Journal of Saffron Research (semi-annual)
Vol. 12, No. 2, Fall & Winter, 2024-2025
p. 241- 255
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2025.8554.1258

University of Birjand

Original Article

Assessment of Conditions for Long Storage of Saffron Corm-Derived Callus

Somaye Amini [1], Seyed Mahdi Ziaratnia [2]*
1- PhD, Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran &Adjunct Professor of Horticultural Sciences Department, Birjand University, Birjand, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

*Corresponding author: *m.ziaratnia@rifst.ac.ir*

Received 11 December 2024; Accepted 07 February 2025

Extended Abstract

Introduction: The efficient long-term storage of plant callus tissues plays a crucial role in preserving and capitalizing on plant genetic resources. Traditional subculturing techniques can be laborious and expensive, often resulting in contamination, genetic instability, and alterations in metabolite profiles. Recent researches suggest that lowering storage temperatures, while avoiding freezing conditions, can significantly improve the viability of callus cultures by inhibiting metabolic activity. This strategy may reduce the necessity for frequent subculturing while maintaining the quality of the cultures. This study sought to discover an effective method for preserving saffron (*Crocus sativus* L.) callus, with a specific focus on sustaining its physiological functions, particularly its regenerative capabilities.

Materials and Methods: This study was conducted at the Research Institute of Food Science and Technology (RIFST) in Mashhad, focusing on the regenerative capability of saffron corm-derived calli. Saffron corms were harvested in mid-May and subjected to surface sterilization through washing with tap water, immersion in 70% ethanol for 1 minute, and treatment with 1% sodium hypochlorite solution. Residual disinfectants were removed by rinsing with sterile water. The sterilized corms were sliced into 1 cm^2 with 1-2 mm thickness and cultured on solid Gamborg's medium (B_5) supplemented with 2 mg/L NAA, 1 mg/L Kinetin (Kin), and 3% sucrose. The cultures were incubated in the dark at 22±2 °C, with subculturing occurring every 20 days to promote callus development. Upon reaching sufficient callus volume, the samples underwent various storage treatments: calli were stored at 4 °C and 22±2 °C, both with and without liquid paraffin coverage for three months without subculturing. The control group comprised calli maintained at room temperature with routine subculturing every three weeks. After the storage period, all calli were transferred to a liquid SH medium containing 2 mg/L NAA, 1 mg/L 6-benzyladenine (BA), and 3% sucrose for six weeks. Parameters including cell growth index, medium pH, and cell viability (live versus dead), were assessed every week. At the end of the culture period, the amount of crocin as the main

secondary metabolite in the saffron cells was measured using spectrophotometric method.

Results and Discussion: The results demonstrated that the stored calli at 4 ℃ showed the highest cell growth index after transfer to liquid culture medium. In contrast, calli covered with liquid paraffin at both 4 ℃ and 22±2 ℃ exhibited a complete loss of regeneration capacity in suspension culture. Interestingly, low-temperature storage not only maintained but also enhanced cell growth index (1.02) in liquid culture when compared to the control treatment (0.42). It is due to the growth of live cells which was evidenced by live cell counts using trypan blue staining. These findings highlight the critical role of temperature regulation in the successful storage of plant callus tissues. Our study also aligning with prior researches as they suggest that refrigerated storage is suitable for the preservation of calli derived from chilling-tolerant plants, but it is not suitable for chilling-sensitive species.

Conclusion: This study concludes that saffron corm-derived calli can be effectively maintained with preserved regenerative capacity when stored at 4 °C for three months without subculture. Additionally, the regeneration capacity was optimized, reflected by a high ratio of live to dead cells after transferring to a cell suspension culture. Thus, storage of saffron calli at 4 ℃ is a reliable and efficient method for long-term conservation. Among the studied treatments, only the calli maintained under control conditions showed crocin content (1.1 mg of per gram of dry cells). Considering that this study was the first to investigate long-term storage methods for saffron calli, it is obvious that more research is needed to increase metabolites after the long storage of calli.

Acknowledgements: We extend our gratitude to the Institute of Food Science and Technology for their financial support throughout this research.

Conflict of Interest: No conflicts of interest have been declared by the authors.

Keyworlds: Cold, *Crocus sativus*, Paraffin, SH medium.

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد دوازدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
شماره صفحه: ۲۵۵ - ۲۴۱
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2025.8554.1258

مقاله پژوهشی

ارزیابی شرایط برای نگهداری طولانی مدت کالوس حاصل از بنه زعفران

سمیه امینی [۱]، سید مهدی زیارت نیا [۲*]

۱- دانش آموخته دکترا رشته گیاهان دارویی، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران و استاد مدعو گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، موسسه علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

*. نویسنده مسئول: Email: *m.ziaratnia@rifst.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۹

چکیده

زیرکشت کالوس‌های گیاهی، نه تنها فرایندی پرهزینه و وقت‌گیر است بلکه احتمال آلودگی سلول‌ها، تغییرات ژنتیکی و امکان تغییر در ماهیت متابولیت‌ها نیز وجود دارد. در این تحقیق روش‌های افزایش مدت زمان نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران به نحوی که قابلیت باززایی سلول‌ها حفظ شود، بررسی شد. این روش‌ها شامل نگهداری در یخچال، دمای اتاق و در زیر لایه‌ای از پارافین بودند. در تیمار کنترل، کالوس‌ها در دمای اتاق بدون حضور پارافین نگهداری شده و هر ۲۰ روز یکبار زیرکشت شدند. بعد از اتمام دوره کشت، کالوس‌ها به محیط SH مایع با ترکیب هورمونی NAA(2mg/l)+BA(1mg/l) انتقال یافتند. سپس در طی ۶ هفته پارامترهای شاخص رشد سلولی، تغییرات پی‌اچ محیط‌کشت و تعداد سلول‌های زنده و غیرزنده اندازه‌گیری شدند. در انتهای دوره کشت میزان کروسین سلول‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان رشد سلول از کالوس‌هایی بدست آمد که در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند. از طرفی کالوس‌هایی که در زیر لایه‌ای از پارافین نگهداری شدند، قابلیت تکثیر در کشت تعلیقی را از دست دادند. بر اساس این نتایج، کالوس‌های حاصل از بنه زعفران را می‌توان بدون نیاز به زیرکشت، تقریباً سه ماه در یخچال نگهداری کرد. از بین تیمارهای بررسی شده فقط تیمار کنترل حاوی ۱/۱ میلی‌گرم کروسین در هر گرم سلول خشک بود. با توجه به اینکه این مطالعه به‌عنوان اولین بررسی در روش‌های نگهداری طولانی مدت کالوس زعفران انجام شد بدیهی است در این راستا به تحقیقات بیشتری در زمینه افزایش متابولیت‌های آن پس از نگهداری طولانی مدت نیاز است.

