



دانشگاه گوارش و تغذیه گیاهی

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد نوزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۱

<http://jopp.gau.ac.ir>

بهینه‌سازی کشت بافت خار مریم به منظور تولید فلاونولیگنان‌های دارویی

سلیمه آرخی^۱، *مهناز اقدسی^۲ و مهناز خلفی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گلستان، ^۲ استادیار گروه زیست شناسی

دانشگاه گلستان، ^۳ استادیار گروه آمار دانشگاه گلستان

چکیده

خار مریم (*Silybum marianum*) گیاهی دو لپه از خانواده آستراسه است که در صنایع داروسازی اهمیت فراوان دارد. ماده موثره این گیاه سیلیمارین نام دارد که ترکیبی از انواع فلاونولیگنان‌ها است. این ترکیب در درمان انواع بیماری‌های کبدی، هپاتیت، دیابت، بیماری‌های قلب و عروق، سرطان، چربی خون و ... موثر است. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی کشت بافت گیاه خار مریم به منظور تولید سیلیمارین است. در تحقیق حاضر اثر هورمون‌های 2,4-D، Kin و NAA بر کالزایی قطعات جدا کشت ریشه، برگ و دم‌برگ مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت غلظت بهینه هورمون‌های بکاررفته جهت تولید سیلیمارین از قطعات جدا کشت نشان داده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، بالاترین درصد کالزایی (۹۸ درصد) در قطعات جدا کشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2,4-D و Kin دیده شد. همچنین استفاده از دو هورمون NAA و Kin نشان داد که بیشترین درصد کالزایی (۹۷ درصد) در قطعات جدا کشت ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر صورت می‌گیرد. رنگ کالوس‌های بدست آمده در اکثر تیمارها، زرد کم‌رنگ تا سبز کم‌رنگ بوده و ساختار فیزیکی آنها نرم بود. بیشترین درصد فلاونولیگنان (۱۴/۴ درصد) از قطعه جدا کشت ریشه در محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و Kin دیده شد. همچنین استفاده از دو هورمون NAA و Kin نشان داد که بیشترین درصد فلاونولیگنان (۹/۳۸ درصد) از قطعه جدا کشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: خار مریم، سیلیمارین، کشت بافت، هورمون، قطعه جدا کشت، فلاونولیگنان.

*مسئول مکاتبه: m.ghdasi@gu.ac.ir

مقدمه

گیاه خارمریم^۱ با نام انگلیسی *Milk thistle* گیاهی دو لپه‌ای، پیوسته گلبرگ، علفی و از خانواده آستراسه است. خارمریم، گیاهی یکساله بوده و در آب و هوای گرم با خاک سبک شنی می‌روید. ارتفاع ساقه متفاوت بوده و بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ سانتی‌متر است. برگها پهن و شکننده‌اند و در اوایل فصل رویش به شکل روزت بر روی زمین قرار می‌گیرند. دمبرگ‌ها بلند، بیضوی و خاردار می‌باشند (قهرمان، ۱۹۸۳). این گیاه در بعضی از مناطق ایران به صورت خودرو می‌روید. اهمیت دارویی این گیاه به دلیل حضور گروهی از فلاونولیگنان با نام سیلیمارین است. سیلیمارین ترکیبی از انواع فلاونوئیدها است که در آب نامحلول و در الکل محلول هستند. در بذرها گیاه خار مریم حدود ۴٪ سیلیمارین وجود دارد که شامل ۵ فلاونوئید با نام‌های سیلیبین آ و ب، سیلیادین، سیلی کریستین و دی‌هیدروسیلیبین است (سابرامانیم و همکاران ۲۰۰۸). سیلیبین ترکیب اصلی سیلیمارین (۵۰ تا ۶۰ درصد) است و بیشتر خواص بیولوژیکی سیلیمارین وابسته به حضور این ترکیب است (درمادروسیان، ۲۰۰۱؛ اسوکووسکی و همکاران، ۲۰۰۴). مطالعات صورت گرفته در مورد خواص دارویی این گیاه در پژوهشکده گیاهان دارویی بیانگر این مطلب است که این گیاه در درمان انواع بیماری کبدی، قلبی، سرطان و... موثر است (کروپاکووا، ۱۹۹۸). همچنین تحقیقات نشان داده است که عصاره هیدرو الکلی خارمریم در پیشگیری از آترواسکلروز موثر است (گازاک و همکاران، ۲۰۰۷).

تاکنون گزارشات اندکی در ارتباط با تولید این ماده ارزشمند دارویی در شرایط کشت بافت انتشار یافته است. اصغری و سلیمان ریزی (۲۰۰۷) در نتایج تحقیقات خود بر روی تاثیر قندهای فروکتوز، گلوکز، ساکارز بر تولید فلاونولیگنان‌ها در کشت بافت این گیاه اعلام داشته‌اند که بیشترین میزان فلاونولیگنان در تیمار ۶ درصد قند تولید می‌شود. در تحقیقات دیگری استفاده از کشت سلول نیز برای تولید سیلیمارین در گیاه خارمریم گزارش شده است (کاجو و همکاران، ۱۹۹۹). در این گزارش آمده است که حضور عناصر غذایی نظیر KNO_3 و KH_2PO_4 و آهن برای تولید فلاونولیگنان در شرایط کشت سلول خارمریم الزامی است. سانچز-سامپدرو و فرناندزتاراگو (۲۰۰۵) نیز در تحقیقات خود بر روی کشت سلول گیاه خارمریم نشان داده‌اند که با حذف یون کلسیم از محیط کشت سلول می‌توان محتوای فلاونولیگنان (سیلیمارین) را تا ۲۰۰ درصد افزایش داد.

