مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

انتخاب محیط کشت بهینه برای جوانه‌زنی بذر و کالزایی و تعیین محتوای ساپونین سوسپانسیون سلولی گیاه چوبک (*Acanthophyllum sordidum*) تحت تنش شوری

زهرا الماسی[۱]، جلیل خارا[۱*] و منصور افشار محمدیان[۲]

[۱] **ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۲] **ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۹/۲۸

چکیده

گیاه چوبک گیاهی دارویی از خانواده میخک می‌باشد. این گیاه دارویی یکی از منابع ارزشمند ساپونین است. روش‌های مختلفی برای افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان وجود دارند که در بین آنها کشت بافت به عنوان یک روش کارآمد مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین منظور در تحقیق حاضر برای انتخاب محیط کشت مناسب برای جوانه‌زنی و کالزایی، تعیین منحنی رشد سلول‌های چوبک و همچنین تعیین میزان ساپونین در تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که طول ریشه‌چه و وزن تر ریشه‌چه بترتیب در محیط کشت‌های MS و WPM افزایش معنی‌داری داشتند، ولی پارامترها شامل طول ساقه‌چه، وزن تر کل و وزن تر ساقه‌چه در محیط کشت‌های استفاده شده (MS، WPM و B5) اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین نتایج تجزیه واریانس درصد کالزایی از دو جداکشت برگ و ساقه اختلاف معنی‌داری بین محیط کشت‌های استفاده شده را نشان نداد. براساس نتایج به دست آمده از منحنی رشد، حداکثر میزان رشد، ۸ روز پس از شروع کشت سوسپانسیون به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار محتوای ساپونین سلول‌های چوبک شد.

واژه های کلیدی: چوبک (*Acanthophyllum sordidum*)، کشت بافت، ساپونین، محیط کشت، کالزایی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: j.khara@urmia.ac.ir

مقدمه

چوبک گیاهی است که به خانواده میخک (Caryophllaceae) و جنس آکانتوفیلوم (*Acanthophyllum*) تعلق دارد (۱ و ۵). از مجموع ۶۱ گونه گیاهی چوبک در کل دنیا، ۳۳ گونه از آن در ایران رشد می‌کنند و از این تعداد، ۲۳ گونه بومی ایران هستند (۷ و ۱۱). چوبک گیاهی است که به شوری مقاوم بوده و دارای ارزش دارویی و اقتصادی بسیاری می‌باشد (۲۲). ریشه این گیاه دارای طبیعت گرم و خشک است و دارای خواصی از قبیل عطسه آوری و تسکین سکسکه بوده و به عنوان مدر و تسریع قاعدگی هم استفاده می‌شود. در قدیم از ریشه‌های این گیاه برای شست و شو استفاده می‌کردند (۳). از آنجایی که جنس *Acanthophyllum* حاوی ترکیبات ساپونینی است، خواص مربوط به این گروه از ترکیبات طبیعی از جمله امولسیون سازی، تشکیل کف و فعالیت ضد میکروبی را دارا می‌باشد (۱۱). ساپونین‌ها گروهی از محصولات طبیعی و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که از نظر ساختاری از آگلیکون‌های چند حلقه‌ای (استروئیدی C27 یا تری پرپن C30) و یک یا چند زنجیره جانبی قندی تشکیل شده‌اند (۳۰). این متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات دارویی مانند گشاد کردن عروق خونی، کاهش فشار خون، فعالیت ضد ترومبوز، ضد

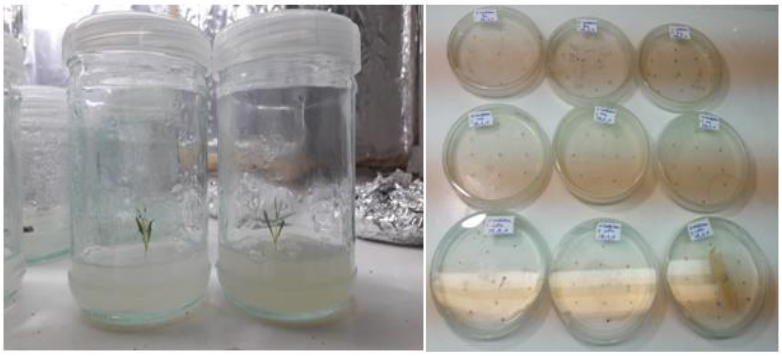
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

التهاب، ضد پیری عروقی، ضد سرطان و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی هستند (۱۷). با توجه به طیف گسترده‌ای از خواص بیولوژیکی و کاربردهای دارویی ساپونین‌ها، تقاضای قابل توجهی برای آنها وجود دارد (۲۱). کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی یا کشت‌های آزمایشگاهی، جایگزین‌های مناسب و مقرون به صرفه‌ای برای روش‌های مرسوم تولید کارخانه‌ای متابولیت‌های ثانویه هستند (۳۱). از طرف دیگر تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و بیوتکنولوژیکی، روش موفقی در تکثیر انبوه گیاهان و حفاظت در شرایط آزمایشگاهی ازگیاهان دارویی کمیاب یا در حال انقراض هستند (۴ و ۶). با این حال همواره طراحی پروتکلی مناسب برای کشت بافت گیاهی موفق یک کار بسیار پیچیده است، چون عوامل زیادی در موفقیت این فرآیند و رسیدن به نتیجه مطلوب اثر گذار هستند (۱۵). عواملی از قبیل ترکیب محیط کشت، منبع ریزنمونه، ژنوتیپ و شرایط محیطی در نتایج آن اثر گذار هستند (۶). به دلیل اهمیت ساپونین‌ها در تولید داروهای گیاهی و استفاده از آنها به عنوان کف کننده طبیعی و از طرف دیگر تولید بیشتر این متابولیت‌ها در شرایط کشت درون شیشه، در تحقیق حاضر سعی بر آن بود که ابتدا محیط کشت مناسب برای جوانه زنی بذر، سپس محیط بهینه برای کالزایی انتخاب شود و بعد در این محیط بهینه سوسپانسیون سلولی گیاه چوبک تهیه شده و بعد از تعیین منحنی رشد آن، میزان ساپونین سوسپانسیون سلولی آن تحت تاثیر تنش شوری ارزیابی شود.

