مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

تأثیر الیسیتور نانوذرات کیتوزان جهت تولید و نشت رنگدانه زرد در کشت ریشه گیاه گلرنگ

راحله گرزی*[۱]، فرانسویز برنارد[۱] و محمد رضا قلمبران[۱]

چکیده

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) متعلق به خانواده Asteraceae دارای رنگدانه‌های کینوشالکونی است که خاصیت دارویی دارند. این رنگدانه‌ها در گل این گیاه فراوان هستند ولی دیده شده که ریشه‌ی این گیاه در شرایط in vitro توان تولید بالای این رنگدانه‌ها را دارد. یکی از راه‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت استفاده از الیسیتورهای متفاوت می‌باشد. در این مطالعه از نانوذرات کیتوزان به عنوان یک الیسیتور استفاده شد. ریشه‌های رشد کرده ابتدا در محیط موراشینگ و اسکوگ (MS) مایع برای تولید انبوه به صورت استاتیک کشت داده شدند. سپس ریشه‌ها همراه با نانوذرات کیتوزان (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) واکشت داده شدند. بعد از ۲۰ روز رنگدانه‌های زرد محیط و ریشه با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که نانوذرات کیتوزان تأثیر منفی بر رشد نداشته و باعث افزایش نشت رنگدانه به محیط کشت شده است. تأثیر نانوذرات کیتوزان بر رهاسازی متابولیت‌های گلرنگ به محیط کشت می‌تواند باعث آسان‌تر شدن انتقال متابولیت‌ها بدون تخریب ریشه‌ها باشد و این یک مزیت قابل توجه برای تولید در شرایط in vitro می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، رنگدانه، نانوذرات کیتوزان، کشت درون شیشه‌ای، محیط MS

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. *نویسنده مسئول، ایمیل: rahil.gorzi@gmail.com

مقدمه

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) متعلق به خانواده Asteraceae و دارای خواص دارویی فراوان، از جمله درمان بیماریهای عروق قلبی، عفونت میوکارد و تشکیل لخته خون در عروق مغزی، کاهش سطح کلسترول و ضد التهاب می باشد (Kulkarni et al., 1997; Tripathi and Tripathi, 2003; Wei et al., 2005). ایران نیز یکی از مراکز کشت گلرنگ در دنیای قدیم بوده و عمدتاً به عنوان منبع تامین رنگ در قالی بافی و صنعت پارچه در اغلب نقاط مخصوصا خراسان، آذربایجان، زنجان و اصفهان کشت می شده است (لاجوردی، ۱۳۵۹). یکی دیگر از عوامل توجه روز افزون به گلرنگ استفاده از دانه های روغنی آن است که دارای میزان بالای لینولئیک اسید(بیش از ۳۵%) بوده و دارای ارزش درمانی است و امروزه نیز به عنوان روغن گیاهی در اروپا و امریکا و همچنین برای درمان های کلینیکی استئوفورز و رماتیسم در کره استفاده می شود (Nikam and Shitole, 1999; Kim et al., 2002). امروزه گیاهان برای تولید بسیاری از ترکیبات متابولیت ثانویه که ساخت آنها از طریق سنتزهای شیمیایی بسیار مشکل و پرهزینه است به کار می روند. کشت های قراردادی و مرسوم گیاهان نیز تحت تأثیر شرایط متفاوتی مانند شرایط آب و هوایی، آفت ها و در دسترس بودن زمین برای کشاورزی است. بنابراین تمایل به کشت های بسیار کنترل شده سلول و بافت و اندام های گیاهی به عنوان روشی برای تولید ترکیبات مورد نیاز مختلف مدنظر قرار گرفته است (Ramawat and Merillon, 1999). تولید متابوليت هاي ثانويه در شيشه از طريق كشت بافت هاي گياهي امكان پذير است. استقرار موفّق لاين هاي سلولي كه منتهي به توليد درصد بالايي از تركيبات ثانويه دركشت هاي سوسپانسيون سلولي شده به وسيله تعداد زيادي ازمحققين گزارش شده است (Tripathi and Tripathi, 2003). مواردي وجود دارد كه ميزان متابوليت هاي موجود در سلول هاي كشت بافت شده خيلي بيشتر از ميزان آن در گياه كامل است و يا حتي سلول هاي كشت بافت شده، متابوليت هايي توليد مي كنند كه در گياه اوليه توليد نمي شود. با توجه به آنكه در طبيعت سرعت توليد متابوليت هاي ثانويه آهسته بوده و مدت زمان طولاني براي توليد لازم است، بنابراين ميزان توليد اقتصادي نبوده و ضروري به نظر مي رسد كه براي توليد سريع و انبوه متابوليت هاي ثانويه و مواد دارويي، از فنون كشت بافت گياهي به طور بهينه استفاده شود. كشت بافت گياهي يكي از مهم ترين تكنيك ها در راستاي توليد صنعتي متابوليت هاي ثانويه در گياهان دارويي است، زيرا پتانسيل اين مواد در شرايط طبيعي بسيار محدود مي باشد. برخي مزيت هاي توليد متابوليت هاي ثانويه از طريق كشت بافت شامل كنترل بهينه شرايط كشت، افزودن پيش سازهاي موردنياز براي افزايش بازده و توليد متابوليت هاي ثانويه خاص مي باشد. اخيراً هدف صنعت آن است كه تكنيكهاي كشت درون شيشه اي گياهي را آن چنان توسعه دهد كه توليد متابوليت هاي ثانويه نسبت به استحصال آن ها از گياه كامل يا سنتزآزمايشگاهي ارزان تر شود (Xing et al., 1998). اقداماتي كه مي توانند در افزايش توليد متابوليتهاي ثانويه موثر باشند عبارتند از: افزودن‌پيش‌سازها، القاگرهاي زنده (با منشاء قارچي، باكتريايي و مخمر) و غير زنده (پلي ساكاريدها، گليكو پروتئين‌ها، آنزيم‌هاي غير فعال شده، نمك هاي فلزات سنگين و زانتان) به عنوان آغازگر در تشكيل متابوليت‌هاي ثانويه، افزايش نفوذ پذيري سلول با استفاده از حلال‌هاي آلي، دي متيل سولفوكسيد (DMSO) و پلي ساكاريدهايي مانند كيتوزان يا اولتراسونيكاسيون، دور كردن محصول از محل توليد، بي تحرك نمودن سلولهاي گياهي، انتخاب سلولهايي با توليد و كارآيي بالا. توليد تجاري كاپسايسين (عامل عمده تندي فلفل) در برگيرنده مراحل متعددي است كه امروزه توليد آن از طريق كشت هاي سلولي بي‌تحرك شده امكان پذير شده است (Johnson et al., 1990). گلبرگ های گلرنگ تولید پیگمان های زرد و قرمز می کنند. پیگمان های قرمز کارتامین نام دارد و رنگدانه های زرد شامل: پیش ساز کارتامین پرکارتامین، سافلومین

