مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد نوزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۱
http://jopp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی کشت بافت خارمریم به منظور تولید فلاونولیگنانان‌های دارویی

سلیمه آرخی[۱]، *مهناز اقدسی[۲] و مهناز خلفی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد 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 انوع بیماری‌های کبدی، هپاتیت، دیابت، بیماری‌های قلب و عروق، سرطان، چربی خون و ... موثر است. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی کشت‌بافت گیاه خارمریم به‌منظور 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-جداکشت نشان داده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، بالاترین درصد کال‌زایی (۹۸ درصد) در قطعات جداکشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون های 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 جداکشت ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر صورت می گیرد. رنگ کالوس‌های بدست آمده در اکثر تیمارها، زرد کمرنگ تا سبز کمرنگ بوده و ساختار فیزیکی آنها نرم بود. بیشترین درصد فلاونولیگنان (۱٤/٤ درصد) از قطعه جداکشت 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 (۹/٦۸ درصد) از قطعه جداکشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: خارمریم، سیلیمارین، کشت‌بافت، هورمون، قطعه جداکشت، فلاونولیگنان.

*مسئول مکاتبه: m.aghdasi@gu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه خارمریم[1] 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، 1983). این گیاه در بعضی از مناطق ایران به‌صورت خودرو می‌روید. اهمیت دارویی این گیاه به‌دلیل حضور گروهی از فلاونولیگنان با نام سیلیمارین است. سیلیمارین ترکیبی از انواع فلاونوئیدها است که در آب نامحلول و در الکل محلول هستند.در بذرهای گیاه خار مریم حدود ٤٪ سیلیمارین وجود دارد که شامل ۵ فلاونویید با نام‌های سیلیبین آ و ب، سیلیادین، سیلی‌کریستین و دی‌هیدروسیلیبین است (سابرامانیم و همکاران ۲۰۰۸). سیلیبین ترکیب اصلی سیلیمارین (۵۰ تا ٦۰ درصد) است و بیشتر خواص بیولوژیکی سیلیمارین وابسته به حضور این ترکیب است (دراردروسیان، ۲۰۰۱؛ اسوکووسکی و همکاران، ۲۰۰٤). 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 (کروپاکواو، 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 کشت‌بافت این گیاه اعلام داشته‌اند که بیشترین میزان فلاونولیگنان در تیمار ٦ درصد قند تولید می‌شود. در تحقیقات دیگری استفاده از کشت سلول نیز برای تولید سیلیمارین در گیاه خارمریم گزارش شده است (کاچو و همکاران، ۱۹۹۹). در این گزارش آمده است که حضور عناصر غذایی نظیر KH_2PO_4 و KNO_3 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 داده اند که با حذف یون کلسیم از محیط کشت سلول می‌توان محتوای فلاونولیگنان (سیلیمارین) را تا ۲۰۰ درصد افزایش داد.

1- *Sylibium marianum*

Archive of SID

www.SID.ir

از طرفی دیگر برخی محققان پیشنهاد کرده‌اند که ریشه‌های مویئن میتوانند منبع مناسبی برای تولید متابولیتهای ثانویه در گیاهان باشد. تشکیل ریشه‌های مویین را می‌توان با تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاهان تحریک کرد (داکولکار و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر نیز گزارشاتی پیرامون تولید فلاونولیگنان دارویی خارمریم در ریشه‌های مویین 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 قرارگرفتند. در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به‌مدت 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 محیط‌کشت پایه MS حاوی ساکارز (۳٪) و آگار (۱٪) با pH=۵/۸ کشت شدند (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲). شرایط اتاق‌کشت با دمای ۲±۲۵ 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 هریک حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS بود استفاده شد. در هر شیشه ۶ عدد بذر استریل کشت گردید.

