Saffron Agronomy & Technology
Vol. 5, No. 3, Fall 2017, P. 231-239

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶ ص. ۲۳۹-۲۳۱

بررسی تأثیر برخی تیمارهای هورمونی مختلف و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زائی زعفران

خدیجه باقری[۱]*، پژمان آزادی[۲]، میترا غلامی[۳] و مسعود میرمعصومی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۸ مهر ۱۳۹۴ **تاریخ پذیرش:** ۳ بهمن ۱۳۹۵

باقری، خ.، آزادی، پ.، غلامی، م.، و میرمعصومی، م. ۱۳۹۶. بررسی تأثیر برخی تیمارهای هورمونی مختلف و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زائی زعفران، زراعت و فناوری زعفران، ۵(۳): ۲۳۹-۲۳۱.

چکیده

زعفران زراعی علاوه بر اینکه گران‌ترین ادویه جهان است از نظر وجود متابولیت‌های داروئی مهم و متعدد نیز حائز اهمیت ویژه‌ای است. این گیاه تریپلوئید بوده و ایجاد بذر نمی‌کند. به دلیل عقیم بودن، موفقیت‌های کسب‌شده با روش‌های اصلاح سنتی بسیار اندک بوده است. ارائه یک دستورالعمل کالوس‌زائی کارآمد برای این گیاه از دو جهت مورد توجه است: اصلاح این گیاه از طریق مهندسی ژنتیک و تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت کالوس است. در این پژوهش ابتدا پنج تیمار مختلف برای ضدعفونی بنه‌ها اعمال شد، سپس ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک به ضخامت حدود یک میلی‌متر و ریزنمونه‌های معمولی به ضخامت یک سانتی‌متر از بخش قاعده‌ای و رأسی بنه تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط MS با غلظت‌های مختلف BAP، NAA و 2,4-D برای سه ماه در تاریکی در دمای ۲± ۲۰^{oc} نگهداری شدند. براساس نتایج، مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی استفاده از قارچ‌کش بنومیل و سپس استفاده از هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد می‌باشد. بالاترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (۹۰ درصد) در این تیمار مشاهده شد و تمامی ریزنمونه‌ها عاری از آلودگی بودند. بالاترین میزان کالوس‌زایی (۷۵ ٪) با ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک بخش قاعده‌ای بنه در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و نیم میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. این میزان کالوس‌زایی در تیمار یک گرم در لیتر 2,4-D از ریزنمونه‌های معمولی بخش قاعده‌ای بنه حاصل شد. با توجه به میزان کالوس‌زایی قابل قبول در ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک و نیز مزیت این ریزنمونه‌ها برای انتقال ژن، استفاده از آنها را می‌توان توصیه کرد.

کلمات کلیدی: تیمار ضدعفونی، زعفران، کشت بافت، لایه سلولی نازک، هورمون.

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.
۲ - استادیار بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.
۳ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.
۴ - کارشناسی ارشد دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران.
(*- نویسنده مسئول: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2017.36767.1120

مقدمه

زعفران تجاری از کلاله‌های خشک گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) به دست می‌آید و گران‌بهاترین ادویه در جهان است،. طعم و عطر ویژه‌ی این گیاه و کاربرد آن در صنایع غذایی در کنار خواص دارویی این گیاه موجب بالا بودن تقاضای آن در بازار جهانی گردیده است (Caiola & Canini, 2010). زعفران زراعی به جهت تریپلوئید بودن ایجاد بذر نمی‌کند و صرفاً از طریق بنه تکثیر می‌شود عقیم بودن این گیاه، روش‌های اصلاح سنتی آن را محدود می‌کند و موفقیت‌های کسب شده با این روش‌ها بسیار اندک بوده است (Agayev et al., 2009). مهندسی ژنتیک با هدف افزایش کیفیت و کمیت مواد مؤثره زعفران به ویژه کارتنوئیدهای موجود در آن می‌تواند گامی رو به جلو برای بهبود ژنتیکی این گیاه منحصر به فرد ایران باشد. موفقیت در انتقال ژن نیز تا حد زیادی به وجود یک دستورالعمل مناسب برای تولید گیاه تراریخت از طریق کشت بافت وابسته است. هرچند تلاش‌ها در زمینه‌ی کشت بافت زعفران با موفقیت‌هایی همراه بوده است اما اغلب ریزنمونه‌های انتخاب شده در روش‌های مختلف باززایی بزرگ هستند که باعث کاهش سطح نفوذ عامل گزینش شده و منجر به شیمریسم[1] می‌شود. استفاده از ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک باعث می‌شود که همه‌ی سلول‌ها در لایه‌ی سلولی نازک در معرض محیط انتخاب‌گر قرارگرفته، سلول‌های غیر تراریخت و در نتیجه شیمریسم پس از آن، حذف شود (Teixeira da Silva & Fukai, 2003).