A، سافلورزرد B، هیدروکسی سافلور A، است که به کارتامیدین نیز مشهورند. همه این ترکیبات ساختار -D-β-Cگلوکوپیرانوزیل کوئینوشالکون دارند که از خانواده فلاونوئیدها می باشند (Toshikatsu and Shingo, 2005). استفاده از گلبرگ های گلرنگ به عنوان منبع رنگدانه های غذایی و دارویی رو به افزایش است. استخراج محصولات گلبرگ های سافلورهای رشد یافته در شرایط طبیعی بسیار هزینه بر و کم محصول بوده و برای تامین نیازهای امروزه کافی نیست (Yu and Xu, 1997). از طرفی گلرنگ گیاهی فصلی است و ترکیبات ارزشمند حاصل از آن همیشه قابل دسترس نیست. اینجا بود که کشت بافت گیاه گلرنگ به عنوان روشی برای حل این مشکلات و کمک به کشاورزی سنتی به منظور تولید متابولیت های بیشتر، مورد توجه قرار گرفت (Gao et al., 2000). کشت بافت یکی از بخش های مورد توجه در بیوتکنولوژی است. تلاش های زیادی برای کشت سلول و کالوس گلرنگ به منظور تولید رنگدانه های زرد و قرمز صورت گرفته است (Hanagata et al., 1992; Hanagata and Karube, 1994; Wakayama et al., 1994; Gao et al., 2000). تاکنون تمامی تحقیقات کشت بافت بر روی قسمت های هوایی گیاه گلرنگ انجام شده است. برنارد و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای اولین بار موفق به افزایش تولید رنگدانه زرد از طریق کشت ریشه و خروج مقدار زیادی از آن به محیط کشت شدند (Bernard et al., 2010). یکی از زمینه های مورد توجه در کشت بافت استفاده از الیسیتور است که با تغییر متابولیسم گیاه می تواند منجر به تولید متابولیت مورد نظر شود (Namdeo, 2007). الیسیتورها ترکیباتي با منشا زیستي و یا غیر زیستي هستند که از طریق القاي پاسخهای دفاعي در گیاه باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت هاي ثانوي مي شوند (Zhao et al., 2005). الیسیتورهای زیستي شامل پلي ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم ها (کیتین و گلوکان) مي باشند. الیسیتورهای زیستي ممکن است داراي ترکیب مشخص مانند کیتین و کیتوزان باشند و یا اینکه از ترکیب مشخصی برخوردار نباشند نظیر همگنای قارچ و عصاره مخمر و یا مجموعه ای از ترکیبات زیستی. ماده اولیه تولید کیتوزان، کیتین می باشد. کیتین ($C_8H_{13}NO_5$) بعد از سلولز فراوانترین پلیمر طبیعی است. کیتین ماده اي سخت با ساختارکریستالی و سفید رنگ است و ماده اصلی پوسته جانوران دریایی نظیر میگو و انواع خرچنگ دریایی می باشد. همچنین در پوشش خارجی حلزونها و حشرات و دردیواره سلولی برخی قارچها نیز یافت می شود. کیتین یک پلی ساکارید فوق العاده قلیایی می باشد (Rinaudo, 2006). کیتوزان از مشتقات کیتین بوده که با فرآیند دیاستیلاسیون کیتین به دست می آید (Alves et al., 2009). غالباً کیتوزان را بعنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالاي ۵۰ درصد می شناسند. کیتوزانهاي تجاري معمولاً درصد دیاستیلاسیون بیش از ۷۰ درصد و وزن مولکولی بین ۱۰ هزار تا ۲/۱میلیون دالتون دارند (Benjakul, 2000; No, 2002). کیتوزان در pH کمتر از ۶ به صورت پلی کاتیونی می باشد و به سهولت با ترکیبات داراي بار منفی مثل پروتئینها، پلی ساکاریدهاي آنیونی، اسیدهاي چرب و فسفولیپیدها واکنش می دهد، این مسأله می تواند ساختار و بافت محصولاتی را که کیتوزان در تولید آنها به کار می رود، تحت تأثیر قرار دهد. به دلیل وجود گروه هاي آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده در محیط هاي اسیدي از حلالیت بهتري برخورداراست (Chen, 1998). درجه دیاستیلاسیون که نسبت گروه هاي استیل گلوکزآمین به گروه هاي آمین موجود در ساختار کیتوزان را نشان می دهد، عامل مهمی در میزان حلالیت وسایر خواص کیتوزان محسوب می شود (Matsuhashi , 1997; Watts, 1998). بعدازتهیه کیتین،کیتوزان به وسیله جابجایی گروه $COCH_3$ به دست می آید که به آن پروسه د- استیلاسیون گفته می شود. در این حالت سوسپانسیونی از کیتین در NaOH غلیظ تهیه شده و حرارت داده می شود، محصول نهایی کیتوزان است. بعد از پروسه د-استیلاسیون، کیتوزان را می توان خشک کرده و

به صورت پودر درآورد و یا محلول هاي اسيدي از آن را تهیه کرد که میزان حلالیتش به درجه د-استیلاسیون آن بستگی دارد. کیتین درمحیط هاي اسيدي یا بازي نامحلول است ولی کیتوزان در محیط هاي اسيدي ضعیف محلول می باشد (Watts, 1998). نانو ذره کیتوزان مشتق داستیله شده پلی ساکارید کیتین می باشد که در زمینه هاي گوناکونی مانند پزشکی، داروسازي و بیوتکنولوژي مورد استفاده قرار می گیرد . این نانو ذره داراي خصوصیات مهم از جمله فراوانی بالا، عدم سمیت، ایمونوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می باشد (Ravi Kumar, 2000).

