بررسی اثر $Pb2+$ بر میزان تولید سیلی بین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم (Silybum marianum)

سمیرا رحیمی آشتیانی (۱)، (۲) و (۳)، طاهره حسنلو (۱)، محمد رضا بی همتا (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، کرج

سیلی مارین یک ماده پلی فنولیک ضد هپاتوتوکسیک است که از دانه های گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) استخراج می شود. سیلی مارین به ترکیب سه فلاونولیگنان مختلف اطلاق می شود. سیلی بین بیشترین فعالیت زیستی و ترکیب اصلی سیلی مارین هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی و خواص دارویی می باشد. از آنجایی که پتانسیل و سرعت تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می باشد، از طریق کشت سلول های گیاهی به روش‌های مختلفی از جمله استفاده از تکنیک انگیزش با استفاده از محرک ها می توان میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد. در این تحقیق $PbNO_3$ با غلظت های مختلف (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۲ میلی مولار) به عنوان محرک به منظور افزایش تولید سیلی مارین و بررسی میزان سیلی بین تولید شده در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم استفاده شد و نمونه برداری در ۶ زمان مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ و ۲۱۶ ساعت) انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که $PbNO_3$ باعث افزایش ۵ برابری میزان سیلی بین نسبت به گروه شاهد، در محیط های تیمار شده با ۱ میلی مولار $PbNO_3$ در پایان ۷۲ ساعت، شد.

واژه های کلیدی: خار مریم، کشت سوسپانسیون سلولی، تحریک، سیلی بین، Pb^{2+}.

مقدمه

سیلی مارین یک گروه از فلاونولیگنان هاست که شامل سیلی بین، ایزوسیلی بین، سیلی دیانین و سیلی کریستین می باشد. تحقیقات نشان داده که سیلی مارین یک ضد اکسیدان است و مهمترین کاربرد بالینی این گیاه به دلیل خصوصیت محافظت کبدی آن می باشد (۲). سیلی بین ترکیب اصلی سیلی مارین بوده و عصاره های استخراج شده از خار مریم معمولا برای دارا بودن ۸۰-۷۰ درصد سیلی بین استاندارد می شوند (۱). کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم قادر به تولید سیلی مارین می باشد(۴). در کشت سلولی به کار گیری محرک ها یک استراتژی مهم به منظور بهبود تولید متابولیت های ثانویه می باشد (۳). این تحقیق به منظور افزایش میزان سیلی مارین گیاه خار مریم و شناسایی و بررسی میزان سیلی بین تولید شده در اثر به کار گیری $PbNO_3$ به عنوان محرک در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم انجام شد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از کالوس های سه ماهه که از برگ های کوتیلدونی بذرهای گیاه خار مریم با منشا مجاری که از پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شده بودند کشت های سوسپانسیون سلولی تهیه شد و تاثیر غلظت های مختلف $PbNO_3$ (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۲ میلی مولار) بر میزان تولید فلاونولیگنان ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کار آیی

بالا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری در ۶ زمان مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ و ۲۱۶ ساعت) پس از اعمال تیمار انجام گردید. این آزمایش در قالب آزمایش پایه فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد و داده‌های حاصل از اندازه‌گیری به وسیله نرم افزارهای کامپیوتری MSTATC، SAS.9.1 و MINITAB.15 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که حداکثر تولید سیلی بین در محیط تیمار شده با ۱ میلی مولار $PbNO_3$ در پایان ۷۲ ساعت بود (۱/۹۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک)،در حالیکه میزان آن در گروه شاهد در همین زمان ۰/۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود. این مطالعه نشان داد که کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم بسیار مستعد تحریک با محرک $PbNO_3$ می باشد. محرک ها منجر به افزایش سرعت تولید فلاونولیگنان ها با تاثیر بر فعالیت آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه می گردند. نتایج به دست آمده از این تحقیق برای افزایش قابلیت تولید فلاونولیگنان ها از طریق کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم در مقادیر بالا بسیار سودمند می باشد.

منابع

1- Schnfeld JV, Weisbrod B. and Muller MK. Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties protects exocrine pancreas from cyclosporine A toxicity. *Cellular and molecular life sciences*. 1997; 53: 917-920.

2- Sonnebbichler, J.; Scaleram F.; Sonnebichler, I. and Weyhenmeyer, R. (1999). Stimulatory effects of silibinin and silichristin form the Milk thistle silybum marianuna on kidney cells. The journal of pharmacology and Exp"erimental Therapeutics. 290 (3): 1375-1383.

3- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances. 20: 101-153".

4- Tumova, L.; Gallova, K. and Rimakova, J. (2004). *Silybum marianum*. In vitro. Ceska slov farm., 53(3): 135-40.

Evaluation of Pb^{2+} affects on silybin production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn

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
Silymarin is an antihepatotoxic polyphenolic substance isolated from fruits of *Silybum marianum* . Silymarin is consists of 3 different flavonolignans components. From the quantity and quality points of view silybin has the most biological activity and main compound of silymarin. Due to the fact that the potential and rate of production of this compound in the natural condition is very low by using the different methods in plant cell culture such as elicitation technique by using elicitors can enhance production of secondary metabolites. In this study various level of $PbNO_3$ (0.2, 0.4, 0.8, 1 and 2 mM) have been used as an elicitor in order to increase silymarin production an evaluation of silybin production in cell suspension culture of *silybum marianum* and harvested in 6 different times (12, 24, 48, 72, 144 and 216 hrs). The result of this study shows that $PbNO_3$ cause improvement in silybin content in the media treated with 1 mM $PbNO_3$ which was 5-fold to compare the control group.

Key words: *Silybum marianum*; Cell Suspension Culture; Elicitation; Silybin; Pb^{2+}.