شرایط کشت: آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. اثرات اصلی شامل چندین تیمار هورمونی (غلظت‌های مختلف هورمون 2,4D، NAA و Kin)، چندین سطح هورمونی (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر برای هورمون Kin و 2,4-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 ۸-۵ 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 مقادیرمختلف 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 محیط‌کشت و در هر

Archive of SID

www.SID.ir

ظرف ٦ قطعه جداکشت قرار داده شد. عملیات واکشت هر ۲۰ روز صورت گرفت. پس از ۲ ماه درصد کال‌زایی، شکل و اندازه ظاهری، وزن خشک و وزن‌تر، و رنگ کالوس‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور تعیین وزن خشک، کالوس‌ها به‌مدت ۵ روز در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روش سنجش درصد فلاونولیگنان (سیلیمارین): ٦۰ 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 ٦۰ 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 ۲و٤دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین 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 الکلی 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 سانتریفوژ ریخته شده و به آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و برای ۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. بعد از ۵ دقیقه، فاز رنگی جدا شده و داخل یک لوله آزمایش ریخته شد. به باقیمانده حاصل از سانتریفوژ، ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و مجددا برای ۵ دقیقه سانتریفوژ 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 ٤۹۰ نانومتری اندازه‌گیری شد و درصد سیلیمارین طبق فرمول زیر محاسبه شد (قاسمی دهکردی و طالب، ۲۰۰۱).

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

در این فرمول E جذب محلول نمونه و b گرم کالوس‌های خشک پودرشده مورد آزمایش می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها و جداول توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های تولید شده در تیمار هورمون‌های Kin و 2,4-D: در این آزمایش از بین ۳٦ غلظت هورمونی مورد استفاده تنها در ۱۵ غلظت کالوس تشکیل شد و از بین این غلظت‌ها تنها در ٤ 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 و2,4-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 جداکشت و غلظت‌های مختلف هورمونی نشان داد که بالاترین درصد کال‌زایی مربوط به قطعه جداکشت 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 جداکشت برگ (۷۷/۳٪) در محیط‌کشت‌های حاوی۱ میلی گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دیده شد. قطعه جدا کشت 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 جداکشت بر درصد کال-زایی نشان می‌دهد که درصد کال‌زایی در قطعه جداکشت برگ تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد با قطعه جدا کشت دمبرگ و ریشه نشان داد. به علاوه بهترین درصد کال‌زایی در قطعه جداکشت 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 جداکشت بر وزن‌تر کالوس نشان داد که فقط کالوس حاصل از قطعه جداکشت برگ در شرایط هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D افزایشی را در وزن‌تر نشان می‌دهد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت بین وزن‌تر کالوس حاصل از قطعه جداکشت برگ نسبت به کالوس حاصل از قطعات جداکشت دمبرگ و ریشه از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. (شکل ٤). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس اثر قطعات جداکشت برگ، دمبرگ و ریشه مربوط به وزن خشک کالوس‌های بدست آمده نشان داد که وزن خشک کالوس‌های حاصل از قطعات جداکشت دمبرگ، برگ و ریشه نسبت به هم از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنادار نیست و اختلافی در وزن خشک آن‌ها مشاهده نمی‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های تولید شده تحت اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های Kin و NAA: از بین غلظت های 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 نظرظاهری 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 حالی‌که بالاترین درصد کال‌زایی در قطعه جداکشت دمبرگ در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳۳ درصد) بوده است. قطعه جدا کشت برگ نیز در محیط‌کشت 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 ٦). 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).

