زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۴۱-۵۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۴/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۱/۰۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۳/۱۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۳/۳۰

تغییر غلظت هورمون‌های برون‌زا و تأثیر آن بر روی بلوغ رویان‌های بدنی و ریزبنه‌زایی زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

شکیبا رجب‌پور [۱]، عذرا صبورا [۲*] و علی وطن‌پور ازغندی [۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷ - ۱۹۳۹۵، ج. ا. ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
[۳] بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

زعفران از جمله گیاهان زراعی و ارزشمند استان خراسان است که با استفاده از بنه تکثیر می‌شود. این روش سنتی همراه با مشکلات عدیده‌ای، همچون تهاجم عوامل بیماریزا به بنه‌ها، نیازمند به دوره‌ای طولانی است. کاربرد طیفی از تنظیم‌کننده‌های رشد و القای رویان‌زایی بدنی، روشی مؤثر برای تکثیر سریع و انبوه بنه‌های سالم در شرایط آزمایشگاهی است. در این تحقیق تأثیر ۴ هورمون برون‌زا طی یک دوره سه ماهه در محیط‌کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS ۱/۲) بر روی بلوغ رویان‌های کروی، جوانه‌زنی و تولید ریزبنه زعفران بررسی شده است. اثر هورمون‌های گیاهی با استفاده از NAA (در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و ABA (در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲و ۴ میلی‌گرم در لیتر) مورد آزمون قرار گرفت. همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح‌های آماری کاملاً تصادفی با حداقل ۴ تکرار اجرا گردید. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد رویان کروی در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ mg/l NAA تشکیل شدند، اما این محیط در مقایسه با محیط‌های حاوی BAP و IBA برای بلوغ رویان‌های کروی مناسب نبود. پس از گذشت دو ماه، استفاده از هورمون IBA در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار برای القای بلوغ رویان و تشکیل ریزبنه بود. هر چند در پایان ماه سوم بیشترین تعداد رویان بالغ در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ mg/l BAP به دست آمده بود، ولی تداوم کاربرد هورمون فوق در ریزبنه‌زایی مؤثر واقع نشد. غلظت‌های مختلف ABA موجب پیشبرد سریع بلوغ رویان‌های کروی شد اما در رابطه با تکثیر ریزبنه‌ها اثر مثبتی نداشت.

واژه‌های کلیدی: بلوغ رویان، تیمار هورمونی، ریزبنه، زعفران زراعی، *Crocus sativus* L.

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: saboora@alzahra.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus Sativus* L. از خانواده زنبق (Iridaceae) است. این گیاه دارویی و صنعتی، که نامش از Corycus نام منطقه‌ای در سیلیسیا واقع در شرق مدیترانه گرفته شده است، در صنایع غذایی و داروسازی به عنوان طعم‌دهنده، آرام‌بخش، ضد اسپاسم، کاهنده فشار، چربی و کلسترول خون، اشتهاآور، ضد افسردگی و مقوی معده استفاده می‌شود. همچنین، به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان به عنوان پیشگیری‌کننده از بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان نیز مطرح است. مهمترین ترکیبات موجود در کلاله زعفران شامل ترکیبات زردرنگ محلول در آب (مشتقات کروستین)، ترکیبات تلخ مزه (از جمله پیکروکروسین)، اسانس (سافرانال تا ۱ درصد وزن خشک)، چربی (حداکثر ۱۰ درصد)، رطوبت (حدود ۱۰-۱۳ درصد)، ویتامین‌ها و ترکیبات معدنی (حدود ۵ درصد) است (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵).

کشت این گیاه با ارزش در ایران به سال‌ها قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. برخی از محققان خاستگاه زعفران را ایالت قدیم ماد (دامنه‌های کوه الوند) و عده‌ای مبدأ آن را از منطقه وسیع‌تری شامل یونان، ترکیه، آسیای صغیر و ایران می‌دانند. نخستین مزارع کشت زعفران در اطراف همدان و کرمانشاه دایر شد و پس از آن به نقاط مختلف ایران، از جمله خراسان رسید. کلاله‌های قرمز رنگ زعفران که طلای سرخ نامیده می‌شود منبع درآمد خوبی برای کشاورزان خراسانی، به ویژه تربت حیدریه، قائن، فردوس، گناباد و بیرجند محسوب می‌گردد. از ۲۳۰ تن زعفرانی که هر سال در جهان تولید می‌شود، حدود ۱۷۰ تن آن در خراسان به دست می‌آید و بقیه عمدتاً در اسپانیا، یونان، مراکش، هند و افغانستان تولید می‌شود (Fernandez, 2004). بر اساس آمار منتشر شده توسط صندوق توسعه صادرات زعفران ایران طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸، قیمت هر کیلو زعفران با توجه به کیفیت آن بین ۳ تا ۴ میلیون تومان عرضه شده است. بنابراین، تکثیر این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار بوده، کاشت، داشت و برداشت آن فرصت‌های شغلی و توان ارزآوری فراوانی را به ارمغان می‌آورد.

از طرف دیگر، زعفران گیاهی اتوتریپلوئید و عقیم است (Ebrahimzadeh *et al*., 1998) و ایجاد مزارع جدید آن فقط به وسیله کشت بنه‌های این گیاه مقدور و معمول است. از آنجا که بنه‌ها مدت نسبتاً زیادی (۵ تا ۷ سال) در زمین می‌مانند، بنه‌های انتخاب شده باید سالم و عاری از هر گونه بیماری و یا آسیب‌دیدگی باشند و قبل از کاشت با سموم قارچ‌کش ضدعفونی شده باشند. با این حال، عدم رعایت اصول کشت زعفران، از جمله انتخاب زمین حاصلخیز و بنه‌های درشت و سالم، مبارزه با علف‌های هرز، تنظیم عمق کاشت، اضافه کردن کودهای حیوانی و شیمیایی، زعفران کاران را مجبور به کشت مجدد مزارع قبل از موعد می‌نماید. بنابراین، تهیه و انتخاب بنه‌های مرغوب جهت کاشت در ایجاد و گسترش کشت آن حایز اهمیت است. از آنجایی که تیمار بنه‌های آلوده به ویروس با موفقیت همراه نبوده است و با توجه 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.

تحقیقات متعددی در زمینه کشت بافت زعفران، به ویژه در زمینه تولید ساختارهای کلاله مانند و رویان‌زایی رویشی زعفران انجام شده است؛ از جمله George و همکاران (۱۹۹۲) با کشت مناطق مریستمی بنه زعفران کالوس‌هایی به دست آوردند که پس از انتقال به محیط کشت MS (Murashing and Skoog, 1962) حاوی هورمون‌های IAA، Kin و آسکوربیک اسید رویان‌های کروی در آنها القا شد. سپس جوانه‌زنی در محیط MS ۱/۲ حاوی GA_3 انجام شد. جوانه‌زنی و تمایز نوشاخه‌ها در رویان‌های کروی به کمک محیط کشت MS ۱/۲ محتوی یک میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و با استفاده از NAA و Kin نیز گزارش شده است. Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ریزنمونه مریستم انتهایی در زعفران مشبک (*C. cancellatus*) کالوس‌های رویان‌زا تولید کردند. این کالوس‌ها مراحل بلوغ رویانی را به طور کامل طی کرده، پس از انتقال به محیط MS ۱/۲ حاوی GA_3 و یا NAA و BAP گیاهچه کامل واجد ریشه و نوشاخه تشکیل دادند. Sheibani و همکاران (۲۰۰۷) نیز با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف بنه در محیط MS حاوی BAP و 2,4-D و همچنین با استفاده از تنظیم‌کننده رشد تیدیازرون (TDZ) کالوس‌های رویان‌زایی را تولید کردند که در نتیجه ایجاد تغییرات هورمونی در محیط MS بلوغ این رویان‌های کروی میسر شد. همچنین Raja و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از محیط‌های کشت MS و B5 حاوی غلظت‌های نسبتاً بالای 2,4-D و BAP و NAA ریزبنه‌ها را به روش القای رویان‌زایی تولید کردند. Sharma و همکاران (۲۰۰۸) نیز شاخه‌زایی و بنه‌زایی را از طریق کشت جوانه‌های رأسی و جانبی دنبال کردند. همچنین، در سال ۲۰۰۹ نقش برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارتباط با فرآیند تمایز و رویان‌زایی ریزنمونه‌های زعفران توسط Blazquez و همکاران بررسی شده است.

