تأثیر ترکیبات محیط‌کشت بر رشد و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی چریش (*Azadirachta indica*)

رضا فرجامی‌نژاد و قاسمعلی گروسی*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۶/۲۷)

چکیده

آزادیراختین یکی از مهم‌ترین متابولیت ثانویه چریش است که به‌عنوان آفت‌کش طبیعی استفاده می‌شود. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز (۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ درصد)، کلسیم کلرید، مونوپتاسیم فسفات، پتاسیم نیترات، منیزیم سولفات ونیترات آمونیوم (غلظت‌های ۰/۵x، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x محیط‌کشت MS پایه) روی رشد سوسپانسیون سلولی چریش و تولید آزادیراختین مورد بررسی قرار گرفت. اگر چه بین تعدادی از غلظت‌های تیمارهای اعمال‌شده اختلاف آماری معنی‌داری از نظر شاخص‌های مورد مطالعه وجود نداشت اما بیشترین مقدار وزن تر و خشک با کاربرد ۳ درصد ساکارز، ۱x کلسیم کلرید، ۱x منیزیم سولفات و ۱xنیترات آمونیوم (٤۹۳/۰۲ و ۷۷/۲۷ گرم در لیتر)، ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات (۵۰۰/۹۷ و ۸۰/۷۷ گرم در لیتر) و ۰/۵x پتاسیم نیترات (٤۹۵/۰۱ و ۷۸/٤۱ گرم در لیتر) حاصل شد. بالاترین حجم سلول‌های ساکن با کاربرد ٤ درصد ساکارز (۹۵/٦۹ درصد)، ۱x کلسیم کلرید و ۱xنیترات آمونیوم (۹٤/۹۳ درصد)، ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات (۹۷/۲۲ درصد)، ۰/۵x پتاسیم نیترات (۹٤/۹٦ درصد) و ۲x منیزیم سولفات (۹٤/۹٦ درصد) به‌دست آمد. حداکثر مقدار تجمع آزادیراختین با کاربرد ٤ درصد ساکارز (۳/۷۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، ۰/۵x کلسیم کلرید (۳/۸۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، ۰/۵x مونوپتاسیم فسفات (۳/۷۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات (۳/٦۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، ۱x منیزیم سولفات (۳/٦۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) و ۱/۵xنیترات آمونیوم (۳/۷۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مشاهده گردید. بیشترین مقدار تولید آزادیراختین نیز با مقدار ۲۸٦/٦۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت MS پایه حاوی ۳ درصد ساکارز حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: آزادیراختین، چریش، ساکارز، سوسپانسیون سلولی، عناصر درشت مغذی

مقدمه

گیاه چریش (*Azadirachta indica*) یکی از اعضای تیره ملیاسه است که در طب سنتی استفاده شده و دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی مختلف نظیر فعالیت ضدسرطان، ضدباکتری، ضدقارچ، ضددرد، ضدانعقاد و ضدآفت است (Deng *et al.*, 2013). این فعالیت‌ها عمدتاً ناشی از وجود لیمونوئیدها در این گیاه است. لیمونوئیدها که به‌عنوان تترانورتری پرنوئیدها نیز شناخته می‌شوند از مهم‌ترین ترکیبات موجود در چریش هستند. آزادیراختین یکی از مهم‌ترین ترکیبات لیمونوئیدی این گیاه بوده و عمداً در هسته دانه قرار دارد و مهم‌ترین ترکیب ضدتغذیه‌ای محسوب می‌شود و در برابر حداقل ۵۵۰ گونه گیاهی دارای فعالیت است (Passos *et*

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: agaroosi90@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

al., 2019; Rafiq and Dahot, 2010). این دانه‌ها یکبار در سال تولید شده و از نظر فرآوری و ذخیره‌سازی دارای مشکلات فراوانی هستند و تنها مقدار اندکی از آنها برای استخراج آزادیراختین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gallego *et al.*, 2015). در مطالعات مختلفی از اسانس این گیاه برای مبارزه با آفات و بیماری‌ها استفاده شده است. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس چریش روی *Spodoptera frugiperda* نشان داد که استفاده از آن باعث کاهش و مدت زنده‌مانی لارو می‌شود (Duarte *et al.*, 2019). در مطالعه دیگر با بررسی تأثیر آزادیراختین حاصل از چریش روی *Helicoverpa armigera* مشخص شد که تغذیه لاروها از آن منجر به ایجاد فنوتیپ‌های مختلف نظیر ترکیدگی، سیاه‌شدگی و پوست‌اندازی ناقص می‌شود (Dawkar *et al.*, 2019).

متابولیت‌های ثانویه گروه متنوعی از ترکیبات آلی هستند که توسط گیاهان تولید شده و تداخل با محیط ایجاد مکانیسم دفاعی را تسهیل می‌کنند (Verpoorte *et al.*, 2002). اکثر متابولیت‌های ثانویه مانند ترپن‌ها، فنول‌ها و آلکالوئیدها بر اساس منشاء بیوسنتز آنها طبقه‌بندی شده و فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی را دارند و به‌عنوان دارو، مواد شیمیایی گیاهی، طعم‌دهنده، عطر، رنگ، آفت‌کش زیستی و مواد افزودنی غذایی استفاده می‌شوند (Farjaminezhad *et al.*, 2013; Verpoorte *et al.*, 2002). مطالعات نشان می‌دهد که تغییرات در ترکیبات شیمیایی گیاهان می‌تواند به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ، وضعیت مواد مغذی، مرحله رشد، شدت نور، غلظت دی‌اکسید کربن اتمسفر، دما و رطوبت قرار گیرد (Padalia *et al.*, 2013). متابولیت‌های ثانویه تولیدشده از طریق کشت مزرعه‌ای دارای معایب مختلفی هستند که از آن جمله می‌توان به عملکرد پایین و تأثیر تغییرات جغرافیایی، فصلی و محیط بر آن اشاره کرد (Monfort *et al.*, 2018). بنابراین، تکنیک‌های بیوتکنولوژی به‌عنوان یک منبع جایگزین برای تولید متابولیت‌های ثانویه هستند (Murthy *et al.*, 2014; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). کشت‌بافت تکنیکی است که به بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه کمک کرده و تحت تأثیر شرایط محیطی و تغییرات اقلیمی قرار نمی‌گیرد (Arikat *et al.*, 2004; Murthy *et al.*, 2014). کشت سلول و اندام به‌عنوان کارخانه‌های شیمیایی تولید متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شود (Murthy *et al.*, 2014; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). چندین عامل شیمیایی و فیزیکی شناسایی شده که می‌توانند تجمع بیوماس و سنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلول و اندام را تحت تأثیر قرار دهد. برخی از این عوامل عبارتند از نوع محیط‌کشت، مقدار نمک مناسب محیط‌کشت، نوع و سطوح کربوهیدرات، سطوح نیترات، سطوح فسفات و سطوح تنظیم‌کننده رشد (Nitzsche *et al.*, 2004; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). فرمولاسیون‌های محیط‌کشت گامبورگ (B5)، لینسمیر و اسکوک (LS)، موراشیگ و اسکوک (MS) و اسچنک و هیلدبرند (SH) به‌طور گسترده برای استقرار کشت سلول و اندام مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین، انتخاب محیط‌کشت مناسب برای استقرار کشت سلول و اندام ضروری است. علاوه بر این، غلظت مناسب نمک‌ها نیز در رشد سلول‌ها و اندام‌ها اهمیت فراوانی دارند. برای مثال در کشت ریشه‌های نابجای جینسنگ حداکثر بیوماس در محیط‌کشت MS ۳/٤ به‌دست آمده بود (Sivakumar *et al.*, 2005). کشت‌های سلول‌های گیاهی معمولاً با استفاده از یک قند ساده یا ترکیبی از قندهای ساده مانند گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز رشد می‌کنند. در محیط‌کشت قند به‌عنوان منبع انرژی و تأمین‌کننده مواد مغذی معدنی عمل می‌کند. در کشت سوسپانسیون سلولی گیمنما (*Gymnema sylvestre*) با استفاده از چندین قند مشخص شد که ساکارز منبع ایده‌آلی برای کربوهیدرات بوده و در تجمع بیوماس و تولید ژیمنمیک اسید استفاده می‌شود (Nagella *et al.*, 2011). در مورد کشت گیاه چریش نیز مطالعاتی صورت گرفته است. برای مثال مشخص شده که استفاده از نسبت ٤:۱نیترات آمونیوم موجب افزایش ۱/۵ برابر تولید آزادیراختین خارج سلولی (۵/۵۹ میلی‌گرم در لیتر) می‌شود (Sujanya *et al.*, 2008). در مطالعه دیگر گزارش

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

شد که در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱ میلی‌گرم درلیتر BA، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزشده و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز کالوس‌های جنین‌زا از ریزنمونه‌های کوتیلدن و هیپوکوتیل گیاه چریش حاصل می‌شوند (Su *et al.*, 1997). در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر درشت مغذی محیط‌کشت MS روی رشد و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی چریش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برگ‌های درخت چریش از شهر بندرعباس (27°11′41.1″N + 56°20′14.0″E) در استان هرمزگان جمع‌آوری شده و به‌مدت ۳ ساعت در آب جاری شسته شدند. سپس برگ‌ها با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ٤٥ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه بار با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند. برگ‌های ضدعفونی شده به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

القاء کالوس‌زایی: برگ‌های ضدعفونی شده با اندازه ۱ سانتی‌متر مکعب برش داده شده و روی محیط‌کشت MS پایه (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد به‌مدت سه هفته در تاریکی نگهداری شدند.

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی: کالوس‌های نرم و شکننده با وزن ۱۸۰–۱۷۵ میلی‌گرم به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS مایع حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین منتقل شدند. کشت‌های مایع روی شیکر با دور ۱۱۰rpm و دمای ۲ ± ۲۵ در تاریکی نگهداری شده و هر ۱۲ روز یکبار واکشت شدند.

