مقایسه میزان تولید فلاونولیگنان ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) تیمار شده با +Ag، +Pb2، سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر

سمیرا رحیمی آشتیانی (۱)، (۲) و (۳)، طاهره حسنلو (۱)، محمد رضا بی‌همتا (۴)

۱- بخش فیزیولوژی و پروتئومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۳- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۴- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران واحد کرج

میزان تولید فلاونولیگنان ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum*) تیمار شده با $AgNO_3$، $PbNO_3$، عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید مقایسه شد. فلاونولیگنان ها از اجزای فعال خارمریم هستند و سیلی مارین یک ماده مشتق شده از این گیاه می باشد که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و در درمان بیماری های کبدی (سیروز و مسمومیت‌های کبدی) و پیشگیری و یا درمان سرطان مورد استفاده قرار می گیرد. محرک ها منجر به افزایش تولید فلاونولیگنان ها با تاثیر بر فعالیت آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه می شوند. بر این اساس اثرات $AgNO_3$، $PbNO_3$، عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید در ۵ غلظت مختلف و ۶ زمان نمونه برداری بر میزان تولید سیلی مارین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم با هدف معرفی بهترین محرک به منظور حداکثر تولید فلاونولیگنان ها در مناسب ترین زمان و غلظت مطالعه شد. نتایج نشان دادند که $AgNO_3$ به طور معنی داری باعث افزایش تولید سیلی مارین در کشت سوسپانسون سلولی گیاه خارمریم شد، بطوریکه میزان آن حدود ۳۰ برابر بیشتر از گروه شاهد بود و مقدار تولید سیلی مارین در محیط های تیمار شده با سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر و $PbNO_3$، به ترتیب ۱۸، ۱۵ و ۲ برابر بیشتر از میزان آن نسبت به گروه شاهد بود.

واژه های کلیدی: خار مریم، کشت سوسپانسیون سلولی، محرک، فلاونولیگنان ها

مقدمه

گیاه دارویی خار مریم بر روی همه بیماری های کبدی اثر مثبت دارد و به عنوان یک درمان پشتیبان در بیماری های کبدی- التهابی مزمن از قبیل سیروز،هپاتیت ها، مسمومیت های الکلی و سموم شیمیایی مانند تتراکلریدکربن مورد استفاده قرار می گیرد (۳). کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم به عنوان منبع خوبی جهت تامین سیلی مارین می باشد(۲). عوامل محرک با تاثیر بر مسیر های انتقال سیگنال، منجر به تغییرات در تنظیم بیان ژن ها و در نهایت تولید متابولیت ها به عنوان پاسخ دفاعی در برابر تنش ایجاد شده می شوند(۱). بر این اساس اثرات Ag^{+}، Pb^{2+} و سالیسیلیک اسید به عنوان محرک های غیر زنده و عصاره مخمر(Yeast extract) به عنوان محرک زنده در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم با هدف معرفی بهترین محرک به منظور حداکثر تولید فلاونولیگنان ها در مناسب ترین زمان و غلظت، مطالعه شد.

مواد و روش ها

برای تهیه کشت سوسپانسیون سلولی، ۰/۵ گرم از کالوس های سه ماهه حاصل از برگ های دو لپه ای دانه رست های خارمریم با منشا مجاری در محیط کشت موراشیج و اسکوگ (حاوی ۳ میلی گرم در لیتر پیکلورام و ۰/۴ میلی گرم در لیتر کاینتین) به محیط مایع موراشیج و اسکوگ (حاوی همان ترکیبات هورمونی) منتقل شدند و در دمای ۲۶ درجه

سانتیگراد درون شیکر انکوباتور (چرخشی) با دور ۱۵۰ دور در دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. پس از ۳ بار واکشت (هر ۱۵ روز) الیسیتورهای Ag^{+} و Pb^{2+} (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۲ میلی مولار)، عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید (۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر ۵۰ میلی لیتر محیط کشت) به محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ و ۲۱۶ ساعت از اعمال تیمار نمونه برداری انجام شد. جهت بررسی دقیق کمی و کیفی فلاونولیگنان ها، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی با لا (HPLC) استفاده شد. آنالیز داده ها با استفاده از آزمون پایه فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ مقایسه شدند. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری به وسیله نرم افزارهای کامپیوتری MSTATC و SAS.9.1 و MINITAB.15 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