هدف از این تحقیق، کشت ریشه گیاه گلرنگ در شرایط کشت درون شیشه ای در راستای افزایش تولید و خروج رنگدانه زرد به محیط کشت می باشد. تأثیر الیسیتور نانوذرات کیتوزان به منظور افزایش تولید و خروج رنگدانه زرد که با کاهش کمتری در میزان رشد ریشه همراه باشد، در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

بذر گیاه گلرنگ (واریته گلدشت)، از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی کرج تهیه گردید. انتخاب این بذر از میان ارقام مختلف گلرنگ با توجه به بررسی های انجام شده توسط محققین وزارت کشاورزی، جزو ارقام پر محصول بهاره بوده و نسبت به آفات و بیماریهای گلرنگ نیز از مقاومت خوبی برخوردار هستند.

ضدعفونی کردن بذر: ابتدا ظروفی که جهت ضدعفونی کردن بذرها مورد نیاز بود، در دماي ۱۲۱ درجه سانتي‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس درزیر هود لامینار مدل JTLVC2، بذرها با کلریدجیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد (W/V) به مدت ۱۰- ۸ دقیقه ضد عفوني شدند، سپس با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند و برای کشت آماده شدند (Mandal et al., 2001).

کشت بذر در شرایط In vitro: بذرهای استریل شده در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) جامد حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز و آگار ۰/۸ درصد با pH 5.7- 5.8، به تعداد ۵ عدد در یک شیشه و با فاصله کشت گردید (Carola et al., 1997). سپس شیشه‌ها به اتاق کشت با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری ۲۲۰۰ لوکس و دمای ۵ ±۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند.

کشت بافت و پروتکل تکثیر ریشه: تکثیر و انبوه‌سازی ریشه بر اساس روش برنارد و همکاران انجام شد، به این ترتیب که بعد از گذشت ۳ هفته از کشت بذر، ساقه‌های جوان از قسمت ریشه جدا شده و از آنها به عنوان منبع جداکشت استفاده شد. ریشه‌های این گیاهچه‌های ۳ هفته‌ای نیز در محیط کشت MS مایع ساکن فاقد هورمون واکشت داده شد. ریشه های حاصل، جهت تیمار با الیسیتور مورد استفاده قرار گرفت (Waraporn et al., 2007).

روش تیماردهی: بعد از آنکه رشد ریشه‌ها به حداکثر رسید و به طور یکنواخت در محیط کشت پخش شدند، در شرایط کاملا استریل در زیر هود لامینار مقدار مشخصی از ریشه ها با وزن تر (۰/۵ g) به ۴ میلی لیتر، محیط-های MS مایع حاوی تیمار های زیر منتقل شدند. برای هر غلظت ۴ تکرار در نظرگرفته شد.

تیمار نانوذرات کیتوزان (Chs Nano-particles): نانو ذرات کیتوزان با میانگین سایز ۷۰ نانومتر از کیتوزان با منشا پوست میگو از آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهید بهشتی توسط دکتر قلمبران با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شدند. pH محلول بدست آمده با استفاده از سود (NaOH) یک مولار، روی ۵/۷ تنظیم شد. سپس در زیر هود لامینار توسط فیلتر با سایز ۰/۲۲ میکرو متر فیلتر شد و غلظت های ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد نانوذرات کیتوزان تهیه شدند.

۰/۵ گرم از ریشه به منظور بررسی اثر نانوذرات کیتوزان بر میزان رنگدانه‌ها و پراکسیداسیون لیپید ، در زیر هود لامینار به ۴ میلی لیتر محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد نانوذرات کیتوزان منتقل شدند.

مقایسه میزان رشد ریشه: با استفاده از ترازوی Sartorius مدل MA40, وزن‌تر ریشه‌های تیمار داده شده بعد از ۲۰روز معلوم گردید و برای بررسی کاهش یا افزایش وزن-تر با وزن ریشه‌های شاهد و وزن اولیه (۰/۵ g) مقایسه شد.

آنالیز رنگدانه‌ها: برای اندازه‌گیری مقدار رنگیزه در ریشه‌ها، ۰/۱ گرم ریشه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰%، به مدت ۲ دقیقه در هاون چینی بر روی یخ هموژن شدند. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و سپس با استفاده از دستگاه سانتریفوژsigma مدل 2k25c با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت حاصل به دقت جدا شده و برای آنالیز اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Specord 210 استفاده شد. جذب رنگیزه safflor yellow B در طول موج ۴۰۰nm و رنگیزه hydroxysafflor yellow A در طول موج nm ۳۲۱ خوانده شد.

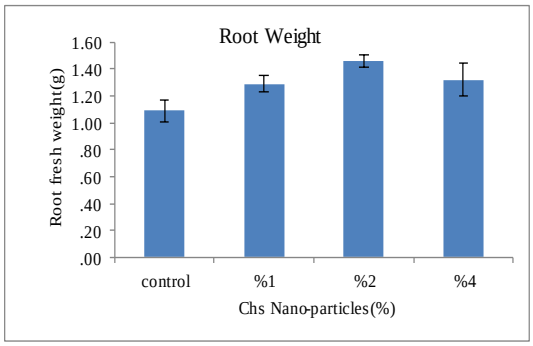
اندازه‌گیري میزان رنگدانه‌های زرد در محیط کشت: ۲۰ روز پس از هر تیمار، محیط کشت MS مایع با سمپلر برداشته شده و در اپندروف ریخته شد. و سپس همانند محیط کشت سایر تیمارها برای آنالیز اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۳۲۱ و ۴۰۰ نانومتر استفاده شد.