با این حال، به نظر می‌رسد علی‌رغم انجام تحقیقات متعدد، یافته‌های منتشر شده در رابطه با تولید انبوه بنه‌های سالم و عاری از عوامل بیماری‌زا که از طریق کشت بافت به دست آمده باشند، هنوز از نظر اقتصادی به صرفه نبوده، برای اینکه بتوان نیاز زعفران کاران را رفع نمود، لازم است گستره‌ای از تیمارهای هورمونی مختلف همراه با تغییرات اختصاصی در ترکیب محیط کشت به آزمایش گذاشته شود تا نتیجه مطلوب حاصل گردد. در پروژه حاضر سعی شده است با استفاده از تجارب قبلی، ضمن ارائه یک ترکیب محیط کشت ساده و کم هزینه برای بلوغ رویان‌های رویشی کروی، تولید ریزبنه‌های سترون حاصل از کشت در شیشه زعفران نیز بهبود یابد. بدین منظور، با توجه به نتایج و پژوهش‌های انجام شده در گذشته، با تهیه محیط کشت MS ۱/۲ و کاربرد غلظت‌های پایینی از چهار تنظیم‌کننده رایج در کشت بافت، سرعت بلوغ رویان‌ها و بنه‌زایی هر یک از تیمار مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ماده گیاهی مورد استفاده، رویان‌های کروی به دست آمده از آزمایش‌های قبلی بود. این رویان‌ها حداقل دو ماه پس از کشت ریزنمونه‌های بنه زعفران در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های 2,4-D و

BAP یا TDZ تشکیل شده بودند (Rajabpoor *et al.*, 2007). ابتدا ریزنمونه‌های واجد کالوس‌های رویان‌زا به مدت ۲۵ روز در محیط کشت پایه MS بدون هورمون نگهداری شدند. سپس برای مطالعه مراحل بلوغ رویان‌های کروی و تبدیل آنها به رویان‌های شاخی و تشکیل ریزبنه، به سه نوع محیط کشت پایه MS ۱/۲ تغییر یافته که حاوی ساکاروز ۶ درصد و ۸ گرم در لیتر آگار بودند، منتقل شدند. محیط‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: الف) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون NAA در سه غلظت ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ب) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون IBA در سه غلظت ۰/۲۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، ج) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون BAP در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و د) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون ABA در چهار غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر. اسیدیته همه محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. این آزمایش‌ها در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۴-۶ تکرار اجرا شد و هر تکرار حداقل حاوی ۴ ریزنمونه بود. کشت‌ها در اتاقک رشد و در دمای ۲±۲۴ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و شدت نور معادل تقریباً ۴۰۰۰ لوکس تنظیم شد. روند تغییرات القا شده در رویان‌های کروی شامل تعداد رویان‌های جوانه‌زده و تعداد ریزبنه‌های تولید شده در هر ریزنمونه در فاصله زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز بعد از اعمال تیمارها ثبت و بررسی شد. تأثیر غلظت‌های مختلف هر یک از هورمونهای مورد بررسی و طول دوره کشت بر روی بلوغ رویان‌ها به کمک آزمون تجزیه واریانس دو طرفه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۲ تجزیه و تحلیل شدند. سپس با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌ها مقایسه و تفاوت معنی‌دار بین آنها در سطح $P<0.05$ تعیین گردید. نمودارها بر اساس میانگین ± انحراف معیار رسم شده است.

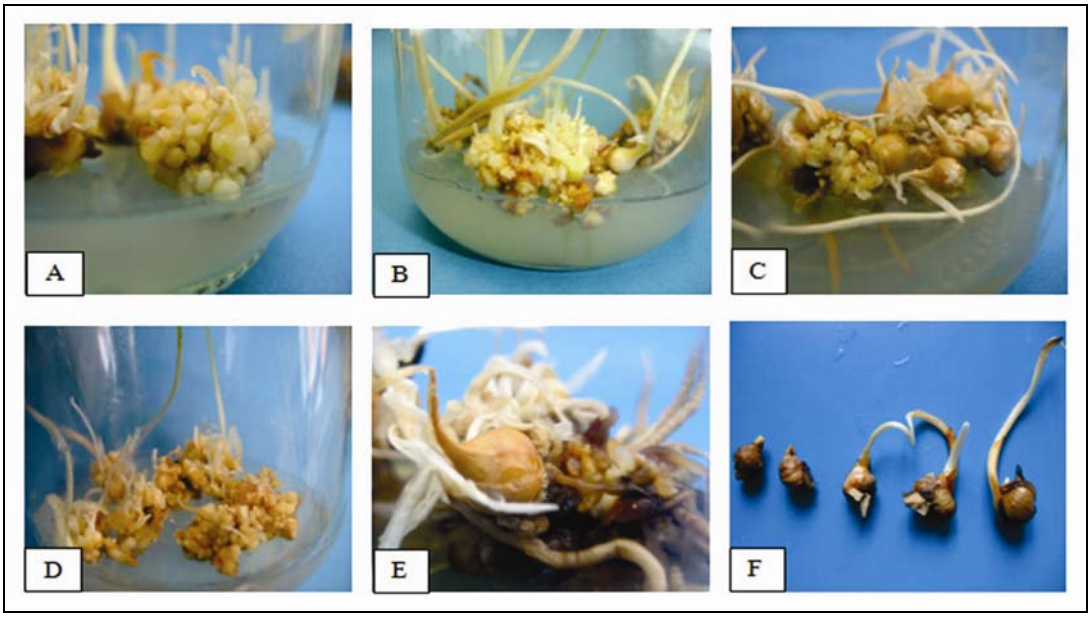
نتایج

در ابتدای آزمایش کالوس‌های رویان‌زای تقریباً هم اندازه، با تعداد رویان‌های کروی یکسان، برای انتقال به محیط‌های کشت جدید (القا بلوغ) انتخاب شدند. در تیمار شاهد، که محیط MS بدون هورمون بود، نه تنها تکثیر رویان‌های کروی متوقف شد، بلکه با تسریع روند قهوه‌ای شدن، پس از مدتی این رویان‌ها از بین رفتند، در حالی که در محیط‌های دیگر کم و بیش تولید و تمایز مراحل رویانی ادامه داشت. همچنان که در جدول ۱ دیده می‌شود، مقایسه میانگین‌های تعداد رویان‌های بالغ تولید شده در نتیجه تیمار با چهار ترکیب هورمونی مورد بررسی (NAA، IBA، ABA و BAP) تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال $P<0.05$ نشان می‌دهد.

شکل ۱ مراحل تکوین رویان‌های بدنی زعفران زراعی را تحت تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. در این آزمایش رویان‌هایی بالغ در نظر گرفته شدند که وارد مرحله کلئوپتیلار شده و جوانه‌زنی را شروع کرده بودند.

جدول ۱- تجزیه واریانس دو طرفه تأثیر متقابل دو عامل زمان تیمار و غلظت هورمون‌های به کار برده شده در رابطه با تکمیل دوره بلوغ رویان‌های بدنی کروی زعفران زراعی؛ **تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.01، *تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.05، ns عدم تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.05، اعداد داخل پرانتز در ستون دوم مربوط به درجه آزادی داده‌های مربوط به ABA است.

