نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد دهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
شماره صفحه: ۲۸۴-۲۷۶
http://dx.doi.org/10.22077/JSR.2022.5718.1198

مقاله پژوهشی:

بهینه سازی کالوس‌زایی و کشت سوسپانسیون سلولی در زعفران

علیرضا رامندی[۱]، عاطفه قلیزادگان احسان آباد[۲]، علیرضا سیفی[۳*]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
*نویسنده مسئول: Email: arseifi@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۴

چکیده

علیرغم اهمیت اقتصادی ویژه زعفران، پژوهش‌های چشمگیری در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک این گیاه انجام نشده است. تریپلویید و نرعقیمی، فقدان تنوع ژنتیکی، دشواری کشت بافت و انتقال ژن از جمله دلایل پیشرفت‌های اندک در پژوهش‌های مولکولی زعفران است. کشت سوسپانسیون سلولی زعفران کمک بسزایی در بهبود پیشرفت این امر خواهد کرد، با این حال تولید سوسپانسیون سلولی پویا در زعفران همواره با مشکلاتی مواجه بوده است. بدین منظور، با استفاده از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد، محیط بهینه القا کالوس در بنه زعفران را به دست آورده و به بهینه کردن کشت سوسپانسیون سلولی در زعفران اقدام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار که هر کدام حاوی ۱۰ ریز نمونه بودند، انجام گرفت. بیشترین درصد کالوس زایی و وزن تازه کالوس‌ها در تیمار حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد. در مرحله بعد از کالوس‌های حاصل از این تیمار جهت کشت سوسپانسیون سلولی استفاده گردید. محیط SM3 حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲ میلی گرم بر لیتر NAA دارای بهترین سرعت رشد در کشت سوسپانسیون سلولی بود ولی سلول‌ها در این تیمار هورمونی دارای شکل و فرم مناسب نبودند. محیط SM2 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP دارای سرعت رشد مناسب و سلول‌هایی با اندازه کوچک و دارای رنگیزه بودند که از نظر کیفیت بهترین عملکرد را در بین تیمارهای کشت مایع دارا بود. جهت افزایش کیفیت از مواد کنترل کننده تولید فنول استفاده شد. افزودن PVP سبب افزایش سرعت رشد سوسپانسیون سلولی در محیط SM2 گردید. محیط SM2 به عنوان محیط کشت مناسب برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی پویا در زعفران، جهت استفاده در مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی، معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کشت سلولی، 2,4-D، BAP، تنظیم کننده‌های رشد، مواد فنولی.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یک گونه گیاهی مهم تجاری است که عمدتاً در یک کمربند جغرافیایی از هند تا ناحیه مدیترانه کشت می‌شود (Ramandi et al., 2023; Khoshpeyk et al., 2022: Schmidt et al., 2019). ایران دارای بیشترین سطح زیر کشت زعفران در جهان می‌باشد، به طوری که، در سال ۱۳۹۷ سطح زیر کشت زعفران در کل کشور حدود ۱۱۴ هزار هکتار با تولید حدود ۴۰۵ تن گل بوده است. ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید زعفران در دو استان خراسان رضوی و جنوبی بوده است (Kohansal et al., 2022; Konjkav, 2022).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی ویژه زعفران، پژوهش‌های چشمگیری در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک این گیاه انجام نشده است. تریپلویید و نرعقیمی، فقدان تنوع ژنتیکی، دشواری کشت بافت و انتقال ژن از جمله دلایل پیشرفت‌های اندک در پژوهش‌های مولکولی زعفران است. با این حال در چند سال اخیر توجه پژوهشگران در اروپا، ایران، ترکیه، هند، چین و پاکستان به پژوهش‌های 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 & Shayesteh 2020)، پزشکی (Ramandi et al., 2022) و تحقیقات 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 (Rezaei et al., 2022). با این حال فقدان روش‌های 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 بیوشیمیایی و مولکولی در سطح سلولی، تولید ترکیبات ثانویه گیاهی، پروتئین‌های نوترکیب، موتاسیون زایی و مهندسی ژنتیک هستند. امتیاز بزرگ کشت سوسپانسیون سلولی این است که از این طریق برطرف کردن پیچیدگی‌های استفاده از ساختار کلی گیاه، امکان مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی و مولکولی با دقت بیشتری میسر می‌گرداند (Sello et al., 2017; Moscatiello et al., 2013). کشت‌های سلولی معمولاً با قراردادن قطعه‌ای 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 سلول‌های تا حد امکان منفرد دارد.