واژه‌های کلیدی: پارافین، سرما ، محیط کشت SH، *Crocus sativus*

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L.، گیاهی است تک‌لپه، متعلق به خانواده زنبقیان (Iridaceae) که چرخه زندگی خود را در یکسال کامل می‌کند (Moradi-Moghaddam et al., 2024). عموماً گل‌های زعفران در اوایل پاییز قبل از ظهور برگ‌ها نمایان می‌شوند. این گیاه ارزشمند به طور گسترده در مناطق مختلف کشورهایی مانند اسپانیا، یونان، فرانسه، مقدونیه، ایران و اخیراً در چین کشت می‌شود (Soeda et al., 2007). کلاله گل زعفران، گران‌ترین ادویه در جهان است و به دلیل رنگ، طعم و عطر متمایز آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Kyriakoudi et al., 2012). عمده ترین ترکیبات موثره زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال است که به ترتیب مسئول ایجاد رنگ، طعم و عطر آن می‌باشند (Kanakis et al., 2004). زعفران علاوه بر کاربرد گسترده در صنایع غذایی، در طب سنتی و نوین و صنعت آرایشی-بهداشتی نیز کاربرد فراوانی دارد (Soeda et al., 2007).

با توجه به ارزش ترکیبات ثانویه موجود در کلاله زعفران، اخیرا تولید این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. یکی از این روش‌ها، کشت تعلیقی سلولی می‌باشد (Amini et al., 2022; 2024; Moradi et al., 2017; 2020). القای پینه یا کالوس (سلول‌های تمایز نیافته از بافت تمایز یافته) اولین گام در راستای کشت سلولی است. بعد از تولید کالوس، یکی از مشکلاتی که محققین با آن مواجه هستند حفظ و نگهداری کالوس‌ها به مدت طولانی می‌باشد. زیرا برای حفظ و نگهداری آن‌ها نیاز به زیرکشت مکرر بر روی محیط کشت تازه است. این فرایند، پرهزینه، وقت‌گیر و پرزحمت بوده و همچنین در طی فرایند زیرکشت، احتمال آلودگی سلول‌ها و از دست رفتن آن‌ها در اثر خطاهای فنی و انسانی وجود دارد. از طرف دیگر احتمال تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌ها و تغییر در الگوی تولید متابولیت‌ها نیز گزارش شده است (Mustafe et al., 2011).

برای حفظ طولانی مدت سلول‌های گیاهی پروتکل‌های انجمادی[1] متعددی از قبیل، انجماد تدریجی[2]، انجماد شیشه‌ای[3] و کپسولاسیون-دهیدراتاسیون[4] ارائه شده است (Prudente & Paiva., 2017; Nausch and Buyel, 2021). این روش‌ها مزایا و معایب زیادی دارند. از جمله معایب روش انجماد دو مرحله‌ای می‌توان به نیاز به در دسترس بودن یک فریزر قابل برنامه‌ریزی گران قیمت اشاره کرد. همچنین استفاده از این سیستم برای سرد کردن سلول‌های حساس گیاهی نامناسب می‌باشد. گاهی استفاده از محافظ‌های انجمادی[5] در روش انجماد شیشه‌ای می‌توانند برای سلول‌ها ایجاد سمیت کنند. به طور کلی تاکنون یک روش انجماد موفق که برای نگهداری کالوس‌های حاصل از گیاهان مختلف قابل اجرا باشد، معرفی نشده است (Mustafa et al., 2011).

محققین بر این باورند، کاهش دما بدون استفاده از دمای یخبندان یکی از روش‌های فیزیکی موثر برای افزایش مدت نگهداری سلول‌ها از طریق کاهش متابولیسم، می‌باشد. در این شرایط نیاز به زیرکشت مکرر کالوس‌ها، کاهش یافته و در نتیجه پایداری ژنتیکی افزایش می‌یابد (Diab et al., 2014). نگهداری سلول‌ها از طریق کاهش دما روشی بسیار ساده و کم هزینه است که بر حسب گونه گیاه از ۶ ماه تا ۵ سال قابلیت نگهداری را افزایش می‌دهد (El-Dawayati & Zaid., 2012). سابقا محققین از دمای ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتیگراد و همچنین روغن‌های معدنی (پارافین مایع) برای نگهداری کالوس‌های گیاهی به مدت ۴ تا ۶ ماه بدون نیاز به زیرکشت استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد پارافین مایع گزینه بسیار جذابی برای نگهداری کالوس‌های بدست آمده از گونه‌های گیاهی مختلف می‌باشد. این گروه از محققین دمای پایین را نیز گزینه موثری برای نگهداری طولانی مدت کالوس‌ها معرفی کردند (Augereau et al., 1986).

گرچه نتایج مطالعات متعدد نشان داده که نگهداری کالوس‌های گیاهی در دمای پایین می‌تواند جایگزینی مناسب بجای نگهداری انجمادی برای تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی باشد، ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه نگهداری کالوس

[1] Cryopreservation

[2] Slow freezing
[3] Vitrification method
[4] Encapsulation-dehydration
[5] Cryoprotectants

زعفران در دمای پایین ارائه نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر برای اولین بار سرعت رشد سلول‌های زعفران و تولید متابولیت کروسین در کشت تعلیقی سلولی پس از نگهداری سه ماهه کالوس حاصل از بنه آن در دمای پایین و یا به‌همراه لایه‌ای از پارافین مایع بررسی شد.

مواد و روش‌ها

- کالوس‌زایی بنه زعفران

این مطالعه در موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی در مشهد[1] (RIFST) به منظور بررسی قابلیت نگهداری و حفظ قدرت باززایی کالوس‌های حاصل از بنه زعفران انجام شد. برای تهیه کالوس، بنه‌ها در اواسط اردیبهشت‌ماه جمع‌آوری (شکل ۱. الف) و پوسته‌های خارجی آن‌ها حذف شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند. ادامه مراحل در زیر هود لامینار در شرایط کاملا استریل به منظور جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی انجام شد. بنه‌ها از درون آب خارج شدند و به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار داده شدند. در مرحله بعد به منظور حذف بقایای مواد ضدعفونی کننده از سطح بنه‌ها، در طی سه نوبت و هر نوبت به مدت ۱۰ دقیقه در آب استریل قرار داده شدند (شکل ۱. ب). سپس بنه‌ها به قطعاتی به ضخات ۲-۱ میلی‌متر و ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع برش داده شده و بر روی محیط کشت گامبورگ[2] (B_5) (۱۹۶۸) با ترکیب هورمونی NAA (2mg/l)+ Kin (1 mg/l) و ساکارز ۳ درصد کشت شدند. سپس ظروف کشت در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی قرار گرفتند (شکل ۱. ج) (Ziaratnia & Amini, 2021). برای دستیابی به حجم دلخواه کالوس، هر ۲۰ روز یکبار عمل زیرکشت و انتقال کالوس‌ها به محیط کشت جدید انجام شد (شکل ۱. د، ر).

