مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

# بهبود باززایی نوساقه از کوتیلدون گیاه خیار در شرایط انتقال ژن با *اگروباکتریوم تومفاشینس*

**حسین وثیقی معراجی ، اصغر میرزایی اصل و محمدرضا عبداللهی**

**ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۱۰/۲۰

## چکیده

بهبود باززایی و تلقیح با اگروباکتریوم یکی از اهداف مهم تراریختی در خیار(*Cucumis sativus*) است که به‌این منظور، اثرات همزمان پیش‌تیمار سرمایی، غلظت‌های مختلف اسیدآمینه آرژنین و اندازه ریزنمونه بر نوساقه‌زایی در شرایط تلقیح با آگروباکتریوم ارزیابی شد. طبق نتایج، اثر برهمکنش پیش‌تیمار سرمایی و اسیدآمینه آرژنین و اثر ساده آرژنین برای تعداد روز تا نوساقه‌زایی در ریزنمونه‌های با کوتیلدون کامل با سطح اطمینان پنج درصد معنی‌دار شد و ریزنمونه‌های تقسیم شده باززایی نداشتند. استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین باعث کاهش روز تا نوساقه‌زایی به میزان ۱۲/۶۳ درصد گردید اما غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین باعث افزایش روز تا نوساقه‌زایی (به میزان ۱۷/۹۲ درصد) شد. کم‌ترین تعداد روز تا نوساقه-زایی در کوتیلدون‌های تیمار شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما (با ۱۶/۱۷ روز) و بیشترین نیز در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم آرژنین در شرایط پیش‌تیمار سرما (۲۵/۳۳ روز) مشاهده گردید. برای ویژگی سرعت رشد نوساقه، فقط اثر ساده آرژنین در سطح یک درصد معنی‌دار شد، نتیجه تجزیه واریانس، اثر برهمکنش تنش سرما و آرژنین برای ویژگی درصد باززایی در سطح پنج درصد را معنی‌دار نشان داد. می‌توان گفت اعمال پیش‌تیمار سرما (بدون آرژنین)، یا استفاده از آرژنین به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط نوساقه‌زایی خیار می‌تواند هم به باززایی و هم به رشد نو ساقه کمک کند.

**واژگان کلیدی**: *Cucumis sativus*، آرژنین، ژن GUS، تراریختی ، تلقیح

* نویسنده مسئول، **پست الکترونیکی**: Mirzaei.asl@gmai.com

## مقدمه

خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) شامل ۱۱۸ جنس و ۸۲۵ گونه است . این خانواده شامل ارقام تجاری مهمی چون خیار، خربزه، هندوانه و انواع کدو است (۸) به گزارش فائو در سال ۲۰۰۹ تولید کشاورزی این خانواده سالانه شامل ۹ میلیون هکتار از زمین‌ها و ۱۸۴ میلیون تن سبزی، میوه و دانه می‌شود . خیار (*Cucumis sativus L.*) یکی از گونه‌های مهم این خانواده است. میزان تولید سالانه این محصول در سال ۲۰۱۹، حدود ۸۸ میلیون تن و سطح زیر کشت آن ۲,۲۳۲,۰۰۰ هکتار بود. خیار جزو ۱۰ سبزی مهم دنیا است. این محصول بیشتر در محیط‌های گلخانه‌ای کشت می‌شود (۱۷) منشا خیار هند است و ۳۰۰۰ سال پیش در آنجا اهلی شد. این گیاه به صورت تجاری در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند. خیار

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

دارای آب بالا و محتوی چربی، کلسترول و سدیم پایینی است و منبع خوبی از مواد معدنی است (۱۰). این گیاه به‌عنوان مدل‌های اولیه در پژوهش‌های تشخیص جنسیت و سیستم آوندی استفاده می‌شود. ارقام جدید و هیبرید به منظور زودرسی، مقاومت به خشکی، افزایش عملکرد، یکنواختی شکل میوه، اندازه، رنگ و کیفیت بهتر محصول در فضای باز معرفی می‌شوند(۲۴).

باززایی و انتقال ژن یکی از فن‌آوری‌های کلیدی در روش‌های مدرن به‌نژادی خیار می‌باشد(۲۴). انتقال ژن برای اولین بار توسط Trulson و همکاران(۲۵) گزارش شد در این روش از *Agrobacterium rhizogenes* بعنوان ناقل استفاده شده بود. خیارهای تراریخت برای اولین بار با استفاده از روش جنین‌زایی سوماتیکی با استفاده از باززایی کوتیلدن و ناقل *A. tumefaciens* به دست آمد(۴). Nishibayashi و همکاران( ۱۵) موفق شدند گیاهان خیار مهندسی شده را با روش باززایی مستقیم از کشت نمونه‌های هیپوکوتیل و ناقل A. tumefaciens تولید کنند. همانطور که Nanasato و همکاران(۱۴) گزارش کرده‌اند روش‌های مختلفی برای تولید گیاهان خیار تراریخت به کار گرفته شده است. در پژوهش Immonen و همکاران(۷) در ۱۹۹۹ بر روی چاودار گزارش شد که پیش‌تیمار سرمای ۲ تا ۴ هفته‌ای تاثیر چشمگیری بر باززایی ریزنمونه‌ها داشته است. در پژوهش Mathew و همکاران(۱۳)، Wang و همکاران(۲۷) و Shumilina و همکاران(۲۱) اثرات مثبت پیش‌تیمار سرما بر باززایی ریزنمونه‌های گیاه کیوی، کلم و خردل صحرایی داشت. همچنین در پژوهش‌های مختلفی از جمله پژوهش‌های Vasanth و همکاران(۲۶)، Satish و همکاران(۱۹)، Sen و همکاران(۲۰)، به اثر مثبت غلظت‌های مختلف اسیدآمینه‌ها از جمله آرژنین اشاره شده است. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ توسط Nanasato و همکاران(۱۴) انجام گرفت، شرایط مختلف تلقیح با به کار بردن پمپ خلا مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد استفاده از پمپ خلا منجر به عمیق‌تر شدن عملیات تلقیح در عمق بافت ریزنمونه شده است. در مقایسه با سیستم‌های باززایی، اتقال ژن در خیار همچنان کاملا موثر نیست و نرخ پایین انتقال ژن در خیار هنوز یک تنگنا به حساب می‌آید (۲۴) تا کنون اثر پیش‌تیمار سرما و استفاده از اسیدآمینه آرژنین بر باززایی نوساقه از گیاه خیار بررسی نشده است.در پژوهش حاضر اثر این عوامل، اثر نوع تلقیح و اثر اندازه ریز نمونه کوتیلدونی بر نوساقه‌زایی، برای بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه خیار بررسی شد.

