



# Callogenesis Optimization and Investigation of Morpho-physiological, Phytochemical and Biochemical Changes in *Hypericum perforatum* L. in Response to Chitosan Elicitor under In Vitro Culture Conditions

Soleimanizadeh M<sup>a</sup>, Yavari A<sup>b</sup>, karimi takallo S<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

<sup>b</sup> Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

<sup>c</sup> M.S. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Soleimanizadeh M, Yavari A, karimi takallo S. Callogenesis Optimization and Investigation of Morpho-physiological, Phytochemical and Biochemical Changes in *Hypericum perforatum* L. in Response to Chitosan Elicitor under In Vitro Culture Conditions. Journal of Cell and Tissue . 2025; 16(1):32-50.

<https://doi.org/10.61882/JCT/16..1.32>

## KEYWORDS

Chitosan  
Elicitation  
Plant tissue culture  
Secondary metabolite technology

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** St. John's Wort, scientifically known as *Hypericum perforatum* L., belongs to the family *Hypericaceae* and is an important medicinal plant widely used today for the treatment of depression. It is one of the best-selling herbal products worldwide. Its medicinal properties are attributed to the secondary metabolites present in its extract, including hypericin, hyperforin, flavonoids, xanthones, and other valuable compounds. To meet the growing demands of the pharmaceutical industry and to obtain high-quality biomass, it is cultivated in various countries. However, plants grown under field conditions often face challenges that may affect their phytochemical composition. Plant tissue culture under controlled conditions can mitigate these issues and serve as an attractive alternative to field cultivation. Today, one of the key aspects of biotechnology in *Hypericum perforatum* is the enhancement of bioactive molecule content using various approaches, including elicitation in tissue culture.

**Aim:** This research aims to investigate the callogenesis optimization and morpho-physiological, phytochemical, and biochemical changes in the callus of *Hypericum perforatum* L. in response to chitosan elicitor under *In Vitro* culture conditions.

\* Corresponding author. Tel.:09150738202 Fax: 07633711000

E-mail address: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

DOI : <https://doi.org/10.61882/JCT/16..1.32>

Received: 30 Nov. 2024; Received in revised form: 8 Jan. 2025; Accepted: 13 Jan. 2025

Original Article

© Author



**Materials and Methods:** After obtaining *Hypericum perforatum* seeds, the effect of sterilization methods on seed contamination percentage was evaluated using a completely randomized design. Subsequently, a factorial experiment in a completely randomized design was conducted to optimize callus induction using hormonal treatments ( $E_1$  to  $E_2$ ), explants ( $E_1$ ,  $E_2$ ), and different light conditions ( $L_1$ ,  $L_2$ ). After preparing the chitosan elicitor at concentrations of 0 (control), 25, 50, and 75 mg, another experiment was carried out in a completely randomized design to apply the elicitor to the seeds. Finally, the effect of the chitosan elicitor on improving morphological, physiological, metabolic, and biochemical traits was examined.

**Results:** The results of the mean comparison for the effect of sterilization methods showed that treatment C (no sterilization) and  $S_2$  exhibited the lowest and highest levels of contamination percentage, respectively. The mean comparison results for the interaction effect of hormonal treatment explant type, and light conditions indicated that the best hormonal combination for callus induction was  $H_1E_1L_1$ . The findings revealed a significant increase in traits such as fresh weight, dry weight, callus volume, flavonoids, phenols, antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, catalase, peroxidase, proline, and chlorophyll a and b at all chitosan concentrations compared to the control. The highest and lowest values for these traits were observed in the 50 mg/L chitosan treatment and the control, respectively. For malondialdehyde content, the highest and lowest levels were associated with the control treatment and the 50 mg/L chitosan treatment, respectively.

**Conclusion:** Overall, the results of this study demonstrated that the chitosan elicitor improved the growth, physiological, metabolic, and biochemical characteristics of *Hypericum perforatum*. Among all the concentrations used, the 50 mg/L concentration was the most effective in enhancing these traits.



## بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی تغییرات مورفوفیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی گل راعی در پاسخ به الیسیاتور کیتوزان تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای

مزگان سلیمانی زاده<sup>۱\*</sup>، علیرضا یآوری<sup>۲</sup>، سمیه کریمی تکلو<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران  
<sup>۳</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
الیسیاتیشن تکنولوژی کشت بافت گیاهی کیتوزان متابولیت ثانویه	<p><b>هدف:</b> گل راعی با نام علمی <i>Hypericum perforatum</i> L. یک گیاه دارویی مهم است که به‌طور گسترده در درمان افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویژگی‌های دارویی آن به ترکیبات متابولیت ثانویه موجود در عصاره (هایپرسیسین، هیپرفورین و غیره) مرتبط می‌باشد. گیاهان رشد کننده در مزرعه معمولاً با چالش‌هایی مواجه هستند که ممکن است بر ترکیب فیتوشیمیایی آن تأثیر بگذارد. کشت بافت‌های گیاهی می‌توانند این مسائل را کاهش داده و به‌عنوان یک جایگزین معرفی شوند. یکی از جنبه‌های بیوتکنولوژی در گل راعی بهبود محتوی متابولیت‌ها با استفاده از رویکردهای مختلف از جمله الیسیاتیشن می‌باشد. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی تأثیر کیتوزان بر صفات مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی گل راعی تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. <b>مواد و روش‌ها:</b> پس از تهیه بذور گل راعی، تأثیر روش‌های ضدعفونی بر درصد آلودگی بذور مورد آزمون قرار گرفت. سپس آزمایش فاکتوریلی در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت بهینه‌سازی کالوس‌زایی آن با تیمارهای هورمونی (<math>H_0</math> تا <math>H_3</math>)، ریزنمونه (<math>E_1</math> و <math>E_2</math>) و شرایط نوری مختلف (<math>L_1</math> و <math>L_2</math>) انجام شد. پس از تهیه الیسیاتور کیتوزان (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم)، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت اعمال الیسیاتور روی بذور انجام شد. در نهایت تأثیر الیسیاتور کیتوزان روی بهبود صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیتی و بیوشیمیایی بررسی شد. <b>نتایج:</b> نتایج مقایسه میانگین اثر روش ضدعفونی نشان داد که تیمار C (عدم ضدعفونی) و <math>S_2</math> به‌ترتیب کم‌ترین و بالاترین میزان درصد آلودگی نشان دادند. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار هورمونی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری نشان داد که بهترین ترکیب هورمونی جهت القا کالوس <math>L_1E_1H_1</math> می‌باشد. نتایج نشان دهنده افزایش معنی‌دار صفات وزن تر، خشک، حجم کالوس، فلاونوئید، فنل، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، آنتوسیانین، کاروتنوئید، کاتالاز، پراکسیداز، پرولین، کلرفیل a و b در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با شاهد بود. برای صفت مالون دی‌آلدئید بالاترین و کم‌ترین میزان به تیمار شاهد و کیتوزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تعلق داشت. <b>نتیجه‌گیری:</b> نتایج نشان داد که الیسیاتور کیتوزان باعث بهبود ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی، متابولیتی و بیوشیمیایی گل راعی شده و غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آن در بهبود این ویژگی‌ها موثرتر بوده است.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۴	

