنمونه های IZE ایجاد کرد. در کشت القاشده با TSA، بیان هم زمان ژن های *HDAC6* و *HDAC19* در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. مطالعات نوآک و همکاران (Nowak et al., 2024) نیز نشان داد که تیمار TSA، سطح بیان ژن های *HDAC6* و *HDAC19* را در کشت درون شیشه ای گیاه جو افزایش می دهد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف تریکوستاتین A بر بیان ژن‌های هیستون‌داستیلاز، شامل A: *HDAC6* و B: *HDAC19*.

میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

Figure 3. Effect of different concentrations of Trichostatin A (TSA) on the gene expression of genes of HDAC-encoding, including A: *HDAC6* and B: *HDAC19*. Means denoted by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at the 0.05 probability level.

آن؛ بنابراین همان‌گونه که نشان داده شد، پیش‌تیمار بذور گیاه کاملینا با ۲ میکرومول تریکوستاتین A سبب افزایش بیان ژن‌های هیستون‌داستیلاز می‌گردد. در پژوهش حاضر، ما نشان دادیم که پیش‌تیمار بذور گیاه *Camelina sativa* L. با تریکوستاتین A به‌عنوان مهارکننده هیستون‌داستیلاز، به‌طور قابل‌توجهی پاسخ‌های رویان‌زایی را در کشت بساک بهبود می‌بخشد. این یافته به وضوح نشان‌دهنده پتانسیل بالای TSA به‌عنوان یک اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیک در افزایش کارایی آندروژنز در این گونه زراعی است. نتایج نشان دادند که تیمار با TSA، بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با رویان‌زایی و همچنین ژن‌های هیستون‌داستیلاز را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد. این افزایش بیان ژن‌ها، که احتمالاً ناشی از تغییرات در وضعیت کروماتین و دسترسی به DNA است، نقش مهم تنظیمات اپی‌ژنتیکی در فرآیند رویان‌زایی و امکان به‌کارگیری آن‌ها در بهبود کشت‌های درون‌شیشه‌ای را نشان می‌دهد.

نتایج مشابهی در مورد افزایش بیان *HDAC19* در آراییدوپسیس (Moronczyk *et al.*, 2022)، HDAC در انگور (Martinez *et al.*, 2021) و گندم (Valero-Rubira *et al.*, 2023) تحت تأثیر تیمار TSA مشاهده شده‌است. مهار شدن هیستون‌داستیلازها توسط TSA، استیلاسیون لیزین را افزایش می‌دهد و در نتیجه بارهای مثبت هیستون را خنثی کرده و برهمکنش‌های هیستون-DNA را کاهش می‌دهد. این فرآیند ساختار کروماتین را سست می‌کند و دسترسی به توالی‌های DNA را توسط فاکتورهای رونویسی و RNA پلیمراز تسهیل می‌کند و در نهایت منجر به افزایش بیان ژن می‌شود (Bannister and Kouzarides, 2011). بررسی‌های ما نشان داد که TSA بیان ژن‌های *HDAC6* و *HDAC19* را در غلظت‌های بالاتر افزایش می‌دهد. این پدیده را می‌توان به توانایی TSA در افزایش باز شدن ساختار کروماتین نسبت داد. این یافته‌ها، همراه با تحقیقات قبلی، نشان می‌دهد که TSA اثر مهار کنندگی بر فعالیت آنزیم هیستون‌داستیلاز دارد، نه بر ژن‌های دخیل در کدگذاری

