نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵ ص. ۱۵۴-۱۴۳

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 2, Summer 2016, P. 143-154
DOI: 10.22048/jsat.2016.17364

اثر هورمون‌های مختلف بر القای کالوس، باززایی و تکثیر بنه زعفران (*Crocus sativus* L.)

عباس صفرنژاد[۱*]، سیده بی بی لیلا علمداری[۲]، هادی درودی[۳] و مرضیه دلیر[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴ اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۴ آبان ۱۳۹۴

چکیده

زعفران گیاهی تریپلوئید است که منبع متابولیت‌های ثانویه و یکی از مهمترین محصولات اقتصادی و دارویی ایران می‌باشد. در این مطالعه تکثیر درون شیشه‌ای زعفران با استفاده از دو روش مستقیم و غیرمستقیم مورد بررسی قرارگرفت. قطعات بنه که به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند، پس از ضدعفونی به محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف هورمونی مربوط به باززایی مستقیم و غیرمستقیم منتقل شدند. تیمار کلرید جیوه ۰/۱۵ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه بهترین تیمار برای ضدعفونی زعفران بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های باززایی مستقیم نشان‌داد که بیشترین بنه در محیط mg/l BAP ۲ تشکیل می‌شود. مقایسه میانگین‌های درصد القای کالوس بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد استفاده در سطح ۵٪ بود. کالوس‌زایی یک هفته بعد از کشت آغاز شد و بهترین محیط برای القای کالوس محیط mg/ l BAP ۲ + mg/ l 2,4-D ۱ شناخته شد. بیشترین تعداد رویان در محیط MS با غلظت کم NAA (mg/ l ۰/۱۵) تولید شد. نتایج حاصل از بررسی جوانه‌زنی رویان‌ها نشان‌داد که دربین محیط‌های مورد استفاده محیط MS با mg/l NAA ۰/۱۵ بهترین تیمار برای جوانه‌زنی بود. تشکیل بنه تنها در محیط mg/ l BAP ۲ + mg/ l 2,4-D ۱ مشاهده‌شد. بنه‌ها برای سازگاری به جی فی منتقل و سپس به‌گلدان و خاک انتقال یافتند.

کلمات کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، درون شیشه‌ای، رویان.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus*) گیاهی از خانواده Iridaceae می‌باشد که حدود ۱۰۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه دارد. مطالعات تاریخی نشان‌می‌دهد اهلی کردن زعفران به ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد برمی‌گردد (Grilli Caiola, 2004). منشاء زعفران از شرق مدیترانه در آسیا و ایران می‌باشد (Winterhalter & Straubinger, 2000). کشت زعفران در ایران، هند، یونان، مراکش، اسپانیا و ... انجام می‌شود. از کل زعفران دنیا ۹۵/۶٪ در ایران تولید می‌شود و در ایران، استان خراسان بالاترین درصد تولید زعفران را دارا می‌باشد (Mollafillabi & Shoorideh, 2009; Fernandes, 2004). زعفران گیاهی نیمه‌گرمسیری است و در نقاطی که دارای زمستان‌های ملایم و تابستان‌های گرم و خشک باشد به‌خوبی می‌روید. این گیاه در دمای بین ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در

۱- دانشیار، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی یا شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۳- دکترای جنگلداری، بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
(*-نویسنده مسئول: sebre14@yahoo.com)

ارتفاع بین ۱۳۰۰ تا ۲۳۰۰ متر از سطح دریا از عملکرد مناسبی برخوردار است (Behnia, 2008; Sepaskhah et al., 2009) از نظر گیاه‌شناسی زعفران گیاهی چند ساله و بدون ساقه است که دارای بنه (پیاز، غده، پداژه یا کورم) غده‌ای تقریباً کروی شکل به قطر ۵-۳ سانتی‌متر می‌باشد. از هر بنه ۶ تا ۹ برگ سوزنی چمنی مانند و ۱ تا ۳ گل بنفش رنگ خارج می‌شود (Salopek-sondi, 2004). ارزش کیفی زعفران به‌علت وجود متابولیت‌های ثانویه اصلی و مشتقات آن می‌باشد. ترکیبات زردرنگ کروسین مسئول رنگ زعفران، مواد تلخ پیکروکروسین مسئول طعم و سافرانال مسئول عطر و بوی آن می‌باشد (Omidi et al., 2009). زعفران از زمان‌های قدیم به‌عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها، هم‌چنین در درمان طیف وسیعی از اختلالات هم‌چون آکنه، جوش، بیماری‌های پوستی، خونریزی مغزی، آسم، سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، بی‌خوابی، خونریزی مزمن رحم، تب سرخ (مخملک) و حتی سرطان مورد استفاده بوده‌است (Abdullaev, 2002; Bathaei & Mousavi, 2010).

زعفران تریپلویید عقیم بوده و تکثیر آن از طریق ایجاد بنه‌های توپر از گیاه مادر صورت می‌گیرد (Ghalavand & Mazaheri, 2000). از این رو بهبود آن از طریق دورگه‌گیری ممکن نیست. در این رابطه روش‌های کشت بافت پتانسیل خوبی را برای بهبود ژنتیکی آن، تکثیر زیاد زعفران و ایجاد بنه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا فراهم می‌کنند.