## ۱- مقدمه

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. متعلق به خانواده Hypericaceae یک گیاه دارویی مهم است. از عصاره‌ها و دمنوش‌های آن از زمان‌های قدیم در درمان بیماری‌های مختلف استفاده شده است. مطالعات نشان داده که این گیاه خواصی از جمله خاصیت ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضدویروسی، ضدسرطانی و ضدباکتری دارد. در حال حاضر، این گیاه دارویی به‌طور گسترده در درمان افسردگی خفیف و متوسط مورد استفاده قرار می‌گیرد و یکی از محصولات گیاهی پر فروش در سراسر جهان می‌باشد (۱). این ویژگی‌های دارویی به ترکیبات متابولیت ثانویه موجود در عصاره (هایپرسیسین، هیپرفورین، فلاونوئید، زانتون و سایر ترکیبات ارزشمند) مرتبط می‌باشد (۲). به دلیل ارزش دارویی شناخته شده خود، این گونه در فارماکوپه چند کشور از جمله اروپا و آمریکا گنجانده شده است. برای تامین نیازهای روزافزون صنعت داروسازی و به‌دست آوردن بیومس با کیفیت بالا، در کشورهای مختلف کشت می‌شود. گیاهان رشد کننده در شرایط مزرعه معمولاً با چالش‌های زیستی و غیر زیستی مواجه هستند که ممکن است بر ترکیب فیتوشیمیایی آن تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، گیاهان به‌دست آمده از مناطق جغرافیایی، فصول و شرایط خاک مختلف به‌طور قابل توجهی در ترکیب فیتوشیمیایی خود تفاوت دارند. از آن‌جا که ظرفیت فارماکولوژیکی عصاره‌های این گیاه به‌طور اصلی توسط ترکیب فیتوشیمیایی و نسبت‌های بین ترکیبات مهم تعیین می‌شود، این تغییرات ممکن است روی کارایی درمانی عصاره‌ها تأثیر بگذارد. کشت‌های درون شیشه‌ای تحت شرایط کنترل شده می‌توانند این مسائل را کم کنند و به‌عنوان یک جایگزین جذاب برای کشت مزرعه معرفی شوند (۳). امروزه یکی از جنبه‌های مهم بیوتکنولوژی در گل راعی بهبود محتوی مولکول‌های فعال زیستی با استفاده از رویکردهای مختلف می‌باشد. یکی از این رویکردها، استفاده از ایسیستین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق ایسیستین با استفاده از انواع سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای علاقه‌مندی بسیاری را به‌خود جلب کرده است (۴). ایسیستورها عمدتاً براساس منشا آن‌ها به سه دسته ایسیستور زیستی، شیمیایی و فیزیکی تقسیم می‌شوند. ایسیستورهای زیستی عمدتاً از دیواره‌های سلولی میکروبی (کیتین، کیتوزان و گلوکان) و کربوهیدرات‌هایی مانند پلی و اولیگوساکاریدهای حاصل از دیواره‌های سلولی گیاهان (پکتین، اسید پکتینیک و سلولز) تشکیل شده‌اند. پس از ایسیستین، یک سری تغییرات متابولیکی در سراسر گیاه به‌طور همزمان آغاز می‌شود تا سیستم ایمنی ذاتی گیاه را فعال کند و همچنین گیاه را برای چالش تنش آماده کند (۵). فلزات سنگین، یون‌ها و اکسیدهای فلزی می‌توانند به‌عنوان ایسیستورهای شیمیایی متابولیسم ثانویه گیاهان عمل کنند (۶). عوامل فیزیکی مانند شوک سرمایی، اشعه ماوراء بنفش، اوزون، تنش اسمزی و تنش آبی نیز فعالیت آنزیمی و متابولیسم ثانویه را ایجاد می‌کنند. با توجه به مطالب ذکر شده بالا هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی تغییرات مورفوفیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی گل راعی در پاسخ به ایسیستور کیتوزان تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**بررسی تأثیر روش‌های مختلف ضد عفونی بر درصد آلودگی بذور گل راعی:** پس از تهیه بذورهای گل راعی از شرکت پاکان بذور اصفهان، تأثیر روش‌های مختلف ضد عفونی بر صفت درصد آلودگی بذور آن آزمون شد. بدین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۵ بذر در هر تکرار انجام شد. تیمارهای ضد عفونی شامل ۱- شاهد (عدم ضد عفونی)، ۲- قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار ۱۰ دقیقه ۳- قرار دادن در قارچ کش ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار ۱۰ دقیقه بود.

**بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی تاثیر ترکیبات هورمونی مختلف، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر تشکیل کالوس:** بدین منظور آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل نوع ترکیب هورمونی در ۴ سطح (شاهد، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP)، فاکتور دوم شامل ریزنمونه در ۲ سطح (برگ و ساقه) و فاکتور سوم شامل نوع شرایط نوری در دو سطح (روشنایی و تاریکی) بود. تیمارها و کدهای آن در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: کدگذاری اثرات متقابل تیمار هورمونی، ریزنمونه و شرایط نوری

کد تیمار	نوع تیمار هورمونی، ریزنمونه و شرایط نوری
H <sub>0</sub> E <sub>1</sub> L <sub>1</sub>	شاهد، برگ، روشنایی
H <sub>0</sub> E <sub>1</sub> L <sub>2</sub>	شاهد، برگ، تاریکی
H <sub>0</sub> E <sub>2</sub> L <sub>1</sub>	شاهد، ساقه، روشنایی
H <sub>0</sub> E <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	شاهد، ساقه، تاریکی
H <sub>1</sub> E <sub>1</sub> L <sub>1</sub>	برگ، ۱ میلی‌گرم BAP + ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D، تاریکی
H <sub>1</sub> E <sub>1</sub> L <sub>2</sub>	برگ، ۱ میلی‌گرم BAP + ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D، تاریکی
H <sub>1</sub> E <sub>2</sub> L <sub>1</sub>	ساقه، ۱ میلی‌گرم BAP + ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D، روشنایی
H <sub>1</sub> E <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	ساقه، ۱ میلی‌گرم BAP + ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D، تاریکی
H <sub>2</sub> E <sub>1</sub> L <sub>1</sub>	برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، روشنایی
H <sub>2</sub> E <sub>1</sub> L <sub>2</sub>	برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، تاریکی
H <sub>2</sub> E <sub>2</sub> L <sub>1</sub>	ساقه، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، روشنایی
H <sub>2</sub> E <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	ساقه، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، تاریکی
H <sub>3</sub> E <sub>1</sub> L <sub>1</sub>	برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، روشنایی
H <sub>3</sub> E <sub>1</sub> L <sub>2</sub>	برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، تاریکی
H <sub>3</sub> E <sub>2</sub> L <sub>1</sub>	ساقه، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، روشنایی
H <sub>3</sub> E <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	ساقه، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP، تاریکی

**تهیه و اعمال الیستور کیتوزان:** این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار و ۵ بذر در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار الیستور زیستی کیتوزان بود. در ابتدا محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از الیستور در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵۱ اتمسفر ضد عفونی شد. پس از اینکه دمای محیط کشت پایین آمد، در زیر هود لامینار درون شیشه‌های مربایی از قبل اتوکلاو شده پخش و پس از سرد شدن کامل محیط کشت درب آن‌ها بسته و آماده کشت گردید. نمونه‌های کشت شده سپس در اتاق کشت درون شیشه‌ای در شرایط ۶۱ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲ ± ۵۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

**اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک کالوس:** برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس از ترازوی دقیق آزمایشگاهی (AS220R1، لهستان) استفاده شد. حجم کالوس نیز بر اساس روش ارشمیدس که شامل غوطه‌ور کردن کالوس‌ها در مایع و اندازه‌گیری حجم مایع جابه‌جا شده است، انجام شد.

**اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و کلروفیل (کلروفیل a و b):** کلروفیل a, b و کاروتنوئید مطابق با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شدند (۷). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاه هدف با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) برای استخراج رنگدانه‌های فتوسنتزی مخلوط گردید. برای هر نمونه، میزان جذب در طول موج ۶۴۶/۸۰، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر با سه تکرار تکنیکال با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (BIOTEK ELX800TS، آمریکا) اندازه‌گیری شد. غلظت هر گروه از ترکیبات مطابق با معادلات زیر محاسبه شد و به‌صورت میلی‌گرم در گرم وزن تر گزارش شد.

$$\begin{aligned} \text{Chl a (mg g}^{-1}\text{)} &= (12.25 \times A_{663.2}) - (2.79 \times A_{646.8}) \\ \text{Chl b (mg g}^{-1}\text{)} &= (21.51 \times A_{646.8}) - (5.1 \times A_{663.2}) \\ \text{Car (mg g}^{-1}\text{)} &= [(1000 \times A_{470}) - (85.02 \times \text{Chl b})] \div 198 \end{aligned}$$

**اندازه‌گیری میزان فلاونوئید و فنل کل:** محتوی فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم (AlCl<sub>3</sub>) محاسبه شد (۸). محتوی فنل کل بر اساس روش Soland and Laima (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد (۹).

