

Evaluation of some secondary metabolites, morphophysiological and biochemical characteristics of *Calendula officinalis* L. under the influence of chitosan elicitor in *in vitro* culture

Mojgan Soleimanizadeh 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

Alireza Yavari 

Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: yavari313@gmail.com

Yoones Mahmoodi

MSc Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: younes_mahmoodi@yahoo.com

Abstract

Objective

Due to its important medicinal metabolites (including calenduloside, quercetin, and others), *Calendula officinalis* L. is considered an excellent source for new drugs. One of the biotechnological tools for enhancing the production of these metabolites is the use of the elicitation process *in vitro* culture. Therefore, the aim of this study was to improve the medicinal metabolites, morphophysiological characteristics, and biochemical properties of this plant under the influence of chitosan elicitor *in vitro* culture.

Materials and methods

In this study, the effects of different seed sterilization methods and seed coating on the germination rate and seed contamination of *Calendula officinalis* L. were evaluated. A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with two factors (sterilization method and seed coating type) and four replications. Then, Low molecular weight chitosan elicitor was prepared in different concentrations (0, 25, 50, and 75 mg/L) and applied to the seeds. Finally, the effects of chitosan on the improvement of morphophysiological, metabolite, and biochemical traits of *Calendula officinalis* L. *in vitro* culture were investigated.

Results

The results of the interaction effect between sterilization method and seed coating showed that treatment S₂C₁ (second sterilization method, place in 10% benomyl fungicide for 5 minutes, place in 70% ethanol for 30 seconds, place in 1% sodium hypochlorite for 15 minutes, combined with no seed coating) had the highest germination percentage (100) compared to other treatments. The results of simple main effect analysis of sterilization methods showed that the highest and lowest contamination rates were related to the first (S₁) and third (S₃) sterilization methods, respectively. The results of the mean comparison indicated a significant increase in the traits of plant height, fresh weight of seedlings, number and length of roots, stem length, and leaf number and width in all chitosan concentrations compared to the control. The highest and lowest amounts of flavonoids, total phenol, antioxidant activity, anthocyanin, carotenoids, chlorophyll a and b, catalase, peroxidase, and proline content were found in the treatment with 50 mg/L chitosan and the control, respectively. The highest and lowest levels of malondialdehyde were observed in the control and 50 mg/L chitosan treatments.

Conclusions

Overall, the results showed that a chitosan concentration of 50 mg/L was more effective in improving the morphophysiological, metabolic, and biochemical traits of *Calendula officinalis* L. *in vitro* culture.

Keywords: Elicitation, Flavonoid, Medicinal Plant, Plant Tissue Culture, Secondary metabolite

Paper Type: Research Paper.

Citation: Soleimanizadeh, M., Yavari, A., & Mahmoodi, Y. (2025). Evaluation of some secondary metabolites, morphophysiological and biochemical characteristics of *Calendula officinalis* L. under the influence of chitosan elicitor in *in vitro* culture. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(2), 1-30.

Agricultural Biotechnology Journal 17(2), 1-30.

DOI: 10.22103/jab.2025.24064.1618

Received: December 9, 2024.

Received in revised form: January 29, 2025.

Accepted: January 30, 2025.

Published online: March 31, 2025.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

The genus *Calendula* includes approximately 25 annual or perennial herbaceous species, with the most common and oldest species being *Calendula officinalis* L. This plant contains numerous phytochemical compounds and various medicinal activities, making it an excellent source for developing new drugs. Some of the most important medicinal components of this plant belong to different classes of chemical compounds, including terpenoids, flavonoids, triterpenoid esters, steroids, phenolic compounds, carotenoids, triterpenoids, essential oils, quinones, fatty acids, minerals, saponins, carbohydrates, sterols, and tocopherols. Due to its richness in these secondary metabolites, the plant exhibits various biological activities, such as anti-inflammatory, anti-diabetic, antioxidant, anticancer, antimicrobial, anti-ulcer, antifungal, antiviral, antithrombogenic, neuroprotective, skin-protective, and anti-fatigue effects. All these properties and secondary metabolites highlight the importance of the *Calendula officinalis* L. plant as a valuable medicinal herb in traditional medicine. The tissue culture technique has been widely used for the rapid production of uniform, disease-free, and high-quality plants on a commercial scale. In vitro culture systems in *Calendula officinalis* L. can propagate this plant through micropropagation, thus serving as an efficient solution for preserving the genetic resources of this valuable plant. Additionally, through in vitro methods such as callus culture, cell suspension culture, and hairy root culture, the continuous supply of bioactive metabolites of this plant can be ensured. Therefore, propagation under in vitro conditions is a crucial step in meeting the demand for such a plant. One of the promising biotechnological tools for enhancing the production of secondary metabolites in plants is the use of the elicitation process in in vitro culture using elicitors. Elicitors are compounds derived from both biotic and abiotic sources that can trigger the plant's response to stress, leading to the intensification of plant secondary metabolite biosynthesis, a process known as "elicitation." Elicitors are classified into two categories based on their origin: biotic elicitors and abiotic elicitors. Abiotic elicitors include physical, chemical, and hormonal factors, while biotic elicitors are substances of biological origin, including polysaccharides and pathogens. The aim of this study is to evaluate the secondary metabolites and morphophysiological characteristics of *Calendula officinalis* L. under the influence of yeast extract, silver nitrate, and chitosan in in vitro culture.

Materials and methods

In this study, the effects of different seed sterilization methods and seed coating on the germination percentage and seed contamination of *Calendula officinalis* L. were evaluated. For this purpose, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with two factors, 4 replications, and 5 seeds per replication. The first factor consisted of three levels of

different disinfection methods, and the second factor involved seed coating at two levels (with and without coating). Additionally, chitosan elicitor with low molecular weight was prepared at various concentrations (0, 25, 50, and 75 mg/l) and added to Murashige and Skoog medium. This experiment was also designed in a completely randomized design with 4 treatments, 3 replications, and 5 seeds per replication. The chitosan powder was initially dissolved in 2% acetic acid, and the required concentrations were prepared from this solution. After approximately one-month, morphological parameters such as seedling height, stem length, root number and length, leaf number and width, and fresh seedling weight were assessed using a caliper, manual counting, and a balance. Furthermore, the effect of the elicitor on other traits such as carotenoids, chlorophyll, total phenol, total flavonoids, antioxidant activity, proline, anthocyanins, malondialdehyde, catalase, and peroxidase was also evaluated. This experiment investigates the effects of various seed disinfection methods and seed coating on germination and early growth of *Calendula officinalis* L., as well as the impact of chitosan elicitor on improving the physiological and biochemical traits of the plant.

Results

The results of the interaction effect between sterilization method and seed coating showed that treatment S₂C₁ (second sterilization method, place in 10% benomyl fungicide for 5 minutes, place in 70% ethanol for 30 seconds, place in 1% sodium hypochlorite for 15 minutes, combined with no seed coating) had the highest germination percentage (100) compared to other treatments. The results of simple main effect analysis of sterilization methods showed that the highest and lowest contamination rates were related to the first (S₁) and third (S₃) sterilization methods, respectively. The results of the mean comparison indicated a significant increase in the traits of plant height, fresh weight of seedlings, number and length of roots, stem length, and leaf number and width in all chitosan concentrations compared to the control. The highest and lowest amounts of flavonoids, total phenol, antioxidant activity, anthocyanin, carotenoids, chlorophyll a and b, catalase, peroxidase, and proline content were found in the treatment with 50 mg/L chitosan and the control, respectively. The highest and lowest levels of malondialdehyde were observed in the control and 50 mg/L chitosan treatments.

Conclusions

Chitosan has been widely used in *in vitro* conditions to enhance growth in tissue cultures and promote the production of secondary metabolites. Most studies have reported significant improvements when this biological elicitor is added to the basal medium or when it replaces conventional plant growth regulators. Due to its unique characteristics, chitosan is also considered

a biocompatible material for mass propagation of plants and increasing the industrial production of bioactive compounds through environmentally friendly methods. In this study, the results generally showed that chitosan improved the growth, physiological, metabolic, and biochemical traits of *Calendula officinalis* L. Among all the concentrations used, the 50 mg/l concentration was found to be the most effective in improving these traits.

Author Contributions

Conceptualization: Soleimanizadeh M, Methodology: Soleimanizadeh M, Software: Soleimanizadeh M, Validation: Soleimanizadeh M, Formal analysis: Soleimanizadeh M, Investigation: Soleimanizadeh M; Resources: Soleimanizadeh M, Data curation: Mahmoodi Y and Yavari A, Writing-original draft preparation: Soleimanizadeh M, Writing-review and editing: Soleimanizadeh M, Visualization: Soleimanizadeh M, Supervision: Soleimanizadeh M, Project administration: Soleimanizadeh M, Funding acquisition: Mahmoodi Y and Yavari A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Not applicable.

Acknowledgements

The authors thank all participants in this study.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Hormozgan, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی برخی متابولیت‌های ثانویه، ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار تحت تاثیر الیسیتور کیتوزان در کشت درون شیشه‌ای

مژگان سلیمانی زاده

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

رایانامه: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

علیرضا یآوری

دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

رایانامه: yavari313@gmail.com

یونس محمودی

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

رایانامه: younes_mahmoodi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۱

چکیده

هدف: به دلیل دارا بودن متابولیت‌های دارویی مهم (از جمله Quercetin, calenduloside و غیره) گل همیشه بهار منبع عالی داروهای جدید محسوب می‌شود. یکی از ابزارهای بیوتکنولوژیکی برای افزایش تولید این متابولیت‌ها، استفاده از فرآیند الیسیتاسیون در کشت درون شیشه‌ای است. لذا هدف از این تحقیق بهبود متابولیت‌های داوریی، ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاه تحت تاثیر الیسیتور کیتوزان در کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تأثیر روش‌های مختلف ضدعفونی و پوشش بذر بر صفات درصد جوانه‌زنی و آلودگی بذور همیشه بهار مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور (نوع روش ضدعفونی و نوع پوشش بذر) و ۴ تکرار انجام شد. سپس الیسیتور کیتوزان با وزن مولکولی پایین با غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر) تهیه و روی بذور مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت تاثیر کیتوزان روی بهبود صفات مورفوفیزیولوژیکی، متابولیتی و بیوشیمیایی همیشه بهار در کشت درون شیشه‌ای بررسی شد.

