القاء ریشه‌زایی به منظور تولید سیلیمارین در گیاه خارمریم در شرایط کشت بافت

سحر ایری، مهناز اقدسی* و منیژه میان آبادی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۹).

چکیده:

خارمریم گیاهی دولپه از خانواده آفتاب‌گردان است که در صنایع داروسازی اهمیت فراوان دارد. ماده مؤثره این گیاه سیلیمارین نام دارد که ترکیبی از انواع فلاونولیگنان‌ها است. هدف از تحقیق حاضر القا نوپدیدی ریشه در قطعات جداکشت ساقه به عنوان منبع مناسب تولید سیلیمارین است. به این منظور قطعات ساقه جوان در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۳۶ غلظت متفاوت از ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA) و نفتالن استیک اسید(NAA) کشت داده شدند. نتایج نشان داد که بالاترین طول ریشه و بالاترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA دیده می‌شود. سپس ریشه‌های تولید شده به محیط کشت مایع انتقال داده شد و پس از تولید ریشه‌های بیشتر تحت تیمارهای مختلف حجم محیط کشت، نور و تاریکی و pHهای مختلف کشت شدند. بررسی اثر فاکتور حجم محیط کشت بر روی رشد ریشه و تولید سیلیمارین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نتایج نشان داد که نور باعث افزایش رشد و نیز میزان سیلیمارین در ریشه‌ها شده است. همچنین تولید سیلیمارین در ریشه کشت شده در محیط کشت مایع نشان داد که pH بهینه در تولید سیلیمارین ۷ است.

کلمات کلیدی: خارمریم، سیلیمارین، کشت ریشه، فلاونولیگنان، محیط کشت مایع

مقدمه:

خارمریم (*Silybum marianum* (L) Geartn) گیاهی دولپه، یک‌ساله یا دوساله، علفی از خانواده آفتاب‌گردان است. اهمیت دارویی این گیاه به علت حضور نوعی فلاونولیگنان با نام سیلیمارین است. ترکیبات مؤثره این گیاه گروهی از فلاونولیگنان‌ها شامل سیلیبین، ایزوسیلیبین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و تاکسی‌فولین بوده که مجموعاً به عنوان سیلیمارین شناخته می‌شوند. ترکیب اصلی سیلیمارین سیلیبین بوده که بیشتر خواص دارویی سیلیمارین وابسته به حضور این ترکیب است (Cacho *et al.,* 1999). از سیلیمارین خواص دارویی متعددی نظیر درمان انواع بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت، چربی خون، بیماری های کبدی (زردی، سیروز و آماس کبدی)، بیماری‌های کیسه صفرا، افسردگی، رفع مسمومیت ناشی از قارچ آمانیتا، مهار سرطان پروستات گزارش شده است (Wenkataramanan, 2000; Demark *et al.*, 2004 Osuchoweski *et al.,* 2004).

به طور معمول سیلیمارین از بذر گیاه استخراج می‌شود. عصاره دانه خشک گیاه ۱ الی ۴ درصد سیلیمارین دارد (Cacho *et al.,* 1996). اما با توجه به تقاضای روز افزون

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.aghdasi@gu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

این ماده در سطح جهانی، نیاز به روش‌های جدید برای تولید این ماده ارزشمند دارویی احساس می‌شود. در حال حاضر تلاش‌هایی در زمینه تولید سیلیمارین به روش کشت سلول و بافت در حال انجام است (Khan *et al*., 2009). استفاده از تکنیک کشت سلول گیاه خارمریم برای تولید سیلیمارین نیز گزارش شده است (Abbasi *et al*., 2010). اما میزان سیلیمارین تولید شده به طریق کشت سلول پایین‌تر از سیلیمارین موجود در دانه های این گیاه بوده است. افزودن کونیفریل الکل به عنوان پیش‌ساز سیلیمارین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم نشان داده که میزان سیلی‌دیانین به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته اما سایر ترکیبات سازنده سیلیمارین تغییر نمی‌یابد (Tumova *et al*., 2006). به علاوه نشان داده شده که متیل جاسمونات، تولید سیلیمارین را در کشت سلول خارمریم تیمار شده با β- سیکلو دکسترین افزایش می‌دهد (Belchi-Navarrow *et al.,* 2010). اصغری و همکاران (۱۳۸۶) با مطاله اثر قندهای فروکتوز، گلوکز و ساکارز بر تولید سیلیمارین در کشت کالوس گیاه خارمریم نشان دادند که بیشترین میزان سیلیمارین در کالوس‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۶ درصد قند دیده شده می شود. نتایج مطالعات آرخی و همکاران (۱۳۹۱) بر کال‌زایی قطعات جداکشت ریشه، برگ و دمبرگ با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و Kin نشان داد که بالاترین درصد کال‌زایی و بیشترین درصد فلاونولیگنان (۱۴/۴۴٪) از کالوس حاصل از قطعه جداکشت ریشه در محیط کشت حاوی ۱و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin دیده می‌شود. محققان دیگر نیز استفاده از ریشه‌های مویین را در تولید سیلیمارین گیاه خارمریم پیشنهاد کرده‌اند. تولید سیلیمارین در ریشه‌های موئین تولید شده با تیمار آگروباکتریوم ۰/۱۱ درصد گزارش شده است (Rahnema *et al.,* 2008). همچنین گزارش شده است که چنانچه ریشه‌های مویین با عصاره مخمر تیمار شود می‌توان تولید سیلیمارین را تا ۲ برابر افزایش داد (Hassanloo *et al.,* 2009). گزارشات دیگری نیز نشان داده که افزودن یون نقره به محیط کشت ریشه موئین گیاه خارمریم تولید سیلیمارین را تا ۰/۱۲ درصد افزایش می‌دهد (Khalili *et al*., 2010).

