اثر تابش اشعه گاما بر ریزازدیادی کورم های زعفران (*Crocus sativus* L.)

زهرا سرگزی مقدم [۱]، نسرین مشتاقی [۲]، احمد شریفی [۳]، عبدالرضا باقری [۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد zahrasm21@yahoo.com

[۲] عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] غضو هیات علمی گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی مشهد – خراسان رضوی

چکیده

استفاده از کورم های موتاسیون یافته‌ی زعفران می تواند برای برنامه های به نژادی موجب عملکرد بهتر و بالاتر آن شود. به این منظور در این مطالعه سه توده کورم زعفران از مناطق مختلف مشهد، تربت حیدریه و سرایان جمع آوری وهر کورم به چهار قسمت حاوی حداقل یک جوانه تقسیم شد و تحت دز اشعه گاما با شدت ۲/۵ گری قرار گرفت، سپس در شرایط این ویترو ودر محیط کشت SH حاوی 3mg/L BAP و 1mg/L NAA به منظور جوانه زنی قرار گرفتند. درصد زنده مانی حدود ۶۰ درصد بود وتعداد جوانه از ۱/۲۲ جوانه در شاهد به ۱۱/۰۳ در تیمار تابش افزایش یافت. برای رشد بهتر، قطعات کورم دارای جوانه به دمای $15\ ^{\circ}C$ وطول روز (۱۰/۱۴:روشنایی/ تاریکی) منتقل شدند. پس از رشد برگها، جهت ریشه زایی از هورمون IAA (۰mg/L) و BAP (۲mg/L) با ساکارز ۹ درصد استفاده شد که از نظر وزن ریشه بهترین تیمار بود. جهت کورم زایی نیز IBA (۱mg/L) در محیط کشت MS ½، SH و SH ½ استفاده شد که ۱۰۰درصد کورم زایی در محیط کشت MS ½ مشاهده شد. داده های این مطالعه نشان می دهد که تابش اشعه می تواند تعداد جوانه و در نهایت تعداد کورمهای تولیدی را افزایش دهد.

کلمات کلیدی : این ویترو، تابش اشعه، تکثیر، زعفران، کورم

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus L.*) یک گیاه اقتصادی و دارویی است و از زمان های قدیم به عنوان دارو و عطر و طعم دهنده برای غذاها استفاده می شده است و امروزه نیز به عنوان یک گیاه ارزشمند با خواص دارویی متعدد شامل ضد سرطانی، ضد جهش، آنتی اکسیدان ، تقویت قلب و مسکن شناخته شده است(۱)، این ارزش تا جایی است که یک کیلوگرم از آن حدود ۱۰۰۰۰ دلار آمریکا به فروش می رسد (۲۰۱۸). محبوبیت زعفران طی قرن گذشته تاحدودی کاهش یافته بود ولی در طول دهه گذشته با کشت در کشورهای مختلف محبوبیت خود را بازیافت به طوری که در حال حاضر در کشورهای مختلف دنیا از جمله ایران، اسپانیا، ترکیه، هند و یونان کشت می شود.

زعفران گونه ای تریپلوئید و در نتیجه عقیم و فاقد بذر است. به همین دلیل تکثیر آن عمدتاً رویشی و از طریق کورم های دختری انجام می گیرد. با توجه به تکثیر رویشی عقیده بر این است که هیچ تنوع ژنتیکی در بین نمونه های مختلف وجود ندارد و مطالعات مختلفی که به این منظور انجام شده است نیز نشان دهنده تنوع کم و یا عدم وجود تنوع است تا جایی که تحقیقات زیادی در این مورد در سراسر دنیا و ایران انجام گرفته است و نشان داده تمام کلون های جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی نه تنها از نظر ویژگی های مورفولوژیکی بلکه در سطح مولکولی نیز مشابه هستند و چون تنوع مبنای همه گزینش ها است، با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه، حدود انتخاب وسیع تر می شود (۳).