نتایج: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل روش ضدعفونی و پوشش بذر نشان داد که تیمار S_2C_1 (روش دوم ضدعفونی، قرار دادن در قارچ کش بنومیل ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه، همراه با تیمار بدون پوشش بذر) بیشترین میزان درصد جوانه زنی (۱۰۰) را در مقایسه با سایر تیمارها داشت. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده روش ضدعفونی نشان داد که بیشترین و کمترین میزان درصد آلودگی به ترتیب مربوط به روش اول (S_1) و سوم (S_3) ضدعفونی می باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار صفات ارتفاع، وزن تر گیاهچه، تعداد و طول ریشه، طول ساقه، تعداد و عرض برگ در همه غلظت های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد بود. بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید، فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتوسیانین، کاروتنوئید، کلرفیل a و b، کاتالاز، پراکسیداز و میزان پرولین به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. بیشترین و کمترین میزان مالون دی آلدید به تیمار شاهد و کیتوزان ۵۰ میلی گرم در لیتر تعلق داشت.

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان در بهبود ویژگی های مورفوفیزیولوژیکی، متابولیسی و بیوشیمیایی همیشه بهار در کشت درون شیشه ای موثرتر بوده است.

کلیدواژه ها: متابولیت ثانویه، کشت بافت گیاهی، الیسیتاسیون، گیاه دارویی، فلاونوئید.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: سلیمانی زاده مژگان، یآوری علیرضا، محمودی یونس (۱۴۰۴) ارزیابی برخی متابولیت های ثانویه، ویژگی های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار تحت تاثیر الیسیتور کیتوزان در کشت درون شیشه ای. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۲)، ۳۰-۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

جنس *Calendula* شامل تقریباً ۲۵ گونه علفی یکساله یا چند ساله می باشد که رایج ترین و قدیمی ترین گونه آن گیاه همیشه بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. می باشد (Ramona et al., 2020). این گونه بومی کشورهای مدیترانه ای می باشد و به عنوان یک گیاه زینتی یکساله یا چندساله با ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی متر کشت می شود. گلچه های زرد یا نارنجی رنگ دارد که به عنوان رنگ در تولید مواد غذایی و لوازم آرایشی نیز استفاده می شود (Arora et al., 2013). با این حال، ویژگی های دارویی و پتانسیل درمانی گل ها و برگ های این گیاه توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. این گیاه حاوی انواع مختلفی از مواد

فیتوشیمیایی و خواص دارویی است که آن را به یک منبع ارزشمند برای توسعه داروهای جدید تبدیل می‌کند. این گیاه برای مدت طولانی در طب سنتی برای درمان سوختگی‌های جزئی، زخم‌های گوارشی، مشکلات پوستی، ضعف بینایی، بی‌نظمی‌های قاعدگی، واریس، هموروئید، زخم اثنی عشر و غیره استفاده می‌شده است (Shahane et al., 2023). گیاه همیشه بهار یک گیاه پاک کننده و سم‌زدا است و دم کرده آن عفونت‌های مزمن را درمان می‌کند. داروهای مورد استفاده در حال حاضر شامل تنتور گل همیشه بهار و پماد می‌باشند که هر دو حاوی کارتنوئیدهای مشتق شده از گل‌های همیشه بهار می‌باشند (Arora et al., 2013). برخی از اجزای مهم در فعالیت‌های دارویی این گیاه متعلق به کلاس‌های مختلف ترکیبات شیمیایی، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، استرهای تری ترپنتول، استروئیدها، ترکیبات فنلی، کاروتن‌ها، تری ترپنوئیدها، اسانس‌ها، کینون‌ها، اسیدهای چرب، مواد معدنی، ساپونین‌ها، کربوهیدرات‌ها و توکوفرول‌ها می‌باشند (Rad et al., 2019; Lima et al., 2022; Olennikov & Kashchenko, 2022; Shahane et al., 2023). تمامی این متابولیت‌های ثانویه اهمیت گیاه همیشه بهار را به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی افزایش می‌دهد (Olennikov & Kashchenko, 2022; Shahane et al., 2023). تکنیک کشت بافت به طور گسترده برای تولید سریع گیاهان یکنواخت، عاری از عوامل بیماری‌زا و با کیفیت بالا در مقیاس تجاری استفاده شده است. سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای در گل همیشه بهار می‌توانند این گیاه را از طریق ریزازدیادی تولید کنند و در نتیجه به عنوان یک راه حل کارآمد برای حفظ منابع ژنتیکی این گیاه ارزشمند عمل نمایند (Victório et al., 2012). همچنین از طریق روش‌های کشت درون شیشه‌ای از جمله کشت کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و کشت ریشه‌های موئن می‌توان عرضه مداوم متابولیت‌های زیست فعال این گیاه را فراهم نمود (Leal et al., 2007; Victório et al., 2012). بنابراین، تکثیر تحت شرایط درون شیشه‌ای گام مهمی در تامین تقاضا برای چنین گیاهی خواهد بود. یکی از ابزارهای بیوتکنولوژیکی امیدوار کننده برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده از فرآیند الیسیتاسیون (Elicitation) در کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. الیسیتورها ترکیباتی هستند که از منابع زیستی و غیرزیستی به دست می‌آیند و می‌توانند پاسخ گیاه به تنش را القا کرده و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تقویت کنند (Kohli et al., 2018). بر اساس منشأ، الیسیتورها به دو دسته الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی تقسیم‌بندی می‌شوند. الیسیتورهای غیرزیستی شامل فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و هورمونی می‌باشند. در مقابل الیسیتورهای زیستی موادی با منشأ زیستی (شامل پلی‌ساکاریدها و پاتوژن‌ها) می‌باشند (Ahmed & Baig, 2014; Guru et al., 2022). پلیمر زیستی کیتوزان (CHT) یکی از مشتقات کیتین است که در پوسته بیرونی میگو، صدف، خرچنگ و همچنین دیواره‌های سلولی قارچ وجود دارد (Chakraborty et al., 2020). یافته‌های متعددی در مورد استفاده از کیتوزان برای بهبود و ارتقاء رشد گیاه و بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی، متابولیتی و بیوشیمیایی در محصولات مختلف ثبت شده است (Ait Barka et al., 2004; Chakraborty et al., 2020; Nahar et al., 2012). تحقیقات نشان داده که کیتوزان به فعال کردن آنزیم‌های هیدرولیتیک مورد نیاز برای تجزیه و تجمع مواد غذایی ذخیره شده از جمله نشاسته و پروتئین کمک می‌کند. به عنوان مثال، صفات مورفولوژیکی مانند رشد ساقه، تعداد گره در ریزنمونه، تعداد برگ، رشد ریشه، وزن تر و غیره در هنگام تیمار کشت با کیتوزان در گیاه *Stevia rebaudiana* به طور قابل

توجهی افزایش یافت (Bayraktar et al., 2016). هدف از این بررسی، ارزیابی متابولیت‌های ثانویه، ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار تحت تاثیر کیتوزان در کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تأثیر روش‌های ضدعفونی و پوشش بذر بر جوانه‌زنی و آلودگی بذور: پس از تهیه بذور گیاه همیشه بهار از شرکت پاکان بذر اصفهان، تأثیر روش‌های مختلف ضدعفونی و پوشش بذر بر صفات درصد جوانه‌زنی و آلودگی بذور گیاه همیشه بهار آزمون شد. بدین منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و ۴ تکرار و ۵ بذر در هر تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل روش‌های مختلف ضدعفونی در ۳ سطح و فاکتور دوم شامل پوشش بذر در دو سطح (با پوسته و بدون پوسته) بود. روش‌های ضدعفونی مختلف و نوع پوشش بذر در جدول ۱ نامگذاری شده‌اند.

