بکارگیری راهکارهای بیوتکنولوژیکی مانند کاربرد الیسیتور و پیش‌ماده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* (L) Gaertn.) و بررسی میزان سیلیمارین تولیدی

آسیه فیروزی (۱)، سید ابوالقاسم محمدی (۱)، محمود خسروشاهلی (۲)، علی موافقی(۲) و طاهره حسنلو (۳)

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ۲- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ۳- گروه فیزیولوژی گیاهی، موسسه بیوتکنولوژی کرج، کرج، ایران

فلاونوئیدها گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در پاسخ به سیگنال‌های محیطی یا رشدی سنتز آنها افزایش می‌یابد. سیلیمارین یک فلاونوئید پلی‌فنلی مشتق شده از ماریتیغال است. ماریتیغال (*Silybum marianum*) گیاه دارویی مهمی است که متابولیت‌های ثانویه آن تحت عنوان سیلیمارین، در درمان خوراکی بیماریهای کبدی مانند هپاتیت استفاده می شوند. با توجه به اهمیت دارویی آن، روش‌های تولید آزمایشگاهی با استفاده از کشت یاخته و بافت مورد توجه قرارگرفته‌اند. به منظور تهیه کالوس جهت کشت سوسپانسیون، ابتدا ریزنمونه‌ها (کوتیلدون و هیپوکتیل) از چهار ژنوتیپ ماریتیغال (رقم اصلاح شده مجارستان و اکوتیپ‌های فریدونکنار، پارس آباد و بهشهر) در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های هورمونی توفوردی و کینتین (۱ میلی‌گرم درلیتر) کشت شدند. وزن‌های برابر از کالوس‌های هر ریزنمونه و ژنوتیپ به ظروف حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع شامل غلظت‌های هورمونی کینتین (۰/٤ میلی‌گرم درلیتر) و پیکلورام (۳ میلی‌گرم درلیتر) منتقل و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از سه مرحله واکشت، کشت‌ها در سه تکرار در قالب طرح فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی تحت تیمارهای الیستوری عصاره مخمر(۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پیش‌ماده فنیل آلانین (۰/۱ میلی مولار) و عصاره مخمر + فنیل آلانین قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، ماده مؤثره استخراج و سیلیمارین حاصله با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. میزان سیلیمارین تولید شده در حالت کاربرد همزمان الیسیتور عصاره مخمر و پیش‌ماده فنیل آلانین در هر دو ژنوتیپ و ریزنمونه بیشتر از تیمار کنترل بود. میزان ماده مؤثره در ریزنمونه هیپوکتیل در هر دو ژنوتیپ بیشتر از ریزنمونه کوتیلدون بود. در مجموع، ژنوتیپ فریدونکنار از سیلیمارین بیشتری نسبت به ژنوتیپ پارس آباد برخوردار بود.

مقدمه

کشت بافت و تکنیک‌های وابسته به آن در گستره بیوتکنولوژی گیاهی، دارای جایگاه قابل توجهی به عنوان راهبردی مؤثر در تکثیر گیاهان ارزشمند، تولید فرآورده‌های گیاهی دارای ارزش دارویی و کشاورزی در محیط‌های کشت سلولی کنترل شده می‌باشد. ماریتیغال (*Silybum marianum*)، گیاهی دارویی است که از دیرباز در درمان بیماریهای کبدی مانند هپاتیت، سرطان کبد و طحال بسیار مؤثر بوده است. مواد مؤثره موجود در ماریتیغال تحت عنوان کلی سیلیمارین معرفی می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه معمولاً کم است و بستگی به مرحله رشدی و فیزیولوژیکی گیاه دارد (نام دئو،۲۰۰۷). کاربرد محرک‌ها و پیش‌ماده‌ها، می-تواند منجر به افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گردد. فنیل‌آلانین یک پیش‌ماده آمینو اسیدی است که برای مسیر فنیل پروپانوئیدی نیز ضروری و مورد نیاز می‌باشد. آزمایشات نشان داد که تیمار ریشه‌های‌موئین گیاه *Tropaeolum majus* توسط پیش‌ماده‌ها و محرک‌ها اثرهای معنی‌داری روی تولید گلوکوتروپائولین داشته‌اند (ویلنک و اوربنک، ۲۰۰٦). چنین استراتژی‌هایی در

مورد گیاه دارویی ماریتیغال نیز به کار گرفته شده و نتایج مطلوب و مورد انتظاری هم به دست آمده است (سانچز– سمپدرو، ۲۰۰۵).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل چهار ژنوتیپ (رقم اصلاح شده مجارستان و اکوتیپ‌های فریدونکنار، پارس آباد و بهشهر) بود. بذرهای هر رقم به صورت جداگانه به لوله‌های حاوی آب و آگار، منتقل و در انکوباتور نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها در محیط MS حاوی ٤،٢-دی و کینتین به میزان دو میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. به منظور کشت سوسپانسیون سلولی، ۱– ۰/۸ گرم از کالوس‌های مناسب، به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی پیکلورام (سه میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (۰/٤ میلی‌گرم در لیتر) منتقل و در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. روز سوم بعد از آخرین واکشت، تیمارهای الیسیتور عصاره مخمر (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، فنیل آلانین (۰/۱ میلی‌مولار) و تیمار همزمان عصاره مخمر+ فنیل آلانین اعمال گردیدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت سیلیمارین آنها استخراج و به منظور تعیین کمی ترکیبات سیلیمارین از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) استفاده شد. آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام و نمودارها با نرم‌افزار EXCEL رسم شدند.