با توجه به آن که نتایج اولیه ما بر روی کشت بافت گیاه خارمریم نشان داده که کالوس حاصل از قطعه جداکشت ریشه توان بالایی در تولید سیلیمارین دارد (آرخی و همکاران، ۱۳۹۱)، در این تحقیق سعی شده تا شرایط بهینه برای تولید ریشه‌های نوپدید و تولید سیلیمارین در شرایط کشت بافت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

تهیه گیاهچه استریل: بذرهای خارمریم پس از جمع‌آوری از منطقه گرگان و پس از شناسایی و تایید آن در هرباریوم دانشگاه گلستان ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در جریان آب شهر قرارگرفتند. در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس در آب‌ژاول ۳۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس بذرها ۵ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شستشو شدند. بذور استریل شده در محیط کشت پایه MS حاوی ساکارز (۳٪) و آگار (۱٪) با pH=5.8 کشت شدند (Murashige and Skoog, 1962). شرایط اتاق کشت با دمای۲۵ ±۲°C و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه‌زنی و رشد بعدی در نظر گرفته شد. برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه استریل از شیشه‌های کوچک با طول ۱۵ سانتی‌متر که هریک حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS بود استفاده شد. در هر شیشه ۶ عدد بذر استریل کشت گردید.

شرایط کشت: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل هورمون IBA و NAA و سطوح هورمونی ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. شرایط اتاقک کشت برای تحریک ریشه‌زایی از نظر تناوب نوری، شدت نور و دما نسبت به شرایط تولید گیاهچه استریل تغییری نداشت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

برای هر تیمار هورمونی ۵ پتری‌دیش حاوی محیط کشت و در هر ظرف ۵ قطعه جداکشت قرار داده شد.

القا ریشه‌زایی: به منظور تعیین غلظت مناسب جهت ریشه‌زایی ابتدا قطعات هیپوکوتیل از گیاهچه استریل جدا و برش داده شدند و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت NAA و IBA به عنوان دو اکسین مؤثر در ریشه‌زایی کشت داده شدند. پس از ۳ هفته ظهور ریشه‌ها از قطعات جداکشت در تیمارها قابل مشاهده بود و با گذشت زمان بر تعداد و اندازه ریشه‌ها افزوده شد. در این آزمایش اندازه‌گیری طول ریشه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J صورت گرفت. پس از تعیین بهترین تیمار هورمونی برای تحریک ریشه‌زایی، ریشه‌های تولید شده به محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. به منظور افزایش میزان سیلیمارین، ریشه‌های تولید شده پس از رشد کافی تحت تیمارهای مختلف میزان محیط کشت، نور، تاریکی و فاکتور pH محیط قرار داده شدند.

تیمار حجم محیط کشت مایع MS: در این تیمار ریشه با وزن اولیه ۰/۰۵ گرم در شیشه‌هایی با مقادیر مختلف (۳، ۶، ۹ میلی‌لیتر) محیط کشت MS انتقال یافتند.

اثر فاکتورpH محیط کشت مایع MS: در این مرحله ریشه‌ها با وزن اولیه ۰/۰۵ گرم در شیشه‌هایی با حجم ۳ میلی‌لیتر محیط MS مایع و با pHهای مختلف (۳، ۴، ۵/۷، ۷ و ۸) کشت شدند.

اثر شرایط نور و تاریکی: در این تیمار ریشه‌ها با وزن اولیه ۰/۰۵ گرم در ظروف حاوی مقدار ۳ میلی‌لیتر محیط مایع MS در دو شرایط نور (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) و تاریکی قرار گرفتند

اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه: وزن تر ریشه‌های هر ظرف با ترازو وزن و یادداشت شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، ریشه‌ها در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک شدند.

سنجش درصد سیلیمارین: به منظور سنجش درصد سیلیمارین، نمونه‌ها با اتیل استات با حجم ۳ برابر نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت چربی‌زدایی و سپس سانتریفیوژ شدند. سپس به رسوب حاصله ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت عصاره‌گیری انجام شد. پس از صاف کردن، محلول متانولی توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا ۱ میلی‌لیتر تغلیظ شد. عصاره به دست آمده در ۲ میلی‌لیتر متانول حل شده و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۲ میلی‌لیتر محلول ۲و۴- دی نیترو فنیل هیدرازین سولفوریک اسید اضافه و به مدت ۵۰ دقیقه بر روی بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس حجم محلول به دست آمده با پتاس متانولی ده درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک میلی‌لیتر از محلول به دست آمده با ۲۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط و سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و پس از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر متانول دوباره سانتریفیوژ شد. در نهایت محتویات بالن بامتانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اساس این روش شدت جذب محلول ۱ درصد سیلیمارین در سل کوارتز ۱ سانتی‌متری ($A_1\%$ 1cm=537) است. محاسبه‌ی درصد سیلیمارین طبق رابطه ۲-۱ به دست می‌آید:

$$\text{درصد سیلیمارین} = \frac{A \times ۱۰ \times ۵۰ \times ۵۰ \times ۱۰۰}{A_1\%\ 1\,cm \times ۱۰۰ \times M}$$

در این رابطه، A برابر میزان جذب محلول نمونه و M عبارت از وزن نمونه گیاهی می‌باشد (قاسمی و طالب، ۱۳۸۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده از lsmeans، آزمون دانکن ۱ در سطح احتمال ۵٪ به وسیله نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها و جداول توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

شکل ۱- الف) گیاهچه استریل، ب) تولید ریشه در قطعات جداکشت ساقه در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAAو IBA ج) تشکیل ریشه و جوانه در قطعه جدا کشت ساقه جوان خارمریم در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.

