6th National Conference on Saffron
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
مجتمع آموزش عالی گنـــاباد
ششمین همایش ملی زعفران

بهینه سازی کشت سوسپانسیون سلولی در زعفران

علیرضا رامندی[۱]، عاطفه قلیزادگان احسان آباد[۲]، علیرضا سیفی[۳]*

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی
۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی
۳-استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی

چکیده

کشت سوسپانسون سلولی پویا و ترجیحا جنین زا در زعفران مزایای زیادی دارد و امکان مطالعه تولید متابولیت های ثانویه زعفران، انتقال ژن و بررسی در سطح سلولی، موتاسیون زایی را فراهم خواهد آورد. با این حال تولید سوسپانسیون سلولی جنین زا در زعفران گزارش نشده است. هدف از پژوهش حاضر دستیابی به یک سیستم سوسپانسیون سلولی با رشد قابل قبول در زعفران بود. برای این منظور ریزنمونه های مختلف تحت تاثیر تیمارهای هورمونی مختلف قرار داده شد تا محیط کالوس زایی و محیط کشت سوسپانسیون بهینه مشخص گردد. تیمار CIM2c دارای کالوس های شکننده و متمایل به زرد بود و همچنین بهترین عملکرد را در کالوس‌زایی و وزن تازه کالوس از خود نشان داد. جنین های سوماتیکی بعد از پنج هفته بر روی تیمار CIM1c تشکیل شد. در کشت سوسپانسون تیمار SM3 دارای سریع ترین سرعت رشت بود. در تیمارSM2 سلول ها در ابتدا دارای رنگ ریزه بودند ولی با گذشت زمان این رنگ ریزه ها از بین میرفتند.

کلمات کلیدی: کورم زعفران، سوسپانسیون، کالوس زایی.

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

۱. مقدمه

زعفران گیاه دارویی با ارزشی است که بیشترین سطح زیر کشت را در ایران دارد. در سال ۱۳۹۷ سطح زیر کشت زعفران در کل کشور حدود ۱۱۴ هزار هکتار با تولید حدود ۴۰۵ تن بوده است که حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید در دو استان خراسان رضوی و جنوبی بوده است (جهاد کشاورزی، ۱۳۹۷). لذا انجام پژوهش و ارائه دستاوردهای نوین در مورد زعفران یکی از اولویت های پژوهشی در حوزه کشاورزی در استان خراسان است.

علیرغم اهمیت اقتصادی ویژه زعفران، پژوهش های چشمگیری در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک این گیاه انجام نشده است. تریپلویید و نرعیقمی، فقدان تنوع ژنتیکی، دشواری کشت بافت و انتقال ژن از جمله دلایل پیشرفت های اندک در پژوهش های مولکولی زعفران است. با این حال در چند سال اخیر توجه پژوهشگران در اروپا، ایران، ترکیه، هند، چین و پاکستان به پژوهش های مولکولی و ژنتیکی در این گیاه جلب شده است و در حال حاضر اطلاعات ارزشمندی در زمینه کشت بافت (Moshtaghi, 2020)، ژنتیک و بیولوژی موکولی (Seifi and Shayesteh, 2020)، و تحقیات اومیکس (Busconi et al, 2020) در این گیاه موجود است. اطلاعات ژنومی و ترنسکریپتوم در این گیاه در حال افزایش است که ابزار بسیار قدرتمندی برای پیش بینی کارکرد ژن‌های مختلف در فرآیندهای مختلف است. با این حال فقدان روش های مناسب ارزیابی و تایید کارکرد ژن‌ها کماکان مانع بزرگی بر سر راه درک بهتر از ژنتیک این گیاه است.

