بهینه کردن شرایط اندام‌زایی در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه، محور زیرلپه و برگ لپه‌ای گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* (L) Gaertn.)

آسیه فیروزی (۱)، سید ابوالقاسم محمدی (۱)، محمود خسروشاهلی (۲)، علی موافقی (۲) و طاهره حسنلو (۳)

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ۲- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ۳- گروه فیزیولوژی گیاهی، موسسه بیوتکنولوژی کرج، کرج، ایران

ماریتیغال *(Silybum marianum)* از گیاهان مهم دارویی است که جایگاه خاصی را در صنایع دارویی پیدا کرده است. در مطالعه حاضر پاسخ به کال زایی ریزنمونه های ریشه، محور زیرلپه و برگ لپه‌ای در تعدادی از ژنوتیپ‌های ماریتیغال در دو نوع محیط کشت MS و B5 با ترکیبات هورمونی ۲،٤-دی و کینتین (۱، ۲ و ٤ میلیگرم در لیتر) مورد بررسی قرارگرفت. ریزنمونه‌های ریشه و محور زیرلپه در محیط کشت B5 با غلظت هورمونی ۲ میلیگرم در لیتر ۲،٤-دی و کینتین، کالوس‌های درشت و شفافی تولید کردند. در حالیکه پاسخ ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای در هر دو محیط MS و B5 با همین غلظت هورمونی یکسان بود. با انتقال کالوس‌های ۲ سانتی متری حاصل از ۳ ریزنمونه به محیط کشت B5 با غلظتهای هورمونی مختلف (۰/۵ ،۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ)، شاخه‌زایی القاء شد. پس از ۲ هفته پریموردیوم‌های شاخه از ریزنمونه برگ لپه‌ای مشاهده گردید و پس از ۲ ماه طول شاخه‌ها در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به ۲ سانتی-متر رسید. شاخه‌های حاصل جهت ریشه‌زایی به محیط B5 با غلظتهای هورمونی مختلف (۰/۰۱ ،۰/۰۲ و ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید و ۰/۰۲۵ ۰ میلیگرم در لیتر بنزیل آدنین) منتقل شدند. بر خلاف تصور، ریشه‌زایی به وفور هم از کالوس‌های بدون شاخه و هم از ریزنمونه به‌طور مستقیم در محیط B5 به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید و ۰/۰۲۵ میلی-گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده شد.

مقدمه

به دلیل این که اکثر گیاهان دارویی در مناطقی رشد می کنند که برداشت آنها بسیار مشکل یا پرهزینه است، کاربرد راهکارهایی جهت کشت آزمایشگاهی این چنین گیاهان دارویی و دسترسی آسان و سریع تر به مواد مؤثره آنها از اولویت سرمایه گذاری در این راستا می باشند. ماریتیغال یا خارمریم (*Silybum marianum*)، گیاهی دارویی است که از دیرباز در درمان بیماریهای کبدی بسیار مؤثر بوده است. مواد مؤثره موجود در ماریتیغال تحت عنوان کلی سیلیمارین معرفی می شوند. در جستجو برای روش‌های جایگزین جهت تولید مواد دارویی، روش‌های بیوتکنولوژیک به خصوص تکنیک کشت بافت و سلول به عنوان روش‌های مکمل برای روش‌های متداول تولید تجاری متابولیت‌های گیاهی می‌باشند (راماچاندرا وراویشانکار، ۲۰۰۲). فعالیت بیوسنتزی سلول‌های کشت شده می‌تواند با دستکاری عوامل محیطی و گزینش مصنوعی لاین‌های سلولی و کلون‌های مناسب افزایش یابد (آلفرمن و پترسن، ۱۹۹۵). به دلیل اهمیت متابولیت ثانویه گیاه ماریتیغال، کشت درون شیشه‌ای آن بسیار مورد توجه بوده است. می‌توان با تولید و انتقال کالوس‌ها به محیط‌های ریشه‌زایی و ساقه‌زایی و نگهداری آنها در انکوباتور جهت تولید گیاهچه‌های کامل به منظور کشت راحتتر در شرایط آزمایشگاهی و در این حالت اسخراج ماده مؤثره از قسمت‌های مختلف آنها و استفاده از مواد مؤثره به

دست آمده در تهیه داروها در شرکت های داروسازی امکان پذیر می‌باشد. تا کنون گزارشی در رابطه با ساقه‌زایی ماریتیغال ارائه نشده است و تحقیق حاضر اولین مورد در این رابطه است.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی پاسخ به کال زایی ریزنمونه های ریشه، محور زیرلپه و برگ لپه‌ای تعدادی از ژنوتیپ‌های ماریتیغال از دو نوع محیط کشت MS و B5 با ترکیبات هورمونی ٤،٢-دی و کینتین (١، ٢ و ٤ میلیگرم در لیتر) استفاده شد. به منظور القاء شاخه‌زایی کالوس‌های ٢ سانتی متری حاصل از ٣ ریزنمونه به محیط کشت B5 با غلظتهای هورمونی مختلف (٠/٥، ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ٠/١ میلی گرم در لیتر TDZ)، منتقل شدند. جهت ریشه‌زایی از محیط B5 با غلظتهای هورمونی مختلف (٠/٠١، ٠/٠٢ و ٠/٠٣ میلی گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید و ٠/٠٢٥ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین) استفاده گردید.

نتایج و بحث

ریزنمونه‌های ریشه و محور زیرلپه در محیط کشت B5 با غلظت هورمونی ٢ میلیگرم در لیتر ٤،٢-دی و کینتین، کالوس‌های درشت و شفافی تولید کردند. کالوس‌های حاصل از محیط کشت‌های MS و B5 جهت بررسی اندام‌زایی (تولید ساقه و ریشه)، به روش سیمینو و همکاران، (٢٠٠٦) پس از واکشت اول به محیط B5 با دو نوع ترکیب هورمونی، اولی مشابه با محیط القای کالوس (٤،٢-دی به میزان ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) به میزان ٠/٠٥ میلی‌گرم در لیتر) و دومی شامل ٤،٢-دی به میزان ٠/٠٢٥ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA) به میزان ٠/٠١ میلی گرم و TDZ به میزان ٠/١ میلی گرم در لیتر در لیتر منتقل شدند. پس از گذشت دو هفته پریموردیوم‌های تشکیل دهنده ساقه در هر دو ریزنمونه موجود در محیط B5 حاوی ٤،٢-دی به میزان ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر و BA به میزان ٠/٠٥ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. پس از چهار هفته و قرار دادن ظروف حاوی این اندام‌های ابتدایی تشکیل دهنده ساقه در شرایط روشنایی، اندازه ساقه‌ها و برگ‌ها به دو الی سه سانتی متر رسید. قابل ذکر است که تشکیل مستقیم برگ از ریزنمونه کوتیلدون، بدون تشکیل کالوس، نیز مشاهده شد. تشکیل ریشه نیز طی دو الی سه هفته پس از قرارگیری کالوس‌ها در محیط B5 حاوی ٤،٢-دی به میزان ٠/٠٢٥ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ٠/٠١ میلی گرم در لیتر و مشاهده شد. شایان ذکر است که همانند ساقه‌زایی، ریشه‌زایی هم بدون تشکیل کالوس و به صورت مستقیم از ریزنمونه کوتیلدون انجام گرفت. همچنین تشکیل کالوس از این ریشه‌های شکل گرفته نیز به وضوح مشاهده شد. این نتایج ریشه‌زایی مطابق با نتایج پیشین در این زمینه بود (سیمینو و همکاران، ٢٠٠٦)، ولی هدف آنها بهینه کردن محیط کشت به منظور تهیه کالوس‌های مناسب جهت استفاده از خاصیت منعقد کنندگی ماریتیغال بود. تا کنون گزارشی در رابطه با ساقه‌زایی و تولید گیاهچه از ماریتیغال ارائه نشده است و تحقیق حاضر اولین مورد در این رابطه است.

تصویر ۱: مراحل مختلف تشکیل کالوس‌ها تا انتقال آنها به شرایط ساقه‌زایی و ریشه‌زایی و در نهایت بدست آوردن گیاهچه‌های کامل در شرایط کشت درون شیشه‌ای.

منابع

1- Alferman, A.W., and Peterson, M. 1995. Natural products formation by plant cell biotechnology. Plant cell, 43: 199- 205.
2- Cimino, C., Caralla, S.V. Spina, F., Natalucci, C., and Priolo, N. 2006. Callus culture for biomass production of milk thistle as a potential source of milk clotting peptidases. Electronic J. Biotec., 9: 237-240.
3- Ramachandra, R.S., and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotech. Adv., 20: 101- 153.

Optimizing of organogenesis condition in calli obtained from root, hypocotyls and cotyledon explants of milk thistle (*Silybum marianum*)

A. Firouzi, S.A. Mohammadi, M. Khosroshahli, A. Movafeghi ,T. Hasanloo

Abstract
Milk thistle (*Silybum marianum)* is one of the important medicinal plants in the drug industries. In the present study, calli induction in root, hypocotyle and cotyledon explants of some milk thistle genotypes at MS and B5 culture media supplemented with 1,2 and 4 mg/l 2,4-D and Kin was studied. Root and hypocotyle explants produced large and transparent calli in B5 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and Kin. Whereas cotyledon explant showed similar response at MS and B5 supplemented with 2 mg/l 2,4-D and Kin. Shoot formation was induced with transferring of calli with 2 cm in size to the B5 medium supplemented with 0.5,1 and 2 mg/l BA and 0.1 mg/l TDZ. After 2 weeks, the shoot primordial were emerged and shoot length in medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.1 mg/l TDZ was reached to 2 cm in average. To induce rhyzogenesis, the shoots were transferred to the B5 medium with different hormones concentrations including 0.01, 0.02 and 0.03 mg/l NAA and 0.025 mg/l BA. Whereas, root formation was unexpectedly observed abundantly from calli that didn't produce shoot as well as directly from explants in B5 medium supplemented with 0.01 mg/l NAA and 0.025 mg/l BA.