Saffron Agronomy & Technology
Vol. 8, No. 3, Fall 2020, P. 361-375

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۸، شماره ۳،پاییز ۱۳۹۹ ص. ۳۷۵-۳۶۱

تأثیر امواج فراصوت، دما، نور، کیتوسان و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی زعفران (*Crocus sativus* L.)

فریبا افخمی حور[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول اصغری زکریا[۳]، محمد مهدی‌زاده[۴]و بهنام فیروزی[۵]

تاریخ دریافت: ۲۳ دی ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۲۰ خرداد ۱۳۹۹

افخمی حور، ف.، زارع، ن.، اصغری زکریا، ر.، مهدی‌زاده، م.، و فیروزی، ب. ۱۳۹۹. تأثیر امواج فراصوت، دما، نور، کیتوسان وتنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی زعفران (*Crocus sativus* L.). زراعت و فناوری زعفران، ۸(۳): ۳۷۵-۳۶۱.

چکیده

زعفران به عنوان گیاهی چندساله و تریپلوئید به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی دنیا محسوب می‌شود. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی عوامل مختلف (نوع اکسین، امواج فراصوت، دما، نور و کیتوسان) بر کالوس‌زایی و رشد کالوس در ریزنمونه‌های بنه زعفران در قالب دو آزمایش انجام شد. در آزمایش اول تأثیر امواج فراصوت و نوع اکسین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بنه‌های زعفران پس از ضدعفونی به قسمت‌های مساوی تقسیم و پس از تیمار با امواج فراصوت، روی محیط کشت MS حاوی ۲ $mg.l^{-1}$ اکسین (NAA و 2,4-D) به همراه ۲ $mg.l^{-1}$ Kin کشت شدند. در آزمایش دوم، تأثیر درجه حرارت، کیتوسان و روشنایی بطورجداگانه بر کالوس‌زایی و رشد کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در ماه دوم و سوم پس از کشت تفاوت معنی‌داری وجود دارد. محیط کشت MS حاوی 0.5 $mg.l^{-1}$ Kin + 2 $mg.l^{-1}$ NAA از نظر درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس ریزنمونه‌های بنه زعفران در مقایسه با محیط کشت MS حاوی 0.5 $mg.l^{-1}$ Kin + 2 $mg.l^{-1}$ 2,4-D از کارایی بالاتری برخوردار بود. در محیط کشت MS حاوی 2,4-D که درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس پایین بود، استفاده از تیمار زخم‌زنی با استفاده از تیمار امواج فراصوت باعث تقویت رشد کالوس گردید. در آزمایش دوم نیز درصد کالوس‌زایی و رشد ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت حاوی NAA بطور معنی‌داری بیشتر از 2,4-D بود. علاوه براین در آزمایش دوم، در محیط کشت MS حاوی 2,4-D استفاده از کیتوسان با غلظت ۰/۲۵ $g.l^{-1}$ باعث تحریک القای کالوس گردید و فراوانی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های بنه زعفران در این محیط کشت را افزایش داد، ولی افزایش غلظت کیتوسان از ۰/۲۵ $g.l^{-1}$ به ۰/۷۵ $g.l^{-1}$ کالوس‌زایی و رشد کالوس را کاهش داد. در حالی که در محیط کشت MS حاوی NAA که از کارایی کالوس‌زایی و رشد کالوس بالایی برخوردار بود، استفاده از کیتوسان، کالوس‌زایی و رشد کالوس بنه زعفران را کاهش داده است. بطورکلی، بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی NAA در دمای ۲۵ ^{o}C و تاریکی بدست آمد که برای مطالعات کشت درون‌شیشه‌ایی و مهندسی ژنتیک زعفران قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: اکسین، سونیکاسیون، کالوس، کشت سلول بافت گیاهی.

۱ - دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳ - استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۴- دانش‌آموخته دکتری علوم علف‌های هرز، دانشگاه محقق اردبیلی
۵- دانش آموخته دکتری بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*-نویسنده مسئول: zarenasser@yahoo.com)

DOI: 10.22048/JSAT.2020.215454.1376

مقدمه

زعفران بـا نـام علمی *Crocus sativus* L. متعلق بـه جنس *Crocus* (زعـفـران) و خـانـواده Iridaceae (زنـبق) بـه‌عنوان گران‌ترین ادویه دارویی جهان، جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات دارویی و صـادراتی ایران دارد. این گیاه بومی ایران اسـت که در تولید داروهای پزشـــکی و درمان بیماری ها و همچنین داشـــتن خواص غذایی جایگاه مهمی دارد و از نظر اقتصادی دارای ارزش بسـیار بالایی می باشد. تکثیر این گیاه فقط از طریق غیرجنسی و توسـط بنه (پیاز) صورت گرفته و هر سال بنه‌های جدیدی از بنه مادری تولید می‌گردد (Kafi et al., 2006). کلاله‌های خشـک گیـاه زعفران علاوه بر دارا بودن ترکیباتی نظیر کربوهیدرات (پکتین‌ها و پنتوزان‌ها)، پروتئین، اسیدهای چرب (اسیدپالمیتیک، اسیداستئاریک و اسیدلینولئیک)، املاح و ویتامین‌ها (B2)، حاوی ترکیبات ویژه‌ای هســـتند که مقدار و نوع این ترکیبات عامل تعیین‌کننده کیفیت و ارزش زعفران اسـت. ترکیبات کروســـین، پیکروکروسـین و سـافرانال که به ترتیب مسئول رنگ زرد، طعم تلخ و عطر و بوی زعفران را شـــامل می‌شـــوند، از متابولیت‌های بسیار مهم این گیاه هستند (Kumar et al., 2008).

روش‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان از طریق کشت بافت، نوعی تکثیر غیرجنسـی اسـت که مزیت آن نسبت به روش‌های مرسوم نظیر تولید تعداد زیادی گیاه، با کیفیت و محتوای ژنتیکی یکنواخت در زمان کوتاه حائز اهمیت اسـت. رشـد و نمو سلول و ریزنمونه‌های گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل متفاوتی نظیر ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، زخم‌زنی سلول‌ها و بافت‌ها، شرایط محیطی رشد و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد می باشد.

انتخاب نوع ریزنمونه در مرحله رشدی مناسب از گیاه مادری به همراه تنظیم‌کننده‌های رشـد، نقش مؤثری در القای کالوس و کشـت بافت در شـرایط درون شـیشه ای داشته است و همچنین سـن ریز نمونه و نحوه‌ی قرار گرفتن آن روی محیط کشـت بر القای کالوس مؤثر می‌باشـد. (Koohi et al., 2014; Verma et al., 2016; Zare et al., 2009).

رشد و تکثیر گیاه زعفران به‌واسطه حساسیت‌هایی که از نظر رشـد آرام و پوسـیدگی کورم‌ها توسط عوامل بیماری‌زای خاکزاد دارد همواره با عوامل محدودکننده زیادی مواجه اسـت. لذا روش کشـت بافت به عنوان یک روش مؤثر جهت تکثیر زعفران مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد. می‌توان با کشـت بافت، توان بالقوه‌ای را برای تولید انبوه بنه‌های بدون پاتوژن و مطلوب از لحاظ ژنتیکی فراهم ســـاخـت. همچنین، عملکرد کمی و کیفی زعفران را با با کشـت بافت می‌توان ارتقاء بخشـیده و درآمدزایی کشـاورزان و صـــادرات زعفران را افزایش داد (Farjaminezhad et al., 2013; Castellar & Iborra, 1997; Sajjadifard & Pazhouhandeh, 2015). علاوه‌براین، کشـت سـلول و بافت گیاهی می‌تواند به عنوان منبع با ارزشی برای تولید متابولیت‌های ثـانویـه مورد اســـتفـاده قرار گیرد (Farjaminezhad et al., 2013). تأثیر عواملی مانند شـــرایط محیطی (دما و روشـــنایی)، ترکیب و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت و نوع ریزنمونه را در موفقیت کشـت درون‌شـیشه‌ایی زعفران مورد تأکید قرار گرفته اسـت (Sajjadifard & Pazhouhandeh, 2015).

