اثرات تحریکی عصاره قارچی بر تولید سیلی‌مارین در کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum*)

طاهره حسنلو[1]*، معصومه احمدی[2]، سید مجتبی خیام نکویی[3]، غلامرضا صالحی جوزانی[4]

۱- استادیار، بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۳- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
٤- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، بلوار شهید فهمیده، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
تلفن: ۳۲۷۰۲۸۹۳ (۰۲٦)، نمابر: ۳۲۷۰٤٥۳۹ (۰۲٦).
پست الکترونیک: thasanloo@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۱ **تاریخ تصویب:** ۹۲/٤/۱۷

چکیده

مقدمه: سیلی‌مارین، استخراج شده از دانه‌های گیاه خارمریم اغلب در درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ریشه‌های مویین حاصل ازگیاه خارمریم قادر به تولید سیلی‌مارین هستند.

هدف: استفاده از عوامل محرک، راه مناسبی جهت افزایش تولید متابولیت‌ها در شرایط درون شیشه می‌باشد. محرک‌ها موجب تغییر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها شده و بدین سبب در شناخت بهتر، از مسیر سیگنالینگ سلولی مؤثر می‌باشند.

روش بررسی: در این پژوهش پس از کشت ریشه‌های مویین گیاه خارمریم، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره قارچ‌های *Fusarium oxysprum* و *Phytophtora meloni* (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) بر میزان تولید فلاونولیگنان‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری در ٤ زمان مختلف (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که کشت ریشه‌های مویین گیاه خارمریم حاوی مقادیر بالایی از فلاونولیگنان‌ها شامل سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلیبین و تاکسی‌فولین می‌باشند. در محیط‌های تیمار شده با عصاره *F. oxysprum* (۱۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) حداکثر میزان تولید سیلی‌مارین ($0/32\ mg\ g^{-1}\ DW$) در پایان ۷۲ ساعت مشاهده شد (۲/۲۸ برابر شاهد). در محیط‌های تیمار شده با *Ph. meloni* (۲۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت)، حداکثر میزان تولید سیلی‌مارین ($0/13\ mg\ g^{-1}\ DW$) در پایان ۷۲ ساعت مشاهده شد (۱/۹ برابر شاهد).

نتیجه‌گیری: کشت ریشه‌های مویین گیاه خارمریم بسیار مستعد تحریک با محرک‌های قارچی می‌باشند که برای افزایش قابلیت تولید سیلی‌مارین از طریق کشت ریشه‌های مویین گیاه خارمریم در مقادیر بالا مفید می‌باشد.

گل‌واژگان: خارمریم، تحریک، ریشه‌های مویین، سیلی‌مارین، عصاره قارچی

مقدمه

دانه‌های گیاه خارمریم (Milk thistle) *Silybum marianum* (L.) Gaerten) از گذشته‌های دور برای مداوای بیماری‌های صفراوی و بیماری‌های مربوط به دستگاه گوارش استفاده شده است. دانه‌های این گیاه حاوی ماده‌ای تحت عنوان سیلی‌مارین ((Silymarin (SLM)) می‌باشد که ترکیبی از فلاونولیگنان‌هایی (Flavonolignane) به نام سیلی‌بین ((Silybin (SBN))، ایزوسیلی‌بین (Isosylibin)، سیلی‌دیانین ((Silydianin (SDN))، سیلی‌کریستین ((Silycristin (SCN)) و تاکسی‌فولین ((Taxifolin (TAX)) است که در درمان بیماری‌های کبدی (سیروز و مسمومیت‌های کبدی) و پیشگیری از سرطان کبد استفاده می‌شود [۱،۲].

امروزه به دلیل مشکل بودن تولید یا عدم صرفه اقتصادی، بیشتر این متابولیت‌ها از گیاهان وحشی یا کشت شده استخراج می‌شوند. استخراج متابولیت‌ها از گیاهان وحشی و زراعی مشکلاتی از قبیل خطر انقراض گیاه را در پی خواهد داشت [۳]. علوم بیوتکنولوژی موقعیتی کارآمد برای بهره‌برداری از سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهان درون محیط کشت مصنوعی درون شیشه‌ای فراهم ساخته است که با دستکاری زنتیکی آنها نیز می‌توان به طیف وسیعی از فرآورده‌های طبیعی دست یافت [٤].

گزارش‌های متعددی در مورد استفاده از سلول‌های گیاهی که تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش را دارند، وجود دارد که از آنها می‌توان به تولید ماده دارویی آنتراکینون (Anthraquinones) از کشت‌های سلولی *Rubia tinctorum*، تولید آلکالوئید کوئینولین (Quinoline) از کشت‌های سلولی *Cinchona ledgerione*، تولید رزماریک اسید (Rosmaric acid) به وسیله کشت‌های سلولی *Coptis japonica*، تولید سولاسودین (Solasodine) از کشت‌های سلولی *Solanum eleagnifolium* و تولید امتین (Emtine) از کشت‌های سلولی *Cephaelis ipecacuanha* اشاره کرد [۵].

یکی از تکنیک‌های نوین که امروزه مورد استقبال قرار گرفته است کشت ریشه‌های مویین می‌باشد. ریشه مویین نوعی بیماری گیاهی است که توسط یک باکتری گرم منفی خاکزی به نام اگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می‌شود. زمانی‌که باکتری وارد گیاه می‌شود، تعدادی از ژن‌ها از پلاسمید باکتری، به گیاه منتقل شده و وارد ژنوم هسته‌های گیاه میزبان می‌شود. حاصل این انتقال تولید ریشه موئین در نزدیکی جایگاه ورود باکتری است [٦]. این ریشه‌ها توانایی رشد سریع در محیط بدون هورمون و تولید ترکیبات بالا را دارند و همچنین پایداری ژنتیکی در این ریشه‌ها مشاهده شده است. ریشه‌های مویین اغلب می‌توانند متابولیت‌های ثانویه را به طور مستمر برای مدت طولانی تولید کنند که این ویژگی‌ها ریشه‌های مویین را از ریشه‌های معمولی متمایز می‌کند [۷].

