Plant Prod., 42(4) (2019) 429-440 ISSN (P): 2538-543x
DOI: 10.22055/ppd.2019.25898.1603 ISSN (E): 2588-5979

In Vitro Regeneration of Ornamental Crocus (*Crocus vernus* L.) by Using Plant Growth Regulators

Sara Parvin[1], Mohammad Hosein Daneshvar[2]* and Amin Lotfi Jalal Abadi[3]

1- M.Sc. Graduate of Horticulture, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2- ***Corresponding Author:** Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran (mhdaneshvar2004@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 19 May, 2018 Accepted: 16 January, 2019

Abstract

Background and Objectives

Crocus flower, which belongs to Iridaceae family, is one of the most important ornamental bulbous plants. The propagation of *Crocus vernus* L. by corm is not commercially affordable due to transmission of fungal and bacterial diseases as well as the long dormancy period which takes 4 to 5 months. Thus, *in vitro* culture of *Crocus vernus* is a suitable solution for commercial reproduction. Plant tissue culture technique would be a better alternative for improving quality and production.

Materials and Methods

In order to micropropagate ornamental saffron, the effect of different culture media on direct organogenesis experiment was conducted in factorial arrangement in a completely randomized design with 3 replications in the tissue culture lab of the Department of Horticulture at Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan from 2015 to 2016. The explants used in this experiment were latheral and terminal buds which were evaluated in 10 hormons treatments and control in the Murashige and Skoog medium (MS). To eliminate surface contamination, the explants were first immersed under water for 30 minutes after placing the corms. Next, they were placed in high temperature Benlate fungicide solution (55° C) for 30 minutes. Then, they were put in 70% ethanol (ethyl alcohol) for 30 seconds and 15% Sodium hypochlorite solution for 6 minutes. The explants were finally washed three times with sterile distilled water under the air flow bench. The effects of plant growth regulators including BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/l), TDZ (0.5, 0.75, 1.0 mg/l), Kin (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and 0.1mg/l IBA in direct regeneration were investigated.

Results

The results showed that the kind of plant growth regulators (PGR) and the explant type are very important in regeneration of *Crocus vernus* so that we can not secure any shoots without PGR. In direct organogenesis experiment, the maximum number of multiple shoots (15.84) was obtained from apical bud explant in MS medium supplemented with 5/0 mg/l TDZ along with 5/0 mg/l BAP, 5/0 mg/l KIN and 1/0 mg/l IBA, after 10 weeks, that had a significant difference with other

treatments at 1% Duncan test. We observed 2.o mg/l BAP along with 1/0 mg/l IBA had the greatest effect on the number of corms.

Discussion

The results showed the shoot regeneration is controlled by the ratio of cytokinin with auxin. It should be mentioned that cytokinin plays a role in the synthesis of RNA, stimulation of the production of protein, and the activity of some enzymes. The results also indicated that the use of cytokinin along with auxin has a beneficial effect on shoot regeneration.

Keywords: *Crocus vernus*, Direct organogenesis, MS medium, Shoot regeneration

باززایی درون شیشه‌ای گیاه زعفران زینتی (*Crocus vernus* L.) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

سارا پروین[۱]، محمد حسین دانشور[۲]* و امین لطفی جلال‌آبادی[۳]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(mhdaneshvar2004@yahoo.com)

۳- استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

چکیده

زعفران زینتی از تیره زنبقیان (Iridaceae) یکی از مهم‌ترین گیاهان پیازی زینتی است. تکثیر این گیاه به‌وسیله پداژه به دلیل انتقال انواع بیماری‌های قارچی و باکتریائی و نیز دوره خفتگی طولانی ۴ تا ۵ ماهه، از نظر تجاری مقرون به‌صرفه نمی‌باشد. بنابراین تکثیر زعفران زینتی از طریق کشت درون شیشه‌ای راهکار مناسبی برای تکثیر تجاری آن است. به منظور ریزازدیادی زعفران زینتی، اثر محیط‌های کشت مختلف در آزمایش اندام‌زایی مستقیم به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، در سال ۹۵-۱۳۹۴ انجام شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش جوانه‌های انتهایی و جانبی بودند که در ۱۰ تیمار هورمونی و کنترل در محیط کشت MS مورد آزمایش قرار گرفتند. برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌ها پس از قرارگیری در زیر آب جاری به‌مدت ۳۰ دقیقه از تیمار قارچ‌کش بنلیت محلول در آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار آبکشی در آب مقطر استریل و هیپوکلرید سدیم ۱۵ درصد به مدت ۶ دقیقه و سه بار آب‌کشی استفاده شد. تیمارهای هورمونی مورد استفاده شامل BAP (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، TDZ (۰/۵، ۰/۰۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بودند. نتایج نشان داد بیشترین طول شاخساره و تعداد آن حاصل از ریزنمونه جوانه انتهائی و محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ،۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید گردید که با سایر تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار داشت. همچنین نتایج نشان داد محیط کشت MS همراه با ۲ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین اثر را روی تعداد پداژک های تولیدشده زعفران زینتی داشت.

