

بهینه سازی شرایط کشت درون شیشه ای گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum*)

و بررسی تنوع سوماکلونال حاصل با استفاده از نشانگرهای RAPD

عاطفه پورجبار¹، سیدابوالقاسم محمدی^{2*}، محمود خسروشاهلی³، علیرضا مطلبی آذر⁴ و علی ضیایی⁵

تاریخ دریافت: 88/3/26 تاریخ پذیرش: 88/5/24

1- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

4- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

5- گروه داروسازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* مسئول مکاتبه E-mail: mohammadi@tabrizu.ac.ir

چکیده

ماریتیغال از گیاهان مهم دارویی است که جایگاه خاصی را در صنایع دارویی پیدا کرده است. برداشت بی رویه آن از رویشگاه‌های طبیعی موجب فرسایش ژنتیکی و از بین رفتن ذخایر ژنتیکی آن می شود. به منظور بهینه سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه ماریتیغال، آزمایشی در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با استفاده از رقم اصلاح شده مجاری و اکوتیپ مغان با ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط کشت MS با چهار ترکیب هورمونی کینیتین و 2-4 D در شرایط تاریکی انجام گرفت. جوانه زنی بزور در محیط کشت MS بدون هورمون در شرایط تاریکی و دمای 26 درجه سانتی گراد صورت گرفت. پس از کالوس زایی، کالوس های حاصل در کلیه ترکیبات تیماری، چهار بار واکشت شدند. قبل از هر واکشت و نیز در واکشت های مختلف وزن تر و قطر کالوس ها اندازه گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده ها در هر واکشت نشان داد که رقم مجاری وزن تر و قطر کالوس بیشتری نسبت به اکوتیپ مغان دارد و ریزنمونه کوتیلدون نیز از نظر وزن تر و قطر کالوس نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل برتر است. با افزایش میزان هورمون در محیط کشت، وزن تر و قطر کالوس افزایش یافت و در هر چهار واکشت کالوس های رشد یافته در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر کینیتین و دو میلی گرم در لیتر 2-4 D بیشترین وزن تر و قطر کالوس را داشتند. بررسی تنوع سوماکلونال حاصل در شرایط مختلف کشت، ریزنمونه ها و واکشت ها با استفاده از نشانگرهای RAPD نشان دهنده الگوی نواری متفاوت در بین کالوس های حاصل از ریزنمونه های مختلف دو ژنوتیپ در واکشت ها و محیط های کشت مختلف بود.

واژه های کلیدی: تنوع سوماکلونال، کشت بافت، کینیتین، ماریتیغال، 2-4 D

Optimization of *in vitro* Culture of Milk Thistle (*Silybum marianum*) and Analysis of Somaclonal Variation by RAPD Markers

A Pourjabar¹, SA Mohammadi^{1*}, M Khosroshahli², AR Motalebi³ and SA Ziai⁴

¹Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Dept. of Animal Science, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Medical University, Iran

*Corresponding author: E-mail:mohammadi@tabrizu.ac.ir

Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum*) is one of the most important medicinal plants and has found special place in pharmacy industries. Irregular harvest of this plant from natural habitats results in the destruction of its genetic resources. In order to optimize *in vitro* culture of milk thistle, this study was carried out in a factorial experiment based on completely randomized design with four replications, two genotypes (Budakalszi from Hungary and Moghan ecotype) and cotyledon and hypocotyle explants in MS medium supplemented with four kinetin and 2-4 D combinations. Seeds were germinated in MS medium without hormones under 26°C and darkness conditions. After callus induction, the calli were subcultured four times into the fresh media. Analysis of variance revealed that in all of the subcultures, Budakalszi cultivar was superior to Moghan ecotype with respect to callus fresh weight and diameter. Callus fresh weight and diameter were also higher in the calli obtained from cotyledon compared with the hypocotyls explant. With the increase in hormone levels, callus weight and diameter were increased. In all of the four subcultures, maximum callus growth was observed in the medium supplemented with 2 mg/l 2-4 D and 2 mg/l kinetin. Analysis of somaclonal variation in the calli obtained from different culture conditions and subcultures using RAPD markers revealed different banding patterns among samples from explants of the two genotypes in different culture and subculture conditions.

Keywords: Kinetin, Milk thistle, Somaclonal variation, Tissue culture, 2-4 D

مقدمه

ماریتغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) از گیاهان دارویی مهم است که جایگاه خاصی را در صنایع داروسازی پیدا کرده است. این گیاه دارای مواد موثره از نوع ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد که از آن در مداوای بیماریهای طحال، کبد، یرقان‌های ویروسی، یبوست‌های مزمن و رفع سنگ کلیه استفاده می‌شود (کامی و همکاران 2003). مواد موثره ماریتغال از نوع ترکیبات فلاونوئیدی است. این ترکیبات در میوه‌های (دانه) آن ساخته و ذخیره شده و به صورت ماده زرد رنگی جلوه می‌کنند. مجموعه مواد موثره این گیاه به سیلیمارین¹ معروف است. امروزه تولید ژنوتیپ‌ها و لاین‌هایی با مقدار بالای سیلی بین مورد توجه است (هتزر و همکاران 1995).

