Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 41, No. 1, Page 130-144 (2025)

DOI:10.22092/ijmapr.2025.365891.3445

Somatic embryogenesis potential in callus induced from hypocotyl and cotyledon explants of *Silybum marianum* under *In Vitro* conditions

Farid Noormand Moaied[1*] and Farnaz Seyyedi Sahebari[2]

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. Research Division of Plant Protection, East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center , Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

Received: May 2024 Revised: October 2024 Accepted: October 2024

Abstract

Background and objectives: Milk thistle (*Silybum marianum*) is an annual or biennial herbaceous plant belonging to the Asteraceae family. The key bioactive compounds of this medicinal plant are flavonoids, which are primarily stored in the fruit (seed) and appear yellow. Among them, silymarin exhibits potent anti-inflammatory properties and plays a role in cancer prevention by affecting the vascular structure of prostate, breast, ovarian, liver, and leukemia cancer tissues. Biotechnological approaches, particularly tissue and cell culture techniques, serve as valuable complementary methods for the commercial production of plant-derived compounds. This study aimed to determine the optimal method for producing sterile *S. marianum* seedlings and to evaluate the effects of genotype, explant type, and growth regulators on callus induction, growth, and embryogenic callus formation.

Methodology: In this study, five genotypes (*Hungary, Borazjan, Fereydon Kenar, Jolgeh Khalaj, and Moghan*) were evaluated using three different seed disinfection methods in a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) with three replications. Seed germination and sterile seedling production were conducted in water and agar culture media without growth regulators, under dark conditions at 25°C. Subsequently, an experiment was performed using two genotypes (*Hungary and Borazjan*), cotyledon and hypocotyl explants, Murashige and Skoog (MS) medium, and growth regulators 2,4-D (1, 2.5, and 5 mg/L) and BAP (0.25 and 0.5 mg/L) in a factorial experiment based on completely random design under dark conditions. After 30 days, the induced callus was transferred to MS medium with half the initial hormone concentrations. Callus diameter was assessed using the Hochrony Berz method, while callus fresh weight, the number of embryogenic calluses, and the number of somatic embryos per callus in cotyledon explants were measured 30 days post-culture. Calluses were freeze-dried, and their dry weight was also recorded.

Results: The optimal method for producing sterile *S. marianum* seedlings involved treatment with Tween-20 solution, 70% ethanol, hydrogen peroxide, and sterile distilled water, followed by cultivation in water and agar medium without growth regulators. Analysis of variance for callus diameter, fresh weight, and dry weight indicated that the best conditions for callus induction were the *Borazjan* genotype, cotyledon explant, 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP.

Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Embryogenic callus formation occurred exclusively in cotyledon explants. Variance analysis of embryogenic callus production and the number of somatic embryos per callus revealed that optimal conditions for embryogenic callus formation were achieved using the *Hungarian* genotype with 5 mg/L 2,4-D and 0.25 mg/L BAP.
Conclusion: Based on the results, the most effective disinfectants for *S. marianum* seeds were Tween-20 solution, 70% ethanol, hydrogen peroxide, and sterile distilled water. For optimal callus production, cotyledon explants and low concentrations of auxin, such as 2,4-D, were preferable. In embryogenic callus formation, improved cultivars like *Hungary* outperformed native genotypes. Additionally, cotyledon explants were more suitable than hypocotyl explants, and high concentrations of auxin (2,4-D) combined with low concentrations of cytokinin (BAP) provided the best results.

Key word: Callus, *in vitro* conditions, *Silybum marianum*, Somatic embryogenesis.

قابلیت جنین‌زایی سوماتیکی در کالوس القاء شده از بخش‌های هیپوکوتیل و لپه گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum*) در شرایط درون شیشه‌ای

فرید نورمند مؤید[۱*] و فرناز سیدی صاحباری[۲]

*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، پست‌الکترونیک: farid.nm@areeo.ac.ir

۲- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: خار مریم یا ماریتیغال گیاهی یکساله یا دوساله و علفی با نام علمی *Silybum marianum* متعلق به تیره *Asteraceae* است. مواد مؤثره این گیاه دارویی از نوع ترکیبات فلانوئیدی است. این ترکیبات در میوه (دانه) ذخیره می‌شود و به‌صورت زرد رنگ جلوه می‌کند. سیلی‌مارین ماده مؤثره این گیاه به دلیل خواص ضدالتهابی با تأثیر بر ساختار عروق بافت سرطانی پروستات، پستان، تخمدان، کبد و لوسمی از سرطان پیشگیری می‌نماید. روش‌های فناوری زیستی به‌ویژه روش کشت بافت و سلول به عنوان روش مکمل در تولید تجاری فراورده‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. هدف از این تحقیق، ارائه بهترین روش تولید گیاهچه‌های استریل ماریتیغال و بررسی اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر القاء و رشد کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا بود.

مواد و روش: در این تحقیق، ابتدا پنج ژنوتیپ مجارستان، برازجان، فریدون کنار، جلگه خلج و مغان با سه روش مختلف ضدعفونی بذر در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار آزمایش شدند. جوانه‌زنی بذرها و تولید گیاهچه‌های استریل در محیط کشت آب و آگار بدون هورمون و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس آزمایشی با استفاده از دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان، ریزنمونه لپه و هیپوکوتیل، محیط کشت MS و تیمارهای هورمونی 2,4-D (۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط تاریکی و در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام گردید. کالوس‌های تولید شده پس از ۳۰ روز در محیط کشت MS با یک‌دوم هورمون‌ها واکشت شدند. صفات قطر کالوس به روش هوکرونی برز، وزن تر کالوس ۳۰ روز بعد از واکشت، تعداد کالوس‌های جنین‌زا و تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس در ریزنمونه لپه اندازه‌گیری شدند. کالوس‌ها توسط دستگاه فریز درایر خشک و وزن خشک نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

