



# Increasing the content of flavonoid compounds and changing the antioxidant enzyme activities in chitosan-elicited callus culture of nettle plant

Afsharipour F<sup>a</sup>, Mahmoodnia Meimand M<sup>b\*</sup>, Dahajipour Heidarabadi M<sup>b</sup>, Dehghani MR<sup>b</sup>

<sup>a</sup> M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. Iran

<sup>b</sup> Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. Rafsanjan, Iran

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Afsharipour FMahmoodnia Meimand M, Ph.Db, Maryam Dahajipour Heidarabadi, Ph.Db, Dehghani MR. Increasing the content of flavonoid compounds and changing the antioxidant enzyme activities in chitosan-elicited callus culture of nettle plant. Journal of Cell and Tissue . 2025; 15(4):317-335.

<https://10.61186/JCT.15.4.317>

## KEYWORDS

Elicitor,  
Kaempferol,  
Medicinal plants,  
Phenylalanine ammoniolyase,  
Polyphenol oxidase

## ABSTRACT

**Aim:** The stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is a very important medicinal plant that is used in the treatment of many diseases. Considering the important medicinal properties (flavonoid compounds and antioxidant enzymes) of nettle and the numerous advantages of using elicitors in plant tissue culture to enhance the production of medicinal compounds, this study investigated the effect of different concentrations of the chitosan elicitor on the production of some secondary metabolites and antioxidant enzyme activities in callus suspension culture of nettle.

**Material and methods:** Nettle seeds were cultured in 1/2MS medium after surface sterilization (with 1% sodium hypochlorite and 70% ethanol). leaf explants were isolated from sterile seedling (at the four-leaf stage). The explants were cultured in MS hormone-containing medium (NAA and BA 2.5 and 1 mg L<sup>-1</sup>, respectively) and maintained under light conditions of 16 : 8 (light : darkness) hours at 25 °C. After several stages of subculturing, uniform callus was produced. Eight days after transfer of calli to MS liquid culture medium, calli were treated with chitosan elicitor at concentrations of 0, 50, and 100 mg L<sup>-1</sup>. Calli were sampled at 24, 48, and 120 hours after treatment. Finally, the production of secondary metabolites (quercetin, kaempferol, and rutin) was determined using HPLC and the standard line equation. Also, the activities of antioxidant enzymes (phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and peroxidase) and the total content of phenol, flavonoid and protein were measured and analyzed by spectrophotometry method. The experiment was conducted in completely randomized design with three replications and was analyzed as a split-time statistical design.

**Results:** According to the results of the analysis of variance, the effect of chitosan elicitor concentration, sampling time after elicitor application and the interaction effect of elicitor concentration and sampling time on all measured parameters except for the total flavonoid content (the effect of elicitor concentration was not significant) were significant. The highest phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase enzyme activities were at sampling times

\* Corresponding author. Tel: 09132916898

E-mail address: : m.mahmoodnia@vru.ac.ir

DOI : <https://10.61186/JCT.15.4.317>

Received: 29 May. 2024; Received in revised form: 24 Dec. 2024; Accepted: 7. Jan. 2025

Original Article

© Author



of 120 and 24 hours after elicitor application at 100 mg L<sup>-1</sup> chitosan concentration, respectively. The peroxidase enzyme activity at the sampling time of 120 hours and a concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> of chitosan was 2.57 times that of the control sample. The total protein content decreased at concentrations of 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> chitosan compared with the control. The highest amount of quercetin production was in the treatment of 100 mg L<sup>-1</sup> chitosan and sampling time of 48 hours after elicitor application, which increased 25 times compared with the control. Kaempferol and rutin had the highest production at sampling times of 48 and 24 hours and a concentration of 50 mg L<sup>-1</sup>, respectively, which increased by 72.6 and 51.2 percent compared with the control.

**Conclusion:** Chitosan elicitor is known as a biotic elicitor with a positive effect on medicinal and antioxidant properties in various plants. In this study, chitosan elicitor increased the production of quercetin, kaempferol, and rutin metabolites as well as the activity of antioxidant enzymes in nettle callus culture. So, chitosan elicitor can be introduced as an enhancer of medicinal properties of nettle plant under *in vitro* culture conditions. Obviously, for the commercial production of medicinal compounds, the conditions for large-scale callus production in bioreactors must be optimized.



## افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در کشت کالوس گیاه گزنه تحریک شده با کیتوزان

فاطمه افشاری پور<sup>۱</sup>، محسن محمودنیا میمند<sup>۲\*</sup>، مریم دهجی پور حیدرآبادی<sup>۲</sup>، محمدرضا دهقانی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

<sup>۲</sup> دکتری تخصصی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
الیستور پلی فنل اکسیداز فنیل آلانین - آمونیا لیا ز کامفرول گیاهان دارویی	<b>هدف:</b> در این تحقیق به بررسی اثر غلظت‌های مختلف الیستور کیتوزان و زمان در معرض الیستور بودن بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در کشت کالوس گیاه گزنه پرداخته شد. <b>مواد و روش‌ها:</b> از ریزنمونه برگ گیاهچه استریل در محیط کشت MS هورمون‌دار جهت تولید کالوس استفاده شد. تیمار کالوس‌ها در محیط کشت مایع MS و با استفاده از کیتوزان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد و نمونه‌برداری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت صورت گرفت. در نهایت میزان تولید کوئرستین، کامفرول، روتین، فنل، فلاونوئید و پروتئین کل و همچنین فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و به صورت خرد شده در زمان تحلیل شد. <b>نتایج:</b> فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و پلی فنل اکسیداز در هر سه زمان نمونه‌برداری با افزایش غلظت کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافت. فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان نمونه‌برداری ۱۲۰ ساعت و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، ۲/۵۷ برابر نمونه شاهد بود. بیشترین میزان تولید کوئرستین در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و زمان ۴۸ ساعت و بیشترین میزان تولید کامفرول و روتین به ترتیب در زمان‌های ۴۸ و ۲۴ ساعت و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود. <b>نتیجه‌گیری:</b> الیستور کیتوزان در غلظت‌ها و زمان خاصی باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در کشت کالوس گزنه شد. بنابراین در تحقیقات آتی می‌توان با استفاده از این الیستور و بهینه‌سازی شرایط تولید در مقیاس بالا به سمت تولید تجاری این مواد حرکت کرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶	

### ۱- مقدمه

گیاهان دارویی سرمایه‌های ژنتیکی ارزشمندی از میراث بومی کشورها محسوب می‌شوند و دارای اهمیت جهانی هستند. این گیاهان در طول تاریخ جزء منابع اصلی پزشکی و داروسازی در بیشتر نقاط جهان بوده‌اند. امروزه برای درمان و حفظ سلامتی انسان تاکید زیادی بر استفاده از داروهای با منشأ طبیعی می‌شود (۱). داروهای گیاهی به دلیل نزدیکی و سازگاری با فیزیولوژی بدن انسان در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای خطرات و عوارض جانبی کمتری هستند. این ویژگی یکی از دلایل اصلی رویکرد و تمایل دوباره مردم جهان به استفاده از گیاهان دارویی در قیاس با داروهای شیمیایی و مرکب از مواد مصنوعی شده است (۲).