پژوهش‌های متعددی در زمینه کشت بافت زعفران ارائه شده‌است. شارما و همکاران (Sharma et al., 2008) در تحقیقی باززایی مستقیم زعفران را مورد مطالعه قرار داده و ایجاد ۱/۸۹ ریزبنه از هر شاخه را در محیط ½MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAو ۸۰ گرم در لیتر ساکارز گزارش کرده‌اند. کرمیان و همکاران (Karamian et al., 2004) جنین‌زایی سوماتیکی را در ۴ گونه زعفران مورد بررسی قرار داده‌اند. در محیط LS حاوی ۴ mg/l BA + ۴ mg/l NAA جنین‌زایی سوماتیکی اتفاق افتاده است. جوانه‌زنی جنین‌های بالغ روی محیط ½ MS همراه با GA_3 ۲۵ mg/l صورت گرفته است. گیاهچه کامل زمانی تشکیل شده است که جنین‌های جوانه‌زده در محیط ½MS دارای ۱ mg/l BA+۱ mg/l NAAدر دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته‌اند. نتایج تحقیقی نشان‌داده است که محیط MS حاوی ۰/۱ mg/l 2,4-D +۰/۵ mg/l BAبرای القای جنین‌زایی سوماتیکی مناسب است. تکثیر کالوس جنینی در محیط MS حاوی ۱ mg/l BAP +۰/۰۵ mg/l NAA اتفاق افتاده است (Blazquez et al, 2004). در تحقیقی برروی زعفران، باززایی مستقیم و غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفته است. محیط MS همراه با ۱ mg/l BAP +۱ mg/l 2,4-D بهترین محیط برای باززایی مستقیم زعفران شناخته شده است. همچنین محیط MS حاوی mg/l BAP +۰/۲۵ mg/l 2,4-D ۱ برای باززایی غیرمستقیم زعفران مناسب بوده است (Yilderim, 2007). شرف زاده و خوشخوی (Sharafzadeh & Khoshkhooy, 2004) نشان‌داده‌اند که ۱ mg/l 2,4-D+ ۰/۵ mg/ l BA برای تشکیل بنه و ۱/۸ mg/l NAA برای رشد ریزبنه مناسب است. همچنین بنه‌ها در محیط نیم‌غلظت MS حاوی ۱ mg/l BA +۱ mg/l 2,4-D ریشه‌دار شده‌اند.

با توجه به ارزش و اهمیت زعفران به‌خاطر اثرات دارویی، غذایی و صنعتی آن و نیاز آبی بسیار کمی که دارد، کشت آن در مناطق کم آب می‌تواند اشتغال‌زایی قابل توجهی به‌همراه داشته باشد. علیرغم قدمت کشت زعفران و ارزش افزوده این محصول در مقایسه با بسیاری از محصولات زراعی رایج در کشور، سهم کمتری از فناوری‌های نوین به آن اختصاص یافته و تولید آن عمدتاً بر دانش بومی متکی بوده است. از آنجایی‌که تکثیر زعفران از طریق بنه‌های در حال استراحت انجام می شود، لذا

بهبود خصوصیات زراعی آن توسط روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک دشوار است. هدف از این تحقیق بهبود شرایط کشت این ویترو و باززایی در محیط این ویترو برای بکارگیری این تکنیک در سایر روش های اصلاحی مثل کشت بساک و یا انتقال ژن و ... می‌باشد که می‌تواند به ایجاد راهکارهای جدید برای اصلاح این گیاه منجر شود. همچنین تهیه پروتکل کشت بافت به‌منظور اصلاح زعفران و تکثیر ژنوتیپ‌های برتر و تهیه ریزبنه یکسان که در سالهای اولیه کشت بتواند به محصول برسد نیز مدنظر است.

مواد گیاهی

ماده گیاهی مورد استفاده در این پژوهش بنه‌های زعفران بودند که از استان خراسان رضوی شهرستان قائن در فصل پاییز تهیه شدند. تعدادی از نمونه‌ها بلافاصله بعد از جمع‌آوری در شرایط درون شیشه‌ای کشت داده شدند و نصف نمونه‌ها به‌مدت ۴ ماه در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرارداده شده سپس کشت شدند.

ضدعفونی

برای ضدعفونی نمونه‌ها ابتدا پوسته‌های اطراف بنه را جدا کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرارداده شدند تا آلودگی‌های سطحی آن از بین برود. سپس تیمارهای مختلف گندزدایی شامل کلرید جیوه، اتانول و هیپوکلریت سدیم مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). بنه‌ها زیر هود لامینار سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد، به قطعات کوچک تقسیم شده و به ظروف کشت منتقل شدند.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای ضدعفونی ریزنمونه‌های زعفران
Table 1- Sterilization treatment for saffron explants

ردیف Number	تیمار ضدعفونی Sterilization treatment
1	اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه 70% ethanol for 5 min+1% $NaOCl_2$ for 20 min
2	کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه 0.1% mercuric chloride for 10 min
3	اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه + کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه 0.1% mercuric chloride for 20 min + 70% ethanol for 30 sec
4	هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه 1% $NaOCl_2$ for 20 min
5	کلرید جیوه ۰/۱۵ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه 0.15% mercuric chloride for 20 min

تکثیر و باززایی مستقیم

به‌منظور باززایی مستقیم، ریزنمونه‌ها که یک قطعه از بنه دارای جوانه بودند به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های گیاهی انتقال یافتند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به کار رفته در این محیط شامل BAP و 2,4-D بود (جدول ۲). مراحل مختلف تشکیل بنه و رشد آن به‌صورت درصد مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی به منظور باززایی ریزنمونه‌های زعفران
Table 2- Hormon treatments for regeneration of **saffron explants**

ردیف Number	تیمار هورمونی Hormon treatment
1	MS + 1mg/l BAP
2	MS + 2mg/l BAP
3	MS + 3mg/l BAP
4	MS + 1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D
5	MS + 2mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D

تکثیر و باززایی غیرمستقیم

بدین منظور قطعات بنه به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP، NAA و 2,4-D منتقل شدند (جدول ۳) . برای مراحل ایجاد و جوانه‌زنی رویان از هورمون‌های NAA و BAP استفاده شد (جدول ۴). مراحل مختلف القا کالوس، ایجاد رویان ، جوانه‌زنی رویان و تشکیل بنه به صورت درصد مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند.