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانسی:** فعالیت مهار رادیکال DPPH مطابق با روش Hatano و همکاران (۱۰) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش (حجم نهایی سه میلی‌لیتر) شامل ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر استیک اسید ۰/۵ مولار (pH ۵/۵)، یک میلی‌لیتر DPPH ۰/۲ میلی‌مولار در اتانول و ۱/۴ DPPH اتانول ۵۰٪ (حجمی/حجمی) که به‌شدت با نمونه‌ها مختلف تکان داده شد. بعد از آنکوبه کردن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، DPPH باقیمانده با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت مهار این رادیکال برای هر نمونه به شکل نسبت کاهش در جذب فعالیت مهار رادیکال DPPH (%) به جذب محلول کنترل (۱۰۰٪) در غیاب نمونه بیان شد. در این معادله A میزان جذب کنترل (اتانول ۵۰ درصد و بدون DPPH) و B میزان جذب تصحیح شده مخلوط واکنش نمونه (اتانول ۵۰ درصد و با DPPH) می‌باشد.

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 = \text{فعالیت مهار رادیکال}$$

**اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین:** آنتوسیانین کل با استفاده از روش متانول اسیدی شده (متانول: HCl با نسبت ۱:۹۹ حجمی/حجمی) و بر اساس روش تغییر یافته Wagner (۱۹۷۹) تعیین شد (۱۱). بعد از همگن‌سازی ۵۰ میلی‌گرم بافت برگی در ۵ میلی‌لیتر اتانول اسیدی شده، این محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. عصاره سپس در ۴۰۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. جذب هر سوپرناتانت در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری میزان پرولین:** میزان پرولین با استفاده از واکنش نین هیدرین و بر اساس روش Bates و همکاران (۱۲) تعیین شد.

**اندازه‌گیری محتوی مالون دی‌آلدئید:** محتوی مالون دی‌آلدئید (MDA)، به‌عنوان یک شاخص از پراکسیداسیون لیپیدی، مطابق با روش Heath و Packer (۱۳) تعیین شد. پس از همگن‌سازی ۰/۲ گرم نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد، مخلوط واکنش در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد و یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت با همدیگر مخلوط شد. مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه شد و سپس به سرعت روی یخ خنک شد. مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب سوپرناتانت در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محتوی MDA با ضریب خاموشی ۱۵۵ mM cm<sup>-1</sup> محاسبه و به صورت میکروگرم در گرم وزن تر بیان شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز:** فعالیت کاتالاز (CAT) با توجه به تجزیه پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) با استفاده از روش توصیف شده توسط Aebi و همکاران (۱۴) در طول موج ۲۴۰nm انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا ( $H_2O_2$ ) ۳٪ (حجمی/حجمی) بود. ضریب خاموشی ( $0.436 m^{-1}cm^{-1}$ ) برای اندازه‌گیری فعالیت استفاده شد و فعالیت آنزیم به صورت میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) با به کارگیری روش Lagrimini (15) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش با کاربرد ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار،  $Hp=7$ )، ۲۰ میکرولیتر گایاکول (۱۰۰ میلی‌مولار،  $10 \times$ )، ۲۰ میکرولیتر عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و  $H_2O_2$  (۲۷/۵ میلی‌مولار،  $10 \times$ ) آماده شد. بعد از ۲۰ ثانیه از دوره انکوبه کردن، میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول A-ELC (A، جذب، E، ضریب خاموشی  $6/39 Mm^{-1}cm^{-1}$ ، C، غلظت آنزیم،  $mMmin^{-1}mgFW^{-1}$ ، و FW وزن تر نمونه را نشان می‌دهد) به دست آمد.

### ۳- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری در نهایت با استفاده از نرم افزارهای SAS و رسم نمودارها Excel انجام شد. مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

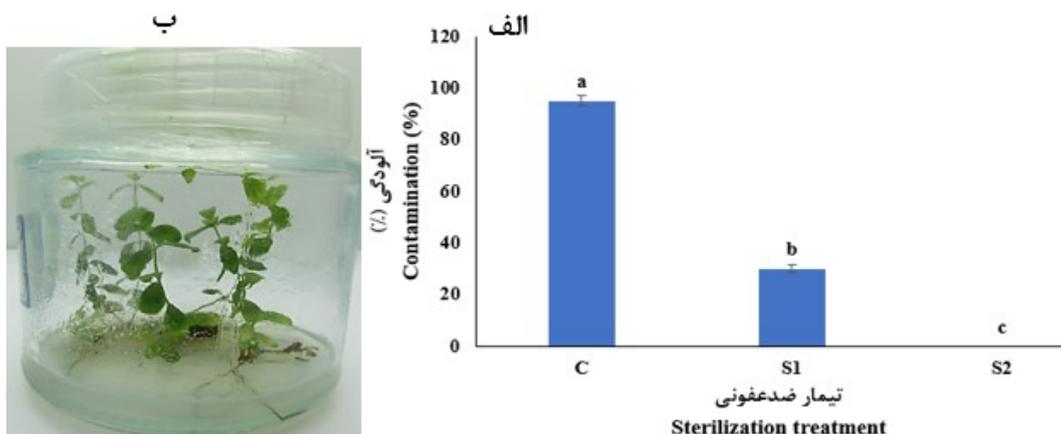
### ۴- نتایج

#### تاثیر روش‌های مختلف ضدعفونی بر درصد جوانه‌زنی بذور گل راعی

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر روش ضدعفونی در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر روش ضدعفونی نشان داد که تیمار C (عدم ضدعفونی یا تیمار شاهد) بالاترین میزان درصد آلودگی (۱۰۰) را در مقایسه با تیمارهای  $S_1$  و  $S_2$  داشت (شکل ۱-الف). کمترین درصد آلودگی مربوط به تیمار  $S_2$  بود که در واقع فاقد هر گونه آلودگی روی محیط کشت بود (شکل ۱-ب).

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس تاثیر روش‌های مختلف ضدعفونی روی درصد آلودگی بذور گل راعی

منابع تغییرات	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of square
S.O.V		
روش ضدعفونی (S)	2	9433.33**
(S) Sterilization method		
خطا Error	18	166.66
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	20.98