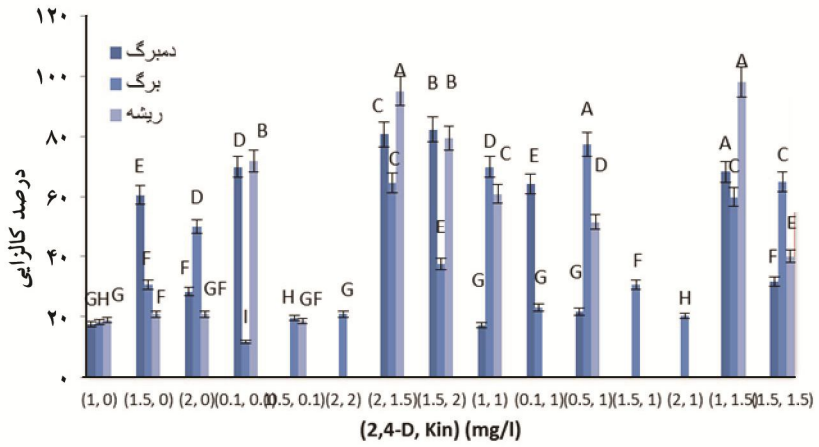
بررسی اثر تیمارهای مختلف هورمون NAA و Kin بر وزن‌تر و خشک کالوس‌ها: بررسی میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمار هورمونی Kin و NAA در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان داد که قطعات جداکشت برگ بالاترین میانگین وزن تر (۸/٥٤ گرم) و وزن خشک (۰/۳٦ گرم) را نسبت به سایر غلظت‌ها داشته و قطعات جداکشت ریشه کمترین وزن تر (۰/٤۳ گرم) و وزن خشک (۰/۰۳ گرم) را داشته است (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

میزان فلاونولیگنان (سیلیمارین) از کالوس‌های تولید شده با تیمارهای هورمونی Kin و2,4-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 (۱٤/٤٤ درصد) بوده است. در حالی‌که بالاترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداکشت دمبرگ در محیط‌کشت حاوی۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۸/٦۲ درصد) دیده شده است (جدول ٤). 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 (۹/٦۸ 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.

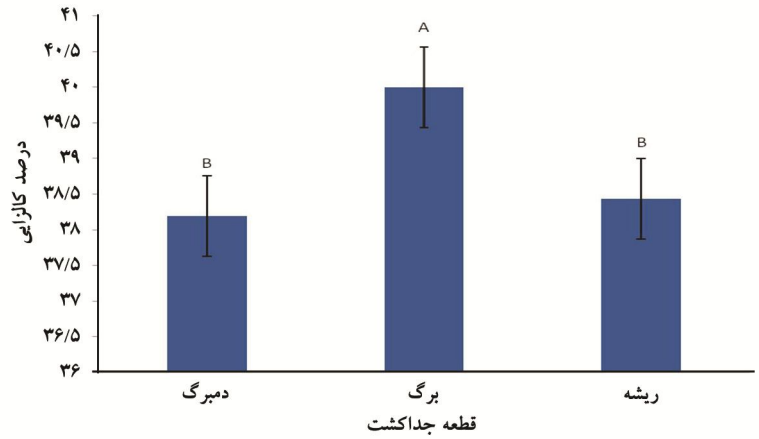
www.SID.ir

جدول ۱- ویژگی‌های مورفولوژیکی و درصد کالزایی قطعات مختلف گیاه خار مریم در تیمارهای 2,4-D و Kin.

