Archive of SID

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد ششم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۷
شماره صفحه: ۱۸۹-۱۷۹
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.1187.1048

تولید ریزبنه در زعفران (*Crocus sativus L.*) از طریق کشت درون شیشه‌ای

علی ایزانلو[1*]، عاطفه درخشان[2]، زهره علیزاده[1] و محمد علی بهدانی[3]
۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
* نویسنده مسئول: *Email: a.izanloo@birjand.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۲

چکیده

زعفران گیاهی تریپلوئید و عقیم است که تکثیر آن فقط از طریق بنه‌های مادری انجام می‌شود. تکثیر گیاه به طور طبیعی خیلی کند است. استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند به تکثیر این گیاه سرعت بخشیده و جوابگوی درخواست بیش از پیش کشاورزان به این گیاه دارویی مهم باشد. هدف از این تحقیق، دستیابی به روش مناسب برای ایجاد ریزبنه از بنه مادری پیش تیمار شده با سرما بود. به این منظور، نمونه‌هایی در دو تاریخ متفاوت مرداد و اوایل شهریور از منطقه قاین در خراسان جنوبی جمع‌آوری و بنه‌های سالم و درشت به مدت ۱۵-۱۳ هفته در دمای ۱±۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. محیط کشت *MS* ۱/۲ همراه با شش درصد ساکارز، دو میلی‌گرم بر لیتر *IBA* و غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر *BAP* در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار مورد برررسی قرار گرفتند. نمونه‌های شاهد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد بودند. نتایج حاکی از آن بود که تنظیم‌کننده‌های رشد در ایجاد ریزبنه‌ها بی‌اثر بودند و بنه‌های برداشت شده در مرداد ماه پیش تیمار شده به مدت ۱۵ هفته بیشترین و بزرگترین ریزبنه‌ها را تشکیل دادند. با توجه به نتایج، استفاده از بنه‌های برداشت شده در مرداد ماه با پیش تیمار سرمایی کافی و کشت بنه‌ها در محیط کشت *MS* ۱/۲ حتی بدون اعمال هورمون برای تهیه ریزبنه از طریق کشت درون شیشه‌ای توصیه می‌شود که به لحاظ اقتصادی نیز به صرفه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اندام‌زایی، تنظیم‌کننده، ریزازدیادی، محیط کشت موراشیگ-اسکوگ

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus L.*) گیاه ادویه‌ای، دارویی و با ارزش اقتصادی بالایی است که امروزه به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف تغذیه‌ای، دارویی، نساجی و غیره کاربرد دارد. به دلیل نیاز آبی کم، سهولت در کاشت، داشت و عملکرد مناسب و همچنین از لحاظ توسعه صادرات غیرنفتی از اهمیت اقتصادی بسیار زیادی برخوردار است (*Gresta et al., 2008*). شناخت خواص ضدمیکروبی، ضدسرطانی و آنتی-اکسیدانی کاروتنوئیدهای محلول در آب زعفران موجب تقاضای بیش از پیش این محصول شده است (*Abdullaev & Frenkel, 1999*).

زعفران گیاهی تریپلوئید و عقیم بوده که تکثیر آن فقط از طریق بنه‌ها انجام می‌شود (*Koocheki et al., 2013*). سرعت تکثیر بنه‌های جدید با روش‌های متداول نسبتاً کند است. در مزارع زعفران معمولاً چهار تا پنج بنه دختری از هر بنه مادری در هر سال تولید می‌شود که در طی سه تا چهار سال به اندازه مطلوب برای گلدهی می‌رسند (*Sharma & Piqueras, 2010*). نرخ پایین تکثیر به همراه آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی، دسترسی به مقدار بنه لازم برای کشت رو به گسترش این گیاه را محدود کرده است (*Vahedi et al., 2014*).

در تکثیر سنتی زعفران، بنه‌های فصل قبل از مزارع چندساله خارج و در اواخر تابستان یا اوایل پاییز کشت می‌شوند. عوامل بیماری‌زا از طریق بنه‌های آلوده می‌توانند از نسلی به نسل دیگر و از مزرعه‌ای به مزرعه دیگر منتقل شوند. عوامل بیماری‌زا باعث پوسیدگی و نکروزه شدن بنه‌ها و برگ-ها شده که اغلب باعث کاهش یا جلوگیری از رشد و گلدهی گیاه و کاهش سال‌های باردهی محصول می‌شوند (*Ahrazem et al., 2010; Vahedi et al., 2014*). متوسط عملکرد کلاله زعفران در طی ۱۰ سال گذشته ۴/۴ کیلوگرم در هکتار بوده است که کاهش شدیدی را نسبت به پتانسیل عملکرد ۱۰ کیلوگرم در هکتار نشان می‌دهد (*Ahmad et al., 2014*). یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد در مزارع زعفران، استفاده از بنه‌های آلوده است. استفاده از باکتری-کش‌ها و قارچ‌کش‌ها برای کنترل پاتوژن‌ها[1] نیز هزینه‌های تولید را بالا خواهد برد و باعث آلودگی‌زیست‌محیطی نیز می‌شوند، درحالی‌که کنترل آلودگی‌های ویروسی خیلی سخت‌تر می‌باشد. مشکل دیگر در تکثیر کلاسیک زعفران، غیریکنواختی و کیفیت پایین بنه‌ها برای کشت است. یافتن روشی برای تولید سریع و کارآمد بنه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا می‌تواند عملکرد زعفران را افزایش داده و همچنین می‌تواند تولید انبوه بنه‌های عاری از پاتوژن را برای مدرن-سازی[2] کشت زعفران مانند کشت ایروپونیک[3] و هیدروپونیک[4] (*Souret & Weathers, 2000*) فراهم سازد. روش‌های کشت بافت مانند ریزازدیادی توان بالقوه‌ای را برای تولید انبوه بنه‌های عاری از پاتوژن و با کیفیت برای ازدیاد و بهبود ژنتیکی فراهم می‌نماید (*Fernández, 2004*).