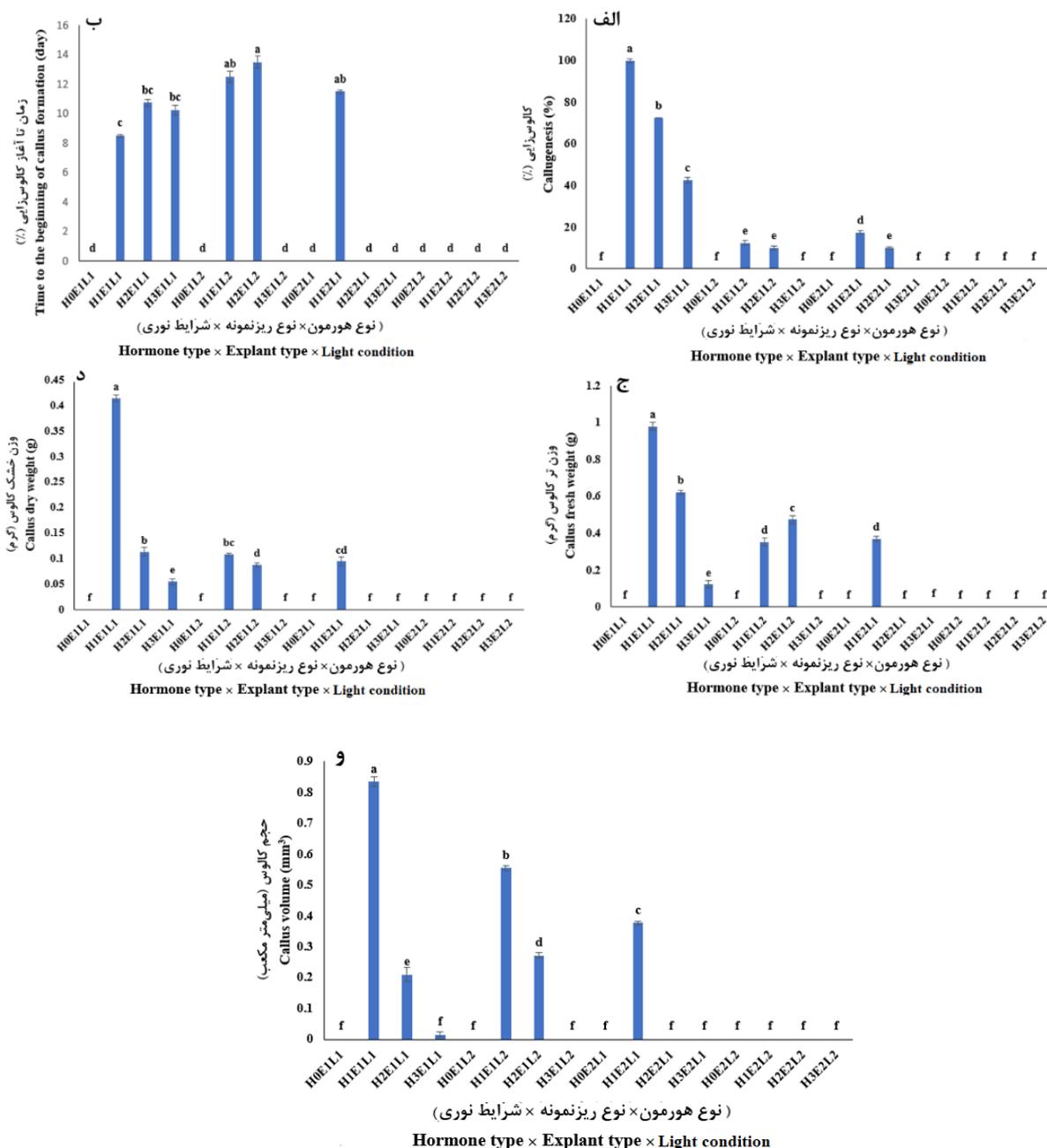
شکل ۱: الف) نتایج مقایسه میانگین اثر روش ضدعفونی بر درصد آلودگی بذر گل راعی: C، شاهد (عدم ضدعفونی)، S1، روش دوم و S2، روش سوم ضدعفونی. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است. ب) رشد بذر بدون آلودگی در روش سوم ضدعفونی.

**بررسی تاثیر نوع تیمار هورمونی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر ویژگی‌های مختلف کالوس گل راعی:** در جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌دار بودن اثرات ساده هورمون، ریزنمونه، شرایط نوری، اثرات متقابل هورمون در ریزنمونه، ریز نمونه در شرایط نوری و هورمون در شرایط نوری و اثر متقابل تیمار هورمونی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری مختلف برای صفات درصد کالوس‌زایی، زمان تا آغاز کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس و حجم کالوس می‌باشد. با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سه گانه، مقایسه میانگین تنها برای این اثر متقابل انجام شد.

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس تاثیر نوع تیمار هورمونی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر کالوس‌زایی گل راعی

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of square			
		حجم کالوس Callus volume	وزن خشک کالوس Callus dry weight (g)	وزن تر کالوس Callus fresh weight (g)	زمان تا آغاز کالوس‌زایی Time to Calogenesis
نوع هورمون (H) Hormon type	3	0.7124**	0.0780**	0.701**	209.0**
نوع ریزنمونه (E) Explant type	1	0.4218**	0.1167**	1.250**	484.0**
شرایط نوری (L) Light condition	1	0.03980**	0.05784**	0.432**	56.25**
HXE	3	0.2253**	0.03663**	0.304**	99.79**
HXL	3	0.1550**	0.03540**	0.145**	37.54**
EXL	1	0.0314**	0.0213**	0.082**	16.0*
HXE × L	3	0.0174**	0.0090**	0.012*	112.2**
خطا Error	8	0.0025**	0.0001**	0.0036	3.15
ضریب تغییرات C.V. (%)	20.25	29.47	21.07	20.56	22.42

نتایج مقایسه میانگین شکل ۲-الف نشان داد که تیمار برگ، ۵/۰ میلی گرم در لیتر 2-4-D + یک میلی گرم در لیتر BAP، روشنایی (H<sub>1</sub>E<sub>1</sub>L<sub>1</sub>) بیشترین میزان درصد کالوس‌زایی را نشان داد (شکل ۳). زمان تا آغاز کالوس‌زایی در تیمارهای مختلف به‌طور قابل توجهی متفاوت است (شکل ۲-ب). بیش‌ترین و کم‌ترین میزان روز تا آغاز کالوس‌زایی به‌ترتیب در تیمار H<sub>2</sub>E<sub>1</sub>L<sub>2</sub> و H<sub>1</sub>E<sub>1</sub>L<sub>1</sub> می‌باشد (شکل ۲-ب). همان‌طور که از شکل ۲-ج و د مربوط به نتایج مقایسه میانگین‌ها بر می‌آید، تیمار E<sub>1</sub>H<sub>2</sub>L به‌طور معنی‌داری وزن تر و خشک کالوس بالاتری نسبت به سایر تیمارها تولید کرده است.



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی (الف)، زمان تا آغاز کالوس‌زایی (ب)، وزن تر کالوس (ج)، وزن خشک کالوس (د) و حجم کالوس (و) گیاه دارویی راعی. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



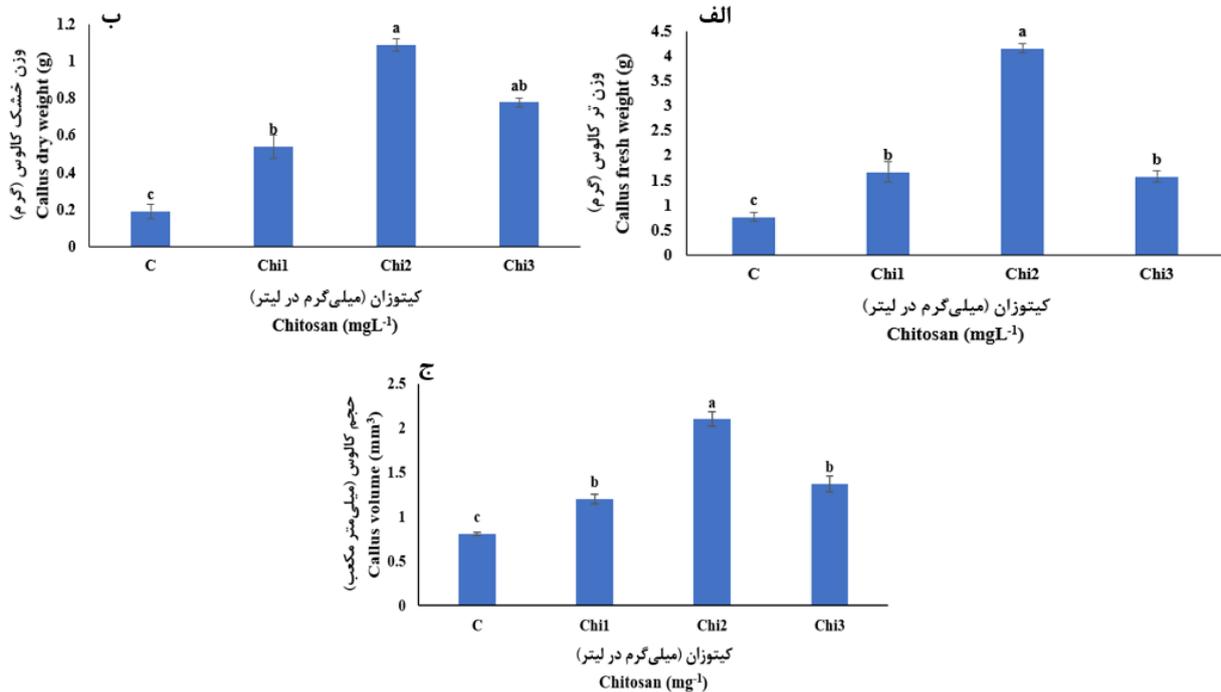
شکل ۳: نمایی شماتیک از کالوس‌های به‌دست آمده روی محیط کشت  $H_1E_1L_1$

