نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد نهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۰
شماره صفحه: ٤٤-۲۹
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2019.2583.1103

مقاله پژوهشی:

بهینه‌سازی القای کالوس جنین‌زا و باززایی غیرمستقیم در زعفران (*Crocus sativus* L.)

عاطفه درخشان[۱]، علی ایزانلو*[۲]، زهره علیزاده[۲]، محمدعلی بهدانی[۳]
۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، صندوق پستی: ۳۳۱
۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
*نویسنده مسئول: *Email: a.izanloo@birjand.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۳۰

چکیده

زعفران گیاهی تریپلوئید و عقیم بوده که تکثیر آن فقط از طریق رویشی انجام می‌شود، لذا بهبود خصوصیات زراعی آن با استفاده از روش‌های اصلاح کلاسیک با محدودیت همراه است. فناوری کشت بافت ابزاری مناسب برای کمک به بهبود خصوصیات زراعی می‌باشد. هدف از این تحقیق دستیابی به پروتکل مناسب برای القاء کالوس جنین‌زا و باززایی غیرمستقیم بر روی قطعات بنه زعفران زراعی بود. در این تحقیق دو آزمایش متوالی برای القاء و کشت کالوس و جنین‌زایی انجام شد. آزمایش اول بصورت فاکتوریل با سه فاکتور شامل؛ نوع ریز نمونه (در چهارسطح) و دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و BAP هرکدام در سه سطح (۱، ۲ و ۳mg/l)، در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرارfsaff اجرا گردید. نتایج آزمایش القاء کالوس حاکی از این بود که قطعات حاصل از ریزبنه‌های تشکیل شده بر روی بنه‌های مادری بیشترین درصد کالوس (۹۴/۳۷ درصد) را در مقایسه با انواع دیگر ریزنمونه‌ها تشکیل دادند. محیط کشت MS حاوی (۲ mg/l) 2,4-D و (۲ mg/l) BAP بهترین محیط برای تشکیل و رشد کالوس (۷۴/۴۹ درصد) در قطعات بنه بود. برای تولید کالوس‌های جنین‌زا، کالوس‌های بدست آمده در محیط کشت MS حاوی (۰/۵ mg/l)2,4-D و(۳mg/l)BAP منتقل و واکشت شدند. به منظور نمو جنین یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار در محیط‌های کشت در دو سطح (نیم‌غلظت MS و کامل MS) بدون هورمون و یا محتوی شش درصد ساکارز و یا محتوی (۱ mg/l)ABA منتقل و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد بهترین محیط برای نمو جنین محیط MS کامل محتوی (۱ mg/l) ABA (با رتبه نموی۴/۸۳ از ۵) بود. سپس کالوس‌های دارای جنین‌های نمو یافته به منظور رشد و تمایز بیش‌تر به محیط کشت کامل MS محتوی شش درصد ساکارز منتقل شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، کالوس‌هایی که در محیط کشت کامل MS محتوی (۱ mg/l)ABA قرار داشتند، بهترین واکنش را به باززایی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بنه، تنظیم‌کننده رشد، جنین سوماتیکی، محیط کشت.

مقدمه

زعفران زراعی (*Crocus sativus L.*) ژئوفیتی چند ساله است که در دامنه وسیعی از محیط‌ها با اقلیم خشک و نیمه‌خشک از اسپانیا تا چین کشت می‌شود. گیاه زعفران از نظر ژنتیکی عقیم بوده و تکثیر آن صرفاً از طریق رویشی بوسیله بنه‌ها انجام می‌گیرد. عدم تشکیل بذر یا عقیمی به علت تری‌پلوئید بودن زعفران محدودیتی برای کاربرد روش‌های اصلاح کلاسیک مبتنی بر تلاقی برای بهبود کمیت و کیفیت محصول می‌باشد. علاوه برآن، وجود تنوع ژنتیکی واقعی در زعفران زراعی بر اساس نتایج برخی تحقیقات ناچیز گزارش شده است (*Grilli Caiola et al., 2004; Sik et al., 2008; Rubio-Moraga et al., 2009; Fluch et al., 2010; Siracusa et al., 2013; Nemati et al., 2014; Mir et al., 2015*)، در حالی‌که فراهمی تنوع و اختلافات ژنتیکی نقطه شروع هرگونه برنامه به‌نژادی محسوب می‌شود. لذا، ضروری است تا تنوع ژنتیکی جدیدی جهت تسهیل گزینش صفات مطلوب مورفولوژیکی و زراعی ایجاد شود. در مواردی که تنوع ژنتیکی مطلوب در ترکیب مناسبی وجود ندارد و یا اینکه اصلاً موجود نیست، جهش القایی می‌تواند باعث ایجاد تنوع جدید شود (*Broertjes & Van Harten, 1988*).

روش‌های کشت بافت و باززایی گیاهان، جهش‌زایی درون شیشه، تراریزش و ابزارهای مولکولی متعددی برای بهبود گیاهان توسعه یافته‌اند. کشت بافت روشی سودمند برای تولید انبوه بنه‌های سالم بوده و فرصت‌هایی را برای ایجاد تنوع از طریق استفاده درون شیشه از مواد جهش‌زا و مواد پلی‌پلوئیدکننده فراهم می‌کند. القاء کالوس و به دنبال آن باززایی گیاهان به عنوان ابزاری ممکن برای القاء تنوع جدید پیشنهاد می‌شود. مطالعات متعددی در مورد باززایی گیاه زعفران از طریق اندام‌زایی غیرمستقیم از کشت‌های کالوس گزارش شده است. اولین گزارش در القاء موفقیت‌آمیز کالوس در زعفران و باززایی گیاهچه‌های کامل از ریزنمونه‌های بنه بود (*Ding et al., 1979; Ding et al., 1981*) که ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی *IAA*[1] و *2,4-D*[2] کشت شدند. ایلاهی و همکاران (*Ilahi et al., 1987*) نیز کالوس را از ریزنمونه‌های بنه در محیط کشت نیم‌غلظت *MS*[3] با استفاده از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد *2,4-D* و *BAP*[4] و شیره نارگیل دو درصد القاء نمودند. همان کالوس‌ها برای تمایز مجدد به جوانه مورد استفاده قرار گرفتند. ساقه‌های بدست آمده سپس در محیط کشت نیم‌غلظت *MS* حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA*[5] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *BAP* یا *Kin*[6] و دو درصد شیره نارگیل بعد از چهار هفته ریشه‌دهی شدند (*Ilahi et al., 1987*). ایسا و اوگاساوارا (*Isa & Ogasawara, 1988*) کالوس‌زایی را با استفاده از ریزنمونه‌های بنه در محیط کشت *MS* حاوی غلظت‌های مختلف *NAA* و *BAP* القاء نمودند. آنها شرایط تاریکی و دمای زیر ۲۰ درجه سانتی گراد را مناسب برای افزایش دوره رشد کالوس پیشنهاد کردند. جورج و همکاران (*George et al., 1992*) بخش‌های مریستمی بنه زعفران را کشت کرده و کالوس تولید کردند. آنها محیط کشت *MS* حاوی *2,4-D* (۲*mg/l*) و *Kin* (۰/۵ *mg/l*) را مؤثرترین ترکیب هورمونی در القاء کالوس زعفران گزارش کردند و واکشت در همان محیط کشت درجه بالایی از کالوس‌زایی و بهبود رشد کالوس‌ها را نشان داد. محیط کشت *MS* حاوی *IAA* (۲*mg/l*)، *Kin* (۲ *mg/l*) و *ABA*[7] (۱۰۰*mg/l*) تشکیل کالوس کروی را القاء نمود. تمایززایی جنین‌های کروی در محیط کشت مایع نیم‌غلظت *MS* دارای یک میلی‌گرم بر لیتر *ABA* انجام شد و تشکیل مستقیم شاخسارها در محیط کشت *MS* حاوی *NAA* (۲ *mg/l*) و *Kin* (۴*mg/l*) بدست آمد (*George et al., 1992*). میلیاوا و همکاران (*Milyaeva et al., 1995*) توانستند کالوس‌ها را در محیط کشت حاوی *2,4-D* و *BAP* القاء کنند، سپس کالوس‌ها را به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* و *BAP* منتقل کردند تا جوانه‌ها بر روی کالوس‌ها تشکیل شوند. آنها نشان دادند که افزایش در مقدار *2,4-D* منجر به افزایش کالوس‌ها و افزایش مقدار سیتوکنین *BAP* منجر به ظهور جوانه‌ها شدند.