یکی از راهکارهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی استفاده از محرک‌های زنده و غیرزنده‌ای است که می‌تواند مسیرهای متابولیکی سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آنها را افزایش دهند [۸،۹]. استفاده از قارچ‌ها به عنوان محرک در محیط کشت بافت به منظور تحریک تولید متابولیت‌ها مورد توجه بسیاری قرار گرفته است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود:

استفاده از محرک قارچی *Aspergillus niger* در افزایش آرتمیزین در گیاه *Artemisia annua* [۱۰]. تیمار ریشه‌های مویین گیاه *Tagete patula* با میسیلیوم‌های قارچ‌های *Aspergillus niger* ، *oRhizopus oligosporus* و *Pencillium natatum* [۱۱]. افزایش تولید آرتمیزین (Artimisin) در گیاه *Artemisia annua* L. توسط میسیلیوم استخراجی از قارچ آندوفیت *Colletotrichum Sp* [۱۲]. اثر تحریکی محرک دیواره سلولی قارچ *Phytophthora cinnamoni*، بر تجمع رزماریک اسید در ریشه‌های مویین گیاه *Ocimum basilicum* [۱۳]. به کارگیری قارچ *Phytophthora parasitica* به عنوان محرک زنده بر ریشه‌های مویین گیاه *Cichorium intybus* [١٤]. استفاده از میسیلیوم قارچی *Aspergillus niger* به عنوان محرک کشت در سوسپانسیون سلولی گیاه *Taxus spp* و افزایش تولید پاکتیتاکسل [۱۵]. افزایش ۷ برابری گزانتون (Xanthone) در کشت سلولی گیاه *Hypericum perforatum* می‌شود [١٦].

استفاده از میسیلیوم قارچی و عصاره پودر دیواره سلولی قارچ *Aspergillus niger* ، *Penicilliumnatatum* و *Rhizopus oligosporus* در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Beta vulgaris* [۱۷]. اثر تحریکی عصاره دیواره سلولی قارچ*Phytophthora megasperma* بر روی ریشه مویین گیاه*Scutellaria baicalensis* و افزایش تولید baicalin ۱/۵ تا ۳ برابر بیشتر از نمونه شاهد [۱۸].

اثرات دیواره سلولی قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Rhizopus stolonifer* بر ریشه‌های مویین گیاه *Nerium oleander* و القا سریع و بیشترین تولید اولئندرین (Oleandrin) [۱۹]. به کارگیری کیتوزان و افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه *Artemisia annua* می‌شود [۲۰]. تیمار ریشه‌های مویین گیاه *Datura metel* تحت تأثیر عصاره قارچ‌های *Aspergillus niger* ، *Fusarium monoliforme* و *Alternarie* sp و تولید بیشترین مقدار هیوسیامین (Hyoscyamin) در محیط‌های حاوی عصاره میسیلیومی قارچ *A. niger* بود [۲۱].

در تحقیقی دیگر اثرات قارچی *Aspergillus niger* به عنوان محرک زنده در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Catharanthus roseus* موجب افزایش تولید آلکالوئیدهای وینبلاستین (Vinblastine) و وینکریستین (Vincristine) شد [۲۲]. ویکتروسکا و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که تیمار کشت سلولی *Calendula officinalis* با عصاره هموژن شده از قارچ *Trichoderma viride* موجب افزایش تولید الئونیک اسید شد [۲۳].

گزارش‌های متعددی در رابطه با اثرات تحریکی به کارگیری محرک‌های زنده و غیرزنده در کشت سوسپانسیون سلولی و یا ریشه‌های مویین گیاه دارویی خارمریم منتشر شده است [۳۰ – ۲۵] اما تاکنون گزارشی از اثرات کاربرد تیمارهای قارچی به عنوان محرک بر تولید سیلی‌مارین و فلاونولیگنان‌های مربوطه در شرایط کشت بافت گیاه خارمریم ارائه نشده است، بنابراین در این مطالعه اثرات عصاره دو نوع قارچ در غلظت‌های مختلف بر تولید فلاونولیگنان‌ها در دوره‌های زمانی مختلف در شرایط کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی خارمریم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