نتایج: براساس نتایج، بهترین روش تولید گیاهچه استریل ماریتیغال، استفاده از محلول‌های tween-20، اتانول ۷۰٪، آب اکسیژنه و شستشو با آب مقطر استریل و کشت در محیط آب و آگار بدون هورمون بود. نتایج تجزیه واریانس صفات قطر کالوس، وزن تر و خشک کالوس نشان داد که شرایط بهینه القاء کالوس استفاده از ژنوتیپ برازجان، ریزنمونه لپه، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. کالوس‌های جنین‌زا فقط در ریزنمونه لپه تشکیل شد. نتایج تجزیه واریانس صفات تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر واحد آزمایشی و تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس حاصل از ریزنمونه لپه نشان داد که شرایط بهینه تولید کالوس‌های جنین‌زا استفاده از رقم مجارستان، ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود.

نتیجه‌گیری: بر‌اساس نتایج بدست آمده بهترین مواد ضدعفونی بذر ماریتیغال، محلول‌های tween-20، اتانول ۷۰٪، آب اکسیژنه و شستشو با آب مقطر استریل است. برای تولید کالوس برتر از گیاه ماریتیغال، بهتر است از ریزنمونه لپه و مقادیر پایین هورمون‌های اکسین از قبیل 2,4-D استفاده شود. در تولید کالوس‌های جنین‌زا ارقام اصلاح شده از قبیل مجارستان نسبت به توده‌های بومی، ریزنمونه لپه نسبت به هیپوکوتیل و مقادیر بالای هورمون‌های اکسین (2,4-D) و مقادیر پایین هورمون‌های سیتوکینین(BAP) مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی سوماتیکی، شرایط درون شیشه‌ای، کالوس، ماریتیغال.

مقدمه

خار مریم یا ماریتیغال گیاهی با نام علمی *Silybum marianum* متعلق به تیره Asteraceae است. خار مریم گیاهی یکساله یا دوساله و علفی است. یک تا دو متر ارتفاع دارد. برگ‌ها پهن و شکننده هستند و در اوایل رویش به شکل روزت روی زمین قرار می‌گیرند. دمبرگ‌ها بلند، بیضی شکل و خاردار می‌باشند. وجود لکه‌های رنگی کلروفیل‌دار در بعضی نقاط سطح برگ و عدم وجود کلروفیل در برخی نقاط دیگر به ظاهر برگ حالتی شبیه مرمر می‌دهد. حاشیه برگ‌ها خاردار است و گل‌آذین مرکب به شکل بیضی و تا حدودی تخم‌مرغی شکل هستند. گل‌ها به رنگ بنفش تیره و بندرت سفید رنگ می‌باشند. میوه (دانه) ماریتیغال تخم‌مرغی شکل و رنگ آن عموماً قهوه‌ای تیره است (Omidbaigi, 1998).

خار مریم در گذشته برای مداوای بیماری‌های صفراوی و بیماری‌های مربوط به دستگاه گوارشی استفاده می‌شد. مجموعه مواد مؤثره این گیاه به سیلی‌مارین (Silymarin) معروف است (Omidbaigi, 1997). سیلی‌مارین به دلیل خواص ضد التهابی با تأثیر بر ساختار عروق بافت سرطانی پروستات، پستان، تخمدان، کبد و لوسمی از سرطان پیشگیری می‌نماید و در کاهش عوارض ناشی از تجویز داروهای ضد سرطانی و تشدید اثر درمانی آنها نیز مؤثر می‌باشد (Katiyar *et al*, 1997).

روش‌های فناوری زیستی به‌ویژه روش کشت بافت و سلول به عنوان روش مکمل در تولید تجاری فراورده‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. سیستم‌های کشت سلولی می‌توانند برای کشت در مقیاس وسیع سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شوند. کشت گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای، بررسی اثر عناصر، تیمارهای مختلف هورمونی، نور، دما و ... بدون اثر عوامل محیطی دیگر بر نوع و میزان تولید فراورده‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد. در این راستا، کشت کالوس و کشت سوسپانسیون و سایر اشکال مختلف کشت بافت گیاهی مانند سلول‌های تثبیت شده در بیوراکتورها و استفاده از گیاهان تراریخته در افزایش تولید و بهینه کردن شرایط سنتز متابولیت‌های گیاهی به‌کار برده شده‌اند. اعمال انواع تیمارهای هورمونی در شرایط درون‌شیشه‌ای یکی از روش‌هایی است که به کمک آن می‌توان سرعت رشد کالوس‌ها و میزان تولید فراورده‌ها را تحت تأثیر قرار داد (Poorjabbar *et al*, 2006).

استفاده از کشت سلول‌های گیاهی که از نظر مورفولوژیکی با هم مشابه‌اند برای تولید متابولیت‌های ثانویه مطلوب می‌باشد. اما ناپایدرای ژنتیکی این سلول‌ها یک محدودیت جدی محسوب می‌شود. بعلاوه در بسیاری از موارد تولید یک متابولیت ثانویه زمانی رخ می‌دهد که یک ساختار تمایز نیافته در مسیر تمایز قرار گیرد (Ramawat & Merillon, 1999).

یکی از مشکلات تجاری کردن فرایندهای تولید متابولیت‌های ثانویه بوسیله کشت سلول یا بافت گیاهی، هزینه بالای تولید است که در نتیجه رشد کم سلول‌های گیاهی، تولید اندک محصول، ناپایداری ژنتیکی رگه یا لاین‌های انتخابی و تجمع بین سلولی مواد تولید شده می‌باشد. بعضی از این مشکلات با تثبیت و پایدار کردن سلول‌ها کاهش می‌یابد. در این تکنیک سلول‌های گیاهی در داخل یک سیستم بیوراکتور قرار می‌گیرند (Purohit, 2004).

