



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 14, Issue, No. 4, Winter 2022
Document Type: Research Paper
Received: 12/08/2023 Accepted: 14/02/2024

Optimizing the Induction of Somatic Embryogenesis in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Variety Money Maker

Asma Zahedi¹, Nasrin Mushtaqhi^{1*} , Abdulreza Bagheri¹,
Amin Mirshamsi Kakhki¹

¹Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture,
Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

The factorial experiment conducted in this study aimed to induce somatic embryogenesis in tomato cultivar Money Maker using different culture media and growth regulator combinations. The experiment was done in a completely randomized design with three replications. Three types of culture media, namely MS, B5, and MS + Vitamin B5, were used in combination with three hormonal combinations: 2,4-D (2 mg/L) + BA (1.5 mg/L), 2,4-D (8 mg/L) + BA (6 mg/L), and IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L). Additionally, three types of explants (cotyledon, hypocotyl and root) were utilized to induce somatic embryos. To promote embryo maturation, the explants were transferred to a hormone-free culture medium. The results revealed that the highest number of immature embryos was obtained from cotyledon explants cultured in MS medium with the hormonal combination of 2,4-D (2 mg/L) + BA (1.5 mg/L) and in hypocotyl explants in MB medium supplemented with the hormonal combination of 2,4-D (8 mg/L) + BA (6 mg/L), with an average of 20.33 embryos per explant. Also, the highest percentage of embryogenesis (93.33%) was in hypocotyl explants at MS culture medium with the hormonal combination of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L). After two weeks of cultivation, the presence of globular embryos was visible on the surface of the explants under binoculars. By transferring the explants to light conditions and subsequently to a hormone-free culture medium, the embryos further developed and matured.

Introduction

Tomatoes belong to the Solanaceae family. In recent years, there has been an increasing interest among scientists in utilizing tomato as a model plant due to its importance. Somatic embryogenesis, a process in which embryos develop from somatic or non-reproductive cells, represents a means of inducing totipotency in plant cells.

* Corresponding Author: moshtaqhi@um.ac.ir



Standardizing successful regeneration methods for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to somatic embryos in tomato can establish a sustainable transfer approach. During the induction of somatic embryogenesis, one of the major factors influencing cell behavior is the presence of high concentrations of auxin in the culture medium. Cytokinin, in combination with auxins, stimulates cell division, which both act synergistically. By investigating the induction of somatic embryos under treatments of auxin and cytokinin hormones *in vitro*, this research contributes to the advancement of propagation techniques for stress-tolerant varieties and genetic improvement in tomato under laboratory conditions. In conclusion, the study highlights the potential of somatic embryogenesis as a powerful tool for plant propagation and genetic manipulation in tomato. The optimization of hormone treatments and culture conditions can enhance the efficiency and success rate of somatic embryogenesis, leading to improved techniques to produce stress-tolerant varieties and the advancement of genetic improvement strategies in tomato.

Materials and methods

The seeds were surface sterilized with 1.5% sodium hypochlorite and sterile distilled water for 10 minutes and were cultured on MS medium without hormones. 14-day-old tomato seedlings were used to obtain explants (cotyledon leaves, cotyledon axis and root) for somatic embryo induction. The explants were cultured on three different types of culture media: MS, B5, and MS + Vitamin B5 (MB). The culture media were supplemented with specific hormonal compounds: 2,4-D (2 mg/L) + BA (1.5 mg/L), 2,4-D (8 mg/L) + BA (6 mg/L), and IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L) 30 g/L sucrose and 8 g/L agar. The cultures were incubated at 25°C for 2 weeks of darkness and one week of light. After three weeks, the explants containing somatic embryos were transferred to MS, B5, and MB culture media without hormones for one week to promote embryo maturation. Microscopic images were taken from embryonic calli. The stages of embryo induction and development were documented. The following traits were measured at the end of the experiment: callus formation percentage, embryogenesis percentage, and the number of embryos in each explant. The experiment was conducted with three replications. The data were analyzed by JMP software. The average values were compared using the LSD test at a significance level of 5%.

Results and discussion

Somatic embryogenesis was successfully induced in tomato explants under different hormonal treatments and culture media conditions. Callus formation was observed in the explants starting from the second week of cultivation. The highest percentage of callus formation (100%) was achieved in all three types of culture media when using cotyledon explants and the hormonal combinations of 2,4-D (1 mg/L) + BA (1.5 mg/L) and 2,4-D (8 mg/L) + BA (6 mg/L). The formation of embryos was mainly observed on the explants from the 14th day of cultivation. The highest percentage of embryogenesis (90.33%) was observed in hypocotyl explants cultured on MS culture medium with the hormonal combination of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L). The highest number of immature embryos (20.33) was produced in cotyledon explants cultured on MS culture medium with the hormonal combination of 2,4-D (2 mg/L) + BA (1.5 mg/L) and in hypocotyl explants, the highest number of immature embryos was obtained in the MB medium with the hormonal combination of 2,4-D (6 mg/L) + BA (8 mg/L). After three weeks, the growth of the embryos stopped at the globular and heart-shaped stage. The


calluses were initially light green, but with time, they turned brown and lost their embryonic tissue. However, in the hormonal treatment of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L), globular embryos were observed on the surface of the explant after two weeks of culture. By transferring the explant to light and then to a hormone-free culture medium, the embryos underwent further developmental stages and reached maturity. This treatment resulted in the highest number of somatic embryos in hypocotyl explants.

Conclusion

The results of the experiment indicate that the hormonal treatment of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L) was particularly effective in promoting the formation of embryonic callus and somatic embryogenesis in tomato hypocotyl explants. The successful production of somatic embryos can provide possibilities for further investigations into artificial seed production in tomato plants.

Keyword: Culture medium, Explant, Hormone, Somatic embryogenesis, Tomato.

