



## Evaluation of the effect of foliar application of nano-chitosan and mineral nutrition (NPK) on the catechins content in green tea (Kashef var.) leaves through analysis of some biochemical, physiological and molecular parameters

Amineh Zeinali<sup>1</sup>, Mitra Parsa<sup>2</sup>, Mona Kashanchi<sup>2</sup>, Hossein Askari<sup>3</sup>, Reza AzadiGonbad<sup>4</sup>, Aghdas Banaei<sup>5\*</sup>, Sanam Safaei-Chaeikar<sup>4</sup>, Ehsan Kahneh<sup>4</sup> and Ali Seraji<sup>4</sup>

- 1- Ph.D student, Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- 2- Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- 3- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- 4- Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran
- 5\*- Department of Nano and Biophysics, Research Institute of Applied Sciences, Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran, E-mail: abanaei5@yahoo.com

Received: May 2023

Revised: October 2023

Accepted: October 2023

### Abstract

**Background and objectives:** Elicitors are used more frequently to promote plant growth and secondary metabolites. One of the main challenges for tea producers is the slow growth and poor quality of green tea leaves (*Camellia sinensis*) in tea-growing regions of Iran. In many plants, foliar application of chitosan or nano-chitosan (NC) enhances secondary metabolite production. It has a positive impact on plants' physiological and biochemical indicators. This study investigated the impact of nano-chitosan on some biochemical and physiological parameters with and without mineral nutrition (NPK), as well as assessing the quality of green leaves by comparing the relative expression levels of three enzymes involved in the flavonoids pathway in the Kashef cv. tea plant in northern Iran.

**Methodology:** For this, two scenarios were used: four different concentrations of nano chitosan solution (0, 25, 50, and 100 mgL<sup>-1</sup>) were prepared and combined with NPK (1%-1%-0.5%), and without NPK were prepared. At the Lahijan Tea Research Center in Iran, two experiments were conducted as foliar treatments applied twice at two-week intervals, after the first season's harvest in 2021. Twenty days following the initial foliar treatment, plant sampling was conducted to examine physiological, biochemical, metabolic, and molecular characteristics. The first and second leaves, as well as the buds, were gathered for metabolic and molecular testing. The third and fourth leaves were collected for physiological and biochemical analyses. Chlorophyll content and relative water content were measured in physiological experiments. Protein content and the antioxidant enzymes CAT, SOD, and PPO were investigated biochemically. Additionally, metabolic properties were determined using the folin-sio-catheo method as well as HPLC to determine catechins, epigallocatechins, and galliccatechins. Molecular analysis was also performed by examining the relative expression of three critical enzymes in the flavonoid biosynthesis pathway, F3H, DFR, and LAR.



**Results:** The results showed that utilizing NC along with NPK significantly increased the content of total polyphenols in tea compared to the control (without NC and NPK). All treatments reduced catechin content 4- to 6-fold. With an increase in NC concentration, epigallocatechin content increased. Gallocatechin content also revealed a slight increase in 100 mg.L<sup>-1</sup> NC concentration. Chlorophyll content indicated a significant difference with a falling trend in treatments with low concentrations of NC; however, a significant difference with a growing trend was seen in treatments with 100 mg.L<sup>-1</sup> of nano chitosan. In comparison to the control, various NC treatments had similar protein content. Except for the 50 mg.L<sup>-1</sup> NC+NPK treatment, there was an apparent significant difference in the SOD enzyme activity in each NC treatment, with a positive trend. With increasing NC concentrations, CAT enzyme activity also rose in various treatments. In treatments with insignificant NC concentrations, PPO enzyme activity significantly decreased. In different treatments, leaf water content rose. Only at a dose of 100 mg.L<sup>-1</sup> NC+NPK did the relative expression of the F3H enzyme rise nearly three times compared to the control; in contrast, other treatments had no meaningful effect on relative expression. Different NC+NPK treatments raised DFR relative expression, and 100 mg.L<sup>-1</sup> NC demonstrated the highest expression (4 times). Compared to the control, LAR relative expression increased at 0, 50, and 100 mg.L<sup>-1</sup> NC and NPK. The treatment without NC and with NPK displayed the highest level of LAR expression, with an expression almost 2.5 times higher than the control.

**Conclusion:** In Kashef cultivar tea plants, chitosan nanoparticles in various concentrations coupled with NPK increased the production of catechin compounds. This effectively reduced oxidative stress and enhanced green tea leaf quality. In addition to addressing oxidative stress, NC may play a practical role in green tea quality. Due to its biodegradable properties, nano chitosan can be used instead of chemicals to improve tea plants' green leaves quality and lower environmental pollution.

**Keywords:** Tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, NPK, nano chitosan, flavonoid, Dihydro flavonol 4 reductase, Flavonone 3 hydroxylase, Leuco anthocyanin reductase.

## ارزیابی تأثیر نانو کیتوزان و NPK بر محتوای کاتچین‌های برگ سبز چای (رقم کاشف) از طریق آنالیز برخی پارامترهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی

- امینه زینالی<sup>۱</sup>، میترا پارسا<sup>۲</sup>، منا کاشانچی<sup>۳</sup>، حسین عسکری<sup>۴</sup>، رضا آزادی گنبد<sup>۵</sup>، اقدس بنایی<sup>۶\*</sup>، صنم صفایی چایکار<sup>۵</sup>، احسان کهنه<sup>۵</sup> و علی سراجی<sup>۷</sup>
- ۱- دانشجوی دکتری، مربی پژوهش، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- مربی پژوهش، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی محیط و صنعت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی و زیست‌فناوری، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- استادیار، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران
- ۶- نویسنده مسئول، استادیار، گروه پژوهشی نانو و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- پست الکترونیک: abanaei5@yahoo.com
- ۷- استادیار، گروه فناوری و مدیریت تولید پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، گیلان، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲

### چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از محرک‌ها به منظور افزایش رشد گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد توجه هستند. رشد کند و کیفیت پایین برگ سبز چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) در مناطق کشت چای در ایران، از مهمترین چالش‌های تولیدکنندگان چای است. محلول‌پاشی برگ‌گی کیتوزان و نانو کیتوزان (NC) در بسیاری از گیاهان باعث القای رشد و افزایش متابولیت‌های ثانویه شده و بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان اثر مثبت دارد. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر نانو کیتوزان بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی با و بدون تغذیه معدنی NPK و ارزیابی کیفیت برگ سبز چای از طریق مقایسه سطح بیان نسبی ۳ آنزیم درگیر در مسیر فلاونوئیدها در گیاه چای رقم کاشف در شمال ایران بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور از دو طرح استفاده شد: ۴ غلظت متفاوت (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی (NPK) و ۴ غلظت متفاوت (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول نانو کیتوزان بدون تغذیه معدنی تهیه شد. این دو آزمایش به صورت محلول‌پاشی پس از اولین چین بهاره دو بار با فاصله دو هفته‌ای در سال ۱۴۰۰ در مرکز تحقیقات چای لاهیجان (ایران) اجرا شد. ۲۰ روز پس از محلول‌پاشی اولیه، نمونه برداری گیاهی انجام شد. نمونه‌های برگ‌گی از شاخساره جوان شامل جوانه و برگ اول و دوم برای آزمایش‌های متابولیکی و مولکولی و برگ سوم و چهارم برای آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شد. بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل محتوای کلروفیل و محتوای نسبی آب (RWC)، ویژگی‌های بیوشیمیایی شامل محتوای پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) اندازه‌گیری شدند. همچنین، اندازه‌گیری ویژگی‌های متابولیکی شامل میزان ترکیب‌های فنلی تام از طریق روش فولین سیو کالنتو و تعیین میزان فلاونوئیدهای کاتچین، اپی‌گالوکاتچین (EGC) و گالوکاتچین (GC) با روش HPLC انجام شد. آنالیز مولکولی از طریق بررسی بیان نسبی ۳ آنزیم کلیدی مسیر بیوستز فلاونوئیدها فلاونون ۳ هیدروکسیلاز (F3H)، دی‌هیدروفلاونول ۴ ردوکتاز (DFR) و لوکوآنتوسیانیدین ردوکتاز (LAR) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد مقدار پلی فنل کل در تیمارهای مورد بررسی افزایش معنی داری نسبت به شاهد (بدون NC و NPK) داشت. میزان کاتچین در تیمارهای مختلف، کاهش ۴ تا ۶ برابری داشت. محتوای اپی گالوکاتچین با افزایش غلظت نانو کیتوزان افزایشی بود. محتوای گالوکاتچین نیز تنها در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان کمی روند افزایشی نشان داد. محتوای کلروفیل در تیمارهای با غلظت پایین نانو کیتوزان تفاوت معنی دار با روند کاهش داشت؛ در حالی که در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان تفاوت معنی دار با روند افزایشی مشاهده شد. البته، محتوای پروتئین در تیمارهای مختلف نانو کیتوزان تفاوت معنی داری نسبت به شاهد نشان نداد. فعالیت آنزیم SOD در تیمارهای مختلف نانو کیتوزان به استثنای تیمار  $50 \text{ mgL}^{-1}$  NC+NPK تفاوت معنی دار آشکاری با روند افزایشی داشت. فعالیت آنزیم CAT نیز در تیمارهای مختلف با افزایش غلظت نانو کیتوزان افزایش یافت. فعالیت آنزیم PPO در تیمارهای با غلظت پایین نانو کیتوزان کاهش معنی داری نشان داد. محتوای نسبی آب برگ در تیمارهای مختلف، افزایش یافت. بیان نسبی آنزیم F3H، تنها در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  NC+NPK افزایش حدود ۳ برابری نسبت به شاهد داشت و در سایر تیمارها بیان نسبی چندان معنی دار نبود. بیان نسبی DFR در تیمارهای مختلف NC+NPK افزایشی و بالاترین میزان بیان (۴ برابر) در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان مشاهده شد. بیان نسبی LAR در غلظت‌های  $0$ ،  $50$  و  $100 \text{ mgL}^{-1}$  NC به همراه NPK نسبت به شاهد روند افزایشی داشت. بالاترین میزان بیان LAR در تیمار فاقد NC و همراه NPK با بیان حدود  $2/5$  برابری نسبت به شاهد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های مختلف به همراه NPK منجر به افزایش تولید ترکیب‌های کاتچین شد که علاوه بر مقابله با تنش اکسیداتیو در کیفیت برگ سبز چای نقش مؤثر دارد. نانو کیتوزان می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی برای القای رشد و افزایش کیفیت برگ سبز در گیاه چای باشد و با توجه به زیست تخریب‌پذیر بودن آن میزان آلودگی محیط‌زیستی را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: گیاه چای، *Camellia sinensis*، تغذیه معدنی، نانو کیتوزان، فلاونوئید، دی‌هیدروفلانول ۴ ردوکتاز، فلاونون ۳ هیدروکسیلاز، لوکوآنتوسیانیدین ردوکتاز.