زعفران حاوی حدود ۱۵۰ نوع ترکیب مختلف است که ۵۰-۴۰ تا آن‌ها شناخته شده هستند. متابولیت‌های مهم داروئی زعفران در سه گروه کروسین‌ها، پیکروکروسین و سافرانال دسته‌بندی می‌شوند. طی دهه گذشته این گیاه از نظر تولید متابولیت‌ها نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Abdullaev, 2001). استفاده از کشت کالوس یکی از روش‌های رایج تولید متابولیت‌های ثانویه بوده و در مورد گیاهان متعدد گزارش شده است (Karuppusamy, 2009).

در این پژوهش سعی شده است که با استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف و انواع ریزنمونه‌های بنه، دستورالعمل کالوس‌زایی با کارایی بالا با هدف انتقال ژن و نیز تولید متابولیت‌ها در گیاه زعفران ارائه شود.

مواد و روش‌ها

بنه‌های زعفران مورد نیاز در این تحقیق از منطقه رباط کریم در استان تهران تهیه شدند. بنه‌های با وزن ۱۰ تا ۱۵ گرم برای تهیه‌ی ریزنمونه‌های کشت بافتی انتخاب و تا زمان استفاده در دمای چهار تا شش درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ابتدا به منظور تعیین بهترین تیمار ضدعفونی بنه‌ها، پنج تیمار ضدعفونی مورد بررسی قرارگرفت. یک مرحله مقدماتی ضدعفونی که برای هر پنج تیمار مشابه بوده و شامل پنج دقیقه شستشو در ارلن حاوی آب و چند قطره مایع ظرفشویی با تکان دادن، ۲۰ دقیقه شستشو در زیر آب جاری، ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار آبشویی با آب مقطر استریل. مرحله دوم ضدعفونی: پنج تیمار ضدعفونی شامل: ۱- کلرید جیوه یک دهم درصد (۱۵ دقیقه) ۲- هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد (۳۰ دقیقه) ۳- نانوسید دو و نیم درصد (۳۰ دقیقه) ۴- قارچ‌کش بنومیل یک گرم در لیتر (۱۵ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد (۲۰ دقیقه) ۵- هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد (۱۵ دقیقه) و حمام آب گرم (۵۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه) بر آنها اعمال شد.

تهیه ریزنمونه از بنه‌ها

بنه‌های ضدعفونی شده بر روی کاغذ واتمن استریل خشک

1- Chimerism

شده و پس از آن هر بنه به دو بخش قاعده‌ای و رأسی تقسیم شد. پس از حذف لایه‌ی سطحی که در تماس با مواد ضدعفونی‌کننده بوده است در مجموع چهار نوع ریزنمونه به شرح زیر از بنه‌ها تهیه شد: ۱- ریزنمونه‌های با ضخامت یک سانتی‌متر از بخش قاعده بنه ۲- ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک با ضخامت یک میلی‌متر از بخش قاعده بنه ۳- ریزنمونه‌های با ضخامت یک سانتی‌متر از بخش رأسی بنه ۴- ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک با ضخامت یک میلی‌متر از بخش رأسی بنه. محیط کشت مورد استفاده در تمام مراحل تحقیق، محیط کشت آماده‌ی MS شرکت فیتوتکنولوژی (شامل نمک‌ها و ویتامین‌های MS) بود. با افزودن ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به محیط و پس از به حجم رساندن، pH محیط روی ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد. برای جامد کردن محیط، هفت گرم در لیتر آگار به آن اضافه شد. تمام محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده و در پلیت‌های یک بار مصرف توزیع شدند.

این تحقیق شامل سه آزمایش به شرح زیر بود:

آزمایش یک: بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف بنه.