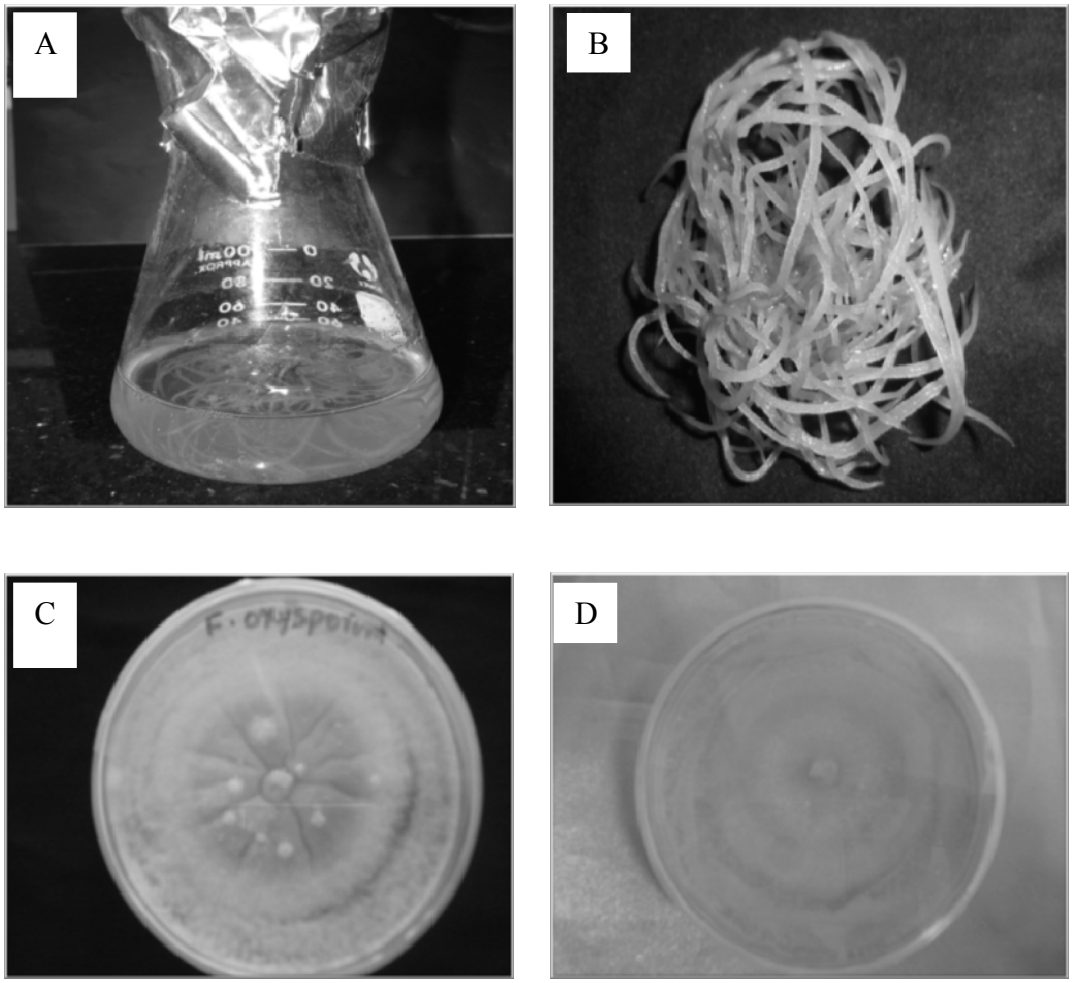
کشت ریشه‌های مویین

ریشه‌های مویین گیاه خارمریم از تحقیق در حال انجام در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تهیه شد (اگروباکتریوم رایزوژنز سویه *AR15834*). آنالیزهای مولکولی جهت اطمینان از ریشه‌های مویین به دست آمده مطابق گزارش ارائه شده در مقاله چاپ شده حسنلو و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد [۲۸]. به منظور کشت ریشه‌های مویین از ریشه‌های ۳۰ روزه، شش قطعه ۱ سانتی‌متری تهیه شد و در ظروف ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مواشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) (MS) [۳۱] کشت داده شد. تمامی این مراحل زیر هود استریل انجام شد (شکل شماره A ۱) [۲۸].

تهیه الیسیتورهای قارچی

سویه‌های قارچی مورد نظر از بخش بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران و بخش بیوتکنولوژی میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (*Fusarium oxysprum* و *Phytophtora meloni*) تهیه شد. نمونه‌ها در زیر هود با کمک اسکالپر ضدعفونی شده به پتری دیش‌های محتوی محیط آب آگار اسیدی (AWA) انتقال داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت ۱ هفته تا ۱۰ روز نگهداری شدند. زمانی که ریسه‌ها بعد از مدت مورد نظر رشد کردند، مجدداً تحت شرایط استریل در زیر هود با کمک پنس و اسکالپر ضدعفونی شده نوک ریسه‌های قارچ مورد نظر را به پتری دیش‌های محتوی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) انتقال داده و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. در مدت تعیین شده ریسه‌ها تمام سطح پتری دیش‌های محیط PDA را پر کرده و این بار هم تحت شرایط استریل، در زیر

هود با کمک پنس و اسکالپر ضدعفونی شده، نوک ریسه‌های قارچ مورد نظر را به ارلن‌های محتوی محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) مایع انتقال داده شدند و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته گذاشته تا قارچ رشد کرده، سطح محیط کشت را به طور کامل بپوشاند. پس از این مرحله ریسه‌های قارچ را تحت شرایط استریل زیر هود، از سطح محیط PDB جمع‌آوری کرده و به فالکون منتقل کرده و در دستگاه فریز درایر در دمای ۸۰ – درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک و به صورت پودر در آمدند (شکل شماره D و C ۱).



شکل شماره ۱ – کشت ریشه‌های مویین خارمریم در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (A)، ریشه‌های مویین ۳۰ روزه (B)، سویه‌های قارچی فوزاریوم اکسی‌اسپروم (C) و فیتوفترا ملونی (D) در محیط PDA

تهیه محیط AWA به منظور کشت سویه‌های قارچی

برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت AWA، در یک ارلن پودر آگار به میزان ۱۸ گرم بر لیتر با مقداری آب مقطر حل و به حجم رسانده شد و ارلن حاوی محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از این مرحله ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید لاکتیک تحت شرایط استریل زیر هود به محیط کشت اضافه شد و سپس، توزیع محیط در پتری دیش‌های استریل صورت گرفت.

تهیه محیط PDA به منظور کشت سویه‌های قارچی

جهت تهیه ۱ لیتر محیط PDA، در یک ارلن، پودر آماده PDA به میزان ۳۹ گرم بر لیتر را با مقداری آب مقطر حل کرده و محیط به حجم رسانده شد و ارلن محتوی محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و سپس تحت شرایط استریل و زیر هود، توزیع محیط در پتری دیش‌های استریل انجام شد.

تهیه محیط PDB به منظور کشت سویه‌های قارچی

برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت PDB، پودر آماده PDB را به میزان ۲۳ گرم بر لیتر را با آب مقطر در یک ارلن به حجم رسانده شد و برای یکنواخت شدن محیط کشت، ارلن روی استیرر با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و محیط کاملاً شفافی به دست آمد.

پس از این مرحله، توزیع محیط در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری ارلن مایر صورت گرفت و ظروف حاوی محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، اتوکلاو شدند.

تهیه محلول مادر سویه‌های قارچی

به منظور افزودن تیمارها به محیط کشت مورد نظر، ابتدا از تیمارهای مورد نظر محلول مادری تهیه شد. به این ترتیب که از هر یک از سویه‌های مورد نظر قارچ *F. oxysprum* و *Ph. melonis* مقدارهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم وزن شده و در ویال‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط MS فاقد هورمون ریخته می‌شود. البته در مورد گروه شاهد نیز به همان میزان، فقط از محیط MS استفاده شد. ویال‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شده و پس از اتوکلاو، تحت شرایط استریل و زیر هود به ارلن‌های حاوی ریشه مویین ۳۰ روزه اضافه می‌شود (شکل شماره B ۱). نمونه‌برداری ریشه‌های مویین گیاه خارمریم در زمان‌های ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام شد.

استخراج و مطالعه کمی و کیفی فلاونولیگنان‌ها از ریشه‌های مویین گیاه خارمریم

ریشه‌های برداشت شده در زمان‌های مورد نظر به وسیله کاغذ خشک کن، خشک شدند، در فویل قرار داده شده و در دستگاه فریز درایر در دمای ٦۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت خشک شدند. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها وزن خشک آنها اندازه‌گیری و یادداشت شد. به منظور چربی‌زدایی نمونه‌ها، ۰/۱ گرم وزن خشک را در کاغذ صافی وزن نموده و سپس به ۱۰ میلی‌لیتر پترولیوم بنزن در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد در داخل حمام آب گرم (بن ماری) به مدت ۲ ساعت، انتقال داده شدند. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها جهت عصاره‌گیری از آنها ۱۰ میلی‌لیتر اتانول استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد در داخل بن‌ماری قرار گرفتند. سپس محلول‌های متانولی جهت تغلیظ به دستگاه فریز درایر با دمای ٦۰- درجه سانتی‌گراد، انتقال داده شدند. پودر زرد رنگ به دست آمده در نتیجه تغلیظ در متانول حل شد و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از رساندن به حجم مورد نظر نمونه‌ها فیلتر شده و جهت بررسی دقیق کمی ترکیبات، به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق شدند. با توجه به اهمیت تعیین درصد ترکیبات فلاونوییدی مختلف موجود در سیلی‌مارین نمونه‌ها، استفاده از روش‌های دقیق‌تر مثل HPLC توصیه می‌شود. اندازه‌گیری سیلی‌مارین توسط دستگاه HPLC (knauer) شامل پمپ k1001، دتکتور UV (۲۸۰ نانومتر)، ستون C_{18}، حلال‌های آب و استو نیتریل (۵۰:۵۰)، نرم‌افزار ChromGate انجام شد. حداقل ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده که

به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C_{18} به قطر ذرات ۵ میکرومتر و ابعاد ۱۵۰×٤/٦ میلی‌متر عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و شناسایی شدند. کل زمان هر تجزیه ۱۰ دقیقه بود. زمان خروج منحنی‌های مربوط به ترکیبات فلاونولیگنان‌ها با سیلی‌مارین استاندارد (سیگما، S-0292، آلمان) مقایسه شده و مقادیر هر یک بر اساس منحنی استاندارد سیلی بین محاسبه شد [۲۵،۲٦].

