# به کارگیری عصاره مخمر به عنوان یک راهکار به منظور افزایش محتوای فلاونولیگنان‌ها در کشت تعلیقی سلولی گیاه خارمریم از طریق مکانیزم تحریک

**سمیرا رحیمی‌آشتیانی[1]، طاهره حسنلو[2]*، محمدرضا بی‌همتا[3]**

۱- کارشناس ارشد، بخش فیزیولوژی و مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج و عضو باشگاه پژوهشگران دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
۲- استادیار، بخش فیزیولوژی و مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، ابتدای جاده ماهدشت، پژوهشکده بیوتکنولوزی کشاورزی، کرج
تلفن: ۲۷۰۲۸۹۳ (۰۲۶۱)، نمابر: ۲۷۰٤٥۳۹ (۰۲٦۱)
پست الکترونیک: thasanloo@abrii.ac.ir

**تاریخ دریافت:** ۸۷/۷/۱٤ **تاریخ تصویب:** ۸۸/٥/٤

## چکیده

**مقدمه:** خار مریم[1] گیاهی دارویی است. عصاره بذر گیاه خارمریم با نام سیلی‌مارین شناخته می‌شود و سیلی‌مارین شامل مجموعه‌ای از فلاونوییدها، فلاونولیگنان‌ها و ترکیبات متعدد دیگر است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در درمان بیماری‌های کبدی (سیروز و مسمومیت‌های کبدی) و پیشگیری و یا درمان سرطان استفاده می‌شود. کشت سلولی گیاه خار مریم منبع خوبی جهت تامین سیلی‌مارین می‌باشد. راهکارهای متعددی شامل استفاده از عوامل محرک برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت بافت و سلول اتخاذ شده است. این عوامل با تاثیر بر مسیرهای انتقال سیگنال، منجر به تغییرات در تنظیم بیان ژن و در نهایت تولید متابولیت‌هایی در برابر تنش ایجاد شده می‌شوند.

**هدف:** استفاده از عصاره مخمر به عنوان محرک زنده به منظور افزایش تولید سیلی‌مارین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم و بررسی اثر آن بر روند رشد سلول‌ها و میزان تولید سیلی‌مارین و معرفی بهترین غلظت محرک در مناسب‌ترین زمان جهت حداکثر تولید فلاونولیگنان‌ها.

**روش بررسی:** در این پژوهش پس از ایجاد کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم، تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی گرم بر ٥۰ میلی‌لیتر محیط کشت) بر میزان تولید فلاونولیگنان‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا بررسی شد. نمونه‌برداری در ٦ زمان مختلف (۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت) پس از اعمال تیمار انجام شد.

**نتایج:** مطالعه کمی و کیفی ترکیبات فلاونولیگنانی تولید شده از این آزمایش‌ها بیانگر تولید سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلیبین و ماده‌ای به نام تاکسی فولین که پیش‌ساز فلاونولیگنان‌های ذکر شده است، می‌باشد. تیماردهی با عصاره مخمر باعث افزایش محتوای سیلی‌مارین در محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم شد. حداکثر تولید سیلی‌مارین در محیط تیمار شده با ٦ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ٥۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پایان ۷۲ ساعت بود (۱٤/٥۱٦ میکروگرم بر گرم) که میزان آن در گروه شاهد در همین زمان ۲/۹ میکروگرم بر گرم بود. سرعت رشد کلیه محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر نسبت به گروه شاهد بیشتر بود، به گونه‌ای که در تمام غلظت‌های اعمال شده از لحظه اعمال تیمار تا ۲۱٦ ساعت پس از آن، همواره سرعت رشد سلول‌ها و وزن خشک آنها نسبت به گروه شاهد در همان زمان‌ها بیشتر بود و در محیط‌های تیمار شده با ٤ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ٥۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پایان ۲٤ ساعت به بالاترین میزان خود رسید (٥/۸۲ گرم) که میزان آن در گروه شاهد در همین زمان ۳/۲۳ گرم بود.

**نتیجه‌گیری:** در این آزمایش مشاهده شد که کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم بسیار مستعد تحریک با عصاره مخمر می‌باشد و همچنین این ترکیب برای افزایش قابلیت تولید در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی بسیار سودمند می‌باشد.