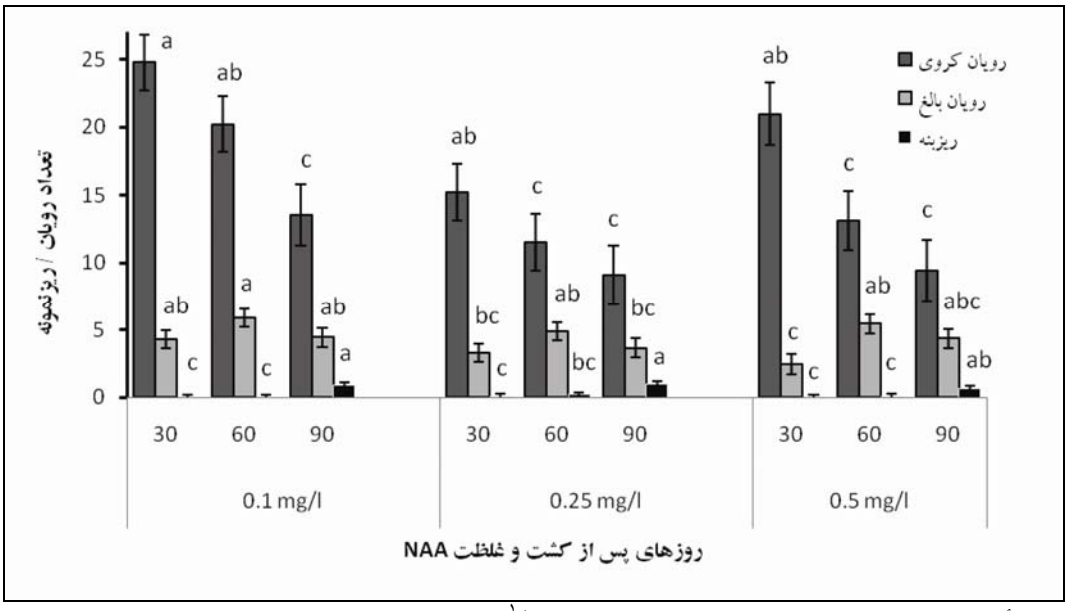
منبع تغییرات	درجه آزادی	ABA	BAP	IBA	NAA
زمان	۲	۸۱/۹۵ **	۴۴/۲۷ *	۶۳/۵۴ *	۱۷/۲۷ ns
غلظت	۲ (۳)	۸۱/۷۵ **	۱۳۰/۸۸ **	۳۲/۳۳ ns	۷۷/۳۶ **
زمان×غلظت	۴ (۵)	۱۱/۲۲ ns	۶۲/۹۳ **	۲/۱۲ ns	۵/۵۲ ns
خطا	۱۳۴ (۱۵۰)	۱۳/۵۰	۱۴/۹۴	۱۶/۹۳	۱۰/۹۰
کل	۱۴۳ (۱۶۱)				



شکل ۱- بلوغ رویان‌های کروی زعفران و تشکیل ریزبنه در یک دوره ۹۰ روزه پس از انتقال رویان‌های کروی به محیط‌های القای بلوغ: A) افزایش رویان کروی در محیط حاوی NAA ۰/۵ mg/l بعد از ۳۰ روز؛ B) رویان‌های جوانه‌زده در محیط NAA ۰/۲۵ mg/l؛ C) ریزبنه‌های تشکیل شده در محیط حاوی IBA ۱ mg/l سه ماه پس از انتقال؛ D) تکثیر (proliferation) رویان‌های کروی و القای بلوغ در محیط واجد BAP ۰/۵ mg/l سه ماه پس از انتقال؛ E) زوال رویان‌های جوانه‌زده در محیط واجد ABA ۱ mg/l سه ماه پس از کشت؛ F) جداسازی ریزبنه‌های نوپدید با فلس‌های غشایی مشابه بنه‌های طبیعی.

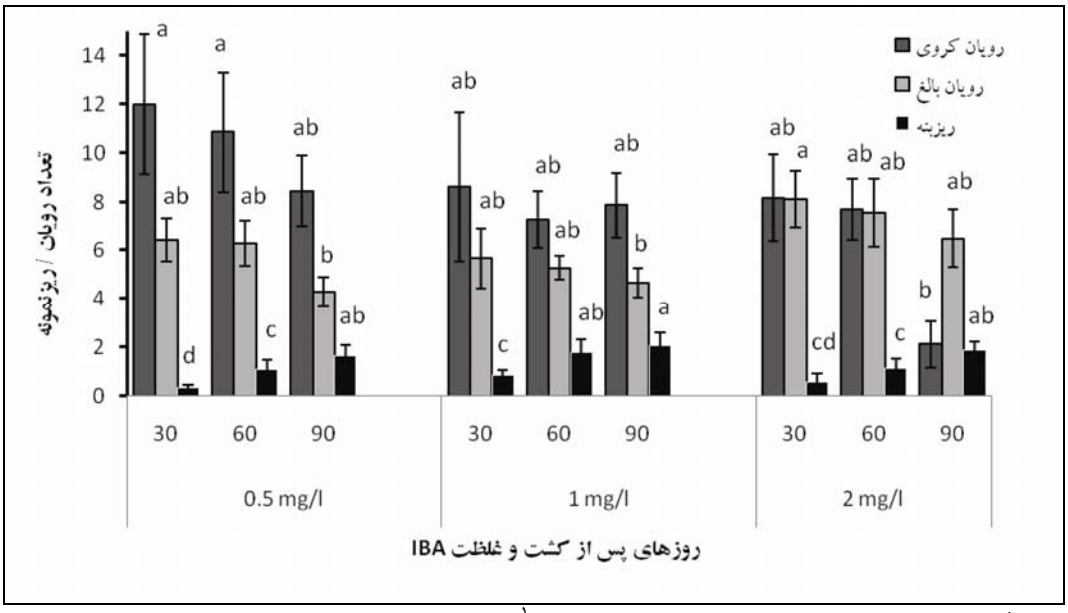
از آنجا که میزان تأثیر NAA و IBA دو هورمون به کار برده شده از گروه اکسین‌ها وابسته به غلظت و ساختار شیمیایی آنها بود، گستره متفاوتی از غلظت‌ها استفاده شد. NAA که بیشتر در تمایز ریشه‌ها مؤثر است، با غلظت‌های کمتر و IBA با قدرت اکسینی ضعیف‌تر در غلظت‌های بالاتر به محیط کشت اضافه شد. نتایج حاصل از کاربرد غلظت‌های مختلف این دوهورمون تفاوت معنی‌داری را نشان داد که در شکل‌های ۲ و ۳ به خوبی قابل مشاهده است. همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، در پایان اولین ماه کشت، رویان‌های کروی در محیط‌های حاوی ۰/۵ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، تعداد رویان‌های کروی القا شده بر روی ریزنمونه‌ها نسبت به تعداد اولیه در ابتدای

آزمایش و اعمال تیمارهای جدید به سرعت افزایش یافت (۲۴/۸ و ۲۱ عدد رویان کروی به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA). میانگین تعداد رویان‌های بالغ بین ۲/۵– ۴/۳ عدد به ازای هر ریز نمونه متغیر بود. تعداد رویان‌های کروی تحت تیمار NAA در ماه‌های دوم و سوم نسبت به ماه اول به طور مشخص کاهش یافت. این پدیده رابطه مستقیم بین افزایش سن ریز نمونه‌ها و تکمیل مراحل رویان‌زایی را در هر یک از غلظت‌های آزمون شده NAA نشان می‌داد؛ به گونه‌ای که در محیط‌های کشت حاوی ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA میزان کاهش تعداد رویان‌های کروی شمارش شده به ترتیب برابر ۴/۵، ۳/۷ و ۷/۸ عدد در ماه دوم و ۱۱/۲، ۶/۱ و ۱۱/۵ عدد در ماه سوم بود و به همین ترتیب، بر تعداد رویان‌های بالغ در ماه دوم و تعداد ریزبنه در ماه سوم افزوده شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA در محیط‌کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه زعفران در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