طرح آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

تجزیه واریانس اثر زمان نمونه‌برداری و غلظت‌های محرک قارچی فوزاریوم اکسی‌اسپروم بر برخی صفات در کشت ریشه‌های مویین خارمریم

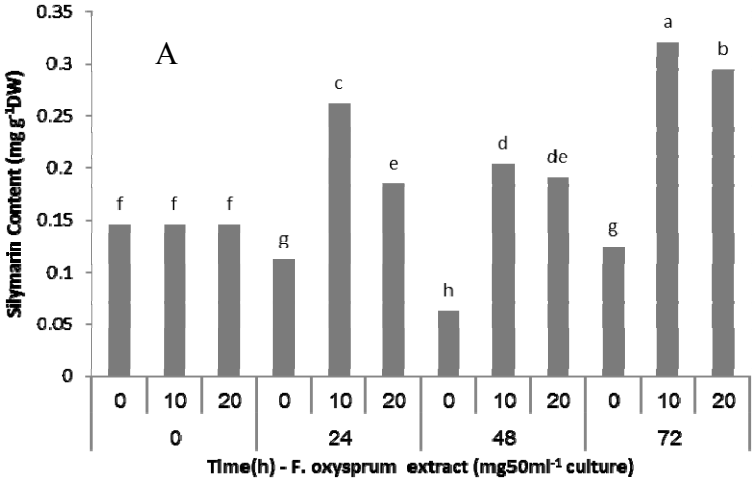
بر اساس محاسبات آماری انجام شده مشخص شد که در تیمار اکسی‌اسپروم بر روی ریشه‌های مویین گیاه خارمریم، بین غلظت‌های مورد آزمایش در صفات میزان وزن خشک و مقدار تاکسی‌فولین و سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در سطح احتمال ۱ درصد و بین زمان‌های مورد آزمایش در صفات مقدار تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در سطح احتمال ۱ درصد و بین اثرات متقابل غلظت‌ها و زمان‌های مورد آزمایش در صفات میزان وزن خشک و مقدار تاکسی فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف بسیار معنی‌دار وجود دارد.

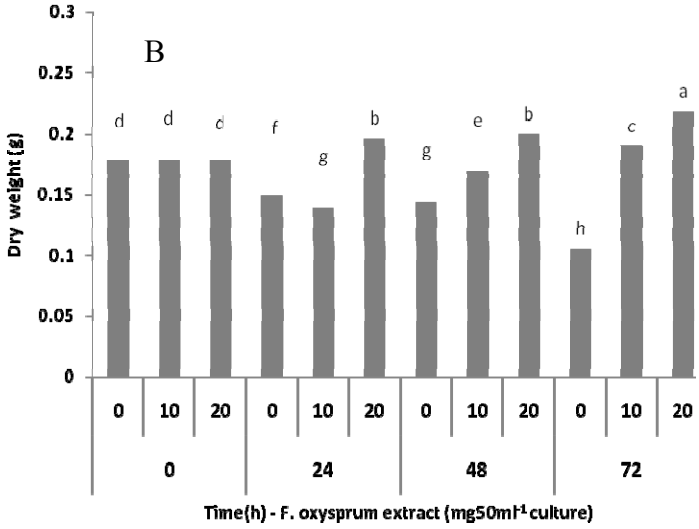
اثرات متقابل دوره‌های زمانی و غلظت های مختلف قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم بر انباشتگی سیلی‌مارین

ریشه‌های مویین که به مدت ۳۰ روز در محیط MS مایع کشت شده بودند با سه غلظت مختلف قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت)، تیمار شدند (شکل شماره A ۲). نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان می‌دهد که اثر متقابل دوره زمانی ۷۲ ساعت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فوزاریوم اکسی‌اسپروم، بیشترین اثرات مثبت و معنی‌دار را بر روی میزان سیلی‌مارین دارند به طوری‌که میزان تولید سیلی‌مارین پس از گذشت ۷۲ ساعت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت برابر با ۰/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک که باعث افزایش ۲/۲۸ برابری میزان سیلی‌مارین نسبت به شرایط گروه شاهد می‌شوند. در دوره زمانی ۲٤ ساعت پس از تیمار، افزودن فوزاریوم اکسی‌اسپروم با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در تجمع سیلی‌مارین با میزان ۰/۲٦۱ نشان داد که این میزان در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در همین ساعت، به ۰/۱۸٤ رسید که کمی کاهش پیدا کرد، ولی هر دو غلظت در این ساعت نسبت به نمونه کنترل (۰/۱۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، افزایش خوبی را نشان داد. همچنین در دوره زمانی ٤۸ ساعت پس از تیمار، ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم فوزاریوم، افزایش را در تجمع سیلی‌مارین به ترتیب به میزان‌های ۰/۲ و ۰/۱۹ نسبت به نمونه کنترل (۰/۰٦۲)، در همین ساعت نشان دادند. به علاوه در دوره زمانی ۷۲ ساعت پس از تیمار، ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم فوزاریوم، منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان انباشتگی سیلی‌مارین از ۰/۱۲٤ در نمونه کنترل به ترتیب به ۰/۳۲ و ۰/۲۹ میلی‌گرم برگرم وزن خشک شد.

اثرات متقابل دوره‌های زمانی و غلظت‌های مختلف قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم برمیزان بیوماس ریشه

شکل شماره B ۲، تغییرات وزن خشک ریشه‌های تیمار شده را با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) عصاره قارچی فوزاریوم اکسی اسپروم را در زمان‌های ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد که اثر متقابل دوره زمانی ۷۲ ساعت با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم، بیشترین اثرات مثبت و معنی‌دار را بر روی میزان وزن خشک دارند.





شکل شماره ۲ – مقایسه اثرات متقابل دوره های زمانی مختلف (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) با مقادیر مختلف (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیترمحیط کشت) عصاره قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم بر انباشتگی سیلی‌مارین و بیوماس ریشه در کشت ریشه‌های مویین خارمریم

میزان وزن خشک در ۲٤ ساعت پس از تیمار، در ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فوزاریوم ۰/۱۳ گرم گزارش شد که این مقدار در همین ساعت در نمونه کنترل ۰/۱٤ گرم بود و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم، این میزان به ۰/۱۹ گرم، افزایش یافت. همچنین میزان وزن خشک در ٤۸ ساعت پس از تیمار، در کشت تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم قارچ فوزاریوم، به ترتیب ۰/۱٦ و ۰/۱۹ گرم رسید که این مقدار در همین ساعت نسبت به نمونه کنترل (۰/۱٤ گرم)، افزایش نشان داد. به علاوه میزان وزن خشک در ۷۲ ساعت پس از تیمار در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم قارچ فوزاریوم به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۲۱ گرم رسید که نسبت به نمونه کنترل (۰/۱ گرم)، افزایش را نشان دادند.

تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با غلظت‌های مختلف قارچ فوزاریوم اکسی‌اسپروم در زمان‌های مختلف

تغییرات بیوسنتز تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین در ریشه‌های تیمارشده با فوزاریوم اکسی‌اسپروم با غلظت‌های (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) در زمان‌های مختلف (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت)، در جدول شماره ۱، نشان داده شده است. بیشترین میزان تاکسی فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و سیلی‌بین و ایزوسیلی بین در محیط تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم قارچ فوزاریوم، ۷۲ ساعت پس از تیمار که به ترتیب (۰/۲۲۵، ۰/۰۲۳، ۰/۰۳٤، ۰/۰۲۱ و ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بودند، درحالی‌که مقادیر مربوطه در ریشه‌های مویین تیمار نشده در همین ساعت به ترتیب ۰/۰۷۱، ۰/۰۱۸، ۰/۰۱۸، ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شدند که نسبت به نمونه شاهد، افزایش نشان دادند. تغییرات میزان تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم و در ۵۰ میلی‌لیتر فوزاریوم در زمان‌های مختلف و مقایسه میانگین آنها در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف فوزاریوم در جدول شماره ۱ آمده است.

تجزیه واریانس اثر زمان نمونه‌برداری و غلظت محرک قارچی فیتوفترا در کشت ریشه‌های مویین خارمریم

بر اساس محاسبات آماری انجام شده مشخص شد که در تیمار فیتوفترا بر روی ریشه‌های مویین گیاه خارمریم، بین غلظت‌های مورد آزمایش در صفات مقدار تاکسی‌فولین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در سطح ۱ درصد و مقدار سیلی‌دیانین در سطح ۵ درصد و بین زمان‌های مورد آزمایش در صفات مقدار تاکسی‌فولین، سیلی‌دیانین، ایزوسیلی‌بین و سیلی‌مارین کل در سطح احتمال ۱ درصد و بین اثرات متقابل غلظت‌ها و زمان‌های مورد آزمایش در صفات میزان وزن خشک و مقدار تاکسی‌فولین، سیلی‌دیانین و سیلی‌مارین کل در سطح احتمال ۱ درصد و مقدار سیلی‌کریستین و ایزوسیلی‌بین در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

اثرات متقابل دوره‌های زمانی و غلظت‌های مختلف قارچ فیتوفترا بر انباشتگی سیلی‌مارین

ریشه‌های مویین که به مدت ۳۰ روز در محیط MS مایع کشت شده بودند با سه غلظت مختلف قارچ **فیتوفترا** (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت)، تیمار شدند. شکل شماره A ۳، تغییرات تجمع سیلی‌مارین را با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) عصاره قارچی در زمان‌های (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین دانکن نشان می‌دهد که اثر متقابل دوره زمانی ۷۲ ساعت با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فیتوفترا، بیشترین اثرات مثبت و معنی‌دار را بر روی میزان سیلی‌مارین دارند به طوری که میزان تولید سیلی‌مارین پس از گذشت ۷۲ ساعت با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت برابر با ۰/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک که باعث افزایش ۱/۹ برابری میزان سیلی‌مارین نسبت به شرایط گروه شاهد می‌شوند.

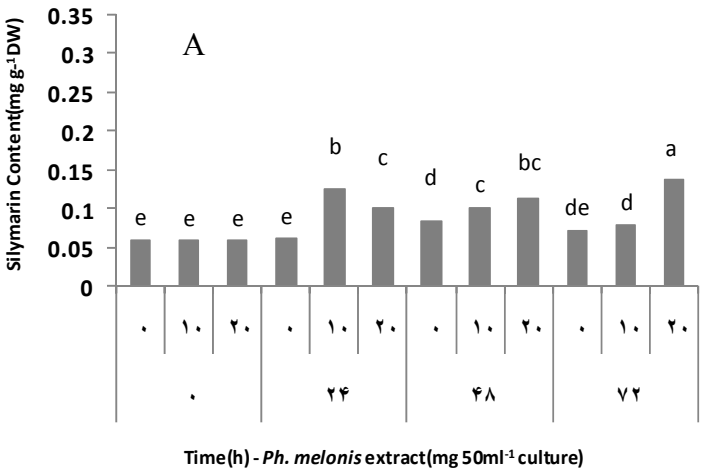
جدول شماره ۱ – تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با غلظت‌های مختلف قارچ فوزاریوم اکسی اسپروم در زمان‌های مختلف

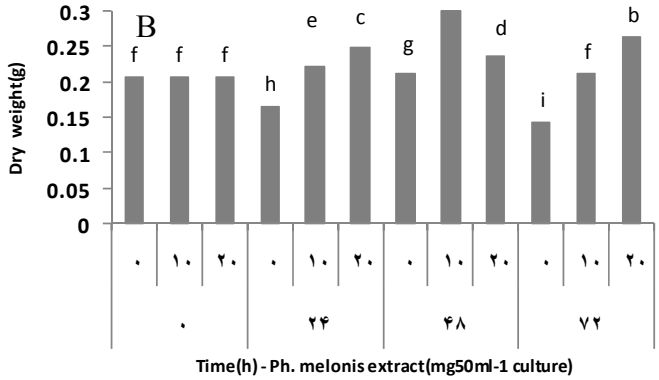
زمان	غلظت عصاره قارچی	فلاونولیگنان (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)				
		تاکسی فولین	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین	سیلی‌بین	ایزوسیلی‌بین
۲٤	۰	۰/۰٦±۰/۰۱	۰/۰۱۹±۰/۰۰۰	۰/۰۱۷ ±۰/۰۰۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰
	۱۰	۰/۱۹۳±۰/۰۲۳	۰/۰۲۲±۰/۰۰۰	۰/۰۳ ±۰/۰۰۲	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰
	۲۰	۰/۱۲۸±۰/۰۰٤	۰/۰۲۲ ±۰/۰۰۰	۰/۰۲ ±۰/۰۰۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰
٤۸	۰	۰/۰۱۲۲±۰/۰۰۰	۰/۱۹۸±۰/۰۰۰	۰/۰۱٦ ±۰/۰۰۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰	۰/۰۰٦±۰/۰۰۰
	۱۰	۰/۱٤٥±۰/۰۰٦	۰/۰۲٤±۰/۰۰۱	۰/۰۱۹ ±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰
	۲۰	۰/۱۳±۰/۰۱٤	۰/۰۲۱±۰/۰۰۰	۰/۰۲۳ ±۰/۰۰۰	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰
۷۲	۰	۰/۰۷۱ ±۰/۰۱	۰/۰۱۸±۰/۰۰۰	۰/۰۱۸ ±۰/۰۰۰	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰
	۱۰	۰/۲۲٥ ±۰/۰۲۳	۰/۰۲۳±۰/۰۰۰	۰/۰۳٤ ±۰/۰۰۰	۰/۰۲۱±۰/۰۰۰	۰/۰۱٥ ±/۰۰۰
	۲۰	۰/۲۲۷ ±۰/۰۱	۰/۰۲۲±۰/۰۰۰	۰/۰۲۹ ±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰

در دوره زمانی ۲٤ ساعت پس از تیمار، افزودن فیتوفترا با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در تجمع سیلی‌مارین با میزان ۰/۱۲ نشان داد که این میزان در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در همین ساعت به ۰/۱ رسید که کمی کاهش پیدا کرد ولی هر دو غلظت در این ساعت نسبت به نمونه کنترل (۰/۱۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، افزایش را نشان داد. همچنین در دوره زمانی ٤۸ ساعت پس از تیمار، ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم فیتوفترا، افزایش را در تجمع سیلی‌مارین به ترتیب به میزان‌های ۰/۱۲ و ۰/۱ نسبت به نمونه کنترل (۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، در همین ساعت نشان دادند. به علاوه در دوره زمانی ۷۲ ساعت پس از تیمار، ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم فیتوفترا تغییر چندانی را در تجمع سیلی‌مارین نسبت به نمونه کنترل نشان نداد و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در همین ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای را در تجمع سیلی‌مارین با میزان ۰/۱۳ نشان داد به طوری که این میزان در نمونه شاهد در همین ساعت برابر با ۰/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد.

اثرات متقابل دوره‌های زمانی و غلظت‌های مختلف قارچ فیتوفترا برمیزان بیوماس ریشه

همان‌طور که در شکل شماره B ۳، مشاهده می‌شود نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد که اثر متقابل دوره زمانی ٤۸ ساعت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فیتوفترا، بیشترین اثرات مثبت و معنی‌دار را بر روی میزان وزن خشک دارند به طوری که میزان وزن خشک پس از گذشت ٤۸ ساعت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت برابر با ۰/۳ گرم در حالی که در همین ساعت در نمونه شاهد این میزان ۰/۲ گرم می‌باشد.





شکل شماره ۳ – مقایسه اثرات متقابل دوره‌های زمانی مختلف (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) با مقادیر مختلف (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) عصاره قارچ فیتوفترا ملونی بر انباشتگی سیلی‌مارین (A) و بیوماس ریشه (B) در کشت ریشه‌های مویین خارمریم

میزان وزن خشک در ۲٤ ساعت پس از تیمار، در ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی قارچ فیتوفترا به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۲٤ گرم گزارش شد که این مقدار نسبت به نمونه کنترل (۰/۱٦ گرم) در همین ساعت افزایش را نشان دادند. همچنین میزان وزن خشک در ٤۸ ساعت پس از تیمار، در کشت تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم قارچ فیتوفترا به ۰/۳ گرم رسید که افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم به ۰/۲۳ گرم رسید که کمی کاهش یافت و این در حالی است که این میزان در نمونه شاهد در همین ساعت ۰/۲۱ گرم، گزارش شد. به علاوه میزان وزن خشک در ۷۲ ساعت پس از تیمار در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم قارچ فیتوفترا به ترتیب ۰/۲۱ و ۰/۲٦ گرم گزارش شد که هر دو غلظت نسبت به نمونه کنترل (۰/۱٤ گرم)، در همین ساعت افزایش نشان دادند.

تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با غلظت‌های مختلف قارچ فیتوفترا در زمان‌های مختلف

تغییرات بیوسنتز تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین در ریشه‌های تیمار شده با فیتوفترا را

با غلظت‌های (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) در زمان‌های مختلف (۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) در جدول شماره ۱، نشان داده شده است. بیشترین میزان تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و سیلی‌بین و ایزوسیلی بین در محیط تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم قارچ فوزاریوم ،۷۲ ساعت پس از تیمار که به ترتیب (۰/۰۸۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱۹، ۰/۰۰٦ و ۰/۰۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بودند درحالی‌که مقادیر مربوطه در ریشه‌های مویین تیمار نشده، در همین ساعت به ترتیب ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۸، ۰/۰۱٤، ۰/۰۰۷ و ۰/۰۰٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شدند که نسبت به نمونه شاهد، افزایش نشان دادند. تغییرات میزان تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین و ایزوسیلی بین در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم و در ۵۰ میلی‌لیتر فوزاریوم در زمان‌های مختلف و مقایسه میانگین آنها در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف فوزاریوم در جدول شماره ۲، آمده است.

بحث

در ریشه‌های تیمار شده با عصاره قارچ *F. oxysprum*، بالاترین میزان تولید سیلی‌مارین ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فوزاریوم اکسی اسپروم مشاهده شد که این میزان برابر با ۰/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود که ۲/۲۸ برابر بیشتر از نمونه شاهد در این ساعت بود. رشد ریشه‌های تیمار شده با فوزاریوم اکسی اسپروم در ۷۲ ساعت پس از تیمار به بالاترین میزان خود رسید که ۲ برابر بیشتر از نمونه شاهد در همین ساعت بود. تیمار ریشه‌های مویین گیاه خارمریم با فوزاریوم اکسی‌اسپروم مشابه با نتایج آجای و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Catharanthus roseus* تحت تیمار قارچی *F. moniliform* است [۳۲].

جدول شماره ۲ – تغییرات فلاونولیگنان‌ها در ریشه‌های مویین گیاه خارمریم تیمار شده با غلظت‌های مختلف قارچ فیتوفترا ملونی (میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) در زمان‌های مختلف (ساعت)

		فلاونولیگنان (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)				
زمان	غلظت عصاره قارچی	تاکسی‌فولی	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین	سیلی‌بین	ایزوسیلی‌بین
	۰	۰/۰۱ ± ۰/۰۰	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۷ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
۲٤	۱۰	۰/۰۷ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
	۲۰	۰/۰٤۲ ± ۰/۰۱۳	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۲ ± ۰/۰۰۹	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰
	۰	۰/۰۲۳ ± ۰/۰۱۲	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
٤۸	۱۰	۰/۰٤۵ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۱ ± ۰/۰۰۷	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
	۲۰	۰/۰۵۳ ± ۰/۰۱٦	۰/۰۲۱ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۲۲ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰
	۰	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰٤	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱٤ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
۷۲	۱۰	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۰٤	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰
	۲۰	۰/۰۸۵ ± ۰/۰۲۸	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰

بررسی اثر عصاره قارچی *Ph. melonis* بر تولید سیلی‌مارین نشان داد که این سویه قارچی سبب افزایش تولید متابولیت ثانویه در گیاه خارمریم شد، به طوری که میزان تجمع سیلی‌مارین پس از گذشت ۷۲ ساعت با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فیتوفترا، باعث افزایش ۱/۹ برابری نسبت به نمونه شاهد در همین ساعت شد. سویه فیتوفترا، باعث افزایش وزن خشک ریشه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه کنترل شد به طوری که پس از گذشت ٤٨ ساعت از اعمال تیمار، به بیشترین میزان خود رسید (۰/۳ گرم)، که این میزان ۱/۵ برابر بیشتر از نمونه شاهد در همین ساعت بود. تیمار ریشه‌های مویین خارمریم با فیتوفترا، با نتایج هارش و همکاران (۲۰۰۲) در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Ocimum basilicum* تحت تیمار عصاره قارچ *Ph. cinnamon*، هارش و همکاران (۲۰۰۳) در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Cichorium intybus* تحت تیمار عصاره قارچ *Ph. parasitica* و سونگ و همکاران (۲۰۰٦)، در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Scutellaria baicalensis* تحت تیمار عصاره قارچ *Ph. megasperma* مشابه است [١٦، ١٤، ١٣].

استفاده از قارچ‌ها به عنوان محرک در محیط کشت بافت به منظور تحریک تولید متابولیت‌ها مورد توجه بسیاری قرار گرفته است و اثرات ایجاد شده به ترکیبات دیواره قارچ‌ها بستگی دارد. قارچ‌ها همانند گیاهان دارای دیواره سلولی می‌باشند ولی ترکیب دیواره سلولی آنها با گیاهان متفاوت است. دیواره سلولی قارچ‌ها از چندین غشا یا لایه تشکیل شده است که حدود ۸۰ تا ۹۰٪ ترکیب دیواره سلولی را پلی ساکاریدهای مختلف از جمله: سلولز، کیتین، گلوکان، لیگنین و کالوز می‌سازند. بقیه ترکیب دیواره را چربی و پروتئین تشکیل داده و Ca و Mg از مواد معدنی رایج در ساختمان دیواره سلولی است و نسبت این ترکیبات در دیواره تمام سلول‌های قارچی یکسان نیست.

محرک‌ها به ترکیبات دیواره سلولی حمله می‌کنند و در پی پاسخ به پیام محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. محرک‌ها به وسیله گیرنده گیاهی یا R پروتئین شناسایی می‌شوند. شناسایی در دیواره پلاسما، آغاز سیگنال پاسخ‌دهی می‌باشد. بعد از سیگنال تحریک، گیرنده‌های گیاهی سیگنال اجرایی‌شان را مثل نشت یونی، انفجار اکسیداتیو و اکسیژن فعال، فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌ها را به کار می‌اندازد و به وسیله مولکول‌های پیام‌بر دوم مثل H_2O، اسید جاسمونیک، اسید سالسلیک، آزادکننده‌های کلسیم داخلی و تلفیق چند ژن و سرانجام بیان ژن دفاعی که همان تولید بالای متابولیت ثانویه حاصل می‌شود [٣٣،٣٤].

به طور کلی می‌توان گفت که وقتی گیاهان با تنش مواجه می‌شوند هموستازی یون در سلول‌های آنها به هم می‌خورد. برای تطابق با عدم تعادل ایجاد شده در سیستم اسمزی و یونی، گیاهان پاسخ‌های متعددی را بروز می‌دهند، این پاسخ‌ها شامل تحریک تعداد زیادی ژن می‌باشد که یک گروه ژن عامل پروتئینی را ایجاد می‌نمایند که در تنظیم انتقال ژن پیام بر نقش دارند و یک گروه دیگر به صورت بیان ژن در پاسخ به تنش دخالت دارند [٣٥].

زمانی‌که محرک‌های قارچی با دیواره سلولی تماس برقرار نماید، اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک سریعاً در آن محل تجمع یافته و به سایر قسمت‌های گیاه نیز انتشار یافته و سنتز پروتئین‌هایی را در پاسخ به حملات پاتوژن‌ها و تولید شکل‌هایی از فیتوالاکسین‌ها را مانند فلاونوییدها و سنتز آنزیم‌هایشان را باعث می‌شوند [٣٦].

ترکیبات سیگنالی شناخته شده حد واسط بین محرک تا پاسخ دفاعی شامل القاء تولید متابولیت‌های ثانویه مشخص شده‌اند، اما اینکه چطور و چگونه این انتقال سیگنال انجام می‌شود، چطور پذیرنده باعث فعال شدن کانال‌های یونی و G پروتئین‌ها می‌شود، چطور پروتئین‌های متصل به GTP (G- protein) کانال‌های یونی را تنظیم می‌کند، چطور Ca^{+2} و Ros ، ژن‌های دفاعی و متابولیسم ثانویه را فعال می‌کنند و چطور اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک و اتیلن ارتباط دارند و واکنش‌های بعدی را فعال می‌کنند هنوز به طور کامل شناخته نشده است [٣٧]. بنابراین مطالعه مسیرهای سیگنالینگ مولکولی منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه بخصوص در شرایط این ویترو ضروری می‌باشد. از این نتایج

در مطالعات مهندسی متابولوم با هدف افزایش تولید متابولیت‌های با ارزش اقتصادی بالا استفاده خواهد شد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به دست آمده مبین این مسأله است که استفاده از عصاره قارچ‌های به عنوان محرک باعث افزایش تجمع و تولید سیلی‌مارین در گیاه خارمریم می‌شود که از نقطه نظر تولید در شرایط این‌ویترو قابل توجه است و به کارگیری این عوامل محرک در کشت بیوراکتور مربوط به ریشه‌های مویین این گیاه توصیه می‌شود. شناسایی مکانیسم مولکولی و فیزیولوژیکی اثر این عوامل محرک بسیار سودمند خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی که حمایت مالی این طرح پژوهشی (شماره ۸۸۰۲٤- ۰۵- ۰۵- ۱۲) را به عهده داشت، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Hasanloo T, Kowsari M, Mohajeri Naraghi S and Bagheri O. Study of different Trichoderma strains on growth characteristics and silymarin accumulation of milk thistle plant. *Journal of Plant Interactions* 2009; 1 - 5.

