مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.353856.2956
جلد ۳۷، شماره ۴، صفحه ۶۳۸-۶۲۸ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.4.5.2

تکثیر غیرجنسی ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) از طریق باززایی مستقیم در شرایط درون‌شیشه‌ای

فرید نورمند مؤید[1*]، نگار ولی‌زاده[2] و طیبه سمندری گیکلو[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان‌شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران، پست الکترونیک: farid.nm@areeo.ac.ir

۲- دانش‌آموخته دکترا، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- دانش‌آموخته دکترا، مدیریت خدمات کشاورزی پارس‌آباد (مغان)، سازمان جهاد کشاورزی استان اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

خارمریم (*Silybum marianum* L.) از خانواده کاسنی (Asteraceae)، به‌علت داشتن ماده مؤثره سیلی‌مارین گیاه دارویی بسیار مورد اهمیتی در صنایع دارویی است. سیلی‌مارین در درمان بیماری‌های کبدی، هپاتیت و ناراحتی‌های قلب و عروق بسیار مؤثر می‌باشد. از آنجایی که پتانسیل و سرعت تولید این ترکیب دارویی در رویشگاه‌ها تحت شرایط طبیعی پایین است، استفاده از مهندسی ژنتیک و تولید گیاه تراریخت با تکنیک‌های مختلفی نظیر کشت بافت در این گیاه مورد توجه واقع شده است. اولین گام در این راه به‌دست آوردن دستورالعمل باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای است. در این تحقیق، ریزنمونه‌های برگ بدست آمده از رقم مجارستانی خارمریم برای باززایی مستقیم تحت تأثیر ترکیب‌های مختلفی از هورمون‌ها، ارزیابی شدند. شش هفته پس از کشت، در محیط MS ½ نیم قدرت حاوی Zeatin ۰/۴ mg l^{-1}، BAP ۰/۲ mg l^{-1}، NAA ۰/۲ mg l^{-1} بیشترین شاخه‌زایی (۵۷٪) مشاهده شد. پس از آن شاخه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی با تیمارهای مختلف هورمونی منتقل شدند. نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای به‌دست آوردن ریشه‌های طویل با تعداد زیاد، محیط کشت MS ½ حاوی NAA ۰/۲۵ mg l^{-1} و زغال فعال ۲ g l^{-1} است. گیاهچه‌های بدست آمده از باززایی مستقیم پس از انتقال به خاک رشد مناسبی داشتند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، خارمریم (*Silybum marianum* L.)، هورمون، سیلی‌مارین، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی.

مقدمه

نیاز روزافزون به مواد اولیه دارویی باعث شده تا تحقیقات بر روی تولید ترکیب‌های طبیعی به‌ویژه به کمک روش‌های بیوتکنولوژی توسعه و سرعت یابد. ماریتیغال یا خارمریم از گیاهان مهم دارویی خانواده آستراسه می‌باشد که در صنایع داروسازی جایگاه ویژه‌ای دارد. این گیاه یک‌ساله یا دو ساله بوده و دارای ترکیب‌های ارزشمند مانند سیلی‌بین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین است. این ترکیب‌ها که در مجموع