**گل‌واژگان:** خارمریم، کشت سلول، عصاره مخمر، سیلی‌مارین

[1] *Silybum marianum*



www.SID.ir

## مقدمه

خارمریم، گیاهی است یک یا دو ساله با نام علمی *Silybum marianum*، از خانواده کاسنی است که منشای آن شرق مدیترانه گزارش شده است [۱]. گیاه خارمریم از گذشته‌های دور در درمان تعدادی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است و مردم برای مداوای بیماری‌های صفراوی از برگ‌های خارمریم استفاده می‌کردند و علاوه بر این مواد موثره میوه‌های رسیده این گیاه که تحت عنوان سیلی‌مارین نامیده می‌شوند برای معالجه بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود. سیلی‌مارین، به علت دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، یک داروی محافظ کبدی است [۲]. علی‌رغم پیشرفت‌ها در زمینه شیمی، مصنوعات ما هنوز به گیاهان به عنوان منابع بیولوژیک برای تولید تعدادی از متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد دارویی نیازمندند [۳]. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه که توسط گیاهان تولید می‌شوند، توسط کشت‌های کالوس و سلول نیز ساخته شده و به عنوان منبع مهمی برای تهیه ترکیبات با ارزش اقتصادی مورد استفاده قرار می‌گیرند [٤،٥،٦]. بیکر[1] و همکاران (۱۹۷۷) موفق به تولید فلاونوییدها در شرایط کشت بافت و سلول گیاه خارمریم شدند [۷]. توموا و همکاران (۲۰۰٤) به مطالعه کشت‌های کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم پرداختند [۸]. از آنجایی که پتانسیل و سرعت تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد، از طریق کشت سلول‌های گیاهی به روش‌های مختلفی از جمله استفاده از تکنیک انگیزش با استفاده از محرک‌ها[2] می‌توان میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد [۹]. محرک ماده‌ای است که وقتی در مقادیر کم در سیستم سلولی به کار می‌رود باعث القا یا توسعه تولید ترکیبات خاص می‌شود. محرک‌ها سیگنال‌هایی تولید می‌کند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند تحریک موجب سنتز یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه به وسیله گیاه به منظور بقاء، مقاومت و رقابت می‌شود [۱۰]. برای مثال در مطالعه‌ای که بر روی کشت ریشه‌های موئین گیاه *Brugmansia candida* انجام شده است مشخص شد که اضافه کردن نیترات نقره، سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر و کلرید کبالت باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه اسکوپال آمین می‌شود [۱۱]. افزودن نیترات نقره، کلرید کبالت، سولفات والدیم و فنیل آلانین به عنوان محرک‌های شیمیایی و همچنین استفاده از محرک‌های استخراج شده از قارچ *Rhizopus stolonifer* در کشت سوسپانسیون سلولی درخت سرخدار، میزان تاکسول تولید شده را نسبت به حالتی که هیچ محرکی اضافه نشده بود، چندین برابر افزایش داد [۱۲]. سانچز سامپدرو[1] و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه‌ای بر روی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Silybum marianum* دریافتند که حذف یون کلسیم از محیط کشت می‌تواند به افزایش تولید سیلی‌مارین کمک کند [۱۳]. نتایج پژوهش‌های شمس اردکانی و همکاران (۲۰۰۵)، درباره تاثیر الیسیتورها ($Cd^{2+}$، $Pb^{2-}$ و $Ag^{+}$) بر بیوسنتز پدوفیلوتوکسین در سوسپانسیون‌های سلولی *Linum album* مشخص کرد که نقره به طور معنی‌داری قادر به تحریک تولید پودوفیلوتوکسین در محیط‌های کشت شد که این اثر احتمالاً مربوط به نقش نقره روی تولید اتیلن بود [١٤]. عوامل متعددی در تحریک کشت‌های سوسپانسیون سلولی موثر می‌باشند که شامل غلظت عامل محرک، طول زمان تحریک، سن کشت و نوع محیط کشت می‌باشد [۱۵]. بنابراین در این بررسی اثرات عصاره مخمر[2] در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم پرداختیم و تاثیر آن بر روند رشد سلول‌ها و میزان تولید سیلی‌مارین بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مواد گیاهی

جهت انجام این تحقیق دانه‌های خشک شده گیاه خارمریم با منشا مجاری از پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شدند.

[1] Becker [2] Elicitors

[1] Sanchez- Sampedro [2] Yeast extract



Archive of SID

www.SID.ir

**سترون‌سازی دانه‌ها و تهیه قطعات جدا کشت**

جهت ضدعفونی دانه‌های گیاه خارمریم و آماده‌سازی آنها برای ایجاد دانه رست و تهیه قطعه جدا کشت، از روش حسنلو و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. به این منظور ابتدا دانه‌های گیاه خارمریم به مدت ۳ دقیقه با محلول اتانول (۷۰ V/ V درصد) به صورت سطحی ضدعفونی شدند، سپس از محلول هیپوکلریت سدیم (۲ V/ V درصد) و توئین ۲۰ (۰/۱ V/ V درصد) به مدت ۱۳ دقیقه استفاده شد و در پایان ۳ بار عمل آبشویی با آب مقطر استریل انجام شد. دانه‌های ضدعفونی شده جهت جوانه‌زنی و ایجاد دانه رست به محیط کشت جامد آب – آگار (۰/۷ V/ V٪) بدون هورمون منتقل شدند (۱۶).

**تهیه محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم**

برای ایجاد کشت‌های سوسپانسیون سلولی از کالوس‌های ۳ ماهه و محیط کشت مایع موراشیج و اسکوک (MS)[1] و هورمون‌های ۳ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر کاینتین استفاده شد [۱۷،۱۸،۱۹]. ۰/۵ گرم کالوس برای کشت به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل و در دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد درون شیکر انکوباتور (چرخشی) با دور ۱۵۰ دور در دقیقه در تاریکی نگهداری شدند این محیط‌ها پس از ۱۵ روز واکشت شدند. به منظور واکشت مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط به ارلن حاوی ٤۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه شد. این ارلن‌ها در شرایط ذکر شده به منظور مطالعه تولید سیلی‌مارین نگهداری شدند. پس از ۳ بار واکشت که هر ۱۵ روز یک بار صورت گرفت محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی جهت بررسی اثر عصاره مخمر مورد استفاده قرار گرفتند [۱۳،۲۰].

**اضافه کردن عصاره مخمر به محیط‌های کشت**

پس از انجام سومین واکشت در روز سوم پس از واکشت، عصاره مخمر با غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) اضافه شدند و نمونه‌برداری در ٦ زمان مختلف (۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت) انجام شد [۱۱،۲۱].