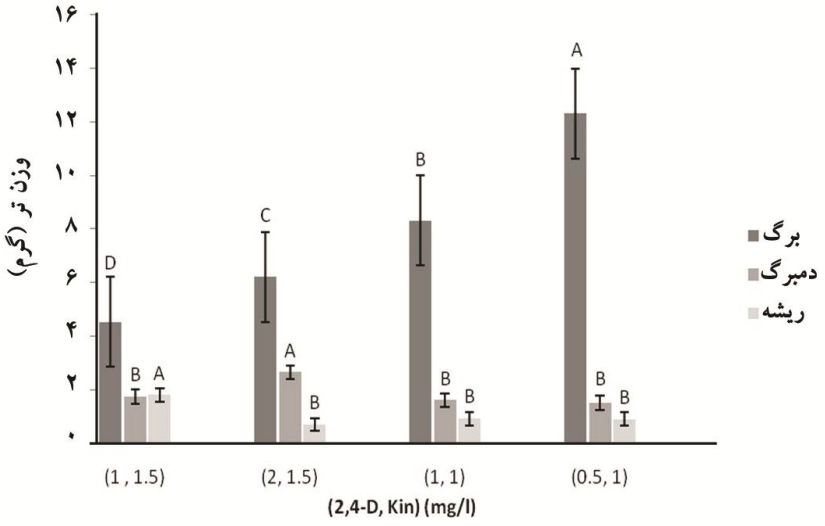
	غلظت هورمون (2,4-D, Kin)												
ویژگی	۰ و ۱	۰ و ۱/۵	۰ و ۲	۰/۱ و ۰/۱	۰/۵ و ۰/۱	۲ و ۲	۱/۵ و ۲	۲ و ۱/۵	۱ و ۱	۰/۱ و ۱	۰/۵ و ۱	۱/۵ و ۱	۲ و ۱	۱/۵ و ۱/۵	قطعه جداکشت
رنگ کالوس	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	-	-	کرم	سبز کمرنگ	قهوه‌ای	سبز کمرنگ	کرم	کرم	-	کرم	دمبرگ
درصد کالزایی	۱۷/۷	۶۰/۷	۲۸/۳	۷۰	-	-	۸۰/۷	۸۲/۳	۱۷/۳	۶۴/۳	۲۱/۷	۳۰/۷	-	۶۳/۳	
رنگ کالوس	کرم	سبز کمرنگ	کرم	کرم	سبز کمرنگ	سبز کمرنگ	کرم	کرم	کرم	سبز کمرنگ	سبز	-	سبز کمرنگ	کرم	برگ
درصد کالزایی	۱۸/۳	۳۰/۷	۵۰	۱۱	۲۰	۱۹	۶۴/۷	۳۷/۳	۷۰	۳۳	۷۷/۳	-	۲۰/۳	۶۰	
رنگ کالوس	کرم	کرم	کرم	کرم	کرم	-	کرم	کرم	کرم	-	-	-	-	کرم	ریشه
درصد کالزایی	۱۹	۲۱	۲۱	۱۹	۱۹	-	۹۵	۷۹/۳	۶۱	-	-	-	-	۹۸	
	۴۰	کرم	سبز	۶۵											

of SID

www.SID.ir

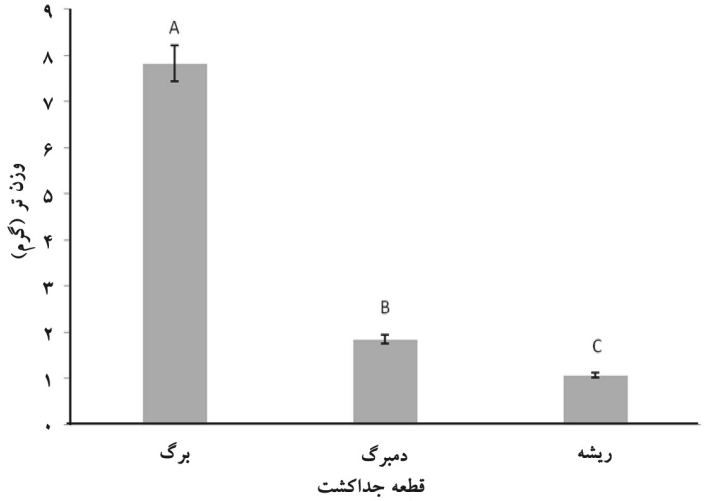


شکل ۲- مقایسه اثر نوع قطعه جداکشت گیاه خارمریم بر درصد کالزایی. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها±انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