به نام سیلی‌مارین شناخته می‌شود، در بذرهای ماریتیغال ذخیره شده و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و از آن در مداوای بیماری‌های طحال، کبد، یرقان‌های ویروسی، پیشگیری و یا درمان سرطان استفاده می‌شود (Subramaniam *et al*, 2008). جمع‌آوری گیاهان دارویی به‌صورت مستقیم از رویشگاه‌های طبیعی به علت مشکلات فراوانی مانند یکنواخت و استاندارد نبودن میزان مواد مؤثره آنها و نیز مشکلات برداشت، تأمین‌کننده نیاز صنایع داروسازی نخواهد بود و نیز برداشت انبوه از طبیعت به‌تدریج موجب نابودی گیاه و کاهش ذخایر ژنتیکی و در نهایت از بین رفتن تنوع زیستی می‌شود. بنابراین اهلی کردن، کشت و بعد اصلاح انواع گونه‌های دارویی، تولید، تکثیر و معرفی ارقامی با متابولیت‌های ثانویه بالا و استاندارد از طریق روش‌های بیوتکنولوژی در آزمایشگاه از اهمیت بالایی برخوردار است. زیرا علاوه‌بر توسعه اقتصادی، مانع از بین رفتن پوشش گیاهی به علت برداشت بی‌رویه شده و می‌تواند در جلوگیری از فرسایش و حفظ آب و خاک مؤثر واقع گردد. روش‌های بیوتکنولوژی در تولید متابولیت‌های ثانویه شامل ایجاد جهش، انتقال ژن، کشت بافت و ریزازدیادی در شرایط درون‌شیشه‌ای بوده که در نهایت موجب تولید گیاهان تراریخت می‌شود. ازدیاد در شرایط درون‌شیشه‌ای دارای قابلیت زیادی برای تولید گیاهان دارویی با مواد مؤثره بالا بوده و اولین گام در اصلاح ژنتیکی، بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و داشتن دستورالعمل باززایی مناسب است، زیرا اگر گیاه به باززایی پاسخ مثبت ندهد، انتقال ژن به گیاه بی‌فایده خواهد بود. شرایط دقیق مورد نیاز برای شروع و حفظ سلول‌های گیاهی در کشت و یا باززایی گیاهان از کشت سلول‌ها، برای هر گونه گیاهی متفاوت است. عوامل متعددی در ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان مؤثر هستند که ازجمله آن می‌توان به محیط، ژنوتیپ گیاهی، ریزنمونه، غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تغذیه‌ای و مواد معدنی اشاره نمود (Kumar & Reddy, 2011). اولین گزارش‌ها از باززایی موفق خارمریم در سال ۱۹۹۵ ثبت شد (Hetz *et al*., 1995). با توجه به اینکه درصد باززایی غیر مستقیمی که Hets و همکاران (۱۹۹۵) با بکارگیری پروتوپلاست‌های مزوفیل برگ در محیط KM حاوی هورمون‌های BAP و TDZ بدست آورند، پایین بود؛ اما به‌عنوان اولین گام، موفقیت بزرگی محسوب می‌شد. پژوهش‌های دیگری نیز روی باززایی خارمریم و مقدار ماده مؤثره سیلی‌بین انجام شد و محققان موفق به باززایی غیرمستقیم از ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP، NAA و Zeatin شدند (Iqbal Sada & Srivastava, 2002). Cimino و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیق خود بهترین محیط کشت برای القاء کالوس از ریزنمونه برگ ماریتیغال را محیطی با غلظت هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و 2,4-D گزارش کردند. در پژوهشی دیگر که با هدف بهینه‌سازی کشت بافت گیاه خارمریم به‌منظور تولید سیلی‌مارین انجام شد، نتایج بیانگر این بود که بالاترین درصد کال‌زایی (۹۸٪) در قطعات جداکشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2,4-D و Kin است. همچنین استفاده از دو هورمون NAA و Kin بیشترین درصد کال‌زایی (۹۷٪) را در قطعات جداکشت ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر موجب شد (Arekhi *et al*., 2012). در گزارشی دیگر، شرایط بهینه برای ریشه‌زایی گیاه ماریتیغال را محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و IBA معرفی نمودند (Iri *et al*., 2013). Abbasi و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقات خود بالاترین فراوانی القای کالوس ماریتیغال را ۲۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده کردند. همچنین بیشترین میزان شاخه‌زایی ۳۰ روز پس از انتقال کالوس‌ها به محیط MS همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA دیده شد. با توجه به اینکه در زمینه کشت بافت و باززایی ماریتیغال تحقیقات قابل ارجاع و جامع اندک است، بنابراین بهینه‌سازی مراحل کشت بافت از طریق روش‌هایی مانند باززایی در ماریتیغال می‌تواند شرایط را برای انجام سایر تحقیقات ازجمله انتقال ژن، تغییر در سطوح پلوئیدی و مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی انواع متابولیت‌های ثانویه مهم در خارمریم فراهم نماید. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر القاء شاخه‌زایی ریزنمونه برگ ماریتیغال در باززایی مستقیم و تعیین بهترین شرایط القاء ریشه‌زایی و رشد شاخه و در نهایت ارائه یک دستورالعمل بهینه بر امکان باززایی گیاه ماریتیغال است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور تکثیر غیرجنسی گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) از طریق باززایی مستقیم در پژوهشکده بیوتکنولوژی غرب و شمال‌غرب کشور (آذربایجان‌شرقی) اجرا شد.

در این تحقیق، برای جوانه‌زنی بذرهای ماریتیغال و تولید گیاهچه استریل، سه نوع محیط کشت MS، MS نیم قدرت و محیط آب و آگار مورد آزمایش قرار گرفتند. به‌منظور باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ و سطوح مختلف هورمون‌های BAP، NAA و Zeatin استفاده شد (Samandari Gikloo *et al*., 2012).