بررسی تاثیر الیسیتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس گل راعی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفات وزن تر، خشک و حجم کالوس در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۴: تجزیه واریانس اثر تیمار الیسیتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های کالوس گل راعی

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of square		
		وزن تر کالوس Callus fresh weight (g)	وزن خشک کالوس Callus dry weight (g)	حجم کالوس Callus volume
کیتوزان (C) Chitosan	3	0.7163**	0.04431**	0.8801**
خطا Error	8	0.0211	0.0327	0.0129
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	10.19	27.71	8.28

نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفات در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴). بیشترین وزن تر، خشک و حجم کالوس در تیمار  $Chi_2$  مشاهده شده است. به‌طور کلی، با افزایش غلظت کیتوزان تا حد مشخصی وزن تر، خشک و حجم کالوس نیز افزایش یافته است (شکل ۴).



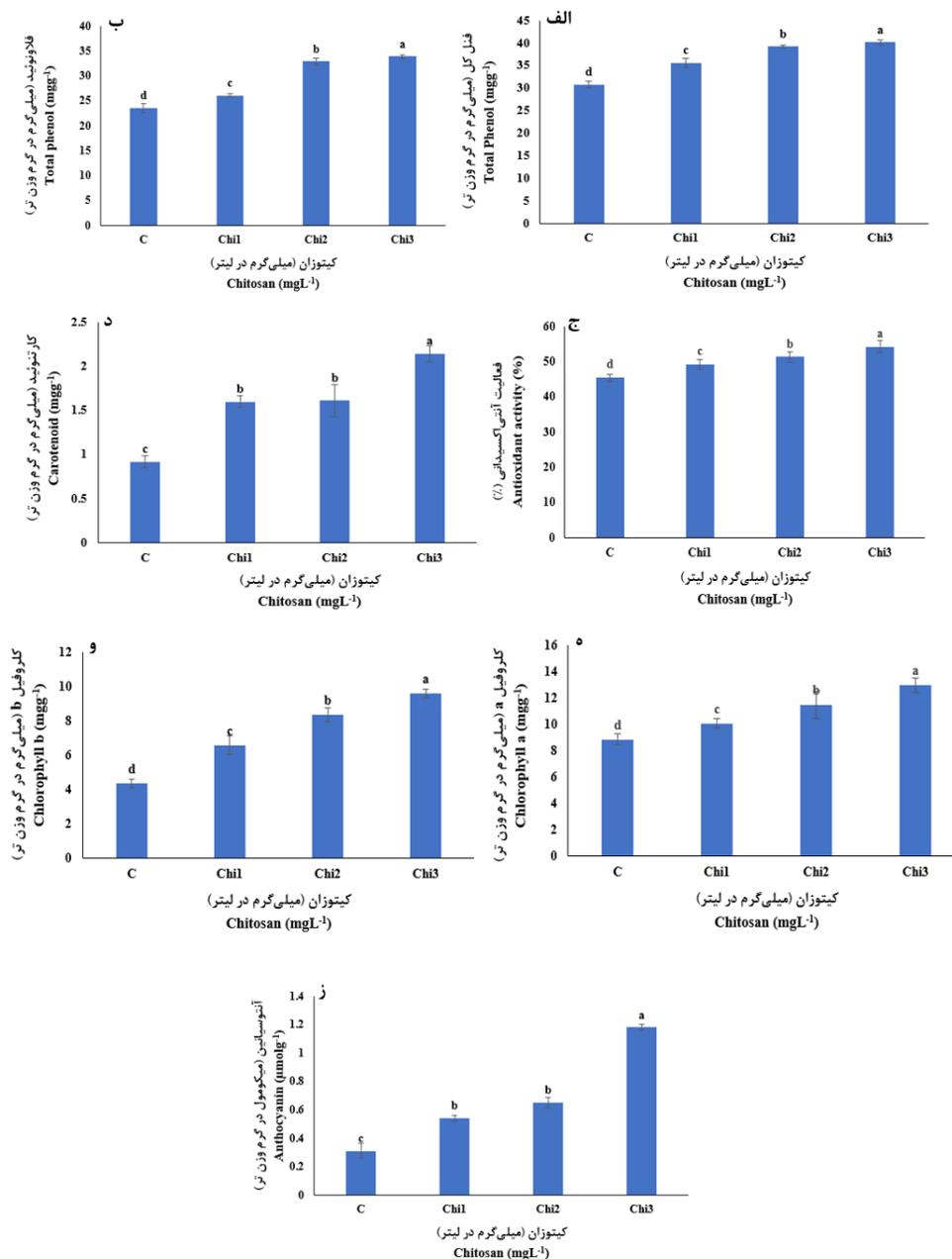
شکل ۴: نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر وزن تر (الف)، خشک (ب) و حجم کالوس (ج) گل راعی: C شاهد، Chi<sub>1</sub>، Chi<sub>2</sub> و Chi<sub>3</sub> به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

### بررسی تاثیر الیسیتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه گل راعی

**فنل کل:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت فنل کل در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴-الف). بالاترین و کم‌ترین فنل کل به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

جدول ۵: تجزیه واریانس اثر تیمار الیسیتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گل راعی

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	Mean of square						
		فلاونوئید کل Total flavonoid	فنل کل Total Phenol	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	C کارتنوئید arotenoid	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	آنتوسیانین Anthocyanin
تیمار Treatment	3	76.65**	53.70**	40.47**	0.7584**	9.4740**	15.6150**	0.4089**
خطا Error	8	0.1096	0.1021	0.1469	0.0075	0.0470	0.3163	0.0074
C.V. (%)	-	1.13	0.87	0.76	5.53	2.00	7.78	12.77



شکل ۵: نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر فنل کل (الف)، فلاونوئید (ب)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ج)، کاروتنوئید (د)، کلروفیل a (ه)، کلروفیل b (و) و آنتوسیانین (ز) گل راعی: C شاهد، Chi1، Chi2 و Chi3 به ترتیب غلظت ۰.۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطی نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

**فلاونوئید کل:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴-ب). بالاترین و کمترین فلاونوئید کل به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

**فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده

افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴-ج). بالاترین و کم‌ترین فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌تی به ترتیب به تیمار ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

**کاروتنوئید:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴-د). بالاترین و کم‌ترین میزان کاروتنوئید به ترتیب به تیمار ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

**آنتوسیانین:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت آنتوسیانین در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۵-الف). بالاترین و کم‌ترین میزان آنتوسیانین به ترتیب به تیمار ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