## مقدمه

فرآوری شده شامل رنگ، عطر و طعم آن نقش دارند در عملکردهای فیزیولوژیکی گیاه نیز دخیل هستند. پلی فنل‌ها در گیاه چای حدود ۳۰-۲۰٪ وزن خشک برگ چای را تشکیل می‌دهند (Gu et al., 2020؛ Zhang et al., 2018). کاتچین‌ها در بین پلی فنل‌های چای بیشترین غلظت را داشته و حدود ۸۰-۶۰٪ از وزن کل پلی فنل‌ها را شامل می‌شوند که متشکل از چهار مونومر اصلی کاتچین؛ اپی کاتچین (EC)، اپی گالوکاتچین (EGC)، اپی کاتچین گالات (ECG) و اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، و سایر محصولات الیگومریزه کاتچین (Theaflavins & Thearubigins) هستند که در طی فرایند تهیه چای سیاه تشکیل می‌شوند (Stodt et al., 2017؛ Jiang et al., 2020؛ Guo et al., 2017).

ترکیب‌های ثانویه گیاهان به‌عنوان دارو، علف‌کش‌های زیستی، عوامل طعم‌دهنده، رنگ‌های طبیعی، سم‌ها و عطرها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mazid et al., 2011). چای یکی از پر مصرف‌ترین نوشیدنی‌ها در جهان است که به دلیل طعم، عطر و فواید بی‌نظیرش برای سلامتی مفید است. برگ‌های جوان گیاه چای حاوی ترکیب‌های ثانویه از جمله ترکیب‌های پلی فنلی، تیائین و کافئین می‌باشند. ترکیب‌های فنلی چای حاوی فلاونوئیدها و مشتقات آن هستند که کاتچین‌ها و مشتقات آن از جمله مهمترین گروه ترکیب‌های ثانویه چای را تشکیل می‌دهند (Li et al., 2017). ترکیب‌های ثانویه چای علاوه بر اینکه در تعیین کیفیت چای

و غیرزیستی هستند که با هدف افزایش ترکیب‌های متابولیسم ثانویه در محیط‌های درون شیشه (in vitro) و برون شیشه (in vivo) در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Naderi et al., 2014). مطالعات متعدد نشان داده است که محرک‌های زیستی با القای تنش اکسیداتیو در گیاهان، با افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز، تولید ترکیب‌های فنلی را افزایش می‌دهند (Halder et al., 2019).

فلاونوئیدها دومین گروه بزرگ از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و مهمترین زیر شاخه ترکیب‌های فنلی در گیاه چای هستند که کارکردهای متفاوت فیزیولوژیکی از جمله محافظت گیاهان از اشعه UV، جذب حشرات برای گرده‌افشانی، همزیستی گیاه با ریزوبیوم‌ها، رنگ گل‌ها و انتقال اکسین را در گیاهان انجام می‌دهند (Zhao & Dixon, 2010).

استفاده از کیتوزان و مشتقات آن به‌عنوان محرک در تولید فیتوالکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای در زیست‌فناوری ایجاد کرده است (Orlita et al., 2008). کیتوزان یک بیوپلیمر طبیعی است که از استیل‌زدایی کیتین (CT) که در اسکلت بیرونی انواع موجودات از جمله سخت‌پوستان، حشرات و دیواره سلول‌های قارچی وجود دارد، بدست می‌آید. پلی‌ساکارید کیتوزان به‌عنوان محرک زیستی عمل کرده و موجب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان می‌شود (Srisornkompon et al., 2014). کیتوزان به‌عنوان مولکول ارتباطی با القاء و تنظیم فرایندهای دفاعی، همزیستی و رشد و نمو در گیاهان موجب افزایش تولید محصول می‌شود (Dzung et al., 2011). کیتوزان بیش از ۲۰ ژن وابسته به پاتوژن مانند بتا-گلوکاناز، کیتیناز و ژن‌های وابسته به متابولیسم، مانند اکسین، سایتوکینین و غیره را فعال می‌کند (Chen et al., 2022). این فعالیت‌های بیولوژیکی کیتوزان موجب افزایش جوانه‌زنی، فتوسنتز، جذب مواد مغذی و مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. استفاده از کیتوزان به‌عنوان عامل ضدتعریق باعث تولید اسید جاسمونیک و سیگنالینگ اسید آبسزیک (ABA) می‌شود که

کاتچین‌ها یکی از مهمترین و فعال‌ترین ترکیب‌های بیولوژیکی در چای هستند که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطانی داشته و در سیستم دفاعی گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا نقش دارند (Guo et al., 2017؛ Li et al., 2017). کاتچین‌ها از طریق مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدی سنتز می‌شوند که شامل یک مجموعه واکنش‌های آنزیمی است که توسط آنزیم‌های مختلف از جمله فلاونون ۳ هیدروکسیلاز (F3H)، دی هیدروفلانول ردوکتاز (DFR) و لوکوآنتوسیانیدین ردوکتاز (LAR) کاتالیز می‌شوند (Lv et al., 2021). در همین راستا، پس از تشکیل فلاونون در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها آنزیم F3H این ماده را به دی‌هیدرو فلاونول تبدیل می‌کند. آنزیم DFR دی‌هیدروفلانول را به لوکوآنتوسیانیدین تبدیل می‌کند. لوکوآنتوسیانیدین دو مسیر را طی می‌کند: ۱- توسط آنزیم LAR سنتز کاتچین و گالوکاتچین را کاتالیز می‌نماید، ۲- توسط آنزیم‌های واسط دیگر ANS و ANR تشکیل ترکیب‌های اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین و غیره را دنبال می‌کند (Shi et al., 2011). بنابراین، درک مسیرهای متابولیک کاتچین در برگ چای در بهبود کیفیت چای و افزایش مزایای سلامتی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. برخی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و تنش‌های محیطی دارند. پاسخ دفاعی طبیعی گیاهان در برابر بیماری بستگی به شناخت زود هنگام عوامل بیماری‌زا دارد. در واقع، در طول گذر تکامل، گیاهان راهبردهای مختلفی را برای مبارزه با تحولات مختلف توسعه داده‌اند. این القای پاسخ دفاعی طبیعی شامل بیان بالای ژن‌ها و آنزیم‌های مرتبط با دفاع‌های مختلف، از جمله افزایش تجمع ترکیب‌های فنلی، سنتز دیواره سلولی و سایر موارد است. گیاهانی که با محرک‌های زیستی مختلف تیمار می‌شوند، این ایمنی ذاتی را در پاسخ به پاتوژن‌های مختلف القاء می‌کنند. همچنین با افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه از طریق محرک‌های زیستی، با افزایش ترکیب‌های ثانویه عطر و طعم گیاه چای افزایش می‌یابد (Chandra et al., 2015). محرک‌ها (elicitors) شامل دو گروه عمده محرک‌های زیستی

Attaran؛ Alaghemand, 2019؛ Jafari *et al.*, 2022؛ Dowom, 2022). همچنین در گیاه *Camellia sinensis*، محتوای اسید گالیک (GA)، اپی کاتچین (EC)، اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، گالوکاتچین گالات (GCG) و اپی کاتچین گالات (ECG) با کاربرد نانوذرات کیتوزان در محلول غذایی افزایش یافت (Chandra *et al.*, 2015).

کاربرد محلول پاشی کود NPK در گیاه دارویی ریحان توسط Askarian و همکاران (۲۰۲۰) در افزایش عملکرد بیولوژیکی گیاه مثبت ارزیابی شده است. همچنین محلول پاشی کود NPK در گیاه پسته باعث افزایش عملکرد محصول شد (Davarynejad *et al.*, 2009). در تحقیق دیگری که توسط Yadegari (۲۰۲۲) بر روی چند گونه آویشن انجام شد، نتایج نشان داد که استفاده از محلول پاشی NPK باعث افزایش وزن بوته خشک، کلروفیل کل و اسانس در گونه‌های مختلف آویشن می‌شود.

کیفیت یک عامل ضروری و مؤثر در ارزش جهانی بازار چای و البته یکی از مهمترین چالش‌ها در صنعت چای ایران محسوب می‌شود. میزان کاتچین‌ها در برگ چای، تعیین‌کننده کیفیت چای هستند (Zhang *et al.*, 2023). از کیتوزان در گیاهان مختلف برای بهبود فاکتورهای رشد استفاده بسیاری شده است اما گزارشی در مورد استفاده از نانو کیتوزان برای افزایش کیفیت برگ چای وجود ندارد. از سویی، به دلیل پیری باغ‌های چای در ایران (سن بیشتر باغ‌های چای در ایران بیش از ۷۰ سال می‌باشد) عملکرد کمی و کیفی باغ‌های چای پایین است. از این رو، استفاده از راهکارهای بیرونی مانند محرک‌های زیستی و غیرزیستی برای افزایش رشد و تولید متابولیت‌های کاتچین در درختچه‌های چای، ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از نانو کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوای نسبی آب و افزایش بیان آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها به ویژه آنزیم‌های مسیر تولید کاتچین به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی موجب القای رشد و افزایش کیفیت برگ سبز می‌شوند.

خود منجر به بسته شدن روزنه‌ها و مقابله با از دست دادن آب می‌گردد (Sharp, 2013).

