Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 52, No 2, Summer 2021 (1-13)
DOI: 10.22059/IJFCS.2018.246700.654416

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۴۰۰ (ص۱۳-۱)

انتخاب بهترین محیط باززایی و بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی ریزنمونه¬های تلقیح شده با *Agrobacterium tumefaciens* در گیاه گوجه¬فرنگی(*Solanum lycopersicum*)

معصومه کوهگرد[1] - هوشنگ علیزاده[2]- پژمان آزادی[3]- علیرضا عباسی[2]- مهران عنایتی شریعت پناهی[4]
۱،۲- دانشجوی دکتری، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران. ۳، ٤- استادیار، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۰/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۳)

چکیده

به منظور بهینه نمودن شرایط کشت بافت گیاه گوجه¬فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، تأثیر۱۳ ترکیب هورمونی مختلف و دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل بر روی میزان باززایی سه رقم نیوتون، این¬فینیتی و دافینس، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بیشترین میزان ساقه¬زایی (۱۱/۹ ساقه در هر ریزنمونه) در مورد رقم دافینس بر روی محیط کشت پایه MS حاوی هورمون¬های NAA=۰/۱ و TDZ=۰/٦۸ میلی¬گرم در لیتر و ریزنمونه کوتیلدون، به دست آمد. پاسخ¬های دفاعی گیاه در مقابل عوامل محیطی، یکی از عوامل بازدارنده باززایی ریزنمونه¬ها در کشت بافت گیاهی است. سیگنال¬دهی یون کلسیم یکی از وقایع اولیه و البته مهم¬ترین واقعه در ایجاد پاسخ دفاعی گیاه در مقابل عوامل محیطی از جمله پاتوژن¬هاست، از این رو تأثیر ترکیب دارویی وراپامیل (Verapamil) به عنوان بلوکه¬کننده کانال¬های کلسیمی بر روی پاسخ دفاعی گیاه، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تلقیح ریزنمونه¬ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و بر اساس شرایط بهینه شده کشت بافت، انجام شد. تأثیر وراپامیل در چهار غلظت ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی¬گرم در لیتر در محیط هم¬کشتی، 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 میلی¬گرم 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*)

Masoomeh koohgard[1], Houshang Alizadeh[1], Pejman Azadi[2], Alireza Abbasi[1], Mehran Enayati Shariatpanahi[2]

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=0.1milligrams 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

گوجه¬فرنگی، با نام علمی Solanum lycopersicum متعلق به خانواده سولاناسه می¬باشد. گوجه¬فرنگی گیاهی است دیپلوئید که با ۹۵ ٪ خودگشنی جزو گیاهان خودگشن محسوب می¬شود (Shankara, 2005) این گیاه، یکی از مهم¬ترین 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، گوجه¬فرنگی 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 می¬گیرد (Cruz-Mendı vil, 2011). کشت بافت، یک ابزار مهم در بیوتکنولوژی به شمار می¬رود و به عنوان یک پیش نیاز اصلی در فرآیند انتقال ژن به گیاه مطرح می¬شود. در گیاه گوجه ¬فرنگی، مهم¬ترین عامل محدود کننده انتقال ژن، به دست آوردن یک دستورالعمل کشت بافت مطلوب با میزان نرخ باززایی بالا می¬باشد (Jamous & Abu-qaoud, 2015) بنابراین کشت بافت گیاه گوجه¬فرنگی به دلیل ارزش تجـاری ایـن محصول و اهمیت اصلاح آن از طریق دستکاری ژنتیکی، لازم و ضروری است (Piri *et al*., 2011). مطالعات مختلف نشان می¬دهد که سه عامل نوع و غلظت هورمون¬های تنظیم¬کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع ژنوتیپ، بیشترین تأثیر را در باززایی گیاه گوجه¬فرنگی دارند (Nasher *et al*., 2010; Gerszberg *et al*., 2015 ;Mohamed).

