

انتخاب بهترین محیط باززایی و بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی ریزنمونه‌های تلقیح شده با *Agrobacterium tumefaciens* در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)  
معصومه کوهگرد<sup>۱</sup> - هوشنگ علیزاده<sup>۲</sup> - پژمان آزادی<sup>۲</sup> - علیرضا عباسی<sup>۲</sup> - مهران عنایتی شریعت پناهی<sup>۴</sup>  
۱،۲- دانشجوی دکتری، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران. ۳، ۴- استادیار، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۳)

### چکیده

به منظور بهینه نمودن شرایط کشت بافت گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، تأثیر ۱۳ ترکیب هورمونی مختلف و دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل بر روی میزان باززایی سه رقم نیوتون، این‌فینیتی و دافینس، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بیشترین میزان ساقه‌زایی (۱۱/۹) ساقه در هر ریزنمونه) در مورد رقم دافینس بر روی محیط کشت پایه MS حاوی هورمون‌های TDZ=۰/۶۸ و NAA=۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه کوتیلدون، به دست آمد. پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل عوامل محیطی، یکی از عوامل بازدارنده باززایی ریزنمونه‌ها در کشت بافت گیاهی است. سیگنال‌دهی یون کلسیم یکی از وقایع اولیه و البته مهم‌ترین واقعه در ایجاد پاسخ دفاعی گیاه در مقابل عوامل محیطی از جمله پاتوژن‌هاست، از این رو تأثیر ترکیب دارویی وراپامیل (Verapamil) به عنوان بلوکه‌کننده کانال‌های کلسیمی بر روی پاسخ دفاعی گیاه، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 بر اساس شرایط بهینه شده کشت بافت، انجام شد. تأثیر وراپامیل در چهار غلظت ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط هم‌کشتی، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از وراپامیل در مقایسه با نمونه شاهد، موجب کاهش پاسخ دفاعی گیاه می‌شود. همچنین استفاده از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر وراپامیل موجب افزایش میزان باززایی شد.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium tumefaciens*، کشت بافت، گوجه فرنگی، وراپامیل

### The Selection of the best regeneration medium and evaluation of the effect of verapamil on the plant defense response in the explants inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* in tomato (*Solanum Lycopersicum*)

Masoomah koohgard<sup>1</sup>, Houshang Alizadeh<sup>1</sup>, Pejman Azadi<sup>2</sup>, Alireza Abbasi<sup>1</sup>, Mehran Enayati Shariatpanahi<sup>2</sup>

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 2. Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran

(Received: December 23, 2017 - Accepted: May 13, 2018)

### ABSTRACT

To optimize tomato (*Solanum Lycopersicum*) plant tissue culture condition, the effect of 13 different hormonal combinations and two explants of cotyledon and hypocotyl on the regeneration rate of three Newton, Infinity and Defines cultivars were investigated. Experiments were conducted in a factorial based on a completely randomized design with three replications. The highest shoot number (11.9 shoots per explant) was obtained for Defines cultivar on MS medium containing the hormones of TDZ=0.68, NAA=0.1 milligrams per liter and cotyledon explant. Plant defense responses against environmental factors are one of the inhibitor factors of explants regeneration in plant tissue culture. Calcium ion signaling is one of the primary events and, of course, the most important event in plant defense response against pathogens, Therefore, the effect of verapamil as a calcium channel blocker was investigated on the plant defense response. For this purpose, inoculation was performed using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 and based on optimized tissue culture condition. The effect of verapamil in four concentrations of 0, 50, 100 and 200 milligrams per liter was investigated in a co-culture medium. Results showed that the use of verapamil in comparison with the control sample reduced the plant defense response. Also, the use of 50 milligrams per liter of verapamil increased the amount of regeneration

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*- Tissue culture- Tomato (*Solanum lycopersicum*)- Verapamil

\* Corresponding author E-mail: halizade@ut.ac.ir

## مقدمه

موجب کالوس‌زایی شد اما میزان کالوس‌زایی در هیپوکوتیل نسبت به کوتیلدون بیشتر بود. همچنین غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP موجب ساقه‌زایی در هر دو ریزنمونه شد. میزان ساقه‌زایی در دو نوع ریزنمونه با هم تفاوت معناداری نداشت اما این میزان در دو رقم با هم متفاوت بود. در این مطالعه استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون BAP به عنوان سیتوکینن سبب القای ساقه‌زایی و کالوس‌زایی گردید (Mohamed Nasher *et al.*, 2010).

آشاکاریان و همکاران در سال ۲۰۱۱، تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های TDZ, BAP و کینتین به عنوان سیتوکینن و غلظت‌های مختلف هورمون IAA به عنوان اکسین را بر روی میزان بازرایی دو رقم Shalimar و MHTM و دو ریزنمونه کوتیلدون و برگ، مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که بیشترین میزان ساقه‌زایی در رقم MHTM، با استفاده از هورمون TDZ با غلظت ۰/۷۴ میلی‌گرم در لیتر و بدون حضور هورمون اکسین اتفاق افتاد. بین این دو محیط اختلاف معناداری دیده نشد. میزان بازرایی در دو ریزنمونه کوتیلدون و برگ نیز اختلاف معناداری با هم نداشت. در مورد رقم Shalimar نیز همین نتایج به دست آمد. اما میزان بازرایی آن نسبت به رقم MHTM کمتر بود (Ashakiran *et al.*, 2011).

