

بررسی تاثیر محرک‌های قارچی، باکتریایی، مخمر و نیترات‌نقره بر محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و سیلیمارین در مراحل نمو گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.)

چکیده

گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.) به دلیل داشتن ویژگی‌های فیتوشیمیایی از فعالیت‌های بیولوژیک موثر شامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطان برخوردار است و از این رو از دیرباز به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش مورد توجه بوده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر محرک‌های زیستی شامل باکتری (*Pseudomonas putida*)، مخمر (*Yarrowia lipolytica*)، قارچ (*Aspergillus niger*) و الیستور AgNO_3 بر محتوای ترکیبات فنلی، سیلیمارین و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در بذر و بخش هوایی گیاه در مراحل رشد رویشی و زایشی به صورت آزمایش‌های جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که محتوای فنل موجود در بذر تحت تاثیر محرک‌های زیستی و غیر زیستی بیشتر از بخش هوایی در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی بود، این در حالی است که کمترین میزان IC_{50} در تمامی تیمارهای مورد بررسی به بذر اختصاص داشت. در این بررسی محتوای فلاونوئید کل با گذر از مرحله رویشی به زایشی و سپس تولید بذر کاهش یافت که احتمالاً به افزایش تمایز سلولی در طول دوره تکمیل رشد، حفاظت در برابر حمله آفات، تجزیه و کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی مربوط می‌شود. اگرچه AgNO_3 درصد سیلیمارین را در مراحل رشد رویشی (۹/۹۶ درصد) و زایشی (۶/۶۴ درصد) نسبت به شاهد افزایش داد ولی در مرحله تولید بذر، تلقیح باکتری بیشترین تاثیر را در بهبود محتوای سیلیمارین داشت و مقدار سیلیمارین بذر را نسبت به شاهد به میزان ۳۳ درصد افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: رادیکال آزاد، ترکیبات فنلی، سیلیمارین، فنولوژی

ABSTRACT

Silybum marianum has effective biological activities, including antioxidant and anticancer, due to its phytochemical properties. Hence, it has long been considered a valuable medicinal plant. The purpose of this study was to investigate the effects of biological stimuli, including bacteria (*Pseudomonas putida*), yeast (*Yarrowia lipolytica*), fungi (*Aspergillus niger*), and AgNO_3 elicitors, on the contents of phenolic compounds, silymarin and antioxidant potential in the seeds and aerial parts of plants during the vegetative and reproductive stages of growth. This study was conducted as separate experiments in a completely randomized design with 3 repetitions in the research greenhouse of Ferdowsi University of Mashhad. The results of the experiment revealed that the phenol content in the seeds with biological and non-biological motivation was greater than that in the aerial parts in both the vegetative and reproductive growth stages, whereas the lowest IC_{50} was assigned to the seeds in all the investigated treatments. In this study, the total flavonoid content decreased with the transition from the vegetative stage to reproductive and seed production that is likely related to the increase in cell differentiation during the period of growth, protection against pest attack, degradation, and reduction in the activity of biosynthetic pathway enzymes. Although AgNO_3 increased the percentage of silymarin in the vegetative growth (9.96%) and reproductive stages (6.64%) compared with the control, in the seed production stage, bacterial inoculation had the greatest effect on improving the silymarin content and the silymarin content in the seed. Compared with the control, the percentage increased by 33%.

Keywords: free radical, phenolic compounds, silymarin, phenology

مقدمه

خارمریم گیاهی دیپلوئید ($2n=34$) (Asghari-Zakaria et al., 2008) با نام علمی *Silybum marianum* L. Gaernt. متعلق به خانواده Asteraceae، یک یا دوساله با ارتفاع حدود دو متر می‌باشد. این گیاه دارای برگ‌هایی سبز متناوب و براق با لکه سفید است که اغلب به صورت خودرو در حاشیه جاده‌ها و اراضی متروک می‌روید (Gad et al., 2020). میوه خارمریم فندقه صاف و قهوه‌ای رنگ است که در انتهای آن تارهایی به نام پاپوس وجود دارد. جوانه‌زنی بذور خارمریم در فصل بهار یا پاییز تحت تاثیر نور و دما می‌باشد که

به نظر می‌رسد نیازمند دوره پس‌رسی هستند و در دمای پایین بهتر جوانه می‌زنند. خارمریم گیاهی کم توقع، متحمل به خشکی و شوری و مدیترانه‌ای است که در طول رویش به گرما و آفتاب فراوان نیاز دارد و در دمای ۱۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قادر به جوانه‌زنی و رشد می‌باشد. دمای مطلوب جوانه‌زنی این گیاه ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Qavami et al., 2013). این گیاه حاوی ترکیبات فلاونولیگانی^۱ (از قبیل سیلی‌بین^۲ A و B، ایزوسیلی‌بین^۳ A و B، سیلی‌دی‌انین، سیلی‌کریستین، دی‌هیدروسیلی‌بین و تاکسی-فولین^۴) بوده که به مجموع آن‌ها سیلی‌مارین^۵ اطلاق می‌شود (Kurkin, 2003) و ۵۰ تا ۷۰ درصد عصاره بذر گیاه را تشکیل می‌دهد (Gad et al., 2020) که انباشت فلاونولیگنان در بذرها وابسته به مرحله نمو گل بوده و در مرحله گلدهی به حداکثر میزان خود می‌رسد (Qavami et al., 2013). از خارمریم در درمان بیماری‌های کبدی، گوارشی (Gad et al., 2020)، صفراوی و مسمومیت استفاده می‌شود (Rainone, 2005). اعتقاد بر این است که اثرات درمانی خارمریم بیشتر به دلیل وجود سیلی‌مارین موجود در عصاره آن می‌باشد که با تحریک اجزای بافت کبدی نقش مثبتی در درمان هپاتیت دارد (Asghari-Zakaria et al., 2008) و موثر در پایداری و تثبیت غشای کبدی بوده که مانع پیوند بسیاری از سموم و داروها با این غشا می‌گردد. سیلی‌مارین با افزایش غلظت گلو‌تاتیون سلولی، حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دی‌سموتاز حفاظت از کبد را سبب می‌شود (Marceddu et al., 2022).

الیستورها مواد شیمیایی از منابع مختلف زیستی (مانند ترکیبات مشتق شده از قارچ‌ها، باکتری‌ها، قطعات دیواره سلول گیاهی و مواد شیمیایی آزاد شده از گیاه طی حمله پاتوژن یا علف‌خوار) و غیرزیستی (یون‌های فلزی و ترکیبات معدنی) هستند که قادر به القای پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بوده و منجر به انباشت فیتوالکسین در گیاهان می‌شوند. گیاهان واکنش‌های دفاعی متفاوتی نسبت به الیستورها دارند که یکی از آن‌ها افزایش تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه است (Hasanloo et al., 2015). عوامل متعددی مانند نوع و غلظت الیستور، مدت زمان قرارگیری در معرض الیستور، زمان تیماردهی، نوع و ترکیب محیط کشت، لاین سلولی، حضور یا عدم حضور تنظیم‌کننده‌های رشد و مرحله‌ای از کشت که در آن تیماردهی الیستورها انجام می‌شود بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار هستند. اتصال الیستور به گیرنده در غشای سلول، مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شامل فعال شدن سیستم دفاعی، فعالیت کانال‌های کلسیمی و کاهش pH در سیتوپلاسم سلول را ایجاد خواهد کرد که نتیجه آن اغلب تغییر در سطح بیان ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی تنظیمی است و معمولاً افزایش سنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه را در سلول گیاهی به دنبال دارد (Blume et al., 2000; Zhao et al., 2003).

پیشینه پژوهش

بهره‌مندی از الیستورها در تحقیقات زیست فناوری با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با دو رویکرد سنتز و تنظیم مسیر متابولیت‌های ثانویه و افزایش تولید به منظور کاربرد تجاری دارای اهمیت می‌باشد. الیستور زیستی مولکول‌هایی از پاتوژن یا خود میزبان هستند که سبب القای پاسخ‌های دفاعی می‌شوند. الیستورهای غیر زیستی شامل پرتو فرابنفش، فلزات سنگین، ترکیبات غیر ضروری محرک تولید فیتوالکسین‌ها هستند. استفاده از این الیستورها با هدف افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Vildová et al., 2014).

قارچ *Aspergillus niger* تقریباً در همه محیط‌های هوازی یافت می‌شود (Gupta, 2012) و به عنوان اصلی‌ترین منبع تولید اسیدسیتریک در جهان شناخته شده است (Anastassiadis et al., 2008) و حضور آن در محصولات کشاورزی مانند انواع میوه‌ها، پیاز،

1. Flavonolignane
2. Silybin
3. Isosilybin
4. Taxifolin
5. Silymarin

مغزها و ذرت تحت شرایط دمایی ۴۷-۶ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH} = ۹/۸-۱/۵$ گزارش شده‌است (Li et al., 2020). باکتری *Pseudomonas putida* به عنوان جمعیت میکروبی موثر خاک و محرک در رشد و نمو گیاهان مورد توجه است (Georgieva et al., 2023). امروزه استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی به عنوان عوامل بهبود دهنده رشد گیاهان، جذب عناصر غذایی با هزینه کم و کاهش آلودگی زیستی رایج شده‌است. قارچ‌ها و باکتری‌ها با تجزیه مواد آلی موجود در خاک سبب تولید مقادیر بالای اسیدهای آلی و مواد هومیک شده که خاک را اسیدی و سبب فراهمی بیشتر فسفر در خاک، افزایش جذب آن توسط گیاهان و بهبود رشد گیاه می‌شوند. در این راستا اثرات مثبت این ریز جانداران بر نمو سیستم ریشه و بخش هوایی، مورفولوژی و فتوسنتز گیاه به اثبات رسیده‌است (Stamford et al., 2002). نارینژین به عنوان پیش‌ساز ترکیبات فلاونوئیدی، مشتقی از مالونیل‌کوآ می‌باشد که نقش مهمی در صنعت دارو سازی ایفا می‌کند. مخمر *Yarrowia lipolytica* (با توان هیدرولیز لیپید) قادر به تجمع سطح بالایی از مالونیل‌کوآ و انتقال آن به میزبان به منظور بیوسنتز لیپید می‌باشد و در تحقیقات پیشین به عنوان میزبان بیوسنتزی نارینژین یاد شده‌است (Palmer et al., 2020). این مخمر قادر به جذب ترکیبات فنلی، منابع قند آلی و آلکانی به عنوان منبع کربن می‌باشد (Coelho et al., 2010; da Veiga et al., 2021) و با توان سنتز اسیدسیتریک سبب افزایش مقاومت در برابر یون‌های فلزی می‌شود (Anastassiadis et al., 2008).

