Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Optimization of Cell Suspension Induction in Tragacanth Astragalus (*Astragalus Verus*)

Safiyyeh Ebrahimi

MSc. Plant Biotechnology, Complex Higher education of Shirvan, North Khorasan, Iran. Email: sara.ebrahimi44@gmail.com

Fatemeh Zaker Tavallaie

* Corresponding author: Assistant Professor, Plant Biotechnology, Complex Higher education of Shirvan, North Khorasan, Iran. Tel: +989155087691, Email: f.zaker.t@um.ac.ir

Mohammad Zare Mehrjerdi

Assistant Professor, Plant Biotechnology, Complex Higher education of Shirvan, North Khorasan, Iran. Email: zarem1381@yahoo.com

Mahmood Ghorbanzadeh Neghab

Associate Professor, Plant Biotechnology, Complex Higher education of Shirvan, North Khorasan, Iran. Email: m_ghorbanzadeh_n@yahoo.com

Abstract

Objective

Astragalus verus is one of best species for tragacanth production. The aim of this study was optimization of cell suspension culture in this plant.

Materials and methods

First, the callus production was optimized then optimization of cell suspension was performed. The callus production experiment was conducted in a factorial arrangement with explants of root, hypocotyl and cotyledon in MS medium containing BAP in combination with 2,4-D and NAA. In experiment of cell suspension optimization, callus that derived from medium containing NAA and 2, 4-D were investigated using 16 hormonal treatments and three replications in a completely randomized design. Also, it was investigated the application of dark treatments, ascorbic acid, poly-vinyl pyrrolidone and EDTA iron chelate to avoid phenolic compounds.

Results

The results showed that the highest callus production percentage (average of 67%) was obtained in the medium of 2,4-D with root explant. The best hormone treatment of cell suspension was 3 mg /L 2,4-D in combination with 0.5 mg/L Kin with an average of 0.277 viability, and 0.040 g dry weight (at 5ml). In the study of the effect of browning inhibitors, the highest dry weight was obtained with 100 mg/l ascorbic acid in cell culture medium with an average of 0.76 g (at 5ml). This treatment was effective in prevention phenolic compounds.

Conclusions

The results of this study showed that 2,4-D could be used alone for inducing proper callus and in combination with Kin for the production of cell suspension. It was also found that ascorbic acid can well control the process of browning cells of cell suspension. The results of this study can be used for in vitro tragacant production.

Keywords: Ascorbic acid, *Astragalus verus*, Browning, Cell suspension.

Citation: Ebrahimi S, Zaker Tavallaie F, Zare Mehrjerdi M, Ghorbanzadeh Neghab M (2019) Optimization of Cell Suspension Induction in Tragacanth Astragalus (Astragalus Verus). Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 1-18.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 1-18.
DOI: 10.22103/jab.2019.2246
Received: June 13, 2018; Accepted: October 14, 2018
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بهینه‌سازی القای سوسپانسیون سلولی در گون مولد کتیرا (*Astragalus verus*)

صفیه ابراهیمی

دانش اموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوزی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان، شیروان، خراسان شمالی، ایران. ایمیل: ebrahimi44@gmail.com

فاطمه ذاکر تولایی

* نویسنده مسئول. استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع اموزش عالی شیروان. شیروان، شمالی، ایران. تلفن: 09891550876910. ایمیل: f.zaker.t@um.ac.ir

محمد زارع مهرجردی

استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع اموزش عالی شیروان. شیروان، خراسان شمالی، ایران ایمیل: zarem1381@yahoo.com

محمود قربانزاده

دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع اموزش عالی شیروان. شیروان، خراسان شمالی، ایران ایمیل: m_ghorbanzadeh_n@yahoo.com

تاریخ دریافت: 1397/03/23، تاریخ پذیرش: 1397/07/22

چکیده

هدف: گون *Astragalus verus* یکی از گونه‌های خوب برای تولید کتیرا است. این مطالعه با هدف بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی در این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا بهینه‌سازی کالوس‌زایی و سپس بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی انجام شد. آزمایش کالوس‌زایی در قالب فاکتوریل با ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی BAP در ترکیب با 2,4-D و NAA در پنج تکرار انجام شد. در آزمایش بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی، کالوس‌های حاصل از محیط کشت NAA و 2,4-D در قالب طرح

پایه کاملاً تصادفی با 16 تیمار هورمونی در سه تکرار بررسی شدند. همچنین کاربرد تیمارهای تاریکی، اسیدآسکوربیک، پلی‌وینیل-پیرولیدون و کلات‌کننده آهن EDTA جهت کنترل ترکیبات فنولی بررسی شد.

نتایج: بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت 2,4-D از ریزنمونه ریشه با میانگین 67 درصد بدست آمد. بهترین تیمار هورمونی سوسپانسیون سلولی شامل سه میلی‌گرم در لیتر2,4-D در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین 0/277 زنده‌مانی، و 0/040 گرم وزن خشک (در پنج میلی‌لیتر) بود. در مطالعه تاثیر مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن بیشترین وزن خشک از تیمار 100 میلی‌گرم در لیتر اسیداسکوربیک با میانگین 0/76گرم (در پنج میلی‌لیتر) بدست آمد که در جلوگیری از قهوه ای شدن بسیار موثر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که 2,4-D می‌تواند به تنهایی جهت القای کالوس مناسب و در ترکیب با Kin برای تولید سوسپانسون سلولی گون قابل استفاده باشد. همچنین مشخص شد که اسیداسکوربیک می‌تواند به‌خوبی فرایند قهوه‌ای شدن سلول‌های سوسپانسیون سلولی را کنترل نماید. نتایج این مطالعه می تواند جهت تولید درون شیشه‌ای کتیرا مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Astragalu sverus*، اسیداسکوربیک، سوسپانسیون سلولی، قهوه‌ای‌شدن

