مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۱۱، شماره ۳، صفحات ۱۷ الی ۳۱ (۱۴۰۳)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
Nova Biologica Reperta 11(3): 17-31 (2024)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI:

بررسی اثرات الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی مشتقات فنلی و سیلی‌مارین گیاه خارمریم(*Silybum marianum* L.Gaernt)در شرایط *In vitro*

ریحانه بهرامی[۱]، علی گنجعلی*[۱]، پروانه ابریشم‌چی[۱]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران،
مسئول مکاتبات*: علی گنجعلی ganjeali@um.ac.ir

چکیده. در سال‌های اخیر استفاده از فن‌آوری کشت بافت و بیش تولید متابولیت دارویی به‌عنوان یک روش جایگزین و مناسب برای برداشت بی‌رویه و فزاینده گیاه از رویشگاه‌های طبیعی مورد تاکید قرار گرفته است. پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر الیسیتورهای زیستی و نیترات نقره بر محتوی متابولیت‌های ثانویه کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگی گیاه خار مریم انجام شده است. در این بررسی بهترین نتیجه تولید کالوس به محیط MS حاوی KIN تعلق داشت و بنابراین برای ادامه آزمایش در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت منتخب هورمونی کشت و پس از گذشت ۸ هفته از رشد کالوس‌ها، الیستورهای زیستی شامل مخمر یاروویا لیپولیتیکا، قارچ آسپرژیلوس نایجر و باکتری سودوموناس پوتیدا در ترکیب با نیترات نقره به‌عنوان الیسیتور غیرزیستی به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگی اضافه شد. با گذشت ده روز از تیمار، محتوی ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار سیلی‌مارین و فعالیت آنزیم پال در کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی‌ها حاکی از آن است که کاربرد توام مخمر یاروویا و نیترات نقره موجب بهبود محتوی مشتقات فنلی، سیلی‌مارین و فعالیت آنزیم پال گردید و تفاوت آن با سایر الیسیتورهای زیستی هم در ترکیب با نیترات نقره و هم در شرایط فاقد آن معنی‌دار بود.
واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، سیلی‌مارین، کالوس، کشت بافت، گیاه ماریتیغال، متابولیت‌های ثانویه

Investigating effects of biotic and a-biotic elicitors on the content of phenolic derivatives and silymarin in *silybum marianum* L.Gaernt *in vitro*

Reyhaneh Bahrami[1], Ali Ganjeali*[1] & Parwaneh Abrishamchi[1]
[1] Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Corresponding author*: Ali Ganjeali, ganjeali@um.ac.ir

Abstract. In recent years, the use of tissue culture technology and the overproduction of pharmaceutical metabolites have been emphasized as an alternative and suitable method to the excessive and increasing harvesting of the plant from its natural habitats. The present study was conducted to investigate the effect of biotic elicitors and silver nitrate on the secondary metabolite content of calluses derived from leaf explants of the *Silybum marianum* plant. In this study, the best result for callus production was obtained in the MS medium containing KIN, and therefore it was used for further stages of the experiment. The explants were cultured in the selected hormonal medium, and after 8 weeks of callus growth, biotic elicitors including *Yarrowia lipolytica* yeast, *Aspergillus niger* fungus, and *Pseudomonas putida* bacteria, combined with silver nitrate as an abiotic elicitor, were added to the calluses obtained from leaf explants. Ten days after the treatment, the content of phenolic compounds, antioxidant capacity, silymarin amount, and PAL enzyme activity in the calli were measured. The results of the studies indicate that the combined application of *Yarrowia* yeast and silver nitrate improved the content of phenolic compounds, silymarin, and PAL enzyme activity, and the difference with other biotic elicitors, both in combination with silver nitrate and in its absence, was significant.

Key words. Callus, milk thistle, Plant Growth regulators, tissue culture, Silymarin, Secondary metabolite
Received 30.04.2024/ Revised 13.11.2024/ Accepted 20.11.2024/ Published 21.12.2024
دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۱/ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳/ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۳۰/ انتشار: ۱۴۰۳/۱۰/۱

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش اقتصادی بالایی در حوزه سلامت و بهداشت جهانی برخوردار هستند (Duke et al., 2002). ارزش دارویی این گیاهان عمدتا به‌دلیل ترکیباتی است که توسط این گیاهان سنتز و در صنایع دارویی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Park et al., 2009). به‌دلیل استفاده بی رویه از گیاهان دارویی، بسیاری از افراد به طب سنتی روی آورده‌اند. ترکیبات دارویی گیاهان به‌دلیل داشتن خاصیت آنتی‌بیوتیکی و فعالیت ضد میکروبی مورد توجه بوده است (Amiri Fard et al., 2013). گیاه خارمریم با نام علمی (*Silybum marianum* (L. *Gaernt* از خانواده کاسنیان (Asteraceae) ، خودرو، بومی جنوب و غرب اروپا می‌باشد. خارمریم در درمان بسیاری از بیماری‌های کبدی، هپاتیت، دیابت موثر است که سابقه آن بیش از هزار سال در طب سنتی برمی‌گردد. ماده فعال بیولوژیکی خارمریم سیلی‌مارین است که از فلاونولیگنان‌ها شامل سیلیبین A و B، ایزوسیلیبین A و B، سیلیدیانین، سیلی‌کریستین و فلاونوئید تاکسی‌فولین تشکیل شده است. دانه‌های گیاه حاوی فلاونولیگنان‌های دیگری مانند: بتائین، اپیژنین، سیلیبون، پروتئین‌ها، روغن ثابت و اسیدهای چرب آزاد می‌باشند (Abdel Azim et al., 2019).

در سال‌های اخیر، کشت بافت گیاه در شرایط *in vitro* به‌عنوان یک روش جایگزین برای تولید سیلی‌مارین در خارج از عرصه مطرح است (Gopi et al., 2006). روش‌های نوین سنتز سیلی‌مارین نظیر کشت سلول، تولید کالوس و ریشه‌های مویین، تولید مداوم و مستقل از فصل این ترکیب را در مقیاس بالا توسط سیستم بیوراکتور ممکن ساخته است. گیاهان عالی علاوه‌بر متابولیت‌های اولیه، قادر به سنتز متابولیت‌های ثانویه هستند (Oksman-Caldentey & Inze,2004). تولید این متابولیت‌ها در هر مرحله از رشدونمو گیاه اتفاق می‌افتد (Shukla et al., 2009).

متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیرهای تنظیمی ویژه در تعدادی از بافت‌ها و اندام‌های خاص تجمع می‌یابند (Li et al., 2020). در کشت سلول و بافت، استفاده از الیسیتورها یک روش مهم برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است (Rahimi Ashtiani et al., 2010). الیسیتورها، عوامل زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی گیاه و فعال شدن مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه شده موجب مقاومت و بقا می‌شوند (Zhang et al., 2009). الیسیتورهای زیستی شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشد (Vasconsuelo & Boland, 2007). الیسیتورها اغلب سبب القای پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند؛ که نتیجه آن بیان ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و نهایتا بیش تولید این متابولیت‌ها است (Rahimi Ashtiani et al., 2010). بررسی‌ها نشان داده است؛ اتصال برخی ترکیبات فوق به گیرنده‌های آنزیمی سبب افزایش فعالیت لیپواکسیژناژی و تولید جاسمونات شده که نتیجه آن افزایش تولید متابولیت ثانویه، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد (Rahimi Ashtiani et al.,2010).

اندوفیت‌ها از این طریق بر فاکتورهای رونویسی هسته اثر کرده و ترجمه بیشتر mRNA را سبب می‌شوند که نتیجه آن تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه خواهد بود (Raffiee et al., 2016). محققان بیان داشتند تولید سیلی‌مارین به رطوبت خاک وابسته است و قارچ‌های اندوفیت با ایجاد رطوبت سبب افزایش تولید سیلی‌مارین می‌شوند (Andrzejewska & sadowska.,2008).

الیسیتورهای قارچی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان به‌کار گرفته می‌شوند و در تحریک تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانوی مانند ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها موثر می‌باشند (Namdeo,2007; Ionkova,2007). کیتین و کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلول بسیاری از گونه‌های قارچی می‌باشند. کیتوزان یک الیسیتور زیستی است که تاثیر آن در بهبود تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول بسیاری از گیاهان دارویی تایید شده است (Cheng et al.,2006). قارچ *Aspergillus niger* متعلق به خانواده *Trichocomacea*e، با تجزیه مواد آلی خاک و تولید اسیدآلی منجر به اسیدی شدن pH خاک و افزایش جذب فسفر توسط گیاه می‌شود (Stamford et al., 2002).

عصاره مخمر به‌عنوان یک منبع غنی از عناصر مغذی و ترکیبات آلی شناخته شده است. مخمر با تحریک تولید مواد تنظیم‌کننده رشد و بهبود جذب عناصر غذایی کم تحرک، رشدونمو گیاهان را بهبود می‌بخشد (Alkaraki et al., 2006). مخمر *Yarrowia lypolitica* از خانواده *Dipodascaceae*، قادر به سنتز اسیدآمینه فنیل‌آلانین می‌باشد. تحمل pH های اسیدی، رشد در شرایط هوازی، برخورداری از ساختارهای غشایی مناسب جهت فراهم کردن محیط هیدروفوبیک، این قارچ را به عنوان میزبان قدرتمند برای تولید ترکیبات طبیعی متنوع تبدیل کرده است (Lv et al., 2019).

باکتری‌های ریزوسفری با تولید هورمون‌های رشد بر مورفولوژی و رشد گیاهان اثر می‌گذارند. باکتری *Pseudomonas putida* یک باکتری گرم مثبت از خانواده *Pseudomonadacea*e می‌باشد.

باکتری‌های ریزوسفری با تولید هورمون‌های رشد، مورفولوژی، تغذیه و رشد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. محققان دریافتند که هورمون اکسین قادر است رشد اولیه ریشه، تشکیل ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده را تحت تاثیر قرار دهد (Glick et al., 2001). در آزمایش‌های مختلف تاثیر محرک‌های غیرزیستی در ایجاد تغییرات فیزیولوژیک تایید شده است. الیسیتورهای غیرزیستی یا عوامل تنشی مانند اشعه ماورا بنفش، فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی مانند نیترات نقره، با مکانیسم‌های عمل متفاوت درکشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Yu et al.,2006; Matkowski,2008). فلزات سنگین مانند نقره به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های فلزی، برای رشدونمو گیاه ضروری است (Halder et al., 2019). با توجه اهمیت گیاه دارویی خار مریم و نظر به این که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تاثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوی مشتقات فنلی این گیاه در شرایط *In vitro* انجام نشده است لذا آزمایش حاضر با هدف بررسی کاربرد الیسیتورهای فوق بر محتوی متابولیت‌های ثانویه فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس های حاصل از کشت ریزنمونه‌های گیاه خارمریم در شرایط *In vitro* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مرحله از آزمایش با هدف بررسی بهترین غلظت و ترکیب هورمونی برای کال‌زایی گیاه خارمریم در شرایط *In vitro* در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این پژوهش از ریزنمونه‌های برگی برای مراحل بعدی آزمایش و تهیه کالوس استفاده شد. برای سترون‌سازی ریزنمونه‌ها از هیپوکلرید سدیم ۵ درصد (v/v) به‌مدت ۳ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد (v/v) به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. در ادامه ریزنمونه‌ها سه نوبت با آب مقطر استریل شستشو و نهایتا زیر هود لامینار (Iran, Jaltajhiz, Jtlvcz) برش‌های میانی از برگ‌ها تهیه و بر روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) ، حاوی تیمارهای منتخب هورمونی KIN (۲۲/۵ و ۱/۵، ۷/۵، ۰ میکروگرم در لیتر) و 2,4-D (۳۰ و ۲۲/۵، ۱/۵، ۷/۵، ۰ میکروگرم در لیتر) قرار گرفتند. نمونه‌ها به‌مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با نمایان شدن نشانه‌های کال‌زایی، نمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در پایان هفته ششم، نمونه‌ها جمع‌آوری شدند. وزن تر کالوس‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ ثبت شد. وزن خشک کالوس‌ها بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در آون (مدل۵-۱۴۸۶ شرکت Memmert، آلمان) و از دست دادن آب، توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ (Sartorius, TE 313s Germany) ثبت شد.

مرحله دوم آزمایش با هدف بررسی تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوی مشتقات فنلی گیاه در شرایط *In vitro* انجام شد. محیط کشت حاوی KIN (۷/۵ میکروگرم درلیتر) که برمبنای صفات کال‌زایی (بیشینه نرخ کال‌زایی و وزن خشک کالوس‌ها در آزمایش اول) به‌عنوان محیط هورمونی منتخب درنظر گرفته شد. پس از تهیه محیط MS و کاشت ریز نمونه، نمونه‌ها به‌مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با نمایان شدن نشانه‌های کال‌زایی، نمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند پس از پایان هفته ششم و واکشت کالوس‌های القا شده، الیسیتورهای مخمر یارووپا لیپولیتیکا، باکتری سودوموناس پوتیدا، قارچ آسپرژیلوس نایجر و نیترات نقره به‌صورت مجزا و هم‌چنین همراه با نیترات نقره به کالوس‌ها اضافه شد. در پایان هفته هشتم، به‌منظور بررسی صفات بیوشیمیایی، کالوس‌ها جمع‌آوری و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای اندازه گیری و سایر سنجش های بیوشیمیایی نگهداری شدند.

عصاره‌گیری برای سنجش ترکیبات فنلی

به‌منظور استخراج ترکیبات فنلی، عصاره‌گیری از بافت کالوس با استفاده از روش Annegowda و همکاران (2012) انجام شد. کالوس‌های سبز ۸ هفته‌ای به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در آون خشک شدند. در ادامه ماده خشک حاصل از کالوس‌ها پودر و متانول ۸۰ درصد (v/v) با نسبت ۱ به ۱۰۰ به پودرها افزوده شد. شیشه‌های حاوی عصاره به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Japan, Parsonic, 2600S) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۵٪±۲۸(KHz) قرار داده شدند و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و به‌مدت ۴۸ ساعت در زیر هود معمولی (Iran, Knowledge Enterprise) در شرایط تاریکی مطلق تا خشک شدن کامل عصاره‌ها قرار گرفتند. در نهایت عصاره خشک شده توزین و با اضافه کردن متانول ۸۰ درصد(v/v)، از این عصاره برای انجام کلیه سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده شد.

سنجش محتوی فنل کل

برای سنجش فنل کل ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمده (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در متانول) ، با ۱/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو (v/v) ۱۰ درصد مخلوط گردید. محلول فوق به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه از محلول

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

کربنات سدیم (w/v) ۷/۵ درصد ۱ میلی‌لیتر به آن اضافه شد و سپس به‌مدت ۹۰ دقیقه در محیط تاریک و دمای محیط نگهداری شدند. جذب محلول‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (7800 UV/Visible, Jasco, Japan) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Singleton *et al.*,1999). برای رسم منحنی استاندارد از گالیک‌اسید استفاده شد. در نهایت غلظت فنل کل در هر واحد آزمایشی معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد Y=0/0046x-0/0136 محاسبه شد.