روش کشت درون شیشه‌ای از طریق اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم در زعفران توسط چندین گروه از محققین با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف در طی دو دهه اخیر مورد بررسی قرار گرفته‌اند (*Plessner et al., 1990; Ebrahimzadeh et al., 2000; Sharma et al., 2008; Zeybek et al., 2012; Cavusoglu et al., 2013; Mir et al., 2014*). به‌خاطر اهمیت این گیاه، روش ریزازدیادی کارآمد می‌تواند ابزاری سودمند برای تکثیر کلونی بوده و همچنین می‌تواند اساسی را برای جهش‌زایی درون شیشه‌ای و تغییر شکل ژنتیکی فراهم نماید. تکثیر درون شیشه‌ای زعفران از طریق جنین‌زایی سوماتیکی یا بنه‌زایی به عنوان روش جایگزین کارآمدی برای تکثیر انبوه بنه‌های عاری از پاتوژن می‌باشد (*Quadri et al., 2010*). گیاهان تغییر ژنتیکی یافته برتر زعفران از طریق مهندسی ژنتیک یا جهش‌زایی درون شیشه‌ای نیز می‌توانند از طریق روش‌های درون شیشه‌ای به سرعت تکثیر یابند. متأسفانه آزمایشات مرتبط با تکثیر سریع بنه زعفران تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده‌اند و بنه‌های اندکی از طریق کشت درون شیشه‌ای تولید شده‌اند. بنه‌های بالغ با منشاء کشت درون شیشه‌ای در تولید انبوه هنوز تولید نشده‌اند.

اندام‌زایی مسقیم دارای مزیت یکنواختی ژنتیکی در مقایسه با باززایی نابجا از کشت کالوس یا جنین‌زایی سوماتیکی است. معمولاً زمان کمتری برای باززایی مستقیم ساقه در مقایسه باززایی غیرمستقیم مورد نیاز است. کارایی باززایی مستقیم در زعفران بستگی به نوع ریزنمونه، ترکیبات

1- Pathogens
2- Modernitisation
3- Aeroponic
4- Hydroponic

www.SID.ir

Archive of SID

تنظیم‌کننده رشد و دمای انکوباسیون دارد (*Sharma & Piqueras, 2010*). اولین گزارش از باززایی مستقیم شاخه از بنه بود (*Homes et al., 1987*) که به دنبال آن باززایی شاخه از جوانه‌های جانبی روی تکه‌های دو میلی‌متری بافت بنه بود و القاء شاخه از جوانه‌های جانبی با کاربرد سیتوکنین‌ها و دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد بهبود یافت (*Plessner et al., 1990*). پلسنر و همکاران (*Plessner et al., 1990*) بنه‌های کوچک و جوان و بنه‌های حاوی جوانه‌های جانبی را کشت و ریزبنه‌ها را تولید کردند، به‌طوری‌که زئاتین[1] دارای اثر مهمی در رشد بنه‌های جدید داشت و برای رشد برگ‌ها ضروری بود. کاراگلو و همکاران (*Karaoğlu et al., 2007*) تکه‌های بنه را در محیط کشت *MS*[2] حاوی دو میلی‌گرم در لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA*[3] کشت کردند و توانستند بعد از شش ماه بنه القاء نمایند. شارما و همکاران (*Sharma et al., 2008*) نیز ریزبنه‌ها را بر روی جوانه‌های جدا شده از مریستم جانبی در محیط کشت *MS* حاوی سه میلی‌گرم در لیتر *BAP*[4] و ۸۰ گرم در لیتر ساکاروز القاء نمودند. آهوران و همکاران (*Ahouran et al., 2012*) با برش و کشت بنه‌های *Crocus cancellatus* به دو نیمه بالا و پایین، نتیجه گرفتند اگرچه هردو نیمه تولید ریزبنه کردند، اما بخش بالایی ریزبنه بیشتری تولید کرد. حداکثر القاء ریزبنه در محیط کشت *MS* حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *NAA* و یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* گزارش شد. این محققان تیمار سرمایی را عامل مؤثری در جوانه‌زنی ریزبنه‌های جدید توصیف کردند. محیط کشت *MS* حاوی شش میلی‌گرم در لیتر *BAP* دارای بهترین نتایج در تشکیل شاخه و تولید برگ به ترتیب با ۹۶/۷ و ۹۳/۳ درصد بود (*Cavusoglu et al., 2013*). دوی و همکاران (*Devi et al., 2011*) از عقب‌اندازهای رشد جهت تولید ریزبنه‌های زعفران استفاده کردند. بعد از ۳-۲ هفته از کشت، نمو ریزبنه به شکل متورم در پایه ساقه‌ها شروع شد. به محض تشکیل ریزبنه‌ها، ساقه‌ها خشک و ریزبنه‌ها با پوشینه‌های کاملاً توسعه یافته بعد از ۱۶-۱۳ هفته از کشت مشاهده شدند. تعداد ریزبنه بیشتر در ۱/۷ میکرومولار پاکلوبوترازول[5] مشاهده شد.