امواج فراصـــوت را می‌توان دســـته‌ای از موج‌های مکانیکی دانسـت که بسـامد آن بیش از ۲۰KHz می‌باشـد. در واقع امواج صـوتی بسامدشان بین ۲۰ Hz تا ۲۰ KHz است و بسامد کمتر از ۲۰ Hz را امواج فروصـوت می‌نامند (Rossing, 2014). تأثیر امواج فراصوت درگونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی با توجه به بسامد و میزان انرژی، متفاوت اسـت به‌طوری که ممکن اسـت انرژی امواج فراصوت، رشد بعضی از گونه‌ها را افزایش و بعضی دیگر را کاهش دهد (Ananthakrishnan et al., 2007).

امواج فراصـوت با توجه به مدت زمان و شدت آن می توانند

تأثیرات متفاوتی را اعمال کنند به‌طور مثال با سطح انرژی پایین تغییرات زیستی مفید و قابل بازگشتی را در سلول و بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کنند اما در شدت بالا و مدت زمان طولانی منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود. در واقع امواج فراصوت با انرژی کم، می‌توانند نفوذ پذیری غشای سلول را افزایش داده و اثرات بیولوژیکی متعددی را در سلول‌های گیاهی ایجاد کنند. به‌طوری که دوزهای بالای امواج فراصوت باعث بزرگتر و زیاد شدن زخم‌های کوچک در بافت‌های گیاهی شده که به مراتب باعث کالوس‌دهی بیشتر ریزنمونه‌ها می‌گردد (Koohi et al., 2014; Honarmand et al., 2017). مطالعات نشان داده است که شدت زیاد امواج فراصوت برای ترکیبات و مولکول‌های زیستی نظیر آنزیم‌ها و DNA مخرب بوده و آن‌ها را غیر فعال می‌سازد. همچنین از امواج فراصوت برای افزایش فراوانی انتقال مولکول‌ها به داخل سلول‌ها و بهبود کارایی تراریختی سلول‌های گیاهی استفاده می‌شود. امواج فراصوت با شدت و انرژی کم از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی داشته و دارای اثرات غیرمخرب زیستی فراوانی روی سلول‌های زنده ازجمله افزایش نفوذپذیری غشاء، تغییر در بیان ژن، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و میزان هورمون‌های خاص می‌باشد (Joersbo & Brunstedt, 1992; Miller et al., 1999).

نور و دما از عوامل محیطی مؤثر بر کالوس‌زایی و رشد و نمو سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ایی هستند. رشد و نمو سلول‌ها و پاسخ کشت‌بافتی ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ایی حاصل برهمکنش بین عوامل محیطی (از قبیل نور، دما و عناصر تغذیه‌ای) و عوامل ژنتیکی سلوها است.

بطوری‌که در دو گونه *Rosa damascene* و *Rosa miniature* نشان داده شده که ریزنمونه‌ها در مرحله کالوس‌زایی نسبت به غلظت‌های مختلف هورمونی به شکل متنوعی پاسخ داده و در همه ریزنمونه‌های مورد بررسی، نور فرایند کالوس‌زایی را به تاخیر انداخت ولی برعکس تاریکی بر روند کالوس‌زایی اثر افزایشی داشت (Abdirad et al., 2012). در گیاه استویا نیز دما و شدت نور به عنوان عوامل مهم و مؤثر بر رشد درون‌شیشه‌ایی ریزنمونه‌های گره گزارش شده است (Ebrahimi et al., 2017).

کیتوسان یک پلی ساکارید قابل تجزیه در طبیعت است که به علت دارا بودن ویژگی‌های متعدد از جمله تقویت رشد و نمو سلول‌های گیاهی، بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیکی و فعال‌سازی ژن‌های دفاعی گیاه مورد، استفاده قرار می‌گیرد (Barka et al., 2004). نشان داده شده که کیتوسان باعث افزایش پرآوری و تحریک رشد گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ایی شده و همچنین درکنترل بیماری‌های قارچی مؤثر است (Chien et al., 2007). در مطالعات متعددی تأثیر کیتوسان بر رشد سلول و تحریک آن گزارش شده است برای مثال کیتوسان در کشت درون‌شیشه‌ای انگور باعث تحریک رشد و نمو انگور رقم چاردونی (*Chardonnay*) شده است (Barka et al., 2004). در کشت بافت اندام‌های گیاهی گل ارکیده، استفاده ازکیتوسان به عنوان محرک رشد و نمو بر باززایی درون‌شیشه‌ای بافت مریستم جوانه‌های جانبی ارکیده، تأثیر مثبت داشته است (Wang et al., 2003). با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت دارویی گیاه زعفران، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی تأثیر امواج فراصوت (اولتراسوند)، کیتوسان، دما، نور و تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی بنه‌های زعفران در کشت‌های درون شیشه‌ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بنه‌های زعفران از خراسان رضوی (شهرستان بجستان) تهیه شده و پس از حذف غلاف‌های خارجی، به مدت۳۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. سپس به ترتیب با استفاده از قارچ‌کش

بنومیل (سه گرم در لیتر) به مدت یک ساعت، اتانول ٪۷۰ به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود لامینار استریل شدند. سپس ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شده و برای کشت در تیمارهای مختلف به شرح زیر استفاده شدند.

آزمایش اول: ارزیابی تأثیر امواج فراصوت و ترکیب هورمونی بر کالوس‌زایی

پس از ضدعفونی، بنه‌ها به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه تحت تأثیر امواج فراصوت (Bandelin Sonorex Digitec) با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز قرار گرفتند. سپس در زیر هود لامینار به قطعات مکعبی شکل و هم‌اندازه برش داده شده و روی محیط کشت پایه ۱MS حاوی ۲ $mg.l^{-1}$ اکسین (NAA و 2,4-D) به همراه $mg.l^{-}$ Kin ۰/۵[1] در چهار تکرار کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد (دمای ۲۵ درجه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری و در دو و سه ماه پس از کشت، صفات مرتبط با کالوس‌زایی (شامل درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس) یادداشت شدند.

آزمایش دوم: ارزیابی تأثیر نور، دما و کیتوسان بر کالوس‌زایی

در آزمایش دوم، تأثیر درجه حرارت، کیتوسان و روشنایی بطورجداگانه بر کالوس‌زایی و رشد کالوس در ریزنمونه‌های بنه زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که ترکیب‌های تیماری عوامل مختلف (کیتوسان، نور و دما) مورد ارزیابی قرار نگرفته است. بنه‌ها پس از ضدعفونی، در زیر هود لامینار به قطعات مکعبی شکل و هم‌اندازه برش داده شده و در محیط کشت MS حاوی $mg.l^{-1}$ ۲ اکسین (NAA و 2,4-D) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin کشت گردید و براساس نوع تیمارها در تاریکی و روشنایی همچنین دماهای مختلف (۱۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در چهار تکرار نگهداری شدند. علاوه براین، بخشی از ریزنمونه‌ها محیط کشت MS حاوی $mg.l^{-1}$ ۲ اکسین (NAA و 2,4-D) به همراه $mg.l^{-1}$ ۰/۵ Kin و کیتوسان (با غلظت صفر، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ $g.l^{-1}$) کشت گردید. کشت‌های مربوط به تیمار کیتوسان در اتاقک رشد (دمای ۲۵ درجه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و کشت‌های مربوط به تأثیر دما در اتاقک رشد با دمای ۱۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و کشت‌های مربوط به تأثیر تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ولی بدون روشنایی نگهداری شدند. حدود ۲ و ۳ ماه پس از کشت، صفات مرتبط با کالوس‌زایی (شامل درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس) یادداشت شدند.

تجزیه آماری داده‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver 20. انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه نرمال بودن توزیع داده ها که با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف تک نمونه مورد بررسی قرار گرفت و میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ایی دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شد.