تیمار کشت سوسپانسیون سلولی با غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر درشت مغذی: کشت‌های سوسپانسیون سلولی استقراریافته با تراکم اولیه $۲/٦ \times ۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز (۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ درصد (w/v)) کلسیم ($CaCl_2$)، مونوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، پتاسیم نیترات (KNO_3)، منیزیم سولفات ($MgSO_4$) ونیترات آمونیوم (NH_4NO_3) (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ برابر مقدار موجود در محیط‌کشت MS) منتقل شدند. پس از توقف رشد مقدار رشد سلول‌ها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رشد در کشت سوسپانسیون سلولی، وزن تر و خشک سلول‌ها: وزن تر و خشک سلول‌ها با روش گزارش‌شده در مطالعات قبلی اندازه‌گیری شد (Godoy-Hernandez and Vazquez-Flota, 2006). برای تعیین وزن تر سلول‌ها توده سلولی با کاغذ واتمن شماره یک و با استفاده از قیف بوخنر تحت شرایط خلاء جدا شده و بلافاصله وزن گردید. وزن خشک سلول‌ها نیز از طریق خشک‌کردن سلول‌های جمع‌آوری شده در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت به‌دست آمد.

حجم سلول‌های ساکن (SCV): مقدار حجم سلول‌های ساکن با استفاده از روش Godoy-Hernandez و Vazquez-Flota (۲۰۰٦) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، کشت سوسپانسیون سلولی به فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و پس از ته‌نشین‌شدن سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه درصد حجم سلول‌های ساکن از طریق تقسیم حجم سلول‌های ته‌نشین‌شده بر حجم کل کشت سوسپانسیون به‌دست آمد.

استخراج آزادیراختین و آنالیز با HPLC: آزادیراختین درون سلولی با روش مطالعات قبلی با اندکی تغییرات استخراج شد (Rafiq and Dahot, 2010). برای این منظور، ۱ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به ۱۰۰ میلی‌گرم سلول خشک و پودرشده اضافه و به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق در حمام اولتراسوند قرار گرفتند (Elmasonic E30H, Germany). سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی جمع‌آوری شد. این فرآیند دو بار انجام گرفت. دی‌کلرومتان در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بن‌ماری تبخیر شده و نمونه‌ها خشک شدند. نمونه‌های خشک در ۱/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل شده و در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد نگهداری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

شدند. مقدار آزادیراختین نمونه‌ها با سیستم Knauer HPLC (UV detector, Germany) برآورد گردید. فاز ثابت ستون Tosoh C-18 (TSKgel-ODS C-18, 5µm, 4.6 × 250 mm, Japan) بود. فاز متحرک ۱۰ درصد استونیتریل و ۹۰ درصد آب بود. سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر در دقیقه بود. مقدار جذب آزادیراختین در طول‌موج ۲۱٤ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آن براساس منحنی استاندارد تهیه شده به‌دست آمد. با توجه به اینکه تولید آزادیراختین کل به تولید بیوماس (وزن خشک سلول‌ها) و تجمع آزادیراختین بستگی دارد، تولید آزادیراختین با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد (Srivastava and Srivastava, 2012):

تولید آزادیراختین (میلی‌گرم در لیتر) = بیوماس (گرم وزن خشک در لیتر) × تجمع آزادیراختین (میلی‌گرم در گرم وزن خشک).

آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS 24.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین به روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel تهیه گردید.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز: شکل ۱ تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر رشد سلول و تولید آزادیراختین توسط سلول‌های چریش را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز تأثیر معنی‌داری ($P<0.01$) روی وزن تر سلول‌ها، وزن خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن، تجمع آزادیراختین و تولید آزادیراختین دارد (جدول ۱). غلظت‌های مختلف ساکارز تأثیر متفاوتی بر حجم سلول‌های ساکن، وزن تر و خشک سلول‌ها و تجمع و تولید آزادیراختین داشتند. افزودن ۳ درصد ساکارز به محیط‌کشت MS باعث بهبود رشد سلول‌ها و افزایش وزن تر سلول‌ها از ۲٥٤/٤۳ گرم در لیتر به ٤۹۳/۰۲ گرم در لیتر شده بود. با افزایش مقدار ساکارز از ۱ درصد به ۳ درصد وزن تر سلول‌ها افزایش یافته بود. استفاده از ۳ درصد ساکارز در محیط‌کشت MS باعث افزایش ۹۳/۷۷ و ٤۰/۷۰ درصدی وزن تر سلول نسبت به غلظت‌های ۱ و ۲ درصد شده بود (شکل a ۱). کاربرد سه درصد ساکارز باعث به حداکثررسیدن وزن خشک سلول‌ها (۷۷/۲۷ گرم در لیتر) گردید. استفاده از این غلظت از ساکارز باعث افزایش ۸۷٤/۳٦، ۱٥۱، ۷۰/۹٦ و ۷۲/۲٤ درصدی وزن خشک نسبت به غلظت‌های ۱، ۲، ٤ و ٥ درصد شده بود (شکل b ۱). در محیط‌های کشت MS حاوی ۳، ٤ و ٥ درصد ساکارز بالاترین مقادیر حجم سلول‌های ساکن (به‌ترتیب ۹٤/۹۳، ۹٥/٦۹ و ۹۳/٦۷ درصد) مشاهده گردید. کاربرد غلظت‌های ۳، ٤ و ٥ درصد ساکارز باعث افزایش قابل توجه حجم سلول‌های ساکن نسبت به کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ درصد ساکارز شده بود (شکل c ۱). از نظر مقدار تجمع آزادیراختین اگر چه استفاده از ۲، ۳ و ٤ درصد ساکارز تفاوت آماری معنی‌داری با هم نداشتند (به‌ترتیب ۳/۱، ۳/٦۳ و ۳/۷۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) اما نسبت به کاربرد ۱ و ٥ درصد ساکارز افزایش را نشان دادند (شکل d ۱). حداکثر مقدار تولید آزادیراختین (۲۸٥/٦٥ میلی‌گرم در لیتر) با کاربرد ۳ درصد ساکارز به‌دست آمد. با کاربرد ۳ درصد ساکارز مقدار تولید آزادیراختین نسبت به تیمارهای ۱، ۲، ٤ و ٥ درصد ساکارز به‌ترتیب ۱۷/٦۸، ۲/۹۱، ۱/٦۹ و ۳/۷۸ برابر افزایش یافته بود (شکل e ۱). در مطالعات مختلف از منابع کربوهیدرات مختلف برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. در این مطالعه بیشترین مقدار تولید بیوماس با کاربرد ۳ درصد ساکارز و بیشترین مقدار سنتز آزادیراختین با کاربرد ٤ درصد ساکارز حاصل گردید. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ساکارز به‌عنوان مولکول پیام‌رسانی بوده و رشد، نمو و متابولیسم را در کشت سلول تحت تأثیر قرار می‌دهد (Praveen and Murthy, 2012). با مطالعه تأثیر سطوح مختلف ساکارز (۸-۱ درصد) روی کشت‌سلول گیمنما (*Gymnema sylvestre*) مشخص شد که ۳ درصد ساکارز مقدار مناسب برای تولید بیوماس بوده و بیشترین مقدار ژیمنمیک اسید (۱۰/۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ٤ درصد ساکارز حاصل می‌شود

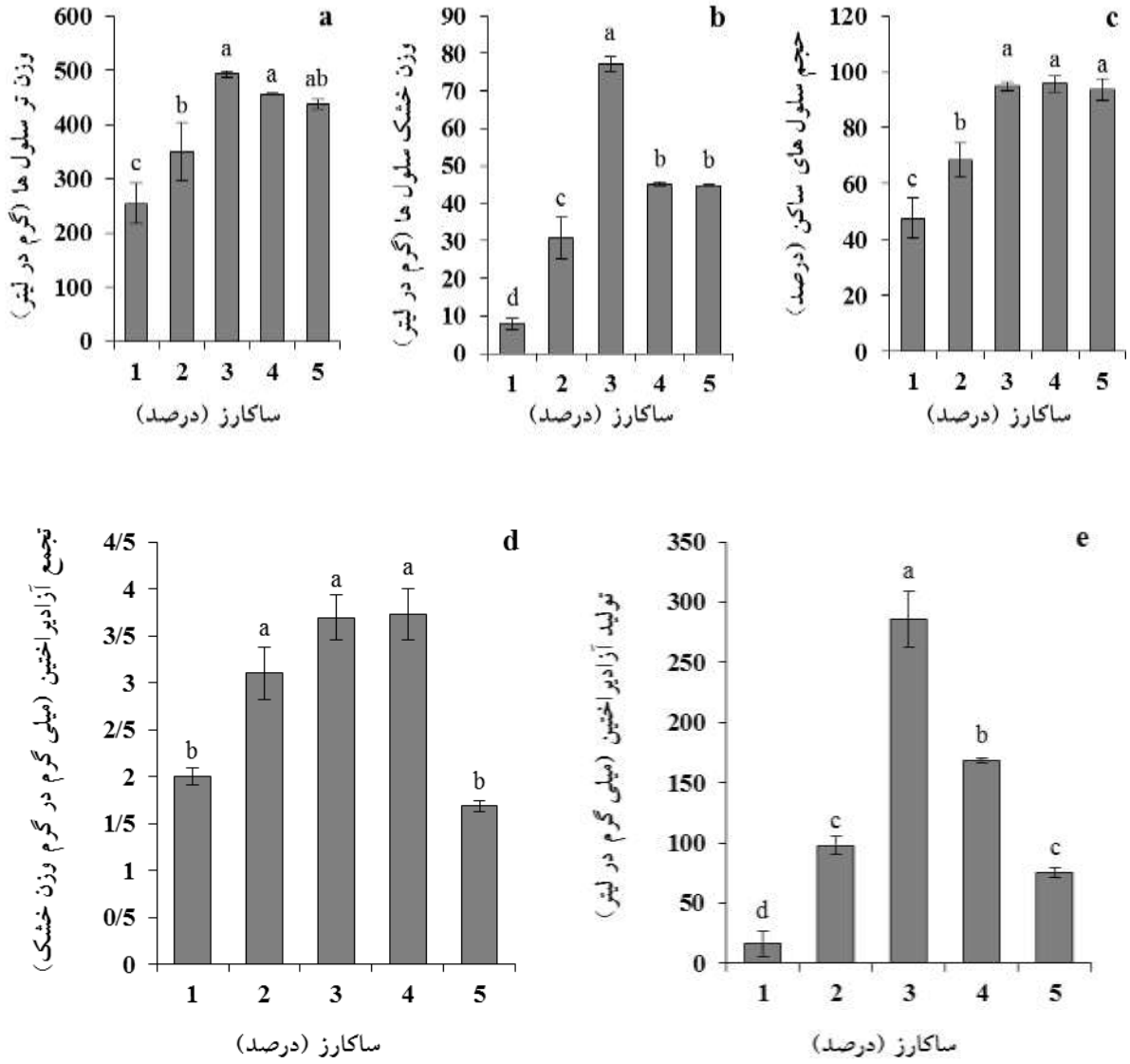
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
غلظت ساکارز	٤	۲۷٦۲٦/٥۸ **	۱۹۰۹/۱۸ **	۱۳۷۱/۸٤ **	۲/۷۰٦ **	۳۱۹۸۹/۳۰ **
خطا	۱۰	۲٦۱۰/۳۷٥	۲۱/۸۸٥	٦٥/۸۱٦	۰/۱۳٤	۷۹٤/۲۰۲
ضریب تغییرات (٪)		۱۲/۸۳	۱۱/۳٥	۱۰/۱۳	۱۲/۸۸	۲۱/۸۸