کالوس یک توده سلولی یا بافتی تمایز نیافته است که معمولاً در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. کالوس از کشت بخش‌های مختلف گیاه مانند قطعات برگ، ساقه، ریشه، دانه گرده و حتی پروتوپلاست و غیره می‌تواند بوجود آید. بافت کالوس کاملاً متجانس نیست، بلکه در بین این بافت ممکن است دستجات تمایز یافته سلولی نیز وجود داشته باشد. همچنین در اغلب مواقع مراکز مریستماتیک اولیه نیز در بین سلول‌های کالوس دیده می‌شود (Wetherall, 1984). رشد کالوس دارای ۳ مرحله است. مرحله اول فاز تأخیری که سلول‌ها برای تقسیم آماده می‌شوند. در مرحله دوم رشد کالوس به‌صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. در مرحله سوم رشد و نمو کالوس حالت سکون خواهد داشت. بهترین مرحله برای انجام واکشت، شروع مرحله سکون است. در صورت عدم واکشت، کالوس‌ها نکروزه شده و از بین

می‌روند (Eriksson, 2022).

مزایای عمده سیستم کشت بافت و سلول نسبت به کشت گیاه کامل برای تولید مواد مؤثره دارویی عبارتند از: متابولیت‌های مفید می‌تواند تحت شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی و شرایط خاک تولید شوند. سلول‌های کشت شده عاری از عوامل بیماری‌زا می‌باشند. سلول‌های هر گیاهی به آسانی قابل تکثیر برای تولید متابولیت‌های خاص آن هستند. کنترل رشد سلول و نیز تنظیم فرایند تولید متابولیت‌ها در سیستم کشت بافت و سلول موجب کاهش هزینه و افزایش تولید و کارآیی خواهد شد (Vanisree, *et al*. 2004).

با توجه به اینکه استفاده از رویشگاه‌های وحشی جوابگوی صنایع داروسازی نیست و چنین استفاده انبوه از گیاهان در طبیعت مسلماً موجبات نابودی آنها را فراهم خواهد ساخت، از این‌رو تولید مواد مؤثره دارویی به روش‌های آزمایشگاهی از قبیل کشت بافت ضروری بنظر می‌رسد.

هدف از این تحقیق، ارائه بهترین روش ضدعفونی بذر و محیط کشت مناسب برای تولید گیاهچه‌های استریل ماریتیغال و بررسی اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و تیمارهای فیتوهورمونی بر القاء و رشد کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش جوانه‌زنی و تولید گیاهچه استریل

هدف از این آزمایش، بررسی بهترین روش ضدعفونی بذر ماریتیغال و انتخاب دو ژنوتیپ برتر با حداکثر جوانه‌زنی و حداقل آلودگی بود. برای اجرای این آزمایش ۵ ژنوتیپ مجارستان، برازجان، فریدون کنار، جلگه خلج و مغان و ۳ روش ضدعفونی بذر در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار و هر تیمار در ۴۰ لوله آزمایش بررسی شدند.

روش‌های ضدعفونی بذر

روش اول: آبشویی ۴۸ ساعت، محلول رقیق مایع ظرف‌شویی ۱۰–۵ دقیقه و ۳ بار شستشو، اتانول ۷۰ درصد ۳–۲ دقیقه و ۳ بار شستشو، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ۲۰– ۱۵ دقیقه و ۳ بار شستشو، کشت در محیط موراشیگ و اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962).

روش دوم: آبشویی ۲۴ ساعت، قرار دادن بذرها در ظرف محتوی آب مقطر با همزن مغناطیسی بمدت یک ساعت برای از بین رفتن پوشش لزج روی بذر، اسید کلریدریک ۱ نرمال ۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر، آب اکسیژنه ۱۵ حجم ۳–۲ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر، محلول هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد ۱۵–۱۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، کشت بذرها در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای استریل شده محتوی کاغذ صافی و آب مقطر استریل، انتقال بذرها بعد از جوانه‌زنی و کمی رشد به محیط کشت MS. سه مرحله آخر زیر هود استریل انجام شد.

روش سوم: محلول tween-20 (۲ قطره در ۱۰cc آب مقطر) ۲۰–۱۵ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل، اتانول ۷۰ درصد ۲–۱ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، آب اکسیژنه ۱۵ حجم ۲/۵ دقیقه یا هیپوکلرید سدیم ۲ درصد ۱۵–۱۰ دقیقه و ۴ بار شستشو با آب مقطر استریل، کشت در محلول آب و آگار. کلیه مراحل زیر هود استریل انجام شد.

تهیه ریزنمونه از گیاهچه‌های استریل و انتقال به محیط کشت هورمون‌دار به منظور القاء کالوس

بذرهای دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان به روش ضدعفونی سوم با حداکثر جوانه‌زنی و کمترین آلودگی، ضدعفونی و به محیط کشت آب و آگار (۱۲ گرم بر لیتر) بدون هورمون منتقل و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ روز نگهداری و پس از جوانه‌زنی و کمی رشد به شرایط روشنایی انتقال داده شدند. در مرحله تولید لپه‌ها (گیاهچه‌های ۲۰– ۱۵ روزه)، دو ریزنمونه لپه و هیپوکوتیل زیر هود استریل از گیاهچه جدا و به قطعات ۱– ۰/۵ سانتی‌متری تقسیم و به محیط‌های کشت تهیه شده در پتری‌دیش‌های استریل منتقل گردیدند. برای بالا بردن