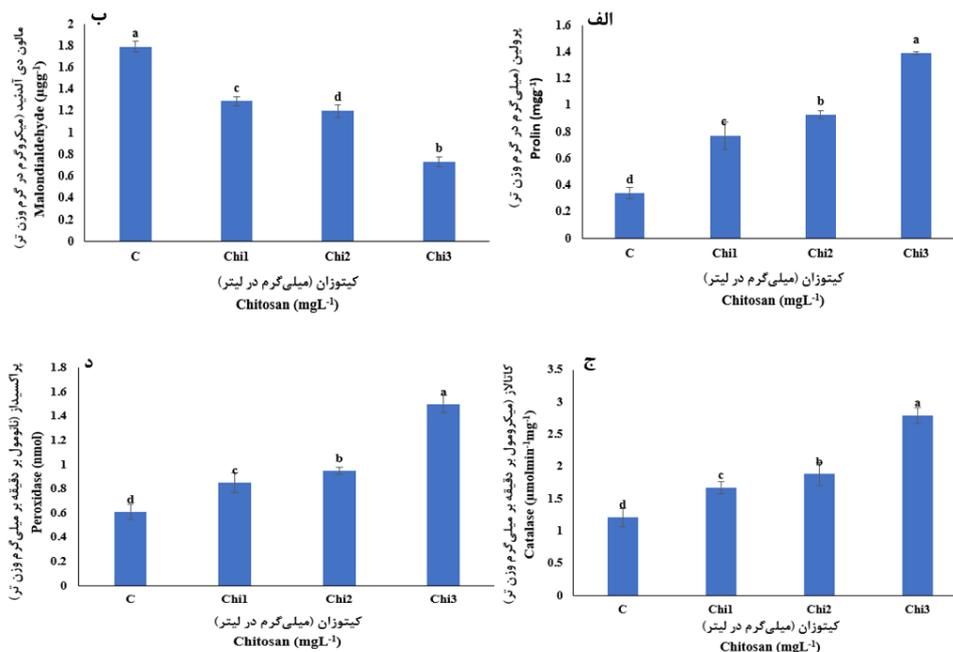
**کلروفیل a و b:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۵) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت کلروفیل a و b در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفات در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۵-ه). بالاترین و کم‌ترین کلروفیل a (شکل ۴-ه) و b (شکل ۴-و) به ترتیب به تیمار ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

#### بررسی تاثیر الیسیاتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گل راعی

**پرولین:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۶) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت میزان پرولین در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۶-الف). بالاترین و کم‌ترین میزان پرولین به ترتیب به تیمار ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت.

جدول ۶: تجزیه واریانس اثر تیمار الیسیاتور کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گل راعی

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	Mean of square			
		پرولین Proline	مالون دی آلدئید Malondialdehyde	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase
Treatment	3	0.5662**	0.5731**	1.3149**	0.4280**
Error	7	0.0066	0.0093	0.0117	0.0021
C.V. (%)	-	9.45	7.66	1.31	4.74



شکل ۶: نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظتهای مختلف کیتوزان بر پرولین (الف)، مالون دی آلدئید (ب)، کاتالاز (ج) و پراکسیداز (د) گل راعی: C شاهد، Chi1، Chi2 و Chi3 به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

### مالون دی آلدئید

در این مطالعه استفاده از کیتوزان منجر به افزایش پایداری غشا و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۶) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر صفت میزان مالون دی آلدئید در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده کاهش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد بود (شکل ۶-ب). بالاترین و کم‌ترین میزان مالون دی آلدئید به ترتیب به تیمار شاهد و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان اختصاص داشت.

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی کاتالاز و پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۶) در این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تاثیر بر فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز (شکل ۶-ج) و پراکسیداز (شکل ۶-د) در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است.

### ۵- بحث

در مطالعه حاضر، در روش سوم ضد عفونی (S<sub>3</sub>) که درصد آلودگی آن صفر بود، قارچ‌کش بنومیل به کار برده شده است. یکی از روش‌های کنترل آلودگی‌ها در کشت بافت گیاهی، استفاده از قارچ‌کش می‌باشد. کاربرد قارچ‌کش‌ها از جمله بنومیل در کاهش آلودگی در شرایط کشت درون شیشه‌ای در گزارشات مختلف گزارش داده شده است (۱۶، ۱۷، ۱۸). نتایج نشان می‌دهد که نوع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی تاثیرگذار است. این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در پتانسیل ژنتیکی، میزان موادمعدنی ذخیره شده و یا پاسخگویی به هورمون‌ها در این دو نوع ریزنمونه باشد (۱۹). هم راستا با این تحقیق، مطالعه‌ای که برای بهینه‌سازی القای کالوس در شاه‌دانه انجام شد، نشان داد که ریزنمونه‌های برگ درصد بالاتری از القای کالوس را نسبت به سایر

انواع ریزنمونه‌ها نشان داده‌اند (۲۰). همچنین تحقیقات مرتبط با ریزازدیادی گیاه نارون نشان داد که درصد القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ بیشتر از ریزنمونه‌های ساقه بوده است (۲۱). مطالعه‌ای دیگری نیز روی القای کالوس و باززایی مستقیم نشان داد که ریزنمونه‌های برگ نسبت به سایر ریزنمونه‌ها درصد بیشتری از کالوس‌زایی داشته‌اند (۱۶). ترکیب مناسب دو هورمون 2-4-D و BAP در غلظت‌های مشخص، می‌تواند به حداکثر شدن درصد کالوس‌زایی کمک کند (۲۲). روشنایی نیز در فرآیند کالوس‌زایی نقش دارد (۲۳). نور می‌تواند بر سنتز کلروفیل، فتوسنتز و تولید ترکیبات فنلی تاثیر بگذارد که همه این عوامل می‌تواند بر رشد و تقسیم سلولی تاثیر بگذارند (۲۴). ترکیب هورمون تاثیر به‌سزایی بر سرعت کالوس‌زایی دارد. برای مثال، نسبت بالاتر سیتوکینین به اکسین در شرایط روشنایی می‌تواند سرعت تقسیم سلولی را افزایش دهد و کالوس‌زایی را تسریع کند (۲۵). شرایط نور و تاریکی نیز می‌تواند بر فعالیت آنزیم‌ها و متابولیت‌های مرتبط با کالوس‌زایی اثر بگذارند (۲۰، ۲۶، ۲۷).

بالا بودن وزن تر و خشک کالوس در تیمار  $E_1H_2L_1$  نشان دهنده این می‌باشد که ترکیبی از این سه عوامل (نوع ریزنمونه، نوع و غلظت هورمون و شرایط نوری) بهینه بوده و باعث بهتر و تولید زیست توده بیشتری در کالوس شده است. افزایش وزن تر و خشک کالوس در تیمارهایی که با کیتوزان تیمار شده‌اند، نشان‌دهنده افزایش تعداد سلول‌ها و بزرگ شدن آن‌ها است. این نشان می‌دهد که برای این گیاه غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از کیتوزان به‌عنوان غلظت بهینه برای تحریک رشد کالوس عمل کرده است. در غلظت‌های بالاتر کیتوزان ( $Chi_3$ )، وزن تر کالوس نسبت به تیمار  $Chi_2$  کاهش یافته است. این نشان می‌دهد که غلظت‌های بسیار بالای کیتوزان ممکن است اثر سمی بر سلول‌های گیاهی داشته باشد و از رشد آن‌ها جلوگیری کند. در مطالعه‌ای روی گیاه دارویی *Catharanthus roseus*، استفاده از غلظت‌های مختلف کیتوزان باعث افزایش قابل توجه وزن تر و خشک کالوس شد (۲۸). افزایش وزن تر و خشک در کشت‌های درون شیشه‌ای در گونه‌های مختلف گیاهی دیگر نیز با کاربرد کیتوزان گزارش شده است که این نتایج همگی در تطابق با نتایج این تحقیق در رابطه با بهبود رشد و افزایش وزن تر و خشک گیاه می‌باشند (۲۹-۳۳). افزایش وزن تر به‌دنبال کاربرد کیتوزان ناشی از توانایی آن در افزایش جذب آب و دسترسی مواد مغذی ضروری و انتقال بهتر این مواد در اندام‌های گیاه می‌باشد (۳۴). در این مطالعه کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ( $Chi_2$ ) سبب افزایش حجم کالوس به‌میزان  $33/83$  درصد سبب در مقایسه با شاهد شد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ( $Chi_2$ ) بیشترین تاثیر را در افزایش حجم کالوس داشته است. بین غلظت‌های ۲۵ و ۷۰ میلی‌گرم در لیتر ( $Chi_3$  و  $Chi_1$ ) تفاوت معنی‌داری در حجم کالوس مشاهده نشد. این نشان می‌دهد که ممکن است در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، اثر تحریکی کیتوزان کاهش یافته یا حتی اثر سمی بر سلول‌ها داشته باشد.