- کاهش دما و استفاده از پارافین مایع برای نگهداری کالوس‌ها

کالوس‌های بدست آمده، بر روی محیط کشت در ظروف شیشه‌ای مربایی در شرایط کاملاً استریل کشت شدند (شکل ۱. ر). برخی به درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد انتقال یافته و برخی کالوس‌های دیگر، با لایه‌ای به ضخامت ۲ سانتی‌متر از پارافین مایع اتوکلاو شده پوشیده شدند و سپس به یخچال انتقال یافتند. گروهی دیگر از کالوس‌ها بعد از اینکه در شیشه‌های کشت قرار گرفتند با لایه‌ای از پارافین مایع استریل پوشیده شده و سپس در دمای اتاق (دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد) و شرایط تاریکی قرار گرفتند. در هیچ یک از سه تیمار فوق زیرکشت انجام نشد و به مدت ۳ ماه بر روی محیط کشت اولیه نگهداری شدند. برای تیمار کنترل نیز ظروف کشت در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار گرفتند ولی هر ۲۰ روز، زیرکشت شده و به محیط کشت جدید انتقال یافتند. شرح تیمارهای مختلف این آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است.

- استقرار کشت سلولی

کالوس‌های رشد یافته در تیمارهای مختلف، جهت بررسی حفظ قدرت باززایی، به محیط کشت شنک و هیلدبرانت[3] (۱۹۷۲) (SH) مایع با ترکیب هورمونی NAA(2 mg/l)+Kin(1 mg/l) و ویتامین‌های محیط کشت B_5 به همراه ۳ درصد ساکارز انتقال یافتند. برای استقرار کشت از ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت SH استفاده شد. به هر ارلن ۱ گرم کالوس تهیه شده از مرحله قبل اضافه شده و بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه، دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مداوم قرار گرفتند (Amini et al., 2022). در پایان هر هفته وزن تر سلول‌ها، پی‌اچ محیط کشت و تعداد سلول‌های زنده و غیرزنده معلق در محیط کشت اندازه‌گیری شد. این مرحله از تحقیق ۶ هفته به طول انجامید.

- اندازه‌گیری شاخص رشد سلولی

شاخص رشد سلولی بر اساس فرمول زیر اندازه‌گیری شد.

[1] Research Institute of Food Science and Technology, RIFST
[2] Gamborg 1968
[3] Schenk-Hildebrandt(1972)

فرمول ۱

$$GI = \frac{W2 - W1}{W1}$$

در این فرمول، GI نشان‌دهنده شاخص رشد سلولی، W1 نشان‌دهنده وزن اولیه سلول‌ها در زمان آغاز دوره کشت و W2 نشان‌دهنده وزن ثانویه سلول‌ها در زمان اندازه‌گیری می‌باشد (Amini et al., 2022).

شکل۱. مراحل تهیه کالوس از بنه زعفران: الف. انتخاب بنه بالغ زعفران در اردیبهشت‌ماه، **ب**. ضدعفونی بنه‌ها، **ج**. کاشت بنه‌ها بر روی محیط کشت گامبورگ جامد به منظور کالوس زایی، **د**. تشکیل کالوس بر روی قطعات بنه، **ر**. زیر کشت کالوس‌ها به منظور افزایش بیومس سلولی، **ز**. انتقال کالوس‌ها به شیشه به منظور اعمال تیمار سرما و یا اضافه کردن پارافین

Fig 1. Callus induction on saffron corms: a. Mature corm selection in May**; b.** Corm disinfection**; c**. Culture of corm explant on B_5 solid medium to callogenesis; **d**. Callus formation on corm explants**, e.** Callus subculture to increase biomass**; f.** Transferring calli to glass jar for cold treatment and W/WO paraffin covering

جدول ۱. تیمارهای مختلف و شرایط نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران

Table 1. Different treatments and storage conditions of saffron corm-derived callus

ردیف Row	شرایط نگهداری کالوس در تیمارهای مختلف Callus storage conditions in different treatments
۱	دمای ۴ درجه سانتیگراد، پوشیده شده با لایه‌ای از پارافین مایع، عدم زیرکشت به مدت ۳ ماه
۲	دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد، پوشیده شده با لایه‌ای از پارافین مایع، عدم زیرکشت به مدت ۳ ماه
۳	دمای ۴ درجه سانتیگراد، بدون حضور پارافین مایع، عدم زیرکشت به مدت ۳ ماه
۴	دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد، بدون حضور پارافین مایع، انجام زیرکشت هر ۲۰ روز (کنترل)

- **آزمون تریپان بلو، شمارش سلولی و تفکیک سلول‌های زنده از غیرزنده**

با توجه به اینکه سلول‌های حاصل از کالوس بنه زعفران در محیط کشت مایع، به دو صورت سلول‌های متراکم (رشد توده‌ای) و غیرمتراکم (سلول‌های معلق در محیط-کشت) رشد می‌کنند، بنابراین نیاز است علاوه بر اندازه-گیری شاخص رشد سلولی که از طریق وزن کردن سلول‌های متراکم در محیط کشت محاسبه می‌شود، میزان رشد سلول‌های منفرد و معلق نیز از طریق شمارش آن‌ها اندازه‌گیری شوند. شمارش سلول‌ها به صورت کلی نیازمند روش عمومی استفاده از اتاقک شمارش‌کننده به نام هموسایتومتر می‌باشد. در این تحقیق برای تفکیک سلول‌های زنده از غیرزنده، از محلول تریپان بلو ۰/۴درصد استفاده شد که به نسبت ۱:۱ با محیط کشت حاوی سلول ترکیب شد. از ترکیب حاصل حجم مشخصی (۱۰ میکرولیتر) بر روی لام هموسایتومتر قرار گرفت و بعد از گذشت ۱ الی دو دقیقه در زیر میکروسکوپ شمارش سلولی انجام شد. رنگ دوظرفیتی تریپان بلو از غشاء سلول‌های مرده عبور کرده و آن‌ها را به رنگ آبی درمی‌آورد در حالی‌که سلول‌های زنده، رنگ را جذب نکرده و در نتیجه از سلول‌های مرده تفکیک می‌شوند. هر طرف لام از ۹ مربع بزرگ تشکیل شده است. شمارش سلولی در ۴ مربع گوشه و مربع وسط انجام شد. سلول‌های آبی روشن را در دسته سلول‌های زنده و سلول‌های آبی تیره در دسته سلول‌های مرده شمارش شدند. هر یک از مربع‌ها به ابعاد یک میلی‌متر و عمق ۰/۱ میلی‌متر می-باشند. حجم نهایی هر مربع در این عمق معادل ۰/۱ میکرولیتر است. هنگامی که شمارش تمامی سلول‌ها انجام شد تعداد سلول‌ها در حجم یک میلی‌لیتر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (در این آزمایش ضریب رقت معادل ۲ می‌باشد) (Singh and Bramhe 2017).

فرمول ۲

$$\text{تعداد کل سلول شمرده شده} = \frac{\text{ضریب رقت}}{\text{تعداد مربع}} \times 10000 = \frac{\text{تعداد کل سلول ها}}{\text{میلی لیتر}}$$

اندازه‌گیری میزان کروسین

برای اندازه گیری میزان کروسین سلول‌ها، نیاز به عصاره‌گیری از آن‌ها می‌باشد. عصاره‌گیری به روش آلام و همکاران انجام شد. بدین منظور، سلول‌های رشد یافته در محیط مایع را با استفاده از صافی از محیط کشت جداکرده و بعد از خشک کردن در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، پودر شده و برای عصاره‌گیری استفاده شدند. ۰/۰۵ گرم پودر سلول خشک شده به همراه ۵ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد به درون لوله‌های فالکون انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی بر روی شیکر[1] قرار گرفتند. سپس برای جداسازی عصاره از بقایای سلولی، از سانتریفیوژ ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. عصاره استخراج شده از فیلتر با قطر منافذ ۰/۲۵ میکرومتر عبور داده شده و سپس میزان جذب[2]عصاره‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CT-5700 مجهز به سل کوارتز قرائت گردید (Alam et al., 2016).