کشت سوسپانسیون سلولی ابزار سودمندی برای مطالعات بیوشیمایی و مولکولی در سطح سلولی، تولید ترکیبات ثانویه گیاهی، پروتئین های نوترکیب، موتاسیون زایی و مهندسی ژنتیک هستند. امتیاز بزرگ کشت سوسپانسیون سلولی این است که از این طریق پیچیدگی های موجود در کل گیاه کنار گذاشته میشود و امکان مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی و مولکولی با دقت بیشتری میسر می‌گردد (Sello et al, 2017; Moscatiello et al, 2013). کشت های سلولی معمولا با قراردادن قطعه ای از کالوس سریع الرشد در محیط مایع مناسب شروع می‌شود و با تکان‌های ممتد باعث میشود تا جمعیت سلولی مطلوب حاصل شود (Mustaf et al, 2011). نوع کالوس، نوع محیط غذایی و ترکیب هورمون های گیاهی مورد استفاده تاثیر مهمی در تولید یک سوسپانسوین سلولی سریع الرشد و با سلول های تا حد امکان منفرد دارد.

در اختیار بودن سوسپانسون سلولی پویا و ترجیحا جنین زا در زعفران مزایای زیادی دارد و امکان مطالعه تولید متابولیت های ثانویه زعفران، انتقال ژن و بررسی کارکرد زن‌ها در سطح سلولی، موتاسیون زایی را فراهم خواهد آورد. گزارشات معدودی از ایجاد کشت سوسپانسیون سلول در زعفران، عمدتا برای تولید متابولیت های ثانویه، گزارش شده است (Yoon et al, 2015; Moradi et al, 2020; Taherkhani et al, 2019). به هدف بهینه سازی تولید کروسین و ترکیبات فنلی، و همکارن از کلاله زعفران کالوس تولید کرده و سپس از این کالوس ها کشت سوسپانسیون ایجاد کردند (Moradi et al, 2020). تولید سافرانال و کروسین و بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز این متابولیت ها نیز در کشت سوسپانسیون سلولی زعفران بررسی شده است (Taherkhani et al, 2019). با این حال تولید سوسپانسیون سلولی جنین زا در زعفران گزارش نشده است. هدف از پژوهش حاضر دستیابی به یک سیستم سوسپانسیون سلولی با رشد قابل قبول در زعفران بود. برای این منظور ریزنمونه های مختلف تحت تاثیر تیمارهای هورمونی مختلف قرار داده شد تا محیط کالوس زایی و محیط کشت سوسپانسیون بهینه مشخص شود.

۲. مواد و روش‌ها

این مطالعه در ۲ سال متوالی در مرکز زیست‌فناوری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در سال اول کورم‌های زعفران از مزارع زعفران شهرستان بیرجند، خراسان جنوبی، جمع‌آوری شد. لایه‌خارجی (تونیک) کورم‌ها حذف گردید. کورم‌ها و برگ‌ها با آب و مایع ظرفشویی کاملا شسته شدند. و سپس به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۹۶٪ و ۱۵ دقیقه در وایتکس ۵۰٪ (۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم) تیمار و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. از برگ‌ها ریزنمونه‌هایی به طول تقریبی ۱ سانتیمتر تهیه شد. جوانه های جانبی و انتهایی، و قسمت میانی کورم‌ها جدا شدند و به شرح فوق ضدعفونی شدند. لایه نازکی از این قطعات کورم استریل شده حذف شد و سپس ریز نمونه‌هایی به قطر تقریبی ۰/۵ سانتی متر تهیه شد. ریزنمونه‌ها روی محیط MS حاوی ۲ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با ۳ ترکیب مختلف از هورمون‌های گیاهی قرار داده شدند. ترکیب هورمونی این ۳ محیط کشت با نامه های CIM1، CIM2، و CIM6 در جدول ۱ مشخص شده است.