فلاونوئیدها، گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی، دارای عملکردهای فیزیولوژیکی متعددی هستند که از آن جمله می‌توان به محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش، دفاع از بیماری‌زا، جذب حشرات، همزیستی ریزوبیوم، رنگ‌دهی گل و غیره اشاره کرد. الگوی بیان چندین آنزیم کدکننده ژن مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق استفاده از محرک‌های مختلف تعدیل می‌شود (۳۵). کیتوزان به‌طور قابل توجهی ژن‌های متعدد مرتبط با متابولیسم فلاونوئید را تنظیم کرد (۳۶). الیسیاتور کیتوزان تولید فلاونوئید را در گیاهان *Salvia leriifolia*، رازیانه، *Fagonia indica*، *Isatis tinctoria* L. (۳۰، ۳۵، ۳۷، ۳۸) مطابق با این گزارش افزایش داده است. استفاده از کیتوزان به‌عنوان الیسیاتور، فعالیت مسیر فنیل آلانین آمونیاک لیاژ را افزایش داد که به تجمع زیستی ترکیبات فنلی در کشت‌های درون شیشه‌ای گلرنگ کمک کرد (۳۹). در *Carum copticum* نیز الیسیتیشن با کیتوزان منجر به افزایش محتوی فنل تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای شد (۴۰). در تحقیقی Khan و همکاران (۳۰) اثر کیتوزان را روی گیاه *Fagonia indica* بررسی کردند. آنها دریافتند که کیتوزان، محتوای فنل کل را در این گیاه افزایش می‌دهد. افزایش درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتی به‌دنبال اعمال تیمار الیسیاتور کیتوزان به این دلیل است که فنول‌ها و فلاونوئیدها عمدتاً

مسئول پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی گیاه هستند (۴۱) و این افزایش در تحقیقات دیگر روی *Vitis vinifera*، *Fagonia indica*، *Isatis tinctoria* L. هم مشاهده شده است (۳۰، ۳۲، ۳۵، ۴۲). مشابه با تحقیق حاضر، گزارش‌هایی از تاثیر مثبت کیتوزان روی میزان کاروتنوئید با کاربرد کیتوزان در گیاهان دیگر نیز وجود دارد (۳۶، ۴۳-۴۶). اثر مثبت کیتوزان روی محتوی آنتوسیانین در گزارش‌های دیگر هم گزارش شده است. به‌طور مثال محتوی آنتوسیانین با کاربرد کیتوزان در کشت درون شیشه‌ای گیاه *sitiV arefiniv*، *eniveparG*، *L. musobmyroc muiniccaV*، *rewolffaS* افزایش یافته است (۳۹، ۴۲، ۴۷، ۴۸). به‌نظر می‌رسد کیتوزان به‌عنوان یک الیستور، بیان ژن‌ها را در مسیر بیوسنتز کلروفیل فعال و افزایش داده و در نتیجه میزان کلروفیل را افزایش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد که کیتوزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز کلروفیل را با افزایش سطح سیتوکینین داخلی و افزایش دسترسی به ترکیبات آمینه آزاد شده از کیتوزان تحریک می‌کند. همچنین، محلول پاشی کیتوزان باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز می‌شود که SOR را در تیلاکوئیدها از بین می‌برد و تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، ممکن است با سرکوب اتیلن (محرک کلروفیل‌لاز) و افزایش فعالیت کربوکسیلاز روبیسکو، کارایی فتوسنتزی را افزایش دهند که باعث بهبود فعال‌سازی روبیسکو و محتوی کلروفیل می‌شود (۳۶). مطابق با سایر گزارش‌ها، در این تحقیق کیتوزان منجر به افزایش سطح پرولین شد (۴۹، ۵۰). آسیب به غشای سلولی عمدتاً از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشایی ناشی از ROS انجام می‌شود. تاثیر ارزشمند کیتوزان را می‌توان به نقش آن در افزایش پایداری غشا و کاهش سطوح MDA نسبت داد، زیرا گروه‌های آمینه خاص می‌تواند با گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) واکنش داده و رادیکال‌های غیرسمی تولید کند (۵۱، ۵۲). نتایج این تحقیق با نتایج گزارشات دیگر مبنی بر نقش کیتوزان در کاهش محتوی مالون دی‌آلدئید مطابقت داشت (۵۱-۵۳). گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی خاصی را تکامل داده‌اند که شامل آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی است. یک فرآیند کلیدی در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی تبدیل آنزیمی رادیکال‌های آزاد  $O_2$  به  $H_2O_2$  و سم‌زدایی بیشتر توسط کاتالاز و پراکسیداز به  $H_2O$  و  $O_2$  است. تحقیق ما نشان داد که فعالیت‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌طور قابل توجهی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان افزایش یافت (۵۰، ۵۲). بالاترین و کمترین فعالیت کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی از جمله کاتالاز مشابه با تحقیق حاضر در تحقیقات دیگر با کاربرد کیتوزان افزایش یافته است (۵۰، ۵۴، ۵۵).

## ۶- نتیجه‌گیری

در رابطه با روش‌های مختلف ضد عفونی، روش سوم ( $S_3$ ) به‌دلیل کاربرد قارچ‌کش بنومیل کمترین میزان آلودگی را داشت. نتایج نشان داد که تیمار برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D + یک میلی‌گرم در لیتر BAP، روشنایی ( $H_1E_1L_1$ ) بیشترین میزان درصد کالوس‌زایی را دارد، لذا به‌عنوان تیمار بهینه برای اعمال الیستور انتخاب شد. کیتوزان به‌طور گسترده در شرایط درون شیشه‌ای برای افزایش رشد کشت درون شیشه‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است و اکثر مطالعات بهبودهای قابل توجهی را هنگام افزودن این الیستور زیستی به محیط پایه یا جایگزینی تنظیم‌کننده‌های مرسوم رشد گیاه گزارش کردند. علاوه بر این، کیتوزان به‌دلیل ویژگی‌هایی که دارد، به‌عنوان یک ماده زیستی مورد علاقه برای تولید انبوه رویشی گیاهان و افزایش تولید صنعتی ترکیبات فعال زیستی، از طریق روشی اکولوژیکی تر در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه نتایج به‌طور کلی نشان داد که الیستور کیتوزان باعث بهبود ویژگی‌های رشدی، فیزیولوژیکی، متابولیتی و بیوشیمیایی گیاه گل راعی شده و از بین تمامی غلظت‌های به‌کاربرده شده غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آن در بهبود این ویژگی‌ها موثرتر بوده است.