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۹۱۶۸۹۸

آدرس پست الکترونیک: m.mahmoodnia@vru.ac.ir

امروزه استفاده بی‌رویه از گیاهان دارویی برای مصارف درمانی، این گیاهان ارزشمند را در معرض خطر انقراض قرار داده و از آنجا که اکثر این گیاهان محدودیت وابستگی به شرایط آب و هوایی دارند، استفاده از کشت بافت برای ازدیاد و بالا بردن سطح ترکیبات مؤثره این گیاهان و فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب جهت رشد این گیاهان راه‌حل مناسبی برای برطرف کردن این مشکل می‌باشد. گیاهان، گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که انسان آن‌ها را به‌عنوان ترکیب دارویی، آرایشی، غذایی و ... مصرف می‌کند. طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش بازاریابی جهانی داروهای گیاهی (شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها)، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است. با توجه به این‌که متابولیت‌های ثانویه گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و از طرفی سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می‌باشد، بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله کشت سلولی گیاه، راه جایگزین سودمندی است. دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از محرک‌ها (الیسیتورها) یکی از راه‌کارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند است. الیسیتورها از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های فوق حساسیتی در گیاهان می‌شوند. تشخیص مولکولی و برهمکنش بین الیسیتور و گیرنده‌های گیاه فرایند پیچیده‌ای است که جهت انتقال پیام الیسیتور ضروری است. به‌دنبال درک الیسیتور پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول گیاهی نظیر افزایش جریان‌ات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر، فعال‌سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و سنتز فیتوآلکسین‌ها اتفاق خواهد افتاد (۳).

گیاه گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L. متعلق به جنس گزنه است. گیاهان این جنس یک‌ساله، دو ساله یا چند ساله، علفی تا بوته‌ای، یک پایه یا دو پایه، دارای کرک‌های گزنده می‌باشند (۴). جنس گزنه با یک گونه فراوان یکی از گیاهان ارزشمند دارویی ایران می‌باشد که اغلب در مناطق مرطوب و سایه‌پسند و در خاک‌های غنی از نیتروژن به وفور می‌روید. گونه‌های جنس گزنه دارای تانن، لسیتین، اسید فرمیک، فلاونوئیدها و نوعی گلوکوزید هستند و از سرشاخه‌های این گیاه ماده قرمز رنگی به نام اورتینین استخراج می‌شود. برای گونه‌های جنس گزنه خواص دارویی بسیاری بر می‌شمرند که از جمله کاهش درد نقرس، جلوگیری از ریزش مو، درمان بیماری قند و کم‌خونی را می‌توان نام برد (۵). گزنه به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌کار می‌رود. این گیاه در طب سنتی ایران نیز وجود داشته و جهت درمان بیماری‌های گوارشی، زخم‌های گوارشی و زخم معده به کار رفته، همچنین اثر ضد حساسیتی داشته و باعث کاهش میزان قند خون و فشار خون می‌شود و به‌عنوان یک داروی مدر و قابض مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌دلیل اهمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی در زمینه صنایع غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده، آرایشی و بهداشتی باعث شده که توجه و تحقیق پیرامون این دسته گیاهان از نقطه نظر کشت، تولید و مصرف آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار شود (۶-۹).

فلاونوئیدها گروه متنوعی از ترکیبات پلی‌فنلیک در بین متابولیت‌های ثانویه هستند که در اندام‌های مختلف گیاهان عالی به‌طور طبیعی یافت می‌شوند. امروزه فلاونوئیدها برای ساخت داروهای ضد تومور، ضد باکتری، ضد ویروس، ضد قارچ و آفت‌کش‌ها به‌کار می‌روند. کوئرستین نیز یکی از فلاونوئیدها از دسته فلاونول‌ها است که به‌عنوان معرف در مطالعات فلاونوئیدها کاربرد داشته و نیز یک آنتی‌اکسیدانت محسوب می‌شود (۱۰). کوئرستین به‌دلیل اینکه باعث بهبود عملکرد مویرگی شده و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در مقابل رادیکال آزاد عمل می‌کند، سبب می‌شود که ارزش گیاه دارویی افزایش یابد (۱۱). اصولاً ترکیب‌های کامفرول، کوئرستین و روتین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی به‌کار می‌روند. این ترکیب‌ها رادیکال‌های آزاد در بدن را که باعث سرطان و بیماری‌هایی از قبیل آترواسکلروز می‌شوند، پاک‌سازی نموده و در پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی و عروقی سودمند

هستند (۱۲). اهمیت تغذیه‌ای و درمانی فلاونوئیدها در تحقیقات زیادی به اثبات رسیده است، از طرفی گیاه دارویی گزنه به‌عنوان منبع مناسب فلاونوئیدهای ضد سرطانی کامفرول و کوئرستین است. وقتی گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد به‌منظور حفظ فعالیت متابولیسمی، فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از جمله آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه افزایش می‌یابد. سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان به‌عنوان یک عامل کلیدی در مکانیسم‌های دفاعی در تنش‌های اکسیداتیو مطرح می‌باشد (۱۳) گیاهان دارای مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی که شامل اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی است می‌باشند. اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی متشکل از چند آنتی‌اکسیدانت آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) هستند. آنزیم فنیل آلانین آنونیلیاز (PAL) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها و ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد که نقشی تنظیمی در تولید این ترکیبات دارد (۱۴).

کیتوزان با فرمول شیمیایی  $(C_6H_{11}O_4N)_n$  از پلی‌ساکاریدهای نیتروژن‌دار، از جمله محرک‌های زیستی است که باعث تغییرات مورفوفیزیولوژیکی در گیاهان می‌شود (۱۵). افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، از طریق محرک‌ها در کشت سلولی گیاه، فضای مطالعاتی جدیدی باز کرده است که می‌تواند منافع اقتصادی مهم برای صنایع زیستی داشته باشد که بسیاری از این ترکیبات از ارزش بالای دارویی برخوردارند (۱۶). از آنجا که سنتز شیمیایی این ترکیبات (متابولیت‌های ثانویه)، پیچیده و پرهزینه می‌باشد، استفاده از ایستورهای زیستی برای تحریک افزایش تولید این ترکیبات راه‌حل مناسبی می‌باشد. مطالعات متعددی نشان‌دهنده این هستند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کتین و کیتوزان، باعث تولید متابولیت‌های ثانویه و تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه می‌شود. کیتوزان به‌عنوان یکی از ایستورهای زیستی کارآمد، جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مطرح بوده است (۱۷).

با توجه به مزایای متعدد کشت بافت و اهمیت دارویی گیاه گزنه و اینکه اثر ایستور کیتوزان روی کالوس بسیار کم مطالعه شده و با توجه به خواص دارویی ترکیب‌های فلاونوئیدی کوئرستین، کامفرول و روتین که برای مقابله با ویروس‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شوند، اثر کیتوزان و زمان در معرض بودن با کیتوزان (زمان نمونه‌برداری) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی کالوس گیاه گزنه و برخی متابولیت‌های ثانویه (کوئرستین، کامفرول و روتین) این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. در واقع مسئله اساسی که این پژوهش به دنبال یافتن پاسخی برای آن بود، سنجش میزان تأثیر غلظت‌های مختلف ایستور کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و تولید کوئرستین، کامفرول و روتین در کشت کالوس گیاه دارویی گزنه بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

تولید گیاهچه استریل و القای کالوس: بذری گیاه گزنه با نام علمی *U. dioica* L. از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ترکیبات آلی و معدنی مورد نیاز جهت ساخت محیط کشت شامل نمک‌های عناصر پرمصرف و کم مصرف، ویتامین، آهن، تنظیم‌کننده‌های رشد، ساکارز و آگار از شرکت Merck تهیه شدند. محلول‌های غذایی موراشیگ و اسکوگ (MS) به‌صورت محلول ذخیره تهیه و در یخچال نگه MS. pH محیط کشت‌ها در محدوده ۵/۷ الی ۵/۸ داری شدند. پس از تهیه محیط‌های کشت تنظیم و به‌وسیله اتوکلاو استریل شدند. بذرها به‌مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیس‌انده شدند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفتند. سپس زیر هود با آب مقطر استریل آبکشی، به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور و پس از آن سه بار با آب مقطر استریل هر بار به‌مدت یک دقیقه آبکشی انجام شد. بذری ضد عفونی شده در محیط MS کشت و در اتاقک رشد (شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری  $\frac{1}{2}$  کشت

شدند. پس از چهار هفته ریزنمونه‌هایی از بخش‌های برگ، گره و میانگره گیاهچه‌های استریل تولید شده برش داده شد و جهت القای کالوس در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی (BA ۱ میلی گرم بر لیتر و NAA ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) کشت شد. پس از سه واكشت در محیط کشت هورمون‌دار فوق و هر واكشت به فاصله چهارهفته کالوس یکنواخت تهیه شد. از کالوس‌های ریزنمونه میانگره جهت القای الیسیتور استفاده شد.