**استخراج و اندازه‌گیری سیلی‌مارین در سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم**

سلول‌های کشت شده در زمان های موردنظر به وسیله کاغذ صافی از محیط جدا شدند و در دستگاه فریز درایر در دمای ٦۰- درجه به مدت ۲ ساعت خشک شدند. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها وزن خشک آنها اندازه‌گیری و یادداشت شد. استخراج سیلی‌مارین به روش حسنلو و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد [۲۲]. جهت بررسی دقیق کمی ترکیبات از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] استفاده شد. اندازه‌گیری سیلی‌مارین توسط دستگاه HPLC (Knauer) شامل پمپ K1001 دتکتور UV (۲۸۰ نانومتر)، ستون C18، حلال‌های آب و استو نیتریل (٤۰:٦۰) و نرم افزارکروموگیت[2] انجام شد [۲۳]. زمان آشکارسازی ۱۰ دقیقه و حجم عصاره تزریق شده به ستون ۱۰ مایکرولیتر بود. اندازه‌گیری سیلی‌مارین کل بر اساس مقایسه با استانداردهای سیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و تاکسی فولین محاسبه شد.

**طرح و آنالیزهای آماری**

از آزمایش پایه فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار استفاده شده است و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ مقایسه شدند. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری به وسیله برنامه کامپیوتری SAS (ورژن ٦/۲) تحلیل شد.

## نتایج

**دوره زمانی رشد سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم و تولید سیلی‌مارین**

از ابتدای کشت تا روز سوم پس از کشت رشد به کندی صورت گرفت و از روز ۳ تا روز ۹ رشد سلولی بسیار قابل

[1] Murashig and skog

[1] High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
[2] Chromgate



Archive of SID
www.SID.ir

ملاحظه بود. در این مرحله رشد سلول‌ها سریع‌تر شد و حداکثر وزن خشک و تولید سیلی‌مارین ۵/۴۳ گرم و ٤/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود (شکل شماره ۱).

**اثرات تیماردهی با عصاره مخمر در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف بر روی رشد سلول‌های گیاه خارمریم**

سرعت رشد کلیه محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. به گونه‌ای که در تمام غلظت های اعمال شده از لحظه اعمال تیمار تا ۲۱٦ ساعت پس از آن، همواره سرعت رشد سلول‌ها و وزن خشک آنها نسبت به گروه شاهد در همان زمان‌ها بیشتر بود (شکل شماره ۲، A، B، C، D و E). در این دوره زمانی خصوصاً در ۲٤ ساعت پس از اعمال تیمار، سرعت رشد سلول‌ها و وزن خشک آنها به حداکثر خود رسید. حداکثر رشد سلول‌ها مربوط به محیط‌های تیمار شده با ٤ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بود که میزان آن به ۵/۸۲ گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت رسید در حالی‌که میزان آن در همین زمان در گروه شاهد ۳/۲۳ گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بود (شکل شماره ۲، C).

**اثرات تیماردهی با عصاره مخمر در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف بر روی میزان تولید سیلی‌مارین**

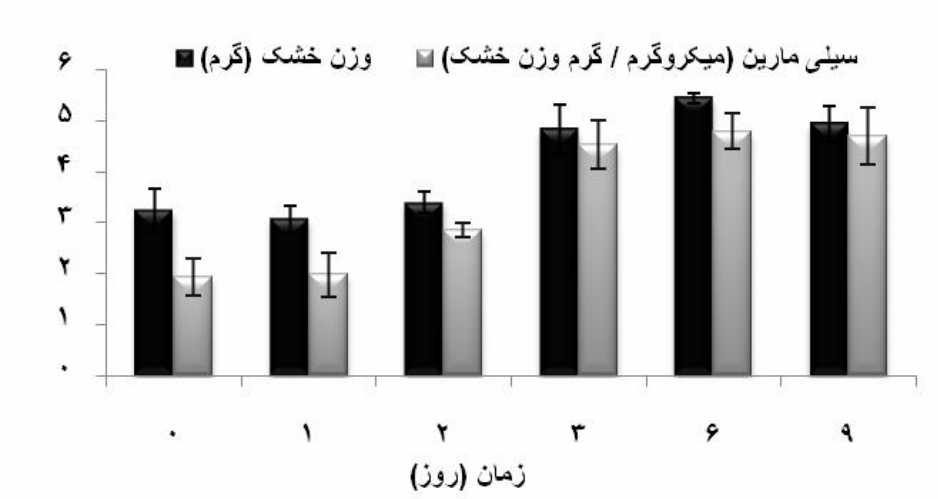
در سلول‌های گیاه خارمریم تیماردهی با عصاره مخمر باعث افزایش محتوای سیلی‌مارین در محیط‌های کشت سوسپانسیون سلولی شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت از اعمال تیمار، میزان سیلی‌مارین در محیط‌های تیمار شده با ۱ و ۲ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ۵۰ میلی‌لیترمحیط کشت به ترتیب به ٦/۹٤ و ۷/۲٤ میکروگرم بر گرم رسید در حالی‌که در همین زمان محتوی سیلی‌مارین گروه شاهد ۲/۸٤ میکروگرم بر گرم بود (شکل شماره ۳، A و B). ۷۲ ساعت بعد از تیماردهی محیط کشت میزان سیلی‌مارین در محیط های تیمار شده با ٤ و ٦ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت به ترتیب به ۸/٤۲ و ۱٤/۵۱٦ میکروگرم بر گرم رسید (شکل شماره ۳، C و D). حداکثر تولید سیلی‌مارین در محیط تیمار شده با ٦ میلی‌گرم عصاره مخمر بر۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پایان ۷۲ ساعت (۱٤/۵۱٦) بود که میزان آن در گروه شاهد در همین زمان ۲/۹ میکروگرم بر گرم بود (شکل شماره ۳، D). در محیط تیمار شده با ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره مخمر، از ۲٤ ساعت پس از اعمال تیمار تا پایان ۷۲ ساعت میزان تولید سیلی‌مارین به حداکثر خود (٦/۷۱٦ میکروگرم بر گرم) رسید در حالی که میزان آن در گروه شاهد ۲/۸٤ میکروگرم بر گرم بود (شکل شماره ۳، E). لازم به ذکر است که میزان سیلی‌مارین بعد از ۱٤٤ ساعت در محیط‌های تیمار شده با ٤ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیترمحیط کشت عصاره مخمر افزایش یافت.