کشت سلول و بافت به عنوان روش مکمل برای روش‌های متداول در تولید تجاری فراورده‌های گیاهی می‌باشد. استفاده از روش‌های کشت بافت و سلول برای تولید مواد موثره دارویی در میزان مشابه و حتی بیشتر از گیاه کامل در سال‌های اخیر پیشرفت و کاربرد چشمگیری داشته است. فعالیت بیوسنتزی سلول‌های کشت شده می‌تواند با دستکاری عوامل محیطی و گزینش لاین‌های سلولی و کلون‌های مناسب افزایش یابد (راماچاندرا و راوی شانکار 2002).

القا و تولید کالوس در گیاهان تک لپه معمولاً مشکل‌تر از گیاهان دو لپه است و برای تحریک و القای کالوس نیاز به افزودن مواد تنظیم‌کننده رشد به محیط کشت می‌باشد. خصوصیات ماده تنظیم‌کننده (نوع، غلظت و نسبت اکسین به سیتوکینین) تا حد زیادی بستگی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های درون زای موجود در بافت گیاهی دارد. در هویج مقادیر کم 2-4 D منجر به تمایز سلولی ولی افزایش غلظت آن موجب القای کالوس می‌شود. سیتوکینین به همراه اکسین در کنترل تمایز ریشه و ساقه نقش دارد. علاوه بر مواد تنظیم‌کننده رشد، عوامل متعدد دیگری از قبیل ژنوتیپ، ترکیب محیط

کشت و عوامل فیزیولوژیکی موثر در رشد مانند نور، دما و غیره نیز در تشکیل کالوس اهمیت دارند (پروهیت 2004).

گزارش شده است که کاربرد ترکیب هورمون‌های NAA (Naphtaleneacetic acid) و کینتین در محیط کشت MS کالوس زایی را در گیاه ماریتغال القاء کردند. ولی کالوس‌ها بعد از سه سری واکشت در همان محیط توانایی زیستی خود را از دست دادند. کاجو و همکاران (1999) نشان دادند که محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم بر لیتر 2-4 D و 0/1 میلی گرم بر لیتر کینتین را مناسبترین محیط برای کالوس زایی ریز نمونه‌های کوتیلدونی گیاهچه‌های 10 روزه ماریتغال می‌باشد

یکی از ویژگی‌های گیاهان حاصل از کشت بافت و سلول، تنوع سوماکلونال می‌باشد. تغییرات ژنتیکی در کشت بافت حاصل طیف وسیعی از جهش‌ها، شامل جهش‌های نقطه‌ای، تغییر آرایش کروموزومی، وارونگی، اضافه و حذف شدن و پلی پلوئیدی است. تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از پروتوپلاست و کشت‌های ریزنمونه سیب زمینی، نیشکر، یونجه، برنج، گندم، ذرت و ... گزارش شده است (پروهیت 2004).

در کشت بافت توتون مشاهده شده است که افزایش در میزان سیتوکینین بنزید آمینو پورین موجب پایداری گیاه می‌شود. افزودن 2-4 D و سیتوکینین به محیط کشت نیز احتمال وقوع جهش و تغییرات ژنتیکی را افزایش می‌دهند (پروهیت 2004).

پیشرفت در زمینه تکنولوژی نشانگرهای مولکولی، ابزارهای مکمل و دقیقی برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی بوجود آورده است که علاوه بر برطرف کردن بسیاری از مشکلات مرتبط با نشانگرهای مورفولوژیکی، بررسی تعداد زیادی نمونه را در زمان کوتاه ممکن ساخته است. نشانگرهای مبتنی بر DNA برای شناسایی تغییرات سوماکلونال نیز بکار گرفته شده است (مارتینز و همکاران 2004 و احسانپور و همکاران 2007).

¹Silymarin

هدف این مطالعه، بهینه سازی شرایط کشت بافت ماریتیغال و بررسی اثر عوامل مختلف از قبیل تنظیم کننده های رشدی، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و تعداد واکشت های کالوس در وزن و قطر کالوس و نیز بررسی تغییرات سوماکلونال حاصل بوسیله نشانگرهای مولکولی می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل رقم اصلاح شده کالازی از مجارستان و اکوتیپ مغان بودند. بذور به مدت 24 ساعت توسط آب جاری برای برطرف کردن خواب بذور آبشویی شدند. پس از آبشویی، بذور به مدت 10 دقیقه در محلول رقیق مایع ظرفشویی قرار داده شدند. بعد از این مرحله نمونه ها سه بار با آب مقطر شستشو داده شده و به مدت دو دقیقه در اتانل 70% قرار گرفتند. پس از این مرحله، بذور چند بار توسط آب مقطر شستشو و سپس به مدت 15 دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم 2/5% تیمار و نهایتاً سه بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شسته شدند. بذور استریل بعد از خشک کردن به محیط کشت منتقل شدند. جوانه زنی بذور در محیط کشت MS بدون هورمون در شرایط تاریکی و دمای $26 \pm 1^\circ\text{C}$ طی چهار هفته انجام شد. بذور جوانه زده پس از انتقال به لوله های آزمایش در شرایط روشنایی قرار داده شدند تا گیاه کامل از آنها تولید شد.

