۴۶۰۸۲

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده‌های علوم زراعی
گروه علوم باغبانی

پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی علوم باغبانی

عنوان:

بررسی جنین زایی رویشی و اندام زایی دو رقم تجاری و خودرو ی گوجه فرنگی در سه محیط کشت B5، MS و NL

۱۳۸۷ /۱۲/ ۲۳

استاد راهنما:
دکتر کامبیز مشایخی

اساتید مشاور:
دکتر خدایار همتی - دکتر بهنام کامکار

نگارنده:
مینا پیری زیرکوهی

اردیبهشت ماه ۱۳۸۷

٤٦٠٨٢

به نام خدا

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده های علوم کشاورزی

صورت جلسهٔ دفاع از پایان نامه دورهٔ کارشناسی ارشد رشته باغبانی

جلسهٔ دفاع از پایان نامه **خانم مینا پیری زیرکوهی** دانشجوی دورهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ **باغبانی** باشماره دانشجویی **۸۴۱۳۰۲۳۱۰۳** تحت عنوان " **بررسی جنین زایی رویش و اندام زایی ۲ رقم تجاری و خودروی گوجه فرنگی در سه محیط کشت B_5 ، MS ، NL** . " در ساعت **۱۳ : ۳۰** روز **یکشنبه** مورخه **۸۷/۲/۸** در سالن اجتماعات دانشکده های علوم کشاورزی با حضور هیأت داوران به شرح زیر برگزار و پایان نامه

با نمره ۱۹/۹۲ پذیرفته شد.

فرزده و نود و دو

اعضاء هیأت داوران:

۱- دکتر کامبیز مشایخی (استاد راهنما)

۲- دکتر خدایار همتی (استاد مشاور)

۳- دکتر بهنام کامکار (استاد مشاور)

۴- دکتر خانم منیژه میان آبادی (نماینده شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه)

۵- دکتر مهدی شریفانی (داور)

۶- دکتر عظیم قاسم نژاد (داور)

این اثر را که به قول شاندل "پاره‌هایی از بودن من‌اند"
تقدیم می‌کنم به:

همسرم و پسرم

تشکر و قدردانی

به مصداق آیه شریفه "من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق"

به پایان بردن این پژوهش بدون تقدیم صمیمانه‌ترین سپاس‌ها به اساتید ارجمند جناب آقای دکتر کامبیز مشایخی به‌عنوان استاد راهنما و آقایان دکتر خدایار همتی و دکتر بهنام کامکار به‌عنوان اساتید مشاور، همچنین آاقایان دکتر مهدی شریفانی و دکتر عظیم قاسم‌نژاد، دوران محترم پایان‌نامه و جناب آقای مهندس کلاتی، کارشناس آزمایشگاه گروه باغبانی و نیز دوست و سرور گرامی سرکار خانم فهیمه وحدت‌پور و کلیه دوستان و همکارانی که مرا در اجرای این پروژه یاری نمودند، مقدور نخواهد بود، چرا که همکاری توأم با خوشرویی آنان فراتر از آن بوده است که با سپاسگذاری‌های من جبران شود.

توفیق و تندرستی همیشگی آنان را از خدای بزرگ مسئلت دارم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و کلیات	
۱-۱- خاستگاه گوجه‌فرنگی	۲
۱-۲- گیاهشناسی گوجه‌فرنگی	۲
۱-۳- شرایط آب و هوایی مناسب گوجه‌فرنگی	۲
۱-٤- موارد مصرف گوجه‌فرنگی	۳
۱-٥- اهمیت غذایی و دارویی گوجه‌فرنگی	۳
۱-٦- تولید گوجه‌فرنگی در جهان	٤
۱-۷- اهداف اصلاحی گوجه‌فرنگی	٥
۱-۷-۱- کاربرد گونه‌های وحشی در اصلاح گوجه‌فرنگی	٥
۱-۸- کشت درون‌شیشه‌ای گوجه‌فرنگی	٦
۱-۹- جنین‌زایی رویشی	٦
۱-۹-۱- کاربردهای جنین‌زایی رویشی	۷
فصل دوم: بررسی منابع	
۲-۱- جنین‌زایی رویشی در گوجه‌فرنگی	۹
۲-۱-۱- فرآیند جنین‌زایی رویشی	۱۲
۲-۱-۲- القای جنین رویشی	۱۲
۲-۱-۳- ظهور جنین رویشی	۱۳
۲-۱-۳-۱- چگونگی تکامل جنین‌های رویشی از مرحله گلبولار تا جنین‌های بالغ و کامل	۱٤
۲-۱-۳-۲- تمایز و تکامل جنین‌های رویشی از بدو تشکیل در محیط رئالیزاسیون	۱٥
۲-۱-٤- عوامل مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱٥
۲-۱-٤-۱- عوامل داخلی مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱٦
۲-۱-٤-۲- عوامل خارجی مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱۷
۲-۱-٤-۲-۱- قندهای محیط کشت	۱۸
۲-۱-٤-۲-۲- ازت و ترکیبات مختلف آن	۱۹
۲-۱-٤-۲-٤- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت جنین‌زایی رویشی	۲۰
۲-۱-٤-۳- نقش اکسین در القای جنین‌زایی رویشی	۲۳
۲-۱-٤-٤- نقش اکسین در مرحله ظهور جنین‌های رویشی(رئالیزاسیون)	۲٤

۲-۱-٤-٥- مکانیسم تأثیر اکسین بر جنین‌زایی رویشی ۲۵
۲-۱-٥- اثر متقابل هورمون‌ها و پروتئین‌ها در جنین‌زایی رویشی ۲٦
۲-۱-٦- رابطه جنین‌زایی رویشی با متابولیسم کربوهیدرات‌ها ۲۷
۲-۱-۷- منشأ جنین‌ها از نظر هیستولوژیکی ۲۸
۲-۱-۸- امبریوئید ۲۸
۲-۲- ریزازدیادی گوجه‌فرنگی ۲۹
۲-۲-۱- اندام‌زایی در گوجه‌فرنگی ۲۹
۲-۲-۲- کشت پروتوپلاست ۳۱
۲-۲-۳- کشت ریشه ۳۲
۲-۲-٤- عوامل مؤثر در باززایی شاخساره و ریشه در گوجه‌فرنگی ۳۲
۲-۲-٤-۱- اثر ژنوتیپ در اندام‌زایی گوجه‌فرنگی ۳۲
۲-۲-٤-۲- عوامل مرتبط با ریزنمونه ۳۳
۲-۲-٤-۳- اثر سن، اندازه و جهت ریزنمونه ۳٤
۲-۲-٤-٤- عوامل مؤثر در اندام‌زایی گوجه‌فرنگی ۳٤
۲-۲-٤-٤-۱- اثر نور و درجه حرارت ۳٤
۲-۲-٤-٤-۲- محیط غذایی ۳٥
۲-۲-٤-٤-۳- غلظت شکر ۳٥
۲-۲-٤-٤-٤- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در اندام‌زایی گوجه‌فرنگی ۳٦
۲-۲-٤-٤-٤-۱- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در مرحله شاخه‌زایی ۳٦
۲-۲-٤-٤-٤-۲- استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده ۳۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- انتخاب بذور گوجه‌فرنگی ۳۹
۳-۲- محیط کشت ٤۰
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های پایه ٤۰
۳-۲-۲- تهیه محیط کشت ٤۱
۳-۳- آماده‌سازی لامینار ایرفلو ٤۱
۳-٤- مراحل مربوط به جنین‌زایی رویشی ٤۱
۳-٤-۱- مراحل مقدماتی فراهم‌سازی منبع گیاهی نونهال ٤۱
۳-٤-۱-۱- آماده‌سازی بذور ٤۱
۳-٤-۲- مرحله القای جنین‌زایی ٤۲

۳-٤-۳- مرحله رئالیزاسیون ٤۳
۳-٤-٤- مرحله شمارش جنین‌ها و عکس‌برداری ٤۳
۳-٤-٥- آماده‌سازی نمونه‌های بافت به منظور رنگ‌آمیزی و مطالعات میکروسکوپی ٤٤
۳-٤-٥-۱- تثبیت در فیکساتور ٤٤
۳-٤-٥-۲- مرحله نفوذ و جایگزینی پارافین در ریزنمونه‌ها ٤٤
۳-٤-٥-۳- قالب‌گیری با پارافین ٤٥
۳-٤-٥-٤- برش‌گیری با میکروتوم ٤٥
۳-٤-٥-٥- رنگ‌آمیزی دوگانه با سافرانینO و فست گرین ٤٥
۳-٤-٥-٥-۱- مواد و محلول‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی ٤٦
۳-٤-٥-٥-۲- طرز ساخت محلول‌های رنگی ٤٦
۳-٤-٥-٥-۲-۱- طرز ساخت محلول رنگی سافرانینO ٤٦
۳-٤-٥-٥-۲-۲- طرز ساخت محلول رنگی فست گرین ٤٦
۳-٤-٥-٥-۲-۳- طرز ساخت محلول رنگی مورد استفاده ٤٦
۳-٤-٥-٥-۲-٤- طرز ساخت محلول رنگ‌بر ٤٦
۳-٤-٥-٥-۳- رنگ‌آمیزی بافت‌ها ٤۷
۳-٤-٥-٥-٤- تثبیت و مشاهده نمونه‌ها ٤۸
۳-٥- مراحل مربوط به اندام‌زایی گوجه‌فرنگی ٤۸
۳-٥-۱- مرحله شاخه‌زایی ٤۸
۳-٥-۱-۱- تهیه محیط کشت ٤۸
۳-٥-۱-۳- مرحله تولید شاخساره ٤۹
۳-٥-۱-٤- مرحله ریشه‌زایی ٤۹
۳-٥-۱-٥- تجزیه و تحلیل داده‌ها ٥۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- مراحل تشکیل جنین‌های رویشی ٥۳
٤-۱-۱- جنین‌زایی رویشی ٥٤
٤-۱-۱-۱- اثر ژنوتیپ بر میزان جنین رویشی ٥٥
٤-۱-۱-۲- اثر محیط کشت بر تشکیل جنین‌رویشی ٥٦
٤-۱-۱-۳- اثر اندام کشت شده بر تشکیل جنین رویشی ٥۸
٤-۱-۱-٤- اثر متقابل ژنوتیپ با محیط کشت ٥۹
٤-۱-۱-٥- اثر متقابل ژنوتیپ با اندام مورد کشت در تولید جنین رویشی ٥۹

٤-١-١-٦- اثر متقابل محیط کشت با اندام مورد کشت ٦٠
٤-١-٢- بررسی هیستولوژیکی بافت جنین‌زا ٦١
٤-١-٣- امبریوئید و ریشه‌زایی ٦٢
٤-١-٣-١- اثر ژنوتیپ در تولید امبریوئید ٦٢
٤-١-٣-٢- اثر محیط کشت بر تولید امبریوئید ٦٣
٤-١-٣-٣- اثر اندام مورد کشت بر تولید امبریوئید ٦٤
٤-١-٣-٤- اثرات متقابل ریزنمونه، محیط کشت و ژنوتیپ بر تولید امبریوئید ٦٤
٤-١-٤- ریشه‌زایی ٦٦
٤-١-٤-١- اثر ژنوتیپ بر ریشه‌زایی ٦٦
٤-١-٤-٢- اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی ٦٨
٤-١-٤-٣- اثر اندام مورد کشت بر ریشه‌زایی ٦٩
٤-١-٤-٤- اثرات متقابل ریزنمونه و محیط کشت بر ریشه‌زایی ٦٩
٤-١-٤-٥- اثرات متقابل ژنوتیپ و ریزنمونه بر ریشه‌زایی ٧٠
٤-١-٥- تأثیر عوامل تشکیل دهنده محیط کشت بر جنین‌زایی رویشی، تولید امبریوئید و ریشه‌زایی ٧١
٤-٢- اندام‌زایی دو رقم گوجه‌فرنگی ٧٥
٤-٢-١- شاخه‌زایی ٧٥
٤-٢-١-١- اثر ژنوتیپ بر میزان شاخه‌زایی ٧٦
٤-٢-١-٢- اثر محیط کشت بر شاخه‌زایی ٧٧
٤-٢-١-٣- اثر غلظت‌های مختلف کینتین بر شاخه‌زایی ٧٩
٤-٢-١-٤- اثر اندام مورد کشت بر شاخه‌زایی ٨٠
٤-٢-١-٥- اثرات متقابل ژنوتیپ، محیط کشت و غلظت کینتین بر تعداد شاخساره ٨١
٤-٢-١-٦- اثرات متقابل ژنوتیپ، محیط کشت و غلظت کینتین بر ارتفاع شاخساره ٨٢
٤-٢-٢- نتایج مربوط به ریشه‌زایی ٨٢
٤-٢-٢-١- اثر ژنوتیپ بر ریشه‌زایی ٨٣
٤-٢-٢-٢- اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی ٨٤
٤-٢-٢-٣- اثر نوع گیاهچه(گیاهچه‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف کینتین) بر ریشه‌زایی ٨٥
٤-٢-٣- تأثیر عوامل تشکیل دهنده محیط کشت بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی ٨٦
نتیجه‌گیری کلی ٨٩
پیشنهادها ٩١
فهرست منابع ٩٢

فهرست جداول

عنوان	صفحه
۱-۱- سطح زیر کشت، عملکرد و میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران در سال‌های۲۰۰۶-۱۹۹۰	٤
۳-۱- غلظت و نوع تنظیم‌کننده رشد در مرحله القای جنین‌زایی رویشی در سه محیط کشت	٤۲
۳-۲- مواد لازم و مقدار مورد نیاز برای ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتور	٤٤
۳-۳- مواد و زمان مورد نیاز برای جایگزینی پارافین در بافت‌های ریزنمونه‌ها	٤٥
۳-٤- طرز ساخت محلول‌های رنگی	٤۷
۳-٥- مواد و زمان لازم برای رنگ‌آمیزی بافت‌ها	٤۷
۳-٦- ترکیب محیط‌های کشت مورد استفاده برای یک لیتر	٥۱
۳-۷- مقادیر عناصر غذایی موجود در محیط‌های کشت برای یک لیتر(میلی‌گرم)	٥۱
۳-۸- ترکیبات مختلف محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمایش‌ها(میلی‌گرم در لیتر)	٥۲
٤-۱- جدول تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی جهت جنین‌زایی رویشی	٥٤
٤-۲- جدول مقایسه میانگین‌های مربوط به جنین‌زایی رویشی	٥٥
٤-۳- جدول تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی جهت تولید امبریوئید	٦۲
٤-٤- جدول مقایسه میانگین‌های مربوط به امبریوئیدهای تولید شده در محیط‌های جنین‌زایی	٦۳
٤-٥- جدول تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها	٦۷
٤-٦- جدول مقایسه میانگین‌های مربوط به ریشه‌های تولید شده در محیط‌های کشت جنین‌زایی	٦۷
٤-۷- جدول ضرایب همبستگی ساده مربوط به جنین‌زایی رویشی، ریشه‌زایی و امبریوئید با عناصر غذایی محیط‌های کشت	۷۱
٤-۸- نتایج رگرسیون گام‌به‌گام بر روی اثر عناصر غذایی محیط‌های کشت بر صفات مورد بررسی	۷۳
٤-۹- جدول تجزیه واریانس بر اساس میانگین مربعات بدست آمده برای تعداد و ارتفاع شاخساره	۷٥
٤-۱۰- جدول مقایسه میانگین‌های دو رقم مورد مطالعه از نظر تعداد و ارتفاع شاخساره‌ها	۷٦
٤-۱۱- جدول مقایسه میانگین‌های دو محیط کشت مورد مطالعه از نظر تعداد و ارتفاع شاخساره‌ها	۷۷
٤-۱۲- جدول مقایسه میانگین‌های غلظت‌های کینتین استفاده شده از نظر تعداد و ارتفاع شاخساره	۷۹
٤-۱۳- جدول تجزیه واریانس بر اساس میانگین مربعات بدست آمده برای تعداد و ارتفاع ریشه‌ها	۸۳
٤-۱٤- جدول مقایسه میانگین‌های دو رقم مورد مطالعه از نظر تعداد و ارتفاع ریشه‌ها	۸۳
٤-۱٥- جدول مقایسه میانگین‌های دو محیط کشت مورد مطالعه از نظر تعداد و ارتفاع ریشه‌ها	۸٤
٤-۱٦- جدول مقایسه میانگین‌های دو نوع گیاهچه رشد یافته در حضورغلظت‌های کینتین از نظر تعداد و ارتفاع ریشه‌ها در هر شیشه آزمایش	۸٦

٤-١٧- جدول ضرایب همبستگی ساده مربوط به تعداد شاخساره و ریشه تشکیل شده با عناصر غذایی محیط‌های کشت ٨٧
٤-١٨- جدول ضرایب همبستگی ساده مربوط به ارتفاع شاخساره و ریشه تشکیل شده با عناصر غذایی محیط‌های کشت ٨٨
٤-١٩- نتایج رگرسیون گام‌به‌گام بر روی اثر عناصر غذایی محیط‌های کشت بر صفات مورد بررسی در مرحله اندام‌زایی گوجه‌فرنگی ٨٩

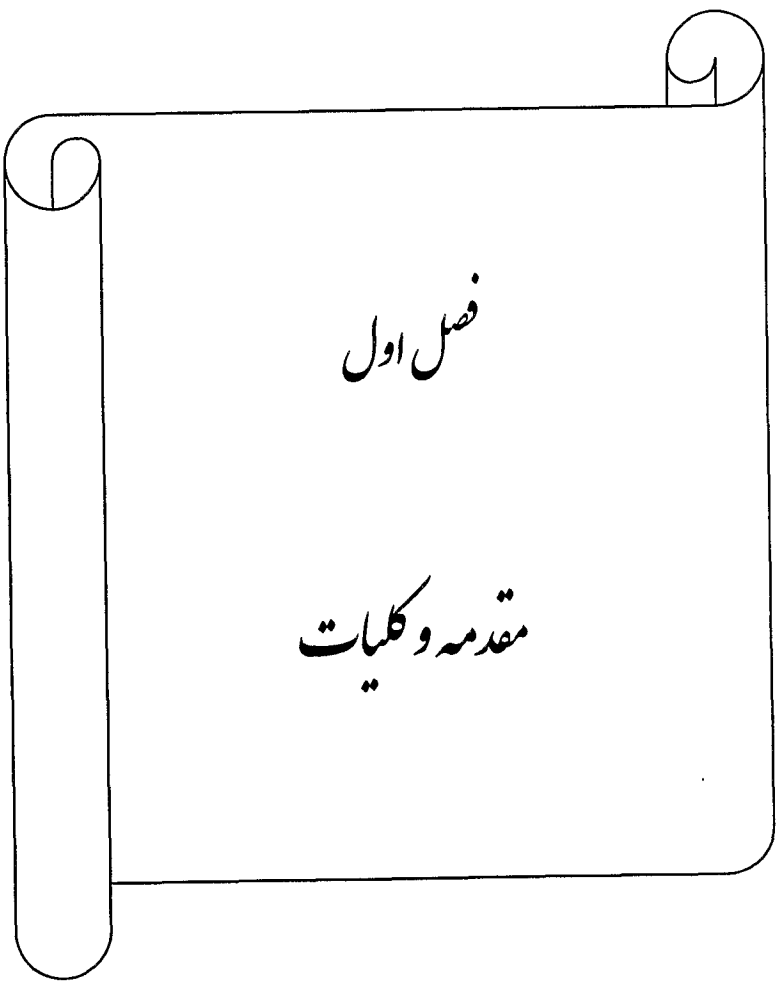
فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
٤-١- جنین‌های رویشی تولید شده در طی فاز رئالیزاسیون(جنین کروی، قلبی و اژدری شکل)	٥٣
٤-٢- الف)جنین‌های رویشی حاصل از رقم خودرو ب) جنین‌های رویشی حاصل از رقم تجاری	٥٦
٤-٣- الف)جنین‌های رویشی تولید شده در محیط کشت B5 ب) جنین‌های رویشی تولید شده در محیط کشت MS	٥٧
٤-٤- الف)جنین‌های رویشی حاصل از ریشه، ب)جنین‌های رویشی حاصل از محور زیرلپه	٥٨
٤-٥- اثرات متقابل ژنوتیپ با محیط کشت در تولید جنین رویشی	٥٩
٤-٦- اثرات متقابل ژنوتیپ با ریزنمونه در تولید جنین رویشی	٦٠
٤-٧- اثرات متقابل محیط کشت با ریزنمونه در تولید جنین رویشی	٦١
٤-٨- الف‌و ب)نمای دیواره سلولی متلاشی شده و خروج جنین‌ها ت)جنین کروی آزاد شده از لایه زیر اپیدرم پ)جنین کروی خارج شده از توده کالوس	٦١
٤-٩- مقایسه اثرات متقابل ژنوتیپ و ریزنمونه برای تولید امبریوئید	٦٥
٤-١٠- مقایسه اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت برای تولید امبریوئید	٦٥
٤-١١- مقایسه اثرات متقابل محیط کشت و ریزنمونه برای تولید امبریوئید	٦٦
٤-١٢- امبریوئیدهای تولید شده در محیط کشت NL	٦٦
٤-١٣- ریزنمونه‌های محور زیرلپه ریشه‌دار شده در محیط کشت NL	٦٨
٤-١٤- الف)ریشه‌های تولید شده در محیط کشت NL، ب)ریشه‌های تولید شده در محیط کشتMS	٦٩
٤-١٥- مقایسه اثرات متقابل محیط کشت و ریزنمونه جهت ریشه‌زایی	٧٠
٤-١٦- مقایسه اثرات متقابل ژنوتیپ و ریزنمونه جهت ریشه‌زایی	٧٠
٤-١٧- الف)جوانه‌های شاخساره تشکیل شده بر روی ریزنمونه محور زیرلپه، ب)تولید گیاهچه کامل با استفاده از کینتین در ریزنمونه محور زیرلپه گوجه‌فرنگی در محیط کشت MS	٧٧
٤-١٨- گیاهچه تولید شده در ریزنمونه محور زیرلپه رقم تجاری گوجه‌فرنگی	٧٨
٤-١٩- الف)ریزنمونه محور زیرلپه همراه با شاخساره تولید شده، ب)ریزنمونه ریشه بدون شاخساره	٨١
٤-٢٠- مقایسه اثرات متقابل محیط کشت و غلظت کینتین بر روی تعدا شاخساره	٨٢
٤-٢١- مقایسه اثرات متقابل محیط کشت و غلظت کینتین بر ارتفاع شاخساره	٨٢
٤-٢٢- گیاهچه‌های تولید شده از ریزنمونه‌های محور زیرلپه رقم خودروی گوجه‌فرنگی در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر کینتین	٨٥

چکیده:

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین سبزی‌های خانواده بادمجانیان (*Solanaseae*) است که اصلاح ژنتیکی آن برای بهبود صفات مختلف ضروری می‌باشد. این صفات شامل مقاومت به آفات و بیماری‌ها و هم‌چنین تحمل به شوری و خشکی موجود در خویشاوندان وحشی است که می‌تواند به‌عنوان منبع باارزشی برای اصلاح گوجه‌فرنگی‌های زراعی موجود استفاده شود. متأسّفانه استفاده از بسیاری از گونه‌های وحشی به دلیل وجود موانع طبیعی محدود شده است، لذا برای رفع این محدودیت‌ها می‌توان از روش‌های جدید بیوتکنولوژی از جمله هیبریداسیون سوماتیکی یا تکنیک‌های انتقال ژن استفاده کرد. کارآیی روش‌های مذکور، مشروط به موفقیت در باززایی گیاه از ریزنمونه‌های مختلف نظیر لپه، هیپوکوتیل، اپیدرم، برگ و ریشه است. تحقیقات نشان داده که بین محیط‌های کشت مختلف در بسیاری از ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مورد مطالعه از نظر باززایی (جنین‌زایی و اندام‌زایی)، تفاوت وجود دارد. لذا ضروری است که محیط کشت، ژنوتیپ و ریزنمونه مناسب جهت بهبود باززایی در گیاهان مختلف مورد مطالعه و شناسایی قرار گیرند. بدین منظور آزمایشی بر روی سه محیط کشت B5، MS و NL در دو رقم تجاری (ردکلود) و خودروی گوجه‌فرنگی و نیز با استفاده از دو ریزنمونه محور زیرلپه و ریشه صورت گرفت. در این تحقیق طرح آماری، طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل با چهار تکرار بود. کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط روشنایی کامل (۲۰۰۰ لوکس) در دستگاه آکسوفیتون استیوارد نگهداری شدند. پس از واکشت ریزنمونه‌ها و گذشت مدت زمان لازم برای مرحله جنین‌زایی رویشی، صفات تعداد جنین‌رویشی، امبریوئید و ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده و برای مرحله اندام‌زایی صفات تعداد شاخساره، تعداد ریشه و میانگین ارتفاع شاخساره‌ها و میانگین ارتفاع ریشه‌ها یادداشت‌برداری گردید. در این آزمایش اثر ژنوتیپ و محیط کشت جهت جنین‌زایی رویشی و اندام‌زایی گوجه‌فرنگی معنی‌دار شد و نتایج زیر به‌دست آمد: محیط کشت B5 برای جنین‌زایی رویشی و محیط کشت MS جهت اندام‌زایی، مناسب‌ترین محیط‌ها تشخیص داده شدند. رقم خودرو مناسب‌ترین رقم برای هر دو مرحله جنین‌زایی و اندام‌زایی، بود. نتایج مربوط به ریزنمونه‌ها نیز نشان داد که جهت جنین‌زایی رویشی مناسب‌ترین ریزنمونه، ریزنمونه ریشه می‌باشد، در حالی‌که در مرحله اندام‌زایی در تمام محیط‌های کشت، باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های ریشه صفر بوده و تنها ریزنمونه‌های محور زیرلپه به اندام‌زایی پاسخ مثبت نشان دادند.

کلمات کلیدی: گوجه‌فرنگی، کشت بافت، جنین‌زایی رویشی، اندام‌زایی، محیط کشت، ژنوتیپ و ریزنمونه.



فصل اول

مقدمه و کلیات

کشت‌بافت تکنیکی است که امکان تولید گیاه در محیط درون شیشه‌ای را فراهم می‌کند. اساس این تکنیک توانمند[1] بودن سلول‌های گیاهی است، زیرا هر سلول گیاهی حاوی کلیه اطلاعات ژنتیکی لازم برای تبدیل شدن به یک گیاه کامل است. بنابراین کشت سلول، بافت یا اندام این امکان را فراهم می‌کند که با کشت یکی از اجزای گیاه، سایر قسمت‌های آن نیز تشکیل شود. کشت بافت گیاهی از آغاز آن در سال ۱۹۳۰، زمانی که دانشمندان این تکنیک را برای رشد سلول‌ها در کشت استفاده نمودند، به میزان زیادی پیشرفت داشته است. این تکنیک به طور رایج برای اهداف بسیار متفاوتی مثل: القای کالوس، کشت بساک، کشت پروتوپلاست، جنین‌زایی رویشی و غیره استفاده می‌شود (حسندخت، ابراهیمی؛ ۱۳۸۵).

جنین‌زایی رویشی به فرآیند بدست آوردن جنین‌ها از بافت‌های رویشی گیاه گفته می‌شود و یکی از روش‌هایی است که اخیراً به دلیل سودمندی‌هایش کاربرد زیادی پیدا کرده است. بررسی‌های زیاد انجام شده بر روی جنین‌زایی رویشی گیاهان مختلف، سبب حصول روش‌های مناسب جهت باززایی گیاهان ارزشمند از این طریق شده و این امیدواری را به‌وجود آورده است که بتوان گیاهان را با هزینه بسیار اندک تولید نموده و یا برخلاف روش‌های قدیمی در مدت کوتاهی پس از دست‌کاری ژنتیکی بوسیله روش‌های انتقال ژن و یا امتزاج سیتوپلاسمی و غیره، ارقام جدید با خواص مطلوب مورد نظر را به‌وجود آورد (هالپرین و همکاران، ۱۹٦٤).

سابقه جنین‌زایی رویشی به حدود بیش از یک‌صد سال پیش یعنی به سال ۱۹۰۲ میلادی برمی‌گردد زمانی که فیزیولوژیست آلمانی هابرلنت[2] ادعا نمود که تشکیل جنین از سلول‌های رویشی نیز امکانپذیر می‌باشد. پس از گذشت حدود ۵۵ سال از فرضیه ارائه شده توسط ایشان، برای اولین بار راینرت[3] در آلمان و استیوارد[4] در آمریکا توانستند از طریق کشت کالوس و نیز کشت تعلیقی سلولی ریشه هویج[5] تشکیل جنین‌های رویشی را گزارش کنند (استوارد و راینرت، ۱۹۵۸). این مطالعات اولیه، پیش‌گویی هابرلنت را مبنی بر اینکه جنین‌ها می‌توانند از سلول‌های رویشی به‌وجود آیند، تأیید کردند. در پی آن در سال ۱۹۵۹

1- Totipotency 2- Haberlant 3- Reinert 4- Steward 5- *Daucus carota*

راینرت عنوان نمود که گیاهک‌هایی که در کشت درون شیشه گیاه هویج به‌وجود می‌آیند از جنین‌های دوقطبی منشأ گرفته‌اند (راینرت، ۱۹۵۹).

با توجه به اهمیت روش‌های نوین ازدیاد گیاهی از قبیل کشت بافت و مزایای آنها در تولید ارقام جدید با خواص مطلوب، می‌توان از این تکنیک در اصلاح محصولات مهم کشاورزی استفاده نمود. از جمله این محصولات گوجه‌فرنگی زراعی[1] بوده که به تازگی به لیست محصولات مهم غذایی جهان اضافه شده است (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱).

۱-۱- خاستگاه گوجه فرنگی

گوجه‌فرنگی بومی آمریکای جنوبی و مکزیک بوده و اهلی شدن آن نیز در مکزیک انجام گرفته است. نام علمی آن در سال ۱۷۸۸ توسط میلر بر این گیاه نهاده شد (جی، کاللو؛ بی ا، برگ، ۱۳۸۲). گوجه‌فرنگی در سال ۱۷۸۱ در آمریکای شمالی به‌عنوان یک غذای خوراکی شناخته شد و اولین‌بار محصول آن در سال ۱۸۱۲ در لوئیزیانای آمریکا به بازار عرضه گردید. ورود و کشت این محصول در ایران دارای سابقه‌ای ۱۵۰ ساله می‌باشد (دانشور، ۱۳۸۵).

۱-۲- گیاهشناسی گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی یکی از اعضای خانواده بادنجانیان[2]، گیاهی است چندساله که اکثراً در تمام جهان به‌صورت یک‌ساله کشت می‌گردد. تمام گونه‌های این جنس دیپلوئیدهای یکساله، با ۲٤ کروموزوم غیرجنسی(۲n=۲x=۲٤) هستند. گل‌های گوجه‌فرنگی کامل، هرمافرودیت، پنتامر و میوه‌ها سته گوشتی بوده که دارای ۲ یا چند حجره می‌باشند (جوانپور هروی، ۱۳۸۲). گوجه‌فرنگی یک گیاه خودگشن است که دارای انواع پاکوتاه و پابلند بوده، و برگ‌های مرکب آن به‌صورت متناوب روی ساقه قرار می‌گیرند. گل‌ها به‌صورت خوشه‌ای روی ساقه، بین دو گره قرار دارند. هر خوشه گل بین ٤-۲ عدد گل دارد که تعداد خوشه‌های گل آن بسته به رقم گوجه‌فرنگی، بین ۱۰۰-٤ متغیر است (دانشور، ۱۳۸۵).

۱-۳- شرایط آب و هوایی مناسب گوجه‌فرنگی

این گیاه حساس به سرمای اول پاییز بوده و می‌توان آن را با موفقیت از خط استوا تا عرض‌های جغرافیایی بالاتر کشت کرد. گوجه‌فرنگی در دما و شرایط رشدی مناسب دوره تولیدمثل خود را در ۱۱۵-۹۵ روز کامل می‌کند. کشت گوجه‌فرنگی با بسیاری از محیط‌ها سازگار است. این گیاه به‌طور

1- *Lycopersicon esculentum* 2- Solanaseae

موفقیت‌آمیزی بر روی انواع خاک‌های شنی تا بافت رسی خوب و نیز خاک‌های حاوی مواد آلی بالا پرورش می‌یابد. محدوده pH خاک از ۷-۵/۵ معمولاً برای بیشتر کشت‌ها رضایت‌بخش است. گوجه‌فرنگی دارای سیستم ریشه‌ای وسیع در عمق ٦۰ سانتی‌متری خاک است. سیستم ریشه عمیق منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر خشک‌سالی می‌شود. معمولاً میزان آب مصرفی ۳۰-۲۵ میلی‌متر در هفته است که در روزهای گرم و خشک میزن تبخیر و تعرق می‌تواند به بیش از ۱۰ میلی‌متر تجاوز نماید. گوجه‌فرنگی را می‌توان در مناطقی با متوسط دمای بالاتر از ١٦ درجه‌سانتی‌گراد که دارای حداقل ٤-۳ ماه شرایط آب و هوایی گرم و عاری از یخبندان می‌باشد، پرورش داد (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱). گوجه‌فرنگی نسبت به طول دوره روشنایی در روز حساس نبوده، و جزء گیاهان بی‌تفاوت به طول روز می‌باشد. بهترین دما برای رشد و نمو آن بین ۱۹ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشدش متوقف و میوه تشکیل نمی‌گردد. در کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد گل‌ها تلقیح نمی‌شوند و درنتیجه میوه‌ای به‌وجود نمی‌آید (دانشور، ۱۳۸۵).

۱-٤- موارد مصرف گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی زراعی، با تولید سالانه حدود ۵۰ میلیون تن در طی قرن گذشته، به یکی از محبوب‌ترین سبزی‌ها تبدیل شده است. وجود حالت تازه‌خوری و قابلیت فرآوری این محصول نقش به‌سزایی در پذیرش سریع و همگانی آن به‌عنوان یک محصول غذایی مهم، داشته است (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱). گوجه‌فرنگی را به شکل‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌دهند. آن را به‌صورت خام با سایر سبزی‌ها در تهیه سالاد به‌کار می‌برند. ممکن است به‌صورت پخته در تهیه غذاهای مختلف و سوپ مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین می‌توان از عصاره آن رب گوجه‌فرنگی، سس و آب گوجه‌فرنگی تهیه کرد. در بعضی موارد گوجه‌فرنگی را خشک کرده و در موقع مناسب از آن استفاده می‌کنند. عده‌ای هم ترجیح می‌دهند آن را به‌صورت پودر درآورده و برای خوش طعم کردن و رنگین کردن غذا به مصرف رسانند (دانشور،۱۳۸۵).

۱-۵- اهمیت غذایی و دارویی گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی حاوی موادی نظیر اسید اسکوربیک، ویتامین K، عناصری مانند پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر و بسیاری از مواد دیگر می‌باشد. ازطرفی گوجه‌فرنگی غنی از ویتامین C،A و الیاف فیبری بوده و نیز عاری از کلسترول می‌باشد. یک گوجه‌فرنگی با اندازه متوسط (١٤٨ گرم)، چیزی حدود ۳۵ کالری انرژی دارد. گوجه‌فرنگی تقریباً حاوی ۵۰-۲۰ میلی‌گرم لیکوپن در هر ۱۰۰ گرم وزن میوه می‌باشد (کالو، ۱۹۹۱). لیکوپن از گروه رنگدانه‌های کاروتنوئیدی است که ترکیبات طبیعی ایجاد کننده رنگ میوه‌ها و سبزی‌ها

می‌باشند. لیکوپن آنتی‌اکسیدانی قوی بوده که به‌عنوان ماده ضدسرطان شناخته شده و بدن را در برابر رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (رااو و آگاروال، ۲۰۰۰).

۱-۶- تولید گوجه فرنگی در جهان

سطح زیر کشت، عملکرد و میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران بر اساس آمارنامه سازمان خواروبار جهانی[1] در طی سال‌های ۲۰۰۶-۱۹۹۰ در جدول (۱-۱) آمده است (FAOStat، ۲۰۰۷).

جدول۱-۱- سطح زیر کشت، عملکرد و میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران در سال‌های ۲۰۰۶-۱۹۹۰ (Faostat، ۲۰۰۷)

سال	سطح زیر کشت(هزار هکتار)	عملکرد(تن در هکتار)	تولید(هزار تن)
۱۹۹۰	۶۸/۵	۲۳/٤	۱٦۰۰
۱۹۹۱	٦۸	۲٤/۲	۱٦٤۲
۱۹۹۲	۹۲	۲۵/۸	۲۳۷۱
۱۹۹۳	۱۱۱	۲۱/٦	۲۳۹۷
۱۹۹٤	۹۲/۳	۲۲/٦	۲۰۸۸
۱۹۹۵	۱۰۳/۷	۲۳/۲	۲٤۰٤
۱۹۹٦	۱۱۹/٤	۲٤/۹	۲۹۷۵
۱۹۹۷	۹۵/٤	۲٦/۷	۲۵٤۷
۱۹۹۸	۱۲۰/۳	۲٦/٦	۳۲۰٤
۱۹۹۹	۱۲۸/۵	۲۷/۲	۳٤۹۰
۲۰۰۰	۱۱۰/۷	۲٦/۹	۳۱۹۱
۲۰۰۱	۱۱۰/۲	۲۷/۳	۳۰۰۹
۲۰۰۲	۱۲۹	۳۱/۹	٤۱۰۹
۲۰۰۳	۱۳۰	۳۲/۳	٤۲۰۰
۲۰۰٤	۱۳۰	۳۲/۳	٤۲۰۰
۲۰۰۵	۱۳۰	۳۲/۳	٤۲۰۰
۲۰۰٦	۱۳۹	۳٤/٤	٤۷۸۱

1 - FAO

۱-۷- اهداف اصلاحی گیاه گوجه‌فرنگی

بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی یک مشکل جدی در تولید گوجه‌فرنگی می‌باشد، در نتیجه ایجاد ارقام مقاوم به این بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف به‌نژادی گوجه‌فرنگی را تشکیل می‌دهند. از طرفی گوجه‌فرنگی به بسیاری از تنش‌های محیطی بویژه حرارت‌های شدید، شوری، خشکی و آلودگی‌های محیطی حساس است و نیاز به تولید ارقامی است که بتواند در مقابل تنش‌های محیطی دوام بیاورد. یکی دیگر ازهدف‌های اصلاحی این گیاه به جهت طعم و مزه آن بوده، از آنجایی‌که طعم به نسبت قند به اسید بستگی دارد و ارقام با سطح بالای قند دارای درصد مواد جامد بالایی(TSS) هستند که برای فرآوری مهم‌ترین صفت است (جی، کاللو؛ بی، ار برگ؛ ۱۳۷۹).

۱-۷-۱- کاربرد گونه‌های وحشی دراصلاح گوجه‌فرنگی

گونه‌های وحشی گوجه‌فرنگی منبع وسیعی از ژن‌هایی با پتانسیل بالا برای بهبود گوجه‌فرنگی‌های زراعی می‌باشند. مشخص شده است که ارقام وحشی گوجه‌فرنگی حاوی TSS بیشتری نسبت به ارقام زراعی هستند، مثلاً *L. chmielewskii* و *L. cheemanii* حاوی ۱۵-۱۰٪ ماده جامد محلول در مقایسه با ٦-٤٪ ارقام زراعی می باشند (قنادها و همکاران، ۱۳۸۲). هم‌چنین برای فرآوری، مقدارpH نیز بسیار مهم است و نباید از ٤/٤ بیشتر شود، به‌طوری‌که معلوم شده است رقم وحشی *L. pimpinellifolium* یک منبع بسیار خوبی از اسیدیته بالا است. از طرفی ارقام دارای میوه‌های ریز و گونه‌های وحشی به‌ویژه *L. peruvianum* و *L. pimpinellifolium* منابع خوبی از اسید اسکوربیک هستند. بسیاری از گونه‌های قدیمی جنس *Lycopersicon* به‌ویژه *L. peruvianum* ،*L. hirsutum* و *L. glandulosum* منبع بسیار مهمی از ژن‌های مقاوم به بیماری‌های مختلف موجود در ژنوتیپ‌های زراعی می‌باشند. اگرچه انتقال و معرفی این ژن‌ها به ژنوتیپ‌های تجاری *L. esculentum* از طریق روش‌های اصلاحی معمول، به دلیل وجود موانع ناسازگاری بالا برای دورگ‌گیری، اغلب با مشکلات جدی همراه است (کااول، ۱۹۹۱). لذا به‌کارگیری روش‌های نوین ازدیاد گیاهی از قبیل کشت بافت می‌تواند برخی از موانعی را که برسر راه بهنژادی یا ازدیاد این گیاه وجود دارد، مرتفع نماید. به‌طورمثال با استفاده از این تکنیک می‌توان هاپلوئیدهای مضاعف، امتزاج پروتوپلاست به‌منظور تولید هیبریدهای غیرجنسی، به‌گزینی سریع و آزمایشگاهی برای عکس‌العمل به تنش‌های محیطی و بیماری‌زایی را انجام داد و از گیاهان با صفت مطلوب موردنظر به تعداد زیاد تولید نمود (جی، کاللو؛ بی، ار برگ؛ ۱۳۷۹).

۱-۸- کشت درون شیشه‌ای گوجه‌فرنگی

باززایی درون شیشه‌ای گوجه‌فرنگی زراعی، به‌دلیل ارزش تجاری این محصول و بالطبع اصلاح بعدی آن از طریق دست‌کاری ژنتیکی لازم و ضروری تشخیص داده شده است (ایوانز، ۱۹۸۹). مطالعات درون شیشه‌ای گوجه‌فرنگی برای اهداف: ۱- انتخاب لاین‌های سلولی برای استرس‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده ۲- توسعه هاپلوئیدها ۳- تولید هیبریدهای بدنی و ٤- تولید انبوه این محصول، صورت گرفته است (فاری و همکاران، ۱۹۹۲).

کشت بافت می‌تواند برای ریزازدیادی درمقیاس زیاد ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی استفاده شود. گوجه‌فرنگی‌ها به‌طور متداول از طریق بذر تکثیر می‌شوند. این گیاه طبیعتاً خودگرده‌افشان است، بنابراین فرآیند تولید بذر هیبریدی آن شامل: اخته کردن و سپس گرده افشانی با دست می‌باشد. این فرآیند (تولید بذر هیبریدی) در شرایط مزرعه، تحت کنترل نیست. از طرفی شرایط غیرقابل پیش‌بینی و نامطلوب آب وهوایی در مزرعه، فرآیند تولید بذر هیبریدی را حتی گران‌تر می‌نماید. بنابراین توسعه یک دستورالعمل کارآمد برای ازدیاد انبوه نهال‌های بذری با کیفیت بالا از طریق کشت بافت گوجه‌فرنگی می‌تواند در تولید با قیمت پایین‌تر هر نهال کمک کند.

۱-۹- جنین‌زایی رویشی

جنین، گیاهی است که در مراحل آغازی تکامل خود می‌باشد. به فرآیند به‌دست آوردن جنین‌ها از بافت‌های رویشی گیاه (بدون امتزاج گامت‌ها)، جنین‌زایی رویشی گفته می‌شود. که دلیل رویشی[1] نامیده شدن این جنین‌ها این است که آنها برخلاف معمول از طریق جنسی به‌وجود نمی‌آیند و منشأ تمایز آنها از سلول‌های رویشی (سوماتیکی) می‌باشد. از طرف دیگر آنها جنین[2] محسوب می‌شوند زیرا از لحاظ ساختمانی و بیوشیمیایی به جنین‌های جنسی شبیه هستند (مشایخی، ۱۳۸٦). جنین‌های رویشی یا مستقیماً روی سطح ریزنمونه و یا به طور غیر مستقیم روی کالوس‌های کشت شده، تشکیل می‌شوند (آروین، ۱۳۸۱). ریزازدیادی از طریق جنین‌زایی رویشی ابزار کارآمدی را برای تولید تعداد زیادی گیاه تراریخته[3] یا برتر، فراهم می‌کند. برای القای جنین‌زایی هورمون‌های گیاهی نقش مهمی دارند، این تنظیم کننده‌ها نه‌تنها برای ورود مجدد سلول به تقسیم میتوز، بلکه برای تعیین مرحله جنین‌زایی نیز ضروری هستند.

1- Somatic 2- Embryo 3- Transgenic