**تجزیه واریانس**

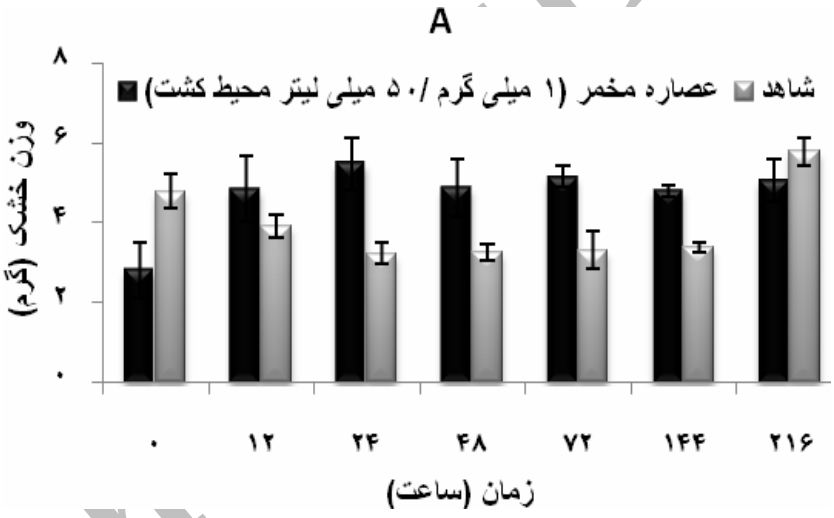
یکی از شرایط لازم برای تجزیه واریانس، شرط برخورداری داده‌ها از توزیع نرمال می‌باشد. که در این پژوهش تمام داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. به منظور بررسی اثرات زمان ها، سطوح مختلف غلظت تیمار های عصاره مخمر و اثرات متقابل زمان ها و سطوح مختلف هر تیمار، تجزیه واریانس طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با ٦ تیمار و ٦ زمان در سه تکرار برای هر تیمار به صورت جداگانه انجام شد. جدول ۱ تجزیه واریانس تیمارها، زمان ها و اثرات متقابل تیمار ها و زمان های مختلف بر روی مقدار تولید وزن خشک، تاکسیفولین، سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین، ایزوسیلی بین و سیلی مارین کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خار مریم را نشان می دهد. بر اساس محاسبات آماری انجام شده، مشخص شد که بین زمان‌ها فقط در میزان وزن خشک، بین غلظت‌های مختلف تیمار در میزان وزن خشک، سیلی دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی بین و در بین اثرات متقابل زمان و تیمار فقط در سیلی دیانین اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

