Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 4, Page 868-879 (2024)

DOI:10.22092/ijmapr.2024.365894.3446

Extraction and measurement of silymarin flavonoid components in the induced callus of *Silybum marianum* L. in vitro conditions

Farid Noormand Moaied[1*]

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

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

Abstract

Background and objectives: Milk thistle (*Silybum marianum* L.) is a significant medicinal plant that has gained a prominent place in the pharmaceutical industry. This annual or biennial plant contains bioactive compounds, particularly flavonoids, which are primarily concentrated in its seeds. The collective active components of this plant are referred to as *silymarin*, a compound recognized for its anti-cancer properties. Cell culture systems provide a promising method for large-scale cultivation of plant cells to produce secondary metabolites. This research aimed to investigate the effects of genotype, micro-sample type, phytohormone treatments, and callus type on the synthesis of bioactive compounds in *S. marianum* calluses using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Methodology: In this research, a combination of Tween-20 solution, 70% ethanol, hydrogen peroxide, and sterile distilled water was used to disinfect *Silybum marianum* seeds to produce sterile seedlings. The sterilized seeds were then transferred to sterilized water and an agar culture medium (12 g/L) and kept in dark conditions at a temperature of 25°C for 15 days. After germination and initial growth, the seedlings were moved to light conditions. An experiment was conducted using two genotypes, Hungary and Borazjan, with cotyledon and hypocotyl micro-samples. The experiment utilized Murashige and Skoog (MS) medium and hormonal treatments of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at concentrations of 1, 2.5, and 5 mg/L, along with Benzyl Amino Purine (BAP) at 0.25 and 0.5 mg/L. This setup was maintained in dark conditions and organized as a factorial design based on a completely randomized block structure. After 30 days, the calluses were transferred to MS culture medium with half the concentration of hormones. The effective compounds were extracted from the callus through defatting with petroleum ether, followed by extraction with methanol solvents. The components of silymarin were then separated into taxifolin, silychristine, silydianin, silybin, and isosilybin using high-performance liquid chromatography (HPLC). Statistical analysis of the data was performed using SPSS software.

Results: The test results demonstrated the effects of different micro-sample treatments, ecotypes, and hormone concentrations on the levels of silymarin flavonoid compounds (taxifolin, silychristin, silydianin, silybin, and isosilybin) in *Silybum marianum* extracts. Analysis of variance and comparison of the mean values of flavonolignans in the callus samples revealed that the highest amount of taxifolin was obtained from the hypocotyl micro-sample. The highest

Copyright: © 2024 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.

silychristin content was associated with the Hungarian genotype and a treatment of 5 mg/L 2,4-D. The highest silydianin concentration was observed in the Hungarian genotype treated with 1 mg/L 2,4-D and 0.25 mg/L BAP. The maximum silybin content was found in the Hungarian cultivar using the hypocotyl micro-sample, with 1 mg/L 2,4-D and 0.25 mg/L BAP. The highest isosilybin levels were achieved in the Hungarian genotype, hypocotyl micro-sample, and 1 mg/L 2,4-D. The overall highest silymarin concentration was recorded in the Hungarian genotype treated with 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP.

Conclusion: The results showed that improved varieties of *Silybum marianum*, such as the Hungarian genotype, produced higher levels of bioactive compounds compared to native ecotypes. In the production of these compounds, the type of micro-sample played a more critical role than the size and type of callus derived from it. Specifically, the hypocotyl micro-sample, which produced small, non-embryogenic calluses, yielded a higher percentage of effective substances compared to the cotyledon, which produced larger, embryogenic calluses. Additionally, lower concentrations of auxin and cytokinin hormones were more effective than higher concentrations in promoting the production of bioactive compounds.

Keyword: Flavonoid, callus, silymarin, *Silybum marianum* L., in vitro conditions.

استخراج و اندازه‌گیری میزان اجزاء فلاونوئیدی سیلی‌مارین در کالوس القاء شده گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) در شرایط درون شیشه

فرید نورمند مؤید[۱*]

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

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

چکیده

سابقه و هدف: ماریتیغال یا خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* L. از گیاهان مهم دارویی است که جایگاه خاصی را در صنایع دارویی پیدا کرده است. خارمریم گیاهی یک‌ساله یا دوساله است که دارای مواد مؤثره از نوع ترکیبات فلانوئیدی می‌باشد که بیشتر در دانه‌های گیاه ذخیره می‌شود. مجموعه مواد مؤثره این گیاه به سیلی‌مارین معروف است. سیلی‌مارین به‌عنوان ماده دارویی ضد سرطان شناخته شده است. سیستم‌های کشت سلولی می‌توانند برای کشت در مقیاس وسیع سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شوند. هدف از این تحقیق، مطالعه اثر ژنوتیپ، ریزنمونه، تیمارهای فیتوهورمونی و نوع کالوس بر میزان سنتز مواد مؤثره در کالوس‌های ماریتیغال با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق برای تولید گیاهچه استریل ماریتیغال، از محلول‌های tween-20، اتانول ۷۰٪، آب اکسیژنه و شستشو با آب مقطر استریل برای ضدعفونی بذر استفاده شد. سپس بذرهای استریل به محیط کشت آب و آگار (۱۲ گرم در لیتر) استریل شده منتقل و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ روز نگهداری و پس از جوانه‌زنی و کمی رشد به شرایط روشنایی انتقال داده شدند. سپس آزمایشی با استفاده از دو ژنوتیپ مجارستان و برازجان، ریزنمونه لپه و هیپوکوتیل، محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) و تیمارهای هورمونی 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینو پورین (BAP) (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در شرایط تاریکی و در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام شد. کالوس‌های تولید شده پس از ۳۰ روز به محیط کشت MS منتقل و با نصف هورمون‌ها واکشت شدند. چربی‌زدایی و استخراج مواد مؤثره از کالوس، به‌ترتیب با استفاده از حلال‌های پترولیوم اتر و متانول انجام شد. اجزای سیلی‌مارین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا به اجزای تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین تفکیک شدند. آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار spss انجام شد.