فاکتورهای این آزمایش شامل نوع ریزنمونه در چهار سطح (ریزنمونه‌های معمولی با ضخامت یک سانتی‌متر از بخش رأسی و بخش قاعده‌ای، ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک با ضخامت یک میلی‌متر از بخش رأسی و بخش قاعده‌ای بنه) و غلظت هورمون 2,4-D در شش سطح (صفر، نیم، یک، دو، پنج و ده میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد.

آزمایش دو: بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک از بخش رأسی بنه.

آزمایش سه: بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک از بخش قاعده‌ای بنه.

در آزمایش دو و سه، فاکتور a غلظت هورمون NAA و فاکتور b غلظت هورمون BAP هر یک در شش سطح (صفر، نیم، یک، دو، پنج و ده میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد که مجموعاً ۳۶ تیمار هورمونی مورد بررسی قرار گرفت.

پس از کشت بافت، کلیه‌ی ریزنمونه‌ها در فیتوترون در دمای۲±۲۰ سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای القای کالوس شرایط تاریکی کامل اعمال شد. همه‌ی نمونه‌ها هر ماه یک بار واکشت شدند. بررسی‌ها به صورت هر دو هفته یک بار انجام شد. داده‌های ثبت شده شامل تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس در آنها القا شده، اندازه‌ی کالوس و صفات کیفی آنها شامل رنگ، نرمی و سفتی کالوس‌ها بود. آزمایش‌های این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن استفاده شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی نتایج تیمارهای ضدعفونی بنه

از مهم‌ترین مسائل در استفاده از بخش‌های زیرزمینی گیاهان برای کشت بافت، کنترل آلودگی می‌باشد. در مورد زعفران ضدعفونی نمودن بنه به دلیل تنوع آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند مشکل‌ساز باشد. با بررسی نتایج تیمارهای ضدعفونی بنه‌های زعفران یک ماه پس از کشت، مشاهده شد که مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی بنه استفاده از قارچ‌کش بنومیل برای ۱۵ دقیقه و پس از آن استفاده از هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد برای ۲۰ دقیقه (تیمار چهار) می‌باشد. تمامی ریزنمونه‌های این تیمار عاری از آلودگی بودند. همچنین بالاترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (۹۰ درصد) در همین تیمار مشاهده

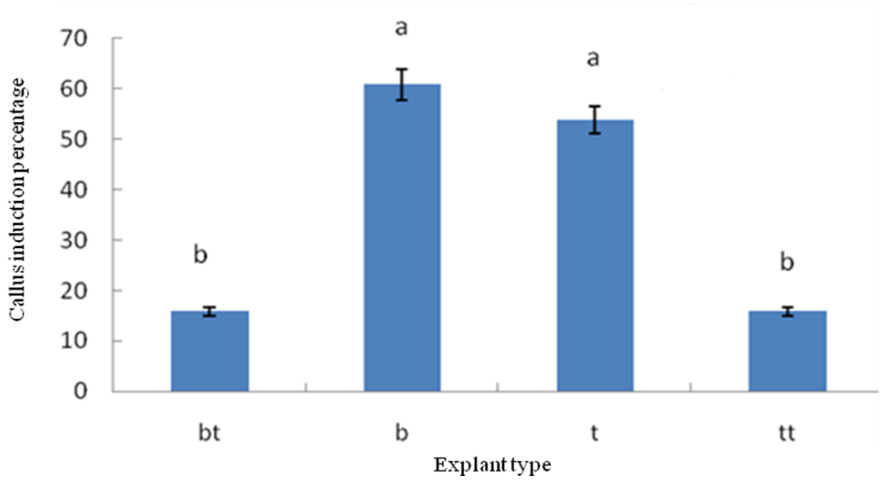
شد. در سایر تیمارها بین۲۰ تا ۸۰ درصد آلـودگی مشـاهده شـد. استفاده از کلرید جیوه اغلب به‌عنوان بهتـرین و مـؤثرترین روش ضدعفونی بنـه‌ی زعفـران شـناخته مـی‌شـود (Plessner et al., 1990). در بررسی نتایج مشاهده شد که هرچند کلرید جیـوه اثـر نسبتاً خوبی در کنترل آلودگی‌هـا دارد (۴۰ درصـد آلـودگی) امـا میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در این تیمار پایین بـوده و در حـدود نیمـی از ریزنمونـه‌هـا در ایـن تیمـار از بـین رفتنـد. اسـتفاده از هیپوکلریت سدیم به تنهایی برای کنتـرل آلـودگی‌هـای قـارچی گسترده در بنه‌های مورد استفاده در این پژوهش مؤثر نبود و ۸۰ درصد نمونه‌ها آلودگی (عمدتا قارچی) نشان دادند. این مغـایر بـا نتایج گزارش شده توسط پیکـوراس و همکـاران مـی‌باشـد کـه مؤثربودن استفاده از هیپوکلریت سدیم بـرای ضـدعفونی بنـه‌ی زعفـران را گـزارش نمـوده‌انـد (Piqueras & Negbi, 1999). در بررسی اثر نانوسید که ترکیبی آنتی‌باکتریـال حـاوی نانوسـیلور و دی اکسید تیتانیوم می‌باشد بر کنترل آلودگی‌های بنـه مشـاهده شد که این ترکیب در حذف آلودگی‌های باکتریـایی بسـیار مـؤثر می‌باشد اما بر آلودگی‌های قارچی اثـری مشـابه بـا هیپوکلریـت سدیم (۸۰ درصد آلودگی) را نشان داد.