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

که با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد (Nagella *et al.*, 2011). در کشت‌سلول گیاه کهن‌دار (*Ginkgo biloba*) استفاده از ۳ درصد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

ساکارز برای تولید بیوماس مناسب است در حالیکه بیشترین مقدار تولید ژینکوگولیدز و بیلوبالیدز در غلظت‌های ۵ و ۷ درصد ساکارز حاصل شده بود (Park *et al.*, 2004). در کشت شاخه *Bacopa monnieri* ۲ درصد ساکارز بهترین غلظت برای تجمع بیوماس بوده و بیشترین مقدار باکوزید A در محیط فاقد ساکارز حاصل شده بود (Naik *et al.*, 2010). مشخص‌شده تنش اسمزی حاصل از ساکارز و سایر ترکیبات اسموتیک باعث تنظیم تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون انگور (*Vitis vinifera*) می‌شود (Do and Cormier, 1990). نقش دوگانه ساکارز به‌عنوان منبع کربن و عامل اسموتیک در بادمجان (*Solanum melongena*) مشاهده شده است (Mukherjee *et al.*, 1991). با مطالعه تأثیر ساکارز روی کشت ریشه مویین *Talinum paniculatum* مشخص شد که غلظت‌های مختلف ساکارز تجمع بیوماس را تحت تأثیر قرار داده و بیشترین مقدار آن در محیط‌کشت MS حاوی ٦ درصد ساکارز حاصل می‌شود. در این مطالعه بیشترین مقدار ساپونین در محیط‌کشت MS حاوی ۵ درصد ساکارز حاصل شده بود (Murthy *et al.*, 2014).

تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید: تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر رشد سلول و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی چریش در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید تأثیر معنی‌داری روی وزن تر و خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن و تجمع و تولید آزادیراختین دارد (جدول ۲). به‌طور کلی، در محیط‌کشت حاوی غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید، وزن تر و خشک سلول‌ها و حجم سلول‌های ساکن بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. در این تیمارها وزن تر سلول‌ها به‌ترتیب ٤٩٣/٠٢، ٤٨٧/٤ و ٤٦٦/٦١ گرم در لیتر و خشک سلول‌ها به‌ترتیب ٧٧/٢٧، ٧١/٢٣ و ٦٦/٥٣ گرم در لیتر و حجم سلول‌های ساکن به‌ترتیب ٩٤/٩٣، ٨٩/٥٤ و ٨٤/٥١ درصد بودند. با تغییر مقدار کلسیم کلرید محیط‌کشت MS مشخص شد که افزایش غلظت از مقدار ۰/۵x به ۱x باعث افزایش رشد سلول‌ها و وزن تر و خشک و حجم سلول‌های ساکن می‌شود اما افزایش غلظت از ۲x به ۲/۵x تأثیر مهاری داشته و موجب کاهش رشد سلول‌ها شده بود. افزودن غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید به محیط‌کشت تفاوت آماری معنی‌داری از نظر وزن تر و خشک سلول‌ها و حجم سلول‌های ساکن مشاهده نشده اما نسبت به غلظت ۰/۵x کلسیم کلرید این افزایش قابل ملاحظه بود. با کاربرد غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید مقدار وزن تر سلول‌ها نسبت به غلظت ۰/۵x به‌ترتیب ٨٤/٢٨، ٨٢/١٨ و ٧٤/٤١ درصد، وزن خشک سلول به‌ترتیب ٨٤٥/٨٠، ٤٤٠/٠٣ و ٤٠٤/٤٠ درصد و حجم سلول‌های ساکن به‌ترتیب ١٠٠/٤٤، ٨٩/٠٦ و ٧٨/٤٤ درصد افزایش یافته بود (شکل c و a ۲). بالاترین مقدار تجمع آزادیراختین با کاربرد غلظت ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x کلسیم کلرید (به‌ترتیب ٣/٨٠، ٣/٦٩ و ٣/٦٦ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) حاصل شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند اما نسبت ۲x و ۲/۵x بیشتر بودند (شکل d ۲). با کاربرد غلظت‌های ۱x و ۱/۵x کلسیم کلرید مقدار تولید آزادیراختین نسبت به غلظت ۰/۵x افزایش یافت اما افزایش غلظت کلسیم کلرید از ۱/۵x تا ۲/۵x موجب کاهش تولید آزادیراختین شد. در واقع، استفاده از غلظت ۱x و ۱/۵x کلسیم کلرید بیشترین تأثیر را روی تولید آزادیراختین داشتند و به‌ترتیب ٢٨٥/٦٤ و ٢٦٠/٨٦ میلی‌گرم در لیتر آزادیراختین را تولید کرده بودند (شکل e ۲). براساس نتایج، افزایش غلظت کلسیم کلرید باعث کاهش سنتز آزادیراختین می‌شود زیرا وجود سطوح بالای یون کلسیم در محیط‌کشت باعث فعال‌شدن پراکسیدازها می‌شود که در تخریب محصولات ثانویه دخالت دارند (Ajungla *et al.*, 2009). مطالعه انجام‌گرفته روی گیاه *Echinacea purpurea* L. نشان می‌دهد که افزایش غلظت کلسیم کلرید باعث کاهش مقدار رشد ریشه مویین می‌شود اما این کاهش رشد از نظر آماری معنی‌دار نبود (Abdoli *et al.*, 2013). در گیاه گل پریوش (*Catharanthus roseus*) استفاده از غلظت‌های بالای کلسیم کلرید (۱۰۰ میلی‌مولار) باعث کاهش رشد کالوس و نکروزه‌شدن بافت شده بود (Siddiqui and Mujib, 2012). پاسخ مشابه در هنگام استفاده از ۱۰۰

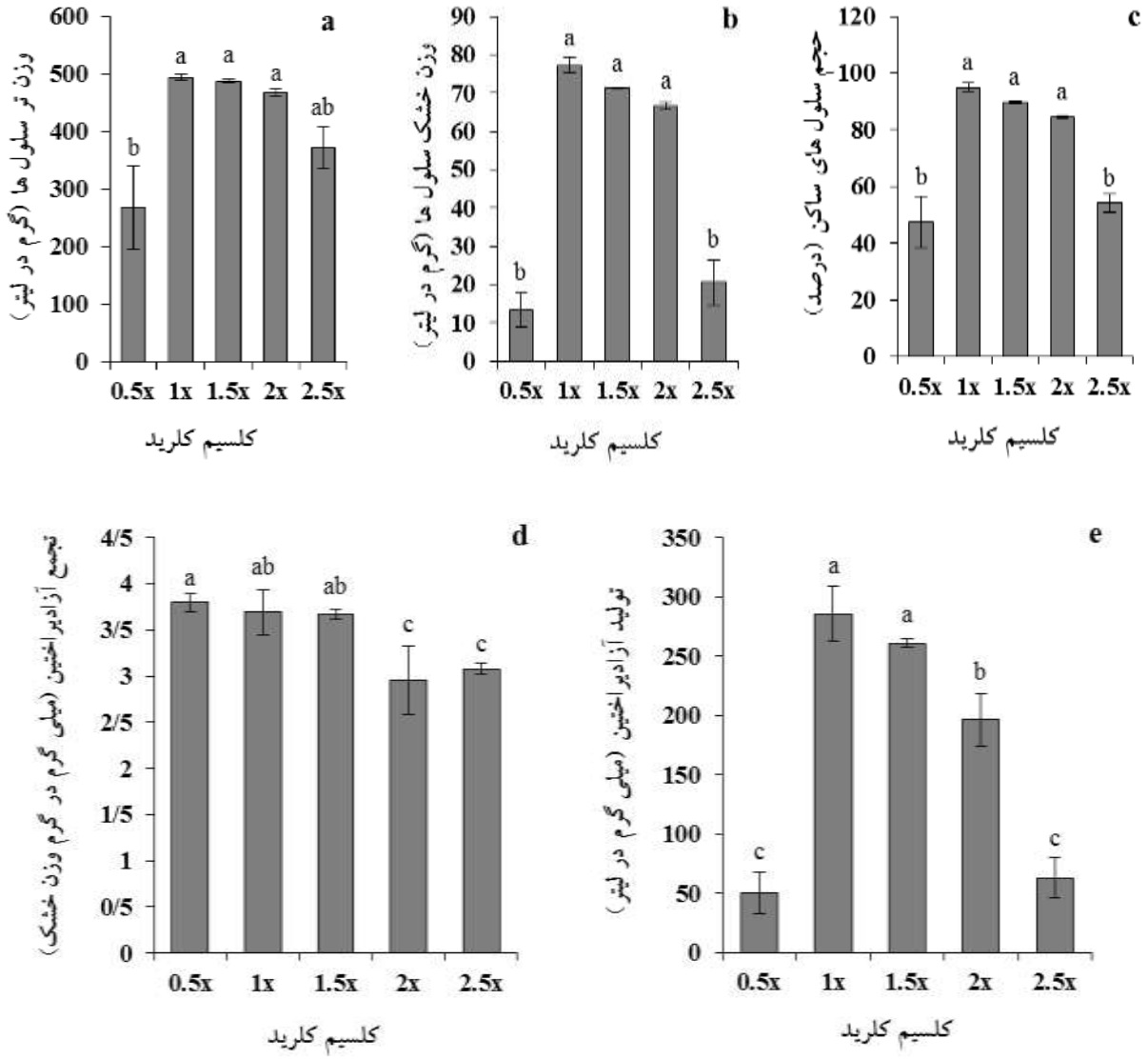
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
غلظت کلرید کلسیم	٤	۲۸۲٤٥/۹۰ **	۲۷۷۰/٤۳ **	۱٤۲۰/۳۳ **	۰/٤٥۰ *	۳٦۱۳۳/۳٤ **
خطا	۱۰	۳۹۳۳/۰۱۸	۳٦/۰۲٥	٥٦/۸٤۳	۰/۱۲٦	۹۸٥/۸۰۷
ضریب تغییرات (٪)		۱٥/۰٤	۱۲/۱٥	۱۰/۱۷	۱۰/۳۲	۱۸/۳٤