نتایج: نتایج آزمایش نشان‌دهنده تأثیر تیمارهای مختلف ریزنمونه، اکوتیپ و هورمون‌ها بر میزان ترکیبات فلاونوییدی سیلی‌مارین (تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین) در عصاره ماریتیغال می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین مقادیر فلاونولیگنان‌ها در کالوس‌های حاصل از آزمایش نشان داد که بیشترین مقدار تاکسی‌فولین مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل بود. بیشترین مقدار سیلی‌کریستین مربوط به رقم مجارستان و مقدار ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. بیشترین مقدار سیلی‌دیانین مربوط به رقم مجارستان، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. بیشترین مقدار سیلی‌بین مربوط به رقم مجارستان، ریزنمونه هیپوکوتیل، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تعلق داشت. بیشترین مقدار ایزوسیلی‌بین مربوط به رقم مجارستان، ریزنمونه هیپوکوتیل و مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. بیشترین مقدار سیلی‌مارین مربوط به رقم مجارستان، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که ارقام اصلاح شده ماریتیغال از قبیل مجارستان مواد مؤثره بیشتری نسبت به توده‌های بومی دارند. در تولید مواد مؤثره، نوع ریزنمونه اهمیت بیشتری نسبت به حجم و نوع کالوس حاصل از آن دارد. به‌طوری که ریزنمونه هیپوکوتیل

با کالوس‌های کوچک و غیر جنین‌زا نسبت به لپه با کالوس‌های حجیم و جنین‌زا درصد تولید مواد مؤثره بالایی داشت. در ضمن، مقادیر پایین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین مؤثرتر از مقادیر بالای آنها در تولید مواد مؤثره بودند.

واژه‌های کلیدی: فلاونوئید، کالوس، سیلی‌مارین، ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)، شرایط درون شیشه.

مقدمه

ماریتیغال یا خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* از گیاهان مهم دارویی است که جایگاه خاصی را در صنایع دارویی پیدا کرده است. خارمریم گیاهی یک‌ساله یا دوساله است که دارای مواد مؤثره از نوع ترکیبات فلانوئیدی می‌باشد که بیشتر در دانه‌های گیاه ذخیره می‌شود (Omidbagi, 1998). مجموعه مواد مؤثره این گیاه به سیلی‌مارین معروف است (Omidbagi, 1997). سیلی‌مارین به‌طور تقریبی مخلوطی از ۶۰-۵۰٪ سیلی‌بین، ۵٪ ایزوسیلی‌بین، ۲۰٪ سیلی‌کریستین و ۱۰٪ سیلی‌دیانین می‌باشد (Cammie *et al*., 2003؛ Wang *et al*., 2020). سیلی‌بین و سایر فلاونوییدهای این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان، آنتی‌پراکسیداسیون و آنتی‌فیبروتیک هستند و موجب محافظت کبد در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن می‌شوند (Fallah hoseaini & Alavian, 2002). میوه ماریتیغال حاوی مقدار نسبتاً زیادی روغن است که این روغن باید پیش از استخراج سیلی‌مارین از دانه جدا شود، در واقع روغن محصول فرعی فرایند تولید سیلی‌مارین است. روغن دانه ماریتیغال دارای مقادیر قابل توجهی ویتامین E است (Hadolin *et al*., 2001).