مزایای استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی مانند قابلیت استفاده در مقیاس بزرگ، چرخه سلولی کوتاه، استقلال از شرایط محیطی مانند دوره نوری و کیفیت خاک، شرایط استریل، امنیت زیستی بالا و سهولت تصفیه محصولاتی مانند پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌های ثانویه کشت سوسپانسیون سلولی را ابزاری عالی برای مطالعات آزمایشگاهی بدل کرده است (Huang & McDonald, 2012; Rademacher et al., 2019).

در اختیار بودن سوسپانسیون سلولی پویا و ترجیحاً جنین زا در زعفران مزایای زیادی دارد و امکان مطالعه تولید متابولیت های ثانویه زعفران، انتقال ژن و بررسی کارکرد ژن‌ها در سطح سلولی، موتاسیون زایی را فراهم خواهد آورد. گزارشات معدودی از ایجاد کشت سوسپانسیون سلول در زعفران، عمدتاً برای تولید متابولیت های ثانویه، گزارش شده است (Yoon et al., 2015; Moradi et al., 2020; Taherkhani et al., 2019). با هدف بهینه سازی تولید کروسین و ترکیبات فنلی، پژوهشگران از کلاله زعفران کالوس ایجاد کرده و سپس از این کالوس‌ها به منظور کشت سوسپانسیون استفاده کردند (Moradi et al., 2020). تولید سافرانال و کروسین و بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز این متابولیت‌ها نیز در کشت سوسپانسیون سلولی زعفران بررسی شده است (Taherkhani et al., 2019). با این حال، تولید سوسپانسیون سلولی جنین‌زا در زعفران گزارش نشده است. هدف از پژوهش حاضر دستیابی به یک سیستم سوسپانسیون سلولی با سلول‌هایی با سرعت رشد و پویایی بالا در زعفران بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ در مرکز زیست-فناوری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در سال اول بنه‌های زعفران از مزارع زعفران شهرستان بیرجند (خراسان جنوبی، ایران) جمع‌آوری

شدند. لایه‌خارجی (تونیک) بنه‌ها حذف گردید. بنه‌ها و برگ‌ها با آب و مایع ظرفشویی کاملاً شسته شدند. 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 (Ramandi et al., 2019). از برگ‌ها ریزنمونه‌هایی به مساحت تقریبی یک سانتی‌متر مربع تهیه شد. جوانه‌های جانبی و انتهایی و قسمت میانی بنه‌ها جدا شدند و به شرح فوق ضدعفونی شدند. لایه نازکی از این قطعات بنه استریل شده، حذف شد و سپس ریز نمونه‌هایی به قطر تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر تهیه شد. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت 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 نام‌های CIM1 تا CIM6 در جدول ۱ مشخص شده است.

در سال دوم بنه‌های زعفران از مزارع شهرستان تربت حیدریه (استان خراسان رضوی، ایران) جمع آوری شد. جوانه‌های جانبی و انتهایی و قاعده بنه‌ها حذف شد و قسمت مرکزی بنه برای تهیه ریز نمونه استفاده شد. ضدعفونی قطعات بنه، 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 زغال فعال بر کالوس زایی، ۰/۳ درصد زغال فعال (Sigma, M5519) نیز به هر کدام از محیط ها اضافه شد. محیط حاوی زغال فعال با افزودن C در انتهای نام محیط مشخص شده است.