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

میلی‌مولار کلسیم کلرید در کشت *Brugmansia candida* نیز مشاهده شد بود (Pitta–Alvarez *et al.*, 2000). در گیاه *Sonneretia alba* استفاده از غلظت بالای کلسیم کلرید موجب کاهش رشد شده بود (Kawana and Sasamoto, 2008).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

استفاده از کلسیم کلرید به‌عنوان ماده محرک در کشت‌سلول گیلاس زمستانی (*Withania somniferum*) منجر به کاهش رشد سلول‌ها شد (Baldi *et al.*, 2008).

تأثیر غلظت‌های مختلف مونوپتاسیم فسفات: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که وزن تر و خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن و تجمع و تولید آزادیراختین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف مونوپتاسیم فسفات قرار می‌گیرد (جدول ۳). بالاترین مقادیر وزن تر و خشک سلول‌ها و حجم سلول‌های ساکن در محیط‌های کشت MS حاوی ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات به‌دست آمد که تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند اما نسبت به غلظت ۰/۵x افزایش یافته بودند. با کاربرد غلظت‌های ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۱/۵x مونوپتاسیم فسفات وزن تر سلول‌ها به‌ترتیب ۴۹۳/۰۲، ۴۹۳/۸۰، ۴۹۶/۰۳ و ۵۰۰/۹۷ گرم در لیتر، وزن خشک سلول‌ها به‌ترتیب ۷۷/۲۷، ۷۷/۶۲، ۷۹/۴ و ۸۰/۷۸ گرم در لیتر و حجم سلول‌های ساکن به‌ترتیب ۹۴/۹۳، ۹۰/۳۲، ۹۶/۴ و ۹۷/۲۲ درصد بود (شکل c و a ۳). بالاترین مقادیر تجمع آزادیراختین با میانگین ۳/۷۳، ۳/۶۹، ۳/۵۸ و ۳/۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵x، ۱x، ۱/۵x و ۲x مونوپتاسیم فسفات به‌دست آمدند که تفاوت آماری معنی‌داری نداشت اما نسبت به غلظت ۲/۵x افزایش قابل توجهی داشتند (شکل d ۳). نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۱/۵x مونوپتاسیم فسفات در محیط‌کشت منجر به تولید مقادیر بالای آزادیراختین (به‌ترتیب ۲۸۵/۶۵، ۲۷۸/۶۹، ۲۵۹ و ۱۹۹/۸۷ میلی‌گرم در لیتر) می‌شوند در حالیکه نسبت به غلظت ۰/۵x مونوپتاسیم فسفات این مقادیر تولید آزادیراختین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. با کاربرد غلظت‌های فوق مونوپتاسیم فسفات مقدار تولید آزادیراختین به‌ترتیب ۴/۷۲، ۴/۵۷، ۴/۲۵ و ۳/۲۸ برابر افزایش یافته بود (شکل e ۳). مونوپتاسیم فسفات یکی از منابع اصلی فسفر است که در محیط‌کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. HPO_4^{2-} و $H_2PO_4^-$ دو فرم فسفات است که در فرآیندهای مختلفی گیاهی دخالت دارند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که مواد مغذی تأثیر معنی‌داری روی رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارد. وجود فسفر در محیط‌کشت MS باعث تحت تأثیر قرارگرفتن رشد گیاهچه‌های *Achmea blanchetlana* شده و بیشترین مقدار وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار حاصل می‌شود (Tavares *et al.*, 2013). با کاربرد غلظت‌های مختلف مونوپتاسیم فسفات در گیاه استویا بالاترین مقدار تجمع استویوزید و ربادیوزید A در محیط‌کشت حاوی ۰/۰۱۷ میلی‌مولار مونوپتاسیم فسفات حاصل شده بود (Kahrizi *et al.*, 2017).

تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات: غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات تأثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن و تجمع و تولید آزادیراختین داشت (جدول ٤). نتایج نشان داد که افزایش غلظت پتاسیم نیترات از ۱/۵x به ۲/۵x باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک سلول‌ها و حجم سلول‌های ساکن می‌شود. بالاترین مقادیر وزن تر و خشک سلول‌ها و حجم سلول‌های ساکن در محیط‌های کشت حاوی ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات به‌دست آمدند. با افزودن غلظت‌های ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات به محیط‌کشت MS وزن تر سلول به‌ترتیب ۴۹۵/۰۱، ۴۹۳/۰۲ و ٤٥٣/٣٥ میلی‌گرم در لیتر، وزن خشک به‌ترتیب ۷۸/۴۱، ۷۷/۲۷ و ۷٤/۰۹ میلی‌گرم در لیتر و حجم سلول‌های ساکن به‌ترتیب ۹٤/۹٦، ۹٤/۹۳ و ۸۲/٦۷ درصد بودند (شکل c و a ٤). تجمع آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی چریش با افزایش غلظت پتاسیم نیترات از ۰/۵x به ۱x افزایش یافته و از ۲/۵٦ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به ۳/٦۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک رسیده بود. اما با افزایش غلظت از ۲x به ۲/۵x مقدار تجمع آزادیراختین کاهش یافته بود. بنابراین غلظت‌های بالای پتاسیم نیترات تأثیر مهاری روی تجمع آزادیراختین دارند. بیشترین مقدار تجمع آزادیراختین با مقدار ۳/٦۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک با کاربرد غلظت‌های ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات به‌دست آمد که نسبت به غلظت‌های ۰/۵x، ۲x و ۲/۵x به‌ترتیب ٤٤/۷۱، ۱۲/۱٦و ۲۰/۹۸ درصد افزایش یافته بود (شکل d ٤). بالاترین مقدار تولید آزادیراختین

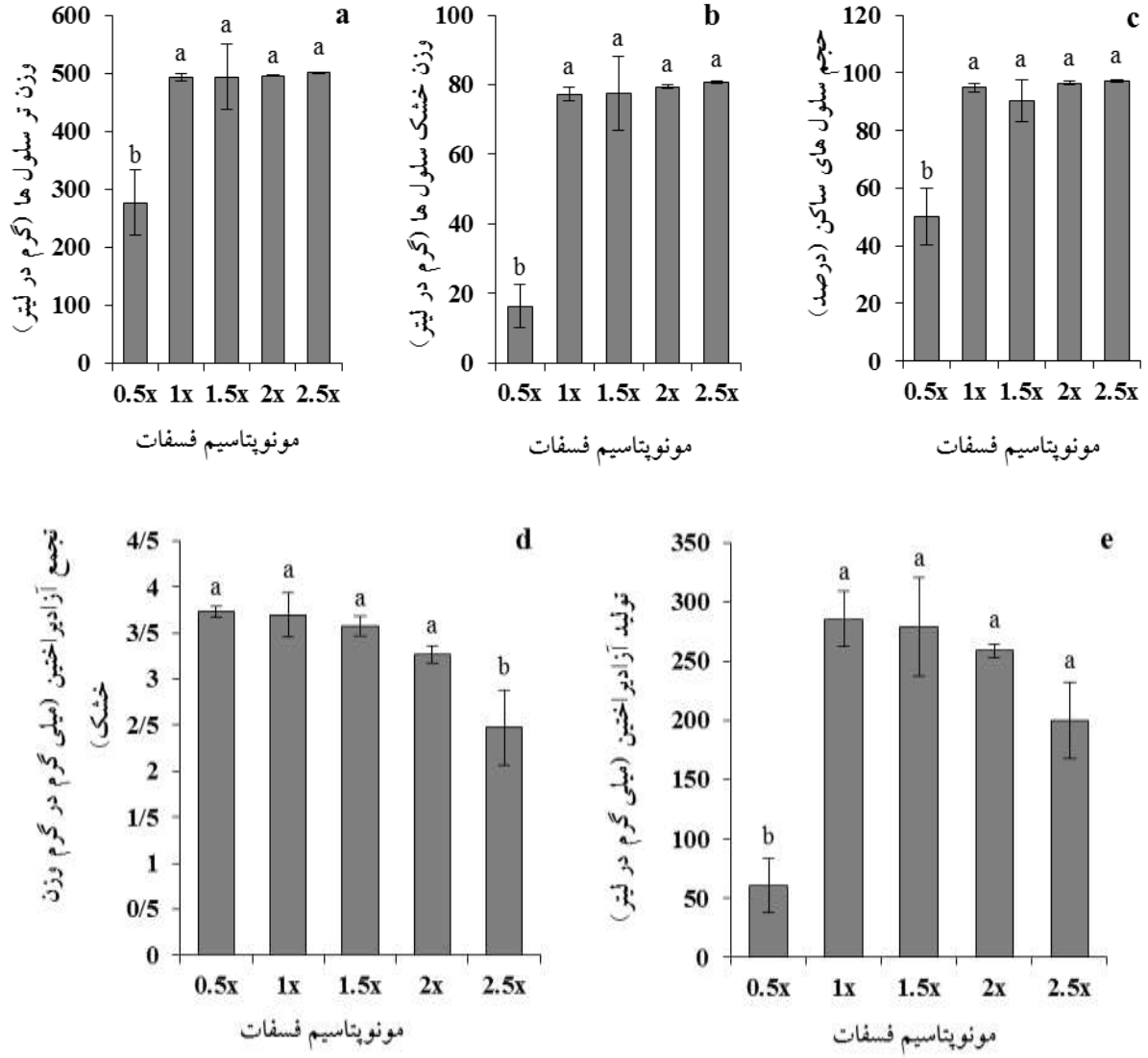
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مونوپتاسیم فسفات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
مونوپتاسیم فسفات	٤	۲۸۸۹۰/۲۵**	۲۳٤۷/۹۹**	۱۲۱۹/۲۱**	۰/۸۱٦*	۲٦۱۹۹/۰٤**
خطا	۱۰	۳۹۳۲/۷۵	۹۳/۹۳۷	۹۲/۲۲۰	۰/۱٤٦	۲۳۳۳/۸٦۲
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۸۷	۱٤/٦۲	۱۱/۱۹	۱۱/٤۲	۲۲/۲۸

