بررسی صفات مرفولوژیکی و انباشت انواع فلاونولیگنان‌ها در گیاه خارمریم کشت شده و بومی ایران

طاهره حسنلو[1*]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[2]، اسلام مجیدی[3]

۱- استادیار پژوهشی، گروه فیزیولوژی و پروتئومیکس، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
۳- استاد پژوهشی، گروه فیزیولوژی و پروتئومیکس، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، ابتدای جاده ماهدشت، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی
تلفن: ۲۷۰۳۵۳٦ (۰۲٦۱)، نمابر: ۲۷۰٤٥۳۹ (۰۲٦۱)
پست الکترونیک: thasanloo@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸٤/۷/۱۷ **تاریخ تصویب:** ۸۵/۹/۸

چکیده

مقدمه: گیاه خارمریم (***Silybum marianum* (L.) Gaertn**) از دیرباز در درمان بیماری‌های کبدی استفاده می‌شده و میوه‌های فندقه این گیاه حاوی گروهی از ترکیبات فلاونوییدی است که به عنوان آنتی‌اکسیدانت کبد را محافظت می‌کنند و سیلی‌مارین نامیده می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه دارای نقش‌های حیاتی در اکوفیزیولوژی گیاهان بوده و در اثر تغییر عوامل محیطی از نظر کمی و کیفی تغییر می‌نمایند. بنابراین بایستی با تحقیقات مناسب و با استفاده از وسایل دقیق وکنترل شده اقدام به شناسایی عوامل مذکور نمود.

هدف: از آنجا که عوامل محیطی تاثیر بسیار عمده‌ای بر کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان دارند و به منظور شناخت عوامل موثر در تولید این متابولیت‌ها و کاربرد این اطلاعات در زمینه فیزیولوژی گیاهی بررسی این متابولیت‌ها در نمونه‌های بومی جمع‌آوری شده و کشت شده در شرایط کنترل شده صورت گرفت.

روش بررسی: دانه‌های این گیاه از نقاط مختلف کشور (شمال، غرب و جنوب غرب) جمع‌آوری شد و به همراه دانه‌های با منشا مجارستان در گل‌خانه کشت داده شدند. ویژگی‌های رویشی و فیزیولوژیکی در طی رشد بررسی شدند. سپس مقدار کمی و کیفی ترکیبات فلاونوییدی پس از استخراج از دانه‌های حاصله به روش **HPLC** بررسی شد.

نتایج: سیلی‌بین ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده سیلی‌مارین است و مقدار تجمع این ترکیبات در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق ایران بسیار بالاتر از نمونه‌های کشت شده در گل‌خانه است. به گونه‌ای که بالاترین مقدار تجمع سیلی‌مارین در دانه‌های مناطق برازجان، رودبارک و مجار بود که در هر دو شرایط کشت مقدار تجمع سیلی‌مارین در آن‌ها بالا بود. رابطه مثبت و معنی‌دار بین طول ساقه اصلی با قطر کپه اصلی در هر گیاه، تعداد شاخه‌های فرعی، تعداد کپه در هر گیاه و وزن هزار دانه با مقدار سیلی‌مارین استخراج شده وجود دارد.

نتیجه‌گیری: بر پایه تحقیقات انجام شده عوامل محیطی محل رویش گیاه خار مریم ضمن تاثیر بر و ویژگی‌های رویشی بر مقدار کمی و کیفی ترکیبات فلاونولیگنانی نیز تاثیر می‌گذارند.

گل‌واژگان: خارمریم، سیلی‌مارین، سیلی‌بین، تنوع

www.SID.ir

مقدمه

فلاونوییدها گروه خاصی از محصولات طبیعی، پلی‌فنلی و پانزده کربنی [۱] گیاهی هستند که از پیش‌سازهای مشتق از فنیل پروپانویید و استات تولید می‌شوند و موجب انواع اعمال فیزیولوژیکی و اکولوژیکی مختلف در گیاهان می‌شوند [۲]. سیلی‌مارین ترکیبی از فلاونوییدها است که از عصاره متانولی میوه‌های خشک شده (دانه) گیاه خارمریم (به میزان ٤ تا ٦ درصد) استخراج می‌شود [۳،٤،٥،٦]. چهار ماده شاخص موجود در عصاره متانولی دانه این گیاه شامل سیلی‌بین[1]، ایزوسیلی‌بین[2]، سیلی‌کریستین[3] و سیلی‌دیانین(SDN) هستند [٦،۷]. سیلی‌بین که به نام سیلی‌بینین نیز شناخته شده است، ترکیب اصلی (۷۰-۵۰ درصد) سیلی‌مارین از نظر کمی و خاصیت دارویی است [٤،۸،۹،۱۰] و بیشتر خواص بیولوژیکی سیلی‌مارین وابسته به حضور این ترکیب است. پژوهش‌های اخیر نشان داده که سیلی‌بین با حضور سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین دارای اثرات درمانی بیشتری است [۱۱،۱۲]. تاکسی فولین که از ترکیب فلاونوییدی نارینجنین مشتق می‌شود، پیش‌ساز در مسیر بیوسنتز سیلی‌بین است [٦،۱۲]. سیلی‌مارین یک داروی محافظ کبدی است که به طور وسیعی در درمان بیماری‌های مختلف کبدی (سیروز، هپاتیت ویروسی و سمی مزمن، کبد چرب و التهاب مجرای صفرا) استفاده می‌شود [٤].

خارمریم بومی اروپای غربی، مرکزی و شمال هند است و امروزه به طور خودرو در اروپای جنوبی، آفریقا، چین، استرالیا، آمریکای جنوبی و برخی قسمت‌های آفریقای شمالی، غرب و جنوب آسیا می‌روید [۱۳]. این گیاه در تمام مناطق شمال، شمال غربی، غرب، جنوب غرب و جنوب ایران می‌روید.

تحقیقات اخیر نشان داده که متابولیت‌های ثانویه دارای نقش‌های حیاتی در اکوفیزیولوژی گیاهان هستند [۱۲،۱٤]. اثر شرایط اکولوژیک بر گیاهان مختلف متفاوت است و همواره باید با تحقیقات مناسب و با استفاده از وسایل دقیق و کنترل شده اقدام به شناسایی عوامل مذکور بر مواد موثره گیاهان دارویی نمود. بر پایه تحقیقات انجام شده، عوامل محیطی محل رویش گیاهان دارویی به سه طریق بر آن‌ها تاثیر می‌گذارند: ۱- تاثیر در مقدار کلی مواد مؤثره گیاهان دارویی، ۲- تاثیر بر عناصر تشکیل‌دهنده مواد موثره ۳- تاثیر بر مقدار تولید وزن خشک گیاه. از مهم‌ترین عوامل محیطی رویش گیاهان دارویی که تاثیر بسیار عمده‌ای بر کمیت و کیفیت مواد موثره آن‌ها می‌گذارد می‌توان به نور، دمای محیط پیرامونی، آبیاری، ارتفاع محل، خاک و موجودات پیرامونی گیاه اشاره نمود [۱۵].