در مطالعه¬ای که در سال ۲۰۱۰ توسط ناشر محمد و همکاران صورت گرفت، تأثیر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل و همچنین غلظت¬های مختلف هورمون BAP، بر روی میزان باززایی دو رقم Pearl و Beril گوجه¬فرنگی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیقات نشان داد که هورمون BAP با غلظت چهار میلی¬گرم در لیتر در هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل، موجب کالوس¬زایی شد اما میزان کالوس¬زایی در هیپوکوتیل نسبت به کوتیلدون بیشتر بود. همچنین غلظت دو میلی¬گرم در لیتر هورمون BAP موجب ساقه¬زایی در هر دو ریزنمونه شد. میزان ساقه¬زایی در دو نوع ریزنمونه با هم تفاوت معناداری نداشت اما این میزان در دو رقم با هم متفاوت بود. در این مطالعه استفاده از غلظت-های مختلف هورمون BAP به عنوان سیتوکینن سبب القای ساقه¬زایی و کالوس¬زایی گردید (Mohamed Nasher *et al*., 2010).

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

در مطالعه¬ی دیگری که بر روی چهار رقم گوجه¬فرنگی به نام¬هایRio، Grande، Moneymaker و Roma انجام شد، میزان کالوس¬زایی و میزان ساقه¬زایی در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، تأثیر هورمون¬های رشد شامل IAA، NAA و توفوردی به عنوان اکسین و زاتین، کینتین و BAP نیز به عنوان سیتوکینن در غلظت¬های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان کالوس¬زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و میزان ساقه-زایی 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 میلی¬گرم در لیتر

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

نظر به اینکه ژنوتیپ¬های متفاوت در باززایی عکس¬العمل متفاوتی نشان می¬دهند، در این مطالعه به منظور بهینه نمودن شرایط کشت بافت سه رقم نیوتون، دافینس و این¬فینیتی گیاه گوجه¬فرنگی، تأثیر محیط کشت¬های مختلف حاوی تنظیم کننده¬های رشد متفاوت و دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفتند.

همان¬طور که اشاره شد یکی از کاربردهای مهم کشت بافت، انتقال ژن می¬باشد. انتقال ژن با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* در گوجه¬فرنگی برای اولین بار توسط(۱۹۸۶) Mccormick گزارش شد. از آن زمان تاکنون گزارشات متعددی در مورد انتقال ژن برای اهداف مختلفی مانند افزایش عملکرد، مقاومت به آفات و بیماری¬ها، مقاومت به علف¬کش¬ها، 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 می¬شود، پاسخ دفاعی گیاه می-باشد که موجب انفجارهای اکسیداتیوی و در نتیجه قهوه¬ای شدن و مرگ سلول¬ها می¬شود (Kuta, 2005 & Tripathi). سیگنال¬دهی یون کلسیم یکی از وقایع اولیه و البته مهم¬ترین واقعه در ایجاد پاسخ دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن¬هاست. مشخص شده است که شروع پاسخ دفاعی گیاه بستگی به انتقال یون¬های کلسیم از آپوپلاست به سیتوسول دارد. پس از ایجاد مسیر سیگنال¬دهی کلسیم، تولید رادیکال¬های آزاد اکسیژن (ROS)، تجمع فیتوهورمون¬هایی مانند آبسیزیک اسید (ABA)، سالیسیلیک اسید (SA) و اتیلن (ET) موجب شکل¬گیری پاسخ دفاعی برنامه¬ریزی شده¬ای در مقابل تنش¬های زنده و غیر زنده خواهد شد. گیاه در مقابل *Agrobacterium tumefaciens* نیز به عنوان یک پاتوژن عکس-العمل نشان می¬دهد که این موضوع منجر به کاهش باززایی و کاهش راندمان تحویل ژن به درون ژنوم گیاه می¬شود. (Lecourieux *et al*., 2006; Rejeba *et al*., 2014) بنابراین، به نظر می¬رسد که هنگام تلقیح ریزنمونه¬ها با *Agrobacterium tumefaciens*، بسته ماندن کانال¬های کلسیمی به صورت موقت می¬تواند سبب کاهش و یا تأخیر در شروع پاسخ دفاعی گیاه و در نتیجه کاهش میزان قهوه¬ای شدن بافت و مرگ سلول¬ها شود.