از حمام آب‌گرم برای ضدعفونی کردن پیاز در گیاهان زینتی به‌طور مؤثری استفاده می‌شود. مقاومـت بافـت‌هـای گیـاهی بـه تیمار آب‌گرم متفاوت است. این مقاومت تا حد زیادی به شـرایط فیزیولوژیکی، اندازه، محتوای رطوبت، شرایط لایه‌های خـارجی، شرایط دمایی در مدت رشد، سطح خواب و سـن بافـت بسـتگی دارد. موفقیت در استفاده از تیمار آب‌گرم علاوه بر وضعیت گیـاه به حساسیت‌های دمایی پاتوژن‌ها نیز بستگی دارد (Langens et al., 1998). در بررسی نتایج مشخص شد استفاده از تیمار حمـام آب‌گرم میزان آلودگی‌ها را به نحو مؤثری کاهش داده اسـت امـا آب‌گرم باعث نرمی و شکننده شدن بافت بنـه و کـاهش درصـد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها می‌گردد به‌نحـوی کـه پـایین‌تـرین میـزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (۴۰ درصد) در این تیمار مشاهده شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلـف 2,4-D بـر کـالوس‌زایـی در ریزنمونه‌های مختلف بنه

در طی بررسی‌های ماهانه، تفاوت آشکار بین میزان و شـکل کالوس‌زایی در ریزنمونه‌هـای مختلـف آشـکار شـد و یادداشـت برداری از نمونه‌ها در هفته هشتم انجام شد. براساس آنالیزهـای انجـام شـده بـین ریزنمونـه‌هـای معمـولی (بـا ضـخامت یـک سانتی‌متر) و لایه سلولی نازک (با ضخامت یک میلی‌متر) تفاوت بسیار معنی‌داری دیده شد. اما بین ریزنمونه‌های بخـش رأسـی و قاعده‌ای بنه تفاوت معنی‌داری مشـاهده نشـد. بـالاترین میـزان کالوس‌زایی ۷۵ درصد بود که در تیمار یـک میلـی‌گـرم در لیتـر 2,4-D از ریزنمونه‌های معمولی بخش قاعده‌ای به دست آمد. در ریزنمونه‌های معمولی بخش رأسی نیز حداکثر کـالوس‌زایـی بـه میزان ۶۵ درصـد مشـاهده شـد در حـالی کـه بـالاترین میـزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایـه‌ی سـلولی نـازک مربـوط بـه بخش رأسی در محیط یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به میزان ۳۰ درصد مشاهده شد. در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک بخـش قاعده‌ای نیز حداکثر کالوس‌زایی (۲۵ درصـد) در همـین محـیط ایجـاد شـد (شـکل ۱). از نظـر انـدازه کـالوس هـم بـه‌ترتیـب ریزنمونه‌های معمولی بخش قاعـده‌ای، ریزنمونـه‌هـای معمـولی رأسی، ریزنمونه لایه سلولی نازک بخـش قاعـده‌ای و ریزنمونـه لایه سلولی نازک رأسی کالوس‌های بزرگ تـا کوچـک را ایجـاد کردند.