## مواد و روشها

در این پژوهش از بذر خیار معمولی با نام تجاری BEIT ALPHA F1 و سویه اگروباکتریوم LBA4404 و ناقل pCambia 2301 استفاده شد. مشخصات محیط‌های کشت مورد استفاده طی این پژوهش در جدول ۱ گردآوری شده است.

در این آزمایش اثر اندازه ریزنمونه کوتیلدونی، پیش‌تیمار سرمایی و اسیدآمینه آرژنین بر نوساقه‌زایی در شرایط انتقال ژن با آگروباکتریوم بررسی شد. این تحقیق به صورت آزمایش چهارعاملی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عامل اول اندازه ریزنمونه کوتیلدونی در دو سطح کامل و تقسیم شده، عامل دوم نوع تلقیح اگروباکتریوم در دو سطح تلقیح ساده و تلقیح با سرنگ، عامل سوم پیش تیمار سرمایی در دو سطح همراه با پیش‌تیمار سرمایی و بدون پیش‌تیمار سرمایی و عامل چهارم غلظت‌های مختلف اسیدآمینه آرژنین (صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) بود. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل ۱۰ ریزنمونه در یک پتری دیش شش سانتی‌متری بود.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

جدول ۱- محیط‌های کشت در مراحل مختلف کشت و تلقیح خیار

| شماره محیط | ترکیب محیط کشت(در لیتر) | کاربرد محیط | منبع |
|---|---|---|---|
| ۱ | B5 | جوانه‌زنی بذر | (۳۰) |
| ۲ | LB مایع+ کانامایسین(۵۰ میلی‌گرم) | کشت اگروباکتریوم | (۳۰) |
| ۳ | MS مایع | رقیق کردن | (۳۰) |
| ۴ | MS جامد+ بنزیل آمین پورین ۲ میلی‌گرم+ آبسیزیک اسید ۱ میلی‌گرم+۰٫۸٪درصد آگار | همکشتی | (۱۴) |
| ۵ | MS جامد+ بنزیل آمین پورین ۲ میلی‌گرم+ اسیدآبسیزیک ۱ میلی‌گرم+۰٫۸٪درصد آگار+ کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم+سفتی‌زوکسیم ۷۵ میلی‌گرم+ اسید آمینه آرژنین در غلظت های ۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم | نوساقه‌زایی | (۱۴) |

در تمام محیط‌های کشت جدول بالا pH با استفاده از NaOH قبل از اضافه کردن آگار، روی عدد ۵٫۸ تنظیم شد. هورمون ABA با استفاده از فیلتر، استریل شد و بعد از اتوکلاو به محیط اضافه شد.

**ضدعفونی و کشت بذرها در محیط کشت جوانه‌زنی:** تعداد ۲۰۰ بذر خیار انتخاب شد. بذرها به مدت یک دقیقه در هیپوکلریدسدیم سه درصد قرار گرفتند. بذرها شسته شده و به مدت ۱۵ دقیقه در آب استریل قرار گرفتند، تا جدا کردن پوشش بذر آسان‌تر شود. پوسته بذرها توسط پنس جدا شد (شکل ۱). بذرهای بدون پوشش به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد بذرهای بدون پوشش به مدت چند ثانیه در هیپوکلریدسدیم غوطه‌ور شدند و سپس ۳ مرتبه با آب استریل شسته و روی محیط B5 قرار داده شدند (شکل ۱).

