6th National Conference on Saffron
17, 18 November 2021 – Gonabad, Iran
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
مجتمع آموزش عالی گناباد
University of Gonabad
ششمین همایش ملی زعفران
۲۶ و ۲۷ آبان ۱۴۰۰ – گناباد، ایران

اثر نوع واکشت و غلظت IBA بر کورم‌زایی از جوانه های تکثیری زعفران در شرایط این ویترو

عاطفه حاجی زاده[۱]، نسرین مشتاقی[۲*]، عباس صفرنژاد[۳]، عبدالرضا باقری[۲]

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۲- به ترتیب دانشیار و استاد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۳- استاد، مرکز تحقیقات کشاورزی، مشهد.

چکیده

میزان تولید پایین کورم زعفران و افزایش حمله عوامل بیماریزای خاکزی به آن‌ها سبب شده تا محققان بخش کشاورزی به دنبال ازدیاد درون شیشه‌ای کورم زعفران از طریق تکثیر جوانه و تبدیل آن‌ها به کورم جدید باشند. تکثیر کورم ها در شرایط این ویترو می‌تواند روش مناسبی برای تولید انبوه و یکنواخت کورم‌ها و پیش زمینه‌ای برای فرایندهای اصلاحی و ژنتیکی بر روی این گیاه باشد. پیروی تحقیقات قبلی نویسندگان در خصوص تکثیر جوانه ها از طریق کشت این ویترو، جوانه انتهایی و جانبی کورم در حال استراحت پس از ضدعفونی با کلرید جیوه ۰/۲ درصد به عنوان ریزنمونه در محیط کشت SH، با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA با هدف تکثیر جوانه قرار گرفتند. برای تبدیل جوانه به کورم، تاثیر سه نوع واکشت و در آزمایشی دیگر تاثیر دو غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر IBA بر کورم زایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برای تبدیل جوانه‌ها به کورم، بهترین واکشت، واکشتی بود که در آن ریزنمونه‌ها هر سه ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند. همچنین جوانه‌های بدست آمده در محیط کشت MS با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA پس از سه ماه به محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS بدون حضور هورمون و حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز منتقل شدند و حدود ۴۵ روز پس از انتقال به آخرین محیط کشت، حدود ۹۰ درصد کورم زایی داشتند.

کلمات کلیدی: زعفران، کورم زایی، این ویترو

*آدرس ایمیل نویسنده مسئول: moshtaghi@um.ac.ir

۱. مقدمه

زعفران گیاه ژئوفیت عقیمی است که سالانه کورم‌های جدیدی را تولید می‌کند و فقط از طریق آن‌ها تکثیر می‌شود (Mathew, 1982). طبیعت تریپلوئید بودن اجازه‌ی تکثیر زایشی را نمی‌دهد. این پدیده به دلیل میوز تریپلوئیدها است که گامت‌های غیرعادی و در نتیجه گیاه غیرعادی تولید می‌کند. عقیم بودن زعفران در اصل به گامتوفیت ماده برمی‌گردد (Chichiricco, 1989). زعفران بذر زنده تولید نمی‌کند؛ بنابراین کورم‌ها برای تکثیر ضروری هستند. برای تضمین آینده‌ی زعفران زراعی باید تکنیک‌های کشت و تولید کورمها بهبود یابد. هر تلاشی برای مدرنیزه کردن کشت زعفران ممکن است نیاز به تولید انبوه موثری از کورم‌های عاری از بیماری داشته باشد که کشت بافت در این زمینه می‌تواند کمک نماید. باتوجه به مشکلات موجود در رابطه با عاری از بیماری نمودن گیاهان پیازی، امروزه استفاده از روش‌های کشت بافت و ریزازدیادی به منظور تکثیر انبوه و عاری از عوامل بیماری‌زای آن‌ها در مقیاس وسیع امری ضروری به نظر می‌رسد (رجب‌پور و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین کشت بافت می‌تواند یک روش بسیار مفید و موثر برای اصلاح ژنتیکی و تولید واریته‌های جدید زعفران باشد؛ چراکه این گیاه عقیم است و روش‌های اصلاح کلاسیک در مورد آن نمی‌تواند به راحتی استفاده شود. کشت پروتوپلاست، کشت بساک و استفاده از تغییرات ژنتیکی مختلف در صورتی به عنوان روش‌های اصلاحی زعفران کاربرد خواهند داشت که روش‌های کشت درون شیشه‌ای و باززایی آن بهینه شده باشد. تا کنون تلاشهای تحقیقاتی متعددی در داخل و یا خارج از کشور برای بهبود تولید کورم در شرایط این ویترو صورت گرفته است و مجموعه ای از این روشها در کتاب زعفران و فصل مربوط به کشت سلول و بافت زعفران آمده است (Moshtaghi, 2020).

