



The Effect of Fungal, Bacterial, Yeast and Silver Nitrate Elicitors on the Content of Antioxidant Compounds and Silymarin in Different Developmental Stages of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)

Arezoo Naghavi^{1✉}  Gholamreza Niknam²  Nasir Vazifeh³ 

1. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: Naghavi.a@lu.ac.ir
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: g_Niknam@tabrizu.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: Nasir.vazife@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	<i>Silybum marianum</i> exhibits significant biological activities, such as antioxidant and anticancer effects, attributed to its phytochemical properties. Hence, it has long been considered a valuable medicinal plant. The purpose of this study was to investigate the effect of biological stimuli, including bacteria (<i>Pseudomonas putida</i>), yeast (<i>Yarrowia lipolytica</i>), fungi (<i>Aspergillus niger</i>), and AgNO ₃ elicitors, on the contents of phenolic compounds, silymarin and antioxidant potential in the seeds and aerial parts of plant during the vegetative and reproductive growth stages. 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 content of phenolic compounds in the seeds of plants treated with bio and non-bio stimulants was greater than that found 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 as the plant progressed from the vegetative stage to the reproductive stage and seed production. This decline is probably associated with the increase in cell differentiation during the period of growth, as well as the mechanisms for protection against pest attack, degradation, and a reduction in the activity of enzymes involved in biosynthetic pathways. Although AgNO ₃ increased the silymarin percentage in both the vegetative (9.96%) and reproductive stages (6.64%) in comparison to the control, it was bacterial inoculation that had the most significant impact on increasing the silymarin content in the seed production stage, resulting in a 33% increase in silymarin content relative to the control.
Article history: Received: 3 August 2024 Received in revised form: 31 October 2024 Accepted: 16 December 2024 Published online: Spring 2025	
Keywords: <i>free radical, phenolic compounds, phenology, silymarin.</i>	

Cite this article: Amjadi, E., Ganjeali, A., Shakeri, A., Lahouti, M. & Tavakoli, S. (2025). The Effect of Fungal, Bacterial, Yeast and Silver Nitrate Elicitors on the Content of Antioxidant Compounds and Silymarin in Different Developmental Stages of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 56 (1), 153-178. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380169.2197>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380169.2197>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

The milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) contains silymarin, a flavonolignan found in its seeds, which is used for the treatment of liver, digestive, biliary, and poisoning diseases. Elicitors are substances that can boost the synthesis of secondary metabolites in plants by activating defense mechanisms. *Aspergillus niger* is known as the main source of citric acid production, *Pseudomonas putida* can produce significant quantities of organic acids through the decomposing organic substances in the soil and subsequently providing more phosphorus in the soil for absorption by plants. The yeast *Yarrowia lipolytica* is recognized as the host of naringenin biosynthesis, which serve as a precursor in the synthesis of flavonoids. Silver nitrate enhances the expression of certain genes and various intracellular enzymes by inhibiting ethylene activity, thereby affecting the synthesis of secondary metabolites in plants. Considering the importance of milk thistle as a medicinal plant, this research was undertaken to explore the potential for enhancing the production of medicinal compounds, particularly silymarin and antioxidant compounds, through the application of various biotic and abiotic elicitors at different phenological stages.

Materials and methods

Twenty-day-old seedlings of milk thistle cultivated in sterile soil in a greenhouse were subjected to four different treatments. These included *Pseudomonas putida*, *Yarrowia lipolytica*, each at a concentration of 0.5 McFarland standards, approximately 1.5×10^8 bacteria or yeast, and *Aspergillus niger* at a concentration of 1.2×10^7 spores per ml. These treatments were added to the rhizosphere in a volume of 10 ml. Additionally, silver nitrate treatment (at a concentration of 100 ppm) was applied through leaf spraying during both vegetative and reproductive stages. The plants aerial parts were collected at two stages namely vegetative and reproductive stages as well as seeds to examine their biochemical characteristics. A methanolic extract prepared by dissolving 1 g of plant powder in 10 ml of 80% methanol to assess the total phenol, flavonoid, phenolic acid content, IC_{50} , as well as silymarin content.

Results and Discussion

The results revealed that the highest content of total phenol in the areal parts at vegetative stage was attributed to the application of silver nitrate (5.33 mg GAE g⁻¹ DW), whereas in the reproductive stage, the highest content was associated with the control treatment (5.11 mg GAE g⁻¹ DW). Furthermore, in seeds, the highest level was obtained through the use of yeast (12.94 mg GAE g⁻¹ DW). The maximum content of flavonoids during the vegetative stage was linked to silver nitrate (5.5 mg QE g⁻¹ DW), while in the reproductive stage it was related to fungi application (3.4 mg QE g⁻¹ DW), and in the seeds, was belonged to yeast application (4.5 mg QE g⁻¹ DW). The highest content of phenolic acid in the vegetative stage (2.73 mg CEA g⁻¹ DW) was related to the application of bacteria, and in the reproductive stage, it was related to fungi (1.62 mg CEA g⁻¹ DW), and in the seeds, it was attributed to yeast (3.5 mg CEA g⁻¹ DW). The studied bio stimulants are sources for citric acid production and are able to produce and accumulate phenolic and flavonoids compounds within the vacuole, thereby enhancing antioxidant activity. Certain heavy metals, such as silver nitrate, protect plants against oxidative damage by the promoting of phenolic compound synthesis, mitigating free radical damage and improving the compatibility of plants with their environment.

The highest antioxidant activity and value of DPPH (IC_{50}) were obtained in both the vegetative (85.99 µg ml⁻¹) and reproductive stages (65.45 µg ml⁻¹) using silver nitrate treatment, while in seed production stage (37.54 µg ml⁻¹) was assigned to yeast treatment. By changing the plasma membrane, yeast can synthesize secondary metabolites and activate a defensive response against reactive oxygen species.

The application of silver nitrate resulted in the highest synthesis of silymarin in the aerial parts of the plant during both the vegetative (9.96%) and reproductive (6.64%) stages. Furthermore, the application of bacteria significantly enhanced the silymarin content 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. Bacteria, as external producers of auxin and gibberellin hormones, induce flavonoid synthesis pathway, which in turn promotes the synthesis of taxifolin and silymarin. Yeast increases the synthesis of phenylalanine, as a precursor in the silymarin synthesis pathway.

Conclusion

The results indicated that the total phenol content of aerial parts of plant increased from the vegetative to the reproductive stage and subsequently in the seed; however, it was different for total flavonoid content. It seems that elicitors have diverse effects on various stages of plant growth, attributable to their specific roles in the biosynthetic pathways of different compounds.

Author Contributions

E. Amjadi: Conceptualization, Investigation, Formal analysis & Writing - original draft. A. Ganjeali: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Final approval of the article. A. Shakeri: Methodology, Writing - original draft & editing. M. Lahoti: Investigation, Methodology. S. Tavakoli: Investigation, Methodology.

Data Availability Statement

All data supporting the findings of this study are available within the paper and are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

We sincerely thank all individuals who provided technical assistance during the execution of this project.

We are special thankful from Ferdowsi University of Mashhad, Ministry of Science, Research, and Technology, Iran to financial support (grant no. 3/55205).

We are grateful to I. R of the Iran Meteorological Organization for providing the meteorological data and the Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR) for the analysis and processing of the medicinal plants.

Ethical considerations

This article does not contain any studies involving human and animal subjects. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism and misconduct.

Conflict of interest

The corresponding author declare that there is no Conflict of interest.



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

الهام امجدی^۱ | علی گنجعلی^۲ | ابوالفضل شاکری^۳ | مهرداد لاهوتی^۴ | سعید توکلی^۵

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: elham.amjadi@um.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: ganjeali@um.ac.ir
۳. گروه فارماکوتکنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: plantchem87@gmail.com
۴. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: mlahouti@um.ac.ir
۵. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران. رایانامه: saeedtavakoli18@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶ تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۴ کلیدواژه‌ها: ترکیبات فنلی، رادیکال آزاد، سیلیمارین، فنولوژی.	گیاه خارمریم (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.) 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 تأثیر محرک‌های زیستی شامل باکتری (<i>Pseudomonas putida</i>)، مخمر (<i>Yarrowia lipolytica</i>)، قارچ (<i>Aspergillus niger</i>) و الیسیتور 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 تحت تأثیر محرک‌های زیستی و غیر زیستی در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی، محتوای فنل موجود در بذر بیشتر از بخش هوایی 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 تأثیر را در بهبود محتوای سیلیمارین داشت و مقدار سیلیمارین بذر را نسبت به شاهد به میزان ۳۳ درصد افزایش داد.