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف مونوپتاسیم فسفات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

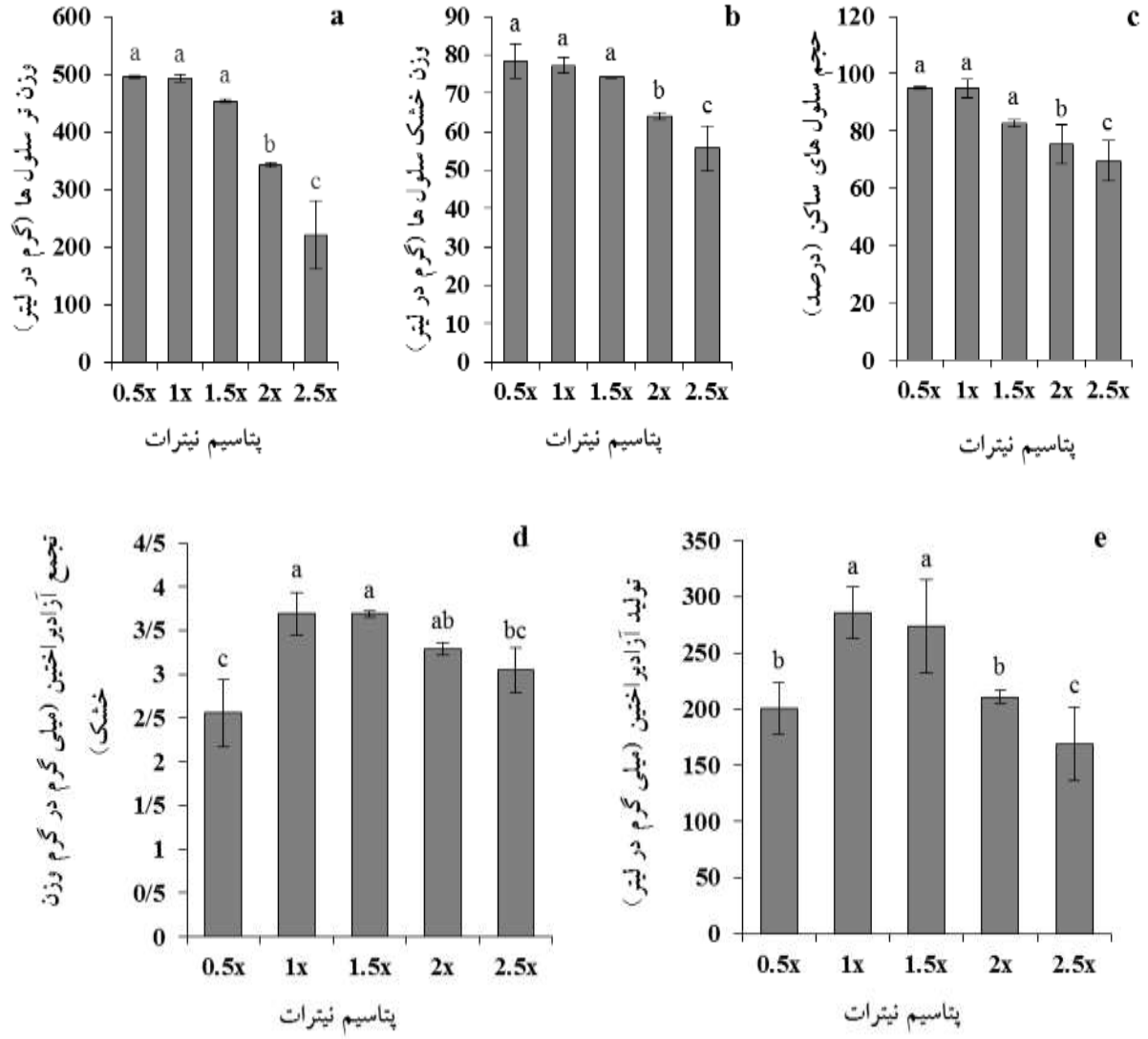
به مقدار ۲۸۵/٦۵ و ۲۷۳/۳۲ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با کاربرد غلظت‌های 1x و 1/5x پتاسیم نیترات حاصل گردید اما با افزایش غلظت آن مقدار تولید آزادیراختین به‌طور کلی با استفاده از غلظت‌های 1x و 1/5x پتاسیم نیترات باعث افزایش

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ٤- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
غلظت نیترات پتاسیم	٤	٤١٨٤٣/٩٩ **	١٧١٧/٤٧ **	١٣٨٧/٧٨ **	١/٢٣٧ *	٢٤٨٧٥/٦٥ **
خطا	١٠	٢١٤٠/٣٤١	٦٥/١٩٤	٦٦/١٩٢	٠/١٦٧	١٥١٥/٦٦٧
ضریب تغییرات (٪)		١١/٥٣	١٣/١٩	١٠/٦٩	١٣/٠٩	٢٠/٠٢

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

قابل توجه تولید آزدیراختین نسبت به غلظت‌های ۰/۵x، ۲x و ۲/۵x شده بود (شکل e ٤). نیتروژن نقش مهمی در رشد و تمایز دارد. شکل و مقدار نیتروژن در محیط‌کشت تأثیر قابل توجهی بر میزان رشد و تمایز سلول‌ها دارند. نیتروژن یک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

عنصر ضروری در فرمولاسیون مواد معدنی بوده و در قالب یون‌های نیترات (NO_3^-) و آمونیوم (NH_4^+) وجود دارد. نیترات یک منبع خوب از نیتروژن بوده و به‌راحتی توسط سلول‌ها جذب و متابولیزه می‌شود. نیترات بر تعدادی از فرآیندهای رشد تأثیر می‌گذارد (Shanjani, 2003). در این مطالعه کاهش مقدار پتاسیم نیترات (۰/۵x) موجب رشد بهتر سلول‌ها شده بود. در باززایی درون شیشه‌ای گیاه*Saraca asoca* مشاهده شد که غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات تأثیر قابل توجهی بر تعداد شاخه‌ها داشته و حداکثر تعداد شاخه در غلظت ۰/۲۵x پتاسیم نیترات حاصل شده بود (Shirin *et al.*, 2015). در کشت گیاه خرنوب (*Ceratonia siliqua*) نیز از غلظت‌های پایین نمک‌های نیتروژن در محیط‌کشت MS استفاده شده بود (Vinterhalter *et al.*, 2007). به‌طور مشابه در کشت کهور سفید (*Prosopis alba*) نیز از مقادیر کم نیتروژن برای تولید شاخه استفاده شده بود (Tabone *et al.*, 1986). منبع نیتروژن تأثیر زیادی بر تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ترپن‌ها و آلکالوئیدها (Zhong, 2001)، آنتوسیانین و شیکونین در کشت سوسپانسیون سلولی دارد (Kim and Chang, 1990). در کشت درون شیشه‌ای خرما استفاده از نصف مقدار پتاسیم نیترات باعث تولید بالاترین مقدار آنتی‌اکسیدان می‌شود (Aldaej *et al.*, 2014).