جدول ۳- تیمارهای هورمونی به‌منظور کالوس‌زایی ریزنمونه‌های زعفران

Table 3- Hormon treatments for callus induction of **saffron explants**

ردیف Number	تیمار هورمونی Hormon treatment
1	MS + 0.5mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D
2	MS + 1mg/l BAP + 0.25mg/l 2,4-D
3	MS + 2mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D
4	MS + 2mg/l BAP
5	MS + 3mg/l BAP

جدول ٤- تیمارهای هورمونی به منظور ایجاد و جوانه‌زنی رویان زعفران

Table 4- Hormon treatments for embryo development and germination of saffron

ردیف Number	تیمار هورمونی Hormon treatment
1	MS + ۰/۱۵ mg/l NAA
2	MS + ۰/۲۵ mg/l NAA
3	MS + ۰/۵ mg/l NAA
4	MS + ۰/۵ mg/l BAP
5	MS + 2mg/l BAP
6	MS + 3mg/l BAP

اسیدیته همه محیطها قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. کشت‌ها در اتاقک رشد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Khorrami & Safarnejad, 2011). آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که هر کدام از تیمارها ۳ تکرار داشتند. داده‌ها با نرم‌فزار SAS و Excel تجزیه و تحلیل شدند. سپس با استفاده از تجزیه واریانس مقایسات کلی و با استفاده از آزمون دانکن، مقایسه میانگین‌ها و تفاوت معنی‌دار بین آنها در سطح ۵٪ تعیین گردید.

نتایج و بحث

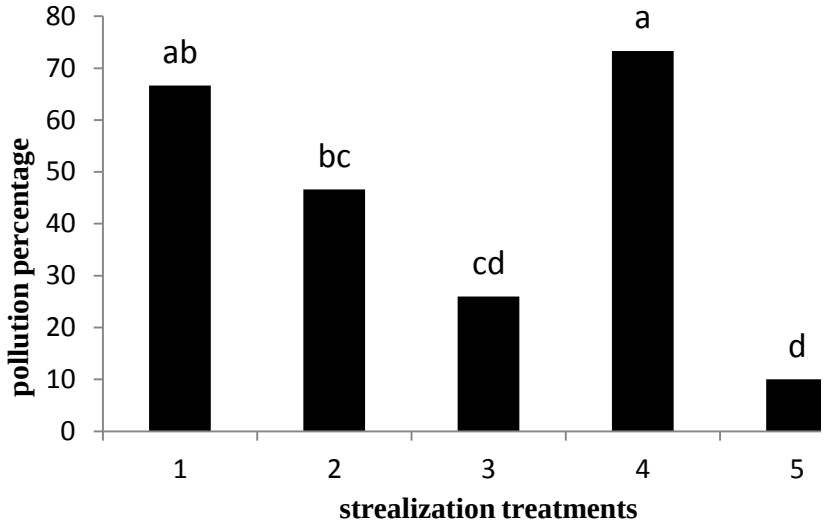
ضدعفونی

نتایج تجزیه تحلیل داده‌های مربوط به ضدعفونی نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار کلرید جیوه ۰/۱۵ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه بهترین تیمار برای ضدعفونی زعفران می‌باشد (شکل ۱). درصد آلودگی این تیمار ۱۰ بود که کمترین میزان آلودگی و بیشترین درصد زنده‌مانی را نشان‌داد.

آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در زمره شدیدترین آلودگی‌های محیط کشت هستند. این موجودات به سرعت و زودتر از مواد گیاهی رشد یافته، شرایط تعریف شده محیط کشت را تغییر داده و باعث رشد ضعیف یا مرگ ریزنمونه‌ها می‌شوند (Mehrdad, 2010). به‌نظر می‌رسد با توجه به این که زعفران در تماس مستقیم با خاک قرار دارد و خاک نیز یکی از مهمترین منابع آلودگی ریزنمونه‌ها به‌شمار می‌رود. تیمار ضدعفونی که از همه شدیدتر بود مناسب‌ترین تیمار به شمار می‌رود. چرا که تیمارهای با شدت کمتر نیز استفاده شده بود ولی کارایی کمتری در از بین بردن آلودگی‌ها داشت تیمارهای هیپوکلریت سدیم و الکل نیز از کارایی مناسبی برخوردار نبودند. در این رابطه عنوان شده که، محلول کلرید جیوه که از سمی‌ترین محلول‌های سترون سازی می‌باشد باید در غلظت پایین یا زمان کوتاه بر نمونه‌ها اثر بگذارد تا از انهدام و مرگ بافت‌ها توسط آن جلوگیری شود (Assareh et al., 2007). برخلاف نتایج تحقیق حاضر در تحقیقی دیگر روی زعفران هیپوکلریت سدیم برای ضدعفونی معرفی شده است (Sharafzadeh & Khoshkhooy, 2004).