پژوهش‌های کشاورزی روی گیاهان دارویی به منظور توسعه ظرفیت برای رشد بهینه گیاه در هنگام کشت انجام می‌شود. این پژوهش‌ها بیشتر در مواقعی صورت می‌گیرد که گیاه دارویی بومی برداشت می‌شود و شرایط برای رشد در هنگام کشت بهینه نشده است و از طرفی برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی در رویشگاه های طبیعی امری نادرست بوده و موجبات کاهش تنوع زیستی و تنوع در کیفیت گیاهان دارویی شده و پیامدهای ناخرسندی را به دنبال دارد. بررسی در زمینه فیزیولوژی گیاهی و پژوهش‌های پایه‌ای روی شناخت گیاهان دارویی بسیار ضروری است [۱٤].

به این منظور دانه‌های این گیاه که از نواحی مختلف رویشی این گیاه در ایران جمع‌آوری شده بودند در گل‌خانه در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج کشت شده و ویژگی‌های رویشی و مقدار تجمع سیلی‌مارین آن‌ها بررسی شدند.

روش کار

جمع‌آوری و تهیه دانه‌های گیاه خارمریم

میوه‌های رسیده گیاه خارمریم (دانه) پس از رسیدگی کامل کپه‌ها در طی ماه‌های خرداد و تیر از نقاط مختلف ایران که این گیاه به صورت خودرو رویش می‌یابد، جمع‌آوری شدند (جدول شمارهٔ ۱). نمونه‌های گیاهی توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه تربیت معلم شناسایی و تایید شدند. دانه‌های اصلاح شده گیاه خارمریم با منشای مجارستان از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهیه شدند.

[1] SBN [2] ISBN [3] SCN

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱ – مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری دانه‌های گیاهان خارمریم.

شماره نمونه	ارتفاع (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	حداقل دما	حداکثر دما	حداقل رطوبت	حداکثر رطوبت
۱	۱۸۰۰	۳۶ ۱۴	۵۱ ۱۸	۲۴	۳۲	۶۱	۸۹
۲	۱۲۶۰	۳۶ ۲۶	۵۱ ۲۰	۲۲	۳۳	۶۰	۸۷
۳	۱۱۸۰	۳۶ ۲۹	۵۱ ۷	۲۴	۳۱	۵۸	۹۰
۴	۱۰۴۰	۳۶ ۳۱	۵۱ ۱۵	۲۳	۳۴	۵۷	۸۸
۵	۸۳۰	۳۶ ۲۳	۵۱ ۱۸	۲۲	۳۲	۵۷	۸۸
۶	۴۶۰	۳۶ ۲۷	۵۱ ۱۸	۲۲	۳۰	۵۹	۹۰
۷	۴۰۰	۳۶ ۲۸	۵۱ ۲۱	۲۳	۳۳	۵۹	۸۹
۸	۱۰۰۰	۳۶ ۱۵	۵۱ ۱۸	۲۵	۳۰	۶۰	۸۵
۹	۱۵۶۰	۳۳ ۲۹	۴۸ ۲۲	۱۶	۳۷	۱۰	۴۳
۱۰	۱۲۰	۳۱ ۲۰	۴۸ ۴۰	۲۵	۳۹	۹	۲۱
۱۱	۸۳۰	۲۹ ۳۶	۵۲ ۳۲	۱۸	۳۶	۱۸	۵۱
۱۲	۱۱۰	۲۹ ۲۰	۵۱ ۱۷	۲۲	۲۶	۶۰	۸۲
۱۳	۶۰	۲۸ ۵۹	۵۰ ۵۰	۲۹	۳۹	۶۱	۹۳
۱۴	۱۵۲۰	۳۵ ۵۲	۵۰ ۵۹	۲۲	۳۷	۱۰	۵۵

بذرهای ناحیه ۸–۱ از مناطق ولی‌آباد، هزارچم، رودبارک، بنفشه‌ده، ولشت، مرزن‌آباد، حسن‌آباد، ولی‌آباد (استان مازندران)؛ ناحیه۹، خرم‌آباد (استان لرستان)؛ ۱۰، ناحیه اهواز (استان خوزستان)؛ ۱۱، کازرون (استان فارس)؛ ۱۲ و ۱۳، از برازجان و بوشهر (استان بوشهر)؛ ۱۴، کرج (گلخانه).

کشت بذور جمع‌آوری شده در شرایط کنترل شده (گل‌خانه)

کلیه بذور در طی ماه اسفند در گل‌خانه‌ای واقع در محوطه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج کشت شدند. دمای گل‌خانه ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد در طی روز و ۱±۱۷ درجه سانتی‌گراد در طی شب، رطوبت حدود ۷۰ درصد، مقدار نور هنگام ظهر حدود $800\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برقرار بود.

هر بذر در یک گلدان منفرد (با قطر دهانه ۴۰ سانتی‌متر و در عمق ۳–۲ سانتی‌متر) کشت شد. مقدار آبیاری گلدان‌ها بر حسب نیاز گیاه و حدوداً ۲ بار در هفته انجام شد و تعداد ۵ گلدان به هر نمونه اختصاص داده شد.

مشاهدات و نمونه‌برداری

مقدار رشد گیاهان گل‌خانه‌ای به فاصله هر ۷ روز اندازه‌گیری شد. مقدار رشد طولی، تعداد شاخه‌های فرعی، تعداد کپه و قطر کپه یادداشت شد. دانه‌ها در اواخر تیرماه پس از رسیدگی کامل کپه‌ها و ظهور دانه‌ها در سطح کپه جمع‌آوری شدند، سپس وزن هزار دانه محاسبه شد و جهت آنالیز فلاونولیگنان‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج فلاونولیگنان‌ها از دانه‌های گیاه خارمریم

به منظور استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های جمع‌آوری شده گیاهان خارمریم و دانه‌هایی که در کرج و در شرایط گل‌خانه کشت شده بودند، مقدار ۳ گرم در داخل یک هاون چینی ساییده شدند، سپس جهت روغن‌گیری به مدت ۱۰ ساعت در حلال پترولیوم اتر در سوکسله گذاشته شدند. پس از جداسازی روغن، نمونه‌ها کاملاً خشک شده و به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از متانول جهت استخراج سیلی‌مارین در دستگاه سوکسله قرار گرفتند. محلول متانولی زرد رنگ حاصل به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از تبخیر متانول پودر زردرنگی به دست آمد. پودر حاصل با متانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جهت بررسی کیفی و کمی فلاونولیگنان‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۲،۱۴].

