Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 1, Page 18-36 (2024)

DOI:10.22092/ijmapr.2023.361795.3305:

Chitosan-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites production of *Teucrium polium* L. in *in vitro* condition

Fahimeh Gharaei[1], Monireh Cheniany[2*] and Ali Ganjeali[3]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: Cheniany@um.ac.ir
3- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: March 2023 Revised: July 2023 Accepted: August 2023

Abstract

Background and Objectives: *Teucrium polium* L. is a herbaceous plant from the mint family that has many uses in traditional medicine. In recent years, numerous medicinal effects such as anti-diabetes, anti-cancer, anti-spasm, and reducing fat and blood pressure have been reported. Therefore, cultivation of this plant under laboratory conditions is necessary to preserve its survival, reproduction, and increased secondary metabolites. Among the solutions, elicitors in the plant tissue culture technique are one of the most widely used methods to increase secondary-medicinal metabolites. Chitosan, as a biopolymer, induces defense responses, increases antioxidant enzyme activity, and accumulates phenolic compounds. In the present study, the effect of chitosan bio-elicitor was studied on some phenolic compounds of *T. polium* under in vitro culture to optimize secondary metabolites and increase antioxidant capacity.

Methodology: Leaf explants were prepared from preserved *T. polium* in hydroponic conditions and fed with Hoagland's solution. After sterilization with sodium hypochlorite 5% (v/v) and ethanol 70% (v/v), middle slices were prepared from the leaf explant and cultured on Murashige and Skoog (MS) culture medium containing separate and combined concentrations of benzyl amino purine (BAP)(1 and 1.5 $mg.L^{-1}$) and naphthalene acetic acid (NAA)(0.5 $mg.L^{-1}$). The samples were kept for four weeks in the dark at 25 degrees Celsius. With callogenesis, the samples were transferred to light conditions of 16 hours of light and 8 hours of darkness. At the end of the sixth week, the induced calli were subcultured. The calli were treated with chitosan at different concentrations (0, 50, 100, and 150 $mg.L^{-1}$). After eight weeks, green calli were collected. Finally, to prepare the final extract for biochemical assays, extraction was done from green calli. The content of phenolic compounds (phenol, flavonoid, flavone, and phenolic acids), antioxidant activity, and phenylalanine ammonialyase (PAL) activity was measured.

Results: According to the results, the application of different concentrations of chitosan (0, 50, 100, and 150 $mg.L^{-1}$) and all hormonal treatments (BAP1, BAP1.5, and BAP1.5+NAA 0.5 $mg.L^{-1}$) caused a significant increase in the content of phenolic compounds, antioxidant capacity, and PAL activity compared to the control samples. So the application of the simultaneous and combined treatment of BAP at a concentration of 1.5 $mg.L^{-1}$ with NAA at a concentration of 0.5 $mg.L^{-1}$, along with the treatment of 100 $mg.L^{-1}$ of chitosan induced green calli of *T. polium* in in vitro culture, results in the maximum content of phenolic derivatives (1884.95 for phenol, 936.65 for o-diphenol, 1462.28 for flavonoid, 631.07 for flavone, and 662.41 for phenolic acids). As compared to the control, the antioxidant capacities (measured by

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DPPH and FRAP assays) increased by 68.34 percent and 71.92 percent, respectively. A significant increase in PAL activity (65.81%) was observed in induced calli.
Conclusion: Considering the importance of *T. polium* as a medicinal plant, chitosan, a successful elicitor, promotes the synthesis of phenolic secondary metabolites. As a result, the increase of antioxidant power and PAL activity in the callus of *T. polium*.

Keywords: Antioxidant, Elicitor, *in vitro* condition, Callus, Phenolic derivatives.

بررسی افزایش تولید مشتقات فنلی دارویی گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) با استفاده از تازن کیتوسان در شرایط *In vitro*

فهیمه قرائی[۱]، منیره چنیانی[۲*] و علی گنجعلی[۳]

۱- کارشناسی ارشد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲*- استادیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، پست الکترونیک: cheniany@um.ac.ir

۳- دانشیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: کلپوره (*Teucrium polium* L.)، گیاهی علفی از تیره نعناع است که مصارف دارویی فراوانی در طب سنتی دارد. در سال‌های اخیر اثرهای دارویی متعدد مانند ضددیابت، ضدسرطان، ضداسپاسم، کاهش‌دهنده چربی و فشار خون آن گزارش شده است. بنابراین کشت این گیاه در شرایط آزمایشگاهی برای حفظ بقاء، تکثیر و افزایش متابولیت‌های ثانویه این گونه ضروریست. از راهکارهای اساسی، استفاده از تازن‌ها در تکنیک کشت بافت گیاهی یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای افزایش متابولیت‌های ثانوی-دارویی است. کیتوسان بیوپلیمری است که سبب القای پاسخ‌های دفاعی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مسیر فنیل‌پروپانوئید و تجمع ترکیبات فنلی می‌شود. در این پژوهش با هدف بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانوی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اثر تازن زیستی کیتوسان بر برخی ترکیبات فنلی گیاه کلپوره در شرایط کشت درشیشه مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: به این منظور ریزنمونه برگ از گیاه کلپوره نگهداری شده در شرایط هیدروپونیک و تغذیه‌شده با محلول هوگلند، تهیه شد و بعد از سترون کردن با سدیم‌هیپوکلرید ۵٪ (v/v) و اتانول ۷۰٪ (v/v)، برش‌های میانی از ریزنمونه برگ تهیه گردید و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مجزا و تلفیقی هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین (BAP) (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شد. نمونه‌ها به‌مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با ظهور نشانه‌های کال‌زایی، نمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند و در پایان هفته ششم، عملیات واکشت پینه‌های القاء شده انجام شد. پینه‌ها با غلظت‌های مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تازن زیستی کیتوسان تیمار شدند. پس از گذشت ۸ هفته از رشد پینه‌ها، پینه‌های سبز جمع‌آوری و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور تهیه عصاره نهایی برای سنجش‌های بیوشیمیایی، عصاره‌گیری از پینه‌های سبز انجام شد و از این عصاره برای اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات فنلی (فنل، فلاونوئید، فلاون و اسیدهای فنلی) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH و سنجش قدرت کاهشی FRAP و سنجش میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که کاربرد کیتوسان در چهار غلظت (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و تمامی تیمارهای هورمونی (BAP_1, $BAP_{1.5}$, $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر)، سبب تأثیر افزایشی معنی‌دار در محتوی ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم PAL نسبت به نمونه شاهد در پینه‌های سبز القاء شده کلپوره شد. به‌طوری که تیمار همزمان و تلفیقی هورمون BAP در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه هورمون NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تازن زیستی کیتوسان در پینه‌های سبز القاء شده کلپوره در کشت درشیشه، موجب بیشینه محتوی مشتقات فنلی (۱۸۸۴/۹۵ برای فنل، ۹۳۶/۶۵ برای *o*-دی‌فنل، ۱۴۶۲/۲۸ برای فلاونوئید، ۶۳۱/۰۷ برای فلاون و ۶۶۲/۴۱ برای اسیدهای فنلی برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک) گردید. براساس تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که

ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده برمبنای آزمون DPPH و FRAP، به‌ترتیب موجب افزایش ۶۸/۳۴ و ۷۱/۹۲ درصدی نسبت به نمونه شاهد شد. فعالیت آنزیم PAL نیز به‌طور قابل‌توجهی افزایش ۶۵/۸۱ درصدی را نسبت به نمونه شاهد در پینه‌های القاء شده کلپوره نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت گیاه دارویی کلپوره، بکارگیری کیتوسان در نقش یک تازن‌زیستی موفق می‌تواند باعث افزایش سنتز متابولیت‌های ثانوی–مشتقات فنلی و به‌دنبال آن افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و افزایش فعالیت آنزیم PAL در پینه کلپوره در شرایط *in vitro* گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تازن، شرایط درون‌شیشه، پینه، مشتقات فنلی.