برای محاسبه غلظت کروسین لازم است منحنی کالیبراسیون[3]رسم شود. بدین منظور محلول کروسین استاندارد ($C_{44}H_{64}O_{24}$ M_r 976.98) در دامنه ۲۵ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شامل ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ تهیه شد. حلال مورد استفاده اتانول ۵۰ درصد بود. سپس میزان جذب غلظت‌های مختلف محلول کروسین استاندارد در طول موج ۴۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و منحنی استاندارد کروسین بر اساس غلظت و مقدار جذب نوری آن رسم گردید (شکل۲).

نهایتا غلظت کروسین در نمونه‌های عصاره سلولی، با استفاده از میزان جذب آن‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر و فرمول بدست آمده از منحنی استاندارد (فرمول ۳)، محاسبه شد. نتایج به صورت میلی‌گرم کروسین بر گرم وزن خشک سلول گزارش شد.

فرمول ۳ $Y= 0.128X+0.0347$

Y= میزان جذب عصاره سلولی در طول موج ۴۴۰ نانومتر

X= میزان کروسین (میلی‌گرم/ لیتر)

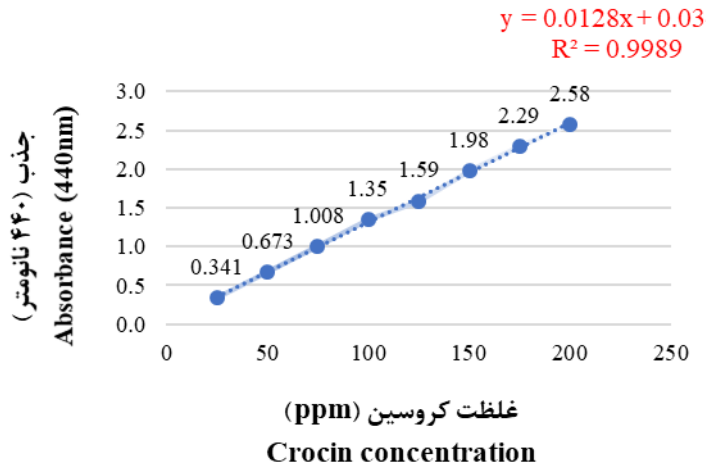
[1] Shaker
[2] Absorbance
[3] Calibration curve

آنالیز آماری

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور شامل تیمارهای آزمایش و زمان، در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۹ انجام شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار محافظت شده (FLSD) با سطح اطمینان ۹۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های رشد سلولی، پی‌اچ محیط کشت، تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده معلق در محیط سوسپانسیون سلولی تحت تاثیر سرما و پارافین در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد، اثرات اصلی تیمارهای مختلف و زمان و نیز اثر متقابل آن‌ها بر شاخص رشد سلولی، پی‌اچ محیط کشت و تعداد سلول‌های زنده و غیرزنده معنی‌دار می‌باشد.



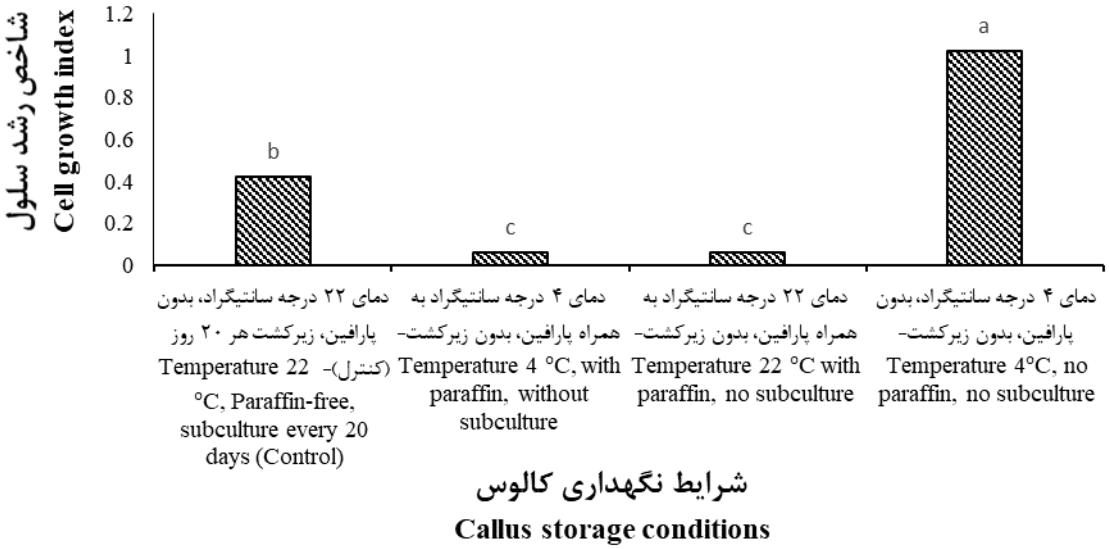
شکل ۲. منحنی استاندارد کروسین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

Fig 2. Standard calibration curve of Crocin in spectrophotometry method

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر شرایط نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران بر شاخص رشد سلول، پی‌اچ محیط کشت، تعداد سلول‌های زنده و غیرزنده در کشت تعلیقی زعفران

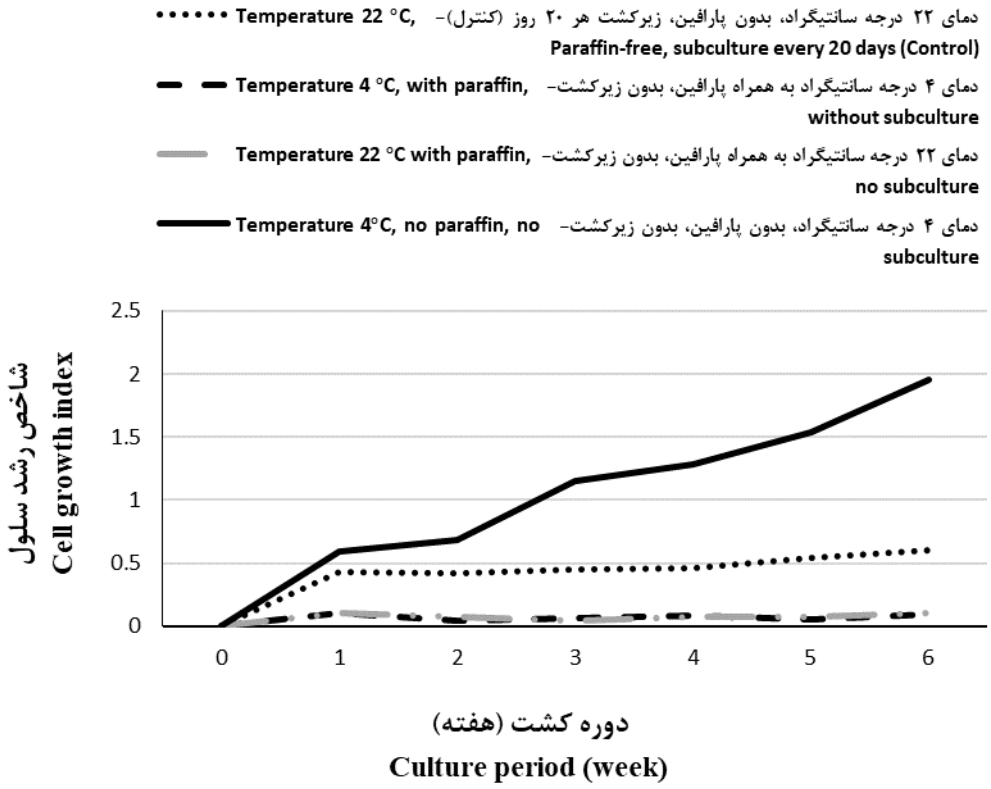
Table 2. Analysis of variance of the effect of different storage conditions of corm-derived callus on cell growth index, medium pH and number of viable and non-viable cells in saffron suspension culture