نیتрат‌نقره (AgNO_3) به عنوان الیستور غیرزیستی، بازدارنده قوی فعالیت اتیلن بوده و بر بیان برخی از ژن‌ها و آنزیم‌های مختلف داخل سلولی تاثیر گذاشته و از این طریق سبب تغییر در سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌شود (Elumalai et al., 2010). به طور کلی میزان تاثیر ترکیبات حاوی نقره بر گیاهان، وابسته به میزان جذب و انباشت آن‌ها در سلول گیاهی است که ابتدا از دیواره سلولی و سپس از غشای پلاسمایی لایه اپیدرمی ریشه‌های گیاه عبور و وارد بافت‌های آوندی می‌شوند (Tripathi et al., 2017). با توجه به محدودیت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت شرایط طبیعی، در سال‌های اخیر استفاده از کشت بافت و سلول (Schrall et al., 1977) و کشت بافت و سوسپانسیون سلول خارمریم مورد توجه واقع شده‌است (Tumová et al., 2010). نتایج کاربرد عصاره قارچ *Fusarium oxysprum* و *Phytophthora meloni* در کشت تعلیقی سلولی خارمریم (Hasanloo et al., 2013) و نیز استفاده از L- فنیل آلانین در کشت ریشه‌های موبین خارمریم (Rahimi et al., 2011) با هدف بیش تولید سیلیمارین امید بخش بوده است. کاربرد قارچ *Trichoderma harzianum* در آزمایش گلدانی و نیز کاربرد کیتوزان در کشت ریشه موئین خارمریم سبب افزایش تولید فلاونولیکان‌ها شده‌است (Hasanloo et al., 2015). نظر به این‌که خارمریم به عنوان گیاه دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارای اهمیت می‌باشد و نیاز فراوان به افزایش تولید ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا با منشاء گیاهی حائز اهمیت بیشتر است و تاکنون نیز تحقیقی در زمینه اثرات استفاده ریز جانداران شامل باکتری، مخمر، قارچ و نیز نیترات‌نقره به عنوان الیستور غیرزیستی در کشت گلخانه‌ای صورت نگرفته لذا این مطالعه با هدف امکان ترغیب سنتز ترکیبات ثانویه دارویی در کشت گلدانی انجام شده‌است.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی و نحوه اعمال تیمارها

در این تحقیق بذر خارمریم ایرانی با شناسه تایید (48355-FUMH) از هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. نتیجه آنالیز خاک مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. آنالیز خاک گلدان

بافت خاک	K	P	N	OC (%)	EC (ds.m)	TNV	Sand	Clay	Silt	pH
لومی	۱۳۳۲/۵	۱۱۸/۶	۰/۴	۳/۵۱	۱/۲	۱۲/۵	۴۶	۱۸	۳۶	۷/۸۷

بذور خارمریم پس از ضدعفونی ابتدا در سینی‌های نشا کاشت و پس از دو برگی شدن گیاهچه‌ها به گلدان‌های به حجم ۴ لیتر (رشد ریشی) و ۷ لیتر (رشد زایشی) که دارای مخلوطی از ماسه نرم و خاک باغچه (۵۰:۵۰) بود منتقل شدند. خاک و ماسه مورد استفاده در آزمایش قبل از کاشت اتوکلاو شدند. گلدان‌ها در گلخانه و دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد با روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت نگهداری شدند و پس از ۲۰ روز از کاشت تیمارها اعمال گردید. باکتری *P. putida* (KT2440)، مخمر *Y. lipolytica* (IBRC- M 30168) و قارچ *A. niger* (ATCC 11414) از بانک میکروارگانیسم دانشکده علوم و کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. باکتری و مخمر با غلظت نیم مک‌فارلند (1.5×10^8) (Simpson et al., 2014) و قارچ به تعداد 1.2×10^7 spores ml⁻¹ تهیه (Medina et al., 2010) و از هر کدام متناسب با تیمار مربوطه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر به اطراف ریشه هر گیاهچه در زمان نشاء اضافه شد. نیترا نقره با غلظت ۱۰۰ ppm در هنگام غروب به برگ گیاه در دو مرحله (۲۰ روز بعد از استقرار گیاه در گلدان) و آغاز مرحله زایشی (ظهور اولین غنچه‌های گل) اسپری شد به طوری که کل بخش هوایی آغشته به نیترا نقره گردید. گلدان‌های گروه اول شامل گلدان‌های مرحله رشد رویشی به محض رویت اولین نشانه‌های غنچه (حدود ۶۰ روز پس از اعمال تیمار در گلدان) برداشت شدند و از بخش هوایی آن‌ها جهت انجام سنجش‌های مربوطه استفاده شد. گروه دوم گلدان‌ها بعد از رویت اولین نشانه‌های غنچه به منظور تکمیل رشد زایشی برای بهره‌مندی از بخش هوایی در انجام سنجش‌های مربوطه مورد بررسی قرار گرفتند. گروه سوم گلدان‌ها جهت تولید بذر و بررسی فاکتورهای مورد نظر در بذر حاصله نگهداری شدند. برای جلوگیری از پراکنده شدن بذر در محیط از کیسه‌های توری استفاده شد (شکل ۱).



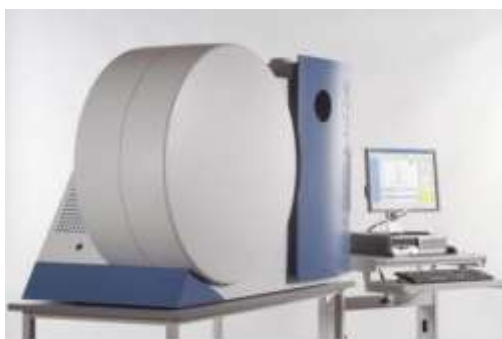
شکل ۱. تصویر مرحله رشد رویشی (A)، زایشی و تولید بذر (B)

عصاره‌گیری نمونه‌ها

جهت تهیه عصاره متانولی، ۱ گرم پودر گیاه (به تفکیک تیمار بخش هوایی رویشی، بخش هوایی زایشی، بذر) در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط روی شیکر قرار گرفت. سپس با دور ۴۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور پس از خشک شدن به عنوان عصاره خشک در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه خاکستر تر جهت سنجش میزان نقره در برگ به روش پلاسمای جفت شده القایی (ICP -OES)

به منظور سنجش انباشتگی عنصر نقره در برگ، ۵۰۰ میلی گرم پودر بافت برگ از هر تیمار تهیه و به صورت جداگانه به هر ارلن ۱۰ میلی لیتر اسیدنیتریک غلیظ به منظور هضم بافت برگ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس ارلن ها به هیتر زیر هود انتقال داده شدند تا به شدت هضم بافت ها افزوده و حرارت دهی تا خشک شدن تقریبی مخلوط واکنش ادامه یافت. در مرحله بعد با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۲ میلی لیتر رسانده و جهت سنجش به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافت. برای سنجش غلظت نقره از طیف سنجی نشری پلاسمای جفت شده القایی (SPECTRO ARCOS, 76004555) استفاده شد (شکل ۲) (Karla, 1998).



شکل ۲. تصویر دستگاه طیف سنج نشری پلاسمای جفت شده القایی (SPECTRO ARCOS, 76004555)

تعیین محتوای فنل کل

به منظور تعیین محتوای فنل کل مطابق روش Vernon و همکاران (۱۹۹۹) به ۱۵۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه و به مدت ۵ دقیقه دردمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. سپس ۱۵۰۰ میکرولیتر بیکرینات سدیم ۷ درصد (v/w) به محتویات هر لوله اضافه و پس از ۹۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-120-02 (Shimadzu، ژاپن) ثبت شد. محتوای فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد ($Y = 0.0013x$, $R^2 = 0.9663$) به صورت میلی گرم GAE در هر گرم وزن خشک عصاره ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{DW}$) بیان گردید.

تعیین محتوای فلاونوئید کل

جهت تعیین محتوای فلاونوئید کل، ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی به ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم (AlCl_3) آبی ۱۰ درصد (w/v)، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار آبی و ۲۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و پس از ۹۰ دقیقه استراحت در تاریکی و دمای محیط، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر UV-۱۲۰-۰۲ (Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۴۱۵ nm ثبت شد. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد ($Y = 0.0049X + 0.0005$, $R^2 = 0.9997$) به صورت میلی گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک عصاره ($\text{mg QE g}^{-1} \text{DW}$) گزارش شد (Chang et al., 2002).

تعیین محتوای اسیدهای فنلی

۲۵۰ ماکرولیتر عصاره متانولی با ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر، ۲۵۰ ماکرولیتر هیدروژن کلراید ۱۰ درصد (w/v)، ۲۵۰ ماکرولیتر نیتروژن سدیم (آبی) ۱۰ درصد (w/v) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و تاریکی نگهداری شد. سپس در لحظه قرائت جذب در طول موج ۴۹۰ nm به هر نمونه ۲۵۰ ماکرولیتر هیدروکسید سدیم و ۲۵۰ ماکرولیتر آب مقطر اضافه شد. محتوای اسیدهای فنلی با استفاده از منحنی استاندارد ($Y = 0.0036X + 0.0293$, $R^2 = 0.9997$) به صورت میلی گرم اسیدکافئیک در هر گرم وزن خشک عصاره (mg CA) گزارش گردید (Matkowski et al., 2008).

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀)

عصاره متانولی (۰/۲۵ mg/ml) با حجم‌های ۵۰۰-۰ میلی لیتر توسط محلول متانولی DPPH (۰/۱ میلی مولار) به حجم نهایی ۱/۵ میلی لیتر رسانده شد و پس از ۶۰ دقیقه استراحت در تاریکی، میزان جذب مخلوط حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. فعالیت روبش رادیکال‌های آزاد با استفاده از رابطه ۱ زیر محاسبه شد که A_c جذب نمونه شاهد و A_s جذب عصاره می‌باشد و به واحد ($\mu\text{g ml}^{-1}$) گزارش شد (Akowuah et al., 2005).

$$\text{FRSA} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

سنجش سیلیمارین

به ۱ میلی لیتر عصاره متانولی، ۲ میلی لیتر محلول ۲ و ۴ دی نیتروفل هیدرازین اضافه و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ دقیقه نگهداری شد (درب لوله‌ها بسته باشد). پس از سرد شدن با KOH متانولی ۱۰ درصد به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد تا مخلوط قرمز رنگ حاصل گردد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول با ۲۰ میلی لیتر متانول مخلوط و با دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. سپس فاز رنگی جدا و به باقی مانده لوله سانتیفریوژ مجدداً ۲۰ میلی لیتر متانول افزوده شد و با دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ گردید و روشنای آن به روشنای قبلی افزوده شد. پس از آن با متانول به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر جذب نمونه‌های خوانده شد. روش محاسبه بر مبنای شدت جذب محلول ۱ درصد سیلیبین در سل کوارتز ۱ سانتی متری ($A_{1\% 1\text{cm}} = 527$) و محاسبه درصد سیلیمارین طبق رابطه ۲ به دست آمد که در این رابطه A برابر میزان جذب محلول نمونه و M عبارت از وزن نمونه گیاهی می‌باشد (Hasanloo et al., 2008).

$$\text{SM (\%)} = (A \cdot 10 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100) / (527 \cdot 100 \cdot M) \quad \text{رابطه ۲}$$

همچنین به منظور تهیه عصاره استونی بذر جهت سنجش سیلیمارین به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از پودر بذر چربی‌زدایی شده توسط سوکسله و آن هگزان استفاده شد. به این منظور پس از چربی‌زدایی، ۳ مرحله عصاره‌گیری با استون و صاف کردن توسط کاغذ صافی انجام و جهت تغلیظ عصاره‌ها، از روتاری با بیشینه دما ۴۵ درجه سانتی گراد استفاده گردید و در نهایت وزن عصاره خشک حاصل ثبت شد. محتوای سیلیمارین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با ستون $\text{C}_{18} 5 \mu (250 \times 4.6)$ (mm)، دکتور UV Knauer K2600A DAD 2.1 L و نرم‌افزار Chromgate 82 برای تشخیص پیک تعیین شد. حلال‌های اسید

فسفریک، متانول و آب (۵:۲۵:۷۰) به عنوان فاز متحرک استفاده شدند. زمان اجرا به مدت ۴۰ دقیقه و با سرعت 1 ml.min⁻¹ انجام شد و پیک‌ها در ۲۸۸ نانومتر شناسایی گردید (Wen et al., 2008). محتوای سیلیمارین بذر با واحد (mg g⁻¹ DW) بیان شد (شکل ۳).