در مطالعه‌ی دیگری که بر روی چهار رقم گوجه‌فرنگی به نام‌های Rio, Grande, Moneymaker و Roma انجام شد، میزان کالوس‌زایی و میزان ساقه‌زایی در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، تأثیر هورمون‌های رشد شامل IAA, NAA و توفوردی به عنوان اکسین و زاتین، کینتین و BAP نیز به عنوان سیتوکینن در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و میزان ساقه‌زایی در ریزنمونه برگ بیشتر اتفاق افتاد. بیشترین میزان تولید کالوس در رقم Rio، سپس به ترتیب در ارقام Roma و Moneymaker با محیط کشت MS پایه به علاوه دو میلی‌گرم در لیتر

گوجه‌فرنگی، با نام علمی *Solanum lycopersicum* متعلق به خانواده سولاناسه می‌باشد. گوجه‌فرنگی گیاهی است دیپلوئید که با ۹۵٪ خودگشنی جزو گیاهان خودگشن محسوب می‌شود (Shankara, 2005). این گیاه، یکی از مهم‌ترین سبزیجات در سراسر دنیا محسوب شده و امروزه عواملی مانند بازار وسیع مصرف داخلی و امکان صادرات به کشورهای همسایه، سبب توجه بیشتر به این محصول و افزایش سطح زیر کشت آن در مناطق مختلف کشورمان شده است (Mohseni fard *et al.*, 2009). علاوه بر این، گوجه‌فرنگی به خاطر داشتن خصوصیات بیولوژی مانند داشتن ژنوم نسبتاً کوچک (Mb950) و انتقال ژن راحت، به میزان زیادی به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات ژنتیکی، پاتولوژی و فیزیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cruz-Mendi vil, 2011). کشت بافت، یک ابزار مهم در بیوتکنولوژی به شمار می‌رود و به عنوان یک پیش نیاز اصلی در فرآیند انتقال ژن به گیاه مطرح می‌شود. در گیاه گوجه‌فرنگی، مهم‌ترین عامل محدود کننده انتقال ژن، به دست آوردن یک دستورالعمل کشت بافت مطلوب با میزان نرخ بازرایی بالا می‌باشد (Jamous & Abu-qaoud, 2015). بنابراین کشت بافت گیاه گوجه‌فرنگی به دلیل ارزش تجاری این محصول و اهمیت اصلاح آن از طریق دستکاری ژنتیکی، لازم و ضروری است (Piri *et al.*, 2011). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سه عامل نوع و غلظت هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع ژنوتیپ، بیشترین تأثیر را در بازرایی گیاه گوجه‌فرنگی دارند (Nasher *et al.*, 2010). (Mohamed ; Gerszberg *et al.*, 2015).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط ناشر محمد و همکاران صورت گرفت، تأثیر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل و همچنین غلظت‌های مختلف هورمون BAP، بر روی میزان بازرایی دو رقم Pearl و Beril گوجه‌فرنگی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیقات نشان داد که هورمون BAP با غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر در هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل،

شکل‌گیری پاسخ دفاعی برنامه‌ریزی شده‌ای در مقابل تنش‌های زنده و غیر زنده خواهد شد. گیاه در مقابل *Agrobacterium tumefaciens* نیز به عنوان یک پاتوژن عکس‌العمل نشان می‌دهد که این موضوع منجر به کاهش باززایی و کاهش راندمان تحویل ژن به درون ژنوم گیاه می‌شود. (Lecourieux et al., 2006; Rejeba et al., 2014). بنابراین، به نظر می‌رسد که هنگام تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* بسته ماندن کانال‌های کلسیمی به صورت موقت می‌تواند سبب کاهش و یا تأخیر در شروع پاسخ دفاعی گیاه و در نتیجه کاهش میزان قهوه‌ای شدن بافت و مرگ سلول‌ها شود.

وراپامیل جزء داروهای بلوکه‌کننده کانال‌های کلسیمی در انسان می‌باشد. در پزشکی از این دارو برای بسته نگه داشتن موقت کانال‌های کلسیمی به منظور درمان انواع بیماری‌های عصبی استفاده می‌شود. در بدن انسان پنج نوع کانال کلسیمی به نام‌های L، P/Q، N، R و T وجود دارد و مشخص شده است که بلوکه‌کننده کانال‌های کلسیمی مانند وراپامیل که بر روی کانال‌های L در بدن انسان تأثیر می‌گذارد، قادر خواهند بود که بر روی کانال‌های کلسیمی در گیاهان نیز تأثیر بگذارند (Pasko & Flynn, 2000; Ram & Elliott, 2011).

این مطالعه، با فرض اینکه با بسته نگه داشتن کانال‌های کلسیمی به صورت موقت با استفاده از وراپامیل و در نتیجه تأخیر در ورود یون‌های کلسیم به سیتوسول می‌تواند سبب کاهش پاسخ دفاعی گیاه در مقابل *Agrobacterium tumefaciens* گردد، به انجام رسید.

## مواد و روش‌ها

### باززایی

در این مطالعه، از سه رقم مختلف گوجه‌فرنگی به نام‌های نیوتون، دافینس و این‌فینیتی استفاده شد. بذرها را رقم‌های انتخاب شده ابتدا در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند، سپس با استفاده از آب مقطر اتوکلاو شده دو بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه به خوبی شسته شدند. بذور ضد عفونی شده پس از خشک شدن با استفاده از کاغذ

IAA و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، به دست آمد. بیشترین میزان ساقه‌زایی نیز در دو رقم Rio و Roman به دست آمد. بهترین محیط ساقه‌زایی شامل MS پایه به علاوه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، یک میلی‌گرم در لیتر زاتین و دو میلی‌گرم در لیتر BAP بود. در مورد رقم MoneyMaker بیشترین میزان ساقه‌زایی در محیط MS پایه حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و سه میلی‌گرم در لیتر BAP اتفاق افتاد (Shah et al., 2015).