نتایج و بحث

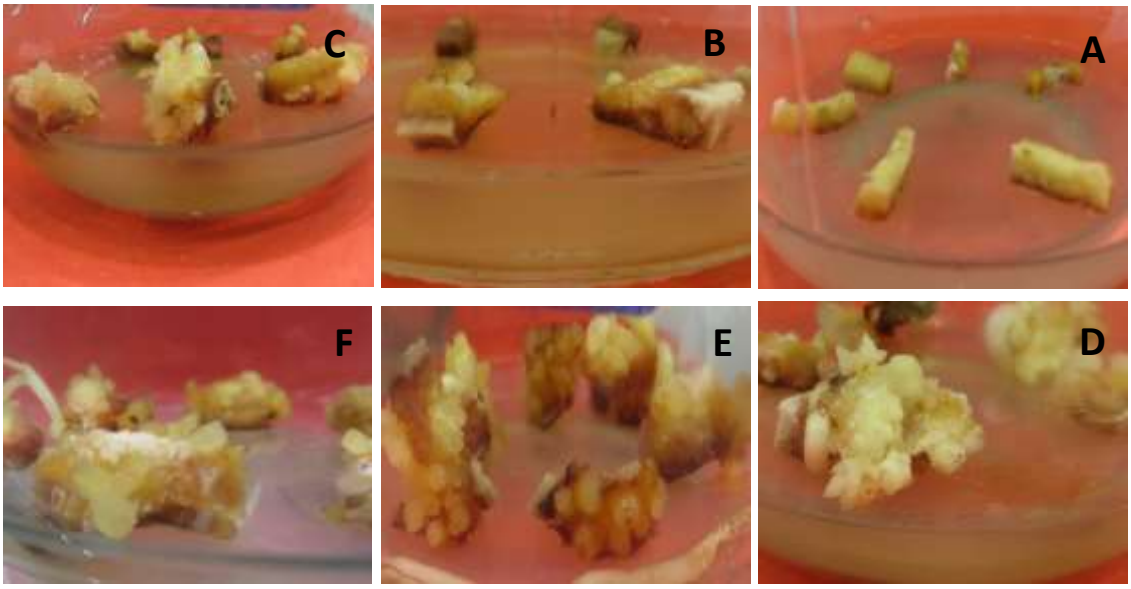
آزمایش اول: تاثیر تیمارهای امواج فراصوت و تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی زعفران

ریزنمونه‌های بنه‌های زعفران ۱۰ روز بعد از کشت، تغییر رنگ داده و متورم شدند و بعد از گذشت ۲۰ روز، شروع به کالوس‌زایی کردند که باتوجه به نوع تیمارهای هورمونی و شرایط محیط کشت، درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس‌ها متفاوت بود (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین مدت زمان های مختلف تیمار امواج فراصوت از نظر صفات مورد بررسی شامل درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس (ماه دوم و

1- Murashige & Skoog

سوم) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۱).

بیشترین درصد کالوس‌زایی به میزان ۷۱/۲۵ و ۸۳/۵ درصد از تیمار امواج فراصوت به مدت ۳ دقیقه و به میزان ۷۹/۵ و ۸۸ درصد برای تیمار شاهد در محیط کشت MS حاوی Kin mg.l^{-1} ۰/۵ + NAA mg.l^{-1} ۲ در ماه های دوم و سوم بعد از کشت به‌دست آمد که با یک‌دیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند.



شکل ۱- کالوس‌زایی درون شیشه‌ای بنه‌های زعفران در محیط کشت MS حاوی (۰/۵ mg.l^{-1}) Kin +(۲ mg.l^{-1}) NAA تحت تأثیر تیمار فراصوت سه دقیقه در زمان‌های متفاوت: A) ۲۰ روز پس از کشت، B) یک ماه پس از کشت، C) دو ماه پس از کشت؛ و مدت زمان‌های مختلف تیمار با امواج فراصوت: D) یک، E) سه و F) پنج دقیقه امواج فراصوت و سه ماه پس از کشت

Figure 1- In vitro callus induction from saffron corms on MS medium supplemented with 2 mg.l^{-1} NAA+ 0.5 mg.l^{-1} Kin and 3 min ultrasound treatment: A) 20 days after the culture B) One month after the culture C) Two months after the culture; and callus growth in different durations of sonication: D) 1, E) 3 and F) 5 min at 3 month after culture.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس زایی و وزن تر کالوس های حاصل از کشت درون‌شیشه ای بنه زعفران تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت

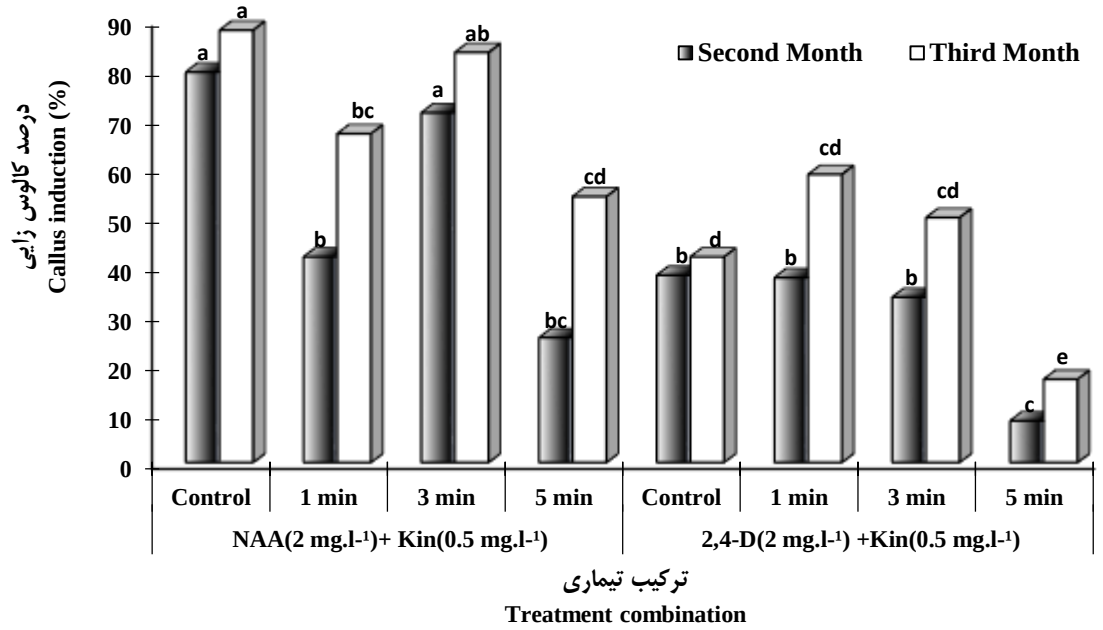
Table 1- Analysis of variance for in vitro callus induction and fresh weight of calli in saffron corm explants under the ultrasound treatment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean square)			
		ماه دوم پس از کشت 2nd month after culture		ماه سوم پس از کشت 3rd month after culture	
		وزن تر کالوس Callus fresh weight	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن تر کالوس Callus fresh weight	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)
تیمار Treatment	7	0.132**	2146.55**	0.153**	2083.05**
خطا Error	24	0.009	153.50	0.011	178.02
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	20.16	28.90	18.42	22.66