در سال‌های اخیر، نانو تکنولوژی به عنوان ابزاری پیشرفته در زمینه کشاورزی ظهور یافته است و راه‌حل‌های نوآورانه‌ای برای تولید محصولات و تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهد. نانوذرات، به ویژه آنهایی که از پلیمرهای طبیعی بدست می‌آیند، به دلیل ظرفیت خود برای افزایش رشد گیاه، بهبود جذب مواد مغذی و افزایش مقاومت در برابر تنش‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. در مقایسه با کیتوزان‌های با حجم انبوه، نانوذرات مبتنی بر کیتوزان کاربردهای بیشتری را در بخش کشاورزی ارائه می‌دهند. پلیمرتوده‌ای کیتوزان در محیط‌های آبی غیر قابل حل است و قابلیت تحریک زیستی نسبتاً کم آن، باعث محدودیت کاربرد آن در کشاورزی می‌شود (Saharan *et al.*, 2013). نانوذرات مبتنی بر کیتوزان انعطاف‌پذیری در فعالیت‌های بیولوژیکی را به علت ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی تغییر یافته مانند اندازه، مساحت، گروه‌های فعال عملکردی و قدرت کپسول‌سازی بیشتر (با یا بدون ترکیب با مواد دیگر) القاء می‌کنند (Saharan *et al.*, 2015). در میان اشکال مختلف کیتوزان، نانو کیتوزان‌ها (NCs) یا نانوذرات کیتوزان (CNPs) ظرفیت قابل توجهی در تغییر متابولیسم گیاه و بهبود عملکرد گیاه نشان داده‌اند. نانو کیتوزان، یک نانو ماده مشتق شده از کیتوزان، به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و ظرفیت بالا برای بهبود رشد گیاه و تحمل به تنش، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Bakshi, 2020). نقش نانو کیتوزان در افزایش محتوای کاروتنوئیدها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، اسید اسکوربیک، جوانه‌زنی و تعدیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان دارویی و زراعی مانند ماریتیغال (*Silybum marianum*)، سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)، سالویا (*Salvia abrotanoides*)، ماش (*Vigna radiate*)، سویا (*Glycine max*)، ذرت (*Z. mays*)، فلفل چیلی (*Capsicum annuum*) و گوجه‌فرنگی (*S. lycopersicum*) به اثبات رسیده است (Hai, 2019؛ Vanti *et al.*, 2020؛ Tovar *et al.*, 2020؛ Sen, 2020).

## آنالیز متابولیکی نمونه‌ها

## سنجش پلی فنل کل

برای اندازه‌گیری پلی فنل کل در چای، به ۰/۲ گرم از هر یک از نمونه‌ها، مقدار ۵ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ اضافه شد. نمونه‌ها درون بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ و محلول رویی با حلال متانول ۷۰٪ در دمای اتاق به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از اسید گالیک به‌عنوان محلول استاندارد استفاده شد. برای سنجش ترکیب‌های پلی فنلی از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد (Singleton *et al.*, 1999). میزان جذب نوری تمامی نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از رابطه زیر، درصد پلی فنل نمونه‌ها محاسبه شد.

$$P = \frac{A_{\text{sample}} * V_{\text{sample}} * d * 100}{S_{\text{std}} * m_{\text{sample}} * 1.000.000}$$

که در آن:

P = درصد پلی فنل کل

A<sub>sample</sub> = جذب نمونه مورد آزمون

V<sub>sample</sub> = حجم نمونه مورد آزمون

d = ضریب رقت (که در این آزمون مقدار آن ۱۰۰ است)

S<sub>std</sub> = شیب خط بدست آمده از منحنی کالیبراسیون

m<sub>sample</sub> = مقدار نمونه مورد آزمون به گرم

شناسایی کیفی کاتچین‌های چای با روش کروماتوگرافی

مایع با کارایی بالا (HPLC)

این آزمون، با استفاده از دستگاه HPLC مدل ۲۶۹۵ کمپانی آمریکایی Waters و دتکتور ۹۹۶ شرکت Waters، مجهز به سیستم تزریق خودکار، با استفاده از حلال‌های

متانول به‌عنوان فاز آلی (حلال A) و آب مقطر (حلال B) با خلوص بالا و گرید HPLC انجام شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان در

در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی NPK و بدون آن در تحریک متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه چای رقم کاشف در شمال ایران و بیان برخی آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها (کاتچین) بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

## تهیه نمونه‌های گیاهی

آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید. از بوته‌های ارقام چای امیدبخش داخلی، رقم کاشف در مرکز تحقیقات چای لاهیجان (گیلان- ایران) استفاده شد.

نمونه‌های گیاهی منتخب در معرض تیمار غلظت‌های مختلف محلول نانوذره کیتوزان، نانوذره به همراه تغذیه معدنی NPK و NPK به تنهایی پس از اولین چین به‌صورت محلول‌پاشی روی برگ قرار گرفتند.

نانوذره کیتوزان مورد استفاده، تولید شرکت نانوشل با مشخصات وزن مولکولی ۱۶۱ گرم بر مول، رنگ سفید، به شکل پودر، با اندازه ۱۰۰-۸۰ نانومتر و درجه خلوص ۹۹٪ و شماره کاتالوگ ۴-۷۶-۹۰۱۲ بود. نانو کیتوزان در اسید استیک ۱٪ حل و غلظت‌های صفر (کنترل)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آن تهیه و برای محلول‌پاشی استفاده شد. تغذیه معدنی شامل اوره به‌عنوان منبع نیتروژن (N) با نسبت ۱٪، سولفات پتاسیم به‌عنوان منبع پتاسیم (K) با نسبت ۱٪ و دی‌آمونیم فسفات به‌عنوان منبع فسفر (P) با نسبت ۵٪/۰ تهیه و دو بار محلول‌پاشی به فاصله دو هفته از هم انجام شد. نمونه‌برداری ۲۰ روز پس از آخرین محلول‌پاشی از سرشاخه‌های جوان (۲ برگ و ۱ جوانه) برای انجام آنالیزهای مولکولی و برگ سوم و چهارم برای سنجش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شد. برای انجام آنالیز متابولیکی نمونه‌ها پس از برداشت، در سایه خشک و آسیاب شده و در ظروف درب‌دار غیرقابل نفوذ در جای تاریک و خشک نگهداری شدند و برای استخراج پلی‌فنل مورد استفاده قرار گرفتند.

۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به میکروتیوپ‌های تمیز انتقال و برای سنجش محتوای کلروفیل برگ استفاده شدند. جذب نمونه در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل *b* و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل *a* با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار کلروفیل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{Chl } a \text{ (mg/ml)} = 12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/ml)} = 22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663}$$

$$\text{Total chlorophyll (mg/ml)} = \text{chlorophyll } a + \text{chlorophyll } b$$

که در آن:  $A_{663}$  = میزان جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر،  $A_{645}$  = میزان جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر،  $\text{Chl } a$  = کلروفیل *a* و  $\text{Chl } b$  = کلروفیل *b* می‌باشد.

#### آنالیز بیوشیمیایی

##### تعیین غلظت پروتئین کل

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل از روش اصلاح شده Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ ml از عصاره آنزیمی با ۰/۱ ml تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰٪ مخلوط شد. پروتئین رسوب داده شده به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد آنکوبه و بعد با دور ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب در ۰/۵ ml محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال حل شد. از این محلول برای سنجش مقدار پروتئین استفاده شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان محلول پروتئین استاندارد استفاده شد. رقت‌های سریال از پروتئین استاندارد تهیه و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها جذب آنها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. با رسم منحنی استاندارد و با استفاده از رابطه بدست‌آمده غلظت پروتئین نمونه‌ها برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

ستون ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. در سنجش کیفی کاتچین‌ها از عصاره استخراج شده به روش استاندارد اینزو ۱-۱۴۵۰۲ (برای سنجش پلی‌فنل کل) استفاده شد. محلول‌های استاندارد کاتچین، اپی‌گالوکاتچین و گالوتچین (سیگما آلدریج) نیز به روش عصاره‌ها آماده شدند. کلیه نمونه‌ها با استفاده از ستون اختصاصی C18 کمپانی واترز و در طول موج ۱۹۵-۴۰۰ نانومتر براساس زمان بازداری با سه تکرار انجام شدند. جمع‌آوری و ادغام داده‌ها با نرم‌افزار Millennium 32 انجام شد.

#### سنجش‌های فیزیولوژیکی

##### تعیین محتوای نسبی آب

برای تعیین محتوای نسبی (RWC) آب برگ، از جوان‌ترین برگ بالغ در هر بوته، تعداد مشخصی دیسک برگ‌گی تهیه و برای تعیین وزن تر (FW) نمونه‌ها بلافاصله توزین شدند. پس از توزین تمامی نمونه‌ها، برای بدست آوردن وزن اشباع (TW) به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و تاریکی درون آب غوطه‌ور گردیدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون آون و تا رسیدن به وزن ثابت (DW) خشک و توزین شدند. محتوای نسبی آب نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه و گزارش شد (Senthilkumar et al., 2021).

$$\text{RWC (\%)} = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100$$

که در آن: FW = وزن تر برگ، DW = وزن خشک برگ و TW = وزن اشباع برگ می‌باشد.

#### اندازه‌گیری میزان کلروفیل

محتوای کلروفیل برگ با استفاده از روش اصلاح شده آرنون (Arnon, 1949) اندازه‌گیری شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ سرد به ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگ‌گی تر کاملاً ساییده اضافه گردید. مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آنکوبه و بعد به مدت ۱۰ دقیقه با دور



## سنجش آنزیمی

## سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش Aebi (۱۹۷۴) و تجزیه پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) توسط کاتالاز و روند کاهش جذب در طول موج ۲۴۰nm در طی زمان انجام شد. اختلاف جذب در طی زمان به مدت سه دقیقه برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم از رابطه زیر به ازای واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

$$U/mg = \frac{(A_0 - A_{180}) * V_t}{Z_{240} * d * V_s * C_t * 0.001}$$

$A_0 - A_{180}$  = اختلاف بین جذب اولیه و جذب نهایی

$V_t$  = حجم نهایی واکنش (۳ml)

$Z_{240}$  = مولاریته ضریب خاموشی  $H_2O_2$  در OD ۲۴۰

(۳۴/۹ mol/cm)

$D$  = پهنای نوری کووت (1cm)

$V_s$  = حجم نمونه به میلی‌لیتر

$C_t$  = غلظت پروتئین در نمونه برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

## سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس روش اصلاح شده Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) و میزان احیاء نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط آنزیم انجام شد. پس از تهیه مخلوط واکنش نمونه‌ها، به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور سفید انکوبه شدند. سپس جذب نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه هر ۱۵ ثانیه در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. براساس افزایش جذب در طول زمان و رابطه زیر، میزان بازدهی آنزیم در احیاء NBT محاسبه شد.

$$Inhibition\ of\ NBT\ reduction\ by\ SOD\ \% = \frac{(A_{560}\ Control - A_{560}\ Test) * 100}{A_{560}\ Control}$$

آنزیمی در مخلوط واکنش استفاده شد. مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه و جذب نمونه‌ها هر ۱۵ ثانیه به مدت ۲ دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم PPO براساس واحد آنزیم در میلی‌لیتر از طریق رابطه زیر محاسبه شد.

## سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز براساس روش Zhang و Shao (۲۰۱۵) انجام شد. سنجش فعالیت آنزیم PPO براساس افزایش جذب در ۳۲۰ نانومتر برای pyrogallol به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. ۰/۲ حجمی از عصاره

$$PPO\ activity\ \frac{U}{ml} = \frac{A_{320} * total\ reaction\ vol}{time\ interval * 0.2} * 0.2$$

$A_{320}$  = اختلاف جذب بین زمان  $t_0$  و  $t_{120}$

۴ml = Total reaction vol

time interval = زمان خوانش (۲ دقیقه)

## آنالیزهای مولکولی

## استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور مطالعه الگوی بیان ژن‌های مؤثر در تولید کاتچین‌های RNA تام (Total RNA) از بافت برگ‌های تازه که در دمای ۸۰- ذخیره شده بود، مطابق شیوه‌نامه ارائه شده توسط Robert و Farrell (۲۰۱۷) استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از بافت برگ هر یک از تیمارها به صورت جداگانه کاملاً پودر گردید. بافت پودر شده بلافاصله در بافر استخراج کاملاً مخلوط شد. میکروتیوپ‌ها برای ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. به محلول رویی مخلوط کلروفرم-ایزوامیل‌الکل (۲۴:۱) اضافه شد. به میزان ۲۵٪ حجم محلول رویی کلرید لیتیوم ۱۲ مولار اضافه شد. پس از یک شب، RNA به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب RNA با اتانول ۷۰٪ شسته شد. به RNA حجم برابر از محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (۲۵:۲۴:۱) اضافه شده و سانتریفیوژ شد. فاز رویی مایع به یک لوله تمیز انتقال و با حجم برابر از کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) مخلوط و سانتریفیوژ گردید. در نهایت RNA با اتانول شستشو و رسوب داده شد. رسوب RNA در آب مقطر nuclease free

حل شد. غلظت و کیفیت نمونه با استفاده از نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, 2000, USA) بررسی گردید.

سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت سنتز شرکت فرمنتاز انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه به روش Real time PCR (RT PCR)

تعیین ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی کاتچین‌های جای با استفاده از روش ساماندهی زیستی و نرم‌افزار String تحت وب نسخه B11 انجام شد و سه ژن F3H، DFR و LAR که در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها نقش تأثیرگذار در تشکیل کاتچین‌ها دارند به‌عنوان ژن‌های کاندید انتخاب و بیان آنها بررسی شد.

بررسی و آنالیز بیان ژن‌های انتخابی براساس روش مبتنی بر رنگ فلورانس Syber green با استفاده از Real time PCR (Rotor gene Q-Pure Detection) مدل ۶۰۰۰ (کیاژن آمریکا)، انجام شد. از ژن خانه‌دار اکتین به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار الیگو ۷ انجام شد (جدول ۱). سطح بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش ct و  $2^{-\Delta\Delta ct}$  انجام شد (Livak & Schmittgen, 2001).

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی ژن مورد استفاده برای real-time PCR

Table 1. Gene-specific primers used for real-time PCR

Gene name	Primer sequence (5'-3')
F3H	Forward: AGCCACATTCCAGAACCCAG
F3H	Reverse: TGGCAAAGCTTCTTGAGCCT
DFR	Forward: AGGACTTGCCAGTTGTGTGCG
DFR	Reverse: GCCATTGACAGGGTTTTCTGC
LAR	Forward: CCCCCAGTACAATGTTCCAACCT
LAR	Reverse: TTCAGTTCTGCAAAAGCCCC
Actin	Forward: CCATCACCAGAATCCAAGAC
Actin	Reverse: GAACCCGAAGGCGAATAGG

## تجزیه و تحلیل آماری

برای هر آزمایش، حداقل سه تکرار در نظر گرفته شد. برای انجام تجزیه آماری و تحلیل و ترسیم نمودارها، به ترتیب از نرم افزار SAS نسخه ۹،۴ و Excel 2016 استفاده شد. از تحلیل واریانس مدل رگرسیونی (GLM) برای تفسیر داده‌ها و شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار استفاده شد و آزمون توکی برای انجام مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به شاهد هستند ( $P > 0.05$ ،  $P > 0.01$ ).

## نتایج

## نتایج سنجش‌های متابولیکی

اثر نانو کیتوزان و NPK بر میزان پلی فنل کل در چای رقم کاشف

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تیمار نانو کیتوزان و اثر متقابل NPK با نانو کیتوزان اثر معنی‌داری بر مقدار پلی فنل کل برگ‌های چای محلول‌پاشی شده در شرایط مزرعه‌ای داشت (جدول ۲).

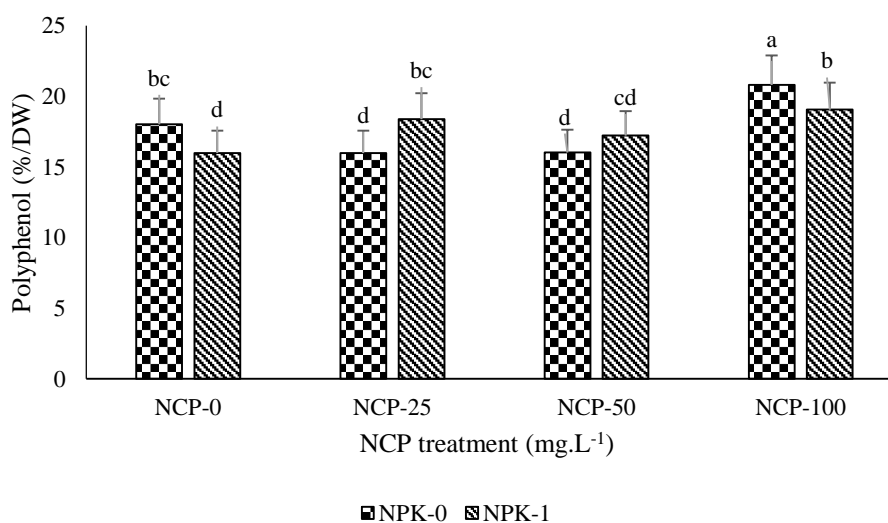
بیشترین میزان پلی فنل کل در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان بدون تغذیه معدنی (شکل ۱) با تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵٪ مشاهده شد. اما از نظر آماری بیشترین تغییرات معنی‌دار میزان پلی فنل کل در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان همراه با NPK نسبت به شاهد همان تیمار در سطح احتمال ۱٪ رخ داد. براساس نتایج بدست آمده در تیمارهای غلظت  $50 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان با و بدون NPK، تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد. براساس نتایج بدست آمده بیشترین مقدار پلی فنل در وزن خشک گیاه به میزان  $20/812$ ٪ در تیمار غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان بدون تغذیه معدنی مشاهده شد و کمترین مقدار پلی فنل کل در تیمار غلظت صفر و  $25 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان به میزان حدود ۱۶٪ وزن خشک گیاه بدست آمد. همانطور که در شکل دیده می‌شود، به نظر می‌آید غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان به‌عنوان محرک زیستی غلظت بهینه محسوب شده و روند افزایشی بر مقدار پلی فنل کل دارد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای نانو کیتوزان و NPK بر سنجش‌های متابولیکی گیاه چای رقم کاشف

Table 2. ANOVA of nanochitosan and NPK treatments effects on metabolic measurements in *Camellia sinensis* var. Kashed

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		Total polyphenol	Catechin	Galocatechin	Epigallocatechin	Total catechin
Nanochitosan	3	9.19**	21.72**	0.42**	402.66**	523.28**
NPK	1	0.01 <sup>ns</sup>	7.36**	0.47*	12.03**	0.00 <sup>ns</sup>
Nanochitosan× NPK	3	4.81**	13.32**	0.43**	82.87**	159.42**
Experimental error	7	0.07	0.09	0.04	0.46	0.86
C.V. (%)		1.78	16.02	18.12	2.55	3.14

n.s., \*, and \*\*: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان و NPK بر مقدار پلی فنل کل در برگ گیاه چای رقم کاشف

**Figure 1. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on total polyphenol content in leaves of *Camellia sinensis* var. Kashef**

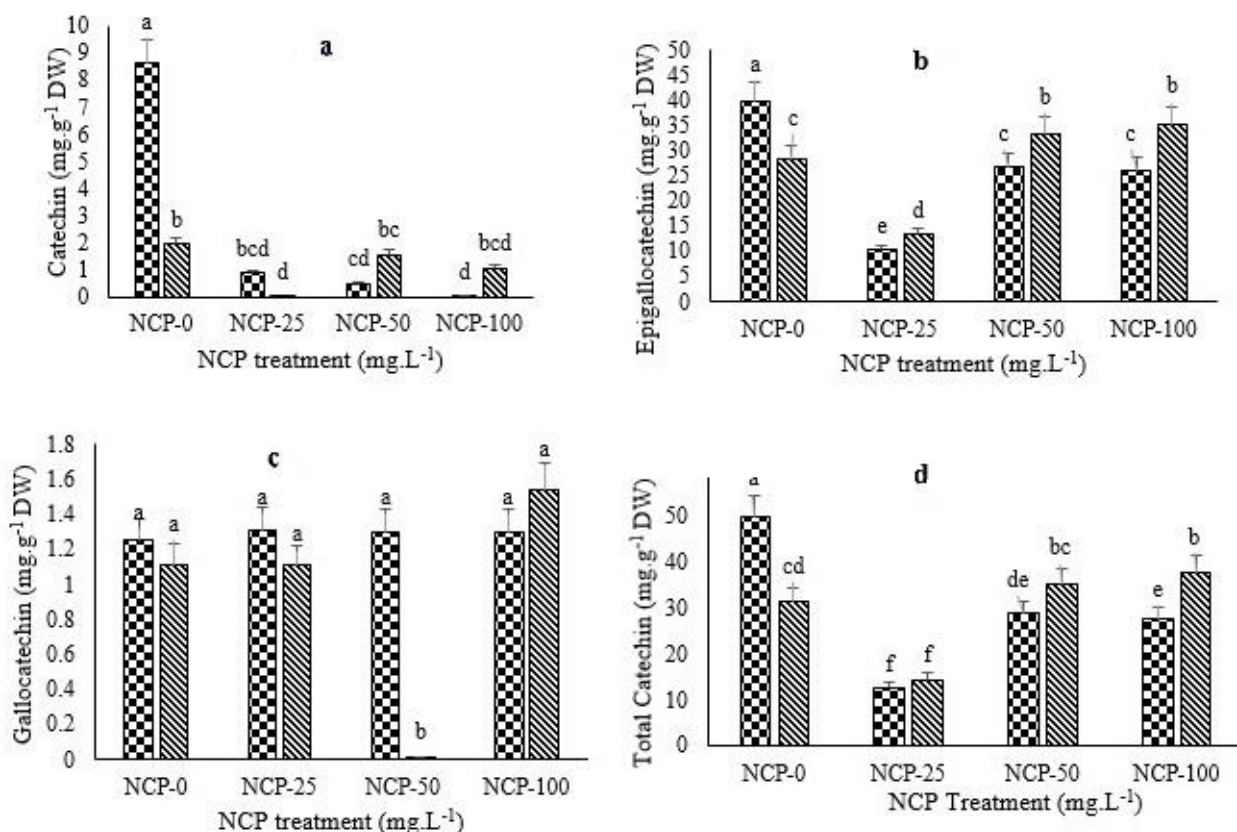
Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1% - 0.5% - 1%)

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).