مقدمه

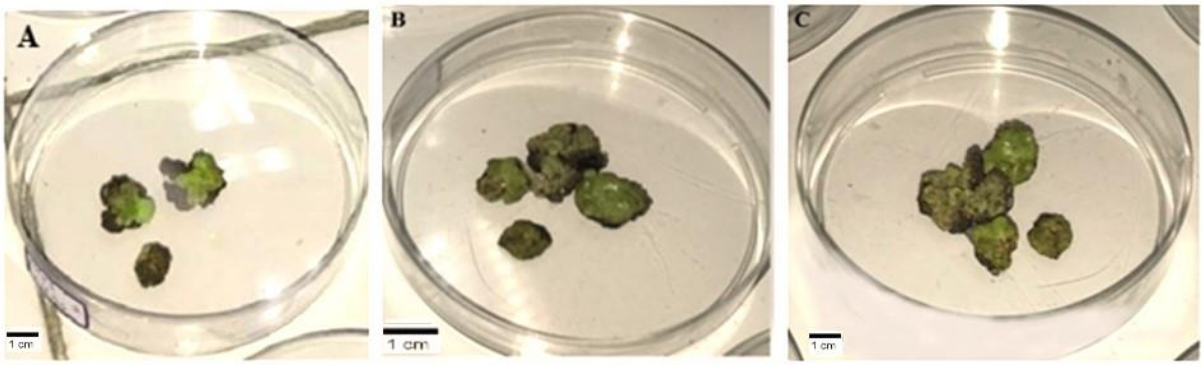
در دهه‌های اخیر، استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی باعث توسعه روزافزون گیاهان دارویی در سطح دنیا شده است. به‌طوری که کشورهای آسیایی به‌دلیل تنوع شرایط آب‌وهوایی و تنوع در پوشش گیاهی تأمین‌کننده‌های اصلی گیاهان دارویی هستند (Chandra *et al*., 2013). گیاهان دارویی طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانوی ازجمله ترپنوئیدها، فنل‌ها، تانن‌ها و آلکالوئیدها را تولید می‌کنند که به‌عنوان واسطه‌های ضروری، برای تعامل و ارتباط با سایر عوامل زنده یا غیر زنده در شرایط تنش عمل می‌کنند (Hatami *et al*., 2019). تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش از طریق کشت بافت یا سلول گیاهی جایگزین مناسبی برای استخراج مواد از کل پیکره گیاه است. زیرا بسیاری از گیاهان دارویی محصولات با ارزش زیادی تولید می‌کنند که به‌سختی در سطح انبوه قابل کشت هستند. همچنین، در مواردی میزان متابولیت‌های موجود در کشت درون شیشه بسیار بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است (Vakil & Mendhulkar, 2013). استفاده از تازن‌ها یکی از ابزارهای مهم و تأثیرگذار برای القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در کشت بافت است. تازن‌ها برای یک گیاه به‌عنوان محرک عمل می‌کنند که می‌توانند پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی را در گیاه باعث شوند (Guru *et al*., 2022). کیتوسان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است که از واحدهای D-گلوکزآمین ساخته شده و در اثر داستیله شدن کیتین بدست می‌آید (Iriti *et al*., 2010). این ترکیب غیرسمّی و تجزیه‌پذیر است و امروزه به علت ویژگی‌های ضد قارچی، محرک رشد گیاهی و فعال‌سازی ژن‌های دفاعی گیاه به‌طور گسترده استفاده می‌شود و به‌عنوان تازن زیستی کارآمد، برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در کشت بافت بسیاری از گیاهان تأیید شده است (Singh, 2016).

Teucrium polium گیاهی دارویی از تیره نعنا است که به‌طور گسترده به عنوان محصولی دارویی کشت می‌شود. این گیاه در نواحی مختلف ایران پراکنش دارد و توسط اهالی بومی نقاط مختلف با اسامی کلپوره و مریم‌نخودی شناخته می‌شود. کلپوره از نظر شاخص‌های ظاهری، گیاهی علفی و پایا است و سراسر پیکره گیاه با کرک‌های خاکستری و سفید پوشیده شده است و برگ‌های آن دندانه‌دار و بدون دمبرگ است. گل‌ها معطر و به رنگ سفید و پوشیده از کرک هستند (Stanković *et al*., 2011). مصرف دارویی این گیاه پیشینه طولانی دارد و به زمان بقراط برمی‌گردد و بخش دارویی آن عمدتاً سرشاخه‌های گلدار است. کلپوره دارای ترکیبات فعال زیستی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و تانن است که سبب از بین بردن رادیکال‌های آزاد و اثرهای آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد میکروبی این گیاه می‌شوند (Nastić *et al*., 2018). این گیاه دارای اثرهای مقوی و ضدتشنج است و مصرف آن برای رفع بیماری‌های تناسلی–ادراری مفید می‌باشد. در برخی نواحی ایران به صورت سنتی برای رفع قلب درد و درمان بیماری دیابت استفاده می‌شود (Bahramikia & Yazdanparast, 2012). کلپوره

از آن دسته از گیاهان دارویی است که به‌دلیل پراکنش زیادی که در مراتع ایران دارد، در معرض آسیب‌های جدی است. از سوی دیگر، گیاهی است که جوانه‌زنی سختی دارد و بذرهای کمی نیز تولید می‌کند. همه این عوامل باعث خطر انقراض این گونه گیاهی در ایران شده است. هر چند مطالعاتی در ارتباط با تأثیر کیتوسان بر ترکیبات ثانوی پینه کلپوره انجام نشده است، اما تأثیر مثبت این تازن بر محتوی فنل و فلاونوئید کل در کشت ریشه موئین کلپوره (*T. polium*) (Khezri *et al*., 2015)، محتوی فنل، فلاونوئید و اسید رزمارینیک ریشه موئین بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum Kotschyi* Boiss.) (Ayyobi & Fattahi, 2017) و تولید تانشیون در ریشه موئین مریم‌گلی (*Salvia miltorrhiza* Bunge.) (Zhao *et al*., 2010) تأیید شده است. برای سایر گیاهان نیز، اثر افزایشی کیتوسان بر محتوی مشتقات فنلی (فنل و فلاونوئید) پینه‌های کاهوی موج‌دار (*Lactuca undulate* Ledeb) (Mofid Bojnoordi *et al*., 2022) ارائه شده است. در مطالعه Kamalipourazad و همکاران (۲۰۱۶)، این تأثیر افزایشی کیتوسان بر مشتقات فنلی گیاه تشنه‌داری (*Scrophularia striata* Boiss.)، به افزایش فعالیت PAL نسبت داده شده است. به همین دلیل، در این مطالعه به اثر تازن کیتوسان بر میزان سنتز متابولیت‌های ثانوی- فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه این گیاه در شرایط درون‌شیشه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت طرح آماری فاکتوریل با سه تکرار زیستی، در دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد بر روی گیاه کلپوره اجرا گردید. بذر گیاه کلپوره (*T. polium*) پس از اعمال تیمارهای شکننده خواب بذر و جوانه‌زنی مقدماتی، در محیط غذایی هوگلند نگهداری و برای انجام این پژوهش، از برگ گیاه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای سترون‌کردن ریزنمونه‌های برگ از سدیم‌هیپوکلرید ۵٪ (v/v) به‌مدت ۳ دقیقه و اتانول ۷۰٪ (v/v) به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده و بعد سه نوبت با آب‌مقطر شسته شد. در زیر هود لامینار (Iran, Jaltajhiz, Jtlvcz) برش‌های میانی از برگ‌ها تهیه شد و بر روی محیط کشت MS حاوی تیمارهای منتخب هورمونی بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) (BAP_1، $BAP_{1.5}$ و $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. در مطالعات Tabarifard (۲۰۲۰)، کال‌زایی نمونه‌ها در محیط‌های کشت MS دارای تیمار مجزا و ترکیبی دو هورمون BAP (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، یعنی ۱۲ تیمار هورمونی مختلف، بررسی شدند و در نهایت، این تیمارهای منتخب بر مبنای بیشینه روند کال‌زایی ریزنمونه برگ کلپوره (۱۰۰٪ کال‌زایی) و بیشترین وزن تر و خشک پینه‌ها انتخاب شدند. نمونه‌ها به‌مدت چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با نمایان شدن نشانه‌های کال‌زایی، نمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند و در پایان هفته ششم، عملیات واکشت پینه‌های القاء شده انجام شد (شکل ۱). برای تهیه محلول پایه کیتوسان (تهیه شده از شرکت Amrica-Sigma Aldrich) ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۰/۰۰۵ گرم کیتوزان وزن و در ۹۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۰/۱٪ آبی (v/v) به آن اضافه گردید و محلول نهایی به‌مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، pH روی ۵/۸ تنظیم شد و اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Kazi *et al*., 2019). از این محلول برای تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان استفاده و برای تیماردهی بکار برده شدند. پینه‌ها با تازن زیستی کیتوسان و با غلظت‌های مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تیمار شدند و در پایان هفته هشتم، پینه‌ها برای بررسی صفات بیوشیمیایی، جمع‌آوری و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱- پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (*Teucrium polium*) در محیط MS حاوی هورمون

Figure 1. Calli obtained from *Teucrium polium* leaf explant on MS medium supplemented with hormones A: BAP_1 ($mg.L^{-1}$), B: $BAP_{1.5}$ ($mg.L^{-1}$), and C: $BAP_{1.5} + NAA_{0.5}$ ($mg.L^{-1}$) Scale bar = 1 cm

