دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره اول، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

بررسی جنین‌زایی رویشی دو رقم تجاری و خودروی گوجه‌فرنگی در محیط‌های کشت بافت مختلف

مینا پیری‌زیرکوهی[۱]، *کامبیز مشایخی[۲]، بهنام کامکار[۳]، خدایار همتی[۴] و فهیمه وحدت‌پور[۱]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

چکیده

جنین‌زایی رویشی ابزار کارآمدی است که جهت تولید تعداد زیادی گیاهان برتر یا تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌منظور بررسی جنین‌زایی رویشی دو رقم تجاری[۱] و خودروی[۲] گوجه‌فرنگی در سه محیط کشت مختلف و با هدف مشخص نمودن محیط غذایی و اندام‌های مناسب جهت کشت بافت این گیاه، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و آرایش فاکتوریل در چهار تکرار انجام شد. در این آزمایش قطعاتی از محور زیر لپه و ریشه نهال‌های بذری رشد یافته درون شیشه گوجه‌فرنگی، در سه محیط کشت مایع B5، MS و NL کشت شدند. پس از انتقال نمونه‌های مورد کشت از محیط القایی و حاوی اکسین به محیط‌های بدون اکسین، جنین‌زایی رویشی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخلاف محیط کشت NL که در آن هیچ جنینی مشاهده نشد، اما میزان جنین‌زایی رویشی به‌طور معنی‌داری در محیط کشت B5 بیشتر از MS بود. هم‌چنین مشخص شد که رقم خودرو نسبت به رقم تجاری افزایش معنی‌داری در تولید جنین رویشی دارد. نتایج مربوط به اثرات

* مسئول مکاتبه: kambizm@yahoo.com

1- *Lycopersicon Esculentum* v. Red Cloud
2- *Lycopersicon Esculentum* v. Carasiform

متقابل نیز نشان داد که بین رقم و محیط کشت در سطح احتمال ۱ درصد و بین رقم و ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد، اثر متقابل وجود دارد. با توجه به نقش مهم مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت بر جنین‌زایی رویشی، تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ گرم در لیتر) بر این پدیده، در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مناسب‌ترین غلظت جهت جنین‌زایی رویشی این گیاه، غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکارز می‌باشد. هدف از بررسی حاضر تعیین بهترین شرایط کشت و مناسب‌ترین اندام و هم‌چنین مقایسه رفتارهای دو گونه وحشی و اهلی گیاه گوجه‌فرنگی در کشت بافت این گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی رویشی، گوجه‌فرنگی، ریزنمونه، محیط کشت، ژنوتیپ، ساکارز

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Millr.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده سیب‌زمینی[1] است که در سراسر جهان کشت می‌شود. این گیاه بومی آمریکای‌جنوبی و مکزیک می‌باشد. تمام گونه‌های جنس آن دیپلوئیدهای علفی یک‌ساله، با ٢٤ کروموزوم غیرجنسی (۲n=۲x=۲٤) هستند (عرشی، ۲۰۰۰). باززایی درون شیشه‌ای گوجه‌فرنگی به‌دلیل ارزش تجاری این محصول و بالطبع اصلاح آن از طریق دست‌کاری ژنتیکی لازم و ضروری است. جنین‌زایی رویشی نیز که به فرآیند به‌دست آوردن جنین از بافت‌های رویشی گیاه (بدون امتزاج گامت‌ها) گفته می‌شود، یکی از کارآمدترین روش‌ها برای مطالعات مربوط به تولید گیاهان تراریخته (دست‌ورزی شده ژنتیکی) می‌باشد (نیومن و همکاران، ۱۹۹٦؛ لیتز و گری، ۱۹۹۵).

عواملی چون خصوصیات ژنوتیپی گیاه و مرحله نموی[2] گیاهانی که از آن‌ها ریزنمونه گرفته می‌شود و نیز موقعیت سلول‌ها در بافت گیاهی کشت شده، در پتانسیل جنین‌زایی رویشی آن‌ها دخیل می‌باشند. به‌عنوان مثال شارما و راجام (۱۹۹۵) در آزمایش خود برروی گیاه بادنجان نشان دادند که ژنوتیپ و نوع ریزنمونه استفاده شده اثرات معنی‌داری بر جنین‌زایی رویشی این گیاه دارد. به عقیده گریب و همکاران (۱۹۹۷)، مهم‌ترین عامل مؤثر در تفاوت بین کشت‌های جنین‌زا و غیرجنین‌زا،

1- Solanaseae
2- Developmental Stage

اختلاف آن‌ها از نظر سطوح هورمون درون‌زا می‌باشد، به‌طوری‌که ایوانف و همکاران (۱۹۹٤) نیز نشان دادند که بین توانایی پاسخ به تیمار القای توفوردی و سطوح IAA درون‌زا، ارتباط مثبتی وجود دارد.