نمود (شکل ۲- a). مقدار اپی‌گالوکاتچین در حضور غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان بدون NPK به‌طور قابل توجهی کاهش نشان داد، اما میزان اپی‌گالوکاتچین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان در حضور NPK افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد داشت (شکل ۲- b). مقادیر گالوکاتچین تحت تأثیر محرک نانو کیتوزان با اینکه نسبت به شاهد معنی‌دار نیست ولی کمتر دچار نوسان و کاهش یا افزایش شد (شکل ۲- c). نمودار مجموع ترکیب‌های کاتچینی (شکل ۲- d) اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد که تغییرات نانو کیتوزان و تغذیه معدنی تأثیر مثبت نسبت به شاهد در افزایش ترکیب‌های کاتچینی نداشته است. هر چند در مقایسه تیمار دارای تغذیه معدنی و غلظت صفر نانو کیتوزان با سایر تیمارها در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی در مجموع روند افزایشی بود.

اثر تیمار نانو کیتوزان و NPK بر میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی گیاه چای رقم کاشف در میان ترکیب‌های پلی‌فنلی چای، فلاونوئیدها فراوانترین ترکیب‌های ثانویه چای از این گروه محسوب می‌شوند. اجزای اصلی فلاونوئیدهای چای در مسیر بیوسنتز کاتچین‌ها، فلاون ۳-اول‌ها هستند (Shi et al., 2011). مقدار سه ترکیب عمده فلاونوئیدی شامل کاتچین، گالوکاتچین و اپی‌گالوکاتچین با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شدند. نتایج پژوهش‌های ما نشان داد براساس آنالیز واریانس انجام شده تغییرات میزان هر سه ترکیب تحت تأثیر غلظت‌های مختلف محرک زیستی نانو کیتوزان در حضور NPK و بدون حضور آن معنی‌دار بود (جدول ۲).

میزان تغییرات کاتچین در کلیه تیمارهای مورد آزمایش نسبت به شاهد کاهش بسیار شدیدی داشت، به‌طوری که مقدار آن در برخی از تیمارها قابل اندازه‌گیری با HPLC



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان و NPK بر مقدار فلاونوئیدها در برگ گیاه چای رقم کاشف

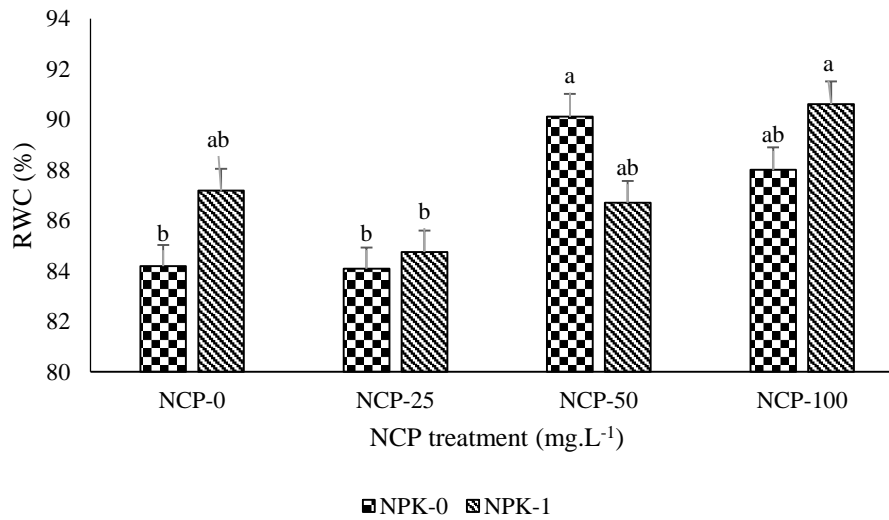
**Figure 2. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on flavonoids content in leaves of *Camellia sinensis* var. Kashef**

Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1%- 0.5%- 1%).

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).

۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوکیتوزان با و بدون تغذیه معدنی اثر معنی‌داری بر محتوای نسبی آب در برگ چای داشتند. همچنین، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوکیتوزان بدون NPK اثر معنی‌داری با روند افزایشی در محتوای نسبی آب برگ چای نسبت به شاهد وجود داشت (شکل ۳).

نتایج سنجش‌های فیزیولوژیکی اثر محرک نانوکیتوزان و NPK بر محتوای نسبی آب در برگ گیاه چای رقم کاشف نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) اثر محرک نانوکیتوزان و NPK بر محتوای نسبی آب در برگ گیاه چای رقم کاشف نشان داد که در سطح احتمال ۱٪، غلظت‌های

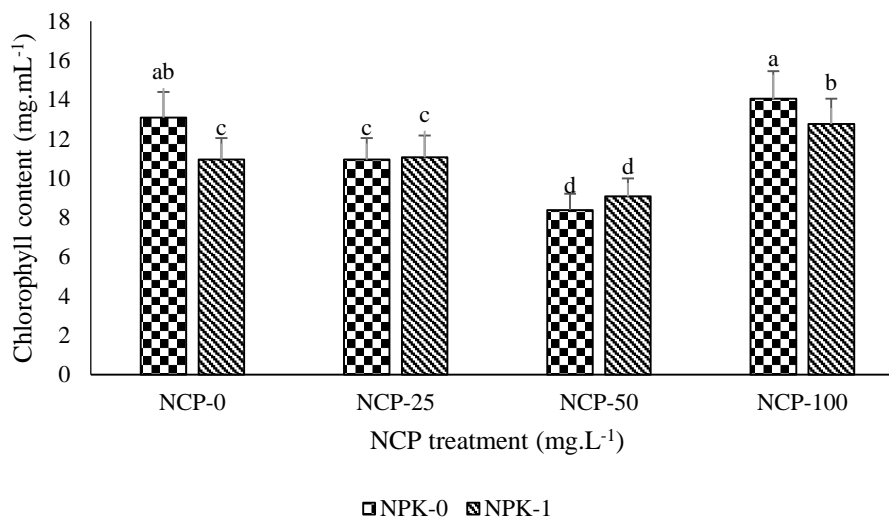


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان و NPK بر محتوای نسبی آب در برگ گیاه چای رقم کاشف

**Figure 3. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on relative water content (RWC) in leaves of *Camellia sinensis* var. Kashef**

Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1% - 0.5% - 1%).

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان و NPK بر محتوای کلروفیل کل در برگ گیاه چای رقم کاشف

**Figure 4. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on chlorophyll content in leaves of *Camellia sinensis* var. Kashef**

Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1% - 0.5% - 1%).

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).

۱۴/۰۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که نسبت به شاهد حدود ۷٪ افزایش داشت که البته این مقدار معنی‌دار نبود.

#### نتایج سنجش‌های بیوشیمیایی

اثر محرک نانو کیتوزان و NPK بر محتوای پروتئین کل در برگ گیاه چای رقم کاشف

نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان با و بدون تغذیه معدنی بر محتوای پروتئین کل در سطح ۵٪ برای ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان معنی‌دار و روند افزایش ملایمی را نسبت به شاهد همسان خود نشان دادند (جدول ۳). بالاترین مقدار پروتئین به میزان  $0.255 \text{ ug mL}^{-1}$  در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان و کمترین مقدار به میزان  $0.18 \text{ ug mL}^{-1}$  در شاهد دیده شد. البته، مقایسه میانگین اثر متقابل نانو کیتوزان و تغذیه معدنی NPK معنی‌دار نبود.