عصاره‌گیری برای سنجش متابولیت‌های ثانوی- فنلی

در ابتدا عصاره‌گیری برای استخراج ترکیبات فنلی انجام شد (Annegowda *et al*., 2012). پینه‌های سبز هشت هفته‌ای به‌مدت ۲۴ ساعت در آون (Germany, Memmert, 5-1486) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس پینه‌ها در هاون چینی پودر شدند و به پودر حاصل، متانول ۸۰٪ (v/v) با نسبت ۱ به ۱۰۰ افزوده شد. شیشه‌های حاوی عصاره به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Japan, Parsonic, 2600S) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۵٪ ± ۲۸ (KHz) قرار داده شدند. در نهایت با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در زیر هود معمولی (Iran, Knowledge Enterprise) در شرایط تاریکی مطلق، برای خشک شدن کامل عصاره‌ها قرار گرفتند و در پایان عصاره خشک وزن شد و با اضافه کردن متانول ۸۰٪ (v/v)، از این عصاره نهایی برای انجام کلیه سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

سنجش محتوی فنل‌کل

سنجش محتوی فنل کل به شیوه فولین-سیوکالچو (Folin-Ciocalteu) انجام شد. به این منظور، ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰٪ آبی (v/v) و ۲ میلی‌لیتر سدیم‌کربنات ۷/۵٪ (w/v) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی هر نمونه اضافه گردید. سپس ۱/۵ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند و جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. رنگ محلول مورد سنجش از آبی روشن تا آبی تیره (با توجه به میزان فنل کل) متغیر بود. محتوی فنل کل برمبنای منحنی استاندارد اسید گالیک و معادله خط $y= 0.0032 x + 0.0313$ محاسبه شد و نتایج براساس میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن خشک پینه ارائه گردید (Marinova *et al*., 2005).

سنجش محتوی *o*-دی فنل کل

برای سنجش محتوی *o*-دی فنل نمونه‌ها از روش Carrasco-Pancorbo و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی هر نمونه ۲ میلی‌لیتر متانول ۵۰٪ (v/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر مولیبدات سدیم دو آبه (w/v) اضافه شد. بعد از ۱۸ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت گردید. محتوی *o*-دی فنل بر مبنای منحنی استاندارد اسید گالیک به صورت $y= 0.0042 x + 0.067$ محاسبه شد و برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک نمونه‌های پینه ارائه گردید.

سنجش محتوی فلاونوئیدها

برای اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید براساس روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹)، ۳۰۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه به ۳/۴ میلی‌لیتر متانول ۳۰٪ (v/v) و ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۰/۵ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۰/۳ مولار اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به نمونه‌ها افزوده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. براساس منحنی استاندارد کاتچین، معادله خط به‌صورت $y= 0.0041 x + 0.0258$ رسم و برحسب میلی‌گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم وزن خشک پینه‌ها محاسبه شد.

سنجش محتوی فلاون‌ها

برای سنجش محتوی فلاون، ۲۵۰ میکرولیتر عصاره به ۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ (w/v) و ۵۰ میکرولیتر استات‌پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. در ادامه، ۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰٪ (v/v) و ۱/۴ میلی‌لیتر آب مقطر به هر نمونه اضافه گردید و به حجم نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. محتوی فلاون عصاره‌ها بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین و معادله خط $y= 0.0022 x – 0.007$ انجام شد و برحسب میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه‌ها گزارش گردید (Kosalec *et al.*, 2004).

سنجش محتوی اسیدهای فنلی

۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به اضافه ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب و ۲۵۰ میلی‌لیتر کلرید هیدروژن و ۲۵۰ میکرولیتر معرف آرنو [مولیبدات سدیم آبی ۱۰٪ (w/w) و نیتریت سدیم ۱۰٪ (w/v)] تهیه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفتند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم آبی ۵۰٪ (w/v) به نمونه‌ها اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش شد. محتوی اسیدهای فنلی عصاره‌های متانولی برمبنای معادله خط $y= 0.0041 x + 0.0258$ حاصل از منحنی استاندارد اسید کافئیک و برحسب میلی‌گرم اسید کافئیک در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک نمونه‌ها ارائه شد (Matkowski, 2008).

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدان به روش DPPH

ارزیابی توان آنتی‌اکسیدان نمونه‌ها طبق روش De Torre و همکاران (۲۰۱۹) و براساس سیستم الایزا (America, Gentaur, STZ 100) و در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. در هر خانه از پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) اضافه شد. در ادامه نمونه بلانک و شاهد هم تهیه شد. برای آماده‌سازی نمونه بلانک از ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص و برای تهیه نمونه شاهد از ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH و ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت و بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ثبت شد. برای سنجش توان آنتی‌اکسیدانی از معادله $\%= [1-(AS-AB)/(AC-AB)]*100$ استفاده شد که در رابطه ذکر شده، AS: جذب نمونه عصاره، AB: جذب نمونه بلانک و AC: جذب نمونه کنترل می‌باشد. درنهایت نتایج ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و به‌صورت IC_{50} (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) ارائه گردید.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل به روش احیاء یون آهن

برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل نمونه‌ها، از روش Li و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. در این روش، ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۲۰ میکرولیتر محلول TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine) تازه تهیه شده (محلول ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم، محلول ۱۰ میلی‌مولار و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن ۳ آبه با

نسبت‌های حجمی ۱:۱:۱۰ مخلوط و بعد از نیم ساعت استراحت در شرایط تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا خوانده شد و براساس معادله خط y= 0.0165 x + 1.323 بدست آمده از غلظت‌های مختلف سولفات‌آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها محاسبه شد. برای تهیه محلول سولفات آهن، یک میلی‌گرم سولفات آهن در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. مقادیر ۱۰، ۲۰،۳۰ و ۴۰ میکرولیتر از محلول پایه با آب مقطر به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد و پس از کنش با معرف‌های مشابه در بالا، منحنی استاندارد براساس غلظت و به‌صورت جذب نوری آن در طول موج ۶۳۰ نانومتر رسم شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

۰/۰۵ میلی‌گرم بافت تازه پینه با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار بافر تریس و اسید کلریدریک با اسیدیته ۸/۵ حاوی ۱۵ میلی‌مولار بتا-مرکاپتو اتانول) همگن شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه با نیروی ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله دستگاه سانتریفوژ (Germany, Hettich, 2406)، سانتریفوژ شد. در نهایت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. فعالیت آنزیم PAL براساس میزان تبدیل فنیل‌آلانین به اسید سینامیک تعیین می‌شود. به این منظور، ۸۰۰ میکرولیتر بافر بورات ۰/۰۵ مولار (pH=8) با ۱ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در پایان، ۰/۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک نرمال به مخلوط واکنش اضافه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Japan, Jasco, 7800) خوانش شد و فعالیت ویژه آنزیم براساس ضریب خاموشی $M^{-1}CM^{-1}$ ۹۵۰ محاسبه و برحسب واحد آنزیمی در گرم وزن تر نمونه بیان گردید (Zucker *et al*., 1965).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۵) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال خطای ۵٪ استفاده شد و نمودارهای مربوط به‌وسیله نرم‌افزار EXCEL (آفیس ۲۰۱۶) رسم شدند.

نتایج

بررسی صفات بیوشیمیایی تحت تأثیر هورمون و تازن کیتوسان در هنگام کال‌زایی

محیط‌های کشت BAP_1، $BAP_{1.5}$، و $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$، میلی‌گرم در لیتر، بر مبنای صفات کال‌زایی (بیشینه روند کال‌زایی، وزن خشک و وزن تر پینه‌ها) به‌عنوان محیط‌های هورمونی منتخب در نظر گرفته شدند (Tabarifard, 2020). کال‌زایی ۱۰۰٪ در همه تیمارهای بررسی شده مشاهده گردید. پس از مراحل دوباره کشت در محیط MS، تیماردهی با غلظت‌های مختلف تازن کیتوسان انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تازن کیتوسان به‌تنهایی و در برهم‌کنش با تیمارهای هورمونی، تأثیر معنی‌داری بر محتوی کل مشتقات فنلی سنجش شده، ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده و فعالیت آنزیم PAL پینه‌ها داشت (جدول ۱).