مطالعه کمی و کیفی ترکیبات فلاونولیگنانی تولید شده از این آزمایش ها بیانگر تولید سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین و ایزوسیلیبین و ماده ای به نام تاکسی فولین که پیش ساز فلاونولیگنان های ذکر شده است، می باشد. در محیط های تیمار شده با Ag^{+} حداکثر میزان تولید سیلی مارین ۵۶ میکروگرم برگرم وزن خشک و مربوط به محیط های تیمار شده با غلظت ۰/۸ میلی مولار در پایان ۲۴ ساعت بود (گروه شاهد: ۲/۸۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک). در محیط های تیمار شده با سالیسیلیک اسید حداکثر میزان تولید سیلی مارین در پایان ۱۴۴ ساعت و مربوط به محیط های تیمار شده با غلظت ۸ میلی گرم بر ۵۰ میلی لیتر محیط کشت بودکه به ۱۷/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک رسید (گروه شاهد: ۰/۱۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک). در محیط های تیمار شده با عصاره مخمر، حداکثر میزان تولید سیلی مارین ۱۴/۵۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک و مربوط به محیط های تیمار شده با غلظت ۶ میلی گرم بر ۵۰ میلی لیتر محیط کشت در پایان ۷۲ ساعت بود (گروه شاهد: ۲/۹۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و در محیط های تیمار شده با Pb^{2+} حداکثر میزان تولید سیلی مارین ۷/۵۳ میکروگرم برگرم وزن خشک و مربوط به محیط های تیمار شده با غلظت ۰/۸ میلی مولار در پایان ۷۲ ساعت بود (گروه شاهد: ۲/۹۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک). اثرات مثبت $AgNo_3$ بر میزان تولید سیلی مارین این تیمار را به عنوان یک کاندیدای مورد قبول برای بهبود بهره وری و مطالعه مسیر های بیو شیمیایی سنتز سیلی مارین معرفی می کند.

منابع

1- Eble J and Coiso EG. Elicitors of plant defense response. *Int. Rev. Cytol*. 1994; 148: 1-36.
2- Ferreiro P, Pais MSS, Cabral JMS. Production of silybin-like compounds in suspension cultures of silybum marianum. *Planta Med*. 1991; 57: 2-3.
3- Muriel P, Garciapina T, Perez- Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J. Appl. Toxicol*. 1992; 12: 439-42.

Comparison of Flavonolignans Production in Cell Suspension Culture of Milk Thistle (*Silybum marianum*) Treated with Ag^{+}, Pb^{2+}, Salicylic acid and Yeast extract

S. Rahimi Ashtiani[1,2 and 3], T. Hasanloo[1], M R. Bihamta[4]
1- Department of Plant Physiology and Proteomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran; 2- Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Karaj, Iran 3- Young

Researchers Club, Islamic Azad University, Karaj, Iran.4- Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

Flavonolignans production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn treated with Ag^{+}, Pb^{2+}, Salicylic acid and Yeast extract were comprised. Flavonolignans are an active parts of *Silybum marianum* and silymarin is a derivate substance from the plant which has an antioxidant property and has been used in livers' diseases treatment and prevention or cancer treatment. Elicitors cause enhancement in flavonolignanse production by effecting on key enzymes in secondary metabolites pathways. Based on this fact we have studied the effect of $AgNO_3$, $PbNO_3$, Yeast extract and Salicylic acid on silymarin production in cell suspension culture of *silybum marianum* in order to nomination best elicitor to extreme flavonolignanse production in the best time and best consistence in 5 different concentration and 6 different exposure times. The results show silymarin production is increased significantly by adding Ag^{+} in cell suspension cultures of *S. marianum* which is about 30-fold that of the control.

Key words: Milk thistle;Cell Suspension Culture; Elicitor; Flavonolignans.