سنجش محتوی فلاونوئید کل

جهت اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید کل، ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره به‌دست آمده (۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در متانول) با ۴۰ میکرولیتر آلومینیم کلراید (w/v) ۱۰ درصد، ۴۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار، ۰/۶ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و ۱/۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (7800 UV/Visible, Jasco, Japan) خوانده شد (Chang *et al.*, 2002). جهت رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. در نهایت غلظت فلاونوئید کل در هر وحد آزمایشی معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد Y=0/0052x + 0/0025 محاسبه شد.

سنجش محتوی فلاون

برای سنجش محتوی فلاون، ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم‌کلرید ۱۰ درصد (w/v)، ۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره اضافه شد. در ادامه۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) و (۱/۴ میلی‌لیتر) آب مقطر به هر نمونه اضافه و به حجم نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد (Kosalec *et al.*, 2004) و در ادامه جذب محلول‌ها در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. محتوی فلاون عصاره‌ها بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین و معادله خط Y= 0.0022x – 0.007 محاسبه و برحسب میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه گزارش گردید.

سنجش محتوی ارتو- دی فنل‌کل

برای سنجش محتوی ارتو-دی فنل نمونه‌ها، ۲ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد (v/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم مولیبدات دو آبه (w/v) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی هرنمونه اضافه شد. جذب نوری نمونه‌ها بعد ار ۱۸ دقیقه در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت شد (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005). محتوای ارتو-دی فنل برمبنای منحنی استاندارد گالیک‌اسید با استفاده ازمعادله Y=0.0042x + 0.067 محاسبه شد و برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک نمونه‌های کالوس ارائه گردید.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، ابتدا، به حجم‌های مختلف عصاره‌های متانولی کالوس حاصل از هر تیمار (،۱۰۰ ،۲۰۰ ،۳۰۰ ،۴۰۰، ۵۰۰ میکرولیتر)، ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص اضافه شد. سپس به هر لوله حاوی عصاره متانولی، ۰/۵ میلی‌لیتر معرف DPPH (Sigma- Aldrich) اضافه گردید. تمامی لوله‌ها بعد از ورتکس شدید، به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفتند. در نهایت جذب نوری مخلوط واکنش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (JASCO UV/Vis 7800) در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. میزان درصد خاموش سازی رادیکال های آزاد عصاره‌های متانولی از طریق فرمول درصد IC50={(A blank- Asampel)/A blank}×100 محاسبه شد (Hatano *et al.*, 1998).

سنجش محتوی سیلی‌مارین

برای سنجش سیلی‌مارین به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر محلول ۲و ۴- دی‌نیترو فنیل‌هیدرازین-سولفوریک‌اسید (۱ گرم از ماده در ۲ میلی‌لیتر سولفوریک اسید حل و سپس توسط متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) اضافه و به‌مدت ۵۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. پس از سرد شدن محلول، با افزودن پتاس متانولی ده درصد، به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه به ۱ میلی‌لیتر از محلول، ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه و محلول سانتریفیوژ شد. به محلول رویی ۲۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و سانتریفیوژ دوباره تکرار شد. در انتها محتویات توسط متانول به حجم۵۰ میلی‌لیتر رسانده و جذب نوری محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد (Hasanloo *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

فعالیت آنزیم PAL براساس سنجش تولید سینامیک‌اسید به‌عنوان فرآورده واکنش تعیین شد. ابتدا به ۱ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین ۰/۰۲ مولار به‌همراه ۲ میلی‌لیتر بافر تریس و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. بلافاصله جذب اولیه نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر، هر ۵ دقیقه به‌مدت ۱ ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر UV خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی سینامیک‌اسید محاسبه و برحسب میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Yan *et al.*, 2006).

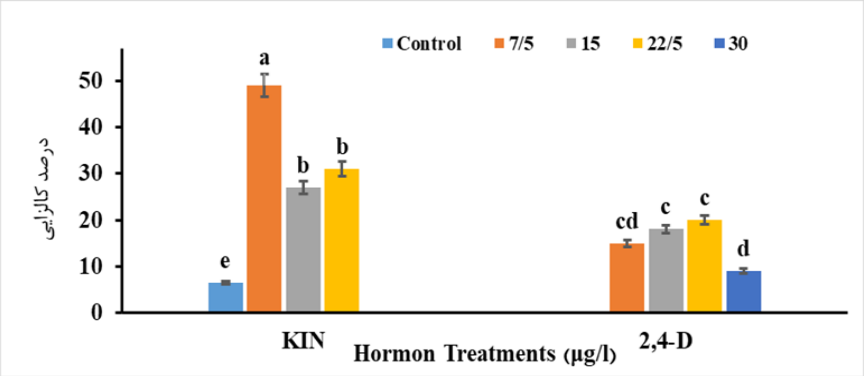
[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

آزمایش اول در قالب طرح کاملا تصادفی و آزمایش دوم به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. مشاهدات با استفاده از نرم‌افزار SPSS(نسخه ۲۷) تجزیه و تحلیل آماری شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($P\leq0.01$) استفاده شد و نمودارهای مربوطه به وسیله نرم‌افزار EXCEL (آفیس ۲۰۱۶) رسم شدند.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ گیاه خارمریم نشان داد که کاربرد مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه تاثیر معنی‌داری بر درصد کال‌زایی ریزنمونه‌ها دارد. نتایج مقایسه میانگین مشاهدات حاکی از آن بود که غلظت ۷/۵ میکروگرم در لیتر هورمون KIN بیشترین تاثیر را در افزایش درصد کالوس‌زایی داشت و تفاوت آن با تیمار شاهد و غلظت ۲۲/۵ میکروگرم در لیتر معنی‌داربود. کاربرد غلظت‌های ۱۵ و ۲۲/۵ میکروگرم در لیتر هورمون KIN ازحیث نرخ کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری نداشتند.



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون KIN و 2,4-D بر درصد کال‌زایی ریزنمونه‌های برگی گیاه خارمریم.
میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 1. The effect of different concentrations of KIN and 2,4-D on the percentage of callus formation for leaf explants of *Silybum marianum.*
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test) $P\leq0.01$)

اثرات الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر صفات بیوشیمیایی کالوس های حاصل از ریزنمونه های برگی گیاه خار مریم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که الیسیتورها تاثیر معنی‌داری بر محتوی مشتقات فنلی، ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان سیلی‌مارین و فعالیت آنزیم PAL کالوس‌ها داشتند (جدول ۱).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

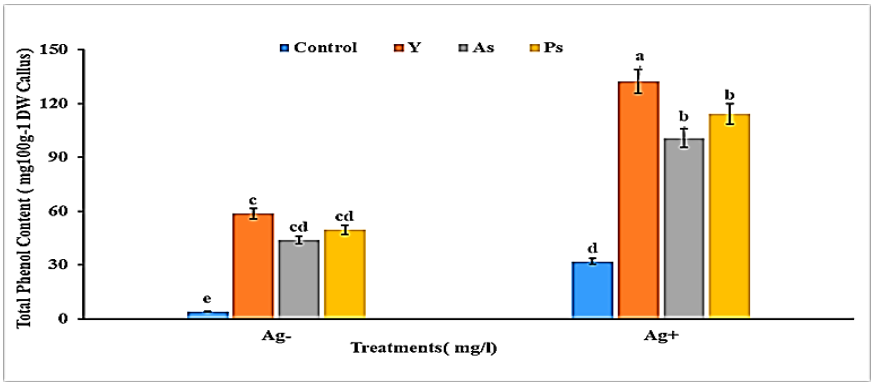
جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوی فنل‌کل، فلاونوئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)، فلاون، سیلی‌مارین،O-D فنل ، PAL کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ خارمریم

Table 1. Analysis variance for content of phenol, flavonoid, antioxidant capacity (DPPH), flavon, silymarin, O-D phenol and PAL activity of *Silybum marianum callus*

				MS				
Source	Df	Phenol	Flavonoid	DPPH	Flavon	Silymarin	OD-Phenol	PAL
Abiotic	1	1781.193**	7130.913**	22377.318**	10974.354**	38.131**	0.091**	18.340**
Biotic	3	7261.411**	2461.157**	3160.637**	3675.588**	15.210**	0.046**	4.978**
Abiotic×Biotic	3	504.397**	91.366**	2245.115**	787.051**	14.873**	0.006**	0.935**
Error	16	66.030	18.551	33.270	21.633	0.013	0.00	0.085

** معنی‌داری در سطح احتمال خطای ($P\leq0.01$) است.

فنل کل: با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، برهم‌کنش بین الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تأثیر قابل توجهی بر غلظت ترکیبات فنلی موجود درکالوس‌ها داشت (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از افزایش محتوی ترکیبات فنلی در نتیجه کاربرد الیسیتورها است. بیشترین (۳۷/ ۱۳۲ میلی‌گرم درگرم وزن خشک) و کمترین (۴/۰۴ میلی‌گرم درگرم وزن خشک) محتوی فنل کل به‌ترتیب به ترکیب تیماری کاربرد مخمر در حضور نیترات نقره و تیمار شاهد (عدم کاربرد نیترات نقره و الیسیتور) مربوط بود. محتوی ترکیبات فنلی در ترکیب تیماری کاربرد مخمر و در حضور نیترات نقره با سایر ترکیبات تیماری و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت. به‌طور کلی در محیط دارای نیترات نقره، کاربرد الیسیتورها از نظر بهبود محتوی ترکیبات فنلی موثرتر از محیط فاقد نیترات نقره بود. در این آزمایش کاربرد نیترات نقره به تنهایی و در شرایط عدم کاربرد الیستورها، محتوی ترکیبات فنلی را به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد اگر چه از نظر کمی این افزایش نسبت به کاربرد اغلب الیسیتورها معنی دار نبود (شکل ۲)

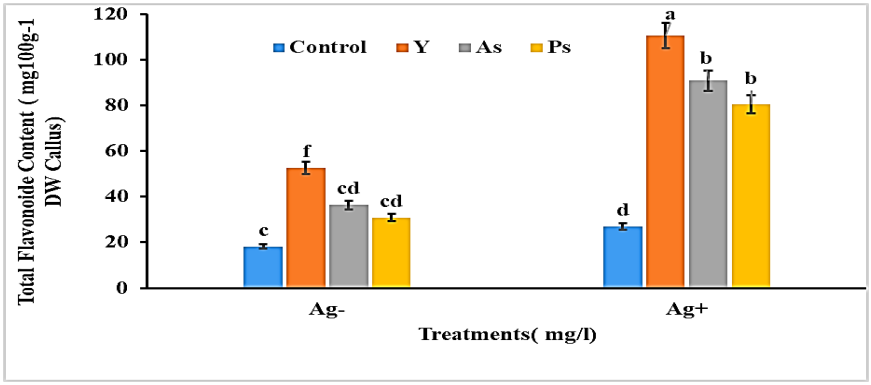


شکل۲- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فنل کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم(Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 2. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^- represent to with and without Ag application respectively.
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

فلاونوئید کل: بر اســـاس نتایج حاصـــل از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها، تعامل بین الیســـیتورهای زیســـتی و غیرزیســـتی تـأثیر قـابـل توجهی بر ســـطوح ترکیبـات فلاونوئیـد موجود در کـالوس‌هـا داشـــت (جـدول۱). نتـایج محتوی فلاونوئیـد کـل در تیمارهای مورد بررسی دارای الگوی مشابهی با نتایج محتوی فنل کل می‌باشـد. کاربرد الیســـتورهای مختلف به‌صـــورت معنی‌داری محتوی فلاونوئید کل را نســـبت به شـــاهد افزایش دادند و این افزایش در شـرایط حضـور نیترات نقره به‌صـورت معنی‌داری بیشـتر بود. بـالاترین محتوی فلاونوئیـد کـل (۱۱۰/۷۴ میلی‌گرم درگرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمریارووییا لیپولیتیکا و حضـور نیترات نقره مربوط بود که با سـایر سـطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشـــت. در این آزمایش تاثیر نیترات نقره در تمامی سطوح کاربرد الیسیتورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیسیتور) معنی‌دار و از نظر بهبود محتوی فلاونوئیـد کـل افزایشـــی و تحریک‌کننده بود. تیمار کاربرد باکتری ســـودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر هم در حضور نیترات نقره و هم در محیط فاقد نیترات نقره از نظر محتوی فلاونوئیـد کـل تفـاوت معنی‌داری نداشـتند ولی محتوی فلاونوئید کل در شـرایط حضـور نیترات نقره بـه‌صـــورت معنی‌داری بیشـــتر از محیط فـاقـد نیترات نقره بود (شکل۳)

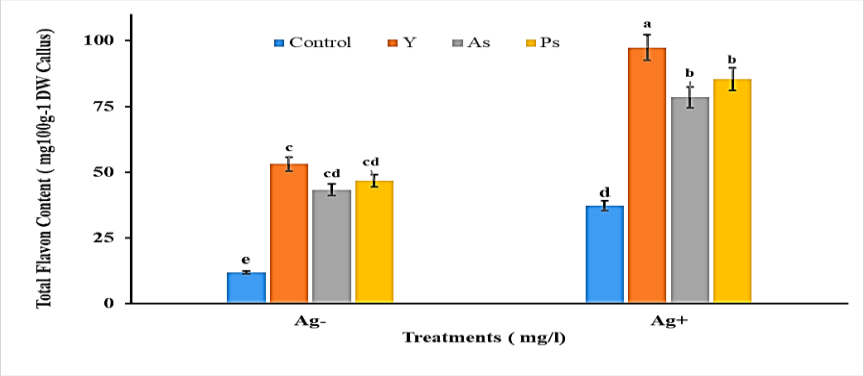


شکل۳- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فلاونوئید کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم(Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 3 . Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

فلاون کل: تجزیه و آنالیز واریانس داده‌های مربوط به میزان فلاون مشـخص نمود که اثربرهم‌کنش الیســیتورهای زیســتی و غیرزیستی تأثیر معنی‌داری بر محتوای فلاون کالوس‌ها داشت بود (جدول۱). نتایج تجزیه واریانس مشـاهدات نشـان داد که تاثیر بر همکنش الیسیتورهای زیستی و نیترات نقره بر محتوی فلاون کل معنی دار ($P\leq0.01$) بود. الیستورهای مختلف، در شرایط وجود و عدم وجود نیترات نقره به‌صـورت معنی‌داری محتوی فلاون کل را نسبت به شاهد افزایش دادند ولی این افزایش در شرایط حضور نیترات نقره به‌صـــورت معنی‌داری بیشـــتر بود. بالاترین محتوی فلاون کل (۹۷/۳۴ میلی‌گرم درگرم وزن خشـــک) به اســـتفاده هم‌زمان ترکیب تیماری کاربرد مخمریاروویا لیپولیتیکا و نیترات نقره مربوط بود که با ســـایر ســـطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشـت. تیمار کاربرد باکتری سـودوموناس پوتیدا و آسـپرژیلوس نایجر فقط در حضور نیترات نقره از نظر محتوی فلاون کل تفاوت معنی‌داری داشـتند. محتوی فلاون کل در شـرایط حضـور نیترات نقره به‌صـــورت معنی‌داری بیشـــتر از محیط فاقد نیترات نقره بود (شکل۴).