**: significant at 1% probability levels.

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

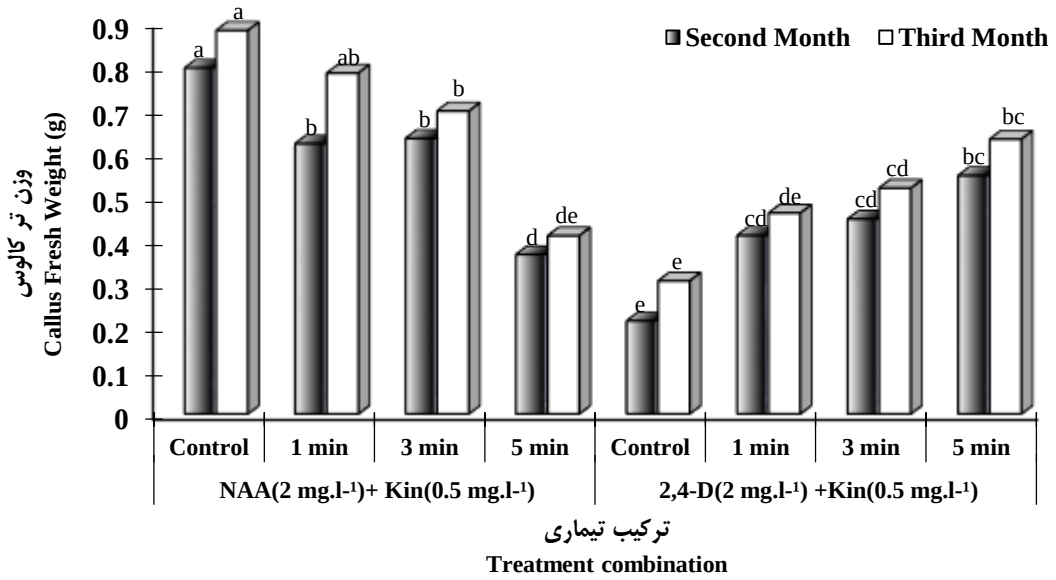
درحالی که کمترین درصد کالوس زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ mg.l^{-1} 2,4-D + ۰/۵ mg.l^{-1} Kin و تیمار ۵ دقیقه‌ای امواج فراصوت به میزان ۸/۵ و ۱۷ درصد به ترتیب در ماه دوم و سوم مشاهده شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود درصد کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی NAA در تمام سطوح امواج فراصوت به‌طور معنی‌داری بیشتر از آن در محیط کشت MS حاوی 2,4-D بود. در محیط کشت MS حاوی 2,4-D تیمار بنه‌ها با امواج فراصوت به مدت ۱ دقیقه باعث کاهش معنی‌دار درصد کالوس‌زایی آن‌ها گردید ولی با افزایش مدت زمان تیمار به ۳ دقیقه درصد کالوس‌زایی نیز مجددا افزایش یافته است. با این حال افزایش مدت زمان تیمار به ۵ دقیقه منجر به کاهش مجدد و معنی‌دار درصد کالوس‌زایی در هر دو محیط کشت (حاوی NAA و 2,4-D) مورد استفاده گردید (شکل ۲). به‌عبارت دیگر، استفاده از تیمار امواج فراصوت در محیط کشت MS حاوی NAA قابل توصیه و استفاده جهت افزایش کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های بنه زعفران نیست.کمترین وزن‌تر کالوس نیز از تیمار ۵ دقیقه‌ای امواج فراصوت در محیط کشت MS حاوی ۲ mg.l^{-1} NAA + ۰/۵ mg.l^{-1} Kin و تیمار شاهد (بدون تیمار امواج فراصوت) در محیط کشت MS حاوی ۲ mg.l^{-1} 2,4-D +۰/۵ mg.l^{-1} Kin به‌دست آمد (شکل ۳). مقایسه میانگین مربوط به وزن تر کالوس‌ها نیز نشان داد که تأثیر تیمار امواج فراصوت در ماه سوم بیشتر از ماه دوم بود. بیشترین وزن تر کالوس از تیمار شاهد (بدون تیمار امواج فراصوت) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mg.l^{-1} Kin + ۲ mg.l^{-1} NAA در ماه‌های دوم و سوم بعد از کشت بدست آمد. اما در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mg.l^{-1} Kin +2,4-D ۲mg.l^{-1} با افزایش مدت زمان قرارگیری ریزنمونه ها در معرض امواج فراصوت میانگین وزن تر کالوس‌ها به حالت مستمری افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین میانگین وزن تر کالوس را در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mg.l^{-1} Kin +2,4-D mg.l^{-1} ۲ در تیمار امواج فراصوت به مدت ۵ دقیقه در ماه دوم و سوم مشاهده شد که با وزن تر کالوس حاصل از تیمار امواج فراصوت به مدت زمان ۱ و ۳ دقیقه در محیط کشت MS حاوی Kin ۰/۵g.l^{-1} +2,4-D mg.l^{-1} ۲ اختلاف معنی‌داری نداشته ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از مقدار آن در تیمار بدون امواج فراصوت در این محیط کشت بود (شکل ۳).



شکل ۲- تأثیر تیمارهای فراصوت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای بنه زعفران

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار به تفکیک ماه دوم و سوم براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

Figure 2- The effect of ultrasound treatments and PGRs on callogenesis (%) of saffron corm explants in in vitro culture. Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range test at 5%.



شکل ۳- تأثیر تیمارهای فراصوت و تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی بر وزن‌تر کالوس درکشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه بنه زعفران

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار به تفکیک ماه دوم و سوم براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

Figure 3- The effect of ultrasound treatment and PGRs on fresh weight of callus (g) of saffron corm explants in in vitro culture.
Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range test at 5%.

امواج فراصوت با شدت و انرژی کم را می‌توان به‌عنوان یک روش مکانیکی در نظر گرفت که باعث زخم‌هایی کوچک در

بافت گیاهی می‌شود. با افزایش مدت زمان اعمال امواج فراصوت زخم‌های سطحی و عمیق‌تری در غشای سلول‌ها رخ داده که باعث افزایش فراوانی کالوس‌زایی می‌شود به‌طوری که هنرمند و همکاران (Honarmand et al., 2017) در بررسی تأثیر تیمار امواج فراصوت (فرکانس۳۷ کیلوهرتز) بر زنده‌مانی و رشد ریزنمونه‌های گیاه اسپرس در مدت زمان‌های صفر تا ۵ دقیقه گزارش کردند که قرارگیری ریزنمونه‌ها در معرض امواج فراصوت به مدت (۳۰ ثانیه) تأثیر مثبتی بر درصد ساقه‌دهی ریزنمونه‌های جوانه رائسی داشته و از طرف دیگر درصد کالوس‌زایی را نیز به‌طور چشمگیری افزایش داده است. با این‌حال، در تحقیق حاضر تیمار ریزنمونه‌های بنه زعفران به مدت یک تا ۵ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت و همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود این تیمارها درصد کالوس‌زایی را در مقایسه با شاهد افزایش ندادند. این اختلاف در تأثیر امواج فراصوت شاید ناشی از تفاوت در مدت زمان تیمار با امواج فراصوت و پاسخ متفاوت گونه‌های گیاهی و ریزنمونه‌های مورد استفاده به امواج فراصوت باشد. علاوه‌بر این، ریزنمونه‌های بنه زعفران پاسخ وابسته به دوز امواج فراصوت و ترکیب هورمونی محیط کشت نشان دادند. به‌طوری که مدت زمان ۵ دقیقه امواج فراصوت درصد کالوس‌زایی را به‌طور قابل ملاحظه و معنی‌داری کاهش داد. علاوه بر این، در محیط کشت MS حاوی 2,4-D بین تیمار شاهد و تیمارهای یک و ۳ دقیقه امواج فراصوت از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. در محیط کشت MS حاوی NAA درصد کالوس‌زایی در تیمار یک دقیقه امواج فراصوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافته ولی بین تیمار شاهد و ۳ دقیقه امواج فراصوت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).

گزارش شده است که فرکانس و مقدار انرژی مورد نیاز برای تیمار امواج فراصوت به‌طور گسترده بین گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهان، متفاوت می‌باشد (Ananthakrishnan et al., 2007). همان‌طور که هنرمند و همکاران (Honarmand et al., 2017) گزارش کردند بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه اسپرس با اعمال امواج فراصوت در دوره های زمانی ۳ و ۴ دقیقه به ترتیب با میانگین ۶۰/۹۸٪ و ۶۱/۱۱٪ و کمترین میزان آن در تیمار شاهد (بدون امواج فراصوت) مشاهده گردید اما در دوزهای بالاتر (بیشتر از ۴ دقیقه) میزان کالوس‌زایی به‌علت آسیب‌های ناشی از دوز بالای امواج فراصوت کاسته شده است.