جدول ۱. نام گذاری روش‌های ضدعفونی مختلف، نوع پوشش بذر و کد گذاری آن‌ها

Table 1. Naming different sterilization methods, types of seed coating, and their coding

روش ضدعفونی/نوع پوشش بذر	کد
Sterilization method/seed coating	Code
خیساندن در آب به مدت دو ساعت، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار ۱۰ دقیقه	S ₁
Soaking in water for two hours, immersing in 70% alcohol for 30 seconds, placing in 1% sodium hypochlorite for 15 minutes, washing three times with sterile distilled water, each time for 10 minutes.	
خیساندن در آب به مدت دو ساعت، قرار دادن در قارچ کش بنومیل ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار ۱۰ دقیقه	S ₂
Soaking in water for two hours, immersing in 10% benomyl fungicide for 5 minutes, immersing in 70% alcohol for 30 seconds, placing in 1% sodium hypochlorite for 15 minutes, washing three times with sterile distilled water, each time for 10 minutes.	
خیساندن در آب به مدت دو ساعت، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه و در نهایت سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار ۱۰ دقیقه	S ₅
Soaking in water for two hours, immersing in 70% ethanol for 30 seconds, placing in 1% sodium hypochlorite for 15 minutes, immersing in 0.1% mercuric chloride for 5 minutes, and finally washing three times with sterile distilled water, each time for 10 minutes.	
بذور بدون پوشش Uncoated seeds	C ₁
بذور با پوشش Coated seeds	C ₂

الیسیتاسیون با کیتوزان: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار و ۵ بذر در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر الیسیتور کیتوزان بود. پودر کیتوزان ابتدا در اسید استیک ۲٪ حل شد و سپس غلظت‌های مدنظر از آن تهیه شد. سپس محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی غلظت‌های مختلف از الیسیتور در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار ضدعفونی شد. پس از پایین آمدن دمای محیط کشت در زیر هود لامینار درون ظروف شیشه‌ای از قبل اتوکلاو شده پخش و پس از سرد شدن کامل محیط کشت در آن‌ها بسته و آماده کشت گردید. نمونه‌های کشت شده سپس در اتاق کشت درون شیشه‌ای در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بررسی تاثیر الیسیتور روی پارامترهای مورفولوژیکی: پس از حدود یک ماه پارامترهای مورفولوژیکی زیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارتفاع گیاهچه: برای اندازه‌گیری این صفت از کولیس استفاده شد.

طول ساقه: برای اندازه‌گیری این صفت از کولیس استفاده شد.

تعداد و طول ریشه: برای اندازه‌گیری این صفات به ترتیب از روش شمارش دستی و کولیس استفاده شد.

تعداد و عرض برگ: برای اندازه‌گیری این صفات به ترتیب از روش شمارش دستی و کولیس استفاده شد.

وزن تر گیاهچه: برای اندازه‌گیری این صفت از ترازو استفاده شد.

بررسی تاثیر الیسیتور روی میزان کاروتنوئید و کلروفیل (کلروفیل a و b): کلروفیل a، b و کاروتنوئید مطابق با روش Lichtenthaler (1987) اندازه‌گیری شدند. مقدار ۲۰۰ میلی گرم از بافت برگ گیاه هدف با ۱۵ میلی لیتر استون ۸۰٪ (حجمی/حجمی) برای استخراج رنگدانه‌های فتوسنتزی مخلوط گردید. برای هر نمونه، میزان جذب در طول موج $646.8/643.2$ و 470 نانومتر با سه تکرار تکنیکال با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. غلظت هر گروه از ترکیبات مطابق با معادلات زیر محاسبه شد و به صورت میلی گرم در گرم وزن تر گزارش شد.

$$\text{Chl a (mg g}^{-1}\text{)} = (12.25 \times A_{663.2}) - (2.79 \times A_{646.8})$$

$$\text{Chl b (mg g}^{-1}\text{)} = (21.51 \times A_{646.8}) - (5.1 \times A_{663.2})$$

$$\text{Chl T (mg g}^{-1}\text{)} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$\text{Car (mg g}^{-1}\text{)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.8 \times \text{Chl A}) - (85.02 \times \text{Chl b})] \div 198$$

بررسی تاثیر الیسیتور روی میزان فنل کل: محتوای فنل کل بر اساس روش Soland & Laima (1999)

اندازه‌گیری شد. میزان ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاه در پنج میلی لیتر اتانول ۹۵٪ (حجمی/حجمی) مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس یک میلی لیتر عصاره با سه میلی لیتر آب مقطر، یک میلی لیتر اتانول ۹۵٪، یک میلی لیتر کربنات سدیم ۵٪ و ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتو (مرک) مخلوط شد. بعد از یک ساعت، جذب هر نمونه

در طول موج ۷۳۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. اسید گالیک (مرک) برای ساخت نمودار استاندارد استفاده شد. نتایج به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر گزارش شد.

بررسی تاثیر الیسیتور روی میزان فلاونوئید: محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم

(AlCl₃) محاسبه شد (Lin & Tang, 2007). مخلوط واکنش (حجم کلی ۱۰ میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر نمونه از عصاره تهیه شده یا استاندارد همراه با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر NaNO₂ (وزنی/حجمی) ۵٪ بود. بعد از پنج و یک دقیقه به ترتیب ۰/۳ میلی‌لیتر AlCl₃ و دو میلی‌لیتر NaOH یک مولار اضافه شد. سپس ۲/۴ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و مخلوط واکنش تکان داده شد. رنگ صورتی حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد و نتایج با به شکل میلی‌گرم کوئرستین در وزن تر نمونه بیان شد.

بررسی تاثیر الیسیتور روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت مهار رادیکال DPPH مطابق با روش Hatano

et al., (1988) 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 به‌مدت 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٪ و بدون DPPH) و B میزان جذب تصحیح شده مخلوط واکنش نمونه (اتانول ۵۰٪ و با DPPH) می‌باشد.

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

بررسی تاثیر الیسیتور روی 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 (1979) تعیین شد. بعد از همگن‌سازی ۵۰ میلی‌گرم بافت برگ در ۵ میلی‌لیتر اتانول اسیدی شده، این محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. عصاره سپس در ۴۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. جذب هر سوپرناتانت در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی $33000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ برای محاسبه آنتوسیانین کل استفاده شد و به شکل میکرومول در گرم وزن تر بیان شد. در معادله زیر A برابر با جذب، b عرض کووت و غلظت مورنظر می‌باشد.

$$A = \epsilon bc$$

بررسی تاثیر الیسیتور روی محتوای مالون دی‌آلدهید: محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA)، به‌عنوان یک شاخص از

پراکسیداسیون لیپیدی، مطابق با روش Heath & Packer (1968) تعیین شد. پس از همگن‌سازی ۰/۲ گرم نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱٪، مخلوط واکنش در ۱۰۰۰۰ g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید

۲۰٪ حاوی تیوباریتوریک اسید ۵/۰٪ و یک میلی لیتر از سوپرناتانت با همدیگر مخلوط شد. مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به سرعت روی یخ خنک شد. مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب سوگرناتانت در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. محتوای MDA با ضریب خاموشی $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و به صورت میکروگرم در گرم وزن تر بیان شد.

بررسی تاثیر الیسیاتور روی میزان پرولین: میزان پرولین با استفاده از واکنش نین هیدرین و بر اساس روش Bates

et al. (1973) تعیین شد. در این روش، عصاره های گیاهی به دست آمده از مخلوط کردن ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید از کاغذ واتمن شماره ۲ عبور داده شد. بعد از عصاره گیری، دو میلی لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر گلاسیال اسید به دو میلی لیتر عصاره فیلتر شده اضافه شد. بعد از حرارت دادن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت و سپس قرار دادن روی یخ، چهار میلی لیتر تولوئن به مخلوط واکنش اضافه شد و میزان جذب آن ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. محتوای پرولین با استفاده از L- پرولین به عنوان منحنی استاندارد تعیین شد.

بررسی تاثیر الیسیاتور روی فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت کاتالاز (CAT) با توجه به تجزیه پراکسید هیدروژن

(H_2O_2) (ضریب خاموشی $39/4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) با استفاده از روش توصیف شده توسط Aebi et al. (1974) در طول موج ۲۴۰ nm انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار، ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترا (H_2O_2) ۳٪ (حجمی/حجمی) بود. فعالیت آنزیم به صورت میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

بررسی تاثیر الیسیاتور روی فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) با به کارگیری روش

Lagrimini & Rothstein (1987) با کمی تغییرات اندازه گیری شد. مخلوط واکنش با کاربرد ۴۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار، pH=۷)، ۲۰ میکرو لیتر گایاکول (۱۰۰ میلی مولار، ۱۰X)، ۲۰ میکرو لیتر عصاره، ۱۰۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر و ۲۰ میکرو لیتر H_2O_2 (۲۷/۵ میلی مولار، ۱۰X) آماده گردید. بعد از ۲۰ ثانیه از دوره انکوبه کردن، میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد و فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول A-ELC (A، جذب، E، ضریب خاموشی $6/39 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، C، غلظت آنزیم، $\text{mgFW}^{-1} \text{ mMmin}^{-1}$ و FW وزن تر نمونه را نشان می دهد) به دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده های آماری: تجزیه و تحلیل داده های آماری در نهایت با استفاده از نرم افزارهای SAS و رسم

نمودارها با استفاده از Excel انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر روش های مختلف ضد عفونی و پوشش بذر بر درصد جوانه زنی بذور گیاه همیشه بهار: نتایج مقایسه

میانگین اثر متقابل روش ضد عفونی و پوشش بذر نشان داد که تیمار S_2C_1 (روش دوم ضد عفونی، قرار دادن در قارچ کش بنومیل

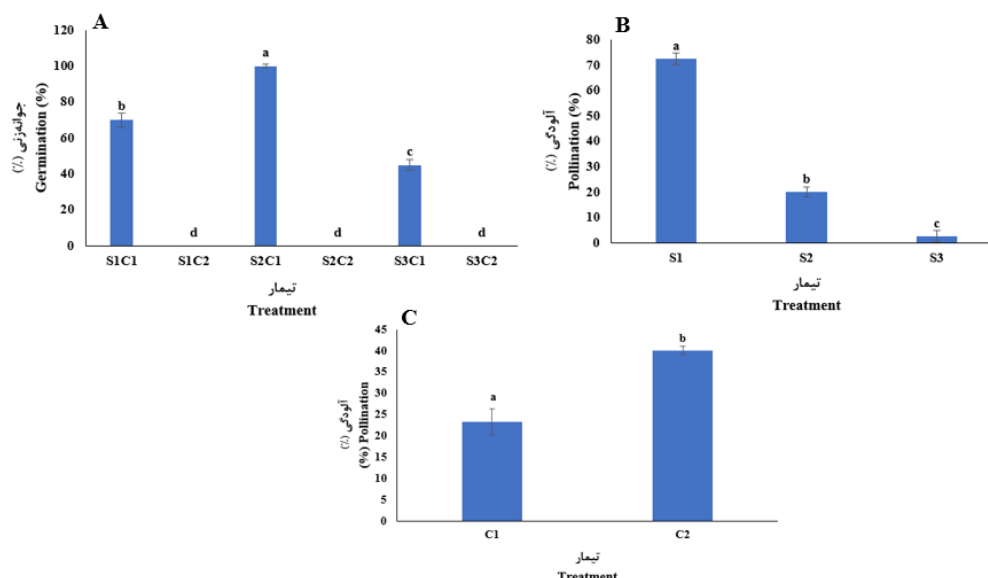
۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه، همراه با تیمار بدون پوشش (بذر) بیشترین میزان درصد جوانه زنی (۱۰۰) را در مقایسه با دیگر تیمارها داشتند (شکل ۱-۱). در واقع پوشش بذر به عنوان مانعی برای جوانه زنی در این گیاه در کشت درون شیشه ای عمل می کند (شکل ۲).