این عدم انطباق احتمالاً به دلیل تفاوت در منبع جمع‌آوری

ریزنمونه و اختلاف در واکنش و کارایی آن‌ها است، چرا که نتایج قابل قبول در کشت وابسته به شرایط محیطی و حالت فیزیولوژیکی گیاه مادری است (Krishna et al., 2008).



شکل ۱- مقایسه درصد آلودگی تیمارهای مختلف ضدعفونی زعفران

Figure 1- Comparison of mean value for infection percentage

۱ (اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه)، ۲(کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه)، ۳(اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه + کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه)، ۴ (هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه)، ۵ (کلرید جیوه ۰/۱۵ ٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه)

1(70% ethanol for 5 min+1% $NaOCl_2$ for 20 min), 2 (0.1% mercuric chloride for 10 min), 3 (0.1% mercuric chloride for 20 min + 70% ethanol for 30 sec), 4 (1% $NaOCl_2$ for 20 min), 5 (0.15% mercuric chloride for 20 min)

بدون پیش‌تیمار دمای پایین حدود ۳ ماه طول کشید تا اولین تشکیل بنه مشاهده شد. نمونه‌هایی که در یخچال قرار داشتند حدود ۲ هفته بعد از کشت تشکیل بنه را آغاز کردند. احتمالا دمای پایین با تغییر در تعادل هورمون‌ها و مواد فنولی برتشکیل بنه تأثیر دارد. ولی بسته به محیط و بسته به عواملی چون سن گیاه، نوع ریز نمونه، دما و نیز بسته به نوع و غلظت هورمون‌ها میزان متفاوتی ترکیبات فنلی ایجاد می‌کنند. یافته‌های حاصل از تحقیق شرف‌زاده و خوشخوی(Sharafzadeh & Khoshkhooy, 2004) روی ریزافزایی زعفران موید این مطلب است طوری‌که در تحقیق ایشان بدون پیش‌تیمار دمای پایین هیچ بنه‌ای روی ریزنمونه‌ها تشکیل نشده است.

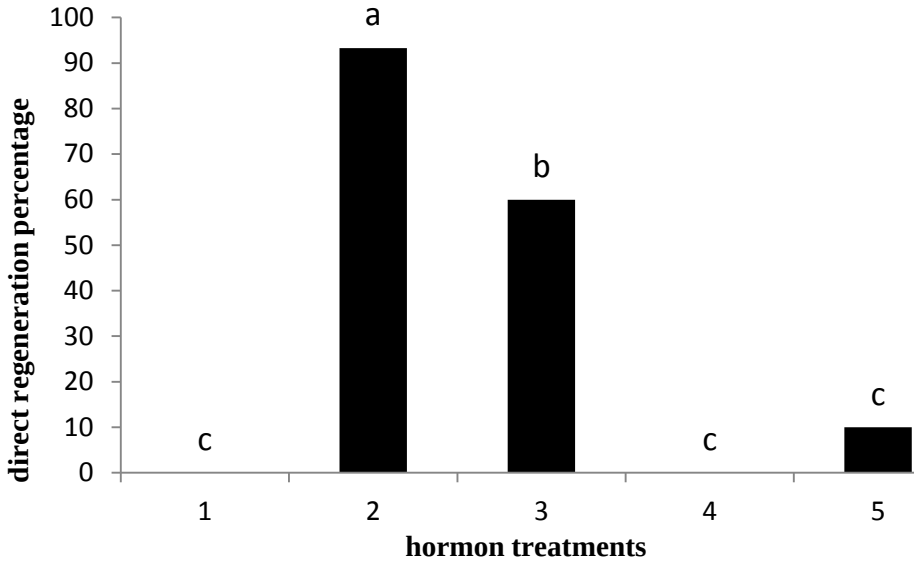
تکثیر و باززایی مستقیم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های باززایی مستقیم اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مورد استفاده نشان داد. بیشترین درصد باززایی بنه در محیط 2 mg/l BAP (۹۳/۳) تشکیل شد (شکل ۲ و ۳). در این پژوهش هورمون BAP برای تشکیل بنه به‌طور مستقیم مناسب بود. مهمترین نقش سیتوکینین‌ها از بین بردن غالبیت انتهایی و باعث تحریک تشکیل ساقه نابجا و عقب افتادگی پیری می‌باشد (Bagheri & Safari, 2004). در مورد گونه‌های درختی از قبیل عناب نیز از هورمون BAP برای القاء شاخه‌زایی استفاده شده است (Safarnejad, 2015) . در این تحقیق استفاده از BAP باعث تشکیل بنه شد. در تحقیق پری و همکاران (Parray et al., 2012) هورمون TDZ که نوعی سیتوکینین می‌باشد برای بنه‌زایی معرفی شده است. استفاده از غلظت‌های بالای BAP برای تولید بنه در گذشته هم به اثبات رسیده است (Sharma

et al., 2008). تیمار سرمایی مهمترین عامل در تشکیل ریز بنه‌ها بر روی ریزنمونه‌های حاوی جوانه می باشد. در تحقیقی اثر پیش تیمار سرمایی را در باززایی گیاهچه های هاپلوئید کلزا بررسی کرده‌اند. نتایج نشان داده است که اثر پیش تیمار ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز و ۲۱ روز به ترتیب بیشترین و کمترین میزان درصد سبز شدن گیاهچه‌های هاپلوئید و باززائی گیاه نرمال را به خود اختصاص دادند (Ommati et al., 2006). در تولید گیاهان هاپلویید نخود به‌روش کشت درون شیشه‌ای نیز عنوان شده که تیمار سرمادهی تأثیر داشته است (Vessal et al., 2002). بنه‌ها برای سازگاری به جی فی منتقل و سپس به گلدان و خاک انتقال یافتند.