ایجاد زخم در سلول‌های بافت‌های گیاهی در اثر امواج فراصوت احتمالاً از طریق تحت تأثیر قرار دادن بیوسنتز و انتقال هورمون‌های گیاهی باعث افزایش هدایت هورمون‌ها به سمت این سلول‌ها شده و درصد کالوس‌زایی را افزایش می‌دهد (Srivastava, 2002). امواج فراصوت با شدت و انرژی کم اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی داشته و دارای اثرات غیر مخرب زیستی فراوانی روی سلول‌های زنده ازجمله افزایش نفوذپذیری غشاء، تغییر در بیان ژن، افزایش بیوسنتز پروتئین، فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌های خاص می‌باشند (Schmidt et al., 1987). همچنین اعمال امواج فراصوت باعث افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانی که بخشی از پاسخ‌های دفاعی سلول‌ها است، می‌شوند. امواج فراصوت با ایجاد منافذ ریز در دیواره و غشای سلول‌های گیاهی می‌تواند تسریع‌کننده تبادل مولکول‌ها از طریق غشاها نیز باشد. تیمار فراصوت ممکن است روی فعالیت Ca2-ATPase و H+-ATPase در غشای پلاسمایی و کانال‌های یونی دیگر که برای رشد و تکثیر سلول خیلی مهم است تأثیرگذار باشد (Liu et al., 2003). بافت‌های مختلف گیاهی وقتی در معرض امواج فراصوت قرار می‌گیرند، اختلالاتی در مقیاس میکروسکوپی ایجاد می‌شود که می‌تواند ساختار یا عملکرد عادی سلول را مختل کند. همچنین امواج فراصوت، فراساختار سلول‌ها را از قبیل غشای سلولی، اسکلت سلولی، کلروپلاست‌ها و میتوکندری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liu et al., 2003). قناتی و سبحان‌نژاد (Ghanati & Sobhannejad,

2015)، در بررسی تأثیر امواج فراصوت با انرژی پایین بر غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.) نشان دادند که سطوح پایینی از انرژی امواج فراصوت می‌تواند محرک رشد سلول‌های گیاهی باشد. در تحقیق حاضر از نظر رشد کالوس (رشد و تکثیر سلولی) حاصل از بنه زعفران در اثر تیمار امواج فراصوت بسته به ترکیب هورمونی محیط کشت پاسخ متفاوتی مشاهده گردید. در محیط کشت MS حاوی NAA رشد کالوس‌ها با افزایش مدت زمان مدت زمان تیمار امواج فراصوت کاهش یافته به‌طوری که کمترین میزان رشد کالوس در این محیط کشت در تیمار بنه‌های زعفران به مدت ۵ دقیقه با امواج فراصوت مشاهده شده است. به عبارت دیگر با افزایش مدت زمان اعمال امواج فراصوت در محیط کشت MSحاوی ۲ $mg.l^{-1}$ NAA + ۰/۵ $mg.l^{-1}$ Kin از درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس کاسته شد. در حالی که در محیط کشت MS حاوی 2,4-D با اعمال تیمار و افزایش مدت زمان تیمار امواج فراصوت رشد کالوس افزایش یافته است به‌طوری که بیشترین وزن تر کالوس (رشد کالوس) در این محیط کشت در تیمار ریزنمونه ها با امواج فراصوت به مدت ۵ دقیقه به‌دست آمد (شکل ۳).

آزمایش دوم: تأثیر تیمارهای دما، نور و کیتوسان بر کالوس‌زایی زعفران

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در ماه دوم و سوم پس از کشت تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که NAA بر صفات کالوس‌زایی و رشد کالوس در شرایط نور و دماهای متفاوت مؤثرتر از 2,4-D بود (شکل ۴). بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰-۸۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی Kin ۲ $mg.l^{-1}$ NAA + ۰/۵ $mg.l^{-1}$ تحت تأثیر تیمارهای روشنایی و تاریکی در ماه سوم به‌دست آمد که با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند و کمترین درصد کالوس‌زایی نیز در محیط کشت MS حاوی Kin ۰/۵ $mg.l^{-1}$ + 2,4-D ۲ $mg.l^{-1}$ و روشنایی حاصل شد (شکل ۵).

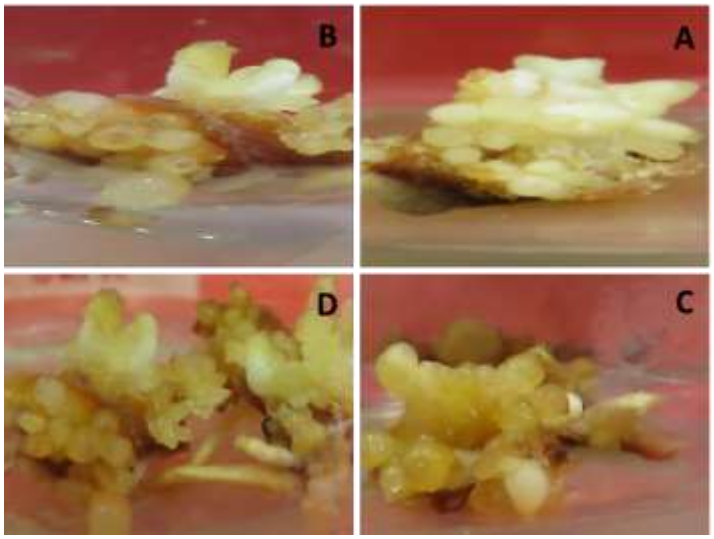
نتایج نشان داد که تأثیر روشنایی بر درصد کالوس زایی بسته به ترکیب هورمونی محیط کشت متفاوت است. به طوری که در محیط کشت MS حاوی NAA اگرچه درصد کالوس‌زایی در تاریکی بیشتر از مقدار آن در روشنایی بوده ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۴ و ۵). با این‌حال در محیط کشت MS حاوی 2,4-D درصد کالوس‌زایی در شرایط تاریکی به‌طور معنی‌داری بیشتر از شرایط روشنایی بود. در هر دو شرایط روشنایی و تاریکی رشد کالوس در محیط کشت MS حاوی NAA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت MS حاوی 2,4-D بود. بیشترین وزن تر کالوس در تیمار MS حاوی Kin ۲ $mg.l^{-1}$ NAA + ۰/۵ $mg.l^{-1}$ در شرایط تاریکی در هر دو زمان به ترتیب با میانگین ۰/۹۱ و ۰/۸۲ گرم در ماه دوم و سوم به‌دست آمد. با این‌حال، هم در محیط کشت MS حاوی NAA و هم در محیط کشت MS حاوی 2,4-D بین شرایط تاریکی و روشنایی از نظر رشد کالوس (وزن تر کالوس) در دو و سه ماه پس از کشت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۶).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای بنه زعفران تحت تأثیر تیمارهای نور، دما و کیتوسان

Table 2- Analysis of variance for in vitro callus induction and callus fresh weight in saffron corm explant cultures under different light, temperature and chitosan treatments

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean square)			
		ماه دوم پس از کشت 2nd month after culture		ماه سوم پس از کشت 3rd month after culture	
		وزن تر کالوس Callus fresh weight (g)	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن تر کالوس Callus fresh weight (g)	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)
Treatment تیمار	11	0.282**	3289.20**	0.304**	3334.74**
Error خطا	36	0.016	172.78	0.016	155.40
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	26.77	21.88	22.71	18.35

**: significant at 1% probability levels. **: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۴- کالوس‌زایی بنه‌های زعفران کشت شده روی محیط MS حاوی Kin ۰/۵ mg.l^{-1} + NAA ۲ mg.l^{-1} ، تحت تأثیر تیمارهای: A) روشنایی، B) کیتوسان (۰/۲۵ g.l^{-1})، C) دمای نگهداری ۲۵ درجه سانتی گراد و D) تاریکی

Figure 4- Callus induction from saffron corms cultured on MS medium supplemented with 2 mg.l^{-1} NAA + 0.5 mg.l^{-1} Kin, under: A) Light, B) chitosan (0.25 g.l^{-1}), C) storage temperature 25 ° C, D) darkness.