از عوامل مؤثر دیگر بر جنین‌زایی رویشی، ترکیب محیط کشت می‌باشد. از جمله ترکیبات محیط کشت می‌توان ازت را نام برد که اشکال مختلف آن در جنین‌زایی رویشی نقش مهم و سرنوشت‌سازی ایفا می‌کنند (مشایخی، ۲۰۰۰). براساس تحقیقات انجام شده توسط هالپرین و وترل (۱۹٦۵) تنها ازت به شکل احیا شده و به‌صورت آمونیوم جهت القای جنین‌های رویشی لازم و ضروری بوده و در محیط کشت فاقد آن، فقط توده‌های سلولی ریشه‌دار تولید می‌شود (هالپرین، ۱۹۹۵)، در حالی‌که راینرت و تازاوا (۱۹٦۹) معتقدند که نیترات نیز در القای جنین‌زایی رویشی نقش مثبتی داشته و به عقیده آن‌ها نوع ازت به‌صورت احیا یا غیراحیا در جنین‌زایی رویشی نقشی نداشته و تنها غلظت ازت موجود در محیط کشت است که نقش تعیین‌کننده‌ای در جنین‌زایی رویشی دارد. پاتریسیا و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که بهترین ترکیب محیط کشت برای جنین‌زایی رویشی گیاه فلفل محیطی است که در آن از ۹/۰۵ میکرومولار 2,4-D استفاده شده باشد. یکی از دلایلی که بیشتر محققان در آزمایش‌های جنین‌زایی از 2,4-D به‌عنوان بهترین ماده مؤثر در القای جنین‌زایی رویشی استفاده می‌کنند، ثبات و ماندگاری زیاد این تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط کشت می‌باشد (نیومن، ۱۹۹۵)، در حالی‌که اکسین ایندول استیک اسید در محیط کشت توسط فتواکسیداسیون به سرعت از بین رفته و از سیستم حذف می‌گردد، در نتیجه IAA مدت زمان لازم جهت القای جنین‌زایی رویشی را فراهم نمی‌آورد (لاد و همکاران، ۱۹۹۷). به‌نظر می‌رسد حضور اکسین، سبب یک‌سری تغییرات بیوشیمیایی درون سلولی می‌شود. تغییر در بیان ژن‌هایی مشخص که در توده‌های سلولی پیش‌جنینی قرار دارند (به واسطه افزایش احتمالی متیلاسیون DNA)، از جمله این موارد به‌شمار می‌رود. این تغییر موجب فعالیت ژن‌هایی خاص در توده‌های پیش‌جنینی می‌شود که برای تولید جنین کروی لازم هستند. اما نکته مهم این است که حضور مداوم برخی از این ژن‌های موجود در توده‌های جنینی سبب می‌شوند که از ظهور و تکوین جنین‌های رویشی ممانعت گردد و در نتیجه با حذف اکسین از محیط کشت می‌توان سبب غیرفعال شدن این ژن‌های بازدارنده شد و لذا برنامه جنین‌زایی را تداوم بخشید (زیمرمن، ۱۹۹۳). به‌عنوان مثال تویفورد و مانتل (۱۹۹٦) توانستند در سلول‌های ریشه یک نوع یام[1] توده‌های سلولی پیش‌جنین‌زا را در محیط القایی موراشیگ و اسکوگ تغییر یافته حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

1- *Dioscorea Alata L."Oriental Lisborn*

ایجاد کنند، ولی تبدیل این توده‌های سلولی پیش‌جنین‌زا به جنین‌های رویشی تنها پس از انتقال آن‌ها به محیط کشت بدون توفوردی صورت گرفت.