تأثیر روش های مختلف ضد عفونی و پوشش بذر بر درصد آلودگی بذور گیاه همیشه بهار: نتایج مقایسه

میانگین اثر ساده روش ضد عفونی نشان داد که بیشترین میزان درصد آلودگی (۱۰۰٪) مربوط به تیمار اول ضد عفونی (S₁) و کمترین درصد آلودگی (۲/۵٪) مربوط به تیمار سوم ضد عفونی (S₂) می باشد (شکل ۱-۲). در این تحقیق در روش دوم ضد عفونی (S₂) از ترکیب قارچ کش بنومیل ۱۰٪ به مدت ۵ دقیقه استفاده شده که با کاربرد این مواد آلودگی های قارچی کاملاً حذف شد. استفاده از قارچ کش در کشت درون شیشه ای برای ضد عفونی ریزنمونه های گیاهی به عنوان یکی از روش های کنترل آلودگی ها استفاده می شود. این ترکیب می تواند برخی قارچ هایی که بافت گیاهی را تحت تأثیر قرار می دهند را مهار و کنترل کنند (Leelavathy & Sankar, 2016). نشان داده شده است که کاربرد قارچ کش ها از جمله بنومیل می تواند به کنترل آلودگی در شرایط کشت درون شیشه ای کمک نماید (Ahmadi et al., 2012; Smith, 2013). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده پوشش بذر نشان داد که بالاترین (۵۵٪) و کمترین (۴۲٪) میزان درصد آلودگی به ترتیب در استفاده از تیمارهای با پوشش و بدون پوشش بذور بوده است (شکل ۱-۳).

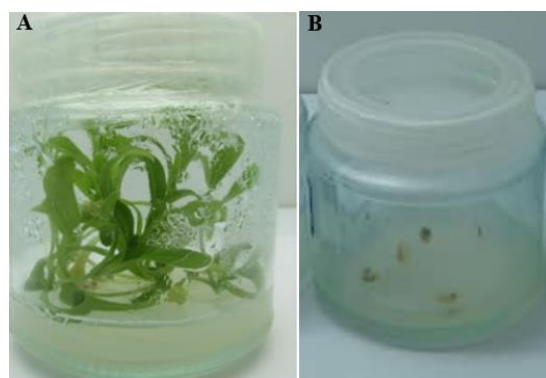
بررسی تأثیر کیتوزان بر ویژگی های مورفولوژیکی گیاه همیشه بهار- ارتفاع گیاهچه: نتایج مقایسه میانگین

نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۳-۱). بیشترین و کمترین ارتفاع گیاهچه به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. همسو با نتایج این تحقیق Rahman et al. (2018) نشان دادند که ارتفاع گیاه با کاربرد کیتوزان افزایش می یابد. همچنین Algam et al. (2010) نشان دادند که پس از ۱ تا ۲ ماه، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده با کیتوزان بیشتر از شاهد بود. گزارش های دیگری نیز نشان داده که با کاربرد کیتوزان ارتفاع گیاه *Iris pseudacorus* در مقایسه با شاهد افزایش می یابد (Van et al., 2013; Hir et al., 2022). اثر کیتوزان (۱۲۰ میلی گرم در لیتر) بر رشد گیاهان به دلیل افزایش جذب آب و عناصر ضروری و کاهش تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی است. دلیل افزایش ارتفاع گیاه به دنبال اعمال کیتوزان، تأثیر آن در تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی، افزایش تثبیت CO₂ و بهبود رشد رویشی گیاه است (Hir et al., 2022). در تحقیق Forouzandeh et al. (2019) دریافتند که اعمال تیمار کیتوزان (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) منجر به افزایش ارتفاع گیاه در مقایسه با شاهد شد. ارتفاع بوته و تعداد ساقه و برگ به دنبال تیمار کیتوزان روی گیاه *Freesia alba* نیز افزایش یافت. کیتوزان ممکن است با افزایش محتوای کلروفیل، ناشی از افزایش جذب مواد مغذی، باعث رشد شود (Salachna & Zawadzinska, 2014).



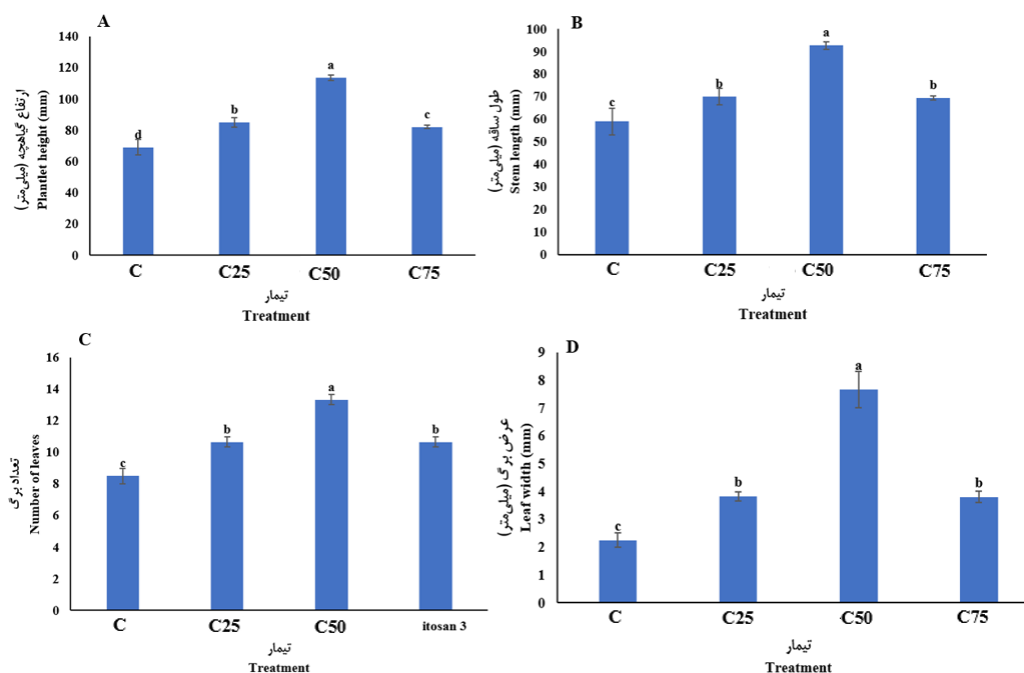
شکل ۱. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل روش ضدعفونی و پوشش بذر بر درصد جوانه‌زنی بذور گیاه همیشه بهار (A)، نتایج مقایسه میانگین اثر ساده روش‌های مختلف ضدعفونی بر درصد آلودگی (B) و نتایج مقایسه میانگین اثر ساده پوشش بذر بر درصد آلودگی بذور گیاه همیشه بهار (C): S₁ روش اول، S₂ روش دوم، S₃ روش سوم ضدعفونی، C₁ و C₂ (بذور با و بدون پوشش). نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 1. The results of the comparison between the average effects of sterilization methods and seed coatings on the germination percentage of *Calendula officinalis* L. seeds (A), the simple effect of different disinfection methods on the percentage of contamination (B) and the simple effect of seed coating on the percentage of contamination of seeds of *Calendula officinalis* L. plant (C): S₁, first method, S₂, second method, S₃, third method of sterilization, C₁ and C₂ (seeds with and without coating). The error bar indicates the standard error



شکل ۲. کشت بذور گیاه همیشه بهار روی محیط کشت MS: بذور بدون پوشش (A)، بذور با پوشش (B)

Figure 2. Cultivation of *Calendula officinalis* L. seeds on MS medium: uncoated seeds (A), coated seeds (B)