کلیدواژه‌ها: باززایی مستقیم، جوانه انتهائی، محیط کشت MS، نوع ریزنمونه

مقدمه

زعفران زینتی با نام علمی *Crocus vernus* L. از تیره زنبقیان است. زیستگاه این گیاه آسیا، اروپا و آفریقای شمالی می‌باشد. زعفران گیاهی پایا، علفی و دارای گل‌آذین کامل است. ساقه آن بسیار کوتاه و زیرسطح خاک قرار می‌گیرد (Mathew, 1982). روش مرسوم و متداول تکثیر زعفران به‌وسیله پداژه‌ها می‌باشد (Gholizade *et al.*, 2017). درحالی‌که میزان پایین تولید پداژه سبب کاهش تعداد گل در سال بعد می‌شود. این گیاه از گونه‌های زینتی کم دوام می‌باشد ولی به دلیل تنوع رنگ

گل به یکی از گل‌های زینتی با ارزش تبدیل شده است و استفاده فراوانی در باغبانی دارد (Sivanesan *et al.*, 2012). تغییرات فصلی دما یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که گلدهی گیاهان پیازی از جمله زعفران را تنظیم می‌کند (Halevy, 1990). با شروع سرما در فصل پاییز، رشد رویشی و گلدهی گیاه زعفران آغاز می‌شود و با خاتمه سرما و شروع گرما در فصل بهار پایان می‌یابد. پداژک‌های به‌جا مانده در زمین، در فصل تابستان ظاهراً دوره خواب را سپری می‌کند. تمایز گل‌ها پس از مرحله خواب و در ماه‌های آخر تابستان اتفاق می‌افتد (Naseri and Ebrahimi Garavi, 2002). به جز گونه زراعی زعفران که تریپلوئید و عقیم است، سایر گونه‌های جنس Crocus قدرت تولید بذر را دارند. تکثیر با بذر تنها برای حصول رقم‌های جدید از گونه‌هایی است که پداژه کمی تولید می‌کنند (Mathew, 1982). هر ساله یک پداژه جدید در نوک پداژه سال گذشته و تعدادی پداژک از جوانه‌های کناری به وجود می‌آید. اندازه پداژه دختری وابسته به تعداد جوانه‌های پداژه مادری است که به پداژه دختری تبدیل شده است (Negbi *et al.*, 1989). کمبود پداژه عاری از بیماری و یا پداژه سالم ممکن است رشد بوته و عملکرد را تحت تأثیر قرار دهد (Plessner *et al.*, 1990).

کشت بافت گیاهی روشی است برای تولید انبوه، انتقال ژن، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا و حفظ برخی از گونه‌های در حال انقراض (Sivanesan *et al.*, 2012; Kharrazi *et al.*, 2018). گزارش‌های زیادی از کشت بافت گونه‌های Crocus وجود دارد (Demeter *et al.*, 2010). همچنین تولید زعفران از طریق پداژک‌های آن به روش ریز ازدیادی نیز گزارش شده است (Devi *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2008). تنها دو گزارش از کشت بافت زعفران زینتی وجود دارد (Chub *et al.*,1994; Sivanesan *et al.*, 2014).

هدف از این تحقیق بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تولید شاخساره و هم‌چنین افزایش تعداد پداژک زعفران زینتی می‌باشد. ظهور شاخساره های نابجا و یا دیگر ارگان‌ها به‌طور مستقیم از ریزنمونه‌های گیاهی یک روش مناسب برای تولید گیاهان همسان در مقایسه با تولید گیاه از طریق کالوس می‌باشد. بر این اساس که اندام‌زایی مستقیم می‌تواند از بافت گیاهی عاری از تشکیل کالوس به دست آید. می‌توان با استفاده از ریزنمونه‌های گیاهی، گیاهان با ساختار ژنتیکی گیاه مادری را به تعداد بسیار زیاد تولید نمود (Gantait *et al.*, 2014). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مهم‌ترین نقش را در مراحل مختلف ریزازدیادی گیاهان ایفا می‌کنند (Gantait and Vahedi, 2015). در بیشتر مطالعات انجام شده در مورد اندام‌زایی مستقیم زعفران، هورمون‌های مورد استفاده ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند 2,4-D، IAA، NAA، IBA، BAP، Kin، TDZ و Zeatin بودند. محیط کشت استفاده‌شده معمولاً دارای سایتوکینین و اکسین به همراه هم می‌باشند (Plessner *et al.*, 1990). در منابع، سیتوکینین مورد استفاده برای آزمایش باززائی مستقیم، اغلب BAP بوده است، اما TDZ تنها منبع سایتوکینینی می‌باشد که توانایی کافی را برای القاء شاخساره از پداژه زعفران دارا بوده است (Sharifi and Ebrahimzadeh, 2010). Sivanesan *et al.* (2014) گزارش دادند که قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری از پداژه گیاه *Crocus vernus* را در محیط کشت Schenk and Hildebrandt (1972) به همراه ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم از هورمون‌های 2-ip، BA و KIN به تنهایی و یا به همراه ۰/۵ یا ۱ میلی گرم NAA کشت دادند. بیشترین تعداد شاخساره پس از گذشت ۴۵ روز به‌دست آمد. تولید شاخساره در محیط کشت عاری از هورمون با شکست مواجه شد و شاخساره‌ها در محیط کشت حاوی سایتوکینین پس از گذشت ۳۰ روز از کشت تولید شدند.