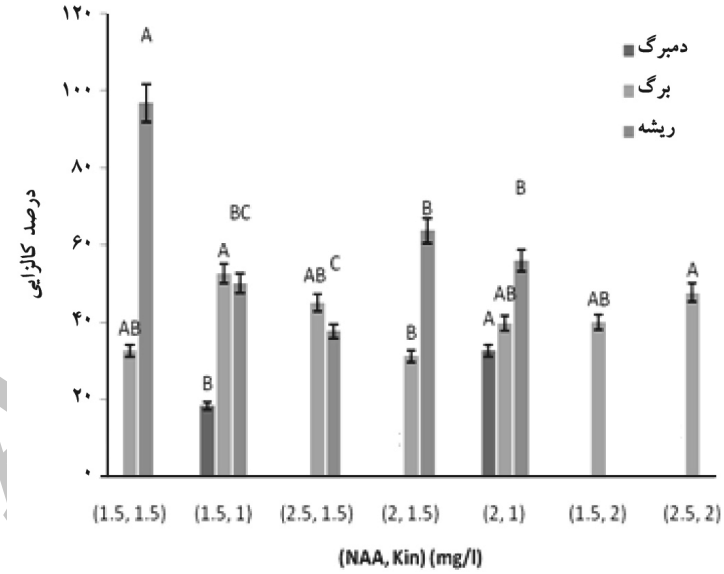


شکل ۳- میانگین وزن تر کالوس حاصل از قطعات جداکشت در غلظت‌های مختلف هورمونی **Kin** و **2,4-D**. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده ها± انحراف معیار است. ستون های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

www.SID.ir



شکل ٤- مقایسه اثر قطعه جداکشت بر وزن تر کالوس. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده ها± انحراف معیار است. ستون های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۵- درصد کال‌زایی قطعه جداکشت 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 معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

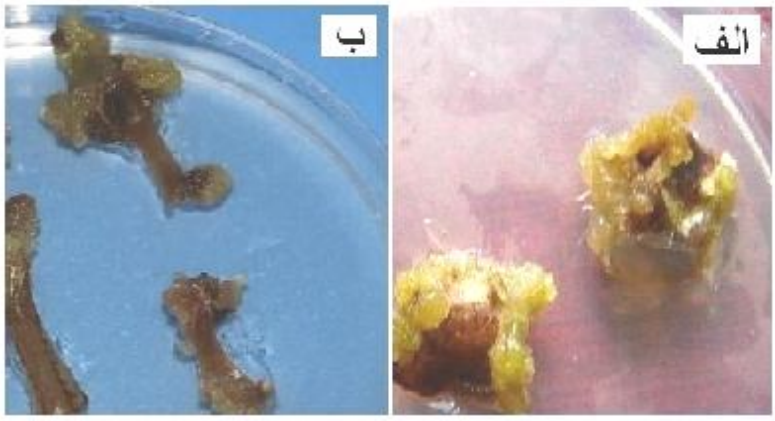
www.SID.ir

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

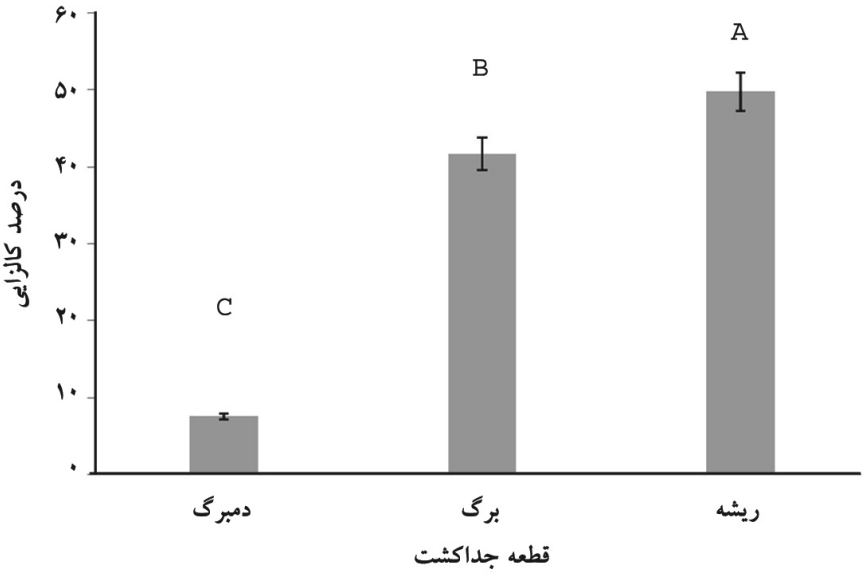
غلظت هورمون (میلی‌گرم/ لیتر)		قطعه جدا کشت	رنگ کالوس	درصدکالزایی
kin	NAA			
۱/۵	۱/۵	دمبرگ	–	–
		برگ	سبز	۳۳
		ریشه	کرم	۹۷
۱	۱/۵	دمبرگ	سبز	۱۸/۳
		برگ	سبز	۵۰
		ریشه	کرم	۵۰
۱/۵	۲/۵	دمبرگ	–	–
		برگ	سبز	٤۵
		ریشه	کرم	۳۸
۱/۵	۲	دمبرگ	–	–
		برگ	سبز	۳۱
		ریشه	کرم	۳٤
۱	۲	دمبرگ	کرم	۳۳
		برگ	سبز	٤۰
		ریشه	کرم	۵۰
۲	۱	دمبرگ	–	–
		برگ	سبز	٤۰
		ریشه	–	–
۲	۲/۵	دمبرگ	–	–
		برگ	سبز	٤۸
		ریشه	–	–