تنظیم‌کننده‌های رشد *NAA* و *BAP* مناسب‌ترین ترکیب برای حمایت از اندام‌زایی و تشکیل ساقه از جوانه‌های بنه در زعفران گزارش شده است (*Parray et al., 2012*). در میان سیتوکنین‌ها *BAP* مؤثرترین سیتوکنین در القاء مستقیم شاخه از جوانه‌ها و ریزبنه‌ها است (*Sharma et al., 2008*). مطالعه اخیر نشان داد که *TDZ*[6] در غلظت‌های زیر ۱۰ میکرومول خیلی مؤثرتر از *BAP* در القاء شاخه از جوانه‌های جانبی است (*Sharifi et al., 2010*). بیشترین تعداد ریزبنه در محیط کشت *MS*۱/۲ تأمین شده با *TDZ* (*20 µM*)، *IAA* (*10 µM*) و ساکاروز (۴۰ *g/l*) بعداز ۸ هفته بدست آمد و *TDZ* برای القاء و تولید ریزبنه‌ها مؤثر واقع شد (*Parray et al., 2012*).

دما و نور بر القاء مستقیم شاخه بر روی ریزنمونه مؤثرند. معمولاً دمای حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای القاء و نمو شاخه مناسب است، اما در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز القاء و نمو شاخه را نیز انجام می‌شود (*Plessner et al., 1990*).

غلظت ساکاروز عامل مؤثر دیگری در شاخه‌زایی از بنه‌ها است که القاء شاخه بیشتر در غلظت‌های ۵۰ گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۳۰ گرم در لیتر گزارش شده است (*Sharma et al., 2008*).

در بسیاری از موارد موفقیت در تکثیر درون شیشه‌ای بستگی به منبع ریزنمونه دارد. برای جنس *Crocus* و بیشتر گیاهان خانواده *Iridaceae*، بنه عمومی‌ترین منبع ریزنمونه برای کشت گزارش شده است (*Ascough et al., 2009*).

پیش تیمار سرمایی و نگهداری بنه‌ها در درجه حرارت پایین نمو جوانه اصلی و جانبی را تحریک می‌نماید که می‌تواند به بنه‌های کوچکی تبدیل شوند. افزایش دما از ۱ به ۱۰ درجه بعد از ایجاد بنه منتج به بنه‌های دختری بزرگتر گردید (*Renau-Morata et al., 2013*). هنگامی‌که بنه‌های تولید شده در دمای پایین در درون شیشه‌ای کشت گردیدند، ۷-۵ جوانه سبز شده بعد از ۸-۶ هفته در محیط حاوی سیتوکنین‌ها بدست آمدند، در حالی‌که فقط ۰/۳۶ جوانه در هر بنه در محیط کنترل تولید شدند. جوانه‌های سبز شده به عنوان ریزنمونه جهت ریزازدیادی زعفران مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از هشت هفته، ریزنمونه‌های شاخه از بنه‌های سبز شده بنه جدیدی را ایجاد نمودند. علاوه بر این، جوانه‌های جانبی القاء شده در روش درون شیشه‌ای از شاخسارهای

1- Zeatin
2- Murashige and Skoog
3- Naphthaleneacetic acid (NAA)
4- 6-Benzylaminopurine (BAP)
5- Paclobutrazol
6- Thidiazuron (TDZ)

www.SID.ir

Archive of SID

بوجود آمده از بنه‌ها در دمای پایین بزرگتر از بنه‌های مزرعه‌ای بدون تیمار بودند (*Renau-Morata et al., 2013*).

تولید ریزبنه می‌تواند در شرایط کشت درون شیشه‌ای به مقدار زیادی و در مدت زمان کوتاهی تولید شود و به عنوان روشی ایده‌آل برای ریزازدیادی زعفران در نظر گرفته می‌شود. به دلیل اندازه کوچک جابجایی و حمل و نقل و ذخیره‌سازی این ریزبنه‌ها در شرایط دمایی پایین آسان بوده و می‌توانند برای حفاظت ژرم‌پلاسم نیز استفاده شوند (*Sharma & Piqueras, 2010*).

امروزه میزان تقاضای جهانی زعفران افزایش یافته است، حال آنکه روش‌های کشت مزرعه‌ای زعفران هزینه بالایی را در برداشته، همچنین هرگونه فعالیت برای بهبود زعفران، نیاز به تولید مقدار انبوه بنه زعفران عاری از عوامل بیماری‌زا دارد. در این شرایط کاربرد روش‌های کشت بافت برای رسیدن به این هدف می‌تواند بسیار سودمند باشد. بنابراین، استفاده از تکنیک‌های کشت بافت جهت تکثیر و افزایش رشد در آزمایشگاه و تولید بنه‌های عاری از عوامل بیماریزا کمک بزرگی به کشاورزان خواهد نمود.

لذا هدف اصلی از این تحقیق دستیابی به روشی مناسب و کم‌هزینه برای ایجاد ریزبنه از زعفران بود. در این آزمایش امکان تکثیر با استفاده از بنه‌های برداشت شده در ماه‌های مختلف (مرداد و شهریور) ذخیره شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ترکیبات هورمونی در محیط کشت *MS*۱/۲ از طریق اندم‌زایی مستقیم با تشکیل بنه‌های دختری از بخش‌های بالایی بنه حاوی نواحی مریستمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام آزمایش، بنه‌های زعفران از منطقه قائن در دو تاریخ مرداد و اوایل شهریور ۱۳۹۳ جمع‌آوری و بنه‌های سالم با قطر حدود ۳-۲/۵ سانتی‌متر (با وزن ۸-۷ گرم) جداسازی شدند. بنه‌های سالم مرداد ماه به مدت ۱۵ هفته و بنه‌های شهریور به مدت ۱۳ هفته در یخچال و در دمای ۱±۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند تا مریستم و جوانه‌های انتهایی تحریک به رشد شوند.