اثر محرک نانو کیتوزان و NPK بر محتوای کلروفیل در برگ گیاه چای رقم کاشف

همانطور که نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد (جدول ۳) اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان با و بدون تغذیه معدنی بر مقدار کلروفیل کل در سطح ۱٪ و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان بدون تغذیه معدنی نسبت به شاهد روند افزایشی داشت اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مقابل، غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان با و بدون تغذیه معدنی محتوای کلروفیل کل نسبت به شاهد با تفاوت معنی‌دار به سمت کاهش میل داشت (شکل ۴). کمترین مقدار کلروفیل با اختلاف معنی‌دار بالا متعلق به غلظت  $50 \text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان بدون تغذیه معدنی به میزان  $8/38$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بالاترین مقدار کلروفیل در تیمار  $100 \text{ mgL}^{-1}$  بدون NPK

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای نانو کیتوزان و NPK بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه چای رقم کاشف

Table 3. ANOVA of nanochitosan and NPK treatments effects on some physiological and biochemical traits in *Camellia sinensis* var. *Kashef*

S.O.V.	d.f.	M.S.					
		Relative water content	Chlorophyll	Protein	Catalase	Superoxide dismutase	Polyphenol oxidase
Nanochitosan	3	20.95**	14.66**	0.00001*	73918.49**	897.04**	4.51**
NPK	1	2.02 <sup>ns</sup>	2.05**	0.00004**	56.40 <sup>ns</sup>	327.52**	6.14**
Nanochitosan×NPK	3	8.60**	1.76**	0.000006 <sup>ns</sup>	53447.39**	303.55**	0.18 <sup>ns</sup>
Experimental error	7	0.96	0.07	0.000002	469.29	0.61	0.12
C.V. (%)		1.12	2.40	6.17	4.25	1.70	9.11

n.s., \*, and \*\*: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

همانطور که در شکل ۵- a نیز دیده می‌شود فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان در سطح احتمال ۱٪ نسبت به هم و همینطور نسبت به شاهد معنی‌دار بوده و روند افزایشی داشت. فعالیت SOD در حضور NPK نیز در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر معنی‌دار و روند افزایشی داشت؛ در حالی‌که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر روند کاهشی تا حدود ۶۰٪ کاهش فعالیت بازدارنده نسبت به شاهد داشت. بالاترین درصد

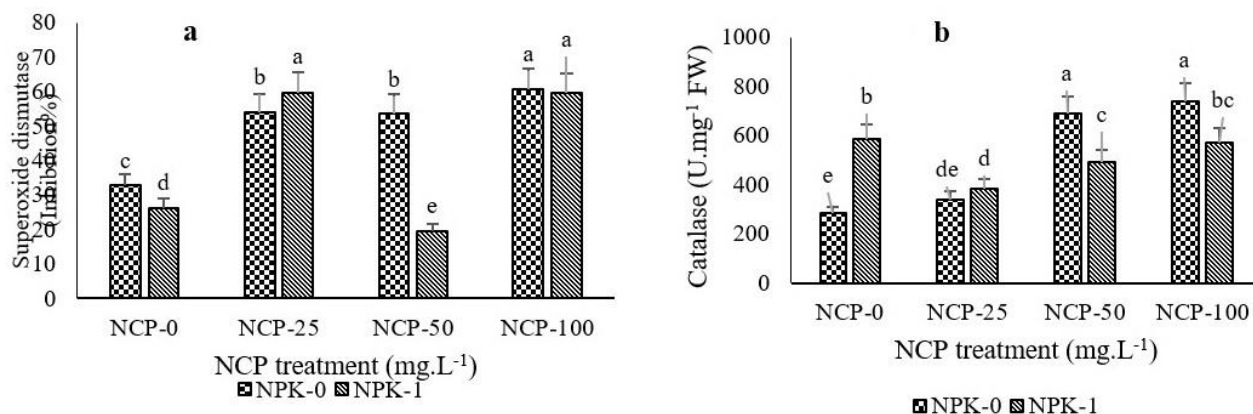
اثر محرک نانو کیتوزان و NPK بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ گیاه چای رقم کاشف

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نانو کیتوزان و NPK بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) معنی‌دار و روند افزایشی داشت. اما در مورد فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO) اثر متقابل این دو ضمن اینکه معنی‌دار نبود، بلکه در غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان نسبت به شاهد روند کاهشی نیز داشت (جدول ۳).

معنی‌دار در سطح ۱٪ بود. فعالیت آنزیم کاتالاز در بررسی اثر متقابل نانوذره و تغذیه معدنی ابتدا نسبت به شاهد کاهش یافت، اما در غلظت‌های بالاتر نانو کیتوزان با افزایش دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد بود (شکل ۵- b).

بازداری SOD در تیمار ۱۰۰ mg.L<sup>-1</sup> نانو کیتوزان با مقدار ۶۰/۶٪ مشاهده شد.

فعالیت آنزیم CAT در کلیه غلظت مورد بررسی نانو کیتوزان به تنهایی نسبت به شاهد افزایشی و دارای اختلاف



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان و NPK بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ گیاه چای رقم کاشف

**Figure 5. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on antioxidant enzymes in leaves of *Camellia sinensis* var. Kashef**

Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1%- 0.5%- 1%).

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).

بیوسنتز فلاونوئیدهای گیاه چای نشان داد که بیان ژن‌های F3H, DFR و LAR تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان و NPK قرار گرفتند (جدول ۴).

نتایج سنجش‌های مولکولی بررسی بیان نسبی ژن‌های F3H, DFR و LAR نتایج تجزیه واریانس بیان نسبی سه ژن کلیدی مسیر

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای نانو کیتوزان و NPK بر بیان برخی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز

کاتچین‌های گیاه چای رقم کاشف

**Table 4. ANOVA of nanochitosan and NPK treatments effects on expression of some key genes in biosynthesis pathway of catechins in *Camellia sinensis* var. Kashef**

S.O.V.	d.f.	M.S.		
		Flavonon-3-hydroxylase	Dihydro flavonol-4-reductas	Leucoantocyanidin reductase
Nanochitosan	3	0.36**	1.49**	0.74**
NPK	1	1.00**	9.82**	2.21**
Nanochitosan× NPK	3	2.93**	3.44**	1.19**
Experimental error	7	0.00	0.00	0.01
C.V. (%)		2.11	3.46	11.57

n.s., \*, and \*\*: non-significant, significant at 5%, and 1% probability levels, respectively.

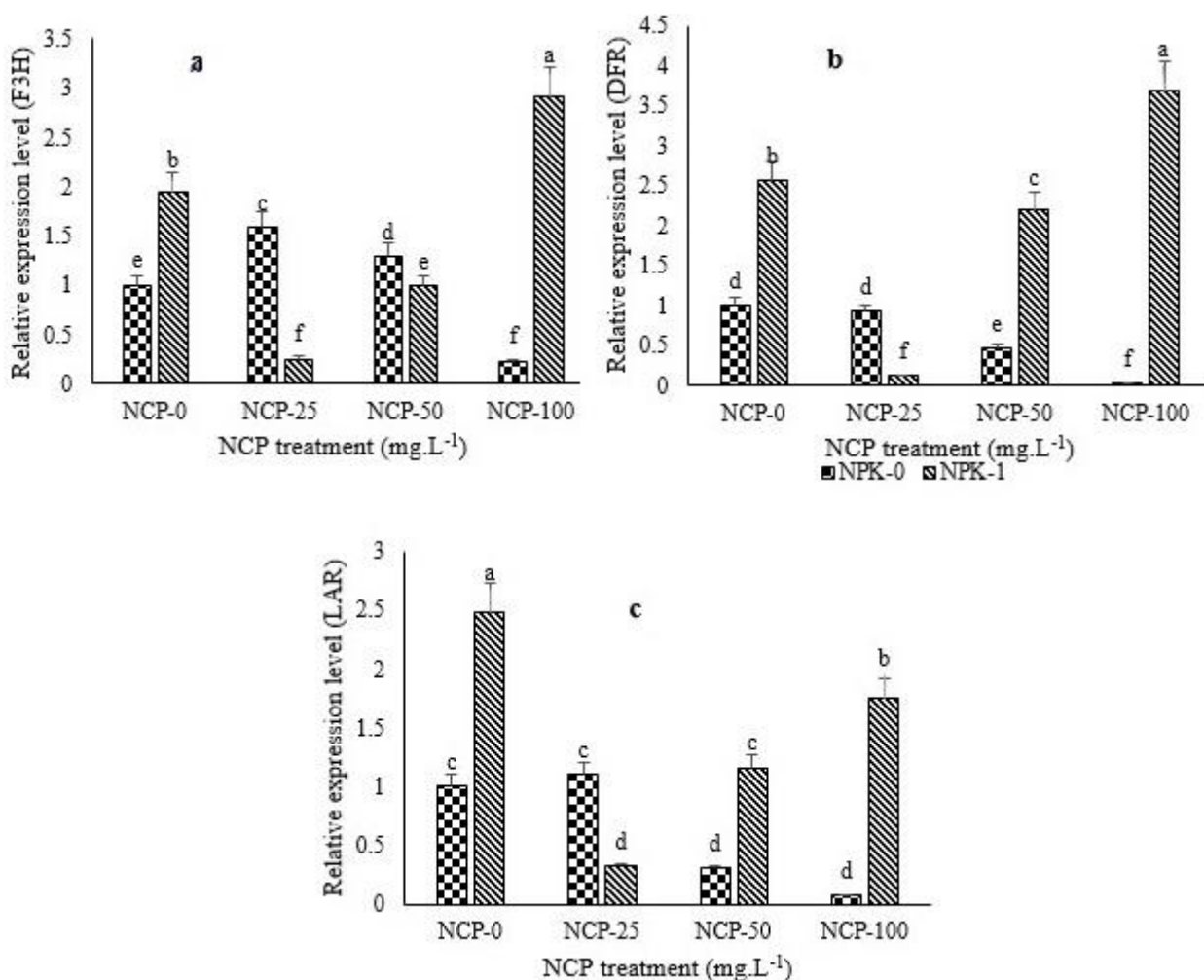


NPK افزایشی در حدود ۲ تا ۴ برابر نسبت به شاهد در غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو کیتوزان داشت (شکل ۶- b).

همچنین، نتایج نشان داد بیان ژن LAR نیز در تیمار غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در حضور NPK به ترتیب به میزان ۲/۴۶، ۱/۲۸ و ۱/۷۶ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۶- c).

تیمار با نانو کیتوزان باعث افزایش بیان آنزیم F3H به میزان ۱/۶۳ و ۱/۲۹ برابر نسبت به کنترل در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به تنهایی شد (شکل ۶- a). در حالی‌که در تیمارهای متشکل از نانو کیتوزان به همراه NPK بیان F3H در غلظت‌های ۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نانو کیتوزان به ترتیب حدود ۲ و ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد.

بیان ژن DFR در تیمارهای مختلف نانو کیتوزان به همراه



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان و NPK بر بیان نسبی برخی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کاتچین‌های گیاه چای رقم کاشف

**Figure 6. Effects of different concentrations of nanochitosan and NPK on expression of some key genes in biosynthesis pathway of catechins in *Camellia sinensis* var. Kashef**

F3H: Flavanon-3-hydroxylase, DFR: Dihydro flavonol-4-reductas, LAR: Leucoantocyanidin reductase; Nanochitosan levels: NCP-0: without nanochitosan, NCP-25: 25 mg.L<sup>-1</sup>, NCP-50: 50 mg.L<sup>-1</sup>, and NCP-100: 100 mg.L<sup>-1</sup>; NPK levels: NPK-0: without NPK and NPK-1: NPK (1%- 0.5%- 1%).

Means with common letters are in the same statistical group at 1 and 5% probability levels (Tukey test).