جدول ۱ـ تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کنندهای رشد و کیتوزان بر برخی صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (***Teucrium polium***)

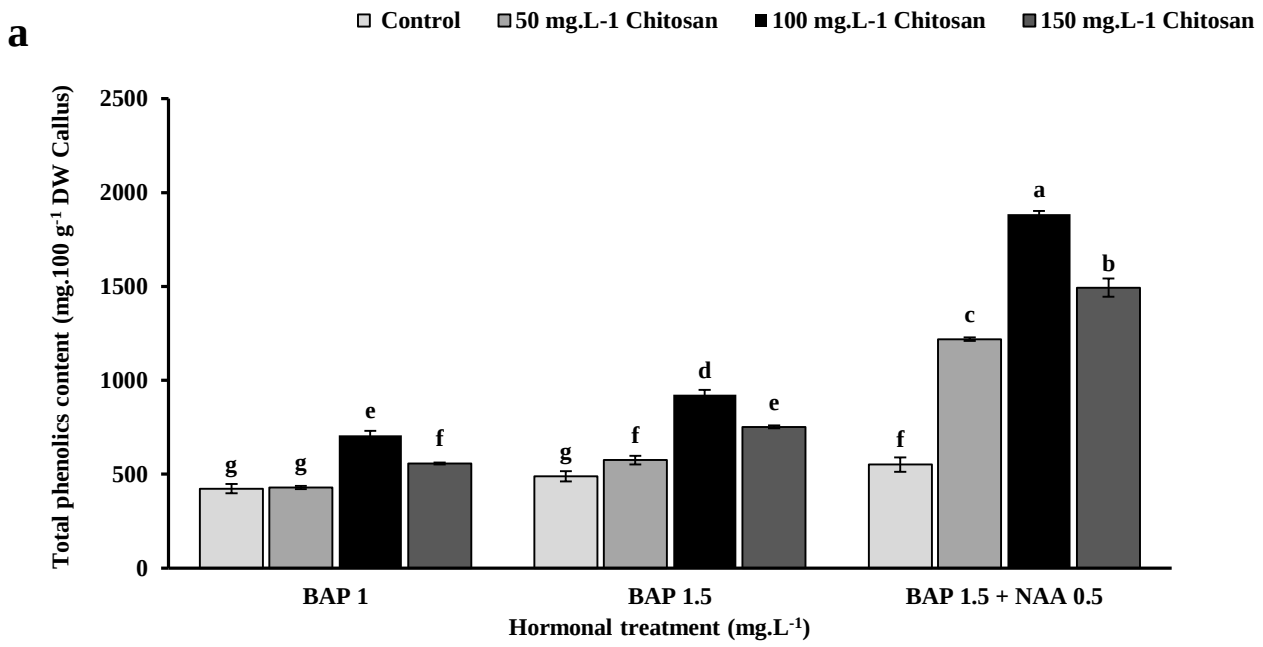
Table 1. **ANOVA of plant growth regulators and chitosan effects on some phytochemical and physiological characteristics of *Teucrium polium* leaf-derived calli**

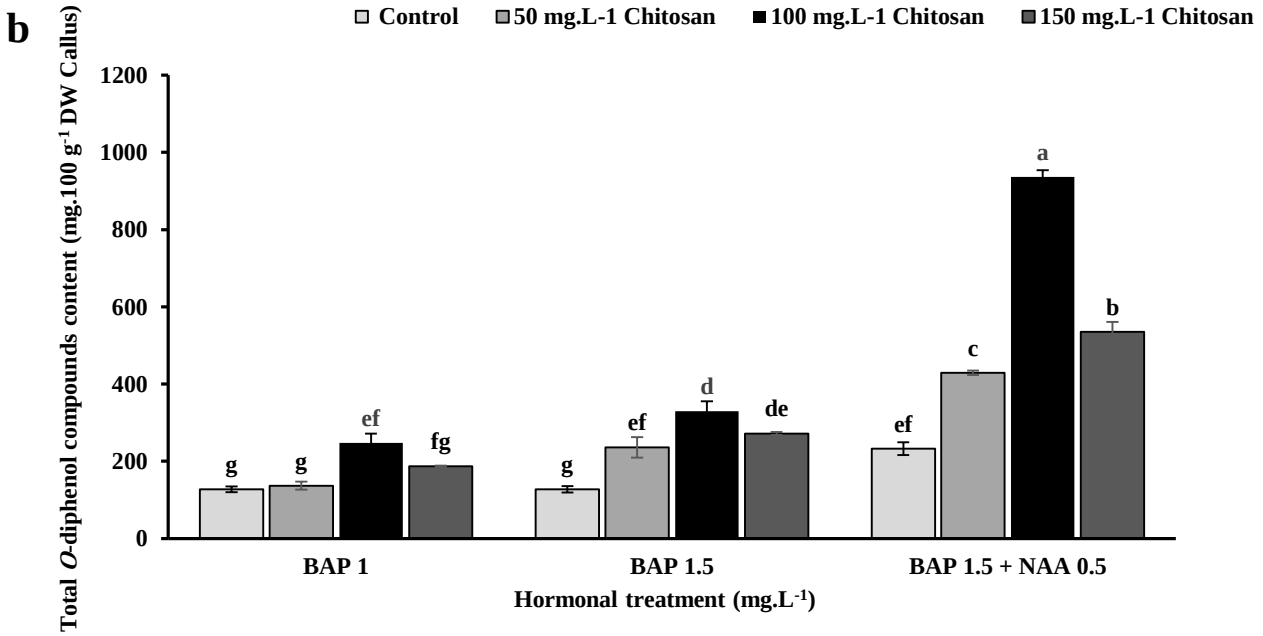
S.O.V.	d.f.	M.S.							
		TPC	DPC	TFC	FLC	PAC	DPPH	FRAP	PAL
Plant growth regulator (PGR)	2	19239.4*	555319.04*	2566823.46*	218975.7*	289931.11*	842.9*	93390.6*	10.06*
Chitosan (CH)	3	758362.6*	873761.17*	3577812.26*	427599.5*	424044.3*	2279.6*	186466.05*	1386.8*
PGR × CH	6	176769.2*	328635.1*	958536.9*	209257.3*	118738.9*	254.3*	35777.3*	5.39*
Experimental error	24	44946.7	15998.05	66688.2	2362.1	25710.3	125.52	7839.7	8.41
C.V. (%)		7.16	6.31	6.55	4.43	5.37	1.42	7.59	1.12

*: significant at 5% probability level; TPC: Total phenolics content, DPC: Total *O*-diphenol compounds content, TFC: Total flavonoids content, FLC: Total flavone compounds content, PAC: Phenolic acids content, DPPH: Radical scavenging activity, FRAP: Ferric reducing antioxidant power, PAL: Phenylalanine ammonia lyase activity

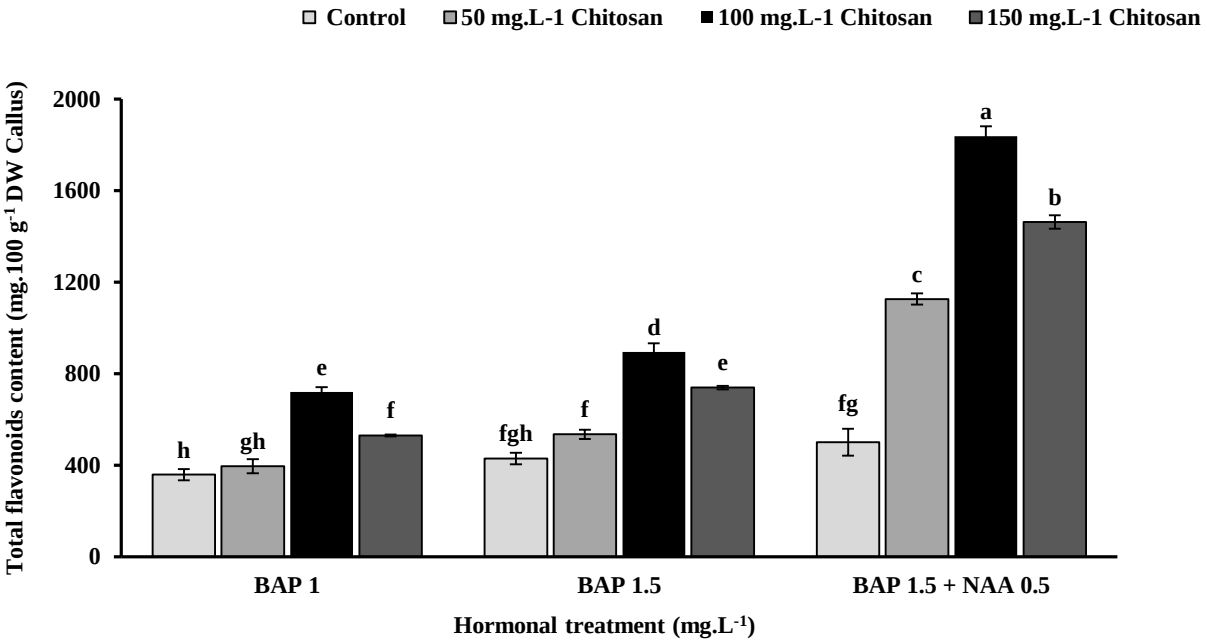
بررسی میانگین داده‌ها نشان داد که میزان فنل کل در دامنه نوسان محتوی از غلظت ۴۳/۰۱ ± ۴۲۲/۹۸ تا ۲۹/۲۷± ۱۸۸۴/۹۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پینه بود. بیشینه غلظت فنل کل در تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان و شرایط هورمونی $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که سبب افزایش ۷۰/۷ درصدی محتوی فنل کل نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۲– a).

این نتایج نشان داد که بیشترین محتوی *o*–دی فنل (۳۹/۷۸ ± ۹۳۶/۵۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پینه) در تیمار همزمان $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان بود. دو تیمار هورمونی دیگر، حتی در شرایط تیمار با غلظت‌های مختلف کیتوسان، از اثر افزایشی معنی‌دار و قابل‌توجه برای ترکیبات *o*–دی فنل عصاره‌ها برخوردار نبودند (شکل ۲– b).