در هر دو آزمایش، در هر پتری دیش ۱۰ ریزنمونه قرار داده شد و سپس پتری دیش‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از سه هفته ریز نمونه ها واکشت شد و ۲ هفته بعد از واکشت، درصد کالوس زایی و وزن‌تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار انجام شد.

جدول ۱. ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد محیط‌های کالوس‌زایی (CIM) و کشت سوسپانسیون سلولی (SM).

Table 1. The growth regulator combinations of callus formation media (CIM) and cell suspension culture media (SM).

محیط کشت Media	ترکیب هورمون گیاهی (میلی گرم بر لیتر) The combinations of growth regulators				
	BAP (Sigma, B3408)	2,4-D (Sigma, D6679)	IAA (Sigma, I3750)	Zeatin (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

کشت سوسپانسیون سلولی

از کالوس‌های حاصل از تیمار CIM2c جهت تهیه کشت مایع، همراه با ۳ نوع محیط کشت مختلف حاوی BAP، 2,4-D و Zeatin استفاده شد (جدول ۱). دو قطعه کالوس با قطر ۰/۵ سانتی متری در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط MS حاوی ۲٪ ساکارز و ترکیبات مختلف از تنظیم کننده‌های رشد 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 میکرومتر) حذف شد و سلول‌ها به فالکون‌های ۵۰ میلی لیتری منتقل شدند. فالکون‌ها 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 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جدید، واکشت انجام شد.پس از دو بار واکشت در هفته سوم سرعت رشد و مورفولوژی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه سازی بهترین تیمار کشت سوسپانسیون سلولی

جهت بهینه سازی کشت سوسپانسیون سلولی از تیمار SM2 حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و PVP استفاده گردید (برای نشان دادن محیط MS ½ حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و PVP، حروف h و a به انتهای نام محیط اضافه شد).

اندازه گیری سرعت رشد در سوسپانسیون سلولی

برای مقایسه سرعت رشد سلولی در تیمارهای مختلف سوسپانسیون سلولی، روش اندازه‌گیری چگالی نوری (OD) سوسپانسیون سلولی استفاده شد (Shokouhi & Seifi., 2021). برای این منظور در یک دوره هشت روزه، هر ۲ روز یک بار چگالی نوری ۱ میلی‌لیتر از کشت-های سلولی در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه گیری شد.

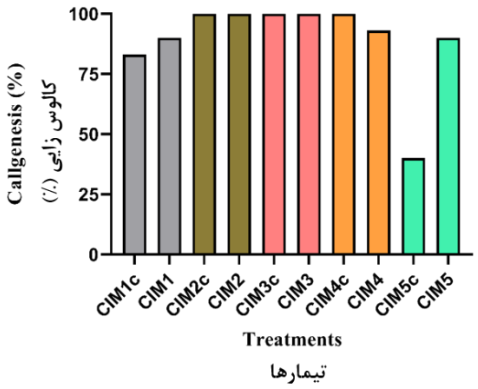
آنالیز آماری داده‌ها

تمام آزمایشات و اندازه‌گیری‌ها دارای دو تکرار بود، بجز کالوس‌زایی که در ۱۰ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون مقایسه میانگین Tukey HSD با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای ترسیم نمودارها از GraphPad Prism 9 استفاده شد.

