مقاله پژوهشی

تأثیر آبسیزیک اسید، نیترات نقره و سفوتاکسیم بر روی پرآوری درون‌شیشه‌ای خیار و ارزیابی کلون‌های باززایی‌شده با نشانگر مولکولی AFLP

رسول امیریان [۱و۲]، زهره حجتی [۲*] و پژمان آزادی [۳]

[۱] بخش تحقیقات ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

[۲] بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

[۳] بخش تحقیقات کشت‌بافت گیاهی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲۸۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲۰۶)

چکیده

به‌منظور پرآوری درون‌شیشه‌ای خیار (*Cucumis sativus* L.) با روش اندام‌زایی، ریزنمونه‌های برگ‌بذری دو رقم "بت‌آلفا" و "دستگردی" استفاده شدند. در طی مراحل اندام‌زایی جهت ایجاد شاخساره، محیط‌های کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) به‌علاوه ۸ حالت ترکیبی آبسیزیک اسید (ABA) (صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، نیترات نقره (صفر و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (صفر و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ارزیابی شدند. نتایج حاصل از اندام‌زایی بیانگر تأثیر معنی‌دار ABA بر روی افزایش درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره بود. نیترات نقره تنها در محیط‌های فاقد ABA موجب افزایش معنی‌دار درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره گردید. همچنین اثر نامطلوب سفوتاکسیم مشاهده نشد و حتی در یک تیمار افزایش تعداد شاخساره‌های القایی تحت تأثیر سفوتاکسیم مشاهده گردید. جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌های جداشده بر روی پنج محیط مختلف شامل یک محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد و چهار محیط حاوی ایندول بوتیریک اسید (IBA) (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) یا نفتالن استیک اسید (NAA) (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. بیشترین تعداد ریشه در هر شاخساره در ارقام "بت‌آلفا" (۹/٤) و "دستگردی" (۸/٦) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده گردید. جهت ارزیابی پایداری ژنتیکی در بین کلون‌های حاصل، ۱۰ گیاهچه باززایی‌شده از رقم بت‌آلفا به‌صورت تصادفی انتخاب و توسط نشانگر AFLP بررسی شدند. همچنین ۱۰ گیاهچه باززایی‌شده از هر دو رقم تحت بررسی سیتوژنتیکی قرار گرفتند. با استفاده از ۹ ترکیب آغازگری نشانگر AFLP در مجموع ۲۹۳ باند تکثیر شدند که همگی یک شکل و بدون تنوع سوماکلونال بودند. شمارش کروموزومی سلول‌های مریستمی ریشه بیانگر ثبات پلوئیدی در کلون‌های حاصل بود.

واژه‌های کلیدی: القاء ریشه، اندام‌زایی، تنوع سوماکلونال، برگ‌بذری، شمارش کروموزومی

مقدمه

میوه خیار (*Cucumis sativus* L.) سهم قابل توجهی در سبد غذایی ایرانیان دارد و میزان تولید آن در سال ۲۰۱٦ در ایران ۱/۷ میلیون تن و در جهان حدود ۸۰ میلیون تن بوده است

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: z.hojati@sci.ui.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

(FAO statistics, 2018). دستورالعمل افزونش درون‌شیشه‌ای این محصول کاربرد زیادی جهت تحقیقات و بهبود آن با استفاده از مهندسی ژنتیک و کشت‌بافت دارد. القاء شاخساره در خیار تاکنون با استفاده از کشت نوک شاخساره (Vasudevan *et al.*, 2001; Venkatachalam *et al.*, 2018)، قطعات برگ (Burza and Malepszy, 1995) و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌بذری بذری (Mohiuddin *et al.*, 1997; Gambley and Dodd, 1990) گزارش شده است. با این وجود در اغلب مطالعات مربوط به مهندسی ژنتیک خیار از ریزنمونه‌های برگ‌بذری استفاده شده است (Tabei *et al.*, 1994; Vasudevan *et al.*, 2007; Nanasato *et al.*, 2013). با وجود معرفی دستورالعمل‌های متعدد، ارزیابی تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت و ژنوتیپ‌های جدید می‌تواند به بهبود فرآیند اصلاح، افزونش و مهندسی ژنتیک آن کمک نماید.

در بسیاری از مطالعات جهت اندام‌زایی و القاء شاخساره در برگ‌بذری خیار از تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت ۲-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و یا سیتوکینین‌های دیگر استفاده شده است (Gambley *et al.*, 1990; Grozeva and Velkov, 2014)، اما مطالعات متعددی در زمینه مهندسی ژنتیک خیار به کاربرد همزمان آبسیزیک اسید (ABA) باBAP جهت باززایی شاخساره از کشت برگ‌بذری اشاره نموده‌اند (Gal-On *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Nanasato *et al.*, 2013; Rajagopalan and Perl-Treves, 2005; Tabei *et al.*, 1994; Vasudevan *et al.*, 2007). در پاسخ به تنش‌های سلولی ABA به‌عنوان واسطه عمل کرده و نقش کلیدی در توسعه سلول، ساخت ذخیره بذر، آب‌گیری، خواب و جوانه‌زنی دارد و در کشت‌بافت گیاهی برای جنین‌زایی سوماتیکی، بهبود کیفیت جنین سوماتیکی، افزایش مقاومت به آب‌گیری، و جلوگیری از جوانی‌زنی زودهنگام استفاده می‌شود (Hilhorst and Karssen, 1992; Finkelstein *et al.*, 2002). در کشت‌بافت خیار از ABA جهت باززایی شاخساره (Tabei *et al.*, 1994; Vasudevan *et al.*, 2007; Nanasato *et al.*, 2013) و بلوغ جنین‌های حاصل از آندروژنز (Kumar *et al.*, 2003) استفاده شده است.

در طی فرآیند کشت‌بافت امکان تولید اتیلن وجود دارد که متعاقب آن باعث ضعف در باززایی و عدم‌پاسخ مناسب به شرایط کشت می‌شود (Chi *et al.*, 1990; Pua and Chi, 1993). اضافه‌کردن برخی ترکیبات بازدارنده سنتز و یا اتصال به گیرنده اتیلن در بهبود باززایی شاخساره و جنین مؤثر بوده است (Chi *et al.*, 1990; Purnhauser *et al.*, 1987; Roustan *et al.*, 1990). کاربرد نیترات نقره به‌عنوان بازدارنده اتیلن در افزایش کارایی القاء شاخساره و باززایی جنین حاصل از ماده‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای خیار گزارش شده است (Li *et al.*, 2013; Mohiuddin *et al.*, 1997).