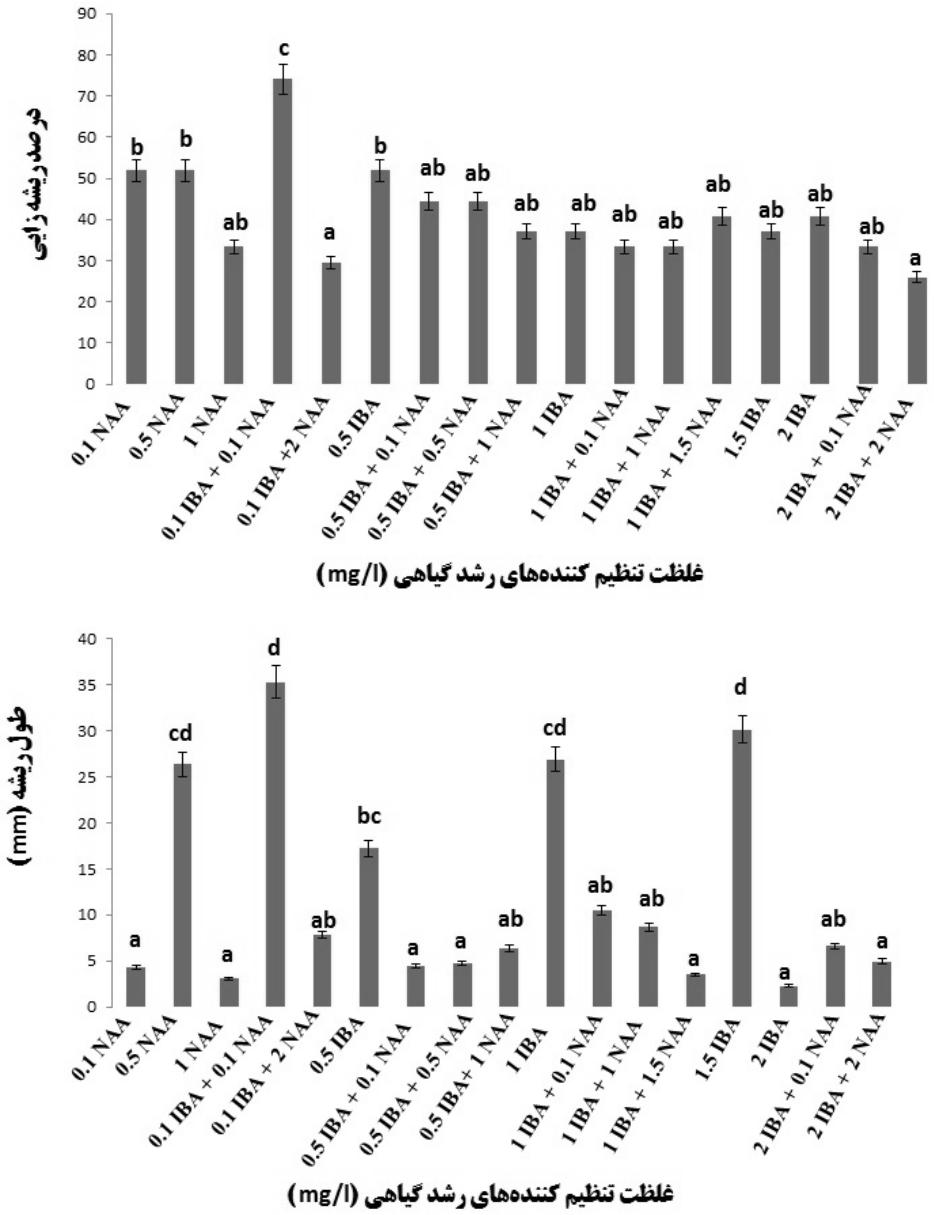
نتایج:

ریشه‌زایی از قطعات جداکشت ساقه: قطعات جداکشت ساقه‌های جوان از گیاهچه استریل حاصل از بذرها تهیه و به منظور القا ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۳۶ غلظت مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و NAA کشت داده شدند. پس از گذشت یک ماه درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های تولید شده محاسبه و آنالیز آماری لازم انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که از بین ۳۶ تیمار مختلف تنها در ۱۷ تیمار ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۱ و ۲) و در بقیه تیمارها ریشه‌زایی صورت نگرفت. این نتایج نشان داد که بیشترین طول ریشه (۳۵/۲۳ میلی‌متر) مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و IBA است. از طرفی دیگر طول ریشه در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (۳۰/۱۳ میلی‌متر) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA وNAA (۳۵/۲۳ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر IBA علاوه بر ریشه‌زایی، تولید جوانه نیز مشاهده شد (شکل ۱). بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۴٪) نیز در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA مشاهده شد. در بیشتر تیمارها تفاوت معنی‌داری از حیث درصد ریشه‌زایی مشاهده نشد (شکل ۲- ب).

اثر حجم محیط کشت بر وزن تر، خشک و میزان سیلیمارین: به منظور تعیین حجم بهینه محیط کشت مایع، ریشه‌ها با وزن اولیه ۰/۰۵ گرم در ظروفی که حاوی ۳ ، ۶ و ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS بود در اتاق کشت با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که میانگین وزن تر ریشه در محیط کشت مایع MS با حجم ۳، ۶ و ۹ میلی‌لیتر پس از گذشت ۲۱ روز به ترتیب۰/۲۷، ۰/۲۵ و ۰/۲۶ گرم بود که نشان‌دهنده افزایش وزن ریشه‌ها در محیط کشت است. اما تفاوت معنی‌داری در وزن تر ریشه‌ها در تیمارهای مختلف مشاهده نمی‌شود (شکل ۳- الف). بررسی میانگین وزن خشک ریشه‌ها در محیط کشت مایع MS با حجم ۳، ۶ و ۹ میلی‌لیتر نیز نشان داده که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (شکل ۳- ب).