در سال دوم کورم‌های زعفران از مزارع شهرستان تربت حیدریه (استان خراسان رضوی، ایران) جمع آوری شد. جوانه-های جانبی و انتهایی، و قاعده کورم‌ها حذف شد و قسمت مرکزی کورم برای تهیه ریز نمونه استفاده شد. ضدعفونی قطعات کورم، تهیه ریزنمونه به شرحی که در بالا توضیح داده شد انجام شد. ریزنمونه‌ها روی محیط های CIM1 تا CIM5 (جدول ۱) کشت شدند. برای بررسی تاثیر ذغال فعال بر کالوس زایی، ۰/۳ درصد ذغال فعال (Sigma, M5519) نیز به هر کدام از محیط ها اضافه شد. محیط حاوی ذغال فعال با افزودن C در انتهای نام محیط مشخص شده است.

در هر ۲ آزمایش، در هر پتری ۵ ریزنمونه قرار داده شد و سپس پتری‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند . بعد از سه هفته ریز نمونه ها واکشت داده شد و ۲ هفته بعد از واکشت، درصد کالوس زایی و وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تکرار انجام شد.

جدول ۱- ترکیب هورمونی محیط های کالوس‌زایی (CIM) و کشت سوسپانسیون سلولی (SM).

محیط	ترکیب هورمون گیاهی (میلی گرم بر لیتر)				
	BAP (Sigma, B3408)	2,4-D (Sigma, D6679)	IAA (Sigma, I3750)	Zeatine (Sigma, Z0164)	NAA (Sigma, N0640)
CIM1	2	1	0	0	0
CIM2	1	2	0	0	0
CIM3	4	2	0	0	0
CIM4	2	4	0	0	0
CIM5	0.5	0.1	0.5	0	0
CIM6	1	0.1	0	0	0
SM1	0.5	0.1	0	0	0
SM2	1	2	0	0	0
SM3	0	0.2	0	0.2	2

۲-۱. کشت سوسپانسیون سلولی

از کالوس‌های حاصل از تیمار CIM2c جهت تهیه کشت مایع و با ۳ نوع محیط کشت مختلف (جدول ۱) استفاده شد. دو قطعه کالوس با قطر ۰/۵ سانتی متری در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط MS حاوی ۲٪ ساکارز و ترکیبات مختلف از هورمون‌های گیاهی قرار گرفت. برای هر تیمار ۲ تکرار در نظر گرفته شد. ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از یک هفته قطعات بزرگ کالوس به وسیله صافی (اندازه منافذ حدود ۴۰۰ میکرو متر) حذف شد و سلول‌ها به تیوب‌های ۵۰ میلی لیتری منتقل شدند. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی میز آزمایشگاه قرارداده شدند تا سلول‌ها ته‌نشین شوند. پس از حذف محیط کشت، سلول‌های ته‌نشین شده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط جدید اضافه شد. سپس هر ۷ روز با افزودن ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جدید واکشت انجام شد.

۲-۲. اندازه گیری سرعت رشد در سوسپانسیون سلولی

برای مقایسه سرعت رشد سلولی در تیمارهای مختلف سوسپانسیون سلولی، روش اندازگیری چگالی نوری (OD) استفاده شد (Shokouhi and Seifi, 2021). به این منظور در یک دوره ۸ روزه، هر ۲ روز یک بار چگالی نوری ۱ میلی‌لیتر از کشت‌های سلولی در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه گیری شد.

۲-۳. آنالیز آماری داده‌ها

تمام آزمایشات و اندازه گیری‌ها دارای دو تکرار بود، بجز کالوس‌زایی که در پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین توسط تست Tukey HSD در سطح اهمیت ۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel Microsoft رسم گردید.