شرایط ویژه محیط‌های کشت مانند میزان تراکم سلول‌ها و فشار اسمزی درون آن‌ها، که قسمتی تحت‌تأثیر میزان قند موجود در محیط کشت می‌باشند، نیز می‌تواند بر جنین‌زایی رویشی اثر تحریک‌کننده داشته باشد. از طرف دیگر با توجه به این‌که ریزنمونه‌های مورد کشت پس از جدا شدن از گیاه مادری، دیگر خودساز نیستند، لذا کربوهیدرات‌های موجود در محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار می‌گردند. از طرفی نوع کربوهیدراتی که در ترکیب محیط‌های کشت بافت به‌کار می‌رود تنها عامل تعیین‌کننده نیست، بلکه مقدار و غلظت این مواد نیز می‌تواند اثرات عمیقی بر چگونگی رشد مواد گیاهی موجود و رفتار آن‌ها از لحاظ جنین‌زایی رویشی داشته باشد (مرکل و همکاران، ١٩٩٥؛ لیتز، ١٩٨٦؛ آرنولد، ١٩٨٧). به‌نظر می‌رسد غلظت ساکارز محیط کشت علاوه‌بر نوع گیاه، تابع اندامی که نمونه از آن گرفته شده است نیز می‌باشد (تاکامورا و میاجیما، ١٩٩٧).

در بعضی از موارد نیز در محیط‌های کشت جنین‌زایی رویشی، ساختارهایی مشاهده می‌شوند که ضمن داشتن شباهت به جنین‌ها، دارای شکل عادی نیستند و در حقیقت همان جنین‌های رویشی هستند که به‌طور غیرعادی تکامل یافته‌اند و از آن‌ها به‌عنوان امبریوئید[1] نام برده می‌شود. بنا به تشخیص محققان، تشکیل این شکل از جنین و عدم تکامل آن نه تنها به مقدار زیاد اکسین داخلی، بلکه به سطح بالای ABA در محیط کشت نیز بستگی دارد (جان و همکاران، ١٩٩٥).

مواد و روش‌ها

ابتدا بذور دو رقم تجاری و خودروی گوجه‌فرنگی در شرایط استریل برروی آگار در شیشه کشت شدند. بدین شکل که ضدعفونی بذرها با استفاده از الکل ٧٠ درصد (٣٠ ثانیه)، سپس محلول وایتکس ٦٠ درصد به همراه ٢ قطره توین (٢٠ دقیقه) انجام شد، سپس بذور پس از شستشو با آب مقطر استریل در محیط جامد کشت شده و در دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد در اتاق رشد با روشنایی دائم (٢٠٠٠ لوکس) نگهداری شدند. پس از گذشت ٤ هفته، ریزنمونه‌های محور زیرلپه و ریشه از نهال‌های بذری دو رقم تجاری و خودروی گوجه‌فرنگی گرفته شده و در محیط‌های القایی حاوی اکسین کشت شدند. لازم به ذکر است که اکسین استفاده شده در محیط‌های کشت B5 و MS،

1- Embryoid

توفوردی با دو غلظت به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، در حالی‌که در محیط کشت NL از اکسین IAA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید (مشایخی، ۲۰۰۷). جهت جدا شدن آگار از ریشه‌ها، ریشه‌ها به‌مدت چند دقیقه داخل آب مقطر استریل قرار گرفتند. سپس ظروف کشت شده به دستگاه آکسوفیتون استوارد با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و نور دائم منتقل شدند. مشاهده نمونه‌ها از نزدیک هر هفته یک بار صورت گرفته و تغییرات مورفولوژیکی شامل جنین‌زایی، ریشه‌زایی و تولید امبریوئید ثبت شد. عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های بدون اکسین[1] جهت ظهور جنین‌ها پس از چهار هفته انجام گرفت. جهت حذف کامل اکسین، ریزنمونه‌ها قبل از کشت، در محیط‌های مشابه بدون اکسین در سه مرحله به فواصل ۳، ۵ و ۷ دقیقه شستشو شدند (مشایخی، ۲۰۰۰). پس از گذشت مدت ٦ هفته، با استفاده از دستگاه استریئوسکوپ از نمونه‌ها و جنین‌های رویشی تولید شده، عکس‌برداری شد و تعداد جنین‌های رویشی تولید شده، تعداد امبریوئید و نیز تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده، یادداشت‌برداری گردید.

داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری نرمال شدند. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل صورت گرفت. تجزیه واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برروی کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (سلطانی، ۱۹۹۸) و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. در این تحقیق با توجه به استفاده از سه محیط کشت مورد استفاده، تنها در دو محیط کشت B5 و MS تولید جنین رویشی صورت گرفت، در حالی‌که در محیط کشت NL هیچ جنینی مشاهده نشد. در نتیجه در تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از محیط کشت NL صرف‌نظر شد.