در این آزمایش ابتدا درصد سیلیمارین در قطعات جداکشت ریشه حاصل از گیاهچه‌های استریل قبل از انتقال به محیط کشت مایع مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد سیلیمارین در این قطعات ۰/۲۴ درصد بود. میانگین درصد سیلیمارین در ریشه‌های تولید شده در محیط کشت مایع MS با حجم ۳، ۶ و ۹ میلی‌لیتر به ترتیب ۳/۲۵٪، ۳/۲۷٪ و ۳/۵۲٪ است. علی‌رغم این که میانگین درصد سیلیمارین در محیط کشت با حجم ۹ میلی‌لیتر بیشترین درصد را دارد اما نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (شکل ۳- ج). این نتایج نشان می‌دهد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]



ب)

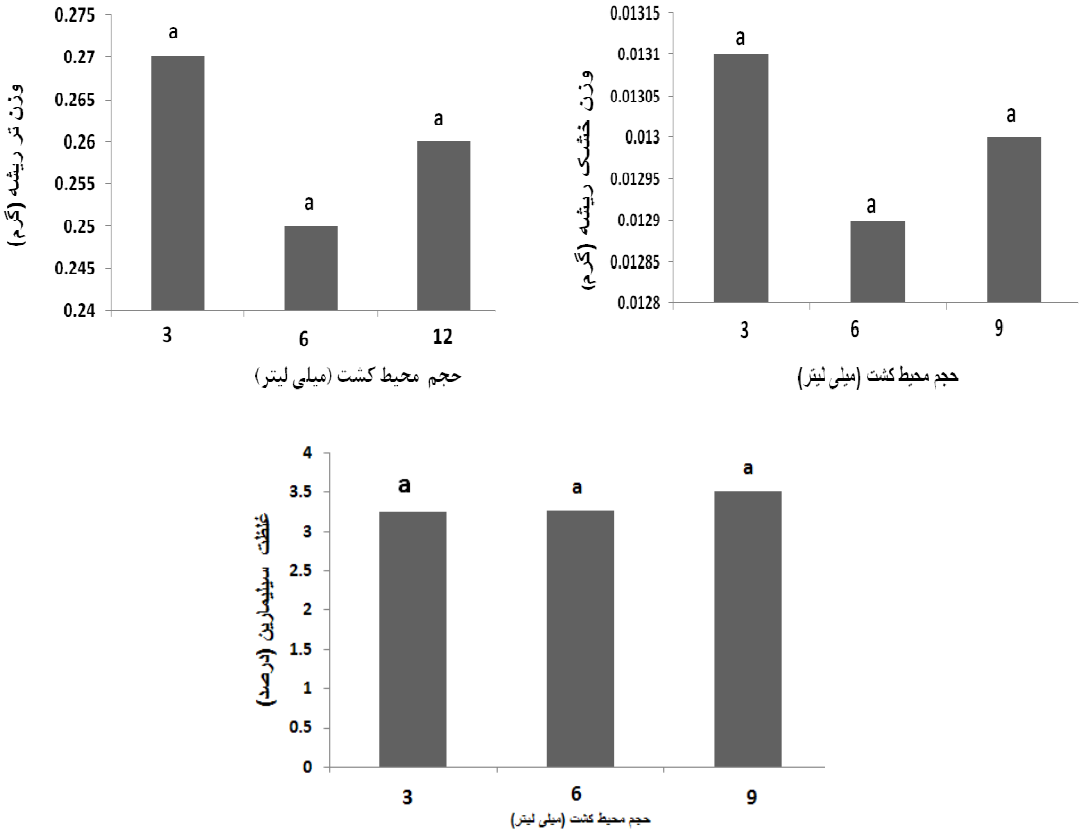
شکل ۲- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت IBA و NAA بر الف) طول ریشه و ب) درصد ریشه‌زایی قطعات جداکشت ساقه گیاه خارمریم. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده ها± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

که ریشه‌های تولید شده در محیط کشت مایع از توان خوبی در تولید سیلیمارین برخوردار می‌باشند.

تیمار نور و تاریکی: با توجه به آن که اثر حجم محیط کشت مایع بر میزان سیلیمارین تولید شده در ریشه‌های نوپدید تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، در ادامه اثر فاکتور نور و تاریکی تنها در حجم محیط کشت ۳ میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان داد که میانگین وزن تر ریشه در شرایط نور و تاریکی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]



شکل ۳- اثر حجم محیط کشت مایع بر الف) وزن تر، ب) وزن خشک و ج) درصد سیلیمارین در ریشه‌های تولید شده. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