بهینه‌سازی القای جنین‌زایی سوماتیکی در گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum L.*) رقم Money Maker

اسما زاهدی^۱، نسرين مشتاقی^{۱*} , عبدالرضا باقری^۱، امین میرشمسی کاخکی^۱
^۱ گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

پژوهش حاضر با هدف القای جنین‌زایی سوماتیکی با تنظیم‌کننده‌های رشدی در گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد. بدین منظور آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار طراحی شد. در این آزمایش از سه نوع محیط کشت MS، B5 و MS + Vitamin B5 با ترکیب‌های هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) و سه نوع ریزنمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه استفاده شد. نتایج نشان داد بیشترین تعداد جنین نابالغ تولید شده، در ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MB با ترکیب هورمونی 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) (۲۰/۳۳ عدد در هر ریزنمونه) بود. بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) و در ریزنمونه هیپوکوتیل (۹۳/۳۳٪) بود. با انتقال ریزنمونه به روشنایی و سپس محیط کشت بدون هورمون، جنین‌ها مراحل تکاملی را طی کرده و به بلوغ رسیدند. نتایج بدست آمده نشان داد، امکان تولید جنین سوماتیکی در حجم انبوه در گیاه گوجه‌فرنگی وجود دارد و می‌توان از این جنین‌ها در تولید بذر مصنوعی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی سوماتیکی، ریزنمونه، گوجه‌فرنگی، محیط کشت، هورمون.



مقدمه

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده‌ی Solanaceae است که در سراسر جهان کشت می‌شود. این گیاه بومی آمریکای جنوبی و مکزیک است و تمام گونه‌های جنس آن، دیپلوئیدهای علفی یک‌ساله، با ۲۴ کروموزوم ($2n=2x=24$) هستند (Godishala et al., 2011). در حال حاضر کشت این گیاه در سراسر جهان رایج است و از نظر اقتصادی به یک محصول مهم تبدیل شده است. در سال‌های اخیر، علاقه دانشمندان به گوجه‌فرنگی به عنوان یک گیاه مدل به طور چشمگیری افزایش یافته است (Salehi et al., 2019). توسعه ابزارهای مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی فرصت‌های بزرگی را برای مهندسی این گیاه فراهم کرده است. پژوهش‌های انجام شده بر روی گوجه‌فرنگی، نمونه‌هایی از کشت بافت موفق و گونه‌های اصلاح شده ژنتیکی را ارائه می‌کند که مقاومت در برابر طیف وسیعی از تنش‌های محیطی همراه با بهبود کیفیت میوه را به همراه داشته است (Gerszberg et al., 2015). جنین‌زایی سوماتیکی (SE) نوعی القای خاصیت توتی‌پوتنسی در سلول‌های گیاهی است که جنین‌ها از سلول‌های سوماتیکی یا بدنی رشد می‌کنند (Horstman et al., 2017). رشد جنین سوماتیکی مراحل مشابهی با جنین‌زیگوتی دارد که شامل مراحل کروی، قلبی‌شکل، اژدری و کوتیلدونی در مورد گونه‌های دو لپه (Winkelmann, 2016) و مراحل کروی، اسکوتلار و کولتوپتیل در مورد گونه‌های تک‌لپه است (Zhao et al., 2017). گیاهان توسط جنین‌زایی سوماتیکی می‌توانند

ساختارهای دوقطبی را از یک سلول سوماتیک بازسازی کنند. فرایند جنین‌زایی سوماتیکی، مدلی برای باززایی گیاه است، اما تا به امروز به دلیل سازوکارهای نامشخصی که در سطح سلولی رخ می‌دهد، اطلاعات دقیقی در مورد آن وجود ندارد (Widmeier et al., 2019). بنابراین استانداردسازی روش باززایی موفق برای انتقال ژن با واسطه *Agrobacterium* به جنین‌های سوماتیک در گوجه‌فرنگی می‌تواند ما را به یک روش انتقال پایدار هدایت کند (Ali et al., 2007). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند اولین مرحله‌ی جنین‌زایی سوماتیکی توسط تعدادی از ژن‌های مرتبط با تنش القا می‌شود. تنش اصلی سلول‌ها در هنگام القای جنین‌زایی سوماتیکی، وجود غلظت زیاد اکسین در محیط کشت است (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016). استفاده از اکسین‌ها، متابولیسم درونی را به روش قابل توجهی تغییر می‌دهد. برای مثال، در هویج، استفاده از 2,4-D در محیط کشت سبب ایجاد پاسخ جنینی می‌شود که با افزایش سطح اسید ایندول-۳-استیک (IAA) درونی همراه است (Abohatem et al., 2017). Raghavan (2005) ارتباط بین مدت زمان قرار گرفتن در معرض 2,4-D و سرنوشت سلولی را در روش جنین‌زایی سوماتیکی غیر مستقیم مورد بررسی قرار داد. کشت‌های جنین نابالغ تحت تأثیر 2,4-D برای مدت‌های مختلف قبل از انتقال به محیط عاری از 2,4-D سبب زنجیره‌ای از تغییرات ریخت‌شناسی و ژنتیکی در کالوس می‌شود. قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض اکسین، به تشکیل کالوس کمک می‌کند و قرار گرفتن متوسط

اکسین و سیتوکنین در گیاه گوجه‌فرنگی، در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای مورد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذور گیاه گوجه‌فرنگی رقم Money maker از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بذور به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شستشو و سپس به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و به مدت ۱۵ دقیقه در وایتکس ۱/۵ درصد همراه با شیک کردن استریل شدند. در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و به محیط کشت MS بدون هورمون، با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا گیاهچه استریل تولید نمایند.