در رابطه با دومین ترکیب اکسینی به کار برده شده جهت بلوغ رویان‌ها؛ یعنی ایندول بوتیریک اسید، چنان که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌گردد، بیشترین تعداد رویان کروی در ماه اول و در غلظت‌های کم IBA تولید شد (۱۲ رویان کروی در هر ریزنمونه در تیمار ۰/۵ mg/l) و کمترین تعداد رویان‌های کروی برابر ۲/۱ رویان نیز در ماه سوم در نتیجه تیمار با غلظت ۲ mg/l از هورمون ایندول بوتیریک اسید حاصل گردید. طی ماه‌های اول و دوم تفاوت معنی‌داری بین میانگین تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده در محیط‌های القای بلوغ که حاوی ۱ –۲ mg/l IBA بودند دیده نشد، اما با گذشت زمان وجود غلظت‌های بالاتر این هورمون موجب کاهش چشمگیری (۶۳ درصد) در تعداد رویان‌های کروی گردید (۲/۱ رویان کروی با تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در ماه سوم به دست آمد).

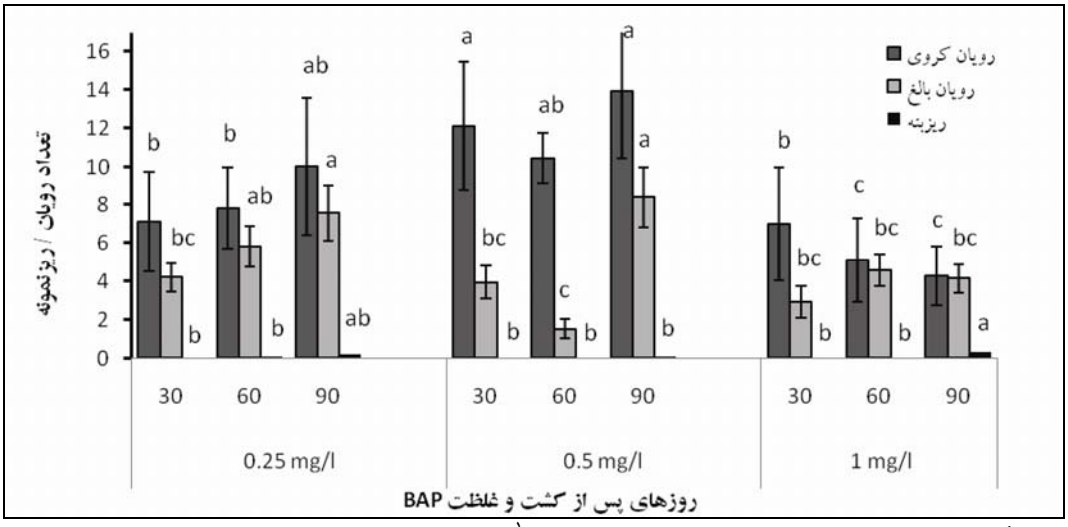


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA در محیط‌کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

بر خلاف مرحله القای رویان‌های کروی، بلوغ و جوانه‌زنی رویان‌ها در این محیط‌کشت تقریباً وابسته به زمان و غلظت هورمون‌های به کار برده شده بود. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، نتایج حاصل از پیشبرد بلوغ رویان‌های کروی تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به طور متوسط باعث جوانه‌زنی ۵/۷- ۶/۴ عدد رویان در طول ماه‌های اول و دوم شد و با غلظت ۲mg/l این تنظیم‌کننده رشد تعداد رویان‌های بالغ حدود ۲۶ درصد افزایش یافت (میانگین ۸/۱ عدد رویان بالغ به ازای هر ریزنمونه در محیط حاوی ۲ mg/l IBA در برابر ۶/۴ عدد رویان بالغ در محیط حاوی ۰/۵ mg/l IBA). افزایش زمان نگهداری ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف IBA نیز همانند اثر هورمون NAA اثر نامطلوبی به جا گذاشت و ۲۰- ۳۰ درصد از تعداد رویان‌های بالغ کاست. البته، کاهش تعداد رویان‌های بالغ به طور مستقیم با سیر تکاملی رویان‌ها در جهت تشکیل ریزبنه ارتباط داشت. برای مثال، طی تیمار با ۱ mg/l IBA میانگین تولید ریزبنه به ازای هر ریزنمونه ۰/۸عدد بود ودر ماه‌های بعد این تعداد افزایش یافت. بیشترین تعداد ریزبنه (۲/۱ و ۱/۹) به ترتیب در پایان ماه سوم طی تیمار رویان‌های کروی با ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. این ریزبنه‌ها پس از چند بار واکشت، ظاهری شبیه بنه‌های طبیعی با همان فلس‌های قهوه‌ای رنگ پیدا کردند که برای آزمایش‌های بعدی از قطعه بنه مادری جدا و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف BAP، از تنظیم‌کننده‌های سیتوکینینی، بر روی میزان جوانه‌زنی رویان‌های کروی و تشکیل ریزبنه (شکل ۴) مشخص گردید که این هورمون در غلظت ۰/۵ mg/l دارای بیشترین تأثیر در القای رویان‌های کروی بر روی سطوح ریزنمونه‌ها

بود و این اثر خود را حتی تا ماه سوم نیز حفظ کرد. بیشترین تعداد رویان کروی مشاهده شده به ازای هر ریزنمونه در ماه‌های اول تا سوم به ترتیب برابر ۱۲/۱، ۱۰/۴ و ۱۴ عدد بود، درحالی که در غلظت ۱ mg/l BAP تعداد رویان‌های کروی به ترتیب به ۷، ۵/۱ و ۴/۳ کاهش یافت.



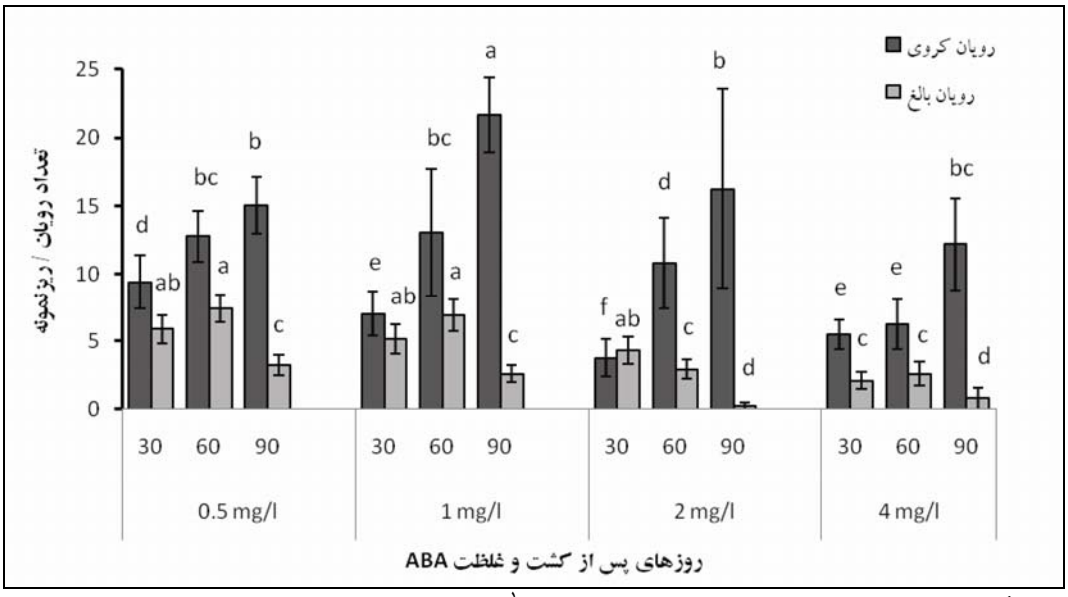
شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP در محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