به منظور القای کالوس از دو بخش هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه های 15 روزه، ریزنمونه تهیه شد. برای تعیین بهترین نسبت هورمونی جهت کالوس زایی از محیط کشت MS با چهار ترکیب هورمونی "0/1 و 1"، "1 و 1"، "1 و 2" و "2 و 2" میلی گرم بر لیتر کینتین و D 2-4 استفاده شد. هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری با 5 ریزنمونه بود که نمونه ها در شرایط تاریکی و دمای $26 \pm 1^\circ\text{C}$ در داخل اتاقک رشد قرار گرفتند. بدین ترتیب، اثر سه عامل ژنوتیپ، ترکیب هورمونی و نوع ریزنمونه (دو ژنوتیپ، چهار ترکیب هورمونی و دو ریزنمونه) بر تولید و رشد کالوس به صورت آزمایش

فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شد. کالوس های هر محیط چهار بار با فواصل زمانی هر پنج هفته یکبار در همان محیط کشت واکشت شدند. قبل از واکشت و در واکشت ها، قطر و وزن تر کالوس به عنوان شاخصی از رشد اندازه گیری شد.

تجزیه واریانس داده ها برای کالوس های اولیه و واکشت ها، بطور جداگانه و نیز به طور مرکب انجام شد. برای محاسبات آماری از نرم افزار SAS v9.0 انیستیتیوی SAS (2003) استفاده شد.

استخراج DNA از برگ گیاه کامل و کالوس به روش CTAB (سقای معروف و همکاران، 1984) انجام و کمیّت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتوتتری و الکتروفورز ژل آگارز 0/8 درصد تعیین شد. برای تکثیر DNA ژنومی از 20 آغازگر تصادفی RAPD در حجم واکنش 20 میکرولیتری بر اساس روش پیشنهادی ویلیامز و همکاران (1990) استفاده شد. چرخه های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در 94°C بمدت پنج دقیقه، 35 چرخه با واسرشته سازی در 94°C بمدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در 36°C بمدت یک دقیقه و بسط دمای 72°C درجه بمدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در 72°C بمدت پنج دقیقه بود. تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 2 درصد و رنگ آمیزی ژل ها با اتیدیوم بروماید انجام شد.

نتیجه و بحث

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین های صفات وزن تر و قطر کالوس

نتایج تجزیه واریانس صفات قطر و وزن تر کالوس در کالوس اولیه و کالوس های حاصل از واکشت های مختلف در جدول 1 ارائه شده است. در کالوس اولیه و کالوس های حاصل از کلیه واکشت ها بغیر از واکشت دوم بین دو ژنوتیپ از نظر وزن تر کالوس

اختلاف معنی‌دار وجود داشت و رقم اصلاح شده Budakalaszi نسبت به اکوتیپ مغان بهتر بود. از نظر قطر کالوس نیز رقم اصلاح شده مجاری نسبت به اکوتیپ بومی مغان در کالوس اولیه و کلیه واکنش‌ها بغیر از واکنش‌های اول و دوم برتری نشان داد. همچنین کالوس اولیه و کالوس‌های تولید شده از واکنش‌های مختلف ریزنمونه کوتیلدونی قطر و وزن تر بیشتری نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل داشتند. هر چند که در واکنش دوم از نظر وزن تر و در واکنش چهارم از نظر هر دو صفات تفاوت آنها معنی‌دار نبود. حسنلو (1384) نیز ریزنمونه‌های کوتیلدونی ماریتیغال را بعنوان ریزنمونه‌های برتر از نظر تولید و رشد سریعتر کالوس‌ها معرفی کرد. سیمینو و همکاران (2006) از ریزنمونه‌های کوتیلدونی در ماریتیغال برای تولید کالوس جهت سنتز پپتیداز استفاده کردند. رهنما و همکاران (2008) از ریزنمونه کوتیلدونی در کالوس زایی برای ترایزش گیاه ماریتیغال جهت تولید ریشه‌های موئین بهره بردند.

بین ترکیبات هورمونی از نظر وزن تر و قطر کالوس اولیه و کالوس‌های حاصل از تمام واکنش‌ها بااستثنای وزن تر کالوس در واکنش دوم تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در کلیه شرایط، کالوس‌های تولید شده در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر D 2-4 و دو میلی گرم در لیتر کینتین، بیشترین میزان وزن تر و قطر کالوس را داشتند. چون القاء و رشد کالوس تابع غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین و نسبت آنها می‌باشد، در مطالعات مختلف ترکیب و نسبت‌های مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای کالوس زایی در ماریتیغال استفاده شده است. کاچو و همکاران (1999) در بررسی اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر کالوزایی ماریتیغال گزارش کردند که محیط کشت MS حاوی 0/1 میلی گرم در لیتر کینتین و 1 میلی گرم در لیتر D 2-4 بیشترین کارایی را بر القاء و رشد کالوس داشت. حسنلو (1384) محیط MS حاوی 1 میلی گرم در

لیتر D 2-4 و 0/4 میلی گرم در لیتر کینتین را بهترین محیط القاء کالوس در ماریتیغال معرفی کرد. در مطالعه‌ای دیگر محیط MS حاوی 3 میلی گرم در لیتر پیکورام و 0/4 میلی گرم در لیتر کینتین برای کال زایی ماریتیغال مناسب تشخیص داده شد (حسینلو و همکاران 2008).