برای تهیه‌ی منحنی استاندارد رنگدانه موجود در ریشه و محیط کشت MS، رنگدانه استاندارد به ترتیب در متانول ۸۰% و محیط کشت MS حل گردید. سپس جذب محلول‌ها در طول موج‌های مربوط به هر رنگدانه خوانده شد و منحنی استاندارد با نرم افزار Excel 2010 رسم گردید.

آنالیزهای آماری: آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) انجام شد. برای بررسی پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی از آزمون Shapirowilk استفاده شد. جهت مقایسه نتایج از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One way) استفاده شد. برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. آنالیزهای آماری با کمک نرم افزار SPSS 19 وسطح اطمینان ۹۵% انجام شد و نمودارها نیز توسط Excel 2010 رسم گردید.

نتایج و بحث

تأثیر مثبت نانوذرات کیتوزان بر رشد ریشه: تیمار ریشه ها با نانوذرات کیتوزان (Chs Nano-particles) در هر سه غلظت، باعث افزایش رشد ریشه ها نسبت به وزن اولیه و شاهد شد که این افزایش رشد نسبت به شاهد معنی دار بود. با مقایسه داده ها توسط آزمون LSD نتایج نشان داد که غلظت ۲% باعث ۱۵/۵ درصد افزایش رشد شده است و غلظت های ۱% و ۴%، نسبت به شاهد افزایش معنی داری ندارند (نمودار ۱).

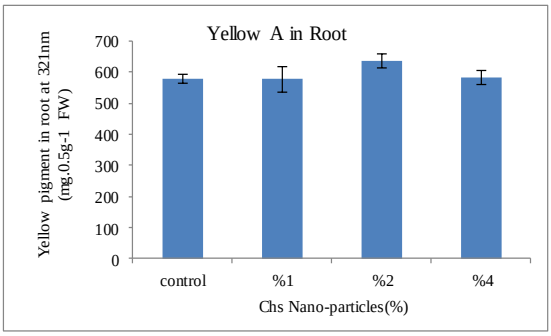


نمودار۱- تأثیر Chs Nano-particles بر رشد ریشه های جداکشت گلرنگ در محیط MS مایع ایستاتیک طی ۲۰ روز

تأثیرنانوذرات کیتوزان بر میزان رنگدانه زرد:

تأثیرChs Nano-particles بر میزان Yellow A در ریشه

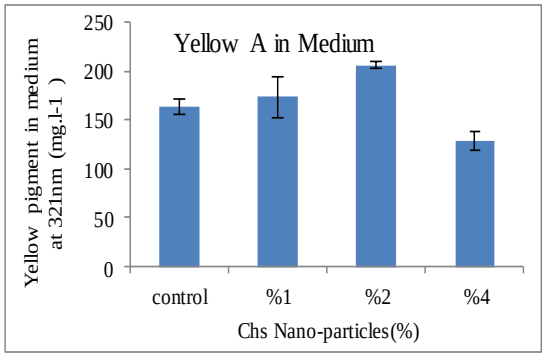
همانطورکه در نمودار ۲ نشان داده شده است، تأثیر نانوذرات کیتوزان بر میزان رنگدانه زرد نوع A در ریشه نسبت به شاهد معنی دار نشد.



نمودار۲- تأثیر Chs Nano-particles بر میزان رنگدانه زرد نوع A تولید شده در ریشه های جداکشت گلرنگ در محیط MS مایع ایستاتیک طی ۲۰ روز

تأثیرChs Nano-particles بر خروج Yellow A در محیط

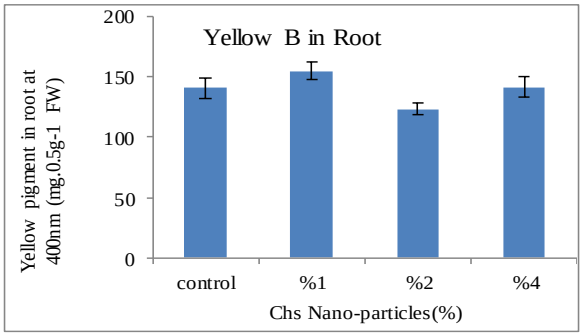
تیمار نانوذرات کیتوزان طبق نمودار ۳ تأثیر معنی داری نسبت به شاهد در خروج رنگدانه زرد نوع A از ریشه به محیط کشت ایجاد کرد. نانوذرات کیتوزان در غلظت۱%، ۶/۰۲ درصد افزایش و درغلظت ۲%، ۲۰/۸۶ درصد افزایش و در غلظت ۴%، ۲۰/۷۳ درصد کاهش، در میزان این رنگدانه در محیط نشان دادند. نتایج آزمون LSD نشان داد که ریشه ها در غلظت ۲% نانوذرات کیتوزان، اختلاف معنی داری در خروج رنگدانه زرد نوع A به محیط ایجاد کرده اند و نیز غلظت ۴% نسبت به غلظت ۲% و ۱% کاهش معنی داری در میزان رنگدانه نشان داد. نانوذرات کیتوزان با غلظت ۲% سبب افزایش تولید و خروج این رنگدانه شده است.



نمودار ۳- تأثیر Chs Nano-particles بر میزان رنگدانه زرد نوع A از ریشه های جداکشت به محیط کشت گلرنگ طی ۲۰ روز

تأثیرChs Nano-particles بر میزان Yellow B در ریشه

نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت‌های مورد استفاده نانوذرات کیتوزان نتوانستند تأثیر معنی‌داری بر میزان رنگدانه زرد نوع B در ریشه نسبت به شاهد ایجاد کنند (نمودار ۴).