شکل ۳. تصویر دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (UV Knauer K2600A DAD 2.1 L)

آنالیز آماری

آنالیز واریانس داده‌ها (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری (P ≤ 0.01) و (P ≤ 0.05) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. به منظور نمایش نقشه هیت‌مپ همبستگی موجود بین الیستورها و متابولیت‌های ثانویه از همبستگی پیرسون و نرم‌افزار 9 Graphpad-Prism استفاده شد (Harper, 2006). داده‌های کمی صفات فیتوشیمیایی مورد نظر به وسیله تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی بای‌پلات (PCA) با استفاده از الیستورهای موردنظر، ارزیابی و بررسی شدند (Sneath, 1973). اجزای اصلی (PC) با مقدار ویژه بیشتر از ۱ در نظر گرفته شدند.

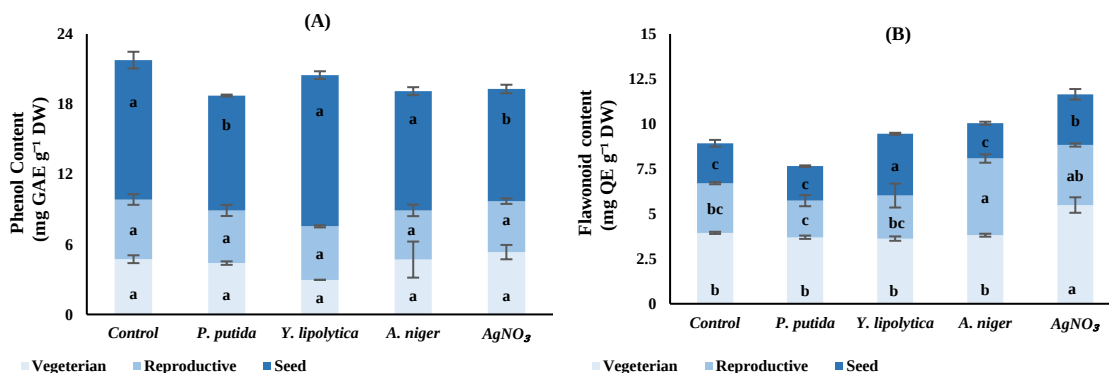
یافته‌های پژوهش

تأثیر محرک‌های زیستی و غیر زیستی بر خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه در مراحل رشد رویشی، زایشی و بذر

محتوای فنل کل

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد برغم اینکه تأثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای فنل کل بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی معنی‌دار نبود اما تأثیر آن بر محتوای فنل کل بذر معنی‌دار بود (P ≤ 0.01) (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد اگر چه کاربرد خارجی نیترات‌نقره (100 ppm) در مراحل مورد بررسی باعث افزایش محتوای فنل کل بخش هوایی شد اما تفاوت آن نسبت به شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود. محتوای فنل کل موجود در بذر در تیمارهای نیترات‌نقره (۹/۶ mg GAE g⁻¹ DW) و باکتری (۹/۸ mg GAE g⁻¹ DW) نسبت به تیمار شاهد با (۱۱/۹۳ mg GAE g⁻¹ DW) به صورت معنی داری کاهش یافتند ولی کاربرد سایر تیمارهای آزمایشی از حیث محتوای فنل کل تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (شکل A

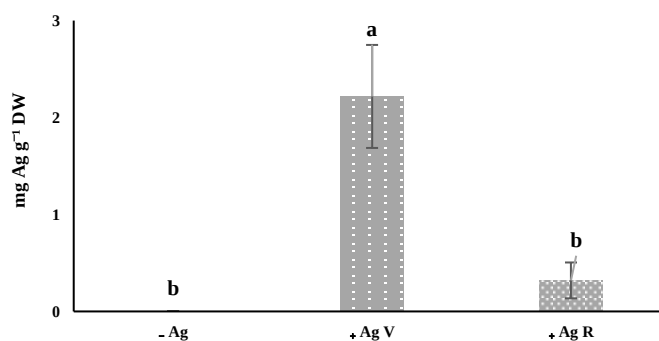
۴. در این بررسی محتوای فنل کل بذر در مقایسه با اندام هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی به صورت قابل توجهی بیشتر بود (شکل A ۶).



شکل ۴. میانگین محتوای فنل کل (A) و فلاونوئید کل (B) در بذر و بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی

(ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) ندارند)

به منظور بررسی و اطمینان از جذب نیترات‌نقره بکار برده شده در آزمایش، آنالیز ICP انجام شد. نتایج بررسی‌ها حاکی از عدم وجود نیترات‌نقره در تیمار شاهد بود. میزان جذب نیترات‌نقره در مرحله رشد رویشی ($2/22 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) و در مرحله رشد زایشی ($0/32 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) تعیین شد (شکل ۵).



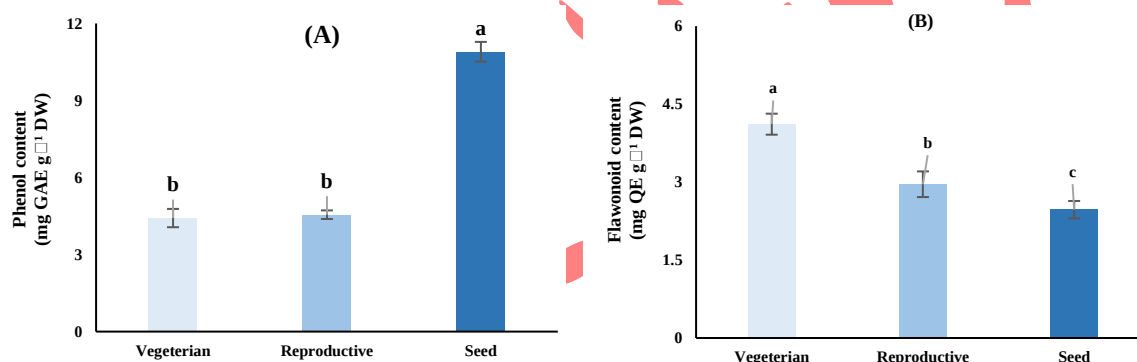
شکل ۵. آنالیز نیترات‌نقره موجود در بافت خشک بخش هوایی گیاه خارمریم

-Ag (شاهد و بدون اسپری نیترات‌نقره)، +Ag V (مرحله رشد رویشی با اسپری نیترات‌نقره)، +Ag R (مرحله رشد زایشی با اسپری نیترات‌نقره)

(ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) ندارند)

محتوای فلاونوئید کل

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که الیسیستورهای زیستی و غیرزیستی تاثیر معنی‌داری در محتوای فلاونوئید کل بذر و بخش هوایی گیاه در مراحل رشد رویشی و زایشی گیاه داشت ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین مشاهدات در مرحله رشد رویشی نشان داد که تنها در تیمار کاربرد خارجی نیترات‌نقره محتوای فلاونوئید کل ($5/5 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) نسبت به تیمار شاهد (mg QE g^{-1}) $3/94^1 \text{ DW}$ افزایش ۳۹/۶ درصدی و معنی‌داری داشت. محتوای فلاونوئید کل بخش هوایی در مرحله رشد زایشی در نتیجه کاربرد قارچ در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۵۳/۶ درصدی داشت و در تیمار کاربرد باکتری، اگرچه فلاونوئید کل کاهش ۲۸/۶ درصدی داشت اما نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. مقایسه میانگین مشاهدات مربوط به بذر نشان داد که استفاده از الیسیستور مخمر محتوای فلاونوئید کل ($3/43 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) را نسبت به تیمار شاهد ($2/22 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) به صورت قابل توجهی افزایش داد ($54/5$ درصد). از طرف دیگر کمترین محتوای فلاونوئید کل بذر با ($1/92 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) به تیمار کاربرد باکتری تعلق داشت که البته نسبت به تیمار شاهد ($2/22 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) و تیمار کاربرد قارچ ($1/96 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$) معنی‌دار نبود (شکل ۴ B). نتایج مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید بخش هوایی گیاه در مراحل رشد رویشی، زایشی و تولید بذر نشان داد که با افزایش سن گیاه و رسیدگی بذر محتوای فلاونوئید به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد (شکل ۴ B).



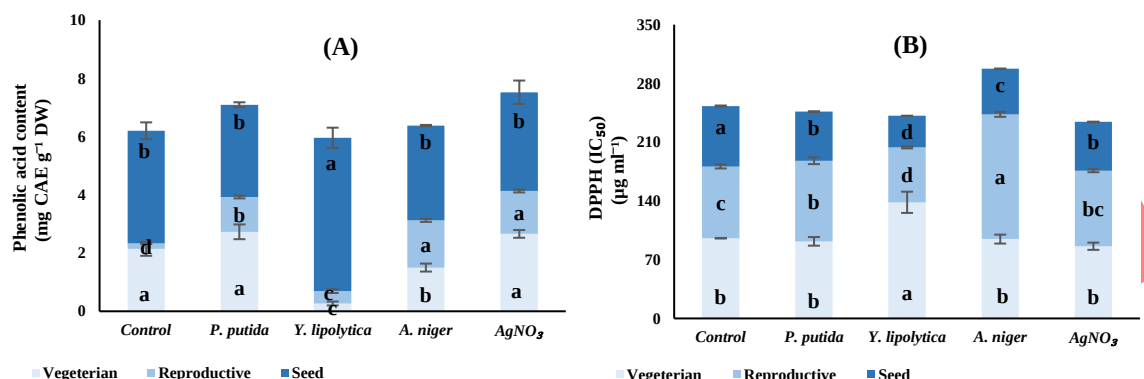
شکل ۶. مقایسه میانگین محتوای فنل (A) و فلاونوئید کل (B) در بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی، زایشی و بذر

(ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) ندارند)

محتوای اسید فنلی

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد کاربرد الیسیستورها به صورت معنی‌داری ($P \leq 0.01$) محتوای اسید فنلی را در بذر و همچنین بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی را افزایش داد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در مرحله رشد رویشی بیشترین محتوای اسید فنلی به میزان $2/73 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$ (افزایش ۲۷/۶ درصدی نسبت به شاهد) به تیمار کاربرد باکتری تعلق داشت که البته نسبت به تیمار شاهد ($2/14 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) و نیترات‌نقره ($2/66 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) تفاوت معنی‌دار نداشت و کمترین مقدار اسید فنلی به کاربرد مخمر ($0/27 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) مربوط بود که اختلاف آن نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود. در مرحله رشد زایشی تیمار کاربرد قارچ از بیشترین محتوای اسید فنلی ($1/62 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) برخوردار بود که نسبت به تیمار شاهد یک افزایش ۷/۵ برابری است، این در حالی است که محتوای اسید فنلی در این تیمار نسبت به تیمار کاربرد نیترات‌نقره (mg CAE g^{-1}) $1/47^1 \text{ DW}$ تفاوت معنی‌دار نداشت. در این آزمایش کمترین محتوای اسید فنلی ($0/19 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) به تیمار شاهد تعلق

داشت. در رابطه با بذر، بیشترین محتوای اسید فنلی به تیمار مخمر ($5/27 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$) تعلق داشت که اختلاف آن نسبت به تیمار شاهد معنی دار و افزایش $36/2$ درصدی داشت. کمترین محتوای اسید فنلی ($3/17 \text{ mg CAE g}^{-1} \text{ DW}$)، به تیمار باکتری مربوط بود که نسبت به تیمارهای شاهد، قارچ و نیترات نقره، تفاوت معنی داری نداشت (شکل A ۷). نتایج ما حاکی از افزایش معنی دار ($P \leq 0.01$) میانگین محتوای اسید فنلی با افزایش سن گیاه و از مرحله رشد رویشی به زایشی و سپس رسیدگی و تولید بذر دارد (شکل A ۸).