تجزیه واریانس مرکب داده‌ها نشان داد که اثر واکنش، ژنوتیپ، ریزنمونه و ترکیب هورمونی در سطح احتمال یک درصد بر وزن تر و قطر کالوس معنی‌دار بودند (جدول 2). براساس مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میانگین وزن تر و قطر کالوس مربوط به واکنش‌های دوم و سوم بود که با کالوس اولیه و واکنش‌ها دیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. بدین ترتیب که رشد کالوس‌ها تا واکنش سوم افزایش پیدا کرد ولی در واکنش چهارم بعلت افزایش سن کالوس‌ها رشد آنها کمتر شد (جدول 3).

در میانگین واکنش‌ها، ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها، بیشترین وزن تر کالوس در محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر D 2-4 و یک میلی گرم در لیتر کینتین حاصل شد. هر چند که از این نظر با کالوس‌های تولید شده در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر D 2-4 و دو میلی گرم در لیتر کینتین تفاوت معنی‌دار نداشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نسبت مساوی اکسین به کینتین یکی از عوامل افزایش میزان کالوزایی است. ولی از نظر قطر کالوس بیشترین میانگین در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر توفوردی و دو میلی گرم در لیتر کینتین حاصل شد که از این نظر با بقیه ترکیبات هورمونی تفاوت معنی‌دار داشت (جدول 4).

اثر متقابل واکنش در ترکیب هورمونی نیز بر هر دو صفت مورد مطالعه تاثیر معنی‌دار در سطح احتمال 1% داشت (جدول 2). در میانگین واکنش‌ها، ترکیبات هورمونی و ریزنمونه‌ها، بین دو ژنوتیپ از نظر وزن تر و قطر کالوس تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 1% وجود داشت و برای هر دو صفت میانگین رقم اصلاح شده مجاری از اکوتیپ بومی مغان بیشتر بود.

جدول 2- تجزیه واریانس مرکب اثر عوامل مورد بررسی برون تر و قطر کالوس ماریتیغال

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
وزن تر کالوس	قطر کالوس		
530/283**	13/016**	4	واکشت
1/403	0/237	15	تکرار (واکشت)
31/033**	15/703**	3	ترکیب هورمونی
28/01**	2/587**	12	واکشت × ترکیب هورمون
107/133**	6/498**	1	ژنوتیپ
6/764**	0/224 ^{ns}	4	واکشت × ژنوتیپ
17/323**	1/54**	3	ترکیب هورمون × ژنوتیپ
10/247**	2/151**	12	واکشت × ترکیب هورمون × ژنوتیپ
73/772**	19/503**	1	ریزنمونه
17/47**	6/91**	4	واکشت × ریزنمونه
7/255**	1/343**	3	ترکیب هورمون × ریزنمونه
3/212**	0/596*	12	واکشت × ترکیب هورمون × ریزنمونه
0/135 ^{ns}	0/351 ^{ns}	1	ژنوتیپ × ریزنمونه
3/215*	0/782*	4	واکشت × ژنوتیپ × ریزنمونه
5/518**	2/16**	3	ترکیب هورمون × ژنوتیپ × ریزنمونه
3/029**	0/78*	12	واکشت × ترکیب هورمون × ژنوتیپ × ریزنمونه
1/24	0/282	225	خطای 2
7/18	3/71		ضریب تغییرات (%)

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1٪.

جدول 3- مقایسه میانگین‌های واکشت‌های مختلف از نظر وزن تر و قطر کالوس در ماریتیغال.

صفات		کشت‌ها
وزن تر کالوس	قطر کالوس	
511/81 ^c	14/03 ^b	کالوس اولیه
679/64 ^b	13/80 ^c	واکشت اول
1026/72 ^a	14/88 ^a	واکشت دوم
1008/20 ^a	14/69 ^a	واکشت سوم
499/62 ^c	14/21 ^b	واکشت چهارم

در هر ستون، میانگین با حروف غیرمشترک دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد هستند.

جدول 4- مقایسه میانگین های ترکیبات هورمونی مختلف از نظر وزن تر و قطر کالوس در ماریتیغال

صفات		محیط کشت
قطر کالوس	وزن تر کالوس	
13/81 ^c	674/86 ^c	0/1 کینیتین و 1 توفوردی*
14/28 ^b	799/66 ^a	1 کینیتین و 1 توفوردی
14/33 ^b	727/82 ^b	1 کینیتین و 2 توفوردی
14/89 ^a	772/85 ^a	2 کینیتین و 2 توفوردی

* واحدها بر حسب میلی گرم در لیتر.