به‌طورکلی کالوس‌زایـی ریزنمونـه‌هـای معمـولی در محـیط حاوی 2,4-D با اختلاف معنی‌داری بالاتر از ریزنمونه‌هـای لایـه سلولی نازک بود و نتایج نشان می‌دهـد کـه ضـخامت ریزنمونـه تأثیر معنی‌داری بر میزان کالوس‌زایی دارد. این تفاوت مـی‌توانـد احتمالاً ناشی از تفاوت در سطح هورمون‌های درون‌زاد باشد.



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بنه زعفران در درصد کالوس‌زایی

(bt: ریزنمونه لایه سلولی نازک بخش قاعده‌ای، b: ریزنمونه معمولی از بخش قاعدای، t: ریزنمونه معمولی از بخش رأسی، tt: ریزنمونه لایه سلولی نازک بخش رأسی)
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ($\rho<0.05$) ندارند.

Figure 1- Effect of explant types on callus induction in saffron.

(bt: thin cell layer explant of corm base, b: typical explant of corm base, t: typical explant of corm apical, tt: thin cell layer explant of corm apical)
Means with the same letter are not significantly different ($\rho<0.05$).

مشاهدات ما نشان داد که هرچند در محیط فاقد سیتوکنین نیز کالوس‌زایی رخ می‌دهد اما درصد کالوس‌زایی و سرعت رشد کالوس‌ها، به‌ویژه در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک پایین می‌باشد. همچنین مشاهده شد که افزایش سطح 2,4-D تا میزان دو میلی‌گرم در لیتر اثر مثبت در میزان کالوس‌زایی دارد اما افزایش بیشتر غلظت 2,4-D میزان کالوس‌زایی را کاهش داد.

کالوس‌های تشکیل‌شده در این ریزنمونه‌ها به لحاظ ظاهری با یکدیگر متفاوت بودند. اولین کالوس‌ها در طی هفته‌ی ششم در ریزنمونه‌های معمولی مشاهده شد. در روند شکل‌گیری این کالوس‌ها ابتدا در تمام سطح ریزنمونه کالوس‌های نرم و آبدار کدر تشکیل شده و سپس با رشد تدریجی، کالوس‌ها حالت سخت‌تری پیدا کردند. در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک کالوس‌ها به صورت توده‌های جداگانه‌ی جوش‌مانندی در سطح ریزنمونه پراکنده بودند. این کالوس‌ها به لحاظ ظاهری تنوع نشان دادند و رنگ آن‌ها از کرم تا سرخ متفاوت بود و سرعت رشد کالوس‌ها در مجموع کند بود (شکل ۲).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک

با توجه به اینکه با تیمارهای هورمون 2,4-D کالوس‌زایی ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک پائین و در حد ۳۰ درصد بود بنابراین تأثیر هورمون‌های BAP و NAA بر کالوس‌زایی این ریزنمونه‌ها با ۳۶ ترکیب هورمونی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک بخش رأسی: جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل این دو هورمون معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). در مقایسه میانگین اثرات متقابل نیز مشاهده شد که بالاترین میزان کالوس‌زایی (۵۵ درصد) در محیط حاوی پنج میلی‌گرم NAA و یک میلی‌گرم BAP ایجاد شده است (جدول ۲). بزرگ‌ترین اندازه‌ی کالوس نیز در همین محیط بدست آمد. در محیط فاقد NAA در هیچ یک از سطوح BAP کالوس‌زایی از ۱۵ درصد بالاتر نبود.

شکل ۲- کالوس زایی در ریزنمونه‌های بنه زعفران دو ماه بعد از کشت در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. a) ریزنمونه‌ی معمولی b) ریزنمونه‌ی لایه‌ی سلولی نازک

Figure 2- Callus formation in corm explants in saffron after 2 months in medium containing 2,4-D (1mg/l) a) typical corm explant b) thin cell layer explants.