1- *Sylibium marianum*

از طرفی دیگر برخی محققان پیشنهاد کرده‌اند که ریشه‌های موئن می‌توانند منبع مناسبی برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان باشد. تشکیل ریشه‌های موئن را می‌توان با تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاهان تحریک کرد (داکولکار و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر نیز گزارشاتی پیرامون تولید فلاونولیگنان دارویی خارمریم در ریشه‌های موئن گزارش شده است (آلیکاریس و همکاران، ۲۰۰۰؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۸). هدف از تحقیق حاضر بهینه‌سازی کشت بافت گیاه خارمریم به منظور افزایش میزان تولید فلاونولیگنان (سیلیمارین) در کالوس‌های تشکیل شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه استریل: بذور خارمریم پس از جمع‌آوری از منطقه گرگان و حومه ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در جریان آب شهر قرار گرفتند. در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس در آب‌ژاول ۳۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس بذرها ۵ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شستشو شدند. بذور استریل شده در محیط کشت پایه MS حاوی ساکارز (۳٪) و آگار (۱٪) با $\text{pH}=5/8$ کشت شدند (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲). شرایط اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه‌زنی و رشد بعدی در نظر گرفته شد. برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه استریل از شیشه‌های کوچک با طول ۱۵ سانتی‌متر که هر یک حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS بود استفاده شد. در هر شیشه ۶ عدد بذر استریل کشت گردید.

شرایط کشت: آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. اثرات اصلی شامل چندین تیمار هورمونی (غلظت‌های مختلف هورمون NAA ، $2,4\text{D}$ و Kin)، چندین سطح هورمونی (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر برای هورمون Kin و $2,4\text{-D}$ و ۱/۵، ۲، و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر برای هورمون NAA و Kin) و ۳ نوع قطعه جداکشت (ریشه، دم‌برگ و برگ) بود. پس از تولید گیاهچه استریل قطعات دم‌برگ و ریشه به اندازه تقریبی ۵-۸ میلی‌متر و برگ با اندازه تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های استریل به طول ۱۰ سانتی‌متری جدا شده و برای کالوس‌دهی در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت پایه MS با مقادیر مختلف هورمون‌های مذکور کشت شدند. شرایط اتاقک کشت برای تولید کالوس از قطعات جداکشت از نظر تناوب نوری، شدت نور و دمای نسبت به شرایط تولید گیاهچه استریل تغییری نداشت. برای هر تیمار هورمونی ۶ پتری‌دیش حاوی محیط کشت و در هر

ظرف ۶ قطعه جداگشت قرار داده شد. عملیات واگشت هر ۲۰ روز صورت گرفت. پس از ۲ ماه درصد کالزایی، شکل و اندازه ظاهری، وزن خشک و وزن تر، و رنگ کالوس‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور تعیین وزن خشک، کالوس‌ها به مدت ۵ روز در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روش سنجش درصد فلاونولیگنان (سیلیمارین): ۶۰ میلی‌گرم از کالوس‌های پودر شده داخل یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و با افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جوشانیده شد. سپس عصاره متانولی، روی بن‌ماری تا حجم ۳۰ میلی‌لیتری تغلیظ شده و پس از صاف‌کردن داخل یک بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. حجم محلول با متانول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک میلی‌لیتر از محلول حاصل به داخل یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شده و ۲ میلی‌لیتر از معرف ۲ و ۴ دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین به آن اضافه شد. پس از بستن درب بالن به مدت ۵۰ دقیقه بر روی بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از سرد کردن حجم بالن ژوژه با محلول پتاس الکی ۱۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اختلاط کامل، محلولی با رنگ قرمز تیره ایجاد شد. بعد از ۲ دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول حاصل به داخل یک لوله سانتی‌فیوژ ریخته شده و به آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و برای ۵ دقیقه سانتی‌فیوژ انجام شد. بعد از ۵ دقیقه، فاز رنگی جدا شده و داخل یک لوله آزمایش ریخته شد. به باقیمانده حاصل از سانتی‌فیوژ، ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و مجدداً برای ۵ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. سپس قسمت رنگی جدا و به محتویات بالن اضافه شد و جذب نهایی محلول در دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل محلول شاهد (متانول) در طول موج ۴۹۰ نانومتری اندازه‌گیری شد و درصد سیلیمارین طبق فرمول زیر محاسبه شد (قاسمی دهکردی و طالب، ۲۰۰۱).

$$\text{درصد سیلیمارین} = \frac{100 \times E \times 50 \times 100}{E^{1\%} \times 100 \times b} = \frac{2500E}{537b}$$

در این فرمول E جذب محلول نمونه و b گرم کالوس‌های خشک پودر شده مورد آزمایش می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها و جداول توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های تولید شده در تیمار هورمون‌های **Kin** و **2,4-D**: در این آزمایش از بین ۳۶ غلظت هورمونی مورد استفاده تنها در ۱۵ غلظت کالوس تشکیل شد و از بین این غلظت‌ها تنها در ۴ غلظت درصد کالزایی بالای ۵۰٪ بوده که از این کالوس‌ها جهت سنجش سیلیمارین استفاده شد. بررسی مورفولوژیکی کالوس‌های بدست آمده نشان داد که رنگ کالوس‌ها بر حسب غلظت‌های هورمونی مورد استفاده **Kin** و **2,4-D** از کرم تا سبز کم‌رنگ و سبز متفاوت بوده و کالوس‌های حاصله از نظر ساختاری نرم می‌باشند (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه اثر متقابل دو عامل قطعه جداگشت و غلظت‌های مختلف هورمونی نشان داد که بالاترین درصد کالزایی مربوط به قطعه جداگشت ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۱ میلی‌گرم در لیتر **2,4-D** بود (۹۸٪). در حالیکه بالاترین درصد کالزایی قطعه جداگشت برگ (۷۷/۳٪) در محیط‌کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **2,4-D** دیده شد. قطعه جداگشت دم‌برگ نیز در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **2,4-D** بالاترین درصد کالزایی (۸۲/۳٪) را نشان داد (شکل ۱). تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و قطعات جداگشت بر درصد کالزایی نشان می‌دهد که درصد کالزایی در قطعه جداگشت برگ تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد با قطعه جداگشت دم‌برگ و ریشه نشان داد. به علاوه بهترین درصد کالزایی در قطعه جداگشت برگ مشاهده می‌شود (شکل ۲).