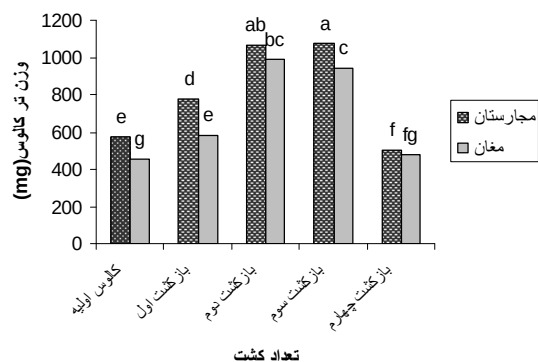
در هر ستون، میانگین با حروف غیرمشترک دارای تفاوت معنی دار در سطح احتمال 5 درصد هستند.

دار بین ژنوتیپ های جو از نظر تولید، تردی و مورفولوژی کالوس مشاهده کرد.

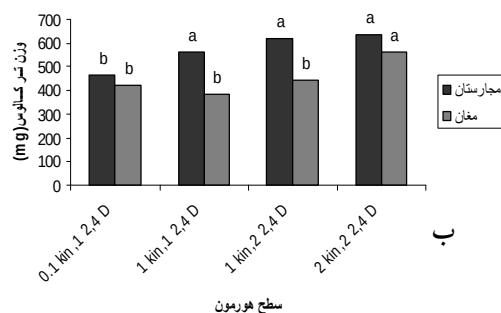
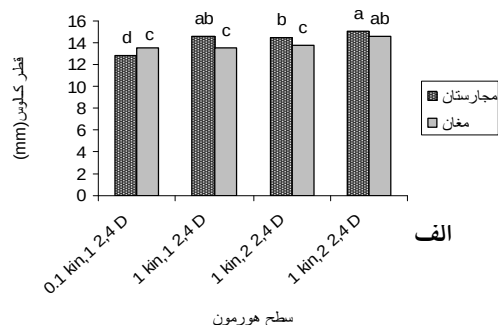
بررسی وزن تر و قطر کالوس های حاصل از ریزنمونه های کوتیلدونی و هیپوکوتیلی در میانگین واکشت ها، ترکیبات هورمونی و ژنوتیپ ها، برتری کالوس های حاصل از ریزنمونه های کوتیلدونی را نشان داد. اثر متقابل دو جانبه ریزنمونه در واکشت و ترکیبات هورمونی برای هر دو صفت معنی دار بود. ولی اثر متقابل ریزنمونه در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و قطر کالوس معنی دار نشد (جدول 2). بیشترین میانگین وزن تر کالوس ها مربوط به هر دو ریز نمونه در واکشت های دوم و سوم بود که از این نظر با بقیه ترکیبات تفاوت معنی دار نشان دادند. در هر دو ریزنمونه با افزایش سن کالوس ها، وزن تر آنها نیز افزایش یافت. این روند تا واکشت سوم ادامه داشت ولی از واکشت سوم به چهارم کاهش معنی داری در وزن تر کالوس ها حاصل شد (شکل 3). بنابراین، افزایش سن کالوس تا حدی سبب افزایش رشد و وزن تر کالوس می شود ولی در کالوس های پیر رشد کالوس کمتر می گردد. هرچند که از نظر قطر کالوس نیز بیشترین میانگین در واکشت های دوم و سوم بخصوص در ریزنمونه های کوتیلدونی مشاهده شد ولی اختلاف معنی دار با ریزنمونه کوتیلدونی در کالوس اولیه نداشت. با مقایسه نتایج مشاهده شد که واکشت تاثیر بیشتری روی وزن تر کالوس در مقایسه با قطر کالوس داشت.

اثر متقابل ژنوتیپ در واکشت برای قطر کالوس غیر معنی دار ولی برای وزن تر کالوس در سطح احتمال 1% معنی دار بود. بدین ترتیب که برای این صفت ژنوتیپ ها عکس العمل متفاوتی را در واکشت های مختلف نشان دادند (شکل 1). بطوریکه مشاهده می شود اثر متقابل از نوع تغییر در مقدار بوده و در تمام واکشت ها رقم مجاری به اکوتیپ مغان برتری داشت. بیشترین مقدار وزن تر را رقم مجاری در واکشت های دوم و سوم تولید کرد. وزن تر کالوس در هر دو رقم از کالوس اول تا واکشت سوم روند صعودی داشت ولی در واکشت چهارم بطور معنی دار کاهش یافت.

ژنوتیپ ها از نظر صفات مورد مطالعه رفتارهای متفاوتی را در ترکیبات هورمونی مختلف از خود نشان دادند و اثر متقابل ژنوتیپ در ترکیب هورمونی برای هر دو صفت در سطح احتمال 1% معنی دار بود (جدول 2). بیشترین وزن تر کالوس در رقم مجاری و در محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر توفوردی و یک میلی گرم در لیتر کینیتین حاصل شد که با بقیه ترکیبات اختلاف معنی دار داشت. ولی حداکثر قطر کالوس در ترکیب هورمونی دو میلی گرم در لیتر توفوردی و دو میلی گرم در لیتر کینیتین برای هر دو ژنوتیپ بدست آمد (شکل 2). در کشت درون شیشه ای عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، ریزنمونه، ترکیبات هورمونی بر تولید و رشد کالوس تاثیر دارند. بریگیتزر (1992) تفاوت معنی