جهت مشخص شدن غلظت بهینه ساکارز بر جنین‌زایی رویشی این گیاه در آزمایش جداگانه‌ای، از چهار غلظت مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ گرم در لیتر) ساکارز استفاده گردید. در این بخش از آزمایش محیط کشت B5 که در مرحله قبلی بهترین پاسخ را به جنین‌زایی رویشی داده بود مورد استفاده قرار گرفت و همچنین محور زیرلپه به‌عنوان ریزنمونه انتخاب شد. عمل واکشت ریزنمونه‌ها نیز پس از شستشوی ریزنمونه‌ها با محیط کشت جدید فاقد اکسین صورت گرفت. شمارش مواد گیاهی به‌وجود آمده، عکس‌برداری از جنین‌ها و آنالیز آماری داده‌ها نیز مانند مراحل قبلی انجام شد.

1- Realization

نتایج و بحث

جنین‌زایی رویشی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس به روشنی نشان داد که اثر دو عامل ژنوتیپ (عامل A)، نوع محیط کشت (عامل C) و اثر متقابل آن‌ها بر جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی کاملاً معنی‌دار است (جدول ١). نتایج مشابهی توسط شارما و راجام (١٩٩٥) که جهت جنین‌زایی رویشی از ژنوتیپ‌های مختلف بادنجان استفاده کردند، گزارش شد. هم‌چنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نوع بافت مورد کشت تأثیر معنی‌داری بر جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی ندارد.

جدول ١- جدول آنالیز واریانس براساس میانگین مربعات به‌دست آمده برای جنین‌زایی رویشی.

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد جنین رویشی	تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده	تعداد امبریوئید
رقم	١	٧٠/٢١**	٢/٧١**	٣٦/١٢ **
بافت	١	٠/٦١ns	٠/٠٢ns	٠/١٢ns
محیط	١	١١٣/٢٥**	١/٤٩**	٢١/١٢**
رقم × بافت	١	٨/٦١*	٠/١٦*	٢/٠٠*
رقم × محیط	١	٣٨/٧٢**	٠/٠٧ns	٢/٠٠*
محیط × بافت	١	٤/٩٦ns	٠/١٤*	٢/٠٠*
رقم× محیط× بافت	١	١/١٢ns	٠/٠١ns	٠/١٢ns
خطا	٢٤	١/١٨	٠/٠٣	٠/٤١
C.V. (درصد)		١٥/٥١	٩/٣٣	١٧/٨١

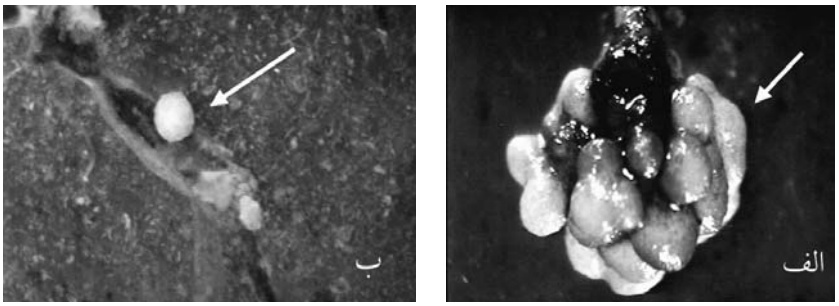
*معنی‌دار در سطح احتمال ٠/٠٥، **معنی‌دار در سطح احتمال ٠/٠١، nsغیرمعنی‌دار.

نتایج نشان داد که بین دو رقم مورد گوجه‌فرنگی مورد مطالعه، بیشترین جنین‌زایی رویشی مربوط به رقم خودرو می‌باشد. هم‌چنین مشخص گردید که در مقایسه با محیط کشت MS، محیط کشت B5 از توانایی القاء جنین‌زایی رویشی بالاتری بر روی این گیاه برخوردار است (جدول ٢ و شکل ١).

جدول ۲- جدول مقایسه میانگین‌های مربوط به جنین‌زایی رویشی در دو رقم خودرو و تجاری گوجه‌فرنگی در دو بافت هیپوکوتیل و ریشه دو محیط کشت MS و B5.