اثر تیمارهای مختلف هورمون **2,4-D** و **Kin** بر وزن تر و خشک کالوس‌ها: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و قطعات جداگشت بر وزن تر کالوس نشان داد که فقط کالوس حاصل از قطعه جداگشت برگ در شرایط هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **2,4-D** افزایشی را در وزن تر نشان می‌دهد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت بین وزن تر کالوس حاصل از قطعه جداگشت برگ نسبت به کالوس حاصل از قطعات جداگشت دم‌برگ و ریشه از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. (شکل ۴). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس اثر قطعات جداگشت برگ، دم‌برگ و ریشه مربوط به وزن خشک کالوس‌های بدست آمده نشان داد که وزن خشک کالوس‌های حاصل از قطعات جداگشت دم‌برگ، برگ و ریشه نسبت به هم از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنادار نیست و اختلافی در وزن خشک آن‌ها مشاهده نمی‌شود.

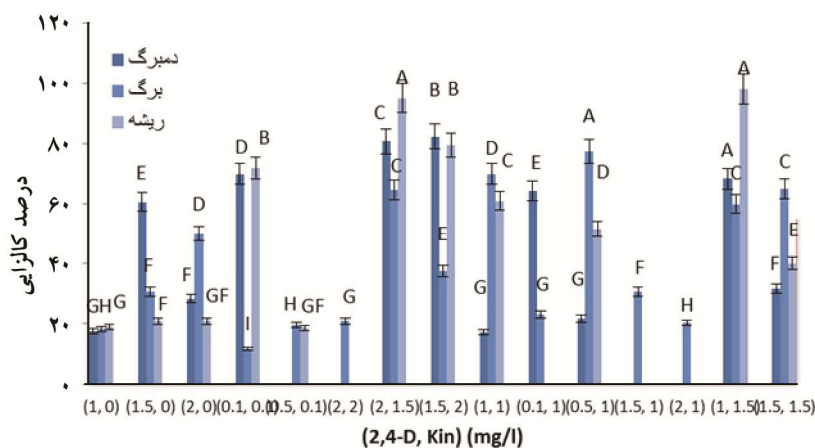
بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های تولید شده تحت اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های **Kin** و **NAA**: از بین غلظت‌های مختلف **Kin** و **NAA** مورد استفاده شده تنها در ۷ غلظت کالوس پدید آمد و از بین این غلظت‌ها تنها در ۱ غلظت درصد کالزایی ۹۷٪ بوده که از این کالوس‌ها جهت سنجش سیلیمارین استفاده شد. بطور کلی کالزایی در این تیمار هورمونی نسبت به تیمار هورمونی **Kin** و **2,4-D** نسبتاً ضعیف بوده و کالوس‌ها از لحاظ اندازه و شکل ظاهری کوچک‌تر بودند. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی نشان داد که رنگ کالوس‌های تولید شده بر حسب غلظت‌های هورمونی مورد استفاده **Kin** و **NAA** از کرم تا سبز کمرنگ متفاوت بوده و کالوس‌های حاصله از نظر ظاهری ساختاری نرم داشتند (جدول ۲).

مقایسه اثر نوع قطعه جداکشت بر درصد کالزایی در تیمار هورمونی **Kin** و **NAA** همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است قطعات جداکشت برگ، دم‌برگ و ریشه در محیط کشت‌های مختلف تظاهرات متفاوتی را نشان دادند. نتایج حاصل از مقایسه اثر متقابل دو عامل قطعه جداکشت و غلظت‌های مختلف هورمونی **Kin** و **NAA** بر درصد کالزایی نشان داده که بالاترین درصد کالزایی در قطعه جداکشت ریشه در غلظت هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و **NAA** (۹۷ درصد) دیده شده است. در حالی که بالاترین درصد کالزایی در قطعه جداکشت دم‌برگ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۲ میلی‌گرم در لیتر **NAA** (۳۳ درصد) بوده است. قطعه جدا کشت برگ نیز در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **NAA** (۵۰ درصد) بالاترین درصد کالزایی را نشان داده است (شکل ۵ و ۶). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و مقایسه میانگین اثر قطعات جداکشت بر درصد کالزایی نشان داد که درصد کالزایی در قطعات جداکشت دم‌برگ، برگ و ریشه نسبت به یکدیگر از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنادار بوده و بهترین درصد کالزایی در قطعه جداکشت ریشه مشاهده می‌شود (شکل ۷).

بررسی اثر تیمارهای مختلف هورمون **NAA** و **Kin** بر وزن‌تر و خشک کالوس‌ها: بررسی میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمار هورمونی **Kin** و **NAA** در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **NAA** نشان داد که قطعات جداکشت برگ بالاترین میانگین وزن تر (۸/۵۴ گرم) و وزن خشک (۰/۳۶ گرم) را نسبت به سایر غلظت‌ها داشته و قطعات جداکشت ریشه کمترین وزن تر (۰/۴۳ گرم) و وزن خشک (۰/۰۳ گرم) را داشته است (جدول ۳).

میزان فلاونولیگنان (سیلیمارین) از کالوس‌های تولید شده با تیمارهای هورمونی Kin و 2,4-D: نتایج حاصل از مقایسه اثر متقابل دو عامل قطعه جداکشت (دمبرگ، برگ و ریشه) گیاه خارمریم و غلظت‌های مختلف هورمونی Kin و 2,4-D بر درصد فلاونولیگنان نشان داده که بالاترین درصد فلاونولیگنان حاصل از قطعه جداکشت ریشه در غلظت هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱۴/۴۴ درصد) بوده است. در حالی که بالاترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداکشت دمبرگ در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۸/۶۲ درصد) دیده شده است (جدول ۴). نتایج حاصل نشان می‌دهد که اثر نوع قطعه جداکشت بر درصد فلاونولیگنان معنی‌دار می‌باشد (شکل ۸).