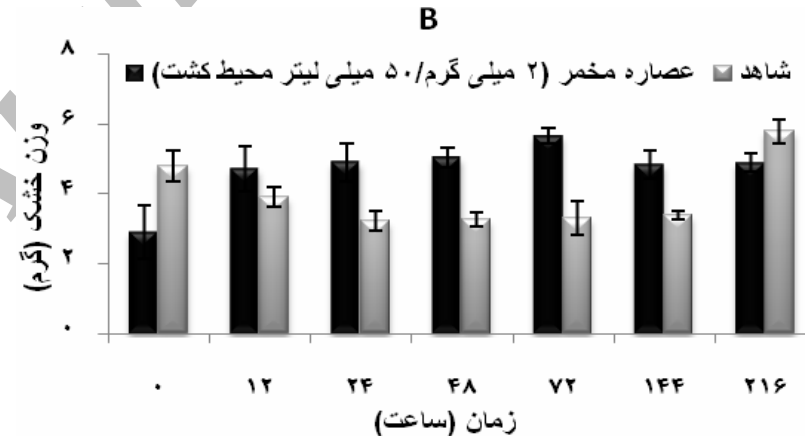


Archive of SID
www.SID.ir




**شکل شماره ۱ – دوره زمانی رشد سلولی و تولید سیلی‌مارین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم**

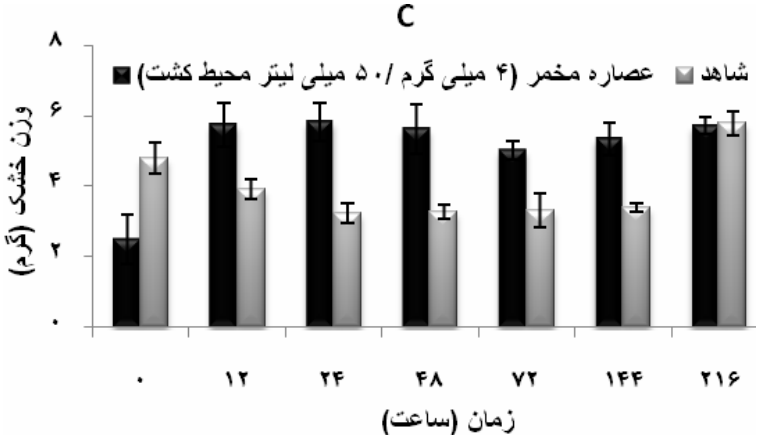


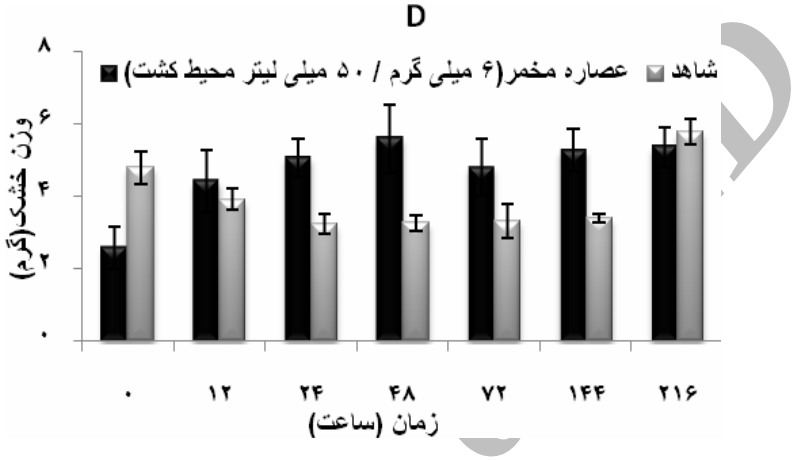



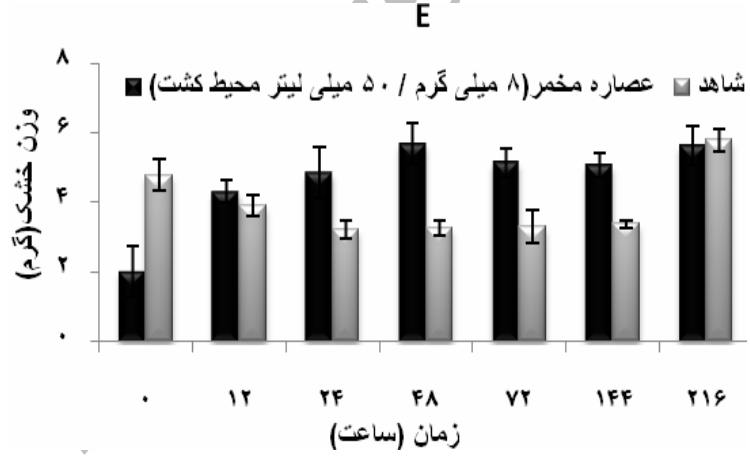

**شکل شماره ۲– مقایسه دوره زمانی رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم تیمار شده در زمان‌های متفاوت (۱۲، ۲٤، ٤٨، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت) با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) نسبت به گروه شاهد**