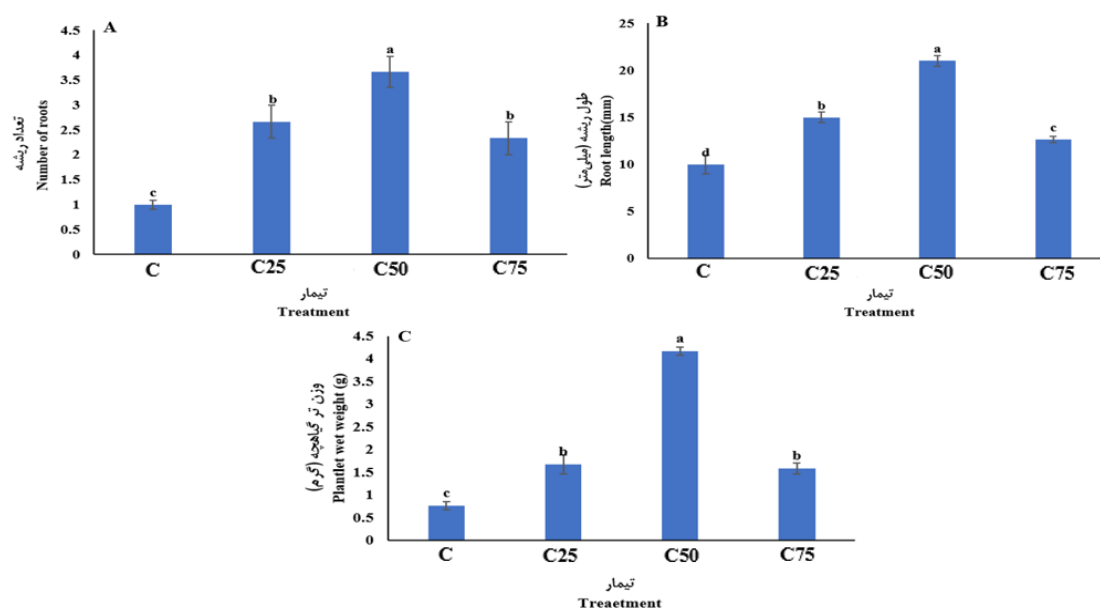
شکل ۳. نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر ارتفاع گیاهچه (A)، طول ساقه (B)، تعداد (C) و عرض برگ (D) همیشه بهار: C شاهد، C₂₅، C₅₀ و C₇₅ به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 3. The results of the mean comparison of the effects of different chitosan concentrations on seedling height (A), stem length (B), number (C) and leaf width (D) of *Calendula officinalis* L.: C, control C₅₀, C₇₅ and C₇₅ respectively at concentrations of 25, 50 and 75 mg per liter of chitosan. The average of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. The error bar indicates the standard error

طول ساقه: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۳-B). بیشترین و کمترین طول ساقه به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. اثر مثبت کیتوزان بر رشد ساقه در شرایط درون شیشه‌ای همسو با نتایج این تحقیق در گیاهان دیگر آشکار شده است (Nahar et al., 2012; Bayraktar et al., 2016; Chourykaew & Sreenamkhum, 2018). کیتوزان دارای پتانسیل بسیار زیادی برای افزایش لیگنینی شدن دیواره سلولی و بیوستز لیگنین در گیاهان است که در نتیجه با رشد بهتر ساقه و افزایش تجمع زیست توده همراه است (Bayraktar et al., 2016; Guru et al., 2022).

تعداد برگ: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۳-۱). بیشترین و کمترین تعداد برگ به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. همسو با نتایج این تحقیق مطالعات دیگر نیز افزایش تعداد برگ را با اعمال تیمار کیتوزان در گیاهان *Ipomoea purpurea* (Acemi et al., 2018)، *Stevia rebaudiana* (Bayraktar et al., 2016) و *Cattleya maxima* (Coelho & Romano, 2022; Paris et al., 2019) نشان داده اند.

عرض برگ: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۳-۲). بیشترین و کمترین عرض برگ به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. در واقع افزودن کیتوزان به محیط کشت، عرض برگ را در این آزمایش افزایش داد. افزایش عرض برگ روی محیط کشت حاوی کیتوزان در گیاه *Cattleya maxima* نشان داده شده است (Paris et al., 2019). این نتایج در آزمایشات دیگر روی گیاه *Rhynchostylis gigantea* هم گزارش شده که مطابق با نتایج تحقیق حاضر است (Obsuwan et al., 2010).



شکل ۴. نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر تعداد ریشه (A)، طول ریشه (B) و وزن تر گیاهچه (C) همیشه بهار: C شاهد، C₂₅، C₅₀ و C₇₅ به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خط نشان دهنده خطای استاندارد است

Figure 4. The results of the mean comparison of the effects of different chitosan concentrations on root number (A), root length (B) and seedling fresh weight (C) of *Calendula officinalis* L.: C, control C₅₀, C₇₅ and C₇₅ respectively at concentrations of 25, 50 and 75 mg/liter, respectively. The average of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. Error bar indicates standard error

تعداد و طول ریشه: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفات در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه

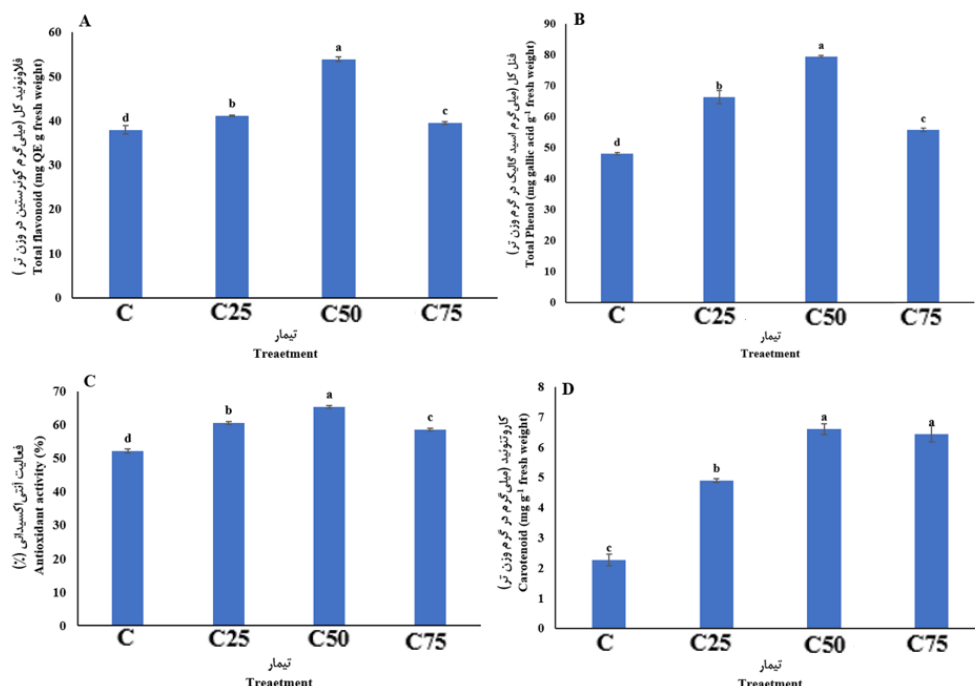
با نمونه شاهد است (شکل ۴-A). بیشترین و کمترین تعداد شکل ۴-A و طول ریشه (شکل ۴-B) به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. افزایش پارامترهای ریشه از جمله تعداد و طول ریشه به دلیل افزودن کیتوزان به محیط کشت در گیاهان دیگر از جمله *Dendrobium* (Obsuwan) *Rhynchostylis gigantea* (Tantasawat et al., 2010)، *Cattleya maxima* (et al., 2010) و (Paris et al., 2019) مشاهده شده است. کیتوزان ممکن است رشد ریشه را از طریق مسیرهای سیگنالی که منجر به بیوسنتز اکسین می شود، تنظیم کند و تقسیم سلول‌های ریشه را تقویت کند (Chakraborty et al., 2020; Malekpoor et al., 2017).

وزن تر گیاهچه: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با

نمونه شاهد است (شکل ۴-C). بیشترین و کمترین وزن تر گیاهچه به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان (۴/۱۶ گرم) و شاهد (۰/۷۶ گرم) اختصاص داشت. نورافکن در سال ۲۰۱۹ نشان داد که با اعمال تیمار کیتوزان، وزن تر گیاه در مقایسه با شاهد افزایش می یابد (Nourafcan, 2019). همچنین Veraplakorn et al. (2021) نشان دادند که تیمار کیتوزان می تواند منجر به افزایش وزن تر در گیاه شود. افزایش وزن تر 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 گیاه می باشند (Zhao et al., 2021; Shah et al., 2019; Khan et al., 2019; Ahmad et al., 2016; Bayraktar et al., 2010). افزایش وزن تر به دنبال کاربرد کیتوزان ناشی از توانایی آن در افزایش جذب آب و دسترسی مواد مغذی ضروری و انتقال بهتر این مواد در اندام‌های گیاه می باشد (Mahdavi et al., 2014).

بررسی تاثیر کیتوزان بر بهبود نسبی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه همیشه بهار-فلاونوئید

کل: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۴-B). بیشترین و کمترین فلاونوئید کل به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. کیتوزان به طور قابل توجهی ژن‌های متعدد مرتبط با متابولیسم فلاونوئید را تنظیم کرد (Attaran Dowom et al., 2022). فعال سازی رونویسی ژن‌های چالکون سنتاز و فلاونوئید هیدروکسیلاز در کشت درون شیشه‌ای القا شده توسط کیتوزان یکی از دلایل افزایش تولید فلاونوئیدها می باشد (Guru et al., 2022; Jiao et al., 2018). کیتوزان (غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر) تولید فلاونوئید را در گیاهان *Salvia leriifolia*، رازیانه، *Fagonia indica*، *Isatis tinctoria* L. (Jami et al., 2018; Jiao et al., 2018) افزایش داده است. (Forouzandeh et al., 2019; Khan et al., 2019).