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٦- کالوس‌های حاصل از قطعات جداکشت بر روی محیط کشت حاوی ۱ و ۲میلی‌گرم در لیتر **Kin** و **NAA** از قطعات جدا کشت الف) برگ و ب) دمبرگ.



شکل ۷- مقایسه اثر نوع قطعه جداکشت 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.

www.SID.ir

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

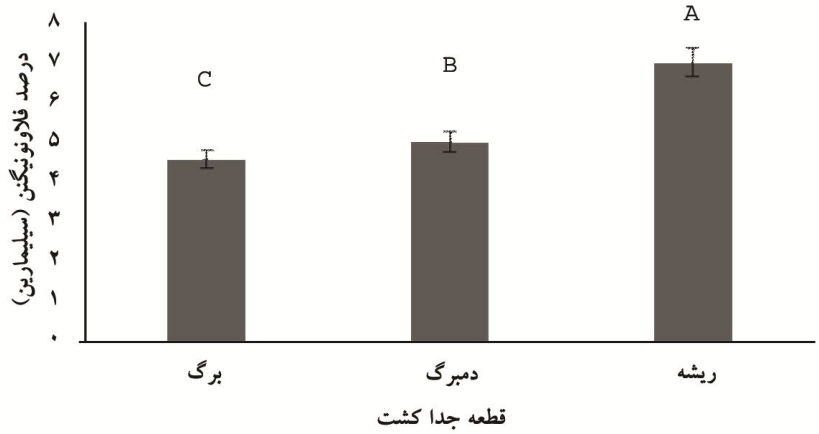
قطعه جدا کشت	وزن تر (گرم)	وزن خشک(گرم)
دمبرگ	۰/۵٤	۰/۰۲
برگ	۸/۵٤	۰/۳٦
ریشه	۰/٤۳	۰/۰۳

جدول ٤- درصد فلاونولیگنان در کالوس‌های حاصل از تیمار هورمون‌های 2,4-D و Kin .

غلظت هورمون (میلی گرم بر لیتر)		قطعه جدا کشت	درصد فلاونولیگنان
2,4-D	Kin		
		دمبرگ	۸/۱۱
۰/۵	۱	برگ	۸/۲٦
		ریشه	۱٤/٤٤
		دمبرگ	۲/۳۳
۱	۱	برگ	۲/۷۳
		ریشه	۲/۸
		دمبرگ	۷/۷۵
۱/۵	۱	برگ	٤/۲۲
		ریشه	۸/۲٤
		دمبرگ	۱/۹۳
۱/۵	۲	برگ	۲/٤۳
		ریشه	۲/٤

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۸- مقایسه اثر قطعه جداکشت بر درصد سیلیمارین. 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 ۵- درصد فلاونولیگنان (سیلیمارین) در کالوس‌های حاصل از تیمار هورمون‌های NAA و Kin .

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

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 فلاونولیگنانهای دارویی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. در این پژوهش سعی شده تا ضمن بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه، تولید فلاونولیگنان‌های دارویی آن را افزایش دهیم.

Archive of SID

www.SID.ir

از بین غلظت‌های مورد استفاده Kin و 2,4-D تنها در ۱۵ غلظت کالوس تشکیل شد و از بین این غلظت‌ها تنها در ٤ 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 به‌دلیل آن‌که قادر به‌عمل 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 نسبتا 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 نسبتا پایین باشد (پیری و همکاران، ۲۰۰٦).