به لحاظ ظاهری در کالوس‌های حاصل از این ریزنمونه‌ها تنوع مشاهده شد. بعضی از کالوس‌ها دارای رنگ قرمز پررنگ بودند که این رنگ می‌تواند ناشی از تولید ماده کروسین در این کالوس‌ها باشد. طبق تحقیق xue و همکاران استفاده از ساکاروز به میزان ۳۰ $g.l^{-1}$ موجب سنتز کروسین در کالوس‌ها می‌شود (xue et al., 2002). اما فراوانی این کالوس‌ها کم بود. اغلب کالوس‌ها رنگ کرم تیره تا قهوه‌ای روشن داشتند (شکل۳).

کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک بخش قاعده‌ای: نتایج تجزیه واریانس در این آزمایش نشان داد که فقط اثر اصلی غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر درصد کالوس‌زایی در این نوع ریزنمونه معنی‌دار است ولی اثرهورمون BAP و همچنین اثر متقابل آنها معنی‌دار نبود (جدول ۱). بالاترین میزان کالوس‌زایی ۷۵ درصد در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA ونیم میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. به لحاظ کیفی کالوس‌های مربوط به این ریزنمونه‌ها تنوع کمتری نشان دادند. کالوس‌ها شفاف به رنگ‌های کرم تا زرد، ترد و شکننده بودند. بعضی از کالوس‌ها نیز در اواخر ماه سوم به کالوس‌های کروی تبدیل شدند. در تعداد محدودی از کالوس‌ها نیز ریشه‌زایی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

هدف اصلی از استفاده از ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک در این تحقیق، استفاده از پتانسیل بالای این ریزنمونه‌ها برای اهداف انتقال ژن می‌باشد. چون این ریزنمونه‌ها با ضخامت در حد یک میلی‌متر تهیه می‌شوند در نتیجه تقریباً تمام سلول‌ها در معرض محیط انتخاب‌گر قرار می‌گیرند و از ایجاد شیمر در گیاهان تراریخت ممانعت به عمل می‌آورند. هم‌چنین در مقایسه با ریزنمونه‌های معمولی، امکان تهیه تعداد زیادی ریزنمونه را هم فراهم می‌کنند. با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که بخش قاعده‌ای بنه برای تهیه ریزنمونه‌ها مناسب‌تر از بخش رأسی هستند و بالاترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های معمولی قاعده و هم‌چنین ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک قاعده با درصد مشابه به‌دست آمد. با توجه به مزیتی که ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک در جلوگیری از تولید گیاهان شیمر دارد استفاده از ریزنمونه لایه سلولی نازک بخش قاعده‌ای در پروژه‌های انتقال ژن به این گیاه قابل توصیه است.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه های لایه‌سلولی نازک بخش رأسی و قاعده‌ای بنه زعفران

Table 1- ANOVA table of callus induction percentage in thin cell layer explants excised from apical and basal part of corm in saffron

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	ریزنمونه لایه سلولی نازک بخش رأسی بنه Thin cell layer explants of corm apical		ریزنمونه لایه سلولی نازک بخش قاعده ای بنه Thin cell layer explants of corm base	
		میانگین مربعات Mean of squares	F	میانگین مربعات Mean of squares	F
بلوک Block	3	14536.11	41.60**	3587.96	4.95**
فاکتورa (غلظت NAA) Factor a: NAA concentration	5	2202.77	6.30**	3691.66	5.09**
فاکتور b (غلظت BAP) Factor b: BAP concentration	5	656.1	1.88 ns	1178.33	1.63 ns
اثر متقابلNAA×BAP NAA×BAP interaction effect	25	661.44	1.89*	893	1.23 ns
خطا Error	105	349.44	-	0.37	-

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و عدم معنی‌داری.