سرعت القاء و رشد کالوس اولیه غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) به همراه غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP (6-Benzylaminopurin) در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) آزمایش شدند (Murashige & Skoog, 1962 ; Cacho *et al*, 1999). هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری‌دیش با ۴ ریزنمونه بود و هر تیمار در ۴ پتری‌دیش کشت شد. نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل اتاقک رشد قرار گرفتند. پس از ۳۰ روز کالوس‌های تولید شده به محیط کشت MS با نصف مقادیر هورمون‌های مورد نظر (غلظت‌های ۰/۵، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و غلظت‌های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP) واکشت شدند. طرح آماری مورد استفاده، طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی شامل ۴ فاکتور: اکوتیپ در دو سطح (مجارستان و برازجان)، ریزنمونه در دو سطح (لپه و هیپوکوتیل)، 2,4-D در ۳ سطح و BAP در دو سطح در ۴ تکرار (هر تیمار در ۴ پتری‌دیش و هر تکرار شامل ۹۶ پتری‌دیش) بود.

روش آماده‌سازی و ترکیب محیط‌های کشت کالوس

به منظور تهیه حجم مشخصی از محیط کشت MS، ابتدا محلول‌های ذخیره نمک‌های ماکرو، نمک‌های میکرو، آهن و ویتامین‌ها طبق جدول ۱ تهیه شد (Baker & Schrall, 1977). تنظیم‌کننده‌های رشد مطابق جدول ۲ به تناسب تیمارهای تعریف شده اضافه شدند. سپس حجم محیط را به یک لیتر رسانده و توسط دستگاه PH متر، اسیدیته محیط بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. مقدار ۸ گرم آگار نیز برای نگهداری و جامدسازی اضافه شد. محلول ذکرشده بمدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد، سپس در شرایط استریل و زیر لامینار مقدار ۲۵ میلی‌لیتر به ازای هر پتری تقسیم گردید، برای هر تیمار ۲۰ پتری در نظر گرفته شد و در هر پتری ۴ قطعه ریزنمونه کشت گردید.

جدول ۱- اجزای محلول‌های ذخیره

Table 1. Stock solution components

Stock solution (macro salts)	mgl^{-1} **(1x)**
KNo_3	1900
NH_4No_3	1650
$MgSo_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KH_2Po_4	170
Stock solution (micro salts)	
H_3Bo_3	6.2
$MnSo_4.4H_2O$	22.3
$ZnSo_4.7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2Moo_4.2H_2O$	0.25
$CuSo_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Iron stock solution	
Na_2. EDTA	37.3
$FeSo_4$. $7H_2O$	27.8
Vitamin stock solution (1)	
Nicotinic acid	0.5
Thiamine Hcl	0.1
Pyridoxine Hcl	0.5
Vitamin stock solution (2)	
Glycine	2

صفات مورد بررسی در کالوس‌های القاء شده

صفات قطر کالوس به روش هوکرونی برز (Etedali, 2003) و وزن تر کالوس توسط ترازوی حساس، ۳۰ روز بعد از واکشت اندازه‌گیری شدند. با توجه به اینکه جنین‌های سوماتیکی فقط در ریزنمونه لپه تشکیل شدند، ازاین‌رو صفات تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر واحد آزمایشی و تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس در این ریزنمونه شمارش گردیدند. سپس کالوس‌ها توسط دستگاه فریز درایر خشک و وزن خشک نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

محاسبات آماری: تجزیه‌های واریانس در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملا تصادفی، مقایسه میانگین به روش دانکن با استفده از نرم افزار spss انجام شد.

جدول ۲ – ژنوتیپ‌ها، ریزنمونه‌ها و مقادیر تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار رفته در محیط‌های کشت کالوس در گیاه ماریتیغال

Table 2. Genotypes, explants, and growth regulators amounts used in callus culture media in *Silybum marianum*

Treatment	Genotype	Explant	Growth regulator	
			Auxin mg.l^{-1} (2,4-D)	Cytokinin mg,l^{-1} (BAP)
1	Hungary	cotyledon	1	0.25
2			1	0.5
3			2.5	0.25
4			2.5	0.5
5			5	0.25
6			5	0.5
7		hypocotyl	1	0.25
8			1	0.5
9			2.5	0.25
10			2.5	0.5
11			5	0.25
12			5	0.5
13	Borazjan	cotyledon	1	0.25
14			1	0.5
15			2.5	0.25
16			2.5	0.5
17			5	0.25
18			5	0.5
19		hypocotyl	1	0.25
20			1	0.5
21			2.5	0.25
22			2.5	0.5
23			5	0.25
24			5	0.5

نتایج

انتخاب بهترین روش ضدعفونی بذر و ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ میزان جوانه‌زنی و آلودگی بذر

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی و درصد عدم آلودگی بذرهای ۵ ژنوتیپ مختلف ماریتیغال به ۳ روش ضدعفونی بذر (جدول ۳) نشان داد که بین روش‌های ضدعفونی و بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ جوانه‌زنی و عدم آلودگی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. اثر متقابل معنی‌دار ژنوتیپ در روش ضدعفونی نیز نشان‌دهنده واکنش متفاوت هریک از ژنوتیپ‌ها در روش‌های ضدعفونی می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین صفات ذکرشده بین ژنوتیپ‌ها (جدول ۴) نشان داد که دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان با قرار گرفتن در کلاس‌های a و b بالاترین درصد جوانه‌زنی و عدم آلودگی را دارند. مقایسه میانگین صفات بین روش‌های مختلف ضدعفونی بذر (جدول ۵) نیز نشان داد که روش دوم ضدعفونی بذر با ۹۸ درصد عدم آلودگی و قرار گرفتن در