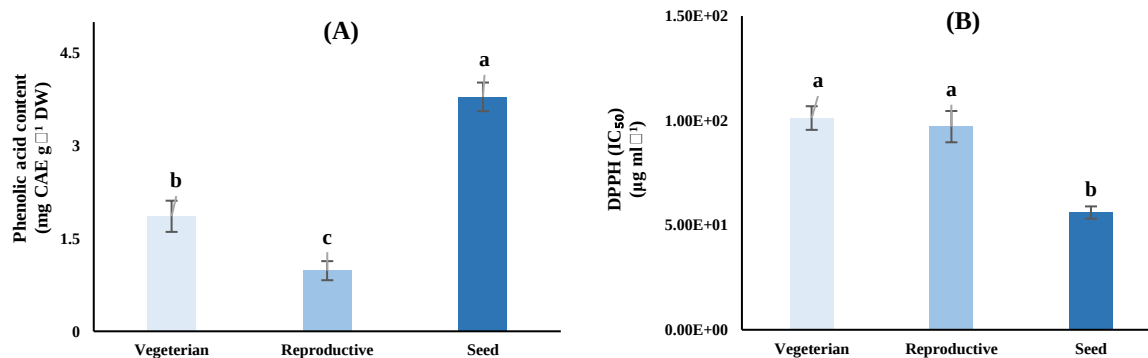


شکل ۷. میانگین محتوای اسید فنلی (A) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (B) بذر و بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی

(ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) ندارند)

ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀)

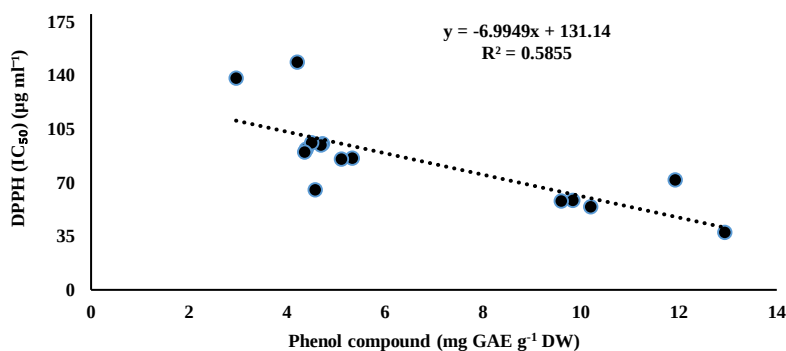
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از وجود تفاوت معنی دار در مقدار IC₅₀ بذر و بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی گیاه در نتیجه کاربرد الیستورها می باشد ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). در این بررسی تنها کاربرد مخمر، مقدار IC₅₀ را بصورت معنی داری در بخش هوایی گیاه و در مرحله رشد رویشی نسبت به تیمار شاهد به مقدار $44/9$ درصد افزایش داد. این موضوع بیانگر کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی در نتیجه کاربرد مخمر می باشد. در مرحله رشد زایشی تفاوت قابل توجه و معنی داری بین کاربرد قارچ ($148/633 \mu\text{g ml}^{-1}$) و کاربرد سایر الیستورها مورد بررسی از حیث شاخص IC₅₀ وجود داشت که اغلب نتایج آن کاهش شدید فعالیت آنتی اکسیدانی بود. کاربرد همه الیستورها مقدار IC₅₀ را در بذر کاهش داد و در این رابطه کمترین آن به الیستور مخمر ($37/536 \mu\text{g ml}^{-1}$) تعلق داشت که نسبت به تیمار شاهد ($71/85 \mu\text{g ml}^{-1}$) معنی دار و بیانگر افزایش چشمگیر فعالیت آنتی اکسیدانی بود (شکل B ۷). مقایسه میانگین مقدار IC₅₀ در مراحل مختلف فنولوژی نشان داد که بیشترین مقدار IC₅₀ به بخش بذر گیاه تعلق دارد که در مقایسه با بخش هوایی و در مراحل رشد رویشی و زایشی معنی دار بود (شکل B ۸).



شکل ۸. مقایسه میانگین محتوای اسید فنلی (A) و ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (B) در بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی، زایشی و بذر (ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای $P \leq 0.01$ ندارند)

همبستگی محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀)

نمودار مذکور همبستگی منفی و معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀) را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار با افزایش محتوای ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀) بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به این معنی که با افزایش محتوای فنل، به حجم عصاره کمتری برای حذف ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد نیاز است. (شکل ۹).



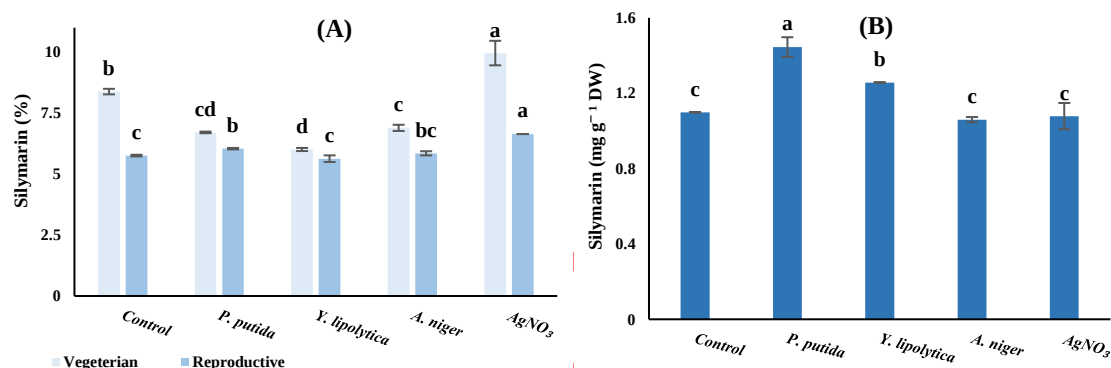
شکل ۹. همبستگی فعالیت آنتی اکسیدانی در بذر خارمریم و محتوای ترکیبات فنلی

سیلیمارین

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در مراحل رشد رویشی و زایشی، کاربرد الیسی‌تورها به صورت معنی‌داری درصد سیلیمارین عصاره متانولی برگ را افزایش داد ($P \leq 0.01$) (شکل A ۱۰ و جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد در مرحله رشد رویشی بیشترین (۹/۹۶ درصد) و کمترین (۶ درصد) مقدار سیلیمارین در هر گرم وزن خشک بخش هوایی به ترتیب به کاربرد نیترات

نقره و مخمر تعلق داشت. در مرحله رشد زایشی بیشترین درصد سیلیمارین (۶/۶۴ درصد) به کاربرد نیترات نقره تعلق داشت که نسبت به شاهد معنی دار بود و کمترین درصد سیلیمارین (۵/۶۳) با کاربرد الیسیتور مخمر مشاهده شد که در مقایسه با شاهد معنی دار نبود.

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تاثیر معنی دار ($P \leq 0.01$) بر محتوای سیلیمارین بذر داشت (شکل B ۱۰ و جدول ۲). بیشترین محتوای سیلیمارین با مقدار ($1/44 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) در نتیجه کاربرد تیمار باکتری حاصل شد که تفاوت آن نسبت به شاهد معنی دار می باشد (افزایش ۳۲ درصدی). کمترین محتوای سیلیمارین ($1/06 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) به کاربرد قارچ تعلق داشت که نسبت به تیمار شاهد ($1/09 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) کاهش ۲/۷ درصدی و البته با تیمار نیترات نقره ($1/08 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) تفاوت معنی دار نداشت.



شکل ۱۰. میانگین درصد سیلیمارین بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی (A) و محتوای سیلیمارین بذر (B)

(ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حرف یا حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای ($P \leq 0.01$) ندارند)

جدول ۲. تجزیه واریانس تاثیر محرک‌های زیستی و غیر زیستی بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه خارمریم در مراحل رشد رویشی، زایشی و بذر

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
مرحله رشد رویشی						
درصد سیلیمارین	DPPH (IC ₅₀)	اسید فنلی	فلاونوئید کل	فنل کل		
۷/۵۱**	۱۳۳۱/۳۵۵**	۳/۱**	۱/۸۱۹**	۲/۳۵۱*	۴	الیسیتور
۰/۱۷۲	۱۳۹/۸۰۵	۰/۰۹۷	۰/۱۳۲	۱/۷۳۶	۱۰	خطای آزمایش
۲/۲۶۸۶۴۲۸۵۷	۴۸۰/۲۴۷۹۲۸۶	۰/۹۵۴۷۸۵۷۱	۰/۶۱۳۷۱۴۲۹	۱/۹۱۱۹۲۸۵۷	۱۴	کل
مرحله رشد زایشی						
سیلیمارین	DPPH (IC ₅₀)	اسید فنلی	فلاونوئید کل	فنل کل		
۰/۴۷۱**	۲۸۸۳/۲۹۷**	۱/۲۲۷**	۲/۲۹۶**	۰/۳۵*	۴	الیسیتور
۰/۰۱۷	۲۱/۵۲۱	۰/۰۰۷	۰/۳۶۴	۰/۴۴۶	۱۰	خطای آزمایش
۰/۱۴۶۶۴۲۸۵۷	۸۳۹/۱۷۰۸۵۷۱	۰/۳۵۵۷۸۵۷۱	۰/۹۱۵۷۸۵۷۱	۰/۴۱۸۲۸۵۷۱	۱۴	کل
بذر					درجه آزادی	منابع تغییرات
سیلیمارین	DPPH (IC ₅₀)	اسید فنلی	فلاونوئید کل	فنل کل		

الیستور	۴	۶/۳۹۳**	۱/۲۵۴**	۲/۲۵۲**	۴۵۴/۱۲**	۰/۰۸**
خطای آزمایش	۱۰	۰/۵۲۶	۰/۰۸	۰/۲۲۴	۰/۶۵۷	۰/۰۰۵
کل	۱۴	۲/۲۰۲۷۱۴۲۹	۰/۴۱۵۴۲۸۵۷	۰/۸۰۳۴۲۸۵۷	۱۳۰/۲۱۷۷۸۵۷	۰/۰۲۶۲۸۵۷۱۴