سفوتاکسیم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک معمولاً برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی در کشت‌بافت گیاهی و حذف *Agrobacterium* در مراحل انتقال ژن استفاده می‌شود (Asif *et al.*, 2013). به‌علاوه، سفوتاکسیم فعالیت شبه اکسینی (auxin-like) نیز از خود نشان می‌دهد (Nauerby *et al.*, 1997) و اثرات مثبت و منفی آن در فرآیند کشت‌بافت گیاهی گزارش شده است. اضافه‌کردن سفوتاکسیم (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به محیط‌کشت کالوس گندم دوروم باعث افزایش باززایی گیاهچه شده است (Borrelli *et al.*, 1992). همچنین تیمار ریزنمونه‌ها در محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به‌مدت ٢٤ ساعت باعث بهبود جنین‌زایی در کشت میکروسپور کلزا (*Brassica napus* L.) شده است (Ahmadi *et al.*, 2014). برخلاف موارد قبل در کشت‌بافت پرتقال (*Citrus sinensis*) اضافه‌کردن ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث جلوگیری از فرآیند اندام‌زایی شده است (da Silva Mendes *et al.*, 2009).

پس از ایجاد شاخساره‌های نابجا از طریق پرآوری درون‌شیشه، ایندول بوتیریک اسید (IBA) اغلب بیشترین کارایی را در القاء ریشه‌های نابجا دارد (Baskaran *et al.*, 2009; Faisal *et al.*, 2005; Martin, 2003; Thomas and Sreejesh, 2004). ولی در برخی گونه‌ها نفتالن استیک اسید (NAA) کارایی بهتری در القاء ریشه داشته است (Alam *et al.*, 2010; Gopitha *et al.*, 2010). بنابراین، ارزیابی این دو اکسین برای تعیین بهترین تیمار جهت ریشه‌زایی در اولویت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

هستند.

تنوع سومالکونال که به تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی ایجادشده در مراحل کشت‌بافت اطلاق می‌شود یکی از چالش‌های پیش‌رو در کشت‌بافت و ریزازدیادی گیاهان است. این تغییر در برخی موارد جهت ایجاد صفات مطلوب استفاده شده است (Hwang and Ko, 2004; Slazak *et al.*, 2015) و در بیشتر موارد موجب تغییر خصوصیات گیاهچه‌های حاصل از عملیات کشت‌بافتی و ایجاد ناهمسانی ژنتیکی در گیاهان حاصل از ریزازدیادی می‌شود (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001). ثبات ژنتیکی گیاهان به‌دست آمده از پرآوری درون‌شیشه‌ای و یا تراریخت‌شده به‌عنوان یک پیش‌نیاز مهم در استفاده از روش‌های مذکور جهت کاربردهای تجاری و تحقیقاتی است (Krishna and Singh, 2013). برای ارزیابی تنوع سوماکلونال حاصل از پرآوری درون‌شیشه‌ای نشانگرهای مختلفی مانند چندشکلی قطعات DNA تکثیریافته تصادفی (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) ، توالی‌های تکراری ساده (Simple Sequence Repeats, SSR)، حدفاصل توالی‌های تکراری ساده (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR)، هدف‌گذاری کدون آغاز (Start Codon Targeted, SCot) و چندشکلی طولی قطعات تکثیرشده (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Martins *et al.*, 2004; Rathore *et al.*, 2014; Venkatachalam *et al.*, 2018; Sebastiani and Ficcadenti, 2016; Slazak *et al.*, 2015; Vroh-Bi *et al.*, 2011). همچنین جهت ارزیابی ثبات کروموزومی کلون‌ها حاصل از پرآوری درون‌شیشه‌ای ارزیابی‌های سیتوژنتیکی یا فلوسایتومتری در کنار نشانگرهای مولکولی استفاده شده است (Venkatachalam *et al.*, 2018; Viehmannova *et al.*, 2016). در بین نشانگرهای مولکولی مختلف، نشانگر AFLP به‌دلیل استفاده از مکانیسم برش آنزیمی و اتصال آداپتور بیشترین تعداد باندهای تکرارپذیر را تولید می‌کند و این امر آن را به‌عنوان گزینه مناسبی جهت ارزیابی تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای تبدیل کرده است (Aversano *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2011; Mo *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2007).

هدف از تحقیق حاضر بهینه‌سازی اندام‌زایی از ریزنمونه‌های برگ‌بذری خیار و همچنین ارزیابی اثر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بر روی کارایی آن است. بنابراین تأثیر ABA، نیترات نقره و سفوتاکسیم همراه با غلظت ثابتی از BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) بر روی القاء شاخساره از برگ‌بذری خیار مطالعه شده است. همچنین میزان افزایش کارایی ریشه‌زایی در شاخساره‌های باززایی‌شده با استفاده از اکسین‌های IBA و NAA بررسی شده است. درنهایت ثبات ژنتیکی کلون‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP و مشاهده کاریوتیپ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آماده‌سازی ریزنمونه‌ها: بذور دور رقم خیار (*Cucumis sativus* L.) شامل هیبرید F1 "بت‌آلفا" (Beth alpha) و رقم بومی "دستگردی" (Dastgerdi) از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) تهیه شدند. به‌منظور آماده‌سازی ریزنمونه‌ها، ابتدا بذور به‌مدت ۱۵ دقیقه در آب‌مقطر خیسانده شدند و سپس پوسته بذرها جدا شد. جهت استریل‌کردن، بذور بدون پوسته به‌مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ و ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه‌ور شدند. پس از سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل، بذور بر روی محیط‌کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۷/۵ گرم بر لیتر آگار کشت شدند و به‌مدت ۳ روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

کشت برگ‌بذری: جهت تهیه ریزنمونه‌ها، ناحیه مریستمی و هیپوکوتیل بذور جوانه‌زده حذف شد و هر برگ برگ‌بذری به چهار قسمت تقسیم شد و قطعات بر روی محیط القاء شاخساره قرار گرفتند. جهت القاء شاخساره محیط‌های MS جامد (۷ گرم بر لیتر آگار) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌علاوه هشت حالت ترکیبی ABA (صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، نیترات نقره (صفر و ۵ میلی‌گرم در لیتر)، سفوتاکسیم (صفر و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ارزیابی شدند (جدول ۱). pH

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

جدول ۱- کد و ترکیب محیط‌های مورداستفاده جهت القاء شاخساره

کد محیط‌کشت	تیمار (میلی‌گرم در لیتر)			
	BAP	ABA	نیترات نقره	سفوتاکسیم
A0S0C0	۲	۰	۰	۰
A0S0C2	۲	۰	۰	۲۰۰
A0S5C0	۲	۰	۵	۰
A0S5C2	۲	۰	۵	۲۰۰
A1S0C0	۲	۱	۰	۰
A1S0C2	۲	۱	۰	۲۰۰
A1S5C0	۲	۱	۵	۰
A1S5C2	۲	۱	۵	۲۰۰

محیط‌ها بر روی ۵/۷ تنظیم شد و پس از اتوکلاوکردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه، حدود ۲۵ میلی‌لیتر درون هر پتریدیش با قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شد. در هر تکرار ۱٤ ریزنمونه درون یک پتریدیش کشت شد و پس از ۱۸ روز ریزنمونه‌ها به درون دو پتریدیش حاوی محیط مشابه تقسیم شدند. در تمام مدت کشت دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ٤۰ میکرومولار بر مترمکعب بر ثانیه و دوره نوری ۱٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. درصد ریزنمونه القاءشده و تعداد شاخساره در هر تکرار در طی ۵ هفته از آغاز کشت یادداشت گردید. در طی مراحل کشت به‌طور هفتگی شاخساره‌های متمایزشده از ریزنمونه به‌طور کامل جدا شدند.