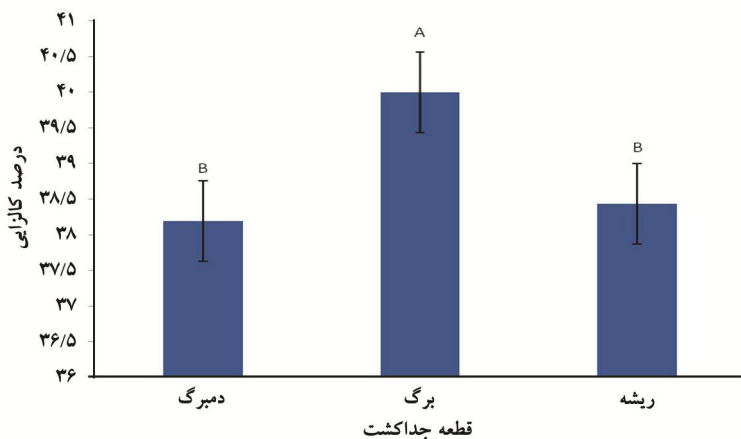
میزان فلاونولیگنان (سیلیمارین) در کالوس‌های حاصل از تیمار هورمونی Kin و NAA: نتایج حاصل نشان داد که در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون‌های گیاهی قطعه جداکشت ریشه در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان سیلیمارین (۹/۶۸ درصد) در قطعه جداکشت ریشه وجود دارد. درصد سیلیمارین قطعه جداکشت برگ و دمبرگ در این غلظت هورمونی با هم برابر و ۷/۷۵ درصد بوده است (جدول ۵).



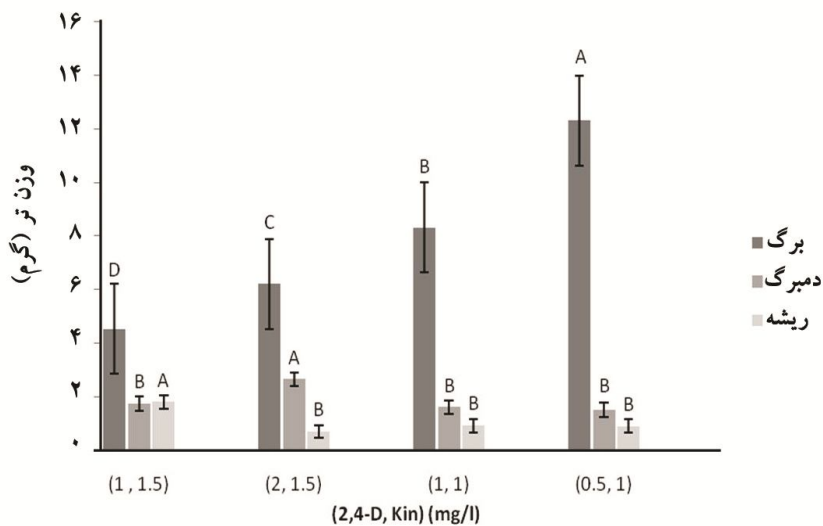
شکل ۱- درصد کالزایی قطعه جداکشت گیاه خارمریم در غلظت‌های مختلف هورمونی Kin و 2,4-D هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۱- ویژگی‌های مورفولوژیکی و درصد کالزایی قطعات مختلف گیاه خار مریم در تیمارهای 2,4-D و Kin
عناصت هر مورفون (2,4-D, Kin)

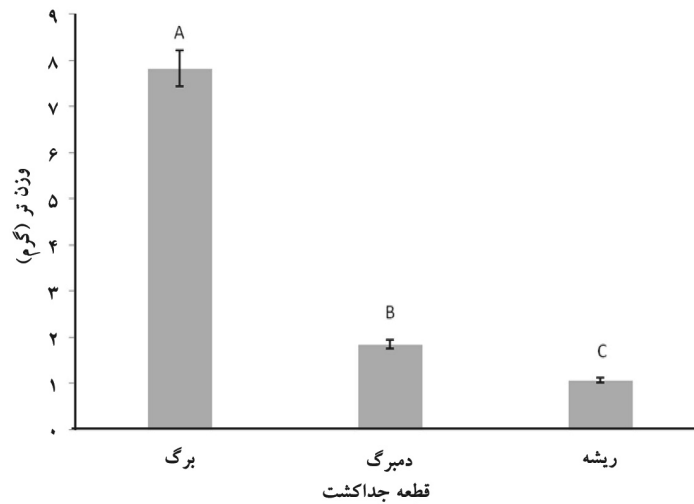
قطعه جداگشت	عناصت هر مورفون (2,4-D, Kin)													
	ویژگی	۱ و ۰	۱/۵ و ۰	۲ و ۰	۰/۱ و ۰/۱	۰/۵ و ۰/۱	۲ و ۲	۲ و ۱/۵	۱ و ۱	۰/۱ و ۰/۱	۰/۵ و ۰/۱	۱/۵ و ۰/۱	۲ و ۰/۱	۱ و ۱/۵
دمبرگ	رنگ	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	-	-	کرم	قهوه‌ای	سبز کمرنگ	کرم	کرم	کرم	کرم
	کالوس	کرم	کمرنگ	کرم	کرم	-	-	کرم	قهوه‌ای	سبز کمرنگ	کرم	کرم	کرم	کرم
	درصد کالزایی	۱۷/۷	۶۰/۷	۲۸/۳	۷۰	-	-	۸۰/۷	۱۷/۳	۶۴/۳	۲۱/۷	۳۰/۷	-	۶۳/۳
برگ	رنگ	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	کرم	سبز کمرنگ	سبز	-	سبز کمرنگ	کرم
	کالوس	کرم	کمرنگ	کرم	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	کرم	سبز کمرنگ	سبز	-	سبز کمرنگ	کرم
	درصد کالزایی	۱۸/۳	۳۰/۷	۵۰	۱۱	۲۰	۱۹	۶۴/۷	۷۰	۲۳	۷۷/۳	-	۲۰/۳	۶۰
ریشه	رنگ	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	-	-	-	کرم	کرم
	کالوس	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	-	کرم	کرم	-	-	-	کرم	کرم
	درصد کالزایی	۱۹	۲۱	۲۱	۱۹	۱۹	-	۹۵	۶۱	-	-	-	۹۸	۴۰