**اعمال تیمار و نمونه برداری:** محلول مادری کیتوزان با غلظت یک گرم بر لیتر کیتوزان با استفاده از حلال اسیداستیک یک درصد تهیه شد. کالوس‌های به‌دست آمده در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع هورمون‌دار کشت شدند و در شیکرانکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. بعد از هشت روز، اعمال تیمار در سه سطح از غلظت کیتوزان (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و در سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار صورت گرفت. نمونه‌ها پس از برداشت بلافاصله فریز و تا زمان اندازه‌گیری‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**تهیه عصاره آنزیمی جهت سنجش میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی:** ۰/۲ گرم نمونه منجمد را با استفاده از هاون در بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار ساییده و سپس با سرعت  $9000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی برای سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مورد استفاده قرار گرفت (۱۸).

**اندازه‌گیری میزان پروتئین کل:** سنجش پروتئین تام بر اساس روش برادفورد انجام گرفت. ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Analytic Jena قرائت شد. آلبومین سرم گاو (Bovine Serum Albumin) با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز:** مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، یک میلی‌لیتر بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸، ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (ماکزیمم فعالیت آنزیم) نگهداری و سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف شد. اسید سینامیک (فرآورده آنزیم PAL) موجود، سه بار (هر بار به میزان ۲ میلی‌لیتر) با اتیل استات استخراج و فاز رویی توسط جریان هوای تصفیه شده خشک شد. میزان اسید سینامیک بعد از حل نمودن در NaOH ۰/۰۵ مولار، در طول موج ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد. محلول اسید سینامیک با غلظت ۰ تا ۳۵ میکرومولار برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز:** فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بر اساس روش نیکولای و همکاران (۲۰) با اندکی تغییرات انجام شد. در این واکنش مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار (pH= ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر پیروگالول ۰/۱۲ مولار بود. مخلوط واکنش ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استخراجی به آن اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر بعد از یک دقیقه خوانده شد.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز:** اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم بر اساس روش چانس و ماهلی (۲۱) با اندکی تغییرات انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مخلوط واکنش شامل ۱/۹ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات

۶۰ میلی مولار (pH= ۶/۱)، ۰/۵ میلی لیتر گایاکول ۱۶۸ میلی مولار، ۰/۵ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی مولار و ۰/۱ میلی لیتر عصاره استخراجی بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر بعد از یک دقیقه خوانده شد.

**تهیه عصاره برای اندازه‌گیری فنل کل و فلاونوئید کل:** ابتدا مقدار ۰/۲ گرم نمونه گیاهی را در هاون ساییده به میکروتیوپ منتقل و به آن ۱/۵ میلی لیتر حلال استخراج (متانول: اسید استیک به نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس با سرعت  $9000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و روشناور حاصل برای سنجش فنل کل و فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری میزان فنل کل:** برای اندازه‌گیری میزان فنل کل، به ۰/۵ میلی لیتر عصاره (۱۲۵ میکرولیتر عصاره استخراجی + ۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر) یا استاندارد اسید گالیک، ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتیو رقیق شده با آب مقطر (به نسبت ۱ به ۱۰) اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر خوانده و مقدار فنل کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (۲۲). غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل:** اندازه‌گیری فلاونوئید کل با استفاده از روش کلرید آلومینیم انجام شد (۲۳). مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار، ۰/۱ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراجی یا استاندارد کوئرستین بود. پس از مخلوط کردن، اجزای واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کوئرستین به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

**عصاره‌گیری جهت انجام HPLC** جهت عصاره‌گیری برای انجام HPLC، ۱/۵ گرم کالوس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آن خشک شد سپس با ۲ میلی لیتر محلول متانول و اسید استیک با نسبت ۹ به ۱ در هاون چینی ساییده و همگن شد (۲۴). عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند. پس از آن ۱۵ دقیقه با سرعت  $10000 \times g$  سانتریفیوژ شدند. روشناورهای حاصل جدا شدند و با فیلترهای ۰/۲ میکرون فیلتر شده و برای انجام HPLC مورد استفاده قرار گرفتند.

**تهیه استوک و ساخت سری استانداردها:** از سه متابولیت کوئرستین، کامفرول و روتین استوک‌های یک میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه شد. مواد مورد نظر (متابولیت‌های کوئرستین، کامفرول و روتین) از شرکت سیگما تهیه شدند. استوک‌های تهیه شده در یخچال تا ساخت سری استاندارد و انجام HPLC نگهداری شدند.

سری استاندارد متابولیت‌های کوئرستین و کامفرول با غلظت‌های ۶/۱۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و متابولیت روتین ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از استوک اولیه با متانول ساخته شد. استوک‌ها قبل از انجام HPLC با فیلترهای ۰/۲ میکرون فیلتر شدند. گراف‌های حاصل از دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

**اندازه‌گیری متابولیت‌ها توسط HPLC** از دستگاه HPLC مدل Azura ساخت شرکت Knauer کشور آلمان که آشکارساز آن بر اساس طول موج‌های اشعه ماوراء بنفش و فلورسنت بود، برای اندازه‌گیری کوئرستین، کامفرول و روتین استفاده شد. فاز متحرک به کار رفته شامل متانول: آب: اسید استیک: استونیتریل بود که به نسبت ۴۵:۳۹:۱:۱۵ استفاده گردید (۲۵). فاز ثابت

ستون EuroSpher-100 C18 با قطر ۲/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر بود. طول موج به کار برده شده ۲۵۷ نانومتر بود (۲۵). (۲۶). میزان تزریق دستگاه ۲۰ میکرولیتر بود. سری استاندارد و نمونه‌های عصاره گیاهی توسط اتوسمپلر اتومات دستگاه به آن تزریق گردیدند و زمان گذر ۱۵ دقیقه برای آن‌ها در نظر گرفته شد.

### ۳- آنالیز آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. با مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس (ANOVA)، مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن انجام شد.

### ۴- نتایج

#### اثر غلظت کیتوزان و زمان نمونه‌برداری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

جدول ۱ نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثرات الیستور کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال الیستور بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیاک‌لیاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز را نشان می‌دهد.