www.SID.ir



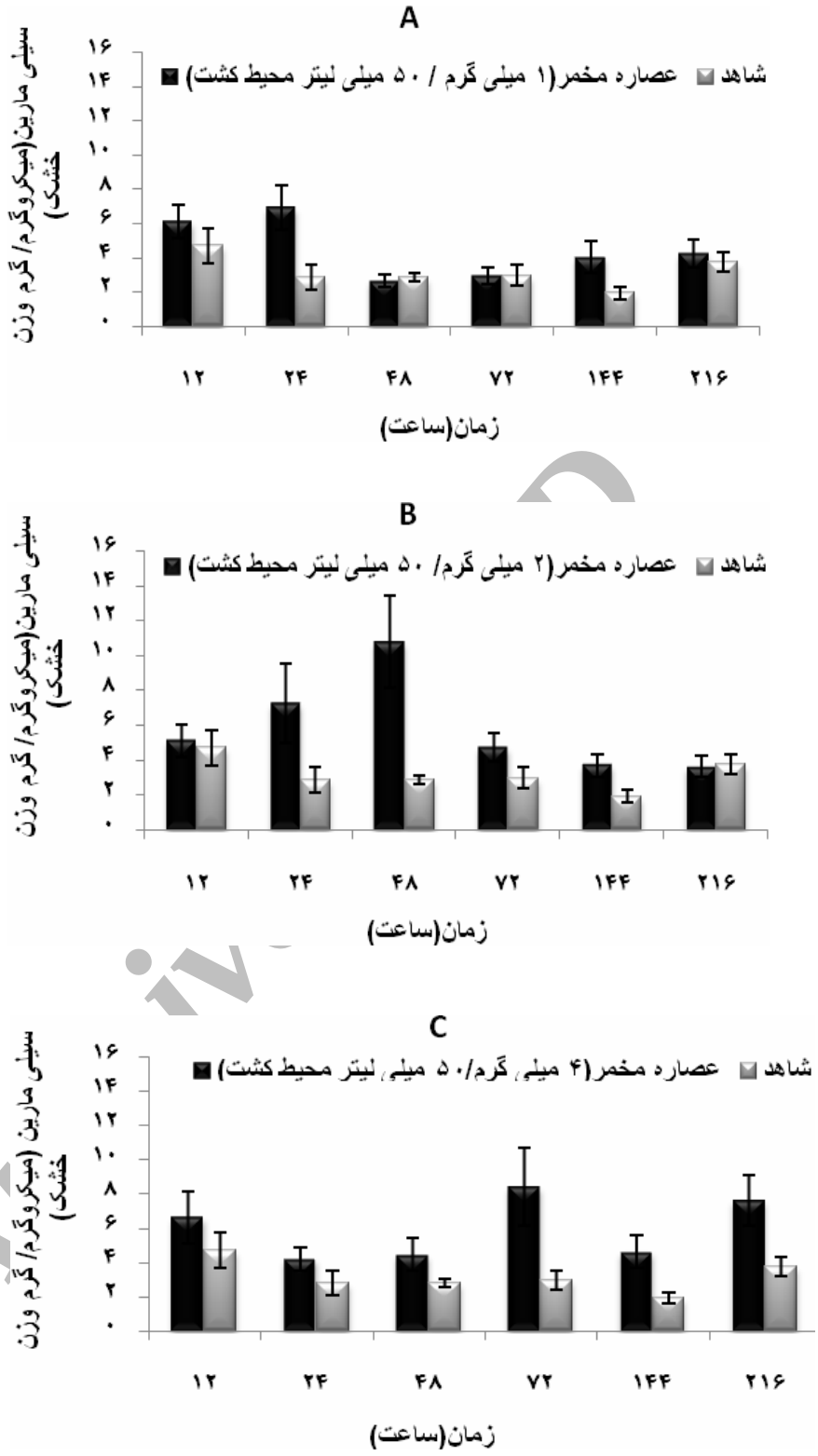




**ادامه شکل شماره ۲- مقایسه دوره زمانی رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم تیمار شده در زمان‌های متفاوت (۱۲، ۲٤، ٤٨، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ساعت) با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) نسبت به گروه شاهد**



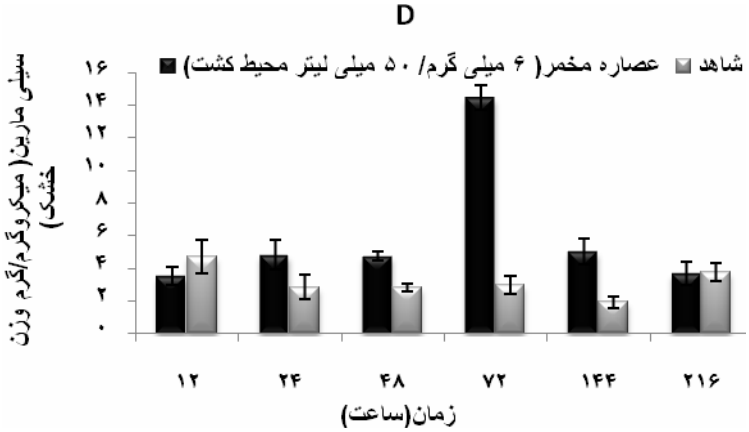
www.SID.ir

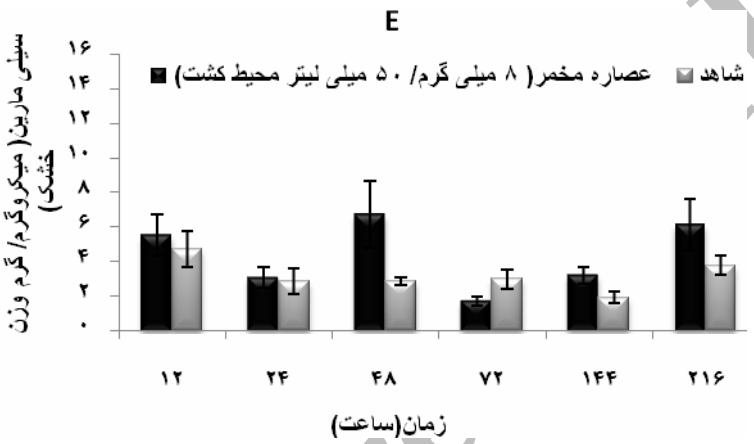



**شکل شماره ۳- مقایسه میزان سیلی‌مارین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم تیمار شده در زمان‌های متفاوت (۱۲، ۲٤، ٤٨، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت) با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) نسبت به گروه شاهد**



www.SID.ir




**ادامه شکل شماره ۳- مقایسه میزان سیلی‌مارین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم تیمار شده در زمان‌های متفاوت (۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت) با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۱، ۲، ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) نسبت به گروه شاهد**

### مقایسه میانگین‌ها

همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس (جدول شماره ۱) که نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در اثرات زمان‌ها و اثرات غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بر روی رشد سلول‌های گیاه خارمریم می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها به منظور بررسی دقیق‌تر از طریق آزمون دانکن صورت گرفت و مشخص شد با اعمال تیمار عصاره مخمر، بهترین مدت زمان اعمال تیمار برای تولید حداکثر وزن خشک، ۲۱٦ ساعت و بهترین غلظت تیمار، ٤ میلی‌گرم عصاره مخمر بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت می‌باشد که گروه a را به خود اختصاص داده‌اند (جدول شماره‌های ۲ و ۳).

## بحث

بهینه‌سازی القاء کالوس و تکثیر سلول‌ها در محیط کشت سوسپانسیون اولین قدم به سوی پایه‌گذاری تولید ترکیبات موثر در مقادیر زیاد می‌باشد. در این مطالعه با بررسی مقدار تجمع فلاونولیگنان‌ها نشان داده شد که رشد و تولید سیلی‌مارین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی با به کاربردن عصاره مخمر



Archive of SID
www.SID.ir

**جدول شماره ۱- تجزیه واریانس تیمارها، زمان‌ها و اثرات متقابل تیمارها و زمان‌های مختلف بر روی مقدار تولید وزن خشک، تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم تیمار شده با عصاره مخمر**

| صفت | میانگین مربعات زمان‌ها | میانگین مربعات تیمارها | میانگین مربعات زمان‌ها × تیمارها |
|---|---|---|---|
| وزن خشک | ۱/۲۲$^{(*)}$ | ٦/۰۷$^{(**)}$ | ۰/۷۸ $^{ns}$ |
| تاکسیفولین | ۱/۱۸ $^{ns}$ | ۲/٤۹ $^{ns}$ | ۱/۵۳ $^{ns}$ |
| سیلی کریستین | ۹/۷۳ $^{ns}$ | ۱۲/۲۰ $^{ns}$ | ۱۲/۲۷ $^{ns}$ |
| سیلی دیانین | ۱/۳۰ $^{ns}$ | ۳/۸٤$^{(**)}$ | ۱/۹۷$^{(**)}$ |
| سیلی بین | ۰/۰٤ $^{ns}$ | ۰/۰۷$^{(*)}$ | ۰/۰٤ $^{ns}$ |
| ایزوسیلی بین | ۰/۰۱ $^{ns}$ | ۰/۰٦$^{(**)}$ | ۰/۰۱ $^{ns}$ |
| سیلی مارین | ۱۰/۲۷ $^{ns}$ | ۲۲/۰۱ $^{ns}$ | ۲۱/٤۳ $^{ns}$ |

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار. * : معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**جدول شماره ۲- مقایسه میانگین میزان وزن خشک در اثر مدت زمان اعمال تیمار عصاره مخمر با استفاده از آزمون دانکن**

| زمان (ساعت) | میانگین |
|---|---|
| ۲۱٦ | $^{a}$۵/٤۱ |
| ٤۸ | $^{ab}$۵/۰۱ |
| ۲٤ | $^{b}$٤/۹۰ |
| ۷۲ | $^{b}$٤/۸۵ |
| ۱٤٤ | $^{b}$٤/۷۹ |
| ۱۲ | $^{b}$٤/٦٦ |

* میانگین‌های با حروف مختلف بر اساس روش دانکن دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

**جدول شماره ۳- مقایسه میانگین میزان وزن خشک در اثر مقادیر مختلف تیمار عصاره مخمر با استفاده از آزمون دانکن**

| مقدار (میلی‌گرم عصاره مخمر بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) | میانگین |
|---|---|
| ٤ | ۵/۵۵ $^{a}$ |
| ۸ | ۵/۱۲ $^{ab}$ |
| ٦ | ۵/۰۹ $^{ab}$ |
| ۱ | ۵/۰٤ $^{ab}$ |
| ۲ | ۵/۰۱ $^{b}$ |
| ۰ | ۳/۸۲ $^{c}$ |

* میانگین‌های با حروف مختلف بر اساس روش دانکن دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است



Archive of SID

www.SID.ir

افزایش می‌یابد. در این آزمایش همچنین مشاهده شد که کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خارمریم بسیار مستعد تحریک با محرک‌ها می‌باشد و عصاره مخمر تولید سیلی‌مارین را بعد از ۷۲ ساعت افزایش می‌دهد و همچنین برای افزایش قابلیت تولید در مقادیر بالا بسیار سودمند می‌باشد. مکانیسم عمل هیچ کدام از کشت‌های سوسپانسیون سلولی هنوز به درستی مشخص نیست. به هر حال بسیاری از مطالعات پیشنهاد می‌کنند که سیگنالی که توسط محرک فرستاده می‌شود به وسیله گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی دریافت شده و یک سیگنال هدایت شبکه ایجاد می‌کنند که بیان ژن‌های درگیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی و به علاوه آنزیم‌های کلیدی که بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هدف را کاتالیز می‌کنند تنظیم می‌کند [۲۴،۲۵]. دلیل ممکن برای تولید سیلی‌مارین و ترکیبات مشابه دیگر از طریق عصاره مخمر می‌تواند مربوط به ترکیبات برخی از کاتیون‌ها از قبیل Zn، Ca و Co باشد که می‌توانند به عنوان محرک غیرزنده عمل کنند. عصاره مخمر نیز ترکیبی از ترکیبات مختلف، آمینواسیدها، ویتامین‌ها و ترکیبات معدنی می‌باشد. همچنین اثر عصاره مخمر به عنوان محرک می‌تواند ناشی از ترکیبات دیگری باشد که هنوز به درستی شناسایی نشده‌اند [۱۱]. عصاره مخمر همچنین باعث افزایش تولید سیرینجین در سوسپانسیون سلولی گیاه *Saussurea medusa* شده است [۲۱]. نتایج مشابه در تولید بتائین در کشت ریشه‌های موئین گیاه چغندرقند نیز به دست آمده است ولی مکانیزم سلولی این پدیده هنوز به طور کامل مشخص نیست. به هر حال مطالعات بسیاری پیشنهاد می‌کنند که سیگنال‌های محرک ساخت الیگو ساکاریدها و پلی‌ساکاریدها ممکن است از طریق گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی مکانیزم تحریک را به راه بیندازند [۲۶]. قطع واکنش‌های اکسایشی یک رویداد قابل توجه در پاسخ‌های دفاعی هنگامی که سلول‌های گیاهی در معرض تنش‌های غیرزیستی و زیستی مانند تیماردهی با محرک‌ها قرار می‌گیرند، می‌باشد. اکسیژن فعال[1] که منجر به تولید آنیون سوپراکسید $(O_2^-)$ و پراکسید هیدروژن $(H_2O_2)$ به عنوان ترکیبات سمی می‌شود. ROS ها در هنگام بروز تنش ایجاد می‌شوند و در بسیاری از سیستم‌های گیاهی تولید ROS مشاهده شده است. افزایش $Ca^{2+}$ آزاد سیتوسلولی در بسیاری از سلول‌های تیمار شده با محرک برای فعال شدن مراحل تولید ROS، یک پیش نیاز است. اینکه ROS ها چگونه باعث القاء و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند هنوز به درستی مشخص نیست اما این واضح است که ROS ها باعث القاء بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی و ژن‌های بیوسنتزکننده متابولیت‌های ثانویه می‌شود [۲۷]. اعتقاد بر این است که در نهایت تمامی مسیرهای انتقال سیگنال بر TFS اثر می‌گذارد و اغلب تمام ژن‌های مسیر بیوسنتز متابولیت ثانویه به وسیله TFS ویژه تنظیم می‌شود. بنابراین تنظیم بیوسنتز، فعال‌سازی یا غیرفعال‌سازی TFS باعث ایجاد شبکه‌ای برای تنظیم متابولیت‌های ثانویه گیاهی شده است [۲۴]. در این تحقیق اثرات مثبت عصاره مخمر بر روی رشد و خصوصاً تولید سیلی‌مارین، این تیمار را به عنوان یک کاندیدای مورد قبول برای بهبود بهره‌وری و مطالعه مسیرهای بیوشیمیایی سنتز سیلی‌مارین معرفی می‌نماید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بهینه‌سازی شرایط محیط کشت به منظور افزایش قابلیت تولید در مقادیر بالا بسیار سودمند می‌باشد.