از طرف دیگر، فراوانی تشکیل رویان‌های بالغ و جوانه‌زنی آنها در غلظت‌های پایین BAP نسبت به غلظت‌های بالاتر (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشتر بود؛ چنانکه در غلظت ۰/۲۵ mg/l تعداد رویان‌های جوانه‌زده بر روی هر ریزنمونه طی ماه‌های اول تا سوم از ۴/۲ به ۷/۶ رویان افزایش یافت، درحالی که در غلظت ۱ mg/l BAP تعداد رویان‌های جوانه‌زده از ۲/۹ به ۴/۲ رسید. در غلظت ۰/۵ mg/l بنزیل آدنین آمینوپورین علی‌رغم بالا بودن تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده بر روی ریزنمونه‌ها، تعداد رویان‌های بالغ شده در ماه اول و دوم به ۳/۹ و ۱/۵ عدد رسید و حتی در ماه دوم تغییر شکل غیر طبیعی تعدادی از رویان‌های جوانه‌زده را نیز نشان داد، اما با گذشت زمان؛ یعنی در ماه سوم میزان تمایز رویان‌های کروی به رویان‌های بالغ به طور معنی‌داری افزایش یافت و به ۸/۴ عدد رسید.

به طور کلی، مجموعه تیمارهای BAP از نظر تولید ریزبنه از ارزش کمتری برخوردار بود. میانگین ریزبنه‌زایی در غلظت‌های ۰/۲۵ mg/l و ۱ mg/l به ترتیب ۰/۲ و ۰/۳ ریزبنه به ازای هر ریزنمونه بود که نسبت به تیمارهای NAA ناچیز است.

چهارمین تیمار هورمونی آزمایش شده برای پیشبرد بلوغ رویان‌های کروی زعفران، آبسزیک اسید بود. این هورمون در چهار غلظت ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌های کشت MS ۱/۲ استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که این ترکیب در دو غلظت اول اثر بارزی در تحریک کالوس‌های رویان‌زای زعفران در جهت تشکیل

رویان‌های کروی و رویان‌های جوانه‌زده داشت. اثر این هورمون در مورد تشکیل رویان‌های کروی در طول زمان به صورت تصاعدی افزایش یافت (شکل ۵). برای مثال، تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده در ماه اول تا سوم در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برابر ۹/۴، ۱۲/۷ و ۱۵/۱ و در غلظت ۱ mg/l برابر ۷/۱، ۱۳/۱ و ۲۶/۱ عدد به ازای هر ریزنمونه بود. روند فوق با غلظت ۲ mg/l نیز به همین ترتیب دنبال شد؛ به طوری که بیشترین تعداد رویان‌های کروی؛ یعنی ۲۱/۶ و ۱۶/۳ عدد به ازای هر ریزنمونه در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف ABA در محیط‌کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی و بلوغ رویان‌ها در طول سه ماه، تولید ریزبنه در این گروه از تیمارها اغلب برابر صفر یا بسیار محدود بود. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

همان طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، در کوتاه مدت، غلظت‌های کم ABA (۱ mg/l و ۰/۵) نقش مؤثری در پیشبرد مراحل تکوین رویان تا مرحله بلوغ و جوانه‌زنی داشتند، اما ریزبنه‌ها تمایز پیدا نکردند. افزایش دوره نگهداری در این نوع محیط‌کشت باعث سیاه شدن رویان‌های بالغ و از بین رفتن آنها شد. برای مثال، تعداد رویان‌های بالغ در محیط‌کشت حاوی ABA ۰/۵ mg/l از ۷/۴ در ماه اول به ۳/۳ در ماه سوم و در محیط حاوی ABA ۴ mg/l از ۲/۱ به ۰/۸ رویان طی ماه‌های اول تا سوم کاهش یافت، درحالی که در همین زمان و همین ترکیب محیط‌کشت میانگین تعداد رویان‌های کروی از ۵/۵ به ۱۲/۲ عدد افزایش یافته بود.

برعکس، در مورد تشکیل رویان‌های بالغ، واکشت‌های متعدد و نگهداری طولانی مدت در محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف ABA منجر به عدم رشد و نمو طبیعی رویان‌ها شد و علی رغم تعداد بالای رویان‌های کروی، تعداد رویان‌های جوانه‌زده به شدت کاهش یافت و حتی به کمتر از ۵۰ درصد تعداد رویان‌های بالغ در ماه اول و دوم

نیز رسید. این پدیده با افزایش غلظت ABA در محیط بلوغ بیشتر مشاهده شد.

بحث

رویان‌زایی رویشی فرآیند تکاملی پیچیده‌ای است که از بسیاری جهات شبیه رویان‌زایی زایشی است. در مرحله اول، بافت‌های رویشی با تمایز زدایی توانایی رویان‌زایی را کسب می‌کنند (مرحله القا) و پس از دریافت محرک مناسب مراحل تکاملی شروع می‌شود. در نهایت طی بلوغ، رویان‌های بدنی برای جوانه‌زنی آماده می‌شوند. این مرحله پس از آبگیری و انباشتگی ذخایر دنبال می‌شود. رویان‌زایی بدنی ممکن است در پاسخ به علامت‌های متعدد، ازجمله حضور اکسین و عوامل تنش‌زا آغاز شود. سطح هورمون‌های درون‌زا و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت، یکی از مهمترین عوامل برای دست‌یابی به واکنش ریخت‌زایی مناسب است (Grieb *et al.*, 1997). بنابراین، بررسی نتایج حاصل از تغییر غلظت و نوع هورمون‌های موجود در محیط‌کشت و پاسخ رویان‌زایی زعفران در هر مرحله باید مورد توجه قرار گیرد.

در بیشترمقالاتی که اخیراً چاپ شده است، حضور اکسین‌ها به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها برای القای رویان‌زایی رویشی ضروری گزارش شده است (Gaj, 2004; Rajabpoor *et al.*, 2007). مروری بر نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که کاربرد اکسین‌های برون‌زا کارآمدترین تیمار برای القای رویان‌زایی بدنی در زعفران است، ولی تکامل بیشتر رویان‌های موجود به واسطه کاهش یا حذف اکسین از محیط‌کشت و حضور ABA تأمین می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان اظهار نمود که هرچند در ماه اول کشت وجود NAA در محیط القای بلوغ رویان‌های کروی زعفران زراعی محرک تولید تعداد بیشتری از رویان‌های کروی در سطح ریزنمونه است، اما نگهداری طولانی مدت ریزنمونه‌ها در این محیط‌ها نه تنها باعث افزایش قابل ملاحظه تعداد رویان‌های بالغ نشد، بلکه از تعداد رویان‌های کروی نیز کاست و به این ترتیب، توان بالقوه این ریزنمونه‌ها را برای تولید ریزبنه کاهش داد. برعکس، عامل زمان در این رابطه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بود؛ چنانکه در ماه دوم بیشترین تعداد رویان‌های بالغ و در ماه سوم بیشترین تعداد ریزبنه با تیمار NAA به دست آمد، اما در نخستین ماه کشت ریزنمونه‌ها، هیچ یک از غلظت‌های NAA به کار برده شده در محیط‌کشت نتوانستند محرک بلوغ رویان‌های کروی و تولید ریزبنه باشند.