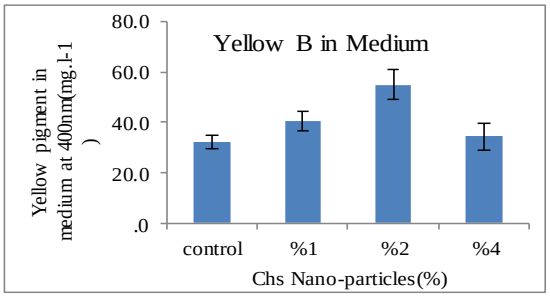


نمودار۴- تأثیر Chs Nano-particles بر میزان رنگدانه زرد نوع B تولید شده در ریشه های جداکشت گلرنگ در محیط MS مایع ایستاتیک طی ۲۰ روز

تأثیرChs Nano-particles بر خروج Yellow B در محیط

با توجه به نتایج، ریشه های تیمار داده شده با نانوذرات کیتوزان تأثیر معنی داری بر میزان خروج رنگدانه زرد نوعB از ریشه به محیط نسبت به شاهد ایجاد کردند. غلظت۱%،۲۰/۶۸ درصد افزایش و غلظت ۲%، ۴۱/۷۱ درصد افزایش و غلظت ۴%، ۶/۷۲ درصد افزایش، در میزان این رنگدانه در محیط نشان دادند. نتایج بدست آمده از آزمون LSD نشان می دهد که تنها غلظت ۲%

نانوذرات کیتوزان نسبت به شاهد اختلاف معنی داری ایجاد کرده است. غلظت ۲% نانوذرات کیتوزان نسبت به غلظت های ۱% و ۴% هم تفاوت معنی داری نشان می دهد ولی بین غلظت های ۱% و ۴% تفاوت معنی داری وجود ندارد (نمودار ۵). ظاهرا ریشه های تیمار شده با نانوذرات کیتوزان تأثیری بر تولید این رنگدانه ایجاد نکرده اند ولی بیشتر باعث خروج این رنگدانه شده اند.



نمودار۵- تأثیر Chs Nano-particles بر میزان رنگدانه زرد نوع B از ریشه های جداکشت به محیط کشت گلرنگ طی ۲۰ روز

اثر تحريك كنندگي كيتوزان بر جوانه زني و رشد گياهچه هاي گندم (Wei et al., 2007)، ذرت (Winter et al., 2001) و بادام زمینی (Winter et al., 2002) ، مشخص شده است. در مطالعات اخير، اثر مثبت كيتوزان روي رشد ريشه ها، ساقه ها و برگ هاي گياهان مختلف از جمله ژربرا (*Gerbera jamesonii*) (Wanichpongpan, 2001) و چند گياه ديگر مشاهده شده است (Chibu and Shibayama, 2001).

اثر كيتوزان روي رشد گياه *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn نيز نشان داده شده است (Ohta, 1999). كيتوزان همچنين رشد گياهان مختلف از قبيل كلم (Hirano, 1988)، جوانه هاي سويا (Lee, 2005) وريحان (Kim, 2005) را تحريك ميكند.

Lee و همكاران (۱۹۹۹) اظهار داشتند كه تيماركيتوزان عملكرد و به طور قابل توجهي رشد جوانه هاي سويا را افزايش می دهد. به هرحال مكانيزم عمل كيتوزان روي رشد هنوز ناشناخته باقي مانده است. احتمالاً كيتوزان قادر است سيگنالي را براي سنتز هورمونهاي گياهي مانند جيبرلين القاء كند و رشد و نمو گياه را توسط بعضي مسيرهاي سيگنالينگ مربوط به بيوسنتز اكسين، از طريق مسير وابسته به تريپتوفان، افزايش دهد (Uthairatanakij et al., 2007).

در پژوهش حاضر مشاهد شد که نانوذرات کیتوزان تأثیر مثبت ایجاد کرد و باعث افزایش معنی داری در رشد ریشه ها شد، البته غلظت بهینه نانوذرات کیتوزان که ۲% می-باشد سبب افزایش معنی داری در رشد ریشه ها نسبت به شاهد شد.

به نظر می‌رسد متابولیت‌های ثانویه در برابر استرس‌ها و تنش‌های محیطی تولید شده و منجر به ایجاد سازگاری شیمیایی در برابر استرس ایجاد شده می‌شوند و نیز در مواردی می‌توانند بعنوان عوامل دفاعی و محافظت‌کننده در برابر میکروارگانیسم‌ها، حشرات و دیگر عوامل خطرزا ایفای نقش کنند (Namdeo, 2007). [فلاونوئیدها از جمله متابولیت‌های ثانویه گران‌بها در گیاهان هستند. مطالعات نشان می‌دهد سنتز فلاونوئیدها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و تحریکات محیطی تولید یا فعال می‌شود، این فعال‌سازی از طریق تعدادی از فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌شود (Dixon and Paiva, 1995; Koes et al., 2005; Quattrocchio et al., 2006). همانطور که ذکر شد فلاوونوئیدها در پاسخ به الیسیتور بطور فعالی از ریشه خارج می‌شوند (Schmidt et al., 1994; Armero et al., 2001; Cesco et al., 2010). در دانه‌رست های chickpea قرار گرفته در معرض الیسیتور گلوتاتیون افزایش بیوسنتز pterocarpan مشاهده شد (Tripathi and Tripathi, 2003). رنگدانه‌های گلرنگ از ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند.

Smita و همکارانش (2011) در تحقیقات خود اثر تنظیم کننده‌های رشد و الیستورهای زنده و غیر زنده را بر روی میزان تولید رنگدانه‌های زرد و قرمز و همچنین تولید α-توکوفرول بررسی کردند (Smita et al., 2011). Bernard و همکاران در سال (۲۰۱۰) به کشت ریشه‌ی گیاه گلرنگ پرداخته و اثر غلظت‌های مختلف گازوئیل را بر تولید

رنگدانه بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که رنگدانه‌های گلرنگ می‌توانند در شرایط کشت ریشه در مقدار بالا سنتز شوند و گازوئیل نیز سنتز این رنگدانه‌ها و آزاد سازی آنها را به محیط کشت تحریک می‌کند (Bernard et al., 2010).