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه‌گیری فلاونولیگنان‌های عصاره متانولی دانه‌های گیاه خار مریم به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

به منظور بررسی دقیق‌تر و تعیین کمی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده شد [۱۶،۱۷،۱۸]. این دستگاه از کارخانه Knauer شامل پمپ K1001، دتکتور UV مدل K2501، اتوسمپلر Marathon و نرم‌افزار Chromgate بود. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با فاز متحرک متانول (مرک)، استونیتریل (مرک) و آب [۱۹] و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C18 به قطر ذرات 5µ و ابعاد ٤/٦ × ۱۵۰ میلی‌متر عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و شناسایی شدند. کل زمان هر تجزیه ۳۰ دقیقه بود. زمان خروج منحنی‌های مربوط به ترکیبات فلاونولیگنان در مقایسه با سیلی‌مارین استاندارد (سیگما) مقایسه شده و مقادیر هر یک بر اساس منحنی استاندارد سیلی‌بین استاندارد محاسبه گردید (شکل شماره ۱) [۱۹].

برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SAS استفاده شد و اختلاف آماری در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد محاسبه گردید.

نتایج

نتایج آماری ویژگی‌های رویشی گیاهان خارمریم کشت شده در گل‌خانه

مقایسه عملکرد در بوته

با توجه به نمودار شماره ۱ و عملکرد بر حسب تعداد دانه در سطح خطای ۵ درصد بین نمونه‌های مختلف کشت شده اختلاف معنی‌دار وجود داشت و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تمامی نمونه‌ها از نظر آماری در یک گروه قرار نمی‌گیرند. بالاترین تعداد دانه مربوط به نمونه‌های حسن‌آباد (۷)، مجار (١٤)، بنفشه ده (٤) و برازجان (۱۲) بود. پایین‌ترین تعداد دانه مربوط به نمونه‌های هزارچم (۲) و ولی‌آباد (۸) بود و تعداد دانه در واحد بوته در نمونه‌های خرم‌آباد (۹) اهواز (۱۰) و کازرون (۱۱) تفاوت چندانی نداشت.

مقایسه وزن هزار دانه نمونه‌ها

براساس تجزیه و تحلیل آماری عملکرد برحسب وزن هزاردانه اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های مختلف (در سطح خطای ۵ درصد) وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که نمونه‌های مربوط به منطقه کازرون (۱۱) و برازجان (۱۲) دارای بالاترین میانگین بوده و حداقل میانگین وزن در نمونه‌های ولی‌آباد (۸) و خرم‌آباد (۹) وجود داشت (نمودار شمارهٔ ۱). وزن هزار دانه در نمونه‌های هزارچم (۲) و ولی‌آباد (۱) نسبت به نمونه‌های مربوط به مناطق بنفشه ده (٤) و حسن‌آباد (۷) تفاوت معنی‌دار داشت و سایر نمونه‌ها از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند.

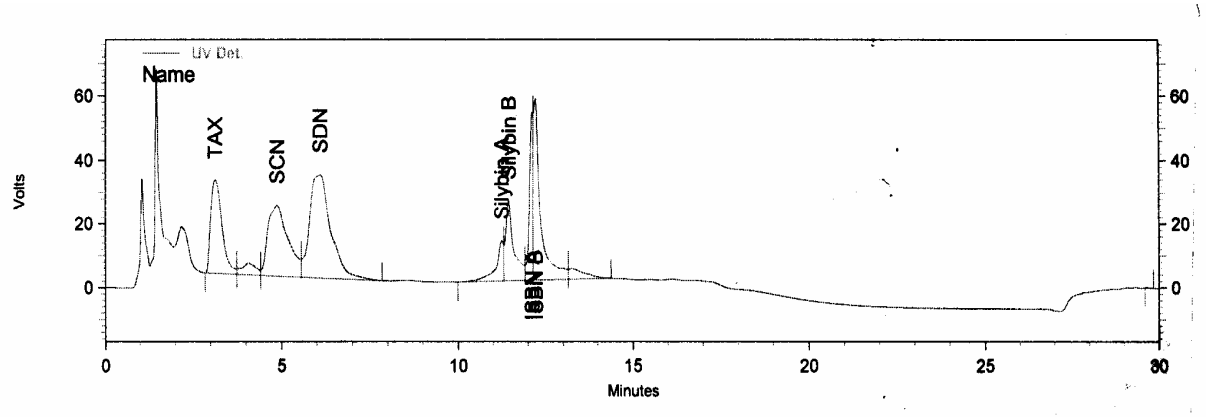
مقایسه طول شاخه اصلی در بوته

در تجزیه و تحلیل عملکرد بر حسب طول شاخه اصلی بین نمونه‌های مختلف در سطح خطای ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت، به گونه‌ای‌که گیاهان خارمریم که منشاء آن‌ها مربوط به منطقه کازرون (۱۱) بود دارای بالاترین میانگین طول شاخه اصلی بودند و گیاهان با منشاء ولی‌آباد (۸) حداقل میانگین را به خود اختصاص دادند. میانگین طول شاخه اصلی در نمونه‌های گیاهی با منشاء مجار ٦۰ سانتی‌متر بود که نسبت به نمونه‌های مجار رشد کرده در کرج (٤۸ سانتی‌متر) بالاتر بود ولی از نظر آماری در یک گروه طبقه‌بندی می‌شدند (نمودار شمارهٔ ۲).

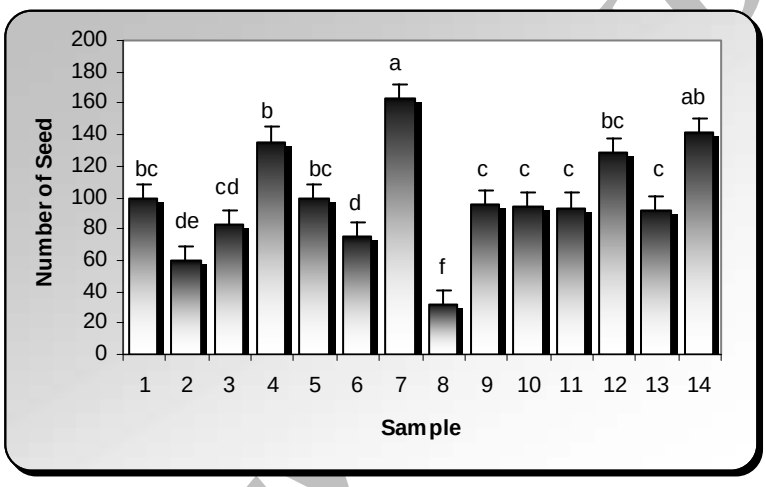
مقایسه تعداد شاخه‌های فرعی در بوته

نتایج آماری و گروه‌بندی میانگین‌ها در سطح خطای ۵ درصد نشان داد که بین نمونه‌های گیاهان خارمریم کشت شده در گلخانه که دانه‌های آن‌ها از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شده بود از نظر تعداد شاخه فرعی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به گونه‌ای‌که بالاترین تعداد شاخه فرعی در نمونه‌های با منشاء خرم‌آباد (۹) و نمونه‌های حسن‌آباد دیده شد و حداقل تعداد شاخه در نمونه‌های ولی‌آباد (۸) وجود داشت. تعداد شاخه فرعی در نمونه‌های مربوط به مناطق هزارچم (۷)، اهواز (۱۰)، بوشهر (۱۳)، ولی‌آباد (۱) و رودبارک (۳) بسیار پایین‌تر از نمونه‌های مربوط به مناطق خرم‌آباد (۹) و حسن‌آباد (۷) بود (نمودار شمارهٔ ۲).

