



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: ۱۴۰۱/۰۷/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۴

چکیده

علیرغم اهمیت اقتصادی ویژه زعفران، پژوهش‌های چشمگیری در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک این گیاه انجام نشده است. تربیلوبید و نرعیمی، 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 تنظیم‌کننده‌های 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 کالوس‌زایی و وزن تازه کالوس‌ها در تیمار حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 4-D, 2 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 میلی‌گرم 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 4-D, 2 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 کنترل‌کننده 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، 4-D, 2, BAP، تنظیم‌کننده‌های رشد، مواد فنولی.

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 سوسپانسیون سلولی سریع‌الرشد 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 نو ترکیب 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 جنین‌زا در زعفران مزایای زیادی دارد و امکان مطالعه تولید متابولیت‌های ثانویه زعفران، انتقال ژن و بررسی کارکرد ژن‌ها در سطح سلولی، موتاسیون‌زایی را فراهم خواهد آورد. گزارشات معدودی از ایجاد کشت سوسپانسیون سلول در زعفران، عمدتاً برای تولید متابولیت‌های 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

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. تریپلوئید و نرعیمی، 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 مولکولی (Ramandi et al., 2020) (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 نو ترکیب، موتاسیون‌زایی 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 سریع‌الرشد در محیط مایع

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 محیط‌های 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 محیط‌ها 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 نمونه‌ها واگشت شد و ۲ هفته بعد از واگشت، درصد کالوس زایی و وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار انجام شد.

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) جمع‌آوری شد.

جدول ۱. ترکیبات تنظیم‌کننده‌های 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

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 فالكون‌های ۵۰ میلی لیتری منتقل شدند. فالكون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی میز آزمایشگاه قرارداده شدند تا سلول‌ها ته‌نشین

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 تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفت.

افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای ترسیم نمودارها از 9 GraphPad Prism استفاده شد.

نتایج و بحث

نرخ کالوس‌زایی

در سال اول این آزمایش امکان کالوس‌زایی 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 کالوس‌زایی روی محیط CIM2، ۷۶ درصد و روی محیط CIM1، ۶۷ درصد بود. در سال دوم شرایط کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های تهیه شده از ناحیه مرکزی بنه بهینه‌سازی 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 کالوس‌زایی روی محیط‌های CIM1 تا CIM4 نداشت، ولی باعث کاهش درصد کالوس‌زایی 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 تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در افزایش درصد کالوس‌زایی همانند سایر اکسین‌های گزارش شده است.

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 میلی‌لیتر محیط کشت جدید، واکشت انجام شد. پس از دو بار واکشت در هفته سوم سرعت رشد و مورفولوژی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی بهترین تیمار کشت سوسپانسیون سلولی

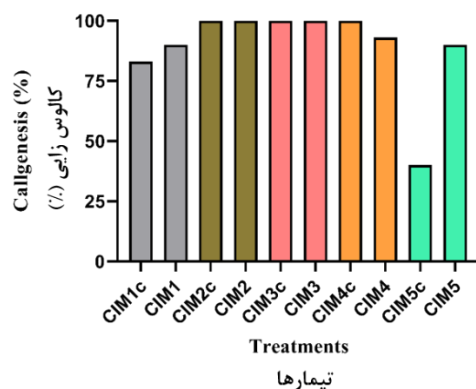
جهت بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی از تیمار SM2 حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و PVP استفاده گردید (برای نشان دادن محیط 1/2 MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و PVP، حروف a و h به انتهای نام محیط اضافه شد).

اندازه‌گیری 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 کشت‌های سلولی در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه‌گیری 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