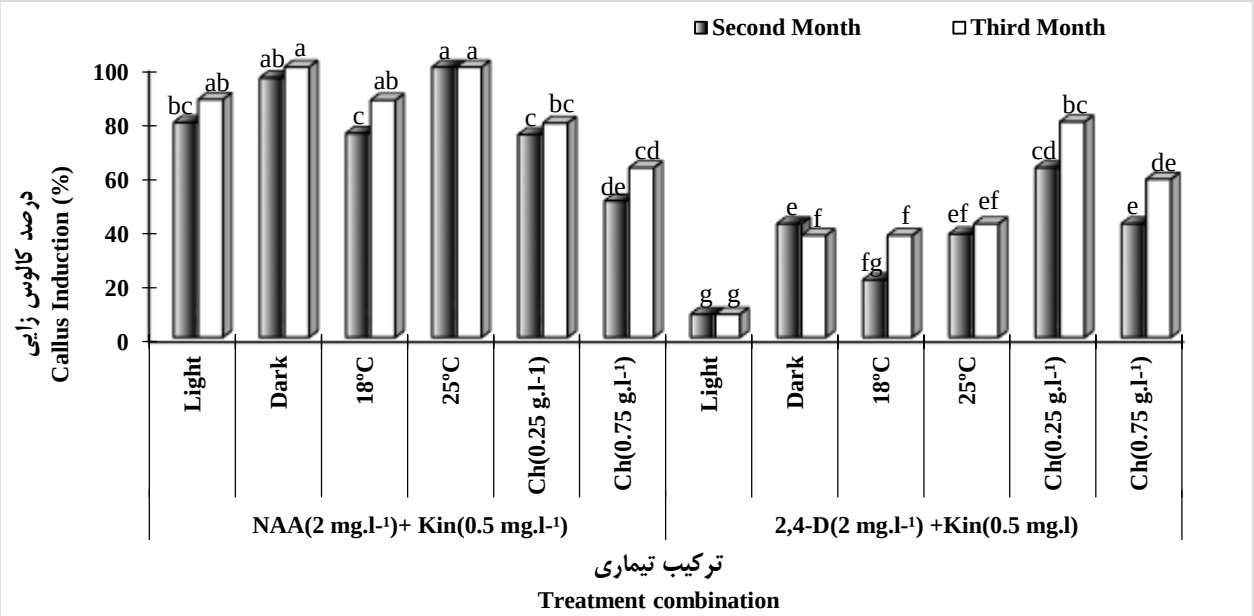
رضا نژاد و طراحی (Rezanejad & Tarrahi, 2013) گزارش کردند که تیمار تاریکی و روشنایی (نور) اختلاف چشمگیری در کال‌زایی رز گالیکا (*Rosa gallica* L.) ایجاد نکرد ولی نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد در کالوس‌زایی مؤثرتر بود. عبدی‌راد و همکاران (Abdirad et al., 2012) در پژوهشی تأثیر نور و تاریکی بر کالوس‌زایی جداکشت‌های رویشی (برگ، دمبرگ وساقه) و گل (گلبرگ، بساک و مادگی) در دو گونه گل محمدی (*damascena mill* Rosa) وگل سرخ مینیاتور (*Rosa miniature*) نشان دادند که در همه جداکشت‌ها، نور، روند کالوس‌زایی را کند و به تاخیر می‌اندازد اما تاریکی باعث افزایش سرعت کالوس‌زایی می‌شود.

شرایط نوری و شرایط فیزیولوژیک ریزنمونه ها در کنار سایر عوامل مانند ژنوتیپ گیاهی و محیط کشت پایه از عوامل مهم تأثیرگذار در پاسخ درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های گیاهی هستند (Daryani et al., 2016; Dixon & Gonzales, 1996). سجادی فرد و پژوهنده (Sajjadi fard & Pazhouhandeh,

2015) در مطالعه‌ای تأثیر نوع ریزنمونه و کاربرد هورمون‌ها را بر کالوس‌زایی و باززایی زعفران بررسی کرده و نشان دادند که شرایط محیطی (دمای پایین و تاریکی) ترکیب هورمونی محیط کشت اولیه، نوع ریزنمونه و کنترل میزان فنل تأثیر چشم‌گیری در بهینه‌سازی کشت بافت گیاه زعفران دارد. همچنین اظهار داشتند که در بررسی میزان کالوس‌زایی از قسمت‌های مختلف گیاه زعفران فقط ریزنمونه‌های بنه قابلیت کالوس‌زایی دارند. باقری و همکاران (Bagheri et al., 2017) در مطالعه‌ای روی رشد و تکثیر زعفران و بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی ریزنمونه زعفران، بالاترین میزان کالوس‌زایی را درمحیط کشت MS حاوی ۲ $mg.l^{-1}$ NAA و ۰/۵ $mg.l^{-1}$ BAP مشاهده کردند که روش کشت بافت زعفران با القای کالوس و باززایی این گیاه همراه بوده است. ورما و همکاران (Verma et al., 2016)، شروع اولیه کالوس در گونه‌های زعفران را ظرف ۲۰ روز در محیط کشت حاوی ۴ $mg.l^{-1}$ TDZ، ۴ $mg.l^{-1}$ NAA و ۵٪ ساکارز گزارش کردند. از نظر تأثیر دمای کشت (۱۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نیز درصد کالوس‌زایی و میزان رشد کالوس در محیط کشت MS حاوی NAA بیشتر از مقدار آن در محیط کشت MS حاوی 2,4-D بود (شکل ۵ و ۶)، ولی در هر دو محیط کشت بین تیمار ۱۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد از نظر درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

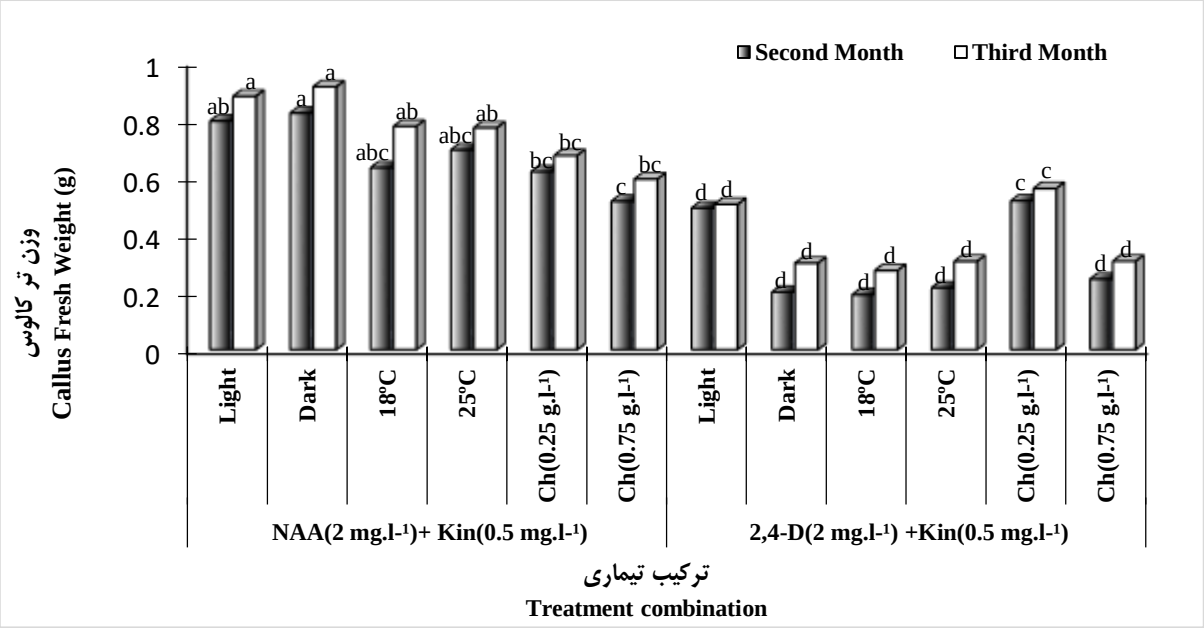
میرجلیلی و پورعزیزی (Mirjalili & Poorazizi, 2015) در تعیین ترکیب هورمون‌های رشد مناسب برای جنین‌زایی و شاخه‌زایی در پیازچه‌های گیاه زعفران، از بین غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و BAP، بیشترین میزان کالوس‌زایی (٪ ۴۴/۲) را در محیط کشت MS دارای ۱ $mg.l^{-1}$ 2,4-D و ۲ $mg.l^{-1}$ BAP به‌دست آوردند. ولی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اکسین NAA در مقایسه با 2,4-D از کارایی بالایی برای القای کالوس‌زایی و رشد کالوس در شرایط رشدی برخوردار است (شکل ۵ و ۶) و بنابراین، اگر هدف کالوس‌زایی از ریزنمونه بنه باشد بهتر است از محیط کشت MS حاوی NAA به جای 2,4-D استفاده کرد. در حالی که کاستلر و ایبورا (Castellar & Iborra, 1997) در بررسی احتمال رشد کالوس از برش ساقه، برگ و ریشه گیاه (Datura innoxia) در محیط MS با غلظت‌های مختلفی از BA و NAA در شرایط تاریکی و روشنایی، بهترین نتیجه را در محیط MS حاوی ۱۰ $mg.l^{-1}$ NAA و ۵ $mg.l^{-1}$ BA در شرایط تاریکی به‌دست آوردند. مطالعات نشان داد که هورمون‌های اکسین به ویژه 2,4-D و NAA به همراه سیتوکینین‌ها از جمله BA در تولید و رشد کالوس نقش مهمی دارند (Dixon & Gonzales, 1996).