## بحث

بررسی تغییرات صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان چای رقم کاشف در شرایط مزرعه‌ای تحت تأثیر محرک نانو کیتوزان با و بدون تغذیه معدنی (NPK) نشان داد، به طور کلی غلظت  $1\text{-}100\text{ mgL}^{-1}$  نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی به استثنای محتوای کاتچین و فعالیت آنزیم ppo، در بقیه پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل پلی‌فنل کل، گالوکاتچین، اپی‌گالوکاتچین، RWC، کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT و بیان ژن‌های کلیدی F3H، DFR و LAR نسبت به شاهد افزایشی و با احتمالات  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  معنی‌دار می‌باشد. البته، نحوه تأثیر نانو کیتوزان به عنوان محرک زیستی در تعامل با تغذیه معدنی با دلایل متعدد و بررسی تحقیقات پیشین قابل توضیح است. استفاده از هیدروژل کیتوزان در خاک قدرت نگهداری آب را تا بیش از دو برابر حالت معمول در خاک بالا می‌برد. Ritonga و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی بر روی رشد گیاه سویا (*Glycine max*) در خاک حاوی هیدروژل کیتوزان مشاهده کردند که گیاه تولید حداکثر تعداد برگ را در این نوع خاک داشت. آنان نتیجه گرفتند که هیدروژل کیتوزان ظرفیت نرم‌کنندگی خاک را دارد و باعث حفظ رطوبت خاک و بالا بردن درصد جذب مواد مغذی توسط گیاه سویا شده است. علاوه بر آن، استفاده از الیسیتور نانو کیتوزان برای افزایش پارامترهای رشد و بهبود عملکرد گیاهان مختلف از جمله ماریتیغال، پروانش، آویشن و ریحان توسط محققان گزارش شده است (Ali et al., 2021; Jafari et al., 2022; Emami Bistgani et al., 2017a; Ghasemi Pirbalouti et al., 2017). کیتوزان در تحریک مسیرهای سیگنالینگ برخی از هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین‌ها و جیبرلین‌ها نقش دارد (Safikhan et al., 2018). بنابراین، می‌تواند در تنظیم متابولیسم‌های کربن و نیتروژن و بهبود رشد گیاه نقش داشته باشد (Zhang et al., 2018). ثابت شده است که نانو کیتوزان‌ها به دلیل کوچک بودن اندازه و سطح وسیع نسبت به کیتوزان نقش مؤثرتری دارند (Divya & Jisha, 2018).

پلی‌فنل‌ها آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی هستند که فعالیت رادیکال‌های آزاد لیپیدی و یا ممانعت تبدیل آنها به رادیکال‌های آزاد را به منظور کاهش تنش بر عهده دارند (Emami Bistgani et al., 2017a; Emami Bistgani et al., 2017b). ترکیب‌های فنلی از گیاهان در برابر ROS، تنش‌ها، اشعه ماوراءبنفش و بیماری‌ها محافظت می‌کنند (Dixon & Paiva, 1995). کیتوزان با تأثیر بر آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید، تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنل‌ها را در گیاهان تحت تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهد (Chakraborty et al., 2009; Ferri et al., 2009). بررسی‌های Halder و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که کیتوزان و مشتقات آن با القای تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز ترکیب‌های فنلی موجب تولید بیشتر این ترکیب‌ها می‌شوند. نتایج بدست آمده در پژوهش ما حکایت از افزایش پلی‌فنل کل در حضور نانو کیتوزان دارد.

ترکیب‌های کاتچینی در گیاه چای شامل کاتچین، گالیک اسید، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین، اپی‌گالوکاتچین‌گالات، گالوکاتچین‌گالات، اپی‌کاتچین‌گالات و گالوکاتچین می‌باشد (Chandra et al., 2015; Liu et al., 2015). با توجه به اینکه در یافته‌های پژوهش ما پلی‌فنل کل تحت تأثیر نانو کیتوزان افزایشی است و از سوی دیگر حدود ۷۰٪ پلی‌فنل‌های چای شامل ترکیب‌های کاتچینی می‌باشد، از این رو عدم معنی‌دار بودن تأثیر نانو کیتوزان در سه ترکیب کاتچینی اندازه‌گیری شده در این پژوهش مستلزم تحقیق بیشتر بوده و لازم است بقیه ترکیب‌های کاتچینی نیز اندازه‌گیری شوند تا بتوان تحلیل دقیق‌تری ارائه داد. همان‌طور که در شکل ۲-d مشاهده می‌شود، مقدار کاتچین کل (اپی‌گالوکاتچین، گالوکاتچین و کاتچین) همراه با تغذیه معدنی NPK افزایش داشته است. بنابراین، حضور این دو ترکیب می‌تواند عامل تأثیرگذاری در افزایش کاتچین کل باشد.

همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشاهده می‌شود، براساس آنزیم‌های مؤثر در سنتز هر یک از ترکیب‌های ذکر شده در

Hassan & Fetouh, 2019). استفاده از محرک نانوقره در گیاه *Artemisia annua* باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Zhang et al., 2013). همچنین، در کلروپلاست گیاه اسفناج استفاده از نانوذرات و سالیسیلیک اسید به عنوان محرک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، POD و APX شد (Singh, 2023؛ Lei et al., 2008). در مطالعه دیگری بر روی گیاه *Satureja khuzestanica* در محیط درون شیشه و برون شیشه تحت تأثیر محرک‌های سالیسیلیک اسید (SA)، متیل جاسمونات (MeJA) و نانوتیوپ‌های کربنی چند دیواره‌ای (MWCNTs)، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مشاهده شد (Fatemi et al., 2020). تحت تنش اکسیداتیو و محرک زیستی کیتوزان و نانو کیتوزان، ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه جای نیز بیان شدند. این ژن‌ها سیستم آنتی‌اکسیدانی ROS را مهار می‌کنند و سطح ROS و تحمل به تنش را افزایش می‌دهند. کاتالاز یکی از مؤثرترین آنزیم‌های دفاعی است که در تمام موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. این آنزیم مستقیماً بر پراکسید هیدروژن تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش اثرهای سمی آن می‌شود (Liu et al., 2015). با توجه به اینکه جای یک گیاه C3 است، فعالیت کاتالاز بالا می‌تواند پراکسید هیدروژن تولید شده توسط سلول‌های مسیره‌های هوایی را از بین برده و موجب کاهش سرعت تنفس نوری شود (Jeyaramraja et al., 2003). پراکسیدازها نیز گروهی از آنزیم‌های دفاعی تولید شده در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که  $H_2O_2$  را در سلول‌ها تجزیه کرده و از تولید ROS جلوگیری می‌کنند (Buller & Aune, 1992). گزارش شده است که کیتوزان ژن‌های دفاعی گیاه را از طریق مسیر اکتادکانوئید فعال می‌کند (Doares et al., 1995) و ترکیب‌های سیگنالی اکتادکانوئید را القاء می‌کند (Rakwal et al., 2002). تحت شرایط تنش، کیتوزان موجب تجمع پراکسید هیدروژن می‌شود (Lin et al., 2005) و بیان چندین آنزیم دفاعی را در سیستم جاروب ROS افزایش می‌دهد (Kim et al., 2005). فعالیت کاتالاز و

مسیر بیوستنز کاتچین‌ها (Zhang et al., Shi et al., 2011؛ Zhang et al., 2016)، به نظر می‌رسد با توجه به اینکه آنزیم لوکوتوسیانیدین ردوکتاز (LAR) تشکیل هر سه ترکیب کاتچینی را هدایت می‌کند در رقابت برای تشکیل ترکیب‌های پایدارتر در حضور محرک زیستی نانو کیتوزان و NPK تشکیل کاتچین در همه تیمارها نسبت به شاهد بدون نانو کیتوزان کاهش قابل توجهی را نشان می‌دهد. از سوی دیگر، با توجه به اینکه تشکیل گالوکاتچین نیز توسط آنزیم LAR القاء می‌شود و در عین حال نسبت به کاتچین پایدارتر است، تولید گالوکاتچین و اپی‌گالوکاتچین در پژوهش ما نسبت به کاتچین تحت هدایت آنزیم LAR بیشتر می‌باشد.

نتایج تحقیقات ما نشان داد که تحت تأثیر محرک نانو کیتوزان، محتوای نسبی آب و محتوای کلروفیل در گیاه جای نسبت به محیط فاقد نانو کیتوزان افزایش یافت.

نانو کیتوزان‌ها می‌توانند در شرایط تنش اکسیداتیو موجب افزایش پروتئین کل شوند. تأثیر نانو کیتوزان‌ها بر محتوای پروتئین به میزان نیتروژن در کیتوزان که نقش اساسی در سنتز پروتئین دارد (Diviya & Jisha, 2018)، وابسته است. علاوه بر این، کیتوزان می‌تواند باعث کاهش تخریب پروتئین محلول از طریق افزایش بیان ژن‌های بازدارنده پروتئیناز و پروتئیناز شود (Hidangmayum et al., 2019؛ Pongprayoon et al., 2022). در شرایط تنش، نقش نانو کیتوزان در افزایش محتوای پروتئین در گیاه *abrotanoides* (Attaran Dowom et al., 2022)، گیاه *T. aestivum* و *H. vulgare* (Behboudi et al., 2018) و *S.* (Li et al., 2019) اثبات شده است. با این حال، در پژوهش ما تغییرات میزان پروتئین تحت تأثیر نانو کیتوزان و NPK و اثر متقابل آنها معنی‌دار نبود.

تنش اکسیداتیو ناشی از محرک‌ها تولید ROS را در گیاهان افزایش می‌دهد و در پی آن سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی برای حذف رادیکال‌های آزاد وارد عمل می‌شوند. اجزای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی دارای نقش حیاتی در سازوکار مهار ROS در برابر تنش اکسیداتیو هستند (Attia et al., 2020؛ Al-Yasi et al., 2020).