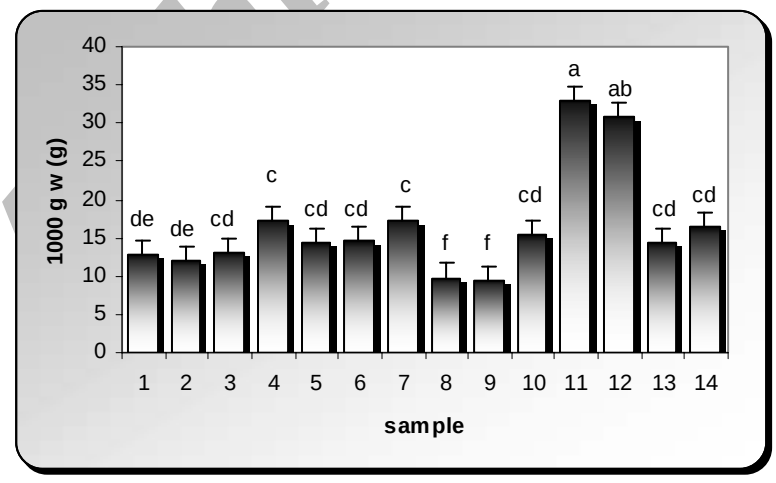
Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱ – کروماتوگرام عصاره متانولی استخراج شده از دانه‌های کشت شده در گلخانه با منشاء رودبارک به روش HPLC



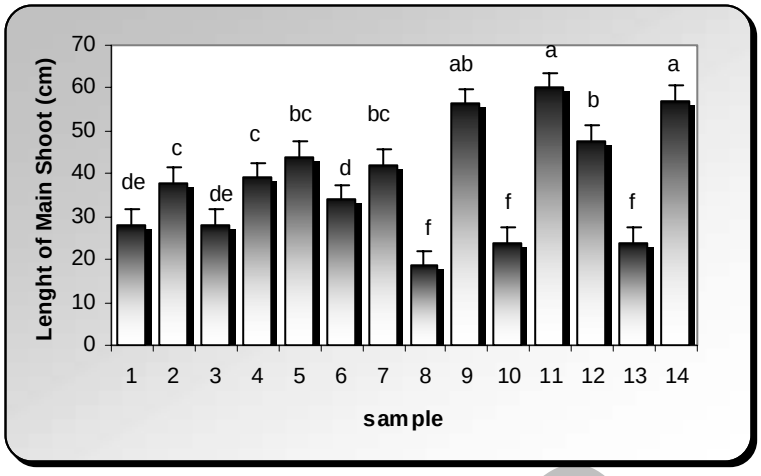
(۱)



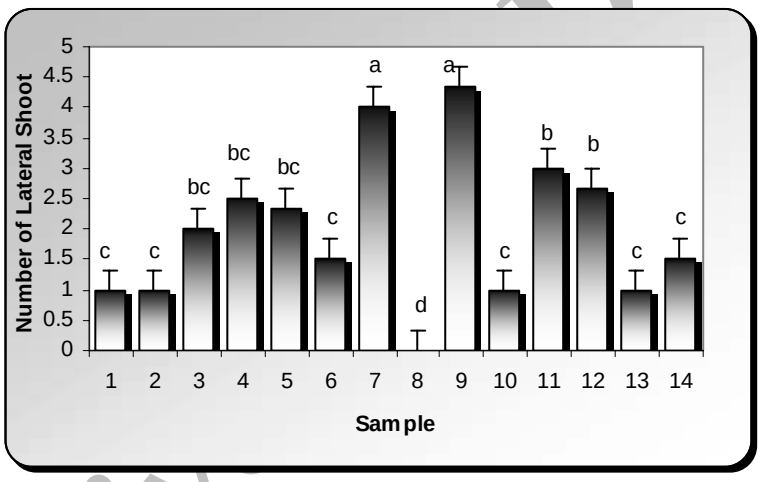
(۲)

نمودار شماره ۱ – تعداد دانه تولید شده (۱) و وزن هزار دانه (۲) در گیاهان خارمریم کشت شده در گلخانه (شماره نمونه‌ها بر اساس جدول شماره ۱)

www.SID.ir



(۱)



(۲)

نمودار شماره ۲ – طول شاخه اصلی (۱) و تعداد شاخه فرعی (۲) گیاهان خارمریم کشت شده در گلخانه (شماره نمونه‌ها بر اساس جدول شماره ۱)

مقایسه تعداد کپه‌ها در بوته

نتایج آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گیاهان خارمریم کشت شده در گلخانه از نظر میانگین تعداد کپه ظاهر شده وجود داشت و بالاترین تعداد کپه مربوط به نمونه‌های حسن‌آباد (۷) بود. حداقل تعداد کپه در نمونه‌های هزارچم (۲) و ولی‌آباد (۸) دیده شد (نمودار شمارهٔ ۳). تعداد کپه مشاهده شده در هر بوته در نمونه‌های ولی‌آباد(۱)، هزارچم (۲)، بوشهر (۱۳)، ولی‌آباد (۸) و مجار (۱٤) تفاوت معنی‌دار نداشت و کمترین تعداد کپه در این نمونه‌ها مشاهده شد.

مقایسه قطر کپه اصلی

نتایج آماری نشان داد که بین گیاهان خارمریم رویش یافته در شرایط گلخانه‌ای که دارای منشاء مختلف بودند از نظر قطر کپه‌های ظاهر شده بر روی ساقه در سطح خطای ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گیاهان خارمریم با منشاء خرم‌آباد (۹) دارای بیشترین مقدار میانگین قطر کپه (۳/٦٦ سانتی‌متر) و حداقل میانگین مربوط به گیاهان خارمریم با منشاء مرزن‌آباد (٦) بود. گیاهان خارمریم مجاری (۱٤) که در کرج رویش یافتند نسبت به نمونه‌های مجاری

www.SID.ir

که در گلخانه رشد کردند دارای قطر کپه بالاتری بودند ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند (نمودار شماره ۳).

بررسی کیفی و کمی ترکیبات فلاونوییدی دانه‌های حاصل از کشت گلخانه‌ای به روش HPLC

بالاترین مقدار تجمع سیلی مارین در نمونه مجاری کشت شده در گلخانه دیده می‌شود (٤/۲۷۸ میلی‌گرم در گرم ماده خشک). نمونه‌های با منشاء خرم‌آباد دارای ۲/۱۱٤ میلی‌گرم در گرم ماده خشک از سیلی مارین بوده و نمونه‌های مربوط به کازرون، برازجان، رودبارک، ولشت، اهواز و حسن‌آباد به ترتیب دارای ۱/۹۰۹، ۱/۵۹۰، ۱/٤٦٥، ۱/۳۷۷، ۱/۳۲۰ و ۱/۱٤٥ میلی‌گرم در گرم ماده خشک (میوه‌های خشک شده یا دانه‌های خار مریم) از سیلی‌مارین بودند. سایر مناطق از جمله دانه‌های مربوط به مناطق بنفشه ده، مرزن‌آباد، بوشهر، هزارچم، ولی‌آباد (ارتفاع ۱۸۰۰ و ۱۰۰۰ متر) دارای مقادیر بسیار کمی از سیلی‌مارین بودند (جدول شمارهٔ ۲).

بالاترین مقدار تجمع تاکسی فولین در دانه‌های مربوط به مناطق خرم‌آباد (۰/۲۳۱)، کازرون (۰/۲۰۸) و مجار بود که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند. دانه‌های مربوط به سایر مناطق از جمله برازجان، رودبارک، ولشت، اهواز، بنفشه ده، حسن‌آباد و ولی‌آباد (ارتفاع ۱۰۰۰ متر) به ترتیب دارای ۰/۱۵۲، ۰/۱٤۸، ۰/۱٤۲، ۰/۱٤۰، ۰/۱۲۸، ۰/۱۱٦ و ۰/۱۰۸ میلی‌گرم در گرم ماده خشک از ترکیب تاکسی فولین بودند (جدول شمارهٔ ۳).

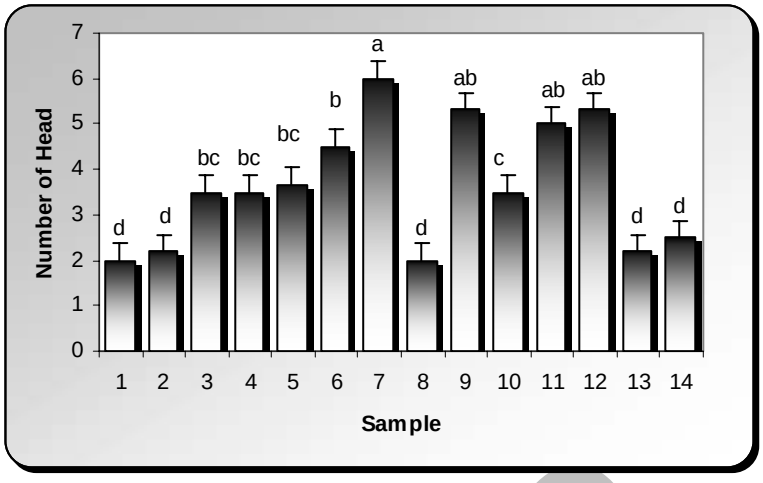
دانه‌های مربوط به مناطق مرزن‌آباد، هزارچم و بوشهر دارای مقادیر بسیار کمی از تاکسی فولین بودند که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند(جدول شمارهٔ ۳) و کمترین مقدار تجمع تاکسی فولین در دانه‌های مربوط به مناطق ولی‌آباد با ارتفاع ۱۸۰۰ متر دیده شد. دانه‌های با منشاء مجار دارای بالاترین مقدار تجمع سیلی مارین و سیلی‌کریستین نسبت به سایر مناطق بودند. دانه‌های مناطق خرم‌آباد، ولشت، برازجان، کازرون، رودبارک، حسن‌آباد و اهواز به ترتیب دارای ۰/۲٦٦، ۰/۲۵۹، ۰/۲٤۰، ۰/۲۳۷، ۰/۲۱۵، ۰/۲۱۰ و ۰/۲۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک سیلی‌کریستین بودند که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند. مناطق ولی‌آباد (ارتفاع ۱۰۰ متر)، بنفشه‌ده، مرزن‌آباد و بوشهر دارای به ترتیب ۰/۱۷۸، ۰/۱٤۳، ۰/۱۳۹، ۰/۱۲۰ و ۰/۱۱۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک از سیلی کریستین و سایر مناطق دارای مقادیر بسیار کمی از سیلی کریستین بودند (جدول شمارهٔ ۳).

دانه‌های مربوط به مناطق ولشت، اهواز، ولی‌آباد (ارتفاع ۱۰۰ متر)، برازجان، رودبارک و حسن‌آباد به ترتیب دارای ۰/۵۸۰، ۰/۵۸۰، ۰/۵۳٤، ۰/٤۷۰، ۰/٤۰۷ و ۰/۳٦۹ میلی‌گرم در گرم ماده سیلی دیانین و سایر مناطق دارای مقادیر بسیار کمی از این ترکیب بودند.

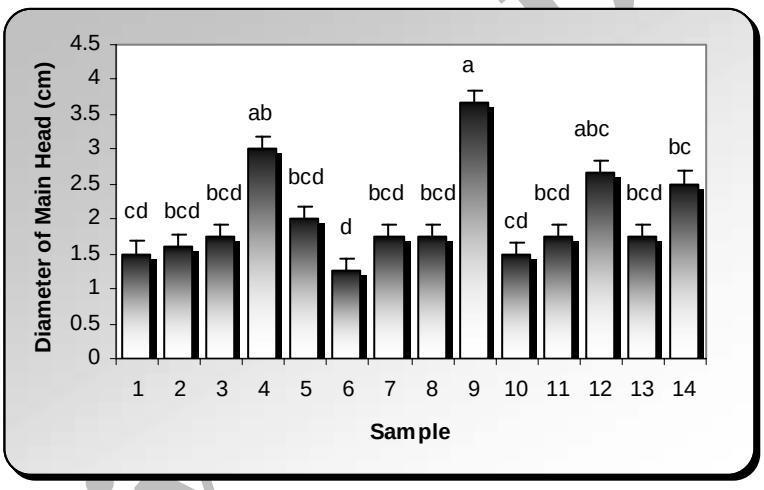
بالاترین مقدار تجمع سیلی بین A در دانه‌های با منشاء مجار دیده شد (۰/۱٤۷ میلی‌گرم در گرم). در حالی‌که دانه‌های مربوط به مناطق خرم‌آباد و کازرون به ترتیب دارای ۰/۳۰۵ و ۰/۲۷۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک سیلی بین A و سایر مناطق دارای مقادیر بسیار پایین سیلی بین A بودند که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند (جدول شمارهٔ ۳). دانه‌های با منشاء خرم‌آباد، برازجان، رودبارک، ولی‌آباد (ارتفاع ۱۸۰۰ متر) و حسن‌آباد دارای به ترتیب ۰/۷۷۹، ۰/۵۹۵، ۰/٤۹۵، ۰/۱۷٤ و ۰/۱۵۰ میلی‌گرم در گرم سیلی بین B و سایر مناطق دارای مقادیر پایینی از سیلی بین B بودند و کمترین مقدار تجمع این ترکیب در دانه‌های با منشاء بوشهر و هزارچم بود (جدول شمارهٔ ۳).

بالاترین مقدار تجمع ایزوسیلی بین A دانه‌های مربوط به مناطق ولی‌آباد با ارتفاع ۱۰۰۰ متر بود و دانه‌های مربوط به مناطق کازرون، حسن‌آباد و رودبارک به ترتیب دارای ۰/۲۰۵، ۰/۱۵۱ و ۰/۱۱۰ میلی‌گرم در گرم از سیلی بین A بودند که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند و سایر مناطق مطابق جدول شمارهٔ ٤ دارای مقادیر بسیار کمی از این ترکیب بودند. بالاترین مقدار تجمع ایزوسیلی بین B در دانه‌های با منشاء ولشت و اهواز دیده شد (به ترتیب ۰/۲۲۲ و ۰/۲۱۰ میلی گرم در گرم ماده خشک) و مقدار تجمع ایزوسیلی بین B در دانه‌های با منشاء مجار، ولی‌آباد با ارتفاع ۱۰۰۰ متر، مرزن‌آباد و بنفشه ده به ترتیب ۰/۱۸٤، ۰/۱۷٤، ۰/۱۵۵ و ۰/۱۵۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک بود که از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند و دانه‌های مربوط به سایر مناطق دارای مقادیر بسیار کمی از ایزوسیلی بین بودند (جدول شمارهٔ ٤).

Archive of SID
www.SID.ir



(۱)



(۲)

نمودار شماره ۳ – تعداد کل کپه‌ها (۱) و قطر کپه اصلی (۲) گیاهان خارمریم کشت شده در گلخانه (شماره نمونه‌ها بر اساس جدول شماره ۱)

بحث

بررسی‌های زیادی نشان داده‌اند که سیلی‌بین، ترکیب اصلی سیلی‌مارین هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی و خواص دارویی است [۱۱]. بر اساس نظر کرسمن و همکاران (۱۹۹۸) سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین در خواص آنتی‌اکسیدانت سیلی‌مارین نقش دارند و پیشنهاد شده که سیلی‌بین در حضور این ترکیبات موثرتر است. بنابراین تعیین درصد سایر اجزای فلاونوییدی سیلی‌مارین از اهمیت زیادی برخوردار است [۱۱،۲۰].

باید توجه داشت که نسبت ترکیبات حاضر در سیلی‌مارین استخراج شده مهم است چون در صنایع داروسازی استفاده خواهد شد و مقدار تجمع این ترکیب در عصاره استخراجی از جنبه اقتصادی در چرخه تولید تاثیرگذار است. بنابراین با ارزیابی وسیع‌تر و شناخت بیشتر منابع طبیعی این ثروت ملی و خالص‌سازی این نمونه‌ها می‌توان در آینده منابعی با کیفیت بالاتر معرفی کرد [۱۲].

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲ – مقدار سیلی‌مارین (±SE) (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در دانه‌های گیاه خارمریم جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران (۱) و کشت شده در گلخانه (۲)

نمونه	سیلی مارین	
	۱	۲
۱	۸/۷۲۸ ± ۰/٤٦ def	۰/۳۳۹±۰/۱٤ f
۲	۱۲/٦۹۰ ± ٦/۲۲ def	۰/٤٤٦±۰/۰۵ ef
۳	۲٤/۵۷۳ ± ۱/۷۵۰ ab	۱/٤٦۵±۰/۰۹ c
٤	۱۲/٦۹۰ ± ۰/۳٦ def	۰/۸۱٤±۰/۰۱ de
۵	۱٤/٤۸۸ ± ۰/٦۵ cde	۱/۳۷۷±۰/۱٦ c
٦	۹/۷٤۸ ± ۰/٤٤ def	۰/۵٤۰±۰/۱٤ e
۷	۸/۳۸٤ ± ۰/۷٤ def	۰/۱٤۵±۰/۱ g
۸	٦/۹۲۹ ± ۰/۲۵ ef	۰/۱٦٤±۰/۰٤ g
۹	۱۷/۲۳٦ ± ۲/۵۱ bcd	۲/۱۱٤±۰/۰۳ b
۱۰	۱٦/۲۳۰ ± ۱/۳٤ bcde	۰/۳۲۰±۰/۰۹ f
۱۱	۱۷/۹٤۷ ± ۱/۲۷ abcd	۰/۹۰۹±۰/۱۵ d
۱۲	۲۷/۱۰۲ ± ۰/۰۱ a	۱/۵۹۰±۰/۰۸ c
۱۳	۹/۱۲٤ ± ۰/۰۰۸ def	۰/۵۱۲±۰/۰۷ e
۱۵	۲۲/۷۳۳ ± ۰/۰۱ abc	٤/۲۷۸±۰/۰۳ a

– شماره نمونه‌های ۱۳-۱ مطابق با جدول شماره ۱ و دانه‌های مجاری شماره ۱۵ است.

– حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف است.

در بررسی مقدار تجمع فلاونولیگنان‌ها به روش HPLC، مقدار تجمع این ترکیبات در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق ایران بسیار بالاتر از نمونه‌های کشت شده در گلخانه بود (جدول شمارهٔ ۲). به گونه‌ای که بالاترین مقدار تجمع سیلی‌مارین در دانه‌های مناطق برازجان، رودبارک و مجار بود که نسبت به همین نمونه‌ها در شرایط گلخانه بسیار بالاتر است. در تمامی نمونه‌های کشت شده در گلخانه سیلی‌بین A و B هر دو وجود داشتند و بالاترین مقدار سیلی‌بین B در نمونه‌های کشت شده در گلخانه و نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۳ – مقدار فلاونولیگنان‌ها (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در دانه‌های گیاه خارمریم کشت شده در گلخانه.

نمونه	فلاونولیگنان (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)		
	تاکسی‌فولین	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین
۱	۰/۰۱٦±۰/۰٦ d	۰/۰۲۰±۰/۰۹ e	۰/۰٤۳±۰/۰۸ de
۲	۰/۰٦۷±۰/۰٤ d	۰/۱۱۳±۰/۰۵ de	۰/۲۲۵±۰/۰۹ cd
۳	۰/۱٤۸±۰/۰۵ bc	۰/۲۱۵±۰/۰٤ c	۰/٤۰۷±۰/۱۲ ab
٤	۰/۱۲۸±۰/۰۸ c	۰/۱٤۳±۰/۰۳ cd	۰/۲۵۳±۰/۰۹ bcd
۵	۰/۱٤۲±۰/۱ bc	۰/۲۵۹±۰/۰٤ bc	۰/۵۸۰±۰/۱۱ a
٦	۰/۰٦۸±۰/۰۹ d	۰/۱۳۹±۰/۰۸ cd	۰/۰۸٤±۰/۰٤ d
۷	۰/۱۱٦±۰/۰۷ c	۰/۲۱۰±۰/۰۹ c	۰/۳٦۹±۰/۰۹ bc
۸	۰/۱۰۸±۰/۰۵ c	۰/۱۷۸±۰/۰۳ cd	۰/۵۳٤±۰/۱٤ ab
۹	۰/۲۳۱±۰/۰٦ a	۰/۲٦٦±۰/۱۲ b	۰/۲٦۰±۰/۰۷ bc
۱۰	۰/۱٤۰±۰/۰۲ bc	۰/۲۰۰±۰/۰۸ c	۰/۵۸۰±۰/۰۲ a
۱۱	۰/۲۰۸±۰/۱۲ ab	۰/۲۳۷±۰/۰۵ c	۰/۲۳۷±۰/۰۹ cd
۱۲	۰/۱۵۲±۰/۰٤ b	۰/۲٤۰±۰/۰۳ bc	۰/٤۷۰±۰/۰٦ ab
۱۳	۰/۰٦۸±۰/۰۹ d	۰/۱۲۰±۰/۰۹ d	۰/۰۲٤±۰/۱۱ de
۱٦	۰/۱۹۰±۰/۰۸ d	۰/۳۹۲±۰/۰٤ a	۰/۸٤۲±۰/۱ d

– شماره نمونه‌های ۱۳–۱ مطابق با جدول شماره ۱ بوده و دانه‌های مجاری شماره ۱٦ است که در گلخانه کشت شده‌اند.

– حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف است.

در نمونه‌های مربوط به منطقه خرم‌آباد دیده شد. اما بالاترین مقدار سیلی‌بین A در نمونه‌های کشت شده در گلخانه در دانه‌های با منشاء بنفشه ده و برازجان و در نمونه‌های جمع‌آوری شده در نمونه‌های مجاری مشاهده شد. در نمونه‌های کشت شده در گل‌خانه با منشاء مجار، اهواز، ولی‌آباد (ارتفاع ۱۰۰۰ متر)، مرزن‌آباد، ولشت و بنفشه ده نسبت ایزوسیلی‌بین B به A بالاتر بود و در نمونه‌های مجاری این نسبت به حدود ۲ برابر رسید. در شریط گلخانه نمونه‌های مربوط به خرم‌آباد دارای بالاترین مقدار تاکسی‌فولین و دانه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ٤ – مقدار سیلیبین و ایزوسیلیبین (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در دانه‌های گیاه خارمریم کشت شده در گلخانه

نمونه	فلاونولیگنان (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)			
	سیلیبین A	سیلیبین B	ایزوسیلیبین A	ایزوسیلیبین B
١	٠/٠٤٧±٠/٠٣ d	٠/١٧٤±٠/٠٩ d	٠/٠٨٤±٠/١٤ cd	٠/٠٤٧±٠/١٦ c
٢	٠/٠٣١±٠/٠٨ d	٠/٠٠٥±٠/٠٥ h	٠/٠٤٩±٠/٠٨ cde	٠/٠٢٧±٠/٠٦ ce
٣	٠/٠٠٥±٠/٠٩ e	٠/٤٩٥±٠/٠٥ bc	٠/١١٠±٠/٠١ bc	٠/٠٩٤±٠/٠١ b
٤	٠/٠٢٦±٠/١٢ d	٠/٠٦١±٠/٠٤ ef	٠/٠٤٩±٠/٠٣ cde	٠/١٥٠±٠/٠٩ ab
٥	٠/٠٠٣±٠/١٣ e	٠/٠٨٨±٠/٠٥ def	٠/٠٨٠±٠/٠٩ cd	٠/٢٢٢±٠/١٢ a
٦	٠/٠٠٣±٠/٠٦ e	٠/٠٤٩±٠/٠٣ fg	٠/٠٣٩±٠/٠٥ de	٠/١٥٥±٠/٠٩ ab
٧	٠/٠٠٤±٠/٠٩ e	٠/١٥٠±٠/٠٢ de	٠/١٥١±٠/١٢ bc	٠/١٥٠±٠/١٥ ab
٨	٠/٠٢٠±٠/٠٧ d	٠/٠٧٤±٠/٠٧ ef	٠/٠٧٣±٠/٠٩ cd	٠/١٧٤±٠/١٦ ab
٩	٠/٣٠٥±٠/٠٩ b	٠/٧٧٩±٠/٠٦ d	٠/٣١١±٠/٠٧ a	٠/٠٤٦±٠/١٢ c
١٠	٠/٠٠٣±٠/٠٨ e	٠/٠٧٧±٠/٠٨ ef	٠/٠٦٠±٠/٠٩ cd	٠/٢١٠±٠/٠٩ a
١١	٠/٢٧٠±٠/٠٩ c	٠/٦٧١±٠/٠٧ ab	٠/٢٠٥±٠/٠٤ b	٠/٠٧٩±٠/١٢ bc
١٢	٠/٠٠٨±٠/١٢ e	٠/٥٩٥±٠/٠٩ b	٠/١١٢±٠/٠٨ bc	٠/٠٩٩±٠/٠٨ b
١٣	٠/٠٠٣±٠/١٦ e	٠/٠٢٣±٠/٠٧ gh	٠/٠١٩±٠/١٤ de	٠/١٠٠±٠/١٢ b
١٦	٢/١٤٧±٠/٠٨ a	٠/٤٢٧±٠/٠٧ bc	٠/٠٩٢±٠/٠٩ cd	٠/١٨٤±٠/١٢ ab

– شماره نمونه‌های ١٣– ١مطابق با جدول شماره ١ بوده و دانه‌های مجاری شماره ١٦ است که در گلخانه کشت شده‌اند.

– حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف است.

مربوط به منطقه ولی‌آباد (ارتفاع ١٨٠٠ متر) در هر دو شرایط دارای پایین‌ترین مقدار تجمع تاکسی‌فولین بودند.

گیاهان به محرک‌های محیطی پاسخ می‌دهند و متابولیت‌های ثانوی دارای نقش‌های کلیدی در بر هم کنش بین گیاه و محیط‌شان هستند و مطابق نتایج بسیاری از محققان فلاونوییدها نیز از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که مسیر بیوسنتزی آن‌ها تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و در مراحل نموی و شرایط محیطی داری نوسان هستند [٩،٢١].

Archive of SID
www.SID.ir

با مقایسه نتایج مربوط به ویژگی‌های رویشی گیاهان خارمریم که در شرایط کنترل شده گلخانه کشت شده بودند، مشخص شد که این نمونه‌ها در شرایط یکسان از نظر ویژگی‌های رویشی دارای پاسخ‌های متفاوتی بودند. بررسی میزان همبستگی میان ویژگی‌های رویشی از جمله تعداد دانه‌ها به ازای هر گیاه، وزن هزار دانه، طول شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی، تعداد کپه، قطر کپه اصلی نشان می‌دهد که بین قطر کپه اصلی با طول شاخه اصلی و تعداد شاخه فرعی، تعداد کپه و وزن هزار دانه و طول شاخه اصلی و همچنین بین تعداد شاخه فرعی و طول شاخه اصلی رابطه همبستگی مثبت معنی‌دار وجود دارد. بررسی رابطه همبستگی بین مقدار تجمع فلاونولیگنان‌ها و ویژگی‌های رویشی نشان می‌دهد که بین تجمع این ترکیبات و وزن هزار دانه، طول شاخه اصلی و تعداد کپه‌ها رابطه مثبت معنی‌دار وجود دارد. مطابق نظر رام و همکاران (۲۰۰۵) تعداد دانه در هر گیاه و تعداد کپسول‌ها در هر گیاه رابطه زیادی با تنوع ژنوتیپی دارد که ارتباط مستقیم این موارد برای گسترش و مطالعه روی این محصول اهمیت زیادی دارد. بر اساس نتایج این پژوهشگران تعداد کپسول‌ها به ازای هر گیاه ارتباط مثبت معنی‌داری با تعداد شاخه‌ها برای هر گیاه و طول برگ داشته در حالی که درصد دانه‌های تولید شده به ازای هر گیاه رابطه معنی‌دار مثبت با طول برگ، طول ساقه و قطر کپسول‌ها و مقدار سیلی‌مارین دارد [۲۲].