ارزیابی تأثیر کیتوسان و غلظت آن را برالقای کالوس‌زایی و رشد کالوس نشان داد که استفاده از کیتوسان در محیط کشت حاوی NAA باعث کاهش معنی‌دار در درصد کالوس‌زایی و همچنین رشد کالوس (وزن تر کالوس) گردید. این کاهش کالوس‌زایی و رشد کالوس در محیط کشت حاوی غلظت بالاتر کیتوسان (۰/۷۵ $g.l^{-1}$) در مقایسه با غلظت پایین‌تر (۰/۲۵ $g.l^{-1}$) آن بیشتر بود (شکل ۵ و ۶).



شکل ۵- تأثیر تیمارهای هورمون‌های گیاهی، نور، دما و کیتوسان بر درصد کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه زعفران
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار به تفکیک ماه دوم و سوم براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

Figure 5- The effect of PGRs, light, temperature and chitosan on callogenesis of saffron corms in in vitro cultures. Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range test at 5%; Ch:Chitosan.



شکل ۶- تأثیر تیمارهای هورمون‌های گیاهی، نور، دما و کیتوسان بر وزن‌تر کالوس در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه زعفران
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار به تفکیک ماه دوم و سوم **براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد می‌باشد**

Figure 6– The effect of PGRs, light, temperature and chitosan on fresh weight of callus of saffron in in vitro cultures. Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range test at 5%. Ch:Chitosan.

برعکس در محیط کشت MS حاوی 2,4-D اضافه کردن کیتوسان به ترکیب محیط کشت باعث تحریک و افزایش القای کالوس‌زایی ریزنمونه های بنه زعفران و همچنین رشد کالوس آن‌ها در مقایسه با محیط کشت فاقد کیتوسان گردید. با این

حال در این محیط کشت نیز افزایش غلظت کیتوسان از $g.l^{-1}$ ۰/۲۵ به $g.l^{-1}$ ۰/۷۵ باعث کاهش معنی‌دار به ویژه رشد کالوس گردید (شکل ۵ و ۶). این نتایج نشان دهنده وجود اثر متقابل بین نوع اکسین محیط کشت و کیتوسان است.

کیتوسان به علت دارا بودن ویژگی‌های متعدد از جمله محرک رشد گیاهی، فعال‌سازی ژن‌های دفاعی گیاه مورد قرار گرفته است. کیتوسان از مشتقات داستیله شده کیتین و یک ماده قابل تجزیه در طبیعت می‌باشد که از پوسته سخت‌پوستان به‌دست می‌آید. نشان داده شده که کیتوسان باعث افزایش پرآوری و تحریک رشد گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای شده و همچنین درکنترل بیماری‌های قارچی مؤثر است (Chien et al., 2007).صادق‌پور و ناصری (Sadeghpour & Lotfali, 2016) در بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان در پرآوری درون‌شیشه‌ایی انگور (*Vitis vinifera* L.) بیشترین پرآوری را در افزودن کیتوسان با وزن مولکولی پایین به محیط کشت MS ۱/۲ حاوی $mg.l^{-1}$ ۰/۵ BAP و $mg.l^{-1}$ ۰/۱ IBA به‌دست آوردند. در تحقیق حاضر پاسخ کالوس‌زایی ریزنمونه بنه زعفران و رشد آن با کیتوسان, بسته به نوع اکسین مورد استفاده در ترکیب محیط کشت و همچنین غلظت کیتوسان متفاوت بود به‌طوری که در محیط کشت MS حاوی 2,4-D که پاسخ کالوس‌زایی و رشد کالوس ریزنمونه های بنه زعفران پایین است اضافه کردن کیتوسان در غظت $g.l^{-1}$ ۰/۲۵ باعث تحریک کالوس‌زایی و رشد کالوس گردیده ولی در محیط کشت MS حاوی NAA که از پاسخ کالوس‌زایی و رشد کالوس بالاتری برخوردار است اضافه کردن کیتوسان در غلظت‌های $g.l^{-1}$ ۰/۲۵ و $g.l^{-1}$ ۰/۷۵ باعث مهار و کاهش کالوس‌زایی و رشد کالوس ریزنمونه‌های بنه زعفران گردید (شکل ۵ و ۶). همان‌طور که در شکل‌های ۵ و ۶ مشاهده می‌شود با افزایش مقدار کیتوسان از $g.l^{-1}$ ۰/۲۵ به $g.l^{-1}$ ۰/۷۵ صفات کالوس‌زایی (درصد و وزن تر کالوس) در هر دو ترکیب هورمونی NAA + ۰/۵ $mg.l^{-1}$ Kin و ۲ $mg.l^{-1}$ 2,4-D +۰/۵ $mg.l^{-1}$ Kin ۲ کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که در محیط کشت MS حاوی NAA درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس (وزن تر کالوس) از ریزنمونه‌های بنه زعفران بطور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت MS حاوی 2,4-D است. همچنین استفاده از تیمار کیتوسان در محیط کشت MS حاوی 2,4-D باعث تحریک القاء کالوس گردید و درصد کالوس زایی و رشد کالوس را افزایش داد اما افزایش غلظت کیتوسان از $g.l^{-1}$ ۰/۲۵ به $g.l^{-1}$ ۰/۷۵ تأثیر منفی بر روند کالوس‌زایی در این محیط داشته و باعث کاهش درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس گردید در حالی که در محیط کشت MS حاوی NAA استفاده از تیمار کیتوسان و افزایش غلظت آن، تأثیر مثبتی بر روند کالوس‌زایی داشته و عملکرد کالوس را افزایش داد. در واقع می‌توان گفت تأثیر امواج فراصوت بر پاسخ درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های زعفران با توجه به نوع اکسین مورد استفاده در ترکیب محیط کشت متفاوت است.

منابع

Abdirad, S., Rezanejad, F., and Kalantari, M.K. 2012. The effect of different light intensities on callogenesis and calli pigments content of shoot and floral explants of *Rosa damascena* Mill and Rosa miniature. Agricultural Biotechnology Journal 3 (1): 43-65. (In Persian with English Summary).

