

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زراعت و اصلاح نباتات

**تأثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی بر روی صفات بیوشیمیایی و میزان
سیلیمارین گیاه خارمریم در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی**

اساتید راهنما:

دکتر مریم الهدو

دکتر لیلا مهوران

استاد مشاور:

دکتر صالحه گنجعلی

تهیه و تدوین:

مریم کاظم پور

تابستان ۱۴۰۲

چکیده

خار مریم (*Silyban marianum*) گیاهی دو لپه از خانواده آستراسه است که در صنایع داروسازی اهمیت فراوان دارد. ماده موثره این گیاه سیلیمارین نام دارد که ترکیبی از انواع فلاونولیگنانها است. این ترکیب در درمان انواع بیماری‌های کبدی، هپاتیت، دیابت بیماری‌های قلب و عروق، سرطان، چربی خون و موثر است. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی کشت بافت گیاه خارمریم، افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن با به کارگیری الیسیتورهای مختلف در شرایط سوسپانسیون سلولی می‌باشد. لذا در این تحقیق به منظور تولید گیاهچه استریل بذور پس از ضدعفونی در محیط یک دوم MS کشت شده و چهار هفته بعد از کشت، از هیپوکوتیل و کوتیلدون این گیاهچه‌ها برای تولید کالوس در محیط MS محتوی هورمونهای تنظیم کننده رشد (BAP و NAA) استفاده گردید. دو واکنش متوالی به منظور ازدیاد کالوس انجام شده و کالوسهای فیبری تولید شده به محیط کشت مایع محتوی هورمونهای تنظیم کننده قبلی منتقل شد. الیسیتورهای سلولاز برگرفته از قارچ *Aspergillus niger* و مانیتول در غلظت‌های مختلف در ابتدای فاز رشدی به محیط سوسپانسیون اضافه شد. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار برای هر الیسیتور انجام گرفت. صفات مورد بررسی شامل شاخص رشد کالوس، محتوی فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، محتوای کربوهیدرات کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان سلیمارین بود. با توجه به نتایج بدست آمده بالاترین درصد القای کالوس در قطعات هیپوکوتیل و کوتیلدون محیط کشت حاوی ۲/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های NAA, BAP بدست آمد. همچنین استفاده از دو هورمون NAA و BAP نشان داد که بیشترین درصد کالوس زایی در قطعات جداکشت مربوط به هیپوکوتیل بود. نتایج تجزیه واریانس نشان بین تیمارهای هر دو الیسیتور از نظر تاثیر بر روی کلیه صفات اختلاف بسیار معنی‌دار وجود دارد. تیمار سلولاز در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و تیمار کنترل به ترتیب بیشترین و کمترین افزایش را در محتوی فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، میزان سلیمارین و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد. محتوی پرولین کل نیز با افزایش غلظت الیسیتور افزایش نشان داد بطوریکه در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین افزایش را نشان داد که به دلیل افزایش تنش ایجاد شده بوسیله این الیسیتور می‌باشد. الیسیتور مانیتول نیز در غلظت‌های مختلف واکنش متفاوتی بر روی صفات نشان داد، بطوریکه محتوای فنل کل در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، محتوای فلاونوئید کل و کربوهیدرات در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، تانن کل و محتوای پرولین در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار کنترل بیشترین افزایش را نشان دادند. میزان سلیمارین نیز در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانیتول بیشترین افزایش را نشان داد. لذا چنانچه هدف افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه باشد افزودن الیسیتور سلولاز با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و مانیتول در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر چنانچه در فاز رشدی (روز هشتم) به سوسپانسیون اضافه گردد، بهترین نتیجه را خواهد داشت.

کلمات کلیدی: خارمریم، سلیمارین، کشت بافت هورمون قطع‌شده کشت ساقه و برگ.

Abstract:

Milk thistle (*Silyban marianum*) is a dicotyledonous plant from the Asteraceae family, which is very important in the pharmaceutical industry. The active substance of this plant is called silymarin, which is a combination of flavonolignans. This combination is effective in the treatment of various liver diseases, hepatitis, diabetes, cardiovascular diseases, cancer, blood fat. In the present research, the aim of this research is to optimize the tissue culture of thistle plant, increase the production of its secondary metabolites by using different elicitors in cell suspension conditions. Therefore, in this research, in order to produce sterile seedling, after disinfection, the seeds were cultivated in MS medium and four weeks after cultivation from the hypocotyl and cotyledon of these seedlings to produce callus in MS medium containing growth regulation hormones (BAP and NAA). Two consecutive cultivations were done to increase the callus and the produced fibrous calluses were transferred to the liquid culture medium containing the previous regulation hormones. Callus treatment at a concentration of 40 mg/ml and control treatment showed the highest and lowest increase in total phenol content, total flavonoid, total tanning and antioxidant activity, respectively. The content of total proline also showed the highest increase at the concentration of 80 µg/ml, which is due to the increase in tension created by this elicitor. The mannitol elicitor shows different reaction on the traits in different content at the conservation such that total phenol content at a concentration of 120 µg/ml, total flavonoids and carbohydrate content at the concentration of 240 µg/ml, total tannin and proline content at a concentration of 60 µg/ml and antioxidant activity showed the highest increase in the control treatment. The amount of silymarin is also. Therefore, if the cellulase elicitor with a concentration of 80 micrograms per ml is added to the suspension in the growth phase (eighth day), it will have the best result in increasing the secondary metabolites of this plant and antioxidant activity.

Keywords: marigold, silymarin, hormone tissue culture, isolated piece, flavonolignan culture.



University of zabol
Graduate school
Faculty of Agriculture
Department of Agronomy and Plant Breeding

The effect of biotic and abiotic elicitors on biochemical traits and silymarin content of milk thistle in cell suspension culture conditions

Supervisors:
Dr.M. Alahdou
Dr.L. Mehravaran

Advisors:
Dr.S. ganjali

By:
M.kazempour

Autumn 2023