در میان سایتوکینین‌های مورد استفاده BA بیشترین تأثیر را بر تولید شاخساره داشت و بیشترین تعداد شاخساره تولیدشده (۱۱/۸ شاخساره) از ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. Sivanesan *et al.* (2011) ۲ بیشترین میزان تولید

شاخساره را از کشت ریزنمونه‌های گیاه *Crocus vernus* در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین (GA3) گزارش دادند. بیشترین تعداد پداژک تولیدشده از محیط کشت MS نیم قدرت به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین گزارش گردیده است. بیشترین درصد شاخه‌زایی (۹۴/۲ درصد) و تعداد شاخساره (۴/۳) مربوط به محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. در این آزمایش به منظور تولید پداژه عاری از بیماری و افزایش سطح تولید پداژک با استفاده از روش اندام‌زایی مستقیم در شرایط کشت درون شیشه‌ای و با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌ها و ترکیب‌های متفاوت انجام شد.

مواد و روش‌ها

گل‌های زعفران زینتی در فصل بهار پس از مشاهده و تأیید، در زیستگاه بومی خود واقع در کوه‌های زاگرس استان کرمانشاه شهرستان اسلام آبادغرب علامت گذاری و پس از خزان، بخش هوایی در اواخر مرداد ماه سال ۱۳۹۴ از زمین خارج‌شده و پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل شدند. پس از جدا کردن پوشش فیبری از سطح پداژه‌ها، آن‌ها را به مدت ۲ ساعت در محلول ۲ میلی گرم در لیتر قارچ کش بنلیت قرار داده و پس از خشک شدن در فضای آزمایشگاه، تمام پداژه‌ها را جداگانه در داخل دستمال کاغذی پیچیده و در داخل کارتن مقوایی در سردخانه آزمایشگاه کشت بافت با دمای ۱ ± ۴+ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰٪ تا زمان انجام آزمایش، نگهداری شدند.

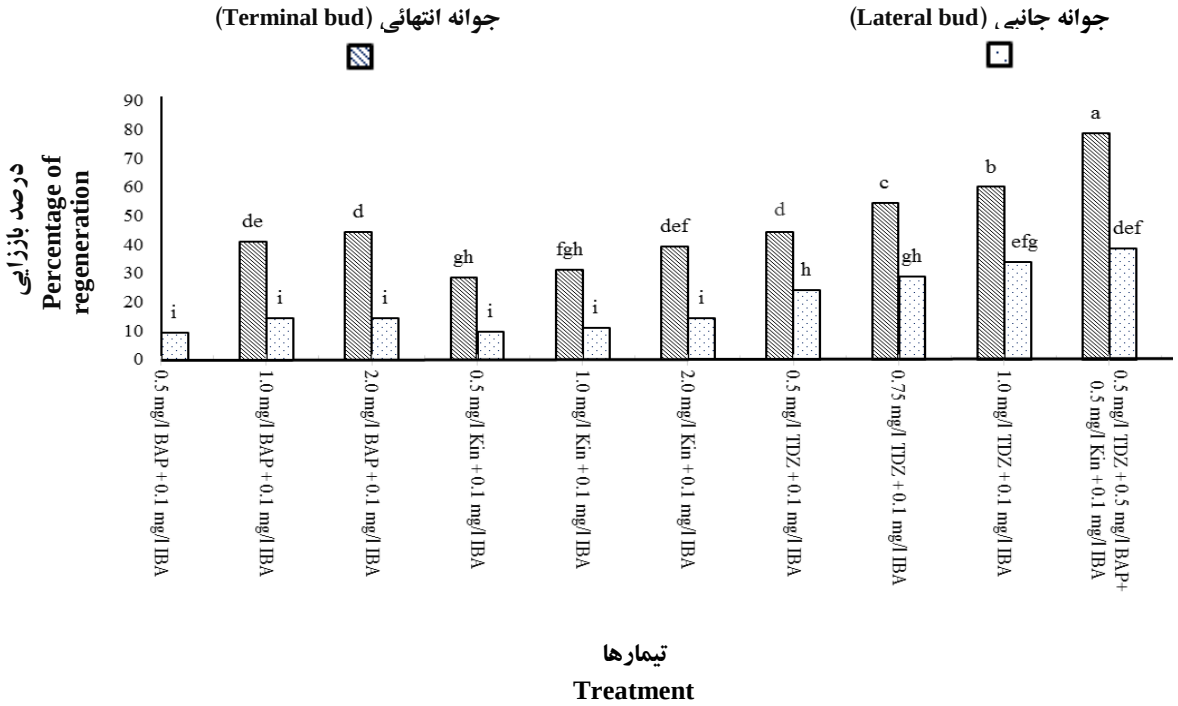
ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش جوانه‌های انتهایی و جانبی بوده که در ۱۰ تیمار هورمونی و تیمار شاهد در محیط کشت پایه موراشیگ-اسکوگ (MS) مورد بررسی قرار گرفت. برای از بین بردن آلودگی سطحی ریز نمونه‌ها پس از قرار دادن پداژه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و پس از آن با تهیه محلول قارچ کش بنلیت در دمای بالا (۵۵ درجه سانتی‌گراد) بر روی دستگاه هات پلیت به مدت ۳۰ دقیقه و سپس الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلرید سدیم (حاوی ۵/۲۵ درصد کلر فعال) ۱۵ درصد به مدت ۶ دقیقه وسپس سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل در داخل کابین ایر فلوبنچ، گندزدایی ریزنمونه‌ها انجام گرفت و به محیط کشت پایه MS به همراه غلظت‌های هورمونی مختلف سیتوکنین و اکسین با pH ۵/۸ و آگار ۶ درصد در لیتر انتقال یافت. در این آزمایش از هورمون‌های Kin، TDZ و BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و در ترکیب با غلظت ۰/۱ هورمون IBA استفاده شد. درنهایت جهت بررسی باززایی شاخساره، ۳ تکرار برای هر تیمار مورد آزمایش قرار گرفت و شاخص‌های طول شاخساره، اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط‌های کشت باززائی بر درصد باززائی، اثر برهمکنش نوع ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشت مختلف اندام‌زائی بر تعداد شاخساره، اثر برهمکنش نوع ریزنمونه‌ها و محیط کشت اندام‌زائی بر طول شاخساره و اثر برهمکنش نوع ریزنمونه‌ها و محیط کشت اندام‌زائی بر تعداد پداژک مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد و همچنین از نرم‌افزار اکسل جهت رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