منابع تغییر		تعداد جنین رویشی
رقم	خودرو	۸/۵۰۶۳[a]
	تجاری	۵/۵۴۳۸[b]
بافت	هیپوکوتیل	۶/۸۸۷۵[a]
	ریشه	۷/۱۶۲۵[a]
محیط	MS	۵/۱۴۳۸[b]
	B5	۸/۹۰۶۳[a]

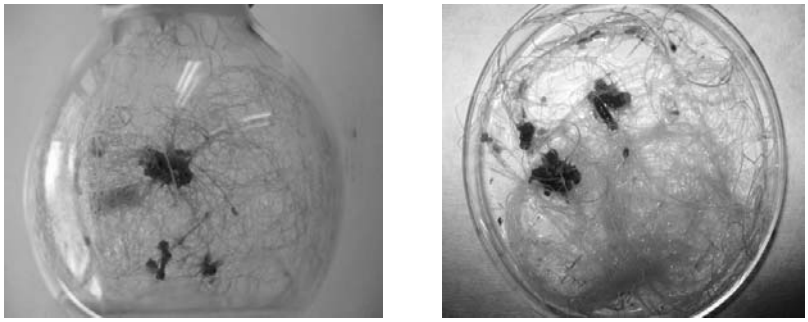
* میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۱- الف) جنین‌های رویشی رقم خودروی گوجه‌فرنگی در محیط کشت B5،
ب) جنین رویشی رقم تجاری در محیط کشت MS.

تولید جنین رویشی بیشتر در رقم خودرو را می‌توان به شرایط درونی ژنوتیپ از جمله سطوح هورمون‌های داخلی نسبت داد. به‌طوری‌که در آزمایش حاضر، رقم خودرو علایم بالا بودن میزان اکسین داخلی را در لوله آزمایش از خود نشان داد. بدین‌صورت که ریزنمونه‌های کشت شده این رقم حتی در محیط‌های کشت بدون تنظیم‌کننده رشد نیز مقدار زیادی ریشه نابجا تولید نمودند (شکل ۲)، لذا به‌نظر می‌رسد که ارقام وحشی این گیاه میزان اکسین درونی زیادی دارند. سطوح بالای هورمون درون‌زا نقش مهمی در جنین‌زایی رویشی بازی می‌کنند، زیرا آن‌ها فرآیندهای تمایزیابی ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت را تنظیم می‌کنند. به این علت تصور می‌شود که تفاوت اصلی بین ژنوتیپ‌ها از نظر جنین‌زایی مربوط به درجات متفاوت قابلیت آن‌ها از این نظر باشد (نیومن، ۱۹۹۵). این مطلب موافق با

نظریه ایوانف و همکاران (۱۹۹٤) است، زیرا این محققان گزارش نمودند که رابطه مثبتی بین توانایی پاسخ به تیمار القای توفوردی و سطوح IAA درون‌زا وجود دارد.



شکل ۲- ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده رقم خودرو در محیط‌های کشت بدون تنظیم‌کننده رشد.

ترکیب محیط کشت از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر دیگر بر جنین‌زایی رویشی می‌باشد. لازم به توضیح است که در این آزمایش از محیط‌های کشت پایه پیشنهاد شده توسط محققان مربوطه جهت جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی استفاده شده است (مشایخی، ۲۰۰۷). نتایج بررسی حاضر نشان داد که در محیط کشت NL که در آن از تنظیم‌کننده رشد IAA استفاده شد، هیچ جنین‌زایی صورت نگرفت و تنها در دو محیط دیگر که حاوی 2,4-D بودند، این پدیده اتفاق افتاد. این مسأله می‌تواند به‌دلیل ثبات و پایداری 2,4-D و عدم ثبات IAA در محیط کشت باشد، که با نتایج لاد و همکاران (۱۹۹۷) هم‌خوانی دارد. هم‌چنین در این آزمایش مشخص شد که میزان 2,4-D موجود در محیط کشت B5 علی‌رغم این‌که در مقایسه با محیط کشت MS کمتر است، اما برای جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی کافی می‌باشد. البته تفاوت در تعداد جنین‌های رویشی را تنها نمی‌توان به غلظت 2,4-D نسبت داد، بلکه مواد دیگر موجود در محیط کشت نیز می‌توانند در این خصوص نقش داشته باشند. به‌عنوان مثال می‌توان از ترکیبات ازته نام برد، به‌طوری‌که در سه محیط کشت مورد آزمایش غلظت‌های مختلفی از انواع ازت نیتراتی و آمونیومی استفاده می‌شود. در محیط کشت NL ازت به فرم آمونیومی استفاده نشده است و میزان ازت نیتراتی آن نیز بسیار کمتر از دو محیط دیگری است که در آن‌ها جنین‌زایی رویشی ایجاد شده است. لازم به توضیح است که در محیط B5 نیز ازت آمونیومی وجود ندارد، ولی جنین‌زایی رویشی صورت گرفته است، بنابراین نتایج ما مغایر با نتایج تحقیقات هالپرین و

