Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
PSI
Phycological Society of Iran

Effects of different concentrations of chitosan bio-stimulant on some physiological and biochemical traits of *Andrographis paniculate* L.

Mozhdeh Jafari Lafoot[1], Leila Pishkar[2*], Daryush Talei[3]

[1]Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran, Email: jafari_ml@gmail.com
[2]Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran, Email: Pishkar@iiau.ac.ir
[3]Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran, E-mail: talei_d66@gmail.com

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 14.11.2021
Revised: 12.01.2022
Accepted: 15.01.2022
Published: 24.06.2023

Keywords
Chitosan
Andrographis paniculata L.
Antioxidant capacity
Secondary metabolites
Photosynthetic pigments

Abstract

Chitosan is a nitrogen containing polysaccharide synthesized naturally by deacetylation reaction of chitin, which is confirmed as an efficient bio-stimulant to improve production of secondary metabolites in medicinal plants. In the present study, the effects of chitosan (0, 100, 200, 300, and 400 mg/L) on growth, photosynthetic pigments, secondary metabolites, antioxidant capacity, activity of antioxidant enzymes, quantity and quality of protein, and the expression of HMGS and HMGR genes were examined in *Andrographis paniculata* L. The results showed that application of chitosan significantly increased the chlorophyll and carotenoids and, as a result, increased plant growth and biomass. Chitosan treatments (300 and 400 mg/L) increased the expression of *HMGS* and *HMGR* genes in plant leaves, which was associated with a significant increase in the accumulation of total phenols and flavonoids. Also, chitosan improved the activity of superoxide dismutase and peroxidase enzymes and increased the antioxidant capacity of *A. paniculata* leaves. Examination of the quantity and quality of proteins showed that the intensity of protein bands with the molecular weight of 60 kD under 300 and 400 mg/L chitosan treatment and also the intensity of protein bands with the molecular weights of 35 and 20 kD under 300 mg/L chitosan treatment increased compared to the other concentrations. Therefore, these results revealed that application of chitosan can increase accumulation of secondary metabolites and the antioxidant capacity in the medicinal plant *A. paniculata*.

Cite this article as: Jafari Lafoot, M., Pishkar, L., Talei, D. (2023). Effects of different concentrations of chitosan bio-stimulant on some physiological and biochemical traits of *Andrographis paniculate* L. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 70(2): 59-73.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/iper.2022.1944978.1747 Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.70.10.0

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا (*Andrographis paniculate* L.)

مژده جعفری لفوت[۱]، لیلا پیشکار[۲]*، داریوش طالعی[۳]

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران، رایانامه: jafari_ml@gmail.com
[۲]گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران، رایانامه: Pishkar@iiau.ac.ir
[۳]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، رایانامه: talei_d66@gmail.com

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳

واژه‌های کلیدی:
آندروگرافیس پانیکولاتا
رنگیزه‌های فتوسنتزی
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
کیتوزان
متابولیت‌های ثانویه

چکیده

کیتوزان یکی از پلی ساکاریدهای نیتروژن‌دار ا ست که با واکنش ا ستیل‌زدایی کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود و به‌عنوان یکی از محرک‌های زیستی کارآمد در تولید متابولیت‌های ثانویه، در گیاهان دارویی زیادی تأیید شده ا ست. در تحقیق حا ضر، کاربرد کیتوزان در غلظت‌های مختلف (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیت‌های ثانویه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کمیت و کیفیت پروتئین و سطح بیان ژن‌های *HMGS* و *HMGR* گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که کاربرد کیتوزان به طور معنی‌داری باعث افزایش رنگیزه های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئیدها و در نتیجه، افزایش رشد و بیومس گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شد. تیمارهای کیتوزان (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) باعث افزایش بیان ژن‌های *HMGS* و *HMGR* در برگ گیاه شدند که با افزایش معنی‌دار تجمع ترکیبات فنل کل و فلاونوئیدها همراه بود. تیمارهای کیتوزان باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی برگ‌های گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شدند. بررسی کمیت و کیفیت پروتئین‌ها نشان داد که شدت نوارهای پروتئینی با وزن مولکولی ۶۰ کیلو دالتون در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و همچنین شدت نوارهای پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ و ۲۰ کیلو دالتون در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به غلظت‌های دیگر افزایش داشته است. بنابراین، این نتایج ثابت کردند که کاربرد کیتوزان می‌تواند باعث افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شود.

استناد: جعفری لفوت، مژده؛ پیشکار، لیلا؛ طالعی، داریوش. (۱۴۰۲). اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا (*Andrographis paniculate* L.) در شرایط تنش کم‌آبی. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۷۰(۲)، ۷۳-۵۹.

Doi: 10.30495/iper.2022.1944978.1747
Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.70.10.0

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

امروزه اهمیت گیاهان دارویی سبب شده است که هر ساله تعداد بیشتری از کشاورزان با تغییر نوع کشت از گیاهان زراعی به کشت گیاهان دارویی، به سمت کشت و پرورش گیاهان دارویی بپردازند (Gerami et al., 2018). استفاده روز افزون از گیاهان دارویی را می‌توان به عوامل فرهنگی و عدم امکان تولید مصنوعی برخی از مواد موثره طبیعی، عوارض جانبی نامطلوب مواد دارویی شیمیایی، لزوم استفاده از اسانس‌ها و مواد موثره طبیعی در ساخت صابون‌ها، عطرها و خوشبوکننده‌ها نسبت داد (Martins et al., 2001; Ghasemi-Omran et al., 2021). گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا (*Andrographis paniculate* L.) به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم خانواده Acanthaceae شناخته می‌شود که دارای برگ‌های بدون کرک، صاف، ساده و با گل‌های سفید می‌باشند (Lin et al., 2009). این گیاه سرشار از ترکیبات فعال با خواص دارویی است. عصاره این گیاه حاوی سه ترکیب عمده یعنی دی ترپنوئید ها، فلاونوئید ها و استیگماا سترول‌ها با ترکیب‌های فعال شناخته شده با نام‌های آندروگرافولاید، نئوآندروگرافولاید و داکسی آندروگرافولاید می باشد. از خواص دارویی مهم برگ‌های این گیاه می‌توان ضد HIV، ضد H1N1، ضدسرطان، ضدهپاتیت، ضداسهال، محافظت از قلب و کبد، کاهش قند خون، تقویت کننده سیستم ایمنی و درمان سوها ضمه را نام برد (Mishra et al., 2009; Lin et al., 2009). از گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا در درمان بیماری های همه‌گیر از جمله بیماری اپیدمی جهانی آنفولانزای ۱۹۱۹ استفاده شده است (Hancke et al., 1995).