القای جنین‌زایی سوماتیکی

بعد از جوانه زنی بذور، از گیاهچه‌های ۱۴ روزه گوجه‌فرنگی برای تهیه ریزنمونه برای القای جنین سوماتیکی استفاده شد. از سه نوع ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای، محور زیر لپه و ریشه استفاده شد. برگ‌های لپه‌ای به قطعات ۱-۰/۵ سانتی‌متر، محور زیر لپه به قطعات ۷-۴ میلی‌متر و ریشه با قطعات ۱-۰/۵ سانتی‌متر برش داده شد. تولید جنین سوماتیکی در دو مرحله شامل القای جنین رویشی و بلوغ آن انجام شد. ترکیب محیط کشت از جمله مهمترین عوامل مؤثر دیگر بر جنین‌زایی سوماتیکی است. لازم به توضیح است در این آزمایش از محیط‌های

در معرض اکسین سبب تشکیل جنین سوماتیکی می‌شود. در این جنین‌ها لپه‌ها به برگ‌ها تبدیل شده‌اند و قرار گرفتن طولانی مدت در معرض اکسین تنها سبب تشکیل جنین سوماتیکی می‌شود. برای مثال، با افزودن غلظت کم 2,4-D، بهره‌وری جنین‌زایی سوماتیکی در خرما به میزان ۲۰ برابر افزایش یافته است (Abohatem et al., 2017). سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند سیتوکنین نیز در رشد گیاهان نقش دارند. سیتوکنین‌ها سبب تشکیل جوانه، تأخیر در پیری برگ‌ها و به همراه با اکسین‌ها سبب تحریک تقسیم سلولی می‌شوند و هر دو تنظیم‌کننده به صورت هم‌افزا عمل می‌کنند (Singh & Sinha, 2017). از چهار دهه گذشته تاکنون، ریزنمونه‌های مختلفی برای ریزازدیادی و یا تراریختی در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی مانند برگ (Behki & Lesley, 1980)، لپه (Costa et al., 2000)، هیپوکوتیل (Park et al., 2003)، مریستم (Mirghis et al., 1995)، گل آذین (Compton et al., 1991)، بساک (Zamir et al., 1980) و سوسپانسیون سلولی (Nover et al., 1982) استفاده شده است. در حال حاضر چندین روش برای القای جنین‌زایی و تولید گیاهچه از ریزنمونه‌های مختلف و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، گزارش شده است. در این راستا، پیشرفت‌های حاصل از آزمایش می‌تواند استفاده از جنین‌زایی سوماتیکی را برای تکثیر در شرایط آزمایشگاهی واریته‌های متحمل به تنش و همچنین بهبود ژنتیکی در گوجه‌فرنگی بهبود بخشد. در پژوهش حاضر القای جنین سوماتیکی تحت تیمارهای هورمونی

پژوهش‌های ریخت‌شناسی

جهت آنالیزهای ریخت‌شناسی توده کالوس‌های جنینی، تصاویر میکروسکوپی از مراحل القاء و نمو جنین تهیه شد. ابتدا بافت‌های کالوس حاوی جنین‌های سوماتیکی در مراحل مختلف با استوکارمن یک درصد بر روی اسلاید شیشه‌ای رنگ‌آمیزی شدند (Varis et al., 2018). در این مرحله عکس نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰۰X انجام شد. به علت اینکه در بافت‌های جنینی، تقسیمات سریع سلولی اتفاق می‌افتد، رنگ‌پذیری بالایی دارند و از این محلول برای بررسی بافت‌های جنینی استفاده می‌شود. روش کار به این صورت بود که برش‌های بسیار نازک از کالوس‌های جنینی تهیه و سپس با محلول استوکارمن رنگ‌آمیزی شد. بعد از گذشت حدود ۳ دقیقه، شستشو داده شدند و با میکروسکوپ مشاهده شدند. همچنین تصویربرداری از جنین‌های سوماتیکی با بینوکولار انجام شد. ثبت و اندازه‌گیری صفاتی مانند درصد

کشت پایه و ترکیبات هورمونی پیشنهاد شده توسط پژوهشگران مربوطه جهت جنین‌زایی روشی گوجه‌فرنگی استفاده شد (Mashayekhi, 2007; Wajeeha et al., 2019; Majd et al., 2011). ریزنمونه‌های برش داده شده در سه نوع محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962)، MS+ Vitamin B5 (Gamborg B5, 1986) و (MB) با ترکیب‌های هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار، با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته تاریکی و یک هفته روشنایی، انتقال داده شدند. برای بلوغ جنین سوماتیکی، بعد از گذشت ۳ هفته، ریزنمونه‌ها به محیط کشت‌های MS، B5 و MB بدون هورمون به مدت یک هفته، منتقل شدند. در ادامه جنین‌های سوماتیکی تولید شده، جهت رشد و جوانه زنی به محیط کشت MS^۱/۲ منتقل شدند.

$$\text{کالوس دهی} (\times 100) = \frac{\text{تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس داشتند}}{\text{تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده}} \times 100$$

$$\text{درصد جنین‌زایی} (\times 100) = \frac{\text{تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید جنین داشتند}}{\text{تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده}} \times 100$$

نتایج و بحث

تولید کالوس در ریزنمونه‌ها از هفته دوم بعد از کشت شروع و تشکیل جنین‌ها بر روی ریزنمونه‌ها اغلب از روز ۱۴م بعد از کشت مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثرات اصلی و متقابل نوع محیط کشت و نوع ریزنمونه استفاده شده و نیز ترکیب‌های هورمونی بر فاکتورهای

و شمارش تعداد جنین در هر ریزنمونه (در روزهای مختلف پس از کشت، تعداد جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و لپه‌ای هر ریزنمونه)، در پایان آزمایش انجام شد. آزمایش در سه تکرار و تجزیه آماری داده‌ها با نرم افزار JMP و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. همچنین رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

درصد کالوس‌زایی، درصد جنین‌زایی و تعداد جنین معنی‌دار بود (جدول ۱).