۳. نتایج

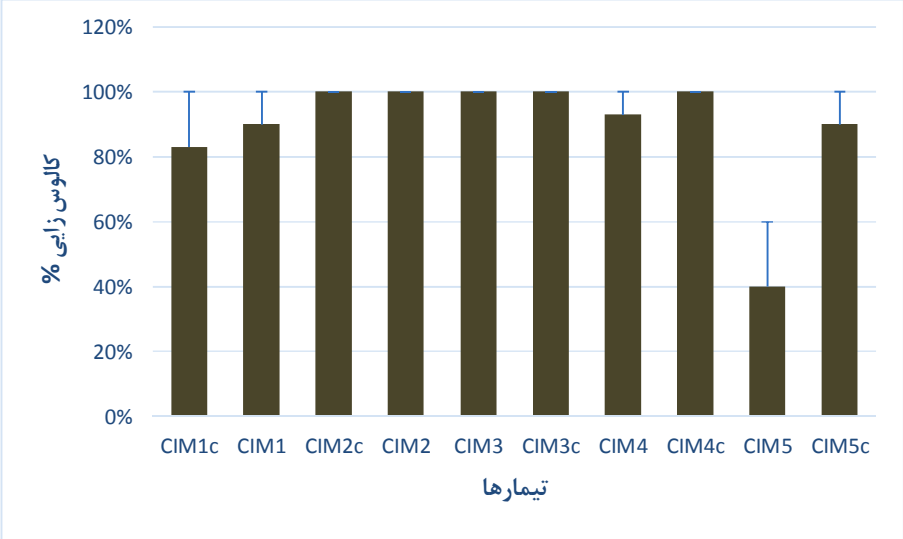
۳-۱. نرخ کالوس زایی

در سال اول این آزمایش امکان کالوس زایی از ۴ نوع ریزنمونه مختلف روی ۳ محیط کشت مختلف بررسی شد. از بین این ریزنمونه‌ها فقط ریزنمونه تهیه شده از ناحیه مرکزی کورم کالوس زایی مشاهده شد. نرخ کالوس زایی روی محیط CIM2، ۷۶ درصد و روی محیط CIM1، ۶۷ درصد بود.

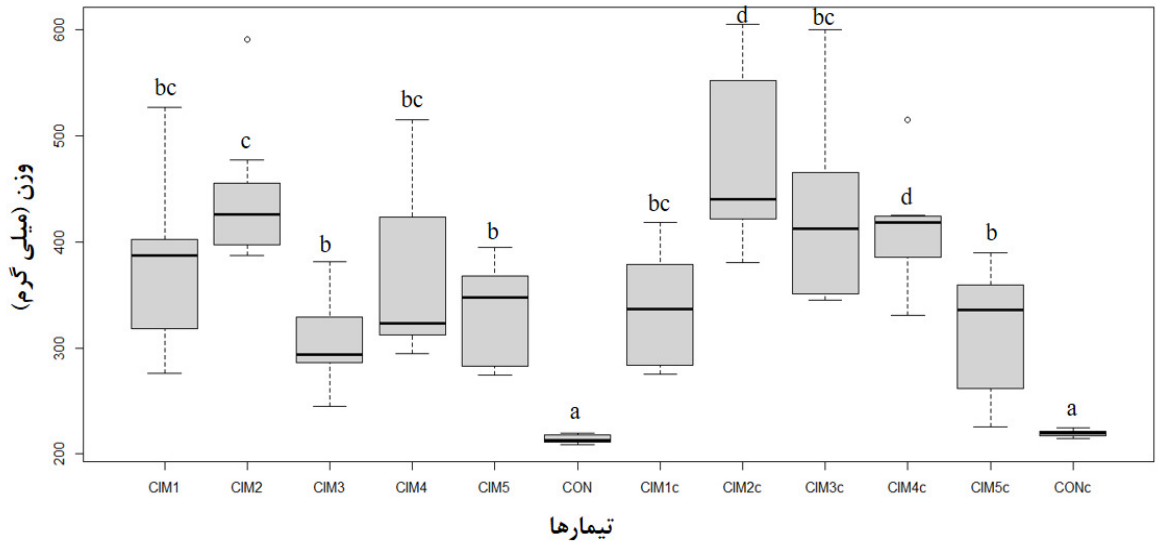
در سال دوم شرایط کالوس زایی از ریزنمونه‌های تهیه شده از ناحیه مرکزی کورم بهینه سازی شد. به این منظور ریزنمونه ها روی ۵ محیط CIM1 تا CIM5 روی محیط حاوی ذغال فعال و یا فاقد ذغال فعال قرار داده شدند. نتایج نشان داد که درصد کالوس زایی در همه محیط‌ها به جز محیط CIM5 بالا بود. قابل ذکر است که افزودن ذغال فعال تاثیر معنی داری روی کالوس زایی روی محیط‌های CMI1 تا CIM4 نداشت ولی باعث افزایش درصد کالوس زایی روی محیط CIM5 شد. (شکل ۱).

