بررسی اثر نوع ظرف بر میزان تولید کالوس در ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل در کشت درون شیشه ای گوجه فرنگی(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

شهرام دانشمندی[۱]، محمود دژم[۲] ، مرتضی گل رازقی[۳] ، عبدالله عباسی[۴]

۱و۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا

۳و۴-دانشجوی کارشناسی ارشد شناسایی و مبارزه با علف های هرز دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا

چکیده

گوجه فرنگی از هزاران سال پیش وجود داشته است و از جمله سبزیجاتی است که به دلایل فراوان کشت آن مورد توجه قرار گرفته است. گوجه فرنگی از نظر ژنتیکی دیپلوئید است و یکی از گیاهان مناسب جهت کشت درون شیشه ای می باشد .کالوس یک بافت کم و بیش غیر سازمان یافته است وسلولهای تشکیل دهنده کالوس همگی ماهیت پارانشیمی دارند. در تحقیقات مهندسی ژنتیک تشکیل کالوس مناسب اهمیت ویژه ای دارد .به منظور تعیین نوع ظرف مناسب کشت درون شیشه ای ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل گوجه فرنگی رقم کل-جی آزمایش هایی در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا انجام شد . محیط کشت مورد استفاده در این آزمایش موراشیگی واسکوگ (MS) حاوی۴ میلی گرم در لیتربنزیل آدنین (BA)و ۲میلی گرم درلیترنفتالین استیک اسید(NAA) بود و میزان تشکیل و رشد کالوس در درون پتری های کوچک و پتری های بزرگ مقایسه شد. براساس نتایج به دست آمده حداکثر تشکیل و رشد کالوس در این محیط در ظروف پتری بزرگ صورت گرفت. همچنین ریزنمونه های برگ نسبت به هیپوکوتیل کالوس بیشتری تولید کردند .

واژگان کلیدی: کشت درون شیشه ای ، گوجه فرنگی ، کالوس، ظرف کشت.

مقدمه

گوجه فرنگی از جمله سبزیجاتی است که به دلایل فراوان کشت آن مورد توجه قرار گرفته است ۰ محصول این گیاه در غذاهای مختلف مورد استفاده قرار می گیرد ۰ واریته های مختلفی از گوجه فرنگی موجود هستند و محصول هرکدام مصرف خاصی در صنایع غذایی دارد. واریته های مختلف گوجه فرنگی از نظر کیفیت میوه و شکل میوه و مقاومت به امراض و آفات ، تفاوتهایی را دارند. خاستگاه اصلی این گیاه آمریکای جنوبی است. گوجه فرنگی جزء سبزیجات فصل گرم می باشد و نسبت به سرما حساس است. این گیاه در هوای گرم و مرطوب رشد بهتری دارد. در ایران گوجه فرنگی در شرایط اقلیمی بسیار متفاوت از بوشهر گرفته تا آذربایجان شرقی و در تمام استان های کشور در سطح وسیعی کشت می شود. کالوس گوجه فرنگی یک بافت کم و بیش غیر سازمان یافته است که از محل زخم و یا برش اندام با بافت های تمایز یافته حاصل می شود. در اغلب موارد ریز نمونه هایی که جهت تشکیل کالوس مورد استفاده قرار می گیرند غیر مریستمی هستند. اغلب از قطعات برگ یا ساقه جوان و یا لپه و هیپوکوتیل جهت تشکیل کالوس در کشت درون شیشه ای گوجه فرنگی استفاده می شود. در چنین مواردی لازم است که فرایند واتمایزیابی صورت گیرد که در این صورت سلول های تمایزیافته به سلول های مریستمی تبدیل می شوند..محققین از بخش های مختلف گیاه گوجه فرنگی به عنوان ریزنمونه در کشت درون شیشه ای استفاده کرده اند و به این نتیجه رسیده اند که در رقم های مختلف گوجه فرنگی ریزنمونه های