شکل ۵. نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظتهای مختلف کیتوزان بر فلاونوئید (A)، فنل کل (B) فعالیت آنتی اکسیدانی (C) و کاروتنوئید (D) همیشه بهار: C شاهد، C₂₅، C₅₀ و C₇₅ به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر کیتوزان. نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است

Figure 5. Comparison results of the average effect of different concentrations of chitosan on flavonoid (A), total phenol (B), antioxidant activity (C) and carotenoid (D) of *Calendula officinalis* L: C, control C₅₀, C₇₅ and C₇₅ respectively at concentrations of 25, 50 and 75 mg, respectively. per liter of chitosan. The error bar indicates the standard error

فنل کل: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظتهای کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۵-B). بیشترین و کمترین فنل کل به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. ترکیبات فنلی گیاهی به دلیل پتانسیل فوق العاده ای که در دفاع در برابر حملات بیماری زا دارند، به عنوان مولکول های سیگنال دهی و تنظیم کننده فرآیندهای بیوشیمیایی حیاتی از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی، یکی از مهمترین متابولیت های ثانویه هستند. نتایج این تحقیق همسو با نتایج Silva et al. (2020) می باشد که در آن پس از الیسیتیشن با کیتوزان افزایش میزان فنل، آنتوسیانین و تانن در گیاه انگور انجام شده است. علاوه بر این، استفاده از کیتوزان به عنوان الیسیتور، فعالیت مسیر فنیل آلانین آمونیاک لیاژ را افزایش داد که به تجمع زیستی ترکیبات فنلی در کشت های درون شیشه ای گلرنگ کمک کرد (Golkar et al., 2019). در *Carum copticum* نیز الیسیتیشن با کیتوزان منجر به افزایش محتوای فنل تحت شرایط کشت درون شیشه ای شد (Razavizadeh et al., 2020). در تحقیقی Khan et al. (2019) اثر کیتوزان را روی گیاه *Fagonia indica* بررسی کردند. آن ها دریافتند که

کیتوزان، محتوای فنل کل را در این گیاه افزایش می‌دهد. در گزارشی (Forouzandeh et al., 2019) همچنین مشاهده کردند که با افزایش کیتوزان، محتوای فنل و فلاونوئید کل رازیانه افزایش یافت. نتایج تحقیق حاضر با تمامی این نتایج مطابقت داشت.

فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در

مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۵-C). بیشترین و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. افزایش درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌دنبال اعمال تیمار الیسی‌تور کیتوزان به این دلیل است که فنول‌ها و فلاونوئیدها عمدتاً مسئول پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاه هستند (Khan et al., 2020) و این افزایش در تحقیقات دیگر روی *Vitis* Cai et al., 2012; Jiao et al., 2018; هم مشاهده شده است. گیاهان با استفاده از مواد شیمیایی گیاهی که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، رادیکال‌های آزاد تولیدشده در فرآیندهای زیستی خود را خنثی کرده و تعادل سلولی را حفظ می‌کنند. از کلاس‌های اصلی این ترکیبات که به‌عنوان مولکول‌های مهار کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند، ترکیبات فنلی هستند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، DPPH، به‌عنوان یک رادیکال آزاد، به‌طور معمول استفاده می‌شود، و سپس نمونه برای بررسی درصد حذف رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار می‌گیرد (Fazal et al., 2016; Khan et al., 2019).

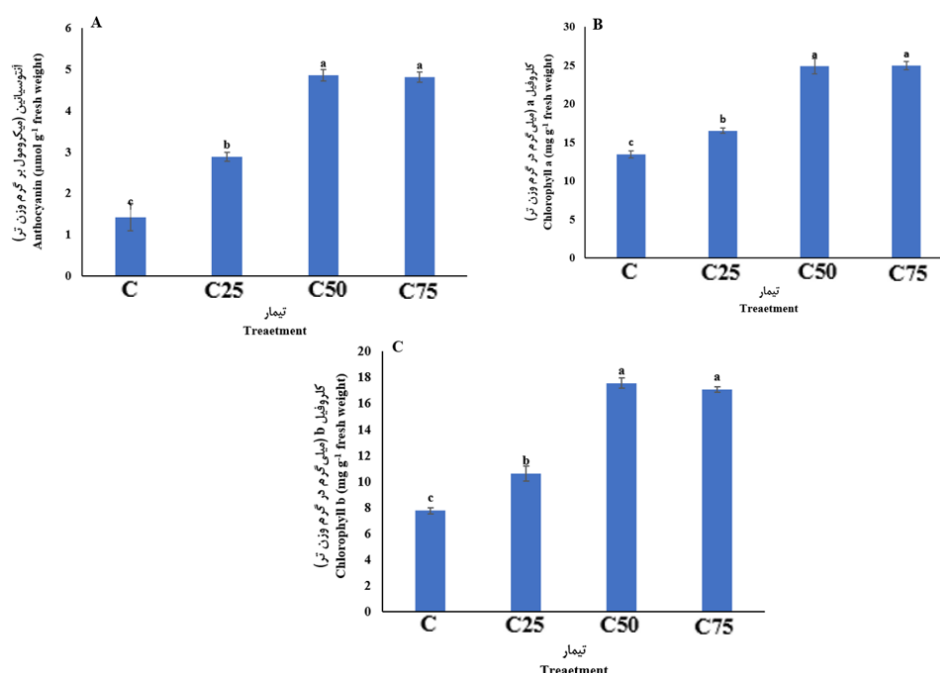
کاروتنوئید: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه

شاهد است (شکل ۵-D). بیشترین و کمترین میزان کاروتنوئید به‌ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. مشابه با تحقیق حاضر، گزارش‌هایی از تأثیر مثبت کیتوزان روی میزان کاروتنوئید با کاربرد کیتوزان در گیاهان دیگر نیز وجود دارد (Attaran Dowom et al., 2022; Dzung et al., 2011; Rahman et al., 2018; Santo Pereira et al., 2015; Silva da Rocha et al., 2017). کاروتنوئیدها رنگدانه‌های تتراترپنوئیدی زرد تا قرمز نارنجی هستند که در برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های غیر فتوسنتزی و در همه موجودات فتوسنتزی پخش می‌شوند. کاروتنوئیدها ترکیبات ارزشمندی هستند که عملکردهای زیادی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و غذایی دارند. این رنگدانه‌ها از دیرباز به‌عنوان رنگ‌های خوراکی مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند و به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، طیف وسیعی از عملکردها را در مورد سلامت انسان از جمله پیشگیری از بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان دارند (Silva da Rocha et al., 2015).

آنتوسیانین: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه

شاهد است (شکل ۶-A). بیشترین و کمترین میزان آنتوسیانین به‌ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. اثر مثبت کیتوزان روی محتوای آنتوسیانین در گزارشات دیگر هم گزارش شده است. به‌طور مثال محتوای آنتوسیانین با کاربرد کیتوزان در کشت درون شیشه‌ای گیاه *Vitis vinifera*,

Cai et al., 2012; Golkar et al.,) افزایش یافته است (*Carthamus tinctorius* L., *Vaccinium corymbosum* L.
(2019; Silva et al., 2020; Cola et al., 2024



شکل ۶. نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر آنتوسیانین (A)، کلروفیل a (B) و کلروفیل b (C) همیشه بهار: شاهد، C₂₅، C₅₀ و C₇₅ به ترتیب غلظت ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر کیتوزان. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است

Figure 6. Comparison results of the average effect of different concentrations of chitosan on anthocyanin (A), chlorophyll a (B) and chlorophyll b (C) of *Calendula officinalis* L.: C, control C₅₀, C₇₅ and C₇₅ respectively with concentrations of 25, 50 and 75 mg per liter of chitosan, respectively. The average of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. The error bar indicates the standard error

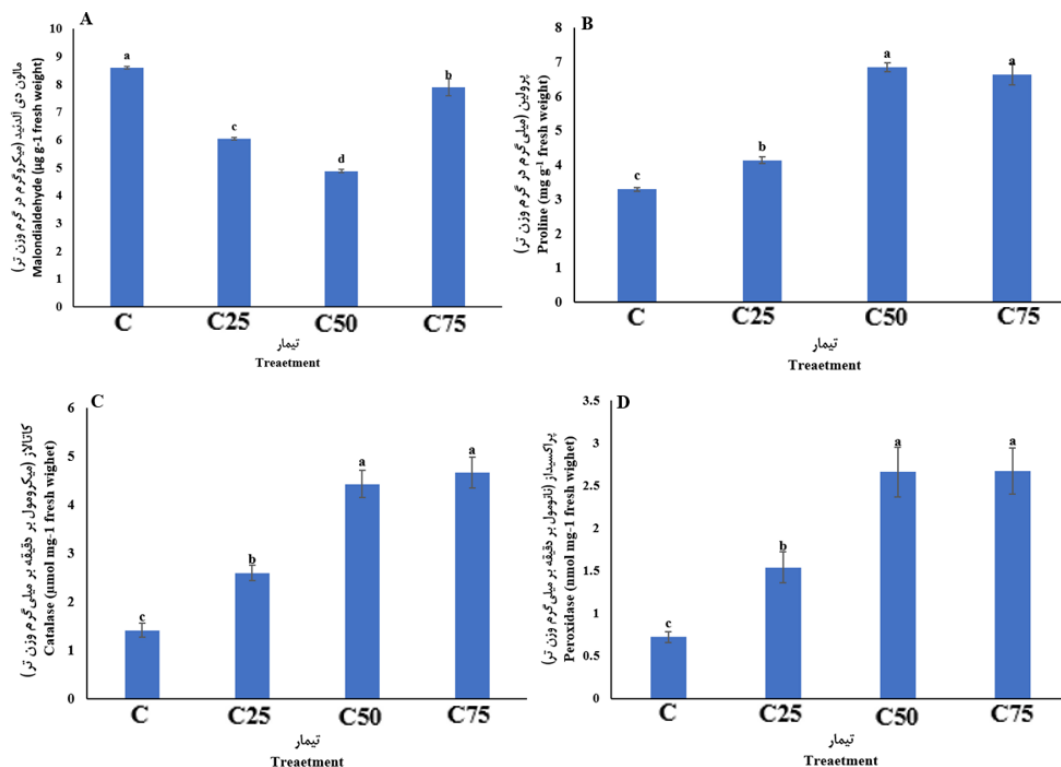
کلروفیل a و b: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفات در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۶-B). بیشترین و کمترین کلروفیل a (شکل ۶-B) و b (شکل ۶-C) به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. تفاوت معنی داری بین غلظت ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر مشاهده نشد. گزارشات نشان داده که کیتوزان به طور قابل توجهی خواص بیوفیزیکی مانند دریافت مواد مغذی و نرخ خالص فتوسنتز را افزایش دادند که به ارتقای رشد نهال قهوه کمک کرد. با بهبود شاخص فتوسنتز با افزایش عملکرد روزنه و محتوای کلروفیل، عملکرد محصول را به طور قابل توجهی