مقدمه

کشور ایران خاستگاه اصلی ویکی از مراکز تنوع گونه‌های گون بوده که بر اساس آخرین اطلاعات 804 گونه در ایران وجود دارد که از آن میان 527 گونه بومی و 277 گونه مشترک با کشور همسایه است (Massoomi 2005). از این تعداد 156 گونه مولد کتیرا است (Genty 1957). صمغ کتیرا جزو مهم ترین منابع صمغ تجاری دنیا به شمار می‌رود و کاربرد عمده آن در صنایع داروسازی می‌باشد. این صمغ به عنوان عامل تعلیق‌کننده در امولیسیون روغن درآب، ژل‌ها، خمیردندان‌ها، تثبیت‌کننده در کرم‌ها و لوسیون‌های پوستی و همچنین عامل پوشش دهنده در تولید قرص‌های دارویی استفاده می‌شود (Verbeken et al. 2003). تولید متابولیت‌های ثانویه با بهره‌گیری از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی مانند القای سوسپانسیون سلولی در گیاهان دارویی قابل انجام است (Mulabagal & Tsayits 2004) کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر سریع و انبوه گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط درون شیشه‌ای فراهم می‌سازد با استفاده از کشت درون شیشه‌ای گیاه، علاوه بر دسترسی به منابع اولیه دارو در شرایط کنترل‌شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به گیاه و تولید ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌گردد(Bourgaud et al. 2002). القای کالوس و باززایی گیاه *Astragalus nezaketaein* گون بومی ترکیه توسط اریسون در سال 2010 انجام شد. بیشترین تعداد شاخه از کالوس برگ در محیط کشت MS دارای BA , NAA) بدست آمد (Erisen et al. 2010). اثرات TDZ روی شاخه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای بر روی گونه *Astragalus cariensis* توسط اریسون در سال 2011 بررسی شد. باززایی غیرمستقیم از ریزنمونه روی محیط‌کشت MS دارای NAA و

TDZ انجام شد (Erisen et al. 2011). در مطالعه باززایی گون *Astragalus adsurgens* توسط Ping Luo et al. (1999) حداکثر کالوس‌زایی در محیط کشت MS دارای 2,4-D و BA در ریزنمونه لپه بدست آمد. در سال 1999 باززایی گون گونه *Astragalus adsurgens* از کشت سوسپانسیون سلولی انجام شد. در این مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت KM8P دارای 0.5 mg/L NAA، 1.0 mg/L 2, 4-D، 0.7 mg/L BA و 0.4 mol/L گلوکز انجام شد. سپس تکثیر سلول‌ها در محیط کشت MS دارای 0.1 mg/L NAA و 0.5 mg/L BA دنبال شد. پس از ان توده‌های پروتوپلاست به محیط کشت MS دارای 0.1 mg/L NAA و 1.0 mg/L BA منتقل شدند و حدود 40 درصد کلونی‌ها جنین سوماتیکی تولید کردند. از توده های پروتوپلاست در کشت طولانی مدت سوسپانسیون سلولی روی محیط کشت 1/2 MS بدون هورمون نیز جنین‌های سوماتیکی تولید شد (Luo & Jia 1998). در سال 2004 باززایی پروتوپلاست‌های گون گونه *Astragalus melilotoides* از کالوس‌های جنین‌زای بدست امده از هیپوکوتیل انجام شد. در این مطالعه پروتوپلاست‌ها از طریق جنین‌زایی سوماتیکی گیاهچه تولید کردند (Huo & Jia 2004).

در سال 2008 باززایی گون گونه *Astragalus chrysochlorus* از طریق کشت سوسپانسیون سلولی جنین‌زا انجام شد. در این مطالعه گیاهچه‌های 30 روزه روی محیط کشت MS دارای 0.1 mg/l NAA به اضافه 1.0 mg/l BA کشت شدند. از مزوکوتیل گیاهچه‌ها کالوس تولید شد و کالوس‌های تولید شده به محیط کشت مایع MS دارای 2,4-D به همراه IAA یا NAA منتقل شدند. پس از ایجاد جنین‌های سوماتیکی، آنها را به محیط کشت دارای IAA منتقل کرده و سپس از این جنین‌ها باززایی انجام دادند (Turgut-Kara & Arı, 2008). با وجود پژوهش‌هایی روی کشت بافت برخی گونه‌های گون، تا کنون در زمینه کشت بافت و سوسپانسیون سلولیگون *Astragalus verus* گزارشی وجود ندارد. با توجه به اهمیت این گونه گون از نظر تولید کتیرا و جلوگیری از فرسایش خاک، این تحقیق با هدف بهینه کردن شرایط کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش *Astragalus verus* می‌باشد که یک گونه تولید کننده کتیرا است. این گونه از گردنه اسدلی در خراسان شمالی جمع‌آوری شده و گونه آن توسط کارشناسان پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تشخیص داده شد. بذرها از داخل گیاه خارج شدند وجهت ضدعفونی، پس از شستشوی سطحی با آب، ابتدا درالکل 70 درصد به مدت یک دقیقه و سپس در هیپوکلریت‌سدیم یک‌درصد به مدت 20 دقیقه قرار داده شدند و پس از آن زیر هود استریل سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند.سپس بذرها جهت شکستن خواب با تیغ اسکالپل خراش داده شده و در محیط کشت MS با 3 درصد ساکارز

و 0/8 درصد آگار با pH=5/7 کشت داده شدند. کشت‌ها سپس به شرایط نوری 16 ساعت روشنایی (2500-3000 لوکس) دمای 1 ±25 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

بررسی اثر نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی محیط کشت بر کالوس‌زایی

در این آزمایش به منظور تهیه کالوس مناسب برای استفاده در تولید سوسپانسیون سلولی، اثر ترکیبات مختلف تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی (جدول یک) بر کالوس‌زایی سه نوع ریزنمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه تهیه شده از گیاهچه استریل بررسی شد.