علاوه بر محتوای بالای سیلی‌مارین، *S. marianum* به دلیل محتوای روغن بالای آن نیز شناخته شده است که از ۲۲٪ تا ۳۱٪ متغیر است (Elateeq *et al*., 2020؛ Milovanovic *et al*., 2022). روغن دانه خار مریم حاوی غلظت بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع، به‌ویژه اسید لینولئیک (امگا ۶) و اسید اولئیک است (Lukic *et al*., 2022). این دو اسید چرب غیراشباع می‌توانند در برابر بیماری‌های قلبی عروقی که شایع‌ترین بیماری‌های مرتبط با افزایش سن در جهان هستند، محافظت کنند (Belury, 2023). از سوی دیگر، روغن دانه *S. marianum* حاوی سطح بالایی از فیتواسترول‌ها، یعنی کامپسترول، سیتوسترول، استیگماسترول و مقدار کمی کلسترول است (Marszałkiewicz *et al*., 2020). این فیتواسترول‌های مختلف اثرهای مفیدی بر سلامت انسان ازجمله در افراد مسن دارند (Rezig *et al*., 2022). برخی از آنها دارای فعالیت‌های ضد التهابی، ضد دیابتی، تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد انگلی، ضد قارچی، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و محافظت کننده عصبی هستند. آنها همچنین برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی کارآمد هستند (Khallouki *et al*., 2024). علاوه بر این، سطح بالایی از توکوفرول‌ها، به‌ویژه α-توکوفرول، در روغن دانه خار مریم مشاهده شد (Meddeb *et al*., 2017؛ Meddeb *et al*., 2018). براساس چندین مطالعه فارماکولوژیک، ترکیبات شناسایی شده در روغن دانه *S. marianum* دارای خواص محافظ کبد، ضد دیابت، ضد التهاب، ضد درد، آنتی اکسیدان و ضد تومور هستند (Awla *et al*., 2023؛ Marmouzi *et al*., 2021).

سیلی‌مارین کبد را در برابر عفونت‌هایی مانند یرقان ویروسی محافظت می‌کند، به این لحاظ از مشتقات سیلی‌مارین داروهای متعددی در صنایع داروسازی جهان ساخته می‌شود که ازجمله آنها می‌توان به لگالون (Legalon)، دوراسیلی‌مارین (Durasilymarin)، هگریمارین (Hegrimarin) و مارین‌دیستل (Mariendistel) اشاره کرد که در مداوای بیماری‌های کبدی استفاده می‌شوند. با توجه به این مسئله، امروزه تولید ژنوتیپ‌ها و لاین‌های با مقدار بالای سیلی‌بین مورد توجه است (Hetz *et al*., 1995). می‌توان از روش‌های جدید بیوتکنولوژی ازجمله هیبریداسیون سوماتیکی و یا روش‌های متعدد انتقال ژن از طریق روش‌های مختلف مهندسی ژنتیک ژنوتیپ‌های جدید تولید کرد. کارایی این روش‌ها مشروط به موفقیت در کشت بافت و باززایی گیاه

می‌باشد (Azadi, 2006).

در سال‌های اخیر با پیشرفت تحقیقات در زمینه بیوتکنولوژی گیاهی و ابداع روش‌های مهندسی ژنتیک، پرورش و کشت تجاری گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه و دارویی از آنها و نیز تولید درون شیشه‌ای فرآورده‌های ثانویه و دستورزی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این فناوری‌ها، کنترل الگوی بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌منظور تولید بهینه آنها در یک گیاه، یا حتی تولید یک متابولیت ثانویه جدید در گیاه می‌باشد. تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه نسبت به کشت مرسوم گیاهان در مزرعه، با مزیت‌هایی همراه است که ازجمله آنها می‌توان به موارد تولید گیاهان و کشت‌های سلولی عاری از پاتوژن‌ها، تکثیر آسان و ساده گیاهان برای تولید فرآورده‌های خاص، کیفیت پایدار محصول، کوتاه شدن طول دوره رشد، کنترل رشد سلول و تنظیم فرایند تولید فرآورده‌ها با بهینه کردن محیط‌های کشت و شرایط فیزیکی رشد سلولی و کمک به حفظ ذخایر توارثی به علت کاهش یا عدم استفاده از گونه‌های طبیعی اشاره کرد (Poorjabbar, 2006).

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که سیلی‌بین مهمترین فلاونوئید این گیاه، در درمان سرطان پروستات نقش مؤثری را ایفاء می‌کند (Zi & Agarwal, 1999). سیلی‌بین هم از نظر کمّی و هم از نظر کیفی و خواص دارویی ترکیب اصلی سیلی‌مارین می‌باشد (Cacho *et al*., 1999). سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین هم در خواص آنتی‌اکسیدانت سیلی‌مارین نقش دارند و پیشنهاد شده که سیلی‌بین در حضور این ترکیبات مؤثرتر است. بنابراین تعیین درصد سایر اجزاء فلاونوئیدی سیلی‌مارین از اهمیت زیادی برخوردار است (Krecman *et al*., 1998).

Wagner و همکاران (۱۹۷۴)، به بررسی شیمیایی اجزاء فلاونوئیدی موجود در سیلی‌مارین بدست آمده از میوه‌های گیاه خار مریم پرداختند، ترکیب سیلی‌دیانین بیشترین درصد را به خود اختصاص داد. Titel و Wagner (۱۹۷۷)، به جداسازی این ترکیبات به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) پرداختند، بیشترین درصد ترکیب مربوط به سیلی‌بین بود. Valenzuela و Garrido (۱۹۹۴)، خواص دارویی و ساختار ایزومرهای سیلی‌بین را در فلاونوئیدهای سیلی‌مارین بررسی کردند. Quaglia و همکاران (۱۹۹۹)، سیلی‌مارین استخراج شده از میوه‌های خشک شده گیاه خارمریم را با دو روش HPLC و کاپیلاری الکتروفورز تجزیه و تحلیل نمودند. Kim و همکاران (۲۰۰۳)، به جداسازی و دسته‌بندی انواع سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین عصاره حاصل از میوه‌های گیاه خارمریم پرداختند.