کلاس a بهترین روش می‌باشد و روش‌های اول و سوم به ترتیب با ۶۷/۸ و ۶۶/۶ درصد عدم آلودگی و قرار گرفتن در کلاس b تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. در مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی، با توجه به اینکه روش دوم ضدعفونی بذر کمترین درصد جوانه‌زنی (۲/۲ درصد) را دارد، با وجود بالا بودن درصد عدم آلودگی (۹۸ درصد) نمی‌توان روش دوم را انتخاب کرد. بنابراین یکی از دو روش اول و سوم را بایستی انتخاب کرد. روش سوم ضدعفونی بذر بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر (۴۴/۹ درصد با کلاس a) را دارد. بنابراین، روش سوم بهترین روش ضدعفونی بذر ماریتیغال معرفی می‌گردد (شکل ۱ و ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر روش ضدعفونی بذر و ژنوتیپ بر درصد جوانه‌زنی و عدم آلودگی بذور ماریتیغال

Table 3. ANOVA of seed disinfection method and genotype effects on germination percentage and non-contamination of *Silybum marianum* seeds

		M.S.	
S.O.V.	**d.f.**	**Germination percentage**	**Non-contamination percentage**
Disinfection *method (D)*	2	7984.95**	4748.6**
Genotype (G)	4	1467.63**	3537.3**
D × G	8	709.83**	809.1**
Experimental error	30	4.616	8.866
C.V. (%)		10.76	3.32

**: significant at 1% probability level.

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر ژنوتیپ بر درصد جوانه‌زنی و عدم آلودگی بذور ماریتیغال

Table 4. Means comparison of genotype effects on germination percentage and non-contamination of *Silybum marianum* seeds

Genotype	Germination (%)	Non-contamination (%)
Hungary	35.33 a	96.67 a
Borazjan	26.17 b	96.33 a
Fereydon kenar	10.5 d	62.33 c
Jolgeh khalaj	17.67 c	79.33 b
Moghan	2.83 e	52.67 d

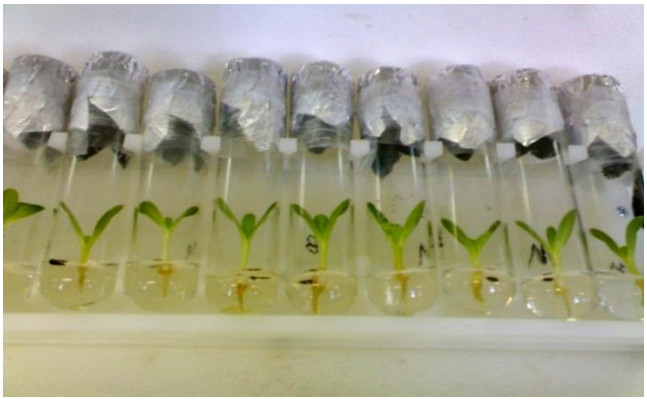
In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Dancan test).

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیر روش ضدعفونی بذر بر درصد جوانه‌زنی و عدم آلودگی بذور ماریتیغال

Table 5. Means comparison of seed disinfection method effects on germination percentage and non-contamination of *Silybum marianum* seeds

Disinfection method	Germination (%)	Non-contamination (%)
1	8.4 b	67.8 b
2	2.2 c	98 a
3	44.9 a	66.6 b

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Dancan test).



شکل۱- گیاهچه‌های استریل ماریتیغال تولیدشده در محیط آب و آگار به روش سوم ضد عفونی بذر

Figure 1. *Silybum marianum* sterile seedlings produced in water and agar medium by the third method of seed disinfection

شکل۲- گیاهچه آماده ماریتیغال برای تهیه ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و لپه

Figure 2. *Silybum marianum* seedling ready for preparation of hypocotyl and cotyledon explants

شرایط بهینه القاء کالوس

نتایج تجزیه واریانس صفات قطر کالوس، وزن تر و خشک کالوس حاصل از دو ریزنمونه هیپوکوتیل و لپه از دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان تحت تیمارهای هورمونی 2,4-D و BAP (جدول ۶) نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها، بین ریزنمونه‌ها و بین مقادیر مختلف 2,4-D از لحاظ صفات قطر، وزن تر و خشک کالوس تفاوت معنی‌دار وجود دارد، ولی بین مقادیر مختلف BAP از لحاظ صفات ذکرشده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. براساس میانگین مقادیر صفات کالوس (جدول ۸) بیشترین مقدار قطر کالوس، وزن تر و خشک کالوس مربوط به ژنوتیپ برازجان و ریزنمونه لپه و مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. مقایسه میانگین صفات ذکرشده بین مقادیر مختلف 2,4-D (جدول ۷) نیز نشان داد که مقدار ۱ میلی‌گرم بر لیتر با قرار گرفتن در کلاس a بیشترین مقدار صفات یادشده را دارد. بنابراین شرایط بهینه القاء کالوس، استفاده از ژنوتیپ بومی برازجان، ریزنمونه لپه، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP می‌باشد.