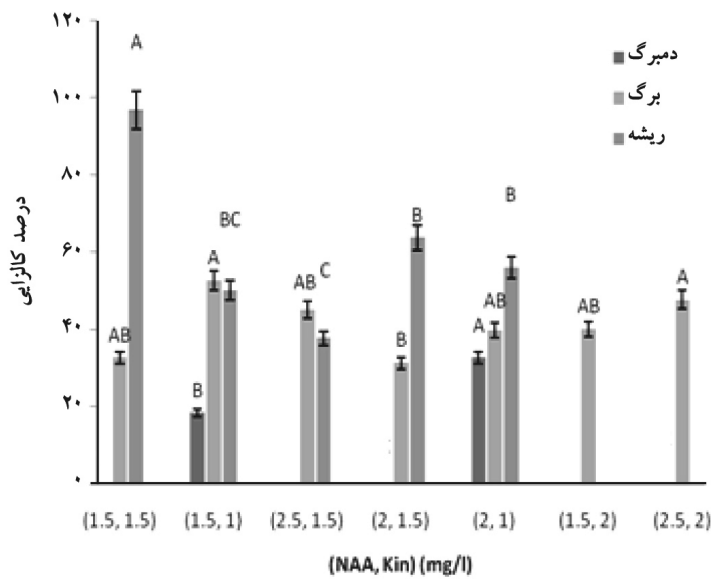
شکل ۲- مقایسه اثر نوع قطعه جداگشت گیاه خارمریم بر درصد کالزایی. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳- میانگین وزن تر کالوس حاصل از قطعات جداگشت در غلظت‌های مختلف هورمونی Kin و 2,4-D. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



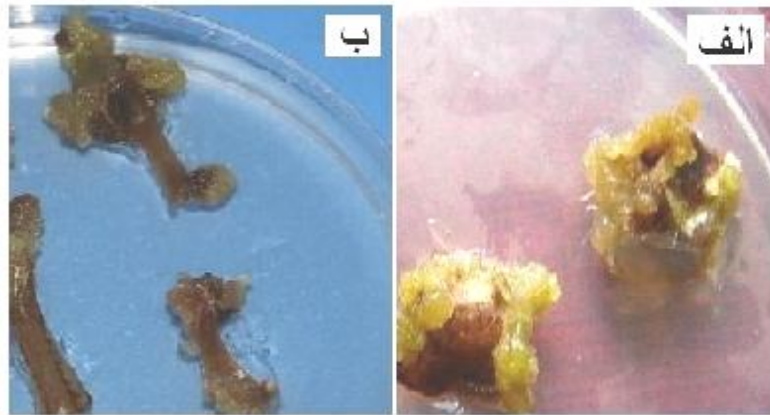
شکل ۴- مقایسه اثر قطعه جداگشت بر وزن تر کالوس. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده ها± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.



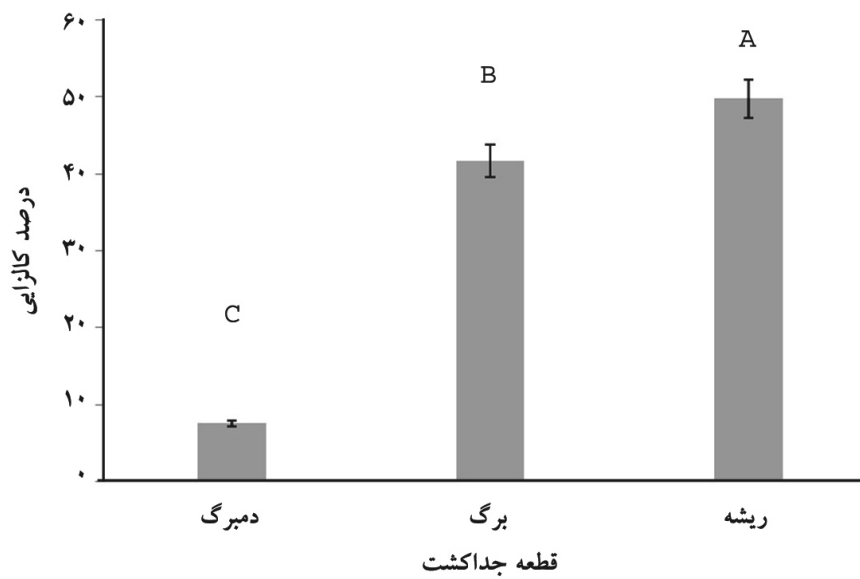
شکل ۵- درصد کالزایی قطعه جداگشت گیاه خارمریم در غلظت‌های مختلف هورمون NAA و Kin. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۲- ویژگی‌های مرفولوژیکی و درصد کالزایی حاصل از تیمارهای هورمونی Kin و NAA.

