

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

رسول امیریان<sup>۱</sup>، زهره حاجتی<sup>۲\*</sup> و پژمان آزادی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> بخش تحقیقات ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

<sup>۲</sup> بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

<sup>۳</sup> 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

به منظور 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 جدا شده 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" (۹/۴) و "دستگردی" (۸/۶) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده گردید. جهت ارزیابی پایداری ژنتیکی در بین کلون‌های حاصل، ۱۰ گیاهچه باززایی شده از رقم بت‌آلفا به‌صورت تصادفی انتخاب و توسط نشانگر AFLP بررسی شدند. همچنین ۱۰ گیاهچه باززایی شده 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  
غذایی ایرانیان دارد و میزان تولید آن در سال ۲۰۱۶ در ایران  
میوه خیار (*Cucumis sativus* L.) سهم قابل توجهی در سبد  
۱/۷ میلیون تن و در جهان حدود ۸۰ میلیون تن بوده است

در طی فرآیند کشت بافت امکان تولید اتیلن وجود دارد که متعاقب آن باعث ضعف در باززایی و عدم پاسخ مناسب به شرایط کشت می شود ( Chi et al., 1990; Pua and Chi, 1993). اضافه کردن 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 به عنوان بازدارنده اتیلن در افزایش کارایی القاء شاخساره و باززایی جنین حاصل از ماده زایی در کشت درون شیشه ای خیار گزارش شده است ( Li et al., 1997; Mohiuddin et al., 2013).

سفوتاکسیم به عنوان یک آنتی بیوتیک معمولاً برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی در کشت بافت گیاهی و حذف *Agrobacterium* در مراحل انتقال ژن استفاده می شود ( Asif et al., 2013). به علاوه، سفوتاکسیم فعالیت شبه اکسینی (-auxin like) نیز از خود نشان می دهد ( Nauerby et al., 1997) و اثرات مثبت و منفی آن در فرآیند کشت بافت گیاهی گزارش شده است. اضافه کردن سفوتاکسیم (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم در لیتر) به محیط کشت کالوس گندم دوروم باعث افزایش باززایی گیاهچه شده است ( Borrelli et al., 1992). همچنین تیمار ریزنمونه ها در محیط حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت ۲۴ ساعت باعث بهبود جنین زایی در کشت میکروسپور کلزا (*Brassica napus* L.) شده است ( Ahmadi et al., 2014). برخلاف موارد قبل در کشت بافت پرتقال (*Citrus sinensis*) اضافه کردن ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث جلوگیری از فرآیند اندام زایی شده است (da Silva Mendes et al., 2009).

پس از ایجاد شاخساره های نابجا از طریق پرآوری درون شیشه، ایندول بوتیریک اسید (IBA) اغلب بیشترین کارایی را در القاء ریشه های نابجا دارد ( Baskaran et al., 2009; Faisal et al., 2005; Martin, 2003; Thomas and Sreejesh, 2004). ولی در برخی گونه ها 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 ریشه زایی در اولویت

(FAO statistics, 2018). دستورالعمل افزونش درون شیشه ای این محصول کاربرد زیادی جهت تحقیقات و بهبود آن با استفاده از مهندسی ژنتیک و کشت بافت دارد. القاء شاخساره در خیار تاکنون با استفاده از کشت نوک شاخساره ( Vasudevan et al., 2001; Venkatachalam et al., 2018), قطعات برگ برگ بذری بذری ( Burza and Malepszy, 1995) و ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ بذری بذری ( Mohiuddin et al., 1997; Gambley and Dodd, 1990) گزارش شده است. با این وجود در اغلب مطالعات مربوط به مهندسی ژنتیک خیار از ریزنمونه های برگ بذری استفاده شده است ( Tabei et al., 1994; Vasudevan et al., 2007; Nanasato et al., 2013). با وجود معرفی دستورالعمل های متعدد، ارزیابی تنظیم کننده های رشد متفاوت و ژنوتیپ های جدید می تواند به بهبود فرآیند اصلاح، افزونش و مهندسی ژنتیک آن کمک نماید.

در بسیاری از مطالعات جهت اندام زایی و القاء شاخساره در برگ بذری خیار از تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت ۰/۵-۲ میلی گرم در لیتر و یا سیتوکینین های دیگر استفاده شده است ( Gambley et al., 1990; Grozeva and Velkov, 2014)، اما مطالعات متعددی در زمینه مهندسی ژنتیک خیار به کاربرد همزمان آبسزیک اسید (ABA) با BAP جهت باززایی شاخساره از کشت برگ بذری اشاره نموده اند ( Gal-On et al., 2005; He et al., 2006; Nanasato et al., 2013; Rajagopalan and Perl-Treves, 2005; Tabei et al., 2007; Vasudevan et al., 1994). در پاسخ به تنش های سلولی ABA به عنوان واسطه عمل کرده و نقش کلیدی در توسعه سلول، ساخت ذخیره بذر، آب گیری، خواب و جوانه زنی دارد و در کشت بافت گیاهی برای جنین زایی سوماتیکی، بهبود کیفیت جنین سوماتیکی، افزایش مقاومت به آب گیری، و جلوگیری از جوانی زنی زود هنگام استفاده می شود ( Hilhorst and Karssen, 1992; Finkelstein et al., 2002). در کشت بافت خیار از ABA جهت باززایی شاخساره ( Tabei et al., 1994; Vasudevan et al., 2007; Nanasato et al., 2013) و بلوغ جنین های حاصل از آندروژنز ( Kumar et al., 2003) استفاده شده است.

هستند.

(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. در نهایت 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 "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 مرستمی و هیپوکوتیل بذور جوانه‌زده حذف شد و هر برگ برگ‌بذری به چهار قسمت تقسیم شد و قطعات بر روی محیط‌القاء 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

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 سومالکونال حاصل از پرآوری درون‌شیشه‌ای نشانگرهای مختلفی مانند چندشکلی قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD)، توالی‌های تکراری ساده (Simple Sequence Repeats, SSR)، حذف‌فاصل 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 آدپتور بیشترین تعداد باندهای تکرارپذیر را تولید می‌کند و این امر آن را به‌عنوان گزینه مناسبی جهت ارزیابی تنوع سومالکونال در گیاهان حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای تبدیل کرده است (Aversano *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2011; Mo *et al.*, )

جدول ۱- کد و ترکیب محیط‌های مورد استفاده جهت القاء شاخساره

کد محیط کشت	تیمار (میلی گرم در لیتر)			
	BAP	ABA	نیترات نقره	سفوناکسیم
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 اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، حدود ۲۵ میلی‌لیتر درون هر پتری‌دیش با قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شد. در هر تکرار ۱۴ 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 ۴۰ میکرومولار بر مترمکعب بر ثانیه و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. درصد ریزنمونه القاء شده و تعداد شاخساره در هر تکرار در طی ۵ هفته از آغاز کشت یادداشت گردید. در طی مراحل کشت به‌طور هفتگی شاخساره‌های متمایز شده 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 (۱۹۹۶) 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 استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *MseI* (Thermo Fisher Scientific, USA) به مدت ۱۶ ساعت (یک شب) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. سپس در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه ساعت مقدار ۰/۵ میکرولیتر از آداپتورهای الیگونوکلوئوتیدی دو رشته‌ای *EcoRI* (۵ میکرومولار) و *MseI* (۵۰ میکرومولار) توسط آنزیم *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific, USA) به قطعات DNA

پیت‌موس و پرلایت (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 (۲۰۱۶) 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 به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پیش‌تیمار شدند. سپس در محلول تثبیت لویتسکی (Lewitsky؛ ۱ گرم کرومیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۱۰ درصد) به مدت ۲۴ ساعت و در محلول تثبیت کارنوی (Carnoy؛ اتانول: استیک اسید به نسبت ۳ : ۱ حجمی) به مدت ۱۶-۲۴ ساعت دیگر تثبیت شدند. پس از ۱۵ دقیقه شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد برای یک شب یا جهت نگهداری طولانی مدت قرار گرفتند. قبل از رنگ‌آمیزی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور شدند و سپس به مدت ۸ دقیقه درون سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه شستشو با آب مقطر و ۵ دقیقه غوطه‌ورسازی در استیک اسید ۵۰ درصد، نمونه‌ها در محلول ۴ درصد همتوکسیلین به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند و ۲ میلی‌متر انتهایی هر نمونه به‌طور جداگانه بر روی یک اسلاید به ۵-۶ قطعه تقسیم شد و یک قطره محلول ۱ درصد ماکراز (Sigma-MACERASE، Aldrich) در بافر فسفات با اسیدیته ۷ به آن اضافه شد. اسلاید به مدت 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 ۶-۸ دقیقه

برش خورده متصل شدند. تکثیر پیش‌انتخابی با استفاده از پرایمرهای بدون باز اضافی *EcoRI-000* (5'- GACTGCGTACCAATTC-3' و *MseI-000* (5'- GATGAGTCCTGAGTAANN-3' صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در طی ۲۴ چرخه و با واسرشت‌سازی (denaturing) اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشت‌سازی در هر چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها (annealing) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، توسعه (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت شش دقیقه انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده در مرحله افزونش انتخابی شامل ۹ ترکیب آغازگری با سه نوکلئوتید انتخابی بودند که به‌طور تصادفی از بین آغازگرهای موجود انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مرحله انتخابی با استفاده از محصول رقیق‌شده مرحله پیش‌انتخابی (به نسبت ۱ به ۳۰) در طی ۳۶ چرخه صورت گرفت و در ۱۴ سیکل اول دمای اتصال به صورت touch down از دمای ۶۵ 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 (GE Healthcare, Sweden) III صورت گرفت و سپس تعداد باندهای افزونش‌شده و امکان وجود باندهای چند شکل در هر تصویر با استفاده از نرم‌افزار (Adobe, Mountain View, CA, Photoshop 7 (USA) 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 به مدت ۱۰-۱۲ روز پس از انتقال گیاهچه‌های دارای ریشه مناسب به گلدان‌های کوچک حاوی

شاخساره در رقم "دستگردی" اثر افزایشی نشان داد (جدول ۲).

ارزیابی تأثیر جداگانه رقم خیار، ABA، نیترات نقره و سفوتاکسیم بیانگر معنی‌دار بودن 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" (۶۵/۰٪) بیشتر بود ولی برخلاف آن تعداد شاخساره بیشتری در رقم "بت‌آلفا" (۱۵/۱٪) نسبت به رقم "دستگردی" (۱۵/۸٪) بازمی‌یافت (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 برگ‌گی 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 ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره گزارش شده است (Venkatachalam et al., 2018). استفاده از نیترات نقره و آمینو اتوکسی وینیل گلیسین (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-زاتین (*trans-zeatin*)، آنالوگ‌های ساختاری اکسین (تریئوفان) و بنزوئیک اسید و آبگیری تدریجی در سلول‌ها می‌شود (Klima et al., 2018). در برخی منابع به اثر آنتاگونیستی اتیلن و آبسزیک اسید اشاره شده است

نمونه‌ها در زیر لامل له شدند. برای مشاهده کروموزوم‌ها از میکروسکوپ (Nikon, Japan) Eclips90i 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  $P \leq 0.05\%$  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



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 ریشه‌دار شده 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 باززایی شده در هر تکرار در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بعد از پنج هفته

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

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

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 اضافه کردن 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 باززایی شده 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. Dodd و Gambley (۱۹۹۰) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم BAP تعداد ۱/۵ شاخساره در هر برگ‌بذری

(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، اضافه کردن 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

جدول ۳- تأثیر جداگانه ارقام خیار، آبسیزیک اسید (ABA)، نیترات نقره و سفوناکسیم بر روی درصد القاء شاخساره و تعداد شاخساره باززایی شده در ارقام "بت آلفا" و "دستگردی" بعد از پنج هفته

درصد القاء شاخساره										
رقم		سفوناکسیم			نیترات نقره			ABA		
درصد القاء	نوع رقم	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>
شاخساره		دستگردی	بت آلفا		دستگردی	بت آلفا		دستگردی	بت آلفا	
۶۵/۰ <sup>a</sup>	بت آلفا	۶۸/۸ <sup>a</sup>	۶۷/۰ <sup>a</sup>	۲۰۰	۷۷/۷ <sup>a</sup>	۷۳/۷ <sup>a</sup>	۱۰	۹۵/۱ <sup>a</sup>	۹۷/۳ <sup>a</sup>	۱
۷۰/۱ <sup>a</sup>	دستگردی	۷۱/۴ <sup>a</sup>	۶۳/۰ <sup>a</sup>	۰	۶۲/۵ <sup>b</sup>	۵۶/۳ <sup>b</sup>	۰	۴۵/۱ <sup>b</sup>	۳۲/۶ <sup>b</sup>	۰

تعداد شاخساره باززایی شده در هر تکرار										
رقم		سفوناکسیم			نیترات نقره			ABA		
تعداد	نوع رقم	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>	رقم	رقم	غلظت mg l <sup>-1</sup>
شاخساره		دستگردی	بت آلفا		دستگردی	بت آلفا		دستگردی	بت آلفا	
۱۵/۸ <sup>a</sup>	بت آلفا	۱۵/۹ <sup>a</sup>	۱۶/۶ <sup>a</sup>	۲۰۰	۱۷/۱ <sup>a</sup>	۱۷/۲ <sup>a</sup>	۱۰	۲۳/۶ <sup>a</sup>	۲۸/۰ <sup>a</sup>	۱
۱۵/۱ <sup>a</sup>	دستگردی	۱۴/۲ <sup>a</sup>	۱۵/۱ <sup>a</sup>	۰	۱۳/۰ <sup>b</sup>	۱۴/۵ <sup>b</sup>	۰	۶/۶ <sup>b</sup>	۳/۷ <sup>b</sup>	۰

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

در هر ریزنمونه تولید نمودند ولی با اضافه شدن 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 باززایی شده در هر ریز نمونه به ترتیب به ۲۲ و ۹ عدد افزایش یافت (Vasudevan *et al.*, 2001). همچنین Vinoth و همکاران (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 (۷/۴۲) 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 "بت آلفا" (۹/۴) و رقم

خیار باززایی نمودند و محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲۸/۷) و ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین (Kin) (۳۰ و ۳۱/۴) 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 متمایز شده بود (حدود ۳ برابر) ولی به دلیل وجود رقابت بین جوانه‌ها و یا عدم غالبیت انتهایی، در طی مدت ۵ هفته بسیاری از این شاخساره‌ها به شکل قابل تفکیک از بقیه رشد نکردند ولی واگشت ریزنمونه‌ها به محیط جدید برای هر ۱۵-۲۰ روز امکان تولید شاخساره‌های بسیار بیشتری را فراهم می‌کند. به‌علاوه احتمالاً افزون مقدار 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 باززایی شده 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 به ترتیب ۸ و ۴ شاخساره



جدول ۴- تأثیر محیط فاقد تنظیم کننده رشد و محیط‌های حاوی IBA و NAA بر روی ریشه‌زایی در ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بعد از دو هفته

محیط	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی گرم در لیتر)		درصد شاخساره‌های ریشه‌دار		تعداد ریشه در هر شاخساره
	IBA	NAA	رقم بت‌آلفا	رقم دستگردی	
R1	۰	۰	۸۳/۳ <sup>b</sup>	۷۶/۷ <sup>a</sup>	۲/۲ <sup>c</sup>
R2	۰/۱	۰	۹۷/۷ <sup>a</sup>	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۶ <sup>a</sup>
R3	۱	۰	۹۳/۳ <sup>ab</sup>	۸۳/۳ <sup>a</sup>	۶/۶ <sup>b</sup>
R4	۰	۰/۱	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۹۰/۰ <sup>a</sup>	۷/۴ <sup>ab</sup>
R5	۰	۱	۹۳/۳ <sup>ab</sup>	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۶/۴ <sup>b</sup>

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

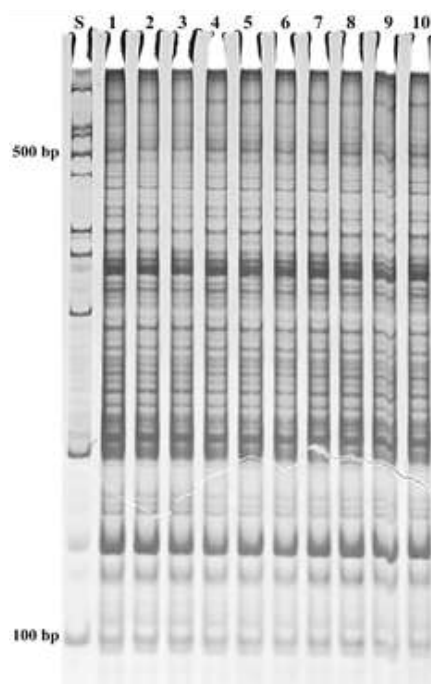
در گیاه *Rauvolfia tetraphylla* L. از بین غلظت‌های مختلف IBA و IAA، مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA منجر به ایجاد بیشترین تعداد ریشه شد (Faisal et al., 2005). همچنین در القاء ریشه در گیاه *Rotula aquatica* Lour. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) و بیشترین تعداد ریشه در شاخساره (۷/۹) درون محیط حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمده است (Martin, 2003). در گونه *Tylophora indica* از بین غلظت‌های متفاوت IBA و IAA (۰/۱-۵) 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 (۲۰۱۶) جهت ریشه‌دار کردن شاخساره‌های حاصل از اندام‌زایی برگ‌بذری خریزه از محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد استفاده کردند (Sebastiani and Ficcadenti, 2016). به‌علاوه Selvaraj و همکاران (۲۰۰۶) 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 نشانگر AFLP بر روی ۱۰ نمونه از گیاهان باززایی‌شده رقم "بت‌آلفا" در مجموع ۲۹۳ باند در محدوده ۵۰۰-۱۰۰۰ bp تکثیر شدند (جدول ۵) که همگی یک شکل و بدون تنوع بودند (شکل ۲). همچنین ارزیابی سیتوژنتیکی کلون‌ها بیانگر دیپلوئید بودن ( $2n = 2x = 14$ ) و

"دستگردی" (۸/۶) 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 ۳-۴ برابر افزایش یافت (جدول ۴). 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 (۹۶/۲٪) 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).

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

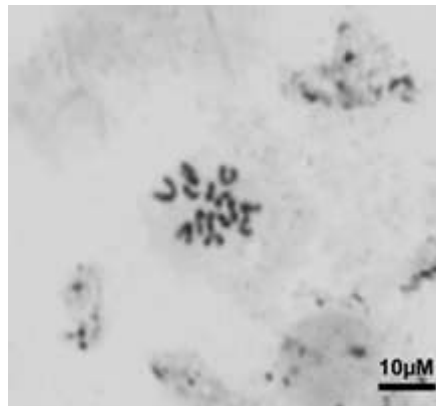
ترکیب آغازگری	تعداد باند افزونش‌شده	تعداد باند چند شکل
E-AAG + M-GTA	۲۵	۰
E-AAG + M-TCG	۳۱	۰
E-AAG + M-GAC	۲۲	۰
E-AAG + M-TAG	۲۳	۰
E-CAT + M- TCG	۳۲	۰
E-CAT + M- GAC	۳۸	۰
E-CAT + M- TAG	۳۱	۰
E-GTC + M- TCG	۲۶	۰
E-GTC + M- GAC	۳۷	۰
E-GTC + M- TAG	۲۸	۰
مجموع	۲۹۳	۰



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 ۱۰۰ bp و ۵۰۰ bp نشان داده شده‌اند.

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 متمایز شده

ثبات کروموزومی در گیاهان باززایی‌شده از ارقام "بت‌آلفا" و "دستگردی" بود (شکل ۳). اغلب ناپایداری حاصل از ریزازدیادی گیاهان در نتیجه تخریب ناشی از تنش اکسیداتیو در



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.

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 باززایی شده 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. نترات نقره (۵ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط بیشترین تعداد ریشه در شاخساره را القاء نمود.

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 نایجا 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

#### 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.

- 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<sub>3</sub> 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. *Osborn 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 *Rauwolfia 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., Shibolet, 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., Vandebussche, 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 rheophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Reports* 21: 415-420.
- Martins, M., Sarmiento, 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.

- 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<sub>3</sub>. *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<sub>3</sub>, 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.

- 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.
- Viehmanna, 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.

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

Rasoul Amirian<sup>1, 2</sup>, Zohreh Hojati<sup>2\*</sup>, Pejman Azadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Isfahan Branch, (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran  
<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> 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<sup>-1</sup> Benzylaminopurine (BAP) along with eight combinations of abscisic acid (ABA) (0 and 1 mgL<sup>-1</sup>), silver nitrate (0 and 5 mgL<sup>-1</sup>), and cefotaxime (0 and 200 mgL<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>) or naphthaleneacetic acid (NAA) (0.1 and 1 mgL<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup> 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