شکل 1- مقایسه میانگین‌های اکوتیپ‌های مجارستان و مغان ماریتغال در واکنش‌های مختلف از نظر وزن تر کالوس



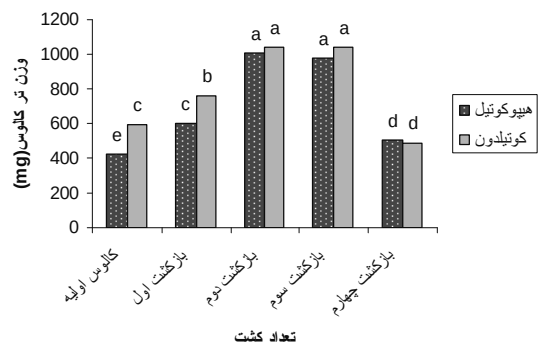
شکل 2- مقایسه میانگین ترکیب تیماری اکوتیپ ماریتغال و ترکیب هورمونی برای وزن تر (الف) و قطر (ب) کالوس

میلی گرم در لیتر 2-4 D و دو میلی گرم در لیتر کینیتین تفاوت معنی دار نداشت. بیشترین قطر کالوس در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه کوتیلدونی در محیط حاوی دو میلی گرم در لیتر 2-4 D و دو میلی گرم در لیتر کینیتین بدست آمد که به بقیه ترکیبات اختلاف معنی دار نشان داد (شکل 4). حسستلو و همکاران (2008) با مقایسه

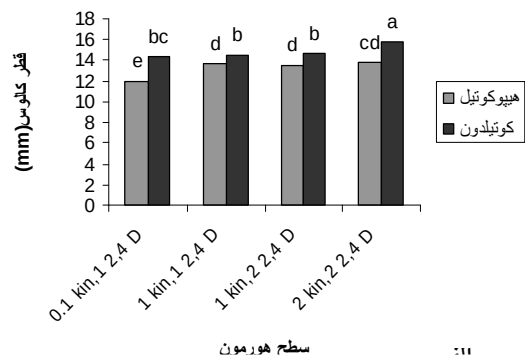
مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ریزنمونه و ترکیبات هورمونی نشان داد که بالاترین وزن تر کالوس مربوط به کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی در محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر 2-4 D و یک میلی گرم در لیتر کینیتین بود. هرچند که از نظر این صفت با کالوس‌های حاصل از ریزنمونه کوتیلدونی در ترکیب هورمونی دو

حاوی یک میلی گرم در لیتر توفوردی و 0/5 میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین برای القاء کالوس و کشت سوسپانسیون ماریتیغال جهت جداسازی یک پروتئین آرابینوگلاکتان بهره بردند.

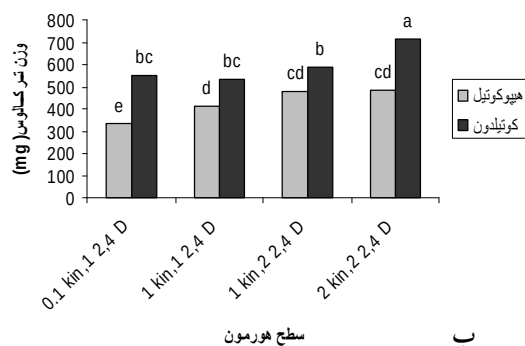
ریزنمونه‌های کوتیلدون، قطعات شاخسار و ریشه در کشت سوسپانسیون ماریتیغال، بیشترین القاء و رشد کالوس را در کشت های حاصل از ریزنمونه کوتیلدون مشاهده کردند. در حالیکه سانچز سامپدرو و همکاران (2008) از ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی در محیط کشت MS



شکل 3- مقایسه میانگین های دو ریزنمونه ماریتیغال در واگشت های مختلف از نظر وزن تر کالوس



الف



ب

شکل 4- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ترکیب هورمونی و ریزنمونه ماریتیغال برای وزن تر (الف) و قطر (ب) کالوس

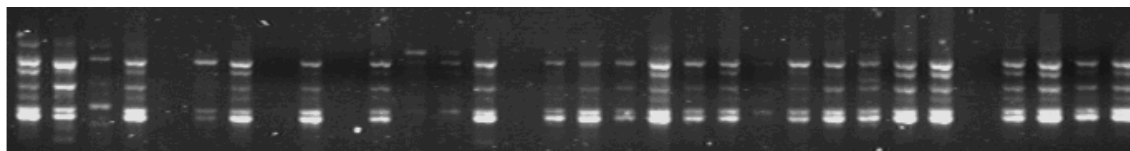
قطعات DNA در نمونه‌های مورد مطالعه بودند (جدول 5). شکل 5 الگوی نواری یکی از آغازگر را در تعدادی از نمونه‌های نشان می‌دهد.