2. Kern V, Walterova. Silibin and silymarin – new effects and applications. (*Biomd Papers*) 2005; 149: 29 - 41.

3. Nader BL, Taketa AT, Pereda-Miranda R and Villarreal ML. Products of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of Galphimia glauca. *Planta Med*. 2006; 72: 842 - 4.

4. Matthys K, Julsing, Wim J and Oliver K. The engineering of medicinal plants: prospects and limitations of medicinal plant biotechnology: part 1, 2007.

5. Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade MS, Yih Lin C and Tsay HS. Studies on the production of some important secondry metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 2004; 1 - 22.

6. Hasanloo T, Rezazadeh SHA and Rahnama H. Hairy root culture as a source of secondary metabolite. *J. Medicinal Plants* 2009; 29: 1 - 18.

7. Lamine B, Maria V and March F. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic Journal of Integrative Biosciences* 2008; 3: 2 - 9.

8. Rahnama H, Razi, Najafi M and Hasanloo T. Enhanced production of Flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* by over-expression of chalcone synthase gene. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnol*. 2012; (In press).

9. Rahimi Ashtiani S, Hasanloo T, Sepehrifar R and Bihamta MR. Elicitation of silymarin production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Pharmaceutical Sciences* 2012; 4: 253 - 66.

10. Liu C, Wang Y, Xu X, Ouyang F, Ye H and Li G. Improvement of artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. by fungal elicitor Bioproc Eng 1999; 20: 161 – 4.

11. Rajasekaran T, Madhusudan R and Ravishankar GA. Elicitation of thiophene production by cultured hairy roots of *Tagetest patula*. *Acta Physiologiae Plantarum* 1999; 21: 243 - 7.

12. Wang JW, Kong FX and Tan RX. Improved artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua* by (22S, 23S)— homobrassinolide. *Biotech. Lett.* 2002; 24: 1573 –7.

13. Harsh PB, Travis SW, Herbert PS and Jorge MV. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* 2002; 983 - 95.

14. Harsh PB, Dattatreya BS and Ravishankar GA. Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L under the influence of fungal elicitore and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography- mass spectrometry. *J. the Science of Food and Agriculture* 2003; 83: 769 - 74.

15. Chang-He Z and Jian-Yong W. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of Taxus of *Taxus spp*. Cell. *Enzyme and Microbial Technol.* 2003; 32: 71 - 7.

16. Luis FR, Ferreres F, Tavares RM and Dias A.C.P. Induction of phenolic compounds in Hypericum perforatum L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochem*. 2006; 67: 149 - 55.

17. Savitha BC, Thimmaraju R and Bhagyalakshmi N. and Ravishankar G.A. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of Beta *vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochem*. 2006; 41: 50 - 60.

18. Sung Jin H. Baicalin production in transformed hairy root clones of *scutellaria baicalensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006; 11: 105 - 9.

19. Amany KI, Sherief K, Ishrak K, Diaa Y, Ikhlas K and Mostafa M. Stimulation of oleandrin production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures. *Enzyme and Microbial Technol*. 2007; 41: 331 - 6.

20. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol. Lett*. 2007; 1143 - 6.

21. Ajungla L, Patil PP, Barmukh RB and Nikam TD. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnol*. 2009; 8: 317 - 22.

22. Taha HS, El-Bahr MK and Seif-El-Nasr MM. In vitro studies on Egyption *Catharanthus roseus* (L.). Ii. Effect of biotic and abiotic stress on Indole Alkaloids production. *Journal of Res. Applied Sciences* 2009; 5: 1826 - 31.

23. Wiktorowska E, Długosz M and Janiszowska W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technol.* 2010; 46: 14 – 20.

24. Rahimi S, Hasanloo T, Najafi F and Khavari-Nejad RA. Methyl Jasmonate Influences on Silymarin Production and Plant Stress Responses in *Silybum marianum* Hairy Root Cultures in Bioreactor. *Natural Product Res*. 2011; 1 - 6.

25. Rahimi S, Hasanloo T, Najafi F and Khavari-Nejad RA. Enhancement of silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. *Plant Omic. J*. 2011; 4: 34 - 9.

26. Khalili M, Hasanloo T and Kazemi Tabar SK. Ag^{+} enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L.) Greatn. *Plant Omic. J*. 2010, 3: 109- 114.

27. Hasanloo T, Sepehrifar R, Rahnama H and Shams MR. Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in Milk thistle hairy root culture. World. *Journal of Microbiology and Biotechnol*. 2009; 25: 1901 - 9.

28. Khalili M, Hasanloo T, Kazemi Tabar SK and Hassan Rahnama H. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum. Cell*

Biol. International. 2009; 33: 988 - 94.

29. Rahimi Ashtiani S, Hasanloo T and Bihamta MR. Enhanced production of silymarin by Ag^+ elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biol.* 2009, 48: 708 -15.

30. Murashige T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15: 473 – 97.

31. Ajay N, Shridhar P and Devanand PF. Influence of fungal elicitors on production of Ajmalicie by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Prog*. 2002; 18: 159 - 62.

32. Montesanot M, Bradert G and Tapio Palva E. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathol*. 2003; 4: 73 - 9.

33. Norbert O, Imre B, Zoltan S and Bela D. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivativesin *Rubia tinctorum* L. cell suspension culturs. *Dyes and Pigments* 2008; 77: 249 - 57.

34. Zang J.S, C. Xie, Z.Y.Li and S.Y Chen. Expression of the plasma membrane H^+- Atpase gene in response to sait stress in a rice salt- tolerant mutant and its original variety. *Theor. Appl. Genet*. 1999; 99: 1006 - 11.

35. Martin J, Mueller, Wilhelm B., Eva S. and Meinhart H. Z. Signaling in the elicitation processis mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Plant Biol*. 1993; 90: 7490 - 4.

36. Sudha G, Ravishankar G.A. Invilment and interaction of various signalihg compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondart metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2002; 71: 181 - 212.