هرچند تنظیم‌کننده رشد IBA به اندازه NAA در تکثیر و افزایش تعداد رویان‌های کروی القا شده بر روی هر ریزنمونه کارآیی لازم را نداشت و در مقایسه با NAA قدرت آن حتی به نصف کاهش می‌یافت، اما مکانیسم تأثیر آن تقریباً شبیه ترکیب اخیر بود؛ بدین ترتیب که تنظیم‌کننده رشد IBA در غلظت‌های کم و در ابتدای زمان کشت، محرک القای رویان‌های کروی در سطح کالوس‌های رویان‌زا بود، اما بعداً اثر آن به سرعت تعدیل شد. به احتمال زیاد، در این مرحله ژن‌های مؤثر در مسیر تکوین و تمایز رویان‌ها فعال شده بودند. با افزایش غلظت هورمون فوق سرعت این فرآیندها با روند تصاعدی افزایش یافت به طوری که در ماه اول میانگین ۶/۴ رویان جوانه‌زده در غلظت ۰/۵ mg/l و ۸/۱ رویان بالغ در غلظت ۲ mg/l ثبت شد و در ماه سوم به ازای ۴/۳ رویان بالغ در غلظت ۰/۵ mg/l حدود ۶/۵ رویان بالغ در غلظت ۲ mg/l حاصل شد. به همین ترتیب، شاخص تشکیل ریزبنه نیز افزایش

یافت. به عبارت دیگر می‌توان در ماه اول با کاربرد mg/l ۰/۵ از هورمون IBA ابتدا تعداد رویان‌های کروی را افزایش داد و سپس با بالا بردن غلظت این هورمون تا mg/l ۲ علاوه بر این که تعداد رویان‌های بالغ را می‌توان در سطح نسبتاً بالایی حفظ کرد، تعداد ریزبنه‌های تمایز یافته نیز تا حد قابل قبولی ارتقا می‌یابد. یکی از اهداف ارزشمند مورد مطالعه در بحث رویان‌زایی زعفران مزروعی تشکیل ریزبنه است. از این نظر تیمارهای IBA نقش تأثیرگذاری در تمایز نوشاخه‌ها در ارتباط با ذخیره‌سازی نشاسته و تشکیل ریزبنه‌ها داشتند، تا آنجا که حتی در ماه اول کشت، آثار تورم در بخش قاعده‌ای نوشاخه‌ها مشاهده شد. Grieb و همکاران (۱۹۹۷) نشان داده‌اند که مرحله بلوغ رویان‌های بدنی و آمادگی آنها برای جوانه‌زنی، تنها پس از آبگیری و انباشتگی ذخایر صورت می‌گیرد. بنابراین، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر IBA که با پیشبرد تمایز سیستم آوندی انتقال ذخایر به بخش قاعده‌ای نوشاخه را سرعت می‌بخشند، تمایز ریزبنه را که از نظر گیاه‌شناسی ساقه زیرزمینی غنی از نشاسته است، افزایش می‌دهد. با گذشت زمان در ماه‌های دوم و سوم همراه با کاهش مختصر در تعداد رویان‌های کروی و جوانه‌زده تعداد ریزبنه‌ها در این گروه از تیمارها به تدریج افزایش نسبی یافت.

در رابطه با آثار مثبت NAA و IBA بر روی تکوین رویان‌های کروی زعفران، گزارش‌های تأیید کننده متعددی وجود دارد؛ از جمله Karaoğlu و همکاران (۲۰۰۷) از طریق کشت قطعات بنه زعفران و القا رویان‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی BAP و NAA موفق شدند به طور میانگین ۱-۲ ریزبنه در هر ریزنمونه تولید نمایند. همچنین، ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۳۸۵) نیز القای کالوس‌های رویان‌زا را در غلظت‌های بالای 2,4-D و غلظت‌های پایین کینتین گزارش کرده‌اند. آنها نشان دادند که NAA به عنوان یک اکسین برون‌زا محرک رویان‌زایی در گونه‌های مختلف زعفران (زراعی و وحشی) است. کاربرد تیمارهای هورمونی مختلف در محیط‌کشت پیاز گلایول نیز نشان داد که هرچند کاربرد اکسین‌ها به تنهایی خواب جوانه را می‌شکنند، اما همچون زعفران، NAA اثر مستقیمی بر غده‌زایی ریزنمونه‌های گلایول نداشت (Nasir *et al.*, 1996).

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها از جمله متداول‌ترین ترکیبات استفاده شده برای گذار از مرحله رویشی به مرحله رویانی هستند. اثبات شده است که کالوس‌های رویان‌زا دارای مقادیر بالاتری از IAA آزاد هستند. تراز بالای IAA آزاد می‌تواند در پایه‌گذاری انتقال قطبی اکسین که برای تکمیل مراحل رویان‌زایی رویشی و تکوین اندام‌ها لازم است، مهم باشد. هنگامی که شرایط مناسب باشد و به محض تحریک کافی، احتمالاً با برقراری یک شیب اکسین درونی در ریزنمونه‌ها رویان‌زایی صورت می‌گیرد (Jimenez and Bangerth, 2001). از طرف دیگر، سطوح بالای اکسین از رشد و نمو مریستم نوشاخه ممانعت می‌کند. اگر غلظت اکسین کم باشد، پس از تشکیل لپه، شکل‌گیری مریستم ساقه خیلی سریع انجام می‌شود و سپس تحت شرایط مناسب محیط‌کشت جوانه‌زنی زود رس انجام می‌شود (Pareek, 2005).

نقش BAP در القای رویان‌زایی زعفران به غلظت این ماده در محیط‌کشت وابسته بود و به نظر می‌رسد که احتمالاً اثر خود را از طریق ایجاد توازن با اکسین‌های درون‌زا و تنظیم نسبت سیتوکینین به اکسین انجام می‌دهد؛ به طوری که با دو برابر شدن غلظت BAP از mg/l ۰/۲۵ به mg/l ۰/۵ این هورمون نقش مهمی در القای و تشکیل

رویان کروی داشت، اما با افزایش غلظت آن از ۰/۵ mg/l به ۱ mg/l این اثر معکوس شد و القای رویان‌های کروی به شدت قابل ملاحظه‌ای افت کرده تعداد آنها به نصف تقلیل یافت. در تک لپه‌ای‌ها، رویان‌زایی اولیه منحصراً در محیط‌های کشت حاوی اکسین القا می‌شود، اما القای رویان‌زایی بدنی توسط سیتوکینین‌ها هم به اثبات رسیده است (Faure *et a1*., 1998). در این تحقیق، علی‌رغم نقش مؤثر هورمون BAP در القای و تشکیل رویان‌های کروی زعفران زراعی و بلوغ آنها در طول یک دوره سه ماهه، کاربرد این تنظیم‌کننده رشد در رابطه با تولید ریزبنه موفقیتی در پی نداشت و تنها تعداد ناچیزی از رویان‌های جوانه‌زده در ماه سوم قدرت ذخیره‌سازی نشاسته در سلول‌های قاعده‌ای نوشاخه و تبدیل آنها به بافت‌های ریزبنه را پیدا کردند. کاربرد تنظیم‌کننده‌های سیتوکینینی نظیر کینتین، زاتین، بنزیل آمینو پورین و تیدیازرون در محیط‌های کشت ریزنمونه‌های بنه، مریستم و برگ زعفران نتایج مشابهی را در رابطه با القای کالوس‌های رویان‌زا و جوانه‌زنی آنها نشان داده است (Karamian, 2004; Majourhat *et al*., 2006; Raja *et al*., 2007).

در مطالعه باززایی گلایول، Nasir و همکاران (۱۹۹۶) نیز نشان دادند که القا و تشکیل پیاز در ریزنمونه‌های حاوی جوانه در محیط‌کشت حاوی NAA ۰/۰۲ mg/l و BAP ۰/۰۸ mg/l تحریک شد. از طرف دیگر، افزودن کینتین موجب القای تشکیل پیازهای جدید گلایول شد.