ضدعفونی ریزنمونه‌ها

به منظور ضدعفونی ریزنمونه، ابتدا فلس‌های روی بنه‌ها بطور کامل برداشته و به مدت ۳۰ دقیقه جهت حذف گرد و غبار و آلودگی‌های سطحی با آب جاری شستشو شد. برای حذف آلودگی‌های سطحی از چند قطره مایع ظرفشویی نیز استفاده شد و برای ۲۰ دقیقه نیز با آب جاری آبکشی شدند. سپس بنه‌های سالم به داخل کابین هود لامینار ایرفلو[1] منتقل و به دو نیمه بالا و پایین برش داده شدند. نیمه پایینی که معمولاً حاوی آلودگی و ریشه بود، کنار گذاشته و نیمه بالایی مجدداً آبشویی و با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شد. سپس ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (حاوی ۰/۰۵ درصد کلرین فعال) به مدت ۱۰ دقیقه خوابانده و پس از آن سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. بعد از آن، ریزنمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۲۵ درصد قرار داده شدند و مجدد سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. دستورالعمل ضدعفونی تشریح شده برای ضدعفونی بنه‌ها کارآمد بود؛ به‌طوری‌که متوسط درصد آلودگی کمتر از نه درصد بود.

آماده‌سازی محیط غذایی و شرایط کشت

در این آزمایش از محیط کشت *MS* ۱/۲ حاوی شش درصد ساکاروز استفاده شد. آزمایش بصورت آشیانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ماه برداشت و ترکیبات هورمونی دو میلی‌گرم در لیتر *IBA*[2] و سه مقدار *BAP* (۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) و شاهد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد بود. *pH* محیط روی ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد. محیط کشت و تمام تجهیزات از قبیل ظروف آب مقطر، پنس و سایر وسایل در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. محیط کشت در زیر هود لامینارایرفلو به شیشه‌های کشت منتقل شد، به این ترتیب که در هر شیشه ۳۰ میلی‌گرم محیط کشت ریخته شد. شیشه‌ها برای یک روز در زیر هود باقی ماندند تا آگار موجود در محیط کاملاً منعقد شده و محیط آماده کشت ریزنمونه‌ها شود. از ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در زیر هود لامینار ایرفلو لایه نازکی از انتهای برش یافته جدا و قبل از انتقال به محیط کشت با محلول آسکوربیک اسید یک درصد به مدت پنج دقیقه آغشته و سپس به شیشه‌های حاوی محیط کشت منتقل گردیدند.

1- Laminar Air Flow Cabinet

2- Indole-3-butyric acid (IBA)

www.SID.ir

Archive of SID

درب شیشه‌ها با پارافیلم بسته شده و شیشه‌ها درون انکوباتور با شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. تعداد ریزبنه‌ها بر روی ریزنمونه‌ها شمارش و قطر آن‌ها، پس از عکس‌برداری از تمامی نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار تحلیل‌گر تصویری *ImageJ v. 1.51i* (*Schneider et al., 2012*) اندازه‌گیری شد.

تجزیه واریانس داده‌ها بصورت آشیانه‌ای و ترسیم نمودار توسط نرم‌افزار *GenStat V12* (*Payne et al., 2009*) انجام شد.

نتایج و بحث

با بررسی اثر ماه برداشت و ترکیبات هورمونی مختلف در تولید ریزبنه‌ها روی نیمه برش‌یافته بالایی بنه، پس از گذشت یک هفته جوانه‌ها از نواحی مریستمی شروع به متورم شدن نمودند. پس از دو هفته از کشت و انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی ریزبنه‌ها رشد کردند و پوشینه‌ها بر روی ریزبنه‌ها ظاهر گردید (شکل ۱). ریزبنه‌ها سپس در سایه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج نشان داد که استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف بر تعداد و قطر ریزبنه‌ها اثر معنی‌داری نداشت و اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، ولی ماه برداشت بر روی قطر و تعداد ریزبنه‌ها در هر بنه مادری مؤثر بود و به ترتیب اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۲). با کشت در محیط *MS* ۱/۲ و برداشت در مرداد ماه متوسط قطر ریزبنه‌ها ۹/۴۰±۰/۴۵ میلی‌متر در مقایسه با ۸/۵۷±۰/۴۲ میلی‌متر در بنه‌های برداشت شده در شهریور بود. بیشترین تعداد ریزبنه با ۱۳/۴۸±۶/۰ ریزبنه در هر بنه مادری نیز بر روی بنه‌های برداشت شده در مرداد ماه حاصل شد، درحالی‌که متوسط تعداد ریزبنه در شهریور ماه ۳/۴۸±۰/۴۵ ریزبنه بود (جدول ۲ و شکل ۴).