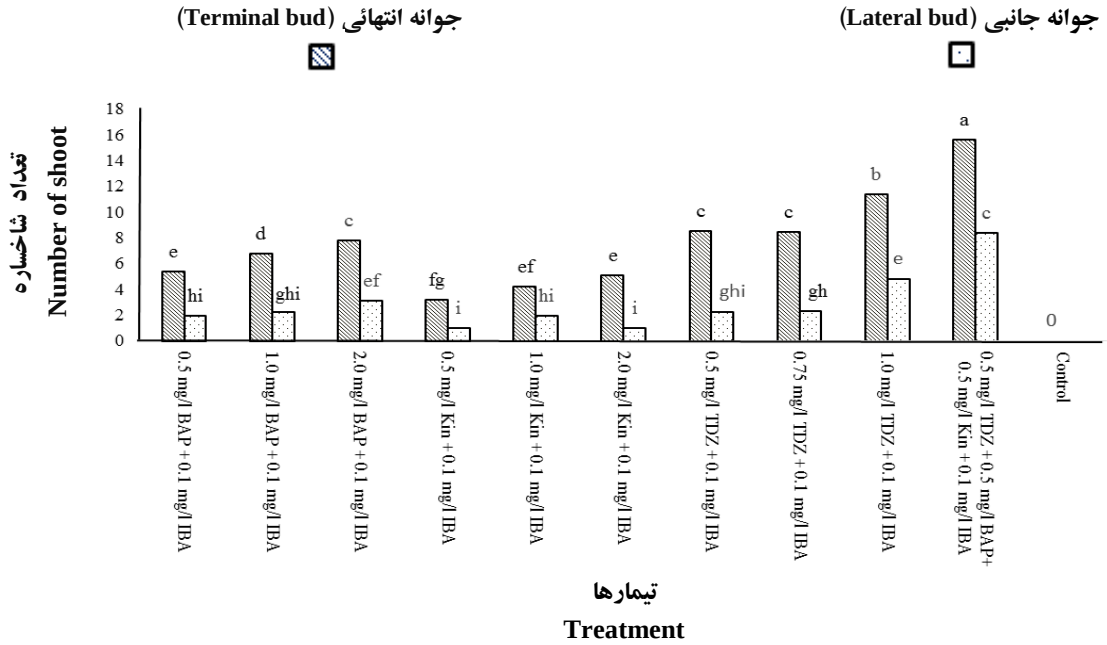
اثر برهمکنش ریزنمونه‌های جوانه‌های جانبی و انتهایی و محیط‌های کشت باززائی بر درصد باززائی نشان داد که بیشترین درصد باززائی در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه جوانه انتهائی مشاهده شد که با سایر تیمارها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد باززائی پس از شاهد در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBAو محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه جوانه جانبی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر برهمکنش نوع ریزنمونه‌ها و محیط کشت باززائی بر درصد باززائی حاصل از ریزنمونه پداژه‌های زعفران زینتی
Figure 1. Effect of interaction on the type of explant and type of regeneration media on percentage of shoots in direct organogenesis from explant of *Crocus vernus* L.