سیلی‌مارین که ترکیبی از فلاونوئیدها و توکرفرول‌ها است اغلب به کمک حلال‌های قطبی مانند دی متیل- کتون، اتیل‌استات و اتانول استخراج می‌شود. استخراج تحت هم‌زدن شدید در نقطه جوش حلال و طی چند مرحله انجام می‌شود (Quaglia *et al*., 1999). در گیاه ماریتیغال سیلی‌مارین از دانه‌های گیاه و کالوس‌های حاصل از ریزنمونه لپه استخراج می‌شود ولی روش استخراج در دو مورد کمی با هم متفاوت است. برای تعیین میزان سیلی‌مارین و تفکیک آن به اجزای تشکیل‌دهنده، HPLC روش متداول است (Cacho *et al*., 1999).

هدف از این تحقیق، مطالعه اثر ژنوتیپ، ریزنمونه، تیمارهای فیتوهورمونی و نوع کالوس بر میزان سنتز مواد مؤثره در کالوس‌های ماریتیغال با استفاده از تکنیک HPLC بود.

مواد و روش‌ها

به منظور تولید گیاهچه‌های استریل، بذرهای دو اکوتیپ مجارستان و برازجان ابتدا در زیر هود استریل و سپس به ترتیب زیر شستشو و ضدعفونی شدند: محلول tween-20 (۲ قطره در ۱۰cc آب مقطر) ۲۰-۱۵ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل، اتانول ۷۰٪ ۲-۱ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، آب اکسیژنه ۱۵ حجم ۲/۵ دقیقه یا هیپوکلریت سدیم ۲٪ ۱۵-۱۰ دقیقه و ۴ بار شستشو با آب مقطر استریل.

سپس بذرهای استریل به محیط کشت آب و آگار (۱۲ گرم در لیتر) استریل شده 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 پتری دیش‌های استریل منتقل شدند. برای القاء و رشد کالوس (طبق جدول ۱) غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid به همراه غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (6-Benzylaminopurin) در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) آزمایش گردیدند (Cacho *et al.*, 1999؛ Murashige & Skoog, 1962). 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 در لیتر 2,4-D و غلظت‌های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) واکشت شدند. طرح آماری مورد استفاده، طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی شامل ۴ فاکتور اکوتیپ در ۲ سطح (مجارستان و برازجان)، ریزنمونه در ۲ سطح (لپه و هیپوکوتیل)، 2,4-D در ۳ سطح و BAP در ۲ سطح در ۳ تکرار (هر تیمار در ۴ پتری دیش و هر تکرار شامل ۹۶ پتری دیش) بود.

جدول ۱- اکوتیپ‌ها، ریزنمونه‌ها و تنظیم کننده‌های رشد استفاده شده در محیط کشت MS کالوس گیاه ماریتیغال

Table 1. Ecotypes, explants and growth regulators used in *Silybum marianum callus culture madia*

Treatment number	Ecotype	Explant	Growth regulator	
			Auxin (2,4-D)mg.L^{-1}	Cytokinin (BAP) mg.L^{-1}
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

استخراج فلاونولیگنان‌ها از کالوس

ابتدا به منظور چربی‌زدایی، کاغذ صافی‌های محتوای کالوس‌های خشک شده مربوط به هر تیمار درون فالکون‌ها، به‌مدت ۱۰ ساعت به همراه ۵۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محلول محتوی چربی و پترولیوم اتر را دور ریخته و باقیمانده در شرایط آزمایشگاه خشک شد. برای عصاره‌گیری، ۱۰ میلی‌لیتر متانول داخل هر فالکون محتوای نمونه خشک شده ریخته و به‌مدت ۱۰-۸ ساعت در بن‌ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کاغذ صافی محتوای نمونه از فالکون خارج و عصاره متانولی حاصل توسط فریزدرایر آزمایشگاهی (برند Operon) تغلیظ گردید. در نهایت پودر زرد رنگ بدست آمده توسط متانول به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد.

اندازه‌گیری فلاونولیگنان‌ها در عصاره متانولی حاصل از کالوس‌های گیاه ماریتیغال به روش HPLC

به منظور تعیین مقادیر کمّی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی مایع Knauer با کارایی بالا استفاده شد. این دستگاه شامل پمپ K1001، دتکتور UV مدل K2501، اتوسمپلر Marathon و نرم‌افزار Chromgate بود. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با فاز متحرک متانول، استونیتریل و آب (جدول ۲) و با فلوی یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C_{18} به قطر ذرات ۵µ و ابعاد ۱۵۰×۴/۶ mm عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر شناسایی شدند. کل زمان هر کروماتوگراف ۳۰ دقیقه بود. پیک‌های مربوط به اجزای فلاونولیگنان در مقایسه با سیلی‌مارین استاندارد سیگما مشخص شده و مقادیر هر یک براساس منحنی استاندارد سیلی‌بین استاندارد محاسبه شد (Brenda, 2000 ؛Bourgand *et al*., 2001). اجزای سیلی‌مارین اندازه‌گیری شده از هر نمونه شامل تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین بود. تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین (به روش دانکن) با نرم‌افزار spss(16) انجام شد.