جدول1. ترکیب هورمونی به کار رفته برای کالوس‌زایی(میلی‌گرم در لیتر)

Table 1. Employed hormonal composition for callus induction (mg/l).

2,4-D	NAA	BAP	تیمار treatment	2,4-D	NAA	BAP	تیمار treatment	2,4-D	NAA	BAP	تیمار treatment
9	0	0	15	0	3	0.25	8	0	0.5	0	1
0.5	0	0.25	16	0	6	0.25	9	0	1.5	0	2
1.5	0	0.25	17	0	9	0.25	10	0	3	0	3
3	0	0.25	18	0.5	0	0	11	0	6	0	4
6	0	0.25	19	1.5	0	0	12	0	9	0	5
9	0	0.25	20	3	0	0	13	0	0.5	0.25	6
				6	0	0	14	0	1.5	0.25	7

ریزنمونه‌های کشت شده تحت شرایط نوری 16 ساعت روشنایی(2500-3000 لوکس)در دمای 1±25 درجه سانتیگراد نگهداری شدند و پس از یک ماه درصد کالوس‌زایی ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل (5×3×2×2) با نوع هورمون اکسین (NAA و 2,4-D)، غلظت هورمون سیتوکنین (صفر و 0/25 میلی‌گرم در لیتر)، نوع ریزنمونه (کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه) و غلظت هورمون اکسین (0/5، 1/5، 3، 6 و 9 میلی‌گرم در لیتر) با اعمال یک نوع هورمون سیتوکینین برای همه تیمارها و فراوانی سه عدد از هر ریزنمونه داخل یک پتری‌دیش در پنج تکرار انجام شد.

آزمایش بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی

درآزمایش کالوس زایی از دو نوع اکسین استفاده شد و تیمارهای مختلف، کالوس‌زایی متفاوتی نشان دادند، لذا برای بهینه-سازی تولید سوسپانسیون سلولی، دو آزمایش ترتیب داده شد. در آزمایش اول از کالوس‌های حاصل از تیمارهای دارای NAA محیط کشت کالوس‌زایی استفاده شد و در آزمایش دوم از کالوس‌های حاصل از تیمارهای دارای 2,4-D استفاده شد. در آزمایش اول برای تهیه محیط کشت پایه سوسپانسیون سلولی از فرمول بهترین محیط کشت آزمایش کالوس‌زایی بدست آمده از آزمایش

کالوس‌زایی بدون افزودن آگار استفاده شد. همراه ترکیب هورمونی (جدول 2)، قطعات کالوس تولید شده در آزمایش کالوس‌زایی (کالوس بدست آمده از محیط کشت با ترکیب هورمونی NAA) برای انتقال به محیط کشت مایع و تشکیل سوسپانسیون سلولی استفاده شد. در این آزمایش کشت در ارلن‌های 50 میلی لیتری (15 میلی‌لیتر محیط کشت در هر ارلن) با میزان مساوی کالوس انجام شد. ارلن‌ها روی شیکر با سرعت 100 دور دردقیقه و در دمای 2±24 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هر10 روز به دلیل قهوه‌ای شدن سوسپانسیون سلولی واکشت انجام شد. در این آزمایش وزن خشک، زنده‌مانی و هر سه روز یک بار شمارش سلول‌ها برای هر تیمار، ارزیابی شد. برای ارزیابی زنده‌مانی از آزمون تترازولیوم کلراید استفاده شد (Towill & Mazur 2011). این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در هشت تیمار (جدول 2) و سه تکرار انجام شد.

جدول 2- ترکیب هورمونی مورد استفاده برای تهیه سوسپانسیون سلولی در آزمایش اول

Table 2. The hormone composition used for preparation of cell suspension in the first experiment

نشانه Sign	تیمار Treatment
T1	3mg/l NAA+0/5mg/l Kin
T2	3mg/l NAA+0/25mg/l Kin
T3	3mg/l NAA+0/5mg/l Kin+0/2mg/l BAP
T4	3mg/l NAA+0/25mg/l Kin+0/5mg/l BAP
T5	3mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin
T6	3mg/l 2,4-D+0/25 mg/l Kin
T7	3mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin+0/25mg/l BAP
T8	3mg/l 2,4-D+0/25mg/l Kin+0/5mg/l BAP

در آزمایش دوم از قطعات کالوس حاصل از تیمارهای دارای2,4-D محیط کشت کالوس‌زایی استفاده شد. برای تهیه محیط کشت پایه سوسپانسیون سلولی نیز از فرمول بهترین محیط کشت آزمایش کالوس‌زایی بدست‌آمده از مرحله قبلی با ترکیب هورمونی 2,4-D بدون آگار استفاده شد.از ترکیب هورمونی (جدول 3) و قطعات کالوس تولید شده در آزمایش کالوس‌زایی (کالوس بدست آمده از محیط کشت با ترکیب هورمونی2,4-D) برای انتقال به محیط کشت مایع و تشکیل سوسپانسیون سلولی استفاده شد. این آزمایش مانند آزمایش اول انجام شد. در این آزمایش صفات شمارش سلول‌ها هر سه روز یک بار، وزن خشک، زنده‌مانی و قهوه‌ای شدن برای هر تیمار ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با هشت تیمار(جدول 3) و سه تکرار انجام شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک سوسپانسیون سلولی محیط کشت سوسپانسیون سلولی به مقادیر مساوی درون فالکون ریخته شد. با سرعت 4000 دور در دقیقه به مدت چهار دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی جدا شد. سلول‌های داخل فالکون در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز قرار داده شدند و پس از خشک شدن وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

جدول 3. ترکیب هورمونی مورد استفاده برای تهیه سوسپانسیون سلولی در آزمایش دوم

Table 3. The hormone composition used for preparation of cell suspension in the second experiment.