نظر به اینکه ژنوتیپ‌های متفاوت در باززایی عکس‌العمل متفاوتی نشان می‌دهند، در این مطالعه به منظور بهینه نمودن شرایط کشت بافت سه رقم نیوتون، دافینس و این‌فینیتی گیاه گوجه‌فرنگی، تأثیر محیط کشت‌های مختلف حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت و دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفتند.

همان‌طور که اشاره شد یکی از کاربردهای مهم کشت بافت، انتقال ژن می‌باشد. انتقال ژن با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* در گوجه‌فرنگی برای اولین بار توسط McCormick (۱۹۸۶) گزارش شد. از آن زمان تاکنون گزارشات متعددی در مورد انتقال ژن برای اهداف مختلفی مانند افزایش عملکرد، مقاومت به آفات و بیماری‌ها، مقاومت به علف‌کش‌ها، افزایش کیفیت میوه و غیره ارائه شده است (Sharma et al., 2009). در انتقال ژن با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* یکی از موانعی که موجب کاهش کارایی انتقال ژن می‌شود، پاسخ دفاعی گیاه می‌باشد که موجب انفجارهای اکسیداتیوی و در نتیجه قهوه‌ای شدن و مرگ سلول‌ها می‌شود (Kuta, 2005 & Tripathi). سیگنال‌دهی یون کلسیم یکی از وقایع اولیه و البته مهم‌ترین واقعه در ایجاد پاسخ دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن‌هاست. مشخص شده است که شروع پاسخ دفاعی گیاه بستگی به انتقال یون‌های کلسیم از آپوپلاست به سیتوسول دارد. پس از ایجاد مسیر سیگنال‌دهی کلسیم، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، تجمع فیتوهورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید (ABA)، سالیسیلیک اسید (SA) و اتیلن (ET) موجب



دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر MS مایع که حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون بود حل شد و در انکوباتور ۲۸ درجه با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. زمانی که OD<sup>۲</sup> باکتری به ۰/۳-۰/۵ رسید برای تلقیح ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. کوتیلدون‌ها پس از این که خراش خوردند به مدت سه تا پنج دقیقه در سوسپانسیون تلقیح غوطه‌ور شدند، سپس با استفاده از کاغذ صافی خشک و بر روی محیط هم‌کشتی (جدول ۲) قرار گرفتند. محیط‌های هم‌کشتی به مدت دو شب در تاریکی و در فیتوترون با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. کوتیلدون‌ها پس از خشک شدن با کاغذ صافی از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی (جدول ۲) منتقل شدند. نمونه‌های باززا شده پس از ۳۸ روز به محیط ساقه‌زایی (جدول ۲) منتقل شدند و پس از دو هفته گیاهچه‌های رشد کرده به محیط ریشه‌زایی (جدول ۲) انتقال یافتند. شرایط اتاق کشت برای محیط‌های باززایی، ساقه‌زایی و ریشه‌زایی داری شرایط فتوپروبیود ۸/۱۶ (به ترتیب روشنایی/ تاریکی) و نور فلورسنت با شدت ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه بود.

برای انجام این مطالعه از رقم دافینس و ریزنمونه کوتیلدون استفاده شد.

### تلقیح ریزنمونه‌ها

به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها، از دستورالعمل Dan et al. (2006) با کمی تغییرات استفاده شد. برای تهیه محیط تلقیح ابتدا یک کلونی از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* کشت شده در محیط کشت جامد را در پنج میلی‌لیتر محیط LB<sup>۱</sup> مایع (Miller, 1972) ریخته و درون انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار دادیم. محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از هریک از آنتی-بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین نیز بود. نظر به اینکه ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در ژنوم سویه LBA4404 وجود دارد، به منظور جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها و در نتیجه کنترل آلودگی از آن در محیط کشت استفاده شد. پس از گذشت ۲۲-۱۸ ساعت، دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته شد و در یک فالكون جدید که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین بود، ریخته شد و به مدت چهار ساعت مجدداً در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از آن محیط تلقیح به مدت ۱۰

جدول ۲- ترکیب محیط کشت‌های مختلف با محیط پایه MS در طی انتقال ژن با *Agrobacterium tumefaciens*

**Table 2- Compound of different media based on MS medium used in *Agrobacterium* mediate transformation**

	Preculture medium	coculture medium	Regeneration medium	Shooting medium	Rooting medium
Sucrose(gr/lit)	30	30	30	30	30
Gelrite(gr/lit)	3	3	3	3	3
TDZ(mg/lit)	0.65	0.65	0.65	0.65	
NAA(mg/lit)	0.1	0.1	0.1		
Cefotaxime (mg/lit)			300	300	300
Kanamycin (mg/lit)			30	30	30
Astusryngan (µM)		100			

هیستوشیمیایی استفاده شد (Jefferson, 1987). در این روش برگ نمونه ترانسفورم شده در یک ویال قرار