۳-۲. اندازه و ریخت شناسی کالوس‌ها

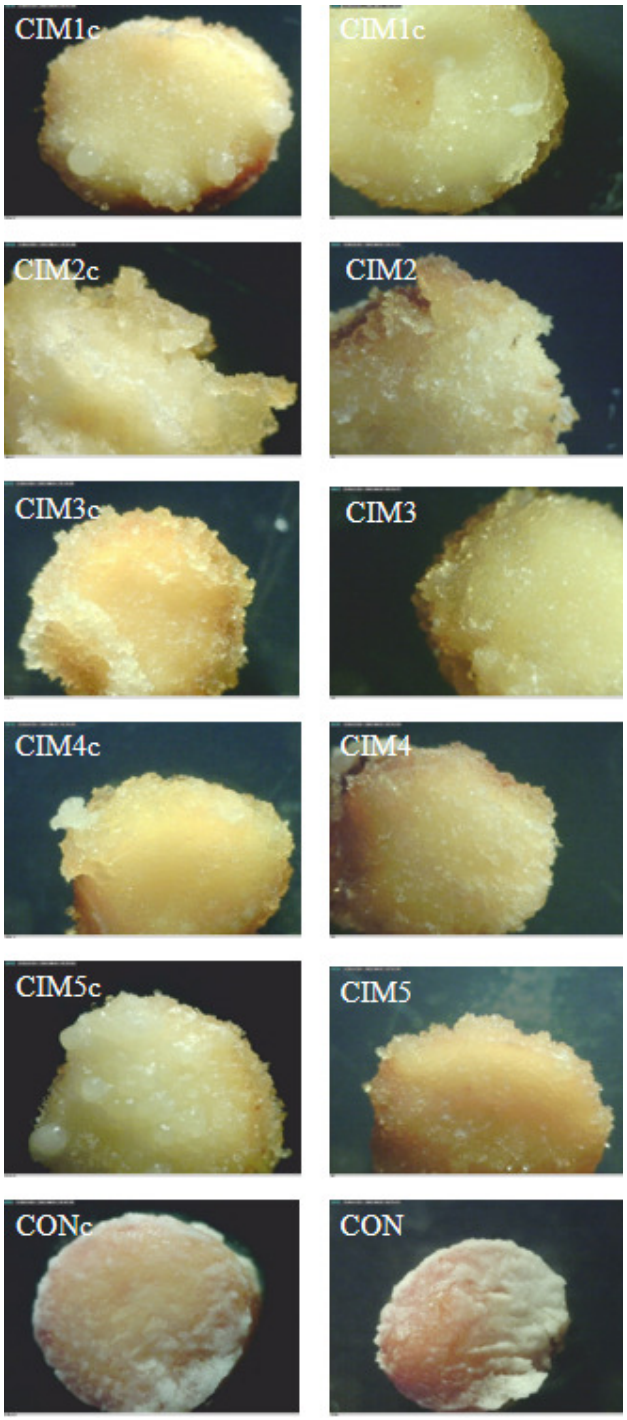
وزن کالوس‌های ایجاد شده روی محیط های مختلف اندازه گیری شد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده میشود کالوس های ایجاد شده روی محیط CIM2 بزرگتر و سنگین‌تر بودند علاوه بر این کالوس‌ها با رنگ های زرد روشن، کهربایی و کهربایی تیره قابل مشاهده بود (شکل ۳). همچنین تیمارهای CIM1c و CIM5c در پنج هفته تشکیل جنین سوماتیکی دادند (شکل ۴).