نشانه Sign	تیمار Treatment
T9	0/5mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin
T10	0/5mg/l 2,4-D+0/25 mg/l Kin
T11	0/5mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin+0/25mg/l BAP
T12	0/5mg/l 2,4-D+0/25mg/l Kin+0/5mg/l BAP
T13	3mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin
T14	3mg/l 2,4-D+0/25 mg/l Kin
T15	3mg/l 2,4-D+0/5mg/l Kin+0/25mg/l BAP
T16	3mg/l 2,4-D+0/25mg/l Kin+0/5mg/l BAP

آزمون تترازولیوم کلراید

برای ارزیابی زنده‌مانی از آزمون تترازولیوم‌کلراید استفاده شد.بدین منظور 0/6 درصد تریفنیل‌تترازولیوم‌کلراید در بافر 0/05 مولار $Na_2HPO_4 – KH_2PO_4$ تهیه شد. سپس به هر یک از نمونه‌های درون فالکون که با استفاده سانتریفیوژ رسوب داده شده بود و مایع رویی آن حذف شده بود، یک میلی‌لیتر از محلول اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت 20 ساعت در دمای 2±25 درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شد. پس از آن رنگ قرمز بدست آمده حاصل از احیای تترازولیوم‌کلراید، پس از تخلیه محلول با استفاده از یک میلی‌لیتر اتانول 95 درصد در حمام آب‌گرم 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه عصاره‌گیری شد. برای ارزیابی میزان احیای تترازولیوم از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. ابتدا برای تعیین حداکثر جذب تترازولیوم احیا شده همین مراحل برای همه نمونه‌ها بدون اضافه کردن تترازولیوم کلراید و با استفاده از اتانول 95 درصد انجام شد. پس از آن درصد جذب تترازولیوم احیا شده و اتانول در سوسپانسیون سلولی در 489 نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی عوامل موثر بر کنترل قهوه‌ای شدن سوسپانسیون سلولی

به دلیل بروز پدیده قهوه‌ای‌شدن در کشت بافت و کشت سوسپانسیون گون (شکل 1) بررسی عوامل موثر بر کنترل قهوه‌ای‌شدن سوسپانسیون سلولی انجام شد. در این راستا از تیمارهای تاریکی، اسیدآسکوربیک، PVPو کلات کننده آهن EDTA استفاده شد. محیط کشت پایه این آزمایش از فرمول بهترین محیط کشت آزمایش بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی استفاده شد و در نتیجه صفات(زنده‌مانی و وزن خشک) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار انجام شد.

شکل 1. مراحل قهوه ای شدن سوسپانسیون سلولی *Astragalus verus* الف) روز اول ، ب) روز دوم و ج) روز سوم پس از کشت

Figure 1. Stages of browning the suspension in *Astragalus verus.* A) First day, B) second day and J) three day after culture

تجزیه و تحلیل‌های آماری

آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم شدند. تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از فرمول ([ArcSin/3/14]×180) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، که اثر نوع اکسین و ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد و اثر ساده BAP و اثرات متقابل (نوع اکسین در ریزنمونه، BAP در اکسین، BAP در ریزنمونه و نوع اکسین در ریزنمونه در BAP) در سطح پنج درصد معنی‌دار شدند (جدول 4). مقایسه میانگین اثر نوع اکسین روی کالوس‌زایی نشان داد که افزایش غلظت 2,4-D سبب کاهش درصد کالوس‌زایی شد. در حالی که بیشترین درصد کالوس در محیط کشت 0/5 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین 56 درصد بدست آمد. کم‌ترین درصد کالوس در محیط کشت نه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین 40 درصد حاصل شد. در مقابل افزایش غلظت NAA سبب افزایش درصد کالوس‌زایی شد. به نحوی که بیشترین درصدکالوس در محیط کشت با نه میلی گرم در لیتر NAA با میانگین 35 درصد حاصل شد. همچنین کم‌ترین درصد کالوس در محیط کشت با 0/5 میلی گرم در لیتر NAA با میانگین 4 درصد حاصل شد (شکل 2). مقایسه میانگین اثر ریزنمونه بر کالوس‌زایی نشان داد که بیشترین کالوس‌زایی از ریزنمونه ریشه با میانگین68 درصد بدست آمد (شکل2 الف). همچنین مقایسه میانگین اثر نوع هورمون اکسین بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها نشان داد، بیشترین درصد کالوس در ریزنمونه‌هادر محیط کشت2,4-D بدست آمد (شکل2 ب).

نتایج این مطالعه نشان داد که در گون *Astragalus verus* استفاده از 2,4-D برای کالوس‌زایی خیلی موثرتر از NAA می‌باشد ضمن اینکه در 2,4-D غلظت‌های بالاتر و در NAA غلظت‌های پایین‌تر کالوس‌زایی بیشتری دارند. در مطالعه Erisen et al. (2011) نیز استفاده از غلظت‌های پایین NAA (1-2mg/l) در ترکیب با TDZ کالوس‌زایی بالایی را را در گونه *Astragalus cariensis* نشان داده شده است (Erisen et al. 2011). در مطالعه Ping Luo et al. (1999) استفاده از ریزنمونه لپه و هورمون 2,4-D با غلظت 2mg/l در گون گونه *Astragalus adsurgens* بیشترین کالوس‌زایی را نشان داد. در باززایی غیرمستقیم گون گونه *Astragalus chrysochlorus* در ترکیه استفاده از NAA 0.1 mg/l به اضافه 1.0 mg/l BA منجر به تولید کالوس شد (Turgut-Kara & Ari 2008). در مطالعه‌ای درگونه *Astragalus melilotoides* ریزنمونه هیپوکوتیل کالوس‌زایی خوبی نشان داد (Huo & Jia, 2004).