جنین‌زایی سوماتیکی فرآیندی است که در یک سلول یا گروهی از سلول‌ها اتفاق می‌افتد که پس از فرآیند نموی منجر به باززایی جنین‌های غیرزیگوتی می‌شود که قابلیت

1- Indole-3-acetic acid
2- 2,4-Di-tert-butylphenol
3- Murashige and Skoog
4- 6-Benzylaminopurine
5- Naphthylacetic acid
6- Kinetin
7- Abscisic acid

جوانه‌زنی و تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند. القاء کالوس جنین‌زا از ریزنمونه‌های ریزبنه در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد *BAP* و *NAA* توسط آهوجا و همکاران (*Ahuja et al., 1994*) انجام شد. ابراهیم‌زاده و همکاران (*Ebrahimzadeh et al., 2000*) موفق به تولید کالوس‌های جنین‌زا در زعفران با استفاده از ریزنمونه‌های مریستم ساقه شدند. این کالوس‌ها مراحل کامل بلوغ جنین را طی کرده سپس بعد از بلوغ به محیط کشت نیم‌غلظت *MS* حاوی GA_3 بدون تنظیم‌کننده‌های دیگر منتقل شدند و جنین‌ها شروع به جوانه‌زنی نمودند. انتقال این جوانه‌های جنینی به محیط کشت نیم‌غلظت *MS* حاوی *NAA* و *BAP* منجر به تشکیل گیاهچه‌های کامل دارای ساقه و ریشه شد. کرمیان (*Karamian, 2004*) باززایی گیاه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی را در چهار گونه *Crocus* (*C. sativus*، *C. cancellatus*، *C. michelsonii* و *C. caspius*) با کشت مریستم ساقه در محیط کشت *LS* حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر از هرکدام از هورمون‌های *NAA* و *BAP* همچنین محیط دارای یک میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* در ترکیب با چهار میلی‌گرم در لیتر کینتین[1] برای جنین‌زایی سوماتیکی را گزارش کرد. مراحل مختلف نمو جنین سوماتیکی وقتی مشاهده شد که کالوس‌های جنینی با جنین‌های کروی به محیط کشت نیم‌غلظت *MS* حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *ABA* منتقل شدند. جنین‌های بالغ سپس در همان محیط غنی‌شده با ۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 جوانه‌زنی نمودند. در نهایت، گیاهچه‌های کامل از طریق انتقال جنین‌های جوانه زده به محیط نیم‌غلظت *MS* دارای یک میلی‌گرم در لیتر *NAA* و یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* تحت دوره نوری ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی در دمای 20^oC بدست آمدند. بلازکویز و همکاران (*Blazquez et al., 2004*) از محیط کشت *MS* غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *BAP* و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی استفاده کردند. کالوس‌های جنین‌زا در محیط کشت *MS* حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA* برای تکثیر واکشت شدند. حدود شش هفته طول کشید تا کالوس‌های جنینی کروی از کشت قطعات ریزنمونه از بنه حاصل شد (*Blazquez et al., 2009*).

کالوس‌ها در مرحله کروی دارای ساختارهای پیش جنینی یا جنین‌های پیش کروی هستند که بعد از سه هفته کشت به جنین‌های کروی، بعد از هفت هفته کشت به جنین‌های تک قطبی (دارای مریستم و کوتیلدون) و بعد از ۱۰ هفته به جنین‌های دو قطبی (دارای یک مریستم انتهایی با یک کوتیلدون در یک سر و ریزبنه در سر دیگر) نمو پیدا می‌کنند. حدود دو هفته کشت برای بلوغ جنین‌های سوماتیکی دو قطبی طول می‌کشد (*Blazquez et al., 2009*). آهوران و همکاران (*Ahouran et al., 2009*) جهت به دست آوردن کالوس‌های جنین‌زا از قطعات بنه به عنوان ریزنمونه استفاده کردند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه *MS* به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد *BAP* و *NAA* با غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند. پس از دو ماه کشت در شرایط تاریکی و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، بیشترین فراوانی کالوس‌های جنین‌زا (۹۵ درصد) در تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های *BAP* و *NAA* مشاهده شد. باقری و همکاران (*Bagheri et al., 2017*) از لایه سلولی نازک به ضخامت حدود یک میلی‌متر و قطعات به ضخامت یک سانتی‌متر از بخش قاعده‌ای و رأسی بنه به عنوان ریزنمونه استفاده کردند. آنها با کشت ریزنمونه‌ها در محیط *MS* با غلظت‌های مختلف *BAP*، *NAA* و *2,4-D* به مدت سه ماه در تاریکی در دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد، بالاترین میزان کالوس‌زایی (۷۵ درصد) با ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک بخش قاعده‌ای بنه در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *NAA* و نیم میلی‌گرم در لیتر *BAP* گزارش کردند. صفرنژاد و همکاران (*Safarnejad et al., 2016*) با کشت قطعات بنه که به عنوان ریزنمونه در محیط کشت *MS* با غلظت‌های مختلف هورمونی، بهترین محیط برای القای کالوس را محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *BAP* و یک میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* گزارش کردند، همچنین تشکیل ریزبنه را تنها در این محیط مشاهده نمودند. آنها محیط *MS* حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA* را بهترین محیط برای جنین‌زایی و جوانه‌زنی جنین گزارش نمودند.

بطورکلی، جنین‌زایی سوماتیکی به عنوان روشی کارآمد برای باززایی گیاهان می‌تواند یکی از جنبه‌های مهم

1- *Kin*

کاربرد کشت بافت در زعفران باشد. همچنین اندام‌زایی غیرمستقیم می‌تواند راه مهمی برای ازدیاد سریع کلون‌های گزینش شده در این گونه باشد. القاء و رشد کالوس، القاء ساقه و تشکیل بنه‌های زعفران مراحل اصلی اندام‌زایی غیرمستقیم هستند. کنترل و بهبود این مراحل قبل از شروع هر برنامه جهش‌زایی درون شیشه و ازدیاد از طریق اندام‌زایی غیرمستقیم حیاتی است و موفقیت هر برنامه جهش‌زایی درون شیشه بستگی به روش مناسب القاء و کشت کالوس و روش‌های کارآمد باززایی گیاه، بهینه‌سازی تیمارهای جهش‌زا و غربال کارآمد جمعیت-های جهش یافته برای تنوع‌های مطلوب مورد نظر دارد *(Xu et al., 2012)*.

بنابراین، هدف این تحقیق در قدم اول بهینه‌سازی القاء وکشت کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی و مطلوب‌سازی شرایط برای باززایی غیرمستقیم در زعفران با استفاده از غلظت و ترکیبات هورمونی مختلف در محیط کشت بود.

مواد و روش‌ها

بنه‌ها از مزارع زعفران مناطق مختلف استان خراسان جنوبی در مرداد ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردیدند. سپس بنه‌های سالم و یکنواخت به وزن ۸-۷ گرم جداسازی و بعد از حذف گرد و خاک و فلس‌ها از روی بنه، به مدت هفت ماه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. با نگهداری در دمای پایین، جوانه‌های اصلی و جانبی شروع به متورم شدن و تولید ریزبنه نمودند. ریزبنه‌های تولید شده در این شرایط خیلی سالم و بدون هیچ‌گونه آسیبی به عنوان یک منبع ریزنمونه برای کشت‌ها استفاده شدند.

برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، از روش ضدعفونی سه مرحله‌ای ایزانلو و همکاران (*Izanloo et al., 2019*) استفاده شد. بنه‌های ضدعفونی شده سپس در زیر هود استریل به قطعات مورد نظر تقسیم و در محیط کشت *MS* حاوی *g/l* ۳ ساکارز، *g/l* ۸ آگار و *mg/l* ۱۰۰ آسکوربیک اسید و تنظیم‌کننده‌های رشد *2,4-D* و *BAP* در غلظت‌های مختلف ۱، ۲ و *mg/l* ۳ از هرکدام کشت گردیدند. شاهد هم فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشد بود. *pH* محیط حدود ۵/۸ تنظیم شد. محیط کشت و تمام تجهیزات مورد استفاده از قبیل ظروف، آب مقطر، پنس و سایر وسایل در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

به منظور مقایسه توان تولید کالوس از انواع ریزنمونه شامل ۱) قطعات ۳×۳ میلی‌متر از بنه مادری (*$Corm_1$*)، ۲) قطعات بنه دارای نواحی مریستمی (*$Corm_2$*)، ۳) قطعات ریزبنه‌های تشکیل شده روی بنه‌های مادری تحت شرایط انباری خنک در شرایط تاریکی و دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد (*$Cormlet_1$*) و ۴) قطعات ریزبنه‌های حاصل از باززایی مستقیم درون شیشه (*$Cormlet_2$*) (*Izanloo et al., 2019*) استفاده شد. آزمایش بصورت فاکتوریل با چهار نوع ریزنمونه فوق‌الذکر در غلظت‌های مختلف *2,4-D* و *BAP* هرکدام در سه سطح (۱، ۲ و ۳ *mg/l*)، در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار اجرا گردید. کشت‌های انجام شده برای مدت دو ماه در شرایط تاریکی و دمای *$^{\circ}C$* ۱±۲۴ نگهداری شدند. در طی دوره هشت هفته اول از انکوباسیون درصد کالوس‌دهی، رشد کالوس و کیفیت کالوس و تغییرات آنها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. تعداد کالوس تشکیل شده روی ریزنمونه‌ها به کل تعداد ریزنمونه در هر تکرار به عنوان درصد کالوس‌دهی در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری کیفیت کالوس امتیازدهی بصری بر مقیاس یک تا پنج انجام شد که یک نشان دهنده کالوس‌های غیرجنینی و نکروزه و پنج کالوس‌های روشن و جنین‌زا بود. بعد از ۱۰ هفته کالوس‌ها به حداکثر رشد خود رسیدند، در این زمان بخشی از کالوس‌ها برای واکشت و بخشی برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک از شیشه‌ها خارج شدند و سطح آنها با استفاده از نرم‌افزار تحلیل‌گر تصویری *ImageJ* اندازه‌گیری شد (*Schneider et al., 2012*).

