بررسی تغییرات فعالیت لیپوکسی ژناز وسیلیمارین در ریشه های مویین گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) تحریک شده با عصاره مخمر

طاهره حسنلو (۱)، روشنک سپهری فر (۱) و حسن رهنما (۲)

۱- بخش فیزیولوژی و پروتئومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی, کرج، ایران، ۲- بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی, کرج، ایران.

تولید سیلیمارین در کشت ریشه های مویین گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L. Gaertn) در حضور عصاره مخمر تحریک می شود. سیلیمارین ترکیبی از فلاونولیگنان های مختلف است که از دانه های گیاه خار مریم استخراج می گردد. فعالیت آنزیم لیپوکسی ژناز که یک آنزیم مهم در مسیر اکتادکانویید در بیوسنتز جاسمونات است نیز در طی تحریک ریشه های مزبور با عصاره مخمر تحریک می شود. ریشه های مویین با استفاده از آلوده سازی قطعات جداکشت برگی با اگروباکتریوم رایزوژنز (AR15834) تولید شدند. تحریک با اضافه نمودن عصاره مخمر در غلظت های مختلف (۰، ۰/۵ ، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر) و در دوره زمانی ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت انجام شد. بالاترین مقدار سیلیمارین در حضور ۲/۵ میلی گرم در لیتر عصاره مخمر ۷۲ ساعت بعد از تحریک به دست آمد. تیمار مزبور قادر به تحریک همزمان تولید سیلیمارین و فعالیت لیپوکسی ژناز می باشد به طوریکه فعالیت لیپوکسی ژناز ٤٨ ساعت بعد از تحریک افزایش یافته و ۷۲ ساعت پس از تحریک به بیشینه فعالیت خود رسیده است. این نتایج نشان می دهد که مسیر جاسمونات در هنگام تحریک تولید سیلیمارین در حضور محرک عصاره مخمر فعال می شود.

مقدمه

از مواد موثره میوه‌های رسیده گیاه خار مریم(خانواده کاسنی) که تحت عنوان سیلی‌مارین نامیده می شوند برای معالجه بیماری‌های کبدی استفاده شده است. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه که توسط گیاهان تولید می شوند، توسط کشت‌های کالوس، سلول و یا ریشه های مویین نیز سنتز شده اند. تولید ریشه های مویین در گیاه خار مریم با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز به عنوان منبعی برای تولید ترکیب دارویی سیلیمارین مورد مطالعه قرار گرفته است (رهنما و همکاران، ۲۰۰۸). دستکاری کشت‌های گیاهی برای افزایش تولید ترکیبات موردنظر از طریق تغییرات و تحریک مسیر بیوسنتزی با به کارگیری عوامل محرک امکان پذیر است. مطالعه مسیر انتقال سیگنال با استراتژی‌های مؤثر و متفاوت که منجر به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شود ضروری است. بنابر این در این بررسی به ارزیابی اثرات عصاره مخمر (Yeast Extract) در کشت ریشه های مویین گیاه خار مریم پرداختیم و اثرات آن را بر روند رشد، میزان تولید سیلی مارین و فعالیت آنزیم لیپوکسی ژناز بررسی نمودیم.

مواد و روش ها

ریشه های مویین در گیاه خارمریم با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز (سویه*AR15834*) به روش رهنما و همکاران (۲۰۰۸) تهیه شد. ریشه ها (۳ قطعه ۱ سانتی متری) در ارلن های حاوی محیط کشت مایع MS (موراشیج و اسکوگ، ۱۹٦۲)به مدت ۲۸ روز کشت شدند. تحریک با اضافه نمودن عصاره مخمر در غلظت های مختلف (۰، ۰/۵ ، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت) و در دوره زمانی ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت(حداقل سه تکرار) انجام شد. تغییرات وزن خشک، سیلیمارین و فعالیت

لیپوکسی ژناز به ترتیب به روش حسنلو و همکاران (۲۰۰۸) و زائو و همکاران (۲۰۰۳) تعیین شد. در این مطالعه از طرح پایه فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شده است و میانگین‌ها (حداقل سه تکرار) بااستفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ مقایسه گردیدند. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری به وسیله برنامه کامپیوتری SAS (V. 6.2) تحلیل شدند.

نتایج و بحث

بالاترین مقدار سیلیمارین (۰/٤۷ میلی گرم در گرم ماده خشک) در حضور ۲/۵ میلی گرم در لیتر عصاره مخمر ۷۲ ساعت بعد از تحریک به دست آمد که حدود ۲ برابر کنترل بود. به منظور تشخیص مکانیسم مولکولی تحریک، فعالیت لیپوکسی ژناز برای نمونه ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار مزبور قادر به تحریک همزمان تولید سیلیمارین و فعالیت لیپوکسی ژناز می باشد به طوریکه فعالیت لیپوکسی ژناز ٤۸ ساعت بعد از تحریک افزایش یافته و ۷۲ ساعت پس از تحریک به بیشینه فعالیت خود رسیده و سپس فعالیت آنزیم کاهش یافته و به سطح اولیه خود می رسد. این نتایج نشان می دهد که مسیر جاسمونات در هنگام تحریک تولید سیلیمارین در حضور محرک عصاره مخمر فعال می شود.

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

Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, majidi E, Shams- Ardakani MR, Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum (L.) Gaertn. Pharmaceutical Biology*. 2008; 46: 1-6.

Murashig T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15: 473-97.

Rahnama, H., Hasanloo, T., Shams' M.R., Sepehrifar, R. Silymarin production in hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iranian J. Biotechnol*.2008; 6: 113-118.

Zhao, J., and Sakai, K. Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced ß-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J. Exp. Bot*. 2003; 54: 647- 656.

Evaluation of lipoxygenas activity and silymarin production in elicitated hairy root cultures of *Silybum marianum* L. Gaertn by yeast extract

T. Hasanloo, R. Sepehrifar, H. Rahnama

Abstract

The silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* can be stimulated by a yeast elicitor. Silymarin is a compound of the fruits of *S. marianum* with strong antihepatotoxic and hepatoprotective activities. Lipoxygenase activity, an important enzyme in the octadecanoid pathway of jasmonate biosynthesis, was also stimulated by this treatment. The hairy roots induced by inoculation of explants with *A. rhizogenes* (AR15834) and growth in the Erlenmeyer flask containing 50 ml MS liquid medium. One month old hairy roots were dissected from the explants and growth in the Erlenmeyer flask containing 50 ml MS liquid medium. The flavonolignans in the hairy roots were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Elicitation was carried out with yeast extract (0, 0.5, 1, 2.5 and 5 mg ml^{-1}) and different exposure times (24, 48, 72 and 96 h). The highest silymarin content was

obtained by 2.5 mg ml^{-1} yeast extract, after 72 h. Lipoxygenas activity was estimated for each sample. This study indicates that elicitor treatment promotes silymarin production in hairy root culture of *S. marianum* and lipoxygenase activity was rapidly activated by yeast extract after 48h and reaching an extremely high level after 72 h of treatment and then decreasing to the basal level. This suggests that the jasmonate pathway may mediate the elicitor-induced accumulation of silymarin.
Keywords: *Silybum marianum,* Elicitation, Signal transduction, Hairy root, Flavonolignans.