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه گیری وزن‌تر و خشک کالوس‌ها در تیمار هورمونی Kin و NAA در غلظت ۱ و ۱/۵میلی‌گرم در لیتر NAA نشان می‌دهد که قطعات جداکشت برگ بالاترین میانگین وزن تر (۸/۵٤ گرم) و وزن خشک (۰/۳٦گرم) را نسبت به سایر غلظت‌ها داشته و قطعات جداکشت ریشه کمترین وزن تر (۰/٤۳ گرم) و وزن خشک (۰/۰۳ گرم) را داشته است. بالا بودن وزن‌تر درکالوس‌های حاصل از قطعات جداکشت برگ را احتمالا می‌توان به محتوای هورمونی درون آوندها نسبت داد. چرا که پدیده کال‌زایی در قطعات جداکشت 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 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 (۱٤/٤٤ درصد) بوده است. در حالی‌که بالاترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداکشت 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 جداکشت برگ نیز در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۸/٦۲ درصد) بالاترین درصد فلاونولیگنان را داشته است. نتایج حاصل از بررسی اثرات متقابل قطعات جداکشت بر درصد فلاونولیگنان نشان می‌دهد که قطعات جداکشت دمبرگ، برگ و ریشه نسبت به هم از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و بهترین درصد فلاونولیگنان در قطعه جداکشت ریشه مشاهده می‌شود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که اثر متقابل دو هورمون Kin و 2,4-D بر درصد فلاونولیگنان کالوس‌های حاصل از قطعات جداکشت 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 جداکشت ریشه (در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) بیشترین میزان فلاونولیگنان (سیلیمارین) (۹/٦۸ درصد) را دارد. درصد سیلیمارین قطعه جداکشت 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 جدا کشت ریشه و نیز ریشه‌های موئین می‌توان جهت تولید سیلیمارین استفاده کرد. بطوریکه، تولید ریشه‌های مویین در گیاه خارمریم با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز[1] به‌عنوان منبعی مهم برای تولید ترکیب دارویی سیلیمارین معرفی شد و بیانگر وجود پنج ترکیب فلاونولیگنانی تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌بینین به‌ترتیب ۰/۰۰۹، ۰/۰۴۲، ۰/۰۴۱، ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. از طرفی دیگر استفاده از جاسمونیک اسید و پیکلورام[2] 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 بذرهای گیاه خار مریم است (حسنلو و همکاران، ۲۰۰۸). بررسی تولید سیلیمارین در کالوس‌های تولید شده در شرایط کشت‌بافت نشان می‌دهد بالاترین درصد سیلیمارین در قطعات جداکشت ریشه به میزان ۱٤/٤٤ 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، ۲۰۰٤). این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از کشت بافت می‌تواند روشی مفید در تولید و افزایش متابولیت ثانویه سیلیمارین باشد. در این خصوص قطعه جداکشت 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. Fitotrapi. 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 Frarandece-Tarrago, J. 1999. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *silybum marianum* (L) Gaertn. Plant Sci. 144: 63-68.

1- *Agrobacterium rhizogenes*
2- Picloram

Archive of SID

www.SID.ir

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 Agrobcterium rhizogenes. Founders Dy Special Issue. 100-106.
6. Ehsanpoor, A. and Amini, F. 2003. Plant cell tissue culture. Isfahan Jehad Daneshgahi. 80-81.
7. Gazak, R., Kren, V. and Sedmera, P. 2007. Preventive effect of hydroalcholic 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 flavonolinan 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. Flavonolinan 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 marinum 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 neorotransmitters 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 19(2), 2012
http://jopp.gau.ac.ir

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

S. Arekhi[1], *M. Aghdasi[2] and M. Khalafi[3]
[1]M.Sc. student, Dept of Biology, Faculty of Science, Golestan University
[3]Assistant Prof., Dept of Biology, Faculty of Science, Golestan University
[3]Assistant 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.aghdasi@gu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir