



## اثر سطوح مختلف pH محیط کشت بر میزان تولید سیلیمارین و رشد ریشه های مویین گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.)

فرزانه نجفی<sup>۱</sup>، شادی رحیمی<sup>۱\*</sup>، طاهره حسنلو<sup>۲</sup>، رمضانعلی خاوری نژاد<sup>۱،۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

\* نویسنده مسئول: شادی رحیمی، shadi@tmu.ac.ir

### چکیده

ریشه های مویین گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.) در محیط مایع موراشیچ و اسکوگ بمدت ۳۰ روز در سطوح مختلف pH ۵، ۵/۷، ۶ و ۷ کشت داده شدند. وزن خشک پودر نمونه های ریشه مویین خشک شده با انجماد سخت، اندازه گیری شدند. جهت بررسی دقیق کمی ترکیبات، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. بیشینه بیوماس و انباشتگی سیلیمارین بترتیب ۰/۵۰ گرم و ۰/۲۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک، در ریشه های کشت شده در pH ۵ مشاهده شد. میزان تاکسی فولین، سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین و ایزوسیلی بین این ریشه ها بترتیب ۰/۰۴۴، ۰/۰۶۱، ۰/۰۹۵، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شدند که بیشتر از ریشه های رشد یافته در pH های بالاتر بود. این مطالعه، اثر سطوح مختلف pH اولیه را بر میزان بیوماس ریشه و تولید سیلیمارین در ریشه های مویین *S. marianum* گزارش می نماید. واژگان کلیدی: ریشه مویین، pH، *Silybum marianum*، سیلیمارین.

### مقدمه

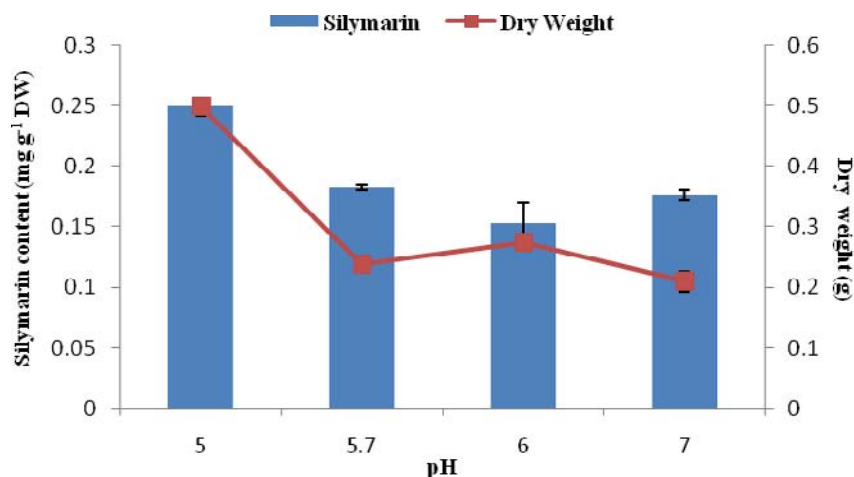
گیاه خارمریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) در درمان مسمومیت کبدی، التهاب مزمن و سیروز کبدی بکار رفته است. سیلیمارین، عصاره متانولی دانه های این گیاه، با فرمول تجربی  $C_{25}H_{22}O_{10}$  شامل تعداد زیادی از فلاونولیکنانها همانند سیلیبین (SBN)، ایزوسیلیبین (ISBN)، سیلی دیانین (SDN)، سیلی کریستین (SCN) و تاکسی فولین (TXF) بعنوان پیش ساز سیلیمارین است (Sanchez-sampedro et al., 2005). رشد سریع، توانایی بیوسنتتیک بیشتر جهت تولید متابولیت های ثانویه و ثبات ژنتیکی از خواص قابل توجه ریشه های مویین تراریخت ژنتیکی توسط آگروباکتریوم ریزوژنز است (Kim et al., 2002). بطوریکه روش کارآمدی جهت توسعه کشت ریشه های مویین *S. marianum* و تولید سیلیمارین با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز ایجاد گردید. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سطوح مختلف pH اولیه محیط کشت بر میزان تولید سیلیمارین و رشد ریشه های مویین گیاه *S. marianum* می باشد.

ریشه مویین *S. marianum* بکار رفته در این مطالعه، بوسیله آگروباکتریوم ریزوژن (AR15834) تراریخت شده و تراریخت سازی ژنتیکی این ریشه های مویین بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تأیید گردید. همه آزمایشات در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی لیتری صورت می گیرد و نمونه ها درون شیکر انکوباتور در تاریکی، دمای ۲۶ درجه سانتیگراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه، انکوبه می شوند. هر فلاسک شامل ۵۰ میلی لیتر محیط موراشیج و اسکوگ شامل ۳۰ گرم سوکروز و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) است. pH محیط پیش از اتوکلاو روی ۵، ۵/۷، ۶ و ۷ تنظیم گردید و با ۶ قطعه ۱ سانتی متری از کشت های ریشه ۲۸ روزه تلقیح گردید. پس از ۴ هفته نمونه برداری انجام شده و میزان رشد و تجمع سیلیمارین بررسی شد. ریشه های برداشت شده به وسیله کاغذ خشک کن، خشک شدند و در دستگاه فریز درایر در دمای ۶۰- درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند، پس از خشک شدن کامل نمونه ها وزن خشک آنها اندازه گیری و یادداشت شد. بمنظور چربی زدایی نمونه ها، از پترولیوم بنزن استفاده گردید. پس از خشک شدن کامل نمونه ها جهت عصاره گیری از آنها ۱۰ میلی لیتر اتانل استفاده گردید و نمونه ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در داخل بن ماری قرار گرفتند. سپس محلول های متانلی جهت تغلیظ به دستگاه فریز درایر با دمای ۶۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند تا پودر زرد رنگی در ظرف باقی بماند. پودر زرد رنگ حاصله مجدداً در متانل حل شد و به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد و جهت بررسی دقیق کمی فلاونولیکان ها، به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق شدند و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و شناسایی شدند و مقادیر هر یک بر اساس منحنی استاندارد سیلی بین استاندارد محاسبه شد. اطلاعات داده شده میانگین حداقل ۵ بار تکرار است.

## نتایج و بحث

در این مقاله اثر سطوح مختلف pH (۵، ۵/۷، ۶ و ۷) بر میزان رشد ریشه های مویین و انباشتگی سیلیمارین بررسی گردید. بیشترین میزان وزن خشک و سیلیمارین در pH اسیدی ۵ (بترتیب ۰/۵۰ گرم و ۰/۲۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک)، مشاهده شد درحالیکه میزان بیوماس در pH ۵/۷، ۶ و ۷ بترتیب ۰/۲۴ و ۰/۲۷ گرم گزارش شدند. pH قلیایی، ۷ کمترین وزن خشک، معادل ۰/۲۱ گرم را نشان داد. میزان سیلیمارین ریشه های کشت شده در pH ۵/۷، ۶ و ۷، بترتیب ۰/۱۸، ۰/۱۵ و ۰/۱۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک بودند. ۰/۰۴۴، ۰/۰۶۱، ۰/۰۹۵، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک بترتیب برای میزان تاکسی فولین، سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین و ایزوسیلی بین در ریشه های رشد یافته در pH ۵، نشان داده شدند. آنالیز آماری با نرم افزار SAS (۶/۲) با استفاده از روش ANOVA و با آزمون Duncan،  $\alpha \leq 0.05$  انجام شد.

در کشت ریشه مویین، pH عامل مهمی است که رشد سلول و انباشتگی متابولیت ثانویه را متأثر می نماید. در pH های بسیار اسیدی، میزان آلومینیوم و هیدروژن موجود در محیط برای سیستم ریشه ای سمی است درحالیکه در pH های بسیار قلیایی، ممکن است مواد مغذی به یکدیگر متصل شده و بصورت اشکال غیر قابل جذب برای ریشه های مویین درآید. بطوریکه در تشابه با نتایج حاضر pH ۴/۶ در مقایسه با ۵/۶ و ۶/۶ در رابطه با میزان رشد و انباشتگی plumbagin در ریشه های مویین ۲۰ روزه *Plumbago indica* مناسب یافت شد (Gangopadhyay et al., 2008)، همچنین رشد بهتر و تولید بیشتر diosgenin در ریشه های مویین *Trigonella foenum-graecum* رشد یافته در pH ۵، در مقایسه با ۵/۵ و ۵/۹ مشاهده شد (Merkli et al., 1997).



نمودار ۱- تغییرات وزن خشک و بیوستز سیلیمارین در ریشه های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با سطوح مختلف pH (۵، ۵/۷، ۶ و ۷) (± SE)

جدول ۱- مقایسه میانگین میزان فلاونولیکتان ها در کشت ریشه های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با سطوح مختلف pH (۵، ۵/۷، ۶ و ۷) با استفاده از

آزمون Duncan (Mean ± SE)

پH	تاکسی فولین (mg g <sup>-1</sup> DW)	سیلی کریستین (mg g <sup>-1</sup> DW)	سیلی دیانین (mg g <sup>-1</sup> DW)	سیلی بین (mg g <sup>-1</sup> DW)	ایزوسیلی بین (mg g <sup>-1</sup> DW)
۵	۰/۰۴۳۹±۰/۰۰۲a	۰/۰۶۱۴±۰/۰۰۱a	۰/۰۹۵۰±۰/۰۰۳a	۰/۰۲۴۵±۰/۰۰۲a	۰/۰۲۴۳±۰/۰۰۴a
۵/۷	۰/۰۴۵۰±۰/۰۰۳a	۰/۰۴۷۴±۰/۰۰۰b	۰/۰۵۸۵±۰/۰۰۳b	۰/۰۲۱۱±۰/۰۰۲b	۰/۰۱۰۴±۰/۰۰۱b
۶	۰/۰۳۷۶±۰/۰۰۱b	۰/۰۳۸۶±۰/۰۰۳c	۰/۰۴۶۱±۰/۰۱۴b	۰/۰۲۱۱±۰/۰۰۱b	۰/۰۰۹۲±۰/۰۰۱b
۷	۰/۰۲۴۴±۰/۰۰۱c	۰/۰۳۹۸±۰/۰۰۴c	۰/۰۸۲۲±۰/۰۰۱a	۰/۰۱۷۱±۰/۰۰۱c	۰/۰۱۲۳±۰/۰۰۲b

### نتیجه گیری کلی

در این بررسی، میزان سیلیمارین بطور قابل توجهی در pH ۵، در مقایسه با سایر سطوح مورد مطالعه افزایش نمود.

### منابع

1. Gangopadhyay M, Sircar D, Mitra A, Bhattacharya S. 2008. Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. *Biologia Plantarum*, 52: 533-537.

2. Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ. 2002. Invited review: Secondary metabolism of hairy root cultures in bioactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38: 1–10.
3. Merkli A, Christen P, Kapetanidis I. 1997. Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenumgraecum* L. *Plant Cell Reports*, 16: 632-636.
4. Sanchez-Sampedro MA, Fernandez-Tarago J, Corchete P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate induced silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* L. Gaerth. *Journal of Biotechnology*, 119: 60-69.

## **Effect of initial pH on growth and silymarin production in *Silybum marianum* hairy root culture**

Najafi F.<sup>1</sup>, Rahimi S.<sup>1,\*</sup>, Hasanloo T.<sup>2</sup>, Khavari-Nejad RA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, P.O.Box 15815-3587, Tehran, IRAN.

<sup>2</sup>Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Mahdasht Road, P. O. Box 31535-1897, Karaj, IRAN.

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, IRAN.

\*Corresponding E-mail address: shadi@tmu.ac.ir

### **Abstract:**

Hairy roots of *S. marianum* were grown for 30 days in Murashige and Skoog's liquid medium at different initial pH levels of 5.0, 5.7, 6.0 and 7.0. Lyophilized powdered hairy root samples were measured in terms of dry weight (DW). Detection and identification of flavonolignans was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Maximum biomass and silymarin accumulation occurred in root cultures which were grown in pH, 5 (0.45 g and 0.26 mg g<sup>-1</sup> DW). The content of silybin, isosilybin, silychristin, silydianin and taxifolin were 0.024, 0.022, 0.056, 0.101 and 0.053 mg g<sup>-1</sup> DW in these hairy root cultures, respectively which were higher than those grown in higher pH. This study reported the effect of different initial pH level on the root biomass and silymarin production in *S. marianum* hairy roots.

**Keywords:** Hairy root; Initial pH; *Silybum marianum*; Silymarin.