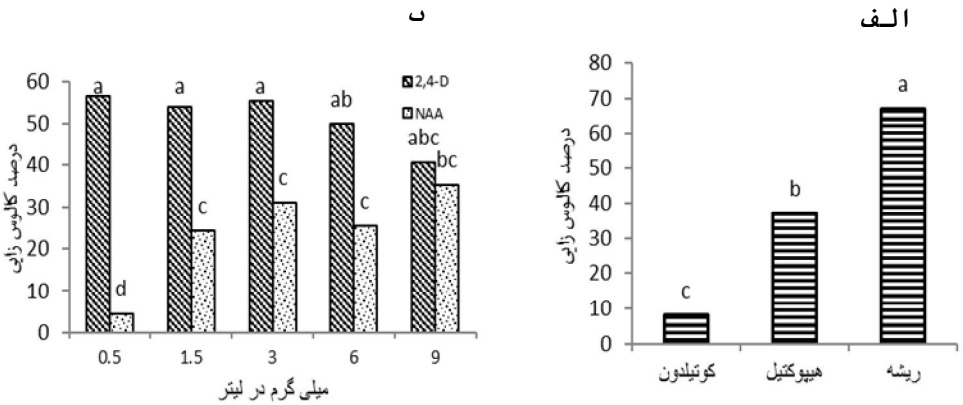
جدول 4. تجزیه واریانس اثر نوع اکسین، BAP و ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی

Table 4. Analysis of variance for effect of auxin type, BAP and explant on percentage on callogenesis.

میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی	منبع تغییرات
درصد کالوس callogenesis percentage	df	Source of variation
1598.82*	1	BAP
4751.47**	9	اکسین Auxin
61793.66**	2	ریزنمونه explant
1245.16*	9	اکسین× BAP BAP ×Auxin
1397.35*	2	ریزنمونه × BAP explant×BAP
883.66*	18	ریزنمونه × اکسین ×Auxin explant
563.67*	18	اکسین × BAP × ریزنمونه explant× BAP ×Auxin
340.55	240	خطا error

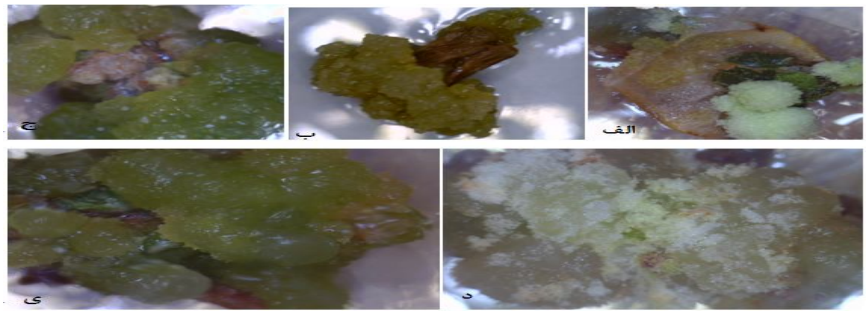
*و ** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد می‌باشد.

* and ** indicate significant difference at the 1% and 5% levels of probability respectively.



شکل 2. الف) مقایسه غلظت‌های مختلف NAA و 2,4-D بر کالوس‌زایی و ب) مقایسه کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها. حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌دار ندارد

Figure 2. (A) Comparison of different concentration of NAA and 2,4-D on Callus induction. (B) Comparison of explants in callus induction. Similar letters based on LSD test at 5% probability level are not significant



شکل 3 . (الف). کالوس لپه در محیط کشت حاوی 2,4-D (ب). کالوس هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی 2,4-D (ج). کالوس هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی NAA (د). کالوس ریشه در محیط کشت حاوی 2,4-D (ی). کالوس ریشه در محیط کشت NAA

Figure. 3 (A) Callus cotyledon in a culture medium containing 2,4-D, (B) Hypocotyl callus in a culture medium containing 2,4-D, (C) Hypocotyl callus in a culture medium containing NAA, (D) Root callus in a culture medium containing 2,4-D and (E) Root callus in a culture medium containing NAA.

بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی

تاثیر تیمارهای هورمونی بر وزن خشک و زنده‌مانی سوسپانسیون سلولی *Astragalus verus*

نتایج تجزیه وایانس داده‌های حاصل از وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) در تیمارهای هورمونی T1-T16 (جدول‌های 2 و 3) نشان داد، که اثر تیمارها بر وزن خشک در سطح یک درصد معنی‌دار بود، ولی بر زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) معنی‌دار نبود (جدول 5). مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف هورمونی (T1-T8) در محیط کشت

سوسپانسیون سلولی بر وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) سلول‌های حاصل از کشت کالوس تولید شده در محیط کشت NAA نشان داد، که بیشترین زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) و وزن خشک از تیمار هفت که شامل سه میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم بر لیتر کینتین و 0/25 میلی‌گرم بر لیتر BAP بود به ترتیب با میانگین 0/343 زنده‌مانی و 0/0106 (گرم در یک میلی‌لیتر) وزن خشک بدست آمد (شکل4).