### مطالعات هیستوشیمیایی

به منظور بررسی انتقال و بیان ژن gus، از مطالعات

<sup>2</sup>Optical Density

<sup>1</sup> Luria-Bertani *Broth*

دیده نشد (جدول ۴). نوع و نسبت ترکیب هورمونی مورد استفاده در محیط کشت مهم‌ترین عامل تأثیرگذار در میزان بازاری می‌باشد (Pawar et al., 2012). در طی دهه‌های گذشته، هورمون‌های متعددی به منظور افزایش بازاری سلول‌های گیاهی به صورت مصنوعی ساخته شده است. TDZ، به خاطر داشتن نقش مؤثر در کشت بافت و کشت سلول‌های گیاهی، در طی چند دهه گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اگرچه این هورمون جزو سیتوکین‌ها طبقه‌بندی می‌شود، اما مشخص شده است که اکسین‌ها نیز تأثیرات مشابه در سلول ایجاد می‌کنند. نکته جالب در مورد این هورمون این است که ساختار شیمیایی آن شبیه به هیچ یک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینن که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند، نمی‌باشد (Guo et al., 2011). در این مطالعه، ترکیب این هورمون با اکسین نفتالین استیک اسید، تأثیر مطلوبی در بازاری دو رقم نیوتون و دافینس گیاه گوجه‌فرنگی داشت. Abu-qaoud & Jamous (2015) از این ترکیب هورمونی با غلظت‌های به ترتیب چهار میکرومولار و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برای TDZ و نفتالین استیک اسید، به طور موفقیت‌آمیزی جهت بازاری گیاه گوجه‌فرنگی استفاده نمودند. در مورد هورمون نفتالین استیک اسید نیز باید به این نکته اشاره نمود که این هورمون نیز یک اکسین مصنوعی می‌باشد و یکی از پرکاربردترین اکسین‌ها در کشت بافت گیاهی به شمار می‌رود (Guo et al., 2011). اما در مورد رقم این‌فینیتی، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین محیط کشت‌های مختلف از جمله محیط کشت حاوی هورمون‌های Zeatin = ۲ و IAA = ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میزان بازاری رقم این‌فینیتی در مقایسه با دو رقم دافینس و نیوتون کم‌تر بود، به گونه‌ای که میانگین تولید ساقه برای این رقم در محیط مذکور سه ساقه در هر ریزنمونه برآورد گردید (جدول ۴). بهترین ریزنمونه جهت بازاری برای ارقام دافینس و نیوتون کوتیلدون و برای رقم این‌فینیتی هیپوکوتیل می‌باشد (جدول ۵). در گزارشات متعددی نیز به این موضوع اشاره شده است

داده شد، سپس محلول X-Gluc به نحوی به هر نمونه اضافه شد که کل نمونه در محلول قرار گرفت و نمونه‌ی مورد نظر به مدت ۱۵-۱۰ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه در تاریکی، نگهداری شد. پس از آن محلول X-Gluc خارج شده و روی نمونه الکل ۹۹٪ (اتانول) ریخته شد. پس از این که نمونه کلروفیل خود را از دست داد عکس‌برداری انجام گرفت.

به منظور بررسی تأثیر ترکیب دارویی وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی گیاه در مرحله هم‌کشتی از این ماده در چهار غلظت ۵۰-۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان تیمار با هشت ریزنمونه در هر پتری دیش با سه تکرار انجام شد. ترکیب این دارو شامل ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر وراپامیل و ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر NaCl می‌باشد که در آب حل، و pH آن بین چهار تا شش تنظیم می‌شود. در این مطالعه نیز از همین ترکیب استفاده شد. از هر تیمار، دو کالوس تصادفی به منظور بررسی میزان قهوه‌ای شدن و سوختگی ریزنمونه‌ها انتخاب شد. میانگین بازاری با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های بازآشده بر تعداد کل ریزنمونه‌ها محاسبه گردید. این آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 آنالیز گردید. از تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* فاکد پلاسمید نیز به عنوان شاهد استفاده شد.

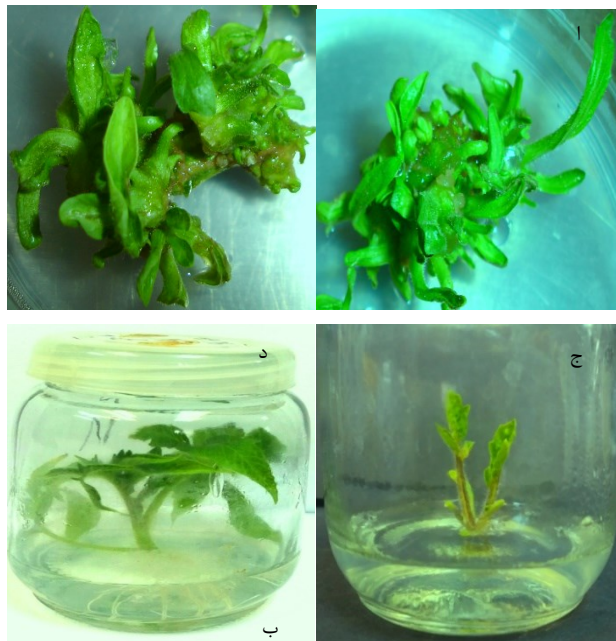
## نتایج و بحث

### بازاری

در این مطالعه مشخص شد که ریزنمونه کوتیلدون در مورد دو رقم دافینس و نیوتون، و ریزنمونه هیپوکوتیل در مورد رقم این‌فینیتی، در زمینه بازاری بهتر عمل می‌کند (جدول ۵). در مورد دو رقم نیوتون و دافینس، محیط کشت حاوی نسبت هورمونی ۰/۶۸ و ۱۱/۹ و شش ساقه در هر ریزنمونه به ترتیب برای ارقام دافینس و نیوتون، بهترین ترکیب هورمونی در بازاری می‌باشد. در مورد رقم نیوتون علاوه بر محیط فوق، محیط ۲=BAP و ۰/۱=IAA میلی‌گرم در لیتر نیز بهترین محیط کشت در بازاری به شمار می‌رود. بین این دو نوع محیط برای رقم نیوتون تفاوت معناداری

مدت زمان ایجاد ساقه در هر سه رقم، چهار هفته، و مدت زمان طویل شدن ساقه‌ها نیز به مدت سه هفته به طول انجامید. در نهایت گیاهچه‌های ایجاد شده از محل اتصال به کالوس جدا شده و در محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند. محیط ریشه‌زایی MS کامل بود. مدت زمان ریشه‌زایی نیز دو هفته طول کشید (شکل ۱).