تنوع سوماکلونال براساس چند شکلی نشانگرهای RAPD از 20 آغازگر تصادفی RAPD استفاده شده برای بررسی تنوع سوماکلونال، 10 آغازگر قادر به تکثیر

جدول 5- نام و توالی آغازگرهای RAPD چند شکل بین کالوس‌های بدست آمده از ژنوتیپ‌های ماریتیغال در

محیط‌های کشت و واکشت‌های مختلف

نام آغازگر	توالی
489	CGCACGCACA
495	CTTTCCTTCC
568	ACCTGTTCTC
569	CGAATTGCTG
576	CACCTAATGG
MT4	CCGCATCTAC
MT8	GGACCCAACC
MT14	CCAGATGCAC
MT16	AGATGCAGCC
MT18	AATCGGGCTG



شکل 5- الگوی نواری تعدادی از نمونه‌ها با استفاده از آغازگر 569. از چپ به راست نمونه‌ها عبارتند از ژنوتیپ‌های مجارستان و مغان ماریتیغال و کالوس‌های حاصل از کشت‌ها، واکشت‌ها و ریزنمونه‌های مختلف

آمده از این محیط‌ها از نظر وزن و قطر کالوس نیز تفاوت داشتند. روند تغییرات سوماکلونال در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های کوتیلدون متفاوت از کالوس‌های هیپوکوتیل بود. بطوریکه در رقم مجاری کالوس‌های ریزنمونه‌های کوتیلدنی الگوی نواری مشابهی با همان نمونه در واکشت اول نشان داد. اما در واکشت‌های دوم، سوم و چهارم این نمونه‌ها الگوی نواری متفاوتی نشان دادند و همچنین در محیط کشت‌های مختلف نیز الگوی نواری متفاوتی بوجود آوردند. همچنین الگوی نواری نمونه‌های هیپوکوتیل رقم مجاری صرف نظر از محیط

بررسی الگوی نواری آغازگرهای مختلف نشان داد که نمونه‌های هیپوکوتیل رقم مجاری الگوی نواری متفاوتی را در محیط‌های کشت مختلف و نیز واکشت‌های متفاوت داشتند. به عنوان مثال، برای نشانگر MT6 از هفت نشانگر مشاهده شده در کل نمونه‌ها، کالوس حاصل از هیپوکوتیل رقم مجاری در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر 2-4 D و دو میلی گرم در لیتر کینیتین در یک نشانگر متفاوت با هیپوکوتیل همان ژنوتیپ در محیط دارای دو میلی گرم در لیتر 2-4 D و یک میلی گرم در لیتر کینیتین بود. کالوس‌های بدست

95 درصد با والد مادری نشان دادند. همچنین یک نمونه که الگوی نواری متفاوت با بقیه داشت.

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، رقم اصلاح شده مجاری در تمام شرایط، از نظر رشد و القاء کالوس نسبت به اکوتیپ مغان بهتر بود و ریزنمونه کوتیلدونی به ریزنمونه هیپوکوتیلی برتری نشان داد. تیمار هورمونی مناسب برای القاء کالوس در همه واکشت ها، محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر کینیتین و D 2-4 بود، هر چند که در برخی از واکشت ها، محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر کینیتین و یک میلی گرم در لیتر D 2-4 تفاوت معنی داری نداشت. بطور کلی با افزایش میزان هورمون ها در محیط کشت کالوس زایی افزایش یافت. بررسی تنوع سوماکلونال با نشانگرهای RAPD نشان داد که الگوی نواری نمونه های کالوس بدست آمده از ریزنمونه در همه آغازگرها با نمونه های کالوس حاصل از واکشت های سوم و چهارم تفاوت داشتند که می توان اظهار داشت که تعداد واکشت و نوع محیط کشت می تواند سبب بروز تغییراتی در سطح مولکول DNA شود. همچنین بررسی الگوی نواری این آغازگرها نشان داد که الگوی نواری نمونه های کالوس حاصل از ریزنمونه های مختلف دو ژنوتیپ در واکشت ها و محیط کشت های مختلف، متفاوت بودند. با این وجود، روند تغییرات در شرایط یکسان در دو ژنوتیپ یکسان نبود.

قدردانی

این پروژه با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور با شماره طرح 84153 و امکانات قطب علمی اصلاح مولکولی غلات و پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهان دارویی دانشگاه تبریز انجام شده است.

کشت ها در واکشت های مختلف نیز متفاوت بود. در مورد اکوتیپ مغان نیز الگوی نواری متفاوتی بین کالوس های حاصل از واکشت های و محیط های کشت مختلف ریز نمونه کوتیلدون مشاهده شد. هرچند که روند تغییرات حاصل تصادفی بوده و از الگوی خاصی تبعیت نمی کرد ولی با افزایش باز کشت ها، تغییرات ژنتیکی در کالوس ها نیز افزایش داشت و همچنین ترکیبات هورمونی محیط کشت نیز می تواند موجب بروز تغییرات ژنتیکی در سطح مولکول DNA شود

یکی از پدیده های رایج در کشت بافت و سلول گیاهی احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی ناشی از جهش و تغییرات کروموزومی است که موجب تغییراتی در فنوتیپ مجموعه های سلولی و گیاهان باززایی شده می شود. تقسیم های میتوز و نیز ادغام سلول ها در کالوس های واکشت شده، موجب دو برابر شدن کروموزوم های هسته ای و یا حذف کروموزومی می شود. احتمال تغییرات ژنتیکی در هسته سلول معمولاً با زیاد شدن سن کشت افزایش می یابد و این تغییرات به شرایط کشت و نیز ترکیبات کشت بویژه تنظیم کننده های رشد، نوع ریزنمونه و تعداد دفعات واکشت بستگی دارد (کاپیلر و همکاران 2000 و سونیا و همکاران 2001).