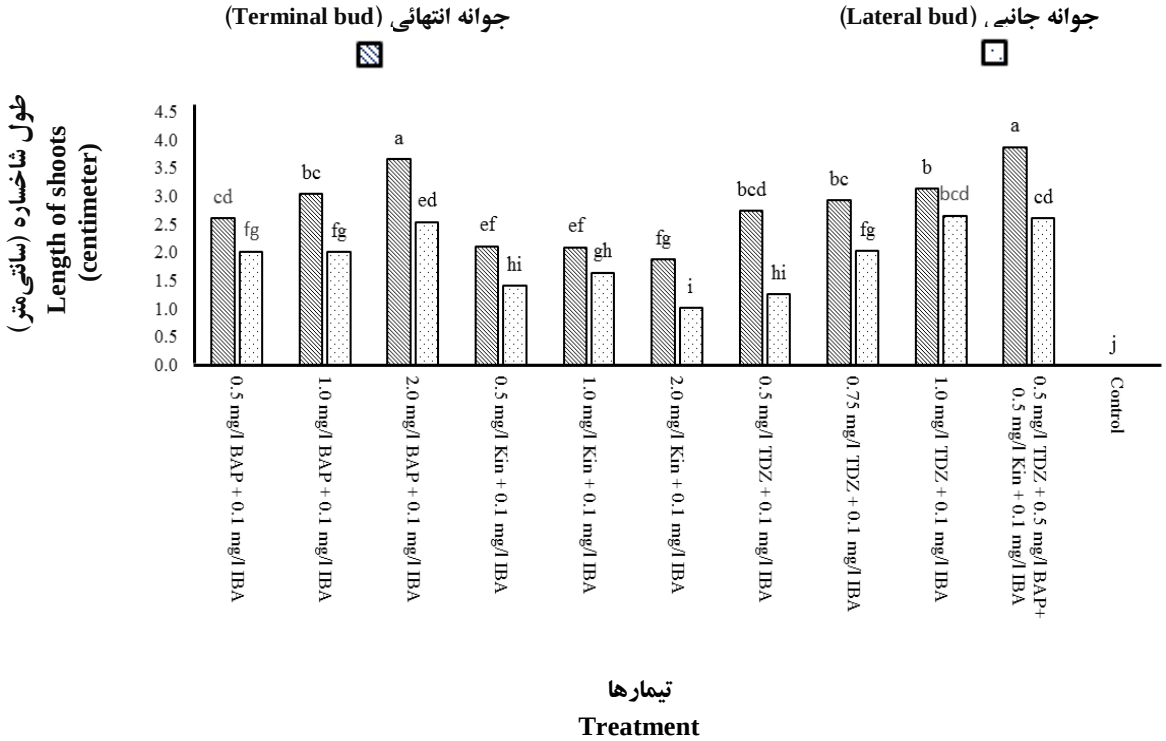
اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت اندام‌زائی بر تعداد شاخساره تولیدشده از پداژه‌های زعفران زینتی نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره حاصل از ریزنمونه جوانه انتهائی و محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA که با سایر تیمارها در سطح یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (شکل ۲). اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت اندام‌زائی بر شاخص طول شاخساره در آزمایش باززائی ریزنمونه‌های پداژه زعفران زینتی نشان داد که در ابتدا با افزایش غلظت هورمون Kin تا ۱ میلی‌گرم در لیتر طول شاخساره افزایش یافت، اما پس از آن با افزایش غلظت این هورمون کاهش طول شاخساره را در پی داشت. با افزایش غلظت هورمون‌های Kin و TDZ طول شاخساره افزایش یافت. بیشترین طول شاخساره در ریزنمونه جوانه انتهائی و محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA که با سایر تیمارها در سطح یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین تعداد شاخساره از ریزنمونه جوانه جانبی و محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل ۳). اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت اندام‌زائی بر شاخص تعداد پداژک حاصل از ریزنمونه‌های پداژک زعفران زینتی نشان داد که با افزایش غلظت هورمون Kin تعداد پداژک کاهش یافت. با افزایش غلظت هورمون TDZ و BAP تعداد پداژک حاصل افزایش یافت، بیشترین تعداد پداژک از محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه جوانه انتهائی به‌دست آمد که با سایر

تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین تعداد پداژک پس از شاهد در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه جوانه جانبی مشاهده شد (شکل ۴). Takayama and Misawa (1982) گزارش دادند که اندام‌زائی مستقیم از فلس‌های سوخ سوسن در محیط کشت MS همراه با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را درپی داشت. Rodrigues *et al.* (1996) گزارش دادند که با استفاده از محیط کشت MS همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد و درصد باززائی را از گیاه پیاز به‌دست آوردند. Santos *et al.* (2002) تشکیل پیازچه از فلس نرگس، در محیط کشت پایه MS همراه با IBA و BAP یا NAA و BAP را گزارش کردند. سیتوکینین‌ها بر توسعه و تشکیل پیاز تأثیر دارند. در پژوهشی پیازهای نرگس (*Narcissus Pseudonarcissus* L.) را جهت رشد در شرایط سرد و مرطوب قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند که سطح سیتوکینین در پیازها بالا رفته است. وجود اکسین و سیتوکنین برای ایجاد پداژک امری ضروری می‌باشد (Milyaeva *et al.*, 1995; Plessner *et al.*, 1990). سیتوکینین‌ها در سنتز RNA، تحریک ساخت پروتئین و فعالیت برخی آنزیم‌ها نقش کمکی ایفا می‌کنند. تقسیم سلولی به‌وسیله عمل توأم اکسین و سایتوکینین تنظیم می‌شود که هر کدام تأثیر خاصی بر چرخه سلولی دارند. اکسین در تولید DNA و تکثیر آن نقش مهمی ایفا می کند، در حالی‌که سایتوکینین‌ها ارتقاءدهنده آن‌ها هستند (George *et al.*, 2008). Sivanesan *et al.* (2011) گزارش کردند که بیشترین تعداد پداژک و شاخساره باززائی‌شده به‌طور مستقیم از ریزنمونه جوانه انتهائی و قطعات پداژه زعفران زینتی و از محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد، که با نتایج آزمایش حاضر در خصوص تأثیر هورمون TDZ برای افزایش تولید پداژک مشابه بود. Plessner *et al.* (1990) گزارش کردند که برای باززائی ریزنمونه‌های قطعات پداژه زعفران وجود سیتوکینین (به خصوص زاتین) و اکسین (به‌ویژه 2,4-D) و افزایش تعداد شاخساره و پداژک تولیدی در شرایط درون شیشه‌ای ضروری می‌باشد. آن‌ها گزارش کردند که پیش تیمار کردن با اتیلن و اتفن با وجود جلوگیری از توسعه برگ، سبب تحریک تولید پداژه می‌شود، که این پیش تیمار کردن سبب افزایش تولید پداژه و جوانه‌زنی می‌گردد. Simona *et al.* (2013) در پژوهشی برای باززائی مستقیم از قطعات پداژک زعفران، گزارش کردند که بهترین محیط کشت برای تشکیل شاخساره محیط کشت MS همراه با ۱میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. نتایج پژوهش حاضر با نتایج Memon *et al.* (2010) که نقش کینتین را در تشکیل پداژک مؤثر دانستند تطابق داشت. در پژوهشی دیگر Nishiuchi (1980) تأثیر هورمون Kin را بر پیازچه‌زائی فلس‌های لاله (Tulipa) گزارش کردند. مشابه نتایج حاضر در گزارش Vahedi *et al.* (2014) استفاه از چند سیتوکینین (TDZ، Kin، BAP و 2,4-D) همراه هم و نیز غلظت کم یک اکسین (NAA) سبب افزایش تولید شاخساره گردید. بر اساس گزارش Raja *et al.* (2007) استفاده از هورمون BAP سبب تولید و افزایش پداژک شد که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. سیتوکینین‌ها به عنوان مهم‌ترین فاکتور مؤثر در باززایی شاخساره به اثبات رسیده‌اند و اثرات چشم‌گیر آن‌ها شاید به خاطر تغییرات حاصل در بافت‌های القا شده باشد (Abd Elaleem *et al.*, 2009). بررسی‌ها نشان می‌دهد حذف اکسین از محیط کشت پیش نیاز خاموش شدن چند ژن و یا سنتز محصولات جدید ژنی می‌باشد که برای نمو رویان لازم است (Shinoyama *et al.*, 2004). به‌طورکلی کنترل فرایندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سیتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را از کالوس سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی به‌شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (Bhaskaran and Smith, 1990).



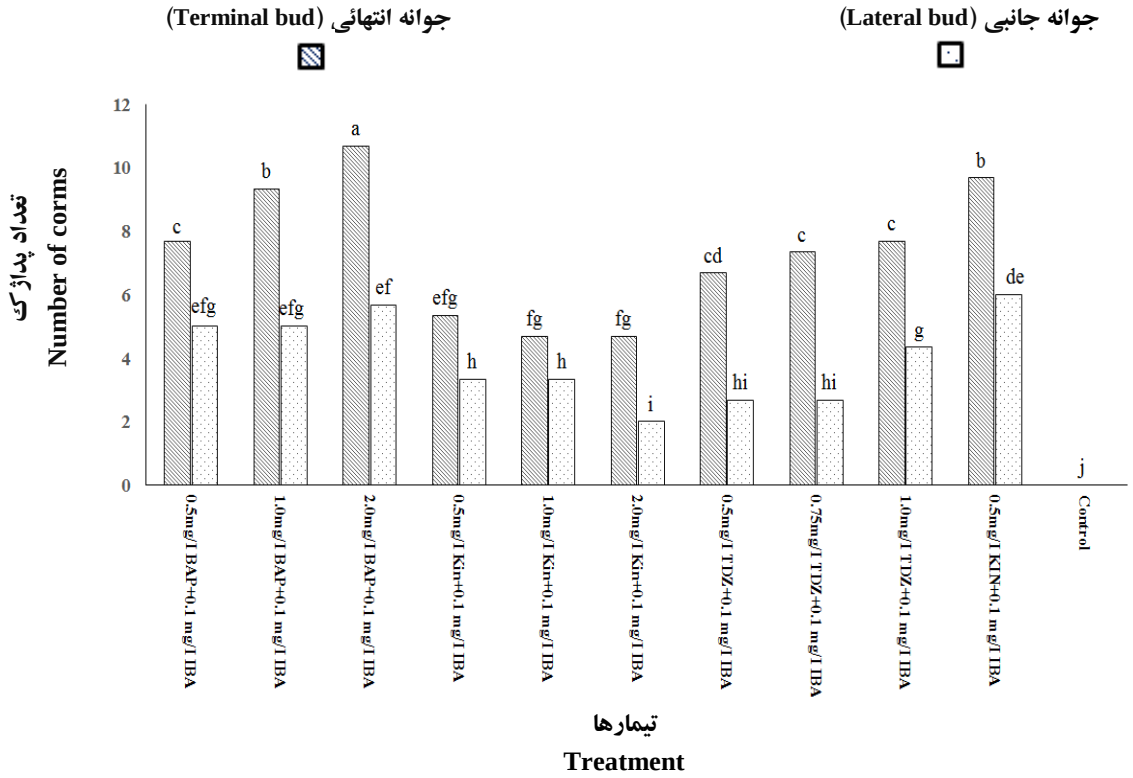
شکل ۲- اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت باززائی بر تعداد شاخساره باززائی‌شده، حاصل از ریزنمونه پداژه‌های زعفران زینتی

Figure 2. Effect of interaction on the type of explant and type of regeneration media on number of shoot regeneration in direct organogenesis from corms of *Crocus vernus* L.