به منظور القاء بیشتر کالوس جنین‌زا، کالوس‌های با کیفیت بدست آمده در آزمایش فوق به محیط کشت کامل *MS* غنی‌شده با (۰/۵ *mg/l*) *2,4-D* و (۳ *mg/l*) *BAP* منتقل و کشت‌ها را در شرایط تاریک و دمای *$^{\circ}C$* ۱±۲۴ به مدت چهار هفته نگهداری شدند و بعد از آن برای القای بیشتر کالوس جنین‌زا و رشد بیش‌تر، کالوس‌ها برای دو بار متوالی با فاصله زمانی حدود یک ماه در محیط ذکر شده واکشت شدند. سپس به منظور ایجاد تمایز و جوانه‌زنی کالوس‌های جنین‌زای با کیفیت مطلوب حاصل از مرحله قبل به محیط‌هایی به شرح ذیل منتقل شدند؛ ۱- محیط کشت نیم‌غلظت *MS* بدون

هورمون *ABA* (*1/2MS-ABA*)، ۲- محیط کشت کامل *MS* بدون *ABA*(*MS-ABA*)، ۳- محیط کشت نیم‌غلظت *MS* محتوی شش درصد ساکارز (*1/2MS+6% Suc*)، ۴- محیط کشت کامل *MS* محتوی شش درصد ساکارز (*MS+6% Suc*)، ۵- محیط کشت نیم‌غلظت *MS* محتوی ۱ *mg/l ABA* (*1/2MS+ABA*)، ۶- محیط کشت کامل *MS* محتوی ۱ *mg/l ABA* (*MS+ABA*). برای بلوغ جنین از هورمون GA_3 به میزان ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، طبق پیشنهاد ابراهیم‌زاده و همکاران (*Ebrahimzadeh et al., 2000*)، استفاده شد. در انتهای آزمایش جنین‌زایی، تعداد جنین‌های تشکیل شده در یک سانتی‌متر مربع از کالوس، کیفیت کالوس جنین‌زا براساس رتبه کیفی، درجه نمو جنین، تعداد شاخساره و ریشه انقباضی شمارش و رتبه‌بندی شدند.

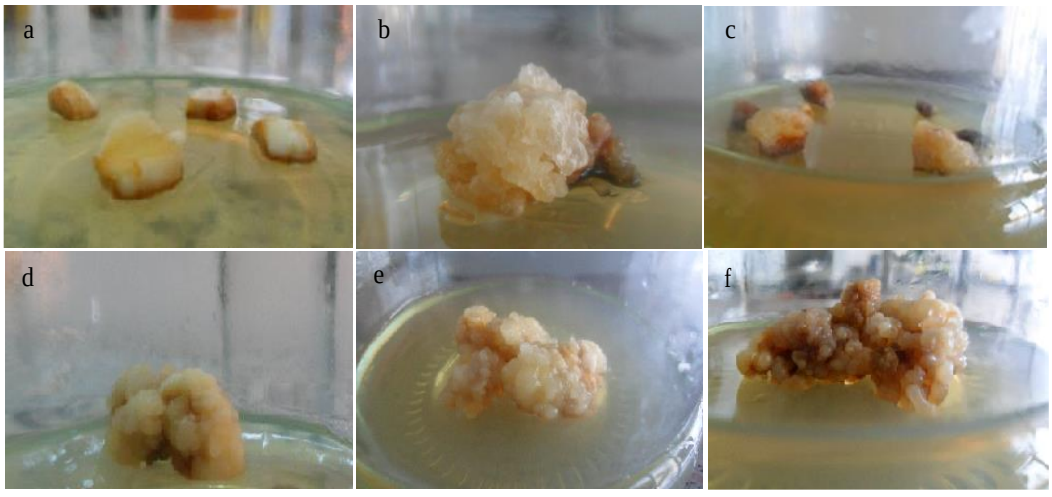
قبل از انجام تجزیه واریانس، آزمون نرمالیته داده‌ها بررسی و تبدیل لگاریتمی برای صفت وزن خشک و تر کالوس، تعداد جنین و میزان تمایز جنین انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار *GenStat 12th* انجام شد. در تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش جنین‌زایی، سه مقایسه متعامد شامل؛ ۱) مقایسه تیمارهای با محیط کشت کامل *MS* در مقابل تیمارهای با محیط کشت نیم‌غلظت *MS*، ۲) مقایسه تیمارهای دارای هورمون *ABA* در مقابل تیمارهای فاقد *ABA* و ۳) مقایسه تیمارهای دارای ۳ درصد ساکارز در مقابل تیمارهای دارای ۶ درصد ساکارز مورد آزمون قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمایشات القاء و رشد کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی در این بخش تشریح شده‌اند.

القاء کالوس

شروع تشکیل کالوس با ظاهر شدن برآمدگی به رنگ کرم تا سفید رنگ روی ریزنمونه‌ها بود که حدود دو هفته بعد از کشت و قرارگیری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مشاهده شد. ولی در شاهد که فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشدی بود هیچ کالوسی تشکیل نشد. اولین نشانه‌های تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های جدا شده از دیواره بنه‌ها و ریزنمونه‌های دارای مناطق مریستمی بودند. اولین تیماری که در آن تشکیل کالوس دیده شد، تیمار هورمونی *2,4-D* و *BAP* هرکدام *mg/l* ۲ بود که ۱۰ روز پس از کشت این تغییرات مشاهده شد. یک ماه پس از کشت (دو هفته بعد از ظهور علائم تشکیل کالوس)، رشد کالوس‌ها سرعت گرفت و لایه سفید رنگی در این مرحله دیده شد، پوسته سفید رنگ روی برآمدگی کنار زده شده و از زیر آن کالوس پدیدار گشت، در مراحل بعد این پوسته به مرور خشک گردید. بعد از ۴۰ روز از تاریخ کشت اولیه، کالوس‌ها واکشت شدند (شکل ۱- *a*- *c*).



شکل ۱. مراحل القاء و تشکیل کالوس روی ریزنمونه‌ها در محیط کشت کامل MS حاوی ترکیب هورمونی 2,4-D و BAP؛ a) شروع تشکیل کالوس با پدیدار شدن برآمدگی سفید رنگ، b) خشک شدن برآمدگی سفید رنگ در سطح ریزنمونه، c) مراحل تشکیل کالوس در تیمار هورمونی 2,4-D (۲ mg/l) وBAP (۲mg/l) ۴۰ روز پس از کشت، d)

نمونه‌هایی از کالوس‌های جنین‌زا در انتهای واکشت اول، e) کالوس در ابتدای واکشت دوم و f) کالوس در انتهای واکشت دوم

Fig. 1. Stages of callus induction and formation on explants in a complete MS medium containing 2,4-D and BAP hormones; (a) the formation of calluses with the appearance of a white bulge; (b) the drying of the white bulge on the explant; (c) the steps of callus formation in 2,4-D (2 mg/l) and BAP (2 mg/l) 40 days after culture, d) Examples of embryonic callus at the end of the first subculture, e) callus at the beginning of second subculture, and f) callus at the end of the second subculture

بررسی کیفی کالوس‌ها نشان داد که برخی از آنها رتبه کیفی پایینی داشتند و برخی نیز دارای رتبه کیفی بالایی بودند، در طی زمان برخی از کالوس‌هایی که در ابتدای تشکیل در رتبه پایین (یک) قرار داشتند به مرور زمان رتبه‌های بالاتری به خود اختصاص دادند. با توجه به عدم رشد و نکروزه شدن کالوس‌های با رتبه کیفی پایین (۱ و ۲ و ۳) در واکشت اول، در واکشت‌های بعدی تنها کالوس‌های با رتبه کیفی ۴ و ۵ استفاده شد. مشاهدات نشان داد که دو بار واکشت کالوس‌ها در محیطی با ترکیب هورمونی که از ابتدا در آنها کشت شده بودند، برای رشد بیشتر آنها و بهبود شرایطشان برای بررسی کیفیت مفید بود. مشاهدات نشان داد که کالوس‌ها در محیط جدید به مرور به کالوس‌های کروی منسجم (کالوس‌های جنین‌زا) نمو پیدا کرده، واکشت‌های مکرر باعث رشد بیش‌تر کالوس‌ها شد و شرایط برای تقسیم و تکثیر کالوس‌ها مهیا شد. بهترین زمان برای انجام واکشت حدود یک ماه بعد از انجام واکشت قبلی تعیین گردید. در پایان واکشت دوم مشاهده شده که کالوس‌های موجود در ترکیب هورمونی *2,4-D* و *BAP* (۲ *mg/l* از هرکدام) بهترین کیفیت را داشتند، کالوس‌ها در این محیط دارای ظاهر کرم تا سفید رنگ، کروی و منسجم بودند (شکل ۱- *f-d*)، بنابراین ترکیب هورمونی ذکر شده به عنوان ترکیب برگزیده برای واکشت‌های بعدی انتخاب شد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی منبع ریزنمونه برای صفات درصد تشکیل کالوس، کیفیت کالوس، قطر کالوس، وزن تر و خشک کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف هورمون *2,4-D* نیز برای صفات درصد تشکیل کالوس و وزن خشک کالوس اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. همچنین نتایج تجزیه واریانس برای قطر کالوس نشان داد که بین سطوح مختلف هورمون *BAP* در سطح احتمال پنج درصد اختلاف وجود داشت. اثر متقابل *BAP* × *2,4-D* نیز در سطح احتمال پنج درصد برای صفت درصد تشکیل کالوس معنی‌دار شد. همچنین نتایج تجزیه واریانس برای کیفیت کالوس‌های تشکیل شده در ریزنمونه‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف هورمون *BAP* در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱).