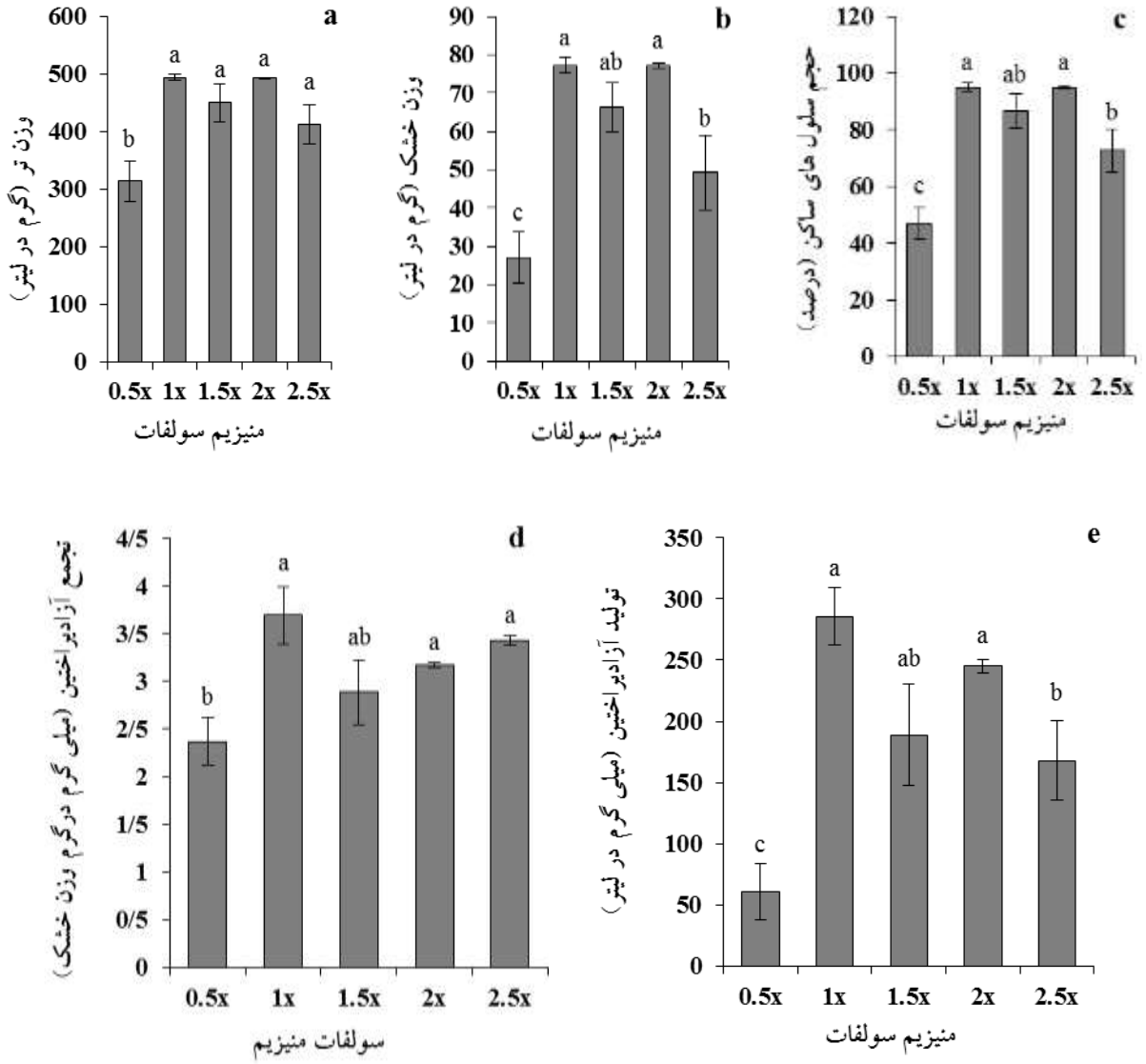
تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات: شکل ۵ تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر رشد سلول و تولید آزادیراختین در سلول‌های چریش را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات تأثیر معنی‌داری ($P<0.01$) بر وزن تر و وزن خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن، تجمع آزادیراختین و تولید آزادیراختین دارند (جدول ۵). افزودن غلظت ۱x منیزیم سولفات به محیط‌کشت باعث رشد سلول‌ها و افزایش وزن تر سلول‌ها از ۳۱۳/۰۳ گرم در لیتر به ۴۹۳/۰۲ گرم در لیتر شده و موجب افزایش ۵۷/۵۰ درصدی وزن تر سلول نسبت به کاربرد غلظت ۰/۵x شده بود (شکل a ۵). بالاترین مقادیر وزن تر سلول‌ها با میانگین ۴۹۳/۰۲، ۴۴۹/۶۳، ۴۹۱/۹۲ و ۴۱۱/۰۷ گرم در لیتر به‌ترتیب با کاربرد غلظت‌های ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x منیزیم سولفات حاصل گردید. استفاده از غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x سولفات منیزیم منجر به افزایش وزن خشک سلول‌ها نسبت به غلظت‌های ۰/۵x و ۲/۵x شده بود. با کاربرد غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x منیزیم سولفات وزن خشک سلول‌ها به‌ترتیب ۷۷/۲۷، ۶۶/۲۲ و ۷۷/۲۴ گرم در لیتر بود (شکل b ۵). بیشترین مقادیر حجم سلول‌های ساکن با میانگین ۹۴/۹۳، ۸۶/۷۶ و ۹۴/۹۶ درصد به‌ترتیب در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲x منیزیم سولفات مشاهده گردید که نسبت به غلظت‌های ۰/۵x و ۲/۵x افزایش قابل ملاحظه‌ای داشتند (شکل c ۵). بالاترین مقادیر تجمع آزادیراختین با میانگین ۳/۶۹، ۳/۱۷ و ۳/۴۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک در غلظت‌های ۱x، ۲x و ۲/۵x منیزیم سولفات حاصل گردید که نسبت به غلظت ۰/۵x اختلاف معنی‌داری داشتند. با کاربرد غلظت ۱x منیزیم سولفات مقدار تجمع آزادیراختین نسبت به غلظت‌های ۰/۵x به‌ترتیب ۵۵/۹۱ درصد افزایش داشت (شکل d ۵). بیشترین مقادیر تولید آزادیراختین (۲۸۵/۶۵ و ۲۴۵/۰۸ میلی‌گرم در لیتر) با کاربرد غلظت‌های ۱x و ۲x منیزیم سولفات به‌دست آمد. با کاربرد غلظت ۱x منیزیم سولفات مقدار تولید آزادیراختین نسبت به تیمارهای ۰/۵x، ۱/۵x و ۲/۵x به‌ترتیب ۴/۷۲، ۱/۵۱ و ۱/۷۰ برابر و با کاربرد غلظت ۲x منیزیم سولفات مقدار تولید آزادیراختین به‌ترتیب ۴/۰۴، ۱/۳ و ۱/۴۶ برابر افزایش یافته بود (شکل e ۵). مطالعات اندکی روی تأثیر منیزیم سولفات روی رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان صورت گرفته است. در مطالعه انجام‌گرفته بر تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر رشد و تولید متابولیت‌های ریشه مویین گیاه *Atropa belladonna* L. مشخص شد که بیشترین مقدار تولید بیوماس در محیط‌کشت حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر منیزیم سولفات حاصل شود. در این مطالعه بیشترین مقدار تولید هیوسیامین در محیط‌کشت حاوی ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر منیزیم سولفات و بیشترین مقدار اسکوپولامین در محیط‌کشت حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر منیزیم سولفات حاصل شد (Hank *et al.*, 2003). در مطالعه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
سولفات منیزیم	٤	١٦٦٦١/٧٧**	١٣٧٦/٥٩**	١٢٢١/٢٩**	٠/٥٥٩*	١٨٨٢٤/٥١**
خطا	١٠	٢١٢٩/١٧٤	١١٠/٧٠٦	٧٦/٠٥٠	٠/١٦١	١٤٤٩/٥٣٣
ضریب تغییرات (٪)		١٠/٦٩	١٧/٧١	١٠/٩٩	١٣/١٩	٢٠/٦٢

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف منیزیم سولفات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

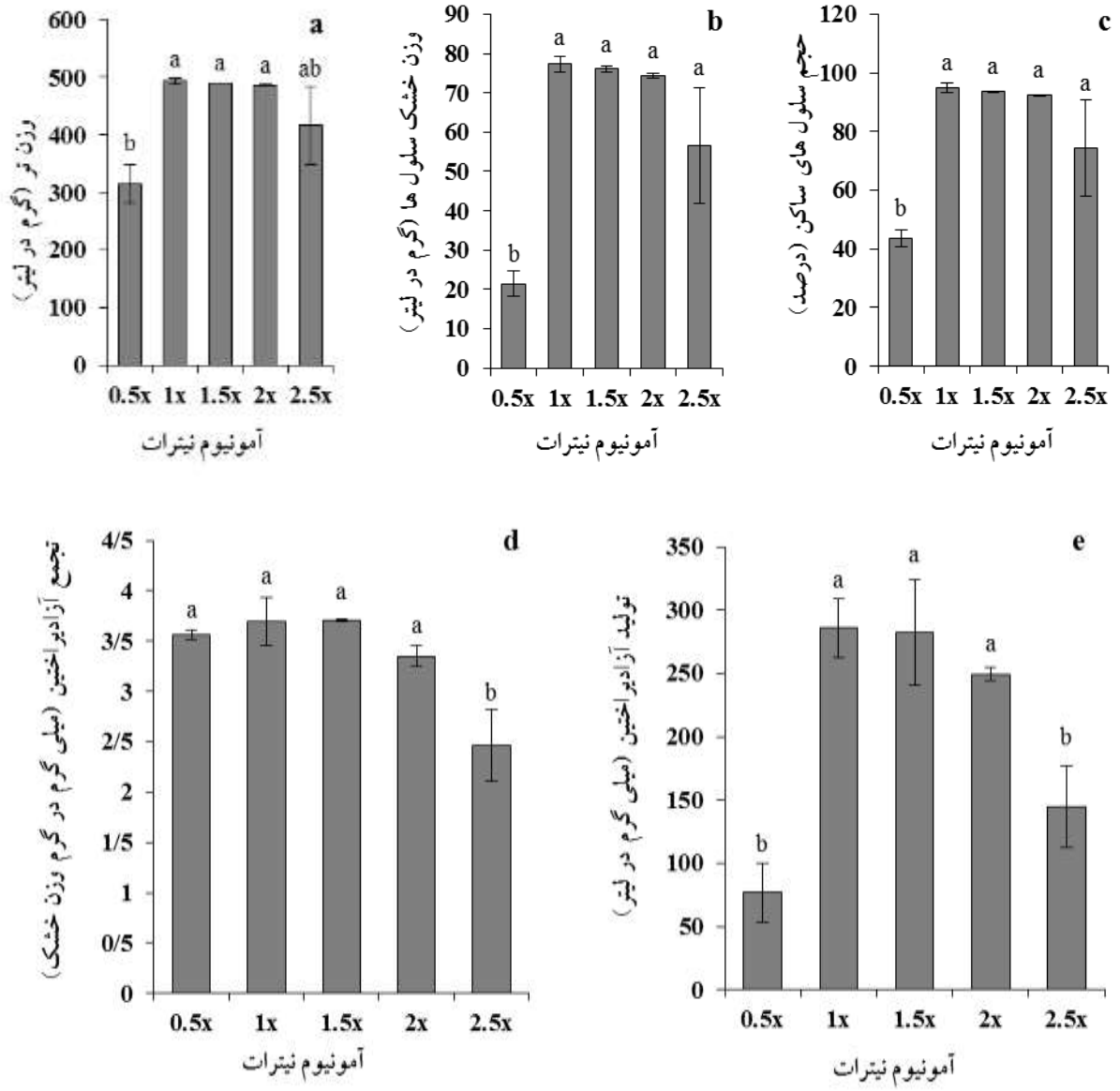
تأثیر غلظت‌های منیزیم سولفات روی رشد و تجمع سیکوریک اسید در کشت ریشه مویین *Echinacea purpurea* L. مشخص شد که بیشترین مقدار سیکوریک اسید (۳۰/۵۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۱٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر منیزیم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