تکثیر و باززایی غیرمستقیم: هم‌چنان که در شکل ۴ مشاهده می‌شود مقایسه میانگین‌های درصد القای کالوس تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای مورد استفاده در سطح ۵٪ نشان می‌دهد. بهترین محیط برای القای کالوس محیط mg/l 2,4-D ۱ + mg/l BAP ۲ شناخته شد. در نتایج بررسی کالوس‌دهی گونه مورد مطالعه به سیتو کینین و اکسین به‌صورت توام واکنش نشان داد.

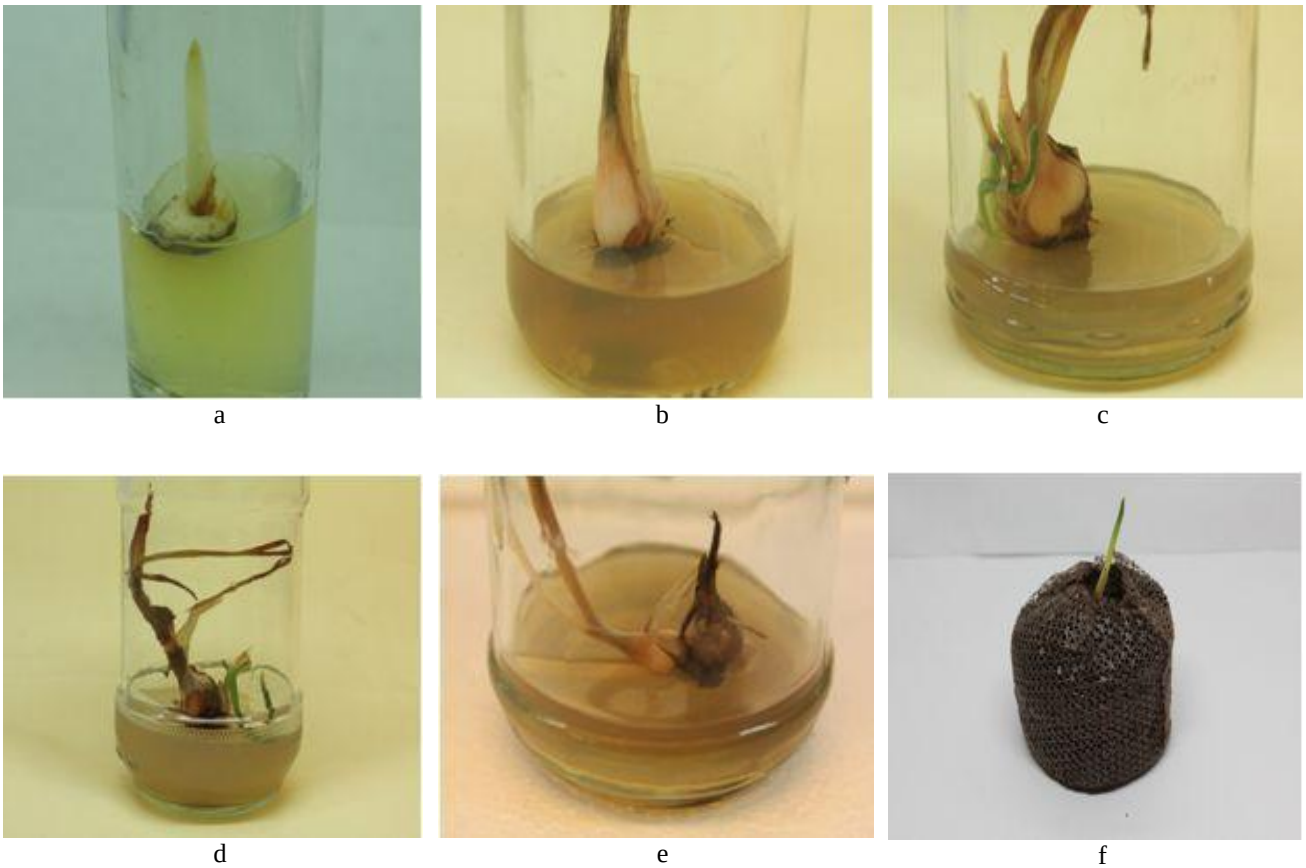
بیشترین تعداد رویان در محیط MS با غلظت کم NAA (۰/۱۵mg/ l) تولید شد (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی جوانه‌زنی رویان‌ها نشان‌داد که در بین محیط‌های مورد استفاده محیط MS با mg/l NAA ۰/۱۵ بهترین تیمار برای جوانه‌زنی بود. از بین تیمارهای مختلف مورد استفاده جهت تشکیل بنه تنها در محیط mg/l 2,4-D ۱ + mg/l BAP ۲ مشاهده شد و در سایر محیط‌ها بنه تشکیل نشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین‌های تیمارهای باززایی مستقیم ریزنمونه زعفران

Figure 2- Comparison of mean value for direct regeneration

1(MS + 1mg/l BAP), 2 (MS + 2mg/l BAP), 3 (MS + 3mg/l BAP), 4 (MS + 1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D), 5(MS + 2mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D)