میانگین درصد کالوس‌های تشکیل‌شده در ریزنمونه‌های جدا شده از ریزبنه‌های به دست آمده از بنه‌های مادری تحت شرایط انباری خنک (*Cormlet₁*؛ ۹۴/۳۷ درصد) بیشترین مقدار و نسبت به ریزنمونه‌های جدا شده از ریزبنه‌های حاصل از کشت درون شیشه (*Cormlet₂*؛ ۷۷/۶۵ درصد) برتری معنی‌داری داشت، در حالی‌که درصد کالوس‌های تشکیل شده در روی ریزنمونه‌های حاصل از بنه مادری کمترین مقدار (*Corm₂*؛ ۴۶/۹ درصد) بود (شکل ۲-*a*). نتایج مقایسه میانگین کیفیت کالوس‌های تشکیل شده بر روی ریزنمونه‌های مختلف نشان داد که ریزنمونه‌های متعلق به *Cormlet₁* نسبت به سایر ریزنمونه‌ها برتری داشت (رتبه کیفی ۳/۸۳)، در حالی‌که میانگین کیفیت کالوس‌های تشکیل شده در *Corm₁* و *Corm₂* به ترتیب ۱/۸۵ و ۱/۹۹ کمترین رتبه کیفی را داشتند (شکل ۲-*b*).

مقایسه میانگین درصد کالوس‌های تشکیل شده برای اثر متقابل *BAP* × *2,4-D* نشان داد که بیشترین مقدار (۷۴/۴۹ درصد) در ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* و *BAP* به دست آمد، در حالی‌که کمترین مقدار (۵۰/۵۹ درصد) در ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* و ۳ میلی‌گرم در لیتر *BAP* حاصل شد (شکل ۳). براساس نتایج تجزیه واریانس، اختلاف آماری معنی‌داری بین منبع ریزنمونه برای وزن خشک و تر کالوس‌های تشکیل‌شده وجود داشت، به طوری‌که ریزنمونه‌های مربوط به *Cormlet₁* نسبت به ریزنمونه‌های دیگر برتری معنی‌داری در میانگین وزن خشک و تر کالوس نشان دادند. مقایسه میانگین قطر کالوس‌ها نیز نشان داد که ریزنمونه‌های متعلق به قطعات جدا شده از ریزبنه‌های به دست آمده از بنه‌های مادری تحت شرایط انباری خنک نسبت به ریزنمونه‌های دیگر برتری داشت.

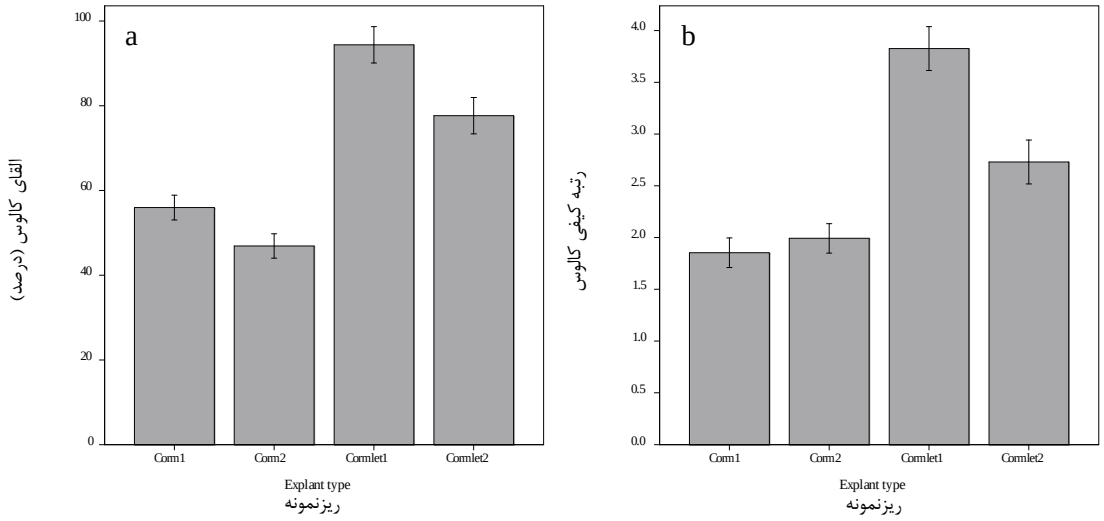
جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مختلف کالوس‌های تشکیل شده در ریزنمونه‌های مختلف با ترکیبات متفاوت 2,4-D و BAP

Table 1. Analysis of variance of different traits of formed callus in different explants with different combinations of 2,4-D and BAP

منابع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		درصد تشکیل کالوس Percent of callus formation	کیفیت کالوس Callus quality	قطر کالوس Callus diameter	وزن خشک کالوس Callus dry weight	وزن تر کالوس Callus fresh weight
ریزنمونه *Explant*	3	10489.5**	17.84**	612317.0**	0.765**	0.382**
2,4-D	2	2063.8**	0.26 ns	60276.0 ns	0.127**	0.068 ns
BAP	2	87.5ns	1.18 ns	128959.0*	0.004 ns	0.043 ns
2,4-D×BAP	4	755.6*	0.61 ns	73902.0 ns	0.016 ns	0.038 ns
ریزنمونه × *2,4-D* *Explant × 2,4-D*	6	321.3ns	0.30 ns	8314.0 ns	0.002 ns	0.0056 ns
ریزنمونه × *BAP* *Explant × BAP*	6	458.7ns	1.23 ns	990.0 ns	0.004 ns	0.0078 ns
ریزنمونه × *2,4-D* × *BAP* *Explant × 2,4-D × BAP*	12	353.9ns	0.59 ns	193810.0*	0.052 ns	0.111*
خطا *Error*	73	292.1	0.78	51959	0.019	0.04
ضریب تغییرات *CV (%)*		27.55	32.82	22.2	10.84	8.7

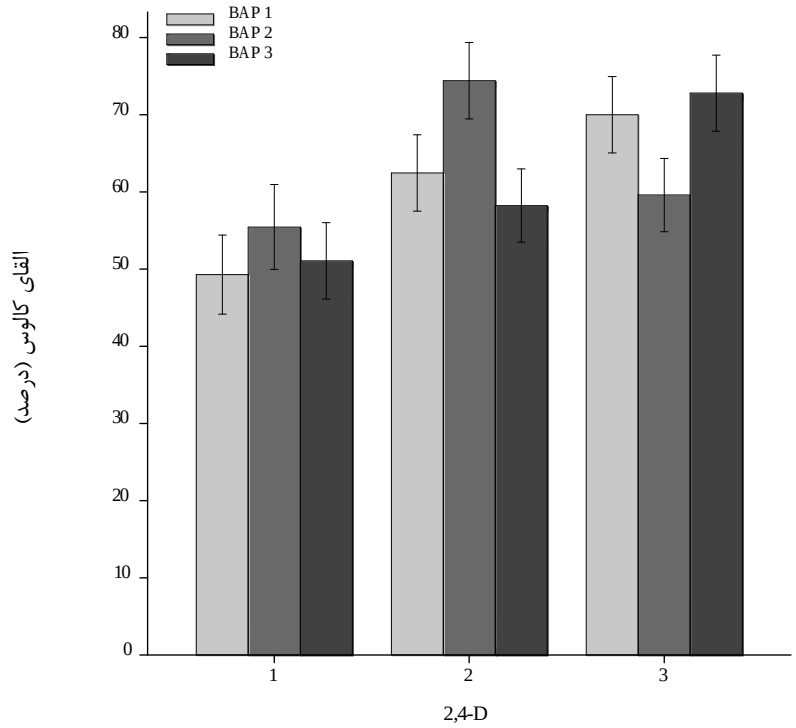
ns، *، ** به ترتیب غیر معنی‌داری و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد را نشان می‌دهد.