نتایج و بحث

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 بنه کالوس‌زایی 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 بنه بهینه سازی شد. به این منظور ریزنمونه‌ها روی ۵ محیط CIM1 تا CIM5 روی محیط حاوی زغال فعال و یا فاقد زغال فعال قرار داده شدند. نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی در همه محیط‌ها به جز محیط CIM5 بالا بود. قابل ذکر است که افزودن زغال فعال تاثیر معنی‌داری روی کالوس-زایی روی محیط‌های CIM1 تا CIM4 نداشت، ولی باعث کاهش درصد کالوس زایی روی محیط CIM5 شد (شکل ۱). استفاده از غلظت‌های چهار میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک میلی‌گرم بر لیتر TDZ می‌تواند درصد کالوس‌زایی را تا ۱۰۰ درصد افزایش دهد (Verma et al., 2016). که نشان از تاثیر بالای اکسین‌ها بر درصد کالوس‌زایی دارد. با این حال، نتایج ما نشان دهنده تاثیر مشابه تنظیم کننده رشد 2,4-D در افزایش درصد کالوس زایی همانند سایر اکسین‌های گزارش شده است.

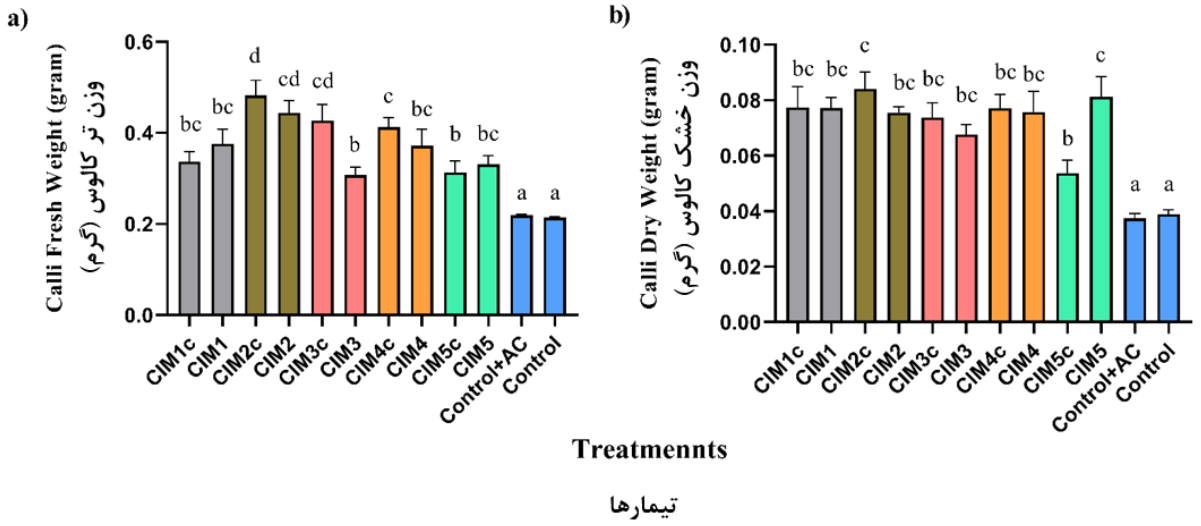


شکل ۱. درصد کالوس زایی پنج تیمار CIM1، CIM2، CIM3، CIM4 و CIM5 برروی دو محیط MS و MS همراه با ذغال فعال.

Fig 1. Callogenesis percentage of five treatments CIM1, CIM2, CIM3, CIM4 and CIM5 on MS and MS with activated charcoal.