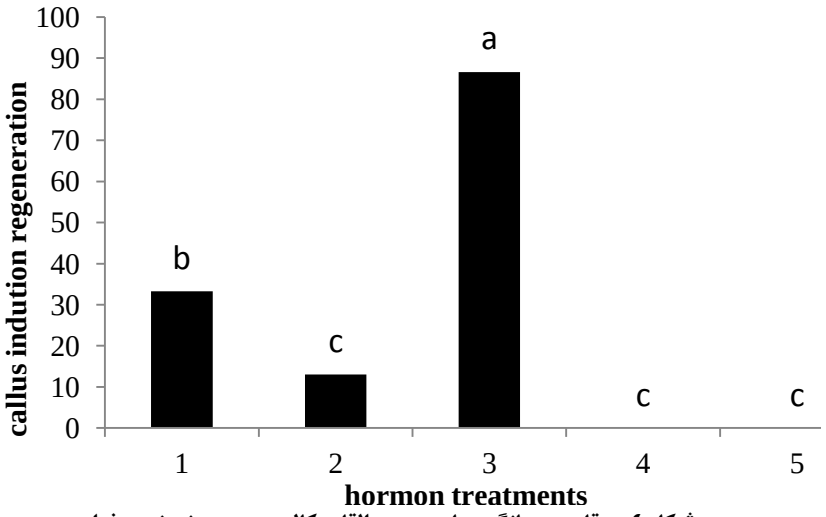
شکل ۳– روند تشکیل بنه به‌روش باززایی مستقیم: a) جوانه‌زنی از ریزنمونه غده b) رشد جوانه و تشکیل غده c) تشکیل غده d) پیاز با فلسهای نسبتا ناقص e) پیاز کامل f) انتقال به جی فی

Figure 3 - Corm formation through direct regeneration: a) germination of corm explant b) bud growth and corm formation c) corm formation d) onion with scales rather incomplete e) full onion f) transfer to jiffy

رویان‌زایی رویشی فرایند تکاملی پیچیده‌ای است که از بسیاری جهات شبیه رویان‌زایی زایشی است. در مرحله اول، بافت‌های رویشی با تمایززدایی توانایی رویان‌زایی را کسب می‌کنند (مرحله القاء) و پس از دریافت محرک مناسب مراحل تکاملی شروع می‌شود. در نهایت طی بلوغ، رویان‌های بدنی برای جوانه‌زنی آماده می‌شوند. رویان‌زایی بدنی ممکن است در پاسخ به علامت‌های متعدد، از جمله حضور اکسین و عوامل تنش‌زا آغاز شود.

سطح هورمون‌های درون‌زا و ترکیب هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت یکی از مهمترین عوامل برای دستیابی به واکنش ریخت‌زایی مناسب است (Grieb et al., 1997). در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها از متداول‌ترین ترکیبات استفاده شده برای گذر از مرحله رویشی به رویان هستند (Rajabpoor et al., 2011) در تحقیق حاضر بیشترین تعداد رویان و بیشترین جوانه‌زنی در محیط MS با غلظت کمتر NAA (۰/۱۵mg/ l) تولید شد. رجب‌پور و همکاران (Rajabpoor et al., 2011) نیز هورمون اکسینی NAA را هورمون مناسب جهت القاء رویان معرفی نموده‌اند لیکن ایشان عنوان کرده‌اند با افزایش غلظت هورمون این روند تصاعدی پیدا نموده‌اند. شیبانی و همکاران (Sheibani et al., 2007) هم با استفاده از هورمون‌های BAP، 2,4-D و TDZ توانسته‌اند کالوس‌های رویان‌زا تولید کنند. گزارش‌های متعددی در مورد

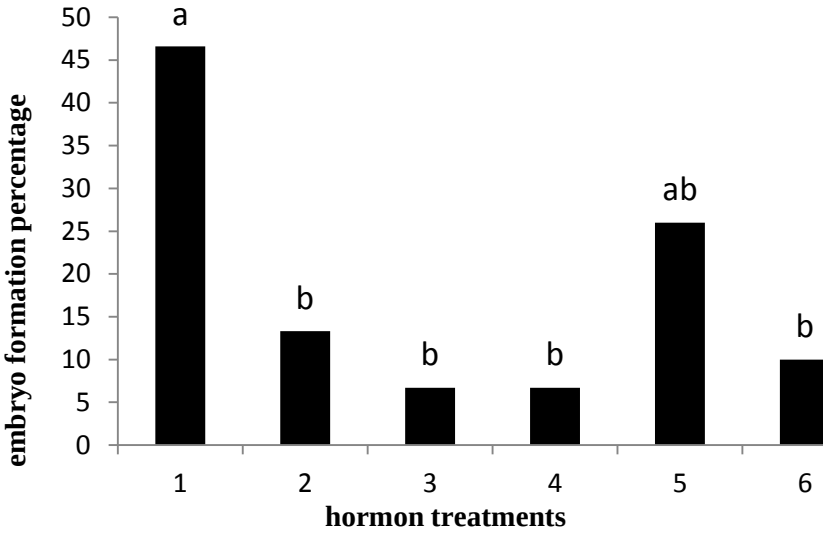
نقش NAA در بلوغ رویان‌های زعفران وجود دارد. در تحقیقی ابراهیم‌زاده و همکاران (Ebrahimzadeh et al., 2006) گزارش کرده‌اند که NAA محرک رویان زایی در گونه‌های مختلف زعفران زراعی و وحشی است.