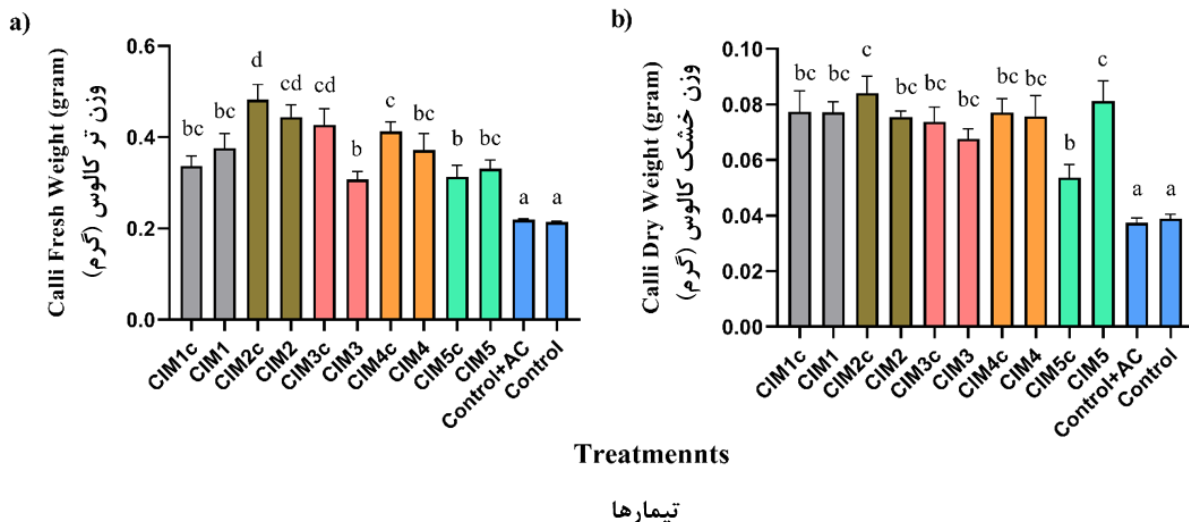
شکل ۱. درصد کالوس‌زایی پنج تیمار CIM1، CIM2، CIM3، CIM4، CIM5 و CIM5 بر روی دو محیط MS و MS همراه با ذغال فعال.

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

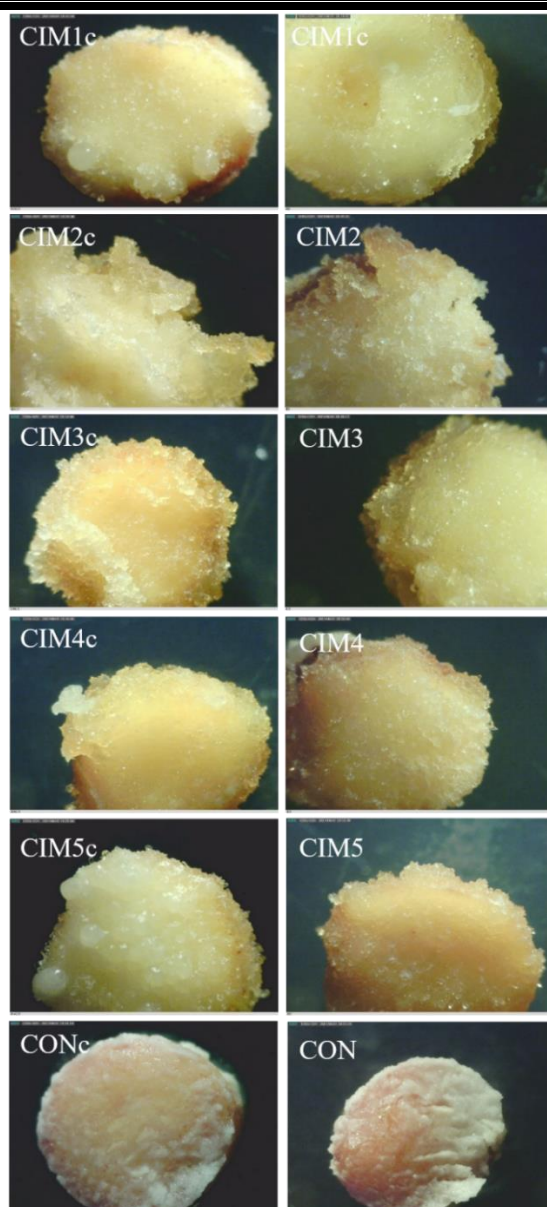
وزن کالوس‌های ایجاد شده روی محیط‌های مختلف اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود کالوس‌های ایجاد شده روی محیط CIM2 بزرگتر و سنگین‌تر بودند. علاوه بر این کالوس‌ها با رنگ‌های زرد روشن، کهربایی و کهربایی تیره قابل مشاهده بود (شکل ۳). به طور کلی القا و رشد کالوس در کشت بافت گیاهی به انواع غلظت تنظیم‌کننده‌های 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 تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین تأثیر متقابل آنها با یکدیگر و عواملی مانند نوع و سن ریزنمونه-ها باید بررسی شوند. تاکنون تحقیقات متعددی انجام شده است که تأثیر انواع و سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های 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 تأثیر را در کالوس زایی زعفران داراست (Safarnejad et al., 2016).