روش‌ها متعددی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی، باعث افزایش بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شوند (Zhao et al., 2005). کیتوزان به عنوان یکی از الیسیتورهای زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن در تولید متابولیت های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی تایید شده است. کیتوزان با فرمول شیمیایی ($C_6H_{11}O_4N$) از پلی ساکاریدهای نیتروژن‌دار است که با واکنش استیل‌زدایی کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود (Cheng et al., 2006). این پلی ساکارید به طور برجسته در پوسته سخت پوستانی مانند خرچنگ و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود (Pichynagkura and Kudan, 2002). کیتوزان به خاطر خواص ضد میکروبی در مقابل گستره وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها، کاربردهای بسیاری در کشاورزی دارد (Arriola et al., 2013). کیتوزان همچنین با ایجاد یک پوشش نازک روی خوراکی‌هایی نظیر میوه و سبزیجات که به صورت یک فیلم محافظ ضدباکتری و ضد قارچ عمل می‌کند، از فساد محصولات کشاورزی جلوگیری می کند (Rabea et al., 2003). گزارش شده است که کیتوزان با فعال نمودن تعدادی از آنزیم‌ها نظیر فیتواکسین و کیتیناز، مقاوت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش داده و صدمات ناشی از آنها را کاهش می‌دهد (Agrawal et al., 2002). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های سمی مانند هیدروکسیل را از بین ببرد و خاصیت محافظت از DNA دارد (Harish Prashanth et al., 2007). بسیاری از محققان گزارش کردند که استفاده از کیتوزان باعث افزایش رشد رویشی، عملکرد و محتوای بیو شیمیایی گیاهان می شود (Pirbalouti et al., 2017; Mukta et al., 2014). اخیرا آنالیز ترانسکریپتوم[1] نشان داد که کیتوزان باعث بیان ژن‌های درگیر در چندین فرآیند

1 . Transcriptome

فیزیولوژیکی از جمله سیستم ایمنی گیاه، فتوسنتز و متابولیسم هورمون می شود. همچنین بر بیان پروتئین شوک حرارتی و تغییر در متابولیسم پروتئین با افزایش پروتئین‌های ذخیره‌ای تاثیر می‌گذارد (Landi et al., 2017; Xoca-Orozco et al., 2017). با این حال، اطلاعات کمی در مورد تاثیر کاربرد کیتوزان بر رشد، متابولیت‌های ثانویه و خواص آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی وجود دارد. بنابراین، این مطالعه برای بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای فنل و فلاونوئیدها، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، الگوی پروتئینی و بیان دو ژن درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه (*HMGR* و *HMGS*) در گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا در شرایط گلخانه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و اعمال تیمار: تحقیق حاضر در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد-تهران به صورت طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. در این تحقیق، اثر کاربرد غلظت های مختلف کیتوزان (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای فنل و فلاونوئید ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، الگوی پروتئینی و بیان دو ژن درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه (*HMGR* و *HMGS*) در گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا بعد از ضدعفونی جوانه‌دار شدند و سپس به گلدان‌های پلاستیک حاوی هوموس، خاک رس و شن اتوکلاو شده در نسبت ۲:۱:۳ منتقل شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده با دمای روز / شب ۱۸/۲۵ درجه سانتی‌گراد، مدت روشنایی ۱۴ ساعت با شدت نور ۳۰۰ وات بر متر مربع و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد در گلخانه نگهداری شدند. گلدان‌ها هر ۱۰ روز با محلول غذایی یک دوم قدرت هوگلند تغذیه شدند و براساس نیاز با آب مقطر آبیاری شدند. ۴۰ روز بعد از جوانه‌زنی، گیاهان به مدت ۳۰ روز تحت تیمارهای مختلف کیتوزان قرار گرفتند. برای تهیه محلول کیتوزان (Sigma Aldrich آمریکا) با وزن مولکولی پایین، از اسید استیک جهت حلال و آب مقطر برای رقیق کردن استفاده شد. تیمارهای کیتوزان به مدت یک ماه و هر یک روز در میان به میزان ثابت ۲۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان‌ها اضافه شد و برای تیمار شاهد از محلول مشابه بدون کیتوزان (آب مقطر و اسید استیک) استفاده شد. ۳۰ روز بعد از شروع تیمارهای کیتوزان، نمونه برداری انجام شد و بعد از ثبت صفت‌های مورفولوژی، نمونه‌ها به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام اندازه‌گیری های بیو شیمیایی و مولکولی منتقل شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های بعد از ثبت وزن تر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس وزن شدند.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از هموژن کردن نمونه‌های برگ (۰/۲۵ گرم) با استون ۸۰ درصد و سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه تعیین شد. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید ها مطابق روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) محاسبه گردید.

فنل کل: برای اندازه‌گیری فنل کل، ۰/۱ گرم از بافت تر برگی گیاه در هاون چینی ساییده و پس از اضافه کردن ۸۰ درصد (۲۰ میلی‌لیتر اتانول) به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار گرفت. سپس عصاره توسط

کاغذ صافی واتمن شماره یک، صاف شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین-سیوکالتو ۰/۲ نرمال و ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد ترکیب شد. نمونه‌ها پس از یک ساعت تاریکی در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری شدند. مقادیر فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک در گرم وزن تر محاسبه شدند (Marinova et al., 2005).