تولید شده در هر ریزنمونه در سطح ۵ درصد

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی متفاوت بر فاکتورهای مورد ارزیابی

Table 1. Results of analysis of variance of simple and reciprocal effects of culture medium type, explant type and different hormone combinations on the evaluated factors

جدول تجزیه واریانس				
درصد جنین‌زایی	تعداد جنین	درصد کالوس‌زایی	df	منابع تغییرات
1105.461*	242.229*	841.440*	2	نوع محیط کشت
6251.713*	115.504*	1960.531*	2	ترکیب هورمونی
3078.755*	106.843*	968.716*	2	نوع ریزنمونه
1105.461*	366.204*	718.996*	4	محیط کشت × ترکیب هورمونی
304.248*	32.774*	206.126*	4	محیط کشت × ریزنمونه
3078.755*	47.707*	1012.772*	4	ترکیب هورمونی × ریزنمونه
304.248*	22.289*	225.473*	8	محیط کشت × ترکیب هورمونی × ریزنمونه
5.73	0.6	86.003	54	خطا
8.727	19.003	10.15		ضریب تغییرات

* معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

* Significance is at the 5% level

درصد کالوس‌زایی

نتایج (جدول ۲) نشان داد بیشترین درصد

کالوس‌زایی ریزنمونه کوتیلدون به ترتیب در محیط کشت‌های MS و MB و B5 مشاهده شد. همچنین درصد کالوس‌زایی این ریزنمونه در ترکیبات هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) بیشتر از درصد کالوس‌زایی این ریزنمونه در ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) در هر سه محیط کشت بود که تفاوت معنی‌داری را نشان داد. از طرفی درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در هر سه نوع محیط کشت مورد

آزمایش ۱۰۰ درصد و کمترین درصد کالوس‌زایی این ریزنمونه در محیط کشت B5 با ترکیب هورمونی 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) (۵۰ درصد) بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل به ترتیب در محیط کشت‌های MS، MB و B5 مشاهده شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه ریشه به ترتیب در محیط کشت‌های MS، MB و B5 بود. همچنین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه در هر سه نوع محیط کشت در ترکیبات هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) (۱۰۰ درصد) زیاده‌تر از ترکیب هورمونی 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) بود که تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). به

ژن‌های موجود در توده‌های جنینی سبب می‌شوند از ظهور و تکوین جنین‌های رویشی ممانعت نموده و در نتیجه با حذف اکسین از محیط کشت می‌توان سبب غیرفعال شدن این ژن‌های بازدارنده شده و برنامه جنین‌زایی را تداوم بخشید ([Zimmerman, 1993](#)). تفاوت در کالوس‌زایی و ایجاد بافت‌های جنینی ریزنمونه‌های مختلف، به تفاوت در فعالیت‌های متابولیک و مقدار هورمون‌های درونی مربوط می‌باشد. تیمار با اکسین بیرونی به عنوان شرایط تنش در بافت تلقی می‌شود و منجر به جنین‌زایی سوماتیکی در تقسیمات سلولی می‌شود، همچنین ترکیب اکسین با هورمون بنزیل آمینوپورین اثر القایی مثبتی در تشکیل کالوس جنین‌زا در گیاه گوجه فرنگی داشته است ([Majd et al., 2011](#)).

درصد جنین‌زایی

نتایج نشان داد بیشترین درصد جنین‌زایی در ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط‌های کشت MS، MB و کمترین درصد جنین‌زایی در ریزنمونه‌های ریشه و کوتیلدون در محیط کشت B5 بود که تفاوت معنی‌داری را نشان داد. همچنین بیشترین درصد جنین‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون در ترکیبات هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) (۹۰ درصد) و کمترین آن در محیط کشت B5 بود که در هر سه نوع ترکیب هورمونی، جنینی تولید نشد. بیشترین درصد جنین‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) (۹۰/۳۳ درصد) در محیط کشت MS مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با دو

طور کلی اثرات متقابل سه گانه نوع ریزنمونه، نوع ترکیب هورمونی و محیط کشت نشان داد بیشترین درصد کالوس‌زایی در هر سه نوع محیط کشت، در ریزنمونه کوتیلدون و در ترکیب‌های هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) (۱۰۰ درصد) است و کمترین آن در هر سه نوع محیط کشت، در ریزنمونه ریشه و در ترکیب هورمونی 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) است که تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). [Yousry \(2013\)](#) جنین‌زایی سوماتیکی گونه‌ای از گوجه (*Physalis pubescens* L.) را تحت تأثیر هورمون‌های BAP و 2,4-D بر روی ریزنمونه برگ مورد آزمایش کردند. نتایج به دست آمده، رابطه مستقیمی بین سطح BAP و شاخص اندازه کالوس نشان داد. اثر متقابل 2,4-D و BAP در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میانگین شاخص اندازه کالوس را به وجود آورد. نتایج آنها نشان داد یک تا دو هفته پس از کشت، ریزنمونه‌های برگ شروع به تشکیل کالوس زرد رنگ کردند. کالوس فشرده از سلول‌های هم‌اندازه حاوی تعداد زیادی دانه نشاسته و جنین‌زا بود و به جنین‌های کروی تبدیل شد که بیشتر آنها به جنین‌های قلبی شکل تبدیل شدند. به نظر می‌رسد حضور اکسین، سبب یکسری تغییرات بیوشیمیایی درون سلولی می‌شود. تغییر در بیان ژن‌هایی که در توده‌های سلولی پیش‌جنینی قرار دارند (به واسطه افزایش احتمالی متیلاسیون DNA) و نیز برای تولید جنین‌کروی لازم هستند، از جمله این موارد به شمار می‌رود. اما نکته مهم این است که حضور مداوم برخی از