وراپامیل جزء داروهای بلوکه¬کننده کانال¬های کلسیمی در انسان می¬باشد. در پزشکی از این دارو برای بسته نگه داشتن موقت کانال¬های کلسیمی به منظور درمان انواع بیماری¬های عصبی استفاده می¬شود. در بدن انسان پنج نوع کانال کلسیمی به نام¬های L، N، P/Q، R و T وجود دارد و مشخص شده است که بلوکه¬کننده کانال¬های کلسیمی مانند وراپامیل که بر روی کانال¬های L در بدن انسان تأثیر می¬گذارند، قادر خواهند بود که بر روی کانال¬های کلسیمی در گیاهان نیز تأثیر بگذارند (Pasko & Flynn, 2000; Ram & Elliott, 2011).

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

مواد و روش‌ها

باززایی

در این مطالعه، از سه رقم مختلف گوجه¬فرنگی به نام¬های نیوتون، دافینس و این¬فینیتی استفاده شد. بذرهای رقم¬های 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

صافی، بر روی محیط کشت MS X ۰٫۵ (Murashige & Skoog, 1962) کشت شدند. محیط مورد استفاده علاوه بر MS، حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و سه گرم در لیتر ژل رایت نیز بود. سپس شیشه¬های حاوی بذور کشت شده به مدت پنج روز در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی¬گراد قرار گرفتند، و پس از آن در نور فلورسنت با شدت ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه با دوره فتوپریود ۸/۱۶ (به ترتیب روشنایی/تاریکی)، قرار گرفتند. در ادامه کوتیلدون¬های ۱۱-۸ روزه و هیپوکوتیل¬های ۱۶-۱۴ روزه، برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (Dan *et al*., 2006; Sharma *et al*., 2009; Ajenifujah-Solebo *et al*., 2012; Durosomo *et al*., 2014; Popoola *et al*., 2015).

به منظور انجام باززایی، از محیط کشت پایه MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و سه گرم در لیتر ژل رایت استفاده شده و pH محیط بر روی ۵/۸ تنظیم شد. همچنین، به منظور به دست آوردن دستورالعمل مناسب جهت باززا نمودن ارقام مورد استفاده، تأثیر ۱۳ ترکیب هورمونی¬ مختلف به همراه دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). پس از گذشت چهار هفته، میانگین تولید ساقه برای هر ریزنمونه محاسبه شد، و بر اساس آن محاسبات آماری جهت تعیین بهترین محیط کشت و بهترین ریزنمونه انجام شد. این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر پتری تعداد شش ریزنمونه انجام شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم¬افزار SAS ۹٫۴ و با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن آنالیز گردید.

جدول ۱- نسبت تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده جهت باززایی ارقام گوجه‌فرنگی

Table 1- The ratio of growth regulators used to regenerate tomato cultivars

Regeneration Medium number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hormon name	TDZ	BAP	TDZ	IAA	TDZ	BAP	BAP	BAP	IBA	BAP	BAP	Zeatin	Zeatin
	NAA	IAA	NAA	Zeatin	-	NAA	IAA	NAA	BAP	IAA	IAA	IAA	-
Hormon (mg/Lit)	0.88	2	0.68	0.1	0.74	2	3	1	0.1	2.5	0.5	2	1.5
	0.5	0.1	0.1	2	-	0.1	0.07	0.5	2	2	0.3	0.2	-
Source	(Jamous & Abu-qaoud., 2015)	-	-	(Dan *et al*., 2006; Ahsana *et al*., 2007)	(Ashakiran *et al*., 2011)	(Cruz-Mendivil, 2011; Popoola *et al*., 2015)	(Jedi *et al*., 2004)	(Nahar Liza *et al*., 2013)	(Manamohan *et al*., 2011)	-	-	(Pawar *et al*., 2012)	(Rani *et al*., 2013)

بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی گیاه

مواد گیاهی و باکتری

در این مطالعه، به منظور بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی گیاه، تلقیح ریز نمونه‌ها با باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404، حاوی پلاسمید pBI121 (کلون تک) انجام شد. این پلاسمید حامل ژن گزارشگر گیاهی بتاگلوکورونیداز (gus) uidA و نشانگر انتخابی نئومایسین فسفوترانسفراز (nptII)، رمزکننده مقاومت به کانامایسین می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از باززایی،

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[1] 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 سوسپانیسون باکتری برداشته شد و در یک فالکون جدید که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع و۵۰ 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 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^2 باکتری به ۰/۵-۰/۳رسید 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 فتوپرویود ۸/۱۶ (به ترتیب روشنایی/ تاریکی) و نور فلورسنت با شدت ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه بود.

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			

مطالعات هیستوشیمیایی

به منظور بررسی انتقال و بیان ژن gus، از مطالعات هیستوشیمیایی استفاده شد (Jefferson, 1987). در این روش برگ نمونهٔ ترانسفورم شده در یک ویال قرار

[1] Luria-Bertani ***Broth***

[2]Optical Density

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 غلظت۰-۵۰-۱۰۰ 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 می-شود. 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 باززایی با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های باززاشده 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 tumefacien* فاقد پلاسمید نیز به عنوان شاهد استفاده شد.

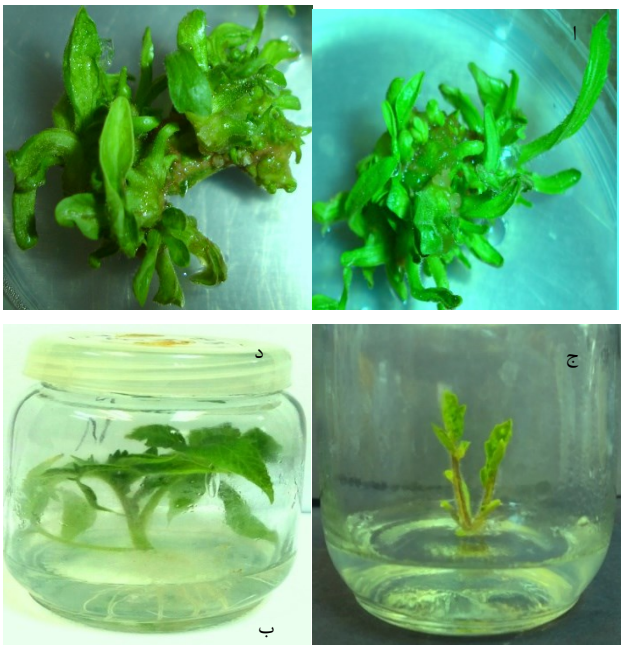
نتایج و بحث

باززایی

در این مطالعه مشخص شد که ریزنمونه کوتیلدون در مورد دو رقم دافینس و نیوتون، و ریزنمونه هیپوکوتیل در مورد رقم این‌فینیتی، در زمینه باززایی بهتر عمل می‌کند (جدول ۵). در مورد دو رقم نیوتون و دافینس، محیط کشت حاوی نسبت هورمونی ۰/۶۸ =TDZ و ۰/۱=NAA میلی‌گرم در لیتر با میانگین تولید ۱۱/۹ و شش ساقه در هر ریزنمونه به ترتیب برای ارقام دافینس و نیوتون، بهترین ترکیب هورمونی در باززایی می‌باشد. در مورد رقم نیوتون علاوه بر محیط فوق، محیط ۲=BAP و ۰/۱=IAA میلی‌گرم در لیتر نیز بهترین محیط کشت در باززایی به شمار می‌رود. بین این دو نوع محیط برای رقم نیوتون تفاوت معناداری دیده نشد (جدول ۴). نوع و نسبت ترکیب هورمونی مورد استفاده در محیط کشت مهم‌ترین عامل تأثیرگذار در میزان باززایی می‌باشد (Pawar *et al*., 2012). در طی دهه‌های گذشته، هورمون‌های متعددی به منظور افزایش باززایی 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 باززایی 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 باززایی 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 ۲= Zeatin و ۰/۱ =IAA میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میزان باززایی 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 باززایی برای ارقام دافینس و نیوتون کوتیلدون و برای رقم این فینیتی هیپوکوتیل می‌باشد (جدول ۵). در گزارشات متعددی نیز به این موضوع اشاره شده است