فلاونوئیدها: برای این منظور، ۰/۱ گرم از وزن تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی هموژن شده و سپس عصاره سانتریفیوژ شد. محلول رویی با سدیم نیترات ۵ درصد و آب مقطر مخلوط شد و بعد از ٦ دقیقه، کلرید آلومینیوم ۱۵ در صد و هیدروکسید سدیم یک مولار به مخلوط واکنش ضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. با قرائت جذب در ۵۱۰ نانومتر، محتوای فلاونوئیدها براساس روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) محاسبه گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) و FRAP (Ferric reducing antioxidant power): میزان یک میلی لیتر از عصاره متانولی برگ را به همراه یک میلی لیتر معرف DPPH (دو هزارم گرم معرف DPPH در ۵۰ میلی لیتر متانول) به درون لوله آزمایش اضافه شد. سپس لوله های آزمایش حاوی محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد تا اثر بخشی مهار رادیکالی توسط DPPH صورت پذیرد. پس از طی مدت زمان لازم، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب اندازه‌گیری شد و میزان DPPH مطابق روش Goulas و Manganaris (۲۰۱۱) محاسبه گردید.

برای اندازه‌گیر FRAP، توانایی آنتی اکسیدانی در احیاء آهن مورد سنجش قرار می گیرد. برای تهیه معرف FRAPT، بافر استات ۳۰۰ میلی مولار (pH 3.6)، ۱۰ میلی مولار TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine) در اسید کلروهیدریک ٤٠ میلی مولار و محلول کلرید آهن III به نسبت ۱۰:۱:۱ مخلوط شدند. به ۱/۵ میلی لیتر از محلول FRAP، ۵۰ میکرولیتر عصاره آبی اضافه شده و پس از چهار دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میزان جذب در ۵۹۳ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با کمک سولفات آهن II، در محدوده معمول ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار رسم شدند (Benzie and Strain, 1996).

سنجش پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: بافت تازه برگ (۰/۵ گرم) در یک میلی‌لیتر از بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7) شامل KCl ۱۰۰ میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی‌مولار، بتا-مرکاپتواتانول[1] ۵ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰ درصد هموژن شد. از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه برای تعیین محتوای پروتیئن‌ها و سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده شد. محتوای پروتئین برگ مطابق روش Bradford (۱۹۷٦) و اضافه کردن معرف برادفورد به عصاره استخراجی و قرائت در طول موج ۵۹۵ نانومتر محاسبه شدند. جهت الکتروفورز پروتئین‌ها از تکنیک SDS-PAGE به روش Laemmli (۱۹۷۰) استفاده گردید. جهت رنگ آمیزی ژل از روش رنگ آمیزی با کوماسی بریلینت بلو (G-250) که نوارهای پروتئینی تا حداقل یک میکروگرم قابل تشخیص است، استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از ممانعت از فتوشیمیایی احیای نیتروبلوتترازولیوم[2] (NBT) توسط عصاره مطابق روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Fielding و Hall (۱۹۷۸) و قرائت

1. Mercaptoethanol

2. Nitro blue tetrazolium

مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH 6.8)، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر بدست آمد.

آنالیز داده‌ها: این آزمایش به صورت ساده در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین صفات توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد و رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

نتایج

تاثیر کیتوزان بر رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمار کیتوزان بر وزن خشک و تر گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر ارتفاع گیاه نداشت با اینحال، کاربرد غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به طور معنی‌داری باعث افزایش ارتفاع گیاه به ترتیب به میزان ۱۳/۵ و ۱۴/۹ در صد نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۲). افزایش غلظت کیتوزان باعث روند افزایشی در وزن تر و خشک کل گیاه شد بطوریکه بیشترین وزن تر و خشک کل گیاه تحت بالاترین غلظت کیتوزان (۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که اثر تیمار بر محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در سطح یک درصد و بر اتفاع گیاه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج نشان دادند که تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش محتوای کلروفیل a به ترتیب به میزان ۲، ۳/۵، ۳/۶ و ۴/۳ برابر و کلروفیل b به میزان ۲، ۳/۳، ۳/۲ و ۳/۵ برابر نسبت به گیاهان شاهد شدند (جدول ۲). محتوای کلروفیل کل با افزایش غلظت کیتوزان روند افزایش نشان داد و تحت غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به بالاترین سطح خود رسید (جدول ۲). کاربرد غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش معنی‌دار محتوای کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شد که بیشترین افزایش تحت غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان ثبت گردید (جدول ۲).

تاثیر کیتوزان بر محتوای فنل کل، فلاونوئیدها و ظرفیت آنتی اکسیدانی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که کاربرد کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر محتوای فنل کل و فلانوئیدهای برگ گیاه در سطح یک درصد داشت (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان دادند که تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش معنی‌دار محتوای فنل کل برگ گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا به ترتیب به میزان ۲۲/۷، ۲۹/۷، ۴۱ و ۵۳/۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل A۱). افزایش غلظت کیتوزان همچنین باعث افزایش معنی‌دار محتوای فلاونوئیدهای برگ نسبت به گیاهان شاهد شد بطوریکه بیشترین افزایش تحت غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد (شکل B۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا تحت تیمار کیتوزان

	ارتفاع	وزن تر کل	وزن خشک کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئیدها
تیمار	۲۷*	۱۵۸۵**	۲۴۸**	۰/۲۷**	۰/۰۸**	۰/۶۴**	۰/۰۴**
خطا	۱۱/۲	۶/۴	۱/۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات	۶/۶	۳/۶	۶	۸/۵	۷/۴	۸	۶/۷

*، ** و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج درصد، یک درصد و عدم معنی‌داری

جدول ۲: مقایسه میانگین صفات رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا تحت غلظت‌های مختلف کیتوزان