در بین بازدارنده‌های رشد، آبسزیک اسید نقش ویژه‌ای را در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه، از جمله تکامل مراحل نموی رویان‌های زایشی ایفا می‌کند. سرعت بلوغ رویان‌های بدنی زعفران زراعی در غلظت‌های کم ABA و در ماه‌های اولیه کشت رضایت بخش بود، اما از جوانه‌زنی رویان‌های بالغ و تشکیل ریزبنه‌ها در این محیط‌های کشت ممانعت شد. نتایج فوق با گزارش‌هایی مطابقت دارد که طبق آنها استفاده از آبسزیک اسید برون‌زا در شرایط درون شیشه‌ای موجب ممانعت از جوانه‌زنی رویان‌های بالغ، افزایش سنتز پروتئین‌های ویژه رویانی و سنتز mRNAهای مربوطه می‌شد (Zeevaart and Creelman, 1988). تحقیقات انجام شده دربارهٔ گیاهانی مانند هویج، یونجه، کاسنی و جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس مشخص کرده است که در اکثر آنها در اواخر دوره رویان‌زایی، بیان برخی ژن‌ها مانند LEA (Late Embryo-Abundant) تحت تأثیر هورمون ABA تشدید می‌شود. عملکرد این ژن‌ها در رویان‌های زایشی باعث حفاظت ساختارهای سلولی رویان‌های بالغ در طول خشک شدن بذر و جلوگیری از جوانه‌زنی زودرس می‌شود (Jimenez *et al*., 2005).

با توجه به نتایج به دست آمده در نتیجه کاربرد هورمون فوق در محیط‌کشت القاکنندهٔ بلوغ رویان‌های کروی زعفران می‌توان اظهار داشت که احتمالاً غلظت‌های ۰/۵ – ۱ mg/l هورمون ABA محرک رونویسی از ژن‌هایی است که در مراحل اولیه تا میانی رویان‌زایی فعال هستند. بیان این ژن‌ها به تولید و تکثیر رویان‌های کروی منجر می‌شود که حتی تا ماه سوم نیز مرحله تمایزی خود را حفظ می‌کردند. تعدادی از این رویان‌ها به سرعت وارد مراحل پیشرفته‌تر شده، باعث تشکیل رویان لپه‌ای و جوانه‌زنی آنها حتی در ۳۰ روز اول کشت شدند. بنابراین، تعداد قابل توجهی رویان بالغ در حضور غلظت‌های پایین ABA تولید می‌کردند. از طرف دیگر، افزایش غلظت ABA (بیشتر از ۲ mg/l) بر روی تکوین رویان‌های کروی و جوانه‌زنی رویان‌های بالغ تأثیرات منفی به جا گذاشت و با ورود به سومین ماه کشت ریزنمونه‌ها، این اثرات ممانعت کننده

تشـــدید شـــد تـــا آنجـــا کـــه بـــا کـــاربرد ۴ mg/l تأثیرات بازدارنده کاربرد ABA نـه تنهـا در مرحلـه بلوغ و جوانه‌زنی، بلکه بر روی القای رویان‌های کروی نیـز آثار ناهنجاری باقی گذاشت و همزمان از تعداد رویان‌هـای کروی و جوانه‌زده کاسته شد.

صـرفنظر از نقـش ABA در تسـریع بلـوغ رویـان‌هـای زعفران، این ترکیب محرک تشکیل ریزبنـه نبـود. در واقـع، القای ریزبنه‌ها در هیچ کـدام از محیط‌هـای کشـت حـاوی ۴ mg/l -۱ از ABA رضـایت بخـش نبـود و عـدم انتقـال رویان‌های بالغ و جوانه‌زده به محیط‌های عـاری از ABA بـه تدریج موجب زوال رویان‌هـا و سـیاه شـدن آنهـا شـد. ایـن مسأله با نظر پژوهشگرانی منطبق است که معتقدند مشخصـه برجسته و قابل توجه رویان‌های بـدنی، رشـد آنهـا در نتیجـه عدم حضور بازدارنده‌های رشد اسـت. بـرای مثـال، Raja و همکاران (۲۰۰۷) از تیمار ۲ میلی‌گـرم در لیتـر ABA و ۲۰ میلی‌گـرم در لیتـر GA_3 بـرای جوانـه‌زنـی رویـان‌هـای بـالغ زعفران استفاده کردند. بر اساس نتـایج Ahuja و همکـاران (۱۹۹۴) پس از القای رویان‌زایی در ریزنمونه‌هـای زعفـران، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های کامل تنها در حضور هورمون تأمین گردید. تحقیقات Ginzburg (۱۹۷۳) و Ginzburg و Ziv (۱۹۷۳) نیز اثبات کرده است که گرچه ABA به عنوان مهمترین بازدارنده رشد درون‌زا، جوانه‌زنی پیـاز گلایـول را کنترل می‌کرد، اما حضور ABA در محیط‌کشت بر قـدرت تشکیل پیاز آن اثر مثبتی نداشته، حتی از رشد آن جلوگیری کرد.

از طـرف دیگـر، تکامـل مراحـل رویـانی زعفـران، بـه خصوص تمایز ریزبنه‌ها، در غلظت‌های بـالای سـاکاروز (۶ درصـد) رخ داد. سـطوح بـالای سـاکاروز سـبب افـزایش اسمولاریته محیط کشت می‌شود. این فرآیند می‌تواند باعث افزایش سطح ABA درون‌زا و کنترل بلـوغ رویـان‌هـا شـود (Komatsuda and Ohyama, 1998). همان طور کـه طـی اندام‌زایی *Adenia hondala*، همبستگی مثبتی بین انباشتگی نشاسـته و سـرعت تمـایز مشـاهده گردیـد (Aruna *et al.*, 2009)، غلظت بالای ساکاروز در محیط‌کشـت زعفـران و انباشـتگی نشاسـته بـه عنـوان یـک منبـع انـرژی ارزان و در دسترس برای فرآیندهای اندام‌زایی و یا به عنوان یک عامل تنظیم اسمزی (مانند قنـدهای محلـول آزاد) در نمـو وتمـایز اندام‌ها ضروری است؛ هر چند ممکن است تصور شود کـه تعداد ریزبنه‌هـای تشـکیل شـده در سـطح ریزنمونـه‌هـا کـم است، اما با توجه به تعداد ریزنمونه‌هـا در هـر پتـری‌دیـش و تعداد تکرارهـای هـر تیمـار نتـایج بـه دسـت آمـده در ایـن پژوهش قابل تأمل اسـت. بـر اسـاس گـزارش‌هـای موجـود تعداد شاخه‌هایی که به ازای یک ریزنمونه بـر روی گیاهـان پیازدار تشکیل مـی‌شـود، بسـیار کـم اسـت. بـرای مثـال، در *Eucrosia stricklandii* در نتیجـه تیمـارهـای هورمـونی مختلف ۰/۷ -۲/۲ نوشاخه تشـکیل شـده بـود (Colque *et al.*, 2002). در پـژوهش حاضـر نیـز بـا ترکیـب هورمـونی IBA ۱ mg/l بـه طـور متوسـط ۲/۰۷ عـدد ریزبنـه در هـر ریزنمونه به دست آمد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد رویـان کـروی زعفـران زراعـی ظـرف مـدت ۳۰ روز در محـیط MS ½ حاوی NAA ۰/۱ mg/l تشـکیل شـدند، امـا ایـن محـیط در مقایسـه بـا محـیط‌هـای حـاوی BAP و IBA بـرای بلـوغ رویان‌های کروی مناسب نبود. استفاده از هورمـون IBA در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر پـس از گذشـت دو مـاه بهترین تیمار برای القای بلوغ رویان و تشکیل ریزبنه بود. هر