براساس مشاهدات و مقایسات حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد شرایط محیطی در تغییرات فلاونولیگنان‌های موجود در دانه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تاثیر گذاشته باشد. ضمناً چالکون سینتاز (CHS) آنزیمی است که در مرحله اتصال ۳ واحد استیل از مالونیل کوانزیم A با ٤ هیدروکسی سینامیل کوانزیم A برای تولید نارینجنین به عنوان پیش‌ساز تولید تاکسی فولین در مسیر بیوسنتز سیلی‌بین نقش دارد. این آنزیم یک نقطه کلیدی در کنترل متابولیکی این مسیر بیوسنتزی است. سطوح آنزیمی و mRNA چالکون سنتتاز در طی مراحل نموی با نوع سلول و در پاسخ به محرک‌های محیطی تغییر می‌کند و موجبات تغییرات سطوح ترکیبات نهایی در مسیر بیوسنتزی را فراهم می‌آورند [۵،۹،۲۳]. نتایج اشمید و همکاران (۱۹۹۰) نشان داد که پروموتور CH58 دارای عناصر Cis مورد نیاز برای کنترل بیوسنتز فلاونوییدها در طی نمو و در پاسخ به محرک‌های محیطی مختلف است. باید توجه داشت که بیشتر گیاهان دارویی هنوز از سیستم‌های طبیعی برداشت می‌شوند و شرایط رشد و تکثیر آن‌ها هنوز بهینه‌سازی نشده است. استفاده از منابع طبیعی و برداشت بی‌رویه این گیاهان موجب کاهش ذخایر و تنوع زیستی و کیفیت گیاهان دارویی می‌شود و پی‌آمدهای فجیعی به دنبال دارد. از دیدگاه فیزیولوژی گیاهی فرصت‌ها و موضوعات بسیاری برای تحقیقات پایه‌ای در زمینه گیاهان دارویی و مطالعه تولید متابولیت‌های دارویی در آن‌ها وجود دارد [١٤].

بررسی عوامل فیزیولوژیک و عوامل ژنتیکی موثر در حضور یا عدم حضور ترکیبات طبیعی گیاهی و نحوه توارث پذیری ژن های مربوطه، دارای اهمیت بوده و اطلاعات حاصل از این بررسی‌ها مورد استفاده اصلاح گران خواهد بود و نتایج این تحقیقات در معرفی گیاهانی که دارای متابولیت های ثانویه خاص و متناسب با منظور محقق و مورد استفاده صنایع مختلف باشند خواهد بود. به این ترتیب این نتایج منجر به افزایش میزان تولید و عملکرد در واحد سطح خواهند شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در محل موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شده است. بدین‌وسیله از ریاست محترم مؤسسه و همکاران محترم ایشان که امکانات لازم جهت انجام طرح را در اختیار اینجانب قرار دادند تشکر می‌کنم. از جناب آقای دکتر سید علی ضیایی به خاطر کمک‌هایشان در تجزیه نمونه‌ها به روش HPLC تقدیر و تشکر می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1.Kubasek WL, Shirley BW, Mckillop A, Goodman HM, Briggs W, and Ausuber FA. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*. 1992; 4: 1229-1239.

2.Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L and Murphy AS. Flavonoid accumulation pattern of transparent testa mutants of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2001; 126: 536-548.

3.Katiyar SK. Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light- induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. *International Journal of Oncology*. 2002; 21: 1213-1222.

4.Kren V, Ulrichova J, Kosina P, Stevenson D, Sedmera P, Prikrylova V, Halada P, and Simanek V. Chemoenzymatic preparation of silybin β-glucoronides and their biological evaluation. *Drag Metabolism and Disposition*. 2000; 28: 1513-1517.

5.Narayana KR, Sripal R, Chaluvadi MR, and Krishan DR, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 2001; 33: 2-6.

6.Samuelsson G. Drugs of natural origin. 4th revised edition. Swedish pharmaceutical press, Stockholm, Sweden. 1999; 226-233.

7.Ding TM, Tian SJ, Zhang ZX, Gu DZ, Chen YF, Shi YH and Sun ZP. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *Journal of Phamaceutical and Biochemical Analysis*. 2001; 26: 155-161.

8.Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T and Nikaido T. Rosmarinic acid production by *coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*. 2005; 80: 151-155.

9.Schnfeld JV, Weisbrod B, and Muller MK. Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties protects exocrine pancreas from cyclosporine toxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1997; 53: 917-920.

10. Venkataramanan R. Milke thistle, an herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metabolism and Dispositions*. 2000; 28: 1270-1273.

11. Cacho M, Moran M, Corchete P, and Fernandez-Tarrago J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Science*. 1999; 144:63-68.

12. Hasanloo T, Khavari-Nejad .A, majidi E, Ziai SA, Shams- Ardakani MR. Determination of flavonolignan of dried fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. *Journal of Medicinal Plants*. 2004; 4: 25-32.

13. Zargari A. Medicinal Plants. 2nd ed. Tehran University Press. Iran. 1996; PP: 34-38.

14. Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*. 2000; 124: 507-514.

15. Omidbeigi R. Production of medicinal plants. 1st ed. Tehran University. Iran. 1993, P: 139.

16. Bosisio E, Benelli, C, Pirola, O. Effect of the flavonolignans of *Silybum marianum* L. Gaertn on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol Research*. 1992; 25: 147-54.

17. Bourgand F, Gravot A, Milesi S and Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*.2001; 161: 839-851.

18. Brenda WS. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. 2000; 126: 485-493.

19. Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, majidi E, Shams- Ardakani MR. Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn

Archive of SID
www.SID.ir

from Iran. Pakistan *Journal of Bbiological Science*. 2005; 8: 1778-1782.

20. Krecman V, Skottova N, Waterova D, Ultichova J, and Simanek V. Silymarin inhibit the development of diet-induced hypercholes-terolemia in rats. *Planta Media*. 1998; 64: 138-142.

21. Kutchan TM. Echological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant physiology*. 2001; 125: 58-60.

22. Schmid J, Doerner PW, Clouse SD, Dixon RA and Lamb CJ. Developmental and environmental regulation of a chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. *The Plant Cell*. 1990; 2: 619-631.

23. Ram G, Bhan, MK, Gupta KK, Brijesh T, Jamwal U, and Pal S. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum*. *Fitoterapia*. 2005; 76: 143-147.

Archive of SID

www.SID.ir