افزایش داد (Dzung et al., 2002). در تحقیقی اثر کیتوزان بر گیاه *Iris seudacorus* بررسی شد. محققان گزارش کردند که کیتوزان مقدار رنگدانه‌های کلروفیل را افزایش می‌دهد (Hir et al., 2022). این افزایش محتوای کلروفیل در گزارشات دیگر هم نشان داده شده است (Coelho & Romano, 2022; Santo Pereira et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zou et al., 2015). این نتایج با مطالعه حاضر در مورد افزایش میزان کلروفیل گیاه با افزایش غلظت کیتوزان مطابقت دارد. به نظر می‌رسد کیتوزان به عنوان یک الیستور، بیان ژن‌ها را در مسیر بیوسنتز کلروفیل فعال و افزایش داده و در نتیجه میزان کلروفیل را افزایش می‌دهد. به نظر 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 (۹۰ میلی گرم در لیتر) باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز می‌شود که ROS 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 فعال سازی روبیسکو و محتوای کلروفیل می‌شود (Attaran Dowom et al., 2022).

بررسی تاثیر کیتوزان بر بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار-مالون دی‌آلدئید: در این مطالعه استفاده از کیتوزان منجر به افزایش پایداری غشا و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شد. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده کاهش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد بود (شکل ۷-A). بیشترین و کمترین میزان مالون دی‌آلدئید به ترتیب به تیمار شاهد و ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان اختصاص داشت. آسیب به غشای سلولی عمدتاً از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشایی ناشی از ROS انجام می‌شود. تأثیر ارزشمند کیتوزان را می‌توان به نقش آن در افزایش پایداری غشاء و کاهش سطوح MDA نسبت داد، زیرا گروه‌های آمینه خاص می‌تواند با ROS واکنش داده و رادیکال‌های غیرسمی تولید کند (Abdelaal et al., 2021; de Souza Silva et al., 2022). نتایج این تحقیق با نتایج گزارشات دیگر مبنی بر نقش کیتوزان در کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید مطابقت داشت (Abdelaal et al., 2021; de Souza Silva et al., 2022; Guan et al., 2009).

پروکلین: نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی دار این صفت در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است (شکل ۷-B). بیشترین و کمترین میزان پروکلین به ترتیب به تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. تفاوت معنی داری بین غلظت ۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر مشاهده نشد. علاوه بر نقش اسمولیت، پروکلین به حذف ROS، تثبیت ساختارهای درون سلولی، تامین انرژی و غیره کمک نموده و به عنوان یک چاپرون مولکولی برای تثبیت ساختار پروتئین عمل می‌کند. پروکلین ترجیحاً در برگ‌ها انباشته می‌شود تا سطح کلروفیل را حفظ کند تا از فعالیت فتوسنتزی محافظت کند (Zhang et al., 2018; Safikhan et al., 2017). همچنین در تنظیم عملکرد میتوکندری‌ها، محافظت از کلروپلاست‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو نقش اصلی را ایفا می‌کند. افزایش محتوای پروکلین در پاسخ به تیمار با کیتوزان به نقش چندجانبه این آمینواسید در مکانیسم‌های

دفاعی و سازگاری گیاهان مرتبط است. کیتوزان می‌تواند با ایجاد شرایط تنش‌زا از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی، واکنش‌های تنش‌زا را تحریک کند (Abdelaal et al., 2021). افزایش میزان پرولین در پاسخ به کیتوزان در گزارشات دیگر هم نشان داده شده است (Zhang et al., 2017; Safikhan et al., 2018).



شکل ۷. نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مالون دی‌آلدهید (A)، پرولین (B)، کاتالاز (C) و پراکسیداز (D) همیشه بهار: C شاهد، C₂₅، C₅₀ و C₇₅ به ترتیب غلظت 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

Figure 7. Comparison results of the average effect of different concentrations of chitosan on anthocyanin (A), chlorophyll a (B) and chlorophyll b (C) of *Calendula officinalis* L.: C, control C₅₀, C₇₅ and C₇₅ respectively with concentrations of 25, 50 and 75 mg per liter of chitosan, respectively. The average of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. The error bar indicates the standard error

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز: گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی خاصی را تکامل داده‌اند که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی است. یک فرآیند کلیدی در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی تبدیل آنزیمی رادیکال‌های آزاد O₂ به H₂O₂ و سم‌زدایی بیشتر توسط کاتالاز و پراکسیداز به H₂O و O₂ است (de Souza Silva et al., 2022;)

(Safikhan et al., 2018). تحقیق ما نشان داد که فعالیت‌های CAT و POD به‌طور قابل‌توجهی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان افزایش یافت. نتایج مقایسه میانگین نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز (شکل ۷-C) و پراکسیداز (شکل ۷-D) در همه غلظت‌های کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد است. بیشترین و کمترین فعالیت کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و شاهد اختصاص داشت. تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز مشابه با تحقیق حاضر در تحقیقات دیگر با کاربرد کیتوزان افزایش یافته است (Arya et al., 2022; Kahromi & Khara, 2021; Safikhan et al., 2018).

نتیجه‌گیری: 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 قابل‌توجهی را هنگام افزودن این الیسیتور زیستی به محیط پایه یا جایگزینی تنظیم‌کننده‌های مرسوم رشد گیاه گزارش کردند. کیتوزان همچنین به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود، به‌عنوان یک ماده زیست‌سازگار برای تکثیر انبوه گیاهان و افزایش تولید صنعتی ترکیبات زیست‌فعال از طریق روش‌های سازگارتر با محیط‌زیست در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه نتایج به‌طور کلی نشان داد که کیتوزان باعث بهبود ویژگی‌های رشدی، فیزیولوژیکی، متابولیتی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار شده و از بین تمامی غلظت‌های به‌کاربرده شده غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آن در بهبود این ویژگی‌ها موثرتر بوده است.

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

References

- Abdelaal, K., Attia, K. A., Niedbała, G., Wojciechowski, T., Hafez, Y., Alamery, S., Alateeq, T. K., & Arafa, S. A. (2021). 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*, 7(11), 510. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110510>
- Acemi, A., Bayrak, B., Çakır, M., Demiryürek, E., Gün, E., Eddine El Gueddari, N., & Özen, F. (2018). Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from nodal explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 537-544. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9915-0>
- Aebi, H. (1974). Catalase, Methods of enzymatic analysis. Elsevier, pp. 673-684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Ahmad, W., Zahir, A., Nadeem, M., Garros, L., Drouet, S., Renouard, S., Doussot, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Enhanced production of lignans and

- neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. *Process biochemistry*, 79, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.025>
- Ahmadi, E., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Savadkoobi, S. K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed *in vitro* culture. *Trees*, 26, 1299-1304. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8>
- Ahmed, S. A., & Baig, M. M. V. (2014). Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 499-504. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.12.008>
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22, 608-614. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0733-3>
- Algam, S., Xie, G., Li, B., Yu, S., Su, T., & Larsen, J. (2010). Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. *Journal of plant Pathology*, 593-600. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.549>
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 179. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120520>
- Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Lenka, S. K. (2022). 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*, 214, 632-641. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.145>
- Attaran Dowom, S., Karimian, Z., Mostafaei Dehnavi, M., & Samiei, L. (2022). Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress. *BMC Plant Biology*, 22(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03689-4>
- Bates, L. S., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bayraktar, M., Naziri, E., Akgun, I. H., Karabey, F., Ilhan, E., Akyol, B., Bedir, E., & Gurel, A. (2016). Elicitor induced stevioside production, *in vitro* shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127, 289-300. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1049-7>
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108, 401-409. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0051-3>

- Chakraborty, M., Hasanuzzaman, M., Rahman, M., Khan, M. A. R., Bhowmik, P., Mahmud, N. U., Tanveer, M., & Islam, T. (2020). Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture*, 10(12), 624.
- Chourykar, B, Sreenamkhum O (2018) Effect of Chitosan on Growth of *In vitro* Seedling Culture of *Dendrobium lindleyi* Steud. *Bur Sci J*, 669-681. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
- Coelho, N., & Romano, A. (2022). Impact of chitosan on plant tissue culture: recent applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148(1), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02156-6>
- Cola G, Cavenago B, Gardana CS, et al. (2024) Effect of Elicitor Treatments on Quality Attributes in Blueberry: Implications of Cultivar and Environmental Conditions. *Plants* 13, 1105. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02156-6>
- de Souza Silva, P. T., de Souza, L. M., de Moraes, M. B., de Moraes, M. M., da Camara, C. A. G., & Ulisses, C. (2022). Effect of biotic elicitors on the physiology, redox system, and secondary metabolite composition of *Lippia alba* cultivated *in vitro*. *South African Journal of Botany*, 147, 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.042>
- Dzung, N. A., Khanh, V. T. P., & Dzung, T. T. (2011). Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate polymers*, 84(2), 751-755. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.066>
- Dzung, N. A., Thang, N. T., Suchiva, V., Chandkrachang, S., Methacanon, P., & Peter, M. (2002). Effect of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation on the growth of soybean. *Advances of Chitin Science*, 5, 463-467.
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., & Ali, M. (2016). Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180, 1076-1092. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2153-1>
- Forouzandeh, M., Mohkami, Z., & Fazelinasab, B. (2019). Evaluation of biotic elicitors foliar application on functional changes, physiological and biochemical parameters of fennel (*Foeniculum vulgare*). *Journal of Plant Production Research*, 25(4), 49-65. <https://doi.org/10.22069/jopp.2018.14077.2262>
- Golkar, P., Taghizadeh, M., & Yousefian, Z. (2019). 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)*, 137, 575-585. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01592-9>