Ananthakrishnan, G., Xia, X., Amutha, S., Singer,

S., Muruganantham, M., Yablonsky, S., Fischer, E., and Gaba, V. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. Plant Cell Reports 26 (3): 267-276.

Bagheri, K., Azadi, P., Gholami, M., and Masoumi, M.M. 2017. Effect of some plant growth regulators and different explants types on callus induction in saffron (*Crocus sativus* L). Saffron Agronomy and Technology 5 (3): 231-239. (In Persian with English Summary).

Barka, E.A., Eullaffroy, P., Clement, C., and Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against Botrytis cinerea. Plant Cell Reports 22 (8): 608-614.

Castellar, M.R., and Iborra, J.L. 1997. Callus induction from explants of *Crocus sativus*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 6 (2): 97-100.

Chien, P.J., Sheu, F., Huang, W.T., and Su, M.S. 2007. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. Food Chemistry 102 (4): 1192-1198.

Daryani, P., Zare, N., Chamani. E., Sheikhzadeh Mossadeg, P., and Mojaddad, D.J. 2016. Eevaluation of the effects of different basal medium and plant growth regulators on in vitro growth of hazelnut. Journal of Horticultural Science 30 (3): 417-422. (In Persian with English Summary).

Dixon, R.A., and Gonzales, R.A. 1996. Plant Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press, pp. 1-230.

Ebrahimi, M., Mokhtari, A., and Amirian, R. 2017. Effects of basal media and some physical parameters on micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 33: 373-385. (In Persian with English Summary).

Farjaminezhad, R., Zare, N., Zakaria, R.A., and Farjaminezhad, M. 2013. Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of Papaver bracteatum: a biotechnology approach for the thebaine production. Turkish Journal of Biology 37 (6): 689-697.

Ghanati, F., and Sobhannejad, S. 2016. Effect of low-intensity ultrasound on membrane integrity of suspension cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.). Journal of Plant Process and Function 5 (16): 1415-1545.

Honarmand, L., Zare, N., Zakaria, R.A., Sheikhzadeh Mosadegh, P., and Askari, A.A. 2017. The effect of ultrasound on multiple shoot regeneration from Sainfoin (*Onobrychis sativa*) shoot apex. Journal of Crop Breeding 9 (22): 73-81. (In Persian with English Summary).

Joersbo, M., and Brunstedt, J. 1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiologia Plantarum 85 (2): 230-234.

Kafi, M., Koocheki, A., Rashed, M.H., and Nassiri, M. 2006. Saffron (*Crocus sativus*): Production and Processing. Science Publishers. 249 p. (In Persian with English Summary).

Koohi, L., Zare, N., Asghari, Z.R., and Sheikhzadeh Mosadegh, P. 2014. Effect of plant growth regulators and different explants on tissue culture response and suspension cell cultures of German chamomilla (*Matricaria chamomilla* L.). Journal of Crop Ecophysiology 8 (2): 203-214. (In Persian with English Summary).

Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M.K., and Ahuja, P.S. 2008. State of of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: a comprehensive review. Food Reviews International 25 (1): 44-85.

Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B., and Sakanishi, A. 2003. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H+-ATPase activity of aloe arborescens callus cells. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 32 (2): 105-116.

Liu, Y., Yoshikoshi, A., Wang, B., and Sakanishi, A. 2003. Influence of ultrasonic stimulation on

the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27 (4): 287-293.

Miller, D.L., Bao, S., Gies, R.A., and Thrall, B.D. 1999. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. Ultrasound in Medicine and Biology 25 (9): 1425-1430.

Mirjalili, S.A., and Poorazizi, E. 2015. Evaluation of callus formation and embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.) for flower harvesting. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 6 (1): 127-131.

Rezanejad, F., and Tarrahi, R. 2013. The effect of light and plant growth regulators on callogenesis and anthocyanin accumulation in calli of different explants in *Rosa gallica*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 26 (2): 184-195.

Rossing T.D. 2014. Introduction to Acoustics. In: Rossing T.D. (ed). Springer Handbook of Acoustics 1-6. Springer, New York. pp. 1-7.

Sadeghpour, S., and Lotfali, N. 2017. Effect of chitosan on in vitro proliferation of Ghezel ouzum grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. Research in Pomology 2 (1): 75-88. (In Persian with English Summary).

Sajjadifard, M., and Pazhouhandeh, M. 2015. Study on effect of type of explant and hormone on callus induction and regeneration in Saffron (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy and Technology 3 (3): 195-202. (In Persian with English Summary).

Schmidt, P., Rosenfeld, E., Millner, R., and Schellenberger, A. 1987. Effects of ultrasound on the catalytic activity of matrix-bound glucoamylase. Ultrasonics 25 (5): 295-299.

Srivastava, L.M. 2002. Plant Growth and Development: Hormones and Environment. Academic Press, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia. 772 p.

Verma, S.K., Das, A.K., Cingoz, G.S., Uslu, E., and Gurel, E. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish *Crocus* species. Biotechnology Reports 10: 66-74.

Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S.A., Malboobi, M.A., and Habashi, A.A. 2009. Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. Journal of Food, Agriculture and Environment 7 (3-4): 567-572.

The Effects of Ultrasound, Temperature, Light, Chitosan and Plant Growth Regulators on Callus Induction in Saffron (*Crocus sativus* L.)

Fariba Afkhami[1], Nasser Zare[2*], Rasool Asghari-Zakaria[3] and Mohammad Mehdizadeh[4]

Submitted: 13 January 2020 **Accepted:** 9 June 2020

Afkhami, F., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., Mehdizadeh, M. 2020. The Effects of Ultrasound, Temperature, Light, Chitosan and Plant Growth Regulators on Callus Induction in Saffron (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy & Technology, 8(3): 361-375

Abstract

Saffron is one of the most important pharmaceutical plants in the world due to its valuable secondary metabolites. The aim of this study is to investigate the different factors on callus induction and growth in saffron corm explants. In the first experiment, saffron corms surface were sterilized and were excised to equal segments, then they were treated with ultrasound and then they were cultured on MS medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ auxin (NAA and 2,4-D) and 0.5 $mg.L^{-1}$ Kinetin. In the second experiment, the effect of temperature, light and chitosan were evaluated. The results of analysis of variance showed that there were significant differences ($P \leq 0.05$) among temperature, light, chitosan as well as ultrasound treatments in terms of callus induction percentage and fresh weight of callus. Callus induction and growth on MS medium containing 2 $mg.L^{-1}$ NAA + 0.5 $mg.L^{-1}$ Kin was higher than those containing 2 $mg.L^{-1}$ 2,4-D +0.5 $mg.L^{-1}$ Kin. In MS medium containing 2,4-D which had low callus induction and callus growth rate, utilization of ultrasound stimulated callus induction and especially it stimulated callus growth from saffron corm explants. In addition, in MS medium containing 2,4-D, utilization of 0.25 $g.L^{-1}$ chitosan stimulated callus induction and increased callus induction of saffron corm explants. However, increasing chitosan concentration from 0.25 $mg.L^{-1}$ to 0.75 $g.L^{-1}$ decreased callus induction and callus growth, while, in MS medium containing NAA, which had efficient callus induction and growth, utilization of these treatments reduced callus induction and callus growth from saffron corm explants. In other words, the effect of ultrasound and chitosan on response of saffron explants in vitro cultures was used, depending on the type of auxin used in composition of the culture medium. Generally, the highest percentage of callus induction occurred on MS medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ NAA + 0.5 $mg.L^{-1}$ Kin and incubated at 25 ºC in the dark, which could be suitable for in vitro culture and gene transfer studies in saffron.

Keywords: Callus induction, *Crocus sativus*. L, Plant cell and tissue culture, Sonication

1 - M.Sc, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2 - Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3 - Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4 -PhD Graduated, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
(*- Corresponding author Email: zarenasser@yahoo.com)
DOI: 10.22048/JSAT.2020.215454.1376