ریشه‌زایی: آزمایش ریشه‌زایی برای هر رقم در سه تکرار انجام شد و در هر تکرار تعداد ۱۰ شاخساره بر روی محیط MS جامد (۸ گرم بر لیتر آگار) فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی و یا محیط‌های حاوی IBA (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. قبل از کشت دو برش عمود برهم با عمق حدود ۲-۳ میلی‌متر در انتهای شاخساره ایجاد می‌شد و سپس درون شیشه‌های درب‌دار حاوی حدود ۳۰ میلی‌لیتر محیط‌های کشت قرار می‌گرفت. پس از دو هفته درصد شاخساره‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه در هر شاخساره ثبت گردید.

ارزیابی پایداری ژنتیکی کلون‌ها با نشانگر مولکولی AFLP: با توجه به اینکه رقم "دستگردی" به‌صورت ناهمگون (heterogeneous) است در این آزمایش تنها از کلون‌های رقم "بت‌آلفا" استفاده گردید. جهت ارزیابی تنوع سوماکلونال، تعداد ۱۰ گیاهچه رقم "بت‌آلفا" حاصل از بهترین محیط اندام‌زایی به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ طبق دستورالعمل Bi و همکاران (۱۹۹٦) صورت گرفت (Bi *et al.*, 1996). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر (NanoDrop® ND-1000) و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد و پس از تأیید، مراحل واکنش AFLP شامل برش آنزیمی، اتصال آداپتورها، تکثیر پیش‌انتخابی (preselective) و انتخابی (selective) طبق دستورالعمل Vos و همکاران (۱۹۹۵) صورت گرفت (Vos *et al.*, 1995). ابتدا مقدار ۲۰۰ نانوگرم از DNA استخراج‌شده با استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *MseI* (Thermo Fisher Scientific, USA) به‌مدت ۱٦ ساعت (یک شب) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. سپس در دمای ۱٤ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت سه ساعت مقدار ۰/۵ میکرولیتر از آداپتورهای الیگونوکلئوتیدی دو رشته‌ای *EcoRI* (۵ میکرومولار) و *MseI* (۵۰ میکرومولار) توسط آنزیم *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific, USA) به قطعات DNA

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

برش خورده متصل شدند. تکثیر پیش‌انتخابی با استفاده از پرایمرهای بدون باز اضافی *EcoRI-000* (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') و *MseI-000* (5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3') صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در طی ۲٤ چرخه و با واسرشت‌سازی (denaturing) اولیه به‌مدت سه دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، واسرشت‌سازی در هر چرخه به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها (annealing) به‌مدت ٤۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد، توسعه (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت شش دقیقه انجام شد. آغازگرهای مورداستفاده در مرحله افزونش انتخابی شامل ۹ ترکیب آغازگری با سه نوکلئوتید انتخابی بودند که به‌طور تصادفی از بین آغازگرهای موجود انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله انتخابی با استفاده از محصول رقیق‌شده مرحله پیش‌انتخابی (به نسبت ۱ به ۳۰) در طی ۳٦ چرخه صورت گرفت و در ۱٤ سیکل اول دمای اتصال به صورت touch down از دمای ٦۵ درجه شروع و هر چرخه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و در ۲۲ چرخه بعدی دمای اتصال به‌طور ثابت بر روی ۵۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول واکنش PCR در مرحله انتخابی بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۷ درصد الکتروفورز شده و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره باندها ظاهر شدند (Blum *et al.*, 1987). عکس‌برداری ژل‌ها با استفاده از اسکنر ImageScanner III (GE Healthcare, Sweden) صورت گرفت و سپس تعداد باندهای افزونش‌شده و امکان وجود باندهای چند شکل در هر تصویر با استفاده از نرم‌افزار (Adobe, Mountain View, CA, USA) Photoshop 7 بررسی شدند.

ارزیابی سیتوژنتیکی کلون‌ها: بدین منظور از نمونه‌های ریشه ضخیم و دارای رشد سریع پس از مرحله سازگارسازی گیاهچه‌ها و پیش از انتقال آنها به گلدان‌های بزرگتر استفاده گردید. سازگار سازی به‌مدت ۱۰–۱۲ روز پس از انتقال گیاهچه‌های دارای ریشه مناسب به گلدان‌های کوچک حاوی پیت‌موس و پرلیت (به نسبت ۵ : ۱) و درون فیتوترون صورت گرفت بدین ترتیب که یک لیوان شفاف بر روی هر گیاهچه قرار داده شد و روز اول دو نوبت ۱۵ دقیقه‌ای لیوان‌ها از روی گیاهچه‌ها برداشته شدند و پس از آن هر روز مدت زمان بیشتری گیاهچه‌ها در معرض هوای آزاد قرار گرفتند و بعد از یک هفته لیوان‌ها کاملاً برداشته شدند.

به‌منظور ارزیابی تغییرات کروموزومی و پلی‌پلوئیدی، کاریوتیپ سلول‌های ریشه با استفاده از دستورالعمل Zarifi و Guloglu (۲۰۱٦) با اندکی تغییرات بررسی شدند (Zarifi and Guloglu, 2016). از هر رقم ۱۰ عدد گیاه انتخاب و حدود ۱ سانتی‌متر انتهایی ریشه‌های قطور و دارای رشد سریع برداشت شدند و در ترکیب ۸- هیدروکسی کینولین با غلظت ۲ میلی‌مولار به‌مدت ۳–٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد پیش‌تیمار شدند. سپس در محلول تثبیت لویتسکی (Lewitsky؛ ۱ گرم کرومیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۱۰ درصد) به‌مدت ۲٤ ساعت و در محلول تثبیت کارنوی (Carnoy؛ اتانول: استیک اسید به نسبت ۳ : ۱ حجمی) به‌مدت ۱٦–۲٤ ساعت دیگر تثبیت شدند. پس از ۱۵ دقیقه شستشو با آب‌مقطر، نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد برای یک شب یا جهت نگهداری طولانی مدت قرار گرفتند. قبل از رنگ‌آمیزی، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در آب‌مقطر غوطه‌ور شدند و سپس به‌مدت ۸ دقیقه درون سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه شستشو با آب‌مقطر و ۵ دقیقه غوطه‌ورسازی در استیک اسید ۵۰ درصد، نمونه‌ها در محلول ٤ درصد هماتوکسیلین به‌مدت ۱٦ ساعت در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه با آب‌مقطر استریل شستشو شدند و ۲ میلی‌متر انتهایی هر نمونه به‌طور جداگانه بر روی یک اسلاید به ۵–٦ قطعه تقسیم شد و یک قطره محلول ۱ درصد ماکراز (MACERASE، Sigma-Aldrich) در بافر فسفات با اسیدیته ۷ به آن اضافه شد. اسلاید به‌مدت یک ساعت درون یک ظرف با هوای اشباع از بخار و دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. محلول ماکراز با یک قطره استیک اسید ۵۰ درصد جایگزین شد و پس از ٦–۸ دقیقه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

نمونه‌ها در زیر لامل له شدند. برای مشاهده کروزوم‌ها از میکروسکوپ Eclips90i (Nikon, Japan) استفاده شد. برای هر نمونه، از ۳-۵ سلول متفاوت در مرحله متافازی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر عکس تهیه شد و سپس تعداد کروموزوم‌ها شمارش گردید.