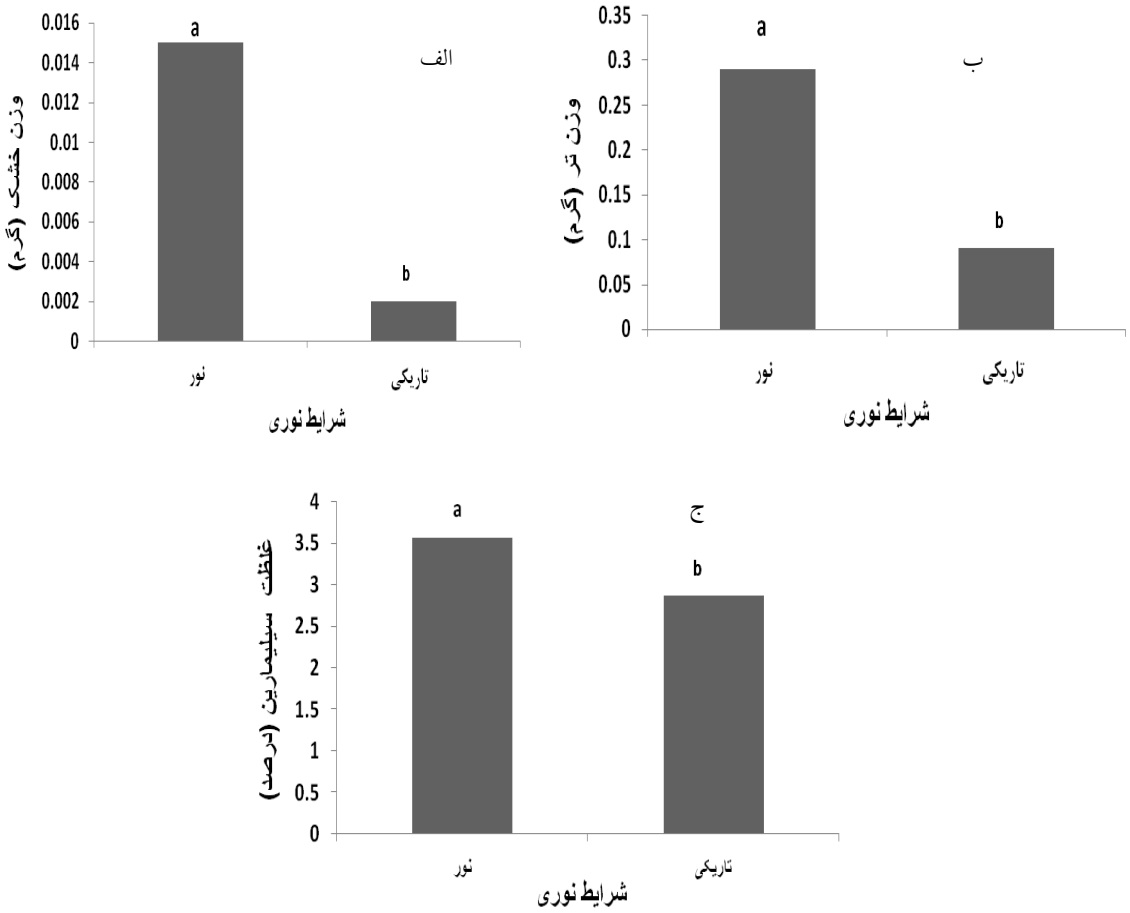
به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۰۹ گرم می‌باشد (شکل ۴- الف). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف بین وزن تر ریشه‌ها در دو شرایط نور و تاریکی معنی‌دار است. میانگین وزن خشک ریشه در شرایط نور و تاریکی به ترتیب ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۲ گرم می‌باشد (شکل ۴- ب) که با توجه به نتایج آنالیز واریانس اختلاف بین وزن خشک ریشه‌ها در دو شرایط نور و تاریکی نیز معنی‌دار است (شکل ۴- ب).

بررسی درصد سیلیمارین در دو تیمار نور و تاریکی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار وجود داشته و میانگین درصد سیلیمارین تولید شده در نور بیشتر از تاریکی است (شکل ۴- ج)

اثر فاکتور pH محیط کشت: با توجه به نتایج به‌دست آمده، میانگین وزن تر ریشه‌های کشت شده در محیط کشت با pH های ۳ ، ۴، ۵/۷، ۷ و ۸ به ترتیب ۰/۱۶۳۳، ۰/۱۶۰۰، ۰/۱۶۳۳، ۰/۱۶۶۷ و ۰/۱۶۳۳ گرم است که با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس تفاوت معنی‌داری بین آنها دیده نشد (شکل ۵- الف). همچنین میانگین وزن خشک ریشه‌ها در محیط MS دارای pHهای ۳، ۴، ۵/۷، ۷ و ۸ به ترتیب ۰/۰۰۱۵، ۰/۰۰۱۴، ۰/۰۰۱۵، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۱۴ می‌باشد. آنالیز واریانس میانگین وزن خشک ریشه‌ها نیزتفاوت معنی‌داری را بین آنها نشان نداد (شکل ۵- ب).

میانگین درصد سیلیمارین در محیط کشت MS مایع با pH محیط ۳، ۴، ۵/۷، ۷ و ۸ به ترتیب ۲/۴۲٪، ۲/۴۳٪، ۳/۵۶٪، ۴/۳۳٪ و ۲/۹۸٪ بوده است. بالاترین درصد سیلیمارین ریشه‌های کشت شده در محیط کشت با pH= ۷ دیده شد که تفاوت معنی‌داری را نسبت به سایر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]