## ۷- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه هرمزگان به‌دلیل حمایت‌های مالی برای انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

## ۸- منابع

1. Oliveira AI, Pinho C, Sarmento B, Dias AC. Neuroprotective activity of *Hypericum perforatum* and its major components. *Frontiers in plant science*. 2016;7:197445.
2. Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2015;2:1-9.
3. Murch SJ, Haq K, Rupasinghe HV, Saxena PK. Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 2003;49(3):251-7.
4. Singh Y, Kumar U, Panigrahi S, Balyan P, Mehla S, Sihag P, et al. Nanoparticles as novel elicitors in plant tissue culture applications: current status and future outlook. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2023:108004.
5. Conrath U. Molecular aspects of defence priming. *Trends in plant science*. 2011;16(10):524-31.
6. Tirillini B, Ricci A, Pintore G, Chessa M, Sighinolfi S. Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium. *Fitoterapia*. 2006;77(3):164-70.
7. Lichtenthaler HK. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*. 148: Elsevier; 1987. p. 350-82.
8. Lin J-Y, Tang C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food chemistry*. 2007;101(1):140-7.
9. Soland S, Laima S. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*. 1999;1:1-5.
10. Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1988;36(6):2090-7.
11. Wagner GJ. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*. 1979;64(1):88-93.
12. Bates LS, Waldren R, Teare I. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*. 1973;39:205-7.
13. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1968;125(1):189-98.
14. Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*: Elsevier; 1974. p. 673-84.
15. Lagrimini LM, Rothstein S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant physiology*. 1987;84(2):438-42.
16. Ahmadi E, Nasr SMH, Jalilvand H, Savadkoobi SK. Contamination control of microbe *Ziziphus spina [christii]* seed in vitro culture. *Trees*. 2012;26:1299-304.
17. Smith RH. *Plant tissue culture: techniques and experiments*: academic press; 2013.
18. Leelavathy S, Sankar PD. Curbing the menace of contamination in plant tissue culture. *Journal of Pure & Applied Microbiology*. 2016;10(3).

19. Mikolajczyk S, Weigt D, Kurasiak-Popowska D, Tomkowiak A, Bazylewska J, Pluta M. Influence of growth regulators and genotype on callus induction from cotyledonary explants of *Camelina sativa* (L.) Crantz. *BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 2015;96(1).
20. Eskandari N, Ebadi A, Salami S. Optimization of Callus Formation In *Cannabis sativa* L. *Cell and Tissue Journal*. 2023;14(4):337-52.
21. Zinhari Z, Pour Seyyedi S, Zolala J. Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. explants. 2016.
22. Rashmi R, Trivedi MP. Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172:2562-70.
23. Ullah MA, Tungmunnithum D, Garros L, Hano C, Abbasi BH. Monochromatic lights-induced trends in antioxidant and antidiabetic polyphenol accumulation in in vitro callus cultures of *Lepidium sativum* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;196:111505.
24. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A. Synthesis of phenolics and flavonoids in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and their effects on photosynthesis rate. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(11):4539-55.
25. Ahmad S, Spoor W. Effect of NAA and BAP on callus culture and plant regeneration in Curly kale (*Brassica oleracea* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)*. 1999;2(1).
26. Adil M, Abbasi BH, ul Haq I. Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. *Biotechnology Reports*. 2019;24:e00380.
27. Rashtbar Astmal F, Haddad R, Garoosi G. Cultivation of anthers of cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.) in a greenhouse for callus induction. *Cell and Tissue Journal*. 2024;15(1):45-57.
28. Pliankong P, Suksa-Ard P, Wannakraioj S. Chitosan elicitation for enhancing of vincristine and vinblastine accumulation in cell culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J Agric Sci*. 2018;10(12):287-93.
29. Ahmad W, Zahir A, Nadeem M, Garros L, Drouet S, Renouard S, et al. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. *Process biochemistry*. 2019;79:155-65.
30. Khan T, Khan T, Hano C, Abbasi BH. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*. 2019;129:525-35.
31. Zhao J-L, Zhou L-G, Wu J-Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87:137-44.
32. Shah M, Jan H, Drouet S, Tungmunnithum D, Shirazi JH, Hano C, et al. Chitosan elicitation impacts flavonolignan biosynthesis in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell suspension and enhances antioxidant and anti-inflammatory activities of cell extracts. *Molecules*. 2021;26(4):791.
33. Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, et al. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2016;127:289-300.

34. Mahdavi B, Modarres Sanavy S, Aghaalikhani M, Sharifi M, Alavi Asl S. Effect of foliar application of chitosan on growth and biochemical characteristics of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under water deficit stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 2014;12(2):229-36.
35. Jiao J, Gai Q-Y, Wang X, Qin Q-P, Wang Z-Y, Liu J, et al. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial crops and products*. 2018;124:28-35.
36. Attaran Dowom S, Karimian Z, Mostafaei Dehnavi M, Samiei L. Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress. *BMC Plant Biology*. 2022;22(1):364.
37. Forouzandeh M, Mohkami Z, Fazelinasab B. Evaluation of biotic elicitors foliar application on functional changes, physiological and biochemical parameters of fennel (*Foeniculum vulgare*). *Journal of Plant Production Research*. 2019;25(4):49-65.
38. Jami S, Esmailzadeh BS, Modarres M. Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. 2018.
39. Golkar P, Taghizadeh M, Yousefian Z. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019;137:575-85.
40. Razavizadeh R, Adabavazeh F, Komatsu S. Chitosan effects on the elevation of essential oils and antioxidant activity of *Carum copticum* L. seedlings and callus cultures under in vitro salt stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2020;29:473-83.
41. Khan MSI, Khatun F, Afrin S, Hoque M. Callus induction and plantlet regeneration in *Chrysanthemum*. *Int J Bus Soc Sci Res*. 2020;8(1):06-10.
42. Cai Z, Kastell A, Mewis I, Knorr D, Smetanska I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2012;108:401-9.
43. Santo Pereira AE, Silva PM, Oliveira JL, Oliveira HC, Fraceto LF. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;150:141-52.
44. Rahman M, Mukta JA, Sabir AA, Gupta DR, Mohi-Ud-Din M, Hasanuzzaman M, et al. Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. *PloS one*. 2018;13(9):e0203769.
45. Dzung NA, Khanh VTP, Dzung TT. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate polymers*. 2011;84(2):751-5.
46. Silva da Rocha A, Rocha EK, Alves LM, Amaral de Moraes B, Carvalho de Castro T, Albarello N, et al. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the in vitro cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). *Journal of plant biochemistry and biotechnology*. 2015;24:105-13.
47. Silva V, Singh RK, Gomes N, Soares BG, Silva A, Falco V, et al. Comparative insight upon chitosan solution and chitosan nanoparticles application on the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of individual grape components of Sousão variety. *Antioxidants*. 2020;9(2):178.
48. Cola G, Cavenago B, Gardana CS, Spinardi A. Effect of Elicitor Treatments on Quality Attributes in Blueberry: Implications of Cultivar and Environmental Conditions. *Plants*. 2024;13(8):1105.

49. Zhang X, Li K, Liu S, Zou P, Xing R, Yu H, et al. Relationship between the degree of polymerization of chitooligomers and their activity affecting the growth of wheat seedlings under salt stress. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017;65(2):501-9.
50. Safikhan S, Khoshbakht K, Chaichi MR, Amini A, Motesharezadeh B. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018;10:49-58.
51. Abdelaal K, Attia KA, Niedbała G, Wojciechowski T, Hafez Y, Alamery S, et al. Mitigation of drought damages by exogenous chitosan and yeast extract with modulating the photosynthetic pigments, antioxidant defense system and improving the productivity of garlic plants. *Horticulturae*. 2021;7(11):510.
52. de Souza Silva PT, de Souza LM, de Moraes MB, de Moraes MM, da Camara CAG, Ulisses C. Effect of biotic elicitors on the physiology, redox system, and secondary metabolite composition of *Lippia alba* cultivated in vitro. *South African Journal of Botany*. 2022;147:415-24.
53. Guan Y-j, Hu J, Wang X-j, Shao C-x. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2009;10:427-33.
54. Kahromi S, Khara J. Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(9):3898-907.
55. Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK. Chitosan nanoparticles and their combination with methyl jasmonate for the elicitation of phenolics and flavonoids in plant cell suspension cultures. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;214:632-41.