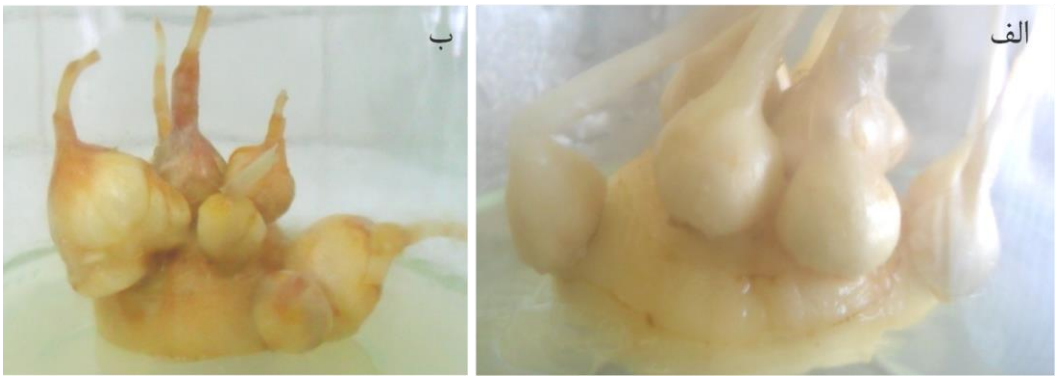
پژوهش‌ها حاکی از این است که در مزرعه نیز برای تشکیل ریزبنه دمای پایین لازم است (*Szlachetka et al., 1990*). شرف‌زاده و خوشخوی (*Sharafzadeh & Khoshkhoy, 2004*) نشان دادند که پیش تیمار با دمای پایین برای تشکیل ریزبنه الزامی است و بنه‌های بزرگ‌تر برای تهیه ریزنمونه، تعداد ریزبنه‌های بیشتری تولید کردند. احتمال دارد دمای پایین موجب تغییر در تعادل هورمون‌ها شده و غلظت مواد فنولیکی را نیز کاهش دهد. نتایج برخی تحقیقات مؤید آن است که وجود اکسین و سیتوکنین برای ایجاد ریزبنه امری ضروری است (*Plessner et al., 1990; Sharafzadeh & Khoshkhoy, 2004*)؛ به‌طوری‌که غلظت بهینه برای تشکیل ریزبنه شامل یک میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* و نیم میلی‌گرم در لیتر *BAP* بود (*Sharafzadeh & Khoshkhoy, 2004*). درحالی‌که ترکیبات هورمونی اختلاف آماری معنی‌داری را با شاهد (بدون هورمون) نشان ندادند. میر و همکاران (*Mir et al., 2014*) نیز تشکیل ریزبنه در تمام ترکیبات محیط کشت را مشاهده کردند، به‌طوری‌که حداکثر تعداد (۱۰) و وزن (۱/۵۴ گرم) ریزبنه‌ها در محیط کشت *MS* حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *BAP*، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA* و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول[1] مشاهده شد. شرایط کشت تحت نور یا در تاریکی بر تشکیل و رشد ریزبنه مؤثر نبودند (*Mir et al., 2014*). به‌نظر می‌رسد که این تفاوت می‌تواند ناشی از سن بنه‌ها، مدت زمان پیش تیمار سرمایی و یا تفاوت در محیط کشت باشد (*Renau-Morata et al., 2013*). کاووس‌اغلو و همکاران (*Cavusoglu et al., 2013*) با کشت بنه‌های دارای گره‌های مریستمی در محیط کشت *MS* حاوی شش میلی‌گرم در لیتر *BAP*، بیشترین شاخه و برگ در طی ۹۰ روز القاء شد (*Cavusoglu et al., 2013*). آهوران و همکاران (*Ahouran et al., 2012*) نیز تشکیل ۵-۱ ریزبنه روی بنه‌های برش‌یافته *C. cancellatus* از طریق اندام‌زایی مستقیم گزارش کردند، بطوری‌که نیمه-فوقانی نسبت به نیمه‌پایینی ریزنمونه بهتری بود و تقریباً در ۹۵ درصد آنها بطور متوسط ۳/۵ ریزبنه در محیط کشت *MS* غنی‌شده با سه درصد ساکاروز و دو میلی‌گرم در لیتر *NAA* به همراه یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* تولید کردند. ریزبنه‌های نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت هشت هفته اثرات مثبت معنی‌داری بر جوانه‌زنی آنها در شرایط کشت درون شیشه‌ای داشت. نگهداری ریزبنه‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد جوانه‌زنی ریزبنه‌ها را به شدت کاهش داد. ریشه‌زایی ریزبنه‌ها در محیط کشت *MS* فاقد تنظیم‌کننده رشد انجام شد؛ درحالی‌که در این آزمایش روی بنه‌های تیمار

1- Paclobutrazol

www.SID.ir

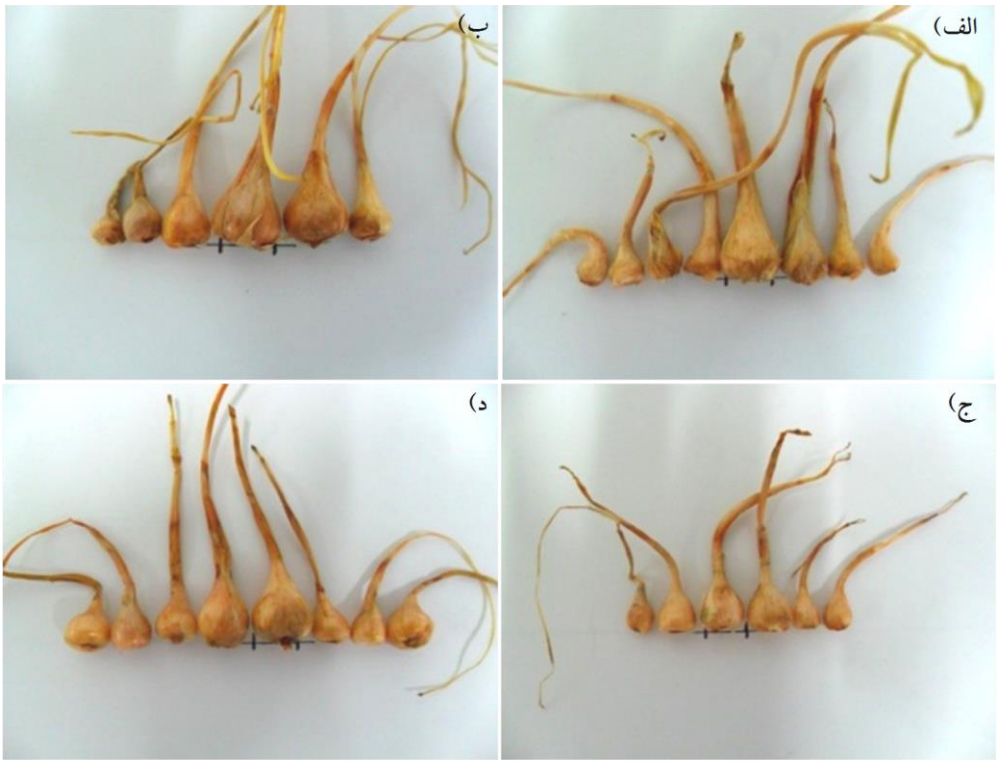
Archive of SID

شده در سرما پس از گذشت دو هفته در محیط کشت *MS* ۱/۲ بدون هورمون ریزبنه‌ها تشکیل شدند.