تیمار کیتوزان (میلی‌گرم بر لیتر)	ارتفاع (سانتی‌متر)	وزن تر کل (گرم بر بوته)	وزن خشک کل (گرم بر بوته)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
صفر	٤٧ ± ٣^{b}	٤٣/٣٣± ٣/٠٦^{d}	٩/٦٦ ± ١/٠١^{e}	٠/٢٢٢±٠/٠١٣^{d}	٠/١٥٣±٠/٠١١^{d}	٠/٣٧٥± ٠/٠١١^{d}	٠/٣٨ ± ٠/٠١٦^{c}
١٠٠	٤٩/٣٣± ١/٢^{ab}	٤٧/٦٧± ٠/٥٨^{d}	١٤/١٣ ± ٠/٥^{d}	٠/٤٣٨ ± ٠/٠١^{c}	٠/٣ ± ٠/٠٠٣^{c}	٠/٧٣٨± ٠/٠١٢^{c}	٠/٤٢٦± ٠/٠٢٨^{c}
٢٠٠	٥٠ ± ٢^{ab}	٧٦ ± ٢^{c}	٢١/٢٧± ١/٧٢^{c}	٠/٧٧ ± ٠/٠٩٢^{b}	٠/٥٠٢± ٠/٠٥^{ab}	١/٢٧٢± ٠/١٤١^{b}	٠/٥٠١± ٠/٠٢٢^{b}
٣٠٠	٥٣/٣٣±٦/١١^{a}	٨٨/٠١±٠/٩٢^{b}	٢٤/٥٧±٠/٣١^{b}	٠/٧٩٤±٠/٠٧١^{b}	٠/٤٨٤±٠/٠٣٤^{b}	١/٢٧٨± ٠/١٠٥^{b}	٠/٦٠٣±٠/٠٣٩^{a}
٤٠٠	٥٤ ± ٢/٠٨^{a}	٩٣/٣٣± ٤/١٦^{a}	٣٢/٩٧ ± ١/٨^{a}	٠/٩٥٤± ٠/٠٢٨^{a}	٠/٥٣٧±٠/٠٢٢^{a}	١/٤٩١±٠/٠٤٩^{a}	٠/٦٥٨± ٠/٠٥٤^{a}

– مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی DPPH و FRAP در سطح یک درصد داشته است (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین برملا ساخت که کاربرد کیتوزان باعث کاهش DPPH برگ گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا نسبت به گیاهان شاهد شد و کمترین میزان DPPH تحت غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان ثبت گردید (شکل C۱). کاربرد کیتوزان بر خلاف DPPH، باعث افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی اکسیدانی FRAP نسبت به گیاهان شاهد شد که بالاترین سطح FRAP در گیاهان تیمار شده با ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بدست آمد و بین غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل D۱).

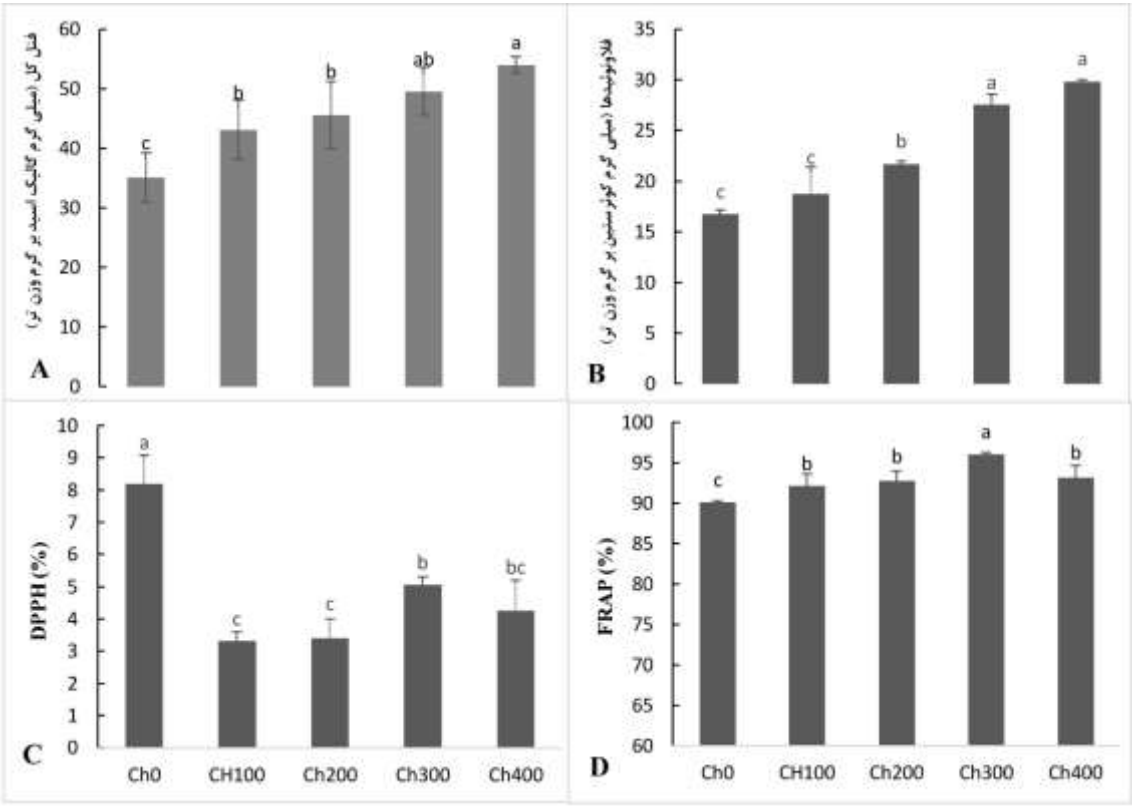
جدول ۳: تجزیه واریانس صفات فنل کل، فلاونوئیدها، ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا تحت تیمار کیتوزان

	فنل کل	فلاونوئیدها	DPPH	FRAP	پروتئین	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	آنزیم پراکسیداز
تیمار	١٥١**	٩٥**	١٢**	١٤**	٠/٠٠٦**	٣١**	٨/٧**
خطا	١٩	١/٧	٠/٤	١/٢	٠/٠٠٠٦	٠/٦٣	١
ضریب‌تغییرات	٩/٥	٥/٧	١٣/٥	٢	٤/٤	٤/٩	١١/٦

** معنی‌داری در سطح یک درصد

تاثیر کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثر تیمار کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به‌ترتیب به میزان ۲۹/٦، ۳۲، ٤۷/۹ و ۷٤/۵ در صد و فعالیت آنزیم پراکسیداز به میزان ۵۷/۱، ٤۱/٤، ۵۲ و ۷۸/۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل A۲ و B).