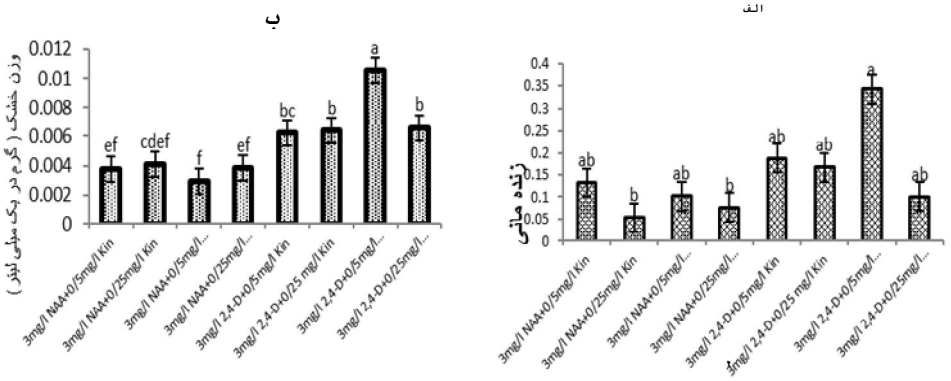
جدول 5 .تجزیه واریانس اثر تیمار هورمونی در محیط کشت سوسپانسیون سلولی بر وزن خشک و زنده-مانی سلول های حاصل

Table 5. Analysis of variance for effect of hormonal treatment in cell suspension medium on Dry weight and viability of derived cells

S.O.V	df	میانگین مربعات (MS)	
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک (در 5 میلی‌لیتر) Dry weight(in 5 ml)	زنده‌مانی (درصد جذب تترازولیوم) viability (tetrazolium absorption percentage)
treatment (T1-T16)	15	0.002682^{**}	0.023115^{ns}
error	32	0.000046	0.02633

**بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یکدرصد و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

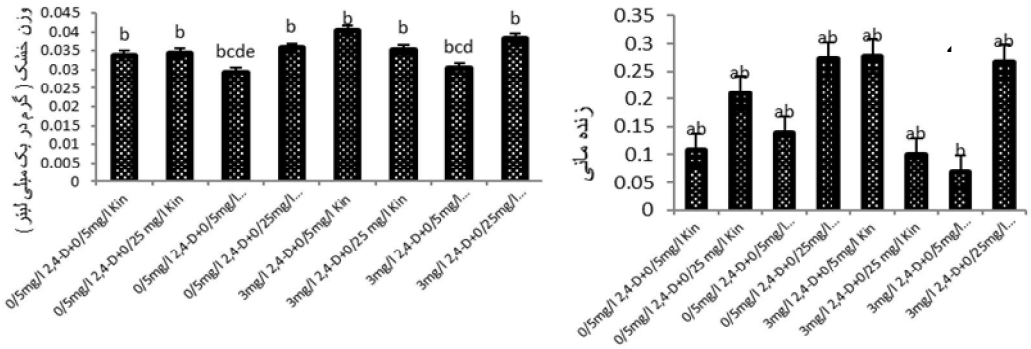
** indicate significant difference at the 1% level of probability and ns indicate no significant difference



شکل 4. سطوح تیمار (T1-T8) هورمونی بر(الف) زنده مانی (احیای تترازولیوم) (ب) وزن خشک سلول‌های سوسپانسیون. حروف مشابه براساس آزمون LSDدر سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی دار ندارد

Figure 4. Effect of hormonal treatment (T1-T8) levels on: A: Survival (tetrazolium absorption) and B: Dry weight of cell suspension. Similar letters based on LSD test at 5% probability level are not significant

مقایسه میانگین اثر تیمار هورمونی T9-T16 در محیط کشت سوسپانسیون سلولی بر وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) سلول‌های حاصل از کشت کالوس تولید شده در محیط کشت 2,4-D نشان داد که تیمار 12 با ترکیب 0/5 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با 0/25 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/25 میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار 13 با سه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین تیمار 16 با سه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با 0/25میلی-گرم در لیتر Kin و 0/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به ترتیب با میانگین 0/272، 0/277، 0/266 (احیای تترازولیوم کلراید) بیشترین زنده‌مانی و 0/007، 0/008، 0/0076 گرم (در یک میلی‌لیتر) بیشترین وزن خشک بدست آمد (شکل5).



شکل 5. سطوح تیمار (T9-T16) هورمونی بر(الف)زنده مانی(احیای تترازولیوم) (ب)وزن خشک سلول سوسپانسیون. حروف مشابه براساس آزمون LSDدر سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی دار ندارد.

Figure 5. Effect of hormonal treatment (T9-T16) levels on: A: Survival (tetrazolium absorption) and B: Dry weight of cell suspension. Similar letters based on LSD test at 5% probability level are not significant

در مطالعه حاضر 2,4-D نسبت به NAA تاثیر بیشتری بر زنده‌مانی و وزن خشک سوسپانسیون سلولی داشت. در بررسی که انجام شد گزارشی در مورد بررسی این فاکتورها و عوامل موثر بر آن درگونه مورد مطالعه و حتی جنس گون مشاهده نشد.

