بررسی اثر محیط های مختلف بر میزان تجمع فلاونو لیگنان ها در ریشه های موئین گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum* L. Gaertn)

روشنک سپهری فر (۱) و طاهره حسنلو (۱)
بخش فیزیولوژی و پروتئومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

خارمریم (*Silybum marianum*) یکی از مهم ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در دنیا می باشد که در درمان بیماری های کبدی از جمله هپاتیت C مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیب فعال موجود در این گیاه سیلیمارین می باشد. ریشه های مویین حاصل از تراریختی با اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*)، به دلیل رشد سریع و پایداری ژنتیکی در محیط های کشت بدون هورمون می توانند در تولید متابولیت های ثانوی مورد استفاده قرار گیرند. در تحقیق حاضر اثر محیط های مختلف بر تولید فلاونو لیگنان ها در کشت ریشه های موئین خار مریم مطالعه شد . این ریشه ها به منظور تکثیر به محیط های مایع مختلف موراشیج اسکوگ(MS) ، نیتچ (N) و اوهیاما نیتج (ON) انتقال یافته و ضمن تعیین میزان شاخص رشد، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در طی دوره کشت یک ماه با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد. نتایج حاصل بیانگر بالاتر بودن میزان رشد و تولید سیلیمارین در محیط MS نسبت به دو محیط دیگر است. همچنین سیلیبین که عمده ترین فلاولیگنان موجود در این ریشه ها می باشد در این محیط به میزان بیشتری یافت شد. تولید موفق این فلاونولیگنان ها نشان می دهد که محیط MS محیط مناسبی برای کشت ریشه های موئین خار مریم می تواند باشد.

مقدمه

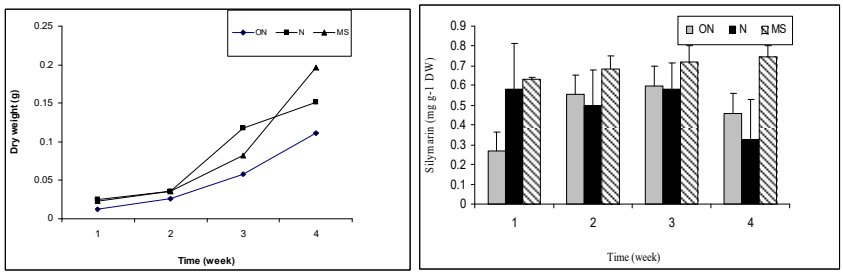
سیلی‌مارین ترکیبی از فلاونوئیدها می‌باشد که از عصاره متانولی میوه‌های خشک شده (دانه) گیاه خارمریم به میزان٤ تا ٦ درصداستخراج می‌شود. سه ماده مؤثر موجود در عصاره متانولی دانه این گیاه شامل سیلی‌بین(SBN) ، ایزوسیلی‌بین (ISBN)، سیلی‌کریستین (SCN) و سیلی‌دیانین(SDN) می‌باشند. سیلی‌مارین یک داروی محافظ کبدی است که بطور وسیعی در درمان بیماری‌های مختلف کبدی استفاده می‌شود[1]. با توجه به محدود بودن منابع گیاهی، ریشه های مویین ایجاد شده توسط اگروباکتریوم رایزوژنز کاربرد های وسیعی در تولید متابولیت های ثانویه با منشاء گیاهی دارند.در تحقیق حاضر تولید ریشه های مویین در گیاه خارمریم و همچنین تولید ترکیبات فلاونوئیدی در این ریشه ها در سه محیط مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

از نمونه های یک ماهه کشت ریشه های مویین حاصل از تراریختی با اگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacteriu rhizogenes*)، قطعات ۱ تا ۲ سانتی متری بریده و جهت تکثیر به محیط های کشت مایع موراشیج و اسکوگ(MS) ، نیتچ(N) و اوهیاما نیتچ(ON) انتقال داده شد. ۳ تکرار از هر نمونه در شیکر انکوباتور در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد. برداشت نمونه ها از محیط در فواصل زمانی یک هفته ای تا پایان هفته چهارم انجام شد. نمونه ها با استفاده از فریز درایر خشک و استخراج و آنالیز فلاونولیگنان ها و مقایسه نمونه های حاصل از کشت در محیط های مختلف با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد.

نتایج و بحث

طی چهار دوره هفت روزه پس از قرار دادن نمونه های ریشه های مویین در محیط های مختلف، به منظور تعیین شاخص رشد و میزان سیلیمارین کل نمونه برداری انجام شد. نتایج نشان داده در شکل ۱ حاکی از بالاتر بودن میزان رشد در محیط MS نسبت به محیط N و ON است. بررسی تولید ترکیبات فلاولیگنانی در ریشه های مویین محیط MS هم بیانگر وجود بالاتر بودن پنج ترکیب: تاکسی فولین, سیلی کریستین, سیلی دیانین، ایزو سیلی بین و سیلیبین به ترتیب ۰/۵۸۹, ۰/۰۸۰, ۰/۰۵۷, ۰/۰۱۷ و ۰/۰۰۱ میلی گرم در گرم ماده خشک بود. عمده ترین فلاولیگنان موجود در این ریشه ها سیلیبین بود که تاکنون گزارشی در این مورد منتشر نشده است. تولید موفق این فلاولیگنان می تواند سیستم مفیدی برای تولید یا مطالعه بیوسنتز سیلیمارین باشد. بنابراین استفاده از محیط MS به دلیل کارایی بالاتر آن نسبت به دو محیط N و ON جهت کشت ریشه های مویین توصیه می گردد.



شکل ۱. تفاوت میزان رشد ریشه های موئین و مقایسه میزان سیلیمارین در محیط های موراشیج و اسکوگ(MS) ، نیتچ(N) و اوهیاما نیتچ(ON)

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی که حمایت مالی این طرح پژوهشی (شماره۸۷۰۰۱-۸۷۰۲-۰۵-۰۵-۱۲)را به عهده داشت، قدردانی می شود.

منابع

Lee D.Y. and Liu Y. (2003) Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybinB, isolated from *Silybum marianum* (milk thistle). *Journal of Natural Products*. 66:1171-1174.

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

Alikaridis F., Papadakis D., Pantelia K., Kephalas T. (2000) Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures. *Fitotrapia 71*: 379-384.

Influence of medium composition on the accumulation of flvonolignans in hairy roots of *Silybum marianum* (L.) Gaertn

Sepehrifar R. and Hasanloo T.

Abstract

The milke thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn) is presently one of the most commonly used medicinal plants worldwide and recommended to treatment of liver disorders. The active component of the plant is silymarin. Hairy roots, transformed with *Agrobacterrium rhizogenese*, have been found to be suitable for production of secondary metabolites because of their stable and high productivity in hormone-free culture

conditions. In the present work, we studied the hairy root production in milke thistle plant in three different media: MS(Murashige & Skoog), N (Nitch) and ON (Ohyama Nitch). After growth index determination, flavonolignan production was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that in MS medium were higher growth index and flavonolignan concentration in comparison to the other two media. Silybin, the major flavonolignan, is found higher in MS medium. This successful production of flavonolignans may serve as a useful system for silymarin production.
Keywords: Hairy roots, *Silybum marianum*, silymarin