

بررسی اثرات الیستورهای 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 الیستورهای زیستی و نیترات نقره بر محتوی متابولیت‌های ثانویه کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ 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 الیستور 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 توأم مخمر یاروویا و نیترات نقره موجب بهبود محتوی مشتقات فنلی، سیلی‌مارین و فعالیت آنزیم پال گردید و تفاوت آن با سایر الیستورهای 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 Bahrami¹, Ali Ganjeali^{1*} & Parwaneh Abrishamchi¹¹ 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: ۱۴۰۳/۰۴/۳۰، اصلاح: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳، پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۰، انتشار: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش اقتصادی بالایی در حوزه سلامت و بهداشت جهانی برخوردار هستند (Duke et al., 2002). ارزش دارویی این گیاهان عمدتاً به دلیل ترکیباتی است که توسط این گیاهان سنتز و در صنایع دارویی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Park et al., 2009). به دلیل استفاده بی‌رویه از گیاهان دارویی، بسیاری از افراد به طب سنتی روی آورده‌اند. ترکیبات دارویی گیاهان به دلیل 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 فلاونوئیدها شامل سیلیبین A و B، ایزوسیلیبین A و B، سیلیدیانین، سیلی کریستین و فلاونوئید تاکسی‌فولین تشکیل شده است. دانه‌های گیاه حاوی فلاونوئیدها، دیگری مانند: بتائین، اپیزین، سیلیبون، پروتئین‌ها، روغن ثابت و اسیدهای چرب آزاد می‌باشند (Abdel Azim et al., 2019).

در سال‌های اخیر، کشت بافت گیاه در شرایط *in vitro* به عنوان 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 موین، تولید مداوم و مستقل از فصل این ترکیب را در مقیاس بالا توسط سیستم بیوراکتور ممکن ساخته است. گیاهان عالی علاوه بر 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 (کتین

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 نهایتاً بیش تولید این متابولیت‌ها است (Rahimi Ashtiani et al., 2010). بررسی‌ها نشان داده است؛ اتصال برخی ترکیبات فوق به گیرنده‌های آنزیمی سبب افزایش فعالیت لیپواکسیژنازی 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 به منظور تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول گیاهان به کار 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 *Trichocomaceae*، 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 به عنوان 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 lipolytica* 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 *Pseudomonadaceae* می‌باشد.

دست دادن آب، توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ (Sartorius, TE 313s Germany) ثبت شد. مرحله دوم آزمایش با هدف بررسی تاثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوی مشتقات فنلی گیاه در شرایط *vitro In* انجام شد. محیط کشت حاوی KIN (۷/۵ میکروگرم در لیتر) که برمبنای صفات کال زایی (بیشینه نرخ کال زایی و وزن خشک کالوس‌ها در آزمایش اول) به عنوان محیط هورمونی منتخب در نظر گرفته شد. پس از تهیه محیط MS و کاشت ریز نمونه، نمونه‌ها به مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با نمایان شدن نشانه‌های کال زایی، نمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند پس از پایان هفته ششم و واکنش کالوس‌های القا شده، الیستورهای مخمر یاروویا لیپولیتیکا، باکتری سودوموناس پوتیدا، قارچ آسپرژیلوس نایجر و نیترا نقره به صورت مجزا و همچنین همراه با نیترا نقره به کالوس‌ها اضافه شد. در پایان هفته هشتم، به منظور بررسی صفات بیوشیمیایی، کالوس‌ها جمع‌آوری و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای اندازه گیری و سایر سنجش‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند.

عصاره‌گیری برای سنجش ترکیبات فنلی

به منظور استخراج ترکیبات فنلی، عصاره‌گیری از بافت کالوس با استفاده از روش Annegowda و همکاران (2012) انجام شد. کالوس‌های سبز ۸ هفته‌ای به مدت 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 به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Japan, Parsonic, 2600S) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس 28 ± 5 (KHz) قرار داده شدند و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و به مدت 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 میلی لیتر از عصاره به دست آمده (۱ میلی گرم بر میلی لیتر در متانول)، با ۱/۲۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتو (v/v) ۱۰ درصد مخلوط گردید. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه از محلول

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. الیستورهای غیرزیستی یا عوامل تنشی مانند اشعه ماورا بنفش، فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی مانند نیترا نقره، با مکانیسم‌های عمل متفاوت در کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Yu et al., 2006; Matkowski, 2008). فلزات سنگین مانند نقره به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های فلزی، برای رشد و نمو 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 الیستورهای فوق بر محتوی متابولیت‌های ثانویه فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کالوس‌های 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 کال زایی 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) به مدت ۳ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد (v/v) به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. در ادامه ریزنمونه‌ها سه نوبت با آب مقطر استریل شستشو و نهایتاً زیر هود لامینار 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 به مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با نمایان شدن نشانه‌های کال زایی، 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 (مدل ۵-۱۴۸۶ شرکت Memmert، آلمان) و از

بر مبنای منحنی استاندارد گالیک اسید با استفاده از معادله $Y = 0.0042x + 0.067$ محاسبه شد و بر حسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه های کالوس ارائه گردید.

بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، ابتدا، به حجم های مختلف عصاره های متانولی کالوس حاصل از هر تیمار (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ میکرو لیتر)، ۱۰۰ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد. سپس به هر لوله حاوی عصاره متانولی، ۰/۵ میلی لیتر معرف DPPH (Sigma- Aldrich) اضافه گردید. تمامی لوله ها بعد از ورتکس شدید، به مدت 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 $IC_{50} = \{(A \text{ blank} - \text{عصاره های متانولی از طریق فرمول درصد} - A \text{ blank}) / A \text{ blank}\} \times 100$ (Hatano et al., 1998).

سنجش محتوی سیلی مارین

برای سنجش سیلی مارین به ۱ میلی لیتر از عصاره، ۲ میلی لیتر محلول ۲ و ۴- دی نیترو فنیل هیدرازین- سولفوریک اسید (۱ گرم از ماده در ۲ میلی لیتر سولفوریک اسید حل و سپس توسط متانول به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) اضافه و به مدت ۵۰ دقیقه در بن ماری ۵۰ درجه سانتی گراد قرارداد شد. پس از سرد شدن محلول، با افزودن پتاس متانولی ده درصد، به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. در ادامه به ۱ میلی لیتر از محلول، ۲۰ میلی لیتر متانول اضافه و محلول سانتی فیوژ شد. به محلول رویی ۲۰ میلی لیتر متانول افزوده و سانتی فیوژ دوباره تکرار شد. در انتها محتویات توسط متانول به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده و جذب نوری محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد (Hasanloo et al., 2005).

اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز (PAL)

فعالیت آنزیم PAL بر اساس سنجش تولید سینامیک اسید به عنوان فرآورده واکنش تعیین شد. ابتدا به ۱ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۱ میلی لیتر فنیل آلانین ۰/۲ مولار به همراه ۲ میلی لیتر بافر تریس و ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد. بلافاصله جذب اولیه نمونه ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر، هر ۵ دقیقه به مدت ۱ ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر UV خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی سینامیک اسید محاسبه و بر حسب میکرومول بر میلی گرم پروتئین گزارش شد (Yan et al., 2006).

کربنات سدیم (w/v) ۷/۵ درصد ۱ میلی لیتر به آن اضافه شد و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در محیط تاریک و دمای محیط نگهداری شدند. جذب محلول ها توسط دستگاه طیف سنج نوری (UV/Visible, Jasco, Japan) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد (Singleton et al., 1999). برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. در نهایت غلظت فنل کل در هر واحد آزمایشی معادل میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد $Y = 0.0046x - 0.0136$ محاسبه شد.

سنجش محتوی فلاونوئید کل

جهت اندازه گیری محتوی فلاونوئید کل، ۰/۲ میلی لیتر عصاره به دست آمده (۱ میلی گرم بر میلی لیتر در متانول) با ۴۰ میکرو لیتر آلومینیم کلراید (w/v) ۱۰ درصد، ۴۰ میکرو لیتر استات پتاسیم ۱ مولار، ۰/۶ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد و ۱/۱۲ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شدند. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری نمونه ها در دمای اتاق، جذب محلول ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج 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 واحد آزمایشی معادل میلی گرم 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 میکرو لیتر آلومینوم کلراید ۱۰ درصد (w/v)، ۵۰ میکرو لیتر پتاسیم استات ۱ مولار به ۲۵۰ میکرو لیتر عصاره اضافه شد. در ادامه ۷۵۰ میکرو لیتر متانول ۸۰ درصد (v/v) و ۱/۴ میلی لیتر آب مقطر به هر نمونه اضافه و به حجم نهایی ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد (Kosalec et al., 2004) و در ادامه جذب محلول ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. محتوی فلاون عصاره ها بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین و معادله خط $Y = 0.0022x - 0.007$ محاسبه و بر حسب میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه گزارش گردید.

سنجش محتوی ارتو- دی فنل کل

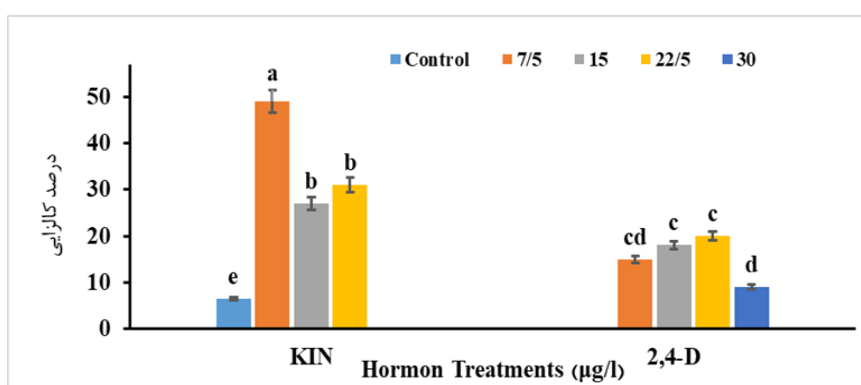
برای سنجش محتوی ارتو- دی فنل نمونه ها، ۲ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد (v/v) و ۰/۵ میلی لیتر سدیم مولیبدات دو آبه (w/v) به ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره متانولی هر نمونه اضافه شد. جذب نوری نمونه ها بعد از ۱۸ دقیقه در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت شد (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). محتوای ارتو- دی فنل

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

آزمایش اول در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش دوم به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً 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 ($P \leq 0.01$) 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 معنی‌دار بود. کاربرد غلظت‌های ۱۵ و ۲۲/۵ میکروگرم در لیتر هورمون KIN از حیث نرخ کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری نداشتند.



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون KIN و 2,4-D بر درصد کال‌زایی ریزنمونه‌های برگ گیاه خارمریم.

میانگین‌هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 0.01$) 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 ($P \leq 0.01$)

آنتی‌اکسیدانی، میزان سیلی‌مارین و فعالیت آنزیم PAL کالوس‌ها داشتند (جدول ۱).

اثرات الیستورهای زیستی و غیر زیستی بر صفات بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ گیاه خارمریم
نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که الیستورها تاثیر معنی‌داری بر محتوی مشتقات فنلی، ظرفیت‌های

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوی فنل کل، فلاونوئید، ظرفیت آنتی اکسیدانی (DPPH)، فلاون، سیلی مارین، O-D فنل PAL، کالوس های حاصل از ریزنمونه برگ خارمریم

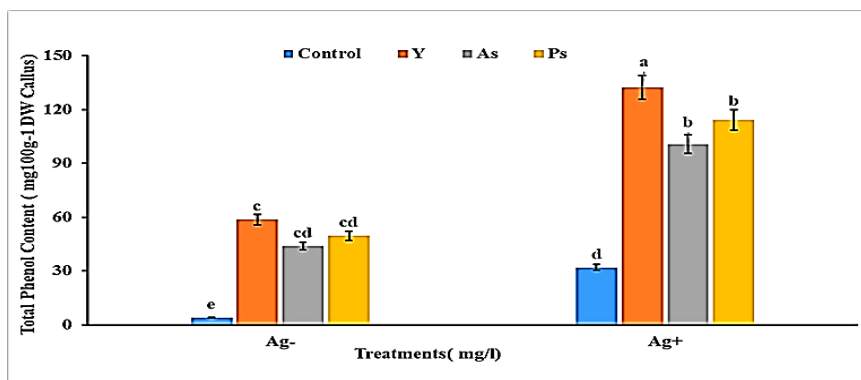
Table 1. Analysis variance for content of phenol, flavonoid, antioxidant capacity (DPPH), flavon, silymarin, O-D phenol and PAL activity of *Silybum marianum callus*

				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

** معنی داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) است.

در ترکیب تیماری کاربرد مخمر و در حضور نیترات نقره با سایر ترکیبات تیماری و تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت. به طور 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 الیسیتورها، محتوی ترکیبات فنلی را به صورت معنی داری نسبت به شاهد افزایش داد اگر چه از نظر کمی این افزایش نسبت به کاربرد اغلب الیسیتورها معنی دار نبود (شکل ۲)

فنل کل: با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها، برهم کنش بین الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تأثیر قابل توجهی بر غلظت ترکیبات فنلی موجود در کالوس ها داشت (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها حاکی از افزایش محتوی ترکیبات فنلی در نتیجه کاربرد الیسیتورها است. بیشترین ($132/37$ میلی گرم در گرم وزن خشک) و کمترین ($4/04$ میلی گرم در گرم وزن خشک) محتوی فنل کل به ترتیب به ترکیب تیماری کاربرد مخمر در حضور نیترات نقره و تیمار شاهد (عدم کاربرد نیترات نقره و الیسیتور) مربوط بود. محتوی ترکیبات فنلی



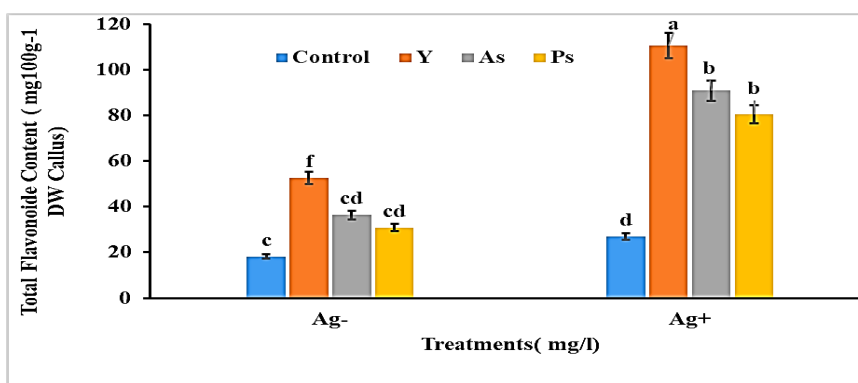
شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فنل کل کالوس حاصل از ریزنمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا، Ag^+ و Ag^- به ترتیب محیط دارای نیترات نقره و بدون نیترات نقره میانگین هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 2. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*, (As) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

حضور نیترا نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. در این آزمایش تاثیر نیترا نقره در تمامی سطوح کاربرد الیستورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیستور) معنی‌دار و از نظر بهبود محتوی فلاونوئید کل افزایشی و تحریک‌کننده بود. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر هم در حضور نیترا نقره و هم در محیط فاقد نیترا نقره از نظر محتوی فلاونوئید کل تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی محتوی فلاونوئید کل در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترا نقره بود (شکل ۳)

فلاونوئید کل: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها، تعامل بین الیستورهای زیستی و غیرزیستی تأثیر قابل توجهی بر سطوح ترکیبات فلاونوئید موجود در کالوس‌ها داشت (جدول ۱). نتایج محتوی فلاونوئید کل در تیمارهای مورد بررسی دارای الگوی مشابهی با نتایج محتوی فنل کل می‌باشد. کاربرد الیستورهای مختلف به‌صورت معنی‌داری محتوی فلاونوئید کل را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی فلاونوئید کل (۱۱۰/۷۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمر یاروویا لیپولیتیکا و

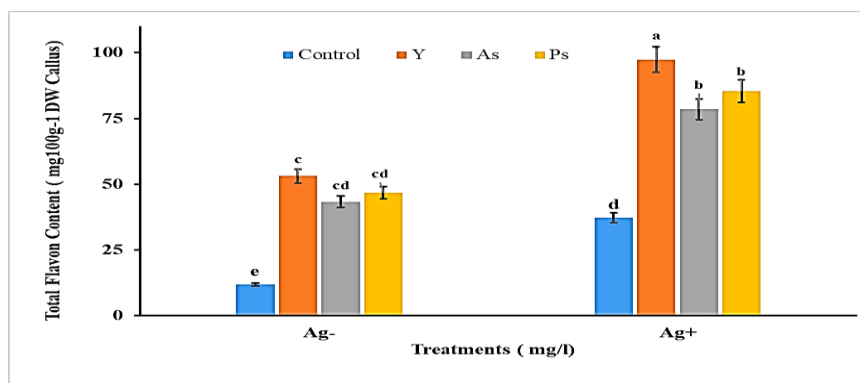


شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فلاونوئید کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^- و Ag^+ به ترتیب محیط دارای نیترا نقره و بدون نیترا نقره میانگین‌هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 3 . Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*, (As) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

فلاون کل (۹۷/۳۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) به استفاده هم‌زمان ترکیب تیماری کاربرد مخمر یاروویا لیپولیتیکا و نیترا نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر فقط در حضور نیترا نقره از نظر محتوی فلاون کل تفاوت معنی‌داری داشتند. محتوی فلاون کل در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترا نقره بود (شکل ۴).

فلاون کل: تجزیه و آنالیز واریانس داده‌های مربوط به میزان فلاون مشخص نمود که اثر برهم‌کنش الیستورهای زیستی و غیرزیستی تأثیر معنی‌داری بر محتوی فلاون کالوس‌ها داشت بود (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که تاثیر بر هم‌کنش الیستورهای زیستی و نیترا نقره بر محتوی فلاون کل معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود. الیستورهای مختلف، در شرایط وجود و عدم وجود نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری محتوی فلاون کل را نسبت به شاهد افزایش دادند ولی این افزایش در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی

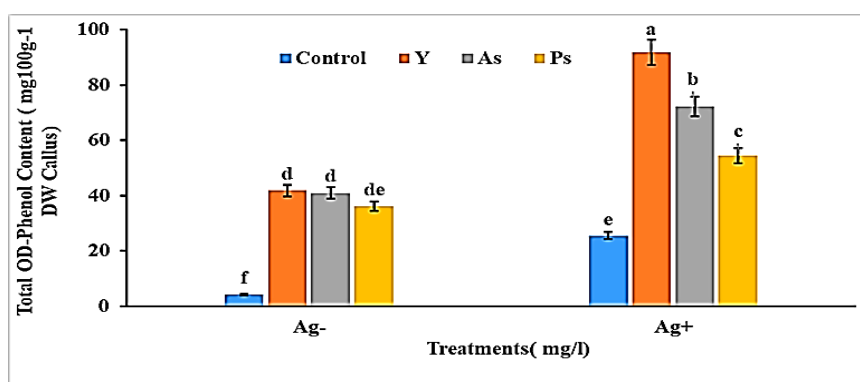


شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات فلاون کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^- و Ag^+ به ترتیب محیط دارای نیترا نقره و بدون نیترا نقره میانگین هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) 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) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

D فنل کل (۹۱/۸۸ میلی گرم در گرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمر یاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترا نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی داری داشت. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترا نقره تفاوت معنی داری با سایر ترکیبات تیماری داشتند ولی در محیط فاقد نیترا نقره از این حیث تفاوت معنی داری نداشتند. محتوی O-D فنل کل در شرایط حضور نیترا نقره به صورت معنی داری بیشتر از محیط فاقد نیترا نقره بود (شکل ۵).

O-D فنل کل : براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها، اثر متقابل الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی تأثیر معنی داری بر محتوای ترکیبات O-D فنلی کالوس ها داشتند (جدول ۱). در این آزمایش تاثیر بر همکنش الیسیتور و نیترا نقره بر محتوی O-D فنل کل معنی دار بود (جدول ۱). کاربرد الیسیتورهای مختلف به صورت معنی داری محتوی O-D فنل کل را نسبت به شاهد افزایش دادند، که این افزایش در شرایط استفاده هم زمان الیسیتور و نیترا نقره به صورت معنی داری بیشتر بود. بالاترین محتوی O-

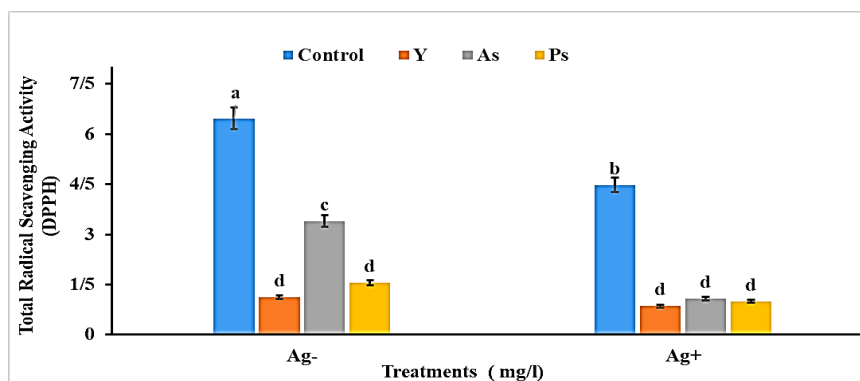


شکل ۵- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ترکیبات O-D فنل کل کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag^- و Ag^+ به ترتیب محیط دارای نیترا نقره و بدون نیترا نقره میانگین هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) 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) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

(جدول ۱). در این بررسی بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی که نشان‌دهنده کمترین میزان IC₅₀ است در نمونه‌های تیمار شده با الیستورهای مختلف مشاهده شد. در شرایط عدم کاربرد الیستورها (شاهد)، محتوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها کاهش یافت (شکل ۶).

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 الیستورها به‌صورت مجزا و تلفیقی تأثیر معناداری بر توان آنتی‌اکسیدانی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ گیاه خارمریم داشت



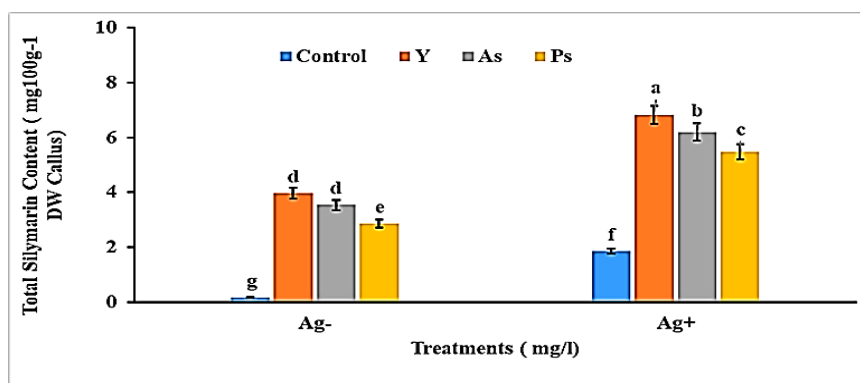
شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کالوس حاصل از ریز نمونه‌های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا. Ag⁻ و Ag⁺ به ترتیب محیط دارای نیترا نقره و بدون نیترا نقره میانگین‌هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن (P≤0.01) 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) *Aspergillus 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≤0.01)

سلولی مارین: براساس بررسی‌های آماری، تأثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای سلولی مارین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ خارمریم معنادار بود (جدول ۱). کاربرد الیستورهای مختلف به‌صورت معنی‌داری محتوی سلولی مارین را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بالاترین محتوی سلولی مارین (۶/۸۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) به ترکیب تیماری کاربرد مخمر یاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترا نقره مربوط بود که با سایر

سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری داشت. در این آزمایش تأثیر نیترا نقره در تمامی سطوح کاربرد الیستورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیستور) معنی‌دار و از نظر بهبود محتوی سلولی مارین افزایشی و تحریک‌کننده بود. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترا نقره و هم در محیط فاقد نیترا نقره از نظر محتوی سلولی مارین تفاوت معنی‌داری داشتند. محتوی سلولی مارین در شرایط حضور نیترا نقره به‌صورت معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد نیترا نقره بود (شکل ۷).



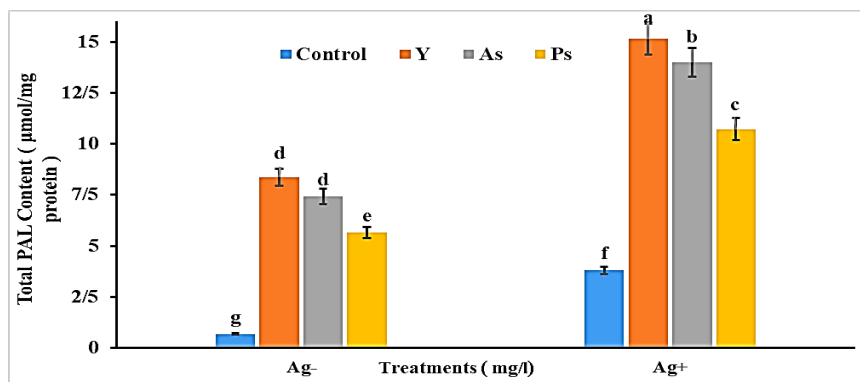
شکل ۷- مقایسه میانگین تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر محتوی سیلی مارین کالوس حاصل از ریز نمونه های برگ گیاه خارمریم (Y) یاروویا لیپولیتیکا، (As) آسپرژیلوس نایجر، (Ps) سودوموناس پوتیدا . Ag^- و Ag^+ به ترتیب محیط دارای نیترا نقره و بدون نیترا نقره میانگین هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 7. Mean values for total phenol content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*, (As) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

آزمایش تاثیر نیترا نقره در تمامی سطوح کاربرد الیسیتورها و نیز تیمار شاهد (عدم کاربرد الیسیتور) معنی دار و از نظر بهبود محتوی PAL افزایشی و تحریک کننده بود. تیمار کاربرد باکتری سودوموناس پوتیدا و آسپرژیلوس نایجر در حضور نیترا نقره و هم در محیط فاقد نیترا نقره از نظر محتوی PAL تفاوت معنی داری داشتند ولی محتوی PAL در شرایط حضور نیترا نقره به صورت معنی داری بیشتر از محیط فاقد نیترا نقره بود (شکل ۸).

PAL: نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که کاربرد الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به صورت معنی داری فعالیت آنزیم PAL را نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۱). کاربرد الیسیتورهای مختلف به صورت معنی داری محتوی PAL را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش در شرایط حضور نیترا نقره به صورت معنی داری بیشتر بود. بالاترین محتوی PAL به ترکیب تیماری کاربرد مخمر یاروویا لیپولیتیکا و حضور نیترا نقره مربوط بود که با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی داری داشت. در این



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^- به ترتیب محیط دارای نیترا ت نقره و بدون نیترا ت نقره میانگین هایی که دارای حرف (حروف) مشترکی می باشند، مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 8. Mean values for total PAL content of *Silybum marianum* callus as affected by biotic and abiotic elicitors. (Y) *Yarrowia lipolytica*, (As) *Aspergillus 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 ($P \leq 0.01$)

بحث

ترکیبی می تواند به نحو موثری تولید متابولیت های 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 به ویژه ترکیب تیماری کاربرد مخمر در حضور نیترا ت نقره بود. بسیاری از مطالعات، از عصاره مخمر برای افزایش میزان متابولیت های ثانویه استفاده شده است. در این ارتباط بررسی ها نشان می دهند که فعالیت مسیر شیکیمات در *Yarrowia lipolytica* بیشتر بوده (Savitha et al., 2006) و با افزودن فنیل آلانین میزان استیل کوآ و متعاقب آن نارینژنین نیز افزایش یافته است (Lv et al., 2019). در یک مطالعه مشخص شد که *niger Aspergillus* قادر به تولید سریع اسیدلینولیک در pH بهینه پایین است (Li et al., 2020).

فلاونوئیدها و فلاون ها دسته ای از متابولیت های ثانویه پلی فنولیک هستند که در گیاهان یافت می شوند. این ترکیبات دارای خواص زیستی مانند خاصیت آنتی اکسیدان برای روبش رادیکال های آزاد می باشند (Chu et al., 2000). محرک های زیستی مانند *Yarrowia lipolytica* در غلظت های مختلف برای انباشت ایزوفلاونوئید در HRCs از *Pueraria candollei* مورد مطالعه قرار گرفتند. در آزمایش فوق الیسیتور *Yarrowia lipolytica*

یک راهکار برای القای کال زایی و افزایش سنتز متابولیت های ثانویه در کشت بافت، استفاده از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی است (Kumar et al., 2011). در آزمایش حاضر نتایج بررسی درصد کال زایی نشان داد، در محیط های کشت حاوی هورمون KIN درصد کال زایی ریز نمونه ها به صورت معنی داری 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 غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانوی می شوند (Zhao et al., 2005). سیگنالی که توسط محرک ارسال می شود به وسیله گیرنده های سطح غشاء پلاسمایی دریافت و بیان ژن های مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه را تنظیم می کند (Savitha et al., 2006). برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه، راهکارهای فراوانی در کشت بافت و بیوتکنولوژی مطرح است. استفاده از عوامل محرک مانند: ترکیبات سیگنالی و تنش های غیرزنده از جمله این راهکارها می باشد (Hu & Du, 2006). نتایج بررسی ها در چندین گونه گیاهی حاکی از آن است که کاربرد دو یا چند الیسیتور به صورت

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 می باشد. اتیلن فیتوهورمونی است که مسیرهای گیاهی از جمله رشد و پاسخ های دفاعی را تنظیم می کند. مسیر سیگنالینگ جاسمونیک اسید و اتیلن برای پاسخ های دفاعی ایجاد شده در مقابل تنش های محیطی ضروری هستند. شواهد محدودی نشان می دهد که تجمع متابولیت های ثانویه با اتیلن تحت تاثیر قرار می گیرند و این اثرات ممکن است مثبت یا منفی باشد (Shams-Ardakani et al., 2005). اثر مثبت نیترات نقره بر روی تولید متابولیت های ثانویه ممکن است منسوب به اثر بازدارندگی آن بر روی سنتز اتیلن یا فعالیت آن باشد.

الیسیتورهای غیرزنده به خوبی تنش های شوری و اسمزی باعث القا متابولیت ثانویه می شوند (Shams-Ardakani et al., 2005; Babar et al., 2006). در سلول های گیاهی که در معرض تنش های زیستی و غیرزیستی هستند، افزایش کلسیم سیتوسولی به عنوان پیش نیاز در بسیاری از سلول های تحت تیمار با محرک، سبب فعال شدن مراحل تولید ROS می شود. ROS ها باعث القا بیان بسیاری از ژن های دفاعی و دخیل در بیوسنتز متابولیت های ثانویه مانند فنیل آلانین آمونیا لایازها می گردد (Fahrendorf et al., 1995). مسیر فنیل پروپانویدها منجر به سنتز فلاونوئیدها می شود. H_2O_2 و پراکسیداسیون چربی های آنزیمی و غیر آنزیمی از مسیرهای اکتادکانوئیدها که سبب تولید جاسمونیک اسیدها و القا متابولیت های ثانویه می گردند، جلوگیری می کنند (Babar et al., 2006). حذف یون کلسیم از محیط کشت می تواند به افزایش تولید سیلی مارین در سوسپانسیون سلولی کمک کند (Sanchez-Sampedro et al., 2005).

نتیجه گیری

خارمریم، گیاهی ارزشمند از نظر ویژگی های 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 اسپرژیلوس 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 سیلی مارین 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 سیلی مارین گیاه داشت. در این

تاثیرگذارترین بود که باعث افزایش ۴/۵ برابری سطح ایزوفلاونوئید، ۱/۴ برابری آکتوزید (یک فنیل اتانوئید گلیکوزید) و ۱/۷ برابری فلاون شد (Wilczańska-Barska et al., 2012). کاربرد خارجی *Yarrowia lipolytica* در ریشه های موین *Pueraria candollei* موثرتر بود. در این راستا کاربرد مخمر به طور موثر رشد ریشه های موین 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 سلول های گیاهی در برابر کاربرد محرک ها، تولید انواع گونه های فعال اکسیژن (ROS) می باشد که بسیار سمی هستند. ROS ها به وسیله سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می شوند (Lie et al., 2013). این کنترل توسط متابولیت هایی مانند آسکوربات، فلاونوئیدها و آنزیم هایی مانند: پراکسیدازها و پلی فنل اکسیداز انجام می شود (Wink, 2010). بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آن ها در گیاهان تغییر می کند، فعالیت آنتی اکسیدانی مخمر به همراه نیترات نقره از طریق مکانیسم های مختلفی مانند افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان به عنوان یک روبنده ROS عمل می کند (Harish, 2007).

فراوان ترین گروه ترکیبات فنولی، از فنیل آلانین مشتق می شوند. یک مولکول آمونیاک از فنیل آلانین حذف و سینامیک اسید، تحت تاثیر فنیل آلانین آمونیا لایاز تشکیل می گردد. فنیل آلانین آمونیا لایاز در یک نقطه انشعابی بین متابولیسم اولیه و ثانویه قرار دارد، بنابراین واکنشی را که این آنزیم کاتالیز می کند، یک مرحله تنظیمی مهم در تشکیل بسیاری از ترکیبات فنلی به حساب می آید (Taiz & Zeiger, 2010). تغییر در فعالیت PAL و سایر آنزیم ها می تواند نخستین گام برای پاسخ گیاه به تنش باشد. PAL به عنوان یکی از نشانگرهای عمده تنش محیطی در بافت های گیاهی مختلف به شمار می رود (Xu et al., 2006). در آزمایش ما بیشینه فعالیت آنزیم PAL در شرایط تیمار مخمر در ترکیب با نیترات نقره حاصل شد.

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

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.

بررسی کاربرد مخمر یاروویا از نظر تاثیر بر مشتقات فنلی با سایر الیسیتورهای 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 کالوس‌های خار مریم استفاده از مخمر یاروویا و نیترات نقره قویا توصیه می‌شود.

REFERENCES

- Ahlawat, S., Saxena, P., Alam, P., Wajid, S. & Abidin, 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 Biotechnology* 23: 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 J* 121(2): 253–260, DOI: 10.1016/j.jbiotec.07.012.
- Cho, H. Y., Lee-Parsons, C. W. T., Yoon, S.Y. 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, S.O., 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. *Perspectives 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. Transcriptional activation of

- oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavanoid phytoalexin response. *Plant Mol 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 flavonolignan 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 Rev*1: 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., Pepelnjak, 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 Rev*1: 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. Bot*58, 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 Stress* Chapman 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 biological

- 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*. Sinaue Associates. 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., Glód, 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 miltiorrhiza* hairy 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 Lett* 8:1027–1031, 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*

- Cultural Research, 46:497– 511. DOI: 10.2135/cropsci2004.0572.
- Zhao J, Davis L.C. & 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.