**, * and ns significant difference over control at P< 0.01 and P< 0.05 and not significantly, respectively.

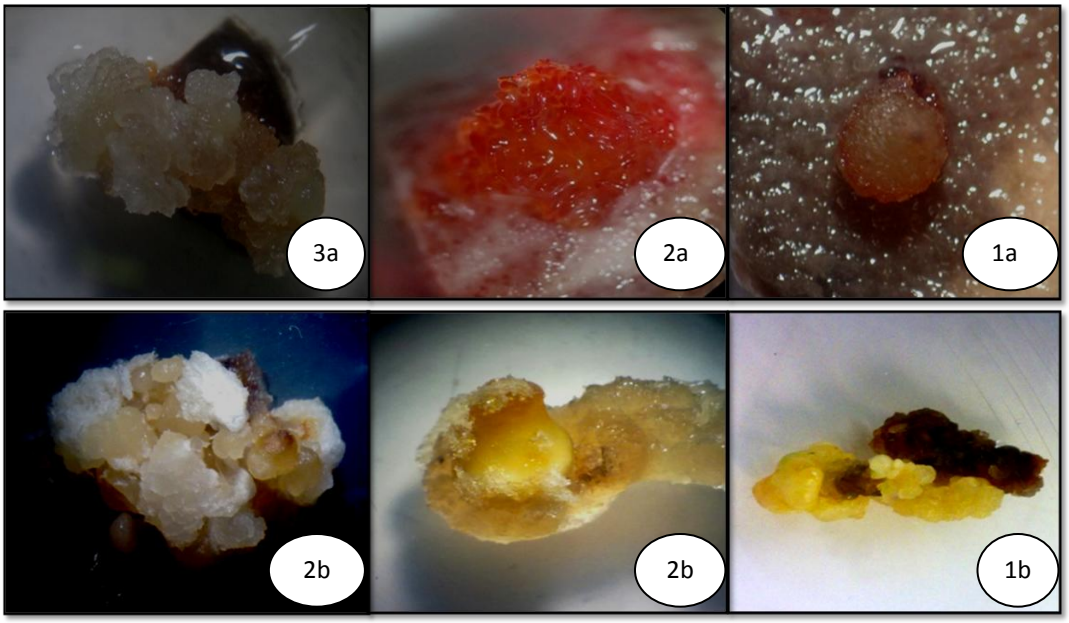
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایه‌ی سلولی نازک بخش رأسی بنه زعفران

Table 2- Mean comparison of interaction effect between BAP and NAA concentration on callus induction in thin cell layer explants of corm apical

شماره تیمار Treatment number	تیمار هورمونی Hormone treatment ($mg.l^{-1}$)	درصد کالوس‌زایی Callus percentage	شماره تیمار Treatment number	تیمار هورمونی Hormone treatment ($mg.l^{-1}$)	درصد کالوس‌زایی Callus percentage
1	N0B0	0^{f}	19	N2B0	15^{cdef}
2	N0B0.5	5^{ef}	20	N2B0.5	30^{abcdef}
3	N0B1	0^{f}	21	N2B1	35^{abcde}
4	N0B2	15^{cdef}	22	N2B2	50^{ab}
5	N0B5	10^{def}	23	N2B5	25^{abcdef}
6	N0B10	0^{f}	24	N2B10	25^{abcdef}
7	N0.5B0	30^{abcdef}	25	N5B0	5^{ef}
8	N0.5B0.5	5^{ef}	26	N5B0.5	30^{abcdef}
9	N0.5B1	20^{bcdef}	27	N5B1	55^{a}
10	N0.5B2	15^{cdef}	28	N5B2	15^{cdef}
11	N0.5B5	20^{bcdef}	29	N5B5	25^{abcdef}
12	N0.5B10	10^{def}	30	N5B10	50^{ab}
13	N1B0	25^{abcdef}	31	N5B0	15^{cdef}
14	N1B0.5	20^{bcdef}	32	N5B0.5	15^{cdef}
15	N1B1	25^{abcdef}	33	N5B1	45^{abc}
16	N1B2	25^{abcdef}	34	N5B2	20^{bcdef}
17	N1B5	45^{abc}	35	N5B5	15^{cdef}
18	N1B10	5^{ef}	36	N5B10	40^{abcd}

در هر ستون تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Similar letter in each column indicate no significant difference based on Duncan multiple test in 5% level.



شکل ۳- کالوس‌های ایجاد شده در ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک بخش راسی (a) و بخش قاعده‌ای (b) بنه زعفران 1a) در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2a BAP) در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و نیم میلی‌گرم در لیتر 3a NAA) در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و پنج میلی‌گرم در لیتر NAA

1b) درمحیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و نیم میلی‌گرم در لیتر 2b BAP) در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و نیم میلی‌گرم در لیتر 3b BAP) در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP

در هر ستون تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3- Callus formation in thin cell layer explants excised from apical (a) and basal(b) part of crom in saffron 1a) medium containing BAP (2 mg.l^{-1}) 2a) medium containing BAP (1 mg.l^{-1}) and NAA (0/5 mg.l^{-1}) 3a) medium containing BAP (1mg.l^{-1}) and NAA (5 mg.l^{-1}).