مختلف برگ، هیپوکوتیل، لپه و ریشه ژنوتیپ های مختلف توان باززایی و تولید شاخساره یکسانی ندارند (باهاتیا و همکاران۲۰۰۴) .باهاتیا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به این نتیجه رسیدند که تنوع در نوع و مقدار تنظیم کننده های رشد گیاهی بر روی درصد پاسخ نمونه ها و در تشکیل کالوس وهم تعداد شاخساره های تشکیل شده روی هر ریز نمونه تاثیر می گذارد. در این تحقیق اثر نوع ظرف پتری کوچک و بزرگ بر روی میزان تشکیل کالوس گوجه فرنگی رقم کال جی از ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل آزمایش شده است .

مواد و روش ها

جهت تشکیل ریزنمونه های استریل برگ و هیپوکوتیل ابتدا بذر های گوجه فرنگی رقم کال جی از محل جهاد کشاورزی شهرستان فسا تهیه و درمحیط MS درون ظروف مک کارتی کشت شدند. در هرظرف کشت ۳ عدد بذر کشت شد و پس از گذشت ۳۰ روز گیاهچه های گوجه فرنگی به اندازه تقریبی ۵ سانتی متر رسید. براساس مطالعات و تحقیقات انجام شده ، جهت انجام این آزمایش محیط کشت موراشیگی واسکوگ (MS) حاوی۴ میلی گرم در لیتربنزیل آدنین (BA)و ۲میلی گرم درلیترنفتالین استیک اسید(NAA) برای کشت ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل گوجه فرنگی تهیه و ضدعفونی آنها توسط دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد . سپس تعداد ۸ عدد ظرف پتری کوچک و ۸عدد ظرف پتری بزرگ به مدت ۱۲۰ دقیقه در حرارت ۲۰۰ درجه استریل شده و در زیر دستگاه لامینار در هرکدام از ظرف ها ۱۵ میلی لیتر محیط کشت ریخته شد و درب آنها گذاشته شد تا سرد شود . پس از آن تعدادی از ظروف مک کارتی محتوی بوته های استریل گوجه فرنگی توسط پنبه الکلی ضد عفونی و به زیر لامینار منتقل شدند واز آنها برگهای جوان و قطعات یک سانتی متری هیپوکوتیل به عنوان ریز نمونه انتخاب شدند .درون هر پتری بزرگ یا کوچک سه عدد ریزنمونه کشت شد . سپس جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی و قارچی سر هرکدام از ظروف پتری توسط پارافیلم کاملا بسته شد . ظروف کشت شده به مدت ۳۰ روز در اتاق رشد در دمای ۲۴ درجه نگهداری شدند ودرپایان میزان تولیدورشدکالوس اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

به تدریج تا روز ۳۰ ، در ظروف پتری از ریز نمونه ها تشکیل کالوس و رشد تدریجی آنها مشاهده شد . پس از مدت ۳۰ روز اندازه کالوسهای تشکیل شده برحسب میلیمتر و وزن ترکالوس ها بر حسب میلی گرم اندازه گیری شد . سپس کالوس های تشکیل شده روی کاغذ صافی قرار داده شدند و درون آون قرار گرفته وسپس وزن خشک با دقت میلی گرم اندازه گیری شد.. براساس نتایج حاصل (جداول ۱و۲ ونمودارهای ۱تا۴)از این آزمایش ، ایجاد کالوس گوجه فرنگی رقم کال جی در هردو نوع پتری کوچک و بزرگ مشاهده شد. با گذشت زمان در شرایط مناسب آزمایشگاهی در هردو نوع پتری، رشد کالوس مشاهده شد . میزان رشد کالوس، در پتری های بزرگ بیشتر از رشد کالوس در پتری های کوچک بود. همچنین ریزنمونه برگ مناسب تر از ریزنمونه هیپوکوتیل بوده وکالوس بیشتری تولید کردند.