که میزان و شرایط باززایی برای ارقام مختلف گوجه-فرنگی متفاوت بوده، و تاکنون یک دستورالعمل یکسان برای تمام ارقام مختلف گوجه‌فرنگی ارائه نشده است (Jedi *et al.*, 2004). بدین ترتیب، بهترین رقم از لحاظ باززایی رقم دافینس بوده و پس از آن رقم نیوتون و رتبه بعدی متعلق به رقم این‌فینیتی می‌باشد (جدول ۶).



شکل ۱- مراحل مختلف رشد گیاه گوجه‌فرنگی الف: رقم دافینس بر روی محیط MS پایه با ترکیب هورمونی  $TDZ=0.6$ ,  $NAA=0.1$  میلی‌گرم در لیتر ب: رقم نیوتون بر روی محیط MS پایه با ترکیب هورمونی  $TDZ=0.6$ ,  $NAA=0.1$  میلی‌گرم در لیتر ج: گوجه‌فرنگی باززا شده پس از جدا شدن از کالوس در محیط ریشه‌زایی قرار گرفت. د: محیط ریشه‌زایی

**Figure 1- Different stages of growth of tomato plant A: Regeneration of The Dafines cultivar on MS medium with combination hormone  $TDZ=0.6$ ,  $NAA=0.1$  mg/Lit. B: Regeneration of The Newton cultivar on MS medium with combination hormone  $TDZ=0.6$ ,  $NAA=0.1$  mg/Lit. C: Regenerated tomato isolated from callus and placed in rooting medium. D: Rooting medium**

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میزان باززایی برای ارقام، هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف مورد مطالعه در گیاه گوجه فرنگی

**Table 3- the results of analysis of variance for regeneration rate for different cultivars, hormones and microelements studied in the tomato plant**

Source	df	Mean Square	F value
V	2	118.63	262.35**
T1	1	223.12	493.43**
T2	12	55.90	123.63**
T1×V	2	126.55	279.86**
T2×V	24	15.89	35.16**
T1×T2×V	24	14.80	32.74**
Errore	154	0.45	
CV(%)		26.37	

\*\* معنی‌داری در سطح ۱٪ ( $p < 0.01$ )

T1: ریزنمونه 'T2: هورمون' V: رقم

T1: Explant, T2: Hormon, V: cultivar

۸ کوهگرد و همکاران: انتخاب بهترین محیط باززایی و بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی ریزنمونه‌های تلقیح شده ...

جدول ۲- مقایسه میانگین باززایی (تعداد ساقه‌ها تقسیم بر تعداد ریزنمونه در هر پتری دیش) ارقام مختلف گوجه‌فرنگی برای محیط کشت‌های مختلف

Table 4 - Comparison of mean regeneration (The number of stems divided by the number of explant per petridish) of different tomato varieties for different culture media

Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Infinity	2.0 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.8 <sup>b</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.9 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>
Newton	2.0 <sup>c</sup>	6.0 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>	1.7 <sup>c</sup>	0.2 <sup>c</sup>	1.6 <sup>c</sup>	3.0 <sup>b</sup>	2.2 <sup>c</sup>	0.2 <sup>d</sup>	2.7 <sup>c</sup>	1.9 <sup>c</sup>	2.5 <sup>c</sup>	0.1 <sup>d</sup>
Dafines	5.9 <sup>b</sup>	5.5 <sup>c</sup>	1.9 <sup>a</sup>	6.5 <sup>b</sup>	0.5 <sup>f</sup>	2.3 <sup>c</sup>	2.5 <sup>c</sup>	4.0 <sup>d</sup>	3.8 <sup>d</sup>	0.8 <sup>f</sup>	3.8 <sup>d</sup>	2.3 <sup>c</sup>	0.1 <sup>f</sup>

\* عدددهای ۱ تا ۱۳ نوع محیط کشت‌های مختلف است که در جدول ۱ جزئیات هورمونی هر محیط کشت نشان داده شده است. حروف مشترک در هر ردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایه آزمون دانکن ( $p < 0.05$ ) است.

\* The numbers range of 1 to 13 are different types of culture mediums that in Table 1 shows the hormonal details of each culture medium. Mean within a row followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the Duncan test.

جدول ۳- مقایسه میانگین باززایی ارقام مختلف برای ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل

Table 5- Comparison of mean regeneration of different cultivars for cotyledon and hypocotyl explants

Cultivar	hypocotyl	Cotyledon
Infinity	1.64 <sup>c</sup>	1.17 <sup>d</sup>
Newton	1.52 <sup>c</sup>	3.23 <sup>b</sup>
Dafines	1.55 <sup>c</sup>	6.16 <sup>a</sup>

حروف مشترک در هر ردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایه آزمون دانکن ( $p < 0.05$ ) است.

Mean within a row followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the Duncan test.