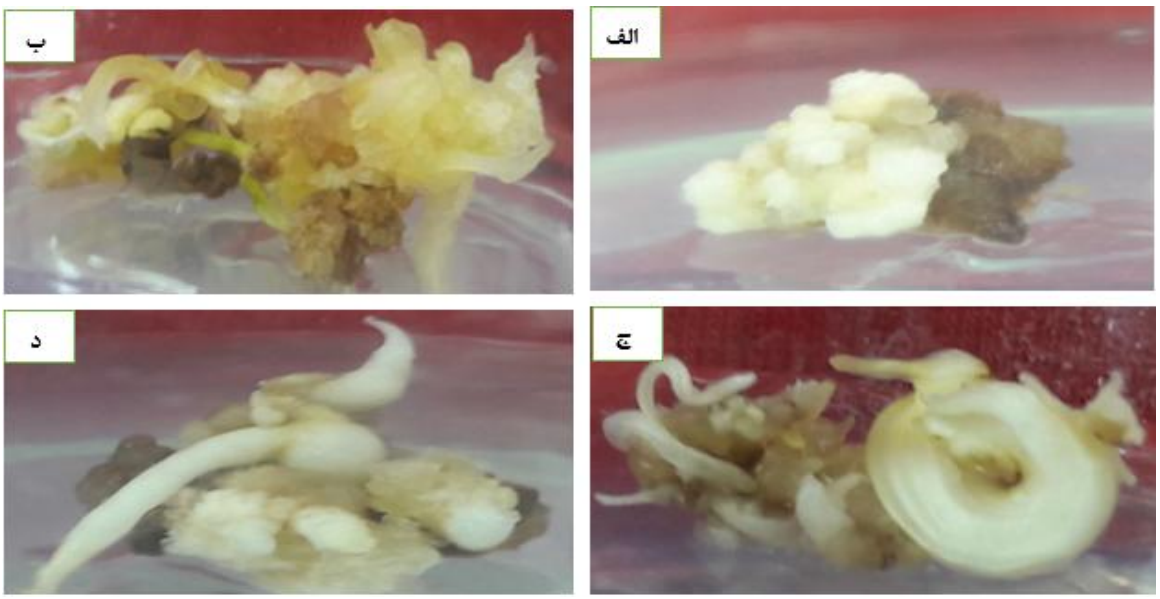
شکل ۳- اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت باززائی بر طول شاخساره حاصل از آزمایش باززائی مستقیم از ریزنمونه‌های پداژه زعفران زینتی

Figure 3. Effect of interaction on the type of explant and type of regeneration media on length of shoots in direct organogenesis from explant of *Crocus vernus* L.



شکل ۴- اثر برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت باززائی بر تعداد پداژک حاصل از آزمایش باززائی مستقیم از ریزنمونه‌های پداژه زعفران زینتی

Figure 4. Effect of interaction on the type of explant and type of regeneration media on number of corms in direct organogenesis from explant of *Crocus vernus* L.



شکل ۵- مراحل مختلف رشد و تولید پداژک و شاخساره

الف- تقسیم سلولی ریزنمونه جوانه انتهایی حاصل از پداژه زعفران زینتی ب- شروع مرحله تمایزیابی ج- تکمیل مراحل تمایز یابی د- تشکیل پداژک‌های حاصل از باززایی غیر مستقیم

Figure 5. Different stages of growth and production of corm and shoots
a- Cell division of the explant of the apical buds from the corm of *Crocus vernus*
b- Starting the differentiation steps c- Completion of differentiation steps
d- Formation of corms from direct regeneration

نتیجه‌گیری

بیشترین باززائی مستقیم برای شاخس‌های تعداد و طول شاخساره تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بهترین تیمار برای شاخص تعداد پداژک ، ۲ میلی‌گرم BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در همه آزمایش‌های انجام شده بهترین ریزنمونه برای نتیجه‌گیری و بازدهی مناسب در اندام‌زایی و پداژک‌زایی ریزنمونه‌های جوانه انتهایی بودند که می‌توان علت آن را وجود اکسین و مریستم انتهایی و در نتیجه افزایش تقسیم سلولی نسبت به سایر ریزنمونه‌ها دانست.

سپاس‌گزاری

با سپاس فراوان از اعضای محترم گروه علوم باغبانی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی وکشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه‌کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که سختی راه را بر ما هموار نمودند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است و کلیه نویسندگان دارای توافق منافع هستند.

سهم نویسندگان

ترتیب نام افراد ذکر شده در این مقاله به عنوان نویسنده، مورد تأیید تمام نویسندگان است و محمدحسین دانشور نویسنده مسئول این مقاله هستند.

References

Abd Elaleem, K. G., Modawi, R. S. and Khalafalla, M. M. (2009). Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar diamant. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2529-2534.