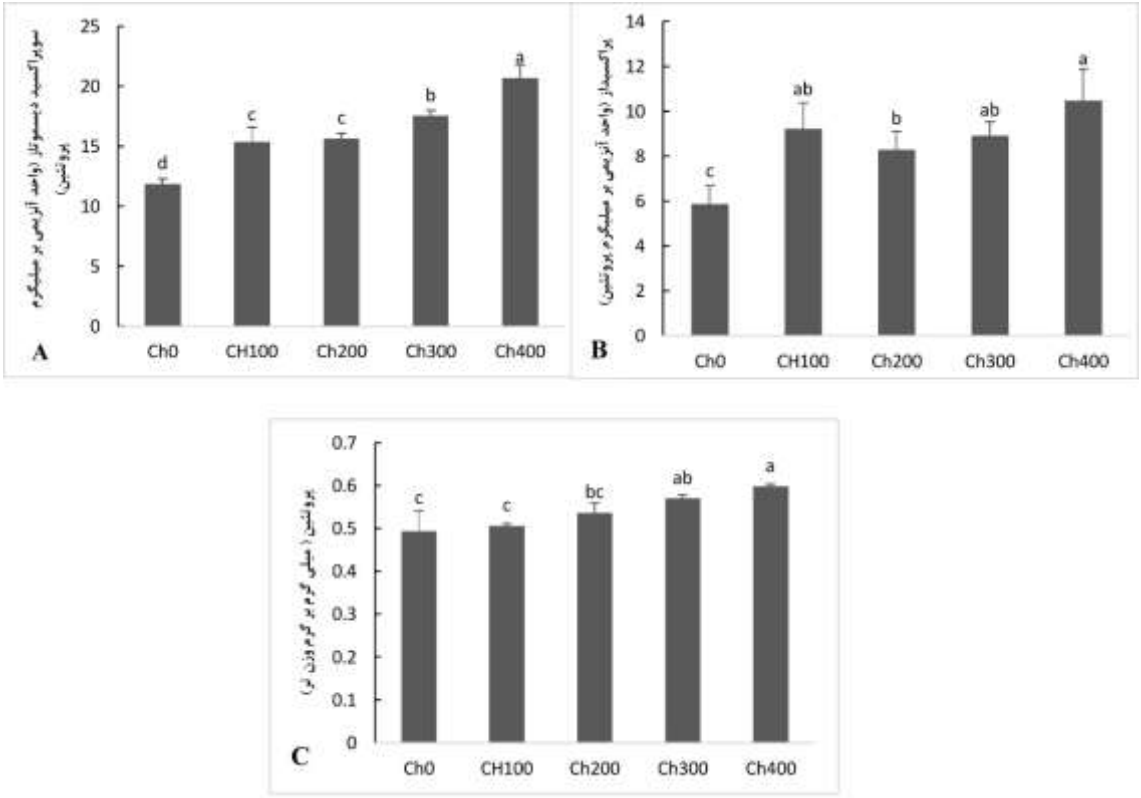
تاثیر کیتوزان بر کمیت و کیفیت پروتئین: نتایج تجزیه واریانش نشان داد که تیمار کیتوزان تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر محتوای پروتئین‌ها در برگ گیاه داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین نشان داد که تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان اثر معنی‌داری بر محتوای پروتئین‌ها نداشتند، با اینحال، غلظت‌های ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش معنی‌دار پروتئین‌ها به ترتیب به میزان ۱۳/۵ و ۲۱/۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل C۲).



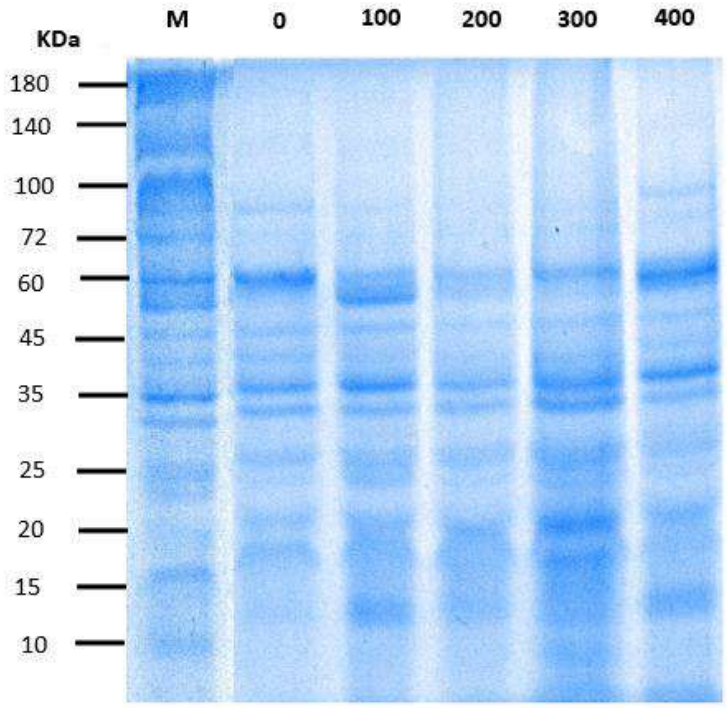
شکل ۱: تاثیر کاربرد کیتوزان (CH، صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر محتوای فنل کل (A)، محتوای فلاونوئیدها (B)، DPPH (C) و FRAP (D) در برگ گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا. میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

الگوی الکتروفورزی در برگ تحت تیمار کیتین در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۳ م شاهده می شود، شدت نوارهای پروتئینی با وزن مولکولی ٦۰ کیلو دالتون در غلظت های ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تحت تیمار کیتین نسبت به غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و همچنین شدت نوارهای پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ و ۲۰ کیلودالتون در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتین نسبت به غلظت‌های دیگر افزایش بیشتری داشته است. هیچ باندی در غلظت های مختلف ناپدید نشد. شدت بیشتر باندها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته بود (شکل ۳).