درصد کالزایی	رنگ کالوس	قطعه جدا کشت	غلظت هورمون (میلی‌گرم / لیتر)	
			NAA	kin
-	-	دمبرگ		
۳۳	سبز	برگ	۱/۵	۱/۵
۹۷	کرم	ریشه		
۱۸/۳	سبز	دمبرگ		
۵۰	سبز	برگ	۱/۵	۱
۵۰	کرم	ریشه		
-	-	دمبرگ		
۴۵	سبز	برگ	۲/۵	۱/۵
۳۸	کرم	ریشه		
-	-	دمبرگ		
۳۱	سبز	برگ	۲	۱/۵
۳۴	کرم	ریشه		
۳۳	کرم	دمبرگ		
۴۰	سبز	برگ	۲	۱
۵۰	کرم	ریشه		
-	-	دمبرگ		
۴۰	سبز	برگ	۱	۲
-	-	ریشه		
-	-	دمبرگ		
۴۸	سبز	برگ	۲/۵	۲
-	-	ریشه		



شکل ۶- کالوس‌های حاصل از قطعات جداگشت بر روی محیط کشت حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA از قطعات جداگشت الف) برگ و ب) دمبرگ.



شکل ۷- مقایسه اثر نوع قطعه جداگشت گیاه خارمریم بر درصد کالزایی. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

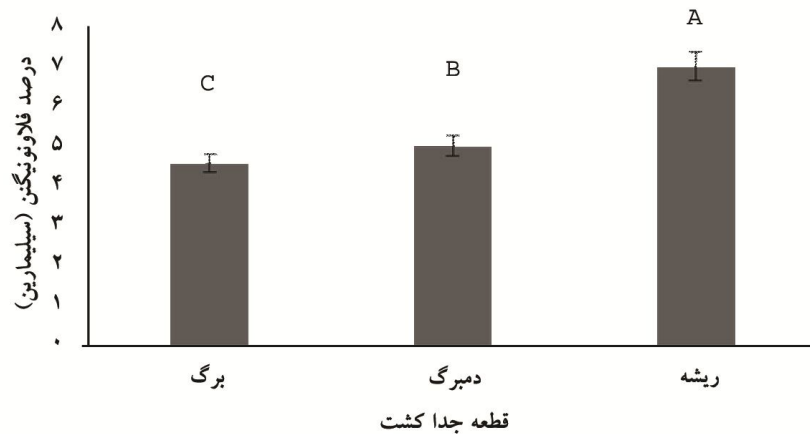
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی (۱۹)، شماره (۲) ۱۳۹۱

جدول ۳- میانگین وزن تر و خشک کالوس‌های حاصل از قطعه جداگشت (برگ، دمبرگ و ریشه) در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر **Kin** و **NAA**

وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	قطعه جداگشت
۰/۰۲	۰/۵۴	دمبرگ
۰/۳۶	۸/۵۴	برگ
۰/۰۳	۰/۴۳	ریشه

جدول ۴- درصد فلاونولیکتان در کالوس‌های حاصل از تیمار هورمون‌های **Kin** و **2,4-D**

درصد فلاونولیکتان	قطعه جداگشت	غلظت هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	
		Kin	2,4-D
۸/۱۱	دمبرگ		
۸/۲۶	برگ	۱	۰/۵
۱۴/۴۴	ریشه		
۲/۳۳	دمبرگ		
۲/۱۳	برگ	۱	۱
۲/۸	ریشه		
۷/۷۵	دمبرگ		
۴/۲۲	برگ	۱	۱/۵
۸/۲۴	ریشه		
۱/۹۳	دمبرگ		
۲/۴۳	برگ	۲	۱/۵
۲/۴	ریشه		



شکل ۸- مقایسه اثر قطعه جدا کشت بر درصد سیلیمارین. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۵- درصد فلاونوئیدگین (سیلیمارین) در کالوس‌های حاصل از تیمار هورمون‌های NAA و Kin.

درصد فلاونوئیدگین (سیلیمارین)	قطعه جدا کشت	غلظت هورمون (میلی‌گرم در لیتر)	
		NAA	Kin
۷/۷۵	دمبرگ		
۷/۷۵	برگ	۱/۵	۱
۹/۶۸	ریشه		

بحث

امروزه تحقیق در زمینه گیاهان دارویی اهمیت فوق العاده‌ای داشته که توجه محققان زیادی را به خود معطوف ساخته است. نظر به روند کند تولید مواد دارویی در گیاهان بسیاری از محققان به تکنیک کشت بافت روی آورده‌اند تا با استفاده از این روش ضمن کوتاه کردن چرخه تولید و افزایش راندمان محصول، از انقراض نسل این گیاهان در سطح کره زمین جلوگیری شود. یکی از این گیاهان با ارزش در زمینه گیاهان دارویی خارمریم است. این گیاه به لحاظ داشتن فلاونوئیدگین‌های دارویی اهمیت فوق العاده‌ای دارد. در این پژوهش سعی شده تا ضمن بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه، تولید فلاونوئیدگین‌های دارویی آن را افزایش دهیم.