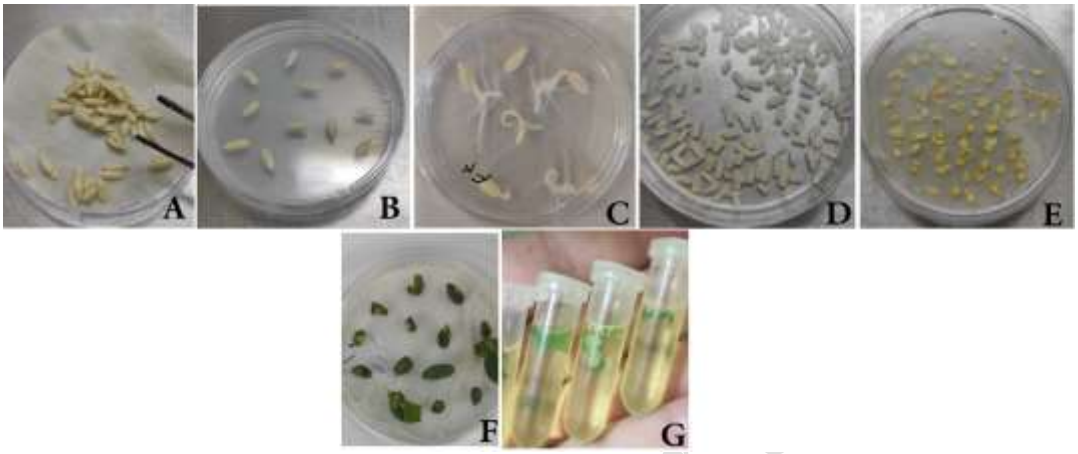
**تهیه محیط تلقیح اگروباکتریوم:** برای آماده‌سازی محیط تلقیح، مقدار۱۰ میلی‌لیتر از محیط شماره دو با یک تک‌کلونی اگروباکتریوم تلقیح شد. محیط کشت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت با دور ۲۰۰ دور در دقیقه حرکت داده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری در ۵۰ میلی‌لیتر محیط تازه LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین(۵۰ میلی‌گرم برلیتر) واکشت شد. محیط کشت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ دور در دقیقه شیک شد، تا زمانی که OD600 به میزان ۰٫۶ الی ۰٫۸ رسید. محیط کشت باکتری سپس با نیروی g ۵۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. قسمت رویی دور ریخته شد. قسمت ته‌نشین شده در محیط MS مایع حل و سپس رقیق شد (OD600=0.25) (۹).

**آماده سازی و تلقیح ریز نمونه:** بعد از دو روز بذرهایی که جوانه زده بودند، با طول ریشه‌چه حداقل یک سانتی‌متر، از محیط جوانه‌زنی جدا شدند (۳۰). تعداد ۱۰۰ بذر در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری و بلافاصله برای تهیه ریزنمونه استفاده شدند (شکل ۱) بذرها روی پتری‌دیش استریل به همراه یک تکه کاغذصافی قرار گرفتند. ریشه‌چه جدا شد و سپس کوتیلدون‌ها از وسط به دونیم تقسیم شدند. سپس ۱/۳ انتهای کوتیلدون حذف شد. در این مرحله کوتیلدون-ها بسته به تیمار، یا بصورت کامل و یا از وسط به دو نیم شده، استفاده شدند(۱۴).کوتیلدون‌های جدا شده در آب استریل نگهداری شدند(۱۱). نصف ریزنمونه‌های کوتیلدونی در محیط MS حاوی اگروباکتریوم اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

شدند. نصف دیگر ریزنمونه‌های کوتیلدونی با سرنگ ساده، در دو نوبت ۵ دقیقه‌ای، تلقیح شدند. بعد از تلقیح، کاغذ صافی استریل روی محیط کشت‌ها قرارداده شد. سپس ریز نمونه‌ها روی محیط همکشتی(محیط۴) قرار گرفتند (شکل۱). نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و به مدت دو روز نگهداری شدند (۳۰).




شکل ۱- مراحل کشت بذر و تلقیح کوتیلدون خیار . A) جداسازی پوسته‌ی بذر، B) قرار دادن بذرها روی محیط جوانه‌زنی، C) جوانه زنی بذرها، D) تهیه و تلقیح ریزنمونه، E) ریزنمونه‌های متمایل به زرد روی محیط همکشتی، I) ظهور نوساقه‌ها، G) انجام آزمون هیستوشیمیایی GUS

**انتقال به محیط نوساقه‌زایی:** ریزنمونه‌های متمایل به زرد با بافت سفت، مطابق شکل ۱ به محیط نوساقه‌زایی منتقل شدند(۱۱). بعد از سه روز از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط نوساقه‌زایی، صفات: تعداد روز تا اولین نوساقه‌زایی، سرعت رشد نوساقه با نرخ میلی‌متر در هفته و درصد نوساقه‌زایی، بررسی شدند. برای بررسی سرعت رشد نوساقه، در اولین مشاهده، اندازه طول نوساقه تعیین و پس از یک هفته مجددا طول آن اندازه‌گیری شد. میزان رشد نوساقه در یک هفته به عنوان سرعت رشد نوساقه در نظر گرفته شد.

**آزمون هیستوشیمیایی GUS:** بعد از ۳۳ روز از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط نوساقه‌زایی، آزمون هیستوشیمیایی GUS روی نمونه‌های برگی گیاهان باززایی شده طبق پروتکل Nanasato و همکاران(۱۴) انجام شد(شکل ۱).

## آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج‌درصد انجام شد. با توجه به این که داده‌های به دست‌آمده نرمال بوده و فرض‌های تجزیه واریانس برقرار بود، تبدیل داده‌ها انجام نشد.

## نتایج

Preproof AI

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

**نوع ریزنمونه:** کوتیلدون‌های کامل، باززاییِ نوساقه نشان دادند ؛ در هیچکدام از کوتیلدون‌های تقسیم شده (با روش Nanasato و همکاران) نوساقه‌زایی صورت نگرفت وعامل اندازه کوتیلدون از تجزیه واریانس حذف گردید.

**تعداد روز تا نوساقه‌زایی:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل پیش‌تیمار سرما و آرژنین برای روز تا نوساقه‌زایی در سطح پنج‌درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که تلقیح با سرنگ تاثیری بر تعداد روز تا نوساقه‌زایی کوتیلدون خیار نداشت. ولی پیش‌تیمار سرما باعث افزایش آن گردید (جدول ۲) همچنین تیمار آرژنین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد روز تا نوساقه‌زایی به میزان ۱۷/۹۲ درصد شد. ولی استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش آن به میزان ۱۲/۶۳ درصد گردید. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، کم‌ترین تعداد روز تا نوساقه‌زایی در کوتیلدون‌های تیمار شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما (با ۱۶/۱۷ روز) و بیش‌ترین تعداد نیز در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم آرژنین در شرایط پیش‌تیمار سرما (۲۵/۳۳ روز) مشاهده گردید (شکل ۲).

**سرعت رشد نوساقه:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده آرژنین برای ویژگی سرعت رشد نوساقه در سطح یک درصد معنی‌دار شد، ولی دیگر تیمارهای مورد بررسی برای این ویژگی معنی‌دار نشدند (جدول ۲). نتایج نشان داد که تلقیح با سرنگ و پیش‌تیمار سرما تاثیری بر سرعت رشد نوساقه نداشتند ولی استفاده از غلظت‌های مختلف آرژنین به صورت معنی‌داری آن را تحت تاثیر قرار داد. تیمار آرژنین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تاثیر معنی‌داری بر میزان سرعت رشد نوساقه نداشت ولی استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین باعث افزایش ۱۱۴/۲۹ درصدی آن گردید. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین سرعت رشد نوساقه در کوتیلدون‌های تیمار شده با آرژنین در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و صفر میلی‌گرم به ترتیب با ۳/۷۵، ۱/۸۳ و ۱/۷۵ میلی متر در هفته مشاهده گردید (شکل ۳).

**درصد باززایی:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر برهمکنش پیش‌تیمار سرما و آرژنین برای ویژگی درصد باززایی در سطح پنج درصد معنی‌دار بود، ولی دیگر تیمارهای مورد بررسی برای این ویژگی معنی‌دار نشد. نتایج به دست آمده نشان داد که تلقیح با سرنگ تاثیری بر میزان درصد باززایی کوتیلدون خیار نداشت. تیمار کوتیلدون خیار با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما باعث افزایش درصد باززایی (به ترتیب به میزان ۵۱ و ۵۰/۶۶ درصد) ولی در شرایط پیش‌تیمار سرما باعث کاهش آن به ترتیب به میزان ۲۲/۳۲ و ۱۹/۰۴ درصد گردید(جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین درصد باززایی در کوتیلدون‌های تیمار شده با ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین در شرایط بدون پیش‌تیمار سرما (به ترتیب با ۷۵/۵۰ و ۷۵/۳۳ درصد) و کم‌ترین نیز در تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر آرژنین در شرایط پیش‌تیمار سرما (۵۰/۰۰ درصد) مشاهده گردید (شکل ۴).

هر چند در پژوهش Liu و همکاران (۱۰) از کوتیلدون تقسیم شده بعنوان ریز نمونه استفاده شده است، در این پژوهش کوتیلدون های تقسیم شده باززایی نداشتند.

Preproof Article

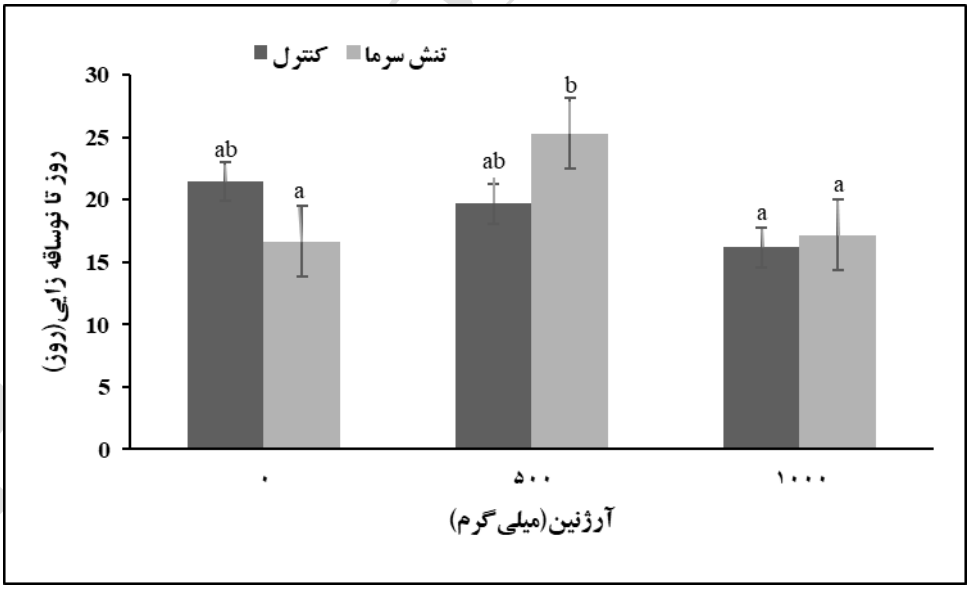
مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر آرژنین در ویژگی‌های تعداد روز تا نوساقه‌زایی، سرعت رشد نوساقه و درصد باززایی کوتیلدون خیار از طریق تلقیح ساده و با سرنگ در شرایط پیش‌تیمار سرما.

| | | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| منابع تغییر | درجه آزادی | تعداد روز تا نوساقه زایی | سرعت رشد نوساقه | درصد باززایی |
| شرایط تلقیح | ۱ | ۲۰,۲۵$^{ns}$ | ۰,۰۰$^{ns}$ | ۴۷۶,۶۹$^{ns}$ |
| پیش تیمار سرما | ۱ | ۳,۳۶$^{ns}$ | ۰,۱۱$^{ns}$ | ۰,۶۹$^{ns}$ |
| آرژنین | ۲ | ۱۰۳,۰۸$^{*}$ | ۱۵,۳۶$^{**}$ | ۸۸,۰۳$^{ns}$ |
| شرایط تلقیح × پیش تیمار سرما | ۱ | ۱۲,۲۵$^{ns}$ | ۱,۰۰$^{ns}$ | ۹۵۰,۶۹$^{ns}$ |
| شرایط تلقیح × آرژنین | ۲ | ۹,۰۸$^{ns}$ | ۰,۰۸$^{ns}$ | ۲۴۰,۵۳$^{ns}$ |
| پیش تیمار سرما × آرژنین | ۲ | ۸۳,۰۳$^{*}$ | ۰,۱۹$^{ns}$ | ۱۵۷۳,۵۳$^{*}$ |
| شرایط تلقیح × پیش تیمار سرما × آرژنین | ۲ | ۲,۵۸$^{ns}$ | ۰,۲۵$^{ns}$ | ۶,۰۳$^{ns}$ |
| خطای آزمایشی | ۲ | ۲۱,۴۷ | ۰,۷۵ | ۴۱۱,۳۹ |
| ضریب تغییر (درصد) | - | ۲۳,۸۷ | ۳۵,۴۳ | ۳۰,۸۲ |

**ns**، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱.

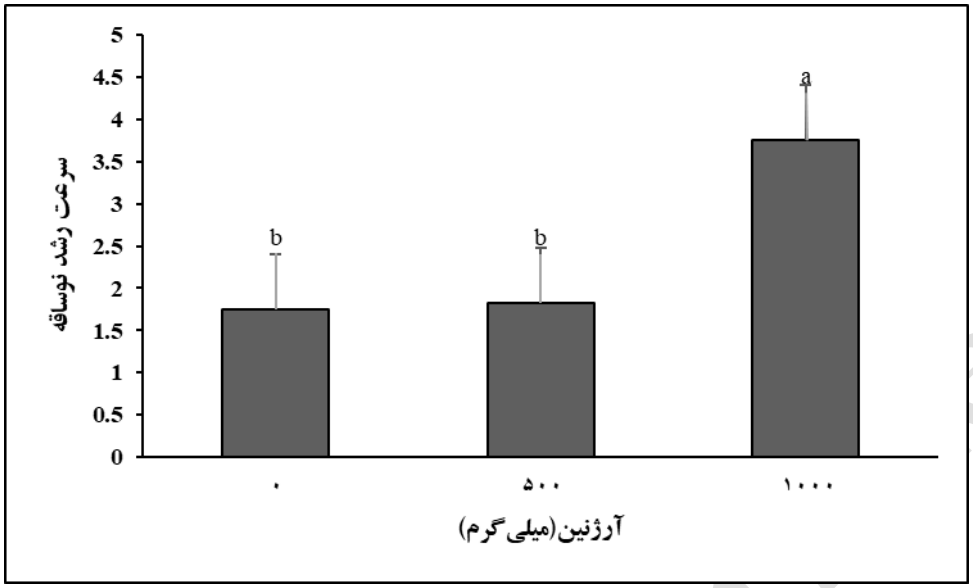
**نتایج آزمون هیستوشیمیایی GUS:** از هر تیمار یک نمونه برای آزمون هیستوشیمیایی GUS انتخاب شد. از بین ۱۲ نمونه ۲ نمونه مثبت بودند(شکل ۵). نمونه‌های مثبت از تیمارهای: ۱. پیش تیمار سرما×تلقیح با سرنگ×۵۰۰ میلی گرم بر لیتر آرژنین،۲. پیش تیمار سرما×تلقیح ساده× ۱۰۰۰ میلی گرم آرژنین، انتخاب شده بودند.



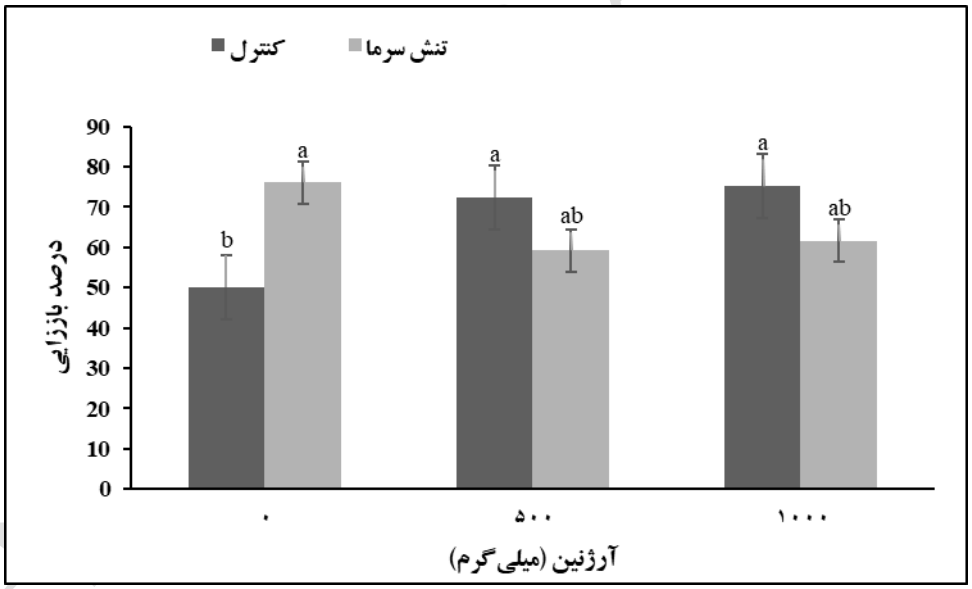

شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف آرژنین بر ویژگی تعداد روز تا نوساقه‌زایی با پیش‌تیمار سرما. در هر ستون، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

Proof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

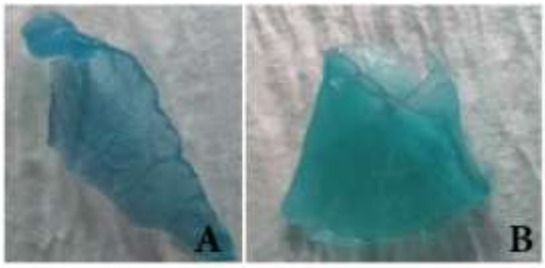



شکل ۳-مقایسه میانگین اثر ساده غلظت‌های مختلف آرژنین بر ویژگی سرعت رشد نوساقه. در هر ستون، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.




شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف آرژنین بر درصد باززایی با پیش تیمار سرما. در هر ستون، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴




شکل ۵- نتایج آزمون هیستوشیمیایی GUS

## بحث

بازازایی مستقیم از نوساقه‌های کوتیلدون رایج‌ترین روش انتقال در خیار است(۱۱). Liu و همکاران(۱۱) با تهیه ریزنمونه از ناحیه مریستم انتهایی ساقه(SAM) گزارش کردند که ۱۰۰ درصد نوساقه‌ها باززایی شدند با این حال در محیط گزینشگر هیچکدام منجر به تولید گیاهچه نشد. Aili و همکاران (۳) باززایی دو ژنوتیپ خیار را مقایسه کردند و به درصدهای ۵۰ و ۱۰۰ درصد رسیدند. در دو پژوهش جداگانه توسط Grozeva و همکاران (۶) و Liu و همکاران (۱۱) درصد باززایی ریز نمونه های خیار ۹۶,۷ درصد بود. Zheng و همکاران(۲۹) با تغییر منبع تهیه ریز نمونه از ساقه به کوتیلدون توانستند نرخ باززایی را از ۶۳ درصد به ۷۸ درصد برسانند. به گزارش Tan و همکاران(۲۴) باززایی ریزنمونه‌های خیار بستگی به عواملی همچون ژنوتیپ ریزنمونه، منبع ریزنمونه، مرحله رشدی منبع مادری ریزنمونه و هورمون‌های اضافه شده به محیط دارد. تا این زمان پژوهشی در مورد تاثیر استفاده از اسیدآمینه در محیط نوساقه‌زایی بر روی باززایی خیار انجام نشده است. در این پژوهش از کوتیلدون برای تهیه ریز نمونه استفاده شد. زمانی که کوتیلدون‌ها تقسیم شدند توانایی باززایی خود را از دست دادند، ممکن است از بین رفتن ریز نمونه‌های تقسیم شده و کوچک به دلیل آسیب دیدن آن‌ها باشد. نرخ باززایی در خیار به عوامل مختلفی بستگی دارد و در پژوهش‌های مختلف حتی نرخ‌های ۱۰۰ درصد هم گزارش شده است، با این حال بسیار مهم است که در شرایط تلقیح با اگروباکتریوم و در محیط گزینشگر، درصد باززایی بالایی صورت گیرد. به نظر می‌رسد استفاده از کوتیلدون کامل به دلیل اندوخته غذایی بیشتر می‌تواند گیاهچه‌های قوی‌تری تولید کرده و بهره‌وری بیشتری در باززایی و انتقال ژن داشته باشد.

استفاده از اسیدآمینه‌های پرولین، گلایسین و آرژنین در محیط کشت باعث بهتر شدن نوساقه‌زایی در گیاه ارزن شد(۱۹). Roa و همکاران(۱۶) گزارش کردند که استفاده از آسپارژین و پرولین باعث بهتر شدن باززایی در ۱۰ ژنوتیپ با باززایی کم در سورگوم شیرین شده است. Sen و همکاران (۲۰) تاثیر مثبت اسیدآمینه پرولین را در باززایی گرم سیاه ( *Vigna mungo*) گزارش کردند. در پژوهش Haque و همکاران(۷) بیشترین باززایی ذرت مربوط به محیط کشتی بود که نیترات نقره و اسیدآمینه گلوتامین به آن اضافه شده بود. در گزارشات Grewal و همکاران (۵) و Satish و همکاران(۱۹) استفاده از اسیدآمینه باعث بهتر شدن باززایی گیاهان شده است. نصیبی و همکاران نیز اثر مثبت کاربرد آرژنین را درافزایش کلروفیل و کاهش مقدار هیدروژن‌پراکسید در گیاه گندم تحت تنش شوری گزارش کرده‌اند(۲). در پژوهش حاضر نیز استفاده از آرژنین با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط نوساقه‌زایی باعث افزایش نرخ یاززایی و همچنین افزایش سرعت رشد ریزنمونه

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

شد. از آنجایی که در بین ۲۱ نوع اسید آمینه، آرژنین بیشترین نسبت ازت به کربن را دارا می‌باشد و در بذرهای پروتئینی گیاهان مختلف ۵۰-۴۰ درصد کل نیتروژن توسط ذخیره آرژنین تامین می‌شود می‌تواند یک منبع خوب برای عنصر نیتروژن باشد و ریزنمونه با استفاده از این منبع در ساخت و توزیع سایر اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک کارآمدی بیشتری داشته باشد. همچنین این اسیدآمینه پیش‌ساخت نیتریک‌اکساید(NO) به شمار می‌رود. نیتریک‌اکساید در ایجاد مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش مهم و مثبتی ایفا می‌کند(۲۹). ممکن است استفاده از آرژنین در محیط به ریزنمونه‌ها برای ترمیم زخم، مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و تحمل آلودگی توسط اگروباکتریوم کمک کند.

Immonen و همکاران (۹) گزارش کردند تیمار سرما به مدت ۲ تا ۴ هفته تاثیر چشمگیری در باززایی گیاهان داشت. Mathew و همکاران (۱۳) تاثیر پیش تیمار اُسمتیک، سرما و آنتی اکسیدانت را بر باززایی کیوی مثبت ارزیابی کردند. پیش تیمار سرما تاثیر چشمگیری بر باززایی بروکلی زینتی داشت(۲۷). تیمار سرما باعث افزایش پاسخ انواع ژنوتیپ شلغم وحشی به باززایی در کشت بافت شد(۲۱). در این پژوهش نیز اثر متقابل پیش تیمار سرما و یا استفاده از آرژنین در محیط نوساقه‌زایی منجر به افزایش درصد باززایی و سرعت رشد نوساقه در شرایط تراریختی با آگروباکتریوم شد. با توجه به نتایج پژوهش طریق‌السلامی و همکاران اعمال تنش سرما می‌تواند به طور معنی داری میزان پرولین در سلول ذرت را افزایش دهد(۱)، بنابراین با توجه به گزارش پژوهش های مختلف میتوان گفت سرما می‌تواند ویژگی‌های متابولیکی و عملکرد آنزیم‌ها را تغییر دهد(۱۰)، اعمال سرما به بذرهای جوانه زده، قبل از تهیه‌ی ریزنمونه ممکن است موجب فعال شدن مسیرهای مقابله با تنش سرما شود که این تغییرات توانایی سلول‌ها برای مقابل با تنش‌های مربوط به تهیه ریزنمونه و نیز آلودگی با اگروباکتریوم را افزایش دهد.

طی این تحقیق، ژن گزارشگر GUS با موفقیت به خیار منتقل شد.

## نتیجه گیری

روش های مختلفی برای اصلاح خیار معرفی شده است اما انتقال ژنِ موفق همچنان یک گلوگاه در مسیر های اصلاحی این گیاه است. بنابراین، این مسیر همچنان نیاز به بهینه سازی و تثبیت دارد تا بتوان به یک دستورالعمل قابل اطمینان رسید. با توجه به نتایج این پژوهش، اعمال پیش‌تیمار سرما و تیمار آرژنین می‌تواند به باززایی بهتر، کاهش دوره باززایی و افزایش کارایی انتقال ژن به ریزنمونه‌های کوتیلدونی خیار کمک کند.

## سپاسگزاری

این پژوهش تحت حمایت مادی و معنوی آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهیِ دانشکده کشاورزیِ دانشگاه بوعلی سینا صورت گرفته است.

**تضاد منافع:** نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

## منابع


۱. طریق الاسلامی، محسن.، کافی، م.، نظامی، ا. و ضرغامی، ر. (۱۳۹۵). اثر اسید آمینه آرژینین بر برخی پارامترهای اکسیداتیو و افزایش تحمل به شوری در گیاه گندم. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۲۹ (۳): ۵۵۲-۵۴۰

۲. نصیبی، ف.، منوچهری کلانتری، خ.، محمدی نژاد، ق. و زنگنه، ر. (۱۳۹۴). اثر تنش سرما بر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه هیبرید ذرت(Zea mays L.) در مرحله گیاهچه‌ای. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۲۸ (۵): ۱۱۲۸-۱۱۱۹

3. Aili, F., Yan, S., & Lingfei, X. (2006). Optimum study of in vitro culture and plantlet regeneration system from cotyledonary nodes of *cucumber* (*Cucumis sativus L*.). Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry.
4. Chee, P. P. (1990). High frequency of somatic embryogenesis and recover of fertile *cucumber* plants. HortScience, 25(7), 792-793.
5. Grewal, D., Gill, R., & Gosal, S. S. (2006). Role of cysteine in enhancing androgenesis and regeneration of indica *rice* (*Oryza sativa L*.). Plant growth regulation, 49, 43-47.
6. Grozeva, S., & Velkov, N. (2014). In vitro plant regeneration of two *cucumber* (*Cucumis sativum L.)* genotypes: effects of explant types and culture medium. Genetika, 46(2), 485-493.
7. Haque, M., Siddique, A. B., & Islam, S. S. (2015). Effect of silver nitrate and amino acids on high frequency plants regeneration in *barley* (*Hordeum vulgare L*.). Plant Tissue Culture and Biotechnology, 25(1), 37-50.
8. Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L. I., Gu, X., Fan, W., ... & Li, S. (2009). The genome of the *cucumber*, *Cucumis sativus L*. Nature genetics, 41(12), 1275-1281.
9. Immonen, S., & Anttila, H. (1999). Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. Plant cell, tissue and organ culture, 57, 121-127.
10. Jat, G. S., Behera, T. K., Lata, S., & Kumar, S. (2021). Classical Genetics and Traditional Breeding in *Cucumber* (*Cucumis sativus L*.). In *Cucumber* Economic Values and Its Cultivation and Breeding. Rijeka, Croatia: IntechOpen.
11. Liu, H. (2018). A modified protocol of Agrobacterium-mediated transformation and map-based cloning and functional analysis of W gene controlling white immature fruit color in *cucumber* [PhD thesis]. Yangling: Northwest A&F University.
12. Liu, H., Zhao, J., Chen, F., Wu, Z., Tan, J., Nguyen, N. H., ... & Weng, Y. (2023). Improving *Agrobacterium tumefaciens*− Mediated Genetic Transformation for Gene Function Studies and Mutagenesis in *Cucumber* (*Cucumis sativus L*.). Genes, 14(3), 601.
13. Mathew, L., McLachlan, A., Jibran, R., Burritt, D. J., & Pathirana, R. (2018). Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved *kiwifruit* shoot tips. Protoplasma, 255, 1065-1077.
14. Nanasato, Y., & Tabei, Y. (2020). A method of transformation and current progress in transgenic research on *cucumbers* and *Cucurbita* species. Plant Biotechnology, 37(2), 141-146.
15. Nishibayashi, S., Kaneko, H., & Hayakawa, T. (1996). Transformation of *cucumber* (*Cucumis sativus L*.) plants using Agrobacterium tumefaciens and regeneration from hypocotyl explants. Plant cell reports, 15, 809-814.
16. Rao, A. M., Sree, K. P., & Kishor, P. K. (1995). Enhanced plant regeneration in *grain and sweet sorghum* by asparagine, proline and cefotaxime. Plant cell reports, 15, 72-75.
17. Sallam, B. N., Lu, T., Yu, H., Li, Q., Sarfraz, Z., Iqbal, M. S., ... & Jiang, W. (2021). Productivity enhancement of *cucumber* (*Cucumis sativus L*.) through optimized use of poultry manure and mineral fertilizers under greenhouse cultivation. Horticulturae, 7(8), 256.
18. Saeed, H., & Waheed, A. (2017). A review on *cucumber* (*Cucumis sativus*). Technical Research & Science, 2, 402-405.
19. Satish, L., Rathinapriya, P., Ceasar, S. A., Rency, A. S., Pandian, S., Rameshkumar, R., ... & Ramesh, M. (2016). Effects of cefotaxime, amino acids and carbon source on somatic


Preproof Article

embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of *foxtail millet* (*Setaria italica L.).* In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52, 140-153.

20. Sen, J., Kalia, S., & Guha-Mukherjee, S. (2002). Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo (L.)* Hepper–Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. Current science, 429-433.
21. Shumilina, D., Kornyukhin, D., Domblides, E., Soldatenko, A., & Artemyeva, A. (2020). Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica Rapa ssp. Rapa L*. Plants, 9(2), 278.
22. Sivanesan, I., Kyoung, K. E., Kyoung, K. M., Young, K. E., & Park, S. W. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants of *onion*. Horticultura Brasileira, 33, 441-447.
23. Sudesh Kumar Yadav. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agronomy for Sustainable Development, 2010, 30 (3), ff10.1051/agro/2009050ff. ffhal-00886535ff
24. Tan, J., Lin, L., Luo, H., Zhou, S., Zhu, Y., Wang, X., ... & Zhang, P. (2022). Recent progress in the regeneration and genetic transformation system of *cucumber*. Applied Sciences, 12(14), 7180
25. Trulson, A. J., Simpson, R. B., & Shahin, E. A. (1986). Transformation of *cucumber* (*Cucumis sativus L*.) plants with Agrobacterium rhizogenes. Theoretical and applied genetics, 73, 11-15.
26. Vasanth, K., Lakshmiprabha, A., & Jayabalan, N. (2006). Amino acids enhancing plant regeneration from cotyledon and embryonal axis of peanut (*Arachis hypogaea L*.). Indian Journal of Crop Science, 1(1and2), 79-83.
27. Wang, Y., Tong, Y., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Feng, J., & Feng, H. (2011). High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*). Scientia horticulturae, 130(1), 296-302.
28. Winter, G., Todd, C. D., Trovato, M., Forlani, G., & Funck, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. Frontiers in plant science, 6, 534.
29. Zheng, L. J. (2009). Study on Regeneration and Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of *Cucumber* (*Cucumis sativus L*.) (Doctoral dissertation, Yangzhou University).
30. zhenxian zhang, Xin Li, Si Ma et al. A Protocol for Agrobacterium-mediated Transformation of *Cucumber* (*Cucumis sativus L*.) from cotyledon explants, 19 September 2017, PROTOCOL (Version 1) available at Protocol Exchange.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات: ۳۴۱-۳۲۴

# Improvement of regeneration from cotyledon of cucumber plant under the conditions of gene transfer with *Agrobacterium tumefaciens*

**Hossein Vasighi Meraji, Asghar Mirzaie-Asl and Mohammad Reza Abdollahi**

**Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Boali Sina University, Hamadan, Iran.**

Preproof Article

## Abstract

Improving regeneration and inoculation with Agrobacterium is one of the important goals of transgenic cucumber (Cucumis sativus) and for this purpose, the simultaneous effects of cold pretreatment, different concentrations of amino acid arginine and the size of the explants on regeneration in the conditions of inoculation with Agrobacterium were evaluated. According to the results, the interaction effect of cold pretreatment and arginine and the simple effect of arginine for the number of days to explant regeneration with complete cotyledons were significant with a confidence level of five percent, and divided explants did not regenerate. Using a concentration of 1000 mg/liter of arginine decreased the days to generation by 12.63%, but the concentration of 500 mg/liter of arginine increased the days to generation (by 17.92%). The lowest number of days until regeneration was observed in cotyledons treated with 1000 mg/L arginine in conditions without cold pretreatment (with 16.17 days) and the highest in the treatment of 500 mg arginine in conditions of cold pretreatment (25.33 days). For the characteristic of shoot growth rate, only the simple effect of arginine was significant at the level of one percent, the result of analysis of variance showed the interaction effect of cold stress and amino acid to be significant at the level of five percent. It can be said that the use of arginine at the rate of 1000 mg/liter in the medium of cucumber regeneration or cold pretreatment can help both regeneration and shoot growth.

**Keywords:** *Cucumis sativus*, Arginine, GUS gene, transgenic, inoculation