کیتوزان از مشتقات کیتین بوده که با فرآیند دیاستیلاسیون کیتین به دست می آید (Alves et al., 2009). غالباً کیتوزان را بعنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالاي ۵۰ درصد می شناسند. کیتوزان یک پلیمر کاتیونیک است که دراثر حرارت دادن کیتین در هیدروکسید سدیم حاصل می شود. بار مثبت موجود به وسیله جذب یون مثبت توسط جفت الکترون آزاد اتم نیتروژن در گروه NH_2 تولید می شود که در طبیعت تقریبا استثنائی می باشد و این مهم به کیتوزان اجازه می دهد که با تمام سطوح بیولوژیکی مانند پوست و مو که بار منفی دارند پیوند ایجاد کند به همین دلیل است که عملکرد آن در علم آرایشی و داروئی دو چندان شده است.

کیتین و کیتوزان ترکیبات طبیعی هستند که در کشاورزی در کنترل بیماریهای گیاهی بکار می روند. این مولکول ها نشان دادند که توانایی مهار رشد قارچ های سمی را دارند، حتی در برابر ویروس ها، باکتری ها و آفات دیگر، باعث افزایش پاسخ های دفاعی گیاهان در برابر عفونت های میکروبی مانند تجمع فیتوآلکسین ها، سنتز لیگنین و تشکیل کالوس می شوند (Abdelbasset et al., 2010).

کیتوزان در pH کمتر از 6 به صورت پلی کاتیونی می باشد و به سهولت با ترکیبات داراي بار منفی مثل پروتئینها، پلی ساکاریدهاي آنیونی، اسیدهاي چرب و فسفولیپیدها واکنش می دهد، این مسأله می تواند ساختار و بافت محصولاتی را که کیتوزان در تولید آنها به کار می رود، تحت تأثیر قرار دهد. به دلیل وجود گروههاي آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده در محیط هاي اسیدي از حلالیت بهتري برخورداراست (Chen, 1998).

در مطالعه ای دیده شد که کیتوزان($150 mg.l^{-1}$) با افزایش در ریشه های ثانویه گیاه *Artemisia annua* L. ، باعث تولید بیشتر متابولیت ثانویه آرتمیسینین در این گیاه شد (Waraporn et al., 2007). کیتوزان همچنین سبب تجمع فراورده های زیستی در بافت های گیاهی، از قبیل تحریک کیتیناز (Mauch et al., 1984; Kendra et al., 1989)، تجمع فیتوآلکسین ها (Walker-Simmons et al., 1983; Kendra et al., 1989)، و افزایش سنتز لیگنین (Pearce and Ride, 1982) می شود. در آزمایشی دیده شده است که کیتوزان باعث کاهش در مقدار مالون دی آدئید، تغییر نسبی در نفوذپذیری غشا پلاسمایی و افزایش در غلظت قند و پرولین محلول و فعالیت پراکسیداز و کاتالاز می شود (Guan et al., 2009).

الیسیتور کیتوزان (۲۵۰µg/ml) قادر به دپلاریزاسیون سریع و گذرا در غشای سلولی گیاه *Mimosa pudica* می باشد که این تغییرات با افزایش گذرا در pH همراه است. استفاده از وزیکول غشای پلاسمایی مشخص کرد که فعالیت این پلی ساکارید مربوط به H^+-ATPase غشای پلاسمایی است، که مشاهده شد تأثیر مهارکننده ای بر روی پمپ پروتون و فعالیت کاتالیکی آنزیم دارد. کیتوزان همچنین نشان داد که می تواند بسیاری از فرایندهای مرتبط با H^+ را تغییر دهد (Amborabe et al., 2008). برای مثال جذب برخی از کربوهیدرات ها و آمینو اسیدها دچار تغییر شد زیرا جذب آنها در ارتباط با انتقال همزمان با H^+ می باشد مانند انتقال همزمان H^+/K^+ که بعد از تیمار این گیاه با کیتوزان (۱۰۰ µg/ml)، مهار شد (Amborabe et al., 2008).

تأثیر کیتوزان بوسیله کاتیون های دو ظرفیتی مهار می شود، به این دلیل که شاید فعالیت پلی کاتیون ها از طریق جابجایی کاتیون ها از قسمت الکترونگاتیو روی غشا که توسط کوئوردیناسیون با کاتیون ها برای پایداری دیمانسیون می باشد (Siegel and Daly, 1966). دیده شده است که ترتیب فعالیت مهاری کاتیون ها به این صورت می باشد:($Ba^+ > Ca^+ > Sr^+ > Mg^+$) که کاتیون

های بزرگ Ba^{+}، Sr^{+} و Ca^{+} در مقابل Mg^{+} توانایی بالایی برای تشکیل کمپلکس با متغیرهای دیگر جهت کوئوردیناسیون دارند.Mg^{+} بیشتر تمایل به تشکیل پیوند جهت پایداری دیمانسیون دارد (Hauser et al., 1976). مطالعات زیادی بر روی نشت پلی کاتیون ها از سلول های گیاهی صورت گرفته است، که دارای وزن مولکولی پایینی هستند (Siegel and Daly, 1966; Drew and Mclaren, 1970; Lerner and Reuveni, 1982). تیمار سلول ها با کیتوزان نشان داد نه تنها موادی با وزن مولکولی پایین بلکه پروتئین هایی با وزن مولکولی بالا(> ۵۰۰۰ D) قابلیت نشت از سلول را دارند. به نظر می رسد که کیتوزان(100µg/ml) باعث ایجاد یک منفذ بزرگ در غشا شده است (David et al., 1982).

نانو ذرات کیتوزان نه تنها سبب افزایش در سنتز رنگدانه ها شده بلکه باعث افزایش نفوذپذیری غشاء نسبت به رنگدانه ها شده است و میزان رنگدانه ها در محیط افزایش یافته است. به نظر می آید، نانوذرات کیتوزان با دپلاریزاسیون غشاء باعث تغییراتی در سلول شده است. نانوذرات کیتوزان با کمپلکسی که با کاتیون ها ایجاد می کند می تواند سلول را دچار انجام فرآیندهایی بکند که احتمال داده می شود نانوذرات کیتوزان با کلسیم تشکیل کمپلکس بدهد و به این طریق با ایجاد پیام های ثانویه، در سلول ایجاد تغییر کند که باعث افزایش سنتز در متابولیت های ثانویه شود. با خروج رنگدانه های گلرنگ از ریشه که مولکولی درشت می باشند این طور به نظر می آید که کیتوزان در غشاء سلول منفذی بزرگ ایجاد کرده باشد.