References

- Abrahamsson, M., Valladares, S., Merino, I., Larsson, E. and von Arnold, S. (2017). Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 53: 86–96. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9797-y>
- Ahmad, M., Waraich, E.A., Hafeez, M.B., Zulfiqar, U., Ahmad, Z. and Iqbal, M.A. (2022). Changing Climate Scenario: Perspectives of *Camelina sativa* as Low-Input Biofuel and Oilseed Crop. In: Ahmed, M., Ed., *Global Agricultural Production: Resilience to Climate Change*, pp. 197–236. Springer Cham, Gewerbestrasse, CH. https://doi.org/10.1007/978-3-031-14973-3_7
- Arshad, M.K., Mohanty, A., Acker, R.V., Riddle, R., Todd, J. and Khalil, H. (2022). Valorization of camelina oil to biobased materials and biofuels for new industrial uses: A review. *Royal Society of Chemistry Advances*, 12(43): 27230–27245. <https://doi.org/10.1039/D2RA03253H>
- Azizian Mosleh, R., Abdollahi, M.R., Sarikhani, H., Mirzaie-Asl, A. and Pour Mohammadi, P. (2021) Study of the effect of 5-Azacytidine as a DNA demethylating agent on agronomic traits, androgenesis induction via anther culture and DNA-methyltransferase gene expression in maize (*Zea mays* L.) leaf tissue. *Plant Genetic Research*, 7(2): 119-134 (In Persian). <https://doi.org/10.52547/pgr.7.2.10>
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3): 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bie, X.M., Dong, L. and Li, X.H. (2020). Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. *Plant Signaling and Behavior*, 15:1820681. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1820681>
- Blume, R.Y., Kalendar, R., Guo, L., Cahoon, E.B. and Blume, Y.B. (2023). Overcoming genetic paucity of *camelina sativa*: possibilities for interspecific hybridization conditioned by the genus evolution pathway. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1259431. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1259431>
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C. M., Van Lammeren, A.A.M. and Miki, B.L.A. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14: 1737–1749. <https://doi.org/10.1105/tpc.001941>
- Chang, S. and Pikaard, C.S. (2005). Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 796–804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409053200>
- Chaudhary, R., Koh, C.S., Kagale, S., Tang, L., Wu, S.W. and Lv, Z. (2020). Assessing Diversity in the Camelina Genus Provides Insights into the Genome Structure of *Camelina sativa*. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 10(4): 1297-1308. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400957>
- Chao, W., Wang, H., Horvath, D. and Anderson, J. (2019). Selection of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in *Camelina sativa* and identification of FLOWERING LOCUS C allele-specific markers to differentiate summer- and winter-biotypes. *Industrial Crops and Products*, 129:495–502. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.017>
- Choi, S.H., Ahn, W.S., Lee, M.H., Jin, D.M., Lee, A., Jie, E.Y., Ju, S.J., Ahn, S.J. and Kim, S.W. (2023) Effects of TSA, NaB, Aza in *Lactuca sativa* L. protoplasts and effect of TSA in *Nicotiana Benthamiana* protoplasts on cell division and callus formation. *PLoS ONE*, 24(2): e0279627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279627>
- Custers, J.B.M. (2003). Microspore culture in crop plants. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. and Szarejko, I. Eds., *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, pp. 185–199. Springer Dordrecht, Dordrecht, NL. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_29
- Fallah, F., Kahrizi, D., Rezaeizad, A., Zebarzadi, A. and Zarei, L. (2020). Evaluation of genetic variation and parameters of fatty acid profile in doubled haploid lines of *Camelina sativa* L.. *Plant Genetic Research*, 6(2): 79-96 (In Persian). <https://doi.org/10.29252/pgr.6.2.79>
- Feng, W. and Michaels, S.D. (2015). Accessing the inaccessible: The organization, transcription, replication, and repair of heterochromatin in plants. *Annual Review of Genetics*, 49: 439–459. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055048>

- Feng, S., Ma, C., Wang, J. and Li, Y. (2017). Histone modifications in plant abiotic stress responses. *Plant Science*, 8: 2038.
- Ferrie, A.M. 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9800-y>
- Fletcher, R. Coventry, J. and Kott, L.S. (1998). *Doubled Haploid Technology for Spring and Winter Brassica napus*. Technical Bulletin OAC Publication, CA.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Görisch, S.M., Wachsmuth, M., Toth, K.F., Lichter, P. and Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of Cell Science*, 118: 5825–5834. <https://doi.org/10.1242/jcs.02689>
- Han, L., Silvestre, S., Sayanova, O., Haslam, R.P. and Napier, J.A. (2022). Using field evaluation and systematic iteration to rationalize the accumulation of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Journal*, 20(10): 1833-1845. <https://doi.org/10.1111/pbi.13867>
- Inoue, K., Oikawa, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Nakamura, T. and Nakano, T. (2015). Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Scientific Reports*, 5: 10127. <https://doi.org/10.1038/srep10127>
- Jeong, M.J., Kim, M.H., Kim, K., Park, C. M. and Kim, J.H. (2024). Trichostatin A promotes de novo shoot regeneration from Arabidopsis callus via the cytokinin pathway. *Scientific Reports*, 14(1): 1074.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2183-3>
- Kagale, S., Warkentin, T.D. and Kagale, S. (2012). Efficient doubled haploid production in *Camelina sativa* (L.) Crantz via isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 31(1): 185-194.
- Li, H., Soriano, M., Cordewener, J.H. G., Muiño, J.M., Riksen-Bruinsma, T., Fukuoka, H., Angenent, G.C. and Boutillier, K.A. (2014). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell*, 26:195–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116491>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ method. *Methods*, 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marks, P.A., Richon, V.M. and Rifkind, R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(15):1210–1216. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.15.1210>
- Martinez, Ó., Arjones, V., González, M.V. and Rey, M. (2021) Histone deacetylase inhibitors increase the embryogenic potential and alter the expression of embryogenesis-related and hdac-encoding genes in grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. mencia). *Plants*, 10: 1164–1183. <https://doi.org/10.3390/plants10061164>
- Moronczyk, J., Braszewska, A. and Wójcikowska, B. (2022). Insights into the histone acetylation-mediated regulation of the transcription factor genes that control the embryogenic transition in the somatic cells of Arabidopsis. *Cells*, 11: 863. <https://doi.org/10.3390/cells11050863>
- Nowak, K., Wójcikowska, B., Gajecka, M., Elżbieciak, A., Morończyk, J., Wójcik, A., Żemła, P., Citerne, S., Kiwior-Wesołowska, A., Zbieszczak, J. and Gaj, M. (2024). The improvement of the in vitro plant regeneration in barley with the epigenetic modifier of histone acetylation, trichostatin A. *Plant Genetics Original Paper*, 65(1): 13-30. <https://doi.org/10.1007/s13353-023-00800-9>
- Tanaka, M., Kikuchi, A. and Kamada, H. (2008). The Arabidopsis histone deacetylases *HDA6* and *HDA19* contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiology*, 146:149–161. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111674>
- Tsuwamoto, R., Yokoi, S. and Takahata, Y. (2010). Arabidopsis EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Molecular Biology*, 73: 481–492. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9634-3>
- Valero-Rubira, I., Castillo, A.M., Burrell, M.Á. and Vallés, M.P. (2023). Microspore embryogenesis induction by mannitol and TSA results in a complex regulation of epigenetic dynamics and gene expression in bread wheat. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1058421. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1058421>
- Wang, X., Niu, Q.W. and Teng, C. (2009). Overexpression of PGA37/ MYB118 and MYB115 promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Cell Research*, 19: 224–235. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.276>

- Wang, H.M., Enns, J.L., Nelson, K.L., Brost, J.M., Orr, T.D. and Ferrie, A.M.R. (2019). Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: Evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 139: 589–599. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01704-5>
- Wójcikowska, B., Botor, M., Moronczyk, J., Wójcik, A.M., Nodzynski, 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*. 9: 1353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01353>
- Xu, L., Zhao, H., Liu, W. and Gao, F. (2017). Histone modification in plant somatic embryogenesis. *Plant Science*, 8: 1429.
- Yuan, L. and Li, R. (2020). Metabolic engineering a model oilseed *camelina sativa* for the sustainable production of high-value designed oils. *Frontiers in Plant Science*, 11: 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00011>
- Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G. and Chua, N.H. (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant Journal*, 30: 349–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01289.x>