در گیاه گوجه‌فرنگی را در محیط کشت MS مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند بیشترین درصد کالوس‌زایی و درصد تشکیل جنین‌های سوماتیکی کروی از ریزنمونه ساقه با ترکیب هورمونی ۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. گزارش شده است که اکسین‌ها به تنهایی کالوس‌های جنینی بدون مرکز مریستمی را تولید می‌کنند، اما در ترکیب با سیتوکینین سبب ایجاد بافت کالوس جنینی می‌شود (Swamy et al., 2005). (Rzepka-Plevnes, et al 2007) طی آزمایشی، جنین‌زایی توسط دو اکسین IAA و 2,4-D، را در ترکیب با BAP در گیاه *L. peruvianum* القا کردند. BAP به عنوان یک هورمون مهم رشد و لازم در شکل‌گیری جنین‌های سوماتیکی اثبات شده است. نتایج آنها نشان دادند بیشترین تعداد جنین سوماتیکی (۸/۹ عدد جنین در هر یک گرم کالوس) در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر از BAP و ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. (Philip et al, 1996) ریزنمونه هیپوکوتیل چهار رقم متفاوت گوجه‌فرنگی را در محیط کشت MS حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر BA، مورد آزمایش قرار دادند و توانستند جنین‌هایی سوماتیک تولید کنند. آنها گزارش کردند هورمون BA در گیاه گوجه‌فرنگی یک تنظیم‌کننده رشد ضروری و مهم برای القای جنین‌های سوماتیک است که نتایج این پژوهش نیز بیان‌کننده نقش مثبت هورمون BA در القاء و تشکیل کالوس‌های جنین‌زا است.

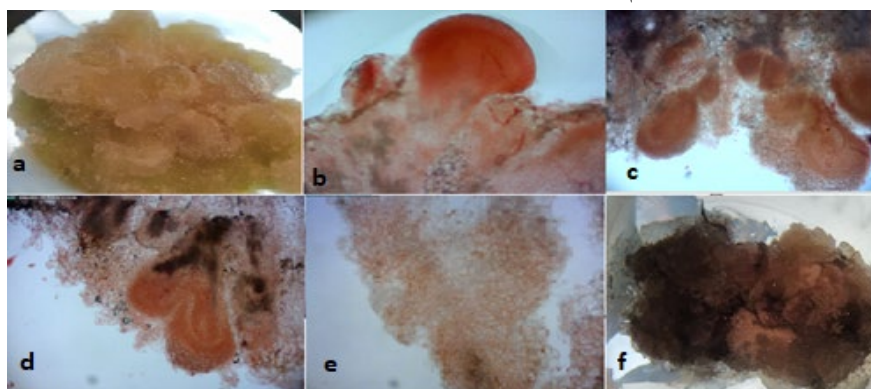
ترکیب هورمونی دیگر مورد آزمایش نشان داد. درصد جنین‌زایی در ریزنمونه ریشه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها کمتر بود. به طوری که بیشترین درصد جنین‌زایی در ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) (۴۱/۶۶ درصد) در محیط کشت MS و کمترین آن در ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) (۰ درصد) بود که هیچ جنینی مشاهده نشد. در مجموع اثرات سه‌گانه نوع ریزنمونه، نوع ترکیب هورمونی و محیط کشت نشان دادند بیشترین درصد جنین‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS (۳۳/۹۰٪) و کمترین آن در محیط کشت B5 بود که در این محیط کشت در هیچ یک از ریزنمونه‌های مورد آزمایش در تیمارهای هورمونی تولید جنین سوماتیکی مشاهده نشد و فقط ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) تولید جنین سوماتیکی داشت (جدول ۲). سطوح بالای هورمون درون‌زا نقش مهمی در جنین‌زایی سوماتیکی دارند زیرا آنها فرآیندهای تمایزبایی ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت را تنظیم می‌کنند. به این علت تصور می‌شود تفاوت اصلی بین ژنوتیپ‌ها از نظر جنین‌زایی، مربوط به سطوح متفاوت هورمون‌های درون‌زای آنها است. پژوهشگران گزارش کردند رابطه مثبتی بین توانایی پاسخ به تیمار القای توفوردی و سطوح IAA درون‌زا وجود دارد (Arnholdt-Schmitt, 1995).

(Majd 2011). القای جنین‌زایی سوماتیکی

تعداد جنین سوماتیکی

BA (۵ میلی گرم در لیتر) (۶/۰۲ عدد) مشاهده شد. تعداد جنین تولید شده در ریزنمونه ریشه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها کمتر بود به طوری که بیشترین جنین تولید شده در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) (۱۲/۳۳ عدد) و کمترین آن در محیط کشت B5 مشاهده شد و هیچ جنین سوماتیکی تولید نشد (جدول ۲). در تیمارهای هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۸ میلی گرم در لیتر) + BA (۶ میلی گرم در لیتر) اگرچه در ابتدا تعداد جنین‌های بیشتری در مقایسه با تیمار هورمونی IAA (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۵ میلی گرم در لیتر) تولید شدند، اما بعد از گذشت ۳ هفته، رشد جنین‌ها در مرحله کروی و قلبی شکل متوقف شد، تا این مرحله کالوس‌ها سبز روشن بودند و با گذشت زمان کالوس‌های جنینی قهوه‌ای رنگ شده و بافت جنینی خود را از دست دادند (شکل ۱).

نتایج این آزمایش نشان داد تعداد جنین‌های تولید شده در ریزنمونه کوتیلدون بالاتر از سایر ریزنمونه‌ها بود. بیشترین تعداد جنین نابالغ تولید شده در ریزنمونه کوتیلدون، در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) و محیط کشت MB با ترکیب هورمونی 2,4-D (۶ میلی گرم در لیتر) + BA (۸ میلی گرم در لیتر) (۲۰/۳۳ عدد) بود و کمترین آن در محیط کشت B5 بود که در هر سه نوع ترکیب هورمونی هیچ جنینی تولید نشد و تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین بیشترین تعداد جنین تولید شده در ریزنمونه هیپوکوتیل، به ترتیب در محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) (۱۲/۳۳ عدد)، محیط کشت MB با ترکیب هورمونی 2,4-D (۶ میلی گرم در لیتر) + BA (۸ میلی گرم در لیتر) (۱۱/۶۷ عدد) و محیط کشت B5 با ترکیب هورمونی IAA (۲ میلی گرم در لیتر) +