شکل ٤- مقایسه میانگین‌های درصد القای کالوس در ریزنمونه زعفران

Figure 4- Comparison of mean value for callus induction

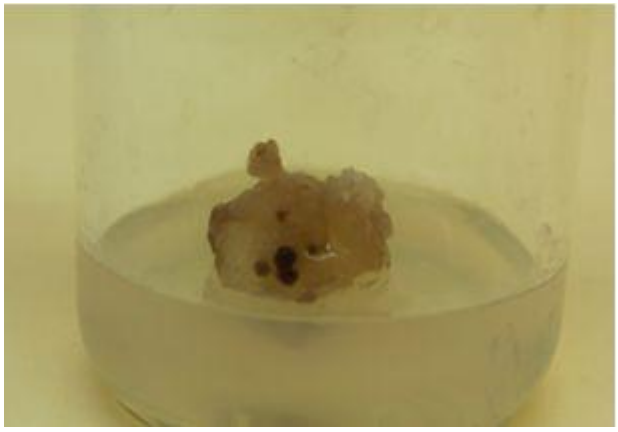
1 (MS + 0.5mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D) , 2 (MS + 1mg/l BAP + 0.25mg/l 2,4-D), 3 (MS + 2mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D), 4(MS + 2mg/l BAP), 5 (MS + 3mg/l BAP)



شکل ٥- مقایسه میانگین‌های درصد تشکیل رویان در ریزنمونه زعفران

Figure 5- Comparison of mean value for embryo formation

1 (MS + ۰/۱۵ mg/l NAA), 2 (MS + ۰/۲۵ mg/l NAA), 3 (MS + ۰/۵ mg/l NAA), 4 (MS + ۰/۵ mg/l BAP), 5 (MS + 2mg/l BAP), 6 (MS + 3mg/l BAP)



a

b

c

d

e

شکل ٦– مراحل تشکیل بنه زعفران به‌روش غیرمستقیم : a) القای کالوس از ریزنمونه ، b) تشکیل رویان، c) جوانه‌زنی رویان، d) تشکیل ریزبنه و e) تشکیل و تکثیر بنه

Figure 6- Cormlet formation through indirect regeneration: a) callus induction, b) embryo formation, c) embryo germination, d) cormlet formation and e) corm formation and propagation

همچنین کاراگلو و همکاران (Karaoglu et al., 2007) از طریق القای رویان‌زایی در محیط کشت MS حاوی BAP و NAA موفق شده‌اند به‌طور میانگین ۱-۲ ریزبنه در هر ریزنمونه تولید نمایند. در تحقیق دیگری که روی تکثیر زعفران صورت گرفته است تشکیل ریزبنه با القای رویان‌زایی با استفاده از هورمون‌های BAP، 2,4-D میسرشده است (Raja et al., 2007). یکی از اهداف مهم در مورد کشت بافت زعفران مزروعی تشکیل ریزبنه است. از این نظر رجب‌پور و همکاران(Rajabpoor et al., 2011) هورمون IBA را هورمون مؤثر در تمایز نوشاخه‌ها در ارتباط با ذخیره‌سازی نشاسته و تشکیل ریزبنه عنوان نموده‌اند. نقش BAP در القای رویان‌زایی به غلظت این ماده در محیط کشت وابسته بود و به‌نظر می‌رسد که احتمالاً اثر خود را از طریق ایجاد توازن با اکسین‌های درون‌زا و تنظیم نسبت سیتوکینین به اکسین انجام می‌دهد. از بین تیمارهای مختلف مورد استفاده جهت تشکیل ریزبنه، تشکیل ریزبنه تنها در محیط 2mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D مشاهده شد و در سایر محیط‌ها ریزبنه تشکیل نشد.

ریزنمونه‌های زعفران برای باززایی به مقادیر نسبتا بالای هورمون سیتوکینین احتیاج دارند و برای تشکیل بنه به هر دو هورمون اکسین و سیتوکینین نیاز دارند که اکسین 2-4-D از سایر اکسین‌های مورد استفاده نتایج بهتری ایجاد نمود. غلظت سیتوکینین مورد نیاز برای ایجاد غده 2mg/l BAP می باشد.

منابع

Abdullaev, F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron. Experimental Biology and Medicine 227 (1): 20-25.

Assareh, M. H., Ghorbanli, M., Akbari Khabbaz, M., Ghamari Zare, A., and Emam, M. 2007. Micropropagation, organogenesis and using photoototropic method in *Eucalyptus gongylocarpa*. Pajoohesh and Sazandegi 75: 135-145. (In Persian).

Bagheri, A., and Safari, M. 2004. Plant Tissue Culture. Ferdowsi University of Masshad, Press. 406 pp. (In Persian).

Bathaei, S.Z., and Mousavi, S.Z. 2010. New applications and mechanism of action of saffron and its important ingredients. Critical Reviews in Food sScience and Nutrition 50 (8): 761-786.

Behnia, M.R. 2008. Assessment of effect of cultivation method of corm on saffron yield in Damavand. Pajoohesh and Sazandegi in Agronomy and Horticulture 79: 101-108. (In Persian with English Summary).

Blazquez, S., Piqueras, A., Serna, M.D., and Casas, J.L. 2004. Somatic embryogenesis in saffron: Optimisation through temporary immersion and polyamine metabolism. Acta Hortculturae 650: 269-276.

Ebrahimzadeh, H., Rajabian, T., Karamian, R., Abrishamchi, P., and Sabora, A. 2006. Iranian Saffron, Information Publication, Tehran. (In Persian).

Fernandez, J.A . 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research. Development of Plant Science 2: 127-159.

Ghalavand, A., and Mazaheri, D. 2000. Temperature effect on flowering and potential of Iranian saffron. Pajoohesh and Sazandegi 4: 65-69. (In Persian with English Summary).

Grieb, B., Schfer,F., Imani, J., Mashayekhi, K. N., Arnholdt-Schmitt, B., and Neumann, K.H. 1997. Changes in soluble proteins and phytohormone concentration of cultured carrot petiole explants during induction

of somatic embryogenesis. Journal of Applied Botany 71: 94-103.