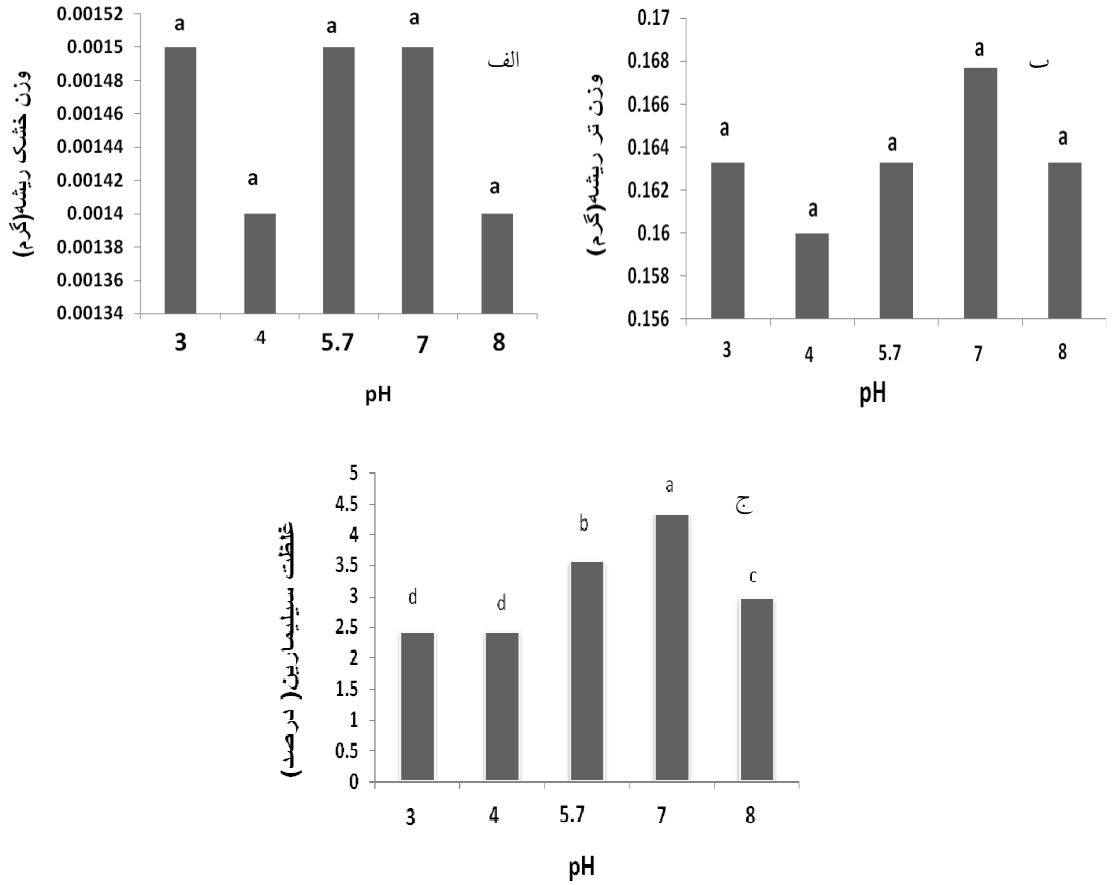
شکل ۴- مقایسه اثر تیمار نور و تاریکی بر الف) وزن خشک، ب) وزن تر و ج) درصد سیلیمارین ریشه‌های تولید شده در محیط کشت مایع. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

pH های مورد بررسی نشان داد (شکل ۵- ج).

بحث:

توسعه روش‌های زیست‌فناوری مانند ریزازدیادی، کشت سلول، ریشه و ریشه‌های مویین یکی از مهم‌ترین شیوه‌های جایگزین تولید محصولات دارویی با ارزش گیاهی است. در این راستا توسعه سیستم‌های سریع کشت و تکثیر ریشه فرصتی بی‌نظیر برای تولید محصولات مختلف متابولیت ثانویه در آزمایشگاه و بدون نیاز به زمین‌های قابل‌کشت خواهد بود (Nandagopal and Ranjitha Kumari، 2007). مزیت استفاده از کشت ریشه این است که سریعاً رشد کرده، آماده‌سازی و حفاظت آن‌ها نسبتاً ساده بوده، تغییرپذیری اندکی داشته و می‌تواند به سادگی برای تولید ذخایر گسترده بافت‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند (Stribling, 1983). در این پژوهش نوپدیدی ریشه گیاه خارمریم از قطعه جداکشت ساقه جوان و بهینه‌سازی آن تحت فاکتورهای مختلف حجم محیط کشت مایع MS، pH و اثر نور و تاریکی در شرایط در شیشه (*in vitro*) تاکنون تلاش‌های فراوانی در زمینه تولید فلاونولیگنان دارویی سیلیمارین در شرایط کشت بافت صورت گرفته است که در برخی از این گزارشات از ریشه به عنوان منبع مهم تولید سیلیمارین یاد شده است. نتایج تحقیقات آرخی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]



شکل ۵- مقایسه اثر pHهای مختلف محیط کشت مایع MS بر الف) وزن خشک، ب) وزن تر و ج) درصد سیلیمارین ریشه‌های در تولید شده در محیط کشت مایع. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

و همکاران (۱۳۹۱) نشان داده که کالوس حاصل از قطعه جداکشت ریشه در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin منبع مناسبی برای تولید سیلمارین (۱۴/۳۸٪) در گیاه خارمریم است. در این تحقیق نیز تولید ریشه در ۳۶ تیمار مختلف هورمونی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد که شرایط بهینه برای ریشه‌زایی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA و NAA است. بیشترین طول ریشه و درصد ریشه‌زایی در این تیمار به ترتیب ۳۵/۲۳ میلی‌متر و ۷۴/۰۷٪ می‌باشد.