مواد و روشها

تهیه بذر، نحوه استریل کردن و تعیین پارامترهای جوانه‌زنی: بذرهای گیاه چوبک (*Acanthophyllum sordidum*) از منطقه دهبای استان خراسان رضوی جمع آوری و سپس توسط کارشناسان سیستماتیک دانشگاه فردوسی مشهد جنس و گونه آن تایید شدند (این گونه با شماره هرباریومی ۹۰۸۱ در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه گیلان نگه‌داری می‌شود). بمنظور انتخاب محیط کشت مناسب برای جوانه‌زنی بذرها،کالزایی از دو جداکشت برگ و ساقه این گیاه و تعیین منحنی رشد سوسپانسیون سلولی آن، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. ضدعفونی کردن بذرها زیر هود لامینار و در شرایط کاملا استریل انجام شد. برای این کار ابتدا بذرها دو مرتبه (هر بار ۲ دقیقه) با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و بعد از شست و شوی مجدد با آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد ضدعفونی و در نهایت ۳ مربته با آب مقطر استریل شستشو شدند. بمنظور تسریع در جوانه‌زنی آنها، بذرها پس از استریل شدن به مدت یک ساعت در محلول ۰/۵ گرم در لیتر ژیبرلین که از قبل توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل شده بود، قرار گرفتند. سپس بمنظور انتخاب محیط کشت مناسب برای جوانه‌زنی بذر این گیاه، بذرها در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت‌های استریل مختلف شامل MS، WPM و B5 قرار گرفتند. به محیط‌های کشت مذکور به میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار اضافه و pH همه آنها قبل از اتوکلاو کردن در محدوده ۵/۸-۵/۷ تعیین شد. برای هر محیط کشت سه تکرار و در هر تکرار تعداد ۱۰ بذر در هر پتری‌دیش در نظر گرفته شد. سپس بذرها در اتاقک رشد و در شرایط استاندارد جوانه‌زنی (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد) و در تاریکی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). شمارش بذور جوانه‌زده به صورت روزانه و در ساعت معینی از روز انجام شد و معیار جوانه‌زنی بذور، خروج ریشه‌چه به طول ۲ میلی‌متر از بذرها بود. شمارش تا زمانی ادامه یافت که افزایشی در تعداد بذور جوانه‌زده مشاهده نشد. پس از اتمام جوانه‌زنی، صفات جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه با کولیس، وزن تر ریشه‌چه و ساقه‌چه با ترازو (دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) و شاخص بنیه بذر با استفاده از فرمول جدول ۱ اندازه‌گیری شدند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216



شکل ۱- بذرهای قرار داده شده در پتری‌دیش برای جوانه زدن (سمت راست) و انتقال گیاهچه‌های حاصل به شیشه‌های محیط کشت (سمت چپ)

جدول ۱- صفات جوانه‌زنی و نحوه محاسبه و روابط محاسباتی

صفات	محاسبات
درصد جوانه‌زنی	Germination Rate= n/N×100
سرعت جوانه‌زنی	Germination speed= Σ(ni/ti)
شاخص بنیه بذر	SVI= GR ×(Sl+Rl)/100
n: تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در طی دوره	ti: تعداد روزهای پس از شروع جوانه‌زنی
N: تعداد بذرهای کاشته شده	ni: تعداد بذرهای جوانه‌زده در فاصله زمانی مشخص ti
Sl: طول ساقه‌چه	Rl: طول ریشه‌چه
GR: درصد جوانه‌زنی	

انتخاب محیط کشت بهینه برای کالزایی: بمنظور انتخاب محیط کشت مناسب برای کالزایی، از گیاهچه‌های تازه رشد کرده در چرخه نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/روشنایی) و در شرایط درون شیشه، قطعاتی به اندازه ۱/۵ × ۱ سانتی‌متر مربع از دو اندام برگ و ساقه به عنوان جداکشت جدا شد. این قطعات در محیط کشت MS استریل حاوی تنظیم کننده‌های رشد شامل اکسین‌ها (2,4-D و NAA) و سیتوکینین‌ها (KIN و BAP) با غلظت‌های مختلف کشت شدند (جدول ۲).

جدول ۲- غلظت هورمون‌های استفاده شده برای کالزایی (میلی‌گرم در لیتر)

تیمار	2,4-D	NAA	KIN	BAP
اول	۱	۰	۰	۰
دوم	./۵	./۵	./۵	./۵
سوم	./۵	۱	۱	۰
چهارم	۲	۱	۱	۱
پنجم	۰	۱	۰	./۵

در هر تیمار ۴ تکرار و در هر تکرار تعداد ۱۰ قطعه از هر جداکشت قرار گرفت. پس از کشت ریز نمونه‌ها، آنها در اتاقک رشد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت یک ماه، درصد کالزایی نمونه‌های مختلف براساس فرمول زیر محاسبه شد.

DOR: 10.22034/CMR.2024.2216 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲

$$\text{درصد تولید کالوس} = \frac{\text{تعداد قطعات تبدیل شده به کالوس}}{\text{تعداد کل قطعات}} \times 100$$

پس از بررسی محیط کشت‌ها از نظر کیفیت کال‌های ایجاد شده (از نظر رنگ و ترد و شکننده بودن)، محیط کشت دوم (جدول ۲) به عنوان بهترین محیط انتخاب شد و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).

شکل ۲- تصویر کالوس به دست آمده در ابتدای آزمایش (سمت راست) و پس از چندین بار واکشت کردن (سمت چپ)

تعیین منحنی رشد سوسپانسیون سلولی چوبک: بمنظور تولید سوسپانسیون سلولی و انتخاب زمان مناسب برای اعمال الیسیتور، ابتدا توده‌های کال چندین بار در محیط کشت جامد مناسب (محیط کشت دوم جدول شماره ۲) واکشت شدند. سپس آنها به محیط کشت MS مایع دارای غلظت مناسب (با ترکیب ۰/۵، ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بترتیب از هورمون‌های 2,4-D، NAA، KIN و BAP) از تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند. برای این کار ۲ گرم از کالوس به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۲ مایع (بدون آگار) اضافه شد. نمونه‌ها روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. در هر واکشت نمونه‌ها، زیر هود لامینار با استفاده از قیف بوخنر، نایلون مش (با اندازه منافذ ۴۰۰ میکرون) و پمپ خلا به محیط جدید مایع منتقل شدند. پس از چندین واکشت متوالی در محیط مایع، منحنی رشد آنها تعیین شد. برای این کار تعداد ۶۴ ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتری از محیط کشت استریل (محیط کشت ۲ مایع) تهیه شد. سپس در هر یک از این ارلن‌ها مقدار ۲ گرم کالوس ریخته شد. بمنظور جلوگیری از آلوده شدن ارلن‌ها، در تمامی آنها با پنبه و پارافیلم پوشیده شد و سپس داخل شیکر انکوباتور در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس‌ها یک روز بعد از کشت در ساعت معینی از روز انجام شد.