استناد: امجدی، الهام؛ گنجعلی، علی؛ شاکری، ابوالفضل؛ لاهوتی، مهرداد و توکلی، سعید (۱۴۰۴) بررسی تأثیر محرک‌های قارچی، باکتریایی، مخمر و نیترات‌نقره بر محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و سیلیمارین در مراحل نمو مختلف گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.). نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۶ (۱)، ۱۷۸-۱۵۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380169.2197>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.380169.2197>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

گیاه خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* (L.) Gaertn. متعلق به تیره کاسنیان، گیاهی دیپلوئید ($2n=34$) (Asghari-Zakaria et al., 2008)، یک یا دوساله با ارتفاع حدود دو متر می باشد. این گیاه دارای برگ های متنوب، سبز و براق با لکه های سفید است که اغلب به صورت خودرو در حاشیه جاده ها و اراضی متروک می روید (Gad et al., 2020). میوه خارمریم فندقه صاف و قهوه ای رنگ است که در راس آن تارهایی به نام جقه وجود دارد. جوانه زنی بذر خارمریم در فصل بهار یا پاییز تحت تاثیر نور و دما می باشد که به نظر می رسد نیازمند دوره پسرسی است و در دمای پایین بهتر جوانه می زند. خارمریم گیاهی کم توقع، متحمل به خشکی و شوری و مدیترانه ای است که در طول رویش به گرما و آفتاب فراوان نیاز دارد و در دمای ۱۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس قادر به جوانه زنی و رشد می باشد. دمای مطلوب جوانه زنی این گیاه ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس گزارش شده است (Qavami et al., 2013). این گیاه حاوی ترکیبات فلاونولیگنانی^۱ (از قبیل سیلی بین^۲ A^۳ و B^۴، ایزوسیلی بین^۵ A^۶ و B^۷، سیلی دینین، سیلی کریستین، دی هیدروسیلی بین و تاکسی فولین^۸ بوده که به مجموع آن ها سیلی مارین^۹ اطلاق می شود (Kurkin, 2003) و ۵۰ تا ۷۰ درصد عصاره بذر گیاه را تشکیل می دهد (Gad et al., 2020). انباشت فلاونولیگنان ها در بذر وابسته به مرحله نمو گل بوده و در مرحله گلدهی به حداکثر میزان خود می رسد (Qavami et al., 2013). از خارمریم در درمان بیماری های کبدی، گوارشی (Gad et al., 2020)، صفراوی و مسمومیت استفاده می شود (Rainone, 2005). اعتقاد بر این است که اثرات درمانی خارمریم بیشتر به دلیل وجود سیلیمارین موجود در عصاره آن می باشد که با تحریک احیای بافت کبدی نقش مثبتی در درمان هپاتیت دارد (Asghari-Zakaria et al., 2008). این ترکیبات در پایداری و تثبیت غشای کبدی موثر بوده و مانع پیوند بسیاری از سموم و داروها با این غشا می گردند. سیلیمارین با افزایش غلظت گلوتاتیون سلولی، حذف رادیکال های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حفاظت از کبد را سبب می شود (Marceddu et al., 2022). الیسیتورها مواد شیمیایی از منابع مختلف زیستی (مانند ترکیبات مشتق شده از قارچ ها، باکتری ها، قطعات دیواره سلول گیاهی و مواد شیمیایی آزاد شده از گیاه طی حمله پاتوژن یا علفخوار) و غیرزیستی (یون های فلزی و ترکیبات معدنی) هستند که قادر به القای پاسخ های فیزیولوژیک و مورفولوژیک بوده و منجر به انباشت فیتوالکسین در گیاهان می شوند. گیاهان واکنش های دفاعی متفاوتی از جمله افزایش تولید و انباشت متابولیت های ثانویه نسبت به الیسیتورها دارند (حسنلو و همکاران، ۱۳۹۴). عوامل متعددی مانند نوع و غلظت الیسیتور، مدت زمان قرارگیری در معرض الیسیتور، زمان تیماردهی، نوع و ترکیب محیط کشت، لاین سلولی، حضور یا عدم حضور تنظیم کننده های رشد و مرحله ای از کشت که در آن تیماردهی الیسیتورها انجام می شود بر تولید متابولیت های ثانویه تاثیر گذار هستند. اتصال الیسیتور به گیرنده در غشای سلول، مجموعه ای از پاسخ های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شامل فعال شدن سیستم دفاعی، فعالیت کانال های کلسیمی و کاهش pH در سیتوپلاسم سلول را ایجاد خواهد کرد که نتیجه آن اغلب تغییر در سطح بیان ژن ها و فاکتورهای رونویسی تنظیمی است و معمولا افزایش سنتز و انباشت متابولیت های ثانویه را در سلول گیاهی به دنبال دارد (Blume et al., 2000; Zhao et al., 2003).

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

پیشینه پژوهش

بهره‌مندی از الیسیتورها 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. الیسیتورهای زیستی مولکول‌هایی از پاتوژن یا خود میزبان هستند که سبب القای پاسخ‌های دفاعی می‌شوند. الیسیتورهای غیر زیستی شامل پرتو فرابنفش، فلزات سنگین، ترکیبات غیر ضروری محرک تولید فیتوالکسین‌ها هستند. استفاده از این الیسیتورها 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 et al., 2012) و به‌عنوان اصلی‌ترین منبع تولید اسیدسیتریک در جهان شناخته شده است (Anastassiadis et al., 2008) و حضور آن در محصولات کشاورزی مانند انواع میوه‌ها، پیاز، مغزها و ذرت تحت شرایط دمایی ۴۷-۶ درجه سلسیوس و pH ۹/۸-۱/۵ گزارش شده است (Li et al., 2020). باکتری *Pseudomonas putida* به‌عنوان 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 به‌عنوان عوامل بهبود دهنده رشد گیاهان، جذب عناصر غذایی با هزینه کم و کاهش آلودگی زیستی رایج شده است. 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، مورفوزن و فتوسنتز گیاه به اثبات رسیده است (Stamford et al., 2002). نارینژنین به‌عنوان پیش‌ساز ترکیبات فلاونوئیدی، مشتقی از مالونیل کوآ می‌باشد که نقش مهمی در صنعت دارو سازی ایفا می‌کند. مخمر *Yarrowia lipolytica* (با توان هیدرولیز لیپید) قادر به تجمع سطح بالایی از مالونیل کوآ و انتقال آن به میزبان به منظور بیوسنتز لیپید می‌باشد و در تحقیقات پیشین به‌عنوان میزبان بیوسنتزی نارینژنین یاد شده است (Palmer et al., 2020). این مخمر قادر به جذب ترکیبات فنلی، منابع قند آلی و آلکانی به‌عنوان منبع کربن می‌باشد (Coelho et al., 2010; da Veiga Moreira et al., 2021) و با توان سنتز اسیدسیتریک سبب افزایش مقاومت در برابر یون‌های فلزی می‌شود (Anastassiadis et al., 2008).

نیتрат نقره (AgNO_3) به‌عنوان الیسیتور 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). به‌طور 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 شده است (Tumová et al., 2010). نتایج کاربرد عصاره قارچ *Fusarium oxysprum* و *Phytophthora meloni* در کشت تعلیقی سلولی خارمریم (حسنلو و همکاران، ۱۳۹۲) و نیز استفاده از L- فیل آلانین در کشت ریشه‌های موئین 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 فلاوونولیگنان‌ها شده است (حسنلو و همکاران، ۱۳۹۴). نظر به این که خارمریم به‌عنوان 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 ریزجانداران شامل باکتری، مخمر، قارچ و نیز نیترات‌نقره به‌عنوان الیسیستور غیرزیستی در کشت گلخانه‌ای صورت نگرفته است، لذا این مطالعه با هدف امکان ترغیب سنتز ترکیبات ثانویه دارویی در کشت گلدانی گیاه خارمریم 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	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	مواد آلی خاک	مواد خنثی شونده	ماسه	رس	سیلت	اسیدیته	الکتریکی (دسی زیمنس/متر)	هدایت
	(میلی گرم بر گیلوگرم)					درصد					
لومی	۱۳۳۲/۵	۱۱۸/۶	۰/۴	۳/۵۱	۱۲/۵	۴۶	۱۸	۳۶	۷/۸۷	—	۱/۲