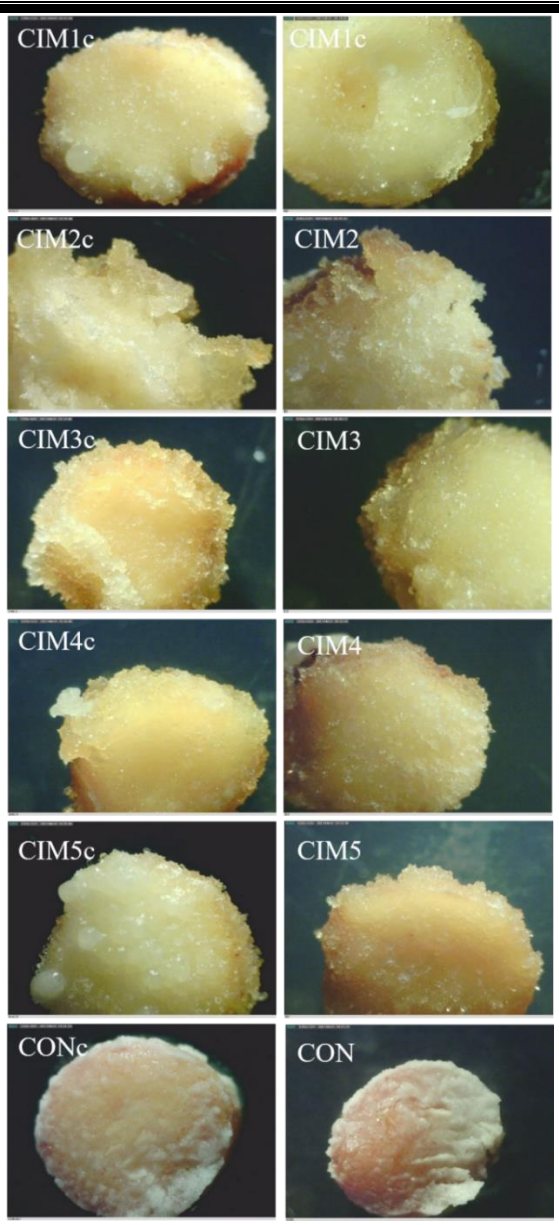
اندازه و ریخت شناسی کالوس‌ها

وزن کالوس‌های ایجاد شده روی محیط‌های مختلف اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود کالوس‌های 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). به طور کلی القا و رشد کالوس در کشت بافت گیاهی به انواع غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاه مورد استفاده در محیط بستگی دارد. علاوه بر این، نسبت اکسین به سیتوکینین نیز نقش مهمی در کالوس زایی دارد (Amini et al., 2013). بر این اساس، نوع و بهترین سطوح این تنظیم کننده‌های رشد و همچنین تأثیر متقابل آنها با یکدیگر و عواملی مانند نوع و سن ریزنمونه‌ها باید بررسی شوند. تاکنون تحقیقات متعددی انجام شده است که تأثیر انواع و سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد را بر القای کالوس زعفران نشان می‌دهد (Georgiev et al., 2009; Sharma et al., 2008). نتایج تحقیقات نشان داده است که همانند نتایج تحقیق حاضر، غلظت‌های یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4 D به همراه دو میلی‌گرم بر لیتر BAP بهترین تاثیر را در کالوس زایی زعفران داراست (Safarnejad et al., 2016).



شکل ۲. a) نمودار تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر کالوس. تیمارهای CIM2 و CIM2c دارای بالاترین و CIM3 و CIM5c دارای پایین ترین وزن تر کالوس بودند. b) نمودار تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن خشک کالوس. تیمارهای CIM5 و CIM1 دارای بالاترین و تیمار CIM5c دارای پایین ترین وزن خشک کالوس بودند.

Fig 2. a) The effects of different treatments on fresh callus weight. CIM2 and CIM2c treatments had the highest and CIM3 and CIM5c had the lowest callus fresh weight. b) The effects of different treatments on callus dry weight. CIM5 and CIM1 treatments had the highest and CIM5c treatment had the lowest callus dry weight.