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).

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).



شکل ۱- مراحل مختلف رشد گیاه گوجه‌فرنگی الف: رقم دافینس بر روی محیط MS پایه با ترکیب هورمونی TDZ=۰/۶۸، NAA=۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ب: رقم نیوتون بر روی محیط MS پایه با ترکیب هورمونی TDZ=۰/۶۸ NAA=۰/۱ 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 •

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[a]	2.4[a]	1.6[a]	3[a]	0.5[b]	0 8[b].	1.6[a]	1.3[a]	0.5[b]	0.1[b]	2.9[a]	1.2[a]	0[b]
Newton	2.0[c]	6.0[a]	6.0[a]	1.7[c]	0.2[c]	1.6[c]	3.0[b]	2.2[c]	0.2[d]	2.7[c]	1.9[c]	2.5[c]	0.1[d]
Dafines	5.9[b]	5.5[c]	1.9[a]	6.5[b]	0.5[f]	2.3[e]	2.5[c]	4.0[d]	3.8[d]	0.8[f]	3.8[d]	2.3[e]	0[f]

*عددهای ۱تا ۱۳ نوع محیط کشت‌های مختلف است که در جدول ۱ جزئیات هورمونی هر محیط کشت نشان داده شده است.

حروف مشترک در هرردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ 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[c]	1.17[d]
Newton	1.52[c]	3.23[b]
Dafines	1.55[c]	6.16[a]

حروف مشترک در هرردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ 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[c]
Newoton	2.3[b]
Dafines	3.8[a]

حروف مشترک در هرردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ 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 .

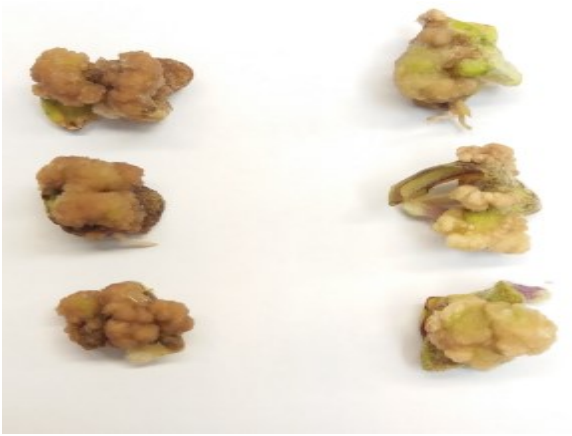
بر اساس نتایج به دست آمده از باززایی، به منظور بررسی تأثیر وراپامیل بر روی پاسخ دفاعی گیاه از رقم دافینس، از ریزنمونه کوتیلدون و محیط کشت حاوی هورمون‌های TDZ و NAA با غلظت‌های به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

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، چغندرقند 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) 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 α۱، α۲، β، γ و δ 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 & 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 Dan *et al*.(2014) 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 فعایت‌های 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 سیگنال دهی یون کلسیم، افزایش میزان H_2O_2 و مرگ برنامه ریزی شده سلول را کاهش دهد.



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 contaioning 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.

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 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، می شود (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.

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^{b}	0.3^{a}	0.1^{b}	0.05^{b}

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

حروف مشترک در هرردیف بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ 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

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 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

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 Nephroogyl*, 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 (*Lycopersicum 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: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fysion 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., Omidi, 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.