شکل ۱. ریزبنه‌های تشکیل شده بر روی بنه مادری نصف شده در محیط کشت *MS* ۱/۲ پس از؛ الف) ۱۰ و ب) ۱۵ روز انکوباسیون در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Fig. 1. The produced cormlets on upper half corms in a 1/2MS medium after a) 10 and b) 15 days incubation in dark at 25 °C

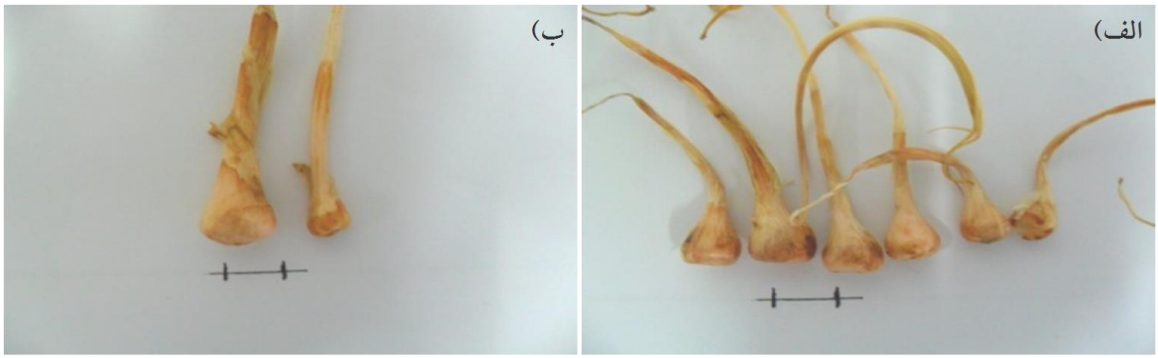


شکل ۲. ریزبنه‌های حاصل از بنه‌های مادری برداشت شده زعفران در مرداد ماه و تیمار هورمونی متفاوت، الف) شاهد (بدون *IBA* و *BAP*)، ب) ریزبنه‌های حاصل در محیط کشت دو میلی‌گرم در لیتر *IBA* و دو میلی‌گرم در لیتر *BAP*، ج) ریزبنه‌های حاصل در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *IBA* و چهار میلی‌گرم در لیتر *BAP* و د) ریزبنه‌های حاصل در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *IBA* و شش میلی‌گرم در لیتر *BAP*

Fig. 2. The produced cormlets from mother corms of saffron harvested in August under hormonal treatments, a) control (without IBA and BAP), b) culture medium with 2 mg.l^{-1} of IBA and BAP; c) culture medium containing 2 mg.l^{-1} IBA and 4 mg.l^{-1} BAP and d) the medium containing 2 mg.l^{-1} IBA and 6 mg.l^{-1} BAP

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. ریزبنه‌های ایجاد شده بر بنه‌های مادری زعفران با تیمار هورمونی (دو میلی‌گرم بر لیتر *IBA* و دو میلی‌گرم بر لیتر *BAP*) در ماه‌های متفاوت برداشت الف) در مرداد و ب) شهریور

Fig. 3. Produced cormlets on mother corms of saffron receiving the same hormonal treatment (2 mg.l^{-1} IBA and 2 mg.l^{-1} BAP) and harvested at different months including a) in August and (b) September

جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر زمان برداشت و ترکیب هورمونی بر تعداد و قطر ریزبنه در هر بنه مادری زعفران

Table 1. Analysis of variance (mean of squares) for the effects of harvest time and hormonal combination on the number and diameter of produced cormlets per mother corm of saffron

منابع تغییر *S.O.V.*	درجه آزادی *df*	قطر ریزبنه *Cormlet diameter*	تعداد ریزبنه *Number of cormlets*
زمان برداشت *Harvest time*	*1*	*7.29**	*18.62***
ترکیب هورمونی/ ماه برداشت *Hormonal combination/Month of harvest*	*6*	*1.77^{ns}*	*2.38^{ns}*
خطا *Error*	*12*	*1.47*	*1.66*
ضریب تغییرات (٪) *CV (%)*	-	*28.01*	*14.00*

*، ** و *ns*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

**, ** and ns: are significant at 5 and 1 probability levels and non-significant, respectively.*

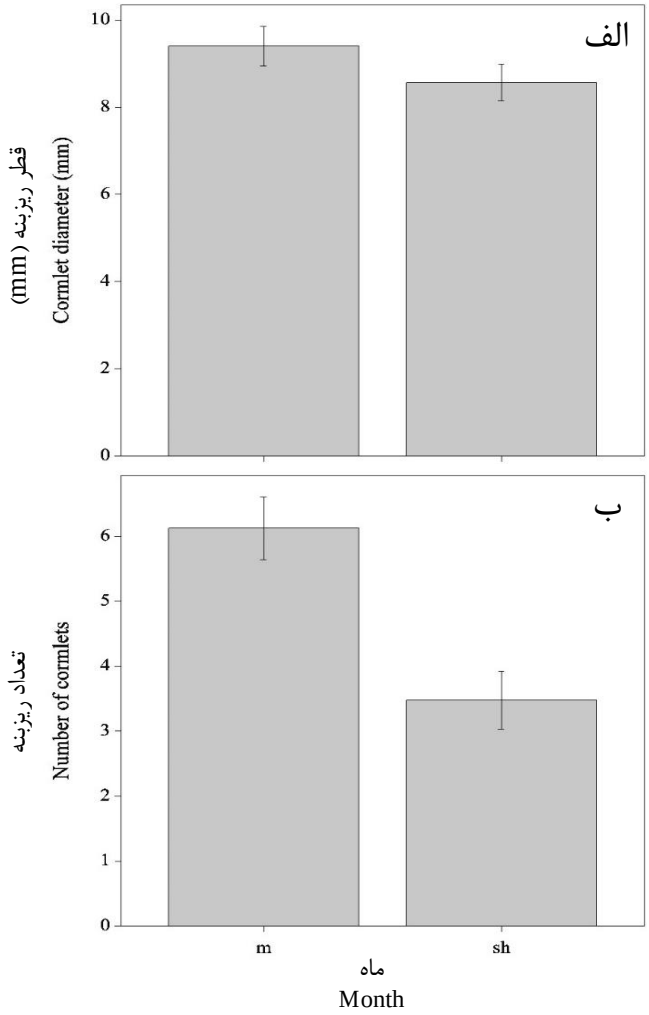
جدول ۲. مقایسه میانگین تعداد و قطر ریزبنه‌های زعفران در تیمارهای مختلف هورمون و زمان برداشت (میانگین ± خطای معیار)