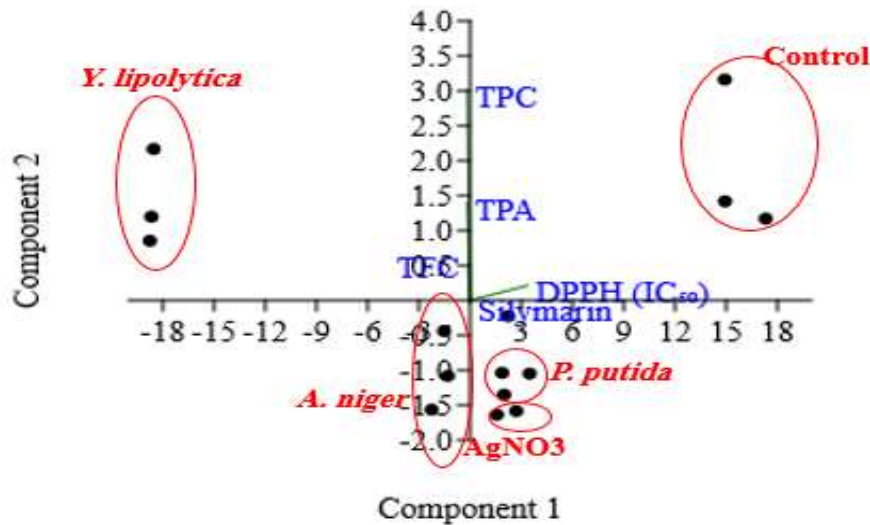
** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns عدم معنی‌دار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل نمودار PCA با توجه به تأثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بذر

تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) به منظور بررسی اثر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بذر خارمریم با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون به منظور نمایش درجه تشابه داده‌ها در جدول ۳ ذکر شده است. به دلیل همبستگی زیاد بین متغیرها، همانطور که در نمودار PCA نشان داده شده است، ۵ عامل در بیوستز ترکیبات فنلی، سیلیمارین و مقدار IC₅₀ بذر موثر شناخته شده است. در جدول مقادیر ویژه و درصد واریانس در بذر حاصل از الیستور، مولفه اول معادل ۹۷/۹۲ درصد دارای بیشترین مقدار می‌باشد. جز اصلی این مولفه مقدار DPPH (IC₅₀) (۰/۹۹۷) بود که بیانگر کاهش محتوای فنل شاهد می‌باشد که منجر به افزایش DPPH (IC₅₀) شده است (شکل ۱۱). در واقع به میزان بیشتر عصاره برای حذف رادیکال‌های آزاد نیاز دارد. جز اصلی مولفه ۲ محتوای فنل (۰/۸۹۷) و اسید فنلی (۰/۴۱۵۷۱) بود که متعلق به شاهد و مخمر بود. در مولفه ۳ جز اصلی به محتوای فلاونوئید (۰/۸۳) تعلق داشت که با کاربرد الیستور مخمر افزایش یافت و دارای درصد واریانس اندک بودند.

جدول ۳. مقادیر ویژه و درصد واریانس عوامل به دست آمده از نمودار PCA در بذر خارمریم بر اساس اعمال الیستورهای زیستی و غیر زیستی و اثر آن بر محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذر خارمریم

متغیر	اجزا				
	جز ۱	جز ۲	جز ۳	جز ۴	جز ۵
فنل کل	-۰/۰۴۳۹۹۹	-۰/۸۹۶۶۷	-۰/۳۳۵۶۹	-۰/۲۸۵۱۴	-۰/۰۰۷۶۴۰۸
فلاونوئید کل	-۰/۰۳۵۳۱۱	-۰/۱۳۷۹	-۰/۸۲۹۷۱	-۰/۵۲۸۶۵	-۰/۰۳۴۱۶۷
اسید فنلی	-۰/۰۴۴۵۲۷	-۰/۴۱۵۷۱	-۰/۴۴۲۰۸	-۰/۷۹۲۶۹	-۰/۰۳۷۶۴۶
DPPH IC ₅₀	-۰/۹۹۷۴۱	-۰/۰۶۲۹۴۸	-۰/۰۳۴۱۴	-۰/۰۰۳۶۹۳۵	-۰/۰۰۵۹۳۰۷
سیلیمارین	-۰/۰۰۳۳۷۳۲	-۰/۰۱۳۹۰۲	-۰/۰۴۷۸۳۲	-۰/۰۱۳۶۵۶	-۰/۰۹۹۸۶۶
مقادیر ویژه	۱۳۰/۸۸۶	۲/۳۷۶۶۲	۰/۲۴۳۲۴۳	۰/۱۳۶۳۳۹	۰/۰۲۳۸۱۲۹۴
درصد واریانس	۹۷/۹۲	۱/۷۷۸	۰/۱۸۱۹۸	۰/۱۰۲	۰/۰۱۷۸۲۸



شکل ۱۱. نمودار PCA در پذر خارمریم با کاربرد الیستورهای زیستی و غیر زیستی و اثر آن بر محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی TPC (فنل کل)، TFC (فلاونوئید کل)، TPA (اسید فنلی کل)، DPPH (IC₅₀) (ظرفیت آنتی اکسیدانی)

بحث

محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و اسید فنلی

ترکیبات فنلی از مهمترین ترکیبات حیاتی در گیاهان دارویی به شمار می‌روند که به دلیل فعالیت بیولوژیکی و عملکرد آن‌ها به عنوان آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان و ضد آلزایمر شناخته شده‌اند (Hazrati et al 2020). این ترکیبات به منظور خنثی‌سازی اثر عوامل زیستی و غیرزیستی سنتز می‌شوند که میزان آن‌ها از سالی به سال دیگر و با توجه به اندام‌های مختلف گیاه متغیر می‌باشد (Pérez-Ochoa et al., 2023). نتایج داده‌ها نشان داد در مرحله رشد رویشی بیشترین تاثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای فنل کل با کاربرد الیستور نیترا نقره ($5/33 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$)، در مرحله زایشی در تیمار شاهد ($5/11 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) و در مرحله تولید پذر با کاربرد مخمر (*Y. lipolytica*) ($12/94 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) حاصل شد. بیشترین محتوای فلاونوئید در مرحله رشد رویشی به استفاده از الیستور نیترا نقره ($5/5 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$)، در مرحله زایشی به کاربرد قارچ *A. niger* ($5/3 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) و در پذر به کاربرد مخمر ($3/4 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) تعلق داشت. در مرحله رشد رویشی بیشترین محتوای اسید فنلی ($4/3 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) به کاربرد باکتری، در مرحله رشد زایشی ($1/62 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) به قارچ و در تولید پذر ($5/3 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) به مخمر تعلق داشت. نتایج مطالعات پیشین مقادیر مختلفی از محتوای ترکیبات فنلی را در عصاره اتانولی رازیانه (Conforti et al., 2006)، دانه شنبلیله (Premanath et al., 2011) و عصاره متانولی *Fumaria vulgaris* (Jaberian et al., 2013) گزارش کردند که به عوامل مختلف از قبیل شرایط محیطی، شرایط کشت، فصل برداشت، عوامل جابجایی و ذخیره‌سازی و مراحل مختلف رشد نسبت داده می‌شود. در راستای نتایج این آزمایش حفظ محتوای ترکیبات فنلی در مرحله رشد رویشی و کاهش آن در مرحله گلدهی نسبت به شاهد هر مرحله، در گیاه *Rosmarinus officinalis* (Del Baño et al., 2003) و توت (Wang et al., 2000) گزارش شده است که احتمالاً افزایش و حفظ تجمع ترکیبات فنلی در مراحل اولیه رشد به تقسیم سلولی زیاد و انتقال به سمت اندام‌های جوان و بیش بیان ژن آنزیم PAL به عنوان آغازگر مسیر سنتز ترکیبات فنلی ارتباط دارد. کاهش انباشت ترکیبات فنلی با افزایش سن گیاه ممکن است

به کاهش فعالیت آنزیم PAL که کاهش جذب متابولیت‌های اولیه و افزایش سنتز نشاسته را در مراحل میانی بلوغ بذر و نیز سنتز اسیدهای فنولیک را میانجی‌گری می‌کند، مربوط باشد (Hazrati et al 2020). در مواردی نیز مشاهده شده است که با رشد گیاه، برخی از ترکیبات فنلی از سیستم آوندی گیاه حذف می‌شوند (Del Baño et al., 2003). به نظر می‌رسد این فرایند احتمالاً به واکنش‌های اکسیدکننده ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در آوندهای آبکشی که با شرکت در واکنش‌های آلکالینی و تولید کوئینون‌های تهاجمی، سبب رویش H_2O_2 می‌شوند، مرتبط می‌باشد (Feduraev et al., 2019). در واقع یک رابطه نزدیک بین فرایندهای مختلف بیوستنز، تخریب و انتقال در توزیع پلی فنل‌ها در گیاهان موجود است (Del Baño et al., 2003). که با توجه به فنولوژی و تاثیر عوامل آب و هوایی و ژنوتیپ، در گیاه محتوی ترکیبات فلاونوئیدی در مرحله رویشی افزایش و در مرحله زایشی کاهش می‌یابد (Maina et al., 2021).

بطور کلی نتایج این آزمایش حاکی بیشترین تاثیر مخمر بر محتوای فنل، فلاونوئید و اسید فنلی در مرحله تولید بذر بود. بیشترین اثر قارچ بر محتوای فلاونوئید در مرحله رشد زایشی مشاهده شد. بیشترین تاثیر باکتری بر محتوای اسید فنلی در مراحل رشد رویشی و زایشی نسبت به شاهد مشاهده گردید. افزایش فلاونوئید از طریق تجمع آنتوسیانین و فلاونون‌ها، تقویت سیستم دفاعی گیاه را سبب می‌شود (Vinogradova et al., 2023). میکروارگانیسم از تراوشات ریشه مانند قندها استفاده کرده و گیاه نیز از مواد غذایی آزاد شده در نتیجه فرایندهای خارج سلولی میکروارگانیسم بهره می‌برد (Chen et al., 2008). باکتری *P. putida* با تولید اسید جاسمونیک و قارچ *A. niger* از طریق تجزیه مواد آلی موجود در خاک موجب تولید مقادیر بالای اسیدهای آلی مانند اگزالات و مواد هومیک می‌گردد که سبب اسیدی شدن خاک و فراهمی فسفر برای میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات و در نتیجه افزایش جذب فسفر توسط گیاهان می‌شود (Saffaryazdi et al., 2020). فسفر غیر آلی تنظیم‌کننده مسیر سنتز ترکیباتی از قبیل فنل، اسید فنلی، فلاونوئید، آلکالوئید و فنیل پروپانویدها می‌باشد (Shokati et al., 2017). بررسی‌ها نشان می‌دهند که گونه *A. niger* و باکتری *P. putida* و *Y. lipolytica* به عنوان منبع تولید اسیدسیتریک (Tong et al., 2023) قادر به تولید و تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اسید فنلی در واکوئل و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. افزایش میزان اسیدسیتریک امکان هیدرولیز واکوئل و تخریب دیواره را افزایش و سبب آزادسازی انواع ترکیبات فنلی می‌گردند (Soroori et al., 2021). در مرحله رشد زایشی به استثنای کاربرد الیستور قارچ، کاهش محتوای فلاونوئیدها در بخش هوایی گیاه نسبت به گیاهان شاهد در مرحله رشد زایشی مشاهده شد. این موضوع به علت افزایش تمایز سلولی در دوره گل‌دهی، گرده‌افشانی، دفاع در برابر گیاهخواران و آفات و تولید مثل و کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوستنز فلاونوئید ارتباط دارد. همچنین در مرحله بلوغ تبدیل، سنتز و تخریب ترکیبات فلاونوئیدی با توجه به شرایط محیطی نیز دستخوش تغییرات می‌شود (Maina et al., 2021). تحقیقات نشان داده‌است محتوای فلاونوئید اندام‌ها بیشتر از برگ‌ها می‌باشد زیرا برگ‌ها تابش ماورا بنفش را کمتر از اندام‌ها دریافت می‌کنند (Moradi et al., 2020). مخمر *Y. lipolytica* قادر به سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک (L- فنیل آلانین، L- تیر زین و L- تریپتوفان) پیش‌ساز مسیر سنتز فلاونوئید بوده و همچنین قادر است از طریق تاثیر بر بیان همزمان پنج ژن مربوط به آنزیم ARO در پنج واکنش کلیدی مسیر شیکیمات سبب افزایش تولید نارینژنین و تاکسیفولین گردد به همین علت این مخمر به عنوان مولد فلاونوئیدهایی از جمله استیلین، نارینژنین، اریودکتیول و تاکسیفولین شناخته شده‌است (Muhammad et al., 2020). نتایج این تحقیق نیز موید اثر افزایشی مخمر بر محتوای فلاونوئید بذر می‌باشد. اتصال الیستورهای زیستی به رسته‌ورها، شارش درون سلولی یون کلسیم بروز می‌کند که به عنوان پیامبر ثانویه سبب دپلاریزاسیون غشا پلاسمایی شده و تحریک فعالیت H^+ ATPase را سبب می‌گردد. این موضوع منجر به شارش پروتون و اسیدی شدن pH سیتوپلاسمی می‌شود. بروز این پدیده‌ها سبب فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی مانند پروتئین کینازهای میتوژنی (MAPK) و NADPH اکسیداز و افزایش ROS و انفجار اکسیداتیو، افزایش سطح اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید می‌گردد که به افزایش بیان ژن‌های متابولیت‌های ثانویه از قبیل فنل، فلاونوئید و اسید فنلی ختم می‌شود (Hao et al. 2020 ; Humbal and Pathak 2023)

فلزات سنگین به عنوان مسئول بیوسنتز ترکیبات فنولی به عنوان سپر گیاهی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و با تسریع متیلاسیون فلزات سنگین سبب کاهش میزان رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان در سلول‌های گیاهی می‌گردند. انباشت ترکیبات فنلی در مواجهه گیاه با تنش‌های غیرزیستی سبب سازگاری بیشتر گیاه با محیط می‌شود (Vinogradova et al., 2023). فلزات سنگین تولید ROS را بیشتر از حذف آن موجب می‌گردند. این موضوع منجر به بروز تنش اکسیداتیو، کاهش مولکول‌های زیستی و تجزیه غشای لیپیدی می‌شوند. افزایش تولید ROS و هجوم یون‌های کلسیم به درون سلول سبب فعال شدن پروتئین کینازهای میتوژن (MAPKs) شده که مستقیماً سبب فسفوریلاسیون فاکتورهای رونویسی از قبیل CrMAPK3 و ORAC3 و افزایش سنتز ترکیبات گیاهی از جمله ترکیبات فنل و فلاونوئیدی می‌گردد (Vinogradova et al., 2023).

DPPH (IC₅₀)

DPPH (IC₅₀) یکی از روش‌های پرکاربرد جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی می‌باشد که به حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی وابسته است (Premanath et al., 2011). نتایج نشان داد بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار DPPH (IC₅₀) در مرحله رشد رویشی به کاربرد الیستور نیترات‌نقره ($85/99 \mu\text{g ml}^{-1}$) و در مرحله رشد زایشی و بذر با کاربرد مخمر به ترتیب با مقادیر $65/45 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $37/54 \mu\text{g ml}^{-1}$ حاصل شد. مقدار IC₅₀ غلظتی از عصاره متانولی بوده که برای مهار ۵۰٪ رادیکال‌های آزاد مورد نیاز می‌باشد. نمودار همبستگی محتوی فنل و مقدار IC₅₀ نیز موید این موضوع است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتباط نزدیک با محتوای ترکیبات فنلی می‌باشد که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند زیرا دارای پتانسیل ردوکس جهت احیای رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Vildová et al., 2014). با توجه به این که تجمع ترکیبات فنلی در مراحل مختلف رشد گیاه متفاوت می‌باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH (IC₅₀) نیز متفاوت است (Omezzine et al., 2013). بر اساس نتایج محتوای پلی‌فنول کل در مرحله گلدهی در *Boerhavia diffusa* (Verma and Kasera., 2007) و *Crithmum maritimum* (Maleš et al., 2003). در طول جوانه‌زدن گل در *Hypericum hyssopifolium* افزایش یافته است. فلاونوئیدها، ویتامین E، اسیدهای فنولیک، فنل‌ها (روس ماریدیفنول، کورکومین، بوتین، یوبی کینول)، نیتروژن ترکیبات (آلکالوئیدها، مشتقات کلروفیل، آمینو اسیدها و آمین‌ها)، کاروتنوئیدها و ویتامین C و سایر مواد گیاهی نقش مهمی در عملکرد آنتی‌اکسیدانی بازی می‌کند (Wang et al., 2000).

در مرحله رشد رویشی، کاربرد باکتری، قارچ و نیترات‌نقره، در مرحله رشد زایشی کاربرد مخمر و در مرحله تولید بذر همه الیستورها سبب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به گیاهان شاهد شدند. بررسی‌های قبلی نشان دادند که حضور قارچ به انفجار تولید H₂O₂ و تخریب سلول و حضور باکتری و مخمر با تغییر غشا پلاسمایی منجر به سنتز متابولیت‌های ثانویه و فعال شدن پاسخ دفاعی علیه ROS می‌گردد. در واقع ارتباط مستقیم بین افزایش سلولی ROS و بیش بیان ژن‌های دفاعی وجود دارد زیرا با افزایش محتوای ترکیبات فنلی مقدار IC₅₀ کاهش می‌یابد که بیانگر افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه است (Humbal et al., 2023). کاربرد سبب افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدانی DPPH (IC₅₀) گیاه شد. احتمالاً افزایش تولید ROS که به ماکرومولکول‌ها و در نهایت ساختار سلولی صدمه می‌رساند به همین علت در گیاه *Erythrina suberosa* افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان در حضور الیستور نیترات‌نقره گزارش شده است (Lam et al., 2023). نتایج تحقیقات Ghanati و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که الیستور نیترات‌نقره در غلظت‌های کم به عنوان افزایش‌دهنده ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند و افزایش بیش از حد آن سبب عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و دفاع آنتی‌اکسیدانی شده که نتیجه آن ایجاد سمیت می‌باشد. نتایج Sun و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که این امکان وجود دارد که خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه خارمریم علاوه بر محتوای فنل و فلاونوئید تحت تأثیر سایر ترکیبات فعال از قبیل اسیدها، قندها و گلیکوزیدها نیز باشد که دارای اثر هم افزایی می‌باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها با توجه به مرحله بلوغ و روش‌های تحلیلی متفاوت است.

سیلیمارین

نتایج نشان داد کاربرد الیسیتورها در هر مرحله اثرات متفاوتی بر محتوای سلیمارین داشتند. بیشترین درصد سلیمارین بخش هوایی گیاه به کاربرد نیترات نقره در مراحل رشد رویشی (۹/۹۶ درصد) و رشد زایشی (۶/۶۴ درصد) مربوط بود. در مرحله تشکیل بذر، کاربرد باکتری ($1/45 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) و مخمر ($1/3 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) بیشترین تاثیر را در افزایش محتوای سلیمارین داشتند. فلزات سنگین از قبیل Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ و V محرک تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که با اتصال به گیرنده در سطح غشا پلاسمایی شبکه‌ای از انتقال سیگنال را راه‌اندازی کرده و بیان کلیه ژن‌های بیوسنتزی دخیل در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله سلیمارین را سبب می‌شوند (Khalili et al., 2010). پژوهش‌های اندکی بر تاثیر تیمار نقره در افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه خارمریم انجام شده است. Ashtiani و همکاران (۲۰۱۰) افزایش محتوای سلیمارین را در گیاهان خارمریم با کاربرد الیسیتور یون نقره مشاهده کردند که با نتایج درصد سلیمارین موجود در بخش هوایی تحقیق حاضر مطابقت دارد. برغم این موضوع Vildová و همکاران (۲۰۱۴) طی پژوهشی دریافتند که فقط غلظت‌های پایین نیترات نقره نقش مثبتی در افزایش فلاونولیکان‌ها مانند سیلی کریستین، سیلی دیانین، سیلی بین A و B در گیاه خارمریم دارد و با افزایش غلظت نیترات نقره میزان این ترکیبات به تدریج به حداقل رسید. در این ارتباط محتوای سلیمارین گاهی مطابق انتظار افزایش نشان نداد چراکه نفوذپذیری دیواره سلول‌ها در محیط کشت دارای الیسیتور تغییر کرده و امکان آزادسازی سلیمارین به محیط کشت را فراهم می‌کند. بیان آنزیم CHS وابسته به اندام (مانند گل‌ها) و ریتم سیرکادیان می‌باشد.

باکتری *P. putida* به عنوان مولد خارجی هورمون‌های اکسین و جیبرلین قادر است سبب افزایش تولید فنل و فلاونوئید گردد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات مانند *P. putida* عمدتاً از طریق افزایش حلالیت فسفات، روی و پتاسیم، سبب دسترسی ماکرومینرال مهم برای گیاه می‌شوند. افزایش فسفات محلول منجر به افزایش متیل جاسمونات و متعاقب آن افزایش فعالیت آنزیم PAL می‌گردد. القای فعالیت بیشتر مسیر سنتز فلاونوئیدها، سبب افزایش سنتز تاکسیفولین و متعاقباً افزایش سنتز سلیمارین می‌شود (Zboralski and Filion 2023 ; Lubna et al. 2018).

از آنجایی که مخمر *Y. lipolytica* قادر به سنتز فیل آلانین به عنوان آغازگر مسیر سنتز سلیمارین (فلاونولیکان) می‌باشد، افزایش محتوای اسیدآمینه آروماتیک، تعداد نسخه‌های ژن CHS را افزایش داده که این خود به افزایش سنتز نارینژنین و نهایتاً سلیمارین منجر می‌شود. در صورت حضور سایر آنزیم‌ها، تبدیل نارینژنین به سایر ترکیبات (آتوسیانین و فلاونوئید) امکان‌پذیر است (Lv et al., 2019). در یک آزمایش تیمار سوسپانسیون *S. maritimum* با عصاره مخمر *Y. lipolytica* تولید سلیمارین را بهبود بخشید و سبب آزادسازی سلیمارین به محیط کشت (سه برابر بیشتر از نمونه‌های شاهد) شد. تصور می‌شود که عصاره مخمر فعالیت لیپوکسیژناز را القا و از این طریق موجب تولید جاسمونات شده است. جاسمونات جزئی از مسیر انتقال علامت مخمر برای تولید فلاونولیکان محسوب می‌شود و از این طریق موجبات افزایش سنتز سیلی مارین را فراهم می‌آورد (Qavami et al., 2013).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

سنتز متابولیت‌های ثانویه به مقدار زیادی تحت تاثیر مراحل نمو گیاه و شرایط حاکم بر رشد گیاه (عوامل زیستی و غیر زیستی) قرار می‌گیرد. در این راستا تغییرات محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه متأثر از شرایط فوق، رابطه نزدیکی با تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارند به همین منظور با اعمال تیمار ریزجانداران و الیسیتور غیرزیستی به بررسی اثر آن‌ها پرداخته شد. انتخاب تیمارها به گونه‌ای بود که ماده حدواسط مسیر سنتز سلیمارین را در اختیار گیاه قرار دهند تا اثر آن‌ها بر متابولیت‌های ثانویه بررسی

کنیم. همچنین تاکنون از بذر گیاه به عنوان منبع اصلی سیلیمارین استفاده می‌شده است که در این تحقیق سعی در افزایش سیلیمارین در بخش هوایی با اعمال تیمارها شد. با توجه به نتایج حاصله بذر گیاه خارمریم غالباً از محتوای ترکیبات فنلی و اسیدهای فنلی بیشتری نسبت به بخش هوایی گیاه برخوردار بود ولی از نظر ترکیبات فلاونوئیدی بخش‌های رویشی گیاه برتر بودند. کاربرد خارجی *Y.lipolytica* محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی را در بذر بطور چشمگیری افزایش داد. نتایج ما حاکی از آن است که کاربرد خارجی نیترات‌نقره درصد محتوای سیلیمارین را فقط در بخش هوایی گیاه افزایش داد ولی الیسیتورهای *P.putida* و *Y.lipolytica* بیشترین تاثیر را در افزایش محتوای سیلیمارین در مرحله تشکیل بذر داشتند. به نظر می‌رسد الیسیتورهای مختلف با توجه به کارکرد اختصاصی که در مسیر بیوسنتزی ترکیبات مختلف دارند (بطور مثال مخمر به عنوان مولد اسیدآمینه فنیل آلانین و باکتری از جهت بهبود دسترسی فسفر) اثرگذاری متفاوتی در مراحل مختلف نمو گیاه گذاشته که البته برای تایید این موضوع به انجام آزمایش‌های تکمیلی نیاز است. در این راستا کاربرد الیسیتورهای مورد بحث در مراحل مختلف نمو گیاه و به صورت ترکیبی می‌تواند زمینه‌های تحقیقاتی جدیدی در خصوص امکان بهبود ترکیبات ثانویه دارویی در گیاه خارمریم باشد.

منابع

- حسنلو، طاهره؛ اسکندری، سحر و نجفی، فرزانه (۱۳۹۴) نقش کیتوزان در افزایش تولید فلاونولیگنان‌ها در کشت ریشه‌های موبین خارمریم (*Silybum marianum* L.). مجله سلول و بافت (پژوهشی - علمی)، ۶ (۳)، ۲۶۷-۲۵۷.
- سروری، سوفیا و باقریان لمراسکی، حسن (۱۳۹۹) مطالعه تاثیر محلول پاشی اسپرمیدین، اسیدسیتریک و پرولین بر رشد و گلدهی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش خشکی. فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران، ۱۵ (۴)، ۳۹-۲۷.
- Akowuah, G. A., Ismail, Z., Norhayati, I., & Sadikun, A. (2005). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 93(2), 311-317. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.09.028
- Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2008). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 1923, 107-123.
- Asghari-Zakaria, R., Panahi, A. R., & Sadeghizadeh, M. (2008). Comparative study of chromosome morphology in *Silybum marianum*. *Cytologia*, 73(3), 327-332. doi: 10.1508/cytologia.73.327
- Ashtiani, S. R., Hasanloo, T., & Bihamta, M. R. (2010). Enhanced production of silymarin by Ag⁺ elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biology*, 48(6), 708-715. doi: 10.3109/13880200903264426
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N., & Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12(8), 1425-1440. doi: 10.1105/tpc.12.8.1425
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary c. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. doi: 10.38212/2224-6614.2748
- Chen, R., Xue, G., Chen, P., Yao, B., Yang, W., Ma, Q., Fan, Y., Zhao, Z., Tarczynski, M. C., & Shi, J. (2008). Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. *Transgenic Research*, 17(4), 633-643. doi: 10.1007/s11248-007-9138-3
- Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., & Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current*

- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., & Menichini, F. (2006). Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. piperitum (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), 2056–2064. doi: 10.1248/bpb.29.2056
- da Veiga Moreira, J., Jolicoeur, M., Schwartz, L., & Peres, S. (2021). Fine-tuning mitochondrial activity in *Yarrowia lipolytica* for citrate overproduction. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-79577-4
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K. W., & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 51, Issue 15, pp. 4247–4253). doi: 10.1021/jf0300745
- Elumalai, E. K., Prasad, T. N. V. K. V, Kambala, V., Nagajyothi, P. C., & David, E. (2010). Green synthesis of silver nanoparticle using *Euphorbia hirta* L. and their antifungal activities. *Archives of Applied Science Research*, 2(6), 76–81. Retrieved from www.scholarsresearchlibrary.com
- Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N., & Skrypnik, L. (2019). Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. *Antioxidants*, 8(7). doi: 10.3390/antiox8070237
- Gad, D., Elhaak, M., Pompa, A., Mattar, M., Zayed, M., Fraternal, D., & Dietz, K. J. (2020). A new strategy to increase production of genoprotective bioactive molecules from cotyledon-derived *Silybum marianum* L. Callus. *Genes*, 11(7), 1–14. doi: 10.3390/genes11070791
- Georgieva, G., Nedeva, T., Badalova, M., Deleva, V., & Savov, V. (2023). Study of the plant growth-promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system. *BioRisk*, 20, 115–128. doi: 10.3897/biorisk.20.97581
- Ghanati, F., Bakhtiar, S., Parast, B. M., & Behrooz, M. K. (2014). Production of new active phytochemicals by *Achillea millefolium* L. after elicitation with silver nanoparticles and methyl jasmonate. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2), 391–399. doi: 10.13005/bbra/1287
- Gupta, K. M. and R. G. (2012). Effect of Various Media Types on the Rate of Growth of. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences ISSN*., 2(2), 141–144.
- Hao, Y. J., An, X. L., Sun, H. D., Piao, X. C., Gao, R., & Lian, M. L. (2020). Ginsenoside synthesis of adventitious roots in *Panax ginseng* is promoted by fungal suspension homogenate of *Alternaria panax* and regulated by several signaling molecules. *Industrial Crops and Products*, 150(October 2019), 112414. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112414
- Harper, Ø. H. and D. A. T. (2006). Paleontological data analysis. In *Choice Reviews Online* (Vol. 43, Issue 09). doi: 10.5860/choice.43-5302
- Hasanloo et al., 2015. (n.d.). The Role of Chitosan (Low Molecular Weight) on Elevation of Flavonolignans Production in *Silybum marianum* Hairy Root Culture. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*.
- Hasanloo et al 2008. (2008). Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 876–882. doi: 10.1080/13880200802367684
- Hasanloo T, Eskandari S, N. F. (2015). The Role of Chitosan (Low MolecularWeight) on Elevation of

- Flavonolignans Production in *Silybum marianum* Hairy Root Culture. *The Role of Chitosan (Low MolecularWeight) on Elevation of Flavonolignans Production in Silybum Marianum Hairy Root Culture*, 6(3), 257–267. doi: 10.52547/JCT.6.3.257
- Hazrati et al 2020. (n.d.). (Hazrati1et al., 2020) *Food Science Nutrition - 2020 - Hazrati - How do essential oil composition and phenolic acid profile of Heracleum.pdf*. Tabriz,. doi: 10.1002/fsn3.1916
- Humbal, A., & Pathak, B. (2023). Influence of exogenous elicitors on the production of secondary metabolite in plants: A review ('“VSI: secondary metabolites”'). *Plant Stress*, 8(April), 100166. doi: 10.1016/j.stress.2023.100166
- Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*, 136(1), 237–244. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.084
- Karla. (1998). Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. In *Crop Science* (Vol. 38, Issue 6). doi: 10.2135/cropsci1998.0011183x003800060050x
- Khalili, M., Hasanloo, T., & Tabar, S. K. K. (2010). Ag+ enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant OMICS*, 3(4), 109–114.
- Kurkin, V. A. (2003). Medicinal plants: Saint-Mary thistle - A source of medicinals (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(4), 189–202. doi: 10.1023/A:1024782728074
- Lam, V. P., Beomseon, L., Anh, V. K., Loi, D. N., Kim, S., Kwang-ya, L., & Park, J. (2023). Effectiveness of silver nitrate application on plant growth and bioactive compounds in *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) kuntze. *Heliyon*, 9(9), e20205. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20205
- Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, 44(September), 107630. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107630
- Lubna, Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Lee, I. J., & Hussain, A. (2018). *Aspergillus Niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 100–111. doi: 10.1080/17429145.2018.1436199
- Lv, Y., Marsafari, M., Koffas, M., Zhou, J., & Xu, P. (2019). Optimizing Oleaginous Yeast Cell Factories for Flavonoids and Hydroxylated Flavonoids Biosynthesis. *ACS Synthetic Biology*, 8(11), 2514–2523. doi: 10.1021/acssynbio.9b00193
- Maina, S., Ryu, D. H., Bakari, G., Misinzo, G., Nho, C. W., & Kim, H. Y. (2021). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity of various organs of african cabbage (*Cleome gynandra* L.) accessions at different growth stages. *Antioxidants*, 10(12). doi: 10.3390/antiox10121952
- Maleš, Ž., Žuntar, I., Nigović, B., Plazibat, M., & Vundać, V. B. (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire - *Crithmum maritimum* L. *Acta Pharmaceutica*, 53(2), 139–144.
- Marceddu, R., Dinolfo, L., Carrubba, A., Sarno, M., & Di Miceli, G. (2022). Milk Thistle (*Silybum Marianum* L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Environments: A Review. *Agronomy*, 12(3). doi: 10.3390/agronomy12030729
- Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J., & Lamer-Zarawska, E. (2008). Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Bioresource Technology*, 99(16), 7892–7896. doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.013