1b) Medium containing NAA (1mg.l^{-1}) and BAP(0/5 mg.l^{-1})) 2a) medium containing NAA (2 mg.l^{-1}) and BAP (0/5 mg.l^{-1}) and 3a) medium containing NAA (2 mg.l^{-1})and BAP (1mg.l^{-1}).

Similar letter in each column indicate no significant difference based on Duncan multiple test in 5% level.

منابع

Abdullaev, F. 2001. Cancer chemo preventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine 227: 20-25.

Agayeve, Y.M., Fernandez, J.A., and Zarifi, E. 2009.Clonal election of saffron (*Crocus sativus* L.): the first experimental result. Euphytica 169: 81-99.

Caiola, M.G., and Canini, A. 2010. Looking for saffron (*Crocus sativus* L.) parents. Functional Plant Science and Biotechnology 4: 1-14.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3: 1222-1239.

Langens, M.G., Albers, M., and Klerk, G. 1998. Hot water, treatment before tissue culture reduces initional contamination in lilium and

acer. Plant Cell Tissue and Organ Culture 52: 75-77.

Piqueras, A., Hee, H.B., Escribano, J., Rubio, C., Hellin, E., and Fernandez, J.A. 1999. Development of cormogenic nodules and microcorms by tissue culture, a new tool improvement of saffron. Agronomie 19: 603-610.

Plessner, O., Ziv, M., and Negbi, M. 1990. In vitro corm production in the saffron *Crocus* (*Crocus sativus* L.). Plant Cell. Tissue and Organ Culture 20: 89-94.

Teixeira da Silva, J.A., and Fukai, S. 2003. Cherysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. Asian Journal of Plant Sciences 2 (6): 505-514.

Xue, L., Zhigang, G., and Ruizhi, L. 2002. Effects of culture conditions, carbon source and regulators on saffron callus growth and crocin accumulation in the callus. Tsinghua Science and Technology 7 (5): 448-453.

Effect of some plant growth regulators and different explants types on callus induction in saffron

Khadijeh Bagheri[1*], Pejman Azadi[2], Mitra Gholami[3] and Massoud Mir Masoumi[4]

Submitted: 10 October, 2015 **Accepted:** 22 January, 2017

Bagheri, KH., Azadi, P., Gholami, M., and Mir Masoumi, M. 2017. Effect of some plant growth regulators and different explants types on callus induction in saffron. Saffron Agronomy & Technology 5(3): 231-239.

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is the world's most expensive spice. Moreover, it is important since it contains various drug metabolites. Saffron is a triploid (2n=3X=24) and sterile plant and it does not have any viable seeds. Because of the sterility, classical breeding of this plant is limited. Developing an efficient callus induction protocol is studied for two reasons, i.e. molecular breeding and the production of secondary metabolites. In order to provide a suitable callus induction protocol, establishment of corms was considered. Five different treatments were applied to sterilization of corms. Thin cell layer explants with approximately 1 mm thickness and typical explants with approximately 1 cm thickness were prepared from sterilized corms. For callus induction, different explants were planted in MS medium containing different concentration of 2, 4-D, BAP and NAA. Then, they were incubated in dark conditions at 20 ±20C for 3 months. The results showed that the use of Benomyl fungicide, followed by surface sterilization using sodium hypochlorite (2.5 %) was the best sterilization treatment. The highest survival rates of explants (90%) were observed in this treatment and all explants were free of contamination. The highest amount of callus induction (75%) was obtained in MS medium supplemented with 2mg/l NAA and 0/5 mg/l BAP from thin cell layer of basal corm. The same result was observed with 1mg/l 2, 4-D from typical explants of basal corm. The results obtained from this study show that the thin cell layer explants are suitable explants because of the high amount of callus formation and the advantages for gene transfer studies.

Keywords: Thin cell layer, Hormone, Sterilization treatment, Saffron, Tissue culture.

1 - Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
2 - Assistant professor, Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.
3 - MS.c Graduated Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan.
4 - MS.c Faculty of Biology, Tehran University.
(*- Corresponding author Email: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir)
DOI: 10.22048/jsat.2017.36767.1120