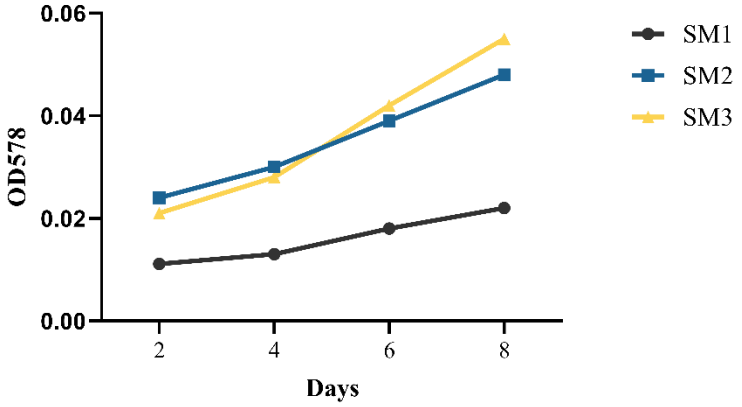


شکل ۳. ریخت شناسی کالوس‌ها برروی دو محیط MS و MS همراه با زغال فعال تحت تاثیر پنج تیمار مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌های CIM2 و CIM2c دارای ساختاری شکننده بودند. تیمارهای CIM1، CIM2c و CIM5c دارای کالوس‌هایی با رنگ زرد روشن، CIM1c، CIM3، CIM3c و CIM4c دارای کالوس‌های کهربایی و CIM2، CIM4 و CIM5 دارای کالوس های کهربایی تیره بودند.

Fig 3. Morphology of calli obtained on different media. MS medium with or without activated charcoalm supplemented with five different combinations of growth regulators were used. CIM2 and CIM2c calli had fragile structure. Treatments CIM1, CIM2c and CIM5c had light yellow calluses, CIM1c, CIM3, CIM3c, CIM4c had amber calluses, and CIM2, CIM4 and CIM5 had dark amber calli.

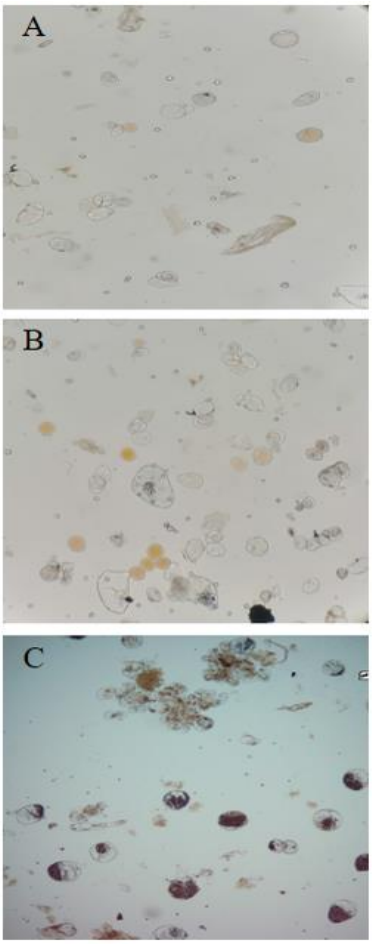
پویایی رشد در سوسپانسیون سلولی

سرعت رشد در سوسپانسیون در یک بازه ۸ روزه بوسیله اندازه‌گیری جذب در ۵۷۸ نانومتر بررسی گردید. SM2 وSM3 دارای سرعت رشد بالاتری بودند و با گذشت زمان نرخ رشد در SM3 در مقایسه با سایر تیمارها عملکرد بهتری را نشان داد (شکل ۴). هورمون‌های سیتوکنین تاثیر مهمی در افزایش حجم سوسپانسیون و کالوس دارند. همان طور که پژوهش حاضر نشان داد، از بین اکسین‌ها، 2, 4-D نسبت به NAA تاثیر بیشتری پویایی کشت سلولی داشت، که در تضاد با سایر مطالعات بود (Ahmad et al., 2013). که می‌تواند ناشی از تحریک پذیری بیشتر بافت بنه زعفران به 2. 4-D نسبت به NAA در ایجاد کالوس باشد.



شکل۴. مقایسه سرعت رشد سلول‌ها در ۳ محیط مختلف کشت سوسپانسیون سلولی. بررسی روند رشد سلولی در کشت مایع بر اساس اندازه‌گیری میزان جذب در ۵۷۸ نانومتر در یک بازه ۸ روزه نشان داده شده است.