اعمال تنش شوری و سنجش میزان ساپونین: بمنظور افزایش میزان ساپونین تولید شده توسط سلول‌های چوبک در محیط کشت بهینه، از تنش شوری به عنوان الیسیتور غیرزیستی استفاده شد. برای این کار غلظت‌های مختلفی از نمک سدیم کلراید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار) پس از عبور از فیلتر (۰/۴۵ میکرومتر) در شرایط استریل زیر هود لامینار در روز هفتم رشد (مرحله رشد لگاریتمی) به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار، سلول‌ها جمع‌آوری شدند. بمنظور اندازه‌گیری محتوای ساپونین سلول‌ها از روش وانیلین-اسید سولفوریک استفاده شد. ابتدا میزان ۰/۲ گرم از نمونه منجمد با ۳ میلی‌لیتر اتانول ۲۰٪ ساییده شد. سپس نمونه‌ها

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

به مدت ۴ ساعت در حمام آب گرم ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در مرحله بعد در دور ۸۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس هم حجم عصاره دی اتیل اتر اضافه و مجددا سانتریفوژ شد. فاز رویی یعنی دی اتیل اتر حذف شده و هم حجم فاز باقیمانده n–بوتانول اضافه و دوباره سانتریفوژ شد. بعد فاز رویی n–بوتانول جدا شده و هم حجم آن محلول NaCl ۵٪ اضافه شد. محلول در دمای اتاق خشک شد. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر متانول به باقیمانده خشک اضافه شد و بعد میزان ۲۰۰ میکرولیتر از این عصاره جدا شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر وانیلین ۸٪ و ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪ اضافه شد. سپس عصاره تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن روی یخ، جذب آن در طول موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Elisa Reader (Hiperion, Model: MPR4+) خوانده شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ورژن ۲۲) و تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. قبل از انجام آنالیز آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene بررسی شد. تفاوت بین پارامترهای جوانه‌زنی در محیط کشت‌های مختلف و محتوای ساپونین سلول‌های چوبک توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل نرمال نبودن داده‌های مربوط به پارامتر وزن تر ساقه‌چه و همچنین درصد کالزایی از برگ و ساقه حتی پس از استفاده از باکس کاکس، از آزمون U Mann-Whitney استفاده شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار Excel نمودارها و جداول مربوط به هر یک از صفات ترسیم شدند.

نتایج

پارامترهای جوانه‌زنی: نتایج تجزیه واریانس برای برخی از پارامترهای جوانه‌زنی (طول و وزن تر ریشه‌چه) اختلاف معنی‌داری بترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد برای نوع محیط کشت نشان داد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول ریشه‌چه (۴۲/۵۹۲ سانتی‌متر) در محیط کشت MS و بیشترین وزن تر ریشه‌چه (۰/۰۰۸ گرم) در محیط کشت WPM بود (جدول ۴). سایر پارامترها شامل طول ساقه‌چه، وزن تر کل و وزن تر ساقه‌چه در محیط کشت‌های استفاده شده اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۴). همچنین براساس نتایج تحقیق حاضر، درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر در محیط کشت‌های مختلف (MS، WPM و B5) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳). در حالی که بیشترین میزان پارامترهای مذکور (۳۰/۳۰٪درصد جوانه‌زنی، ۰/۳۳سرعت جوانه‌زنی و ۱۹/۶۹شاخص بنیه بذر) در محیط کشت WPM مشاهده شد (جدول۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر پارامترهای جوانه‌زنی

منبع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن تر کل	وزن تر ریشه‌چه	وزن تر ساقه‌چه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر
	درجه آزادی و میانگین مربعات								
محیط کشت	۲	۲۰۵/۶۳۶*	۳۰/۰۵۵ ns	۱/۰۸۵ ns	۱/۲۹۸**	۸/۵۴۸ ns	۱۱۹/۳۷۸ ns	۰/۰۴۸ ns	۱۲۶/۳۴۶ ns
خطای آزمایش	۶	۲۶/۹۷۰	۳۰/۰۷۲	۷/۸۸۶	۸/۹۹۸	۲/۵۹۱	۱۱۹/۳۷۸	۰/۰۱۴	۶۵/۳۲۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۴/۶	۱۶/۴	۱۴/۴	۱۵/۶	۳۲/۶	۴۳/۳	۶۱/۷	۶۱/۵

** و *:به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns عدم اختلاف معنی دار آماری می‌باشد

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲ DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

جدول ۴- اثر محیط کشت بر پارامترهای جوانه‌زنی

محیط کشت	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن تر کل	وزن تر ریشه‌چه	وزن تر ساقه‌چه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بینه بذر
MS	۴۲/۵۹۲^{a}± ۲/۸۲	۳۵/۱۴۲ ^{a}± ۱/۸۲	۰/۰۲۲۱ ^{a} ±۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۴^{b} ± ۰/۰۰۰۶	۰/۰۱۴۹ ^{a} ±۰/۰۰۰۶	۱۸/۱۸ ^{a}±۳/۶۴۲	۰/۱۰ ^{a}±۰/۰۵۰	۷/۲۹ ^{a}±۲/۹۹
WPM	۳۴/۴۷۹^{ab}± ۲/۸۲	۲۹/۶۹۵ ^{a}± ۱/۸۲	۰/۰۲۰۸ ^{a} ±۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۸ ^{a} ±۰/۰۰۰۶	۰/۰۱۲۱ ^{a} ±۰/۰۰۰۶	۳۰/۳۰ ^{a}±۳/۶۴۲	۰/۳۳ ^{a}±۰/۰۵۰	۱۹/۶۹ ^{a}±۲/۹۹
B5	۲۶/۰۳۵ ^{b}± ۲/۸۲	۳۵/۲۱۱ ^{a} ±۱/۸۲	۰/۰۱۸۳ ^{a} ±۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۵ ^{b} ±۰/۰۰۰۶	/۰۱۱۸ ^{a} ±۰/۰۰۰۶	۲۷/۲۷ ^{a}±۳/۶۴۲	۰/۳۰ ^{a}±۰/۰۵۰	۱۶/۸۳ ^{a}±۲/۹۹

داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد بیان شده‌اند. اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

درصد کالزایی: نتایج تجزیه واریانس درصد کالزایی از دو جداکشت برگ و ساقه، اختلاف معنی‌داری را بین محیط کشت‌های مختلف استفاده شده نشان نداد (جدول ۵). براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، بیشترین درصد کالزایی(۱۰۰٪) از جداکشت برگ در محیط کشت ۳ (با ترکیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۱ بترتیب از هورمون‌های 2,4-D، NAA و KIN) و از جداکشت ساقه در محیط کشت ۲ (با ترکیب ۰/۵، ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بترتیب از هورمون‌های 2,4-D، NAA، KIN و BAP) وجود داشت (جدول ۶).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر درصد کالزایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	درجه آزادی و میانگین مربعات	
		درصد کالزایی از برگ	درصد کالزایی از ساقه
محیط کشت	۴	۳۸۷/۵۰۰ ^{ns}	۱۱۴/۳۷۵ ^{ns}
خطای آزمایش	۱۵	۴۰۶/۲۵۰	۱۹۴/۱۶۷
ضریب تغییرات (٪)		۲۳/۳	۱۴/۳

** و *:به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns عدم اختلاف معنی دار می‌باشد

جدول ۶- اثر محیط کشت بر درصد کالزایی

محیط کشت	درصد کالزایی از برگ	درصد کالزایی از ساقه
۱	۷۸/۷۵ ^{a}±۴/۴۷	۸۵ ^{a}±۲/۹۷
۲	۸۷/۵۰ ^{a}±۴/۴۷	۱۰۰ ^{a}±۲/۹۷
۳	۱۰۰ ^{a}±۴/۴۷	۹۳/۷۵ ^{a}±۲/۹۷
۴	۷۵ ^{a}±۴/۴۷	۹۳/۷۵ ^{a}±۲/۹۷
۵	۹۰ ^{a}±۴/۴۷	۹۲/۵۰ ^{a}±۲/۹۷

داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد بیان شده‌اند

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

تعیین منحنی رشد: بمنظور شناسایی شروع و مدت مراحل مختلف رشد، منحنی رشد کالوس‌های به دست آمده از محیط کشت شماره ۲ تعیین شد. براساس تحلیل رگرسیونی متغیر زمان یا روز ۸۷/۴٪ از تغییرات وزن تر را تعیین می‌کند (جدول ۷ و ۸). در بررسی منحنی رشدی چهار مرحله رشد مختلف (تاخیر، نمایی، خطی و کاهش)

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

مشاهده شد. در ابتدا، در فاز تاخیر رشد سلولی با سازگاری سلول‌ها با محیط جدید به کندی پیش رفت، اما با گذشت زمان، رشد نسبتاً سریع پیش رفت و سپس به حالت ثابت رسید. مرحله نمایی، در روز سوم پس از شروع کشت مشاهده شد. پس از این مرحله، یک الگوی رشد خطی آغاز شد و تا روز ۱۰ ادامه داشت. کاهش رشد از روز ۱۲ تا ۱۴ رخ داد (شکل ۱). حداکثر میزان رشد ۸ روز پس از شروع کشت سوسپانسیون به دست آمد.

جدول ۷- آماره‌های تحلیل رگرسیون تک متغیره و خلاصه مدل رگرسیونی برازش شده

Rsquare	۰/۸۸۲	ضریب تعیین
Adjusted R Square	۰/۸۷۴	ضریب تعیین تصحیح شده
Std.Error of the Estimate	۰/۹۰۲	خطای معیار
Durbin watson	۰/۳۸۷	دوربین واتسون

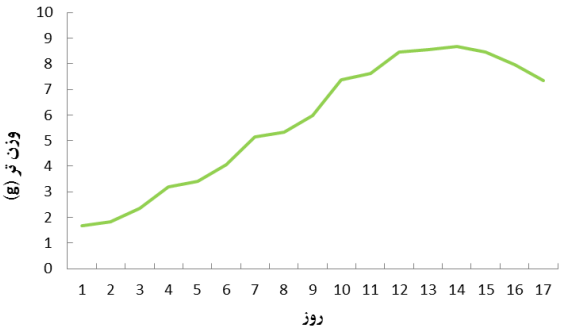
جدول ۸- آماره‌های متغیر وارده در مدل برازش رگرسیونی وزن تر (رشد)

نام متغیر	B	Std.B	Beta	T	Sig
عرض از مبدا	۱/۴۷۹	۰/۴۵۸	-	۳/۳۲۱	۰/۰۰۶
روز	۰/۴۷۲	۰/۰۴۵	۰/۹۳۹	۱۰/۵۷۶	۰/۰۰۰

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از تحلیل رگرسیون تک متغیره، معادله پیش بینی وزن تر در طی روزهای مختلف به صورت زیر است:

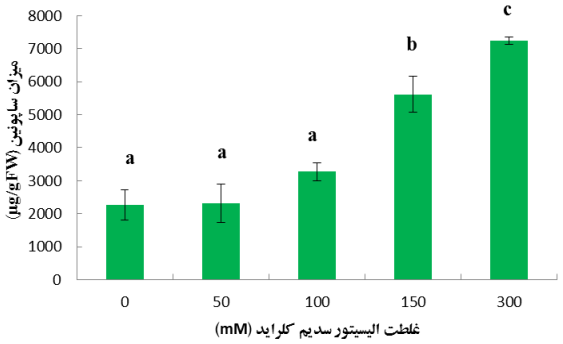
$$y = a + bx$$

وزن تر = ۱/۴۷۹ + ۰/۴۷۲(روز)



شکل ۱- منحنی رشد سوسپانسیون سلولی گیاه چوبک نسبت به زمان (سلول‌های به دست آمده از محیط کشت دوم)

سنجش میزان ساپونین: نتایج به دست آمده نشان داد که در همه غلظت‌های اعمال شده روی سلول‌های جدا کشت چوبک با محرک تنش شوری، افزایش در میزان ساپونین وجود داشت، اما افزایش معنی‌دار تنها در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مول نسبت به سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات محتوای ساپونین در سلولهای جداکشت چوبک تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سدیم کلراید. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P < 0/05$ براساس آزمون دانکن است.