Table 2. Mean comparisons for the number and diameter of produced cormlets of saffron in different treatments of hormone and harvest time (Mean ± Standard Error)

تیمار *Treatment*	قطر ریزبنه (*mm*) *Cormlet diameter (mm)*		تعداد ریزبنه *Number of cormlets*	
زمان برداشت *Harvest time*	مرداد *August*	شهریور *Sept.*	مرداد *August*	شهریور *Sept.*
شاهد (بدون هورمون) *Control (Without hormone)*	*8.96 ± 0.86*	*8.43 ± 0.70*	*5.5 ± 0.91*	*4.67 ± 0.74*
2 mg.l^{-1} BAP+2 mg.l^{-1} IBA	*9.17 ± 0.86*	*7.3 ± 0.70*	*6.0 ± 0.91*	*4.0 ± 0.74*
4 mg.l^{-1} BAP+2 mg.l^{-1} IBA	*9.35 ± 0.61*	*10.75 ± 1.21*	*5.0 ± 0.64*	*2.0 ± 1.29*
6 mg.l^{-1} BAP+2 mg.l^{-1} IBA	*10.13 ± 1.21*	*7.78 ± 0.61*	*8.0 ± 1.29*	*3.25 ± 0.64*
کل *Total*	***9.40 ± 0.45***	***8.57 ± 0.42***	***6.13 ± 0.48***	***3.48 ± 0.45***

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۰۲. تأثیر زمان برداشت (*sh*: شهریور و *m*: مرداد) بر الف) تعداد و ب) قطر ریزبنه‌های زعفران (میله خطا = خطای معیار)

Fig. 4. Effect of harvest time on (sh: August and m: September) (a) diameter and (b) numbers of produced cormlets of saffron (Error bar = the standard error)

نتیجه‌گیری

بخاطر اینکه بنه‌ها دارای نواحی مریستمی متعددی بویژه در بخش بالایی هستند، ریزنمونه‌های مناسبی در کشت بافت زعفران به منظور ریزازدیادی و تولید ریزبنه می‌باشند. با توجه به نتایج، محیط کشت *MS* ۱/۲ بدون تنظیم‌کننده‌های رشد برای تولید ریزبنه از بنه‌های برداشت شده در مرداد ماه و تیمار شده به مدت ۱۵ هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد می‌تواند روشی کارآمد و کم هزینه در تکثیر در شرایط کشت درون شیشه‌ای زعفران باشد. نتایج و مشاهدات آزمایش می‌تواند به عنوان روشی ممکن برای تولید مواد کشت زعفران و ابزاری برای بهبود ژنتیکی زعفران باشد. برای ایجاد روشی کارآمد در تکثیر درون شیشه‌ای زعفران نیاز است تا این پروتکل اصلاح شده تا بنه‌های درشت‌تر و دارای قابلیت گلدهی در طی مدت زمان کمتری تولید شوند.

منابع

Ahmad, M., Razvi, S., Zaffar, G., Nengroo, Z., Mir, S., Wani, B., Ameeque, A., and Habib, M., 2014. Micropropagation of saffron

Abdullaev, F.I., and Frenkel, G.D., 1999. Saffron in Biological and Medical Research. Saffron. CRC Press, pp. 103-113.

www.SID.ir

Archive of SID

(Crocus sativus L.): A review. J. Cell Tissue Res. 14, 4073-4076.

Ahouran, M., Hosseini, R., and Zarghami, R., 2012. Corms as a source of explants for the successful clonal propagation of Crocus cancellatus. J. Crop Sci. Biotechnol. 15, 47-51.

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, Á., Castillo-López, R., Mozos, A.T., and Gómez-Gómez, L., 2010. Crocus sativus pathogens and defence responses. Saffron. Funct. Plant Sci. Biotechnol. 4, 81-90.

Ascough, G.D., Erwin, J.E., and van Staden, J., 2009. Micropropagation of Iridaceae-a review. PCTOC. 97, 1-19.

Cavusoglu, A., Sulusoglu, M., and Erkal, S., 2013. Plant regeneration and corm formation of saffron (Crocus sativus L.) in vitro. Res. J. Biotechnol. 8, 128-133.

Devi, K., Sharma, M., Singh, M., and Singh Ahuja, P., 2011. In vitro cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (Crocus sativus L.)- A commercially important crop. Eng. Life Sci. 11, 189-194.

Ebrahimzadeh, H., Karamian, R., and Noori-Daloii, M.R., 2000. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, Crocus sativus L. Iran. J. Sci. I. R. 11, 169-173. [in Persian with English Summary].

Fernández, J.A., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Res. Dev. Plant Sci. 2, 127-159.