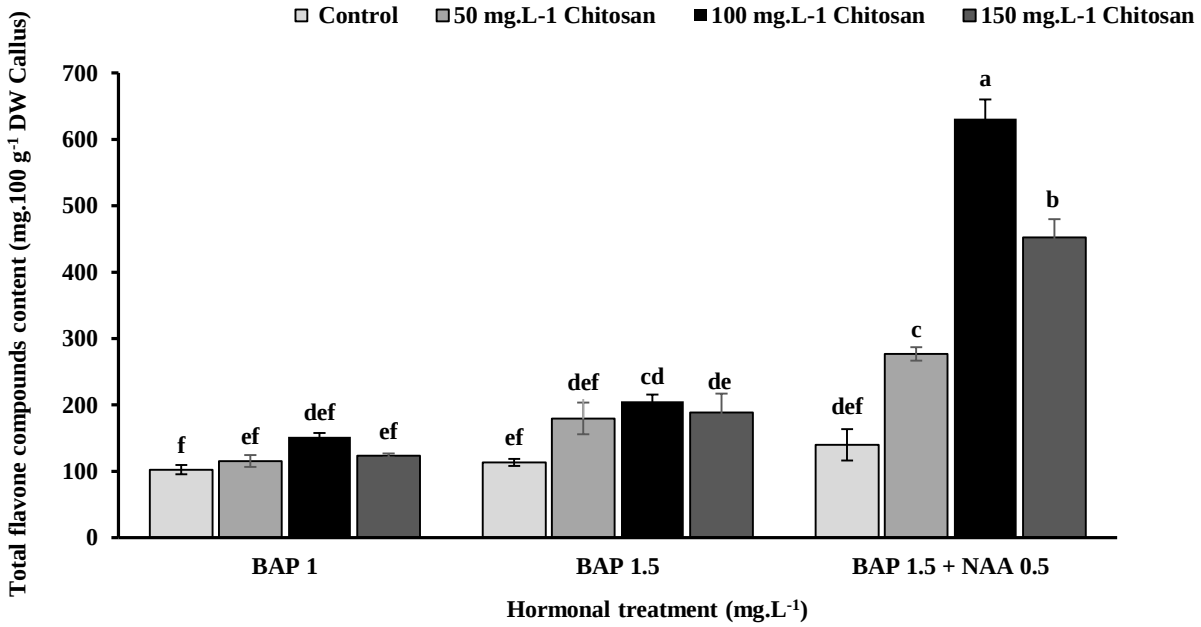

a
Control
50 mg.L-1 Chitosan
100 mg.L-1 Chitosan
150 mg.L-1 Chitosan
Total phenolics content (mg.100 g-1 DW Callus)
2500
2000
1500
1000
500
0
g g e f g f d e f c a b
BAP 1
BAP 1.5
BAP 1.5 + NAA 0.5
Hormonal treatment (mg.L-1)

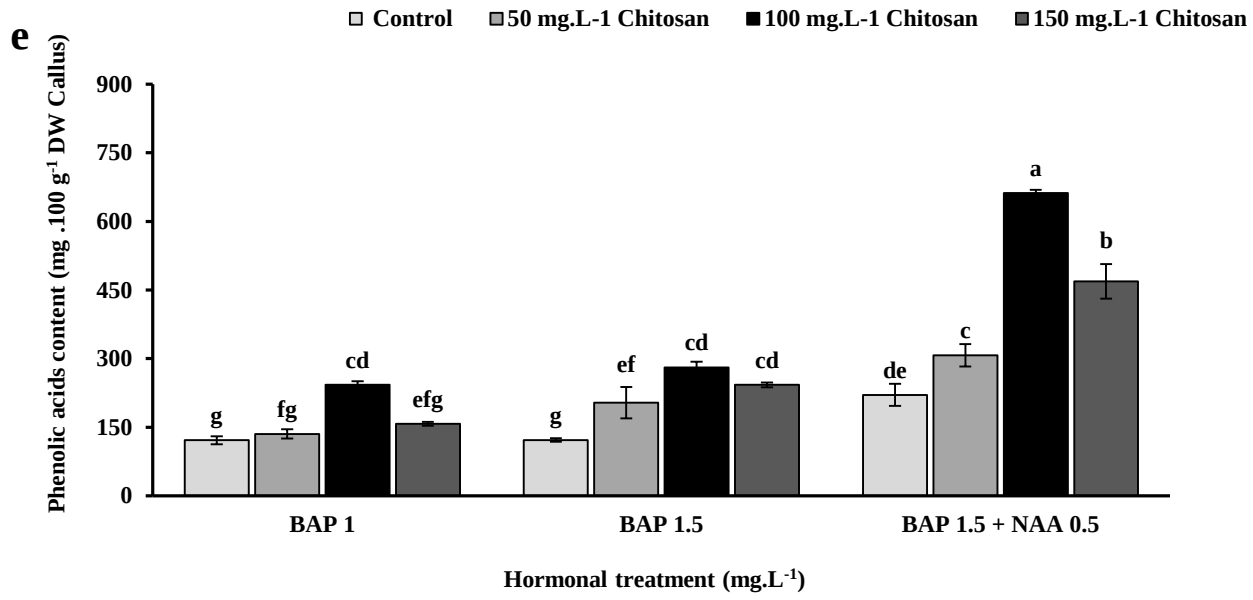

b
Control
50 mg.L-1 Chitosan
100 mg.L-1 Chitosan
150 mg.L-1 Chitosan
Total O-diphenol compounds content (mg.100 g-1 DW Callus)
1200
1000
800
600
400
200
0
g g ef fg g ef d de ef c a b
BAP 1
BAP 1.5
BAP 1.5 + NAA 0.5
Hormonal treatment (mg.L-1)

c


Control
50 mg.L-1 Chitosan
100 mg.L-1 Chitosan
150 mg.L-1 Chitosan
Total flavonoids content (mg.100 g-1 DW Callus)
2000
1600
1200
800
400
0
h
gh
e
f
fgh
f
d
e
fg
c
a
b
BAP 1
BAP 1.5
BAP 1.5 + NAA 0.5
Hormonal treatment (mg.L-1)

d


Control
50 mg.L-1 Chitosan
100 mg.L-1 Chitosan
150 mg.L-1 Chitosan
Total flavone compounds content (mg.100 g-1 DW Callus)
700
600
500
400
300
200
100
0
f
ef
def
ef
ef
def
cd
de
def
c
a
b
BAP 1
BAP 1.5
BAP 1.5 + NAA 0.5
Hormonal treatment (mg.L-1)



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون × کیتوزان بر برخی صفات فیتوشیمیایی (**a-e**) پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (***Teucrium polium***)

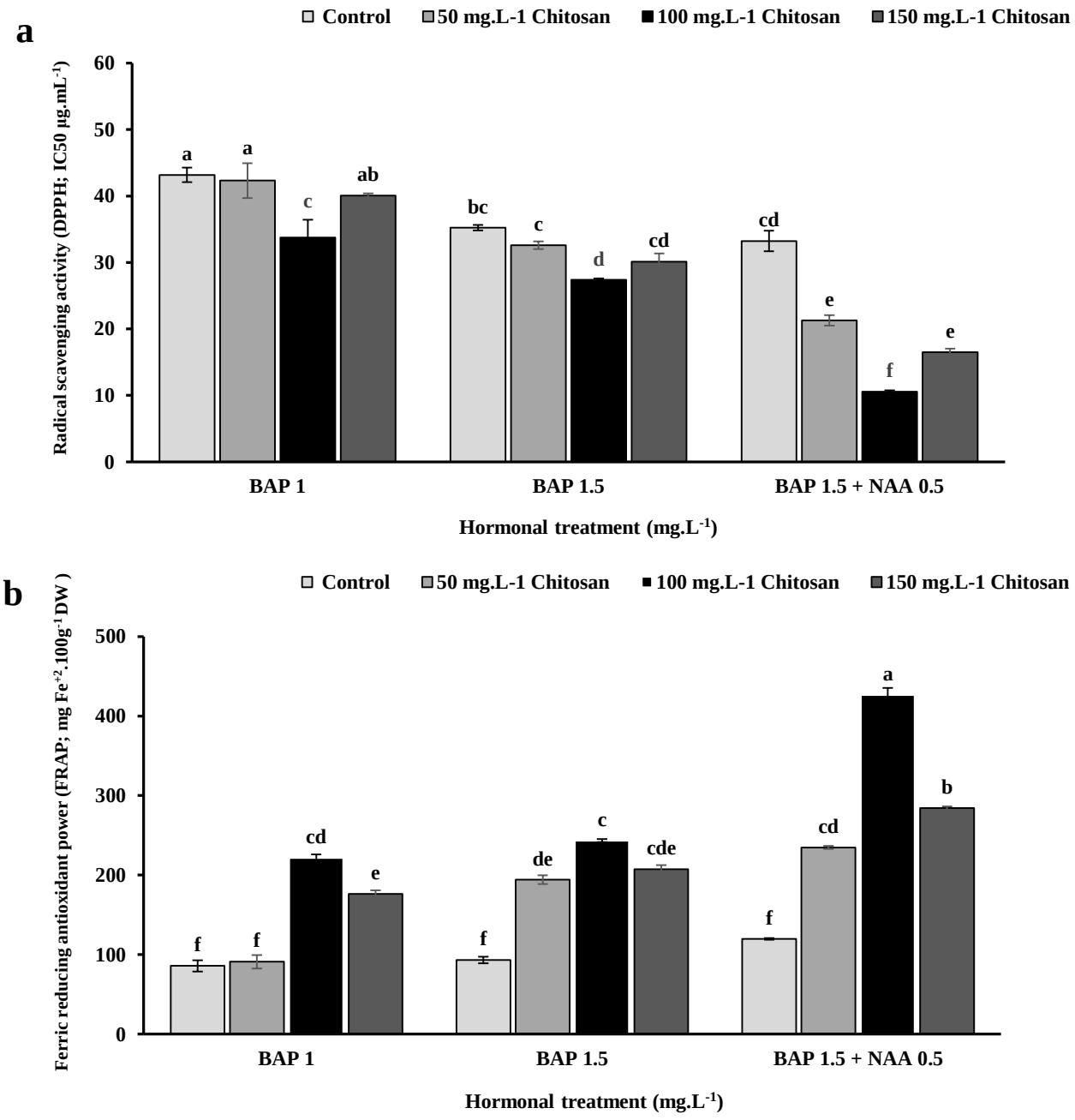
Figure 2. Means comparison of plant growth regulators × chitosan interaction on some phytochemical characteristics (a-e) of *Teucrium polium* leaf-derived calli