*ns, *, ** Representing non-significant and the significant differences at 5% and 1% levels, respectively.*



شکل ۲. مقایسه میانگین درصد تشکیل کالوس (a) و کیفیت کالوس (b) در ریزنمونه‌های مختلف بنه و ریزبنه زعفران (میله خطا: ± خطای استاندارد)

Fig. 2. Mean comparisons of callus formation (a) and callus quality (b) in different explants from mother corm and cormlet of saffron (Error bar: ±SE)



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل 2,4-D × BAP بر درصد کالوس‌های تشکیل شده زعفران

Fig. 3. Mean comparisons for interaction of 2,4-D × BAP on percentage of callus formation of saffron

در این آزمایش در مرحله القاء و رشد کالوس زعفران، از دو تنظیم‌کننده رشد *BAP* و *2,4-D* و ریزنمونه از بنه‌های مختلف استفاده شد. تفاوت‌های آماری معنی‌داری بین ترکیبات هورمونی همچنین نوع منبع ریزنمونه برای تشکیل و رشد کالوس وجود داشت. بهترین منبع ریزنمونه برای القاء و تشکیل کالوس ریزبنه‌های تشکیل شده بر روی بنه‌های مادری در شرایط انباری خنک بودند (*Cormlet$_1$*) و استفاده از محیط کشت *MS* غنی‌شده با ترکیب یکسان ۲ میلی‌گرم در لیتر از هرکدام از تنظیم‌کننده‌های رشد *2,4-D* و *BAP* بهترین نتایج القاء کالوس و رشد را نشان داد (شکل ۳). برخی مطالعات (*Ilahi et al., 1987; Plessner et al., 1990; Chen et al., 2003; Zeybek et al., 2012*) نیز اثر مثبت ترکیبات مختلف *BAP* و *2,4-D* بر القا کالوس زعفران گزارش کردند. آهوجا و همکاران (*Ahuja et al., 1994*) که با کشت قطعات ریزبنه در محیط کشت *LS* غنی‌شده با *BAP* ۲×۱۰$^{-۲}$ *mg/l* و *NAA* ۲×۱۰$^{-۲}$ *mg/l* بیش‌ترین درصد تشکیل کالوس (۹۴ درصد) و همچنین با کیفیت‌ترین کالوس‌ها را به دست آوردند (*Ebrahimzadeh et al., 2000*) نیز در ترکیب هورمونی مشابه با آهوجا بیشترین درصد تشکیل کالوس (۷۸/۵ درصد) و با کیفیت‌ترین کالوس‌ها را به دست آوردند. زیبک و همکاران (*Zeybek et al., 2012*) بهترین ترکیب هورمونی برای تشکیل و رشد کالوس ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* و ۱ میلی‌گرم در لیتر *BAP* گزارش کردند. در حضور توام *BAP* و*naa* هریک به مقدار دو میلی‌گرم در لیتر بالاترین میزان کالوس‌زایی (۹۰ درصد) روی داد (*Azadi et al., 2017*). واحدی و همکاران (*Vahedi et al., 2014*) بالاترین میزان القاء کالوس و پارامترهای رشد نظیر قطر و سطح کالوس‌ها را در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر *D*-۲،۴ به همراه یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* را گزارش کردند.

نقش *2,4-D* و تنظیم‌کننده‌های دیگر رشد در القاء جنین‌زایی سوماتیکی واضح است. وجود *2,4-D* برای القاء کالوس جنین‌زا لازم است در حالی‌که نبود آن منجر به نمو کالوس‌های غیرجنینی می‌شود (*Karamian, 2004*). بطورکلی، تمام کالوس بطور یکنواخت تبدیل به جنین نمی‌شود و تنها برخی از نواحی جنین‌ها را تشکیل می‌دهند. این نواحی به عنوان نواحی جنینی نامیده می‌شوند و بطور گزینشی در طی واکشت‌های بعدی تکثیر می‌شوند تا جنین‌های کافی بدست بیایند (*Blazquez et al., 2009*).

جنین‌زایی و باززایی

کالوس‌های کروی و دارای رتبه کیفی بالای حاصل از آزمایش القاء، در محیط کشت کامل *MS* غنی‌شده با *2,4-D* (۰/۵ *mg/l*) و *BAP* (۳ *mg/l*) واکشت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این محیط کالوس‌های جنین‌زای با کیفیت و یکنواخت‌تر تشکیل شدند. در این محیط سه واکشت متوالی در کالوس‌ها انجام شد (شکل ۴).

شکل ۴. کالوس‌های جنین‌زا بر کالوس‌های تشکیل شده روی قطعات بنه در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سه میلی‌گرم در لیتر BAP در واکشت‌های متوالی؛ a، b و c به ترتیب در واکشت‌های اول، دوم و سوم.

Fig. 4. Embryogenic calluses on the formed callus on the segments of corm in MS medium containing 0.5 mg / L 2,4-D and 3 mg / L BAP in successive subculture; a) First, b) Second and c) Third subculture, respectively.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش جنین‌زایی نشان داد که بین تیمارهای مختلف فقط برای صفت کیفیت جنین اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد (جدول ۲). هر چند آماره *F* برای صفات تعداد جنین، درجه نمو جنین و تعداد شاخساره معنی‌دار نشد، ولی مقدار ارزش احتمال *F* (*P-value*) برای آنها به ترتیب برابر ۰/۰۵۷، ۰/۰۶۲ و ۰/۰۸۶ بود. لذا مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که بیشترین تعداد جنین کروی (۱۸/۳۲) در تیمار نیم‌غلظت *MS* بدون هورمون *ABA* وجود داشت، در حالی‌که کمترین تعداد (۹/۹۱ جنین کروی) در تیمار *MS* کامل دارای هورمون *ABA* مشاهده شد. اما برای صفت کیفیت کالوس جنینی، بهترین کیفیت مربوط به تیمارهای محیط کشت *MS* کامل حاوی *ABA* و شش درصد ساکارز به ترتیب با میانگین ۳ و ۲/۸۳ بود. کمترین کیفیت مربوط به تیمارهای نیم‌غلظت *MS* بدون *ABA* و نیم‌غلظت *MS* دارای شش درصد ساکارز با رتبه ۱/۱۷ بود. بهترین تیمارهای برای صفت نمو جنین، تیمارهای *MS* کامل و نیم‌غلظت حاوی هورمون *ABA* به ترتیب با رتبه ۴/۸۳ و ۴/۲۸ بودند، در حالی‌که جنین‌های موجود در تیمار نیم‌غلظت *MS* بدون *ABA* کمترین رتبه نموی را نشان دادند. بیشترین تعداد شاخساره نیز در تیمارهای *MS* کامل و نیم‌غلظت حاوی هورمون *ABA* مشاهده شد (جدول ۳).

آزمون مقایسات متعامد نشان داد که برای صفت تعداد جنین بین محیط کشت کامل *MS* و *MS* نیم‌غلظت اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد، به طوری‌که متوسط تعداد جنین به ترتیب ۱۰/۶۹ و ۱۶/۰۸ بود (جدول ۳). برای صفت کیفیت کالوس جنینی بین محیط کشت کامل *MS* و *MS* نیم‌غلظت، همچنین بین وجود *ABA* یا عدم وجود آن در محیط کشت اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱ در صد مشاهده شد. کیفیت کالوس جنینی در محیط‌های *MS* کامل بهتر از محیط *MS* نیم‌غلظت بود، همچنین کالوس‌ها در محیط‌های حاوی *ABA* در مقایسه با محیط‌های فاقد آن از رتبه کیفی بهتری برخوردار بودند (جدول ۳). نتایج تجزیه همبستگی بین این دو صفت نشان داد که همبستگی منفی معنی‌داری (**r=-۰/۶۹) بین تعداد جنین و کیفت کالوس جنینی وجود داشت. نتایج مقایسه متعامد برای صفات درجه نمو جنین و تعداد شاخساره اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین محیط‌های حاوی *ABA* و بدون *ABA* نشان داد. در محیط‌های کشت حاوی *ABA* نسبت به محیط‌های فاقد آن، درجه نمو کالوس بهتر و تعداد شاخساره بیشتری مشاهده شد (جدول‌های ۲ و ۳). بین

درجه نموی جنین و تعداد شاخساره همبستگی مثبت معنی‌داری (**۰/۵۳=r) وجود داشت. وجود شش درصد ساکاروز در محیط کشت در مقابل سه درصد تأثیری بر هیچ یک از صفات مورد بررسی نداشت.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات تعداد، کیفیت و درجه تمایز جنین‌های سوماتیکی و تعداد شاخساره در آزمایش جنین‌زایی

Table 2. Analysis of variance for number, quality and degree of differentiation of somatic embryos and number of shoots in the embryogenesis experiment

منابع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares			
		تعداد جنین Number of embryo	کیفیت کالوس جنینی Quality of embryonic callus	نمو جنین Embryo development	تعداد شاخساره Number of shoots
تیمار *Treatment*	*5*	*0.0728^{ns}*	*3.711***	*0.2839^{ns}*	*0.1526^{ns}*
۱) *MS* کامل در مقایسه با *MS* نیم غلظت *1) MS vs 1/2MS*	*1*	*0.2715***	*13.444***	*0.1022^{ns}*	*0.0259^{ns}*
۲) وجود *ABA* در مقایسه با نبود *ABA* *2) ABA vs non ABA*	*1*	*0.0509^{ns}*	*4.167***	*1.1153***	*0.4677***
۳) ٪۶ ساکاروز در مقایسه با ۳٪ ساکاروز *3) 6% Suc vs 3% Suc*	*1*	*0.0185^{ns}*	*0.056^{ns}*	*0.0062^{ns}*	*0.18^{ns}*
خطا *Error*	*30*	*0.0299*	*0.311*	*0.1194*	*0.0708*
ضریب تغییرات *CV (%)*		*15.5*	*27.1*	*18.1*	*52.9*

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.