Fig 4. Comparison of cell growth rate in 3 different cell suspension culture media. Investigating the process of cell growth in liquid culture is shown based on the measurement of absorbance at 578 nm in a period of 8 days.



شکل۵. مورفولوژی سلول‌ها در تیمارهای مختلف کشت سوسپانسیون سلولی. SM1 دارای تراکم سلولی پایین و سلول‌های کروی کوچک بود (A). SM2 و SM3 دارای واکوئل‌های بزرگ بودند که مقدار زیادی نشاسته در خود ذخیره داشتند (B و C).

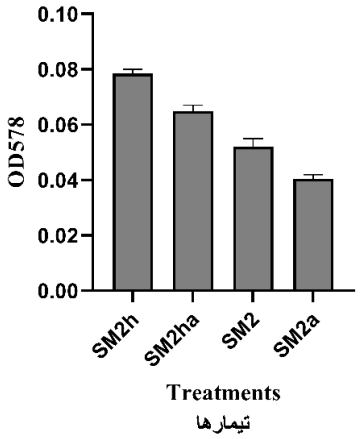
Fig 5. Morphology of cells in different cell suspension culture media. SM1 had low cell density and small spherical cells (A). SM2 and SM3 had large vacuoles that stored a large amount of starch (B and C).

مورفولوژی سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی

سوسپانسیون‌های سلولی 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 سلول‌های منفرد بیشتری قابل مشاهده بود. در هر سه تیمار سلول‌های متفاوتی از نظر رنگ، شکل و اندازه قابل مشاهده بود. درSM1 با وجود سرعت رشد کمتر سلول‌هایی کروی کوچک و دارای ساختار خوبی مشاهده شد. در SM2 سلول های حاوی رنگیزه در ابتدای کشت مشاهده می‌شد که با گذشت زمان این رنگیزه‌ها از بین می‌رفتند. علاوه بر این، در SM3 سلول-هایی بزرگ که مقدار زیادی نشاسته در واکوئل خود ذخیره کرده بودند مشاهده گردید (شکل ۵).

بهینه سازی محیط کشت سوسپانسیون

جهت بهینه کردن محیط کشت سوسپانسیون سلولی از تیمار هورمونی SM2 به دلیل دارای بودن کلاسترهای ۵ تا ۱۰ عددی و تنوع سلولی بالاتر نسبت به تیمار SM3 استفاده گردید. کاهش غلظت محیط MS سبب افزایش سرعت رشد سوسپانسیون سلولی می‌گردید ($SM2_a$)، هم چنین اضافه کردن اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، و PVP به عنوان مواد مهار کننده ترکیبات فنولی (محیط کشت SM2h) عملکرد منفی بر سرعت رشد سلولی داشت (شکل ۶).



شکل۶. بررسی سرعت رشد در کشت مایع در محیط های مختلف به وسیله اندازه گیری جذب در ۵۷۸ نانومتر پس از ۸ روز.

Fig 6. the cell growth rate in different suspension culture media. The growth rate was compared by measuring absorption at 578 nm after 8 days of initiation of cell cultures.

نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان داد که بهترین ریزنمونه برای کالوس زایی در زعفران قسمت میانی بنه است. بیشترین درصد کالوس زایی و بیشترین وزن کالوس از استفاده از این ریزنمونه در محیط MS حاوی یک میلی گرم بر لیتر BAP و دو میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D به دست آمد. در محیط‌های کشت SM2 و SM3 بالاترین سرعت رشد سوسپانسیون سلولی مشاهده شد. با این وجود، تیمار SM3 دارای سلول‌هایی با واکوئل دارای نشاسته بالا بودند. اما تیمار SM2 دارای سلول‌های کوچک‌تر و حاوی رنگیزه بود.

منابع

Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, R. M., & Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. Am Eurasian J Agric Environ Sci, 13(4), 539-547.