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



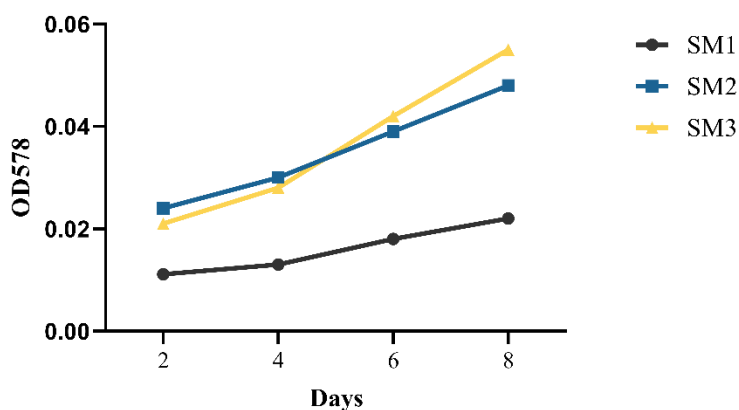
شکل ۳. ریخت شناسی کالوس‌ها بر روی دو محیط MS و MS همراه با زغال فعال تحت تاثیر پنج تیمار مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌های CIM2 و CIM2c دارای ساختاری شکننده بودند. تیمارهای CIM1، CIM2c و CIM5c دارای کالوس‌هایی با رنگ زرد روشن، CIM1c، CIM3، CIM3c، CIM4c و CIM4 دارای کالوس‌های کهربایی و CIM2، CIM4 و CIM5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

Fig 3. Morphology of calli obtained on different media. MS medium with or without activated charcoal 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.

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.

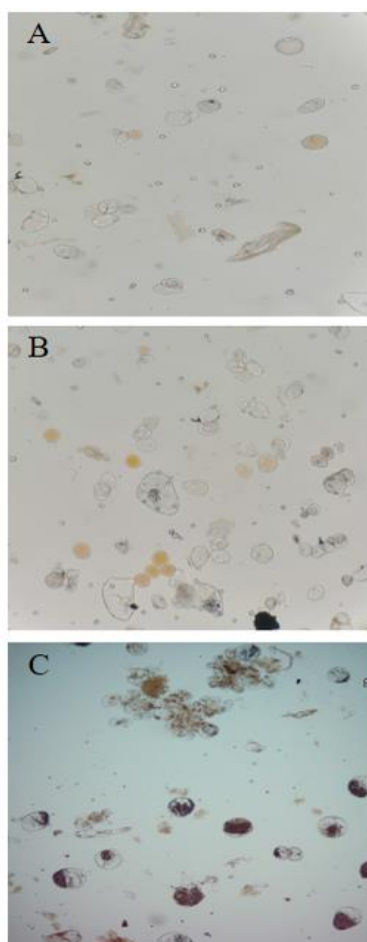
پویایی رشد در سوسپانسیون سلولی

سرعت رشد در سوسپانسیون در یک بازه ۸ روزه بوسیله اندازه‌گیری 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 داد (شکل ۴). هورمون‌های سیتوکینین



شکل ۴. 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.



شکل ۵. مورفولوژی سلول‌ها در تیمارهای مختلف کشت سوسپانسیون سلولی. SM1 دارای تراکم سلولی پایین و سلول‌های کروی کوچک بود (A). SM2 و SM3 دارای واکنش‌های بزرگ بودند که مقدار زیادی نشاسته در خود ذخیره داشتند (B و C).

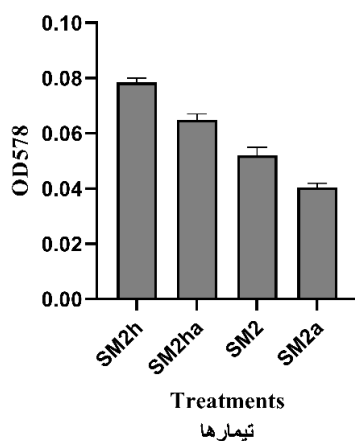
Fig 5. Morphology of cells in different cell suspension culture media. SM1 had low cell density and small spherical cells (A). SM2 and SM3 had large vacuoles that stored a large amount of starch (B and C).

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 (SM2a)، 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).

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. در SM1 با وجود سرعت رشد کمتر سلول‌هایی کروی کوچک و دارای ساختار خوبی مشاهده شد. در SM2 سلول‌های حاوی رنگیزه در ابتدای کشت مشاهده می‌شد که با گذشت زمان این رنگیزه‌ها از بین می‌رفتند. علاوه بر این، در SM3 سلول‌هایی بزرگ که مقدار زیادی نشاسته در واکوئل خود ذخیره کرده بودند مشاهده گردید (شکل ۵).



شکل ۶. بررسی سرعت رشد در کشت مایع در محیط‌های مختلف به وسیله اندازه‌گیری 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.

BAP و دو میلی‌گرم بر لیتر 4-D, 2 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.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد که بهترین ریزنمونه برای کالوس‌زایی در زعفران قسمت میانی بنه است. بیشترین درصد کالوس‌زایی و بیشترین وزن کالوس از استفاده از این ریزنمونه در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر

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). Salicylic 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 hormones on 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., Omid, 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/>)