منبع تغییرات (Source)	درجه آزادی (df)	شاخص رشد سلول Cell growth index		پی اچ محیط کشت Medium pH		سلول‌های زنده Viable cells		سلول‌های غیر زنده None-viable cells	
		میانگین مربعات Mean Square	p-value	میانگین مربعات Mean Square	p-value	میانگین مربعات Mean Square	p-value	میانگین مربعات Mean Square	p-value
تیمار (Treatment x)	3	5.06	0.000	1.61	0.000	10448314815	0.000	1523495370	0.000
زمان (Time)	5	0.31	0.001	0.17	0.000	4954555556	0.000	618325000	0.000
اثر متقابل تیمار و زمان (Time x Treatment)	15	0.18	0.002	0.23	0.000	891392593	0.000	726650926	0.000
خطا (Error)	48	0.05		0.01		134555556		1750000	
کل (Total)	71								



شکل ۳. اثر شرایط مختلف نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران بر رشد توده سلولی در کشت تعلیقی. (میانگین-های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار محافظت شده (FLSD) در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند). ($p\leq0.05$)

Fig 3. Effect of different storage conditions of corm-derived callus on the growth of cell biomass in saffron suspension cultures (means with the same letter based on the Fisher's Least Significant Difference (FLSD) do not show significant difference). ($p\leq0.05$)



شکل ۴. اثر شرایط مختلف نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران بر شاخص رشد سلولی در کشت تعلیقی در طی ۶ هفته

Fig 4. Effect of different storage conditions of corm-derived callus on cell growth index in suspension saffron culture over 6 weeks ($p\leq0.05$)

در شکل ۳ شاخص رشد سلولی در کشت تعلیقی حاصل از تیمارهای مختلف شرایط نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران ارائه شده است.

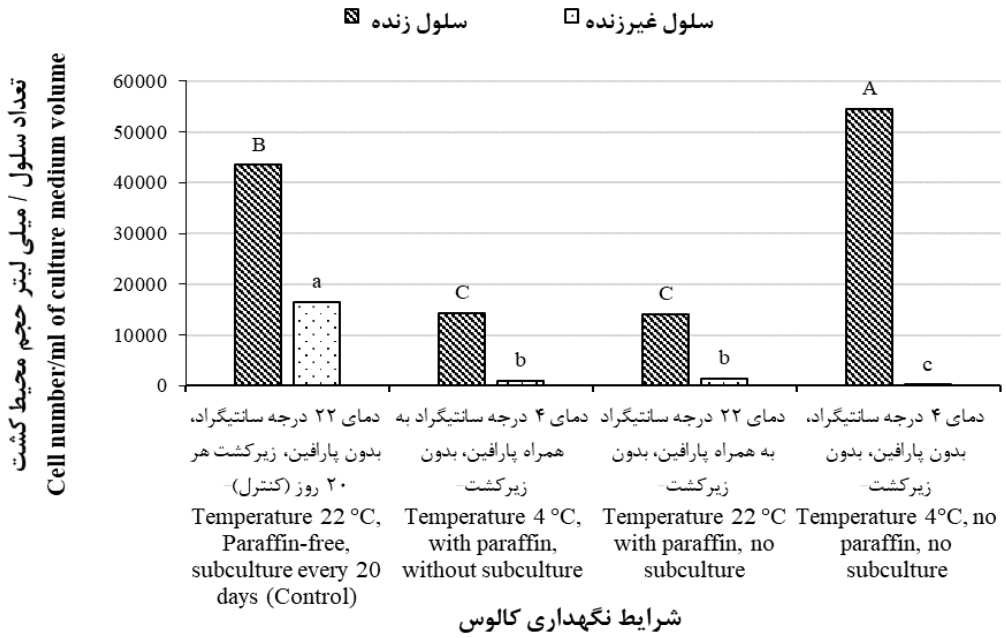
همانطور که در شکل ۳ مشخص است، کمترین شاخص رشد سلولی (۰/۰۶) در محیط کشت تعلیقی از کالوس-هایی بدست آمد که در زیر لایه‌ای از پارافین مایع نگهداری شده بودند (هم در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد و هم در دمای محیط در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد). در واقع وجود پارافین مایع و احتمالا عدم اکسیژن رسانی، قدرت باززایی سلول‌ها را از بین برده بود. از طرفی بیشترین شاخص رشد سلول (۱/۰۲) از کشت کالوس‌هایی بدست آمد که در یخچال نگهداری شده بودند و هیچگونه زیرکشتی در مدت ۳ ماه در آنها صورت نگرفته بود. نکته جالب توجه اینکه، نگهداری کالوس‌ها در دمای اتاق و زیرکشت آن‌ها در مواقع لزوم (تیمار کنترل) همواره قدرت باززایی کمتری در مقایسه با نگهداری کالوس‌ها در یخچال و بدون زیرکشت، ایجاد کرد.

نتایج مربوط به اثر شرایط مختلف نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران بر روند رشد سلول‌ها در کشت تعلیقی سلولی آن در طی ۶ هفته در شکل ۴ ارائه شده است. نتایج ارائه شده در این شکل نشان می‌دهد، بالاترین شاخص رشد سلولی در طی ۶ هفته، از کالوس-هایی بدست آمد که در یخچال نگهداری شده بودند. این گروه از کالوس‌ها، زمانی که به محیط کشت مایع انتقال یافتند، بدون اینکه وارد فاز تاخیر یا مرحله رشد کند اولیه[1] شوند، مستقیما وارد مرحله رشد لگاریتمی یا همان رشد تصاعدی (رشد نمایی)[2]شدند و تا انتهای هفته ششم نیز رشد بالایی داشتند. این سلول‌ها در طی ۶ هفته وارد فاز ثابت [3]و فاز مرگ[4]سلولی نشدند. از طرفی، کالوس‌هایی که در زیر لایه‌ای از پارافین نگهداری شده بودند عملاً قدرت تکثیر و رشد خود را از دست داده و در محیط کشت مایع در طی ۶ هفته، رشد بسیار کمی در آنها مشاهده شد. همین رشد اندک نیز مربوط به هفته اول بعد از کشت بود و از هفته دوم به بعد رشد سلول‌ها کاهش یافت. کالوس‌های نگهداری شده در دمای اتاق که هر ۲۰ روز زیرکشت شده بودند (تیمار کنترل)، در هفته اول بعد از کشت، رشد تصاعدی داشتند. گرچه رشد آن‌ها همواره کمتر از میزان رشد سلول‌های حاصل از کالوس نگهداری شده در یخچال بود. ولی از انتهای هفته اول تا انتهای دوره کشت، عملاً رشد بسیار اندکی در آن‌ها مشاهده شد.

تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده معلق در محیط کشت تعلیقی سلولی زعفران در شکل ۵ ارائه شده است. نتایج ارائه شده در این شکل نشان می‌دهد شرایط نگهداری کالوس زعفران بر تعداد سلول‌های معلق در محیط کشت موثر است و قابلیت حیات این سلول‌ها تحت تاثیر شرایط نگهداری کالوس‌ها قبل از کشت، قرار می‌گیرد. همانطور که انتظار می‌رفت بیشترین سلول‌های زنده و کمترین سلول‌های غیرزنده در محیط کشت‌هایی مشاهده شد که از کالوس‌های نگهداری شده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) بدست آمده بودند. از طرفی تعداد سلول‌هایی که قدرت باززایی خود را از دست داده بودند، در کشت‌های حاصل از کالوس‌های نگهداری شده در دمای اتاق به‌همراه زیرکشت کردن‌های مکرر (تیمار کنترل) در مقایسه با سایر تیمارها افزایش چشمگیری داشت (شکل ۵). نتایج نشان داد کالوس‌هایی که در زیر پارافین مایع نگهداری شدند نه تنها در محیط کشت تعلیقی، تعداد سلول زنده معلق اندکی تولید کردند بلکه سلول‌های مرده در این محیط کشت‌ها نیز به طرز چشمگیری کمتر از سایر کشت‌ها بود (شکل ۵).

باید همواره این نکته را مد نظر قرار داد که گرچه شرایط نگهداری عامل کلیدی مهمی در تعیین مدت زمان نگهداری کالوس‌های گیاهی می‌باشد ولی از طرف دیگر قابلیت نگهداری آن‌ها به شدت وابسته به گونه گیاهی است. نتایج تحقیقات نشان داده است کالوس حاصل از گیاهان مقاوم به سرما را می‌توان در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ماه یا حتی بیشتر نگهداری کرد در حالیکه کالوس حاصل از گیاهان حساس به سرما، این قابلیت را نداشته و در دمای پایین آسیب می‌بینند (Hiraoka & Kodama T. 1984). گروه دیگری از محققین نیز ثابت کردند دمای پایین از طریق کاهش تقسیم سلولی مدت ماندگاری کالوس‌های حاصل از گیاهان مقاوم به سرما را افزایش می‌دهد (Hiraoka & Kodama T. 1984; Orshinsky & Tomes., 1985).

[1] Lag phase
[2] Log phase or Exponential phase
[3] Stationary phase
[4] Death phase



شکل ۵. اثر شرایط مختلف نگهداری کالوس‌های حاصل از بنه زعفران بر تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده معلق در کشت سلولی (میانگین‌های دارای حرف مشترک، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار محافظت شده (FLSD) در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).($p\leq0.05$)

Fig 5. Effect of different storage conditions of corm-derived callus on number of suspended viable and non-viable cells in cultures (means with the same letter based on the Fisher's Least Significant Difference (FLSD) do not show significant difference). ($p\leq0.05$)

اولین بار استفاده از روغن‌های معدنی برای نگهداری کالوس‌های گیاهی توسط کاپلین پیشنهاد شد (Caplin, 1959). گرچه در چندین مطالعه مروری به استفاده از این روش اشاره شده است (Bridgen and Staby, 1984; Nitzche, 1984)، ولی استفاده کاربردی از روغن‌های معدنی در نگهداری کالوس‌های گیاهی محدود به گزارش‌های اندکی می‌باشد. کاپلین پیشنهاد کرد روغن‌های معدنی اکسیژن رسانی به سلول‌های گیاهی را کاهش داده و از این طریق مدت زمان ماندگاری آنها را افزایش می‌دهند. البته باید این نکته را مد نظر قرار داد که گاهی این فرایند منجر به تخمیر سلول‌های گیاهی خواهد شد. گروه دیگری از محققین گزارش کردند دمای ۵ درجه و یا ۱۰ درجه بالای صفر نمی‌تواند شرایط مناسبی برای نگهداری طولانی مدت کالوس‌های گیاهی فراهم کند ولی استفاده از روغن‌های معدنی گزینه مناسبی برای نگهداری کالوس‌ها می‌باشد. این گروه از محققین استفاده از روغن‌های معدنی را در مقایسه با کاهش دما برای نگهداری کالوس‌های گیاهی، اقتصادی‌تر و کم هزینه‌تر نیز معرفی کردند (Augereau et al., 1986). گرچه نتایج مشاهده شده در تحقیق حاضر موارد فوق را تایید نمی‌کند زیرا کالوس‌های نگهداری شده در زیر لایه پارافین قدرت باززایی خود را از دست دادند. تغییر رنگ مشاهده شده در آن‌ها احتمالا به دلیل ایجاد فرایند تخمیر ایجاد شده بود.

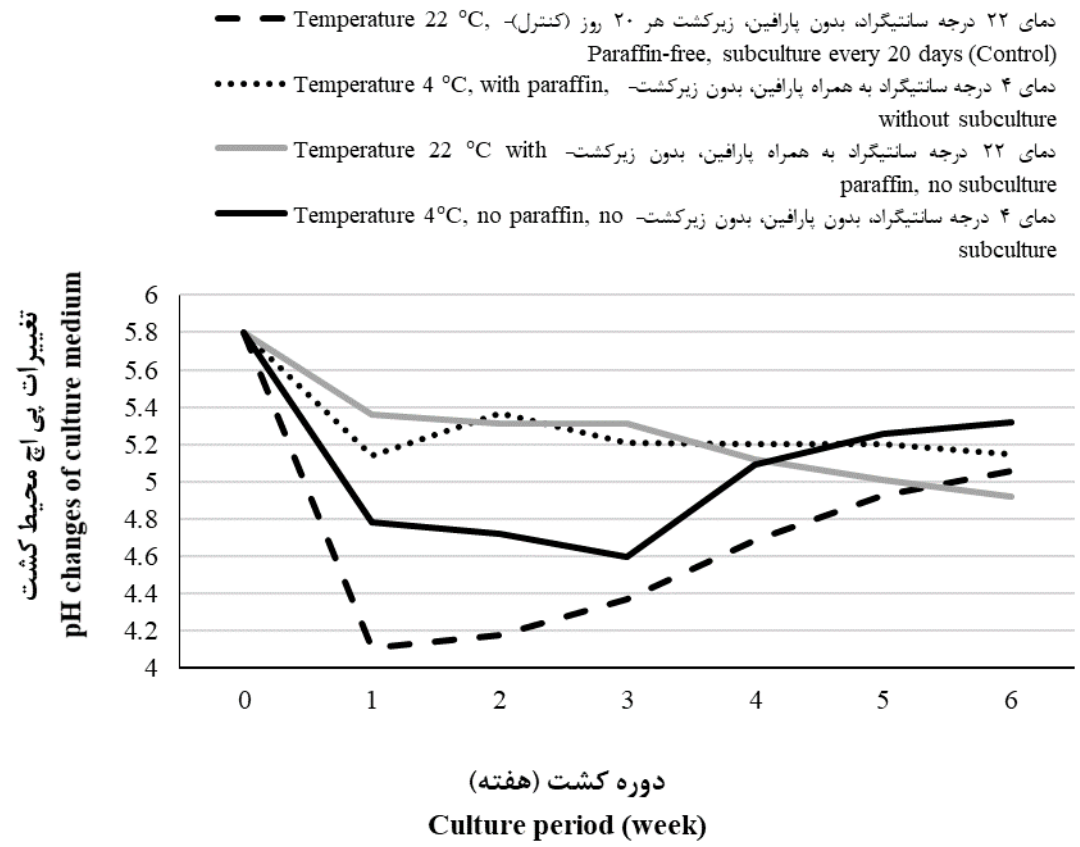
در این تحقیق تغییرات پی‌اچ محیط‌کشت در طی دوره کشت سلولی زعفران در مدت ۶ هفته، بصورت هفتگی ارزیابی شد. نتایج در شکل ۶ ارائه شده است. کلیه تیمارهای مورد بررسی در هفته اول از دوره کشت، با کاهش پی‌اچ مواجه شدند. بیشترین کاهش در محیط کشت‌هایی مشاهده شد که از کالوس‌های نگهداری شده در دمای اتاق، بدون پارافین و با زیرکشت‌های مکرر (تیمار کنترل) بدست آمده بودند. پی‌اچ در این محیط کشت‌ها در همان هفته اول از ۵/۸ به ۴/۱ رسید. از انتهای هفته اول تا هفته ششم شاهد افزایش پی‌اچ در این محیط کشت‌ها بودیم و در انتهای دوره، پی‌اچ آن‌ها

به ۵/۰۶ رسید. کشت‌های سلولی که از کالوس‌های نگهداری شده در یخچال بدست آمده بودند نیز در سه هفته اول دوره کشت با کاهش پی‌اچ مواجه شدند ولی بیشترین کاهش، در هفته اول رخ داد (از ۵/۸ به ۴/۷۸ رسید) و از انتهای هفته سوم به بعد، افزایش پی‌اچ در آن‌ها مشاهده شد به شکلی که در انتهای دوره به ۵/۳۲ رسید. به طور کلی شدت کاهش پی‌اچ در این محیط کشت در مقایسه با تیمار کنترل کمتر بود. کالوس‌هایی که در زیر پارافین نگهداری شده بودند همانطور که بعد از انتقال به محیط کشت مایع شاهد رشد آن‌ها نبودیم، تغییرات شدیدی در پی‌اچ آن‌ها نیز مشاهده نشد و از ابتدای دوره کشت تا انتها، همواره روند کاهشی خفیفی در پی‌اچ نشان دادند.

غلظت یون هیدروژن (pH) در محیط‌کشت یکی از عواملی است که بر تجمع توده سلولی و تولید متابولیت-ها در کشت سلول‌های گیاهی موثر است. غلظت این یون در طول دوره کشت تحت تاثیر مرحله رشد سلول-ها و جذب برخی از عناصر از محیط‌کشت، تغییر می‌کند و در طول دوره کشت همواره در حال نوسان است (Murthy et al. 2014). تغییرات پی‌اچ به‌دلیل جذب و استفاده الکترولیت‌ها از محیط‌کشت رخ می‌دهد و منعکس‌کننده فازهای مختلف دوره کشت می‌باشد. عمدتا پی‌اچ محیط‌کشت در مرحله فاز تاخیر کشت سلول‌های گیاهی، کاهش یافته و سپس افزایش شدیدی را در مرحله نمایی نشان می‌دهد که به‌دنبال آن مقدار نسبتاً ثابتی در فاز ساکن خواهد داشت (Ryu et al. 1990). بنابراین در اوایل فاز لگاریتمی، محیط‌کشت در مقایسه با فاز اولیه و ثابت، اسیدی‌تر است. احتمالا فعالیت‌های متابولیکی منجر به تولید پروتون‌ها و اسیدی شدن محیط‌کشت می‌شود. از طرف دیگر حذف سریع یون‌ها از محیط‌کشت توسط ترکیبات بافری مانند ترکیبات فسفاته، EDTA، اسیدهای آمینه یا اسیدهای آلی، رخ می‌دهد و دوباره منجر به افزایش پی‌اچ محیط-کشت می‌شود (Steingroewer et al., 2017). در تحقیق حاضر نیز الگوی تغییرات پی‌اچ درمحیط‌کشت-هایی که شاهد رشد سلولی در آنها بودیم، مشابه الگوی ذکر شده در بالا بود. با توجه به توضیحات فوق، احتمالا تغییرات پی‌اچ مشاهده شده در این تحقیق نیز تحت تاثیر عواملی از جمله رشد سلول‌ها، جذب عناصر و مواد غذایی از جمله مصرف آمونیوم و نیترات در محیط کشت و یا تولید پروتون‌ها در نتیجه فعالیت‌های متابولیکی، می‌باشد. به عنوان مثال جذب نیترات نیاز به pH اسیدی دارد، اما محیط به سمت قلیایی می رود (Bayely, et al. 1972). در مقابل، جذب آمونیوم pH محیط را به سمت اسیدیته تغییر می‌دهد و در نتیجه جذب بیشتر آمونیوم مهار می‌شود (Fowler, et al. 1982).

نتایج بخش اندازه‌گیری میزان کروسین که با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شده بود نشان داد، هیچ یک از تیمارهای بررسی شده در این تحقیق حاوی کروسین نبوده و فقط تیمار کنترل که در آن کالوس‌های حاصل از بنه در دمای اتاق و بدون لایه‌ای از پارافین نگهداری شده بودند و هر ۳ هفته یکبار زیر کشت شده بودند، حاوی ۱/۱ میلی‌گرم کروسین در هر گرم سلول خشک بودند. در واقع اعمال سرما به کالوس‌های زعفران و یا نگهداری آنها در زیر لایه‌ای از پارافین احتمالا موجبات تخریب و یا عدم سنتز کروسین در سلول‌ها را فراهم آورده بود.