تأثیر نانوذرات کیتوزان وابسته به غلظت آن می باشد. نانوذرات کیتوزان با غلظت ۲% افزایش در میزان کل رنگدانه A شد ولی مقدار رنگدانه B معنی دار نبود. همچنین باعث افزایش خروج رنگدانه ها از ریشه به محیط شد.

منابع

لاجوردی، ن. (۱۳۵۹). دانه های روغنی. انتشارات دانشگاه تهران.

Abdelbasset, E.H., Lorne, R., Ismail, E.H. and Fouad, D. (2010). Chitisan in plant protection. Marine Drugs, 8, 968-987

Alves, N., Picart, C. and Mano, J. (2009). Self-assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR spectroscopy. Macromolecular Bioscience, 9(3), 776-785.

Amborabe, B.E., Bonmort, J., Fleurat- lessard, P. and Roblin, G. (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. Journal of Experimental Botany, 59, 2317-2324.

Armero, J., Requejo, R., Jorrin, J., Lopez-Valbuena, R. and Tena, M. (2001). Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level. Plant Physiology and Biochemistry, 39, 785–795.

Benjakul, S. (2000). Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred gar fish (*Hemiraphus* far.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(1), 102-108.

Bernard, F., Hassanpour, A., Gholizadeh, G., Hassannejad, S. and Chaghari, Z. (2010). High yellow pigments production by root culture of *Carthamus tinctorius* and its release in medium under gas oil treatment. Acta Physiologiae Plantarum, 33(2), 431-436.

Carola, F., Trabace, T. and Sunseri, F. (1997). High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 16, 295-298.

Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R. and Weisskopf, L. (2010). Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. Plant and Soil, 329, 1–25.

Chavan, S.P., Lokhande, V.H., Nitnaware, K.M. and Nikam, T.D. (2011). Influence of growth regulators and elicitors on cell growth and α-tocopherol and pigment productions in cell cultures of *Carthamus tinctorius* L. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 1701–1707.

Chen, C.S. (1998). Antibacterial of N-sulfonated and Nsulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. Journal of Food Protection, 621(9), 1124-1128.

Chibu, H. and Shibayama, H. (2001). Effects of chitosan applications on the growth of several crops, in: Uragami, T., Kurita, K. and Fukamizo T. (Eds.), Chitin and Chitosan in Life Science, Yamaguchi, pp. 235-239.

David, H., Young Harald, K. and Heinrich, K (1982). Effect of membran permebility of suspension-cultured *Glycin max* and *Phaseolus vulgaris* cells. Plant Physiology, 70, 1449-1454.

phytochemicals from edible plants using methyl jasmonate (MeJA) and chitosan. PhD Thesis, Clemson University, USA. 178 pp

Kim, H.J., Bae, Y.C., Park, R.W., Choi, S.W., Cho, S.H., Choi, Y.S. and Lee, W.J. (2002). Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. Calcified tissue international, 71, 88-94.

Koes, R., Verweij, W. and Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends in Plant Science, 10, 236–242.

Kulkarni, D.N., Revanwar, S.M., Kulkarni, K.D. and Deshpande, H.W. (1997). Extraction and uses of natural pigments from safflower florets. In: Proceedings of the Fourth International Safflower Conference, Bari, pp 365–367.

Lee, Y.S., Kang, C.S. and Lee, Y.S. (1999). Effects of chitosan on production and rot control of soybean sprouts. Korean Journal of Crop Science, 44, 368-372

Lee, Y.S., Kim, Y.H. and Kim, S.B. (2005). Changes in the respiration, growth and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. HortScience, 40, 1333-1335.

Lerner, H.R. and Reuveni, M. (1982). Induction of pore formation selectively in the plasmalemma of plant cells by poly-L-lysine treatment: A method for the direct measurement of cytosol solutes in plant cells. In Marme, D., Marre, E. and Hertel, R. (eds,) Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. pp 49-52.

Mandal, A.K.A., Gupta, S.D. and Chatterji, A.K. (2001). Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower. Biological Plantarum, 44, 503-507.

Matsuhashi, S (1997). Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation. Journal Science Food Agric. 73(3): 237-241.

Mauch, F., Hadwiger, L.A. and Boller, T. (1984). Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. Plant Phsiology, 76, 607-611.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology, 15, 437-497.

Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1, 69-79.

Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1, 69-79.

Nikam, T.D. and Shitole, M.G. (1999). In vitro culture of safflower cv. Bhima: Initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55, 15–22.

Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, 7, 1085–1097.

Drew, M.C. and Mclaren, A.D. (1970). The effect of histones and other basic macromolecules on cell permeability and elongation of barley roots. Physiol Plant, 23, 544-560.

El Ghaoth, A., Arul, J., Grenier, J. and Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology, 82, 398-402.

Gao, W.Y., Fan, L. and Paek, K.Y. (2000). Yellow and red pigment production by cell cultures of *Carthamus tinctorius* in a bioreactor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60, 95–100.

Guan, Y.J., H, J., Wang, X.J. and Shao, C.X. (2009). Seed priminig with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. Journal of Zheijang University Science, 10, 427-433.

Han, S.Y., Li, H.X., Ma, X., Zhang, Z.Z. and Tu, P.F. (2009). Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. Phytomedicine, 16(8), 694-702.

Hanagata, N. and Karube, I. (1994). .Red pigment production by *Carthamus tinctorius* L. cells in a two-stage culture system. Journal of Biotechnol .Ogy, 37, 59–65.

Hanagata, N., Ito, A., Fukuju, Y. and Murata, K. (1992). Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorius* L. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56, 44–47.

Hauser, H., Levine, B.A. and Williams, R.J.P. (1976). Interactions of ions with membranes. Trends in Biochemical Sciences, 1, 278-281.