شکل ۱- درصد کالوس زایی پنج تیمار CIM1، CIM2، CIM3، CIM4 و CIM5 برروی دو محیط MS و MS همراه با ذغال فعال.

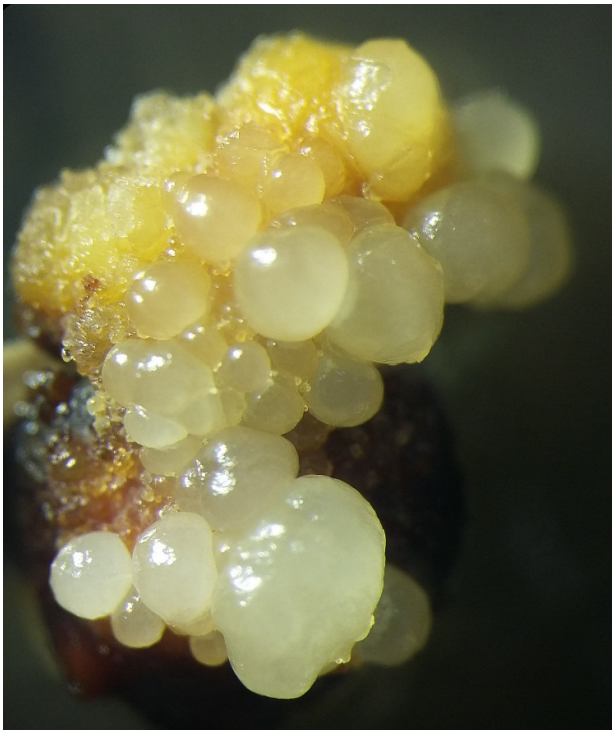


شکل ۲- نمودار جعبه‌ای تاثیر تیمار های مختلف بر وزن تر کالوس. تیمارهای CIM2 و CIM2c دارای بالاترین و CIM3 و CIM5c دارای پایین ترین عملکرد در وزن تر کالوس‌ها بودند.



شکل ۳- ریخت شناسی کالوس‌ها برروی دو محیط MS و MS همراه با زغال فعال تحت تاثیر پنج تیمار مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌های CIM2 و CIM2c دارای ساختاری شکننده بودند. تیمارهای CIM1، CIM2c و CIM5c دارای

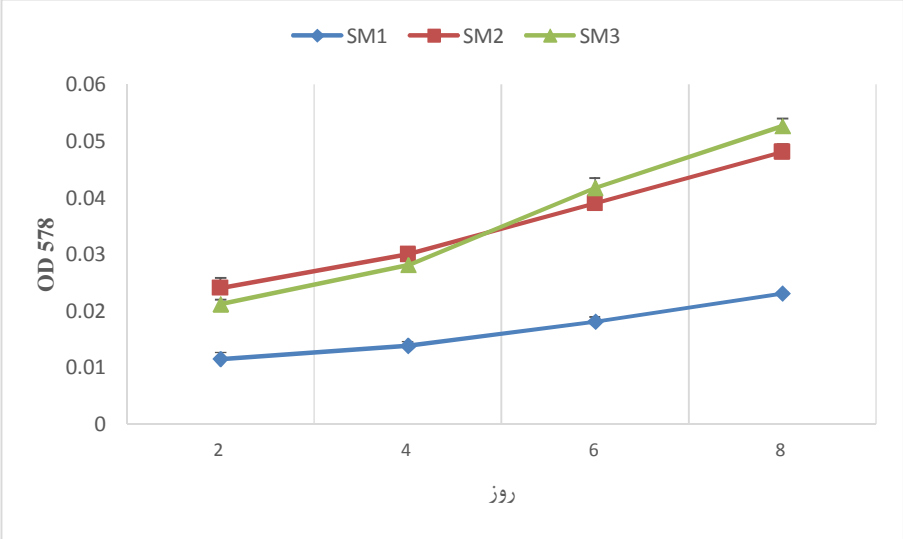
کالوس‌هایی با رنگ زرد روشن، CIM1c، CIM3، CIM3c و CIM4c دارای کالوس‌های کهربایی و CIM2، CIM4 و CIM5 دارای کالوس های کهربایی تیره بودند.