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بررسی و مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده از بررسی محتوی فلاونوئید و فلاون کل در پینه‌های حاصل از برگ کلپوره نشان داد که بیشترین محتوی این دسته از مشتقات فنلی در محیط کشت دارای تیمار هورمونی $BAP_{1.5}$+$NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و تازن کیتوسان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. به‌طوری که بیشینه محتوی فلاونوئید و فلاون به‌ترتیب شامل ۷۳/۴۵± ۱۸۳۷/۶۶ و ۵۰/۲۷ ± ۶۳۱/۰۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک پینه‌ها بود (شکل ۲- c و d).

طبق نتایج حاصل از این پژوهش، بیشترین محتوی اسیدهای فنلی نیز در تیمار هورمونی $BAP_{1.5}$+$NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تازن کیتوسان مشاهده شد (محتوی ۱۱/۴۹ ± ۶۶۲/۴۱ میلی‌گرم اسیدهای فنلی در ۱۰۰ گرم وزن‌خشک پینه) (شکل ۲- e). به‌نحوی که نسبت به نمونه شاهد خود، افزایش ۳ برابری نشان داد. در تیمارهای هورمونی BAP_1 و $BAP_{1.5}$ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین غلظت کیتوسان به‌ترتیب موجب افزایش تنها ۱/۹۹ و ۲/۳ برابری محتوی این دسته از ترکیبات نسبت به نمونه‌های شاهد خود شدند.

در این بررسی بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی که نشان‌دهنده کمترین میزان IC_{50} است در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تازن کیتوسان (متعلق به تیمار هورمونی تلفیقی) مشاهده شد (شکل ۳- a). همچنین، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدست آمده از آزمون FRAP مربوط به نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تازن کیتوسان در تمامی غلظت‌های هورمونی بود (شکل ۳- b). همواره ارتباط مستقیمی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با محتوی مشتقات فنلی در پینه‌های القاء شده با تازن‌ها مشاهده شد.

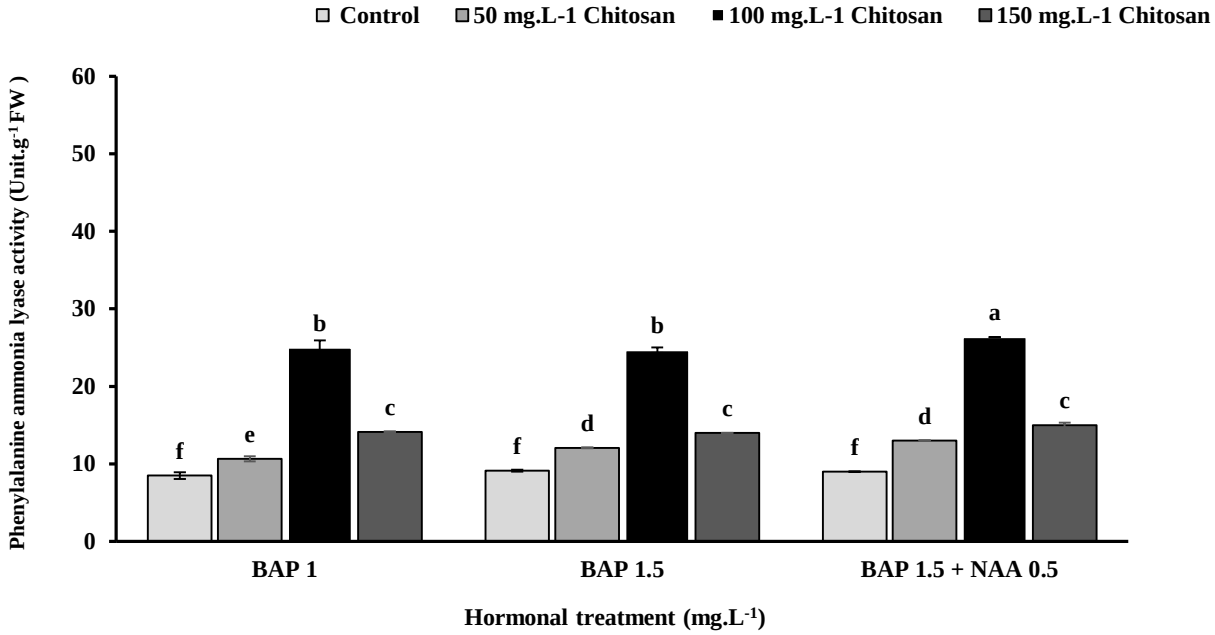


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون × کیتوزان بر ظرفیت آنتی اکسیدانی **DPPH** و **FRAP** (**a-b**) پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (***Teucrium polium***)

Figure 3. Means comparison of plant growth regulators × chitosan interaction on DPPH and FRAP antioxidant capacity (a-b) of *Teucrium polium* leaf-derived calli

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

براساس نتایج حاصل از داده‌های این پژوهش، مشخص شد که بیشینه فعالیت آنزیم PAL در شرایط تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان در محیط کشت MS انجام شد که دارای تیمار هورمونی $BAP_{1.5}$+$NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر بود (افزایش ۲/۹ برابری نسبت به نمونه شاهد) (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون × کیتوزان بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (***Teucrium polium***)

Figure 4. Means comparison of plant growth regulators × chitosan interaction on phenylalanine ammonia lyase activity of *Teucrium polium* leaf-derived calli

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

جدول ۲- همبستگی پیرسون صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره (***Teucrium polium***) تحت تأثیر تیمارهای هورمونی و کیتوزان

Table 2. Pearson's correlation of some phytochemical and physiological characteristics of *Teucrium polium* leaf-derived calli affected by plant growth regulators and chitosan treatments

	Phenol	***O*-diphenols**	**Flavonoids**	**Flavone**	**Phenolic acids**	**DPPH**	**FRAP**	**PAL**
Phenol	1							
O-diphenols	0.962**	1						
Flavonoids	0.994**	0.959**	1					
Flavones	0.960**	0.960**	0.958**	1				
Phenolic acids	0.960**	0.976**	0.964**	0.954**	1			
DPPH	0.994**	-0.907**	-0.936**	-0.897**	0.912**	1		
FRAP	0.915**	0.926**	0.925**	0.923**	0.923**	-0.874**	1	
PAL	0.594**	0.615**	0.626**	0.532**	0.625**	-0.539**	0.771**	1

**: significant at 1% probability level; DPPH: Radical scavenging activity, FRAP: Ferric reducing antioxidant power, PAL: Phenylalanine ammonia lyase activity

در این مطالعه ارتباط بین مشتقات فنلی، فعالیت آنزیم PAL و ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدان براساس ضریب همبستگی پیرسون ($p \leq 0.01$) ارزیابی شد. قوی‌ترین همبستگی‌ها (برمبنای ضریب همبستگی پیرسون) بین محتویات فنل با ترکیبات فلاونوئید ($r^2= 0.962$) و آزمون DPPH ($r^2= 0.994$) مشاهده شد (جدول ۲). براساس نتایج بدست آمده مشخص شد که با افزایش محتوی ترکیبات فنلی، توان آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیز افزایش می‌یابد. ظرفیت

آنتی‌اکسیدانی کل به روش احیاء یون آهن III (FRAP) نیز همبستگی معنی‌دار زیادی (بیشتر از ۰/۹) را با محتوی فنل، *o*-دی فنل، فلاون، فلاونوئید، اسیدهای فنلی و نیز فعالیت آنزیم PAL نشان داد ($P \leq 0.01$).