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد بر برخی صفات کالوس در گیاه ماریتیغال

Table 6. ANOVA of genotype, explant, and growth regulator effects on some *Silybum marianum* callus traits

S.O.V.	d.f.	M.S.		
		Callus diameter	Callus fresh weight	Callus dry weight
Genotype (G)	1	1.935**	115.686**	11.374**
Explant (E)	1	12.164**	1843.56**	89.216**
G × E	1	0.017	43.368**	0.017
2,4-D	2	3.75**	291.247**	16.445**
G × 2,4-D	2	0.62**	31.345**	4.425**
E × 2,4-D	2	3.105**	343.352**	22.674*
G × E × 2,4-D	2	0.035	23.258**	1.308*
BAP	1	0.111	0.419	1.046
G × BAP	1	0.503**	79.931**	3.678**
E × BAP	1	0.198**	91.848**	8.251**
G × E × BAP	1	0.001	7.146	0.272
BAP × 2,4-D	2	0.426**	203.028**	13.843**
G × 2,4-D × BAP	2	0.03	5.089	1.597**
E × 2,4-D × BAP	2	0.343**	15.985**	0.21
G × E × 2,4-D × BAP	2	0.606**	86.434**	4.002**
Experimental error	48	0.039	4.357	0.416
C.V. (%)		5.08	9.22	8.7

*and**: significant at 1, 5% probability levels

جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر **2,4-D** بر برخی صفات کالوس در گیاه ماریتیغال

Table 7. Means comparison of 2,4-D effects on some *Silybum marianum* callus traits

2,4-D (mgl^{-1})	Callus diameter (mm)	Callus fresh weight (mg)	Callus dry weight (mg)	Number of somatic embryos in each callus	Number of embryonic calluses
1	15.77 a	672.6 a	51.5 a	4.234 b	1.625 b
2.5	14.11 b	628.8 b	49.08 a	3.953 b	2.375 a
5	10.77 c	393.5 c	33.65 b	5.359 a	2.563 a

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

شرایط بهینه تولید کالوس‌های جنین‌زا

براساس مشاهدات بدست آمده (شکل‌های ۳، ۴، ۵ و ۶)، کالوس‌های جنین‌زا فقط در ریزنمونه لپه تشکیل شد. نتایج تجزیه واریانس صفات تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر واحد آزمایشی و تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس حاصل از ریزنمونه لپه بدست آمده از دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان تحت تیمارهای هورمونی 2,4-D و BAP (جدول ۹) نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و بین مقادیر مختلف 2,4-D از لحاظ هر دو صفت تفاوت معنی‌دار وجود دارد و بین مقادیر مختلف BAP نیز از لحاظ صفت تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس تفاوت معنی‌دار است.

براساس میانگین مقادیر صفات کالوس (جدول ۸) بیشترین تعداد کالوس‌های جنین‌زا و جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس مربوط به ژنوتیپ مجارستان و مقدار ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. مقایسه میانگین صفات ذکرشده بین مقادیر مختلف 2,4-D (جدول۷) نیز نشان داد که مقدار ۵ میلی‌گرم بر لیتر با قرار گرفتن در کلاس a بیشترین مقدار صفات یادشده را دارد. بنابراین شرایط بهینه تولید کالوس‌های جنین‌زا، استفاده از رقم اصلاح شده مجارستان، ریزنمونه لپه، ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP می‌باشد.

جدول ۸- میانگین برخی صفات کالوس حاصل از تیمارهای مورد نظر در گیاه ماریتیغال

Table 8. The mean values of different callus traits obtained from the desired treatments in *Silybum marianum*.

Treatment	Callus diameter (mm)	Callus fresh weight (mg)	Callus dry weight (mg)	Number of somatic embryos in each callus	Number of embryonic calluses
1	20.54	802.5	61.87	6.82	2
2	16.79	855	58.75	6.75	3
3	15.92	786.25	61.63	3.56	1.75
4	20.09	1069	85.68	9	4
5	10.08	361.75	30.11	14.94	4
6	7.5	226.5	20.7	2.88	2
7	10.72	339.25	30.11	0	0
8	11.07	426	30.72	0	0
9	11.17	397.75	34.05	0	0
10	8.89	217.75	19.74	0	0
11	10.75	516	38.72	0	0
12	7.22	144.75	13.28	0	0
13	19.22	729	24.92	2.75	1.25
14	24.04	1576.25	108.22	0.63	0.25
15	16.21	844.25	61.3	2.19	2
16	19.67	1036.25	70.64	1.06	1.75
17	14.17	682.5	50.34	2.31	2.25
18	11.29	383.25	30.35	1.31	2
19	12.8	301	31.01	0	0
20	10.94	351.75	36.44	0	0
21	10.39	326.25	28.1	0	0
22	10.56	352.75	31.49	0	0
23	11.93	448.25	54.33	0	0
24	13.22	385	31.38	0	0

جدول ۹- تجزیه واریانس تأثیر ژنوتیپ و تنظیم‌کننده رشد بر تعداد کالوس‌های جنین‌زا و تعداد جنین‌های سوماتیکی در هر کالوس حاصل از ریزنمونه کوتیلدون در گیاه ماریتیغال

Table 9. ANOVA of genotype and growth regulator effects on number of embryogenic calli and number of somatic embryos in each callus obtained from cotyledon explant in *Silybum marianum*

S.O.V.	d.f.	M.S.	
		The number of somatic embryos in each callus	The number of calluses embryonic
Genotype (G)	1	378.283**	17.521**
2,4-D	2	8.859*	3.938**
G × 2,4-D	2	6.755*	0.896**
BAP	1	39.876**	0.021
G × BAP	1	1.98	2.521**
BAP × 2,4-D	2	77.068**	4.521**
G × 2,4-D × BAP	2	83.859**	5.396**
Experimental error	36	2.234	0.104
C.V. (%)		32.18	14.95

*and**: significant at 1, 5% probability levels

بحث

براساس نتایج بدست آمده برای تولید کالوس برتر از گیاه ماریتیغال، بهتر است از ریزنمونه لپه و مقادیر پایین هورمون‌های اکسین از قبیل 2,4-D استفاده شود. در تولید کالوس‌های جنین‌زا ارقام اصلاح شده از قبیل مجارستان نسبت به توده‌های بومی، ریزنمونه لپه نسبت به هیپوکوتیل و مقادیر بالای هورمون‌های اکسین (2,4-D) و مقادیر پایین هورمون‌های سیتوکینین (BAP) مناسب می‌باشد.