نتایج مربوط به اثر فاکتور حجم محیط کشت بر تولید سیلیمارین نشان داد که بیشترین درصد سیلیمارین (۳/۵۲٪) در محیط کشت با حجم ۹ میلی‌لیتر بوده است. اما تفاوت معنی‌داری در این خصوص دیده نمی‌شود (P>۰/۰۵). نتایج به دست آمده از تأثیر فاکتور pH بر رشد ریشه نشان داد که pH اسیدی محیط تأثیر چندانی بر طویل شدن ریشه‌ها ندارد. بر طبق فرضیه‌ی رشد اسیدی، تنظیم انبساط سلول‌ها از طریق اصلاح pH پیرامون دیواره سلولی صورت می‌گیرد. درنتیجه انبساط‌یافتگی سلول‌ها تحت pHهای پایین افزایش می‌یابد (Cosgrove, 1999). شواهد فراوانی این فرضیه را در خصوص کلئوپتیل‌های ساقه یا انبساط برگ‌ها تائید می‌کند (Kotake *et al.*, 2000). با این وجود نتایج فوق در خصوص ریشه گیاهان چندان قطعی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

نیست. گزارشات مختلف نتایج متفاوتی را در خصوص اثر pH بر طویل شدن ریشه‌ها نشان داده اند (Edwards and Scott, 1974; Evans, 1976). بررسی اثر pH (با گستره‌های ۴، ۵، ۵/۸، ۶ و ۷) بر روی القا نوپدیدی ریشه‌ها در قطعه جداکشت برگی گیاه اورتوسینون استامینوس نشان داد که pH بهینه برای رشد ریشه ۶/۵ است). این امر نشان می‌دهد pH بهینه در گیاهان مختلف متفاوت است. نتایج حاصل از تأثیر pH محیط کشت مایع MS بر تولید سیلیمارین نشان داد که تولید سیلیمارین در ریشه‌های کشت شده در pH =۷ نسبت به ریشه‌های کشت شده در سایر pHها بیشتر بود و به لحاظ آماری اختلاف میانگین موجود در درصد سیلیمارین ریشه‌های کشت شده در محیط کشت MS مایع با pH =۷ با سایر pHها معنی‌دار است. نتایج مطالعات اصغری و همکاران (۱۳۸۱) نشان داد که میزان فلاونولیگنان تولید شده در کالوس گیاه خارمریم در محیط کشت با pH=۷ بیشتر از کالوس‌های کشت شده در pH=۵/۶ و pH=۹ بوده است که نتایج مطالعه‌ی حاضر از نتایج فوق تبعیت می‌کند. در خصوص تأثیر فاکتور pH بر تولید متابولیت‌های ثانویه نظریات متفاوتی وجود دارد که به نظر می‌رسد بسته به گیاه و نوع ترکیب متابولیت ثانویه متفاوت است. برای مثال بالاترین مقدار ژنیپوزیدیک اسید (Geniposidic acid) و پیورسینول دی گلوکوزید (Pinoresinol diglucoside) در ریشه‌های کشت شده گیاه *Eucommia Ulmoides* در pH=۴ بوده در حالی‌که بالاترین مقدار کلروژنیک اسید (chlorogenic acid) در pH=۷ به دست آمده است (Xiaojun, 2007).

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میانگین وزن تر ریشه‌های تولید شده در نور نسبت به شرایط تاریکی بیشتر است. فاکتور نور در رشد و نمو و تولید محصول در گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. البته رشد ریشه‌های گیاهان مختلف تحت شرایط نور و تاریکی متفاوت است. برای نمونه در گیاه برنج، رشد ریشه‌ها در تاریکی بیشتر از رشد آن‌ها در شرایط نوری است (Kwan-Long and China-Ri, 1975).یکی از عوامل مهم در رشد طول دوره‌ی نوری (فتوپریودیسم) می‌باشد که در این مطالعه اثر آن بر روی رشد ریشه‌ها بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان وزن خشک و تر ریشه‌های گیاه خارمریم مربوط به شرایط نوری است. در نتیجه شرایط نوری باعث افزایش زیتوده محصول و ماده‌سازی در ریشه‌های گیاه خارمریم می‌شود. نتایج حاصل از سنجش درصد سیلیمارین نیز نشان داد که میانگین درصد سیلیمارین در شرایط نور، نسبت به شرایط تاریکی بیشتر است. در بررسی حاضر تولید سیلیمارین تحت شرایط نوری افزایش پیدا کرده است و در قیاس با شرایط تاریکی تفاوت معنی‌داری را دارد. نور عامل مهمی در تحریک شروع سنتز فلاونوئیدها است زیرا سوخت و ساز نیتروژن و کربوهیدرات‌ها سبب تشکیل رنگ (فلاونوئیدها) در گیاهان می‌شود. نور مهم‌ترین عامل خارجی کنترل سنتز فلاونوئیدها است. به عنوان مثال نشان داده شده که در میوه سیب، توت‌فرنگی و بسیاری از گل‌ها نور سبب سنتز فلاونوئید می‌شود (Bruneton, 1995).

به طور کلی بالاترین درصد سیلیمارین تولید شده در ریشه‌های تشکیل شده در محیط کشت مایع (۴/۳۳٪) بوده که نسبت به ریشه گیاهچه استریل (۰/۲۴ ٪) رقم بسیار بالاتری بوده و قابل مقایسه با دیگر گزارشات منتشر شده است. در حالی که میزان سیلیمارین تولید شده در ریشه های مویین القا شده با اگروباکتریوم رایزوژنز پایین‌تر از میوه‌های این گیاه گزارش شده است (Rahnema *et al.,* 2008). همچنین گزارشات دیگر نشان داده که تولید سیلیمارین در کشت سلول این گیاه نزدیک به ۱/۵٪ بوده که نسبت به گزارش حاضر درصد پایین‌تری است (Cacho *et al.*, 1999). اما تولید سیلیمارین در جوانه‌های نوپدید القا شده در شرایط در شیشه که با اشعه گاما تیمار شده‌اند ۶/۵۹۸٪ گزارش شده است (El Sherif *et al.*, 2013). در مجموع نتایج حاضر نشان می‌دهد که ریشه‌های کشت شده گیاه خارمریم در محیط

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

کشت مایع پتانسیل خوبی برای تولید سیلیمارین داشته و با تیمارهای مناسب نور و pH می‌توان تولید این ماده را به طور قابل توجهی افزایش داد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به سبب حمایت مالی این تحقیق نهایت سپاس و قدردانی را داشته باشند.