بحث

ترکیبات فنلی از ترکیبات فیتوشیمیایی، با انتشار وسیع در گیاهان هستند (Gaspar *et al*., 2002). نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین محتوی فنل کل در تیمار همزمان $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان حاصل شد. هم‌راستا با نتایج بدست آمده از این پژوهش، Ayyobi و Fattahi (۲۰۱۷) مطالعه‌ای روی گیاه بادرنجبویه دنایی (*D. Kotschyi*) انجام دادند. در این مطالعه اثر کیتوسان در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر رشد ریشه‌های موئین تولیدشده در شرایط *in vitro* بررسی شد و بررسی داده‌ها نشان داد که کیتوسان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب بیشترین میزان تولید ترکیبات فنل کل در ریشه‌های تراریخت می‌گردد. Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نیز در پژوهشی اثر تحریکی کیتوسان بر میزان تولید ترکیبات ثانوی (فنل کل) گیاه مریم‌گلی (*S. miltiorrhiza*) را در شرایط کشت بافت بررسی و بیان کردند که با افزایش غلظت کیتوسان، میزان تولید و تجمع این دسته از ترکیبات در ریشه‌های موئین افزایش یافت. مسلم شده است که کیتوسان سبب القاء بیان ژن‌های درگیر در تولید ترکیبات فنلی می‌شود، به‌طوری که افزایش رونویسی mRNA آنزیم PAL و فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئید و به‌دنبال آن افزایش تولید مشتقات فنلی تأیید شده است (Anterola *et al*., 2002). اسید سینامیک تولید شده توسط آنزیم PAL به‌عنوان ماده اولیه در مسیرهای بیوسنتزی مصرف می‌شود و در ادامه کیتوسان، سبب افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های سینامات۴-هیدروکسیلاز (C_4H) و ۴-کومارات کوآنزیم A لیگاز (4CL) می‌گردد. به‌دنبال این افزایش، سنتز ترکیباتی که زیرواحد سازنده انواع مختلف متابولیت‌های فنلی هستند افزایش می‌یابد. در این پژوهش برهم‌کنش دو عامل هورمون و تازن کیتوسان، نشان داد که تیمار هورمونی $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و کیتوسان ۱۰۰ میلی‌گرم، بیشترین *o*-دی فنل‌ها را موجب گردید. برای تأیید نتایج این پژوهش می‌توان به مطالعه Naderi و همکاران (۲۰۱۵) پرداخت که پژوهشی در شرایط *in vitro* و برای ارزیابی تأثیر کیتوسان بر گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) انجام دادند و مشخص کردند که تازن کیتوسان سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز و به‌دنبال آن افزایش سنتز *o*-دی فنل‌ها گردید. *o*-دی فنل‌ها توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و از مونو فنل‌ها ایجاد می‌شوند. کیتوسان ضمن افزایش بیان ژن آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز موجب می‌گردد تا مونو فنل‌های بیشتری تبدیل به *o*-دی فنل‌ها شود. در نتیجه محتوی این دسته از ترکیبات افزایش می‌یابد.

فلاونوئیدها و فلاون‌ها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانوی پلی‌فنلی هستند که در گیاهان وجود دارند و دارای خواص زیستی متعدد ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضد التهابی می‌باشند (Chu *et al*., 2000; Aslani *et al*., 2023). بیشترین محتوی این دسته از ترکیبات فنلی (فلاونوئید و فلاون) در مطالعه پیش‌رو، در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان در محیط MS دارای $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. Ayyobi و Fattahi (۲۰۱۷) مشخص کردند که کاربرد تازن زیستی کیتوسان، اثر افزایشی بر میزان سنتز فلاونوئیدهای ریشه‌های تراریخته بادرنجبویه دنایی (*D. Kotschi*) دارد. تجزیه‌وتحلیل داده‌های پژوهشی دیگر نشان داد که تازن کیتوسان اثر مثبت بر سنتز ترکیبات فنلی (فلاونوئیدها) در شرایط کشت بافت گیاه پلکترانتوس آمبوینیکاس (*Coleus aromaticos*) دارد (Govindaraju & Arulselvi, 2018). بر پایه تحقیقات، کیتوسان دارای اثر تحریکی قابل توجه بر بیان ژن‌های آنزیم‌های مؤثر در مسیر

سنتز فلاونوئیدها است. این تازن سبب افزایش بیان ژن چالکون سنتاز (*CHS*) و فلاونوئید-۳-هیدروکسیلاز (*F3H*) که دو آنزیم مهم در مسیر سنتز فلاونوئیدها هستند می‌گردد. به‌دنبال افزایش بیان ژن، سطح فعالیت این دو آنزیم افزایش یافته و میزان سنتز نارینژنین افزایش پیدا می‌کند. در ادامه مسیر بیوسنتزی، نارینژنین‌های تولیدی توسط آنزیم فلاونوئید-۳-هیدروکسیلاز (F_3H) تبدیل به انواع مختلف فلاونوئیدها شده و از این طریق بیوسنتز انواعی از فلاونوئیدها مانند روتین و کوئرستین افزایش می‌یابد (Jiao *et al*., 2018).

مسلم است که بخش مهمی از ارزش دارویی گیاهان تیره نعناع وابسته به حضور انواع مختلف اسیدهای فنلی است (Li *et al*., 2013). اسید کافئیک، اسید رزمارینیک و اسید سالویانولیک رایج‌ترین اسیدهای فنلی گزارش شده در تیره نعناع هستند (Scarpati & Oriente, 1958). در این تحقیق، بیشترین محتوی اسیدهای فنلی در تیمار هورمونی $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تازن کیتوسان مشاهده شد. Jami و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه‌ای بر روی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) به بررسی اثر کیتوسان (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان سنتز ترکیبات فنلی پرداختند و غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان را به‌عنوان مؤثرترین غلظت برای ایجاد بیشترین میزان اسیدهای فنلی ازجمله اسید گالیک و اسید کافئیک معرفی کردند. هرچند غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز سنتز اسید رزمارینیک را به شدت افزایش داد. اسید رزمارینیک واحد ساختاری مرکزی برای تولید اسیدهای فنلی پیچیده‌تر است. بیوسنتز اسید رزمارینیک با متراکم شدن دو ترکیب ۴ـکوماریل کوآ و دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید که به‌ترتیب از پیش‌سازهای اولیه فنیل‌آلانین و تیروزین تولید می‌شوند آغاز می‌گردد. فنیل‌آلانین از طریق مسیر فنیل پروپانوئید به اسید کافئیک تبدیل و بعد توسط آنزیم PAL به ۴ـکوماریل بنزیل تبدیل می‌شود. با افزایش فعالیت PAL، متأثر از کیتوسان فنیل‌آلانین‌های بیشتری تولید می‌شوند و می‌توانند تبدیل به اسید کافئیک و در نهایت اسید رزمارینیک شوند و اسیدهای فنلی پیچیده‌تر را تولید کنند (Sabarre & Yagonia-Lobarbio, 2021).

آزمون DPPH یکی از پرکاربردترین روش برای تخمین محتوی آنتی‌اکسیدان است (Chung *et al*., 2006). در بررسی Ayyobi و Fattahi (۲۰۱۷)، به تأثیر تازن کیتوسان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) ریشه‌های موئین گیاه بادرنجبویه دنایی (*D. kotschyi*) پرداخته شد و نتایج حکایت از این داشت که کمترین محتوی IC_{50} در تیمار کیتوسان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. برپایه گزارش‌های Jami و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH گیاه نوروزک (*S. leriifolia*) تحت تیمار با تازن کیتوسان نشان داد که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان و افزایش محتوی ترکیبات فنلی هم‌راستا با یکدیگر هستند. در سه تیمار هورمونی مطالعه شده در این پژوهش، اعمال غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان، به‌ترتیب افزایش ۷۲، ۶۱ و ۶۲ درصد در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به نمونه شاهد در هر تیمار هورمونی را موجب گردید، هرچند بیشینه این افزایش متعلق به تیمار هورمونی $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر بود. باید بیان کرد که آزمون DPPH بر مبنای دهندگی الکترون و یا هیدروژن است، در حالی که آزمون FRAP تنها به بررسی قدرت دهندگی الکترون می‌پردازد. یک پاسخ مهم سلول‌های گیاهی در برابر کیتوسان، تولید انواع کنشگر اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید O^{-2}، هیدروژن پراکسید H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل OH هستند که بسیار سمّی و واکنشگر می‌باشند. ROSهای تولید شده در سلول گیاهی به‌وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی کنترل می‌شوند (Li *et al*., 2013). این کنترل توسط متابولیت‌هایی مانند گلوتاتیون، آسکوربات، فلاونوئیدها و آنزیم‌های روبندگی ROS مانند پراکسیدازها و پلی‌فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز انجام می‌شود (Wink, 2010). این