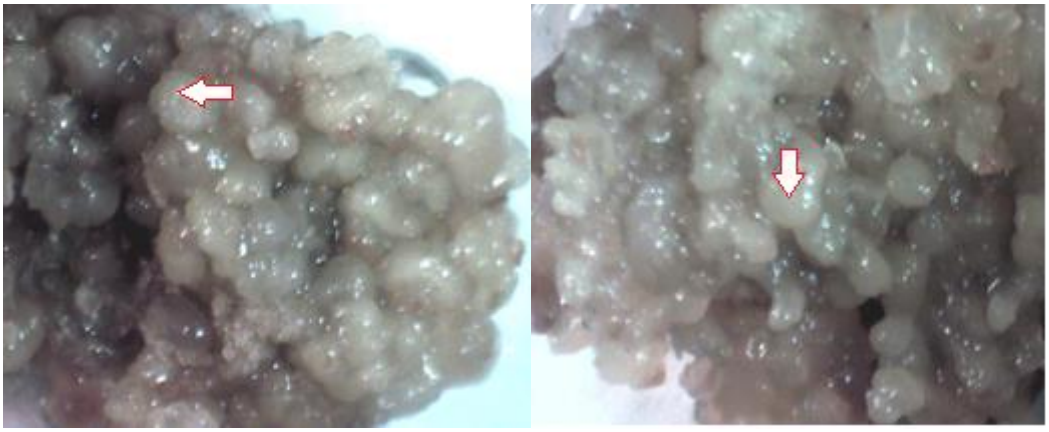
نتایج تحقیقات محققان نیز نشان داد که ژنوتیپ، ترکیبات موجود در محیط کشت، نوع ریزنمونه، نوع هورمون‌های مورد استفاده، شرایط کشت، پاسخ به کالزایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان رشد و القای کالوس، هم به شرایط آزمایشگاهی و هم به پایه ژنتیکی گیاه وابسته است و اثر متقابل این دو نیز می‌تواند بر میزان کالزایی تأثیر بگذارد (Kuusiene & Kandzezauskaite, 2001; Bregitzer, 1992 ; Liu *et al*, 1997).

در بررسی تولید کالوس در خار مریم از ریزنمونه لپه، Cimino و همکاران (۲۰۰۶)، بهترین تیمار هورمونی را ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D معرفی کردند.

Samandari و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در محیط‌های دارای اکسین بالا، بافت‌های کالوس دانه دانه (nodular) تشکیل شد که احتمال جنین‌زایی در این نوع ساختارها وجود دارد. از لحاظ وزن تر و قطر کالوس بهترین تیمار برای رقم مجارستان، ریزنمونه لپه در محیط B5 حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر Zeatin، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود.

در محیط کشت MS با ترکیب هورمون‌های NAA و Kin، Baker و Schrall (۱۹۷۷) توانستند گیاه ماریتیغال را وادار به کالوس‌دهی کنند. ولی این کالوس‌ها بعد از ۳ سری بازکشت در همان محیط توانایی زیستی خود را از دست دادند.

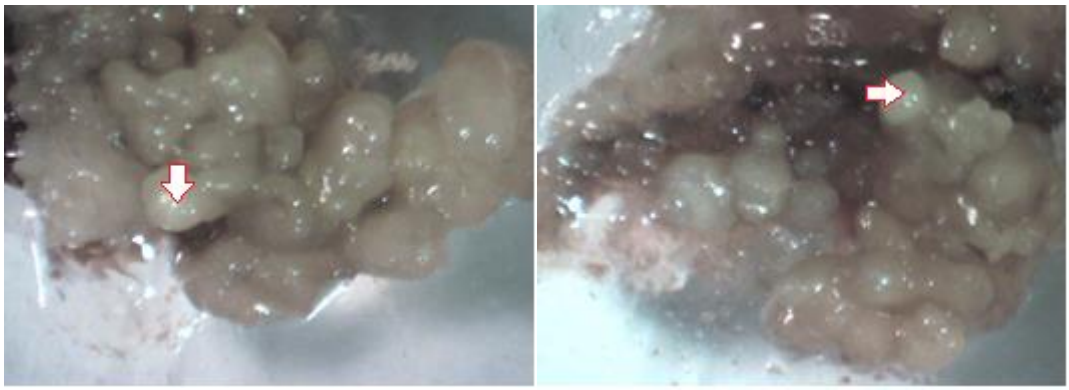
در بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر کال‌زایی ماریتیغال توسط Cacho و همکاران (۱۹۹۹)، بهترین کالوس از ریزنمونه لپه در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در شرایط تاریکی بدست آمد.



شکل ۳- کالوس‌های محتوی جنین‌های سوماتیکی به‌دست آمده از ریزنمونه لپه در محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP در گیاه ماریتیغال (رقم مجارستان)

Figure 3. Calli containing somatic embryos obtained from cotyledon explant in MS containing 5 mg.l^{-1} 2,4-D and 0.25 mg.l^{-1} BAP in *Silybum marianum* (Hungarian variety)

Poorjabba و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایش‌های القاء و رشد کالوس ماریتیغال نشان دادند که رقم مجارستان وزن تر و قطر کالوس بالاتری نسبت به ژنوتیپ نورآباد مغان داشت و ریزنمونه لپه نیز از نظر وزن تر و قطر کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل بالاتر بود. با افزایش میزان هورمون‌ها در محیط کشت، وزن تر و قطر کالوس افزایش یافت و در هر بازکشت کالوس‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر Kin و دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین وزن تر و قطر کالوس را داشتند. Hasanloo (۲۰۰۵) طی آزمایشی بهترین محیط القاء کالوس را از ریزنمونه لپه در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر Kin بدست آوردند.