Hirano, S. (1988). The activation of plant cells and their self-defence function against pathogens in connection with chitosan. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 62, 293-295. (in Japanese with English summary)

Johnson, T., Ravishankar, G A. and Venkataraman, L V. (1990). In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. Plant Science Asia, 70, 223-229.

Kendra, F.D., Christian, D. and Hadwiger, L.A. (1989). Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/β-glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology, 35, 215-230.

Kim, H.J. (2005). Characterization of bioactive compounds in essential oils, fermented anchovy sauce, and edible plants, and, induction of

both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. Biochemical and Biophysical Research Communications, 110, 194-199.

Wanichpongpan, P., Suriyachan, K. and Chandrkrachang, S. (2001). Effect of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). Chitin and chitosan: Chitin and Chitosan in Life Science, Yamaguchi, Japan, pp. 198-201.

Waraporn, P.,Wanwimon, L., Wanchai, D., Hiroyuki, T. and Yukihiro, S (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnology Letter, 29, 1143–1146.

Watts, B. (1998). Basic sensory methods for food evaluation. International Development Reasearch Center. Ottawa, Canada. Pp,140-162.

Wei, S., Zang, X.M., Xue, J.P. and Xiang, G. (2007). Effect of chitosan on seeds germination and seedling physiological property of wheat. Periodicals. Core Journals Biology Journal, 24 (2).

Wei, X., Liu, H., Sun, X., Fu, F., Zhang, X., Wang, J., An, J. and Ding, H. (2005). Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia reperfusion injury by antioxidant action. Neuroscience, 386(1), 58–62.

Winter, Y., House, Q.P., Xiu-juan, W., Zhi- Meng, Z. and You-rong, S. (2001). Effect of chitosan on physiological activities in germinating seed and seedling leaves of maize. Periodicals Hebei Vocational and Technical Teachers College Journal, 15(4).

Winter, Y., House, Q.P., Zhi-Meng, Z., Xiujuan, W. and Xiao-jun, H. (2002). Germinating seed of peanut effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. Core Journal of Peanut Science. 31(1).

Xing, J., Min, Z., De-Xiu, L. and Mao-Yin, M. (1998). Cell growth and flavonoids production in suspension culture of *Saussurea medusa*. Acta Botanica Sinica. 40 (9), 836-41.

Yu, H. and Xu, L.X. (1997). Separation and determination of flavonols in the flowers of carthamus tinctorius by RP-HPLC. Acta Pharmaceutica Sinica, 32, 120–122.

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

No, H.K. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbilogy, 74, 65-72.

Ohta, K., Tanguchi, A., Konishi, N. and Hosoki, T. (1999). Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. Hortscience, 34, 233-234.

Pearce, R.B. and Ride, J.P. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. Physiological Plant Pathology, 20, 119-123.

Quattrocchio, F., Baudry, A., Lepiniec, L. and Gotewold, E. (2006). The regulation of flavonoid biosynthesis. In: Grotewold, E. (ed.). The science of flavonoids. Columbus, OH: The Ohio State University. 97–122.

Ramawat, L.G. and Merillon, J.M .(1999). Biotechnology Secondary Metabolites. Science Puplishers, Inc. 63-66.

Ravi Kumar, M.N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46(1), 1-27.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Polymer Science, 31(1), 603-632.

Schmidt, P.E., Broughton, W.J. and Werner, D. (1994). Nod-factors of Bradyrhizobium japonicum and Rhizobium sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. Molecular Plant- Microbe Interactions, 7, 384–390.

Siegel, S.M. and Daly, O. (1966). Regulation of betacyanin efflux from beet root by poly-L-lysine, Ca-ion and other substances. Plant Physiology, 4, 1429-1434.

Toshikatsu, N. and Shingo, S. (2005). Studies on the synthesis of safflomin-A, a yellow pigment in safflower petals: oxidation of 3-c-β-d-glucopyranosyl-5- methylphloroacetophenone", Department of Chemistrey and Chemical Engineering, Faculty of Enginering, Yamaguta University, 4-3-16 Jonan, Yonezawa-Shia, Yamagata. 851-992, Japan.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2, 243-53.

Uthairatanakij, A., Teixeira da Silva, J.A. and Obsuwan, K. (2007). Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. Orchid Science and Biotechnology, 1(1), 1-5

Wakayama, S., Kusaka, K. and Kanehira, T. (1994). Kinobeon A, a novel red pigment produced in Safflower tissus culture systems. Zeitschrift für Naturforschung, 49c, 1-5.

Walker-Simmons, M., Hadwiger, L.A. and Ryan, C.A. (1983). Chitosan and pectic polysaccharides

Journal of Medicinal Plants Biotechnology
Vol 4, No 1, Spring & Summer 2018

The effect of chitosan nanoparticles for the production and spread of yellow pigments in root cultivation of safflower

Rahele Gorzi*[1], Françoise Bernard[1] and Mohammad Reza Ghalamboran[1]

Abstract

The plant of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) belonging to the Asteraceae family contains kinocalcone pigments that have medicinal properties. These pigments are abundant in the flower of this plant, but it has been seen that the roots of this plant in vitro have the potential for high production of these pigments. One of the ways to increase the production of secondary metabolites in tissue culture is to use different elicitors. In this study, chitosan nanoparticles were used as an elicitor. Grown roots were first cultured in liquid Murashige and Skoog(MS) medium for mass production, in static condition. The roots were then subcultured with chitosan nanoparticles (0, 1, 2 and 4%). After 20 days of culture the growth was determined and the yellow pigments of root and medium were measured by spectrophotometer and the results showed that chitosan nanoparticles had no effect on growth and increased the pigment leakage to the culture medium. The effect of chitosan nanoparticles on release of safflower metabolites into the culture medium can facilitate the transfer of metabolites without destroying the roots, and this is a significant advantage for in vitro production.

Keywords: Elicitor, Pigment, Chitosan nanoparticles, In-glass culture, MS medim

[1]Department of Biology, Shahid Beheshti University. * Crresponding author, Email: rahil.gorzi@gmail.com