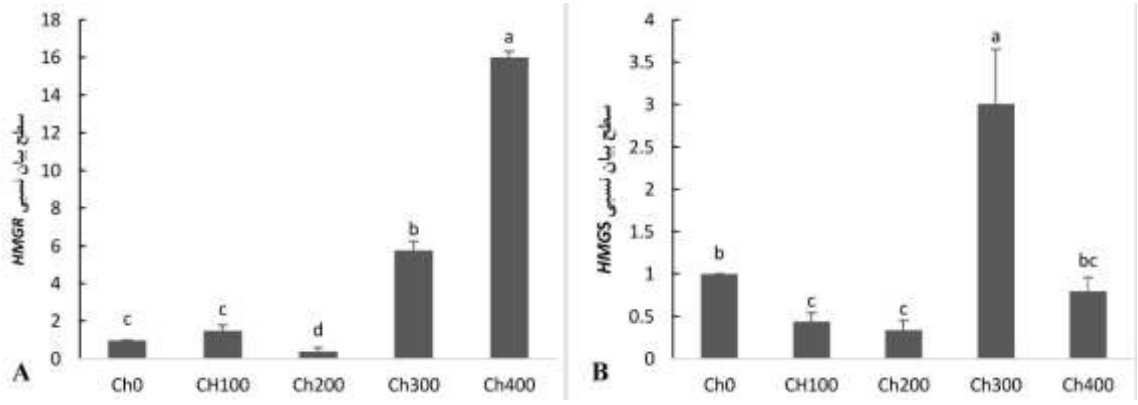
بیان ژن‌های *HMGR* و *HMGS*: نتایج بیان ژن نشان داد کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن *HMGR* ندا شت اما غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *HMGR* نسبت به گیاهان شاهد شد. با اینحال، تیمارهای ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش معنی‌دار بیان *HMGR* شد (شکل A٤). کاهش معنی‌داری در سطح بیان ژن *HMGS* در گیاهان تیمار شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد درحالیکه تیمار های۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *HMGS* به ترتیب به میزان ۳ و ۱/۸ برابر نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل B٤).



شکل ۲: تاثیر کاربرد کیتوزان (CH، صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤٠٠ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (A)، آنزیم پراکسیداز (B) و محتوای پروتئین (C) در برگ گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا. میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳: الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ در گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا تحت تیمار کیتوزان



شکل ٤. تاثیر کاربرد کیتوزان (CH، صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر سطح بیان ژن‌های *HMGR* (A) و *HMGS* (B) در برگ گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا. میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزایش غلظت کیتوزان باعث افزایش رشد و بیومس گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شد که مطابق نتایج بدست آمده از اثر کیتوزان بر رشد گیاهان دارویی همیشه بهار (Hussaini Begum et al., 2013)، استویا (Mehregan et al., 2017) و ریحان (Naderi et al., 2015) می‌باشد. در پژوهشی که بر روی گیاه گوجه فرنگی صورت گرفت محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش تعداد شاخه، تعداد برگ، وزن خشک برگ و اندام هوایی شد (El-Tantawy et al., 2009) و در تحقیقات مشابه که بر روی گیاه توت فرنگی انجام شد، تیمار کیتوزان باعث افزایش وزن تر و خشک برگ شد (Abdel-Mawgoud et al., 2010). گزارش شده است که کیتوزان با استفاده از افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن (نیترات ردکتاز، گلوتامین و پروتئاز سنتتاز) و بهبود انتقال نیتروژن، باعث توسعه و رشد گیاه می‌شود (Mondal et al., 2012). همچنین عنوان شده است که کیتوزان از طریق القای مسیرهای پیام رسانی مربوط به سنتز هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین و اکسین، باعث افزایش سنتز آنها و در نتیجه بهبود رشد می‌شود (Hussaini Begum et al., 2013). بنابراین، نتایج ما نشان دهنده بهبود رشد و بیومس گیاه با کاربرد کیتوزان است در راستای نتایج ذکر شده می باشد و می تواند با دلایل ذکر شده توجیه شود.

فرآیند فتوسنتز رابطه نزدیکی با رشد و بیومس گیاه دارد (Ghorbani et al., 2019). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد کیتوزان باعث افزایش سطح رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئیدها شد که می‌توند نقش مهمی در بهبود رشد و بیومس گیاه داشته باشد. نتایج مشابهی از افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی با کاربرد کیتوزان در گیاهان مختلف گزارش شده است که نشان دهنده نقش مثبت این الیستور بر محتوای رنگیزه‌های فتو سنتزی می‌باشد (Zong et al., 2017; Pirbalouti et al. 2017). اثرات کیتوزان بر سطح رنگیزه‌های فتوسنتزی می تواند ناشی از تاثیر آن بر بیان ژن‌های درگیر در سنتز رنگیزه‌ها و یا فراهم کردن بیشتر عناصر مغذی در گیاه باشد (Limpanavech et al., 2008)، که برای شناخت دقیق نقش کیتوزان بر رنگیزه‌های فتوسنتزی نیاز به بررسی‌های بیشتر در

سطح بیوشیمیایی و مولکولی آنزیم‌های درگیردر سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌باشد.

نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون-احیاء آنها است که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکالهای آزاد، فرونشاندن اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیداز های تجزیه کننده دارند (Ghorbani et al., 2021). انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به عنوان یک علامت عمل کند و برای راه‌اندازی زنجیره‌ای از واکنش‌های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می‌شوند، عمل نماید (Ghorbani et al., 2018a). نتایج نشان دادند که کاربرد کیتوزان به طور موثری باعث افزایش تجمع فنل و فلاونوئیدها در برگ گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شدند که نشان دهنده تاثیر کیتوزان بر سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در تحقیقی که روی گیاه گوجه فرنگی انجام شد کاربرد کیتوزان باعث افزایش ترکیبات فنل و فلاونوئید ها نسبت به گیاهان شاهد شد (Liu et al., 2007) که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر مشخص شد که اسپری برگی کیتوزان در گیاه چای و کتان سفید سبب افزایش قابل توجهی در محتوای فنلی برگ‌ها شده است (Esmaeilzadeh Bahabadi et al., 2012; Palida et al., 2014). اگرچه تاثیر کیتوزان به طور دقیق مطالعه نشده و هنوز کاملا درک نشده است، شواهدی وجود دارد که تیمار کیتوزان ممکن است آنزیم‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید به ویژه فنیل آلانین آمونیالیاز که آنزیم اصلی مرحله اول بیوسنتز فنول‌ها می‌باشد، را فعال کند (Portu et al., 2016).