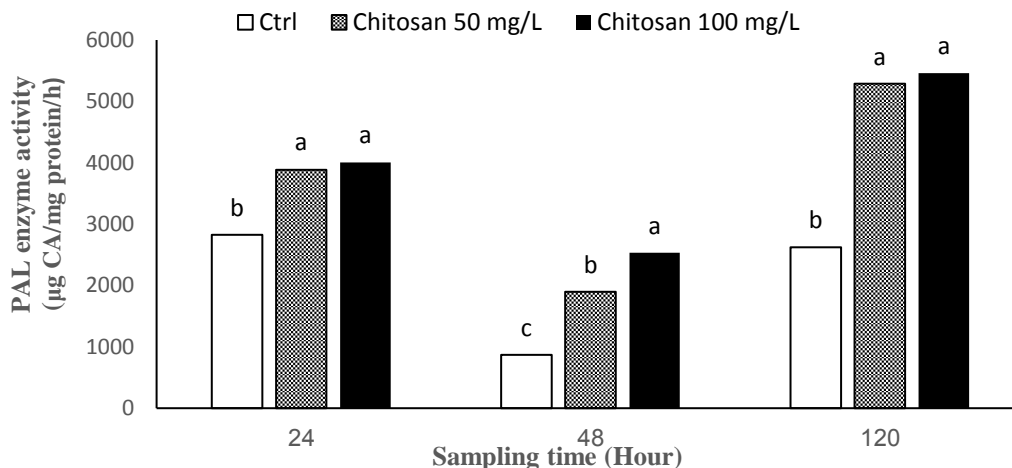
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر کیتوزان و زمان پس از اعمال کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیاک‌لیاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در کشت مایع کالوس گزنه

میانگین مربعات			درجه آزادی	منبع تغییر
پراکسیداز	پلی‌فنل اکسیداز	فنیل‌آلانین آمونیاک‌لیاز		
۵۷۶۲/۷۱۰**	۱/۵۵۳**	۹/۲۹۹**	۲	کیتوزان
۷۳۷/۴۶۰	۷۴۱۵/۱۶۷	۱۴۱۷۸۳/۶۹۰	۶	خطا ۱
۳۰۵۶۴/۹۱۴**	۶۰۰۴۱۲/۳۲۲**	۱/۶۹۳**	۲	زمان
۲۰۶۳۹/۰۴۹**	۲۲۷۶۶۴/۹۰۹**	۸۴۲۰۳۴/۷۰۵**	۴	زمان × کیتوزان
۲۱۲۷/۳۵۳	۱۱۱۰۴/۰۴۳	۸۳۶۴۳/۰۸۴	۱۲	خطا ۲
۸۶/۲	۹۰/۵	۹۱/۳		درصد ضریب تعیین ( $R^2$ )

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

#### میزان تغییر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاک‌لیاز

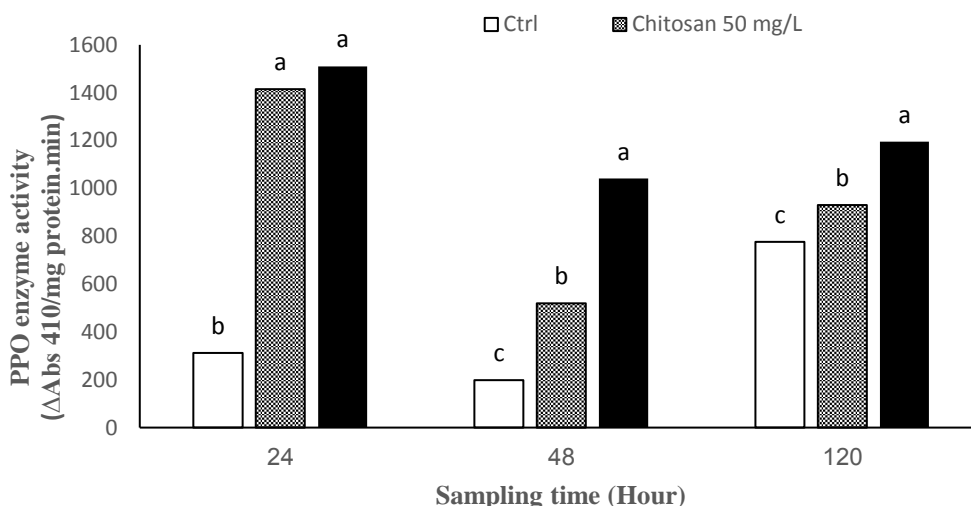
بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثر غلظت الیستور، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان نمونه‌برداری بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاک‌لیاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری شد (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، در زمان ۲۴ و ۱۲۰ ساعت بین شاهد با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌دار بود، اما بین غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در زمان ۴۸ ساعت بین تمامی غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار بود به گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه برداری پس از اعمال کیتوزان بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشتند)

### میزان تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

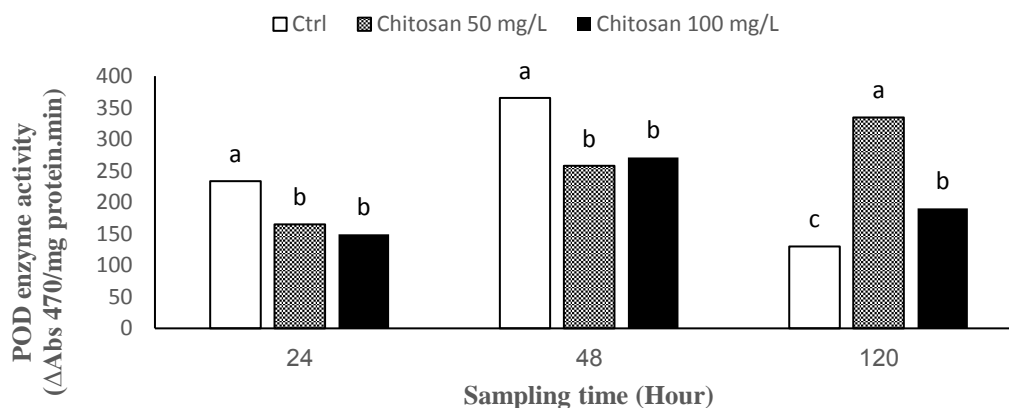
نتایج جدول تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تفاوت معنی داری در سطح احتمال یک درصد در اثر استفاده از کیتوزان و زمان نمونه برداری بر فعالیت این آنزیم نشان داد (جدول ۱). در زمان ۲۴ ساعت بین شاهد با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز وجود داشت؛ اما در همین ساعت بین دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی دار مشاهده نشد. در زمان‌های ۴۸ و ۱۲۰ ساعت بین همه غلظت‌ها تفاوت معنی دار بود به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و سپس غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان اتفاق افتاد (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه برداری پس از اعمال کیتوزان بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشتند)

## میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثر زمان، غلظت الیسیستور کیتوزان و اثر متقابل کیتوزان و زمان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). فعالیت این آنزیم در زمان ۲۴ ساعت در نمونه شاهد نسبت به دو غلظت دیگر تفاوت معنی‌داری داشت به طوری که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در این زمان باعث کاهش فعالیت این آنزیم شدند. در زمان ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد وجود نداشت. در ۱۲۰ ساعت بین همه غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار بود به گونه‌ای که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال کیتوزان بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در کشت مایع کالوس گزنه

(در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند)

اثر غلظت کیتوزان و زمان نمونه‌برداری بر میزان فلاونوئید، فنل و پروتئین کل: جدول ۲ نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر الیسیستور کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال الیسیستور بر میزان فلاونوئید، فنل و پروتئین کل را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به غیر از اثر غلظت کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل (معنی‌دار نشد)، اثر الیستور، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها بر صفات اندازه‌گیری شده، معنی‌دار شد.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر کیتوزان و زمان پس از اعمال کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل، فنل کل و پروتئین کل در کشت مایع کالوس گزنه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فلاونوئید کل	فنل کل	پروتئین کل
کیتوزان	۲	۳۰/۴۲۳ <sup>ns</sup>	۳۶۶۵۰۳/۰۱۹ <sup>**</sup>	۱۶۷۹۱۶/۷۸۴ <sup>**</sup>
خطا ۱	۶	۵۶/۲۵۰	۳۵۱۶/۳۶۰	۵۹۵/۱۸۰
زمان	۲	۱۰۲۰/۸۶۵ <sup>*</sup>	۶۱۵۰۴۶/۹۵۸ <sup>**</sup>	۱۱۵۱۳۰/۹۰۱ <sup>**</sup>
زمان × کیتوزان	۴	۴۴۳/۰۲۱ <sup>*</sup>	۸۰۹۰۷/۴۹۸ <sup>**</sup>	۱۷۲۲۰/۶۹۸ <sup>**</sup>
خطا ۲	۱۲	۱۶۹/۲۸۸	۱۹۲۸/۹۸۸	۵۳۹/۳۸۷
درصد ضریب تعیین (R <sup>2</sup> )		۷۷/۵	۹۱	۹۲