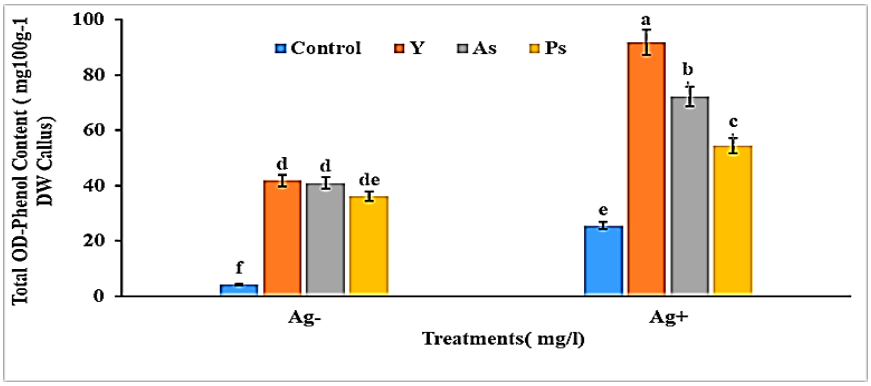
[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]



شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فلاون کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 4. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors.(Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

O-D فنل کل : براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تأثیر معنی‌داری بر محتوای ترکیبات O-D فنلی کالوس‌ها داشتند (جدول۱). در این آزمایش تاثیر بر همکنش الیسیتور و نیترات نقره بر محتوی O-D فنل کل معنی‌دار بود (جدول ۱). کاربرد الیستورهای مختلف به‌صورت معنی‌داری محتوی O-D فنل کل را نسبت به شاهد افزایش دادند، که این افزایش در شرایط استفاده هم‌زمان الیسیتور و نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی O-D فنل کل (۹۱/۸۸ میلی‌گرم درگرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمریاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترات نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترات نقره تفاوت معنی‌داری با سایر ترکیبات تیماری داشتند ولی در محیط فاقد نیترات نقره از این حیث تفاوت معنی‌داری نداشتند. محتوی O-D فنل کل در شرایط حضور نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترات نقره بود (شکل۵).

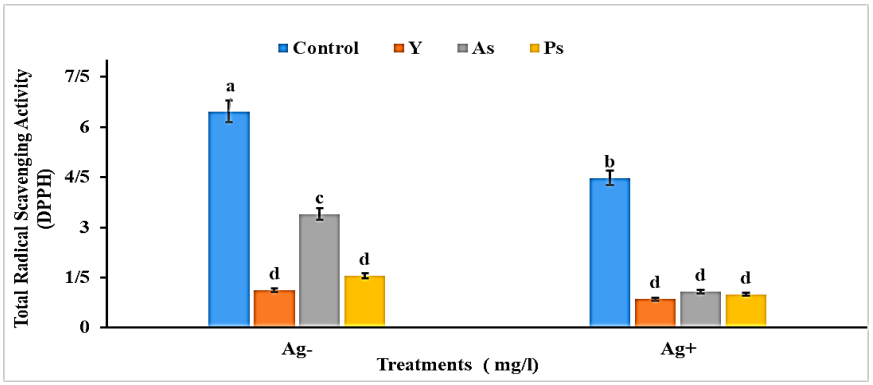


شکل ۵- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات O-D فنل کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا . Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 5. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی(DPPH): در این بررسی میزان IC50 برابر است با توانایی خاموش سازی ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره کالوس‌های حاصل از برگ گیاه خارمریم محاسبه شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها مشخص نمود که الیسیتورها به‌صورت مجزا و تلفیقی تأثیر معناداری بر توان آنتی‌اکسیدانی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ گیاه خارمریم داشت (جدول۱). در این بررسی بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی که نشان‌دهنده کمترین میزان IC50 است در نمونه‌های تیمار شده با الیسیتورهای مختلف مشاهده شد. در شرایط عدم کاربرد الیستورها (شاهد)، محتوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت معنی‌داری نسبت به دیگرتیمارها کاهش یافت (شکل ۶).

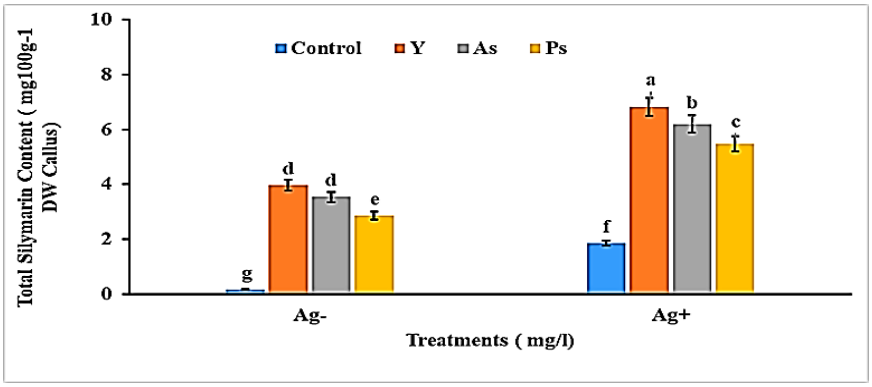


شکل۶- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا . Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 6. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

سیلی‌مارین: براساس بررسی‌های آماری، تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای سیلی‌مارین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ خارمریم معنادار بود (جدول۱). کاربرد الیستورهای مختلف به‌صورت معنی‌داری محتوی سیلی‌مارین را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش در شرایط حضور نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی سیلی‌مارین (۶/۸۲ میلی‌گرم درگرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمریاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترات نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. در این آزمایش تاثیر نیترات نقره در تمامی سطوح کاربرد الیسیتورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیسیتور) معنی‌دار و از نظر بهبود محتوی سیلی‌مارین افزایشی و تحریک‌کننده بود. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترات نقره و هم در محیط فاقد نیترات نقره از نظر محتوی سیلی‌مارین تفاوت معنی‌داری داشتند. محتوی سیلی‌مارین در شرایط حضور نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترات نقره بود (شکل۷).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]



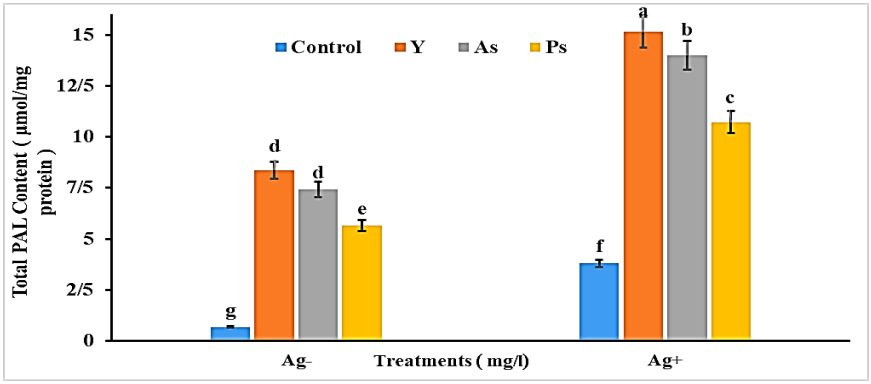
شکل ۷- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی سیلی‌مارین کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا . Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 7. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively

Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

PAL: نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که کاربرد الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به‌صورت معنی‌داری فعالیت آنزیم PAL را نسبت به شاهد افزایش داد (جدول۱). کاربرد الیستورهای مختلف به‌صورت معنی‌داری محتوی PAL را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش در شرایط حضور نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی PAL به ترکیب تیماری کاربرد مخمریاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترات نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. در این آزمایش تاثیر نیترات نقره در تمامی سطوح کاربرد الیسیتورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیسیتور) معنی‌دار و از نظر بهبود محتوی PAL افزایشی و تحریک‌کننده بود. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترات نقره و هم در محیط فاقد نیترات نقره از نظر محتوی PAL تفاوت معنی‌داری داشتند ولی محتوی PAL در شرایط حضور نیترات نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترات نقره بود (شکل۸).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]



شکل ۸- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر فعالیت آنزیم PAL در کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا . Ag^+ و Ag^- به‌ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین‌هایی که دارای حرف(حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 8. Mean values for total PAL content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*,(As) *Aspergollus niger*,(Ps) *Pseudomonas putida*, Ag^+ and Ag^-represent to with and without Ag application respectively
Means with a common letter(s) do not differ significantly according to the Duncan multiple range test ($P\leq0.01$)

بحث

یک راهکاربرای القای کال‌زایی و افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت‌بافت، استفاده از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی است (Kumar et al., 2011). در آزمایش حاضر نتایج بررسی درصد کال‌زایی نشان داد، در محیط‌های کشت حاوی هورمون KIN درصد کال‌زایی ریزنمونه‌ها به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در این ارتباط کاربرد غلظت ۷/۵ میکروگرم در لیتر هورمون KIN، نسبت به سایر سطوح تیماری موثرتر بود و لذا از این هورمون و سطح غلظت در ادامه آزمایش استفاده شد.

الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (Zhao et al.,2005). سیگنالی که توسط محرک ارسال می‌شود به‌وسیله گیرنده‌های سطح غشاء پلاسمایی دریافت و بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تنظیم می کند (Savitha et al., 2006). برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، راهکارهای فراوانی در کشت بافت و بیوتکنولوژی مطرح است. استفاده از عوامل محرک مانند: ترکیبات سیگنالی و تنش‌های غیرزنده از جمله این راهکارها می‌باشد (Hu & Du, 2006). نتایج بررسی ها در چندین گونه گیاهی حاکی از آن است که کاربرد دو یا چند الیسیتور به‌صورت ترکیبی می‌تواند به‌نحو موثری تولید متابولیت‌های ثانویه را در مقایسه با کاربرد انفرادی آنها افزایش دهد (Ahlawat et al.,2014; . Zheng et al.,2008; Lajayer et al.,2017; Piątczak et al.,2016; Wang et al.,2009; Gangopadhyay et al.,2011). نتایج آزمایش حاضر حاکی از افزایش محتوی ترکیبات فنلی در نتیجه کاربرد الیسیتورها و به‌ویژه ترکیب تیماری کاربرد مخمر در حضور نیترات نقره بود. در بسیاری از مطالعات، از عصاره مخمر برای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. در این ارتباط بررسی‌ها نشان می‌دهند که فعالیت مسیر شیکیمات در *Yarrowia lipolytica* بیشتر بوده (Savitha et al.,2006) و با افزودن فنیل‌آلانین میزان استیل‌کوآ و متعاقب آن نارینژنین نیز افزایش یافته است (Lv et al.,2019). در یک مطالعه مشخص شد که *Aspergillus niger* قادر به تولید سریع اسیدلینولنیک در pH بهینه پایین است (Li et al.,2020).

فلاونوئیدها و فلاون‌ها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه پلی فنولیک هستند که در گیاهان یافت می‌شوند. این ترکیبات دارای خواص زیستی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدان برای روبش رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Chu et al., 2000). محرک‌های زیستی مانند (*Yarrowia lipolytica*) در غلظت‌های مختلف برای انباشت ایزوفلاونوئید در HRCs از *Pueraria candollei* مورد مطالعه قرار گرفتند. در آزمایش فوق الیسیتور *Yarrowia lipolytica*

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

تاثیرگذارترین بود که باعث افزایش ۴/۵ برابری سطح ایزوفلاونوئید، ۱/۴ برابری آکتئوزید (یک فنیل‌اتانوئید گلیکوزید) و ۱/۷ برابری فلاون شد (Wilczańska-Barska et al.,2012). کاربرد خارجی *Yarrowia lipolytica* در ریشه‌های مویین *Pueraria candollei* موثرتر بود. در این راستا کاربرد مخمر به‌طور موثر رشد ریشه های مویین و محتوی فلاونوئیدها (روتین و کوئرستین) را از طریق تحریک مسیر فنیل پروپانوئید افزایش داد. (Udomsin *et al.*,2019). در آزمایش حاضر، بیشترین محتوی این دسته از ترکیبات فنلی (فلاونوئید و فلاون) به تیمار کاربرد خارجی مخمر در محیط دارای نیترات نقره مربوط بود.

یک پاسخ مهم سلول‌های گیاهی در برابر کابرد محرک‌ها، تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد که بسیار سمی هستند. ROSها به‌وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی کنترل می‌شوند (Lie et al., 2013). این کنترل توسط متابولیت‌هایی مانند آسکوربات، فلاونوئیدها و آنزیم‌هایی مانند: پراکسیدازها و پلی‌فنل‌اکسیداز انجام می‌شود (Wink, 2010). بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آن‌ها در گیاهان تغییر می‌کند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مخمر به‌همراه نیترات نقره از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان یک روبنده ROS عمل می‌کند (Harish, 2007).

فراوان‌ترین گروه ترکیبات فنولی، از فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند. یک مولکول آمونیاک از فنیل‌آلانین حذف و سینامیک اسید، تحت تاثیر فنیل آلانین آمونیالیاز تشکیل می‌گردد. فنیل‌آلانین آمونیالیاز در یک نقطه انشعابی بین متابولیسم اولیه و ثانویه قرار دارد، بنابراین واکنشی را که این آنزیم کاتالیز می‌کند، یک مرحله تنظیمی مهم در تشکیل بسیای از ترکیبات فنلی به حساب می‌آید (Taiz & Zeiger, 2010). تغییر در فعالیت PAL و سایر آنزیم‌ها می‌تواند نخستین گام برای پاسخ گیاه به تنش باشد. PAL به عنوان یکی از نشانگرهای عمده تنش محیطی در بافت‌های گیاهی مختلف به شمار می‌رود (Xu et al.,2006). در آزمایش ما بیشینه فعالیت آنزیم PAL در شرایط تیمار مخمر درترکیب با نیترات نقره حاصل شد.

بررسی ها موید آن است که فلزات سنگین از جمله نیترات نقره باعث تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود (Mithofer et al.,2004; Sheng & Citovsky, 1996). در مطالعه‌ای بر روی گیاه *Burgmansia candida* مشخص گردید، افزودن نیترات نقره و عصاره مخمر باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی این گیاه می‌شود (Sandra et al., 2000).

نتایج آزمایش حاضر نشان داد استفاده از الیسیتورهای زیستی همراه با نیترات نقره سبب افزایش مشتقات فنلی شده است.

نیترات نقره یک بازدارنده قوی در مسیرهای هدایت سیگنال های اتیلن می‌باشد. اتیلن فیتوهورمونی است که مسیرهای گیاهی از جمله رشد و پاسخ‌های دفاعی را تنظیم می‌کند. مسیر سیگنالینگ جاسمونیک اسید و اتیلن برای پاسخ های دفاعی ایجاد شده در مقابل تنش‌های محیطی ضروری هستند. شواهد محدودی نشان می‌دهد که تجمع متابولیت‌های ثانویه با اتیلن تحت تاثیر قرار می‌گیرند و این اثرات ممکن است مثبت یا منفی باشد (Shams-Ardakani et al.,2005). اثر مثبت نیترات نقره بر روی تولید متابولیت‌های ثانویه ممکن است منسوب به اثر بازدارندگی آن بر روی سنتز اتیلن یا فعالیت آن باشد.

الیسیتورهای غیرزنده به خوبی تنش‌های شوری و اسمزی باعث القا متابولیت ثانویه می‌شوند (Shams-Ardakani et al.,2005; Babar et al.,2006). در سلول‌های گیاهی که در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند، افزایش کلسیم سیتوسولی به‌عنوان پیش‌نیاز در بسیاری از سلول‌های تحت تیمار با محرک، سبب فعال شدن مراحل تولید ROSها می‌شود. ROSها باعث القا بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی و دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند فنیل‌آلانین آمونیالیازها می‌گردد (Fahrendorf et al.,1995). مسیر فنیل پروپانوئیدها منجر به سنتز فلاونوئیدها می‌شود. H2O2 و پراکسیداسیون چربی‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از مسیرهای اکتادکانوئیدها که سبب تولید جاسمونیک اسیدها و القا متابولیت‌های ثانویه می‌گردند، جلوگیری می‌کنند (Babar *et al.*,2006). حذف یون کلسیم از محیط کشت می‌تواند به افزایش تولید سیلی‌مارین در سوسپانسیون سلولی کمک کند (Sanchez- Sampedro et al.,2005).

نتیجه‌گیری

خارمریم، گیاهی ارزشمند از نظر ویژگی‌های دارویی است و هر روشی که با ایجاد کمترین آسیب و تغییر سبب تولید ترکیبات مفید دارویی آن شود، کارآمد و قابل توجه است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد کاربرد الیسیتورهای زیستی شامل مخمر یاروویا لیپولیتیکا، قارچ آسپرژیلوس نایجر و باکتری سودوموناس پوتیدا در کالوس های حاصل از ریز نمونه های برگی موجب بهبود تولید مشتقات فنلی، افزایش فعالیت آنزیم PAL و نیز محتوی سیلی‌مارین گیاه در شرایط *In vitro* شدند. کاربرد نیترات نقره در تمام سطوح کاربرد الیسیتور های زیستی نقش افزایشی و محرک در محتوی مشتقات فنلی و سیلی‌مارین گیاه داشت. در این

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

بررسی کاربرد مخمر یاروویا از نظر تاثیر بر مشتقات فنلی با سایر الیسیتور های زیستی هم در حضور نیترات نقره و هم در شرایط عدم حضور آن تفاوت معنی داشت. بنابراین در راستای بیش تولید متابولیت‌های دارویی حاصل از کالوس های خار مریم استفاده از مخمر یاروویا و نیترات نقره قویا توصیه می شود.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد از محل گرنت شماره ۵۸۰۷۳/۳ حمایت مالی شده است که بدین‌وسیله قدردانی میشود.

REFERENCES

Ahlawat, S., Saxena, P., Alam, P., Wajid, S. & Abdin, M. Z.2014. Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Journal of Plant Interactions, 9:1, 811-824, DOI: 10.1080/17429145.949885.

Ali, S. K., Abdel-Azim, N. S., Khalil, A. K., Hegazy, M. F., Mohamed, T. A., Hamed, A. R., Shams, K. A. & Hammouda, F. M. 2019. The potential of cultivated milk thistle by-products as cancer chemopreventive and anti-inflammatory drugs. Egyptian Pharmaceutical Journal 18(4):p 411-418, DOI: 10.4103/epj.epj_34_19.

Al-Karaki, G.N. 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhiza fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. Scientia Horticulture. 109: 1-7, DOI:10.1016/j.scienta.02.019.

Andrzejewska, J. & Sadowska, K. 2008. Effect of cultivation conditions on the variability and interrelation of yield and raw material quality in milk thistle (*Silybum marianum* (L) Gaertn) Scientiarum Polonorum Agricultura Agricultura. 7: (3),3 – 11.

Annegowda, H.V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A.A. & Mansor, S.M. 2012. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. Journal of Food Science and Technology 49(4): 510- 514, DOI: 10.1007/s13197-011-0435-8.

Babar, A. M., Yu K, W., Hahn, E. J. & Peak, K. Y. M. 2006. jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture Panax ginseng roots in bioreactors. Plant Cell Rep 25(6): 613- 620,DOI: 0.1007/s00299-005-0065-6

Bonfil, M., Bentebibel, S., Moyano, E., Palazon, J., Cusido, R. M., Eibl, R. & Pinol, M. T. 2007. Paclitaxel and baccatin III production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cells of Taxus baccata. Biologia Plantarum 4: 647- 652.

Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T. & Fernandez-Gutierrez, A. 2005. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 16;53(23):8918-25. DOI: 10.1021/jf0515680

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis 10:178-182.

Chen, W. H., Xu ,C. M., Zeng, J. L., Zhao, B., Wang, X. D. & Wang, Y. C. 2007. Improvement of echinacoside and acteoside production by two-stage elicitation in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. World Journal of Microbiology and Biotechnology23: 1451- 1458, DOI: 10.1007/s11274-007-9389-4.

Cheng X, Zhou, U .& Cui X. 2006. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in Cistanche deserticola cell suspension cultures by chitosan elicitor. Biotechnol J121(2): 253–260, DOI: 10.1016/j.jbiotec.07.012.

Cho, H. Y., Lee-Parsons, C. W. T., Yoon, SY. H., Rhe e, H. S. & Park, J. M. 2007. Enhanced benzophenanthridine alkaloid production and protein expression with combined elicitor in Eschscholtzia californica suspension cultures. Biotechnol Lett 29(12):,DOI: 10.1007/s10529-007-9469-4.

Duke, SO., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schrader, K.K., Aliotta, G., Oliva, A. & Romagni, J.G. 2002. Chemicals from nature for weed management. Weed Sci 50(2): 138– 151, DOI: 10.1614/0043-1745-050 (0138;Ipcfnf) 2.0.co:2.

Fenner, M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. Perspecives in plant Ecology, Evolution and Systematics, 1:78-91,DOI: 10.1078/1433-8319-00053.

Fahrendorf, T. Ni. W., Shorroosh, B. S. & Dixon, R. A. 1995. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XIX. Transcripttional activation of

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

oxidative pentose phosphate pathway genes at the onest of the isoflavanoid phytoalexin response. Plant Mob Biol 28(5): 885- 900, DOI: 10.1007/BF00042073.

Gangopadhyay, M., Dewanjee, S. & Bhattacharya, S. 2011. Enhanced plumbagin production in elicited Plumbago indica hairy root cultures. J. Biosci. Bioeng 111(6), 706–710, DOI:10.1016/j.jbiosc.02.003.

Glick, B.R. Penrose, D. & Wendo, M. 2001. Bacterial promotion of plant growth. Biotechnology Advance 19(2): 135-138, DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00065-3

Gopi,C., vatsala,T.M. & Afr.j. 2006 . In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R.Br . Journal / African Journal of Biotechnology 1215-1219.

Halder, M., Sarkar, S. & Jha, S. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Journal of Engineering Life Sciences 25: 19(12): 880–895, DOI: 10.1002/elsc. 00058.

Hasanloo, T., khavari nejad, A., Majidi, E., Ziai SA. & Shams-Ardakani, MR. 2004. Determination of flavonolinan of dried fruits of *silybum marianum* (L) Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. J. Medicinal Plants 4: 25- 32.(In Persian).

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. & Okuda, T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and scavenging effects. Chemistry and Pharmaceutical Bulletin. 36(6): 2090-2097, DOI: 10.1248/cpb.36.2090.

Hu, Z. B. & Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. J. of Integrative Plant Biol 48: 121- 7, DOI: 10.1111/j.1744-7909.00121.x.

Ionkova I. 2007. Biotechnological Approaches for the Production of Lignans. Phcog Rev1: 427- 443.

Kumar, L., Ramalakshmi, M. & Sivakumar, U. 2011. Production of microbial oils from Mortierella sp for generation of biO-Diesel livestock. African Journal of Microbiology Research. 24:4105-411, DOI: 10.5897/AJMR11.277.

Komaraiah, P., Reddy, G .V., Raghvendra, A. S., Ramakrishna, S. V. & Reddanna, P. 2003. Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. Biotechnol Lett 25: 593- 597.

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knezevic, S.A.N.D.A. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharmaceutica-Zagreb 54 (1): 65- 72.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R. & Wu, H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry, 148:80–89, DOI: 10.1016/j.plaphy.01.006.