منابع:

اصغری، غ. و سلیمیان ریزی، ط. (۱۳۸۶) تأثیر قندهای فروکتوز، گلوکز و ساکارز بر تولید فلاونولیگنان‌ها در کشت کالوس گیاه خار مریم، فصلنامه گیاهان دارویی ۱۱ : ۱۶-۲۳.

آرخی، س.، اقدسی، م. و خلفی، م. (۱۳۸۹) بهینه‌سازی کشت بافت خارمریم به منظور تولید فلاونولیگنان‌های دارویی، مجله تولیدات گیاهی ۱۹: ۶۹-۸۸.

قاسمی دهکردی، ن. و طالب، م. (۱۳۸۰) استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص. انتشارات چوگان. ۱۳۸-۱۳۲.

Abbasi, B., Khan, M., Mahmood, T., Ahmad, M., Chaudhary, M. and Khan, M. (2010) Shoot regeneration and free radical scavengering activity in *Silybium marianum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 371-376.

Belchi-Navarro, S., Pedreno, M. A. and Corchete, P. (2010) Methyl jasmonate increase silymarin production in *Silybum marianum* L. Gaernt cell cultures treated with β-cyclodextrins. Biotecnology Letter 33:179-184.

Bruneton, J. (1995) Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Intercept Limited, UK.

Cacho, M., Maran, M., Corchet, Frarandece, P. and Tarrago, J. (1999) Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *silybum marianum* (L) Gaertn. Plant Science 144: 63-68.

Cosgrove, D. J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 391- 417.

Demark-Wahnefried, W., Robertson, C. N. and Walther, P. J. (2004) Pilot study to explore effects of low-fat, flaxseed-supplemented diet on proliferation of benign prostatic epithelium and prostate-specific antigen. Urology 63: 900–904.

Edwards, K. L. and Scott, T. K. (1974) Rapid growth responses of corn root segments: effect of pH on elongation. Planta 119: 27-37.

El Sherif, F., Khattab, S., Ibrahim, A. K. and Ahmed, S. A. (2013) Improved silymarin content in elicited multiple shoot cultures of *Silybium marianum* L. Physiology and Molecular Biology of Plants 19: 127-136.

Evans, M. L. (1976) A new sensitive root auxnometer. Plant Physiology 58: 599-601.

Hasanloo, T., Sepehrifar, R., Rahnama, H. and Shams, M. R. (2009) Evalution of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:1901-1909.

Hasanloo, T., Khavarinejad, A., Majidi, E., Ziai, S. A. and Shams, M. R. (2004) Determination of flavonolignan of dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. Journal of Medicinal Plants. 4:25-32.

Khalili, M., Hasanloo, T. and Tabar, S. (2010) Ag^+ enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybium marianum* (L.). Plant Omics Journal 3:109-114.

Khan, M. A., Blackshaw, R. E. and Marwat, K. B. (2009) Biology of milk thistle (*Silybium marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. Weed Biology Management 9:99-105.

Kotake, T. N., Nakagawa, K. and Takeda, N., (2000) Auxin - induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo-and endo-beta-glucanases in barley coleoptiles. Plant and Cell Physiology 41: 1272-1278.

Kwan-Long, L. and China-Ri, H. (1975) Effects of light on the cultured rice roots. Botany Bulletin Academia 16: 45-54.

Murashing, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Nandagopal, S. and Ranjitha Kumari, B. D. (2007) Effectiveness of Auxin Induced *In Vitro* Root Culture. Journal Central European Agriculture 3:73- 80.

Osuchoweski, M. F., Johson, V. J. and Sharma, R. P. (2004) Alteration in regional brain neorotransmitters by silymarin a natural antioxidant flavonoid mixture in BALB/c mice. Pharmaceutical Biology 42: 384-389.

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

human hepatocyte cultures. Drug Metabolism and Disposition 28:1270-1273.

Xiaojun, W. U. (2007) Establishment and chemical analysis of hairy roots of Encomia unmolds. Shanghai University of TCM, Shanghai, China.

Stribling, J. M. (1983) Pioneers in plant tissue culture. Carolina Tips 46: 33-5.

Tumova, J., Rimakova, J. and Tuma, J. (2006) *Sylibum marianum in vitro*-flavonolignan production. Plant Soil Enviroment 10: 454-458.

Wenkataramanan, R. (2000) Milk thistle and herbal supplement decrease in the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transfarase in

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]

Induction of root formation to produce silymarin in *Silybium marianum* plant in tissue culture condition

Sahar Iri, Mahnaz Aghdasi and Manijeh Mianabadi
Biology department, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan-Iran
(Received: 16 April 2013; Accepted: 10 July 2013).

Abstract:

The *Silybium marianum* is the dicotyledonous herbs of the Asteraceae family that is important in medical industry. The biological active compound of *Silybium marianum* is a mixture of several flavonolignals generally known as silymarin. The purpose of current research is root formation induction in hypocotyls explants in medium culture. The young shoots were cultured on MS medium containing different concentrations of indole-3-butyric (IBA) and Naphtalene acetic acid (NAA). The results indicated that the highest root formation percentage and root length were observed in young shoots which were treated in MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA and NAA. Then produced roots were transferred to liquid medium. After root growth, roots were subjected to different volumes of medium culture, light and dark treatments and different pH medium. The effect of volumes of culture medium did not showed any significant difference on root growth and silymarin production. Results showed that light treatment induced more silymarin in production compared to dark treatment. Also the culture medium with pH=7 was superior to other pH for silymarin production.

Key Words: flavonolignan, liquid culture medium, root culture, silymarin, *Silybium marianum.*

* Corresponding Author: m.aghdasi@gu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-08]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.4.3.3]