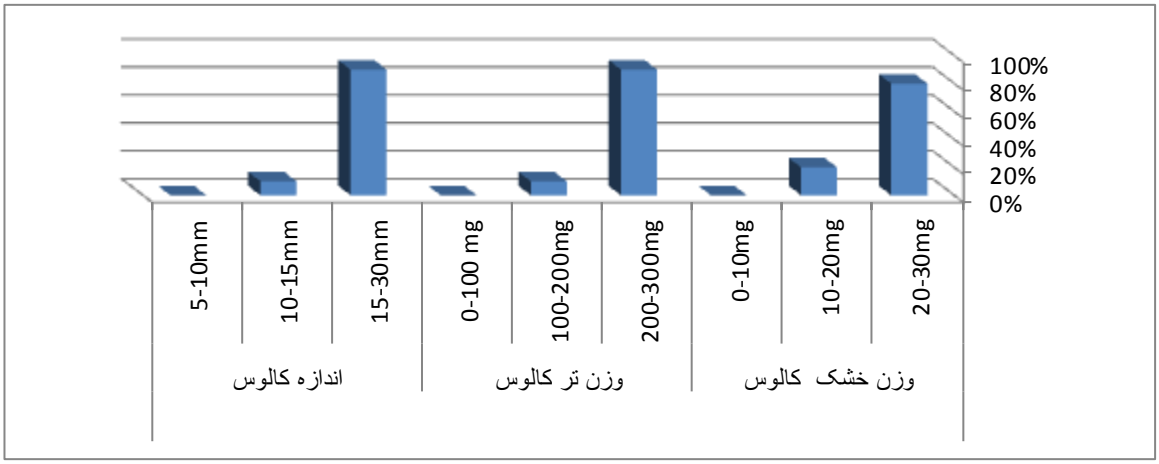
مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه برگ در پتری های بزرگ	مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه برگ در پتری های کوچک

کالوس وزن خشک			کالوس وزن تر			کالوس اندازه		
۳۰-۲۰mg	۲۰-۱۰mg	۱۰-۰mg	۳۰-۲۰۰mg	۲۰۰-۱۰۰mg	۱۰۰-۰mg	۳۰-۱۵mm	۱۵-۱۰mm	۱۰-۵mm
٪۸۰	٪۲۰	٪۰	٪۹۰	٪۱۰	٪۰	٪۹۰	٪۱۰	٪۰
٪۲۰	٪۷۰	٪۱۰	٪۵۰	٪۴۰	٪۱۰	٪۱۰	٪۴۰	٪۵۰

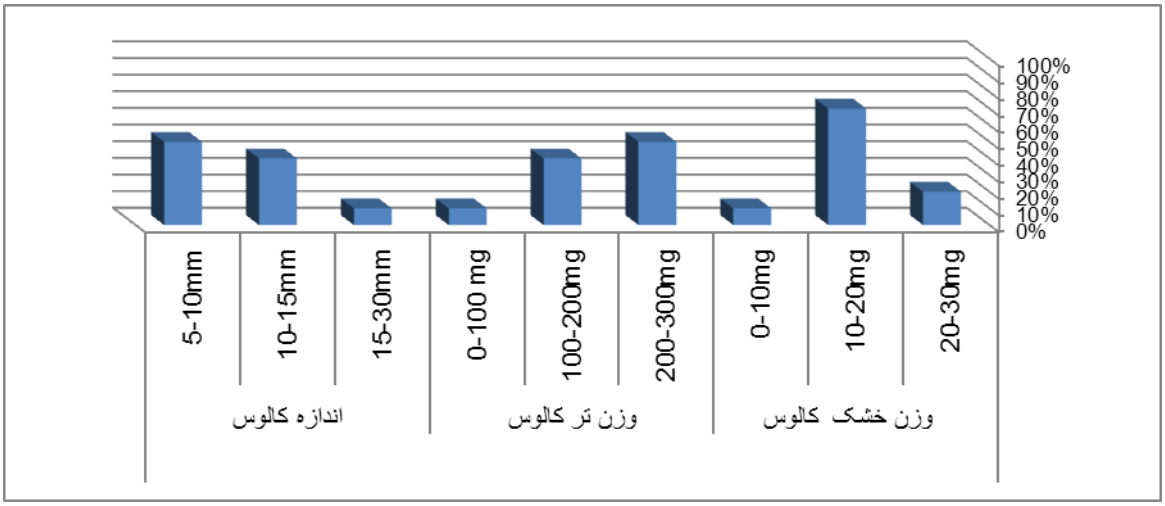
جدول ۱- مشخصات کالوس های حاصل از زیز نمونه برگ در پتری های بزرگ و کوچک

مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه هیپوکوتیل در پتری های بزرگ									مشخصات کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در پتری های کوچک								
کالوس وزن خشک			کالوس وزن تر			کالوس اندازه			کالوس وزن خشک			کالوس وزن تر			کالوس اندازه		
۳۰-۲۰mg	۲۰-۱۰mg	۱۰-۰mg	۳۰۰-۲۰۰mg	۲۰۰-۱۰۰mg	۱۰۰-۰mg	۳۰-۱۵mm	۱۵-۱۰mm	۱۰-۵mm	۳۰-۲۰mg	۲۰-۱۰mg	۱۰-۰mg	۳۰۰-۲۰۰mg	۲۰۰-۱۰۰mg	۱۰۰-۰mg	۳۰-۱۵mm	۱۵-۱۰mm	۱۰-۵mm
٪۱۵	٪۳۰	٪۵۵	٪۱۵	٪۴۰	٪۴۵	٪۵	٪۴۰	٪۵۵	٪۰	٪۵۵	٪۴۵	٪۲۵	٪۴۵	٪۳۰	٪۰	٪۴۵	٪۵۵

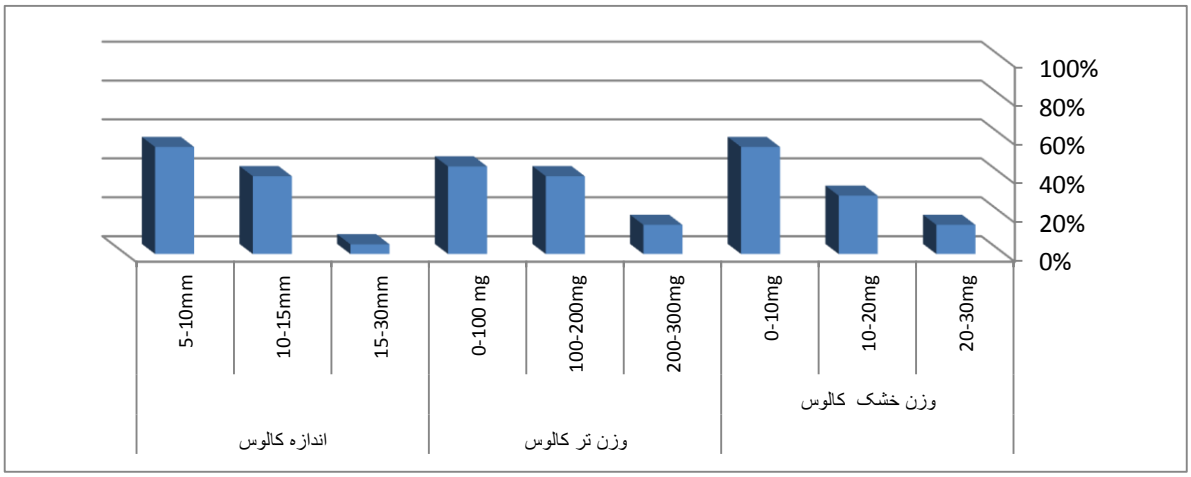
جدول ۲- مشخصات کالوس های حاصل از زیز نمونه هیپوکوتیل در پتری های بزرگ و کوچک