- Guan, Y.-j., Hu, J., Wang, X.-j., & Shao, C.-x. (2009). 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*, 10, 427-433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P., & Pandey, D. K. (2022). Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under *in vitro* condition. *South African Journal of Botany*, 149, 1029-1043. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.014>
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(6), 2090-2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Pourbeyrami Hir, Y., Adham, R., Chamani, E., Maleki Lajayer, H., & Hasanzadeh, M. (2022). Effect of chitosan on morpho-physiological traits and regeneration of *Iris pseudacorus* plantlets under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 12(2), 71-83. <https://doi.org/10.22034/jppb.2022.16255>
- Jami, S., Esmaeilzadeh, B. S., & Modarres, M. (2018). Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 31, 568-578. <https://doi.org/10.22034/jppb.2022.16255>
- Jiao, J., Gai, Q.-Y., Wang, X., Qin, Q.-P., Wang, Z.-Y., Liu, J., & Fu, Y.-J. (2018). Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial crops and products*, 124, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.056>
- Kahromi, S., & Khara, J. (2021). Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3898-3907. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11030>
- Khan, M. S. I., Khatun, F., Afrin, S., & Hoque, M. (2020). Callus induction and plantlet regeneration in *Chrysanthemum*. *Int. J. Bus. Soc. Sci. Res*, 8(1), 06-10.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial crops and products*, 129, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.048>

- Kohli, S. K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R., & Bhardwaj, R. (2018). Modulation of antioxidative defense expression and osmolyte content by co-application of 24-epibrassinolide and salicylic acid in Pb exposed Indian mustard plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.051>
- Lagrimini, L. M., & Rothstein, S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant physiology*, 84(2), 438-442. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.438>
- Leal, F., Rodrigues, A., Fernandes, D., Nunes, F., Cipriano, J., Ramos, J., Teixeira, S., Vieira, S., Carvalho, L., & Pinto-Carnide, O. (2007). *In vitro* multiplication of *Calendula arvensis* for secondary metabolites extraction. (Ed.),[^](Eds.). III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812. pp. 251-256. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.812.33>
- Leelavathy, S., & Sankar, P. D. (2016). Curbing the Menace of Contamination in Plant Tissue Culture. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 10(3), 2145-2152.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes (*Methods in enzymology* Vol. 148, pp. 350-382). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lima, A. d. M., Siqueira, A. S., Möller, M. L. S., Souza, R. C. d., Cruz, J. N., Lima, A. R. J., Silva, R. C. d., Aguiar, D. C. F., Junior, J. L. d. S. G. V., & Gonçalves, E. C. (2022). In silico improvement of the cyanobacterial lectin microvirin and mannose interaction. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(3), 1064-1073. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1821782>
- Lin, J.-Y., & Tang, C.-Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food chemistry*, 101(1), 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>
- Mahdavi, B., Modarres Sanavy, S., Aghaalikhani, M., Sharifi, M., & Alavi Asl, S. (2014). 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*, 12(2), 229-236. <https://doi.org/10.22067/gsc.v12i2.39153>
- Malekpoor, F., Salimi, A., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2017). Effect of bio-elicitor chitosan on physiological and morphological properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit. *Journal of Plant Ecophysiology*, 8(27), 56-71. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.20085958.1395.8.27.5.6>

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nahar, S. J., Kazuhiko, S., & Haque, S. M. (2012). Effect of polysaccharides including elicitors on organogenesis in protocorm-like body (PLB) of *Cymbidium insigne* *in vitro*. *Journal of Agricultural Science and Technology. B*, 2(9B), 1029.
- Nourafcan, H. (2019). Effect of chitosan on physiological and morphological traits of Lemon Verbena (*Lippia citriodora* L.) under *in vitro* and field conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*, 13(49 (1)), 73-86. <https://doi.org/10.30495/jcep.2019.664838>
- Obsuwan, K., Yoodee, S., & Uthairatanakij, A. (2010). Application of chitosan on *in vitro* growth of *Rhynchostylis gigantea* protocorms and seedlings. (Ed.),[^](Eds.). I International Orchid Symposium 878. pp. 283-288. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.35>
- Olennikov, D. N., & Kashchenko, N. I. (2022). Marigold metabolites: Diversity and separation methods of *Calendula* genus phytochemicals from 1891 to 2022. *Molecules*, 27(23), 8626. <https://doi.org/10.3390/molecules27238626>
- Paris, L., García-Caparrós, P., Llanderal, A., Silva, J., Reca, J., & Lao, M. (2019). Plant regeneration from nodal segments and protocorm-like bodies (PLBs) derived from *Cattleya maxima* J. Lindley in response to chitosan and coconut water. *Propagation of Ornamental Plants*, 19(1), 18-23. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20203245875>
- Rad, Z. P., Mokhtari, J., & Abbasi, M. (2019). *Calendula officinalis* extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 530-543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.204>
- Rahman, M., Mukta, J. A., Sabir, A. A., Gupta, D. R., Mohi-Ud-Din, M., Hasanuzzaman, M., Miah, M. G., Rahman, M., & Islam, M. T. (2018). Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. *PloS one*, 13(9), e0203769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203769>
- Mitu, R., Velicevici, G., Madoșă, E., Camen, D., Ciulca, A., Ciulca, S., & Lupulescu, C. (2020). Research on the variability of some morphological characteristics in local populations of *Calendula officinalis* L. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 24, 80-83. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20219977355>
- Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., & Komatsu, S. (2020). 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*, 29, 473-483. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00560-1>

- Safikhan, S., Khoshbakht, K., Chaichi, M. R., Amini, A., & Motesharezadeh, B. (2018). 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*, 10, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.06.002>
- Salachna, P., & Zawadzińska, A. (2014). Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *Journal of ecological engineering*, 15(3). <https://doi.org/10.12911/22998993.1110223>
- Santo Pereira, A. E., Silva, P. M., Oliveira, J. L., Oliveira, H. C., & Fraceto, L. F. (2017). Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>
- Shah, M., Jan, H., Drouet, S., Tungmunthum, D., Shirazi, J. H., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2021). Chitosan elicitation impacts flavonolignan biosynthesis in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell suspension and enhances antioxidant and anti-inflammatory activities of cell extracts. *Molecules*, 26(4), 791. <https://doi.org/10.3390/molecules26040791>
- Shahane, K., Kshirsagar, M., Tambe, S., Jain, D., Rout, S., Ferreira, M. K. M., Mali, S., Amin, P., Srivastav, P. P., & Cruz, J. (2023). An updated review on the multifaceted therapeutic potential of *Calendula officinalis* L. *Pharmaceuticals*, 16(4), 611. <https://doi.org/10.3390/ph16040611>
- Silva da Rocha, A., Rocha, E. K., Alves, L. M., Amaral de Moraes, B., Carvalho de Castro, T., Albarello, N., & Simões-Gurgel, C. (2015). Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24, 105-113. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0241-7>
- Silva, V., Singh, R. K., Gomes, N., Soares, B. G., Silva, A., Falco, V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Pereira, J. E., & Amaral, J. S. (2020). 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*, 9(2), 178. <https://doi.org/10.3390/antiox9020178>
- Smith, R. H. (2013). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-650340-1.X5001-9>
- Soland, S., & Laima, S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*, 1, 1-5.
- Tantasawat, P., Wannajindaporn, A., Chantawaree, C., Wangpunga, C., Poomsom, K., & Sorntip, A. (2010). Chitosan stimulates growth of micropropagated plantlets. (Ed.),^(Eds.). I

- International Orchid Symposium 878. pp. 205-212.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.24>
- Van, S. N., Minh, H. D., & Anh, D. N. (2013). Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 289-294. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.24>
- Veraplakorn, V., & Kudan, S. (2021). Chitosan elicitor stimulation of *in vitro* growth and ex vitro acclimatization of Lantana camara L. *Agriculture and Natural Resources*, 55(3), 431–439-431–439. <https://doi.org/10.34044/j.anres.2021.55.3.13>
- Victório, C. P., Lage, C. L. S., & Sato, A. (2012). Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. *Revista Ciência Agronômica*, 43, 539-545. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000300017>
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, 64(1), 88-93. <https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88>
- Zhang, X., Li, K., Liu, S., Zou, P., Xing, R., Yu, H., Chen, X., Qin, Y., & Li, P. (2017). 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*, 65(2), 501-509. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03665>
- Zhao, J.-L., Zhou, L.-G., & Wu, J.-Y. (2010). Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 137-144. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2443-4>
- Zou, P., Li, K., Liu, S., Xing, R., Qin, Y., Yu, H., Zhou, M., & Li, P. (2015). Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress. *Carbohydrate polymers*, 126, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.028>