DOR: 10.22034/CMR.2024.2216 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲

بحث

سنجش پارامترهای جوانه‌زنی: طراحی محیط کشت بافت گیاهی به دلیل تأثیر متقابل عوامل مختلف بر آن، کار پیچیده‌ای است. نوع ماده گیاهی، شرایط کشت و مواد موجود در محیط کشت (مواد مغذی غیر آلی و آلی مانند کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاه) از عوامل تعیین کننده و تاثیر گذار می‌باشند (۱۵). معمولا چند نوع محیط کشت برای اکثر کارهای کشت سلول و بافت گیاهی استفاده می‌شود. مهم‌ترین محیط کشت‌های معرفی شده شامل محیط‌های ارائه شده توسط Murashige و Skoog (۱۹۶۲)، Gamborg و همکاران (۱۹۶۸) و Llyod و McCown (۱۹۸۰) هستند. محیط کشت Murashige و Skoog (MS) و محیط کشت Gamborg (B5) مقادیر بیشتری از درشت مغذی‌ها را در مقایسه با محیط کشت McCown (MC) دارند (۲۳).

براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، طول ریشه‌چه به عنوان یکی از پارامترهای جوانه‌زنی در محیط کشت MS به شکل معنی‌داری بالاتر از محیط کشت B5 بود. Qtvos و همکاران (۲۷) بیان داشتند که رشد یعنی تقسیم سلولی و طویل شدن، توسط جریان اکسین بین دو لایه بافت خارجی مجاور ریشه هماهنگ می‌شود. این هماهنگی با دفسفوریلاسیون وابسته به نیترات در ناقل جریان اکسین یعنی PIN2 در محل فسفوریلاسیون به دست آمده و منجر به قرار گرفتن جانبی PIN2 و در نتیجه تنظیم جریان اکسین بین بافت‌های مجاور می‌شود. میزان عنصر نیتروژن (به دو شکل آمونیوم نیترات و پتاسیم نیترات) در محیط کشت MS بیشتر از میزان آن در محیط کشت B5 می‌باشد (۳۲). از این رو احتمالا افزایش معنی‌دار طول ریشه‌چه در محیط کشت MS نسبت به میحط B5 به دلیل غلظت بالاتر نیتروژن و تاثیر آن در دفسفریلاسیون حامل اکسین (PIN2) می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط Ali و همکاران (۸) برای بررسی تأثیر محیط کشت‌های مختلف (WPM و OM) و تنظیم کننده‌های رشد (زئاتین و BAP) بر تکثیر اندام‌های هوایی گیاه زیتون (رقم moraiolo) در شرایط آزمایشگاهی نتایج نشان داد که محیط OM منجر به ریزشاخه زایی بهتر و تغییرات مورفولوژیکی بهتر در مقایسه با محیط WPM شد. زئاتین (۰/۳ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد ریزشاخه در هر ریزنمونه (۰/۸۴)، با ۲/۲۵ سانتی‌متر طول ساقه و ۱/۸۸ تعداد گره در محیط کشت OM در مقایسه با استفاده تکی از این هورمون‌ها را به دنبال داشت. این محققین بیان داشتند که محیط OM دارای سطوح بالاتر نیتروژن، فسفر و گلوتامین در مقایسه با محیط WPM است. نیتروژن ممکن است به عنوان یک مولکول سیگنال رشد گیاه از طریق افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم مسئول جذب و استفاده از نیترات عمل کند.

از طرف دیگر، براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، میزان وزن تر ریشه‌چه در محیط کشت WPM به شکل معنی داری بالاتر از میزان این پارامتر در دو محیط استفاده شده دیگر بود. محلول‌های نمک در محیط‌های کشت نه تنها یک اثر تغذیه‌ای، بلکه یک اثر تنظیم‌کننده اسمزی نیز دارند که بر رشد و مورفوژنز سلولی با پتانسیل فشاری که بر پایداری و انبساط دیواره‌های سلولی حاکم است، تأثیر می‌گذارد. فشار اسمزی بالا جذب آب را از محیط به سلول محدود می‌کند و بنابراین، غلظت نمک کمتر WPM نسبت به محیط MS باعث بهبود در دسترس بودن آب برای سلول می‌شود (۱۰). از آنجایی که مقدار آب در واحد وزن خشک یا تر یکی از راه‌های بیان محتوای آب بافتی می‌باشد (۱۳)، شاید بتوان گفت که وزن تر بالاتر ریشه‌چه در بذرهای رشد کرده در محیط WPM نسبت به دو محیط دیگر به دلیل بالاتر بودن محتوای آب سلول‌های رشد کرده در این محیط باشد. براساس نتایج به دست آمده، پارامترهای طول ساقه‌چه، وزن تر کل و وزن تر ساقه‌چه، درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر در محیط کشت‌های مختلف (MS، WPM و B5) اختلاف معنی‌داری

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲
DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

نداشتند. کمترین میزان درصد جوانه‌زنی در محیط کشت MS وجود داشت. این درصد پایین‌تر را می‌توان به ناخالصی‌های احتمالی موجود در آگار یا حساسیت بذرها به محتوای نمک بالای محیط MS نسبت داد (۱۶ و ۲۹). از آنجایی که موفقیت در جوانه‌زنی بذر عمدتاً به میزان آب در دسترس بستگی دارد (۱۹) و غلظت بالای نمک موجود در محیط کشت محتوای آب در دسترس بذرها را کمتر می‌کند، این مسئله می‌تواند یکی از دلایل پایین بودن سرعت و درصد جوانه زنی در محیط‌های دارای آگار باشد. بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی (۳۰/۳۰٪)، سرعت جوانه‌زنی (۰/۳۳) و شاخص بنیه بذر (۱۹/۶۹) در محیط کشت WPM مشاهده شد.

سنجش کالزایی در محیط کشت‌های مختلف: فراوانی تشکیل کالوس نیز در کشت بافت تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله ترکیب محیط کشت، منبع ریزنمونه، ژنوتیپ و شرایط محیطی است (۶). یکی از مهمترین عوامل موثر بر کالزایی، ترکیب محیط کشت است. مواد مغذی مورد نیاز سلول‌های گیاهی کشت شده بسیار شبیه به نیازهای گیاهان کامل است (۲۳ و ۲۶). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها معمولاً برای القای تشکیل کالوس استفاده می‌شوند، زیرا با تحریک تقسیم و طویل شدن سلول، رشد سلولی را تقویت می‌کنند. بنابراین، بهینه سازی نوع و سطح تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت برای به دست آوردن حداکثر بازده کالوس ضروری است (۱۳). در تحقیق حاضر بین میزان کالزایی از دو جداکشت برگ و ساقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. البته بالاترین درصد کالزایی (۱۰۰٪) از جداکشت ساقه در محیط کشت با ترکیب ۰/۵، ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بترتیب از هورمون‌های 2,4-D، NAA، KIN و BAP و از جداکشت برگ در محیط کشت با ترکیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۱ بترتیب از هورمون‌های 2,4-D، NAA و KIN وجود داشت. اگرچه 2,4-D اکسینی است که در ایجاد کالوس در بسیاری از گونه‌های گیاهی موثر است (۲۶)، اما در تحقیق حاضر کمترین میزان کالزایی از جداکشت ساقه در محیط شماره ۱ (که تنها با هورمون 2,4-D غنی شده است) وجود داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که در مورد جداکشت ساقه گیاه چوبک استفاده از اکسین (2,4-D) به تنهایی برای رسیدن به درصد بالاتر کالزایی مناسب نیست. در سایر محیط کشت‌های بررسی شده به دلیل استفاده از سایر هورمون‌ها همراه 2,4-D درصد بالای ۹۰٪ برای کالزایی از جداکشت ساقه وجود دارد. بررسی درصد کالزایی جداکشت برگ در محیط کشت‌های مختلف نشان می‌دهد که این اندام گیاهی در محیط کشت‌هایی که غلظت اکسین 2,4-D در آن بالاتر هست و یا به صورت تنها استفاده شده، درصد کالزایی کمتری دارد (محیط ۱، ۲ و ۴)، اما در محیط کشت‌هایی که این هورمون وجود ندارد و یا غلظت آن نصف سایر هورمون‌های به کار گرفته شده است (محیط ۳ و ۵)، درصد کالزایی آن بالای ۹۰ درصد می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط برآوردی و همکاران (۲) که ریز نمونه‌های جوانه جانبی و برگ گیاه سرو کوهی برای القای کالوس در محیط کشت‌های MS و WPM با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از KIN با غلظت‌های ۰، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D و غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از KIN با غلظت‌های ۰، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر از NAA قرار گرفتند، بیشترین میانگین درصد کالزایی در محیط WPM حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D در ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از KIN به دست آمد و همچنین درصد کالزایی از جوانه جانبی به طور معنی‌داری بالاتر از جداکشت‌های برگ بود. Nasution و Nasution (۲۵) در بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه بر ایجاد کالوس در گیاه *Garcinia mangostana* L مشاهده کردند که افزودن 2,4-D و آب نارگیل بر روی محیط کشت می‌تواند باعث ایجاد کالوس از ریزنمونه ساقه در این گیاه شود. در تحقیق دیگری، اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D (۱، ۲، ۳،۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) بر کالزایی دانه‌های برنج معطر تایلندی رقم KDML105 کشت شده در محیط MS بررسی و

DOR: 10.22034/CMR.2024.2216 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲

مشخص شد که اضافه کردن ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای القای کالوس مؤثرتر بود، به طوری که کالوس‌های ایجاد شده از نظر بافت بسیار خوب و ماهیت شکننده‌ای داشتند.

تعیین منحنی رشد: از آنجایی که واکشت کردن در پایان مرحله رشد لگاریتمی، بیشترین تولید زیست توده را به دنبال خواهد داشت، تعیین فاصله زمانی مورد نیاز برای واکشت کردن بسیار مهم می‌باشد. این فاصله زمانی به تعیین چرخه و منحنی رشد در محیط کشت بستگی دارد (۲۴). روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری رشد سلولی و منحنی مربوطه در شرایط آزمایشگاهی، از جمله شمارش سلول یا کلنی، وزن خشک و وزن تر و حجم سلولی بسته‌بندی شده استفاده می‌شوند (۹). در تحقیق حاضر منحنی رشد دارای مراحل مختلف تأخیر، نمایی، خطی، کاهشی و ثابت بود. در دوره تاخیر (Lag phase) رشد سلولی به دلیل سازگاری سلول‌ها با محیط جدید به کندی پیش رفت. در این مرحله، سلول‌های جداکشت برای تقسیم سلولی آماده شده و زیست توده را انباشته می‌کنند (۱۲). در تحقیق حاضر این دوره از روز اول واکشت تا روز سوم به طول کشید. مرحله بعدی رشد دوره نمایی (Exponential or log phase) بود که از روز سوم واکشت تا روز هشتم طول کشید. در این مرحله حداکثر رشد سلولی اتفاق می‌افتد (۱۲). در دوره خطی رشد (Linear phase) کاهش سرعت تقسیم سلولی در داخل و در نتیجه تثبیت تراکم سلولی و حجم کالوس مشاهده می‌شود (۱۲). در تحقیق حاضر این دوره از روز هشتم تا روز دهم دوره رشدی بود. روز دهم تا دوازدهم دوره رشدی، دوره رشد کاهشی (Deceleration) بود. در این مرحله با تثبیت قطر و تراکم سلول و کاهش قطر کالوس احتمالاً به دلیل مرگ سلولی ناشی از کمبود مواد مغذی رخ می‌دهد. کاهش مواد مغذی، خشک شدن آگار یا حتی تجمع مواد سمی در محیط کشت در نتیجه کاهش اکسیژن در داخل سلول‌ها از دلایل کاهش رشد در این مرحله می‌باشد (۱۲ و ۱۷). از روز دوازدهم تا پانزدهم دوره رشدی نیز دوره یا فاز ثابت (Stationary) طول کشید. این مرحله در کشت سلولی مرحله‌ای است که رشد زیست توده متوقف می‌شود، اما سلول‌ها از نظر متابولیکی فعال باقی می‌مانند (۱۶).

سنجش میزان ساپونین: تولید متابولیت ثانویه با استفاده از کشت بافت می‌تواند بر بسیاری از مشکلات گیاهان کاشته شده در شرایط مزرعه غلبه کند (۲۰). در مطالعات کشت بافت بمنظور افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه، از الیسیتورها، پیش‌سازها، استرس‌های محیطی و یا تغییر در اجزای محیط کشت استفاده می‌شود (۲۸). در تحقیق حاضر نیز سلول‌های چوبک تحت تیمار تنش شوری با غلظت‌های مختلف سدیم کلراید برای افزایش میزان تولید ساپونین قرار گرفتند. طبق نتایج به دست آمده با افزایش غلظت تیمار سدیم کلراید، محتوای ساپونین نیز افزایش داشت. از بین غلظت‌های استفاده شده، غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار از NaCl باعث افزایش معنی‌داری در میزان ساپونین سلول‌ها نسبت به شاهد شده است. السیتورها معمولا به گیرنده‌های خاص خودشان در غشای پلاسمایی یا غشای درونی متصل می‌شوند و پس از این، یک سیگنال شناسایی و یک پاسخ تولید می‌شود. مولکول السیتور به عنوان یک پاتوژن شناسایی می‌شود و در نتیجه ژن‌های مقاومت گیاه و عامل بیماری‌زا را فعال می‌کند (۱۸). قدرت احیای قوی متناظر (مقادیر انبوه NADPH و H^+) باعث افزایش سنتز ترکیباتی مانند ایزوپرنوئیدها، فنل‌ها یا آلکالوئیدها می‌شود. تجمع اسمولیت‌ها (پرولین) و متابولیت‌های ثانویه (فلاونوئیدها و ساپونین‌ها) ممکن است نقش مهمی در تنظیم اسمزی داشته باشد، از تولید رادیکال‌های اکسیژن جلوگیری کرده و سلول‌ها را از اثرات مخرب محافظت کند و منجر به مقاومت آن‌ها در برابر شوری شود (۱۴). بنابراین افزایش میزان ساپونین مشاهده شده در تیمار شوری اعمال شده، از جمله راهکارهای سلولها برای مقابله با شرایط ایجاد شده می‌باشد.

DOR: 10.22034/CMR.2024.2216 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که بین محیط کشت‌های مختلف استفاده شده برای بیشتر پارامترهای جوانه‌زنی و همچنین کالزایی از دو جداکشت برگ و ساقه اختلافی وجود نداشت، می‌توان بیان کرد که هر دو جداکشت برگ و ساقه گیاه چوبک در محیط‌های مختلف، قابلیت جوانه‌زنی و کالزایی را دارد. همچنین استفاده از الیسیتور غیرزیستی مانند تنش شوری می‌تواند در افزایش میزان متابولیت ارزشمند ساپونین موثر باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه ارومیه به جهت تامین مالی این پروژه و دانشگاه گیلان به خاطر تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی و خانم دکتر فاطمه جمال امیدی و خانم دکتر مهوش هادوی و دیگر عزیزانی که در اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- شرفی یورقانلو ر، همتی ه، فعال همدانی ن. ۱۳۹۹. بررسی خصوصیات ساختاری وآنتی اکسیدانی فیلم زیست تخریب پذیر هیدروکسی پروپیل متیل سلولز حاوی صمغ آلژینات و اسانس چوبک و تأثیرآن برمقاومت اکسیداتیو روغن کره محلی. نشریه ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی. سال دوازدهم. شماره چهارم. ص: ۱۱۱-۱۲۶.

۲- برآوردی ح، رنجبر غ و کمالی فرح آبادی س. ۱۳۹۴. مقایسه میزان کالزایی گیاه سرو کوهی در محیط کشت‌های MS و WPMبا غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D، NAA و Kin. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. سال هفتم. شماره ۱۶. ۱۴۹-۱۵۷.

۳- سجادی الف، حسین‌زاده ح و مهاجری الف. ۱۳۸۱. اثر جذب افزایی ساپونین تام چوبک بر جذب انسولین از راه بینی و تاثیر آن بر قند خون در رت. مجله دیابت و لیپید ایران. دوره ۲شماره ۱. ص: ۱۷-۲۴.

۴- شعفی ب، موسوی س، قمبرعلی باغنی س، عبداللهی م و ساریخانی ح. ۱۳۹۹. ریز ازدیادی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Berton) از طریق کشت دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره بهمراه غلظت‌های مختلف زغال فعال و هورمون‌هایBAP و Kn.. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد۳۳. شماره ۱۳.

۵- کیهانی و، مرتضوی ع، کریمی م، کاراژیان ح و شیخ‌الاسلامی ز. ۱۳۹۴. کاربرد امواج فراصوت در استخراج ترکیبات ساپونینی ریشه گیاه چوبک (*Acanthophyllum glandulosum*) پایه ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی و کف‌زایی آنها. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی.جلد ۴. شماره ۴. ص: ۳۲۵-۳۴۲.

6- Abbas, MS. El-Shabrawi, HM. Soliman, ASh. Mai Selim, A. 2018. Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. J. Gen. Eng. Biotechnol. 16: 191–201.

7- Aghel, N. Moghimipour E. and Raies Dana, A. 2007. Formulation of a herbal shampoo using total saponins of *Acanthophyllum squarrosum.* Iran. J. Pharma. Res. 6 (3): 167-172.

8- Ali, A. Ahmad, T. Akhtar Abbasi N. and Ahmed Hafiz, I. 2009. Effect of different media and growth regulators on in vitro shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'. Pak. J. Bot. 41(2): 783-795.

9- Al-Khayri, JM. 2012. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. Emir. J. Food Agric. 24 (5): 444-455.

10- Araruna, E. Ribeiro-Oliveira, J. José Pereira, V. Abreu Asmar, S. and de Melo, B. 2017. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata* in vitro. Pesq. Agropec. Bras., Brasília. 52 (12): 1295-1300.

11- Aryan, S. Mortazavian, AM. Mohammadi, F. Mahdavi, V. Moazami, N. and Jazaeri, S. 2021. Physicochemical properties of saponin containing *Acanthophyllum laxiusculum* extract: example application in foam stability and qualitative parameters for malt beverage industry. J. Food Sci. Technol. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05169-3.

12- Galvão Mendonça, E. Vilela Paiva, L. Cristina Stein, V. Ferreira Pires, M. Régis Santos, B. and

José Pereira, F. 2012. Growth curve and development of the internal calli structure of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Bra. Arch. Biol. Technol. 55 (6): 887-896.

13- Grunennvaldt, RL. Degenhardt-Goldbach, J. Brooks, P. de cássia Tomasi, J. Augusto Hansel, F. Tran, T. Gomes EN. and Deschamps, C. 2020. Callus culture as a new approach for the production of high added value compounds in Ilex paraguariensis: genotype infl uence, medium optimization and compounds identification. Ann. Acad. Bras. Cienc. 92(3): e20181251 DOI 10.1590/0001-3765202020181251.

14- Hameg, R. Arteta, TA. Landin, M. Gallego, PP. and Barreal, ME. 2020. Modeling and optimizing culture medium mineral composition for in vitro propagation of *Actinidia arguta*. Fron. Plant Sci. 11. doi: 10.3389/fpls.2020.554905.

15- Hesami, M. Daneshvar, M.and Najafabadi, M. 2018. Establishment of a protocol for in vitro seed germination and callus formation of *Ficus religiosa* L., an important medicinal plant. Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod. 13(4): e62682. doi: 10.5812/jjnpp.62682.

16- Heydari, H. Chamani, E. Esmaeilpour, B. 2020. Effect of total nitrogen content and NH_4^+/NO_3^- ratio on biomass accumulation and secondary metabolite production in cell suspension culture of *Salvia nemorosa*. Iran. J. Gen. Plant Breed. 9 (1).

17- Hu, Y. Cui, X. Zhang, Z. Chen, L. Zhang, Y. Wang, C. Yang, X. Qu, ID Y. and Xiong, Y. 2018. Optimisation of ethanol-reflux extraction of saponins from steamed *Panax notoginseng* by response surface methodology and evaluation of hematopoiesis effect. Molecules. 23. 1206. doi:10.3390/molecules23051206.

18- Kochan, E. Szymczyk, P. Kuźma, Ł. Szymańska, G. Wajs-Bonikowska, A. Bonikowski, R. Sienkiewicz, M. 2018. The increase of triterpene saponin production induced by trans-anethole in hairy root cultures of *Panax quinquefolium*. Molecules. 23: 2674; doi: 10.3390/molecules23102674.

19- Koné, M. Koné, T. Silué, N. Soumahoro, A. and Hilaire Kouakou, T. 2015. In vitro seeds germination and seedling growth of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)). Sci. World J. http://dx.doi.org/10.1155/2015/595073.

20- Lambert, E. Faizal, A. & Geelen, D. 2011. Modulation of triterpene saponin production: In vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. Appl. Biochem. Biotechnol. 164: 220–237.

21- Mahmood Alsoufi, AS. Paczkowski, C. Długosz, M. and Szakiel, A. 2019. Influence of selected abiotic factors on triterpenoid biosynthesis and saponin secretion in marigold (*Calendula officinalis* L.) in vitro hairy root cultures. Molecules. 24. doi: 10.3390/molecules24162907.

22- Meratan, AA. Ghaffari, SM. Niknam, V. 2008. Effects of salinity on growth, proteins and antioxidant enzymes in three *Acanthophyllum* species of different ploidy levels. J. Sci. (Univ. Tehran) (JSUT). 33(4): 1-8.

23- Michel, Z. Tanoh Hilaire, K. Mongomaké, K. Nguessan Georges, A. and Yatty Justin, K. 2008. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Austral. J. Crop Sci. 2(1): 1-9.

24- Mustafa, NR. de Winter, W. Iren, FV. and Verpoorte, R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature Protocols. 6 (6): 715-742.

25- Nasution, NH. and Nasution, IW. 2019. The Effect of plant growth regulators on callus induction of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). The 4th Intl. Conf. Biol. Sci. and Biotechnol. Earth Environ. Sci. 30. doi:10.1088/1755-1315/305/1/012049.

26- Osman, N. Sidik, N.and Awal, A. 2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. Asian. Pac. J. Trop. Biomed. 6(2): 143–147.

27- Ötvös, K. Marconi, M. Vega, A. O'Brien, J. Johnson, A. Abualia, R. and Benková, E. 2021. Modulation of plant root growth by nitrogen source-defined regulation of polar auxin transport. EMBO J. 40(3): e106862.

28- Patel, H. and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in plant tissue culture. J. Pharmacognosy Phytochem. 2 (2): 60-65.

29- Plessis, H. Nikolova, R. Kleynhans, R. Egan, B. 2020. In vitro seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. Barnardii. Ornam. Hort. 26 (4): 598-606.

30- Singh, R. Sharma, R. Soren, P. Mal, G. and Singh, B. 2019. Extraction and detection of saponin-enriched fractions from different plants of north-western Himalayas, India. J. Pharmacognosy Phytochem. 8(3): 3817-3820.

31- Vijendraa, PD. Jayannaa, SG. Kumarb, V. Sannabommajib, T. Rajashekar J, Gajula, H. 2020. Product enhancement of triterpenoid saponins in cell suspension cultures of *Leucas aspera* Spreng. Ind. Crops Prod. 156. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112857

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۸۸-۲۷۲ DOR: 10.22034/CMR.2024.2216

Choosing the optimal culture medium for seed germination and callus formation and determining the saponin content of the cell suspension of *Acanthophyllum sordidum* under salt stress

Almasi Z.[1], Khara J.[1] and AfsharMohammadian M.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Urmia, Urmia, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Acanthophyllum sordidum is a medicinal plant from Caryophllaceae family. This medicinal plant is one of the valuable sources of saponin. There are several methods to increase the production of plant secondary metabolites, among which tissue culture is used as an efficient technique. For this purpose, in the present research, to select the suitable culture medium for germination and calligenesis, to determine *A. sordidum* (Chubek) cell suspension growth curve, and also to determine the amount of saponin under salt stress *in vitro*, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized designThe results showed that root length and root fresh weight were significantly increased in MS and WPM cultures, respectively. Other parameters including shoot length, total fresh weight and shoot fresh weight in the three culture medium used were not significantly different. Also, the results of analysis of variance of callus percentage from two leaf and stem organs did not show a significant difference among different culture media which have been used in this study (Ma, WPM and B5). Based on the current results obtained from the growth curve, the maximum growth rate was obtained 8 days after the start of suspension culture. Also, the results showed that salt stress caused a significant increase in saponin content of Chubek cell suspension.

Key words: *Acanthophyllum sordidum*, tissue culture, Saponin, culture medium, callus