جدول ۲- برنامه سیستم حلال‌ها در دستگاه HPLC

Table 2. Solvents system program in HPLC device

Time (min)	Methanol (%)	Acetonitrile (%)	Water (pH = 2.3) with H_3Po_4 10%
0:00	22	15	63
7:30	22	15	63
15:00	40	20	40
30:00	22	15	63

نتایج

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین مقادیر فلاونولیگنان‌ها در کالوس‌های حاصل از دو ریزنمونه هیپوکوتیل و لپه بدست آمده از دو اکوتیپ مجارستان و برازجان تحت سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-D و BAP، نشان‌دهنده مقادیر مختلف اجزاء فلاونوئیدی سیلی‌مارین (تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین) تحت تأثیر تیمارهای ذکرشده می‌باشد (جدول‌های ۳، ۴ و ۵).

در تجزیه واریانس (تاکسی‌فولین)، بین اکوتیپ‌ها و مقادیر 2,4-D و BAP تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. فقط بین نوع ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. بیشترین مقدار تاکسی‌فولین مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل بود.

در تجزیه واریانس (سیلی‌کریستین)، بین ریزنمونه‌ها و مقادیر BAP تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. ولی بین اکوتیپ‌ها و مقادیر 2,4-D تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین مقدار سیلی‌کریستین مربوط به رقم مجارستان و مقدار ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود.

در تجزیه واریانس (سیلی‌دیانین)، بین ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. ولی بین اکوتیپ‌ها، مقادیر 2,4-D و BAP تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. بیشترین مقدار سیلی‌دیانین مربوط به رقم مجارستان، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

در تجزیه واریانس (سیلی‌بین)، بین اکوتیپ‌ها، ریزنمونه‌ها و مقادیر 2,4-D و BAP تفاوت معنی‌دار وجود داشت. بیشترین مقدار سیلی‌بین مربوط به رقم مجارستان، ریزنمونه هیپوکوتیل، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

در تجزیه واریانس (ایزوسیلی‌بین)، بین مقادیر BAP تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. ولی بین اکوتیپ‌ها، ریزنمونه‌ها و مقادیر 2,4-D تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. بیشترین مقدار ایزوسیلی‌بین مربوط به رقم مجارستان، ریزنمونه هیپوکوتیل و مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود.

در تجزیه واریانس (سیلی‌مارین)، بین ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. ولی بین اکوتیپ‌ها، مقادیر BAP و مقادیر 2,4-D تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. بیشترین مقدار سیلی‌مارین مربوط به رقم مجارستان، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (شکل ۱).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر اکوتیپ، ریزنمونه و تیمارهای هورمونی بر مقدار فلاونولیگنان‌های کالوس گیاه ماریتیغال

Table 3. ANOVA of ecotype, explant, and hormonal treatment effects on callus flavonolignans amount in *Silybum marianum*

S.O.V.	d.f.	M.S.					
		taxifolin	Silychristin	Silydianin	Silibin	Isosilibin	Silymarin
ecotype	1	0.806	36.285**	130.68**	29.235**	22.932**	815.043**
explant	1	25.56**	0.424	22.001	22.088**	6.697**	68.959
ecotype × explant	1	0.118	24.595**	11.842	8.612**	1.952	170.999*
2,4-D	2	2.113	85.04**	770.158**	9.874**	6.519**	690.449**
ecotype × 2,4-D	2	11.218**	24834**	123.594**	0.939	0.285	219.977**
2,4-D × explant	2	10.278**	0.876	68.868*	2.633**	3.58*	131.255*
ecotype × explant × 2,4-D	2	8.881*	14.303**	9.004	0.046	3.086*	67.089
BAP	1	4.47	0.297	68.056*	12.87**	0.851	237.735**
ecotype × BAP	1	11.94*	6.534	376.294**	5.88**	13.736**	380.958**
BAP × explant	1	50.803**	7.057	3.125	0.083	1.14	52.369
ecotype × explant × BAP	1	13.364*	1.655	169.28**	0.034	2.431	274.801**
2,4-D × BAP	2	10.199**	4.26	361.42**	1.719	2.84	231.291**
ecotype × BAP × 2,4-D	2	13.621**	26.555**	362.683**	1.383	0.688	700.93**
explant × BAP × 2,4-D	2	5.705	17.149**	17.14	0.118	4.047*	68.396
ecotype × explant × BAP × 2,4-D	2	4.057	1.162	34.841	1.146	0.079	42.259
error	48	2.279	1.892	18.23	0.618	1.028	34.387
C.V. (%)		15.1	11.38	18.58	7.6	10.26	8.96

n.s., *, and **: non-significant, significant at 1% and 5% probability levels, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین فلاونولیگنان‌ها (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) حاصل از کالوس در مقادیر مختلف 2,4-D در گیاه ماریتیغال