برای اجرای این طرح، ابتدا بذرهای گیاه ماریتیغال با منشأ مجارستان از پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شدند. به‌منظور ضدعفونی کردن بذرها، در زیر هود لامینار ابتدا بذرها به‌مدت ۲۰–۱۵ دقیقه در محلول TWEEN 20 قرار گرفته و با آب‌مقطر استریل سه بار شستشو داده شد. در مرحله بعد بذرها به مدت دو دقیقه در محلول اتانول ۷۰٪ قرار گرفته و بعد با آب‌مقطر استریل آبکشی شده و در مرحله آخر بذرها به مدت سه دقیقه در آب اکسیژنه ۱۵ حجم غوطه‌ور و دوباره با آب‌مقطر استریل پنج بار شستشو داده شدند. برای جوانه‌زنی بذرهای استریل شده، از محیط کشت MS نیم قدرت استفاده شد (Murashige & Skoog, 1962). مقادیر نمک‌های معدنی و ویتامین‌های محیط کشت نصف شده و آگار به میزان ۶/۷ گرم در لیتر استفاده شد. محیط کشت پس از تهیه در شرایط فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. بذرها پس از کشت در لوله‌های آزمایش محتوای محیط کشت به اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ °C منتقل شدند. بعد از یک هفته، جوانه‌زنی در بذرها مشاهده شد. گیاهانی که هیپوکوتیل آنها حدود سه سانتی‌متر رشد کرده بود به روشنایی منتقل شدند. به‌طوری که گیاهچه‌ها دو هفته پس از کشت، آماده برداشت ریزنمونه‌های برگ بودند. برگ‌های اول و دوم در محیط کشت MS نیم قدرت حاوی سطوح مختلف هورمون‌های BAP، NAA و Zeatin (جدول ۱) به صورت کامل و بدون برش برای شاخه‌زایی کشت شدند و بعد پتری‌ها به اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ °C منتقل گردیدند. از هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار پنج ریزنمونه وجود داشت. حدود دو ماه پس از کشت، شاخه‌های بدست آمده واکشت شد و در اتاقک رشد در شرایط روشنایی نگهداری گردید.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی برای شاخه‌زایی مستقیم

نام تیمار	BAP mgl^{-1}	Zeatin mgl^{-1}	NAA mgl^{-1}
A	۰/۲	۰/۲	۰/۲
B	۰/۳	۰/۲	۰/۲
C	۰/۴	۰/۲	۰/۲
D	۰/۲	۰/۳	۰/۲
E	۰/۳	۰/۳	۰/۲
F	۰/۴	۰/۳	۰/۲
G	۰/۲	۰/۴	۰/۲
H	۰/۳	۰/۴	۰/۲
I	۰/۴	۰/۴	۰/۲

دو هفته پس از واکشت، شاخه‌های به طول سه سانتی‌متر برای ریشه‌زایی، به محیط MS نیم قدرت حاوی ساکارز به غلظت ۲٪، آگار به غلظت ۵/۷ گرم در لیتر، زغال فعال به غلظت‌های ۰/۲ و صفر گرم در لیتر و غلظت‌های مختلف تیمارهای هورمونی IBA و NAA منتقل شدند (جدول ۲).

جدول ۲- تیمارهای هورمونی برای ریشه‌زایی در دو شرایط بدون زغال فعال و با زغال فعال به غلظت ۰/۲ گرم در لیتر

نام تیمار	NAA mgl^{-1}	IBA mgl^{-1}
A	۰	۰/۲۵
B	۰	۰/۵
C	۰	۰/۷۵
D	۰/۲۵	۰
E	۰/۵	۰
F	۰/۷۵	۰
G	۰	۰
H	۰/۲۵	۰/۲۵
I	۰/۵	۰/۵

حدود دو هفته پس از کشت، طول بلندترین ریشه و تعداد ریشه‌ها در هر تیمار هورمونی یادداشت شد و بعد گیاهچه‌ها برای طی مراحل سازگاری تدریجی با محیط، به گلدان‌های سرپوش‌دار حاوی خاک مخلوط پیت ماس/پرلیت/ورمیکولیت سترون با نسبت ۴:۲:۴ کشت شده و به‌تدریج با گذر زمان منافذی در سرپوش ایجاد و رطوبت درون گلدان کاهش یافت و به شرایط گلخانه سازگار شدند. آزمایش براساس طرح اسپلیت پلات بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ مقایسه شدند. محاسبات آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

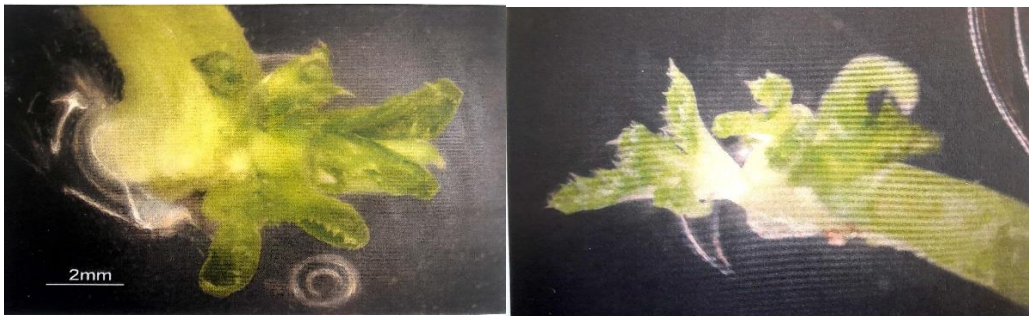
نتایج ارزیابی محیط‌های کشت برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های استریل نشان داد که در محیط کشت MS جوانه‌زنی به آرامی انجام شد. در محیط آب و آگار نیز گیاهچه‌ها زود از بین رفتند، ولی جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌ها تا مرحله برگ‌های اول و دوم در محیط MS نیم قدرت به خوبی انجام و گیاهچه‌های سالم و استریل برای برداشت ریزنمونه تولید شد (شکل ۱).

حدود شش هفته پس از کشت برگ‌ها در سه تکرار در محیط‌های کشت برای شاخه‌زایی (جدول ۱)، ریزنمونه‌ها شروع به باززایی مستقیم و تولید شاخه کردند. اولین شاخه در محیط کشت G مشاهده شد (شکل ۲). درصد باززایی شاخه در هر ریزنمونه در همه محیط‌ها اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی تمامی محیط‌ها بیانگر این بود که به غیر از تیمار D، کم و بیش در تمامی تیمارها شاخه‌زایی انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی (جدول ۳) نشان داد که بین تیمارهای مختلف هورمونی

برای شاخه‌زایی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. براساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۳)، تیمار G (BAP 0.2 mgl^{-1}, zeatin 0.4 mgl^{-1}, NAA 0.2 mgl^{-1}) با ۵۷٪ شاخه‌زایی بهترین تیمار برای باززایی شاخه شناسایی شد.

شکل ۱- گیاهچه‌های استریل بدست آمده از محیط MS نیم قدرت برای برداشت ریزنمونه‌های برگ

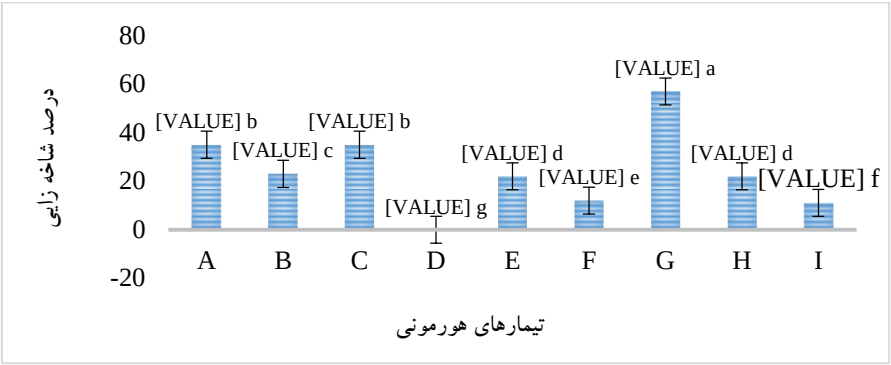


شکل ۲- باززایی مستقیم و تولید شاخه در تیمار G

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد باززایی شاخه در محیط کشت MS نیم قدرت با تیمارهای مختلف هورمونی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۲	۰/۴۴
تیمارهای هورمونی	۸	۸۲۱/۱۲**
اشتباه آزمایشی	۱۶	۰/۱۱۱
ضریب تغییرات		۱/۳۸

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد باززایی شاخه در محیط کشت MS نیم قدرت با تیمارهای مختلف هورمونی

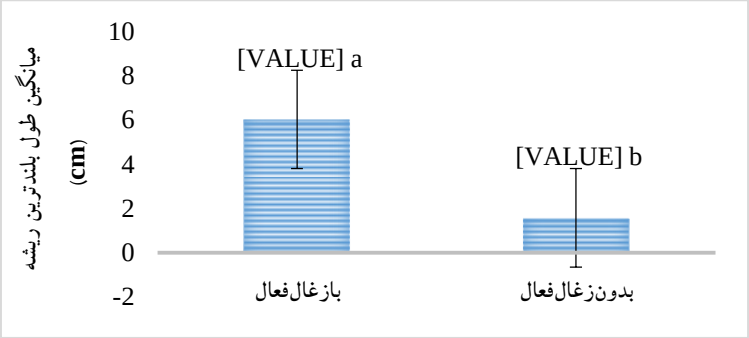
۱۴ تا ۱۶ روز پس از انتقال شاخه‌ها به محیط‌های ریشه‌زایی (جدول ۲)، در تمامی تیمارها ریشه‌زایی مشاهده گردید. قبل از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک، طول بلندترین ریشه و تعداد ریشه در همه محیط‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس براساس صفات تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه (جدول ۴) برای محیط کشت MS نیم قدرت به‌عنوان فاکتور اصلی در دو سطح (با زغال فعال و بدون زغال فعال) و سطوح هورمونی (بدون هورمون، IBA و NAA هر دو در غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر)) به‌عنوان فاکتور فرعی در قالب طرح اسپلیت‌پلات بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بیانگر این بود که بین دو محیط کشت MS نیم قدرت (با زغال فعال و بدون زغال فعال) از نظر تعداد ریشه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. ولی از نظر طول ریشه اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شد. با این تفاوت که گیاهان رشد کرده در محیط حاوی زغال فعال دارای ریشه‌های طویل‌تر و گیاهان رشد کرده در محیط بدون زغال فعال دارای ریشه‌های کوتاه و ضخیم‌تری بودند (شکل‌های ۴ و ۵). البته بین سطوح مختلف هورمونی از لحاظ طول بلندترین ریشه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. ولی از نظر تعداد ریشه اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ مشاهده شد. به‌طوری که تیمار هورمونی D با مقدار هورمون NAA به غلظت $0/25\ mgl^{-1}$ بیشترین تعداد ریشه را تولید کرد (شکل ۶). به‌نحوی که وجود اثر متقابل معنی‌دار نیز نشان می‌دهد که سطوح مختلف هورمونی در دو نوع محیط با زغال فعال و بدون زغال فعال اثرهای متفاوتی را در تعداد ریشه دارند.