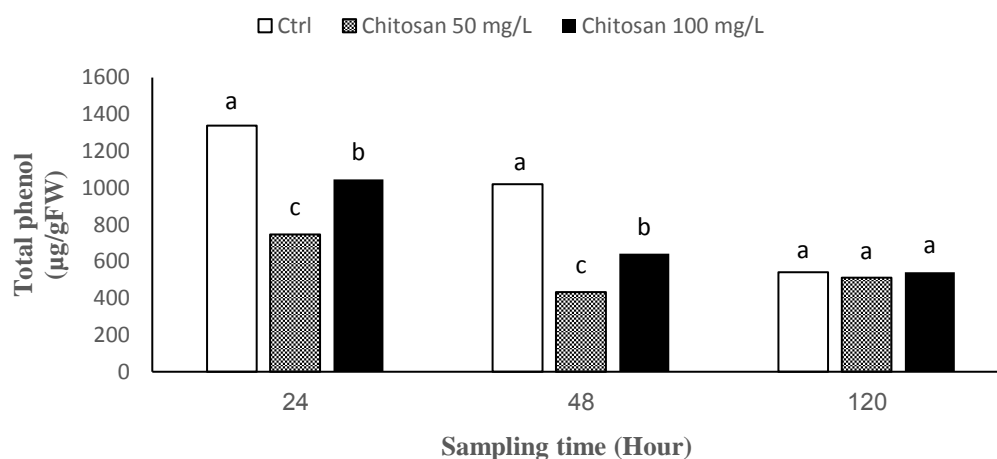
<sup>ns</sup>، \* و \*\* به ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطوح ۰/۰۵ و ۰/۰۱.

### تغییرات محتوای فلاونوئید کل

غلظت کیتوزان بر محتوای فلاونوئید کل اثر معنی داری نداشت اما اثر زمان نمونه برداری و اثر متقابل زمان با کیتوزان با احتمال پنج درصد بر محتوای فلاونوئید کل معنی دار شد (جدول ۲). با توجه به اینکه اثر غلظت کیتوزان بر محتوای فلاونوئید کل معنی دار نشد، نمودار مقایسه میانگین تیمارها ارائه نشد.

### تغییرات محتوای فنل کل

کیتوزان، زمان نمونه برداری و اثر متقابل آن‌ها با احتمال یک درصد بر محتوای فنل کل اثر معنی دار داشتند (جدول ۲). در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بین همه غلظت‌ها نسبت به شاهد تفاوت معنی داری وجود داشت به طوری که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به شاهد در محتوای فنل کل از نظر آماری کاهش داشتند. در زمان ۱۲۰ ساعت بین غلظت‌های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۴).

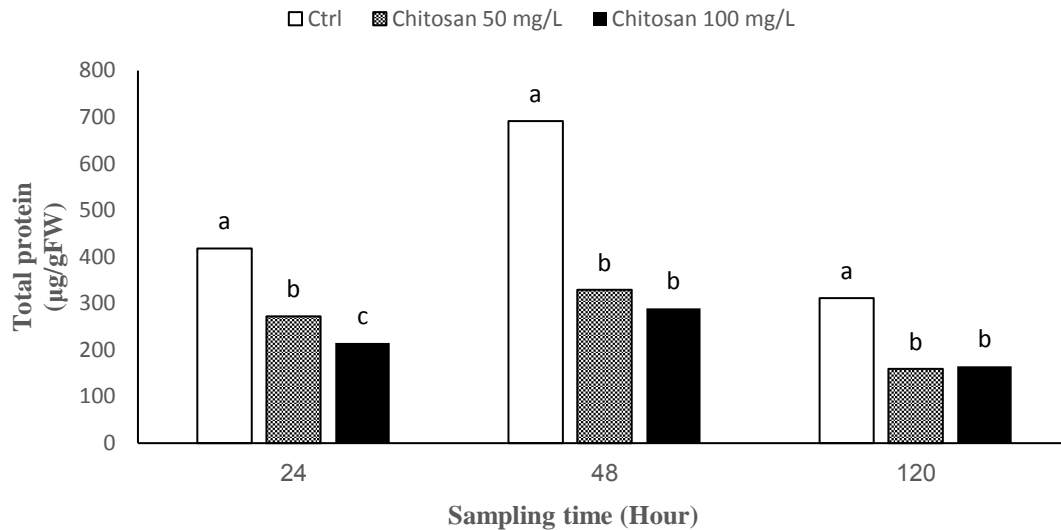


شکل ۴: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه برداری پس از اعمال کیتوزان بر محتوای فنل کل در کشت مایع کالوس گزنه

(در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشتند)

### تغییرات محتوای پروتئین کل

با توجه به جدول ۲ اثر کیتوزان، زمان نمونه برداری و اثر متقابلشان با احتمال یک درصد بر محتوای پروتئین کل معنی دار شد. در زمان ۲۴ ساعت بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی داری وجود دارد به گونه‌ای که محتوای پروتئین کل در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به شاهد کاهش یافت. در زمان‌های ۴۸ و ۱۲۰ ساعت بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی داری وجود نداشت، ولی این غلظت‌ها نسبت به شاهد تفاوت معنی داری داشتند به طوری که محتوای پروتئین کل در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال کیتوزان بر محتوای پروتئین کل در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند)

### میزان تولید متابولیت‌های کوئرستین، کامفرول و روتین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر کیتوزان، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل این دو عامل بر میزان تولید متابولیت‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

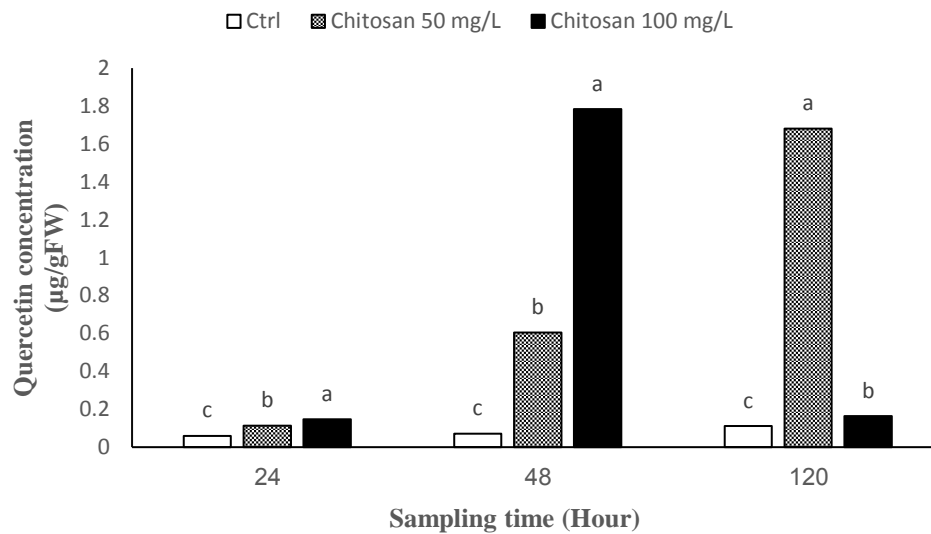
جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس اثر کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال کیتوزان بر تولید متابولیت‌های کوئرستین، کامفرول و روتین در کشت مایع کالوس گزنه