Grilli Caiola, M. 2004. Saffron reproductive biology. Acta Horticulturae 650: 25-37.

Karamian, R. 2004. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. Acta Horticulturae 650: 253-259.

Karaoglu, C., Cocu, S., Ipek, A., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Sarihan, E., Arslan, N., Kaya, M. D., Sancak, C., Ozcan, S., Gurbuz, B., Mirici, S., Er, C., and Khawar, K. M. 2007. *In vitro* micropropagation of saffron. Proceeding of the second international symposium on saffron biology and technology. Acta Horticulture 739: 223-227.

Khorrami, A., and Safarnejad, A. 2011. *In vitro* selection of *Foeniculum vulgare* for salt tolerance. Notulae Scientia Biologicae 3 (2): 90-97.

Mehrdad, M. 2010. The study of *Tilla begonifolie* micropropagation *in vitro*. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements. For the degree of M.Sc. in. Silviculture and Forest Ecology. 67 pp.

Mollafillabi, A., and Shoorideh, H. 2009. The new method of saffron production. 4th national festival of saffron. 27-28 october 2009. Iran. 38 pp. (In Persian).

Omidi, H., Naghdi Badi, H.A., Golzad , A, Torabi, H., and Footou Kian, M.H. 2009. The effect of chemical and biofertilizer source of nitrogen on qualitative and quantitative yield of saffron. Journal of Medicinal Plants 8 (30): 98-109. (In Persian).

Ommati, A., Farshadfar, E., Ardekani, M.R., and Naserian, B. 2006. Effect of cold pretreatment and filter paper in regeneration of canola haploid plants. Ninth Congress of Agriculture Sciences and Plant Breeding.

Parray, J.A., Kamili, A.N., Hamid, R., and Husaini, A.M. 2012. *In vitro* cormlet production of saffron (*Crocus sativus* L.) and their flowering response under greenhouse. Genetically Modified Crop and Food 3 (4): 289-295.

Raja, W., Zaffer, G., and Wanti, S.A. 2007. *In vitro* microcorm formation in saffron. Proceeding of the second international symposium on saffron biology and technology. Acta Horticulture 739: 291-301.

Rajabpoor, S., Saboora, A., and Vatanpour Azghandi, A. 2011. Changes in exogenous hormone concentration and its effect on somatic embryo maturation and microcorm of saffron. Journal of Plant Biology 8: 41-58.

Safarnejad, A. 2015. Effect of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus jujube*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23 (1): 40-48. (In Persian with English Summary).

Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agents: a case study on *E.coli* as a model for gramnegative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275: 177-182.

Sepaskhah, A.R., and Kamgarj-Haghighi, A. 2009. Saffron irrigation regime. International Journal of Plant Production. 3: 1-16.

Sharafzadeh, S.H., and Khoshkhooy, M. 2004. Effects of precooling and growth regulators on micropropagation of estahban saffron. Iranian Journal of Horticulture Science 5 (3): 129-136. (In Persian).

Sharma, K.D., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T.R., and Singh, B.M. 2008. *In vitro* cormlet

development in *Crocus sativus*. Biologia Plantarum 52 (4): 709-712.

Sheibani, M., Azghandi, A.V., and Nemati, S.H. 2007. Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron. Pakistan Journal of Biological Science 10: 3564-3570.

Vessal, S.R., Bagheri, A., and Safarnejad, A. 2002. The possibility of *in vitro* haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 6 (2): 68-76.

Winterhalter, P., and Straubinger, M. 2000. Saffron-renewed interest in an ancient spice. Food Reviews International 16:39-59.

Yilderim, E. 2007. Development of *in vitro* micropropagation techniques for saffron (*Crocus sativus* L.). Biology Master's Thesis. Middle East Technical University. 76 P.

The Effect of Different Hormones on Callus Induction, Regeneration and Multiplication of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Corms

Abbas Safarnejad[1], Seyedeh Bibi Leyla Alamdari[2], Hadi Darroudi[3] and Marzieh Dalir[2]*

Received: 4 May, 2015 **Accepted:** 26 October, 2015

DOI: 10.22048/jsat.2016.17364

Abstract

Saffron (*Crocus sativus; Iridaceae*) is an important economic and medicinal crop in Iran. The saffron that is an herbaceous triploid geophyte is used mainly as a source of secondary metabolites having aromatic and medicinal value. The plant develops annually from buds on the mother corm – i.e. a thickened stem - which acts as a resting, perennating storage organ. In this research *in vitro* propagation of *Crocus sativus* through direct and indirect methods has been studied. Corm slices as explants were sterilized and transferred to MS media with different concentrations of plant growth regulators. The results showed that use of $HgCl_2$ 0.15% for 20 minutes is the best treatment for sterilization. The results of ANOVA of direct regeneration indicated that the most corm formation was observed in 2 mg/l BAP. Maximum callus induction was achieved on MS supplemented with 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP. As results indicate the most number of embryos were obtained in MS medium containing 0.15 mg/ l NAA. Also this medium was suitable for germination of embryo. Corm formation was only observed in MS supplemented with1 mg/l 2, 4-D + 2 mg/l BAP in the indirect method. The corm was transferred to JF pot for adaptation and then it was transferred to the pot and soil for growing.

Keywords: growth regulators, embryo, *in vitro*

1- Associate Professor, Faculty member of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center or Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
2- MSc, Biotechnology, Post Address: Tissue Culture Research Department, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
3- MSc, Forestry, Post Address: Tissue Culture Research Department, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.