جدول ٦- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف آمونیوم نیترات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر سلول‌ها	وزن خشک سلول‌ها	حجم سلول‌های ساکن	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
غلظت نیترات آمونیوم	٤	۱۷۸۵۷/٦۱**	۱٦۹۰/۷۱**	۱٤٤۲/۵۰**	۰/۸۱۰**	۲۵۸۵۸/۹۵**
خطا	۱۰	۳٤٤۰/۳٤	۱۳۷/۵۸۲	۱٦۵/۰۲۸	۰/۲۱۲	۱۹۷٤/۷۸٦
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۳۳	۱۹/۱۹	۱٦/۱۱	۱۰/۳۷	۲۱/۲۵

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ٦- تأثیر غلظت‌های مختلف آمونیوم نیترات بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی چریش

سولفات حاصل می‌شود (Abdoli *et al.*, 2013). **تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم:** با مطالعه تأثیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر کشت سوسپانسیون سلولی چریش مشخص گردید که وزن تر و خشک سلول، حجم سلول‌های ساکن و تجمع و تولید آزادیراختین تحت تأثیر آن قرار می‌گیرند (جدول ٦). براساس نتایج، کاربرد غلظت‌های بالاتر از ۰/۵xنیترات آمونیوم باعث افزایش رشد سلول‌ها شده بود. بیشترین مقادیر وزن تر، خشک و حجم سلول‌های ساکن در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱x، ۱/۵x و ۲xنیترات آمونیوم حاصل گردید (شکل c و a ٦). از بین غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم موجود در محیط‌کشت استفاده از غلظت‌های ۰/۵x، ۱x، ۱/۵x و ۲x بیشترین مقادیر تجمع آزادیراختین را به‌دست داده بودند. در این غلظت‌ها مقدار تجمع آزادیراختین به‌ترتیب ۳/۵٦، ۳/٦۹، ۳/۷۱ و ۳/۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بود که که نسبت به غلظت ۲/۵x به‌ترتیب ٤٤/۷۱، ۵۰، ۵۰/۸۱ و ۳٦/۱۸ درصد افزایش یافته بودند (شکل d ٦). با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر تولید آزادیراختین مشخص گردید که بالاترین مقادیر تولید آزادیراختین با میانگین ۲۸۵/٦۵، ۲۸۱/۹۱ و ۲٤۹/۳٦ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱x، ۱/۵X و ۲xنیترات آمونیوم حاصل می‌شود که نسبت به غلظت ۰/۵x به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بودند اما با اضافه‌کردن غلظت ۲/۵x نیترات آمونیوم مقدار تولید آزادیراختین کاهش یافت (شکل e ٦).نیترات آمونیوم یکی از مهمترین ترکیبات آلی بوده و به‌عنوان منابع نیتروژن در بسیاری از فرآیندهای ضروری جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و تولید آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود (Shehata *et al.*, 2014). مطالعات نشان می‌دهد که ساختار محیط‌کشت MS حاوی مقادیر بالای نیتروژن به فرم آمونیوم و نیترات اهمیت زیادی در تقسیم سلولی، تشکیل کالوس و زنده‌مانی گیاه دارد (Al-Turki *et al.*, 2010). آمونیوم به‌راحتی در بافت تجمع می‌یابد و اگر به سرعت متابولیزه نشود بسیار سمی می‌گردد. هنگامی که غلظت آمونیوم در محیط کم است اکثر آمونیوم انباشته–شده توسط سلول‌ها متابولیزه می‌شود. در حالیکه در صورت بالا بودن غلظت آمونیوم تنها مقدار کمی از آن متابولیزه می‌گردد (Bensaddek *et al.*, 2001). در این مطالعه اگر چه بین غلظت‌های ۰/۵x، ۱x، ۱/۵x و ۲x اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت اما بیشترین مقدار تجمع آزادیراختین در غلظت ۱x نیترات آمونیوم به‌دست آمد. استفاده ازنیترات آمونیوم باعث افزایش سطوح پلی‌آمین‌ها می‌شود که به‌عنوان پیش‌ماده متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کند (Chen *et al.*, 2011). افزایش اسکلت‌های کربن برای آسمیلاسیون آمونیوم ممکن است فعالیت‌های مسیر شیکمیک اسید را تحریک کرده و به نوبه خود تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی را افزایش دهد (Fan *et al.*, 1998). در مطالعه انجام‌گرفته روی کشت سوسپانسیون سلولی *Panax quinquefolium* مشخص شد که غلظت‌های پایین نیترات آمونیوم باعث بیشترین تجمع جنسینوزید می‌شود؛ در حالیکه غلظت‌های بالا موجب کاهش تجمع فنول‌ها می‌گردد (Zhong and Wang, 1998). مطالعات انجام‌گرفته در *Vitis vinifera* نشان داد که بیشترین مقدار بیوماس، فنول و رسوراترول در محیط‌کشت حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات آمونیوم حاصل می‌شود (Sae-Lee *et al.*, 2014).

منحنی رشد کشت سوسپانسیون سلولی: منحنی رشد کشت سوسپانسیون سلولی چریش در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین با تراکم اولیه $۱۰^{۵} \times ۲/٦$ سلول در میلی‌لیتر در شکل ۷ نشان داده شده است. براساس این منحنی مرحله اول مرحله تأخیری به‌مدت ۳ روز است که در آن سلول‌ها به محیط جدید سازگار می‌شوند. سپس سلول‌ها وارد مرحله رشد نمایی شده و تا روز ششم ادامه می‌یابد. پس از آن سلول‌ها وارد مرحله رشد خطی شده و تا روز چهاردهم ادامه می‌یابد. پس از ۱٤ روز، سلول‌ها وارد مرحله کاهش رشد شده و تا روز بیست و چهارم آن را ادامه می‌دهند و در نهایت سلول‌ها وارد مرحله مرگ می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر درشت مغذی محیط‌کشت MS از جمله کلسیم کلرید، مونوپتاسیم فسفات، پتاسیم نیترات، منیزیم سولفات و آمونیوم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]



شکل ۷- کشت سوسپانسیون بسته رشد چریش در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین

نیترات بر رشد سوسپانسیون سلولی و تولید آزادیراختین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف این تیمارها تأثیر معنی‌داری روی وزن تر و خشک سلول‌ها، حجم سلول‌های ساکن، تجمع و تولید آزادیراختین دارند. در این مطالعه حداکثر مقدار وزن تر سلول‌ها با کاربرد ۳ و ٤ درصد ساکارز، ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x منیزیم سولفات و ۱x، ۱/۵x و ۲x نیترات آمونیوم به‌دست آمد. بیشترین مقدار وزن تر سلول‌ها با کاربرد ۳ درصد ساکارز، ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۱x و ۲x منیزیم سولفات و ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x نیترات آمونیوم حاصل شد. بالاترین حجم سلول‌های با کاربرد ۳، ٤ و ۵ درصد ساکارز، ۱x، ۱/۵x و ۲x کلسیم کلرید، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۱x و ۲x منیزیم سولفات و ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x نیترات آمونیوم به‌دست آمد. بیشترین مقدار تجمع آزادیراختین با کاربرد ۲، ۳ و ٤ درصد ساکارز، ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x کلسیم کلرید، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵x، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x منیزیم سولفات و ۱x، ۱/۵x، ۲x و ۲/۵x نیترات آمونیوم.مشاهده گردید. بیشترین مقدار تولید آزادیراختین نیز با کاربرد ۳ درصد ساکارز، ۱x و ۱/۵x کلسیم کلرید، ۱x، ۱/۵x و ۲x مونوپتاسیم فسفات، ۱x و ۱/۵x پتاسیم نیترات، ۱x و ۲x منیزیم سولفات و ۱x، ۱/۵x و ۲x نیترات آمونیوم حاصل شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان کمال تشکر را از دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) برای حمایت مالی و دکتر جعفر احمدی برای حمایت تکنیکی را دارند.

منابع

Abdoli, M., Moieni, A. and Naghdi Badi, H. (2013) Influence of KNO_3, $CaCl_2$ and $MgSO_4$ concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Journal of Medicinal Plants 12: 75-84.

Ajungla, L., Patil, P., Barmukh, R. and Nikam, T. (2009) Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. Indian Journal of Biotechnology 8: 317-322.

Al-Turki, S., Shahba, M. A. and Stushnoff, C. (2010) Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits as affected by cultivar and location. Journal of Food, Agriculture and Environment 8: 253-260.