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
روتین	کامفرول	کوئرستین		
۱/۱۶۵**	۰/۱**	۱/۱۴۶**	۲	کیتوزان
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۶	خطا ۱
۴۵۵۹۸۴/۱۹۰**	۰/۱۲۳**	۰/۰۳۰**	۲	زمان
۱/۴۲۴**	۰/۰۴۵**	۱/۱۷۲**	۴	زمان × کیتوزان
۲۲۹۷/۶۵۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱۲	خطا ۲
۹۹/۷	۹۹/۸	۱۰۰		درصد ضریب تعیین (R <sup>2</sup> )

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

### میزان تولید متابولیت کوئرستین

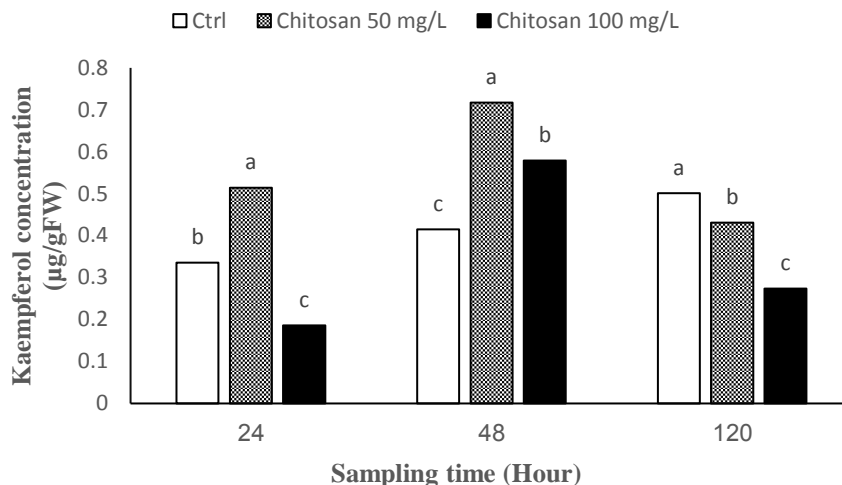
میزان کل تولید متابولیت کوئرستین در زمان نمونه برداری ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد به طوری که بیشترین میزان این متابولیت در زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود که نسبت به شاهد ۲۵/۰۳ برابر بیشتر شد. در زمان ۱۲۰ ساعت میزان این متابولیت در غلظت‌های مختلف کیتوزان نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد به طوری که بیشترین میزان این متابولیت در این زمان مربوط به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود که نسبت به شاهد ۱۰/۵ برابر شد (شکل ۶).



شکل ۶: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه برداری پس از اعمال کیتوزان بر میزان تولید متابولیت کوئرستین در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند)

### میزان کل تولید متابولیت کامفرول

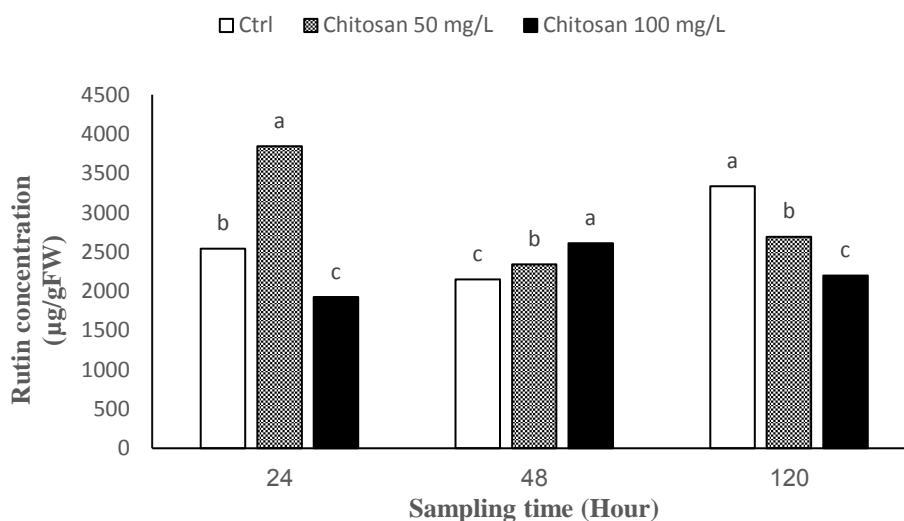
تأثیر زمان نمونه برداری، کیتوزان و اثر متقابل آن‌ها بر تولید متابولیت کامفرول از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در زمان نمونه‌گیری ۲۴ ساعت بیشترین میزان تولید این متابولیت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود اما در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان میزان تولید این متابولیت نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. در ۴۸ ساعت میزان تولید این متابولیت در هر دو غلظت کیتوزان افزایش پیدا کرد به طوری که بیشترین میزان تولید این متابولیت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود که نسبت به شاهد ۱/۷ برابر شد. در زمان نمونه‌گیری ۱۲۰ ساعت میزان تولید این متابولیت در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد به گونه‌ای که کمترین میزان تولید این متابولیت در این زمان مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود (شکل ۷).



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال کیتوزان بر میزان تولید متابولیت کامفرول در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند)

### میزان کل تولید متابولیت روتین

زمان نمونه‌برداری، کیتوزان و اثر متقابل آن‌ها با احتمال یک درصد بر میزان کل تولید متابولیت روتین معنی‌دار بودند (جدول ۳). بیشترین میزان تولید این متابولیت در زمان نمونه‌برداری ۲۴ ساعت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود که نسبت به شاهد ۱/۵ برابر شد، اما میزان تولید این متابولیت در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. در ۴۸ ساعت میزان تولید این متابولیت در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافت به گونه‌ای که بیشترین میزان تولید این ماده در این زمان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود. در زمان نمونه‌گیری ۱۲۰ ساعت میزان تولید این متابولیت در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد به طوری که کمترین میزان تولید این متابولیت در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود (شکل ۸).



شکل ۸: مقایسه میانگین اثر کیتوزان و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال کیتوزان بر میزان تولید متابولیت روتین در کشت مایع کالوس گزنه (در هر زمان تیمارهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند)

## ۵- بحث

نقش کیتوزان در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تحقیقات مختلف گزارش زده است. افزایش در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز تحت تاثیر کیتوزان با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در کشت تعلیقی بادرنجبویه مشاهده شد (۲۷). در پژوهش حاضر نیز فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز تحت تاثیر کیتوزان در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در تمامی زمان‌ها (۲۴، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت) افزایش نشان داد. استفاده از کیتوزان در کشت سلولی گیاه نارگیل فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز را در شروع تیمار به‌طور معنی‌داری افزایش داد. اگر چه این افزایش فعالیت تا روز سوم پس از افزودن کیتوزان ادامه داشت ولی فعالیت آن پس از گذشت پنج روز از آغاز تیمار کاهش نشان داد (۲۸). اما در پژوهش حاضر فعالیت این آنزیم در روز پنجم (۱۲۰ ساعت) پس از اعمال تیمار کاهش نشان نداد. همچنین افزایش فعالیت فنیل‌آلانین آمونیلایز، چهار روز پس از اعمال تیمار کیتوزان در کشت سلولی انگور مشاهده شد (۲۹). افزایش فعالیت این آنزیم یک روز پس از اعمال الیسیستور کیتوزان در کتان سفید مشاهده شد (۳۰). نتایج تحقیقات متعددی افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز را تحت تیمار با محرک‌ها نشان داده است (۳۰ و ۳۱).

الیسیستور کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ریحان شد (۳۲). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در ریشه بادمجان تحت تیمار با محرک کیتوزان افزایش یافته است (۳۳). همچنین غلظت‌های مختلف کیتوزان سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در گیاه بادرنجبویه شد (۳۴). کیتوزان در سطوح مختلف باعث بهبود بخشیدن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی (پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز) در گیاه دارویی زنیان شد (۳۵). نتایج فوق با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین در پژوهشی کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه خار مریم شد (۳۶). در پژوهش حاضر فعالیت این آنزیم در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در زمان ۱۲۰ ساعت نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های آزاد OH و O<sub>2</sub> را از طریق القای آنزیم کاتالاز خنثی کند (۳۷).