Table 4. Comparison of the mean of flavonolignans (mg/g dry matter) obtained from callus in different amounts of 2,4-D in *Silybum marianum*

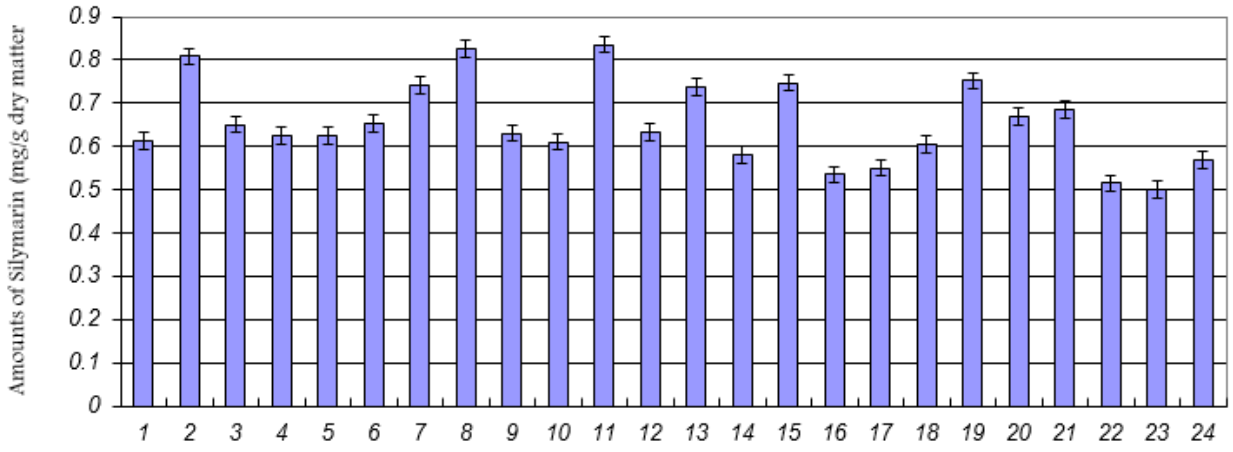
2,4-D	Silychristin	Silydianin	Silibin	Isosilibin	Silymarin
1 mg\L	0.1041 c	0.2948 a	0.1103 a	0.1032 a	0.7157 a
2.5 mg\L	0.1172 b	0.2028 b	0.1024 b	0.1001 a	0.6247 b
5 mg\L	0.1412 a	0.1915 b	0.0976 c	0.0931 b	0.621 b
LSD	0.0081	0.0246	0.0045	0.0058	0.0339

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیر اکوتیپ، ریزنمونه و تیمار هورمونی بر مقدار فلاونولیگنان‌های کالوس گیاه ماریتیغال

Table 5. Means comparison of ecotype, explant, and hormonal treatment effects on callus flavonolignans amount in *Silybum marianum*

Treatment number	Taxifolin	Silychristin	Silydianin	Silibin	Isosilibin	Silymarin
1	0.0855	0.1115	0.2087	0.1062	0.1003	0.6121
2	0.0858	0.0968	0.4133	0.1071	0.1047	0.8078
3	0.0862	0.1098	0.2517	0.1018	0.1012	0.6506
4	0.1377	0.1211	0.1833	0.0902	0.0935	0.6258
5	0.0971	0.1397	0.1943	0.097	0.0972	0.6254
6	0.0821	0.149	0.2163	0.1028	0.1016	0.6519
7	0.1288	0.1209	0.249	0.1291	0.1136	0.7414
8	0.0863	0.1	0.3937	0.1305	0.116	0.8264
9	0.1138	0.1076	0.1827	0.1196	0.1069	0.6306
10	0.0961	0.1282	0.145	0.1147	0.1263	0.6103
11	0.1405	0.2001	0.2937	0.1135	0.0878	0.8356
12	0.0851	0.1506	0.186	0.1055	0.1043	0.6315
13	0.1020	0.1059	0.324	0.1088	0.0961	0.7368
14	0.0871	0.0918	0.2283	0.0869	0.0859	0.58
15	0.0831	0.1295	0.3183	0.1021	0.1042	0.7473
16	0.0998	0.1128	0.147	0.0888	0.0863	0.5348
17	0.0811	0.1091	0.175	0.0951	0.0896	0.5499
18	0.1134	0.1638	0.152	0.0884	0.0884	0.606
19	0.1229	0.0991	0.292	0.1168	0.1206	0.7514
20	0.1279	0.1072	0.249	0.0973	0.0884	0.6698
21	0.1053	0.1212	0.2517	0.1134	0.0933	0.6838
22	0.095	0.1072	0.1327	0.09	0.0895	0.5143
23	0.0959	0.1025	0.1217	0.09	0.0879	0.4989
24	0.0862	0.1139	0.1927	0.0886	0.0877	0.5691

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).
The details of the treatments are written in Table No. 1



شکل ۱- مقادیر سیلی‌مارین (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در کالوس حاصل از تیمارهای مورد نظر در گیاه ماریتیغال

Figure 1. Amounts of silymarin (mg/g dry matter) in the callus obtained from the desired treatments in *Silybum marianum*

بحث

نتایج بدست آمده نشان داد که ارقام اصلاح شده ماریتیغال از قبیل مجارستان مواد مؤثره بیشتری دارند. در تولید مواد مؤثره نوع ریزنمونه اهمیت بیشتری نسبت به حجم و نوع کالوس حاصل از آن دارد. به‌طوری که ریزنمونه هیپوکوتیل با کالوس‌های کوچک و غیر جنین‌زا نسبت به لپه با کالوس‌های حجیم و جنین‌زا درصد تولید مواد مؤثره بالایی داشت. در ضمن، مقادیر پایین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین مؤثرتر از مقادیر بالای آنها در تولید مواد مؤثره بودند.