در ادامه تحقیقات قبلی که در راستای افزایش تولید جوانه در شرایط این ویترو بر روی ریزنمونه های کورم زعفران انجام شده است، روشی برای تبدیل جوانه های تولیدی به کورمچه مدنظر بوده است که در این تحقیق دو روش برای تبدیل جوانه به کورم در شرایط این ویترو معرفی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. تهیه مواد گیاهی و ریزنمونه‌ها

کورم‌های زعفران در خردادماه و در مرحله خواب، به منظور بررسی تاثیر هورمون‌های مورد استفاده در شرایط آزمایشگاهی و عدم تاثیر هورمون‌های درونی گیاه، از زعفرانکاری‌های اطراف شهرستان مشهد جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از ضدعفونی سطحی، قسمت‌هایی از کورم که حاوی جوانه بودند به منظور تکثیر جوانه و کورم‌زایی به عنوان ریزنمونه استفاده شدند.

۲-۲. ضد عفونی سطحی کورم‌ها و تکثر جوانه

با توجه به آلودگی‌های زیاد قارچی و باکتریایی کورم‌های زعفران، بهترین کورم‌ها انتخاب و ضدعفونی شدند. ابتدا فلس کورم‌ها جدا گردید. کورم‌های بدون فلس به مدت ۶۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. کورم‌ها برای استریل نمودن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۲درصد فرو برده شدند و پیوسته بهم زده می‌شدند. در انتها به منظور ازبین بردن محلول سمی کلرید جیوه، زیر هود لامینار ۲ بار با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. همچنین شیشه‌های حاوی محیط کشت به همراه وسایل مورد نیاز قبل از کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. ریزنمونه های حاوی جوانه های انتهایی

و جانبی جهت تکثیر جوانه ها به محیط کشت SH، با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA با هدف تکثیر جوانه قرار گرفتند.

۲-۳. مطالعه اثر واکشت‌های مختلف بر کورم‌زایی مستقیم از جوانه‌ی تکثیر شده‌ی زعفران

در این آزمایش با هدف تبدیل جوانه‌های بدست آمده به کورم، به صورت کاملا تصادفی از میان نمونه‌هایی که بیشترین درصد جوانه‌زنی و تعداد جوانه را داشتند، برای مرحله کورم‌زایی انتخاب شدند. در این مرحله اثر ۳ نوع واکشت مورد مطالعه قرار گرفت. در واکشت نوع یک، ریزنمونه‌ها به صورت هر دو ماه یک‌بار با اضافه شدن محیط مایع تغذیه می‌شدند، در واکشت نوع ۲، ریزنمونه‌ها هر دو ماه یک‌بار در همان محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند و در واکشت نوع ۳، ریزنمونه‌ها هر سه ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند، و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در فتوپریود ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با شدت نور حدود ۴۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. این آزمایش به مدت ۶ ماه به‌طول انجامید. آزمایش با ۳ تیمار و ۶ تکرار و هر تکرار حاوی ۴ شیشه و هر شیشه حاوی یک ریزنمونه انجام شد. آنالیز داده‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17 و آزمون Tukey انجام شد.

۲-۴. مطالعه اثر هورمون IBA بر کورم‌زایی

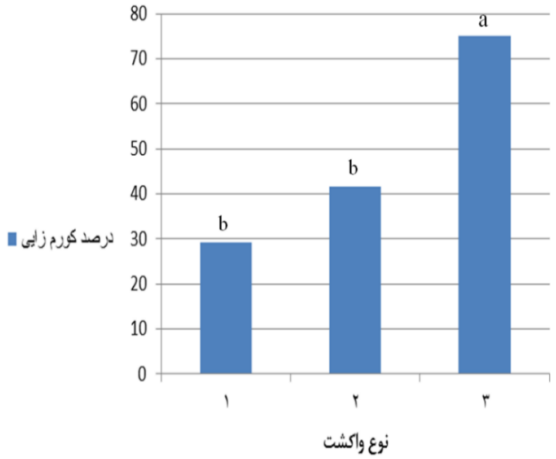
تعدادی از جوانه‌هایی که در آزمایش تکثیر جوانه پس از ۳ ماه به اندازه مطلوب رسیده بودند وارد این آزمایش شدند. ابتدا ریزنمونه‌ها به محیط کشت پایه $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز منتقل شدند، و به مدت ۳ ماه بدون واکشت، در همان محیط کشت باقی ماندند. پس از ۳ ماه با در نظر گرفتن محیط قبلی، وارد محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS بدون حضور هورمون و حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز شدند. این آزمایش در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در فتوپریود ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با شدت نور حدود ۴۰۰۰ لوکس قرار گرفت. برای هر تیمار، ۴ تکرار و برای هر تکرار ۴ شیشه و هر شیشه حاوی یک ریزنمونه در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17 و آزمون Tukey انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳,۱. مطالعه اثر واکشت‌های مختلف بر کورم‌زایی مستقیم از جوانه‌ی تکثیر شده‌ی زعفران

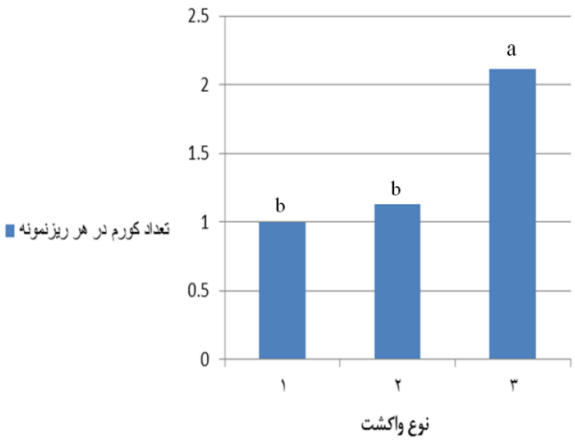
به منظور تبدیل جوانه به کورم، در این مرحله ۳ نوع واکشت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده از آنالیز داده‌ها پس از تبدیل شدن جوانه‌ها به کورم در این تحقیق نشان داده‌است که بین واکشت‌های انجام شده از نظر درصد کورم‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود داشته‌است ($Pvalue \leq 0.002$). در شکل یک نشان داده شده‌است که بین واکشت‌های یک و دو تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، اما درصد کورم‌زایی واکشت سوم، تفاوت معنی‌داری با دو واکشت دیگر دارد. به‌علاوه بررسی حاصل از تعداد کورم در هر ریزنمونه بین واکشت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان

داده‌است (Pvalue≤ 0.007). در شکل ۲ واکشت سه با تعداد ۲/۱۱ کورم در هر ریزنمونه کورم‌زایی بیشتری نسبت به واکشت یک و دو هرکدام به ترتیب با تعداد ۱/۱۳ و یک کورم در هر ریزنمونه، داشته‌است.



شکل۱. تاثیر انواع واکشت‌های مختلف بر درصد کورم در هر ریزنمونه (نوع ۱: هر دو ماه یک‌بار با اضافه شدن محیط مایع تغذیه می‌شدند، نوع ۲: هر دو ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند، نوع ۳: هر سه ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند.)

(حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است)



شکل۲. تاثیر انواع واکشت‌های مختلف بر تعداد کورم در هر ریزنمونه (نوع ۱: هر دو ماه یک‌بار با اضافه شدن محیط مایع تغذیه می‌شدند، نوع ۲: هر دو ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند، نوع ۳: هر سه ماه یک‌بار در محیط قبلی خودشان واکشت می‌شدند.)

(حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است)

در بسیاری از آزمایش‌ها، اثر غلظت‌های مختلفی از ساکارز بر القای میکروکورم از ریزنمونه کورم زعفران در شرایط این‌ویترو مورد بررسی قرار گرفته‌است (Sharma et al. 2008 ؛Raja et al. 2002). به نظر می‌رسد افزایش ساکارز در محیط کشت و وادار کردن گیاه به تحمل شرایط تنش‌زا باعث می‌شود تا گیاه در شرایط نامناسب از رشد رویشی صرف نظر

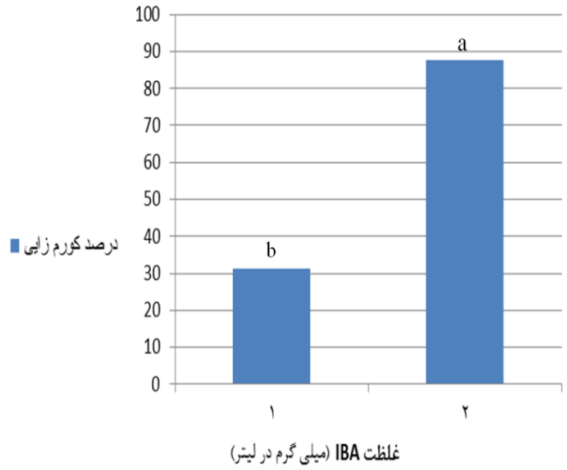
کرده و برای بقای خود وارد مرحله زایشی شود و تولید کورم کند تا بتواند نسل خود را نگه دارد، که تولید کورم از ریزنمونه از اهداف کشت این گیاه در شرایط این ویترو بوده‌است. کورم زعفران به دلیل ذخیره نمودن نشاسته در خود می‌تواند در صورت وجود شرایط مساعد جوانه بزند و رشد رویشی خود را ادامه دهد. در این تحقیق به منظور استفاده از روشی جدید که همان شرایط ذکر شده اعمال گردد، از واکشت‌های مختلف استفاده شده‌است. علت این نوع واکشت‌ها اعمال یک تنش خشکی و کاهش رشد رویشی و وارد شدن به مرحله زایشی بوده‌است. زیرا در آزمایش‌های اولیه‌ای که انجام شد، ریزنمونه‌هایی که به طور پی در پی و هر ۴ هفته یک‌بار واکشت می‌شدند به دلیل مساعد بودن شرایط اعمال شده، فقط رشد رویشی را ادامه می‌دادند و تولید جوانه‌های بلند و قوی و برگ‌های زیادی می‌کردند که حتی عمل واکشت در زیر هود را نیز با مشکل مواجه کرده بودند. به طوری‌که اندازه پتری برای قطع برگ‌ها مناسب نبوده و احتمال آلودگی را زیاد می‌کردند. همچنین تمام فضای شیشه‌های بزرگی که برای کشت انتخاب شده بودند را پر کرده و شیشه برای ریزنمونه کوچک به نظر می‌رسید.

به‌علاوه مطالعات انجام شده در چندین منبع نشان می‌داد که رشد رویشی بیش از حد مانع ورود گیاه به مرحله زایشی می‌شود، که می توان به مورد مشاهده شده در توت فرنگی اشاره داشت. توت‌فرنگی به آب زیادی احتیاج دارد، بنابراین برای کشت باید آب کافی در اختیار باشد، اما آبیاری توت‌فرنگی باید با توجه به مرحله رشد آن و شرایط محیط انجام گیرد. آبیاری زیاد در ماه‌های تیر و مرداد رشد رویشی توت فرنگی را افزایش داده و استولون‌های زیادی تولید می‌شوند. طبق بررسی‌های انجام شده آبیاری زیاد در ماه‌های تیر و مرداد، باعث کاهش جوانه‌های گل و کاهش محصول به میزان ۱۲ تا ۲۵ درصد در سال بعد شده‌است (حکمتی و کاشی، ۱۳۷۰). بنابراین با کاهش رشد رویشی نظیر آنچه که در زعفران اتفاق افتاد می‌توان گیاه زعفران را وادار به تولید کورم نمود (شکل۳).

شکل۳. کورم‌زایی مستقیم از جوانه‌های بدست آمده در محیط کشت‌های حاوی BAP و NAA

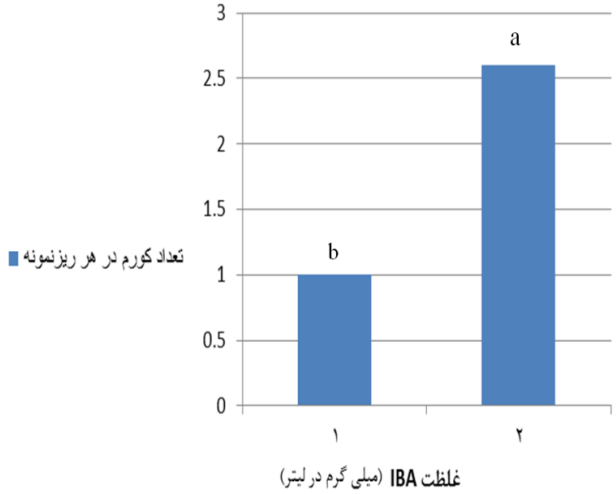
۳,۲. مطالعه اثر هورمون IBA بر کورم‌زایی

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در شکل ۴ و ۵ نشان می‌دهد که بین مقادیر ۱ و ۲ میلی‌گرم از هورمون IBA تفاوت معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب Pvalue≤ 0.001 و Pvalue≤ 0.003). غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA با ۸۷/۵ درصد کورم‌زایی و تعداد ۲/۶۲ کورم در هر ریزنمونه بهتر از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA با ۳۱/۲۵ درصد و تعداد یک کورم در هر ریزنمونه می‌باشد.



شکل۴. تاثیر غلظت‌های IBA بر درصد کورم‌زایی

(حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است)



شکل۵. تاثیر غلظت‌های IBA بر تعداد کورم در هر ریزنمونه

(حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است)

اکسین به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر هورمون‌ها نقش مهمی در ریشه‌زایی (Cavusoglu et al. 2013) و تولید کورم (رجب‌پور و همکاران، ۱۳۹۰؛ Cavusoglu et al. 2013) زعفران دارد. از آنجایی که اکسین تمایز آوندها را القا می‌کند کاربرد تنظیم‌کننده‌ی رشدی نظیر IBA که با پیشبرد تمایز سیستم آوندی، انتقال ذخایر به بخش قاعده‌ای جوانه را سرعت می‌بخشد، تمایز میکروکورم را که از نظر گیاه‌شناسی ساقه زیرزمینی غنی از نشاسته است، افزایش می‌دهد (رجب‌پور و همکاران، ۱۳۹۰). شکل ۶ کورم‌های دختری، که مستقیما از جوانه‌هایی بر روی کورم مادری تکثیر شده‌اند را نشان می‌دهد.

شکل۶. کورم‌زایی مستقیم از جوانه‌ها با اثر IBA

۴. نتیجه‌گیری

بررسی های انجام شده در این تحقیق نشان داد که قرارگیری جوانه ها در شرایط تنش سبب تحریک تولید کورم در شرایط این ویترو می شود. عدم واکشت در فواصل سه ماه نیز شرایط تنشی را بر روی جوانه ها اعمال می کند که تحریک تولید کورم را به دنبال دارد. همچنین استفاده از مقادیری هورمون اکسین IBA نیز توانست در فرایند تبدیل جوانه ها به کورم نقش داشته باشد.

منابع

- حکمتی، ج. و کاشی، ع. ۱۳۷۰. توت فرنگی. انتشارات کوروش. تهران.
- رجب‌پور، ش.، صبورا، ع. و وطن‌پور ازغندی، ع. ۱۳۹۰. تغییر غلظت هورمون‌های برون‌زا و تأثیر آن بر روی بلوغ رویان‌های بدنی و ریزبنه‌زایی زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.). زیست شناسی گیاهی. ۸: ۴۱ تا ۵۸.
- Cavusoglu, A., Sulusoglu, M. and Erkal, S. 2013. Plant regeneration and corm formation of saffron (*Crocus sativus* L.) In vitro. Research Journal of Biotechnology, 8(12):128-133.
- Chichiricco, G. 1989. Microsporogenesis and pollen development in *Crocus sativus* L. Caryologia, 42: 249-257.
- Mathew, B. 1982. The *Crocus*: a Revision of the Genus *Crocus*. London.

- Moshtaghi, N. 2020. Tissue and Cell Culture of Saffron In "Saffron: Science, Technology and Health" (Eds:Koocheki, A. Khajeh Hosseini, M.). Elsevier Press.
- Raja, W., Zaffer, G. and Wani, S.A. 2002. *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Acta Horticulture, 739: 291-296.
- Rajabpoor S., Azghandi A. V. and Saboora A. 2007. Effects of different concentrations of 2,4-D and BAP on somatic embryogenesis Induction in saffron (*Crocus sativus* L.). Pakistan Journal Biology Science, 10(21): 3927-3930.
- Sharma, K.D., R. Rathour, R. Sharma, S. Goel, T.R. Sharma and B.M. Sing. 2008. *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. Biology Plant, 52: 709-712.

Effect of subculturing and IBA concentration on cormogenesis of saffron buds which propagated in vitro condition

Atefe Hajizade [1], Nasrin Moshtaghi [2] *, Abbas Safarnejad [3], Abdolreza Bagheri [2]
1- MSc of Agricultural Biotechnology
2- Associate Professor and Professor respectively, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad.
3- Professor, Agricultural Research Center, Mashhad.

Abstract
The low production of saffron corm and increasing the attack of soil pathogens on them have caused agricultural researchers to increase the number of saffron corms by propagating sprouts and turning them into new corms. Propagation of corms in vitro can be a good way to produce massive and uniform corms and a background for breeding and genetic processes on this plant. Following the authors' previous research on bud propagation by in vitro culture, the terminal and lateral buds of resting corms after disinfection with 0.2% mercury chloride as a explant in SH culture medium at a concentration of 3 mg / l BAP hormone and a concentration of one mg / l of NAA hormone were targeted for bud proliferation. To convert buds to corm, the effect of three types of subculturing and in another experiment, the effect of two concentrations of 1 and 2 mg / l IBA on corm production were investigated. The results showed that the best subculture to convert buds to corm was in which the explants were subcultured every three months in their previous media. Also, the buds obtained in MS culture medium with a concentration of 2 mg / l of IBA hormone after three months were transferred to free hormone MS culture medium with 60 g / l sucrose and about 45 days after, about 90% cormogenesis was observed.

Keywords: Saffron, Corm production, In vitro

*آدرس ایمیل نویسنده مسئول: moshtaghi@um.ac.ir