بذور خارمریم پس از ضدعفونی ابتدا در سینی‌های نشا کاشته شد و گیاهچه‌ها در مرحله دو برگ به گلدان‌هایی به حجم چهار لیتر (رشد ریشی) و هفت لیتر (رشد زایشی) حاوی مخلوطی از ماسه نرم و خاک باغچه (۵۰: ۵۰) ضدعفونی شده در اتوکلاو منتقل شدند. گلدان‌ها در گلخانه و دمای حدود ۲۵ درجه سلسیوس با روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت نگهداری شدند. تیمارهای آزمایش ۲۰ روز پس از کاشت 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 ($10^8 \times 1/5$) (Simpson et al., 2014) و قارچ به تعداد $10^7 \times 1/2$ اسپور بر میلی لیتر تهیه (Medina et al., 2010) و متناسب با تیمار مربوطه به مقدار ۱۰ میلی لیتر به اطراف ریشه هر گیاهچه در زمان نشاء اضافه شد. نیترات‌نقره با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام، در هنگام غروب آفتاب و در دو مرحله رویشی (۲۰ روز بعد از استقرار گیاه در گلدان) و آغاز مرحله زایشی (ظهور اولین غنچه‌های گل) به برگ گیاه اسپری شد، به‌طوری که کل بخش هوایی آغشته به نیترات‌نقره 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 (بالا)، زایشی و تولید بذر (پایین) در گیاه خارمریم

عصاره گیری نمونه ها

جهت تهیه عصاره متانولی، یک گرم پودر گیاه (به تفکیک تیمار بخش هوایی رویشی، بخش هوایی زایشی، بذر) در ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط روی شیکر قرار گرفت. سپس با دور ۴۵۰۰ در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشنای پس از خشک شدن به عنوان عصاره خشک در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد (Sultana *et al.*, 2009).

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 (Karla, 1998).

تعیین محتوای فنل کل

به منظور تعیین محتوای فنل کل مطابق روش Singleton *et al.* (1999)، به ۱۵۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. سپس ۱۵۰۰ میکرولیتر بی کربنات سدیم ۷ درصد به محتویات هر لوله اضافه و پس از ۹۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل UV-120-02 شیمادز، ژاپن) ثبت شد. محتوای فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد ($Y = 0.0013x$, $R^2 = 0.9663$) به صورت میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک عصاره بیان گردید.

تعیین محتوای فلاونوئید کل

مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی به ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم آبی ۱۰ درصد، 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 (مدل UV-۱۲۰۰۲-UV شیمادز، ژاپن) در طول موج ۴۱۵ نانومتر 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 گزارش شد (Chang *et al.*, 2002).

تعیین محتوای اسیدهای فنلی

۲۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر، ۲۵۰ میکرولیتر هیدروژن کلراید ۱۰ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر نیتروژن سدیم (آبی) ۱۰ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و تاریکی نگهداری شد. سپس در لحظه قرائت جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر به هر نمونه ۲۵۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم و ۲۵۰ میکرولیتر 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 اسید کافئیک در هر گرم وزن خشک عصاره گزارش گردید (Matkowski *et al.*, 2008).

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH (IC₅₀)

عصاره متانولی (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) با حجم های ۵۰۰-۰ میکرولیتر 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 رادیکال های آزاد با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد که در آن A_c جذب نمونه شاهد و A_s جذب عصاره می باشد و به واحد میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد (Akowuah *et al.*, 2005).

$$FRSA = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

(رابطه ۱)

سنجش سیلیمارین

به یک میلی لیتر عصاره متانولی، دو میلی لیتر محلول دو و چهار دی نیترو فنل هیدرازین اضافه و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ دقیقه در لوله های درب بسته نگهداری شد. پس از سرد شدن با هیدروکسید پتاسیم متانولی ۱۰ درصد به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد تا مخلوط قرمز رنگ حاصل گردد. سپس یک 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 در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ گردید و روشناور آن به روشناور قبلی افزوده شد. پس از آن محلول حاصل با متانول به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و در طول موج ۴۹۰ نانومتر جذب نمونه ها خوانده شد. روش محاسبه بر مبنای شدت جذب محلول یک درصد سیلیبین در سل کوارتر یک سانتی متری ($A_{1\% 1cm} = 527$) 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 می باشد (Hasanloo *et al.*, 2008).

$$SM (\%) = (A \times 10 \times 50 \times 50 \times 100) / (527 \times 100 \times M)$$

(رابطه ۲)

همچنین به منظور تهیه عصاره استونی بذر جهت سنجش سیلیمارین از پودر بذر چربی زدایی شده توسط سوکسله و آن هگزان استفاده شد. به این منظور پس از چربی زدایی، سه مرحله عصاره گیری با استون و صاف کردن توسط کاغذ صافی انجام و جهت تغلیظ عصاره ها، از روتاری با بیشینه دما ۴۵ درجه سلسیوس استفاده گردید و در نهایت وزن عصاره خشک حاصل ثبت شد. محتوای سیلیمارین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مجهز به ستون C18 $250 \times 4/6$ میلی متر، اندازه ذرات ۵ میکرون شناساگر فرافش Knaauer K2600A DAD 2.1 L و نرم افزار Chromgate 82 برای تشخیص پیک تعیین شد. حلال های اسید فسفریک، متانول و آب با نسبت حجمی (۵/۰ : ۲۵ : ۶۵) به عنوان فاز متحرک استفاده شدند. زمان اجرا به مدت ۴۰ دقیقه و با سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد و پیک ها در ۲۸۸ نانومتر شناسایی گردید (Wen et al., 2008). محتوای سیلیمارین بذر با واحد میلی گرم بر گرم وزن خشک بیان شد.

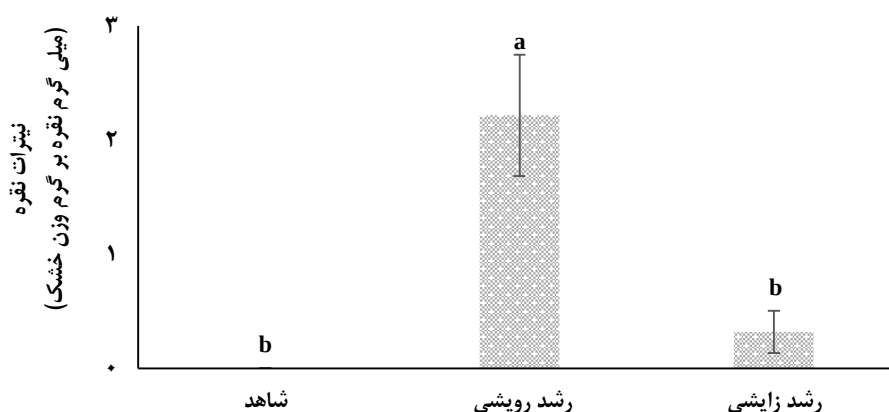
آنالیز آماری

آنالیز واریانس داده ها (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ($P \leq 0.01$) و ($P \leq 0.05$) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و همبستگی های بین صفات با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. داده های کمی صفات فیتوشیمیایی مورد نظر به وسیله تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی بای پلات (PCA) با استفاده از الیستورهای مورد نظر، ارزیابی و بررسی شدند (Sneath, 1973). اجزای اصلی (PC) با مقدار ویژه بیشتر از یک در نظر گرفته شدند.

یافته های پژوهش

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

به منظور بررسی و اطمینان از جذب نیترات نقره به کار برده شده در آزمایش، آنالیز پلاسمای جفت شده القایی^۱ انجام شد. نتایج بررسی ها حاکی از عدم وجود نیترات نقره در تیمار شاهد بود. میزان جذب نیترات نقره در مرحله رشد رویشی ۲/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک و در مرحله رشد زایشی ۰/۳۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک تعیین شد (شکل ۲).