Amini, F., Ghanbarzadeh, Z. & Askary Mehrabadi, M. (2013). Optimization of callus production and plant regeneration in *Salsola arbuscular* pall. *Journal of Cell and Tissue*, *4*(2), 129-137.

Busconi, M., Soffritti, G., & Fernández, J. A. (2020). Utilizing O-mics technologies for saffron valorization. In *Saffron* (pp. 219-228). Woodhead Publishing.

Huang, T. K., & McDonald, K. A. (2012). Bioreactor systems for in vitro production of

foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology advances*, *30*(2), 398-409.

Georgiev, M. I., Weber, J. & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(5), 809-823.

Kohansal, M., hendizadeh, H., sahabi, H. (2022). Investigating the Factors Affecting Iran's Saffron Trade with an Emphasis on the Role of Trade Sanctions. *Journal of Saffron Research*, 9(2), 322-310.

Konjkav Monfared, A. (2022). The Effect of Internet Marketing Capabilities on International Communications and Export Capabilities of Companies Operating in The Saffron Industry. *Journal of Saffron Research*, 10(1).

Khoshpeyk, S., sadrabadi haghghi, R., ahmadian, A. (2022). The Effect of Irrigation Water Quality and Application of Silicon, Nanosilicon and Superabsorbent Polymer on the Yield and Active Ingredient of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 10(1), 64-83.

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 Mol Biol*, 953, 77-93.

Moshtaghi, N. (2020). Tissue and cell culture of saffron. In *Saffron* (pp. 229-246). Woodhead Publishing.

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.

Ramandi, A., Nourashrafeddin, M., Marashi, H., Seifi, A. (2023). Microbiome contributes to phenotypic plasticity in saffron crocus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(9).

Ramandi, A., Naseri, M., Yousefijavan, I. (2022). The Effect of aqueous extract of *crocus sativus* style on blood coagulation indices in Rats. *Journal of Saffron Research*, 10(1), 168-160.

Rademacher, T., Sack, M., Blessing, D., Fischer, R., Holland, T., & Buyel, J. (2019). Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(8), 1560- 1566.

Ramandi, A., Javan, I. Y., Tazehabadi, F. M., Asl, G. I., Khosravanian, R., & Ebrahimzadeh, M. H. (2019). Improvement in Seed Surface Sterilization and in vitro Seed Germination of Ornamental and Medicinal Plant-*Catharanthus roseus* (L.). Chiang Mai Journal of Science, 46(6), 1107-1112.

Rezaei, M., Sharifi, H., & Seifi, A. (2022). Transcriptome assembly and identification of EST-SSR markers in crocus sativus. *Saffron Agronomy and Technology*, *10*(1), 41-49.

Safarnejad, A., Alamdari, S. B. L., Darroudi, H. & Dalir, M. (2016). The effect of different hormoneson callus induction, regeneration and multiplication of saffron (*Crocus sativus* L.) corms. *Saffron Agronomy & Technology*, *4*(2), 143-154.

Seifi, A., & Shayesteh, H. (2020). Molecular biology of Crocus sativus. In *Saffron* (pp. 247-258). Woodhead Publishing.

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.

Sharma, K., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T. & Singh, B. (2008). In vitro cormlet development in *Crocus sativus*. *Plant Biology*, *52*(4), 709-712.

Schmidt, T., Heitkam, T., Liedtke, S., Schubert, V., & Menzel, G. (2019). Adding color to a century-old enigma: multi-color chromosome identification unravels the autotriploid nature of saffron (Crocus sativus) as a hybrid of wild Crocus cartwrightianus cytotypes. *New Phytologist*, *222*(4), 1965- 1980.

Shokouhi, D., Seifi, A. (2021). Growth dynamics 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, S. Y. H., Ketchum, R. E., Caldwell, C. G. (2015). U.S. *Patent Application No.* 14, 395-387.

COPYRIGHTS

© 2022-2023 by the authors. Published by University of Birjand – Saffron Research Group. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)