چند در پایان ماه سوم بیشترین تعداد رویان بالغ در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ mg/l BAP به دست آمده بود، ولی تداوم کاربرد هورمون فوق در ریزبنه‌زایی مؤثر واقع نشد. غلظت‌های مختلف ABA موجب تحریک بلوغ رویان‌های کروی شد، اما تأثیری در ریزبنه‌زایی نداشت. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد برای پیشبرد بلوغ رویان‌زایی در زعفران مزروعی از غلظت‌های کم ABA (۰/۲۵ -۱ mg/l) و آن هم فقط در ماه‌های اول و دوم کشت استفاده شود. سپس ریزنمونه‌های واجد رویان‌های بالغ به محیط‌های کشت عاری از ABA منتقل شوند که حاوی تنظیم‌کننده‌های مصنوعی IBA هستند. همان طور که گفته شد، هورمون اخیر بر روند تمایز و تکوین ریزبنه‌ها دارای آثار مثبت و چشمگیری است که آن را از سه ترکیب هورمونی دیگر متمایز می‌نماید. در نهایت، می‌توان اظهار نمود که برای کنترل مراحل القا و پیشرفت در هر مرحله رویانی، نیازهای متفاوتی وجود دارد. این پیچیدگی در رابطه با شناسایی چگونگی تکامل بیوشیمیایی و فیزیولوژیک رویان‌های رویشی و نقش هورمون‌های گیاهی و تنظیم‌کننده‌های رشد یک مانع اساسی است. از این رو، تحقیقات بیشتر در آینده می‌تواند به فهم مکانیسم عمل این هورمون‌ها در پیشبرد مراحل رویان‌زایی زعفران کمک کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از یک پایان‌نامه کارشناسی ارشد از دانشگاه الزهراء (س) است که در قالب طرح پژوهشی در مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کمک‌ها و پشتیبانی ریاست محترم مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی و همکاران بخش کشت بافت و انتقال ژن قدردانی کنند.

منابع

ابراهیم‌زاده، ح.، رجبیان، ط.، کرمیان، ر.، ابریشم‌چی، پ. و صبورا، ع. (۱۳۸۵) زعفران ایران با نگاه پژوهشی. انتشارات اطلاعات، تهران.

Ahuja, A., Kaul, S., Ram, G. and Kaul, B. L. (1994) Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron (*Crocus sativus* L.). Indian Journal of Experimental Biology 32: 135-140.

Aruna, A., Joseph, J. P. and Joseph, G. (2009) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis in *Adenia hondala* (Gaertn.) de Wilde, an endangered medicinal plant of the Western Ghats (Report). International Journal of Biotechnology and Biochemistry.

Blazquez, S., Olmos, E., Hernandez, J. A., Fernandez, N., Fernandez, J. A. and Piqueras, A. (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. Plant Science 97(1):49-57.

Colque, R., Villadomat, F., Bastida, J. and Codina, C. (2002) Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (Amaryllidaceae) by twin-scaling and shake liquid culture. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77(6): 739-743.

Ebrahimzadeh, H., Rajabian, T. and Karamian, R. (2000) *In vitro* production of floral buds and stigma-like structures on floral organ of *crocus sativus* L.. Pakistan Journal of Botany 32(1): 141-150.

Ebrahimzadeh, H., Saboora, A., Noori-Daloii, M. R. and Gaffari, M. R. (1998) Chromosomal

studies on four Iranian *Crocus* species (Iridacea). Iranian Journal of Botany 7(2): 179-192.

Faure, O., Dewitte, W., Nougarede, A. and Van Onckelen, H. (1998) Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. Physiologia Plantarum 102: 591-595.

Fernandez, J. A. (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Plant Science 2: 127-159.

Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L.. Plant Growth Regulation 43: 27-47.

George, P. S., Visvanath, S., Ravishakar, G. A. and Venkataraman, L. V. (1992). Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food Biotechnology 6 (3): 217-223.

Ginzburg, C. (1973) Hormonal regulation of cormel dormancy in *gladiolus grandiflorus*. Journal of Experimental Botany 24: 558-566.

Ginzburg, C. and Ziv, M. (1973). Hormonal regulation of cormel formation in *gladiolus* stolon grown *in vitro*. Annual Bototany 37: 219-224.

Grieb, B., Schafer, F., Imani, J., Mashayekhi, K. N., Arnholdt-Schmitt, B., and Neumann K. H. (1997) Changes in soluble proteins and phytohormone concentration of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). Journal of Applied Botany 71: 94-103.

Jimenez, V. M. and Bangerth, F. (2001) *In vitro* culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus culture of normal and high-lysine barley genotypes. Journal of Applied Botany 75: 1-7.

Jimenez, V. M. and Thomas, C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: Somatic embryogenesis (eds. Mujib, A. and Šamaj, J.) 103-118. Speringer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Karamian, R. (2004) Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. Acta Horticulture 650: 253-259.

Karaoğlu, C., Çöcü, S., Ipek, 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. Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture 739: 223-227.

Komatsuda, T. and Ohyama, K. (1998) Genotypes of high competence for somatic embryos and plantlet regeneration in soybean (*Glycine max*). Theoretical Applied Genetic 75:695-700.

Majourhat, K., Marinez, P., Fernandez, J. A. and Piqueras, A. (2006) Enhanced plantlet regeneration from cultured meristems in sprouting buds of saffron corms. Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture.

Murashing, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue culture. Physiology of Plant 15: 437-493.

Nasir, I. A., Afrasiab, H. and Riazuddin, S. (1996) Plant regeneration of *gladiolus* through *in vitro* technique. Pakistan Journal of Biological Science 4: 165-169.

Pareek, L. K. (2005) Trends in plant tissue culture and biotechnology. Agro Botanical Publishers, Nagar Bikaner.

Raja, W., Zaffer, G. and Wanti, S. A., (2007). *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture 739:291-301.

Rajabpoor, Sh., 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 of Biological Sciences 10(21): 3927-3930.

Sharma, K. D., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T. R. and Singh, B. M. (2008) *In vitro*

cormlet development in *Crocus sativus*. Biologie Plantarum 52(4):709-712.

Sheibani, M., Azghandi, A. V. and Nemati, S. H. (2007) Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ). Pakistan Journal of Biological Science 10: 3564-3570.

Zeevaart, J. A. D. and Creelman, R. A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 39: 439-473.

Changes in exogenous hormone concentration and its effect on somatic embryo maturation and microcorm formation of saffron (*Crocus sativus* L.)

Shakiba Rajabpoor [1], Azra Saboora *[2] and Ali Vatanpour Azghandi

[1] Department of Biology, Payame Noor University, 19395-4697 Tehran, I. R. of IRAN
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[3] Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agriculturel Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is an important economic crop in Khorasan province which is propagated by corms. The traditional culture has various problems such as pathogen attack and a long period of time for proliferation. Application of plant growth regulators and induction of somatic embryogenesis is an efficient method to propagate a large number of intact corms in *in vitro* condition. In this research, effects of four exogenous hormones during 90 days on maturation of globular embryo, its germination and microcorm induction of saffron by using half strength Murashige and Skoog media were studied. Investigated phytohormones were NAA (0.1, 0.25 and 0.5 mg l^{-1}), IBA (0.5, 1 and 2 mg l^{-1}), BAP (0.25, 0.5 and 1 mg l^{-1}) and ABA (0.5, 1, 2 and 4 mg l^{-1}). All treatments carried out based on completely randomized design in 4 replicates. Results showed that the most number of globular somatic embryos were obtained in ½ MS medium containing 0.1 mg l^{-1} NAA, but this media in relation to which were contained BAP or IBA was not suitable for maturation. After 60 days, the media supplied with 1 and 2 mg l^{-1} IBA were the best for induction of embryo maturation and cormlet formation. Although at the end of 90 days, highest number of mature embryos was obtained in the presence of 0.5 mg l^{-1} BAP, microcorm induction did not occurred by BAP treatments in long term. Different concentration of ABA quickly improved maturation of globular embryos but they had no positive effect on cormlet regeneration.

Key word: Embryo maturation, Hormone treatment, Microcorm, Saffron, *Crocus sativus* L.

* Correspong Author: saboora@alzahra.ac.ir