Lv. Y., Marsafari, M., Koffas, M., Zhou, J. & Xu, P. 2019 b. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. ACS Synthetic Biology 8(11): 2514-2523, DOI: 10.1021/acssynbio.9b00193.

Matkowski, A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants A review. Biotech. Adv 26(6): 548–560, DOI: 10.1016/j.biotechadv.07.001.

Mithofer, A., Schulze, B. & Bolvand W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants evidence for common signals. FEBS Letters 566 (1-3) 1- 5, DOI: 10.1016/j.febslet.04.011.

Namdeo, A. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Phcog Rev1: 320-345.

Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F. & Aminkhani, A. 2014. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.) 11: 6317, DOI:10.1186/s13588-014-0011-0 .(In Persian).

Oksman-Caldentey, K.M. & Inze, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce 409 designer secondary metabolites. Trends in Plant Science, 9:433-440, DOI: 10.1016/j.tplants.07.006

Park, B. J., Tsunetsugu, Y., Kasetani ,T., Morikawa, T., Kagawa, T. & Miyazaki, Y. 2009. Physiological effects of forest recreation in a young conifer forest in Hinokage Town, Japan. Silva Fennica vol. 43 no. 2 article id 213, DOI:10.14214/sf.213.

Piątczak, E., Kuźma, Ł. & Wysokińska, H. 2016. The influence of methyl jasmonate and salicylic acid on secondary metabolite production in *Rehmannia glutinosa* Libosch. hairy root culture. Acta Acta biologica Cracoviensia. Series botanica. Ser. Bot58, 57–65, DOI:10.1515/abcsb-0004.

Polle, A. & Rennenberg, H. 1993. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: Mansfield T, Fowden L, Stoddard F. (ed.): Plant Adaptation to Environmental StressChapman and Hall, London 263- 273.

Rafiee, H., Naghdi badi, H., mehrafarin, A., Qaderi, A., Zarinpanjeh, N., Sekara, A. & Zand, E. 2016. Application of plant biostimulants as new approach to improve the biologival

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

responses of medical plant. A critical review. Journal of medicinal plants. 15(59): 6-39.

Rahimi Ashtiani, S., Hasanloo, T. & Bihamta, M. R. 2010. Enhanced production of silymarin by Ag^{+} elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. Journal of Pharmaceutical Biology 48(6):708-715,DOI: 10.3109/13880200903264426 .(In Persian).

Sanchez- Sampedro, M. A., Fernandez- Tarrago, J. & Crchete, P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonat-induced silymarin production in cell cultures of *silybum marianum* L. Gaernt. J. biotech 119(1): 60- 69, DOI: 10.1016/j.jbiotec.06.012.

Sandra, I., Pitta-Alvarez, T., Spollansky, C. & Giulietti, A. M. 2000. 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 Technology 26: 252- 258, DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00137-4.

Sanchez- Sampedro, M. A., Fernandez- Tarrago, J. & Crchete, P. 2006. Enhanced silymaril accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *silybum marianum* L. Gaernt. Plant Physiology 164(10): 669- 674, DOI: 10.1016/j.jplph.2005.01.012.

Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. & Ravishankar, G.A. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of Beta vulgaris in shake-flask and bioreactor. Process Biochem. 41: 50 – 60, DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.071.

Shams- Ardakani, M. R., Hemmati, S. & Mohagheghzadeh, A. 2005. Effect of elicitors on the enhancement of podophylotying biosynthesis in suspension cultures of *Linum album*. Daru 13(2): 56- 60.(In Persian.)

Sheng, J. & Citovsky, V. 1996. Agrobacterium-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. The plant Cell 8: 1699- 1710, DOI:10.1105/tpc.8.10.1699.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K. & Shukla, S. 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food and Chemical Toxicology, 47(9) :2338-2343, DOI: 10.1016/j.fct.06.024

Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152- 178, DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

Stamford, N. P., Silva, J. A., Freitas, A. D. S. & Araujo Filho, J. T. 2002. Effect of sulphur inoculated with Acidithiobacillus in a saline soil grown with Leucena and mimosa tree legumes. Journal of Bioresource Technology. 81: 53- 59, DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00099-2.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2010. Plant Physiology.SinaueAssociates. Sunderland,782pp.

Udomsin, O., Yusakul, G., Kraithong, W. & Udomsuk, L. 2019. Enhanced accumulation of high-value deoxymiroestrol and isoflavonoids using hairy root as a sustainable source of *Pueraria candollei* var. mirifica. Plant Cell Tissue and Organ Culture 136(1), 141–151, DOI:10.1007/s11240-018-1500-z

Vasconsuelo A. & Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci 172: 861-875, DOI: 10.1016/j.plantsci.01.006.

Wang, C. H., Zheng, L. P., Tian, H. & Wang, J. W. 2016. Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. J. Photochem. Photobiol. B 159, 93–100, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.01.012.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Zhang, B. & Zou, T. 2009. Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. Appl. Microbiol. Biotechnol 85, 285–292, DOI: 10.1007/s00253-009-2090-9.

Wilczańska-Barska, A., Królicka, A., Głód, D., Majdan, M., Majdan, M., Kawiak, A. & Krauze-Baranowska, M. 2012. Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation. Biotechnol. Lett 34, 1757– 1763, DOI: 10.1007/s10529-012-0963-y.

Xu, M., Dong ,J. & Zhu, M. 2006. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. Suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. Science in China Series C: Life Science 49(4): 4: 379- 389, DOI: 10.1007/s11427-006-2010-5.

Yan,Q., Shi, M., Ng, J. & Wu, J.Y. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhizahairy* roots. Plant Science 170(4),pp.853-858, DOI: 10.1016/j.plantsci.12.004.

Yu Z, Fu CX, Han YC. & Li YX. 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnol Lett8:1027–1031, DOI: 10.1007/s10529-006-9035-5.

Zhang, Y., Mian, M.R. & Bouton, J.H. 2009. Recent Molecular and Genomic Studies on Stress Tolerance of Forage and Turf Grasses. Cross

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]
[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]

Cultural Research, 46:497– 511. DOI: 10.2135/cropsci2004.0572.

Zhao J, Davis LC. & Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv 23(4): 283–333, DOI: 10.1016/j.biotechadv.01.003.

Zhao, J. & Sakai, K. 2003. Peroxidases are involved in the biosynthesis and biodegradation of hthujaplicin in fungal elicitor-treated *Cupressus lusitanica* suspension cultures. New Phytol 159(3): 719- 31, DOI: 10.1046/j.1469-8137. 00841.x.

Zhao, J., Zheng, S. H., Fujita, K. & Sakai, K. 2004. Jasmonate and ethylene signalling and their interaction are integral parts of the elicitor signalling pathway leading to β-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures 55: 1003- 12, DOI: 10.1093/jxb/erh127.

Zheng, L. P., Guo, Y. T., Wang, J. W. & Tan, R. X. 2008. Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. J. Integr. Plant Biol 50(1), 49–55, DOI: 10.1111/j.1744-7909.00589.x.

*****

How to cite this article:

Bahrami, R., Ganjeali, A &Abrishamchi, P. 2024. Investigating effects of biotic and a-biotic elicitors on the content of phenolic derivatives and silymarin in *silybum marianum* L.Gaernt *in vitro* 11:17-31.(In persian).

بهرامی، ر.، گنجعلی، ع. و ابریشم‌چی، پ. ۱۴۰۳. بررسی اثرات الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی مشتقات فنلی و سیلی‌مارین گیاه خارمریم(*Silybum marianum* L.Gaernt)در شرایط *In vitro*. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۱: ۱۷-۳۱ .

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-12-31]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1403.11.3.2.6]

[DOI: 10.22034/NBR.11.3.17]