تنوع ژنتیکی ناشی از تغییرات ژنتیکی است که در جمعیت به طور ناگهانی رخ می دهد و به عنوان یک نتیجه از نوترکیبی ، کم داشت، انورسیون، ترانسلوکاسیون، پلی پلوئیدی، جدا شدن ناقص و موتاسیون است. هر گیاهی که تغییر ژنتیکی داشته باشد

می تواند تبدیل به یک کلون منحصر به فرد و جدید شود(۲). القای جهش می تواند یکی از روش های موثر جهت ایجاد و افزایش تنوع ژنتیکی باشد. و چون جهش های خود به خودی در طبیعت به میزان خیلی پایین رخ می دهند و استفاده از آنها برای اصلاح یک محصول مشکل است بنابراین از جهش های مصنوعی استفاده می شود. تابش اشعه گاما ناشی از کبالت ۶۰ یک روش مؤثر برای ایجاد موتاسیون است به طوری که معرفی تنوع ژنتیکی ایجاد شده از طریق آن می تواند استفاده از کورم های موتاسیون یافته برای برنامه های به نژادی را افزایش دهد و درنهایت به عملکرد بهتر و بالاتر بیانجامد.

علاوه بر افزایش تنوع ژنتیکی برای اطمینان از آینده زعفران، لازم است تکنیک های کشت نیز بهبود یابد و در این راستا تکنیک کشت بافت گیاهی ممکن است پتانسیل زیادی برای تولید زعفران در مقایسه با روش های کشت سنتی ارائه دهد (۴). در کشت سنتی نرخ تکثیر کورم ها بسیار پایین می باشد ولی در شرایط کشت بافت می توان این مقدار را افزایش داد و از یک کورم چندین کورم دختری به دست آورد. با ادغام روش های کشت بافت و تنوع ناشی از موتاسیون می توان به عملکرد بالاتر دست یافت که با ایجاد جوانه های بیشتر و نیز افزایش میزان کورم های دختری همراه است .

مواد و روش ها

کورم های زعفران از زعفران کاری های سه شهر مشهد، تربت حیدریه و سرایان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. برای تهیه ریزنمونه، کورم های زعفران سالم و عاری از بیماری که تونیک آنها جدا شده و حداقل ۴ جوانه جانبی دا شتند و از نظر اندازه یکسان بودند جهت موتا سیون زائی انتخاب شدند. موتا سیون زائی تو سط پرتو گاما نا شی از کبالت ۶۰ در پژوهشکده کاربرد پرتو ها در مرکز انرژی هسته ای کرج با دُز اشعه ۲/۵ گری انجام شد. در آزمایشگاه ضد عفونی سطحی کورم ها شامل تمیز کردن با د ستمال و سپس غوطه وری در آب جاری به مدت ۶۰ دقیقه ، در اتانول ۷۰ در صد به مدت یک دقیقه و سپس وایتکس ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس شستشو با آب دو بار تقطیر به مدت ۵ دقیقه و غوطه وری در بنومیل و کاربندازیم ۱/۱۰۰۰ انجام شد. بعد از آن کورم ها به هود لامینار منتقل شدند و قسمت هایی از کورم که حاوی جوانه بودند برش خوردند به طوری که هر کورم به ۴ قسمت تقسیم شد و برای کاشت مورد استفاده قرار گرفت.

محیطی که برای ر شد ریزنمونه ها ا ستفاده شد محیط کشت ا سچنک و هیلدبرانت (SH) بود که برای ر شد بیشتر جوانه ها حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۳ میلی گرم در لیتر BAP بود. بعد از تهیه‌ی محیط کشت و توزیع آن در شیشه ها، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱,۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس ریزنمونه‌های تهیه شده در زیر هود درون محیط کشت قرار گرفتند و برای جوانه زنی به اتاقک رشد منتقل شدند. پس از یک ماه درصد جوانه زنی گرفته شد و نمونه ها در همان محیط واکشت شدند. تعداد جوانه بر روی هر قطعه نیز سه ماه بعد از کشت اولیه بررسی شد. سپس برای رشد بهتر ، قطعات کورم دارای جوانه به دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و طول روز کمتر (۱۰/۱۴ : روشنایی/ تاریکی) منتقل شدند. پس از سه ماه و زمانی که ر شد برگ ها کامل شده بود، قطعات کورم جهت ریشه زایی به محیط کشت SH حاوی هورمون IAA (۱،۰ و ۲ *mg/L*) و BAP (۰،۲ و ۴ *mg/L*) همراه با ساکارز ۳، ۶ و ۹ درصد منتقل شدند. وزن نمونه ها قبل و بعد از شروع تیمار در زیر هود لامینار با ا ستفاده از ترازو تعیین شد. سپس نمونه ها برای کورم زایی و ظهور کورمچه ها به محیط کشت MS ½، SH ½ و SH همراه با هورمون IBA (۱ *mg/L*) منتقل شدند و سه ماه در این محیط باقی ماندند.

داده های به دست آمده در تمام مراحل مطالعه با استفاده از نرم افزار JMP8 آنالیز شدند. آنالیز داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و تفاوت معنی داری میانگین ها در سطح ۵٪ توسط آزمون LSD سنجیده شد.

نتایج و بحث

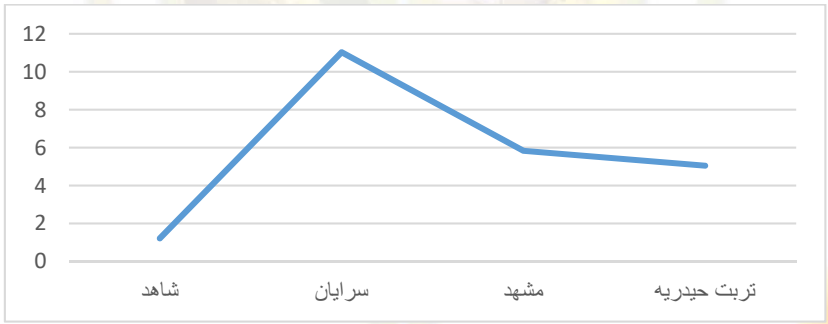
کاربرد دزهای مختلف پرتوی گاما در مطالعه نهوی[1] و همکاران (۴) نشـــان داد بهترین دوز ۲,۵ گری اســـت و صـــفات مورد بررسی افزایش داشته است. به همین جهت ما نیز دوز اشعه ۲,۵ را به عنوان بهترین دوز انتخاب و با شاهد مقایسه کردیم . در این مطالعه ۱۷۰ نمونه مورد مطالعه قرار گرفت که شـــامل ۶۶ نمونه جوانه انتهایی و ۱۰۴ نمونه جوانه جانبی بود، از این تعداد پس از یک ماه از تاریخ کشـــت اولیه ۱۰۷ نمونه (۶۳٪) باقی ماندند (جدول ۱) . نتایج تجزیه واریانس درصـــد زنده مانی در مورد جوانه های انتهایی و جانبی معنی دار بوده و نشـــان می دهد درصـــد زنده مانی در جوانه های انتهایی و جانبی با هم متفاوت بوده و جوانه های انتهایی نســـبت به جوانه های جانبی زنده مانی بیشـــتری نشـــان داده اند. همچنین در مورد منطقه جغرافیایی نیز معنی داری وجود دارد و زنده مانی در مناطق مختلف با هم متفاوت بوده و بیشترین در صد زنده مانی در نمونه های تربت حیدریه بوده است.

جدول ۱- درصد زنده مانی به تفکیک نوع ریزنمونه از جوانه انتهایی و یا جانبی پس از تیمار با دز ۲,۵ گری

	نوع	تعداد نمونه	از بین رفته	باقی مانده	درصد زنده مانی	درصد از بین رفته
ریزنمونه	انتهایی	۶۶	۱۳	۵۳	۸۵٪	۱۵٪
	جانبی	۱۰۴	۵۰	۵۴	۵۲٪	۴۸٪
مجموع		۱۷۰	۶۳	۱۰۷	۶۲,۹۴٪	۳۷,۰۶٪

مقایســه میانگین داده های زنده مانی با اســتفاده از آزمون LSD نشـان داد که درصـد زنده مانی در دز تابش ۲/۵ گری و در جوانه های انتهایی منطقه جغرافیایی تربت حیدریه با ۹۰ درصد زنده مانی بیشترین میزان زنده مانی را داشته است.

معیار بعدی تعداد جوانه فعال شده بر روی هر ریزنمونه است که سه ماه پس از کشت اولیه به دست آمده است (شکل c۲) و داده ها نشان می دهد که نمونه های منطقه سرایان در دز ۲/۵ گری تعداد بیشتری جوانه ی فعال داشته و بعد از آن شهر مشهد و تربت حیدریه قرار دارد، در حالیکه شـاهد، کمترین میزان جوانه فعال شـده بر روی هر نمونه را نشـان می دهد (شـکل ۱). تعداد جوانه در دز تابش ۲/۵ گری در منطقه جغرافیایی سـرایان با میانگین ۱۱/۰۳ جوانه در هر نمونه بیشـترین تعداد جوانه و بعد از آن تربت حیدریه و مشهد به ترتیب با ۵/۰۵ و ۵/۸۳ جوانه بر روی هر نمونه نسبت به شاهد با ۱/۲۲ جوانه بر روی هر نمونه بوده است.

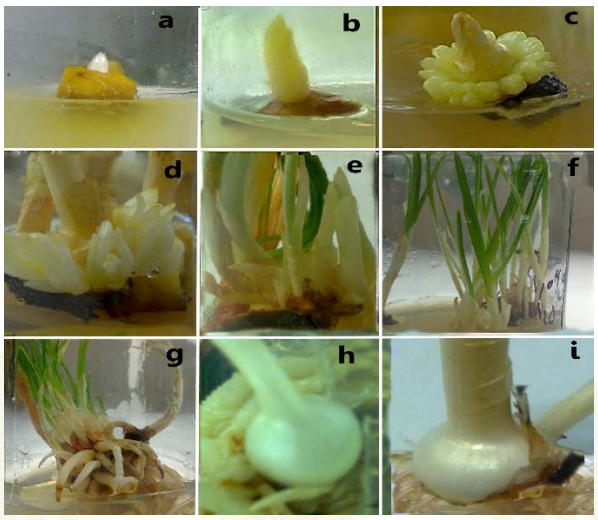


شکل ۱- میانگین تعداد جوانه فعال شده بر روی هر نمونه به تفکیک منطقه جغرافیایی

در مطالعه سجادی فرد و پژوهنده (۶) نتایج نشان داد که در شرایط سرمای ۴ درجه سانتی گراد رشد بخش هوایی زعفران بیشتر بود. در مطالعه رنو و همکاران (۵) نیز از دمای ۳-۱درجه سانتی گراد استفاده شد. در مطالعه مولینا و همکاران (۳) نیز دمای ۱۷ درجه سانتی گراد به این منظور استفاده شد. در مطالعه حاضر ریزنمونه های حاوی جوانه های فعال شده به ژرمیناتور

[1] Nehvi

با دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۰/۱۴: روشنایی/ تاریکی منتقل شد و رشد برگ ها و افزایش طول آنها در این شرایط به خوبی دیده شد (شکل ۲ e) .



شکل ۲- افزایش تعداد جوانه ها و رشد برگ ها همراه با ریشه زایی در دوز ۲/۵ گری

a: کشت اولیه نمونه ها در محیط کشت. b: نمونه های کشت شده یک ماه پس از کشت اولیه. c: فعال شدن جوانه ها در اطراف جوانه اولیه. d: رشد جوانه ها دو ماه پس از کشت اولیه. e: جوانه ها سه ماه پس از کشت اولیه. f: رشد برگ ها در دمای پایین. g: ریشه دهی نمونه ها. h و i: کورم زایی.

در مورد ریشه زایی نتایج جدول تجزیه واریانس حاصل از اختلاف وزن بین قبل و بعد از تیمار در سطح ۵ در صد اختلاف معنی داری بین تیمارها نشان داد که این معنی داری در مورد هورمون BAP و همچنین درصد ساکارز وجود داشت به طوری که ساکارز ۹ درصد همراه با دو میلی گرم در لیتر BAP بالاترین میانگین وزن ریشه را در بین تیمارها با ۲/۱۰ گرم ایجاد کرد. ولی هورمون IAA جهت ریشه زایی تفاوت معنی داری بین تیمارها ایجاد نکرد و تیمارهای بدون هورمون IAA و در حضور هورمون BAP بیشترین میانگین و تیمارهای بدون BAP کمترین میانگین داده ها از نظر وزنی را داشتند (جدول ۲).

جدول ۲ – میانگین داده های حاصل از ریشه زایی براساس درصد ساکارز و هورمون های IAA و BAP

ساکارز	۳۰									۶۰									۹۰								
IAA	۰			۱			۲			۰			۱			۲			۰			۱			۲		
BAP	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴	۰	۲	۴
میانگین	0.13	1.41	0.72	0.16	0.34	1.01	0.68	0.42	0.62	0.29	0.39	0.75	0.60	1.08	1.83	0.07	0.79	0.4	0.3	2.1	1.21	0.56	1.18	1.22	0.44	1.49	**1.41**

هورمون IBA جهت کورم زایی در محیط کشت های MS ½، SH و SH ½ استفاده شد که بهترین محیط MS ½ بود که در آن ۱۰۰ درصد کورم زائی دیده شد با این حال در محیط های SH و SH ½ نیز ۶۶ درصد کورم زایی مشاهده شد که از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند.

استفاده از کورم های تابش دیده با دوز اشعه ۲/۵ گری در طی این مطالعه موجب افزایش تعداد جوانه بر روی هر ریزنمونه شد که با استفاده از روش های کشت بافت و هورمون های تنظیم کننده رشد موجب افزایش کورم های دختری شد به طوری

که در حالت طبیعی از هر کورم والدی در بهترین حالت ممکن می توان حدود سه تا چهار عدد کورم دختری به دست آورد ولی با روش های بهبود یافته در این مطالعه توانستیم از هر جوانه ایجاد شده بر روی ریزنمونه یک عدد کورم دختری به دست بیاوریم. بنابراین از این روش می توان برای افزایش تعداد کورم های تولیدی ا ستفاده کرد که در نتیجه موجب افزایش عملکرد اقتصادی خواهد شد.

منابع

1. **Ahmad, M., Zaffar, G., Habib, M., Arshid, A., Dar, N., & Dar, Z. (2014).** Saffron (*Crocus sativus L.*) in the light of biotechnological approaches: A review. *Scientific Research and Essays, 9*(2), 13-18 .

2. **Mir, J., Ahmed, N., Singh, D., Khan, M., Zaffer, S., & Shafi, W. (2015)**. Breeding and biotechnological opportunities in saffron crop improvement. *African Journal of Agricultural Research, 10*(9), 970-974 .

3. **Molina, R., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, J., & Garcia-Luis, A. (2005)**. Temperature effects on flower formation in saffron (Crocus sativus L.). *Scientia Horticulturae, 103*(3), 361-379.

4. **Nehvi, F., Wani, S., Dar, S., Makhdoomi, M., Allie, B., & Mir, Z. (2007)**. Biological interventions for enhancing saffron productivity in Kashmir. *Acta Horticulturae, 739*, 25 .

5. **Renau-Morata, B., Moyá, L., Nebauer, S., Seguí-Simarro, J. M., Parra-Vega, V., Gómez, M., & Molina, R. (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. *Industrial Crops and Products, 46*, 97-104.

6. **Sajjadi fard, M. , Pazhouhandeh, M., (2015)**. Study on Effect of Type of Explant and Hormone on Callus Induction and Regeneration in Saffron (Crocus sativus L.). *Saffron Agronomy & Technology*, 3, 195-202.

The effect of Gamma radiation on in vitro saffron (*Crocus sativus* L.) cormogenesis

Sargazi, Z., Moshtaghi, N. ,Sharifi, A., Bagheri, A.

Abstract

Use of the mutant corms for breeding programs could cause higher and better saffron's performance. In this study, three masses of saffron corm were collected from different regions of Khorasan province in IRAN (Mashhad, Torbat Heidarieh and Sarayan). Each corm was divided into four sections containing at least one bud and irradiated at 2.5 Gy dose of gamma ray, then cultured at in vitro conditions in SH medium containing 3 mg / L BAP and 1 mg / L NAA for germination. The viability rate was about 60%, and the number of buds increased from 1.22 in the control to 11.03 in treatment. For better growth, we transferred corm pieces with buds to 15 ° C and less daytime (14/10: light/dark) photoperiod. For rooting, after growth of leaves, IAA (0 mg / L) and BAP (2 mg/L) were used in SH medium with 3% , 6% and 9% sucrose which was the best treatment for rooting percentage and root weight. For cormogenesis, IBA (1 mg / l) was used in media: ½ MS, SH and ½ SH, which 100% cormogenesis was observed in ½ MS medium. This study shows that low irradiation can increase the number of buds and ultimately increase the number of corm production in saffron.

Keyword: in-vitro, Radiation, Proliferation, Saffron, Corm