[1] Reactive Oxygen Source (ROS)

## منابع


**1.** Caitlin B. Silybum marianum. St. 3th Nature conservancy, California: 785 Market floor. Sanfrancisco. 1985, pp: 120 - 5.

**2.** Sonnebbichler J, Scaleram F, Sonnebichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory effects of silibinin and silichristin form the Milk thistle *Silybum*




Archive of SID
www.SID.ir

*marianum* kidney cells. *The j pharmacol and Expe Therapeu*. 1999; 290 (3): 1375 - 83.

**3.** Pezzuto JM. Natural product cancer chemoprotective agents In: Arnason JT, Mata R, Romeo JT, editors. Recent advances in *phytochemistry*. Phytochemistry of medicinal plants. New York: Plenum press. 1995, pp: 29: 19 - 45.

**4.** Alfermann AW, Petersen M. Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Org Culture*. 1995; 199 - 205.

**5.** Dornenburg H, Knorr D. Production of the phenolic flavour compounds with cultured cells and tissue of Vanilla planifolia species. *Food Biotechnol*. 1996; 10: 75 - 92.

**6.** Ravishankar GA, Bhyalakshmi N, Ramachandra Rao s. Production of food additives. *Biotechnology: secondary metabolites*. New Dlhi:Oxford IBH. 1999, 89 - 110.

**7.** Becker H, Schrall R. Callus und Suspensionskulturen von *Silybum marianum*. *Planta Med.* 1977; 31: 185 - 92.

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

**9.** Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. advances* 2002; 20: 101 - 53.

**10.** Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003; 37: 91 - 102.

**11.** Sandra I. Pitta-Alvarez, Tatiana C. spollansky, Ana M. Giulietti. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropan alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technol*. 2000; 26: 252 - 8.

**12.** Yari Khosroshahi A. Evaluation of tissue culture of *Taxus baccata* and *In vitro* taxol production. MSc in biotechnology. Tabriz University. 2004, pp: 87, 91.

**13.** Sanchez- Sampedro MA, Fernandez- Tarrago J, Crchete P. Enhanced silymaril accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *silybum marianum* L. Gaerth. *Plant Physiology*. 2005; 162: 1177 - 82.

**14.** Shams- Ardakani MR, Hemmati S, Mohagheghzadeh A. Effect of elicitors on the enhancement of podophylotying biosynthesis in suspension cultures of Linum album. *Daru*. 2005; 13: 56 - 60.

**15.** Ganapathi G, Karji F. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *J. Exptl. Bot.* 1990; 41: 259 - 67.

**16.** Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E, Shams- Ardakani MR. Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn from Iran. *Pakistan J. Biol. Sci*. 2005; 8: 1778 - 2.

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

**18.** Cacho M, Moran M, Crchete P, Fernandez-Tarrago J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silbym marianum* (L.) gaertn. *Plant science*. 1999; 144: 63 – 8.

**19.** Hasanloo T, Ramazan A, Khavari-Nejad RA, Majidi E. Media optimization for flavonolignans accumulation and growth index of callus culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. of Plant Sci. Res.* 2007; 1: 7 - 12.

**20.** Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E, Shams- Ardakani MR. Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Pharmaceutical Biol.* 2008; 46: 876 - 82.

**21.** Chunming Xu, Bing Zhao, Yuan Ou, Xiaodong Wang, Xiaofan Yuan, Yuchun Wang, Elicitor- enhanced syringing production in suspension cultures of Saussurea medusa. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 23: 965 - 70.

**22.** Hasanloo T, Sepehri R. Evaluation of silymarin extraction from *Silybum marianum* (L.)



Archive of SID

www.SID.ir

Gaertn seeds by water. *Quarterly Jon Plant Sci. Res*. 2008; 1: 1 - 8.

**23.** Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, Majidi E, Ziai SA, Shams- Ardakani MR. Determination of flavonolignan of dried fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. *J. Medicinal Plants* 2004; 4 (1): 25 - 32.

**24.** Cheong JJ, Hahn MG. A specific, high affinity binding site for the hepta-glucoside elicitor exists in soybean memberanes. *Plant Cell.* 1991; 3: 137 - 47.

**25.** Hanania U, Avni A. High affinity binding site for ethylene-inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J*. 1997; 12: 113 - 20.

**26.** Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of Beta vulgaris in shake-flask and bioreactor. *Process Biochem.* 2006; 41: 50 - 60.

**27.** Fahrendorf T, Ni W, Shorroosh BS, Dixon RA. Stress responses in alfalfa (Medicago sativa L.). XIX. Transcripttional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onest of the isoflavanoid phytoalexin response. *Plant Mob Biol.* 1995; 28: 885 - 900.

Archive of SID



www.SID.ir