نتایج اعمال کیتوزان به‌عنوان الیسیستور روی کتان سفید نشان داد که میزان فلاونوئید و فنل پس از افزودن کیتوزان افزایش معنی‌داری داشت (۳۰). در آزمایشی تاثیر کیتوزان بر محتوای فنل کل در گیاه بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که تیمار کیتوزان باعث افزایش میزان فنل کل در کشت تعلیقی بادرنجبویه شد (۲۷). افزایش سطح کیتوزان باعث افزایش در میزان فنل و فلاونوئید کل در زرین گیاه می‌شود (۱۶). استفاده از کیتوزان باعث افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل در سیاه‌دانه شد (۳۸). همچنین در گیاه نوروزک کیتوزان باعث افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل شد (۳۹). نتایج این آزمایش‌ها با آزمایش حاضر مطابقت ندارد؛ از آن‌جا که در آزمایش حاضر محتوای فنل کل و فلاونوئید کل در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش داشت، احتمال این‌که محتوای فنل کل و فلاونوئید کل در غلظت‌های بیشتر کیتوزان افزایش یابد، وجود دارد. در آزمایشی (۲۷)، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به‌طور معنی‌داری میزان پروتئین کل را نسبت به شاهد در کشت تعلیقی بادرنجبویه افزایش داد، با افزایش غلظت کیتوزان به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش کمتری در میزان پروتئین کل نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آن مشاهده شد. نتایج این آزمایش با آزمایش حاضر مطابقت نداشت. بررسی میزان پروتئین کل در گیاه سیاه‌دانه مشخص کرد استفاده از کیتوزان به‌عنوان الیسیستور باعث افزایش چشمگیر این ماده نسبت به شاهد نشد. همچنین میزان پروتئین کل در دانه گیاه سیاه‌دانه کاهش یافت (۳۸) که با کاهش میزان پروتئین در آزمایش حاضر مطابقت داشت.

تولید ۱۱ متابولیت از جمله کامفرول در کشت کالوس گیاه *Fagonia indica* تیمار شده با کیتوزان و سالیسیلیک اسید نشان داد که تولید کل این متابولیت‌ها در هر دو تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت اما کالوس‌های تیمار شده با کیتوزان سطوح بالاتری از فنل، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها را نشان داد (۴۰). در آزمایشی که از کیتوزان به‌عنوان الیسیتور برای افزایش فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در کشت ریشه موپین گیاه *Isatis tinctoria* L. استفاده شد، نتایج نشان داد کیتوزان با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در زمان‌های ۶ تا ۳۶ ساعت پس از اعمال تیمار، باعث افزایش ۷/۰۸ برابری فلاونوئید کل در مقایسه با شاهد شد علاوه بر این منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی شد همچنین غلظت‌های بالای کیتوزان (۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و زمان‌های طولانی‌تر (۷۲ تا ۹۶ ساعت) قرار گرفتن در معرض کیتوزان تاثیر مطلوبی بر افزایش فلاونوئیدها نداشت. در همین پژوهش تولید ۸ فلاونوئید از جمله کوئرستین، کامفرول و روتین اندازه‌گیری شد، نتایج حاصل حاکی از آن بود که تولید همه فلاونوئیدهای مورد بررسی افزایش یافت، اما تولید فلاونوئیدهای روتین، کوئرستین، ایزورامنتین و ایزولیکوئیریتیزین به طور چشمگیری از سایر فلاونوئیدها در تیمار کیتوزان با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و زمان ۳۶ ساعت بیشتر بود (۴۱). در پژوهشی اثر الیسیتور کیتوزان روی محتوای ترکیبات فنلی که شامل گالیک اسید، کافیک اسید، بنزوئیک اسید، زمارینیک اسید و سینامیک اسید بود را در کشت جوانه انتهایی گیاه نوروک مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد کیتوزان در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم باعث القاء بیشترین محتوی تولید ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی شد (۳۹). بسیاری از تحقیقات گزارش کردند که کیتوزان به‌عنوان الیسیتور می‌تواند تأثیر مثبتی (از طریق القای پاسخ‌های دفاعی) بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف در گیاهان کامل یا کشت‌های آزمایشگاهی گیاهی داشته باشد؛ به‌عنوان مثال: آرتیمیزین در *Artemisia annua* L. (۴۲)، کورکومین در *Curcuma longa* L. (۴۳)، اکیناکوزید در کشت سوسپانسیون سلولی *Scrophularia striata* Boiss (۴۴)، تانن در کشت سوسپانسیون سلولی *Phyllanthus debilis* (۴۵)، ویتانولید در کشت ریشه‌های فرعی *Withania somnifera* L. Dunal (۴۶) و پلمباگین در کشت ریشه‌های فرعی *Plumbago indica* L. (۴۷). در پژوهش حاضر نیز مشخص شد کیتوزان و زمان نمونه‌برداری به طور معنی‌داری باعث افزایش تولید متابولیت‌های کوئرستین، کامفرول و روتین شدند که با پژوهش‌های فوق مطابقت دارد.

کیتوزان به‌دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. علت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط کیتوزان می‌تواند به‌دلیل تعداد زیاد گروه آمین و هیدروکسیل قابل دسترس در ساختار کیتوزان مربوط باشد که با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهند و آن‌ها را خنثی می‌کنند (۴۸). به‌طور کلی، کیتوزان همچنین با تحریک و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و خنثی‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن باعث مقاومت گیاه در مقابل تنش‌ها و تحریک رشد گیاه می‌شود (۴۹).

## ۶- نتیجه‌گیری

در این مقاله به بررسی اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور کیتوزان و زمان در معرض الیسیتور بودن با کیتوزان بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی و تولید متابولیت‌های ثانویه کالوس گیاه گزنه پرداخته شد. نتایج نشان داد که اثر الیسیتور کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانیل آمونیلایز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز با احتمال یک درصد معنی‌دار بود، به‌صورتی که فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانیل آمونیلایز و پلی‌فنل اکسیداز به‌ترتیب در زمان‌های نمونه‌برداری ۱۲۰ و ۲۴ ساعت در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بیشترین مقدار بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان نمونه‌برداری ۱۲۰ ساعت و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، ۲/۵۷ برابر نمونه شاهد (غلظت صفر کیتوزان) بود. اثر کیتوزان بر میزان فلاونوئید کل معنی‌دار نبود و میزان فنل کل (به‌جز

زمان نمونه برداری (۱۲۰ ساعت) و پروتئین کل نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. کیتوزان باعث افزایش تولید متابولیت‌های کوئرستین، کامفرول و روتین شد. بیشترین میزان تولید کوئرستین در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان و زمان نمونه برداری ۴۸ ساعت پس از اعمال ایسیستور بود که نسبت به شاهد ۲۵/۰۳ برابر شد. کامفرول و روتین به ترتیب در زمان‌های نمونه برداری ۴۸ و ۲۴ ساعت و غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان بیشترین میزان تولید را داشتند که به ترتیب ۷۲/۶ و ۵۱/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان ایسیستور کیتوزان را به عنوان محرک خصوصیات دارویی گیاه گزنه در شرایط کشت درون شیشه پیشنهاد داد. بدیهی است جهت تولید اقتصادی این ترکیبات، نیاز به مطالعات در مقیاس بالا در بیوراکتورها و بهینه‌سازی شرایط افزایش ماده زیستی (کالوس) و متابولیت‌های ثانویه در آن می‌باشد.

## ۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان برای حمایت‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

## ۸- منابع

1. Sarin R. Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology*. 2005; 4(2): 79-93.
2. Patel H, Krishnamurthy R. Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013; 2(2): 60-5.
3. Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safai N, Behmanesh M. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. *Iran Journal of Plant Biology*. 2013; 4(11): 13-26. (In Persian)
4. Jani Ghorban M. Flora of Iran No. 36: Dark nettle (Urticaceae). Publications of Iran's Forests and Pastures Research Institute. 2000; 32 p.
5. Austin SB. The paradox of *Urtica dioica* L., stinging nettle: a blessing and a curse. A Publication of the Creation Research Society. 2008; 1-12.
6. Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Press. 1986; 942 p.
7. Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin FJ, et al. Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89(1): 47-53.
8. Bakhshi Khaniki GH, Alinejad M, Kazemi Tabar SK, Hamidi R. An investigation of genetic diversity *Urtica dioica* L. in central area of mazandaran provenience by RAPD marker. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2017; 7(25): 85-90. (In Persian)
9. Zarei A, Selajeh F, Kamalizadeh M. Effect of different plant growth regulators, explant types and light on callogenesis traits of medicinal plant nettle (*Urtica dioica* L.). *Plant Products*. 2020; 43(2): 255-66. (In Persian)
10. Nouri, M. Extraction and identification of quercetin in the leaves of some higher plants using chromatography methods. National Conference of Medicinal Plants, Mazandaran Branch Academic Jihad, March 2018, Sari. (In Persian)
11. Inocencio C, Rivera D, Alcaraz F, Tomás-Barberán FA. Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in mediterranean countries. *European Food Research and Technology*. 2000; 212(1): 70-4.
12. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20(7): 933-56.
13. Neill S, Boini MK, Lodagala SD, Behara RB. The fresh leaves of *Catharantus roseus* Linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. *BMC complementary and alternative medicine*. 2003; 3(4): 1-12.
14. Sharma A, Jha AM, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. *Journal of Botany*. 2012; 26: 1-26.

15. Malekpour F, Salimi A, Ghasemi Pirbaluti A. Effect of chitosan biostimulant on physiological and morphological traits of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) under water stress. *Journal of Plant Ecophysiology*. 2017; 8(27): 56-71.
16. Ayoubi N, Hosseini B, Fatahi M. Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of zarrin-giah (*Dracocephalum kotschy* Boiss). *Cellular and Molecular Research* 2017; 30(1): 1-13. (In Persian)
17. Mehrgan M, Mehrafarin A, Labafi M, Nakhdiabadi HA. Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of Stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Medicinal Plants*. 2017; 16(62): 169-81.
18. Imam Y, Pirasteh Anoushe H. *Field and laboratory methods in agricultural sciences* (1st edition), Mashhad University Press, 2013, 108 p.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-54.
20. Nicoli MC, Elizabel BE, Piotti A, Lericri CR. Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry*. 1991; 15(3): 169-84.
21. Chance B, Maehly AC. The Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 1955; 1: 764-75.
22. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999; 299: 152-78.
23. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10(3): 178-82.
24. Jaimand K, Rezaei M, Ezra M, Tabai Eghdai SR, et al. Extraction and measurement of flavonoid compounds kaempferol and quercetin in the petals of ten genotypes of *Rosa damascena* Mill. from the western regions of Iran. *Research of Medicinal and Aromatic Plants of Iran*. 2010; 25(4): 547-55. (In Persian)
25. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006; 41(3): 714-9.
26. Al-Rifai AA, Aqel A, Awaad A, Alothman ZA. Analysis of quercetin and kaempferol in an alcoholic extract of *Convolvulus pilosellifolius* using HPLC. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2015; 46(11): 1411-8.
27. Mahdavian Fard A, Dahajipour Heidarabadi M, Malekzadeh Kh, Sahafi SR. The effect of chitosan on the amount of phenolic compounds, rosmarinic acid and the expression of key genes of rosmarinic acid biosynthesis in suspension culture of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Cell and Tissue Journal*. 2021; 11(4): 243-63. (In Persian)
28. Chakraborty M, Karun A, Mitra A. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*. 2009; 166(1): 63-71.
29. Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M, Righetti L, et al. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*. 2009; 9(3): 610-24.
30. Nag S, Kumaria S. In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. *Phytochemistry*. 2018; 156: 176-83.
31. Yu XZ, Fan WJ, Lin YJ, Zhang FF, et al. Differential expression of the PAL gene family in rice seedlings exposed to chromium by microarray analysis. *Ecotoxicology*. 2018; 27(3):325-35.
32. Naderi S, Ismailzadeh Bahadi S, Fakheri B. The effect of chitosan on some physiological and biochemical indicators in basil plant (*Ocimum basilicum*). *Plant Process and Function*. 2015; 4(12):29-41. (In Persian)
33. Mandal, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Journal of Biotechnology*. 2010; 9: 8038-47.
34. Khaje H, Naderi S. The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activities and biochemistry characterization in Melissa (*Melissa officinalis*). *Research Journal of Crop Science in Arid Area*. 2014; 1(1): 100-117. (In Persian)
35. Taheri F, Dehmarde M, Salari M, Bagheri R. Evaluate the effect of chitosan on the activities of antioxidant enzymes in Ajwain (*Carum copticum* L.) under drought stress. *Horticultural Sciences of Iran*. 2017; 48(3):575-584. (In Persian)

36. Hassanlou T, Eskandari F, Najafi F. The role of Chitosan (low molecular weight) on elevation of flavonolignans production in *Silybum marianum* hairy root culture. Cell and Tissue Journal. 2016; 6(3): 257-67. (In Persian)
37. Abdallah MMS, Ramadan A, El-Bassiouny HMS, Bakry, BA. Regulation of antioxidant system in wheat cultivars by using chitosan or salicylic acid to improve growth and yield under salinity stress. Asian Journal of Plant Sciences. 2020; 19: 114 -126.
38. Mehdipour F, Saadatmand S, Iranbakhsh A, Nowrozi B, et al. Investigating the effect of chitosan and chitosan nanoparticles on some physiological and phytochemical traits of the medicinal plant *Nigella sativa* L. Ecophytochemistry of Medicinal Plants. 2022; 10(2): 96-113.
39. Jami S, Esmailzadeh Bahadi S, Modares M. The effect of chitosan on microproliferation, the amount of secondary metabolites and the antioxidant activity of Norozak plant in vitro. Plant Researches (Iranian Biology Journal). 2017; 31(3): 568-78. (In Persian)
40. 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.
41. Jiao J, Gai QY, Wang X, Qin QP, 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.
42. Lei C, Ma D, Pu G, Qiu X, et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Industrial Crops and Products. 2011; 33(1): 176-82.
43. Sathiyabama M, Bernstein N, Anusuya S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). Industrial Crops and Products. 2016; 89: 87-94.
44. Kamalipourazad M, Sharifi M, Maivan H Z, Behmanesh M, et al. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. Cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry. 2016; 107: 374-384.
45. Malayaman V, Sisubalan N, Senthilkumar RP, Ranjithkumar R. Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. International Journal of Biological Macromolecules. 2017; 104: 1656-63.
46. Sivanandhan G, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, et al. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Industrial Crops and Products. 2012; 37(1): 124-9.
47. Jaisi A, Panichayupakaranant P. Chitosan elicitation and sequential Diaion HP-20 addition a powerful approach for enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures. Process Biochemistry. 2017; 53: 210-5.
48. Mahdavi B, Rahimi A. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of Ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. Eurasian Journal of Biosciences. 2013; 7: 69 -76.
49. Harish Prashanth KV, Dharmesh KS, Jagannatha R, Tharanathan RN. Free radical -induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrate Research. 2007; 342: 190 -5.