آنزیم‌ها نقش مهمی در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد در سلول گیاه دارند. با توجه به گونه گیاهی و شدت تنش، میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می‌کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوسان از طریق سازوکارهای مختلفی مانند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز) به‌عنوان یک جاروب‌گر ROS عمل می‌کند (Harish Prashanth *et al.*, 2007). طبق نتایج حاصل از داده‌های این پژوهش، مشاهده شد که بیشینه فعالیت آنزیم PAL در شرایط تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان در محیط کشت دارای تیمار هورمونی $BAP_{1.5}+NAA_{0.5}$ میلی‌گرم در لیتر بود. Zhau و همکاران (۲۰۱۰) به مطالعه اثر کیتوسان در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در گیاه مریم‌گلی (*S. miltiorrhiaz*) پرداختند و بیان کردند که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان موجب بیشترین فعالیت آنزیم PAL می‌گردد که هم‌راستا با نتایج این پژوهش است. Mahdavian fard و همکاران (۲۰۲۱) پژوهشی بر روی گیاه وارنگ‌بو (*Melissa officinalis* L.) در شرایط کشت بافت انجام دادند و بیان کردند که تازن کیتوسان سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL می‌شود. البته، بیان شده است که کیتوسان به‌عنوان یک محرک زیستی به ترکیبات دیواره سلولی حمله می‌کند و در پاسخ به این محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. بعد از شناسایی کیتوسان توسط محرک، پیام‌دهی آغاز می‌شود که نتیجه آن افزایش غلظت کلسیم سیتوپلاسمی است. به‌دنبال آن مسیر آبشاری MAP کینازی فعال شده و رونویسی و بیان ژن *PAL* افزایش می‌یابد (Wink, 2010).

در مجموع، نتایج این پژوهش تأکید می‌کند که کاربرد تازن زیستی کیتوسان در غلظت بهینه بدست آمده (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند بر میزان تولید متابولیت‌های دارویی- مشتقات فنلی و توان آنتی‌اکسیدان پینه‌های القاء شده کلپوره، در شرایط هورمونی BAP و NAA مؤثر باشد. همچنین، ترغیب فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان یکی از سازوکارهای عملکردی کیتوسان در روند افزایش محتوی مشتقات فنلی پیشنهاد می‌گردد. ازاین‌رو، تیماردهی با تازن کیتوسان (در غلظت بهینه)، برای افزایش خاصیت دارویی کلپوره در شرایط *in vitro* پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبارات متمرکز معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (کد طرح به شماره ۳/۵۵۰۸۷) تأمین شده است. ازاین‌رو، از مساعدت این عزیزان قدردانی می‌گردد.

References

- Annegowda, H.V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A.A. and Mansor, S.M., 2012. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. Journal of Food Science and Technology, 49(4): 510-514.
- Anterola, A.M., Jeon, J.H. and Davin, L.B., 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Journal of Biological Chemistry, 277(21): 18272-18280.
- Aslani, Z., Hedayati, A. and Esmaielpour, B., 2023. The most important bioactive compounds, nutritional and ecological characteristics of Hippophae rhamnoides L., Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 39(4): 691-710.
- Ayyobi, N. and Fattahi, M., 2017. Induction Effects of Colchicine and Chitosan on Rosmarinic Acid Production in Hairy Root Cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.). Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 30(1): 1-13.
- Bahramikia, S. and Yazdanparast, R., 2012. Photochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). Phytotherapy Research, 26: 1581-1593.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T. and Fernandez-Gutierrez, A., 2005. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(23): 8918-8925.

- Chandra, K., Nautiyal, B.P. and Nautiyal, M.C., 2013. Herbal-based traditional medicinal knowledge of local inhabitants in Rudraprayag district of Uttarakhand. Ethnobotany Research and Applications, 11: 299-313.
- Chu, Y.H., Chang, C.L. and Hsu, H.F., 2000. Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 561-566.
- Chung, Y., Chien, C., Teng, K. and Chou, S., 2006. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb and Zucc. Journal of Food Chemistry, 97: 418-425.
- De Torre, M.P., Cavero, R.Y., Calvo, M.I. and Vizmanos, J.L., 2019. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. Antioxidants, 8(5): 142.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. and Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation, 37(3): 263-285.
- Govindaraju, S. and Arulselvi, P.I., 2018. Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on in vitro propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb–*Coleus aromaticus* Benth. (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 17(4): 435-444.
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P. and 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(7): 1029-1043.
- Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, K.S., Jagannatha, R. and Tharanathan, R.N., 2007. Free radical - induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrat, 342: 190-195.
- Hatami, M., Naghdi Badi, H. and Ghorbanpour, M., 2019. Nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. Journal of Medicinal Plants, 18(71): 6-36 (In Persian).
- Iriti, M., Giulia, C. and Sara, V., 2010. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. Biological Control, 54: 241-247.
- Jami, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Modarres, M., 2018. Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *Salvia leriifolia* Benth. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 31(3): 710-725.
- Jiao, J., Gai, Q.Y., Wang, X., Qin, Q.P., Wang, Z.Y., Liu, J. and 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.
- Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H.Z., Behmanesh, M. and Chashmi, N.A., 2016. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry, 107: 374-384.
- Kazi, G.A.S., Yamanaka, T. and Osamu, Y., 2019 Chitosan coating an Efficient Approach to Improve the Substrate Surface for In Vitro Culture System. Journal of The Electrochemical Society, 166(9): 3025-3030.
- Khezri, M., Jafari, M. and Darvishzadeh, R., 2015. Production of flavonoids in hairy root cultures of *Teucrium polium* using *Fusarium graminearum* extract as elicitor. Sixth International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2015″, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, University of East Sarajevo, October 15-18: 226-232.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. and Vladimir-Knezevic, S.A.N.D.A., 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharmaceutica-Zagreb, 54(1): 65-72.
- Li, M.H., Li, Q.Q., Liu, Y.Z., Cui, Z.H., Zhang, N., Huang, L.Q. and Xiao, P.G., 2013. Pharmacophylogenetic study on plants of genus *Salvia* L. from China. Chinese Herbal Medicines, 5(3): 164-181.
- Li, T., Elhadi, D. and Chen, G.Q., 2017. Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. Metabolic Engineering, 43: 29-36.
- Mahdavian fard, A., Dahajipour, M., Heidarabadi, K. and Malekzadeh, S., 2021. The effect of chitosan on phenolic compounds, rosmarinic acid and expression of key genes involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell suspension culture of *Melissa officinalis* L. Journal of Cell and Tissue, 11(4): 243-261.

metabolic pathway using DART-MS technique. Food Chemistry, 199: 176-184.
- Stanković, S.M., Vassilev, K., Stanković, N.M., Milošević, T., Topuzović, M., Marković, A. and Solujić, S., 2011. Inter-population variation in phenolic content of *Teucrium chamaedrys* L. Journal of Medicinal Plants, 77(12): 1374-1375.
- Tabarifard, M., 2020. Effect of Methyl jasmonate on the production of phenolic compounds in *Teucium polium* L. in tissue culture. Master's Thesis, Department of Biology, Faculty Sciences, Ferdowsi University, Mashhad, 144. (In Persian)
- Vakil, M.M.A. and Mendhulkar, V.D., 2013. Enhanced synthesis of andrographolide by *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* elicitors in cell suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. Botanical Studies, 54: 1-8.
- Wink, M., 2010. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second edition, International Nut and Dried Fruit, 39: 20-30.
- Zhao, J.L., Zhou, L.G. and 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.
- 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: 555-559.
- Zucker, M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiology, 40(5): 779-784.
- Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40(3): 255-26.
- Matkowski, A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants- a review. Biotechnology advances, 26(6): 548-560.
- Mofid Bojnoordi, M., Aghdasi, M. and Fatemi, M., 2022. The effect of different concentrations of chitosan on the production of phenolic acids in cell culture of *lactuca undulate* ledeb. Agricultural Biotechnology Journal, 14(3): 1-20.
- Naderi, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Fakheri, B., 2015. The effect of chitosan on some physiological and biochemictry characterization in Basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Plant Process and Function, 4(12): 29-41.
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue Matos, C., Morais, S., Barroso, M.F. and Moreira, M.M., 2018. Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). The Journal of Supercritical Fluids, 138: 200-206.
- Sabarre, D.C. and Yagonia-Lobarbio, C.F., 2021. Extraction and Characterization of Polyphenol Oxidase from Plant Materials: A Review. Journal of Applied Biotechnology Reports, 8(2): 83-95.
- Scarpati, M.L. and Oriente, G., 1958. Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. La Ricerca Scientifica, 28(11): 2329-2333.
- Singh, S., 2016. Enhancing phytochemical levels, enzymatic and antioxidant activity of *spinach* leaves by chitosan treatment and an insight into the