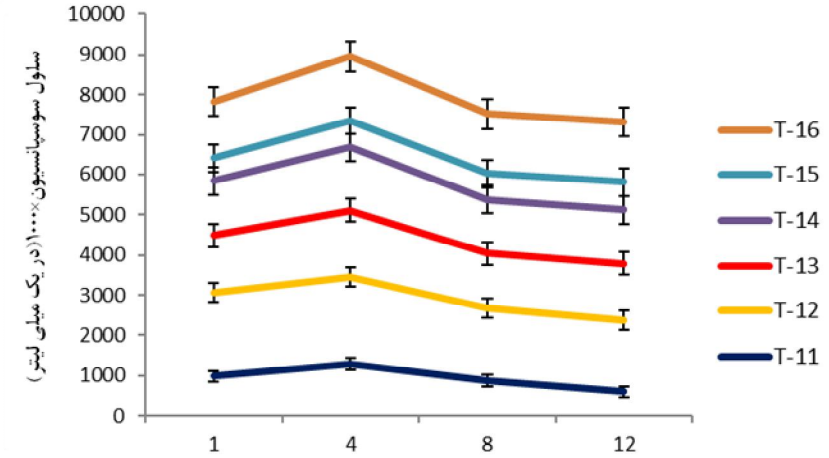
کنترل ترکیبات فنولی در کشت سوسپانسیون

ترکیبات فنولی به عنوان واکنش گیاه به تنش تولید می‌شود و می‌توانند سبب مرگ بافت گیاهی شوند. بر این اساس هر تیماری که تولید ترکیبات فنولی را افزایش دهد نامطلوب به شمار می‌رود. یکی از مشکلات عمومی در ایجاد سوسپانسیون سلولی جدا نشدن توده کالوس و قهوه‌ای‌شدن سریع آن است (Tabatabaei and Omidi 2009) که باعث تبدیل فاز نمایی به فاز ایستایی می‌شود. روند قهوه‌ای‌شدن سوسپانسیون سلولی دو روز پس از کشت با تغییر رنگ محیط کشت مشاهده شد. واکشت در

محدوده 7 تا 10 روز مفید واقع نشد (شکل 6). به نحوی که مقایسه میانگین شمارش سلول‌های سوسپانسیون هر سه روز نشان داد، ترکیبات فنولی مانع رشد سوسپانسیون سلولی شد (شکل7).

شکل 6. (الف) قهوه‌ای شدن سلول های سوسپانسیون. (ب) جلو گیری از قهوه‌ای شدن با استفاده از کنترل کننده‌ها ترکیبات فنولی در سلول سوسپانسیون.(ج) ساختار جنین‌زا سوسپانسیون. (د) روز اول سوسپانسیون. (ی) روز دوم. (ن) روز پنجم. (و) قهوه‌ای شدن ساختار جنین‌های شکل گرفته در گون.

Figure 6. (a) Browning of cells in suspension. (B) Preventing of browning using preventer of phenolic compounds in suspension cells. (C) Embryonic structure of suspension. (D) The first day of suspension. (S) The second day. (N) The fifth day. (V) Browning of the produced embryo-shaped structure.



شکل 7. میانگین تعداد سلول‌های سوسپانسیون در روزهای پس از کشت

Figure 7. Average number of suspension cells during days after culture

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای کنترل کننده ترکیبات فنولی در محیط سوسپانسیون سلولی بر وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) نشان داد، تاثیر تیمارها بر وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازولیوم کلراید) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول 6).

جدول 6. جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف کنترل ترکیبات فنولی بر وزن خشک و زنده‌مانی در کشت سوسپانسیونی

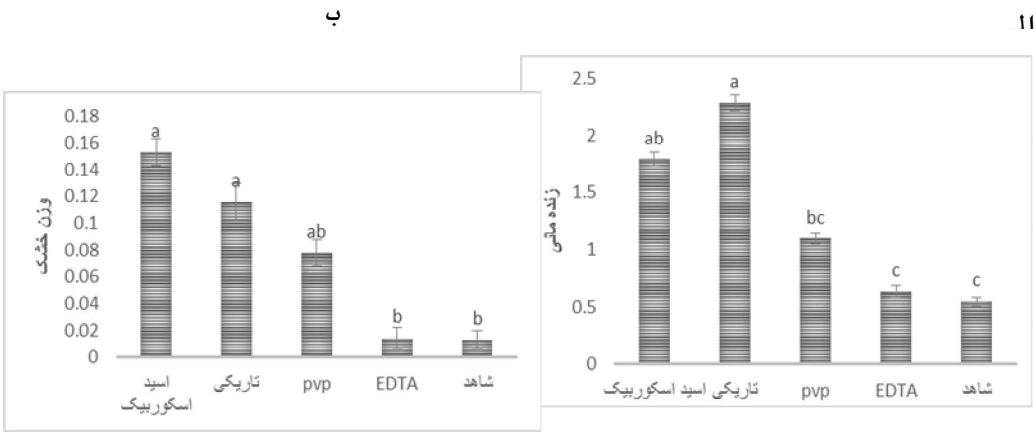
Table 6. Analysis of variance for effect of phenolic compounds control treatments on dry weight and viability in suspension culture.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	
Source of variation	df	وزن خشک(در 5 میلی‌لیتر) Dry weight(in 5 ml)	زنده‌مانی (درصد جذب تترازولیوم) viability (tetrazolium absorption percentage)
تیمار کنترل ترکیبات فنولی Phenolic compounds control treatment	4	0.40089*	2.57722*
خطا error	15	0.0775	0.5954

* معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد

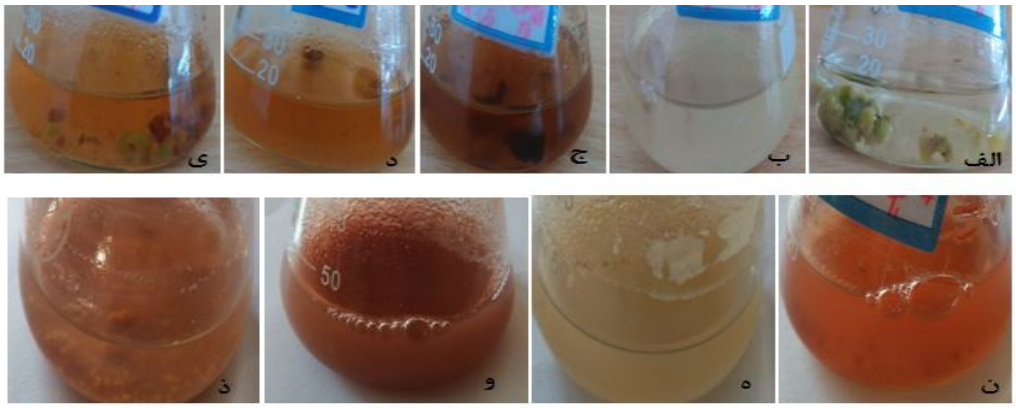
* Significant at 5% probability level

نتایج مقایسه میانگین نشان داد، که بیشترین وزن خشک از تیمار 100 میلی‌گرم در لیتر اسیداسکوربیک در محیط کشت سوسپانسیون سلولی با میانگین0/152 گرم (در یک میلی‌لیتر) بدست آمد. همچنین بعد از آن از تیماری که در تاریکی نگهداری شده بود و تیماری که شامل 300 میلی‌گرم در لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدون(PVP) به ترتیب با میانگین 0/115 و 0/078 گرم (یک میلی‌لیتر) وزن خشک بدست آمد. کم‌ترین مقدار وزن خشک از تیمار شاهد با میانگین 0/009 گرم (یک میلی‌لیتر) بدست آمد (شکل8). همچنین استفاده از تیمارهای کنترل‌کننده ترکیبات فنولی باعث افزایش وزن خشک و زنده‌مانی (احیای تترازویوم کلراید) سلول سوسپانسیون نسبت به تیمار شاهد شد. در پژوهشی .Elmore et al (1990) گزارش کردند که اسیدآسکوربیک در محیط کشت بسیار ناپایدار است، اما برخی از فراورده‌های تجزیه شده آن نیز نقش آنتی‌اکسیدانی را به خوبی انجام می دهند .اضافه کردن زغال فعال و pvp (پلی وینیل پیرولیدون) به محیط کشت نیز سبب حذف ترکیبات فنولی می‌شود (Tabatabaei and Omidi 2009). نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر می‌تواند برای تولید کتیرا و سایر متابولیت‌های ثانویه گون در محیط درون شیشه‌ای بکار رود.



شکل 8. تاثیر تیمار های کنترل کننده ترکیبات فنولی بر (الف) وزن خشک (ب) زنده مانی (احیای تترازولیوم کلراید). حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی دار ندارد.

Figure 8. Effect of preventer treatments of phenolic compounds on (a) dry weight (b) viability (Reduction of tetrazolium chloride). Similar letters based on LSD test at 5% probability level have no significant difference



شکل 9. روند کنترل ترکیبات فنولی (الف) روز اول گذاشتن سوسپانسیون. (ب) روز سوم تیمار اسید اسکوربیک. (ج) روز سوم تیمار EDTA. (د) روز سوم تیمار تاریکی. (ی) روز سوم تیمار PVP. (ن) سه هفته بعد از کشت تیمار EDTA. (ه) سه هفته بعد از کشت تیمار اسید اسکوربیک. (و) سه هفته پس از کشت تیمار PVP. (ذ) سه هفته پس از کشت تیمار تاریکی.

Figure 9. Control of phenolic compounds (A) 1st day of suspension. (B) 3rd day of Ascorbic acid treatment. (C) 3rd day of treatment (EDTA); (d) 3rd day of darkness treatment. (E) 3rd day of treatment. PVP (N) 3 weeks after EDTA treatment. (H) 3 weeks after ascorbic acid treatment. (V) 3 weeks after PVP treatment. (Z) 3 weeks after darkness treatment culture.

منابع

معصومی علی اصغر (1385). گون‌های ایران (جلد 5). موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. 786 صفحه.

طباطبایی بدرالدین ابراهیم سید، امیدی منصور (1394). کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. 368 صفحه.

References

Bourgaud F, Gravot A, Goniter E. (2002). Production of plant secondary metabolites. Plant Sci 161: 839-851.

Erisen S, Atalay E, Yorgancilar M et al. (2010). Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketaein* Turkey. Electronic J Biotechnol 13, 1-7.

Erisen S, Atalay E, Yorgancilar M (2011). The effect of thidiazuron on the in vitro shoot derelopment of endemic *Astragalus cariensis* in turkey. Turk J Biotechnol 35: 521-526.

Elmore HW, Samples B, Sharma S, Harrison M (1990) Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. Plant Cell Tissue Organ Cult 20, 131–135.

Genty HS (1957) Gum tragacanth in Iran. Econom Botany 11, 40-63.

Housw Jia JF (2004) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. Plant Cell Rep 22, 741–746.

Luo JP, Jia JF (1998) Plant regeneration from callus protoplasts of the forage legume Astragalus adsurgens pall. Plant Cell Rep 17, 313–317.

Maassoumi A (2005) Astragalus in Iran. Forests and Rangelands Research Institute Tehran (in Persian).

Mulabagal V, Tsayits HS (2004) Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International J Appl Sci Eng 2, 29-48

Ping Luo J, Fen Jia J, Hua Gu Y, Liu J (1999) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* pall. Plant Sci 143, 93-99.

Tabatabaei BES, Omidi M (2009) Plant cell and Tissue culture. Tehran university press, 172 pp (in Persian).

Towill LE, Mazur P (2011) Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can J Botany 53, 1097-1102.

Turgut-Kara N, Arı U (2008) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminoseae). Afr J Biotechnol 7, 1250-1255.

Verbeken D, Dierrckx S, Dewettink K (2003) Exudate gum: Occurrence, production, and application. Appl Microbiol Biotechnol 63, 10-12.

Yorgancilar M, Erisen S (2011) The effect of TDZ on shoot regeneration of *Astragaluss chizopterus*. J Anim Plant Sci 21, 519-524.