شکل ۱- جنین‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون در ترکیب هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی گرم در لیتر). a: کالوس سبز روشن دارای بافت جنینی - b-c: جنین در مرحله کروی - d: جنین در مرحله قلبی شکل - e: بافت کالوس بدون جنین - f: کالوس تیره شده بعد از گذشت ۳ هفته از کشت در رنگ آمیزی با استوکارمین

Figure 1- Embryogenesis in cotyledon explants of 2,4-D (1 mg/L) + BA (1.5 mg/L) hormonal compounds. a: Light green callus with embryonic tissue-b-c: Embryo in spherical stage-d: Embryo in heart-shaped stage-e: Callus tissue without embryo-f: Darkened callus after 3 weeks of culture- Staining with acetocarmine

محیط کشت بدون هورمون، جنین‌ها مراحل تکاملی را طی کرده و به بلوغ رسیدند. همچنین جهت ریشه‌زایی، جنین‌ها به محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ منتقل شدند. در این تیمار، بیشترین تعداد جنین سوماتیکی تولید شده در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد (شکل ۲ مراحل تکامل جنین سوماتیکی).

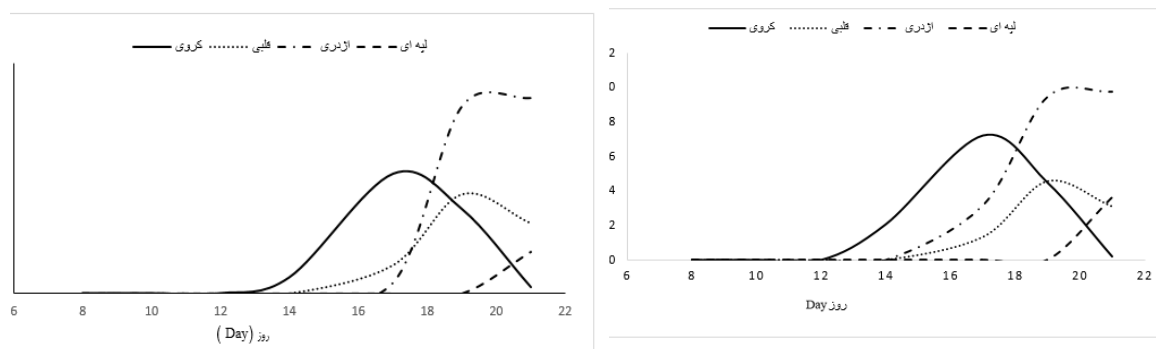


شکل ۲- مراحل تکامل جنین سوماتیکی در ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر). a جنین در مرحله کروی- b مرحله قلب شکل- c مرحله لپه ای- d مرحله گیاهچه- e گیاهچه ریشه دار؛ تصویر برداری با باینوکولار

Figure 2- Stages of somatic embryo development in cotyledon explant under hormonal treatment of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L). a Embryo in spherical stage- b heart-shaped stage- c cotyledon stage- d seedling stage- e Rooted seedling- Binocular imaging

جنین‌های لپه‌ای قابل مشاهده بودند (شکل ۳a). همچنین مراحل رشد جنین‌ها در ریزنمونه کوتیلدون مشابه با ریزنمونه هیپوکوتیل بود، اما در ریزنمونه کوتیلدون تعداد جنین‌ها کمتر از ریزنمونه هیپوکوتیل بود. به طوری که بیشترین جنین کروی تولید شده در روز ۱۷ام برابر با ۲/۶ عدد بود و در روزهای بعد جنین‌های کروی تبدیل به قلبی و اژدری شکل شدند که بیشترین جنین‌های قلبی و اژدری شکل به ترتیب در روزهای ۱۹ و ۲۱ام (۲/۱۶ و ۴/۲۵ عدد) از اعمال تیمار مشاهده شد. در روز ۲۱ام از اعمال تیمار نیز جنین‌های لپه‌ای قابل مشاهده بودند (شکل ۳b).

در پژوهش حاضر، شمارش تعداد جنین‌های سوماتیکی تولید شده در مراحل مختلف رشدی (کروی، قلبی، اژدری و لپه‌ای) در ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون در تیمار هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. تقریباً از روز ۱۴ام، جنین‌های کروی در سطح ریزنمونه با باینوکولار قابل مشاهده بودند. نتایج نشان دادند در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین جنین کروی تشکیل شده در روز ۱۷ام از شروع اعمال تیمار بوده است (۷/۲۴ عدد) و با گذشت زمان، جنین‌های کروی مراحل رشد و بلوغ خود را طی کردند، به طوری که پیک تولید جنین‌های قلبی روز ۱۹ام از کشت بود (۴/۵۶ عدد). همچنین در روز ۲۱ام،



شکل ۳- روند افزایش تولید جنین سوماتیکی در تیمار هورمونی IAA (۲ میلی گرم در لیتر) + BA (۵ میلی گرم در لیتر) در مراحل مختلف پس از کشت. a: در ریزنمونه هیپوکوتیل. b: در ریزنمونه کوتیلدون

Figure 3- The process of increasing somatic embryo production under the hormonal treatment of IAA (2 mg/L) + BA (5 mg/L) at different stages after cultivation. a: in hypocotyl explant. b: in cotyledon explant

جدول ۲. اثرات متقابل نوع محیط کشت، ترکیب هورمونی و نوع ریزنمونه بر فاکتورهای مورد ارزیابی

Table 2. The interaction effect of the type of culture medium, hormonal composition and the type of explant on the evaluated factors