- Medina, A., Roldán, A., & Azcón, R. (2010). The effectiveness of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Aspergillus niger* or *Phanerochaete chrysosporium* treated organic amendments from olive residues upon plant growth in a semi-arid degraded soil. *Journal of Environmental Management*, 91(12), 2547–2553. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.07.008
- Moradi, H., Ghavam, M., & Tavili, A. (2020). Study of antioxidant activity and some herbal compounds of *Dracocephalum kotschy* Boiss. in different ages of growth. *Biotechnology Reports*, 25, e00408. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00408
- Muhammad, A., Feng, X., Rasool, A., Sun, W., & Li, C. (2020). Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances*, 43, 107555. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107555
- Omezzine, F., & Haouala, R. (2013). Effect of *Trigonella foenum-graecum* L. development stages on some phytochemicals content and allelopathic potential. *Scientia Horticulturae*, 160, 335–344. doi: 10.1016/j.scienta.2013.06.023
- Palmer, C. M., Miller, K. K., Nguyen, A., & Alper, H. S. (2020). Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metabolic Engineering*, 57, 174–181. doi: 10.1016/j.ymben.2019.11.006
- Pérez-Ochoa, M. L., Vera-Guzmán, A. M., Mondragón-Chaparro, D. M., Sandoval-Torres, S., Carrillo-Rodríguez, J. C., Mayek-Pérez, N., & Chávez-Servia, J. L. (2023). Effects of Annual Growth Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in the Roots of *Eryngium montanum*. *Plants*, 12(18), 1–15. doi: 10.3390/plants12183192
- Premanath, R., Sudisha, J., Devi, N. L., & Aradhya, S. M. (2011). Antibacterial and anti-oxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) leaves. In *Research Journal of Medicinal Plant* (Vol. 5, Issue 6, pp. 695–705). doi: 10.3923/rjmp.2011.695.705
- Qavami, N., Naghdi Badi, H., Labbafi, M. R., & Mehrafarin, A. (2013). A review on pharmacological, cultivation and biotechnology aspects of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Journal of Medicinal Plants*, 12(47), 19–37.
- Rainone, F. (2005). *Milk Thistle - American Family Physician*. 72(7), 1285–1288. Retrieved from <http://www.aafp.org/afpsort.xml>.
- Saffaryazdi, A., Ganjeali, A., Farhoosh, R., & Cheniany, M. (2020). Variation in phenolic compounds, α -linolenic acid and linoleic acid contents and antioxidant activity of purslane (*Portulaca oleracea* L.) during phenological growth stages. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7), 1519–1529. doi: 10.1007/s12298-020-00836-9
- Sánchez-Sampedro, M. A., Fernández-Tárrago, J., & Corchete, P. (2005). Enhanced Silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Plant Physiology*, 162(10), 1177–1182. doi: 10.1016/j.jplph.2005.01.012
- Schrall, R., & Becker, H. (1977). Callus– Und Suspensionskulturen Von *Silybum Marianum*. *Planta Medica*, 32(05), 27–32. doi: 10.1055/s-0028-1097554
- Shadi Rahimi, Tahereh Hasanloo, Farzaneh Najafi, R. A. K.-N. (2011). Enhancement of Silymarin Accumulation Using Precur.pdf. *Plant Omics Journal*, 4(1), 34–39.
- Shokati, B., & Poudineh, Z. (2017). An overview of plant growth promoting rhizobacteria and their influence on essential oils of medicinal plants. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 7(3), 2051–2061. doi: 10.22034/ijpp.2017.533559

- Simpson, C. A., Geornaras, I., Yoon, Y., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Sofos, J. N., & Dalynn Biologicals. (2014). McFarland Standard. *Journal of Food Protection*, 71(3), 2. Retrieved from http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf
- Sneath, P. H. A. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*.
- Soroori, S., & Lemraski, H. B. (2021). *Calendula officinalis L.* Effect of foliar application of spermidine, citric acid and proline on growth and flowering in *Calendula officinalis L.* under dr.
- Stamford, N. P., Freitas, A. D. S., Ferraz, D. S., & Santos, C. E. R. S. (2002). Effect of sulphur inoculated with *Thiobacillus* on saline soils amendment and growth of cowpea and yam bean legumes. *Journal of Agricultural Science*, 139(3), 275–281. doi: 10.1017/S0021859602002599
- Sun, J., Li, X., & Yu, X. (2016). Antioxidant activities, total flavonoids and phenolics content in different parts of *Silybum marianum* L. plants. *Chemical Engineering Transactions*, 55, 37–42. doi: 10.3303/CET1655007
- T Hasanloo * 1, M Ahmadi 2, SM Khayyan Nequei 3, G. S. J. (2013). Elicitation Effects of Fungal Extracts on Silymarin Accumulation in *Silybum marianum* (L.) Gaertn Hairy Root Culture. *J. Med. Plants*, 12(48), 25–39. doi: 20.1001.1.2717204.2013.12.48.3.0
- Tahereh Hasanloo, Mojegan Kowsari, S. M. N. &, & Bagheri, O. (2010). Study of different Trichoderma strains on growth characteristics and silymarin accumulation of milk thistle plant.pdf. *Journal of Plant Interactions*, 5(1), 45–49. doi: 10.1080/17429140903189166
- Tong, Z., Tong, Y., Wang, D., & Shi, Y. C. (2023). Whole Maize Flour and Isolated Maize Starch for Production of Citric Acid by *Aspergillus niger*: A Review. *Starch/Staerke*, 75(3–4), 1–11. doi: 10.1002/star.202000014
- Tripathi, D. K., Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V. K., Mishra, R. K., Upadhyay, R. G., Dubey, N. K., Lee, Y., & Chauhan, D. K. (2017). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2017.00007
- Tůmová, L., Tůma, J., Megušar, K., & Doležal, M. (2010). Substituted pyrazinecarboxamides as abiotic elicitors of flavolignan production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cultures in Vitro. *Molecules*, 15(1), 331–340. doi: 10.3390/molecules15010331
- Verma and Kaseera. (n.d.). SHORT COMMUNICATION VARIATIONS IN SECONDARY METABOLITES IN SOME ARID ZONE MEDICINAL PLANTS IN RELATION TO SEASON AND PLANT GROWTH. *Indian J. Plant Physiol.*
- Vernon L. Singleton, Rudolf Orthofer, R. M. L.-R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299.
- Vildová, A. A., Hendrychová, H., Kubeš, J., & Tůmová, L. (2014). Influence of AgNO₃ Treatment on the Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybummarianum* (L.) Gaertn. 1(7), 2014.
- Vinogradova, N., Vinogradova, E., Chaplygin, V., Mandzhieva, S., Kumar, P., Rajput, V. D., Minkina, T., Seth, C. S., Burachevskaya, M., Lysenko, D., & Singh, R. K. (2023). Phenolic Compounds of the Medicinal Plants in an Anthropogenically Transformed Environment. *Molecules*, 28(17). doi: 10.3390/molecules28176322
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140–146. doi: 10.1021/jf9908345

- Wen, Z., Dumas, T. E., Schrieber, S. J., Hawke, R. L., Fried, M. W., & Smith, P. C. (2008). Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(1), 65–72. doi: 10.1124/dmd.107.017566
- Zboralski, A., & Filion, M. (2023). *Pseudomonas* spp. can help plants face climate change. *Frontiers in Microbiology*, 14(June), 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2023.1198131
- Zhao, J., & Sakai, K. (2003). Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 647–656. doi: 10.1093/jxb/erg062

The effect of fungal, bacterial, yeast and silver nitrate elicitors on the content of antioxidant compounds and silymarin in milk thistle plant development stages (*Silybum marianum* L.)

Extended Abstract

Introduction

The milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn L.) contains silymarin as the flavonolignan in its seeds, which is used to treat liver, digestive, biliary, and poisoning diseases. *Aspergillus niger* is known as the main source of citric acid production, *Pseudomonas putida* can produce high amounts of organic acids by decomposing organic substances in the soil and subsequently providing more phosphorus in the soil for absorption by plants. The yeast *Yarrowia lipolytica* is known as the host of naringenin biosynthesis. By inhibiting the activity of ethylene, silver nitrate increases the expression of some genes and different intracellular enzymes and affects the synthesis of secondary metabolites in plants. Considering the importance of milk thistle as a medicinal plant, this study was conducted to investigate the possibility of increasing the synthesis of secondary medicinal compounds, especially silymarin and antioxidant compounds, by using some biotic and abiotic elicitors in different phenological stages.

Materials and methods

Milk thistle seedling were transferred to pots containing sterile soil. *P. putida* and *Y. lipolytica* with 0/5 McFarland standards (approximately $1/5 \times 10^8$ bacterial or yeast suspensions mL^{-1}) and *A. niger* suspension (1.2×10^7 spores mL^{-1}) (Medina *et al.*, 2010) were added to the rhizosphere of seedling in a volume of 10 ml. Foliar spraying of silver nitrate (ppm 100) was performed in vegetative and reproductive stages. A methanolic extract (1 gram of plant powder in 10 ml of 80% methanol) was prepared, and the phenol content was measured via Vernon *et al.* (1999), flavonoid content (Chang *et al.*, 2002), phenolic acid content (Matkowski *et al.*, 2008), IC_{50} (Akowuah *et al.*, 2005), silymarin percentage (Hasanloo *et al.*, 2008), and silymarin content (Wen *et al.*, 2008).

Results and Discussion

The results revealed that the highest content of total phenol in the vegetative stage was related to the application of silver nitrate ($5.33 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$), whereas in the reproductive stage, the highest content was associated with the control treatment ($5.11 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$), and in seeds was achieved via the use of yeast ($12.94 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$). The highest content of flavonoids in the vegetative stage was associated with silver nitrate ($5.5 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$), that in the reproductive stage was related to fungi ($3.4 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$), and that in the seeds was belonged to yeast ($4.5 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$). The highest content of phenolic acid in the vegetative stage ($2.73 \text{ mg CEA g}^{-1} \text{ DW}$) was related to the applied bacteria, and in the reproductive stage, it was related to fungi ($1.62 \text{ mg CEA g}^{-1} \text{ DW}$) and yeast in the seeds ($3.5 \text{ mg CEA g}^{-1} \text{ DW}$). Fungi, bacteria, and yeast was applying in this experiment are the sources of citric acid production (Tong *et al.*, 2023) and are able to produce and accumulate phenolic and flavonoids compounds in the vacuole and also increasing antioxidant activity (Soroori *et al.*, 2021). Some heavy metals protect plants against oxidative damage via the induction of phenolic compound synthesis, reduce free radical damage and increase the compatibility of plants with the environment (Vinogradova *et al.*, 2023).

The highest antioxidant activity and value of DPPH (IC_{50}) were obtained by using silver nitrate in the vegetative stage ($85.99 \mu\text{g ml}^{-1}$) and in the reproductive stage ($65.45 \mu\text{g ml}^{-1}$) and in seed ($37.54 \mu\text{g ml}^{-1}$) was belong to yeast. By changing the plasma membrane, yeast can synthesize secondary metabolites and activate a defensive response against ROS (Humbal *et al.*, 2023).

Silver nitrate caused the synthesis of the highest percentage of silymarin in the aerial part of the plant in the vegetative (9.96%) and reproductive (6.64%) stages, and applying the bacteria significantly increased the content of silymarin in the seeds. Heavy metals bind to receptors on the surface of the plasma membrane, initiate a network of signal transmissions and cause the overexpression of all genes involved in the synthesis of secondary metabolites, including silymarin (Khalili *et al.*, 2010). Bacteria, as external producers of auxin and gibberellin hormones, induce flavonoid synthesis pathway, which subsequently lead to increases the taxifolin and silymarin synthesis (Zboralski and Filion., 2023). Yeast increases the synthesis of phenylalanine as the primer of the silymarin synthesis pathway (Lv *et al.*, 2019).

Conclusion

Results revealed that the content of total phenol increased from the vegetative to reproductive stage and then the seed, but this, adversely for total flavonoid content. It seems that the elicitors have various effects on different plant growth stages due to their special function in the biosynthetic pathway of various compounds including silymarin.

پژوهشهای زیست‌شناسی