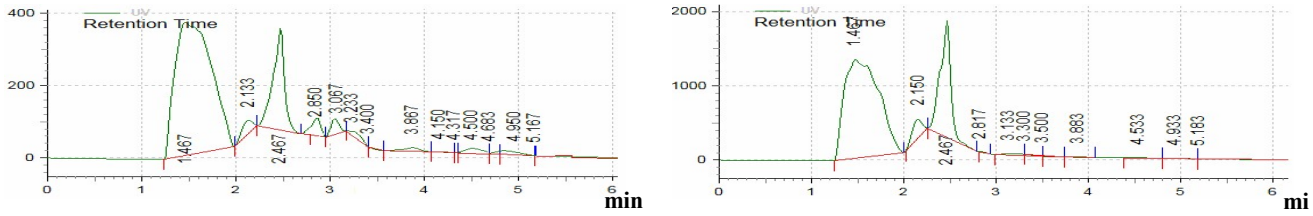
نتایج و بحث

سنجش کشت‌های سوسپانسیون نشان داد که میزان سیلیمارین در تیمار همزمان عصاره مخمر+ فنیل آلانین بیشتر از تیمار به تنهایی عصاره مخمر یا فنیل آلانین بود. نتایج فوق در هر چهار ژنوتیپ مورد بررسی و هر دو ریزنمونه مشاهده گردید. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از HPLC نشان داد (جدول۱) که اثر تیمار و اثر متقابل سه جانبه ریزنمونه در تیمار در ژنوتیپ، بر میزان تاکسی فولین تولیدی به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بودند تولید این جزء در کشت‌های سوسپانسیون ریزنمونه هیپوکتیل در دو ژنوتیپ در تیمار عصاره مخمر+ فنیل آلانین به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمار کنترل بود. میزان سیلی کریستین تولیدی بطور معنی‌دار تحت تاثیر تیمار محرک بود. تیمار تنها منبع تغییر تاثیرگذار بر میزان سیلی‌دیانین تولیدی بود. کلیه عوامل مورد بررسی و اثر متقابل آنها تاثیر معنی‌دار بر تولید سیلی‌بین داشتند. تولید سیلی‌بین و ایزوسیلی بین در کلیه ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها در حضور تیمار عصاره مخمر+ فنیل‌آلانین بیشترین میزان خود را داشت. کاربرد باهم فنیل‌آلانین و عصاره مخمر موجب افزایش در تولید سیلیمارین به میزان ۷ برابری در کشت‌های سلولی ریزنمونه هیپوکتیل فریدونکنار نسبت به حالت کنترل شد، درحالیکه کاربرد فنیل‌آلانین به تنهایی باعث افزایش تقریباً ۵ برابری سیلیمارین تولیدی در در همین کشت‌های سلولی شد. کروماتوگرام های مربوط به HPLC اثر مثبت فنیل‌آلانین و عصاره مخمر در آنها به وضوح نشان دادند (شکل۱). میزان سیلیمارین در ریزنمونه هیپوکتیل بیشتر از ریزنمونه کوتیلدون بود و ژنوتیپ فریدونکنار سیلیمارین بیشتری را نسبت به سه ژنوتیپ دیگر تولید کرد. ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های متابولیسم فنیل پروپانوئیدی به صورت هم‌پایه و پشت سرهم توسط محرک‌هایی مانند جاسمونات‌ها فعال می‌شوند (الارد– ایوی و دوگلاس، ۱۹۹٦). بنابراین می‌توان با کاربرد چنین راهکارهای بیوتکنولوژیک میزان تولید مواد مؤثره را در گیاهان دارویی افزایش داد و در هزینه های بسیاری صرفه‌جویی به عمل آورد.

جدول (۱): تجزیه واریانس اثر عوامل مورد مطالعه بر هر یک از پنج جزء سیلیمارین در کشت‌های سوسپانسیون

		میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	تاکسی فولین	سیلی کریستین	سیلی دیانین	سیلی بین	ایزوسیلی بین
تکرار	۲	۰/۸٤٥ ns	۱/۸۹٥ ns	۱٤/۱۲۸ ns	۳/۰۳٥ **	۰/٥۸۷ ns
ژنوتیپ	۳	۱/۱۲٤ ns	۰/٤۱٥ ns	۸/۳۲٥ ns	۱۰/۲٥۸ **	٥/٦٤۱ **
ریزنمونه	۱	۰/٥٤۸ ns	۱/۹۹٤ ns	۰/۳٥۸ ns	۷٦/٦۸۹ **	۰/۳٦۲ ns
ژنوتیپ × ریزنمونه	۳	۱/٥۱۸ ns	۱/۲٥٥ ns	۱۸/۲۳۷ ns	۲۳/۳٦٥ **	۰/۸۲۸ ns
تیمار	۳	٤/۳۲٥ **	٤/٥۷۸ **	۳۸/٦۳۲ **	٤۲/۳۲٥ **	۹/٤٥۸ **
ژنوتیپ × تیمار	۹	۰/۲٥۸ ns	۰/۷۲٦ ns	۱۳/۳٦۹ ns	۹/۸٥۲ **	۱/۲٤٥ **
ریر ریزنمونه × تیمار	۳	۰/۲٤٤ ns	۰/۹۱٦۸ ns	٤/٤٥۸ ns	٦/۰۳۹ **	۰/٦۳٥ ns
ریزنمونه×ژنوتیپ×تیمار	۹	۲/۲۳٥ *	۰/۷٥٤ ns	٥/۷۸۹ ns	۱/٦۸٤ **	۳/۲٥۱ **
خطای آزمایشی	۷۲	۰/۸٦٥	۱/٤٥۷	٦/٤٥۷	۰/٥۸۷٥	۰/۷٤۱
ضریب تغییرات (٪)	–	۲۳/٤۸ ٪	۱۸/۳۹ ٪	۲۲/٦٥ ٪	۷/۸۱ ٪	۱۷/۲٥ ٪

** = معنی داری در سطح احتمال ۱ ٪ * = معنی داری در سطح احتمال ۵ ٪ ns = غیر معنی دار



شکل (۱): نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیون گیاه ماریتیغال

شکل سمت راست مربوط به سیلیمارین استخراج شده در حضور عصاره مخمر+ فنیل‌آلانین و شکل سمت چپ مربوط به سیلیمارین تولیدی در حالت کنترل می‌باشد. اعداد روی نمودارها نشان‌دهنده زمان ظهور پیک‌های مربوطه هستند. فلش‌های ۱ تا ۵ به ترتیب نشان دهنده پیک‌های تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزو سیلی‌بین می‌باشند.

منابع

1- Ellard-Ivey, M., and Douglas, C.J. (1996). Role of jasmonates in the elicitor- and wound- inducible expression of defense genes in parsley and transgenic Tobacco, Plant Physiol., 112: 183- 192

2- Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Rev., 1: 69- 79.
3- Sanchez-Sampedro, M.A., Fernandez-Tarrago, J. and Corchete, P. (2005). Yeast extract and methyl jasmonate- induced silymarin production in cell cultures of *silybum marianum* (L.) Gaertn. J. Biotech., 119: 60-69.
4- Wielank, M. and Urbank, H. (2006). Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86: 177- 186.

Apply of biotechnological strategies such as elicitors and feeding with precursor in suspension cell cultures of milk thistle (*Silybum marianum*) and investigation of silymarin production

Firouzi, S.A. Mohammadi, M. Khosroshahli, A. Movafeghi ,T. Hasanloo

Abstract

Flavonoids are the important group of secondary metabolites that synthesized in response to developmental and environmental signals and perform many functions in plants. Silymarin is a polyphenolic flavonoid derived from milk thistle. Milk thistle (*Silybum marianum*) is one of the important medicinal plants and its secondary metabolites known as silymarin that is used for oral treatment of toxic liver damage. Tissue and cell cultures are important *in vitro* techniques for industrial production of these metabolites. In order to obtain calli for suspension culture, the explants (cotyledon and hypocotyls) from four genotypes (Budakalaszi, Fereydun'Kenar, Pars Abad and Behshahr cultivars) were cultured in MS medium supplemented with "2, 4-D (1 mg/l) and Kinetin (1 mg/l)". Calli were subcultured four times in MS medium with Kinetin (0.4 mg/l) and Picloram (3 mg/l) and were used for suspension culture. Equal weights of calli from each explants of each genotype transferred to erlenmeyers contained 50 ml MS medium culture (without agar) with growth regulated Picloram (3 mg/l) and Kinetin (0.4 mg/l) and subcultured every 2 weeks. After 3 times of subculture, suspension cultures were treated with precursor (phenylalanine) and elicitor (yeast extract), combinations of these elicitors and control) using a factorial experiment based on randomized complete block design with 3 replications. After 72 hours, the flavonoid components of cultured were extracted with methanol and determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and separated into 5 components (Taxifolin, Silydianin, Silychristin, Silybin and Isosilybin). Analysis of variance revealed the significant effect of elicitor treatments on all components of silymarin. The effect of phenylalanine on production of silymarin in all cultures was higher compared with yeast extract. Amount of silymarin was higher in hypocotyls explants than cotyledon explants in the four genotypes. In total, Fereydun'Kenar and Behshahr genotypes produced high and low levels of silymarin, respectively.

Key words: Milk thistle, Silymarin, Suspension culture, Elicitor, Feeding precursor, HPLC