درصد جنین‌زایی	تعداد جنین	درصد کالوس‌زایی	ترکیب هورمونی	نوع ریزنمونه	نوع محیط کشت
90 ^a	20.33 ^a	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D	کوتیلدون	MS
20 ^f	4.33 ^{ede}	100 ^a	6 BA+8 2-4.D		
51.16 ^{ed}	2.16 ^{ef}	96.67 ^{ab}	5 BA+2 IAA	هیپوکوتیل	
65 ^b	12.33 ^b	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D		
0 ^g	0 ^f	83.33 ^{bc}	6 BA+8 2-4.D	ریشه	
90.33 ^a	5.17 ^{cd}	93.33 ^{ab}	5 BA+2 IAA		
41.66 ^{de}	12.33 ^b	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D	کوتیلدون	
0 ^g	0 ^f	73.33 ^c	6 BA+8 2-4.D		
0 ^g	0 ^f	100 ^a	5 BA+2 IAA	کوتیلدون	
58.33 ^{bc}	4 ^{ede}	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D		
90 ^a	20.33 ^a	100 ^a	6 BA+8 2-4.D	هیپوکوتیل	MB
0 ^g	0 ^f	93.33 ^{ab}	5 BA+2 IAA		
58.33 ^{bc}	4 ^{ede}	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D	ریشه	
61.66 ^b	11.67 ^b	100 ^a	6 BA+8 2-4.D		
36.07 ^c	3.04 ^{de}	72.20 ^c	5 BA+2 IAA	کوتیلدون	
0 ^g	0 ^f	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D		
18.33 ^f	4.33 ^{ede}	90 ^{ab}	6 BA+8 2-4.D	کوتیلدون	
0 ^g	0 ^f	100 ^a	5 BA+2 IAA		
0 ^g	0 ^f	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D	کوتیلدون	
0 ^g	0 ^f	100 ^a	6 BA+8 2-4.D		
0 ^g	0 ^f	90 ^{ab}	5 BA+2 IAA	هیپوکوتیل	B5
0 ^g	0 ^f	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D		
0 ^g	0 ^f	50 ^d	6 BA+8 2-4.D	ریشه	
56.66 ^{bc}	6.02 ^c	74.42 ^c	5 BA+2 IAA		
0 ^g	0 ^f	100 ^a	1.5 BA+ 2 2-4.D	کوتیلدون	
0 ^g	0 ^f	50 ^d	6 BA+8 2-4.D		
0 ^g	0 ^f	100 ^a	5 BA+2 IAA		

حروف یکسان بیان کننده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

The same letters indicate no significant difference at the $P < 0.05$ level using the LSD test.

بیان‌کننده نقش مثبت هورمون BA در القا و تشکیل کالوس‌های جنین‌زا است. (Godishala et al., 2011) در آزمایشی گزارش کردند ریزنمونه‌های کوتیلدون گیاه گوجه‌فرنگی، کالوس‌های جنینی را بر روی محیط کشت MS با ترکیب IAA و BAP تولید می‌کنند. تیمار با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP منجر به القای بیشترین فراوانی جنین‌زایی سوماتیکی با بالاترین تعداد جنین سوماتیکی مستقیم از ریزنمونه شد که با نتایج این پژوهش مطابقت داد (Swamy et al., 2005).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، فقط جنین‌های تولید شده در تیمار هورمونی IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۵ میلی‌گرم در لیتر) مراحل تکاملی را طی و منجر به تولید گیاهچه کامل شدند. در این تیمار، بیشترین تعداد جنین سوماتیکی تولید شده در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد. اما در تیمارهای هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) + BA (۶ میلی‌گرم در لیتر) در ابتدا تعداد جنین‌های کروی و قلبی شکل بیشتری تولید شد که با گذشت زمان رشد جنین‌ها متوقف شد و رنگ کالوس‌های جنینی به قهوه‌ای تغییر کردند و در نهایت بافت جنینی خود را از دست دادند. نتایج این پژوهش نقش مثبت هورمون BA و IAA در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا و جنین‌زایی سوماتیکی را نشان داد که با یافته‌های پژوهشگران مذکور مطابقت دارد. با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز تولید جنین‌های سوماتیکی در این پژوهش، تولید بذر مصنوعی در گیاه گوجه‌فرنگی می‌تواند بررسی شود.

(Wajeaha et al., 2019) گزارش کردند ظرفیت باززایی ریزنمونه‌های جوان بهتر از ریزنمونه‌های بالغ است. نتایج آنها نشان دادند کالوس‌های جنین‌زای مشتق‌شده از ریزنمونه‌های کوتیلدون، پتانسیل باززایی بالاتری نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل دارند. پژوهش‌های زیادی با هدف بررسی ریخت‌شناسی جنین‌زایی سوماتیکی انجام شده است که نشان می‌دهد اکسین‌ها در تشکیل سلول‌های اولیه جنینی، نقش اساسی داشته، اما تداوم حضور آنها مانع از تمایز سلول‌های مرستمی اندام هوایی شده و جنین‌های غیر طبیعی با قدرت جوانه زنی پائین تولید می‌کنند (Horstman et al., 2017). هورمون‌های ایندول استیک اسید و بنزیل آمینو پورین، در غلظت‌های متفاوت برای تمامی ریزنمونه‌ها، بر کالوس‌های جنین‌زا در گیاه گوجه‌فرنگی اثر مثبتی دارند (Chaudhry et al., 2010). (Wajeaha et al., 2019) غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد را در گیاه گوجه‌فرنگی برای ارزیابی القای جنین سوماتیکی در شرایط آزمایشگاهی آزمایش کردند. نتایج آنها نشان دادند غلظت بالاتر سیتوکینین به همراه غلظت کم اکسین سبب ایجاد تمایل به سمت تولید کالوس جنین‌زا می‌شود. بیشترین القای کالوس از محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin در ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون مشاهده شد. (Philip et al., 1996) گزارش کردند هورمون BA در گیاه گوجه‌فرنگی یک تنظیم‌کننده رشد ضروری و مهم برای القای جنین‌های سوماتیکی است که نتایج این پژوهش نیز