از نظر محققین حفظ قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه در کالوس‌هایی که در سرما نگهداری شده‌اند تحت تاثیر نوع گونه گیاهی و نوع متابولیت قرار می‌گیرد. به‌عنوان مثال تولید متابولیت نیکوتین از کالوس گیاه تنباکو با نگهداری کالوس‌ها در سرما، کاهش یافت. در حالیکه تولید متابولیت آنتوسیانین از کالوس حاصل از گیاهان *Buplerum faculatum* و *Mallotus japonicus* و همچنین قابلیت تولید شیکونین از کالوس گیاه *Lithospermum erythrorhizon* تحت تاثیر سرما قرار نگرفتند. این گروه از محققین ثابت کردند گرچه دمای پایین از طریق کاهش تقسیم سلولی مدت ماندگاری کالوس‌های حاصل از گیاهان مقاوم به سرما را افزایش می‌دهد ولی همیشه گزینه مناسبی برای حفظ قابلیت تولید متابولیت در آنها نبوده و در مورد هر گونه گیاهی نیاز به تحقیق و بررسی می‌باشد (Hiraoka & Kodama T. 1984).



شکل ۶. اثر شرایط مختلف نگهداری کالوس حاصل از بنه زعفران بر تغییرات پی‌اچ محیط‌کشت در کشت سلولی تعلیقی در طی ۶ هفته ($p\leq0.05$)

Fig 6. Effect of different storage conditions of corm-derived callus on medium pH changes in suspension saffron cell culture over 6 weeks ($p\leq0.05$)

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد در راستای ممانعت از زیرکشت‌های مکرر کالوس حاصل از بنه زعفران می‌توان آن را بر روی محیط کشت جامد در شرایط کاملا استریل در یخچال به مدت سه ماه، نگهداری کرد. در این شرایط نه تنها قدرت باززایی سلول‌ها حفظ شد بلکه قدرت باززایی در آنها افزایش نیز یافت. احتمالا به دلیل اینکه گیاه زعفران گونه مقاوم به سرما است، کالوس حاصل از بنه آن نیز قابلیت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد را دارد. بدیهی است نگهداری کالوس زعفران در این شرایط باعث کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌ها شده و احتمالا به همین دلیل تولید متابولیت‌ها به حداقل رسیده است. البته به دلیل حفظ توان تکثیر و باززایی سلول‌ها می‌توان با ایجاد شرایط تغذیه‌ای مناسب تولید متابولیت‌های ثانویه را امکان پذیر ساخت. برهمین اساس تحقیق برای بررسی تحریک تولید متابولیت‌ها پس از باززایی سلول‌ها شامل بهره‌مندی از روش‌های مختلف از جمله کاربرد الیسیتورها و یا تغییر ترکیبات محیط کشت بر افزایش تولید متابولیت‌های این گیاه ارزشمند ضروری به نظر می‌رسد.

قدردانی

بدینوسیله از موسسه علوم و صنایع غذایی برای حمایت‌های مالی در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

Alam, P., Elkholy, Sh. F., Hosokawa, M., Mahfouz, S. A., & Sharaf-eldin, M. A. (2016). Simultaneous extraction and rapid HPLC based quantification of crocin and safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8 (10), 224-227.

Amini, S., Hemmati, Kh., & Ziaratnia, S. M. (2024). Image analysis for detection of crocin content and growth index of saffron corm derived cells under different physiological and chemical conditions. *Research and Innovation in Food Science and Technology* 13 (2), 65-78.

Amini, S., Ziaratnia, S. M., & Hemmati, Kh. (2022). Optimization of conditions for increasing of saffron cell biomass and crocin production in stirred bioreactor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 149, 243-255.

Augereau, J. M., Courtois, D., & Petiard, V. (1986). Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Reports* 5, 372-376.

Bayely J.M., King, J., & Gamborg, O. L. (1972). The ability of amino compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirements of soybean cells grown in suspension cultures. *Planta 105*, 25–31

Bridgen, H. P., & Staby, G. L. (1984). Handbook of plant cell culture, New-York, 816-827.

Caplin, S. M. (1959). Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *American Journal* of *Botany*, 46, 324-329.

Diab, M. I., Sahah, A. H., & Mahdia, F. G. (2014). In vitro preservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) embryogenic callus. *Egyptian Journal* of *Desert Research*, 64, 83-98.

El-Dawayati, M. M., Zaid, Z. E., & Elsharabas, S. F. (2012). Effect of conservation on steroids contents of callus explants of date palm cv. Sakkoti. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(5), 305-310.

Fowler, M. W., Watson, R., & Lyons, I. (1982). Substrate utilization, carbon and nitrogen, by suspension cultured plant cells. 5th Congress of Plant Tissue and Cell culture.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.

Hiraoka, N., & Kodama, T. (1984). Effects of non-frozen cold storage on the growth, organogenesis and secondary metabolism of callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3, 349-357.

Kanakis, C. D., Deferera, D. J., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2004). Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-l-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 15-21.

Kyriakoudi, A., Chrysanthou, A., Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z. (2012). Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from *Crocus sativus* L. dry stigmas (saffron). *Analytica Chimica Acta*, 755, 77-85.

Moradi, A., Zarinkamar, F., Azadi, P., & Caretto, S. (2017). Saffron (*Crocus sativus* l.) cell cultures as source of crocin and other bioactive compounds. Proceedings of the Joint Congress.

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, 1-18.

Moradi-Moghaddam, S., Fallahi, H. R., Behdani, M. A., & Mahmoodi, S. (2024). The Effect of corm storage conditions during the summer dormancy stage on reproductive growth and yield of saffron. *Journal of Saffron Research*, 12(1), 1-14.

Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 118, 1-16.

Mustafa, N. R., Winter, W. D., Iren, F. V., & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6 (6), 715-742.

Nausch, H., Buyel, J. F. (2021) Cryopreservation of plant cell cultures – Diverse practices and protocols. *New Biotechnology*, 62, 86-95.

Nitzche, W. (1984). Handbook of plant cell culture, New-York, 782-805

Orshinsky B. R., & Tomes, D. T. (1985). Effect of long-term culture and low temperature incubation on plant regeneration from a callus line of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 119(5), 389-397.

Prudente, D. O. & Paiva, R. (2017). Plant cryopreservation: Biochemical aspects. *Journal of Cell Developmental Biology*, 1(2), 1-3.

Ryu, D. D. Y., Lee, S. O. & Romani, R. J. (1990). Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(3), 305-311.

Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and

dicotyledonous plant cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204.

Singh, Y., & Bramhe, P. (2017). Cell viability testing with trypan blue exclusion method. National Institute of Environmental Health Sciences. 1-2. file:///C:/Users/AVA/Downloads/Cell%20ViabilityTesting%20with%20Trypan%20Blue%20Exclusion%20Method.pdf

Soeda, S., Ochiani, T., Shimeno, H., Saito, H., Abe, K., & Tanaka, H. (2007). Pharmacological activities of crocin in saffron. *Journal of Natural Medicine.* 61, 102-111.

Steingroewer, J., Haas, C., & Winkler, K. (2017). Monitoring of plant cells and tissues in bioprocesses. 1-49. Springer International Publishing

Ziaratnia, S. M., & Amini, S. (2021). The effect of developmental stages of corm, type of medium and plant growth regulators in callus induction of *Crocus sativus* L. *Journal of horticulture and postharvest research ,4* (*special issue: recent advances in saffron*), 43-56.

COPYRIGHTS

© 2024- 2025 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/)