*ns, *,** representing non-significance and the significance at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.*

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات و مقایسات متعامد

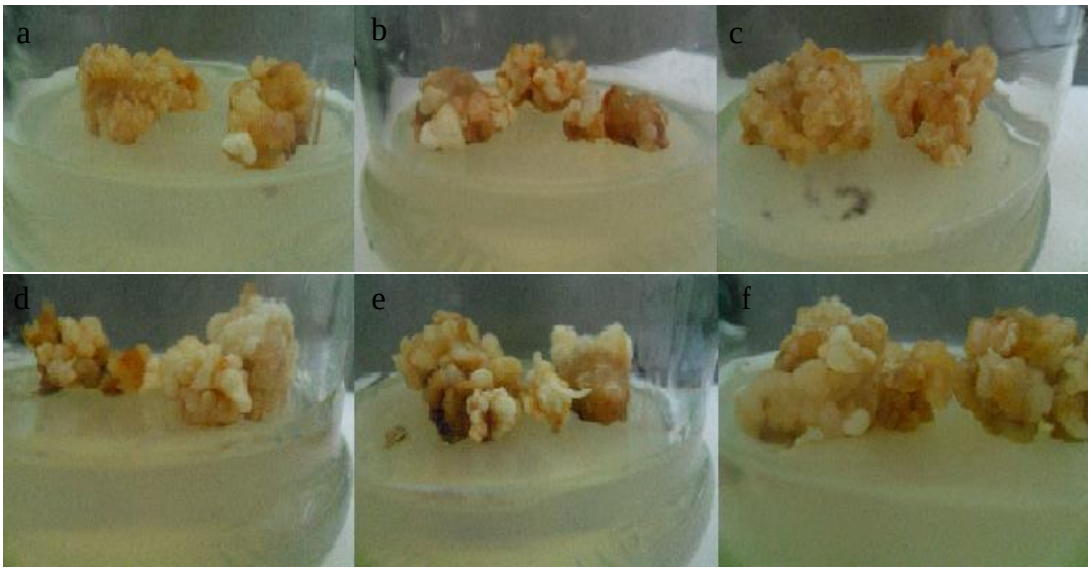
Table 3. Mean comparisons for studie traits and orthogonal comparisons

شماره تیمار Treatment number	کد تیمار Treatment code	تعداد جنین Number of embryos	کیفیت کالوس جنینی Quality of embryonic callus	نمو جنین Embryo development	تعداد شاخساره Number of shoot
1	*1/2MS-ABA*	*18.32^{a*}*	*1.17 ^{c}*	*2.45 ^{b}*	*0.24 ^{b}*
2	*MS-ABA*	*10.62^{bc}*	*2.17 ^{b}*	*3.38 ^{ab}*	*0.99 ^{ab}*
3	*1/2MS+Suc*	*17.06^{ab}*	*1.17 ^{c}*	*3.73 ^{ab}*	*0.8 ^{ab}*
4	*MS+Suc*	*11.53^{abc}*	*2.83 ^{a}*	*3.41 ^{ab}*	*0.29 ^{b}*
5	*1/2MS+ABA*	*12.85^{abc}*	*2.00 ^{b}*	*4.28 ^{a}*	*2.28 ^{ab}*
6	*MS+ABA*	*9.91^{c}*	*3.00 ^{a}*	*4.83 ^{a}*	*3.68 ^{a}*
	MS	*10.69*	*2.67*	*3.48*	*1.11*
	1/2MS	*16.08*	*1.44*	*3.87*	*1.65*
	ABA	*11.38*	*2.5*	*4.55*	*2.98*
	بدون *ABA* *No ABA*	*14.47*	*1.67*	*2.91*	*0.62*

*مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. تیمارها شامل؛ ۱- محیط کشت نیم‌غلظت *MS* بدون هورمون *ABA (1/2MS-ABA)*، *2-* محیط کشت کامل *MS* بدون *ABA (MS-ABA)*، *3-* محیط کشت نیم‌غلظت *MS* محتوی شش درصد ساکارز (۲/۱*(Suc 6%+MS*، *4-* محیط کشت کامل *MS* محتوی شش درصد ساکارز *(MS+6% Suc)*، *5-* محیط کشت نیم‌غلظت *MS* محتوی ۱ میلی گرم در لیتر*ABA (1/2MS+ABA)*، *6-* محیط کشت کامل *MS* محتوی ۱ میلی گرم در لیتر *ABA (MS+ABA)*.

**The mean comparison was performed using Duncan's test at 5% probability level. Treatments including; 1) ½ MS medium − ABA, 2) full MS medium − ABA, 3) ½ MS medium containing 6% sucrose (½ MS + 6% Suc.), 4) full MS medium containing 6% sucrose (MS + 6% Suc.), 5) ½MS medium containing 1 mg/l of ABA (½ MS + ABA), and 6) full MS medium containing 1 mg/l of ABA (MS + ABA).*

بطور کلی، نتایج آزمایش نمو جنین نشان داد که کالوس‌های جنین‌زای کشت شده در محیط‌های نیم‌غلظت *MS* هر چند دارای تعداد جنین بیشتری بودند (۱۸/۳۲ جنین کروی در هر سانتی‌متر مربع)، ولی کالوس‌ها از رشد و کیفیت خوبی برخوردار نبودند و اغلب کالوس‌ها کوچک بودند، در عین‌حال، کالوس‌های کشت شده در این محیط از نظر تمایز، درجه نموی پایینی داشتند و کالوس‌ها اغلب در همان مرحله کروی باقی ماندند. اما در محیط‌های کامل *MS* هرچند تعداد جنین کروی کمتری دیده می‌شد (بطور متوسط ۱۰/۶۹ جنین کروی در هر سانتی‌متر مربع)، ولی کالوس‌ها دارای رتبه کیفی بالاتری بوده و رشد خوبی نیز نشان دادند، همچنین این کالوس‌ها از نظر تمایز هم پیشرفت خوبی داشتند. بیشترین میزان تمایز در محیط کشت کامل *MS* محتوی *ABA* ۱ *mg/l* وجود داشت که در تمام تکرارهای آن شاخه‌زایی مشاهده شد. علاوه بر آن، در محیط کشت کامل *MS* محتوی شش درصد ساکارز تمایز کامل و شاخه‌زایی دیده شد، اما در محیط کشت کامل *MS* بدون هورمون *ABA* تمایزی رخ نداد (شکل ۵). بنابراین، بهترین محیط برای نمو جنین محیط کشت کامل *MS* محتوی *ABA* ۱ *mg/l* بود.



شکل ۵. تفاوت رشد و تمایز کالوس‌های جنین‌زا در محیط‌های کشت نیم‌غلظت MS و محیط‌های کشت کامل MS. a) کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت نیم‌غلظت MS محتوی ABA ۱ mg/l، b) کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت نیم‌غلظت MS محتوی شش درصد ساکارز، c) کالوس‌هاس رشد یافته در محیط کشت نیم‌غلظت MS بدون تنظیم‌کننده رشد، d) کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت کامل MS محتوی ABA ۱ mg/l، e) کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت کامل MS محتوی شش درصد ساکارز، f) کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت کامل MS بدون هورمون.

Fig. 5. Differences in growth and differentiation of embryonic callus in the half strength and complete MS medium; a) callus grown in 1/2 MS containing one mg /L ABA, b) callus grown in 1/2 MS medium containing 6% sucrose, c) callus grown in a 1/2 MS without growth regulators, d) callus grown in full MS medium containing one mg /L ABA, e) callus grown in MS medium containing 6% sucrose, and f) callus grown in complete MS without hormone.

در این آزمایش پس از القاء، کالوس‌های باکیفیت پس چندین واکشت به محیط کشت *MS* حاوی ۰/۵ میلی‌گرم از *2,4-D* و سه میلی‌گرم *BAP* منتقل شدند که در این محیط تعداد سلول‌های جنینی کروی با کیفیت مطلوبی تولید شدند. بلازکوئز و همکاران (*Blazquez et al., 2009*) ترکیب هورمونی (۰/۵ *mg/l*) *NAA* و (۲ *mg/l*) *BAP* را به عنوان ترکیب برگزید برای القاء کالوس جنین‌زا بر روی کالوس‌های تشکیل شده معرفی کردند. در حالی‌که ابراهیم‌زاده و همکاران (*Ebrahimzadeh et al., 2000*) ترکیب هورمونی (۲×۱۰$^{-۲}$ *mg/l*) *BAP* و (۲×۱۰$^{-۲}$ *mg/l*) *NAA* به عنوان ترکیب برگزیده برای القاء کالوس جنین‌زا پیشنهاد نمودند. لاگرام و همکاران

(*Lagram et al., 2017*) ترکیب هورمونی *BAP* و *2,4-D* هرکدام به مقدار یک میلی‌گرم در لیتر را بهترین ترکیب برای القاء و رشد کالوس در ریزنمونه‌ها از بنه زعفران پیشنهاد نمودند. آنها کمترین میزان تشکیل کالوس در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *2,4-D* گزارش کردند. علاوه برآن، افزایش مقدار *BAP* به میزان ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر میزان القاء ساقه را بهبود بخشید. در ضمن، ترکیب *BAP* (۸ میلی‌گرم در لیتر) و *NAA* (دو میلی‌گرم در لیتر) بطور معنی‌داری میزان تشکیل ساقه‌های پیشرفته را بهبود بخشید. اندازه کالوس‌های بدست آمده بین ۰/۵ و ۲/۷ سانتی‌متر بود *(Lagram et al., 2017)*.

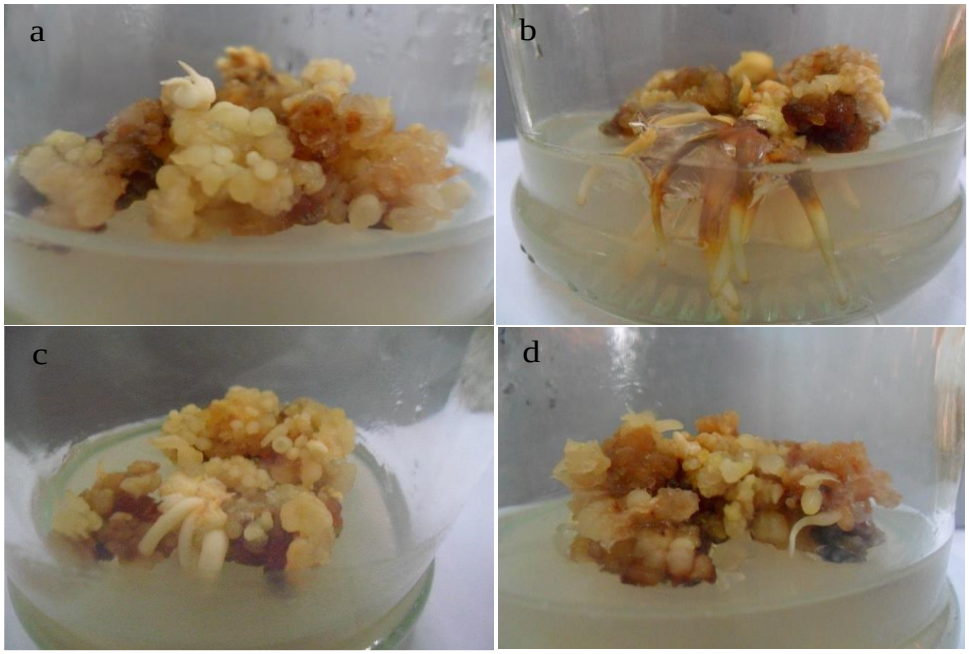
در این آزمایش، به منظور نمو جنین از کالوس‌های جنینی پس از انتقال به محیط کشت *MS* حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *ABA*، درصد جنین‌های نمو یافته بیشتری تولید شدند. در حالی‌که کالوس‌های منتقل شده به محیط کشت حاوی شش درصد ساکارز تولید ریشه-های انقباضی نمودند. عوامل مؤثر بر بلوغ جنین‌ها در زعفران افزایش مقدار ساکارز (شش درصد) در محیط کشت *MS* بدون هورمون (*Sheibani et al., 2007*) یا اضافه کردن یک میلی‌گرم در لیتر *ABA* به محیط کشت باعث بلوغ جنین‌ها شده و جنین‌های بالغ سپس در حضور ۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 وادار به جوانه‌زنی شدند (*Karamian, 2004*). در طی جوانه‌زنی بخش‌های تحتانی جنین‌ها معمولاً متورم شده و منجر به تشکیل ریزبنه‌ها بعد از سه ماه شدند (*Sheibani et al., 2007*). لاگرام و همکاران (*Lagram et al., 2017*) به منظور مطالعه اثر غلظت ساکارز بر تشکیل و رشد ریزبنه زعفران، ساقه‌های زعفران در محیط کشت نیم‌غلظت *MS* غنی‌شده با یک میلی‌گرم در لیتر *BAP* و *2,4-D* با دو غلظت مختلف ساکارز (سه و پنج درصد) کشت شدند. بعد از دو ماه کشت، تقریباً ۵۰ درصد از حالات بنه تشکیل شد. با توجه به تشکیل بنه و ریشه و تعداد آنها، تفاوت آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ساکارز مشاهده نشد، ولی در غلظت پنج درصد بنه‌های قطورتر و با وزن تر بالاتری در مقایسه با غلظت سه درصد تشکیل شدند *(Lagram et al., 2017)*. در این آزمایش با انتقال کالوس‌های جنینی با جنین‌های توسعه یافته پس از واکشت و قرارگیری در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دوره نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی باعث تشکیل شاخساره‌ها گردید.

نتایج این آزمایش نشان داد که کالوس‌هایی که در محیط کشت کامل *MS* محتوی (*ABA*(۱ *mg/l* قرار داشتند، بهترین واکنش را به باززایی نشان دادند، به طوری‌که بیشترین تمایز در این کالوس‌ها دیده شد، بر روی آنها هم ریشه‌های انقباضی هم شاخه و هم ریزبنه تشکیل شد. بطورکلی، در کالوس‌هایی که تحت تیمار هورمونی (*mg/l* ۱) *ABA* قرار نگرفتند، ریشه‌زایی بیش‌تر از شاخه‌زایی رخ داد و برعکس بر روی کالوس‌هایی که قبل‌تر تحت تیمار هورمونی (*mg/l* ۱) *ABA* قرار گرفتند، شاخه‌زایی بیش‌تر از ریشه‌زایی رخ داد (شکل ۶). پس از واکشت و انتقال نمونه‌های دارای جنین‌های نمویافته به شرایط فوق جوانه و شاخسارها رشد یافتند (شکل ۷).

نتیجه‌گیری

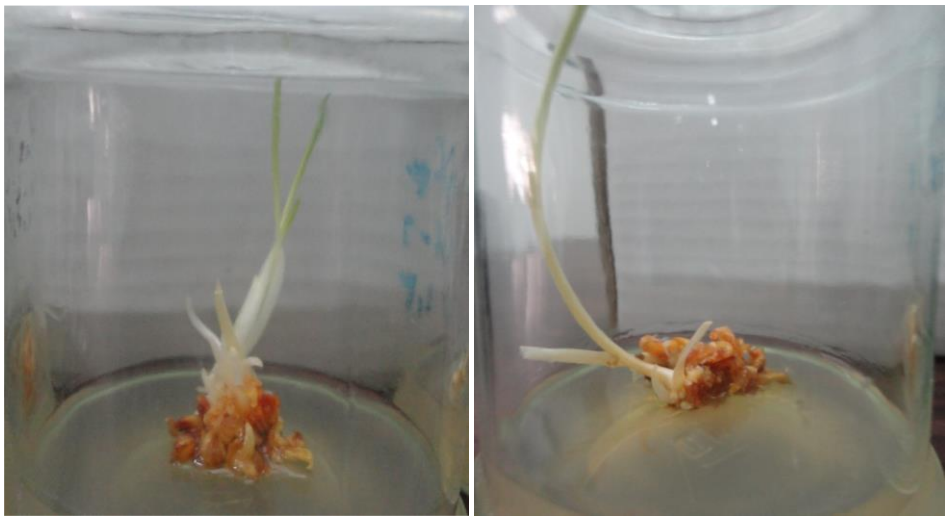
با توجه به مشاهدات در طی آزمایش و نتایج تجزیه واریانس می‌توان استفاده از ریزنمونه‌های جدا شده از ریزبنه‌های به دست آمده از بنه‌های مادری تحت انباری خنک (*Cormlet*$_1$) و کشت آنها در محیط کشت کامل *MS* غنی‌شده با (*mg/l* ۲) *2,4-D* و (*mg/l* ۲) *BAP* را برای به دست آوردن بیشترین و بهترین کالوس‌ها توصیه کرد. بنا به نتایج مشاهده شده در طی واکشت‌ها می‌توان محیط کشت کامل *MS* غنی‌شده با *2,4-D* و *BAP* (به میزان *mg/l* ۲ از هر یک) را بهترین محیط، فاصله زمانی حدود یک ماه را بهترین مدت برای واکشت و قرارگیری نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای $^{\circ}C$ ۲۵-۲۰ را بهترین شرایط برای انجام واکشت به منظور حفظ و تکثیر کالوس دانست. بهترین تیمار برای جنین‌زایی و نمو جنین، محیط کشت کامل *MS* دارای *ABA* بود که باعث تولید جنین‌های با کیفیت و دارای درجه تمایز بالاتر و تولید شاخساره‌ها شد. در این آزمایش جنین‌های سوماتیکی بدست آمده سپس می‌توانند در برنامه‌های اصلاح موتاسیون مورد استفاده قرار گیرند. تولید جنین‌های سوماتیکی از طریق کشت بافت و سیستم ریزازدیادی انبوه، امکان ایجاد تنوع جهت اصلاح زعفران با استفاده از موتاژن‌های فیزیکی و شیمیایی را بطور کارآمدی فراهم می‌نماید. پس از بدست آوردن پروتکل موثر القاء کالوس و باززایی غیرمستقیم، القاء جهش توسط مواد جهش‌زای

شمیایی و فیزیکی روی کالوس‌ها و ریزنمونه‌های مختلف
به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی انجام شود.



شکل ۶. تشکیل ریشه‌های انقباضی در کالوس‌های رشد یافته در محیط‌های فاقد هورمون ABA و شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در کالوس‌های رشد یافته در محیط‌های محتوی هورمون ABA. a) کالوس در محیط کشت نیم‌غلظت MS محتوی شش درصد ساکارز دارای جنین‌های نمو یافته و ریزبنه‌های تشکیل شده، b) کالوسی که در محیط کشت کامل MS بدون هورمون رشد یافته، c) کالوسی که در محیط کشت نیم‌غلظت MS محتوی ۱ mg/l ABA رشد یافته و d) کالوس رشد یافته در محیط کشت کامل MS محتوی ۱ mg/l ABA.

Fig. 6. Formation of contractile roots in callus grown in ABA-free medium and shoots and rooting in callus grown with ABA medium; a) callus in medium containing half-strength MS containing 6% sucrose with developed embryos, b) A callus grown in a complete MS medium, c) a callus in half-strength MS medium containing one mg/l ABA, and d) a callus which has been grown in MS medium containing one mg /L ABA.



شکل ۷. شاخسارهای تولید شده از کالوس‌های زعفران در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر 2,4-D و ۳ میلی‌لیتر BAP در دمای ۲۵ درجه با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت

Fig. 7. Shoots produced from saffron callus in MS medium containing 0.5 ml 2,4-D and 3 ml BAP at 25 °C with the photoperiod of 16/8 hours

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۱/۴۵۵۳ با حمایت ستاد توسعه زیست فناوری، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شد. بدینوسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود از حمایت مالی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و کمک‌های اداری و تدارکاتی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بیرجند را اعلام می‌دارند.

منابع

Ahouran, M., Hosseini, R., and Zarghami, R., 2009. Regeneration of plantlet from protoplast of Crocus sativus L. 6th Iranian Congress of Horticultural Science Rasht, I.R. Iran, p. 79. [in Persian].

Ahuja, A., Kaul, S., Ram, G., and Kaul, B.L., 1994. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, Crocus sativus L. Indian J. Exp. Biol. 32, 135-140.

Azadi, P., Bagheri, K., Gholami, M., Mirmasoumi, M., Moradi, A., and Sharafi, A., 2017. Thin cell layer, a suitable explant for in vitro regeneration of saffron (Crocus sativus L.). JAST. 19, 1429-1435.

Bagheri, K., 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 Agron. & Technol. 5, 231-239. [in Persian with English Summary].

Blazquez, S., Olmos, E., Hernández, J., Fernández-García, N., Fernández, J., and Piqueras, A., 2009. Somatic embryogenesis in saffron (Crocus sativus L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. PCTOC. 97, 49-57.

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

Broertjes, C., and Van Harten, A., 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier, The Netherlands. 345 pp.

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. J. Sci. I. R. Iran. 11, 169-173.

Fluch, S., Hohl, K., Stierschneider, M., Kopecky, D., and Kaar, B., 2010. Crocus sativus L.-Molecular evidence on its clonal origin. Acta Hortic. 850, 41-46.

George, P.S., Visvanath, S., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V., 1992. Tissue culture of saffron (Crocus sativus L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food Biotechnol. 6, 217-223.

Grilli Caiola, M., Caputo, P., and Zanier, R., 2004. RAPD Analysis in Crocus sativus L. accessions and related Crocus species. Biol. Plant. 48, 375-380.

Ilahi, I., Jabeen, M., and Firdous, N., 1987. Morphogenesis with saffron tissue culture. J. Plant Physiol. 128, 227-232.

Isa, T., and Ogasawara, T., 1988. Efficient regeneration from the callus of saffron (Crocus sativus L.). JPN J. Breed. 38, 371-374.

Izanloo, A., Derakhshan, A., Alizadeh, Z., and Behdani, M.A., 2019. Cormlet production of saffron (Crocus sativus L.) using in vitro culture techniques. J. Saffron Res. 6(2), 179-189. [in Persian with English Summary].

Karamian, R., 2004. Plantlet regeneration via somatic emberiogenesis in four species of Crocus. In: Fernandez, J.A., and Abdullaev, F. (Eds.). The 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. Acta Hortic. Spain, pp. 253-259.

Lagram, K., El Caid, M.B., El Aaouam, S., Lachheb, M., El Mousadik, A., and Serghini, M.A., 2017. In vitro shoot regeneration and development of microcorms of moroccan saffron

(Crocus sativus L.). Atlas J. Plant Biol. 50-55.

Milyaeva, E., Azizbekova, N.S., Komarova, E., and Akhundova, D., 1995. In-vitro formation of regenerant corms of saffron Crocus (Crocus sativus L). Russ. J. Plant Physiol. 42, 112-119.

Mir, J.I., Ahmed, N., Khan, M.H., Mokhdomi, T.A., Wani, S.H., Bukhari, S., Amin, A., and Qadri, R.A., 2015. Molecular characterization of saffron-potential candidates for crop improvement. Not. Sci. Biol. 7, 81-89.

Nemati, Z., Mardi, M., Majidian, P., Zeinalabedini, M., Pirseyedi, S.M., and Bahadori, M., 2014. Saffron (Crocus sativus L.), a monomorphic or polymorphic species?. Span. J. Agric. Res. 12(3), 753-762.

Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O., 2009. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. BMC Res. Notes. 2, 1-5.

Safarnejad, A., Alamdari, S.B.L., Darroudi, H., and Dalir, M., 2016. The effect of different hormones on callus induction, regeneration and multiplication of saffron (Crocus sativus L.) corms. Saffron Agron. & Technol. 4, 143-154. [in Persian with English Summary].

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

Sik, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T., and Tanyyolc, B., 2008. Genetic variation among Crocus sativus L. species from western Turkey as revealed by RAPD and ISSR marker. J. Appl. Biol. Sci. 2, 73-78.

Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Albertini, E., Raggi, L., Marconi, G., Lombardo, G.M., and Ruberto, G., 2013. Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (Crocus sativus L.) of different origin by LC-UV–vis-DAD and AFLP analyses. Genet. Resour. Crop Evol. 60, 711-721.

Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M.S., Wan, G.L., Jin, Z.L., Khan, F., and Zhou, W.J., 2012. In vitro Mutagenesis and Genetic Improvement. In: Gupta, S.K. (Ed.), Technological Innovations in Major World Oil Crops. Volume II: Perspectives. Springer New York, New York, NY. pp. 151-173.

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.

Journal of Saffron Research (semi-annual)

Vol.9, No.1, Spring & Summer, 2021

p. 29-44

http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2019.2583.1103

University of Birjand

Original Article:

Optimization of Embryogenic Callus Induction and Indirect Regeneration in Saffron (*Crocus sativus* L.)

Atefe Derakhshan[1], Ali Izanloo[*2], Zohreh Alizadeh[2], Mohammad Ali Behdani[3]

1. MSc. Graduated student in Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.

2. Assistance professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand. POB: 331

3. Professor in Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculaty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

** Corresponding author Email: a.izanloo@birjand.ac.ir*

Received 15 June 2019; Accepted 21 December 2019

Abstract

Saffron is a sterile triploid plant which is propagated by daughter corms from the mother corm, thus improving its agronomic characteristics has been limited using conventional plant breeding. Tissue culture technology is a useful technique to improve crop characteristics. The purpose of this research was to find the appropriate protocol for the induction of callus in parts of saffron corms. A factorial layout based on a completely randomized design was carried out with plant growth regulators 2,4-D and BAP, at three levels (including 1, 2 and 3 mg/l) with five replications. The control samples had no growth regulators. These results indicated that MS culture medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 2 mg/l BAP was the best culture medium for callus growth and formation. The purpose of this study was to achieve a suitable protocol for inducing embryogenic callus and indirect regeneration in saffron. To achieve this, an experiment was conducted based on a completely randomized design with four replications using two growth regulators such as 2,4-D, 0.5 mg/l and BAP at three levels of 3, 4 and 5 mg/l. The results revealed that there were no significant differences between treatments. Then, these calluses were sub-cultured into two different levels of MS medium (half-strength MS and complete MS) without ABA with 3 and 6% sucrose, and with one mg/l ABA. The factorial layout was conducted based on a completely randomized design with six replications to study embryo development. The results indicated that the best medium for embryo development was complete MS medium containing one mg/l ABA. Finally, in order to growth and differentiation, these calluses were transferred to MS medium with 6% sucrose. The observations indicated that calluses in full MS medium containing one mg/l ABA, had the best reaction to regeneration of saffron.

Keywords: Corm, Culture medium, Growth regulator, Somatic embryo.