Gresta, F., Lombardo, G., Siracusa, L., and Ruberto, G., 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. Agron. Sustain. Dev. 28, 95-112.

Homes, J., Legros, M., and Jaziri, M., 1987. In vitro multiplication of Crocus sativus L. International Society for Horticultural Science (ISHS). Leuven, Belgium, pp. 675-676.

Karaoğlu, C., Çöcü, S., İpek, A., Parmaksız, I., Uranbey, S., Sarıhan, E., Arslan, N., Kaya, M. D., Sancak, C., Özcan, S., Gürbüz, B., Mirici, S., Er, C., and Khawar, K.M., 2007. In vitro micropropagation of saffron. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp. 223-227.

Koocheki, A., Rezvani Moghaddam, P., Mollafilabi, A., and Seyyedi, S.M., 2013. The effects of high corm density and manure on agronomic characteristics and corms behavior of saffron (Crocus sativus L.) in the second year. J. Saffron Res. 1(2), 144-155. [in Persian with English Summary].

Mir, J.I., Ahmed, N., Shafi, W., Rashid, R., Khan, M.H., Sheikh, M.A., Shah, U.N., Zaffar, S., and Rather, I., 2014. In vitro development and regeneration of microcorms in saffron (Crocus sativus L.). Afr. J. Biotechnol. 13, 2637-2640.

Parray, J.A., Kamili, A.N., Hamid, R., and Husaini, A.M., 2012. In vitro cormlet production of saffron (Crocus sativus L. Kashmirianus) and their flowering response under greenhouse. GM Crops and Food: Biotechnol. Agric. Food Chain. 3, 289-295.

Payne, R., Harding, S., Murray, D., Soutar, D., Baird, D., Welham, S., Kane, A., Gilmour, A., Thompson, R., Webster, R., and Tunnicliffe, W.G., 2009. GenStat Release 12.1. VSN International Hemel Hempstead, UK.

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

Quadri, R.R., Kamili, A.N., Husaini, A.M., Shah, A.M., and Teixeira da Silva, J., 2010. In vitro studies on cormogenesis and maximization of corm size in saffron. Funct. Plant Sci. Biotechnol. 4, 132-135.

Renau-Morata, B., Moyá, L., Nebauer, S.G., Seguí-Simarro, J.M., Parra-Vega, V., Gómez, M.D., and Molina, R.V., 2013. The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the in vitro propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates. Ind. Crop Prod. 46, 97-104.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. Nat. Methods. 9, 671–675.

Sharafzadeh, S.H., and Khoshkhoy, M., 2004. Effects of pre-cooling and growth regulators on micropropagation of saffron (Crocus sativus L.) of Estahban. Iran. J. Hortic. Sci. Technol. 5, 129-136. [in Persian with English Summary].

Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H., Ghareyazie, B., and Karimi, M., 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient Thidiazuron-induced multiple shoot

www.SID.ir

Archive of SID

formation in saffron (Crocus sativus L.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 46, 274-280.

Sharma, K.D., and Piqueras, A., 2010. Saffron (Crocus sativus L.) tissue culture: Micropropagation and secondary metabolite production. Funct. Plant Sci. Biotechnol. 4, 15-24.

Sharma, K.D., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T.R., and Singh, B.M., 2008. In vitro cormlet development in Crocus sativus. Biol. Plantarum. 52, 709-712.

Souret, F.F., and Weathers, P.J., 2000. The growth of saffron (Crocus sativus L.) in aeroponics and hydroponics. J. Herbs Spices Med. Plants. 7, 25-35.

Szlachetka, W., Drozd, J., and Drozd, W., 1990. Effect of meteorological conditions on crocus corm yield in commercial production. Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach. Seria B, Rośliny Ozdobne. 15, 35-40.

Vahedi, M., Kalantari, S., and Salami, S.A., 2014. Factors affecting callus induction and organogenesis in saffron (Crocus sativus L.). Plant Tissue Cult. Biotechnol. 24, 1-9.

Zeybek, E., Önde, S., and Kaya, Z., 2012. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. Cent. Eur. J. Biol. 7, 138-145.

www.SID.ir

Journal of Saffron Research (semi-annual)
Vol.6, No.2, Fall & Winter, 2018-2019
p. 179-189
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.1187.1048
Archive of SID
University of Birjand

Cormlet Production of Saffron (Crocus sativus L.) using in vitro Culture Techniques

Ali Izanloo*[*1], Atefe Derakhshan[2], Zohreh Alizadeh[1], Mohammad Ali Behdani[3]
1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
2- MSc. in Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
**Corresponding Author email: a.izanloo@birjand.ac.ir*

Received 7 December 2017; Accepted 24 July 2018

Abstract
Saffron is a triploid plant from Iridaceae family, which is propagated only via mother corms. In vitro culture techniques can accelerate the propagation of this plant in order to comply with the increasing demands of farmers to this important medicinal plant. The purpose of this research was to find out a proper protocol to cormlet production on the mother corms were collected in August and early September months which cold pre-treated. To this end, two saffron ecotypes of corms were collected from Qaen and Souht Khorassan regions. Samples were kept at 3±1°C for 13 to 15 weeks. After sterilization, samples were transferred into half strength MS culture medium with 6% sucrose, 2 mg.l^{-1} IBA and 2, 4 and 6 mg.l^{-1} BAP based on a CRD with five replications. Control was without growth regulators. The results showed that there were no significant differences between growth regulator concentrations in cormlet production. However, the August samples were significantly different in the number of cormlets per mother corm and cormlet diameter. According to the results, sufficient cold pre-treatment on corms harvested in August and culture in 1/2 MS medium without any growth regulators are recommended for the production of micro-corms of saffron through in vitro culture, which is also economically important.

***Keywords:** Growth regulators, Micropropagation, MS medium, Organogenesis*

www.SID.ir