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان باززایی برای ارقام این‌فینیتی، نیوتون و دافینس

Table 6- Comparison of mean total regeneration for Infinity, Newton and Dafines

Cultivar	Average Regeneration
Infinity	1.4 <sup>c</sup>
Newton	2.3 <sup>b</sup>
Dafines	3.8 <sup>a</sup>

حروف مشترک در هر ردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایه آزمون دانکن ( $p < 0.05$ ) است.

Mean within a row followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the Duncan test.

هورمون‌های TDZ و NAA با غلظت‌های به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

بر اساس نتایج به دست آمده از باززایی، به منظور بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی گیاه از رقم دافینس، از ریزنمونه کوتیلدون و محیط کشت حاوی



(Elliott, 2011). در این مطالعه برای اولین بار مشخص شد که با استفاده از بلوکه‌کننده کانال‌های کلسیمی-وراپامیل-می‌توان با کاهش پاسخ دفاعی گیاه میزان قهوه‌ای شدن و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را کاهش داد. تجمع  $H_2O_2$  که به دنبال پاسخ دفاعی گیاه اتفاق می‌افتد نقش کلیدی را در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بازی می‌کند (Dan et al., 2016). از این رو *et al.* (2014) Dan برای اولین بار تأثیر ماده‌ای به نام ملاتونین و ۱۷ ترکیب دیگر شامل پنج آنتی‌اکسیدان و ۱۲ غیرآنتی‌اکسیدان را بر روی افزایش میزان کارایی انتقال ژن با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* بر روی گوجه‌فرنگی و سویا، مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که ملاتونین زمانی که به محیط انتخابی اضافه می‌شود، بیش از سایر ترکیبات میزان انتقال ژن را افزایش می‌دهد. آنها بیان نمودند که ملاتونین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد، از ایجاد پاسخ دفاعی گیاه و قهوه‌ای شدن ناشی از آن جلوگیری می‌کند و بدین ترتیب میزان باززایی پس از انتقال ژن را افزایش می‌دهد. ملاتونین یک هورمون انسانی است که توسط مغز ترشح می‌شود و در طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های عصبی، سیستم ایمنی بدن، فعالیت قلب، سیستم تناسلی و غیره ایفای نقش می‌کند. مشخص شده است که ملاتونین بیشتر فعالیت‌های خود را از طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند (Munik & Ekmekcioglu, 2015). Levine et al. (1995) نیز نشان دادند که تجمع  $H_2O_2$ ، به دنبال سیگنال‌دهی یون کلسیم اتفاق می‌افتد. بنابراین به نظر می‌رسد وراپامیل این قابلیت را دارد که یک گام جلوتر از ملاتونین حرکت کند و با به تعویق انداختن سیگنال‌دهی یون کلسیم، افزایش میزان  $H_2O_2$  و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را کاهش دهد.

## تأثیر وراپامیل بر روی ریزنمونه‌های تلقیح شده با *Agrobacterium tumefaciens*

### بررسی میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها

میزان سوختگی و قهوه‌ای شدن کالوس‌هایی که در محیط‌های حاوی وراپامیل رشد کرده بودند نسبت به کالوس‌های شاهد یعنی کالوس‌هایی که در محیط‌های فاقد وراپامیل رشد کرده بودند، به طور محسوسی کمتر بود (شکل ۲). ورود *Agrobacterium* به سلول گیاهی به علت تجمع  $H_2O_2$  موجب مرگ سلول و در نتیجه کاهش نرخ انتقال ژن خواهد شد. قهوه‌ای شدن بافت و مرگ سلول در اثر ورود *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه، در بسیاری از گیاهان مثل سویا، گوجه‌فرنگی، آفتابگردان، انگور، چغندر قند و غیره گزارش شده است. Hansen (2000) نشان داده است که در ذرت پس از تلقیح با *Agrobacterium tumefaciens* مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، به علت تکه تکه شدن DNA اتفاق افتاده است. (Parrott et al., 2002). Parrott نشان دادند که پس از تماس جنین و ریشه گندم با *Agrobacterium tumefaciens* مرگ سلول همزمان با تجمع  $H_2O_2$  در سلول اتفاق می‌افتد (Dan et al., 2016).

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، وراپامیل با تأثیر بر روی کانال‌های L در انسان برای درمان بیماری‌های عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کانال‌های کلسیمی نوع L کانال‌های نسبتاً بزرگی هستند که دارای فعالیت ولتاژ بالایی نیز می‌باشند. این کانال‌ها دارای وزن مولکولی ۴۰۰ کیلودالتون با پنج زیرواحد  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  هستند. این نوع از کانال‌های کلسیمی از طریق مسیرهای فسفریله کننده پروتئین CAMP فعال می‌شوند و به وسیله بلوکه‌کننده‌های کلسیمی هم سریع غیر فعال می‌شوند (Pasko & Flynn, 2001; Ram &



شکل ۱- مقایسه بین کالوس‌ها در محیط با و بدون وراپامیل؛ سمت راست: کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با *Agrobacterium tumefaciens* رشد کرده در محیط دارای وراپامیل، سمت چپ: کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با *Agrobacterium tumefaciens* رشد کرده در محیط فاقد وراپامیل

**Figure 2- Comparison between calluses in mediums containing and free verapamil. Right: The calluses derived from inoculated tomato explants with *Agrobacterium tumefaciens* that grows in medium containing verapamil and Left: The calluses derived from inoculated tomato explants with *Agrobacterium tumefaciens* that grows in medium free verapamil.**