- (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120, 881-902. Doi: [10.1007/s11240-014-0664-4](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4)
- Godishala, V., Mangamoori, L., & Nanna, R. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), 2521. ISSN: [0974 - 0910](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17)
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848-857. Doi: [10.1104/pp.17.00232](https://doi.org/10.1104/pp.17.00232)
- Majd, A. (2011) Investigation of the effects of some plant growth regulators on the body embryogenesis and histology of its stages in tomato plant variety Y. *Plant Science Research Quarterly*, 5(4), 49-56. [In Persian]. SID: <https://sid.ir/paper/185785/en>
- Mashayekhi, K. (2007) Plant somatic embryogenesis. *Makhtoumgholi faraghi (Sarly) Press*, 483p. [In Persian]. Doi: [10.22069/JOPP.2017.10221.1953](https://doi.org/10.22069/JOPP.2017.10221.1953)
- Mirghis, E., Mirghis, R., & Lacatus, V. (1995, March). Analysis of tomato cultivars and hybrids for in vitro callus formation and regeneration. In *I International Symposium on Solanacea for Fresh Market*, 412 (pp. 111-116). Doi: [10.17660/ActaHortic.1995.412.12](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.412.12)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. Doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M. (2016) The role of the auxins during somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis: fundamental Aspects and Applications*, 171-182. Doi: [10.1007/978-3-319-33705-0_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_10)
- Nover, L., Kranz, E., & Scharf, K. D.
- ## References
- Abohater, M. A., Bakil, Y., & Baaziz, M. (2017) Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of date palm. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: Tissue Culture Applications*, 203-214. Doi: [10.1007/978-1-4939-7156-5_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17)
- Ali, A., Naz, S. H. A. G. U. F. T. A., Alam, S. S., & Iqbal, J. (2007) In vitro induced mutation for screening of red rot (*Colletotrichum falcatum*) resistance in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany*, 39(6), 1979-1994. CorpusID: [59356420](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17)
- Arnholdt-Schmitt, B., Herterich, S., & Neumann, K. H. (1995) Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 809-815. Doi: [10.1007/BF00220964](https://doi.org/10.1007/BF00220964)
- Behki, R. M., & Lesley, S. M. (1980) Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 98(1), 83-87. Doi: [10.1016/S0044-328X\(80\)80222-4](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(80)80222-4)
- Chaudhry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H. A. B. I. B., & Anjum, M. A. (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 155-163. RN: [41071655](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17)
- Compton, M. E., & Veilleux, R. E. (1991) Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24, 223-231. Doi: [10.1007/BF00033481](https://doi.org/10.1007/BF00033481)
- Costa, G. M., Nogueira, F. T. S., Otoni, W. C., & Brommonschenkel, S. H. (2000) In vitro regeneration of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 'IPA-5' and 'IPA-6'. *Ciencia e Agrotecnologia*, 24(3), 671-678. Record Number: [20013070141](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17)
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K.

- Venkataiah, P., Rambabu, M., Upender, M., & Subhash, K. (2005) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. Doi: [Int. Cl.7 A01H 4/00, 5/10, 5/12](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(82)80041-3)
- Varis, S., Klimaszewska, K., & Aronen, T. (2018) Somatic embryogenesis and plant regeneration from primordial shoot explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. somatic trees. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1551. Doi: [10.3389/fpls.2018.01551](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01551)
- Widmeier, E., Airik, M., Hugo, H., Schapiro, D., Wedel, J., Ghosh, C. C., & Hildebrandt, F. (2019) Treatment with 2, 4-dihydroxybenzoic acid prevents FSGS progression and renal fibrosis in podocyte-specific Coq6 knockout mice. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 30(3), 393. Doi: [10.1681/ASN.2018060625](https://doi.org/10.1681/ASN.2018060625)
- Winkelmann, T. (2016) Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 25-46. Doi: [10.1007/978-1-4939-3061-6_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2)
- Yousry, M. M. (2013) In vitro propagation and somatic embryogenesis in Egyptian husk tomato (*Physalis pubescens* L.). *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3), 1415-1425. ISSN: [1819-544X](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2)
- Zamir, D., Jones, R. A., & Kedar, N. (1980) Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. *Plant Science Letters*, 17(3), 353-361. Doi: [10.1016/0304-4211\(80\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90168-6)
- Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., & Sun, M. X. (2017) Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players. *Plant Physiology*, 173(1), 130-142. Doi: [10.1104/pp.16.01406](https://doi.org/10.1104/pp.16.01406)
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1411. Doi: [10.1105/tpc.5.10.1411](https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1411)
- (1982) Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 177(6), 483-499. Doi: [10.1016/S0015-3796\(82\)80041-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(82)80041-3)
- Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D., & Smith, R. H. (2003) Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1253-1257. Doi: [10.1078/0176-1617-01103](https://doi.org/10.1078/0176-1617-01103)
- Philip, R., Penzkofer, A., Bäumler, W., Szeimies, R. M., & Abels, C. (1996) Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 96(1-3), 137-148. Doi: [10.1016/1010-6030\(95\)04292-X](https://doi.org/10.1016/1010-6030(95)04292-X)
- Raghavan, V. (2005) Control of leaf formation and somatic embryogenesis in cultured zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). *International Journal of Plant Sciences*, 166(4), 575-588. Doi: [10.1086/430336](https://doi.org/10.1086/430336)
- Rzepka-Plevnes, D., Kulpa, D., & Kurek, J. (2007) Somatic embryogenesis in callus cultures of tomato *Lycopersicon peruvianum* (L.) MILL. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych-Polska Akademia Nauk*, 523, 185. [71-424 SZCZECIN](https://doi.org/10.1086/430336)
- Salehi, B., Sharifi-Rad, R., Sharopov, F., Namiesnik, J., Roointan, A., Kamle, M., & Sharifi-Rad, J. (2019) Beneficial effects and potential risks of tomato consumption for human health: An overview. *Nutrition*, 62, 201-208. doi: [10.1016/j.nut.2019.01.012](https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.01.012)
- Singh, P., & Sinha, A. K. (2017) Interplay between auxin and cytokinin and its impact on mitogen activated protein kinase (MAPK). *Auxins and cytokinins in plant biology: Methods and Protocols*, 93-100. Doi: [10.1007/978-1-4939-6831-2_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6831-2_7)
- Swamy, N. R., Ugandhar, T., Praveen, M.,