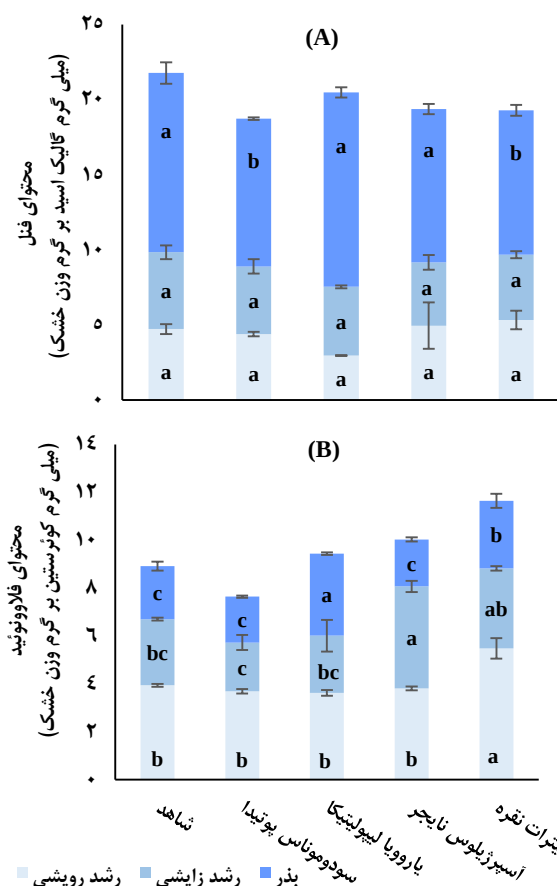


شکل ۲. آنالیز نیترات نقره موجود در بافت خشک بخش هوایی گیاه خارمریم

(ستون های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح احتمال خطای یک درصد ندارند)

محتوای ترکیبات فنلی کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از عدم معنی‌داری الیستورهای مختلف بر محتوای ترکیبات فنلی کل بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی بود، اگرچه بر محتوای ترکیبات فنلی بذر تاثیر معنی‌دار داشت ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که اگر چه کاربرد خارجی نیترات‌نقره (۱۰۰ پی پی ام) در مراحل مورد بررسی باعث افزایش محتوای ترکیبات فنلی کل بخش هوایی شد اما تفاوت آن نسبت به شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود. محتوای ترکیبات فنلی کل موجود در بذر در تیمارهای نیترات‌نقره (۹/۶ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) و باکتری (۹/۸ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) نسبت به تیمار شاهد (۱۱/۹۳ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به صورت معنی‌دار کاهش یافتند ولی کاربرد سایر تیمارهای آزمایشی از نظر محتوای ترکیبات فنلی کل تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (شکل ۳ A). در این بررسی محتوای ترکیبات فنلی کل بذر در مقایسه با اندام هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی به صورت قابل توجهی بیشتر بود (شکل ۴ A).

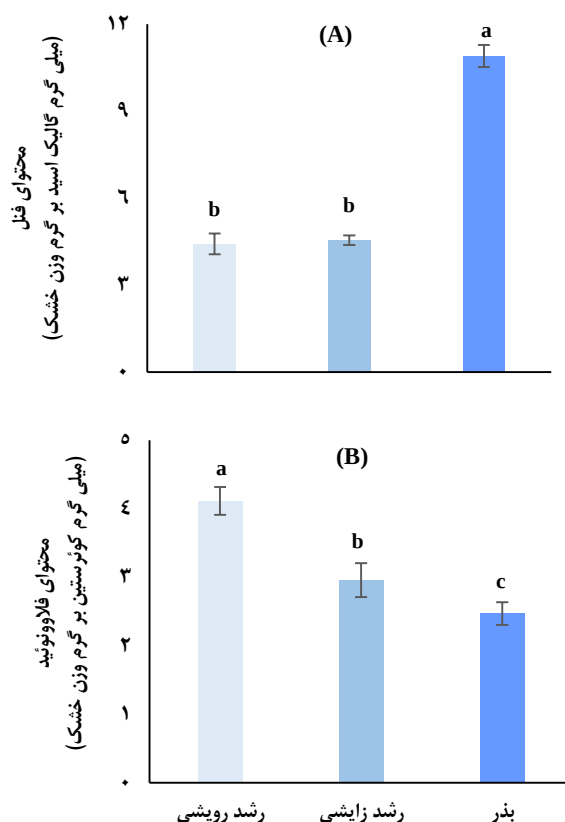


شکل ۳. میانگین محتوای فنل کل (A) و فلاونوئید کل (B) در بذر و بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی (ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای یک درصد ندارند)

محتوای فلاونوئید کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها تاثیر معنی‌دار الیستورهای مختلف بر 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 (۵/۵ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) نسبت به تیمار

شاهد (۳/۹۴ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) افزایش ۳۹/۶ درصدی و معنی داری 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 معنی داری نداشت. مقایسه میانگین مشاهدات مربوط به بذر نشان داد که استفاده از الیسیتور مخمر محتوای فلاونوئید کل (۳/۴۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) را نسبت به تیمار شاهد (۲/۲۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) به صورت قابل توجهی افزایش داد (۵۴/۵ درصد). از طرف دیگر کمترین محتوای فلاونوئید کل بذر (۱/۹۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) به تیمار کاربرد باکتری تعلق داشت که البته نسبت به تیمار شاهد (۲/۲۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) و تیمار کاربرد قارچ (۱/۹۶ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) معنی دار نبود (شکل ۳ B). نتایج مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید بخش هوایی گیاه در هر سه مرحله نمو مورد بررسی نشان داد که با افزایش سن گیاه و رسیدگی بذر محتوای فلاونوئید به صورت قابل توجهی کاهش می یابد (شکل ۴ B).

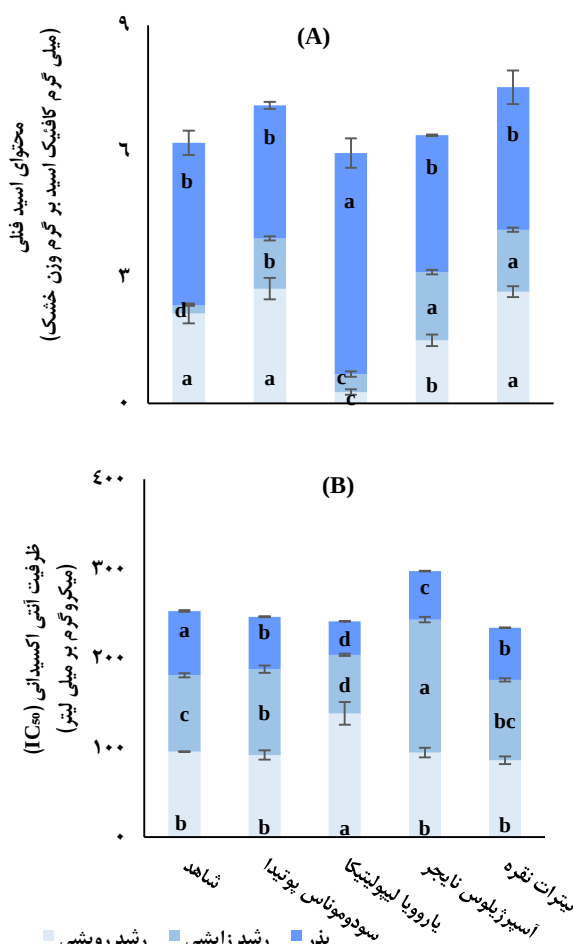


شکل ۴. مقایسه میانگین محتوای فنل (A) و فلاونوئید کل (B) در بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی، زایشی و بذر (ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح احتمال خطای یک درصد ندارند)

محتوای اسید فنلی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها تاثیر معنی دار الیسیتورهای مختلف بر ($P \leq 0.01$) محتوای اسید فنلی را در بذر و همچنین بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی داشت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در مرحله رشد رویشی بیشترین محتوای اسید فنلی به میزان ۲/۷۳ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک (افزایش ۲۷/۶ درصدی نسبت به شاهد) به تیمار کاربرد باکتری تعلق داشت، اگرچه نسبت به تیمار شاهد (۲/۱۴ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) و نیترات نقره (۲/۶۶ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی دار نداشت. کمترین مقدار اسید فنلی (۰/۲۷ میلی گرم

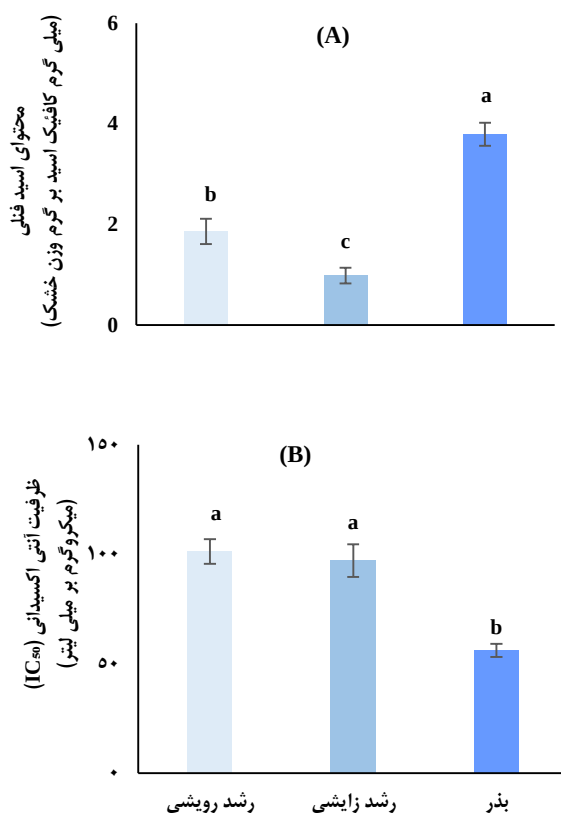
کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) با کاربرد مخمر به دست آمد که اختلاف آن با تیمار شاهد معنی دار بود. در مرحله رشد زایشی تیمار کاربرد قارچ از بیشترین محتوای اسید فنلی (۱/۶۲ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) برخوردار بود که نسبت به تیمار شاهد یک افزایش ۷/۵ برابری نشان داد، این در حالی است که محتوای اسید فنلی در این تیمار نسبت به تیمار کاربرد نیترات نقره (۱/۴۷ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی دار نداشت. در این آزمایش کمترین محتوای اسید فنلی (۰/۱۹ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) به تیمار شاهد تعلق داشت. در رابطه با بذر، بیشترین محتوای اسید فنلی به تیمار مخمر (۵/۲۷ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک) تعلق داشت که اختلاف آن نسبت به تیمار شاهد معنی دار و افزایش ۳۶/۲ درصدی داشت. کمترین محتوای اسید فنلی (۳/۱۷ میلی گرم کافئیک اسید بر گرم وزن خشک)، به تیمار باکتری مربوط بود که نسبت به تیمارهای شاهد، قارچ و نیترات نقره، تفاوت معنی داری نداشت (شکل A ۵). نتایج ما دلالت بر 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 ۶).



شکل ۵. میانگین محتوای اسید فنلی (A) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (B) بذر و بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی (ستون های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح احتمال خطای یک درصد ندارند)

ظرفیت آنتی اکسیدانی (DPPH (IC₅₀)

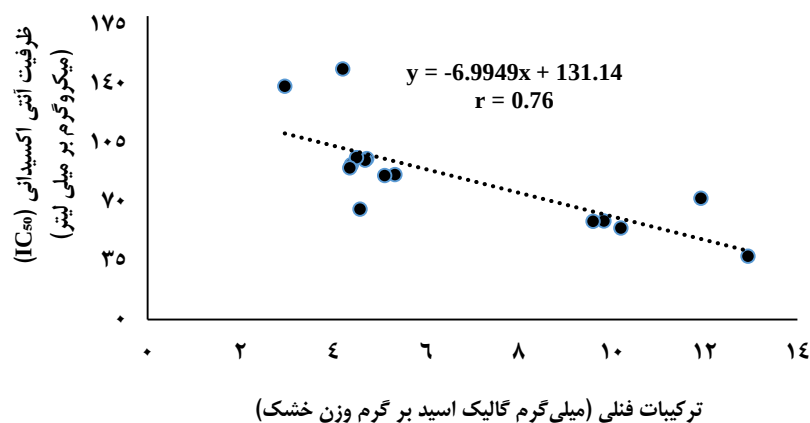
نتایج تجربه واریانس داده‌ها حاکی از تاثیر معنی‌دار الیستورهای مختلف بر مقدار IC₅₀ بذر و بخش هوایی در مراحل رشد رویشی و زایشی گیاه دارد ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). در این بررسی تنها کاربرد مخمر، مقدار IC₅₀ را بصورت معنی‌داری در بخش هوایی گیاه و در مرحله رشد رویشی نسبت به تیمار شاهد به مقدار ۴۴/۹ درصد افزایش داد. این موضوع بیانگر کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی در نتیجه کاربرد مخمر می‌باشد. در مرحله رشد زایشی تفاوت قابل توجه و معنی‌داری بین کاربرد قارچ (۱۴۸/۶۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کاربرد سایر الیستورهای 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 (۳۷/۵۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعلق داشت که نسبت به تیمار شاهد (۷۱/۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) معنی‌دار و بیانگر افزایش چشمگیر فعالیت آنتی اکسیدانی بود (شکل B ۵). 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 معنی‌دار بود (شکل B ۶).



شکل ۶. مقایسه میانگین محتوای اسید فنلی (A) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (DPPH (IC₅₀) (B) در بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی، زایشی و بذر (ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای یک درصد ندارند)

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

نتایج نشان‌دهنده همبستگی منفی و معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی (DPPH (IC₅₀) عصاره بذر بود به طوری که با افزایش محتوای ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی اکسیدانی (DPPH (IC₅₀) به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به عبارت دیگر با افزایش محتوای فنل، به حجم عصاره کمتری برای حذف ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد نیاز است (شکل ۷).

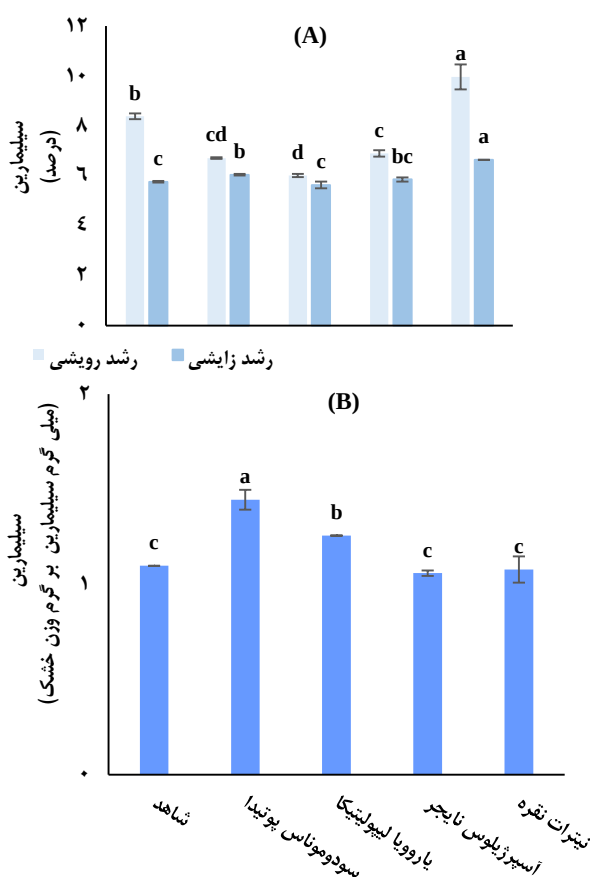


شکل ۷. همبستگی فعالیت آنتی اکسیدانی در بذر خارمریم و محتوای ترکیبات فنلی

سیلیمارین

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که در مراحل رشد رویشی و زایشی، کاربرد الیسیتورها تاثیر معنی داری بر درصد سیلیمارین عصاره متانولی برگ داشت ($P \leq 0.01$) (شکل A ۸ و جدول ۲). همچنین، نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که 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 واریانس داده ها نشان داد که کاربرد الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تاثیر معنی دار ($P \leq 0.01$) بر محتوای سیلیمارین بذر داشت (شکل B ۸ و جدول ۲). بیشترین محتوای سیلیمارین (۱/۴۴ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) در نتیجه کاربرد تیمار باکتری حاصل شد که تفاوت آن نسبت به شاهد معنی دار بود (۳۲ درصد افزایش). کمترین محتوای سیلیمارین (۱/۰۶ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) به کاربرد قارچ تعلق داشت که نسبت به تیمار شاهد (۱/۰۹ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) ۲/۷ درصد کاهش داشت، اگرچه با تیمار نیترات نقره (۱/۰۸ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی دار نداشت.



شکل ۸. میانگین درصد سیلیمارین بخش هوایی گیاه در دوره رشد رویشی و زایشی (A) و محتوای سیلیمارین بذر (B) (ستون‌های با رنگ یکسان که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال خطای یک درصد 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						
فنل کل	فلاونوئید کل	اسید فنلی	DPPH (IC ₅₀)	درصد سیلیمارین		
*۲/۳۵۱	**۱/۸۱۹	**۳/۱	**۱۳۳۱/۳۵۵	**۷/۵۱	۴	الیستور
۱/۷۳۶	۰/۱۳۲	۰/۰۹۷	۱۳۹/۸۰۵	۰/۱۷۲	۱۰	خطای آزمایش
۱/۹۱۱۹۲۸۵۷	۰/۶۱۳۷۱۴۲۹	۰/۹۵۴۷۸۵۷۱	۴۸۰/۲۴۷۹۲۸۶	۲/۲۶۸۶۴۲۸۵۷	۱۴	کل
مرحله رشد زایشی						
*۰/۳۵	**۲/۲۹۶	**۱/۲۲۷	**۲۸۸۳/۲۹۷	**۰/۴۷۱	۴	الیستور
۰/۴۴۶	۰/۳۶۴	۰/۰۰۷	۲۱/۵۲۱	۰/۰۱۷	۱۰	خطای آزمایش
۰/۴۱۸۲۸۵۷۱	۰/۹۱۵۷۸۵۷۱	۰/۳۵۵۷۸۵۷۱	۸۳۹/۱۷۰۸۵۷۱	۰/۱۴۶۶۴۲۸۵۷	۱۴	کل
بذر						
**۶/۳۹۳	**۱/۲۵۴	**۲/۲۵۲	**۴۵۴/۱۲	**۰/۰۸	۴	الیستور
۰/۵۲۶	۰/۰۸	۰/۲۲۴	۰/۶۵۷	۰/۰۰۵	۱۰	خطای آزمایش
۲/۲۰۲۷۱۴۲۹	۰/۴۱۵۴۲۸۵۷	۰/۸۰۳۴۲۸۵۷	۱۳۰/۲۱۷۷۸۵۷	۰/۰۲۶۲۸۵۷۱۴	۱۴	کل

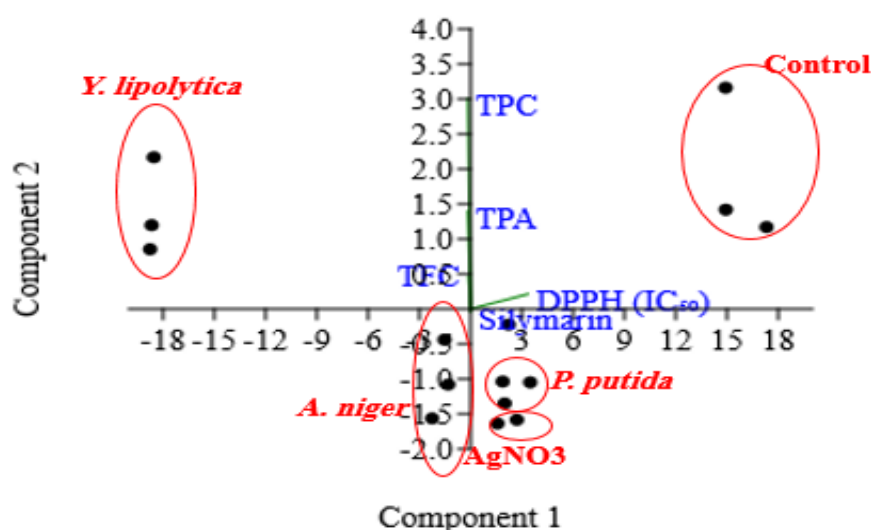
* و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌دار می‌باشد.

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

تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی 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، پنج عامل در بیوستز ترکیبات فنلی، سیلیمارین و مقدار IC_{50} بذر موثر شناخته شد. مولفه اول معادل ۹۷/۹۲ درصد از واریانس کل و بیشترین مقدار را دارا بود. جز اصلی این مولفه مقدار $DPPH (IC_{50})$ (۰/۹۹۷) بود که بیانگر کاهش محتوای ترکیبات فنلی شاهد می‌باشد که منجر به افزایش $DPPH (IC_{50})$ شده است (شکل ۹). در واقع به میزان بیشتر عصاره برای حذف رادیکال‌های آزاد نیاز دارد. اجزاء اصلی مولفه ۲ محتوای ترکیبات فنلی کل (۰/۸۹۷) و اسید فنلی (۰/۴۱۵۷۱) بودند که متعلق به شاهد و کاربرد مخمر بودند. در مولفه ۳ جز اصلی به محتوای فلاونوئید (۰/۸۳) تعلق داشت که با کاربرد الیستور مخمر افزایش یافت و درصد واریانس آن اندک بود.

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

متغیرها	مولفه ۱	مولفه ۲	مولفه ۳	مولفه ۴	مولفه ۵
فصل کل	-۰/۰۴۳۹۹۹	۰/۸۹۶۶۷	-۰/۳۳۵۶۹	۰/۲۸۵۱۴	-۰/۰۷۶۴۰۸
فلاونوئید کل	-۰/۰۳۵۳۱۱	۰/۱۳۷۹	۰/۸۲۹۷۱	۰/۵۳۸۶۵	۰/۰۳۴۱۶۷
اسید فنلی	-۰/۰۴۴۵۳۷	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	۰/۰۲۳۸۲۹۴
درصد واریانس	۹۷/۹۲	۱/۷۷۸	۰/۱۸۱۹۸	۰/۱۰۲	۰/۰۱۷۸۲۸



شکل ۹. نمودار PCA در بذر خارمریم با کاربرد الیستورهای زیستی و غیر زیستی و اثر آن بر محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ترکیبات فنلی کل)، TFC (فلاونوئید کل)، TPA (اسید فنلی کل)، $DPPH (IC_{50})$ (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی)

بحث

محتوای ترکیبات فنلی 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 آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان و ضد آلزایمر شناخته شده‌اند (Hazrati et al 2020). این ترکیبات به منظور خنثی‌سازی اثر عوامل زیستی و غیرزیستی در گیاهان سنتز می‌شوند و میزان آن‌ها از سالی به سال دیگر و در اندام‌های مختلف گیاه متغیر می‌باشد (Pérez-Ochoa et al., 2023). نتایج داده‌های این تحقیق نشان داد که در مرحله رشد رویشی بیشترین تاثیر الیسیستورهای زیستی و غیرزیستی بر محتوای فنل کل با کاربرد الیسیستور نیترات‌نقره (۵/۳۳ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک)، در مرحله زایشی در تیمار شاهد (۵/۱۱ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) و در مرحله تولید بذر با کاربرد مخمر (*Y. lipolytica*) (۱۲/۹۴ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) حاصل شد. بیشترین محتوای فلاونوئید در مرحله رشد رویشی به استفاده از الیسیستور نیترات‌نقره (۵/۵ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک)، در مرحله زایشی به کاربرد قارچ *A. niger* (۴/۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) و در بذر به کاربرد مخمر (۳/۴ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) تعلق داشت. در مرحله رشد رویشی بیشترین محتوای اسید فنلی (۲/۷۳ میلی گرم کافئیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به کاربرد باکتری، در مرحله رشد زایشی (۱/۶۲ میلی گرم کافئیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به کاربرد قارچ و در مرحله تولید بذر (۵/۳ میلی گرم کافئیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به کاربرد مخمر تعلق داشت. نتایج مطالعات پیشین مقادیر مختلفی از محتوای ترکیبات فنلی را در عصاره اتانولی رازیانه (Conforti et al., 2006)، دانه شنبلله (Premanath et al., 2011) و عصاره متانولی شاهتره^۱ (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 شده‌اند. 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 رزماری^۲ (del Baño et al., 2003) و توت (Wang et al., 2000) گزارش شده‌است که احتمالاً افزایش و حفظ تجمع ترکیبات فنلی در مراحل اولیه رشد به تقسیم سلولی زیاد و انتقال به سمت اندام‌های جوان و بیش‌بیاثر ژن آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز^۳ 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 شده‌است 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 روبش پراکسید هیدروژن می‌شوند، مرتبط می‌باشد (Feduraev et al., 2019). در واقع یک رابطه نزدیک بین فرآیندهای مختلف بیوسنتز، تخریب و انتقال در توزیع پلی فنل‌ها در گیاهان وجود دارد (del Baño et al., 2003) که با توجه به فنولوژی و تاثیر عوامل آب و هوایی و ژنوتیپ، در گیاه محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در مرحله رویشی افزایش و در مرحله زایشی کاهش می‌یابد (Maina et al., 2021).

به طور کلی نتایج این آزمایش حاکی از بیشترین تاثیر مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی، 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 فرآیندهای خارج سلولی میکروارگانیسم بهره می‌برد (Chen et al., 2008).

1. *Fumaria vulgaris*2. *Rosmarinus officinalis*

3. Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

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 قارچ *A. niger* باکتری *P. putida* و مخمر *Y. lipolytica* به‌عنوان منبع تولید اسیدسیتریک (Tong et al., 2023) قادر به تولید و تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اسیدهای 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 می‌گردد (Soroori & Bagherian Lemraski, 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 به‌علت افزایش تمایز سلولی در دوره گل‌دهی، گرده‌افشانی، دفاع در برابر گیاهخواران و آفات و تولید مثل و کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز 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- فنیل‌آلانین، L- تیروزین و L- تریپتوفان) پیش‌ساز مسیر سنتز فلاونوئیدها بوده و همچنین قادر است از طریق تاثیر بر بیان همزمان پنج ژن مربوط به آنزیم ARO^۱ در پنج واکنش کلیدی مسیر شیکیمات سبب افزایش تولید نارینژنین و تاکسیفولین گردد به‌همین علت این مخمر به‌عنوان مولد فلاونوئیدهایی از جمله استیلبن، نارینژنین، اربودکتیول و تاکسیفولین شناخته شده‌است (Muhammad et al., 2020). نتایج این تحقیق نیز موید اثر افزایشی مخمر بر محتوای فلاونوئید بذر می‌باشد. با اتصال الیستورهای زیستی به رستپورها، شارش درون سلولی یون کلسیم بروز می‌کند که به‌عنوان پیامبر ثانویه سبب دیپلاریزاسیون غشا پلاسمایی شده و تحریک فعالیت ATPase^۲ - H⁺ را سبب می‌گردد. این موضوع منجر به شارش پروتون و اسیدی شدن pH سیتوپلاسمی می‌شود. بروز این پدیده‌ها سبب فعال شدن مسیر سیگنال دهی مانند پروتئین کینازهای میتوژنی^۳ و NADPH اکسیداز و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و انفجار اکسیداتیو، افزایش سطح اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید می‌گردد که به افزایش بیان ژن‌های متابولیت‌های ثانویه از قبیل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی ختم می‌شود (Hao et al. 2020 ; Humbal & Pathak 2023).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمار نیترا ت نقره سبب افزایش محتوای فلاونوئید و اسید فنلی در اندام هوایی خارمریم در مرحله رویشی شد که به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ختم گردید. فلزات سنگین به‌عنوان مسئول بیوسنتز ترکیبات فنولی به‌عنوان سپر گیاهی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو هستند 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 گونه‌های فعال اکسیژن را بیشتر از حذف آن موجب می‌گردند. این موضوع منجر به بروز تنش اکسیداتیو، کاهش مولکول‌های زیستی و تجزیه غشای لیپیدی می‌شوند. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۳ و هجوم یون‌های کلسیم به درون سلول سبب فعال شدن MAPK^۴ ها 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).

1. Aromatic

2. mitogen-activated protein kinase (MAPK)

3. Reactive Oxygen Species (ROS)

DPPH (IC₅₀)

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش DPPH (IC₅₀) یکی از روش‌های پرکاربرد در پژوهش‌های گیاهی است که به حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی وابسته است (Premanath et al., 2011). نتایج نشان داد بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار DPPH (IC₅₀) در مرحله رشد رویشی به کاربرد الیستور نیترا نقره (۸۵/۹۹ میکروگرم بر میلی لیتر) و در مرحله رشد زایشی و بذر با کاربرد مخمر به ترتیب با مقادیر ۶۵/۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۳۷/۵۴ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل شد. مقدار IC₅₀ غلظتی از عصاره متانولی بوده که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد مورد نیاز می‌باشد. نمودار همبستگی محتوی فنل و مقدار IC₅₀ نیز موید این موضوع است. فعالیت آنتی اکسیدانی در ارتباط نزدیک با محتوی 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 آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀) نیز متفاوت است (Omezzine et al., 2013). براساس نتایج محتوی پلی فنول کل در مرحله گلدهی در *Sida cordifolia* (Verma & Kasera., 2007) و *Crithmum maritimum* (Maleš et al., 2003) و در طول جوانه‌زدن گل در *Hypericum hyssopifolium* افزایش یافته است. فلاونوئیدها، ویتامین E، اسیدهای فنولیک، فنل‌ها (روس ماریدیفنول، کورکومین، بوتین، یوبی کینول)، ترکیبات نیتروژنی (آلکالوئیدها، مشتقات کلروفیل، آمینو اسیدها و آمین‌ها)، کاروتنوئیدها و ویتامین C و سایر مواد گیاهی نقش مهمی در عملکرد آنتی اکسیدانی بازی می‌کنند (Wang et al., 2000).

در مرحله رشد رویشی، کاربرد باکتری، قارچ و نیترا نقره، در مرحله رشد زایشی کاربرد مخمر و در مرحله تولید بذر همه الیستورها سبب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی نسبت به گیاهان شاهد شدند. بررسی‌های قبلی نشان دادند که حضور قارچ به انفجار تولید پراکسید هیدروژن و تخریب سلول و حضور باکتری و مخمر با تغییر غشا پلاسمایی منجر به سنتز متابولیت‌های ثانویه و فعال شدن پاسخ دفاعی علیه گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد. در واقع ارتباط مستقیم بین افزایش سلولی گونه‌های فعال اکسیژن و بیش‌بین ژن‌های دفاعی وجود دارد زیرا با افزایش محتوی ترکیبات فنلی مقدار IC₅₀ کاهش می‌یابد که بیانگر افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه است (Humbal et al., 2023). کاربرد الیستورها سبب عملکرد آنتی اکسیدانی DPPH (IC₅₀) گیاه شد. احتمالاً به دلیل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن که به ماکرومولکول‌ها و در نهایت ساختار سلولی صدمه می‌رساند. در گیاه درخت مرجانی چوب‌پنبه‌ای افزایش ترکیبات آنتی اکسیدان در حضور الیستور نیترا نقره نیز به همین علت گزارش شده است (Lam et al., 2023). الیستور نیترا نقره در غلظت‌های کم به عنوان افزاینده ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عمل می‌کند و افزایش بیش از حد آن سبب عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و دفاع آنتی اکسیدانی می‌گردد که نتیجه آن ایجاد سمیت می‌باشد (Ghanati et al., 2014). این امکان وجود دارد که خواص آنتی اکسیدانی گیاه خارمریم علاوه بر محتوی فنل و فلاونوئید تحت تأثیر سایر ترکیبات فعال از قبیل اسیدها، قندها و گلیکوزیدها نیز باشد که دارای اثر هم‌افزایی می‌باشند (Sun et al., 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدان‌ها با توجه به مرحله بلوغ و روش‌های تحلیلی متفاوت است.

سیلیمارین

نتایج نشان داد که کاربرد الیستورها در هر مرحله اثرات متفاوتی بر محتوی سیلیمارین داشتند. بیشترین درصد سیلیمارین بخش هوایی گیاه به کاربرد نیترا نقره در مراحل رشد رویشی (۹/۹۶ درصد) و رشد زایشی (۶/۶۴ درصد) مربوط بود. در مرحله تشکیل بذر، کاربرد باکتری (۱/۴۵ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) و مخمر (۱/۳ میلی گرم سیلیمارین بر گرم وزن خشک) بیشترین تأثیر را در افزایش محتوی سیلیمارین داشتند. فلزات سنگین از قبیل Co^{2+} ، Ni^{2+} ، Fe^{2+} و Ag^{+} محرک تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که با اتصال به گیرنده‌های سطح غشا پلاسمایی شبکه‌ای از انتقال سیگنال

را راه اندازی کرده و بیان تمامی ژن های بیوسنتزی دخیل در مسیر سنتز متابولیت های ثانویه از جمله سیلیمارین را سبب می شوند (Khalili et al., 2010). پژوهش های اندکی بر تاثیر تیمار نقره در افزایش متابولیت های ثانویه گیاه خارمریم انجام شده است (Ashtiani et al. 2010). افزایش محتوای سیلیمارین را در گیاه خارمریم با کاربرد الیسیاتور یون نقره مشاهده کردند که با نتایج درصد سیلیمارین موجود در بخش هوایی تحقیق حاضر مطابقت دارد. برخلاف این موضوع Vildová et al. (2014) طی پژوهشی دریافتند که فقط غلظت های پایین نیترا ت نقره نقش مثبتی در افزایش فلاونولیکان ها مانند سیلی کریستین، سیلی - دیانین، سیلی بین A و B در گیاه خارمریم دارد و با افزایش غلظت نیترا ت نقره میزان این ترکیبات به تدریج به حداقل می رسد. در این ارتباط محتوای سیلیمارین گاهی مطابق انتظار افزایش نشان نداد چرا که نفوذپذیری دیواره سلول ها در محیط کشت دارای الیسیاتور تغییر کرده و امکان آزادسازی سیلیمارین به محیط کشت را فراهم می کند. علاوه بر این، بیان آنزیم چالکون سنتاز وابسته به اندام (مانند گل ها) و ریتم سیرکادیان می باشد.

باکتری *P. putida* به عنوان مولد خارجی هورمون های اکسین و جیبرلین قادر است سبب افزایش تولید فنل و فلاونوئید گردد. باکتری های حل کننده فسفات مانند *P. putida* عمدتاً از طریق افزایش حلالیت فسفات، روی و پتاسیم، سبب دسترسی درشت مغذی های مهم برای گیاه می شوند. افزایش فسفات محلول منجر به افزایش متیل جاسمونات و متعاقب آن افزایش فعالیت آنزیم PAL می گردد. القای فعالیت بیشتر مسیر سنتز فلاونوئیدها، سبب افزایش سنتز تاکسیفولین و متعاقباً افزایش سنتز سیلیمارین می شود (Zboralski & Filion, 2023; Lubna et al., 2018).

از آن جایی که مخمر *Y. lipolytica* قادر به سنتز فنیل آلانین به عنوان آغازگر مسیر سنتز سیلیمارین (فلاونولیکان) می باشد، افزایش محتوی اسیدآمینه آروماتیک، تعداد نسخه های ژن چالکون سنتاز را افزایش داده که این خود به افزایش سنتز ناریژنین و نهایتاً سیلیمارین منجر می شود. در صورت حضور سایر آنزیم ها، تبدیل ناریژنین به سایر ترکیبات (آنتوسیانین و فلاونوئید) امکان پذیر است (Lv et al., 2019). در یک آزمایش تیمار سوسپانسیون خارمریم با عصاره مخمر *Y. lipolytica* تولید سیلیمارین را بهبود بخشید و سبب آزادسازی سیلیمارین به محیط کشت (سه برابر بیشتر از نمونه های شاهد) شد. تصور می شود 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 می شود و از این طریق موجبات افزایش سنتز سیلیمارین را فراهم می آورد (Qavami et al., 2013).

نتیجه گیری و پیشنهادها

سنتز متابولیت های ثانوی به مقدار زیادی تحت تاثیر مراحل نمو گیاه و شرایط حاکم بر رشد گیاه (عوامل زیستی و غیر زیستی) قرار می گیرد. 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 الیسیاتور غیرزیستی به بررسی اثر آن ها پرداخته شد. انتخاب تیمارها به گونه ای بود که ماده حدواسط مسیر سنتز سیلیمارین را در اختیار گیاه قرار دهند تا اثر آن ها بر متابولیت های ثانویه بررسی شود. همچنین تاکنون تنها از بذر گیاه خار مریم به عنوان منبع اصلی سیلیمارین استفاده می شده 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 بخش های رویشی گیاه برتر بودند. کاربرد خارجی *Y. lipolytica* محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی را در بذر به طور چشمگیری افزایش داد. نتایج ما حاکی از آن است که کاربرد خارجی نیترا ت نقره درصد محتوای سیلیمارین را فقط در بخش هوایی گیاه افزایش می دهد ولی الیسیاتورهای *P. putida* و *Y. lipolytica*، بیشترین تاثیر را در مرحله تشکیل بذر دارند. به نظر می رسد الیسیاتورهای مختلف با توجه به کارکرد اختصاصی که در مسیر بیوسنتزی ترکیبات مختلف دارند

(به طور مثال مخمر به عنوان مولد اسیدآمینو فنیل آلانین و باکتری از جهت بهبود دسترسی فسفر) اثرگذاری متفاوتی در مراحل مختلف نمو گیاه دارند، اگرچه تایید این موضوع نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی بیشتر 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؛ احمدی، معصومه؛ خیام نکویی، سید مجتبی و صالحی جوزانی، غلامرضا (۱۳۹۲). اثرات تحریکی عصاره قارچی بر تولید سیلیمارین در کشت ریشه‌های موین گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum* L.).
 حسنلو، طاهره؛ اسکندری، سحر و نجفی، فرزانه (۱۳۹۴). نقش کیتوزان در افزایش تولید فلاونوئیدها در کشت ریشه‌های موین خارمریم (*Silybum marianum* L.). *مجله سلول و بافت*، ۳(۶)، ۲۶۷-۲۵۷. <http://dx.doi.org/10.52547/JCT.6.3.257>
 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.

RERERENCES

- 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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.2174/187220808784619757>.
- Asghari-Zakaria, R., Panahi, A. R. & Sadeghzadeh, M. (2008). Comparative study of chromosome morphology in *Silybum marianum*. *Cytologia*, 73(3), 327–332. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-007-9138-3>
- Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F. & Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 930–944.
- 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. <http://dx.doi.org/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.

- <http://dx.doi.org/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. 51(15). 4247–4253. <http://dx.doi.org/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.
- 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). <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.3897/biorisk.20.115-128>
- Gupta, K. M. & 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, 112414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112414>.
- Hasanloo, T., Khavari Nejad, R. A., Majidi, E. & Shams Ardakani, M. R. (2008). Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 876–882. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200802367684>
- Hazrati, S., Mollaei, S., Rabbi Angourani, H., Hosseini, S. J. & Sedaghat, M. (2020) How do essential oil composition and phenolic acid profile of *Heracleum persicum* fluctuate at different phenological stages? *Food Science & Nutrition*, 8(11), 6192-6206. Tabriz,. <http://dx.doi.org/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*, 100166. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.084>
- Karla. Y. (1998). handbook of reference methods for plant analysis. 320 pp. CRC Press. <http://dx.doi.org/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, 189–202. <http://dx.doi.org/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). <http://dx.doi.org/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, 107630. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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). <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10121952>
- 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). <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.07.008>
- Moradi, H., Ghavam, M. & Tavili, A. (2020). Study of antioxidant activity and some herbal compounds of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. in different ages of growth. *Biotechnology Reports*, 25, e00408. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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*. 5(6). 695–705. <http://dx.doi.org/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.
- Rahimi, S., Hasanloo, T., Najafi, F. & Khavari Nejad, R. A. (2011). Enhancement of silymarin accumulation using Precursor feeding in '*Silybum marianum*' hairy root cultures. *Plant Omics*, 4(1), 34–39.
- Rainone, F. (2005). *Milk thistle - American Family Physician*. 72(7), 1285–1288. <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. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-020-00836-9>
- Schrall, R. & Becker, H. (1977). Callus- und suspensionskulturen von *Silybum Marianum*. *Planta Medica*, 32(5), 27–32. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1097554>
- 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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-71.3.494>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sneath, P. H. A. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. 573 pp. San Francisco, Freeman.
- Soroori, S., & Bagherian Lemraski, H. B. (2021). Effect of foliar application of spermidine , citric acid and proline on growth and flowering in *Calendula officinalis* L . under drought stress. *Iranian Journal of Plant and Biotechnology*, 15(4). <http://dx.doi.org/10.22059/IJHST.2022.341462.555>
- 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. *The Journal of Agricultural Science*, 139(3), 275–281. <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859602002599>
- Sultana, B., Anwar, F. & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180. doi: 10.3390/molecules14062167
- 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.
- Tong, Z., Tong, Y., Wang, D. & Shi, Y. C. (2023). Whole maize flour and isolated maizestarch for production of citric acid by *Aspergillus niger*: a review. *Starch/Staerke*, 75(3–4), 1–11. <http://dx.doi.org/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, 1–16. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.3390>
- Verma, V. & Kasera, P. K. (2007). Short communication variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian J. Plant Physiol.*
- Vildová, A. A., Hendrychová, H., Kubeš, J. & Tůmová, L. (2014). Influence of AgNO₃ treatment on the flavonolignan production in cell suspension culture of *silybum marianum* (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). <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.107.017566>
- Zboralski, A. & Filion, M. (2023). Pseudomonas spp. can help plants face climate change. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1–13. <http://dx.doi.org/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. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg062>