تنوع سوماکلونال یک فرآیند تصادفی است که نه تنها روی ژن ها و نهایتاً مورفولوژی گیاه اثر می گذارد بلکه باعث تغییر بیان ژن و کنترل آن نیز می شود (کاپو و همکاران 1999). با توجه به اینکه تنوع سوماکلونال بیشتر در اثر وقوع جهش ها می باشد. بنابراین، باید از تکنیک های ارزیابی مناسبی برای تشخیص انواع جهش ها در کشت بافت استفاده شود.

سونیا و همکاران (2001) از 20 آغازگر تصادفی برای تعیین تنوع سوماکلونی در گوجه فرنگی استفاده کردند که فقط شش آغازگر سطح چند شکلی قابل قبولی نشان دادند. در این مطالعه، 10 گیاه باززایی شده شباهت

منابع مورد استفاده

حسنلو ط، 1384. مطالعه برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان خارمریم *Silybum marianum* جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و کشت بافت و سلول آن به منظور تولید سیلیمارین. رساله دکتری دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

Bregitzer P, 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. Crop Science 32: 1108-1112.

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

Cammie A, Burgess BBA and Pharm D, 2003. *Silybum marianum* (Milk Thistle). J. Pharmacy Society Wisconsin 2: 38-40.

Cimino C, Cavalli SV, 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: 238-240.

Ehsanpour AA, Madani S and Hoseini M, 2007. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR. General Applied Plant Physiology 33: 3-11.

Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E and Shams-Ardakani MR, 2008. Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*. Pharmaceutical Biology 46: 876-882.

Hetz, E, Liersch R and Schieder D, 1995. Genetic investigations on *Silybum marianum* and *S. eburneum* with respect to leaf colour, outcrossing ratio and flavonolignan composition. Planta Medica 61:54-57.

Kaeppler SM, Kaeppler HF and Rhee S, 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179-188.

Martins M, Sarmiento D and Oliveira M, 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 23: 492-496.

Purohit SS, 2004. Plant Tissue Culture. Agrobios, India. pp. 364.

Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR and Sepehrifar R, 2008. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Iranian Journal of Biotechnology 6:113-118.

Ramachandra SR and Ravishankar GA, 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advance 20: 101-153.

Saghai-Maroofof MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW, 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceeding of National Academic Science USA 81: 8014-8018.

Sa'nchez-Sampedro MA, Pela'ez R and Corchete P, 2008. An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. Carbohydrate Polymers 71: 634–639.

SAS Institute, 2003. The SAS System for Windows. Release 9.0. SAS Inc, Cary, NC.

Soniya EV, Banerjee NS and Das MR, 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus- derived plants of tomato. Current Science 80: 1213-1218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV, 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

جدول 1- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد مطالعه بر قطر و وزن تر کالوس ماریتیغال در کشت اول و واکشت‌های مختلف

ردیف	تجزیه واریانس	میانگین مربعات							
		کشت اول		واکشت اول		واکشت دوم		واکشت سوم	
		قطر کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس	وزن تر کالوس
1	ژئوتیپ	2/89**	215064/06**	0/23 ^{ns}	600818/77**	1/02 ^{ns}	102880/56 *	1/63 **	24406/64 ^{ns}
1	ریزنمونه	38/75**	453602/25 **	5/29**	406246/89**	2/07 *	14701/56 ^{ns}	0/77 *	77910/77 *
3	ترکیب هورمون	7/41**	76077/37 *	10/96**	1084082/56**	4/57 **	4826/60 ^{ns}	1/69 **	39370/68 *
1	ژئوتیپ×ریزنمونه	0/18 ^{ns}	17095/56 ^{ns}	0/42 ^{ns}	5058/77 ^{ns}	1/18 ^{ns}	58927/56 ^{ns}	0/36 ^{ns}	12460/14 ^{ns}
3	ژئوتیپ×ترکیب هورمون	2/31**	19733/77 ^{ns}	2/52**	439754/81**	0/17 ^{ns}	25307/94 ^{ns}	5/19 **	65088/35 **
3	ریزنمونه×ترکیب هورمون	1/95**	51417/62 ^{ns}	1/04 *	110608/27**	0/33 ^{ns}	3990/02 ^{ns}	0/16 ^{ns}	5656/56 ^{ns}
3	ژئوتیپ×ریزنمونه×ترکیب هورمون	2/93**	110265/31**	1/87 **	40643/89 ^{ns}	0/20 ^{ns}	28831/35 ^{ns}	0/12 ^{ns}	2651/93 ^{ns}
48	خطای آزمایشی	0/30	27170/55	0/34	15281/08	0/39	20063/74	0/14	12094/3
	ضریب تغییرات (%)	3/89	14/7	4/21	18/19	4/18	13/8	2/51	10/89
		8/05	3/22						

ns و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال 5٪ و 1٪.