در حال حاضر استفاده از تکنولوژی کشت بافت برای تولید تعدادی از ترکیبات دارویی استفاده می‌شود. با پیشرفت علم در زمینه بیوشیمی و شناسایی عوامل مؤثر در مسیر بیوسنتزی و تکنیک‌های انتقال ژن، این تکنولوژی به سمت تولید ترکیبات دارویی با ارزش پیش می‌رود. بنابراین پیشنهاد می‌شود با دستکاری و بهینه‌سازی اجزاء سازنده محیط کشت از قبیل استفاده از انواع محیط‌های کشت پایه و هورمون‌های مختلف طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاه ماریتیغال تولید شود.

مطالعه ترکیبات سیلی‌مارین به‌وسیله HPLC در اکوتیپ‌های خارمریم از نقاط مختلف کشور (شمال، غرب و جنوب غرب) نشان دادند که بالاترین مقدار سیلی‌مارین در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان تجمع داشت (Hasanloo, 2005).

با افزایش سن کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های لپه و هیپوکوتیل ماریتیغال میزان سیلی‌بین افزایش و بعکس میزان ایزوسیلی‌بین کاهش می‌یابد. بیشترین میزان تاکسی‌فولین در کالوس‌های اولیه مشاهده شد. از نظر میزان سیلی‌بین ریزنمونه لپه رقم مجارستان بیشترین میزان را داشت و از نظر مجموع سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین ریزنمونه هیپوکوتیل رقم مجارستان بهتر عمل کرد، همچنین در مورد میزان تاکسی‌فولین، در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل رقم مجارستان بالاتر بود (Poorjabbar, 2006).

مشخص شده است که 2,4-D باعث تمایززدایی سلول‌ها در محیط کشت شده و از تولید متابولیت‌های ثانویه که بیشتر در بافت‌های تمایز یافته تجمع می‌یابند، ممانعت بعمل می‌آورد. تولید بربرین در کشت سلولی گیاه *Thalictrum minus* تحت تأثیر ترکیب هورمونی محیط کشت است. در حضور 2,4-D سلول‌ها سریعتر رشد کرده و بربرین کمی تولید می‌شود (Bhojwani & Razdan, 1996).

تنظیم کننده‌های رشد دارای اثرهای بسیار متفاوتی بر میزان رشد و تجمع فلاونولیگنان‌ها می‌باشند و کالوس‌های موجود در محیط‌های حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین از نظر رشد و تولید فلاونولیگنان‌ها بهتر از سایر نمونه‌ها بودند (Hasanloo, 2005).

تکنولوژی کشت سلولی گیاه در اواخر دهه ۱۹۶۰ به‌عنوان ابزاری برای مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه شروع شد. کشت در شرایط *in vitro* سلول‌ها و بافت‌های گیاهی یکی از راه‌های تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیلی‌مارین می‌باشد. تا کنون مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است. در تمامی موارد تولید فلاونولیگنان‌ها در شرایط کشت *in vitro* بسیار پایین بوده و در طی واکشت‌ها از بین می‌رود. در بسیاری از مطالعات در بیشتر گونه‌ها دستکاری و بهینه‌سازی اجزاء سازنده محیط کشت موجب افزایش در تولید این ترکیبات شده است (Cacho *et al*., 1999).