شکل۴- نمونه‌ای از جنین‌های سوماتیکی شکل گرفته روی کالوس زعفران. این جنین‌ها (بخش‌های کروی شیری رنگ) روی محیط CIM1c بعد از ۵ هفته ایجاد شده است.

۳-۳. پویایی رشد در سوسپانسیون سلولی

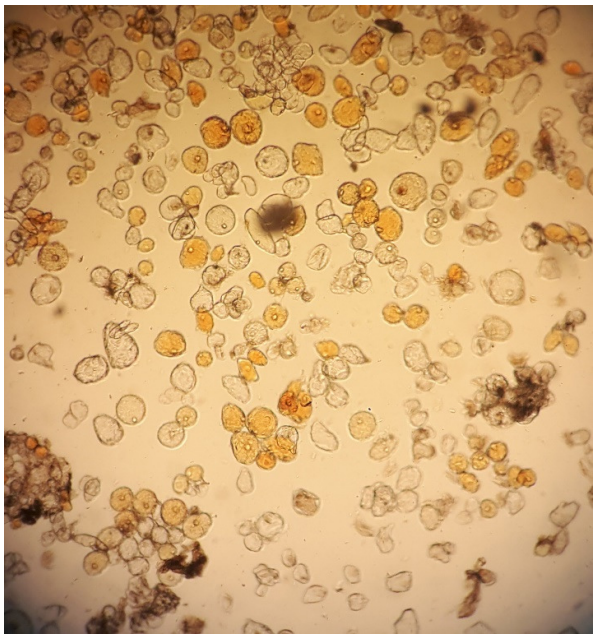
سرعت رشد در سوسپاسیون در یک بازه ۸ روزه بوسیله اندازه گیری جذب در ۵۷۸ نانومتر بررسی گردید. SM2 و SM3 دارای سرعت رشد بالاتری بودند و با گذشت زمان نرخ رشد در SM3 در مقایسه با سایر تیمارها عملکرد بهتری را نشان می‌داد (شکل ۵).



شکل ۵- سرعت رشد در کشت مایع به‌وسیله اندازه گیری جذب در ۵۷۸ نانومتر در یک بازه ۸ روزه.

۳-۴. مورفولوژی سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی

سوسپانسیون‌ها از نظر تراکم سلولی و نوع سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیمارهای SM1 و SM2 دارای تجمع‌های ۵ تا ۱۰ عددی از سلول‌ها بودند ولی در SM3 سلول های منفرد بیشتری قابل مشاهده بود. در هر سه تیمار سلول‌های متفاوتی از نظر رنگ، شکل و اندازه قابل مشاهده بود. SM1 با وجود سرعت رشد کمتر سلول‌هایی کروی کوچک و دارای ساختار خوبی مشاهده شد. در SM2 سلول های حاوی رنگ ریزه در ابتدای کشت مشاهده می‌شد (شکل ۶) که باگذر زمان این رنگ ریزه‌ها از بین میرفتند و در SM3 سلول‌هایی بزرگ که در واکوئل خود حجم زیادی از نشاسته دخیره کرده‌اند مشاهده گردید . مرادی و همکاران (2020) به هدف بهینه سازی تولید کروسین و ترکیبات فنلی، از کلاله زعفران کالوس تولید کرده و سپس از این کالوس ها کشت سوسپانسیون ایجاد کردند. همچنین تولید سافرانال و کروسین و بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز این متابولیت ها نیز در کشت سوسپانسیون سلولی زعفران بررسی شده است(Taherkhani et al, 2019).