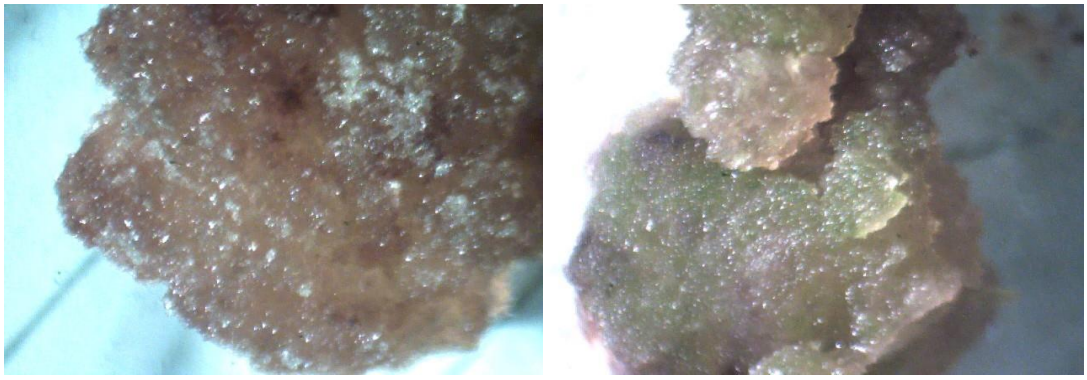


شکل ٤- کالوس‌های محتوی جنین‌های سوماتیکی به‌دست آمده از ریزنمونه لپه در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP در گیاه ماریتیغال (رقم برازجان)

Figure 4. Calli containing somatic embryos obtained from cotyledon explant in MS containing 1 mg.l^{-1} 2,4-D and 0.5 mg.l^{-1} BAP in *Silybum marianum* (Borazjan variety)

شکل ٥- کالوس‌های غیر جنین‌زا به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP در گیاه ماریتیغال (رقم برازجان)

Figure 5. Non-embryogenic calli obtained from hypocotyl explant in MS containing 1 mg.l^{-1} 2,4-D and 0.5 mg.l^{-1} BAP in *Silybum marianum* (Borazjan variety)



شکل ٦ – کالوس‌های غیر جنین‌زا به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر BAP در گیاه ماریتیغال (رقم مجارستان)

Figure 6. Non-embryogenic calli obtained from hypocotyl explant in MS containing 5 mg.l^{-1} 2,4-D and 0.25 mg.l^{-1} BAP in *Silybum marianum* (Hungarian variety)

References

- Baker, H. and Schrall, R., 1977. Tissue and Suspension Culture of *Silybum marianum* L. Communication: isolation and growth of tissue and suspension cultures and studies on flavonoids. Planta Medica, 131: 92-185.
- Bregitzer, P., 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. Crop Sciences, 32: 1108-1112.
- Cacho, M., Moran, M., Corchete, P. and Fernandez, J., 1999. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* L. Gaertn. Plant Science, 144: 63-68.
- Cimino, C., Cavalli, S.V., Spina, Natalucci, F.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.
- Eriksson, H., 2022. Basic principles of plant tissue culture and its applications. Global Science Research Journals, www.globalscienceresearchjournals.org/.
- Etedali, F., 2003. Genetic analysis of callus formation in canola by Dialel method. Master's Thesis in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz University. (In Persian)
- Hasanloo, T., 2005. Study of some secondary metabolites in plant *Silybum marianum* L. collected from different parts of Iran and its tissue and cell culture to produce silymarin. PhD thesis in Biology, Plant Sciences. Faculty of Science, Tarbiat Moalem University. (In Persian)
- Katiyar, S.K., Korman, N.J. and Mukhta, H., 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. Journal of the National Cancer Institute, 89(8): 556-566.
- Kuusiene, S. and Kandzezauskaite, M., 2001. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda*. Acta Horticulturae, 560 (560):501-508.
- Liu, Z.H., Wang, W.C. and yan, S.Y., 1997. Effect of hormone treatment on callus formation and indole acetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyl cultivated in vitro. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38: 171 -176.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15: 473-497.
- Omidbaigi, R. 1997. Approaches to the Production and Processing of Medicinal Plants (Vol.1), Publication of Astan Ghods Razavi, Mashhad, 283p. (In Persian)
- Omidbaigi, R. 1998. Investigating the production of silymarin and silybin in *Silybum marianum* plant by growing its wild and cultivated seeds. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 29(2): 417-413.
- Poorjabbar, A., Mohammadi, S.A., Khosroshahli, M. and Ziyaii, A., 2006. Optimizing the in vitro cultivation conditions of the medicinal plant *Silybum marianum* L. and investigation of somaclonal diversity with molecular markers. Master's thesis in Agricultural Biotechnology. Faculty of Agriculture, University of Tabriz. (In Persian)
- Purohit, S.S., 2004. Plant Tissue Culture. Publication of Bio-Green Books, 364p.
- Ramawat, K.G. and Merillon, J.M., 1999. Biotechnology of secondary metabolite. http://www.Scipub.Net.
- Samandari, T., Khosroshahli, M. and Noormand moaied, F. 2009. Investigating the possibility of regeneration from different parts of *Silybum*

marianum plant. Master's thesis in the field of agricultural biotechnology. Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Science and Research Unit.

- Vanisree, M., Lee, C.Y., LO, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. and Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 1-22.
- Wetherall, D.F., 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells.
Plant cell Tissue Organ Culture, 3: 221- 227.