Bhaskaran, S. and Smith, R. H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1329-1336.

Chub, V. V., Vlasova, T. A. and Butenko, R. G. (1994). Callus development and morphogenesis in generative organ culture of spring-flowering *Crocus* L. species. *Russian Journal of Plant Physiology*, 41(6), 815- 820.

Demeter, Z., Suranyi, G., Molnar, V. A., Sramko, G., Beyer, D. and Konya, Z. (2010). Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 349-353.

Devi, K., Sharma, M., Sing, M. and Ahuja, P. S. (2011). *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.): A commercially important crop. *Engineering in Life Sciences*, 11(2), 189-194.

Gantait, S. and Vahedi, M. (2015). *In vitro* regeneration of high value spice *Crocus sativus* L.: A concise appraisal. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 124-133.

Gantait, S., Das, A. and Mandal, N. (2014). Stevia: A comprehensive review pharmacological properties and *in vitro* regeneration. *Sugar Technology*, 17(2), 95-106.

George, P. S., Visvanath, S., Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L.V. (2008). Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): somatic emberyogensis and shoot regeneration. *Food Biotechnology*, 6(4), 217-223.

Gholizade, Z., Aminifard, M. H. and Sayyari, M. H. (2017). Evaluating the effects of municipal waste compost and corm weight on qualitative characteristic and secondary metabolites of saffron (Crocus sativus L.). *Plant Productions*, 40(3), 53-64. [In Farsi]

Halevy, A. H. (1990). Recent advance in control of flowering habit of geophytes. *Acta Horticulcture*, 266, 35-42.

Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykha Akhar, Bagheri, A. and Moradian, Y. M. (2018). Effect of Hormonal Compositions on Micropropagation of Fifteen Cultivars of Gerbera (Gerbera Jamesonii Bolus ex Hooker f.). *Plant Productions*, 40(4), 91-102. [In Farsi]

Mathew, B. (1982). *The Crocus: A revision of the genus Crocus (Iridaceae*). London: BT Batsford Ltd.

Memon, N., Qasim, M., Jaskani, M. and Ahmad, R. (2010). *In vitro* cormel production of gladiolus. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 47(2), 115-123.

Milyaeva, E. L., Azizbekovas, N. S., Komarova. E. N. and Akhundova, D. D. (1995). *In vitro* formation of regenerant corms of saffron *Crocus* (*Crocus sativus* L.). *Russian Journal of Plant Physiology*, 42(1), 112-119.

Naseri, M. T. and Ebrahimi Garavi, M. (2002). *Culture of the spring flowering species of Crocus*. Mashhad: Astan Ghods Razavi Press. [In Farsi]

Negbi, M., Dagan, B., Dror, A. and Basker, D. (1989). Growth, flowering, vegetative reproduction and dormancy in the saffron (*Crocus sativus* L.). *Israel Journal of Botany*, 38(2), 95-113.

Nishiuchi, Y. (1980). Studies on vegetative propagation of tulip, formation and development adventitious buds in the existed bulb scale cultivated *in vitro. Japanese Society for Horticultural Science*, 2(3), 235-240.

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

Raja, W., Zaffer, G. and Wani, S. (2007). *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Horticulturae*, 739(37), 291-296.

Rodrigues, B. M., Pinato, J. E. B., Maluf, W. R. and De Souza, C. M. L. (1996). Micropropagation of onion from *in vitro* induced bulblet. *Bragantia, Campinas*, 55(1), 19-28.

Santos, A., Fidalgo, F. Santos, I. and Salema, R. (2002). *In vitro* bulb formation of *Narcissus asturiensis*, a threatened species of the Amaryllidaceae. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(2), 149- 152.

Schenk, R. U. and Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany***,** 50(1), 199-204.

Sharifi, G. and Ebrahimzadeh, H. (2010). Changes of antioxidant enzyme activities and isoenzyme profiles during *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Biologica Hungarica*, 61(1), 123-135.

Sharma, K. D., Rathour, Sharma, R., Goel, S., Sharma, T. R. and Sing, B. M. (2008). *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, 52(4), 709-712.

Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T. (2004). A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Chrysanthemum* (dendranthema× grandiflorum (Ramat.) Kitamura). *Plant Biotechnology*, 21(1), 25-33.

Simona, L., Cerasela, P., Florina, F., Lazar, A., Giancarla, V., Danci, M. and Maria, B. (2013). *In vitro* regeneration of *Crocus sativus* L. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17(2), 244-247

Sivanesan, I. Young Lim, M., Eun Hae, J. and Ryong Jeong. (2011). *Somatic embryogenesis and plant regeneration in Crocus vernus.* 2nd International Conference on Environmental Science and Development, Singapore.

Sivanesan, I., Son, M. S. and Buong, R. G. (2014). *In vitro* shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* L. Hill. *Pakistan Journal of Botany*, 46(2), 693-697.

Sivanesan, I., Son, M. S., Jana, S. and Jeong, B. R. (2012). Secondary somatic embryogenesis in *Crocus vernus* L. Hill. *Propagation of Ornamental Plants*, 12(3), 163-170.

Takayama, Sh. and Misawa, M. (1982). *Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in Lilium bulb scales grown in vitro*. *Plant and Cell Physiology*, 23(1), 67-74.

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

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)