شکل ۶- نمونه‌ای از سلول ها در سوسپانسیون سلولی زعفران. سلول‌های حاوی رنگیزه در مرال اولیه رشد مشاهده میشوند.

۴. نتیجه گیری

در اختیار بودن سوسپانسون سلولی پویا و ترجیحا جنین زا در زعفران مزایای زیادی دارد و امکان مطالعه تولید متابولیت های ثانویه زعفران، انتقال ژن و بررسی کارکرد زن‌ها در سطح سلولی، موتاسیون زایی را فراهم خواهد آورد. تیمار های CIM2 و SIM2 در این آزمایش نتایج مناسبی در جهت رسیدن ما به این هدف فراهم کردند.

منابع

- آمار نامه کشاورزی. (۱۳۹۷). وزارت جهاد کشاورزی. www.maj.ir.
- Busconi, M., Soffritti, G., & Fernández, J. A. (2020). Utilizing O-mics technologies for saffron valorization. Woodhead Publishing, 219-228.
- Moradi, A., Zarinkamar, F., De Domenico, S., Mita, G., Di Sansebastiano, G. P., Caretto, S. (2020). Salycilic Acid Induces Exudation of Crocin and Phenolics in Saffron Suspension-Cultured Cells. *Plants*, *9*(8), 949.
- Moscatiello, R., Baldan, B., Navazio, L. (2013). Plant cell suspension cultures. Methods Molecular Biology, 953, 77-93.
- Moshtaghi, N. (2020). Tissue and cell culture of saffron. Woodhead Publishing, 229-246.
- Mustafa, N.R., De Winter, W., Van Iren, F., Verpoorte R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature Protocols, 6, 715.
- Seifi, A., Shayesteh, H. (2020). Molecular biology of Crocus sativus. Woodhead Publishing, 247-258.
- Sello, S., Moscatiello, R., La Rocca, N., Baldan, B., Navazio, L. (2017). A rapid and efficient method to obtain photosynthetic cell suspension cultures of Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science, 8, 1444.

- Shokouhi, D., Seifi, A. (2021). Growth daynamics and cell viability in tomato suspension cultures derived from different types of calli. International Journal of Horticulture Science and Technology, 8, 25-35.
- Taherkhani, T., Asghari Zakaria, R., Omidi, M., & Zare, N. (2019). Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their controlling genes in suspension culture of saffron (*Crocus sativus* L.). Natural product research, 33(4), 486-493.
- Yoon, SY. H., Ketchum, R. E., Caldwell, CG. (2015). U.S. Patent Application No. 14, 395,387.

6th National Conference on Saffron

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
مجتمع آموزش عالی گنـــابـاد

ششمین همایش ملی زعفران

Optimization of cell suspension culture in saffron

Alireza Ramandi[1], Atefe Gholizadegan[2], Alireza Seafi[3*]

1- Master student of Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University.
2- Master of Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University.
3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University.

Abstract

Cultivation of dynamic and preferably embryonic cell suspension in saffron has many advantages and it will be possible to study the production of saffron secondary metabolites, gene transfer and study at the cellular level, mutagenesis. However, the production of embryonic cell suspension in saffron has not been reported. The aim of this study was to achieve a cell suspension system with acceptable growth in saffron. For this purpose, different explants were exposed to different hormonal treatments to determine the callus culture medium and the optimal suspension culture medium. CIM2c treatment had brittle and yellowish calluses and also showed the best performance in callus formation and fresh callus weight. Somatic embryos were formed after five weeks on CIM1c treatment. In suspension culture, SM3 treatment had the fastest velocity in Rasht. In SM2 treatment, the cells were initially pigmented, but over time, these pigments disappeared.

Keywords: saffron corm, Suspension, callus

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