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه در سطوح مختلف هورمونی و دو محیط کشت

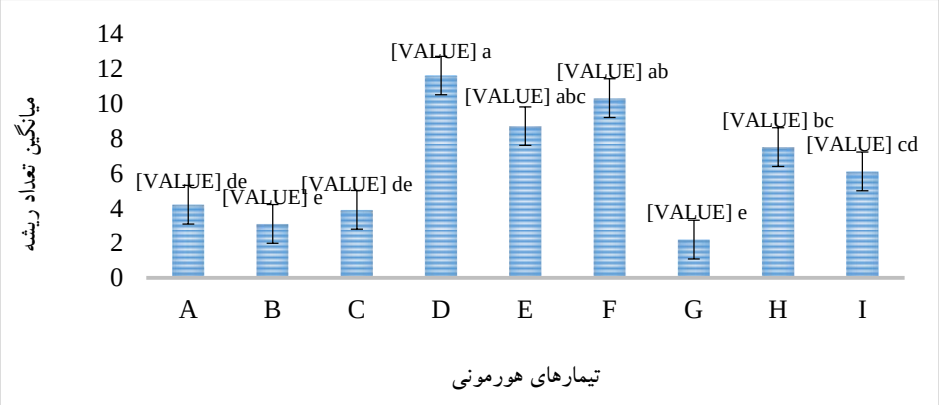
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد ریشه	طول بلندترین ریشه
تکرار	۲	۰/۸۴	۰/۰۸
محیط کشت	۱	۰/۸۵	۲۱۸/۰۱**
اشتباه آزمایشی	۲	۰/۲۵	۳/۸۴
هورمون	۸	۲/۵۱**	۳/۱۹
محیط کشت × هورمون	۸	۱/۳۸**	۲/۴۹
اشتباه آزمایشی	۳۲	۰/۲۵	۱/۵۰
ضریب تغییرات		٪ ۱۹/۳	٪ ۲۵/۳۰

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

شکل ۴- ریشه‌زایی در محیط حاوی زغال فعال (سمت راست) و محیط بدون زغال فعال (چپ)



شکل ۵- مقایسه میانگین طول بلندترین ریشه در محیط کشت MS نیم قدرت با زغال فعال و بدون زغال فعال



شکل ۶- مقایسه میانگین تعداد ریشه در شاخه در تیمارهای مختلف هورمونی

گیاهچه‌های بدست آمده از باززایی مستقیم دارای ریشه‌های ترد و شکننده نبودند، بلکه ریشه‌ها بسیار انعطاف‌پذیر بوده و خیلی راحت بدون هیچ صدمه‌ای به ریشه، به خاک منتقل شدند (شکل ۷). گیاهچه‌ها پس از انتقال به خاک رشد مناسبی داشتند و در طی ۳ تا ۴ هفته گیاهچه‌ها به‌تدریج با محیط و هوای آزاد سازگار شدند.

شکل ۷- گیاهچه‌های بدست آمده از باززایی

بحث

ازدیاد در شرایط درون‌شیشه‌ای، قابلیت زیادی در تکثیر و تولید گیاهان دارویی با کمّیت و کیفیت بالا دارد (Zarei *et al.*, 2020). اولین قدم در استفاده موفق از روش‌های مدرن برای اصلاح ژنتیکی گیاهان، باززایی مناسب آن گیاه است (Khalafalla *et al.*, 2010). برای یک باززایی موفق، محل برداشت ریزنمونه، محیط کشت پایه، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط قرارگیری نمونه در اتاقک رشد بسیار مؤثر است. در بین این فاکتورها نوع ریزنمونه مهمترین فاکتور برای باززایی مستقیم گیاه خارمریم می‌باشد. در این آزمایش استفاده از محیط کشت MS نیم قدرت برای تولید گیاهچه‌های سالم و استریل و برگ‌های اول و دوم گیاه به‌عنوان ریزنمونه برای باززایی گیاه بسیار مؤثر بود. ارزیابی نتایج نشان داد که اگر ریزنمونه را به صورت برگ کامل، بدون هیچ برشی به محیط کشت انتقال دهیم و بعد از شاخه‌زایی تا مرحله انتقال شاخه‌ها به محیط ریشه‌زایی، شاخه‌ها را روی برگ‌های کامل نگه داریم تعداد شاخه‌های سالم بدست آمده نسبت به حالتی که پس از شاخه‌زایی قسمتی از ریزنمونه جدا شود، بیشتر می‌شود. در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای ماریتیغال علاوه‌بر نوع ریزنمونه، نسبت اکسین بر سیتوکینین نیز نقش مهمی را ایفاء می‌کند. به‌طوری که با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها مانند Zeatin و به‌ویژه BAP در محیط رشد درصد شاخه‌زایی افزایش یافته است. البته القاء ریشه‌زایی نیز در محیط حاوی زغال فعال به همراه NAA توصیه می‌گردد. مطالعات زیادی نشان دادند که برای تولید کالوس با هدف باززایی، ریزنمونه برگ مفید واقع شده است (Meiners *et al.*, 2007). نتایج تحقیقات دیگر نشان داد که در بین ریزنمونه‌های گرفته شده از ساقه، دمبرگ و برگ بیشترین فراوانی القای کالوس در خارمریم در ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط MS حاوی ۵ mgl^{-1} Kin و ۰/۵ mgl^{-1} IAA بوده است (Bekheet *et al.*, 2014). البته نسبت اکسین بر سیتوکینین یکی از عواملی است که تأثیر مهمی در شاخه‌زایی دارد و غلظت بالاتر سیتوکینین موجب تمایز جوانه‌های ساقه و در نهایت شاخه‌زایی می‌شود (Verma *et al.*, 2011). در این آزمایش از بین غلظت‌های مورد استفاده در شاخه‌زایی به‌جز تیمار ۰/۳ mgl^{-1} Zeatin، ۰/۲ mgl^{-1} BAP و ۰/۲ mgl^{-1} NAA شاخه‌زایی در تمامی تیمارهای هورمونی مشاهده گردید، اما تعداد شاخه و درصد شاخه‌زایی میان تیمارها متفاوت بود. بهترین غلظت هورمونی از لحاظ درصد شاخه‌زایی تیمار ۰/۴ mgl^{-1} Zeatin، ۰/۲ mgl^{-1} BAP و ۰/۲ mgl^{-1} NAA بود. این نتایج ثابت می‌کند که نوع و غلظت سیتوکینین‌ها مانند Zeatin و به‌ویژه BAP نقش فوق‌العاده‌ای در تحریک شاخه‌زایی دارند، زیرا سیتوکینین‌ها نقش اساسی در تقسیم سلولی داشته و باعث رفع غالبیت انتهایی شده و بر القای شاخساره و رشد شاخساره اثر می‌گذارند (Preece, 1995). نتایج تحقیقی روی کشت بافت عناب نشان داد که محیط کشت MS حاوی ۲ mgl^{-1} BAP و ۰/۰۱ mgl^{-1} IBA بهترین محیط کشت برای شاخه‌زایی بوده است (Safarnejad, 2015). در پژوهشی دیگر بیان شد که هورمون BAP در غلظت‌های ۰/۵ mgl^{-1} و ۱ نسبت به کمترین (۰/۱ mgl^{-1}) و بیشترین مقدار (۳ mgl^{-1}) آن نقش مؤثرتری در شاخه‌زایی دارد (Verma *et al.*, 2011). در پژوهشی دیگر که بر روی باززایی ماریتیغال در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد، نتایج نشان داد که بیشترین درصد باززایی مستقیم مربوط به ریزنمونه‌های برگ در محیط حاوی ۱ mgl^{-1} BAP و ۲ mgl^{-1} NAA بود (Bekheet *et al.*, 2014). پژوهشگران زیادی به علت تأثیر مثبت کاهش نمک و ساکارز در مرحله ریشه‌زایی و نیز سازگاری راحت‌تر ریشه در مرحله انتقال به خاک، استفاده از محیط کشت MS نیم قدرت را ترجیح دادند (Dalal & Rai, 2004؛ Nagori & Purohit, 2004). از سویی Ahmadi و همکاران (۲۰۱۲) نیز در تحقیق خود به‌منظور ریشه‌زایی گونه چوبی کنار (*Ziziphus spina christti* (L.) Willd) از محیط کشت MS نیم قدرت استفاده کردند و نتایج مطلوبی بدست آوردند. البته اخیراً زغال فعال به‌طور گسترده‌ای در

پژوهش‌های کشت بافت به علت بهبود رشد و نمو سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، همچنین زغال فعال به‌طور عمده منجر به جذب ترکیب‌های بازدارنده رشد همانند ترکیب‌های فنولی موجود در محیط کشت و کاهش اثرهای ترکیب‌های سمّی می‌شود. البته غلظت بهینه استفاده از زغال فعال بسیار مهم است، زیرا مقدار زیاد آن موجب جذب ترکیب‌های هورمونی ازجمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و برخی از ویتامین‌ها و املاح مانند آهن و روی می‌شود (Pierik, 1987؛ Thomas, 2008). در ضمن استفاده از زغال فعال کمک می‌کند تا هرچه بیشتر شرایط محیط کشت به شرایط گیاه در محیط خارج از شیشه شبیه شود که این مورد بعدها برای انتقال گیاه به محیط مزرعه می‌تواند مفید بوده و استقرار اولیه گیاه را بهبود بخشد (Schenk & Hilderandt, 1972). هورمون اکسین در گیاهان معمولاً باعث تحریک ریشه‌زایی و جلوگیری از ایجاد شاخه‌های جانبی می‌شود. NAA یکی از متداول‌ترین اکسین‌ها در کشت بافت گیاهیست. در این تحقیق نیز نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای بدست آوردن ریشه‌های زیاد و طویل در خارمریم محیط کشت MS نیم قدرت حاوی NAA mgl^{-1} ۰/۲۵ و زغال فعال gl^{-1} ۲ بود. در همین رابطه در تحقیقاتی که در سال‌های گذشته بر روی چندین گونه گیاهی انجام شده است، نقش NAA به‌عنوان اکسین بسیار مناسب در القاء ریشه‌زایی در ازدیاد درون‌شیشه‌ای به اثبات رسیده است (Maliti *et al*., 2005). همچنین براساس گزارش‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای درخت مقاوم به خشکی (*Celtis caucasica*) بیشترین ریشه‌زایی را در محیط حاوی NAA mgl^{-1} ۰/۵ داشته است (Dadvar *et al.*, 2013). تولید ریشه‌های طویل‌تر در محیط کشت حاوی زغال فعال و معنی‌دار شدن اثر متقابل محیط کشت با زغال فعال و بدون زغال فعال با مقادیر مختلف هورمون‌ها نشان داد که با بدست آوردن مقدار کافی و مناسب از این مواد، در باززایی مستقیم می‌توان به نتیجه مطلوب در القاء ریشه‌زایی رسید. البته گزارش‌های متعددی از تأثیر زغال فعال بر القای ریشه‌زایی آمده است (Mulwa & Bhalla, 2006؛ Joshi & Dhawan, 2007؛ Agarwal & Kanwar, 2007؛ Sharma *et al*., 2007).

منابع مورد استفاده

- Abbasi, B.H., Khan, M.A., Mahmood, T., Ahmad, M., Chaudhary, M.F. and Khan, M.A., 2010. Shoot regeneration and free-radical scavenging activity in *Silybum marianum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 371-376.
- Ahmadi, E., Hosseini Nasr, S.M., Jalilvand, H. and Salehian Aghblaq, H., 2012. In vitro somatic propagation of *Ziziphus spina christti* (L.) Willd via indirect regeneration from leaf explants. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(1): 111-123.
- Arekhi, S., Aghdasi, M. and Khalafi, M., 2012. Optimization of *Silybum marianum* tissue culture for production of medicinal flavonolignan. Journal of Plant Production, 19(2): 69-87.
- Agarwal, S. and Kanwar, K., 2007. Comparison of genetic transformation in *Morus alba* L. via different regeneration systems. Plant Cell Report, 26: 177-185.
- Bekheet, S.A., El-Bahr, M.K., Ali, S.A. and Hamed, M.A., 2014. Callus production of Globe artichoke and Milk thistle: In vitro hypolipidemic and antioxidant activities. World Journal of Pharmaceutical Research, 3(4): 1-17.
- Cimino, C., Cavalli, 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 Journal of Biotechnology, 9(3): 237-240.
- Dalal, N.V. and Rai, V.R., 2004. In vitro propagation of *Oroxylum indicum* Vent. a medicinally important forest tree. Journal for Research, 9: 61-65.
- Dadvar, F., Rostami, T., Assare, M.H., Emam, M. and Shirvany, A., 2013. Effects of different concentrations of plant regulators on In vitro micropagation of *Celtis caucasica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21: 13-23.
- Thomas, T.D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.
- Hetz, E., Perales, E.H., Liersch, R. and Schieder, O., 1995. Plant regeneration from mesophyll and suspension protoplasts of *Silybum marianum*. Planta Medica, 61(6): 554-557.
- Iqbal Sada, M. and Srivastava, P., 2002. In vitro micropropagation of *silybum marianum* L. from various explants and silybin content. Plant Biochemistry and Biotechnology, 9(2): 81-87.

- Iri, S., Aghdasi, M. and Mianabadi, M., 2013. Induction of root formation to produce silymarin in *Silybium marianum* plant in tissue culture condition. Journal of Plant Process and Function, 2(2): 1-12.
- Joshi, P. and Dhawan, V., 2007. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. Biologia Plantarum, 51: 22-26.
- Khalafalla, M.M., Elaleem, K.G. and Modawi, R.S., 2010. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar almera. Journal of Phytology, 2: 40-46.
- Kumar, N. and Reddy, M.P., 2011. In vitro plant propagation. Journal of Forest Science, 2: 61-72.
- Maliti, C.M., Basile, D.V. and Corpe, W.A., 2005. Effects of Methylobacterium spp. Strains on rice *Oryza sativa* L. callus induction, plantlet regeneration, and seeding's growth. In vitro Journal Torrey Botany Society, 132: 355-367.
- Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I., 2007. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. Plant Cell Tissue Organ Culture, 89: 169-176.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Mulwa, R.M.S. and Bhalla, P.L., 2006. In vitro plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson). Plant Cell Report, 25: 1281-1286.
- Nagori, R. and Purohit, S.D., 2004. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. Scientia Horticulturae, 99: 89-98.
- Pierik, R.L.M., 1987. In vitro culture of higher plants. MortinusNijhof Publisher, Dordrecht, 348p.
- Preece, J.E., 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? Plant Tissue Culture Biotechnology, 1: 26-37.
- Safarnejad, A., 2015. Effects of growth regulators on in vitro regeneration of *Ziziphus jujube*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1): 40-48.
- Samandari Gikloo, T., Elhami, B. and Khosrowchahli1, M., 2012. Effects of explant type, plant growth regulators and activated charcoal on direct organogenesis of *Silybum marianum*. African Journal of Biotechnology, 11(37): 9023-9027.
- Schenk, R.U. and Hilderandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, 50: 199-204.
- Sharma, T., Modgil, M., Thakur, M., 2007. Factors affecting induction and development of in vitro rooting in apple rootstocks. Indian Journal of Experimental Biology, 45: 824-829.
- 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 Technology, 99(7): 2501-2506.
- Verma, S.K., Yucesan, B.B., Shahin, G., Gurel, S. and Gurel, E., 2011. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii*, an endemic medicinal species. Turkish Journal of Botany, 35: 689-695.
- Zarei, B., Taghipour, Z. and Kahrizi, D., 2020. Effect of growth regulators on in vitro callogenesis and regeneration of *Atropa Belladonna*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 27(2): 231-239.

In vitro propagation of marigold (*Silybum marianum* L.) via direct regeneration

F. Noormand Moaied[1*], N. Valizadeh[2] and T. Samandari Gikloo[3]

1*- Corresponding author, Research Division of Natural Resources, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tabriz, Iran
E-mail: farid.nm@areeo.ac.ir
2- Ph.D. graduate, Medicinal Plants and By-Products Research Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran
3- Ph.D. graduate, Agricultural Services Management of Parsabad (Moghan), Agricultural Jihad Organization of Ardabil Province, Iran

Received: March 2021 Revised: July 2021 Accepted: July 2021

Abstract

Silybum marianum L., from fam. asteraceae, is a very important medicinal plant in the pharmaceutical industry due to its active ingredient silymarin. Silymarin is very effective in treating the liver diseases, hepatitis, and cardiovascular disorders. Since the potential and production speed of this medicinal compound is low in habitats under natural conditions, the use of genetic engineering and production of transgenic plants using the various techniques such as tissue culture has been considered in this plant. The first step in this direction is to obtain an *in vitro* regeneration protocol. In this study, the leaf explants obtained from the Hungarian cultivar of *S. marianum* were evaluated for the direct regeneration affected by different combinations of hormones. Six weeks after the culture, the highest shooting (57%) was observed in the ½ MS medium containing 0.4 mg l^{-1} zeatin, 0.2 mg l^{-1} BAP, and 0.2 mg l^{-1} NAA. The shoots were then transferred to the root culture medium with the different hormonal treatments. The results showed that the best treatment to obtain the long and high roots was the ½ MS medium containing 0.25 mg l^{-1} NAA and 2 g l^{-1} activated charcoal. The seedlings obtained from the direct regeneration grew well after transplanting into the soil.

Keywords: Regeneration, Milk thistle (*Silybum marianum* L.), hormone, silymarin, shooting, rooting.