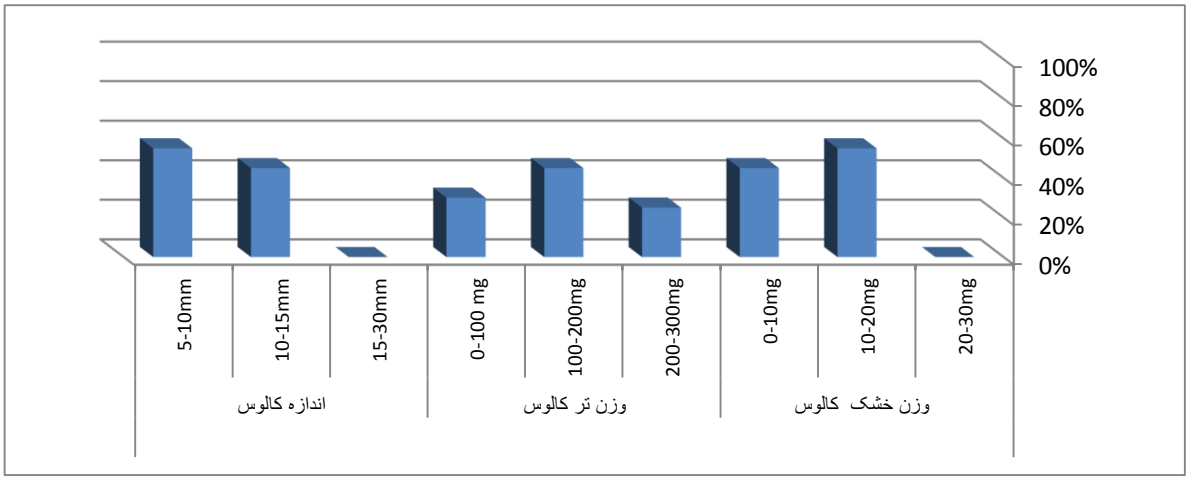
نمودار ۱- مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه برگ در پتری های بزرگ



نمودار ۲- مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه برگ در پتری های کوچک



نمودار۳- مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه هیپوکوتیل در پتری های بزرگ



نمودار۴- مشخصات کالوس حاصل ازریزنمونه هیپوکوتیل در پتری های کوچک

فهرست منابع

1. CAIRNEY,J.,XU,N.,MACKAY,J.&PULLMAN,J . 2000 .Special symposium: in vitro plant recalcitrance transcript proling: a tool to assess the development of conifer embryos. In Vitro Cell. Dev.Biol. 36: 152-162.

2. P. Bhatia, N. Ashwath, T. Senaratna. D. Midmore .2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 45:1-21.

3. Jatoi, S.K., G.M. Sajid, H. Sappal, M.S. Baloch, A. Qureshi and R. Anwar. 2001. Differential in vitro response of tomato hybrids against a multitude of hormonal regimes. Online J. Biol Sci., 1: 1141-1143.

Study on the effect of vessel type on callus production of leaf and hypocotyl explant in *in vitro* culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Daneshmandi Sh.[1], Dejam M.[2], Golrazeghi M.[3], Abbasi A.[4]
1and 2- Faculty members of Islamic Azad University Fasa Branch
3 and 4- MS Students of Islamic Azad University Fasa Branch

Abstract

Tomato is one of the most important vegetables. Tomato is diploid and has 24 chromosoms and is a suitable plant for *in vitro* studies. Callus is a non-organized paranchymatic tissue. Callus induction has great importance in gene transfer studies. In order to determine the best vessel type for callus production in leaf and hypocotyl explants of tomato, the experiments were conducted in tissue culture lab of Islamic Azad University , Fasa Branch. The medium was MS + 4mg/l BA + 2mg/l NAA.The results showed that callus production was better in large petri-dish than small one and also leaf explants produced more callus than hypocotyl ones.

Keyword: *In vitro* culture, tomato, callus, vessel type.