واکاوی آماری: آزمایشات اندام‌زایی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شدند. ریشه‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس توسط نرم‌افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) در سطح احتمال $P\leq0.05\%$ صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر ترکیب هورمونی، نیترات نقره و سفوتاکسیم بر ایجاد شاخساره: براساس نتایج به‌دست آمده از هشت محیط مورد استفاده، کمترین درصد القاء شاخساره در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" در محیط A0S0C2 مشاهده شد. کمترین تعداد شاخساره نیز در رقم "بت‌آلفا" در محیط A0S0C2 و در رقم "دستگردی" در محیط A0S0C0 به‌دست آمد که هر دو محیط فاقد ABA و نیترات نقره هستند (شکل A ۱). به‌علاوه در محیط‌هایی که فاقد ABA ولی حاوی نیترات نقره بودند (A0S5C0 و A0S5C2) درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره در مقایسه با محیط‌های فاقد هر دو مورد ذکرشده (A0S0C0 و A0S0C2) افزایش معنی‌داری نشان دادند. در هر دو رقم، محیط A1S5C0 بیشترین درصد القاء شاخساره و محیط A1S0C2 بیشترین تعداد شاخساره باززایی‌شده را تولید کرد (شکل B ۱) با این وجود، در هر دو رقم تفاوت معنی‌داری بین چهار محیط حاوی ABA شامل A1S0C0، A1S0C2، A1S5C0 و A1S5C2 از نظر درصد القاء شاخساره وجود نداشت و در رقم "بت‌آلفا" نیز تعداد شاخساره در محیط‌های A1S0C2، A1S5C0 و A1S5C2 تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. سفوتاکسیم تنها در محیط حاوی ABA و فاقد نیترات نقره (A1S0C2 در مقایسه با A1S0C0) بر روی تعداد شاخساره در رقم "دستگردی" اثر افزایشی نشان داد (جدول ۲).

ارزیابی تأثیر جداگانه رقم خیار، ABA، نیترات نقره و سفوتاکسیم بیانگر معنی‌داربودن اثرات ABA و نیترات نقره در افزایش درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره بود. اگرچه میانگین درصد القاء شاخساره در رقم "دستگردی" (۷۰/۱٪) از رقم"بت‌آلفا" (٦٥/٠٪) بیشتر بود ولی برخلاف آن تعداد شاخساره بیشتری در رقم "بت‌آلفا" (۱۵/۱٪) نسبت به رقم"دستگردی" (۱۵/۸٪). باززایی‌شده بود (جدول ۳). تأثیر زیاد ABA در استفاده همزمان با BAP جهت القاء شاخساره و همچنین جنین‌زایی از برگ‌بذری خربزه (*Cucumis melo* L.) نیز گزارش شده است (Ficcadenti *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 2001). اضافه‌کردن نیترات نقره به محیط (۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) باعث افزایش باززایی شاخساره از کشت برگ‌بذری و هیپوکوتیل خیار(Mohiuddin *et al.*, 1997) و همچنین نمونه‌های برگی در *Sinningia speciosa* (Park *et al.*, 2012) شده است. در یک مطالعه با استفاده از ترکیب BAP و نیترات نقره، بیشترین میزان القاء شاخساره از کشت درون‌شیشه‌ای جوانه انتهایی در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و بهترین باززایی در محیط مشابه به‌علاوه ٤/٥ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره گزارش شده است (Venkatachalam *et al.*, 2018). استفاده از نیترات نقره و آمینو اتوکسی وینیل گلایسن (بازدارنده سنتز اتیلن) به‌طور معنی‌داری باززایی شاخساره از برگ‌بذری و هیپوکوتیل گونه‌های *Brassica campestris* و *B. juncea* را افزایش داده است (Chi *et al.*, 1990). در کشت کالوس *Picea glauca* میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای با افزایش غلظت ABA افزایش می‌یابد (Roberts *et al.*, 1990). از طرف دیگر استفاده از نیترات نقره باعث افزایش نفوذپذیری بیشتر غشاء پلاسمایی نسبت به آب، سیتوکینین، ترانس- زآتین (trans-zeatin)، آنالوگ‌های ساختاری اکسین (تریپتوفان) و بنزوئیک اسید و آبگیری تدریجی در سلول‌ها می‌شود (Klima *et al.*, 2018). در برخی منابع به اثر آنتاگونیستی اتیلن و آبسیزیک اسید اشاره شده است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]



شکل ۱- نتایج اندام‌زیی از ریزنمونه‌های برگ‌بذری خیار رقم "بت‌آلفا". A) در محیط A0S0C0 (بدون ABA) B) در محیط A1S0C2 (دارای ABA و سفوتاکسیم) C) شاخساره ریشه‌دارشده در محیط R2 (حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA). D) مرحله سازگارسازی گیاهچه.

جدول ۲- تأثیر محیط‌های مختلف بر روی درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره باززایی‌شده در هر تکرار در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بعد از پنج هفته

محیط	درصد القاء شاخساره		تعداد شاخساره باززایی‌شده در هر تکرار	
	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی
A0S0C0	۱۶/۱ d	۳۵/۷ c	۱/۵ c	۳/۰ d
A0S0C2	۱۴/۳ d	۲۶/۸ c	۱/۳ c	۳/۵ d
A0S5C0	۴۱/۷ c	۵۷/۱ b	۴/۳ bc	۹/۵ c
A0S5C2	۵۸/۹ b	۶۰/۱ b	۷/۸ b	۱۰/۳ c
A1S0C0	۹۴/۶ a	۹۲/۹ a	۲۵/۳ a	۲۰/۰ b
A1S0C2	۱۰۰/۰ a	۹۴/۶ a	۳۰/۰ a	۲۵/۵ a
A1S5C0	۱۰۰/۰ a	۱۰۰/۰ a	۲۹/۵ a	۲۴/۳ a
A1S5C2	۹۴/۶ a	۹۲/۹ a	۲۷/۳ a	۲۴/۵ a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار ی در سطح احتمال ٪۵ ندارند.