ودرل (۱۹٦۵) است که بیان داشتند تنها ازت به فرم احیا شده و در قالب آمونیوم جهت القای جنین‌زایی رویشی لازم و ضروری است. از طرفی نتایج آزمایش ما با نتایج راینرت و تازاوا (۱۹٦۹) که معتقدند نیترات نیز در جنین‌زایی رویشی نقش مثبتی داشته و در کل این غلظت ازت موجود در محیط کشت و نه نوع آن است که در جنین‌زایی رویشی مؤثر است، مطابقت دارد. این مسأله در نتایج به‌دست آمده توسط مشایخی (۲۰۰۰) نیز دیده می‌شود. وی به این نتیجه رسید که ازت نیتراتی نیز می‌تواند سبب القای جنین‌زایی رویشی در دمبرگ هویج گردد. از طرفی وی معتقد است که شکل‌های مختلف ازت تنها می‌توانند بر روند تکامل بعدی جنین‌های رویشی اثر بگذارد. در این پژوهش علاوه‌بر تولید جنین رویشی در محیط‌های کشت، ریشه و امبریوئید نیز تولید شدند. با توجه به این‌که ریشه و امبریوئید تنها در دو محیط کشت MS و NL تشکیل شدند، در نتیجه در تجزیه و تحلیل داده‌های مربوطه، از محیط کشت B5 استفاده نشد.

ریشه‌زایی: نتایج نشان داد که بین دو رقم تجاری و خودرو و نیز دو محیط کشت MS و NL، از لحاظ ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- جدول مقایسه میانگین‌های مربوط به ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده و امبریوئیدهای تولید شده در محیط‌های کشت جنین‌زایی رویشی*.

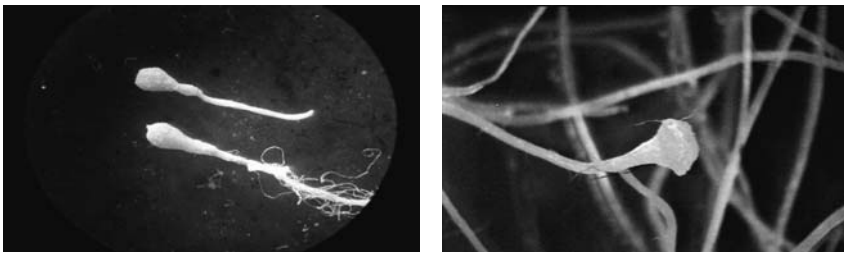
منابع تغییر		تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده	تعداد امبریوئید
رقم	خودرو	۲/۱٤[a]	٤/٦۹[a]
	تجاری	۱/۵٦[b]	۲/۵٦[b]
بافت	هیپوکوتیل	۱/۸۲[a]	۳/۵٦[a]
	ریشه	۱/۸۷[a]	۳/٦۹[a]
محیط	MS	۱/٦۳[b]	۲/۸۱[b]
	NL	۲/۰٦[a]	٤/٤٤[a]

*اعداد داخل جدول، جذر اعداد اصلی می‌باشند.

براساس نتایج پیش‌گفته، می‌توان میزان ریشه‌زایی زیاد رقم خودرو را به تفاوت ژنوتیپ‌ها در میزان هورمون‌های داخلی آن‌ها از جمله بالا بودن مقدار اکسین درونی در این رقم نسبت داد. از طرفی دیگر بایستی عنوان نمود که بین محیط‌های کشت به‌کار رفته از نظر نوع و غلظت ترکیبات مختلف مانند

ازت اختلاف وجود دارد. به‌عنوان مثال در تحقیقی برروی محیط کشت سلولی هویج معلوم شد که در محیط کشت حاوی ازت احیا شده جنین‌های رویشی به وجود آمدند، در حالی‌که در محیط کشت فاقد آن توده‌های سلولی ریشه‌دار تولید گردید (هالپرین، ۱۹۹۵)، که حالتی شبیه به افزایش اکسین داخلی می‌باشد. این موضوع در نتایج این بررسی در محیط NL که تنها حاوی ازت به فرم نیتراتی است، صدق می‌کند، زیرا ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه در این محیط تولید توده‌های ریشه نابجای فراوانی نمودند، بدون این‌که جنینی تولید گردد.

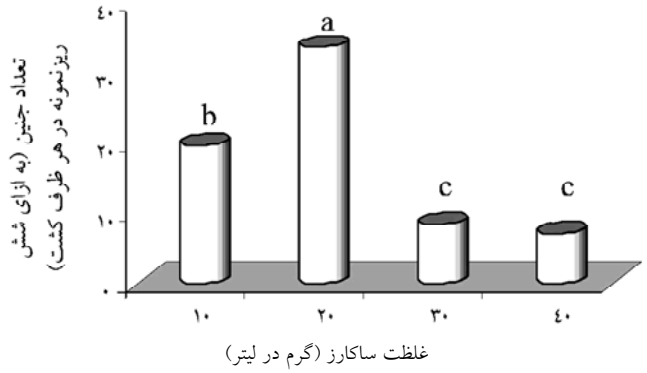
تولید امبریوئید: نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که بین دو رقم تجاری و خودرو و نیز دو محیط کشت MS و NL، از لحاظ تولید امبریوئید تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۳ و شکل ۳).



شکل ۳- امبریوئیدهای تولید شده در محیط کشت NL.

به‌نظر می‌رسد رقم خودرو با استفاده از سطح اکسین درونی بالایی که دارد سبب القای جنین‌های رویشی فراوانی در ریزنمونه‌های کشت شده گردیده است، اما این جنین‌های القا شده به دلایل مختلف نتوانسته‌اند تکامل عادی یافته و به شکل امبریوئید در محیط ظاهر شده‌اند. به‌نظر می‌رسد که عامل ممانعت‌کننده تکامل آن‌ها، بالا بودن سطح ABA داخلی در این ریزنمونه‌ها در حضور اکسین درونی بالا باشد، که با نتایج جان و همکاران (۱۹۹۵) هم‌خوانی دارد. از طرفی غلظت ازت موجود در محیط کشت نقش مهمی در جنین‌زایی رویشی دارد. حال این که غلظت ازت در محیط NL کم می‌باشد و هم‌چنین این محیط کشت فاقد ازت آمونیومی می‌باشد که در تکامل جنین‌های رویشی نقش به‌سزایی دارد، در نتیجه جنین‌های القاء شده در اثر IAA تمایز نیافته و به فرم ساختارهای امبریوئیدی ظاهر شده‌اند، که با نتایج مشایخی (۲۰۰۰) مبنی بر نقش مؤثر ازت آمونیومی بر تکامل جنین‌های رویشی مطابقت دارد.

تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر جنین‌زایی رویشی: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز تأثیر بسیار معنی‌داری بر میزان جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین غلظت ساکارز جهت القاء جنین‌زایی رویشی در ریزنمونه‌های محور زیرلپه این گیاه، ۲۰ گرم در لیتر بود، به‌طوری‌که بیشترین تعداد جنین رویشی در محیط کشت تکمیل شده با این غلظت ساکارز به‌دست آمد (شکل ٤)، که از این لحاظ شبیه به گیاه هویج می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۷). نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از آن است که غلظت کمتر ساکارز (۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر)، جهت جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی مناسب‌تر است. این نتایج با گزارش ارایه شده توسط لیتز (۱۹۸٦) مبنی بر این‌که غلظت‌های بالای هیدرات کربن در محیط کشت، سبب تحریک جنین‌زایی رویشی در کشت‌های تعلیقی خربزه درختی می‌گردد، تناقض دارد. از طرفی طبق آزمایش‌های مختلف صورت گرفته توسط بسیاری از دانشمندان، مشخص شده که همیشه غلظت‌های بالای هیدرات‌های کربن، تحریک جنین‌زایی رویشی را سبب نشده است. به‌عنوان مثال آرنولد (۱۹۸۷)، ثابت کرد که آغازش جنین‌زایی رویشی در کشت‌های درخت نوئل در غلظت ۱ درصد ساکارز بهتر از غلظت‌های بالاتر آن می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر مطابقت دارد.



شکل ٤- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان جنین‌زایی رویشی.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج جنین‌زایی رویشی نشان داد که محیط کشت B5 برای جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی مناسب‌تر از دو محیط کشت دیگر یعنی محیط کشت‌های MS و NL می‌باشد و بهترین

ژنوتیپ برای این منظور نیز رقم خودروی آن تشخیص داده شد. نتایج مشخص نمود که بین ریزنمونه‌های محور زیرلپه و ریشه این گیاه نیز اختلاف معنی‌داری از نظر جنین‌زایی رویشی وجود ندارد. هم‌چنین مشخص شد که غلظت‌های پایین‌تر ساکارز به‌خصوص غلظت ۲۰ گرم در لیتر آن، جهت جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی مناسب‌تر است.

منابع

1.Arnold, S.V. 1987. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies*(L.) Karst. J. Plant Physiol. 128: 233-244.

2.Arshi, Y. 2000. Genetic improvement of vegetable crops. JDM Press, 725p. (In Persian)

3.Grieb, B., Schfer, F., Imani, J., Mashayekhi, K., Arnholdtschmitt, B., and Neumann, K.H. 1997. Changes in soluble proteins and phytohormone concentrations of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota L.*). J. Appl. Bot. 71: 94-103.

4.Halperin, W. 1995. In Vitro embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe, T.A. (ed.): In vitro embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Pp: 155-203.

5.Halperin, W., and Wetherell, D.F. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. Nature, 201: 519-520.

6.Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Atanassov, A., and Van Onckelen, H.A. 1994. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago Falcata*. Phys. Plantarum, 92: 85-89.

7.John, A., Drake, P., and Selby, C. 1995. Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). In: Jan, M.S., Gupta, P.K., and Newton, R.J. (eds.), Somatic Embryogenesis in woody Plants, Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 3: 125-143.

8.Lad, B.L., Jayasankar, S., Pliegoalfaro, F., Moon, P.A., and Litz, R.E. 1997. Temporal effect of 2,4-D on induction of embryogenic nucellar cultures and somatic embryo development of "*Carabao mango*" in vitro cellular and developmental Biology Plant, 33: 4. 253-257.

9.Litz, R.E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in Carica suspension cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 111: 969-970.

10.Litz, R.E., and Gray, D.J. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J. Microbiology & Biotechnology, 11: 416-425.

11.Mashayekhi, K. 2000. The protein synthsis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. Ph.D. Thesis, Justus liebig University, Giessen. 140p.

12.Mashayekhi, K. 2007. Plant somatic embryogenesis. Makhtoumgholi faraghi (Sarly) Press, 483p.
13.Merkle, S.A., Parrott, W.A., and Flinn, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.): In vitro embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Pp: 1-16.
14.Neumann, K.H. 1995. Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer. 304p.
15.Newman, P.O., Krishnaraj, S., and Saxena, P.K. 1996. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. Int. J. Plant Sci., 157: 554-560.
16.Oetiker, J.H., and Aeschbacher, G. 1997. Temperature-sensitive plant cells with shunted indole-3-acetic acid conjugation. Plant Physiology, 114: 4. 1385-1395.
17.Patricia, Y.Z.C., Adriana, C.F., Guadalupe, L.P., Anabel, S.R., Felipe, B.P., and Nancy, S.B. 2007. Somatic embryogenrsis in Habanero Pepper (*C. chinense Jacq.*) from cell suspensions. Hort. Sci., 42: 2. 329-333.
18.Reinert, J., and Tazawa, M. 1969. Wirkung von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen. Planta, 87: 239-248.
19.Soltani, A. 1998. Application of SAS in statistical analysis (for fields in agriculture). JDM Press, 166p.
20.Sharma, P., and Rajam, M.V. 1995. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena L.*). J. Exp. Bot. 46: 1. 135-141.
21.Takamura, T., and Miyajima, I. 1997. Micropropagation of *Cyclamen Persicum Mill.* In: Bajaj, Y.P.S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 40: High-Tech and Micropropagation. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Pp: 96-112.
22.Twyford, C.T., and Mantell, S.H. 1996. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the Greater Yam. Plant Cell. Tiss. Org. Cult, 46: 1. 17-26.
23.Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. The Plant Cell, 5: 1411-1423.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(1), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media

M. Piri Zirkouhi[1], *K. Mashayekhi[2], B. Kamkar[3], Kh. Hemmati[4] and F. Vahdatpour[1]

[1]Former M.Sc. student, Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,[4]Assistant Prof., Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Embryogenesis is an effective method for producing a huge number of genetically modified plants with selective traits. In order to determine suitable nutritional media and organs for embryogenesis with a commercial and a native tomato cultivar, they were tested with three culture media using a factorial completely randomized design with four replications. Pieces of in-vitro cultured hypocotyls and seedling roots were transfered to B5, MS and NL media. Their embryogenesis was investigated when transfered from induction media containing auxin to the free auxin media. No embryogenesis was observed with NL, but it was greater with B5 than MS. Embryogenesis was also significantly greater with native tomato cultivar relative to commercial. one The interactions of cultivar×culture media ($P<0.01$) and cultivar×explants ($P<0.05$) were both significant. The effect of different sucrose concentrations (10, 20, 30 and 40 g/l) on somatic embryogenesis was investigated with in-vitro culture; 20 g/l showing the best response.

Keywords: Somatic embryogenesis, Tomato, Explant, Culture media, Gynotype, Sucrose

* Corresponding Author; Email: kambizm@yahoo.com