Aldaej, M. I., Alturki, S. M., Shehata, W. F. and Ghazzawy, H. S. (2014) Effect of potassium nitrate on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. Pakistan Journal of Biological Sciences 17: 1209-1218.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. and Shibl, R. A. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae 100: 193-202.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

Baldi, A., Singh, D. and Dixit, V. K. (2008) Dual elicitation for improved production of withaferin A by cell suspension cultures of *Withania somnifera*. Applied Biochemistry and Biotechnology 151: 556.

Bensaddek, L., Gillet, F., Saucedo, J. E. N. and Fliniaux, M. A. (2001) The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology 85: 35-40.

Chen, L., Liu, Q. Q., Gai, J. Y., Zhu, Y. L., Yang, L. F. and Wang, C. (2011) Effects of nitrogen forms on the growth and polyamine contents in developing seeds of vegetable soybean. Journal of Plant Nutrition 34: 504-521.

Dawkar, V. V., Barage, S. H., Barbole, R. S., Fatangare, A., Grimalt, S., Haldar, S., Heckel, D. G., Gupta, V. S., Thulasiram, H. V., Svatos, A. and Giri, A. P. (2019) Azadirachtin a from *Azadirachta indica* impacts multiple biological targets in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. ACS Omega 4: 9531-9541.

Deng, Y. X., Cao, M., Shi, D. X., Yin, Z. Q., Jia, R. Y., Xu, J., Wang, C. L. C., Liang, X. X., He, C. L., Yang, Z. R. and Zhao, J. (2013) Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: Acute and subacute toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology 35: 240-246.

Do, C. B. and Cormier, F. (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Reports 9: 143-146.

Duarte, J. P., Redaelli, L. R., Jahnke, S. M. and Trapp, S. (2019) Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and adults. Florida Entomologist 102: 408-412.

Fan, Y., Wang, Y., Tan, R. and Zhang, Z. (1998) Seasonal and sexual variety of Ginkgo flavonol glycosides in the leaves of *Ginkgo biloba* L. Journal of Traditional Chinese Medicine 23: 267-269.

Farjaminezhad, R., Zare, N., Zakaria, R. A. and Farjaminezhad, M. (2013) Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production. Turkish Journal of Biology 37: 689-697.

Gallego, A., Bonfill, M., Cusido, R. M., Pastor, M., Palazon, J. and Moyano, E. (2015) Assessing factors that affect the growth of *Corylus avellana* cell suspension cultures: a statistical approach. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 51: 530-538.

Victor, M. L. V. and Neftali, O. A. (2006) Plant cell culture protocols. In: Growth Measurements (eds. Godoy-Hernandez, G. and Vazquez-Flota, F. A.) Pp. 51-58. Springer.

Hank, H., Laszlo, I., Balvanyos, I., Toth, E., Kursinszki, L., Kovacs, G., and Szoke, E. (2003) Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. Acta Horticulturae 597: 271-274.

Kahrizi, D., Ghari, S., Ghaheri, M., Fallah, F., Ghorbani, T., Beheshti, A. A. A., Kazemi, E. and Ansarypour, Z. (2017) Effect of KH_2PO_4 on gene expression, morphological and biochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni under *in vitro* conditions. Cellular and Molecular Biology 63: 107-111.

Kawana, Y. and Sasamoto, H. (2008) Stimulation effects of salts on growth in suspension culture of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, compared with another mangrove, *Bruguiera sexangula* and non-mangrove tobacco BY-2 cells. Plant Biotechnology 25: 151-155.

Kim, D. J. and Chang, H. N. (1990) Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization. Biotechnology and Bioengineering 36: 460-466.

Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., de Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F. and Pinto, J. E. B. P. (2018) Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. Industrial Crops and Products 116: 231-239.

Mukherjee, S. K., Rathinasabapathi, B. and Gupta, N. (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 13-16.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Murthy, H. N., Lee, E. J. and 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 (PCTOC) 118: 1-16.

Nagella, P., chung, I. M. and Murthy, H. N. (2011) In vitro production of gymnemic acid from cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. Engineering in Life Sciences 11: 537-540.

Naik, P. M., Manohar, S. H., Praveen, N. and Murthy, H. N. (2010) Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 100: 235-239.

Nitzsche, A., Tokalov, S. V., Gutzeit, H. O. and Ludwig-Müller, J. (2004) Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 2915-2923.

Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A. and Chanotiya, C. S. (2013) Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum taxa* during plant ontogeny. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2567-2587.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

Park, Y. G., Kim, S. J., Kang, Y. M., Jung, H.Y., Prasad, D. T., Kim, S. W., Chung, Y. G. and Choi, M. S. (2004) Production of ginkgolides and bilobalide from optimized the *Ginkgo biloba* cell culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering 9: 41-46.

Passos, M. d. S., Carvalho, A. R. d., Boeno, S. I., Virgens, L. d. L. G. d., Calixto, S. D., Ventura, T. L. B., Lassounskaia, E., Braz-Filho, R. and Vieira, I. J. C. (2019) Terpenoids isolated from *Azadirachta indica* roots and biological activities. Revista Brasileira de Farmacognosia 29: 40-45.

Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C. and Giulietti, A. M. (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology 26: 252-258.

Praveen, N. and Murthy, H. N. (2012) Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. Industrial Crops and Products 35: 241-243.

Rafiq, M. and Dahot, M. U. (2010) Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). African Journal of Biotechnology 9: 449-453.

Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

Sae-Lee, N., Kerdchoechuen, O. and Laohakunjit, N. (2014) Enhancement of phenolics, resveratrol and antioxidant activity by nitrogen enrichment in cell suspension culture of *Vitis vinifera*. Molecules 9: 7901-7912.

Shanjani, P. S. (2003) Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. International Journal of Agriculture and Biology 5: 419-422.

Shehata, W. F., Aldaej, M. I., Alturki, S. M. and Ghazzawy, H. S. (2014) Effect of ammonium nitrate on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. Biotechnology 13: 116-125.

Shirin, F., Parihar, N. S. and Shah, S. N. (2015) Effect of nutrient media and KNO_3 on *in vitro* plant regeneration in *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. American Journal of Plant Sciences 6: 3282.

Siddiqui, Z. H. and Mujib, A. (2012) Accumulation of vincristine in calcium chloride elicitated *Catharanthus roseus* cultures. The Natural Products Journal 2: 307-315.

Sivakumar, G., Yu, K. W. and Paek, K. Y. (2005) Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. Engineering in Life Sciences 5: 333-342.

Srivastava, S. and Srivastava, A. K. (2012) Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 48: 73-84.

Su, W. W., Hwang, W. I., Kim, S. Y. and Sagawa, Y. (1997) Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 91-95.

Sujanya, S., Poornasri Devi, B. and Sai, I. (2008) In vitro production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. Journal of Biosciences 33: 113-120.

Tabone, T., Felker, P., Bingham, R., Reyes, I. and Loughrey, S. (1986) Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B2V50. Forest Ecology and Management 16: 191-200.

Tavares, A., Kanashiro, S., Ribeiro, R., Goncalves, A. and Jocys, T. (2013) Effect of phosphorus on in vitro growth and development of bromeliad *Aechmea blanchetiana*. Paper presented at: VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1083.

Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J. (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1: 13-25.

Vinterhalter, B., Ninkovic, S., Zdravkovic-Korac, S., Subotic, A. and Vinterhalter, D. (2007) Effect of nitrogen salts on the growth of *Ceratonia siliqua* L. shoot cultures. Archives of Biological Sciences 59: 217-222.

Zhong, J. J. (2001) Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In: Plant Cells (eds. Zhong, J. J., Byun, S. Y., Cho, G. H., Choi, J. W., Haigh, J. R., Honda, H., James, E., Kijne, J. W., Kim, D. I., Kobayashi, T., Lee, J. M., Kino-oka, M., Linden, J. C., Liu, C., Memelink, J., Mirjalili, N., Nagatome, H., Taya, M., Phisaphalong, M., Van Der Heijden, R. and Verpoorte, R.) Pp. 1-26. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Zhong, J. J. and Wang, S. J. (1998) Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. Process Biochemistry 33: 671-675.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]

The effect of medium compounds on growth and azadirachtin production in cell suspension culture of neem (*Azadirachta indica*)

Reza Farjaminezhad and Ghasem-ali Garoosi*

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

(Received: 02/03/2019, Accepted: 18/09/2019)

Abstract

Azadirachtin is an important secondary metabolite of neem which is used as a natural biopesticide. In this study the effect of different concentrations of sucrose (1, 2, 3, 4 and 5%), calcium chloride, monopotassium phosphate, potassium nitrate, magnesium sulfate and ammonium nitrate (0.5x, 1x, 1.5x, 2x and 2.5x concentrations of MS base medium) on neem cell suspension growth and azadirachtin production was investigated. Although there were no significant difference between some of the treatment in terms of studied indices, the highest amount of fresh and dry cells weight were obtained by using 3% sucrose, 1x calcium chloride, 1x magnesium sulfate and 1x ammonium nitrate (493.02 and 77.27 g/L), 2.5x monopotassium phosphate (500.97 and 80.77 g/L) and 0.5x potassium nitrate (495.01 and 78.41 g/L). The highest settled cell volume was obtained by application of 4% sucrose (59.69%), 1x calcium chloride and 1x ammonium nitrate (94.93%), 2.5x monopotassium phosphate (97.22%), 0.5x potassium nitrate (94.96%) and 2x magnesium sulfate (94.96%). Maximum amount of azadirachtin accumulation observed by using 4% sucrose (3.72 mg/g DW), 0.5x calcium chloride (3.80 mg/g DW), 0.5x monopotassium phosphate (3.73 mg/g DW), 1x and 1.5x potassium nitrate (3.69 mg/g DW), 1x magnesium sulfate (3.69 mg/g DW) and 1.5x ammonium nitrate (3.71 mg/g DW). The highest amount of azadirachtin production was 286.65 mg/L obtained in MS basal medium supplemented with 3% sucrose.

Keywords: Azadirachtin, Cell suspension, Macronutrients, Neem, Sucrose

Corresponding author, Email: agaroosi90@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.33.26.6]