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند اما گیاهان مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند (Ghorbani et al., 2018b). تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند. حضور گونه‌های فعال اکسیژن برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای مهم سلولی مثل غشاها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز شد که می‌تواند به طور موثری باعث پایین نگهداشتن سطح رادیکال‌های سمی در گیاه شود. مطالعات متعدد نشان داده است که کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد (Kim and Thomas, 2007; Yen et al., 2008). طبق تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات فنلی در گوجه فرنگی شده است (Liu et al., 2007). تیمار کیتوزان همچنین باعث کاهش DPPH و افزایش FRAP شد که مطابق نتایج گزارش شده توسط Silva و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد. بنابراین، این نتایج ثابت کردند که کاربرد کیتوزان با افزایش تجمع ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، باعث بهبود شرایط آنتی اکسیدانی گیاه شد که می‌تواند نقش موثری در بهبود رشد گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا داشته باشد.

در سال‌های اخیر، تغییرات پروفایل پروتئین برای شناسایی و فهم نقش پروتئین‌ها تحت القای الیستورها مورد توجه قرار گرفته است، به هر حال، نقش اکثر پروتئین‌ها در این خصوص ناشناخته باقی مانده است. نتایج ما نشان دادند که کاربرد کیتوزان باعث افزایش محتوای پروتئین گیاه شد که بالاترین سطح تحت تیمار ٤٠٠ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مشاهده شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که در گیاهان تیمار شده با ۳۰۰ و ٤٠٠ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان شدت باندهای ٦٠

کیلو دالتون بیشتر از بقیه تیمارها بود که نشان می‌دهد کیتوزان باعث تغییر در الگوی پروتئینی برگ گیاه شد. با اینحال، نیاز به مطالعات دقیق‌تر برای شناسایی پروتئین‌های تغییر یافته تحت تیمار کیتوزان می‌باشد تا مکانیسم‌هایی که کیتوزان باعث بهبود رشد گیاه شده است، شناخته شود.

آنزیم‌های HMGS و HMGR دو آنزیم مهم در مسیر موالونات هستند که در سنتز ۳-هیدروسکی-۳-متیل گلوتاریل کو-A و تبدیل آن به موالونات نقش دارند (Schaller et al., 1995). مطالعات مختلف نشان دادند که دو ژن HMGS و HMGR با هم تنظیم می‌شوند و در سنتز ترکیبات ترپنوئیدها و متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (Wang et al., 2012; Suwanmanee et al., 2013). نشان داده شده است که بیان بالای ژن *HMGS* باعث بهبود جوانه‌زنی، افزایش تولید بذر و افزایش تحمل گیاه به تنش می‌شود (Wang et al., 2012; Liao et al., 2014). نتایج تحقیق ما نشان داد که غلظت های ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش بیان ژن‌های *HMGS* و *HGMR* شدند که با افزایش تجمع متابولیت های ثانویه و کاروتنوئید ها مطابقت دارد. افزایش بیان این دو ژن در گیاه گوجه فرنگی نیز باعث افزایش ترکیبات ترپنوئیدی و همچنین افزایش سطح کاروتنوئیدها و ویتامین E شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (Liao et al., 2018). بنابراین، نتایج ما ثابت کرد که کاربرد کیتوزان باعث افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه و کارتنوئیدها در برگ گیاه شد که می‌توند ناشی از افزایش سطح بیان ژن‌های *HGMS* و *HGMR* درگیر در مسیر سنتز ترپونوئیدها باشد.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل شده، می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد کیتوزان در غلظت‌های مناسب (۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از طریق تنظیم بیان ژن های *HMGS* و *HMGR*، باعث افزایش تجمع ترکیبات فنلی و ظرفیت آنیی اکسیدانی گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا شد. کاربرد کیتوزان همچنین باعث افزایش محتوای پروتئین ها و تغییر الگوی پروتئینی در برگ گیاه شد. کاربرد کیتوزان همچنین باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شد که با افزایش رشد و بیومس گیاه دارویی آندروگرافیس پانیکولاتا همراه بود.

References

Abdel-Mawgoud, A.M.R., Tantawy, A.S., El-Nemr, M.A. and Sassine, Y.N. (2010). Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. European Journal of Scientific Research. 39(1): 161-8.

Agrawal, G., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekurad, M., Kubo, A. and Saji, H. (2002). Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza Sativa* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 1061-9.

Arriola, O.C., Rocha, M.C., Hernandez, A.B., Brauer, J.M.E. and Jatomea, M.P. (2013). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93(7): 1525-36

Benzie, I., and Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochemistry. 72: 248-254

Cheng, X., Zhou, U. and Cui, X. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Biotechnology Journal. 121: 253-60.

El-Tantawy E.M. (2009). Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12(17): 1164-73.

Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaie, N. and Behmanesh, M. (2012). Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. Iranian Journal of Plant Biology. 4(11): 13-26.

Fielding, J.L. and Hall, J. (1978). A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in root of *Pisum sativam*. Journal of Experimental Botany. 29: 981-989.

Gerami, M., Ghorbani, A., and Karimi, S. (2018). Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Plant Biology. 10(1): 81–95.

Ghasemi-Omran, V.O., Ghorbani, A., and Sajjadi-Otaghsara, S.A. (2021). Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in in vitro cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 57: 319–331.

Ghorbani, A., Ghasemi Omran, V.O., Razavi, S.M., Pirdashti, H., and Ranjbar, M. (2019) *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K^+/Na^+ homeostasis and water status. Plant Cell Reports 38: 1151–1163.

Ghorbani, A., Pishkar, L., Roodbari, N., Pehlivan, N., and Wu, C. (2021). Nitric oxide could allay arsenic phytotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by modulating photosynthetic pigments, phytochelatin metabolism, molecular redox status and arsenic sequestration. Plant Physiology and Biochemistry 167: 337–348.

Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. (2018a). *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. Russian Journal of Plant Physiology. 65: 898–907.

Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O., and Pirdashti, H. (2018b). *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant Biology 20: 729–736.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase I. Occurrences in higher plants. Plant Physiology. 59(2): 309-414.

Goulas, V., and Manganaris, G.A. (2011). The effect of postharvest ripening on strawberry bioactive composition and antioxidant potential. Journal of the Science of Food and Agriculture. 91: 1907–1914.

Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, S.M., Jagannatha Rao, K.S. and Tharanathan, R.N. (2007). Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrate Research. 342: 190-5.

Hussaini Begum, M., Taheri, G.H., Vaezi Kakhaki, M.R. and Tlaty, M. (2013). Foliar application of chitosan on growth and morphological characteristics of marigold (*Calendula officinalis*). National Conference of passive defense in the agricultural sector. 2013 November 30.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Landi, L., De Miccolis Angelini, R.M., Pollastro, S., Feliziani, E., Faretra, F. and Romanazzi, G. (2017). Global transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes in strawberry after preharvest application of Benzothiadiazole and chitosan. Frontiers in Plant Science. 8: 235.

Liao, P., Chen, X., Wang, M., Bach, T.J. and Chye, M.L. (2018). Improved fruit α-tocopherol, carotenoid, squalene and phytosterol contents through manipulation of *Brassica juncea* 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYLCOA SYNTHASE1 in transgenic tomato. Plant Biotechnology Journal. 16: 784–796.

Liao, P., Wang, H., Wang, M., Hsiao, A.S., Bach, T.J. and Chye, M.L. (2014). Transgenic tobacco overexpressing *Brassica juncea* HMG-CoA synthase 1 shows increased plant growth, pod size and seed yield. PLoS One. 9: e98264

Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods of Enzymology. 148: 350-382.

Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongpromek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S., Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, A. and Bangyeekhun, T. (2008). Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the Dendrobium orchid. Scientia Horticulturae. 116: 65–72

Lin, F.L., Wu, S.J., Lee, S.C. and Ng, L.T. (2009). Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. Phytotherapy Research. 23(7): 958- 964.

Liu, J., Tian, S., Meng, X. and Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Journal of Postharvest Biology and Technology. 44: 300-306.

Marinova, D., Ribarov, F. and Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bolgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 40: 255-260.

Martins, H.M., Martins M.L., Dias, M.I. and Bernardo, F. (2001). Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. International Journal of Food Microbiology. 58: 149-153.

Mehregan, M., Mehrafarin, A., Labbafi, M. and Naghdi Badi, H. (2017). Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Journal of Medicinal Plants. 16(62): 169-181

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies. 15(4): 523-530.

Mishra, U.S., Mishra, A., Kumari, R., Murthy, P.N. and Naik, B.S. (2009). Antibacterial activity of ethanol extract of *Andrographis paniculata*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 71: 436- 438.

Mondal, M.A., Malek, M.A., Puteh, A.B., Ismail, M.R., Ashrafuzzaman, M. and Naher, L. (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Science. 6(5): 918-921

Mukta, J.A., Rahman, M., Sabir, A.A., Gupta, D.R., Surovy, M.Z., Rahman, M. and Islama, M.T. (2017). Chitosan and plant probiotics application enhance growth and yield of strawberry. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 11: 9-18.

Naderi, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Fakheri, B. (2015). The effect of chitosan on some physiological and biochemictry characterization in basil (*Ocimum basilicum*). Plant Process and Function. 4(12); 29-41

Palida, S., Rath, P. and Supachitra, C. (2014). Chitosan increased phenolic compound contents in tea (*Camellia sinensis*) leaves by Pre- and Post-treatments. Journal of Chitin and Chitosan Science. 2(2): 93-98.

Pichynagkura, R. and Kudan, S. (2002). Quantitative production of 2-acetamido 2-deoxy-Dglucose from cryatallin chitin by bactrial Chitinase. Carbohydrate Research. 337: 1-9.

Pirbalouti, A.G., Malekpoor, F., Salimi, A., Golparvar, A. (2017). Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. Scientia Horticulturae. 217: 114-122.

Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P. and Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. Food Chemistry. 201: 213–221.

Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G. and Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Aplications and mode of action. Biomacromolecules. 4(5): 1457-65.

Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M.L., Tan, C.T., Song, Y.H. and Chua, N.H. (1995). Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. Plant Physiology. 109: 761–770.

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., Igrejas, G. and Poeta, P. (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: 178.

Suwanmanee, P., Sirinupong, N. and Suvachittanont, W. (2013). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase and rubber biosynthesis of Hevea brasiliensis (B.H.K.) Mull. Arg. In: Bach TJ, Rohmer M, eds. Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: new concepts and experimental approaches. New York: Springer, 315–327.

Valdiani, A., Mihdzar, A.K., Tan, S.G., Talei, D., Puad, M.A. and Nikzad, S. (2012). Nain-e Havandi (*Andrographis paniculata*) present yesterday, absent today: A plenary review on underutilized herb of Iran's pharmaceutical plants. Molecular Biology Reports. 39: 5409-5424.

Wang, H., Nagegowda, D.A., Rawat, R., Bouvier-Navé, P., Guo, D., Bach, T.J. and Chye, M.L. (2012). Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in Arabidopsis up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. Plant Biotechnology Journal. 10: 31–42

Xoca-Orozco, L.A.Â., Cuellar-Torres, E.A., GonzaÂlez-Morales, S., GutieÂrrez-MartõÂnez, P., LoÂpez-GarcõÂa, U., Herrera- Estrella, L., Vega-Arreguín, J. and Chacón-López, A. (2017). Transcriptomic analysis of avocado hass (*Persea americana* Mill) in the interaction system fruit-chitosan-Colletotrichum. Frontiers in Plant Science. 8: 956.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23(4): 283–333

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64(4): 555-559

Zong, H., Liu, S., Xing, R., Chen, X. and Li, P. (2017). Protective effect of chitosan on photosynthesis and antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety. 138: 271-278.