از بین غلظت‌های مورد استفاده Kin و 2,4-D تنها در ۱۵ غلظت کالوس تشکیل شد و از بین این غلظت‌ها تنها در ۴ غلظت درصد کالزایی بالای ۵۰٪ بوده است. بررسی مورفولوژیکی کالوس‌های بدست آمده نشان داد که رنگ کالوس‌ها بر حسب غلظت‌های هورمونی مورد استفاده Kin و 2,4-D از کرم تا سبز کم‌رنگ و سبز متفاوت است. نتایج نشان داد که کالوس‌های سبز به دلیل آن‌که قادر به عمل فتوسنتز بوده و منبع کربن مورد نیاز خود را تامین می‌کنند رشد بهتری نسبت به کالوس‌ها با رنگ کرم دارند (احسانپور و امینی، ۲۰۰۳). ضمناً کالوس‌ها از نظر ساختار فیزیکی نرم بودند که این امر در کشت سلول این گیاه بسیار موثر است. چرا که سلول‌ها در کالوس‌های سخت در محیط کشت سلولی جدا نخواهند شد و این امر کشت سلول و استفاده از این تکنیک را در جهت بالا بردن مواد موثره دچار مشکل خواهد کرد (امیدبیگی، ۱۹۹۸). نتایج بدست آمده نشان داد که قطعات جداکشت برگ، دمبرگ و ریشه در محیط کشت‌های مختلف تظاهرات متفاوتی را نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی کشت بافت گیاهان مختلف نیز نشان داده که انواع مختلف قطعه جداکشت پاسخ‌های متفاوتی را در محیط کشت بافت بروز داده و درصد کالزایی متفاوتی را نشان می‌دهند (احسانپور و امینی، ۲۰۰۳). اصغری و سلیمیان (۲۰۰۷) در بررسی‌های مشابهی برای تولید کالوس از دانه‌رست خارمریم از هورمون‌های Kin و 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D موفق به تولید کالوس شدند. اما نتایج این تحقیق خلاف نتایج حاضر است. بطوری‌که، در غلظت هورمونی ذکر شده و غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ و ۰/۵ (غلظت‌های نزدیک به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin) میلی‌گرم در لیتر Kin هیچگونه کالزایی صورت نگرفت. این افراد در مقاله خود اشاره‌ای به نوع قطعه جداکشت نداشته و ممکن است این اختلاف به دلیل نوع قطعه جداکشت مورد استفاده باشد.

از بین غلظت‌های مورد استفاده از هورمون Kin و NAA تنها در ۱ غلظت درصد کالزایی بالای ۵۰٪ بوده است. بطورکلی کالزایی در این تیمار هورمونی نسبت به تیمار هورمونی Kin و 2,4-D نسبتاً ضعیف‌تر بوده و کالوس‌ها از لحاظ اندازه و شکل ظاهری کوچکتر بودند. با توجه به اینکه هورمون 2,4-D نسبت به هورمون NAA هورمون اکسینی قوی‌تری است، بنابراین طبیعی به نظر می‌رسد که با تیمار هورمونی NAA درصد کالزایی نسبتاً پایین باشد (پیری و همکاران، ۲۰۰۶).

اندازه گیری وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمار هورمونی Kin و NAA در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان می‌دهد که قطعات جداگشت برگ بالاترین میانگین وزن تر (۸/۵۴ گرم) و وزن خشک (۰/۳۶ گرم) را نسبت به سایر غلظت‌ها داشته و قطعات جداگشت ریشه کمترین وزن تر (۰/۴۳ گرم) و وزن خشک (۰/۰۳ گرم) را داشته است. بالا بودن وزن تر در کالوس‌های حاصل از قطعات جداگشت برگ را احتمالاً می‌توان به محتوای هورمونی درون آوندها نسبت داد. چرا که پدیده کالزایی در قطعات جداگشت به مجموع سطوح هورمونی درون زاد و برون زاد (هورمون‌های اضافه شده به محیط کشت) بستگی دارد (احسانپور و امینی، ۲۰۰۳).

نتایج حاصل از مقایسه اثر متقابل دو عامل قطعه جداگشت (دمبرگ، برگ و ریشه) گیاه خارمریم و غلظت‌های مختلف هورمونی Kin و 2,4-D بر درصد فلاونولیگنان نشان داده که بالاترین درصد فلاونولیگنان حاصل از قطعه جداگشت ریشه در غلظت هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱۴/۴۴ درصد) بوده است. در حالی که بالاترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداگشت دمبرگ در محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۷/۷۵ درصد) دیده شده است. قطعه جداگشت برگ نیز در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۸/۶۲ درصد) بالاترین درصد فلاونولیگنان را داشته است. نتایج حاصل از بررسی اثرات متقابل قطعات جداگشت بر درصد فلاونولیگنان نشان می‌دهد که قطعات جداگشت دمبرگ، برگ و ریشه نسبت به هم از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و بهترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداگشت ریشه مشاهده می‌شود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که اثر متقابل دو هورمون Kin و 2,4-D بر درصد فلاونولیگنان کالوس‌های حاصل از قطعات جداگشت ذکر شده معنی‌دار است. نتایج حاصل از تیمار هورمونی Kin و NAA نشان داد که در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون‌های گیاهی همانند تیمار هورمونی Kin و 2,4-D قطعه جداگشت ریشه (در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) بیشترین میزان فلاونولیگنان (سیلیمارین) (۹/۶۸ درصد) را دارد. درصد سیلیمارین قطعه جداگشت برگ و دمبرگ در این غلظت هورمونی با هم برابر و ۷/۷۵ درصد بوده است. رهنما و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که از قطعه جداگشت ریشه و نیز ریشه‌های موئین می‌توان جهت تولید سیلیمارین استفاده کرد. بطوریکه، تولید ریشه‌های موئین در گیاه خارمریم با

استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز^۱ به عنوان منبعی مهم برای تولید ترکیب دارویی سیلیمارین معرفی شد و بیانگر وجود پنج ترکیب فلاونولیکنانی تاکسی فولین، سیلی کریستین، سیلی دیانین، ایزوسیلی بین و سیلی بینین به ترتیب ۰/۰۰۹، ۰/۰۴۲، ۰/۰۴۱، ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود. از طرفی دیگر استفاده از جاسمونیک اسید و پیکلورام^۲ به عنوان پیش ساز در شرایط کشت سلول نیز نشان داده که میزان سیلیمارین تولید شده در شرایط کشت سلول کمتر از میزان تولید شده در بذره‌های گیاه خار مریم است (حسنلو و همکاران، ۲۰۰۸). بررسی تولید سیلیمارین در کالوس‌های تولید شده در شرایط کشت بافت نشان می‌دهد بالاترین درصد سیلیمارین در قطعات جداگشت ریشه به میزان ۱۴/۴۴ درصد وزن خشک مشاهده شده است. در حالیکه بالاترین درصد سیلیمارین در گیاه خارمریم رشد یافته در شرایط طبیعی در دانه‌های این گیاه وجود داشته که حدود ۳/۲۷۷ درصد وزن خشک دانه‌ها را تشکیل می‌دهد (حسنلو و همکاران، ۲۰۰۴). این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از کشت بافت می‌تواند روشی مفید در تولید و افزایش متابولیت ثانویه سیلیمارین باشد. در این خصوص قطعه جداگشت ریشه به عنوان بهترین قطعه در تولید سیلیمارین در شرایط کشت بافت پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به سبب پشتیبانی مالی نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Alikaridis, F., Papadakis, D., Pantelia, K. and Kephlas, T. 2000. Flavonolignan production from *Silybium marianum* transformed and untransformed root culture. *Fitotrap*. 71: 379-384.
2. Asghari, Gh. and Solimanrizi, T. 2007. the effects of fructose, glucose and sucrose on flavonolignans production in callus culture of *silybium marinum*. *Medicinal Plant J*. 6: 16-23.
3. Cacho, M., Maran, M., Corchet, P. and Frandeece-Tarrago, J. 1999. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *silybium marianum* (L) Gaertn. *Plant Sci*. 144: 63-68.

1- *Agrobacterium rhizogenes*

2- Picloram

4. Dermardersian, A. 2001. The review of natural products. 1st ed. Facts and comparisons. St. Louis. Pp: 405-409.
5. Dhkulkar, S., Bhrgva, S., Ganapathi, TR. and Bapat, VA. 2005. Induction of Hairy root in *Gmelina arborea* Roxb. Using *Agrobacterium rhizogenes*. Founders Dy Special Issue. 100-106.
6. Ehsanpoor, A. and Amini, F. 2003. Plant cell tissue culture. Isfahan Jihad Daneshgahi. 80-81.
7. Gazak, R., Kren, V. and Sedmera, P. 2007. Preventive effect of hydroalcoholic extract of *Silybum marianum* and *Fumaria vailanti* in athrosclerosis. *Pharmaceutical Sci.* 10: 29-34.
8. Ghahreman, A. 1983. *Flora Iranica*, 9: 1095
9. Ghasemi Dehkordi, N. and Talebi, AM. 2001. Extraction, Identification and quantification of components of medicinal plants. Chogan Publication. 132-137.
10. Hasanloo, T., khavari nejad, A., Majidi, E., Ziai SA. and Shams-Ardakani, MR. 2004. Determination of flavonolignan of dried fruits of *silybum marianum* (L) Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. *J. Medicinal Plants.* 4: 25-32.
11. Hasanloo, T., khavari nejad, A., Majidi, E. and Shams-Ardakani, MR. 2008. Flavonolignan production in cell suspension culture. *Phrmaceutial Biol.* 46: 876-882.
12. Kropacova, K. 1998. Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage. *Radiant Biol Radioecol.* 38: 411-5.
13. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473- 497.
14. Omidbigi R., 1998. An investigation on silymarin and silybin production in *silybium marianum* plantation via wild type seeds. *Iranian Agric Sci J.* 29: 413-421
15. Osuchoweski M.F., Johson V.J. and Sharma R.P. 2004. Alteration in regional brain neurotransmitters by silymarin a natural antioxidant flavonoid mixture in BALB/c mice. *Pharm. Biol.* 42: 384-389.
16. Piri Kh., Hasandokht M. and Abrishami R. 2006. Plant tissue culture guide. Marze Danesh Publication, Tehran.
17. Rahnema, H., Hasanloo, T., Shams Ardakani, MR., and Sepehrifar, R. 2008. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iran J. Biotechnol.* 6: 279-291.
18. Sanchez-Sampedro, M.A. and Fernandez-Tarrago, J. 2005. Enhanced silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Plant Physiol.* 11: 1-6.
19. Subramaniam, S., Vaughn, K., Carrier, D.J. and Clausen, E.C. 2008. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: an alternative to petroleum ether defatting. *Bioresour Technol.* 99: 2501-2506.



Optimization of *Silybum marianum* tissue culture for production of medicinal flavonolignan

S. Arekhi¹, *M. Aghdasi² and M. Khalafi³

¹M.Sc. student, Dept of Biology, Faculty of Science, Golestan University

³Assistant Prof., Dept of Biology, Faculty of Science, Golestan University

³Assistant Prof., Dept of Statistical, Faculty of Science, Golestan University

Abstract

The *Silybum marianum* is the dicotyledonous herbs of the Asteraceae Family that is important in medicinal industry. The biological active compound of *Silybum marianum* is a mixture of several flavonolignans generally known as the silymarin. These flavonolignans are used for treatment of various liver diseases, hepatitis, diabetes, heart diseases, cancer, blood cholesterol and etc. The purpose of this work was optimizing of *Silybium marianum* tissue culture for silymarin production. In the current work, the effect of 2,4-D, Kin and NAA hormones were investigated on callus formation in root, leaf and shoot explants. Finally the best hormone concentration was determined for silymarin production. The experiment performed in complete randomized test with three replicates. The results showed that the highest percentage of callus formation (%98) was observed at 1 & 1.5 mg/l of 2,4-D and Kin hormones in root explants. Also maximum percentage of callus formation (%97) was observed at 1.5 & 1.5 mg/l of NAA and Kin hormone treatment in root explants. In the most treatments, the color of callus was light yellow to light green and their physical structures were soft. Flavonolignan measurement showed that the maximum percentage of silymarin (14.4%) was observed at 0.5 & 1 mg/l of 2,4-D and Kin hormones in calluses from root explants. Meanwhile, the highest percentage of silymarin (9.68%) was achieved at 1.5 & 1 mg/l of of NAA and Kin in calluses from root explants.

Keywords: *Silybum marianum*; Silymarin; Tissue culture; Hormone; Explants; flavonolignan.

*Corresponding author; Email: m.ahdasi@gu.ac.ir