References

- Awla, N.J., Naqishbandi, A.M. and Baqi, Y., 2023. Preventive and Therapeutic Effects of *Silybum Marianum* Seed Extract Rich in Silydianin and Silychristin in a Rat Model of Metabolic Syndrome. ACS Pharmacology & Translational Science, 6(11): 1715-1723.
- Azadi, P., 2006. Plant regeneration from sunflower cotyledons through direct organogenesis. Master's Thesis in Agriculture and Plant Breeding. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University.
- Belury, M.A., 2023. Linoleic Acid, an Omega-6 Fatty Acid That Reduces Risk for Cardiometabolic Diseases: Premise, Promise and Practical Implications. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 26(3): 288-292.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., 1996. Plant Tissue Culture. Elsevier Science, 510p.
- Bourgand, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.
- Brenda, W.S., 2000. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology, 126: 485-493.
- 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, B.B.A. and Pharm, D., 2003. *Silybum marianum* (Milk Thistle). Journal of the Pharmacy Society Wisconsin. 2: 38-40.
- Elateeq, A.A., Sun, Y., Nxumalo, W. and Gabr, A.M.M., 2020. Biotechnological Production of Silymarin in *Silybum Marianum* L.: A Review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 29: 101775.
- Fallah hoseaini, H. and Alavian, S.M., 2002. Control and treatment of hepatitis with complementary and herbal medicines. Journal of Medicinal Plants, 4: 1-10.
- Hadolin, M., Skerget, M., Knez. Z. and Bauman, D., 2001. High pressure extraction of vitamin E- rich oil from *Silybum marianum*. food Chemistry, 74: 355-364.
- 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 in order to produce silymarin. Ph.D. thesis in biology- plant sciences, Faculty of Science, Tarbiat Moalem University.
- Hetz, E., liersch, R. and Schieder, D., 1995. Genetic investigations on *silybum marianum* and *S. eburneum* with respect to leaf colour, out crossing ratio and flavonolignan composition. Planta Medica, 61(1): 54-57.
- Kim, N.C., Graf, T.N., Sparacino, C.M., Wani, M.C. and Wall, M.E., 2003. Complete isolatation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). Organic & Biomolecular Chemistry, 1(10): 1684-1689.
- Khallouki, F., Ksila, M., Ghzaiel, I., Essadek, S., Joutey, M.T. and Maaloul, S., 2024. Chemical and Biochemical Features of Spinasterol and Schottenol. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1440: 45-55.
- Krecman, V., Skottova, N., Waterova, D., Ultichova, J. and Simanek, V., 1998. Silymarin inhibits the development of diet- induced hypercholes- terolemia in rats. Planta Medica, 64: 138-142.
- Lukic, I., Milovanovic, S., Pantic, M., Srbljak, I., Djuric, A. and Tadic, V., 2022. Separation of High-Value Extracts from *Silybum Marianum* Seeds: Influence of Extraction Technique and Storage on Composition and Bioactivity. LWT, 160: 113319.
- Marmouzi, I., Bouyahya, A., Ezzat, S.M., El Jemli, M. and Kharbach, M., 2021. The Food Plant *Silybum Marianum* (L.) Gaertn.: Phytochemistry, Ethnopharmacology and Clinical Evidence. Journal of Ethnopharmacology, 265: 113303.
- Marszałkiewicz, S., Siger, A., Gawrysiak-Witulska, M., Kmiecik, D. and Rudzińska, M., 2020. The Effect of Drying Temperature of Milk Thistle Seeds on Quality and Bioactive Compounds in the Lipid Fraction. Journal of Food Science and Technology, 57(11): 4003-4013.
- Meddeb, W., Rezig, L., Abderrabba, M., Lizard, G. and Mejri, M., 2017. Tunisian Milk Thistle: An Investigation of the Chemical Composition and the Characterization of Its Cold-Pressed Seed Oils. International Journal of Molecular Sciences, 18(12): 2582.
- Meddeb, W., Rezig, L., Zarrouk, A., Nury, T., Vejux, A. and Prost, M., 2018. Cytoprotective Activities of Milk Thistle Seed Oil Used in Traditional Tunisian Medicine on 7-Ketocholesterol and 24S-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity on 158N Murine Oligodendrocytes. Antioxidants, 7(7): 0095.
- Milovanovic, S., Lukic, I., Stamenic, M., Kamiński, P., Florkowski, G. and Tyśkiewicz, K., 2022. The Effect of Equipment Design and Process Scale-up on Supercritical CO2 Extraction: Case Study for *Silybum Marianum* Seeds. The Journal of Supercritical Fluids, 188: 105676.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.
- Omidbagi, R., 1997. Approaches to The Production and Processing of Medicinal Plants. Tehran, Designs Publishing House, first edition, 283p.
- Omidbagi, 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., 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 the field of agricultural biotechnology. Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
- Quaglia, M.G., Bossu, E., Donati, E., Mazzanti, G. and Brandt, A., 1999. Determination of silymarin in the extract from the dried *Silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19: 435-442.
- Rezig, L., Ghzaiel, I., Ksila, M., Yammine, A., Nury, T. and Zarrouk, A., 2022. Cytoprotective Activities of Representative Nutrients from the Mediterranean Diet and of Mediterranean Oils against 7-Ketocholesterol- and 7β-Hydroxycholesterol-Induced Cytotoxicity: Application to Age-Related Diseases and Civilization Diseases. Steroids, 187: 109093.
- Titel, G. and Wagner, H., 1977. High-performance liquid chromatographic separation of silymarins and their determination in a raw extract of *silybum marianum*. Journal Chromatography, 135(2): 499-501.
- Valenzuela, A. and Garrido, A., 1994. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and its structural isomer silibinin. Biological Research, 27(2): 105-112.
- Wagner, H., Diesel, P. and Seites, M., 1974. The chemistry and analysis of silymarin from *silybum marianum*. Arzheimittle Forschung, 24(4): 466-471.
- Wang, X., Zhang, Z. and Wu, S.C., 2020. Health Benefits of *Silybum Marianum*: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(42): 11644-11664.
- Zi, X. and Agarwal, R., 1999. Silibinin Prostate-Specific a with cell growth inhibition via Gl arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma Cells: Implications for prostate cancer intervention. The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 96(13): 7490-7495.