(Ghassemian *et al.*, 2000) و این امر می‌تواند تا حدودی اثر جایگزین نیترات نقره را در محیط‌های فاقد ABA توجیه نماید چرا که نیترات نقره باعث کاهش قابلیت اتصال اتیلن به گیرنده اتیلن در سلول می‌شود (Yang, 1986).

در این تحقیق، اضافه‌کردن سفوتاکسیم به محیط با غلظت مورد استفاده در بیشتر آزمایشات (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نه تنها اثر نامطلوبی بر روی القاء شاخساره نداشت بلکه در محیط A1S0C2، در مقایسه با محیط A1S0C0 که فاقد سفوتاکسیم است، موجب افزایش معنی‌دار تعداد شاخساره‌ها در رقم "دستگردی" گردید. در منابع نیز تأثیر مثبت سفوتاکسیم جهت اهداف مختلف کشت بافتی گزارش شده است برای مثال میزان شکل‌گیری ساختارهای شبه‌جنین در کشت میکروسپور گندم و تریتیکاله در محیط‌های حاوی ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم افزایش نشان داده است (Asif *et al.*, 2013). همچنین اثرات مثبت سفوتاکسیم و بازدارنده‌های اتیلن در باززایی گیاهان از کشت جنین‌زای *Pennisetum americanum* گزارش شده است (Plus *et al.*, 1993) و اضافه‌کردن ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به محیط باززایی باعث افزایش قابلیت باززایی جنین‌های بالغ در پنج ژنوتیپ گندم شده است (Yu and Wei, 2008).

بیشترین تعداد شاخساره باززایی‌شده از هر تکرار در محیط A1S0C2 و رقم "بت‌آلفا" (۳۰/۰ شاخساره) مشاهده شد و با توجه به اینکه هر بذر به هشت ریزنمونه تقسیم و در هر تکرار ۱۴ ریزنمونه کشت شده بود از هر بذر حدود ۱۷/۱ عدد گیاه به‌دست آمده است. Gambley و Dodd (۱۹۹۰) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم BAP تعداد ۱/۵ شاخساره در هر برگ‌بذری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

جدول ۳- تأثیر جداگانه ارقام خیار، آبسیزیک اسید (ABA)، نیترات نقره و سفوتاکسیم بر روی درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره باززایی‌شده در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بعد از پنج هفته

درصد القاء شاخساره

ABA			نیترات نقره			سفوتاکسیم			رقم	
غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	نوع رقم	درصد القاء شاخساره
۱	۹۷/۳ a	۹۵/۱ a	۱۰	۷۳/۷ a	۷۷/۷ a	۲۰۰	٦٧/٠ a	٦٨/٨ a	بت‌آلفا	٦٥/٠ a
۰	۳۲/٦ b	٤٥/١ b	۰	٥٦/٣ b	٦٢/٥ b	۰	٦٣/٠ a	٧١/٤ a	دستگردی	٧٠/١ a

تعداد شاخساره باززایی‌شده در هر تکرار

ABA			نیترات نقره			سفوتاکسیم			رقم	
غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	غلظت mgl^{-1}	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	نوع رقم	تعداد شاخساره
۱	۲۸/۰ a	۲۳/٦ a	۱۰	۱۷/۲ a	۱۷/۱ a	۲۰۰	١٦/٦ a	١٥/٩ a	بت‌آلفا	١٥/٨ a
۰	۳/۷ b	٦/٦ b	۰	١٤/٥ b	١٣/٠ b	۰	١٥/١ a	١٤/٢ a	دستگردی	١٥/١ a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ ندارند.

خیار باززایی نمودند و محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲۸/۷) و ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر کینتین (Kin) (۳۰ و ۳۱/٤) بیشترین تعداد شاخساره را از هر برگ‌بذری تولید نمودند (Gambley and Dodd, 1990). براساس مشاهدات، تعداد جوانه شاخساره خصوصاً در محیط‌های دارای ABA بسیار بیشتر از تعداد شاخساره‌های متمایزشده بود (حدود ۳ برابر) ولی به‌دلیل وجود رقابت بین جوانه‌ها و یا عدم‌غالبیت انتهایی، در طی مدت ۵ هفته بسیاری از این شاخساره‌ها به شکل قابل تفکیک از بقیه رشد نکردند ولی واکشت ریزنمونه‌ها به محیط جدید برای هر ۱۵-۲۰ روز امکان تولید شاخساره‌های بسیار بیشتری را فراهم می‌کند. به‌علاوه احتمالاً افزودن مقادیر اندکی اکسین در ابتدای کشت ریزنمونه‌های برگ‌بذری و یا ۲-۳ هفته بعد از القاء جوانه‌های شاخساره می‌تواند در ایجاد غالبیت انتهایی در جوانه‌های شاخساره و افزایش تعداد شاخساره‌های باززایی‌شده مؤثر باشد. Vasudevan و همکاران (۲۰۰۱) در القاء شاخساره از کشت جوانه انتهایی خیار در محیط‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN به‌ترتیب ۸ و ٤ شاخساره در هر ریزنمونه تولید نمودند ولی با اضافه‌شدن ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر اکسین NAA به هر یک محیط‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تعداد شاخساره‌های باززایی‌شده در هر ریز نمونه به‌ترتیب به ۲۲ و ۹ عدد افزایش یافت (Vasudevan *et al.*, 2001). همچنین Vinoth و همکارارن (۲۰۱۵) در کشت برگ‌بذری *Citrullus lanatus* بیشترین باززایی شاخساره (۱۳/۱۳ شاخساره در هر ریز نمونه) را در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده نمودند و تعداد شاخساره حاصل از محیط مشابه بدون IAA به مراتب کمتر (۷/٤۲ شاخساره در هر ریز نمونه) بود (Vinoth *et al.*, 2015). این نتایج بیانگر لزوم ایجاد غالبیت انتهایی و جلوگیری از افزونش متوالی جوانه شاخه در یک مرحله از کشت با استفاده از نوع و غلظت مناسب اکسین در کنار سیتوکینین است.

اثر ترکیب هورمونی بر ریشه‌زایی: میزان القاء ریشه در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط‌های حاوی دو سطح IBA و NAA پس از دو هفته بررسی شد. بیشترین تعداد ریشه در هر شاخساره در رقم "بت‌آلفا" (۹/٤) و رقم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

جدول ٤- تأثیر محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد و محیط‌های حاوی IBA و NAA بر روی ریشه‌زایی در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بعد از دو هفته

محیط	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر)		درصد شاخساره‌های ریشه‌دار		تعداد ریشه در هر شاخساره	
	IBA	NAA	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی
R1	۰	۰	۸۳/۳ b	۷٦/۷ a	۲/۵ d	۲/۲ c
R2	۰/۱	۰	۹۷/۷ a	۱۰۰/۰ a	۹/٤ a	۸/٦ a
R3	۱	۰	۹۳/۳ ab	۸۳/۳ a	۷/۰ c	٦/٦ b
R4	۰	۰/۱	۱۰۰/۰ a	۹۰/۰ a	۷/۳ c	۷/٤ ab
R5	۰	۱	۹۳/۳ ab	۱۰۰/۰ a	۸/۵ b	٦/٤ b

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ ندارند.

"دستگردی" (۸/٦) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (R2) مشاهده شد (شکل C ۱). اگرچه تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر درصد ریشه‌زایی مشاهده نشد ولی بیشترین درصد ریشه‌زایی در رقم "بت‌آلفا" (٪۱۰۰) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (R4) و در رقم "دستگردی" (٪۱۰۰) نیز در محیط‌های حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (R2) و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (R5) مشاهده گردید. در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (R1) نیز درصد بالایی از شاخساره‌های ریشه‌دار مشاهده شد ولی تعداد ریشه‌های ایجادشده تحت تأثیر استفاده از IBA و NAA حدود ۳-٤ برابر افزایش یافت (جدول ٤). در اغلب گونه‌ها IBA بیشترین کارایی را در القاء ریشه نشان داده است ولی گزارشات بیانگر تفاوت در غلظت‌های بهینه IBA جهت ایجاد بیشترین کارایی است. در بررسی صورت‌گرفته توسط Venkatachalam و همکاران (۲۰۱۸) بر روی القاء ریشه در شاخساره‌های خیار با ترکیبات مختلف IBA، NAA و Kin، بیشترین میزان ریشه‌زایی (٪۹٦/۲) در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN گزارش شد (Venkatachalam *et al.*, 2018). Vinoth و همکاران (۲۰۱۵) غلظت‌های مختلف IBA، IAA و NAA را جهت القاء ریشه در شاخساره‌های *Citrullus lanatus* مقایسه نمودند که بیشترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده نمودند (Vinoth *et al.*, 2015).

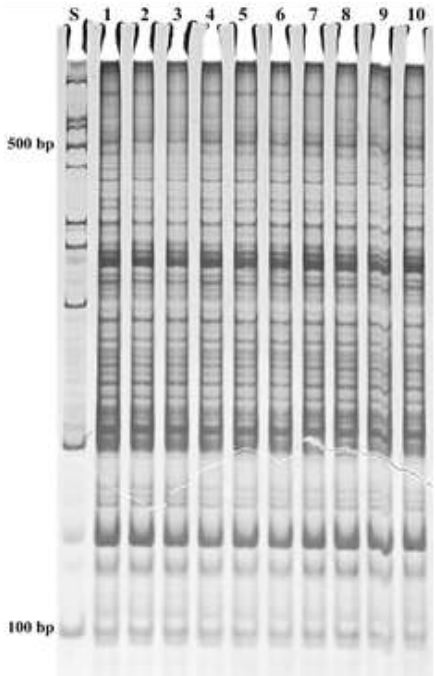
در گیاه *Rauvolfia tetraphylla* L. از بین غلظت‌های مختلف IBA و IAA، مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA منجر به ایجاد بیشترین تعداد ریشه شد (Faisal *et al.*, 2005). همچنین در القاء ریشه در گیاه *Rotula aquatica* Lour.، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) و بیشترین تعداد ریشه در شاخساره (۷/۹) درون محیط حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمده است (Martin, 2003). در گونه *Tylophora indica* از بین غلظت‌های متفاوت IBA و IAA (۵-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، بیشترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA گزارش شده است (Sahai *et al.*, 2010). Sebastiani و Ficcadenti (۲۰۱٦) جهت ریشه‌دار کردن شاخساره‌های حاصل از اندام‌زایی برگ‌بذری خربزه از محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد استفاده کردند (Sebastiani and Ficcadenti, 2016). به‌علاوه Selvaraj و همکاران (۲۰۰٦) محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را جهت القاء ریشه در شاخساره‌های خیار به‌کار برده‌اند (Selvaraj *et al.*, 2006).

ارزیابی پایداری ژنتیکی کلون‌ها: در ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۹ ترکیب آغازگری نشانگرAFLP بر روی ۱۰ نمونه از گیاهان باززایی‌شده رقم "بت‌آلفا" در مجموع ۲۹۳ باند در محدوده bp ۵۰۰-۱۰۰ تکثیر شدند (جدول ۵) که همگی یک شکل و بدون تنوع بودند (شکل ۲). همچنین ارزیابی سیتوژنتیکی کلون‌ها بیانگر دیپلوئیدبودن (2n = 2x = 14) و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

جدول ۵- ترکیب‌های آغازگری استفاده‌شده در مرحله انتخابی نشانگر AFLP جهت آنالیز پایداری ژنتیکی کلون‌ها در رقم بت‌آلفا و تعداد باندهای تکثیرشده

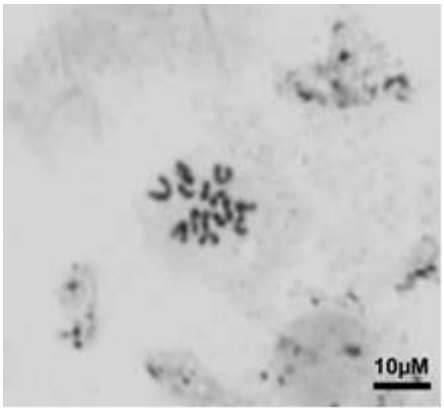
ترکیب آغازگری	تعداد باند افزونش‌شده	تعداد باند چند شکل
E-AAG + M-GTA	۲۵	۰
E-AAG + M-TCG	۳۱	۰
E-AAG + M-GAC	۲۲	۰
E-AAG + M-TAG	۲۳	۰
E-CAT + M- TCG	۳۲	۰
E-CAT + M- GAC	۳۸	۰
E-CAT + M- TAG	۳۱	۰
E-GTC + M- TCG	۲۶	۰
E-GTC + M- GAC	۳۷	۰
E-GTC + M- TAG	۲۸	۰
مجموع	۲۹۳	۰



شکل ۲- نتایج الکتروفورز پلی‌آکریلامید حاصل از تکثیر در مرحله انتخابی نشانگر AFLP با ترکیب آغازگری E-CAT + M- GAC در ۱۰ کلون حاصل از رقم "بت‌آلفا" (چاهک‌های شماره ۱ – ۱۰). نشانگر اندازه DNA (S) و باندهای دارای طول bp ۱۰۰ و bp ۵۰۰ نشان داده شده اند.

ثبات کروموزومومی در گیاهان باززایی‌شده از ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بود (شکل ۳). اغلب ناپایداری حاصل از ریزازدیادی گیاهان درنتیجه تخریب ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاهان به‌وجود می‌آید (Cassells and Curry, 2001; Nivas and DSouza, 2014). همچنین نوع ریزنمونه تأثیر زیادی بر روی ایجاد تنوع سوماکلونال دارد و بافت‌های کاملاً متمایزشده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]



شکل ۳- کاریوتیپ سلول ریشه در یکی از کلون‌های حاصل از اندام‌زایی در رقم "بت‌آلفا" که نشان‌دهنده ثبات کروموزومی و دیپلوئید بودن (2n = 2x = 14) آن است.

مانند ریشه، برگ و شاخساره تنوع بیشتری در مقایسه با ریزنمونه‌های مریستمی مانند جوانه‌های جانبی و انتهایی ایجاد می‌کنند (Duncan, 1997). میزان تنش اکسیداتیو بسته روش کشت‌بافت متفاوت است و روش‌هایی مانند کشت پروتوپلاست و کالوس که تحولات شدیدی در سلول‌های ریزنمونه ایجاد می‌کنند موجب جهش و تغییرات بیشتر می‌شوند (Cassells and Curry, 2001; Smulders and de Klerk, 2011). همچنین تنوع کروموزومی بیشتری در فرایند باززایی از کالوس در مقایسه با القاء مستقیم شاخساره نابجا مشاهده می‌شود (Saravanan *et al.*, 2011). Plader و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی امکان وقوع تنوع سوماکلونال در ۵ روش باززایی خیار نشان دادند که در روش ریزازدیادی تنوعی ایجاد نمی‌شود ولی در روش باززایی از پروتوپلاست بیشترین تغییرات (۹۰ درصد) رخ می‌دهد (Plader *et al.*, 1998). در این تحقیق، با توجه به استفاده از ریزنمونه برگ‌بذری و القاء مستقیم شاخساره، تنوع ژنتیکی و کروموزومی در بین گیاهان باززایی‌شده مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، جهت القاء شاخساره در برگ‌بذری خیار و تولید گیاهان همسان، استفاده از ABA (۱ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان مکمل BAP (۲ میلی‌گرم بر لیتر) تأثیر بسیار زیادی نشان داد. نیترات نقره (۵ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط بیشترین تعداد ریشه در شاخساره را القاء نمود.

منابع

Ahmadi, B., Shariatpanahi, M. E., Ojaghkandi, M. A. and Heydari, A. A. (2014) Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 497-505.

Alam, I., Sharmin, S. A., Mondal, S. C., Alam, J., Khalekuzzaman, M., Anisuzzaman, M. and Alam, M. F. (2010) In vitro micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.). Australian Journal of crop science 4: 81-84.

Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., Yanke, J. and Spaner, D. (2013) Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. Plant Cell Reports 32: 1637-1646.

Aversano, R., Di Dato, F., Di Matteo, A., Frusciante, L. and Carputo, D. (2011) AFLP analysis to assess genomic stability in solanum regenerants derived from wild and cultivated species. Plant Biotechnology Reports 5: 265-271.

Baskaran, P., Velayutham, P. and Jayabalan, N. (2009) In vitro regeneration of *Melothria maderaspatana* via indirect organogenesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 45: 407-413.

Bi, I. V. L., Harvengt, A., Chandelier, G., Mergeai, P. and Jardin, D. (1996) Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115: 205-206.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

Borrelli, G. M., Di Fonzo, N. and Lupotto, E. (1992) Effect of cefotaxime on callus culture and plant regeneration in durum wheat. Plant Physiology 140: 372-374.

Burza, W. and Malepszy, S. (1995) Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation. Plant Breeding 114: 341-345.

Cassells, A. C. and Curry, R. F. (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 145-157.

Chi, G. L., Barfield, D. G., Sim, G. E. and Pua, E. C. (1990) Effect of $AgNO_3$ and aminoethoxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Reports 9: 195-198.

da Silva Mendes, A. F., Cidade, L. C., de Oliveira, M. L. P., Otoni, W. C., Soares-Filho, W. D. S. and Costa, M. G. C. (2009) Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* L. Osb Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 331-336.

Duncan, R. R. (1997) Tissue culture-induced variation and crop improvement. Advances in agronomy 58: 201-240.

Faisal, M., Ahmad, N. and Anis, M. (2005) Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 187-190.

FAO statistics (2018) Available online at: http://faostat.fao.org. Accessed July 2018.

Ficcadenti, N. and Rotino, G. L. (1995) Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 293-295.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. and Rock, C. D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. The Plant Cell 14: 15-45.

Gal-On, A. D., Wolf, Y., Antignus, L., Patlis, K., Ryu, B., Min, M., Pearlsman, O., Lachman, V., Gaba, Y., Wang, Y. M., Shiboleth, J. Y. and Zelcer, A. (2005) Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. Transgenic Research 14: 81-93.

Gambley, R. L. and Dodd, W. A. (1990) An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 177-83.

Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. and McCourt, P. (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. The Plant Cell 12: 1117-1126.

Gopitha, K., Bhavani, A. L. and Senthilmanickam, J. (2010) Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. International Journal of Pharma and Bio Sciences 1: 1-7.

Grozeva, S. and Velkov, N. (2014) In vitro plant regeneration of two cucumber (*Cucumis sativum* L.) genotypes: Effects of explant types and culture medium. Genetika 46: 485-93.

He, Z., Duan, Z., Liang, W., Chen, F., Yao, W., Liang, H., Yue, C., Sun, Z. and Dai, J. (2006) Mannose selection system used for cucumber transformation. Plant Cell Report 25: 953-958.

Hilhorst, H. and Karssen, C. (1992) Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. Plant Growth Regulation 11: 225-238

Hwang, S. C. and Ko, W. H. (2004) Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. Plant Disease 88: 580-588.

Klima, P., Lankova, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D. and Petrasek, J. (2018) Silver ions increase plasma membrane permeability through modulation of intracellular calcium levels in tobacco BY-2 cells. Plant Cell Report 37: 809-818.

Krishna, H. and Singh, D. (2013) Micropropagation of lasora (*Cordia myxa* Roxb.). Indian Journal of Horticulture 70: 323-327.

Kumar, H. A., Murthy, H. N. and Paek, K. Y. (2003) Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. Scientia Horticulturae 98: 213-222.

Li, J., Si, S., Cheng, J., Li, J. and Liu, J. (2013) Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus.* Biologia Plantarum 57: 164-168

Martin, K. (2003) Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rhoeophytic woody medicinal plant. Plant Cell Reports 21: 415-420.

Martins, M., Sarmento, D. and Oliveira, M. M. (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 23: 492-496.

Mehta, R., Sharma, V., Sood, A., Sharma, M. and Sharma, R. K. (2011) Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of in vitro-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall., using AFLP markers. European Journal of Forest Research 130: 729-736.

Mo, X. Y., Long, T., Liu, Z., Lin, H., Liu, X. Z., Yang, Y. M. and Zhang, H. Y. (2009) AFLP analysis of somaclonal variations in *Eucalyptus globulus*. Biologia Plantarum 53: 741.

Mohiuddin, A., Chowdhury, M., Abdullah, Z. C. and Napis, S. (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 75-78.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S. and Ito, A. (2001) Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Horticulturae 90: 85-92.

Nanasato, Y. K., Konagaya, I., Okuzaki, A., Tsuda, M. and Tabei, Y. (2013) Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. Plant Biotechnology Reports 7: 267-76.

Nauerby, B., Billing, K. and Wyndaele, R. (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 123: 169-177.

Nivas, S. K. and Dsouza, L. (2014) Genetic fidelity in micropropagated plantlets of *Anacardium occidentale* L. (Cashew) an important fruit tree. International Journal of Science and Research 3: 2142-2146.

Park, E. H., Bae, H., Park, W. T., Kim, Y. B., Chae, S. C. and Park, S. U. (2012) Improved shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*) using silver nitrate and putrescine treatment. Plant Omics 5: 6-9.

Peraza-Echeverria, S., Herrera-Valencia, V. A. and Kay, A. J. (2001) Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Plant Science 161: 359-367.

Plader, W., Malepszy, S., Burza, W. and Rusinowski, Z. (1998) The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica 103: 9-15.

Plus, J., George, L., Eapen, S. and Rao, P. (1993) Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 91-96

Prado, M. J., Gonzalez, M. V., Romo, S. and Herrera, M. T. (2007) Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 1-10.

Pua, E. C. and Chi, G. L. (1993) De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. Physiologia Plantarum 88: 467-474.

Purnhauser, L., Medgyesy, P., Czako, M., Dix, P. J. and Marton, L. (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor $AgNO_3$. Plant Cell Reports 6: 1-4.

Rajagopalan, P. A. and Perl-Treves, R. (2005) Improved cucumber transformation by a modified explant dissection and selection protocol. HortScience 40: 431-435.

Rathore, N. S., Rai, M. K., Phulwaria, M., Rathore, N. and Shekhawat, N. S. (2014) Genetic stability in micropropagated *Cleome gynandra* revealed by SCoT analysis. Acta Physiologiae Plantarum 36: 555-559.

Roberts, D. R., Flinn, B. S., Webb, D. T., Webster, F. B. and Sutton, B. (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. Physiologia Plantarum 78: 355-360

Roustan, J. P., Latche, A. and Fallot, J. (1990) Control of carrot somatic embryogenesis by $AgNO_3$, an inhibitor of ethylene action: Effect on arginine decarboxylase activity. Plant Science 67: 89-95.

Sahai, A., Shahzad, A. and Anis, M. (2010) High frequency plant production via shoot organogenesis and somatic embryogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. Turkish Journal of Botany 34: 11-20.

Saravanan, S., Sarvesan, R. and Vinod, M. S. (2011) Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauvolfia serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis. Indian Journal of Science and Technology 4: 1241-1245

Sebastiani, M. S. and Ficcadenti, N. (2016) In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. cantalupensis and genetic stability evaluation using RAPD analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 124: 69-79.

Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A. (2006) In vitro organogenesis and plant formation in cucumber. Biologia Plantarum 50: 123-126.

Slazak, B., Sliwinska, E., Saługa, M., Ronikier, M., Bujak, J., Slomka, A., Goransson, U. and Kuta, E. (2015) Micropropagation of *Viola uliginosa* (*Violaceae*) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120: 179-190.

Smulders, M. and de Klerk, G. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regulation 63: 137-146.

Tabei, Y., Nishio, T., Kurihara, K. and Kanno, T. (1994) Selection of transformed callus in a liquid medium and regeneration of transgenic plants in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Breeding Science 44: 47-51.

Thomas, T. D. and Sreejesh, K. R. (2004) Callus induction and plant regeneration from cotyledonary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.). Scientia Horticulturae 100: 359-367.

Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A. and Choi, C. W. (2007) *Agrobacterium*- mediated genetic transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) American Journal of Biochemistry and Biotechnology 3: 24-32.

Vasudevan, A., Selvaraj, N., Kumar, P. S. and Ganapathi, A. (2001) Multiple shoot induction from shoot tip explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Report-Cucurbiy Genetics Cooperative 24: 8-12.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

Venkatachalam, P., Jinu, U., Sangeetha, P., Geetha, N. and Sahi, S. V. (2018) High frequency plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis sativus* L. cultivar 'Green Long'via adventitious shoot organogenesis and assessment of genetic fidelity by RAPD-PCR technology. 3 Biotech 8: 60.

Viehmannova, I., Cepkova, P. H., Vitamvas, J., Streblova, P. and Kisilova, J. (2016) Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 125: 293-302.

Vinoth, A. and Ravindhran, R. (2015) Reduced hyperhydricity in watermelon shoot cultures using silver ions. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 51: 258-264.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414.

Vroh-Bi, I., Anagbogu, C., Nnadi, S. and Tenkouano, A. (2011) Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa* spp.). Plant Molecular Biology Reporter 29: 440-448.

Yang, S. (1986) Regulation of biosynthesis and action of ethylene. Acta Horticulturae 201: 53-60.

Yu, Y. and Wei, Z. M. (2008) Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. Biologia Plantarum 52: 553-556.

Zarifi, E. and Guloglu, D. (2016) An improved aceto-iron-haematoxylin staining for mitotic chromosomes in cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Caryologia 69: 67-72.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]

The effects of abscisic acid, silver nitrate and cefotaxime on cucumber *in vitro* organogenesis and evaluation of regenerated clones by AFLP markers

Rasoul Amirian[1, 2], Zohreh Hojati[2*], Pejman Azadi[3]

[1] Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Isfahan Branch, (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[3] Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
(Received: 19/12/2018, Accepted: 24/08/2019

Abstract

In vitro organogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) was investigated using the cotyledonary explants of "Beth Alpha" and "Dastgerdi" cultivars. Organogenesis was examined on the MS medium containing 2 mgl^{-1} Benzylaminopurine (BAP) along with eight combinations of abscisic acid (ABA) (0 and 1 mgl^{-1}), silver nitrate (0 and 5 mgl^{-1}), and cefotaxime (0 and 200 mgl^{-1}). The results indicated the significant effect of ABA on increasing the percent of shoot induction and number of regenerated shoots. In the absence of ABA, silver nitrate had a significant effect on shoot induction and number of shoots. No negative effects of cefotaxime were observed, meanwhile, the number of shoots increased in one treatment. Root induction in the regenerated shoots was also studied using 5 different media including PGR-free MS medium and the media containing indolebutyric acid (IBA) (0.1 and 1 mgl^{-1}) or naphthaleneacetic acid (NAA) (0.1 and 1 mgl^{-1}). The highest number of roots per shoot in "Beth Alpha" (9.4) and "Dastgerdi" (8.6) were observed in the MS medium supplemented with 0.1 mgl^{-1} IBA. The genetic stability among 10 randomly selected clones of "Beth Alpha" cultivar was evaluated using AFLP markers. In addition, cytogenetic assessment of 10 clones from each cultivar was implemented. In total 293 monomorphic bands were amplified using 9 primer combinations of AFLP markers, indicating the absence of somaclonal variation. The chromosome counting of root meristematic cells revealed the stability of ploidy level among regenerated clones.

Keywords: Cotyledon, Chromosome counting, Organogenesis, Root induction, Somaclonal var

Corresponding author, Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.5.2]