اتفاق افتد. در حالت عادی میزان غلظت کلسیم در سیتوسول ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومولار، یعنی  $10^4$  بار کمتر از آپوپلاست و  $10^4$  تا  $10^5$  بار کمتر از اندامک‌های سلولی است. این موضوع سبب ایجاد اختلاف پتانسیلی خواهد شد که در صورت نیاز، منجر به ورود یون کلسیم به درون سیتوسول یعنی جایی که به عنوان پیغام‌رسان ثانویه عمل می‌کند، می‌شود (Lecourieux *et al.*, 2006; Ben Rejeba *et al.*, 2014) بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به نقش کانال‌های کلسیمی در رشد و نمو گیاه، هرچند غلظت مناسبی از وراپامیل سبب تأخیر در باز شدن کانال‌های کلسیمی و در نتیجه کاهش پاسخ دفاعی گیاه می‌شود، اما استفاده از غلظت بالای آن سبب اختلال در فعالیت کانال‌های کلسیمی و در نتیجه اختلال در فرآیند رشد گیاه خواهد شد.

### باززایی

در جدول (۷)، مقایسه میانگین باززایی نمونه‌های رشد کرده بر روی غلظت‌های مختلف وراپامیل نشان داده شده است. میزان باززایی به علت تنش ناشی از تلقیح ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* در مقایسه با حالت کشت بافت به شدت کاهش یافته است. زمانی که از محیط هم‌کشتی دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر وراپامیل استفاده شد، نرخ باززایی نسبت به شاهد و سایر غلظت‌های وراپامیل بیشتر بود. کاهش پاسخ دفاعی گیاه به واسطه وجود وراپامیل سبب افزایش نرخ باززایی شده است. یون‌های کلسیم به عنوان پیغام‌رسان ثانویه در بسیاری از مسیرهای سیگنال‌دهی در گیاهان و همین‌طور در جانوران فعالیت می‌کنند و سبب ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژی مناسب گیاه به دامنه وسیعی از محرک‌های محیطی می‌شوند. تغییرات غلظت کلسیم در پاسخ به محرک‌های مختلفی شامل هورمون‌ها، نور، تنش‌های غیرزنده و الیستورهای میکروبی، می‌تواند

جدول ۵- مقایسه میانگین باززایی نمونه‌های گوجه فرنگی رقم دافینس ترانسفورم شده با *Agrobacterium tumefaciens* در غلظت‌های مختلف وراپامیل به عنوان بلوکه کننده کانال‌های کلسیمی.

**Table 7- Average regeneration of transformed tomato *Dafines* variety explants with *Agrobacterium tumefaciens* on different concentrations of verapamil as blocker of calcium channels**

Different concentrations of verapamil(mg/L)	0	50	150	200
Average regeneration*	0 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>

The number of shoots divided by the number of explant per Petri dish •

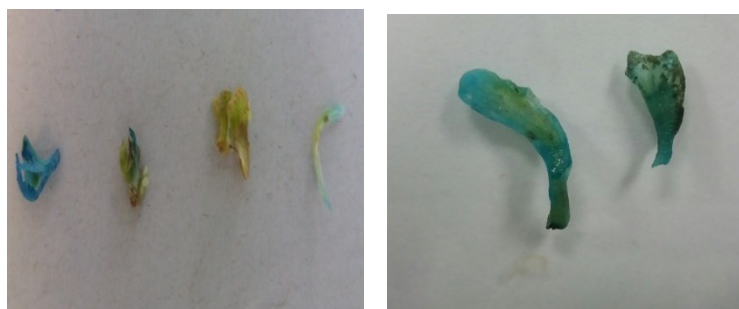
حروف مشترک در هر ردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایه آزمون دانکن ( $p < 0.05$ ) است.

Mean within a row followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$  according to the Duncan test.

### مطالعات هیستوشیمیایی

نتایج حاصل از مطالعات هیستوشیمیایی نشان داد که از تعداد هشت نمونه باززا شده شش تای آن‌ها در تماس با

محلول X-gluc، آبی شدند (شکل ۳).



شکل ۲- نمونه‌های برگ حاصل از تست هیستوشیمیایی که به علت بیان پروتئین gus آبی شده‌اند.

**Figure 3- Leaf samples resulted from a histochemical test, which is blued due to the expression of gus protein.**

### نتیجه‌گیری کلی

کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به حساب می‌رود. اما به نظر می‌رسد از آنجا که کانال‌های کلسیمی در بسیاری از فعالیت‌های حیاتی سلول نقش دارند، استفاده از غلظت بالای وراپامیل در محیط کشت احتمالاً منجر به اختلال در فعالیت‌های حیاتی سلول و کاهش رشد و نمو آن شود. در نتیجه اگر از وراپامیل در غلظت بالا استفاده شود، خود یک عامل بازدارنده برای باززایی و در نتیجه انتقال ژن خواهد بود. به گونه‌ای که در این مطالعه مشخص شد، غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر غلظت مناسبی است و در غلظت‌های بالاتر نتیجه عکس خواهد بود. در این جا باید به این نکته نیز اشاره نمود که به دلیل اهمیت سیگنال‌دهی یون کلسیم در سایر فعالیت‌های حیاتی گیاه، تأثیر وراپامیل در محیط

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیب هورمونی TDZ و NAA نتیجه بسیار مطلوبی در باززایی دو رقم دافینس و نیوتون ایجاد می‌کند. اما در مورد رقم این‌فینیتی باززایی آن در چند ترکیب هورمونی مختلف، تفاوت چندانی با هم نداشت. علاوه بر این مشخص شد که در بین سه رقم مورد مطالعه، میزان باززایی رقم دافینس بیشتر و میزان باززایی رقم این‌فینیتی کمتر می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار مشخص شد که وجود غلظت مناسبی از وراپامیل در محیط کشت سبب تأخیر و یا کاهش باز شدن کانال‌های کلسیمی و در نتیجه کاهش پاسخ دفاعی می‌شود. کاهش پاسخ دفاعی خود عامل مهمی برای افزایش میزان باززایی و همچنین

هم‌کشتی مورد بررسی قرار گرفت، چون به نظر می‌رسید وجود این ماده در محیط انتخابی سبب اختلال در رشد و نمو گیاه شود.

### References:

1. Ahsan, N., Lee, S. H. M., Anisuzzaman, D. G., Alam, M. F., Yoon, H. S., Choi, M. S., Yang, J. K. & Lee, B. H. (2007). The effects of wounding type, preculture, infection method and co-cultivation temperature on the Agrobacterium-mediated gene transfer in tomatoes. *Annals of Applied Biology*, 151, 363-372.
2. Ajenifujah-Solebo, S. O. A., Isu, N. A., Olorode, O., Ingelbrecht, I. & Abiade, O. (2012). Tissue culture regeneration of three Nigerian cultivars of tomatoes. *African Journal of Plant Science*, 6(14), 370-375.
3. Ben, R. I., Pastor, V. & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress. *Molecular Mechanisms Plants*, 3, 458-475.
4. Cruz-Mendivil, A. (2011). A Simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explant. *Horticultural Science*, 46(12), 1655-1660.
5. Dan, Y., Hua, Y., Munyikwa, T., Dong, J., Zhang, Y. & Armsrtrong, C. (2006). MicroTom-a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Reports*, 25, 432-444.
6. Dan, Y., Zhang, S. & Matherly, A. (2016). Regulation of hydrogen peroxide accumulation and death of Agrobacterium-transformed cells in tomato transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 127, 229-236.
7. Durosomo, H. A., Popoola, A. R., Afolabi, C. G. & Idehen, E. O. (2014). Germination and in vitro regeneration response of local Nigerian Tomato Cultivar using different explant sources. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 28, 35-42.
8. Elliott, W. & Ram, V. (2011). Calcium Channel Blockers. *Clinical Hypertension*, (13)9, 687-689.
9. Flynn, J. T. & Pasko, D. A. (2001). Calcium channel blockers: pharmacology and place in therapy of pediatric hypertension. *Pediatric Nephrology*, 15, 302-316.
10. Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T. & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 120, 881-902.
11. Guo1, B. X., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L. & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984-9000.
12. Jamous, F. & Abu-Qaoud, H. (2015). In vitro Regeneration of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 16, 181-190.
13. Jedi, L., Davarani Oliaie, A. & Farsi, M. (2009). Optimizing of factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* transformation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8, 368-374. (In Persian)
14. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1989). Gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fision marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901-3907.
15. Kuta, D. D. & Tripathi, L. (2005). Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 752-757.
16. Lecourieux, D., Ranjeva, R. & Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signaling pathways. *New Phytologist Journal*, 171, 249-269.
17. Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R. & Lamb, C. (1995). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, 4, 427-437.
18. McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsh, R. & Fraley, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reporter*, 5, 581-584.

19. Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. *Cold Spring Harbor*, New York.
20. Mohseni fard, A., Farsi, M., Nematie, H. & Malekzadeh, K. H. (2009). *Evaluation of Genetic Diversity of 16 Lycopersicon esculentum Lines Using the SSR Molecular Marker and its Correlation with Heterosis*. First National Conference on Tomato Production and Processing, 11-12 Feb., Mashhad University, IRAN. (In Persian).
21. Munik, M. S. & Ekmekcioglu, C. (2015). Prooxidant effects of melatonin: a brief review. *Turkish Journal of Biology*, 39, 832-839.
22. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-49.
23. Nasher Mohamed, A., Ismail, M. R. & Rahman, M. H. (2010). In vitro response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzyl amino purine. *African Journal of Biotechnology*, 9(30), 4802-4807.
24. Pawar, B. D., Jadhav, A. S., Kale, A. A., Chimote, V. P. & Pawar, S. D. (2012). Zeatin induced direct shoot regeneration in tomato (*Solanum Lycopersicum*). *The Bioscan*, 7(2), 247-250.
25. Piri zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, K. H. & Vahdatpour, F. (2010). Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media. *The Journal of Plant Production*, 16(1), 102-114. (In Persian)
26. Thorpe, T. A., Loyola-Vargas, V. M. & Vazquez-Flota, F. (2006). History of plant tissue culture methods in molecular biology (2nd ed.). *Humana Press Inc*.
27. Shah, S. H., Ali, S., Jan, S. A., Din, J. & Ali, G. M. (2015). Callus induction in vitro shoot regeneration and hairy root formation by the assessment of various plant growth regulators in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(2), 528-538.
28. Shahpiri, A., Omid, M., Ahmadian Tehrani, P. & Davoodi, D. (2004). Study of tissue culture and diversity of Somaclon in potatoes. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 2, 323-335. (In Persian)
29. Shankara, N., Jeude, J. V., Goffau, M. D., Hilmi, M. & van Dam, B. (2005). Cultivation of tomato production processing and marketing (5th ed.). *Wageningen Agromisa Foundation and CTA*.
30. Sharma, M. K., Solanek, A. K., Jandi, D., Singh, Y. & Sharma, A. K. (2009). A simple and efficient Agrobacterium-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of Bioscience*, 34, 423-433.