مسیر بیوسنتز فلاونوئید است که در آن بسیاری از ژن‌ها در پاسخ به تنش نقش دارند (Lenka et al., 2011)؛ Vasquez-Robinet et al., 2008). یکی از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز فلاونوئیدها، F3H است که نقش مهمی در شرایط تنش غیرزیستی و زیستی دارد. مطالعات انجام شده در *Reaumuria soongorica* (Liu et al., 2013)، انگور (Ahmed et al., 2007) و صنوبر (Castellarin et al., 2021)، افزایش رونوشت‌های F3H را تحت تنش اکسیداتیو نشان دادند. در مطالعه ما، القای F3H تحت تنش اکسیداتیو ناشی از محرک نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی کاملاً معنی‌دار بود. میزان این آنزیم در حضور نانو کیتوزان و تغذیه معدنی افزایش یافت. آنزیم‌های پایین‌دست مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، DFR و LAR هستند. نتایج تحقیقات بر روی *Populus euramericana* نشان داد که تحت تنش، بیان آنزیم‌های پایین‌دستی مسیر فلاونوئید مانند DFR و ANS افزایش یافته است (Ahmed et al., 2021). افزایش قابل توجه در محتوای اپی‌گالوکاتچین در تیمار با نانو کیتوزان در تحقیق ما ممکن است نتیجه افزایش بیان LAR و DFR باشد، زیرا LAR از آنتوسیانیدین‌ها به‌عنوان سوبسترا برای سنتز اپی‌گالوکاتچین استفاده می‌کند. Chandra و همکاران (۲۰۱۵)، افزایش میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی از جمله اپی‌گالوکاتچین، گالوکاتچین و اپی‌گالوکاتچین را در شرایط تنش زیستی مشاهده کردند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که استفاده از نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های مختلف به‌طور قابل توجهی تنش اکسیداتیو ناشی از محرک را از طریق القای سازوکار بالقوه آنتی‌اکسیدانی در گیاه چای کاهش داده است. محتوای آب نسبی، محتوای کلروفیل، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز) و غیرآنزیمی (پلی‌فنل کل) در نتیجه تأثیر نانو کیتوزان در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  افزایش یافت. براساس نتایج مطالعه ما به این نتیجه رسیده‌ایم که آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه بسیار مهم برای افزایش کیفیت برگ سبز برداشت شده گیاه چای و مقابله با تنش‌های اکسیداتیو

پراکسیدازها تحت تأثیر نانو کیتوزان از طریق مسیر اکسید نیتریک اثبات شده است (Zhang et al., 2011) و این نشان می‌دهد که گیاهان تیمار شده با نانو کیتوزان کارایی بالاتری برای حذف  $\text{H}_2\text{O}_2$  و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی دارند. نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان می‌دهد که نانو کیتوزان‌ها می‌توانند القاء‌کننده مسیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشند که قادر به حذف ROS، حفظ یکپارچگی غشاء و در نهایت باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Ali et al., 2021; Li et al., 2017; Ma et al., 2014). یافته‌های ما نشان داد که در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از محرک نانو کیتوزان میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه چای رقم کاشف افزایش یافت.

ترکیب‌های فنلی از جمله فلاونوئیدها ترکیب‌های بسیار قدرتمند در گیاهان هستند که می‌توانند در مقاومت به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش بسزایی داشته باشند. نتایج HPLC پژوهش ما نشان داد که میزان اپی‌گالوکاتچین در حضور نانو کیتوزان به همراه تغذیه معدنی NPK افزایش یافت. Cheruiyot و همکاران (۲۰۰۸) پیشنهاد کردند که تحت تنش اکسیداتیو تغییر در محتوای کاتچین ممکن است با سطح مقاومت گیاهان چای به تنش مرتبط باشد و محتوای EGC و EC در گیاهان چای مقاوم به خشکی با تغییرات رطوبت خاک همبستگی مثبت دارند. آنان به این نتیجه دست یافتند که همه ترکیب‌های کاتچین در فعالیت آنتی‌اکسیداسیونی نقش نداشته و احتمالاً EGC و EC نقش اساسی در مقاومت به خشکی چای داشته باشند. در مطالعه دیگری تجمع بیشتر ترکیب‌های فنلی در نمونه‌های تیمار شده گیاه چای با کیتوزان در نتیجه بیان ژن PAL که از آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید و القای بیان ژن F3H که از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می‌باشد تأیید شد، که نتیجه آن تجمع بیشتر فلاونوئیدهایی مانند EC، ECG، EGCG برای ایجاد مقاومت به پاتوژن‌ها بود (Chandra et al., 2017). در گیاهان، یکی از مسیرهای متابولیک ثانویه شناخته شده در شرایط تنش،

- properties and omega-3, 6 and 9 fatty acids in some cultivars of *Nigella sativa* L. under drought stress condition. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 7(4): 83-96.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1): 1-15.
  - Askarian, M., Aminifard, M.H., Khayyat, M. and Jahani, M., 2020. Effects of Different Levels of NPK Fertilizer and Fulvic Acid on Morphological Characteristics, Yield and Yield components of Basil as a Medicinal Plant (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agroecology*, 11(4): 1375-1388.
  - Attaran Dowom, S., Karimian, Z., Mostafaei Dehnavi, M. and Samiei, L., 2022. Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress. *BMC Plant Biology*, 22(1): 364-377.
  - Attia, H., Al-Yasi, H., Alamer, K., Ali, E., Hassan, F., Elshazly, S. and Hessini, K., 2020. Induced anti-oxidation efficiency and others by salt stress in *Rosa damascena* Miller. *Scientia Horticulturae*, 274: 109681.
  - Bakshi, P.S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K. and Kumar, N.S., 2020. Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications. *International journal of biological macromolecules*, 150: 1072-1083.
  - Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1): 276-287.
  - Behboudi, F., Tahmasebi Sarvestani, Z., Kassae, M.Z., Modares Sanavi, S.A.M., Sorooshzadeh, A. and Ahmadi, S.B., 2018. Evaluation of chitosan nanoparticles effects on yield and yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.) under late season drought stress. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, 3(1): 22-39.
  - Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
  - Buller, D.B. and Aune, R.K., 1992. The effects of speech rate similarity on compliance: Application of communication accommodation theory. *Western Journal of Communication (includes Communication Reports)*, 5: 37-53.
  - Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E. and Di Gaspero, G., 2007.

شرایط محیطی هستند. تیمار گیاهان چای با نانو کیتوزان منجر به افزایش تولید کلروفیل و ترکیبات کاتچین شد که علاوه بر تأثیر مثبت در کیفیت برگ سبز چای در شرایط تنش می تواند نقش تعدیل کننده داشته باشد. بررسی مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها نشان داد که بیان آنزیم های DFR، F3H و LAR افزایش یافت. بنابراین، نانو کیتوزان می تواند جایگزین مناسب مواد شیمیایی برای افزایش کاتچین ها و برگ سبز با کیفیت تر در گیاه چای باشد و با توجه به زیست تخریب پذیر بودن آن میزان آلودگی محیط زیستی را کاهش دهد.

### سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۲۰-۴۰۰۹ مصوب معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی و با حمایت پژوهشکده علوم پایه کاربردی و همکاری پژوهشکده چای لاهیجان انجام شد. نویسندگان مقاله از حمایت های انجام شده صمیمانه قدردانی می نمایند.

### References

- Aebi, H., 1974. Catalase. 673-684, In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic press, 555p.
- Ahmed, U., Rao, M.J., Qi, C., Xie, Q., Noushahi, H.A., Yaseen, M. and Zheng, B., 2021. Expression profiling of flavonoid biosynthesis genes and secondary metabolites accumulation in populus under drought stress. *Molecules*, 26(18): 5546-5553.
- Al-Yasi, H., Attia, H., Alamer, K., Hassan, F., Ali, E., Elshazly, S. and Hessini, K., 2020. Impact of drought on growth, photosynthesis, osmotic adjustment, and cell wall elasticity in Damask rose. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150: 133-139.
- Ali, E.F., El-Shehawi, A.M., Ibrahim, O.H.M., Abdul-Hafeez, E.Y., Moussa, M.M. and Hassan, F.A.S., 2021. A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161: 166-175.
- Alaghemand, A., Khaghani, Sh., Bihamta, M.R., Gomarian, M. and Ghorbanpour, M., 2019. Effect of chitosan and nano-chitosan on agronomic

- Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5: 407-415.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017b. Morpho-physiological and phytochemical traits of (*Thymus daenensis* Celak in response to deficit irrigation and chitosan application. *Acta Physiologiae plantarum*, 39(10): 1-13.
  - Fatemi, F., Abdollahi, M.R., Mirzaie-Asl, A., Dastan, D. and Papadopoulou, K., 2020. Phytochemical, antioxidant, enzyme activity and antifungal properties of *Satureja khuzistanica* in vitro and in vivo explants stimulated by some chemical elicitors. *Pharmaceutical biology*, 58(1): 286-296.
  - Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M.J. and Bagni, N., 2009. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 9(3): 610-624.
  - Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Salimi, A. and 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 Horticulture*, 217: 114-122
  - Gu, H., Wang, Y., Xie, H., Qiu, C., Zhang, S., Xiao, J. and Ding, Z., 2020. Drought stress triggers proteomic changes involving lignin, flavonoids and fatty acids in tea plants. *Scientific Reports*, 10(1): 15504.
  - Guo, F., Guo, Y., Wang, P., Wang, Y. and Ni, D., 2017. Transcriptional profiling of catechins biosynthesis genes during tea plant leaf development. *Planta*, 246: 1139-1152.
  - Hai, N.T.T., Thu, L.H., Nga, N.T.T., Hoa, T.T., Tuan, L.N.A., Van Phu, D. and Hien, N.Q., 2019. Preparation of chitoooligosaccharide by hydrogen peroxide degradation of chitosan and its effect on soybean seed germination. *Journal of Polymers and the Environment*, 27: 2098-2104.
  - Hassan, F. and Fetouh, M., 2019. Does moringa leaf extract have preservative effect improving the longevity and postharvest quality of gladiolus cut spikes. *Scientia Horticulturae*, 250: 287-293.
  - Halder, M., Sarkar, S. and Jha, S., 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12): 880-895.
  - Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell & Environment*, 30(11): 1381-1399.
  - Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K. and Acharya, K., 2015. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports*, 5(1): 15195-15207.
  - Chandra, S., Chakraborty, N., Panda, K. and Acharya, K., 2017. Chitosan-induced immunity in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze against blister blight disease is mediated by nitric-oxide. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 298-307.
  - Chakraborty, M., Karun, A. and Mitra, A., 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166(1): 63-71.
  - Chen, M., Li, H., Zhang, W., Huang, L. and Zhu, J., 2022. Transcriptomic analysis of the differences in leaf color formation during stage transitions in *Populus euramericana* 'Zhonghuahongye'. *Agronomy*, 12(10): 2396.
  - