اسکن شد
تاریخ:
اپراتور:

۱۴۴۲۲۴-۲۰۲۲۵۳۸

دانشکده کشاورزی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی – گرایش سبزیکاری

عنوان

تاثیر اکسین و سایتوکینین بر شاخه زایی در ریزنمونه لایه نازک سلولی و هیپوکوتیل در گوجه فرنگی

Effect of auxin and cytokinin on shoot regeneration in two explants of TCL and Hypocotyl in tomato

استادان راهنما

دکتر علیرضا مطلبی آذر

دکتر سعد الله علیزاده

استاد مشاور

دکتر محمد رضا دادپور

پژوهشگر

طاهره فاضلی بهگو

۱۳۸۹/۸/۲

تابستان ۸۹

۱۴۴۲۲۴

تقدیم به پدر و مادر فداکارم و
همسر مهربانم

تقدیر و تشکر:

خداوندا من در کلبه گدایی خویش چیزی دارم که تو در عرش کبریایی خود نداری! من چون تویی دارم! و تو چون خود نداری! پس تو را سپاس می گویم نه به خاطر الطاف وسیعت! بلکه تنها به خاطر خودت ای بیکرانه محبوب.

اکنون که مرحله ای دیگر از راه پر پیچ و خم علم را با موفقیت طی کرده ام بر خود فرض می دانم از تمامی کسانی که مرا در این راه یاری نموده اند تشکر و قدردانی کنم. در ابتدا لازم می دانم:

از اساتید راهنمای ارجمند جناب آقای دکتر علیرضا مطلبی آذر و جناب آقای دکتر سعد الله علیزاده به پاس زحمات بی شائبه ، دلسوزیها و راهنماییهایشان کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

از جناب آقای دکتر محمد رضا دادپور به دلیل مشاوره پایان نامه قدردانی می کنم. از جناب آقای دکتر ناصر مهنا به دلیل تقبل داوری کمال تشکر را دارم.

در اینجا بر خود وظیفه می دانم از پدر و مادر دلسوز و فداکارم که که پیمودن مسیر زندگی جز با دعای خیر مادر و قوت قلب بی شائبه پدر میسر نمی شد قدردانی و تشکر کنم . همچنین از همسر عزیزم که همواره در تمامی مراحل زندگی حامی و همراه من است سپاسگزاری می کنم. از خواهران و برادر مهربانم به دلیل راهنماییها و دلسوزیهایشان در تمام مراحل زندگی خود تشکر می کنم.

از دوستان و همکلاسیهای عزیزم که در طول این دوره افتخار همراهی با ایشان را داشته ام و تحمل سختیها بدون حضور آنها ممکن نبود بسیار سپاسگذارم.

نام خانوادگی: فاضلی بهگو نام: طاهره

عنوان: تاثیر اکسین و سایتوکینین بر شاخه زایی در ریزنمونه لایه نازک سلولی و هیپوکوتیل در گوجه فرنگی

استادان راهنما: دکتر عیرضا مطلبی آذر، دکتر سعد الله علیزاده استاد مشاور: دکتر محمد رضا دادپور

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: مهندسی کشاورزی-علوم باغبانی گرایش: سبزیکاری

دانشگاه: تبریز دانشکده: کشاورزی تاریخ فاغ التحصیلی: تابستان: ۸۹ تعداد صفحات:۸۹

کلمات کلیدی: کالوس زایی- شاخه زایی- لایه نازک سلولی

چکیده

این تحقیق جهت بررسی پاسخهای ریخت زایی ریزنمونه های لایه نازک سلولی هیپوکوتیل و قطعات هیپوکوتیل گوجه فرنگی به غلظتهای مختلف 2ip و IAA انجام شد تا تولید کالوس، شاخساره و ریشه بررسی شود. بذور پس از ضد عفونی، در MS بدون هورمون کشت شدند. ریزنمونه لایه نازک سلولی (TCL) هیپوکوتیل (۰/۳ الی ۰/۵ میلیمتر) و ریزنمونه هیپوکوتیل (۵ الی ۱۰ میلیمتر) در محیط های کشت دارای پنج غلظت 2ip (۰، ۰/۳، ۰/٦، ۰/۹، ۱/۲)میلی گرم در لیتر و سه غلظت IAA (۰، ۰/۳، ۰/٦) میلی گرم در لیتر کشت شدند و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از یک ماه کالوسهای حاوی شاخه به محیط کشت MS فاقد هورمون بازکشت شدند. کالوسهای فاقد شاخه به همان تیمارهای قبلی و سپس به محیط کشت MS فاقد هورمون بازکشت شدند. اختلاف معنی داری بین غلظتهای مختلف 2ip و نوع ریزنمونه از نظر درصد کالوس زایی وجود داشت (p <۰/۰۵). حداکثر درصد کالوس زایی در غلظتهای بالای 2ip مشاهده شد و درصد کالوس زایی در هیپوکوتیل بیشتر از TCL بود. درصد شاخه زایی به طور معنی داری تحت تاثیر اثر متقابل 2ip × IAA× explant قرار گرفت (p <۰/۰۱). حداکثر درصد شاخه زایی در کشت لایه نازک سلولی (٤٤/٤٤ درصد)، در محیط کشت دارای ۰/٦ میلی گرم در لیتر 2ip و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA بدست آمد. در حالی که حداکثر درصد شاخه زایی در کشت هیپوکوتیل (۳٦/٦٦ درصد)، در محیط کشت دارای ۱/۲ میلی گرم در لیتر 2ip و فاقد IAA مشاهده شد. غلظتهای مختلف 2ip تاثیر معنی داری روی وزن تر کالوس داشت (p <۰/۰۱). حداکثر وزن تر کالوس در محیط کشت دارای ۰/٦ میلی گرم در لیتر 2ip به دست آمد. تعداد شاخه در هر کالوس از اثر متقابل 2ip explant× (p <۰/۰۵) متاثر شد. حداکثر تعداد شاخه در هر کالوس در کشت لایه نازک سلولی در محیط های کشت دارای ۰/۳ و ۰/٦ میلی گرم در لیتر 2ip حاصل شد. حداکثر تعداد شاخه در هر کالوس در کشت هیپوکوتیل در محیط کشت دارای ۱/۲ میلی گرم در لیتر 2ip حاصل شد. بازکشت کالوسهای دارای شاخه به محیط کشت فاقد هورمون به افزایش تعداد تعداد شاخه در هر کالوس در لایه نازک سلولی منجر گردید (٦/۵ شاخه) که به طور معنی داری بیشتر از تعداد شاخه تشکیل شده در کالوس حاصل از قطعات هیپوکوتیل (۳/٤) بود. حداکثر تعداد گیاهچه تولید شده در TCL، در محیط کشت دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر 2ip و ۰/٦ میلی گرم در لیتر IAA مشاهده شد. در کشت قطعات هیپوکوتیل حداکثر تعداد گیاهچه در محیط کشت دارای ۱/۲ میلی گرم در لیتر 2ip و فاقد IAA به دست آمد. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از بازکشت کالوسهای فاقد شاخه به همان محیطهای کشت قبلی نشان داد که درصد شاخه زایی فقط تحت تاثیر اثر متقابل 2ip × IAA × explant قرار گرفت (p <۰/۰۵). در ریزنمونه لایه نازک سلولی، حداکثر درصد شاخه زایی (٤۷/۰۲) در محیط کشت دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر 2ip و دارای ۰/٦ میلی گرم در لیتر IAA رخ داد. حداکثر درصد شاخه زایی در کشت قطعات هیپوکوتیل (٤۷/٦۱)، در محیط کشت دارای ۱/۲ میلی گرم در لیتر2ip و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA بود. اثر متقابل

2ip × IAA × explant بر وزن تر کالوس معنی دار بود (p <۰/۰۱). وزن تر کالوس در کشت TCL در محیط کشت فاقد 2ip و دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA حداکثر بود. درحالی که در کشت قطعات هیپوکوتیل، حداکثر وزن تر کالوس در محیط کشت دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر 2ip و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA مشاهده شد. تعداد شاخه به طور معنی داری تحت تاثیر اثر متقابل IAA × explant قرار گرفت (p <۰/۰۵). حداکثر تعداد شاخه تولیدی در کالوس حاصل از کشت لایه نازک سلولی و در کشت قطعات هیپوکوتیل، در ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA به دست آمد. در بازکشت دوم، تعداد شاخه در هر کالوس به طور معنی داری تحت تاثیر نوع ریز نمونه قرار گرفت (p <۰/۰۵). تعداد شاخه تولیدی از کالوسهای حاصل از لایه نازک سلولی ٦/٤٥ شاخه و در قطعات هیپوکوتیل ۳/۲۲ شاخه بود. بیشترین طول شاخساره در محیط کشت فاقد 2ip و دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA و در کشت قطعات هیپوکوتیل در مقایسه با ریزنمونه لایه نازک سلولی بطور معنی داری بیشتر بود. حداکثر تعداد گیاهچه باززایی شده در کشت TCL، در محیط کشت دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر 2ip و ۰/٦ میلی گرم در لیتر و در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت فاقد 2ip و دارای ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA مشاهده شد.

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱-گوجه فرنگی ٤

۱-۲- کشت بافت گوجه فرنگی ٥

۱-۲-۱- کالوس زایی ٦

۱-۲-۲- شاخه زایی ۹

۱-۳- لایه نازک سلولی (TCL) ۱۹

۱-٤- اهداف پژوهش ۲٦

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- ضدعفونی سطحی بذرها و تهیه ریزنمونه ۲۸

۲-۲- تهیه محیط کشت ۲۸

۲-۳- ضدعفونی محیط کشت و پتری دیش ها ۲۹

۲-٤- کشت و بازکشت ریزنمونه ها ۲۹

۲-٥- محیط کشت باززایی شاخه در پتری دیش ۳۰

۲-٦- محیط کشت باززایی ۳۰

۲-۷- محیط کشت القاء ریشه ۳۱

۲-۸- مرحله انتقال گیاهچه ها به گلدان ۳۱

۲-۹- آنالیز داده ها ۳۲

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- فرایند کال زایی و شاخه زایی از لایه نازک سلولی و هیپوکوتیل ۳٤

۳-۲- تجزیه و تحلیل داده های بازکشت اول ٤۰

۳-۲-۱- درصد کالوس زایی در شرایط تاریکی ٤۰

۳-۲-۲- درصد شاخه زایی به ازاء ریزنمونه در شرایط تاریکی ٤۳

۳-۲-۳- درصد شاخه زایی به ازاء کالوس در شرایط تاریکی ٤٦

۳-۲-٤- قطر کالوس در شرایط تاریکی ٤۹

۳-۲-۵- درصد ریشه زایی در شرایط تاریکی ۵۰

۳-۲-٦- وزن تر کالوس در شرایط تاریکی ۵۳

۳-۲-۷- متوسط تعداد شاخه در هر کالوس در شرایط تاریکی ۵٤

۳-۳- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انتقال کالوسهای حاوی شاخه به محیط کشت باززایی ۵٦

۳-۳-۱- تعداد شاخه در هر کالوس تولید شده ۵۷

۳-۳-۲- طول شاخه ۵۸

۳-۳-۳-تعداد گیاهچه تولیدی ۵۸

۳-٤- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از بازکشت کالوسهای فاقد شاخه به همان محیط های کشت در شرایط روشنایی ٦١

۳-٤-١-درصد شاخه زایی از کالوس بازکشت شده در شرایط روشنایی ٦١

۳-٤-٢- قطر کالوس در شرایط روشنایی ٦٢

۳-٤-۳- درصد ریشه زایی در شرایط روشنایی ٦٦

۳-٤- ٤- وزن تر کالوس در شرایط روشنایی ٦٨

۳-٤-٥- متوسط تعداد شاخه تولید شده در هر کالوس در روشنایی ٧١

۳-٥- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انتقال کالوسها به محیط کشت باززایی ٧٢

۳-٥-١- تعداد شاخه در هر کالوس ٧٢

۳-٥-٢- طول شاخه ٧٣

۳-٥-۳- باززایی گیاه ٧٥

تعداد کل گیاهان باززایی شده در دو مرحله ٧٧

نتیجه گیری کلی ٧٩

پیشنهادات ٨١

منابع ٨٢

فصل اول

بررسی منابع

مقدمه

با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، در سالهای اخیر نیاز به مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است. یکی از راههای افزایش مواد غذایی از طریق افزایش تولیدات کشاورزی است. تولید غذا به عنوان اصلی ترین مسئله در جهان مطرح است. گوجه فرنگی پس از سیب زمینی به دلیل کشت و کار آسان به عنوان دومین سبزی رایج در جهان کشت می شود. گوجه فرنگی به دلیل داشتن ویتامین C و مواد معدنی مورد توجه قرار دارد. همچنین گوجه فرنگی به دلیل وجود آنتی اکسیدانت خاصیت ضد سرطان دارد. اولین مطالعه بر روی کشت بافت گوجه فرنگی در سال ۱۹۵٤ توسط نورتون و بول انجام شد (سینک و ری نولد، ۲۰۰٤).

باززایی درون شیشه ای به تعدادی از فاکتورها بستگی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: نوع ریزنمونه، ژنوتیپ، ترکیبات محیط کشت پایه، تنظیم کننده های رشد، مواد جامد کننده، شدت و کیفیت نور، فتوپریود، دما (شی جا و مندل، ۲۰۰۳، بتیا و اشواث، ۲۰۰۸). بیشترین روش استفاده شده برای باززایی در گوجه فرنگی، شاخه زایی از کالوس یا به طور مستقیم از ریزنمونه های برگ و لپه است (کامپتون و ولوس، ۱۹۹۰). در بین گونه های *Lycopersicon*، گونه *L. peravianum* به دلیل اندام زایی و باززایی شاخه از ریشه مورد توجه قرار گرفته است. شاخه زایی از کالوس حاصل از هیپوکوتیل (*L. pimpinellifolium* cv. Wv700)، لپه (*L. esculentum* cv. Uc82)، و نیز سوسپانسیون سلول cv (*L. esculentum*.Lukullus) مشاهده شده است (دوی و همکاران، ۲۰۰۸).

یکی از روشهای مطالعه ریخت زایی استفاده از تکنیک کشت لایه نازک سلولی یا TCL می باشد. سیستم کشت TCL مطالعه سلول شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمی و تغییرات ملکولی که در یک برنامه ریخت زایی ویژه اتفاق می افتد، ممکن می سازد. این روش به مطالعه نحوه ریخت زایی جنین سوماتیکی، شاخه زایی، ریشه زایی کمک می کند (تیکسریا داسیلوا، ۲۰۰۳). برتری سیستم کشت لایه

نازک سلولی طولی این است که، حاوی سلولهای مشابه بوده و می تواند تمام الگوهای ریخت زایی را آغاز کند، اما تنها یک الگو را در هر تیمار نشان می دهد (کیم، ۱۹۸۱). سیستم TCL اجازه جداسازی سلولهای ویژه یا بافت را که بستگی به وضعیت ژنتیکی و اپی ژنتیکی دارد، می دهد. در این ارتباط عوامل موثر بر رشد مانند pH، نور، تنظیم کننده های رشد و افزودنی ها به محیط کشت نیز نقش دارند که منجر به القاء برنامه های ریخت زایی ویژه در شرایط کشت درون شیشه ای می شود (تیکسریا دا سیلوا، ۲۰۰۳).

علی رغم اهمیت گوجه فرنگی و روشهای اصلاح آن متاسفانه در زمینه ریخت زایی از لایه نازک سلولی این گیاه و بهبود فراوانی شاخه زایی آن تحقیقات چندانی انجام نشده است. لذا این تحقیق جهت بررسی پاسخهای ریخت زایی ریزنمونه های لایه نازک سلولی هیپوکوتیل و نیز هیپوکوتیل به غلظتهای مختلف 2ip و IAA انجام شد.

۱-۱-گوجه فرنگی

گوجه فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* Mill. متعلق به جنس *Lycopersicon* و تیره بادمجانیان است. این گیاه در اواسط قرن شانزدهم به اروپا و در قرن هجدهم به آمریکا معرفی شد و امروزه در سراسر جهان کشت می شود .گوجه فرنگی بومی آمریکای مرکزی می باشد و برای اولین بار در مکزیک اهلی شده است و بنابراین قسمت شرقی آند در آمریکای جنوبی مرکز ثانویه آن به حساب می آید. تولید جهانی این محصول ۱۲۹۹۴۲۴۱۶ تن است

گوجه فرنگی گیاه دائمی علفی است، اما معمولاً به عنوان گیاه یکساله در مناطق معتدله کشت می شود زیرا گوجه فرنگی توسط یخبندان از بین می رود (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱). در انواع پابلند، ساقه گوجه فرنگی ابتدا ایستاده، بعد به صورت خزنده درمی آید و بر اثر تماس با خاک تولید ریشه های نابجا می کند. برگهای مرکب و ساقه جوان گوجه فرنگی پوشیده از کرکهای ریز و سفید می باشد ولی با افزایش عمر ساقه، کرکها حذف شده و زاویه دار و خشن می شود. برگ گوجه فرنگی مرکب است که به صورت متناوب روی ساقه قرار دارد. گل گوجه فرنگی کامل بوده و به صورت گل آذین گرزن یک سویه روی ساقه، بین دو گره قرار می گیرد. هر خوشه گل آذین بین چهار تا هشت عدد گل دارد. تعداد گل آذین گوجه فرنگی بسته به رقم گوجه فرنگی بین ۴ تا ۱۰۰ متغیر است. گوجه فرنگی یک گیاه خود گرده افشان بوده و میوه آن سته مرکب است که شکل، اندازه و رنگ آن در ارقام مختلف با یکدیگر کاملاً متفاوت است. تعداد حجره های موجود در میوه بین ۲ تا ۱۵ متغیر می باشد (دانشور، ۱۳۸۳).

گوجه فرنگی آب و هوای گرم را ترجیح می دهد، دمای سرد، (۱۰ درجه سانتیگراد و پایین تر)، جوانه زنی بذر و رشد رویشی را به تاخیر می اندازد، گل انگیزی را کاهش داده و به میوه های رسیده آسیب می رساند. دمای بالا، (بیشتر از ۳۵ درجه سانتیگراد) گل انگیزی را کاهش می دهد و از توسعه طبیعی رنگ میوه جلوگیری می کند. گیاه گوجه فرنگی روز خنثی است، گلدهی آن در روزهای کوتاه و نیز در روزهای بلند اتفاق می افتد. گوجه فرنگی به عنوان یک منبع ویتامین C محسوب می شود و یک میوه گوجه فرنگی با اندازه متوسط، حدود نیمی از نیاز روزانه را تامین می کند. گوجه فرنگی همچنین منبع قابل توجه ویتامین A است. آب گوجه فرنگی شامل ۱۹ اسید آمینه، مخصوصاً اسید گلوتامیک است (دانشور، ۱۳۸۳).

۱-۲- کشت بافت گوجه فرنگی

کشت بافت برای ریزازدیادی، دستورزی ژنتیکی گیاهان، ذخیره ژرم پلاسم و مطالعات ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به کار برده می شود. در طی ۴ دهه اخیر پیشرفتهای قابل توجهی در تکامل تکنیکهای کشت درون شیشه ای انجام شده و در بیش از ۱۰۰۰ گونه متفاوت محصولات به کار برده می شود. پیشرفتهایی در جهت مطالعه فرایندهای متابولیکی مرتبط با باززایی گیاه انجام شده است. با این حال، استاندارد کردن شرایط فیزیکی و شیمیایی برای باززایی درون شیشه ای[1] گیاهان مختلف نیازمند تحقیقات تکمیلی می باشد. باززایی درون شیشه ای به تعدادی از فاکتورها بستگی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: نوع ریزنمونه، ژنوتیپ، ترکیبات محیط کشت پایه، تنظیم کننده های رشد، مواد جامد کننده، شدت و کیفیت نور، فتوپریود، دما (شی جا و مندل، ۲۰۰۳، بتیا و همکاران، ۲۰۰۴). برای انتقال موثر و قابل اطمینان ژن به سلولهای گیاهی، لازم است که فاکتورهای مهمی مانند نوع ژنوتیپ،

---

[1] In vitro

ریزنمونه و محیط کشت که روی باززایی تاثیر می گذارند، مورد مطالعه قرار گیرند (جابین و همکاران، ۲۰۰۵).

اگرچه، اطلاعات وسیعی از ریخت زایی گوجه فرنگی در دسترس است، با این حال تکنیکهایی که بتوانند به مقدار زیاد در تکثیر رقم های تجاری استفاده شوند، تکامل نیافته است (دوی و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۲-۱- کالوس زایی

کشت کالوس و سوسپانسیون سلول به راحتی در ارقام اهلی و وحشی *Lycopersicon* و Solanum انجام شده است. مهمترین فاکتور در ایجاد کشت های کالوس و نگهداری آن ژنوتیپ است. ژنوتیپها به طور متفاوتی به مواد غذایی و تنظیم کننده های رشد (یا بازدارنده ها) در محیط کشت پاسخ می دهند. بهترین ریزنمونه مورد نیاز برای تشکیل کالوس با کیفیت خوب، ریزنمونه نابالغ حاصل از بذرهای جوانه زده یا گیاهان جوان است (سینک و ری نولد، ۲۰۰۴). تشکیل کالوس و باززایی از ریزنمونه های مریستم انتهایی، لپه، ساقه، گلبرگ، برگ، بساک و گل آذین در گوجه فرنگی گزارش شده است (یانگ و همکاران، ۱۹۸۷).

بسیاری از مواد شیمیایی شامل پورین ها و پیریمیدین ها، ویتامین ها، در ترکیب با آنتی اکسیدانت ها و افزودنیهای مکمل مثل زغال فعال در محیط کشت بر کالوس زایی درون شیشه ای تاثیر می گذارند. اغلب این مواد شیمیایی. مواد افزوده شده دیگر که مزایای استفاده از آن افزایش واکنش اندامزایی است، کازیین هیدرولیز شده است (بتیا و اشوث، ۲۰۰۸). ترکیبات هورمونی مختلف برای القاء کالوس و باززایی درون شیشه ای گوجه فرنگی مثل BAP، IAA و IAA، Kin استفاده می شود (چادری و همکاران، ۲۰۱۰). اثرات متقابل بین هورمونهای اکسین و سایتوکینین درکل مراحل نمو گیاه مشخص

شده است. تحقیقات ژنتیکی به سیگنالهای وابسته به اکسین و سایتوکینین درونی محدود شده است. ثابت شده است که اکسین و سایتوکینین رشد گیاه را هم با سیگنالهای مشترک و هم به طور جداگانه تنظیم می کنند (کونن و لاماکس، ۱۹۹۵).

تاثیر هورمونهای NAA و IAA در ترکیب با غلظتهای متفاوت BAP و Kin روی تشکیل کالوس در شش رقم گوجه فرنگی هندی تحقیق شد. حداکثر تشکیل کالوس (بالای ۹۰ درصد) برای همه رقم ها در ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BAP بود. بنابراین، حتی با وجود تفاوتهای ژنتیکی بین رقم ها، می توان از یک محیط کشت واحد برای تشکیل کالوس استفاده کرد (هریش و همکاران، ۲۰۱۰).

به منظور کالوس زایی در گوجه فرنگی رقم Money Marker از ریزنمونه های هیپوکوتیل و قطعات برگ استفاده شد. حداکثر کالوس زایی از هیپوکوتیل در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA، ۲ میلی گرم در لیتر NAA، ۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۴ میلی گرم در لیتر Kin به دست آمد. بیشترین کالوس زایی از قطعات برگ در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA، ۲ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۴ میلی گرم در لیتر Kin به دست آمد (چادری و همکاران، ۲۰۱۰).

تاثیر دو نوع اکسین (NAA, IAA) و سیتوکینین BAP و شرایط کشت (نور، تاریکی) بر تشکیل کالوس در لپه گوجه فرنگی رقم Maskotka و گوجه فرنگی وحشی *L. peravianum* بررسی شده است. وزن، رنگ و ساختار کالوس به ژنوتیپ گوجه فرنگی و شرایط آزمایش بستگی داشت. بهترین محیط کشت برای رقم Maskotka و رقم وحشی *L. peravianum* محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر BAP بود (زپکا، ۲۰۰۶).

تشکیل کالوس از ریزنمونه های لپه و برگ از رقم های گوجه فرنگی Roma و Rio در محیط کشت بدون تنظیم کننده های رشد مشاهده نشد. حداکثر تشکیل کالوس در رقم Roma (۹۴/۴۸) و در رقم Rio (۹۲/۱۵) از کشت لپه در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۲ میلی گرم در لیتر Kin بدست آمد. در ریزنمونه برگ، حداکثر تشکیل کالوس در محیط کشت دارای ۲ میلی گرم در لیتر Kin برای Rio (۸۹/۱۱ درصد) و برای Roma (۸۸/۸۷ درصد) حاصل شد. در ریزنمونه لپه رقم Roma نسبت به رقم Rio کالوس زایی بیشتری حاصل شد، در حالیکه قطعات برگ Rio در مقایسه با Roma به تشکیل کالوس بیشتر واکنش نشان دادند (رازیودین و همکاران، ۲۰۱۰).

کالوس زایی در گوجه فرنگی رقم Omdurman مطالعه شده است. حداکثر تشکیل کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد. در ریزنمونه لپه، حداکثر تشکیل کالوس در محیط کشت MS دارای ۲ یا ۳ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد (عثمان و همکاران، ۲۰۱۰).

دانه گرده بساک سه رقم موتانت نرعقیم گوجه فرنگی و رقم شاهد در معرض چندین فاکتور قرار داده شدند تا کالوس القاء شود. کالوس از بساک در محیط کشت MS، دارای ۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۲/۵ میلی گرم در لیتر Zeatin تشکیل شد (ما و همکاران، ۱۹۹۹).

اثر انواع تنظیم کننده های رشد روی تولید کالوس از ریزنمونه های بساک در گوجه فرنگی رقم IPA-5 مطالعه شده است. در محیط کشت، ۱ میلی گرم در لیتر GA_3، ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP یا ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر NAA استفاده شد. محیط کشت دارای ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر NAA حداکثر کالوس را تولید کرد. هنگامی که کالوسها در محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر

NAA بازکشت شدند باززایی گیاه از طریق اندام زایی غیرمستقیم بهبود یافت (براسیلیرو و همکاران، ۲۰۰۶).

پاسخ به کشت بساک چهار لاین گوجه فرنگی و نتاج حاصل از تلاقی نیمه دیالل[1] بین آنها در سه محیط کشت مورد توصیه برای گوجه فرنگی مورد تجزیه و تحلیل ژنتیکی قرار گرفته است. درصد تشکیل کالوس، میزان باززایی شاخساره و نیز قطر کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر ژنوتیپ برای تمام صفات در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر 2ip معنی دار بود (مطلبی آذر و همکاران، ۱۳۸۴ a).

اثرات پیش تیمار سرما و گرما روی غنچه ها و بساکهای کشت شده در چهار لاین گوجه فرنگی و شش هیبرید حاصل از آنها در سه محیط کشت بررسی شده است. حداکثر درصد کالوس زایی و قطر کالوس در بساکهای پیش تیمار نشده که در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر 2ip کشت شده بودند، مشاهده شد (مطلبی آذر و همکاران، ۱۳۸۴ b).

۱-۲-۲- شاخه زایی و باززایی گیاه

برای اولین بار در سال ۱۹۵۴ باززایی شاخه از کالوس ریزنمونه های ریشه *L. Peravianum* از طریق انتقال بافت کالوس تشکیل شده در محیط کشت White به محیط کشت Gauthere انجام شد (سینک و ری نولد، ۲۰۰۴). قابلیت باززایی گوجه فرنگی درون شیشه ای عامل محدود کننده برای انتقال ژنتیکی موثر است. اگرچه، قابلیت باززایی درون شیشه ای می تواند از گونه های وحشی *Lycopersicon* به گوجه فرنگی منتقل شود. قابلیت باززایی زیاد در ژنوتیپ MSK از *L .peravianum* به دست آمده است. در یک آزمایش، قابلیت اندام زایی زیاد از ژنوتیپ MSK به رقم Micro-Tom انتقال داده شد.

[1]- Semi diallel

هنگامی که هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه انتخاب شد، گیاهان MSK F6 به دست آمد که قابلیت باززایی برتری نسبت به Micro-Tom داشتند (لیما و همکاران، ۲۰۰۴).

بیشترین روش استفاده شده برای باززایی در گوجه فرنگی شاخه زایی از کالوس، یا مستقیم از ریزنمونه های برگ و لپه یا لایه های نازک سلولی گل آذین است (کامپتون و ولوس، ۱۹۹۰). در بین گونه های *Lycopersicon*، گونه *L. peravianum* به دلیل اندام زایی و باززایی شاخه از ریشه مورد توجه قرار گرفته است. شاخه زایی از کالوس حاصل از هیپوکوتیل (*L. pimpinellifolium* cv. Wv700)، لپه (*L. esculentum* cv. Uc82) و نیز سوسپانسیون سلول (*L. esculentum* cv Lukullus) مشاهده شده است (دوی و همکاران، ۲۰۰۸).

کالوس حاصل از کشت میانگره، باعث باززایی *L. esculentum* Mill و *L. peravianum* (L). شده است. نتایج آزمایشات متفاوت با فیتوهورمونها نشان دهنده یک اکسین درونی زیاد در ریزنمونه حاصل از ساقه *L. peravianum* بود. *L. esculentum* در محیط کشت دارای Zeatin یا شیره نارگیل باززایی شد. ریزنمونه های پیش تیمار شده با CCC (۲- کلرو اتیل تری متیل–آمونیوم کلرید) افزایش معنی داری در تشکیل شاخه در مقایسه با انواع تیمار نشده نشان دادند. بافت کالوس با بیش از دو سال سن و ۳۰ بار بازکشت هنوز قابلیت تولید شاخه و ریشه را داشت (لانگ و بزویجن، ۱۹۷۶).

ریزنمونه های هیپوکوتیل از چهار رقم گوجه فرنگی با طول ۱۰ میلی متر، دو هفته بعد از کشت بذر در محیط کشت MS دارای یا فاقد BAP حاصل شد. ریزنمونه های هیپوکوتیل در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد یا در محیط های کشت دارای ۵، ۱۰، ۲۰ یا ۴۰ میلی مول در لیتر BAP بازکشت شدند. شاخه زایی در همه تیمارها، حتی در هیپوکوتیل های دانهال های رشد یافته در محیط کشت پایه و محیط کشت بازکشت بدون تنظیم کننده رشد حاصل شد. ریزنمونه های دانهالهای رشد یافته در محیط

کشت دارای BAP حداکثر باززایی را هنگام بازکشت در محیط کشت شامل BAP داشتند (فیلیپ و همکاران، ۱۹۹٦).

تمایزیابی شاخه و انتقال این قابلیت به هیبریدها در گوجه فرنگی درون شیشه ای مطالعه شده است. بیشتر نتایج با ریزنمونه های هیپوکوتیل به دست آمد. بیشترین تشکیل شاخه در محیط کشت دارای IAA و IPA[1] مشاهده شد، اما میزان تغییر غلظت این تنظیم کننده های رشد به لاینها و هیبریدها و به ریزنمونه های تیمار شده (هیپوکوتیل و برگ) و به موقعیت ریزنمونه روی این اندامها بستگی دارد. قابلیت اندامزایی هیپوکوتیلهای (تعداد شاخه به ازاء هر ریزنمونه) دو لاین و هیبریدهای F_1 آنها، توسط تنظیم کننده های رشد خارجی تغییر کرد (اوکی و همکاران، ۱۹۷۸).

تاثیر تنظیم کننده های مختلف رشد بر رشد و باززایی ریزنمونه های حاصل از لپه و هیپوکوتیل دانهالهای گوجه فرنگی مطالعه شد. در رابطه با فراوانی باززایی، تعداد پریموردیای شاخه و تعداد شاخه به ازاء هر ریزنمونه، حداکثر باززایی در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر Zeatin و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA به دست آمد. در همه ژنوتیپهای مطالعه شده، باززایی هنگام استفاده از ریزنمونه لپه ۱۰۰ درصد بود (گوبیس، ۲۰۰٤).

باززایی گوجه فرنگی با استفاده از ریزنمونه های هیپوکوتیل، برگ و قطعات لپه مطالعه شده است. از انواع مختلف کالوس به دست آمده، فقط کالوس سبز فشرده و کالوس گره دار شاخه فراوان تولید کرد. شاخه زایی در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر Kin حاصل شد. شاخه های تشکیل شده همچنین در محیط کشت مشابه با محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد، طول زیادی داشتند. حداکثر شاخه باززایی شده در ریزنمونه های لپه، ۱۰ در ریزنمونه های هیپوکوتیل میانگین

[1]- Indol piruic acid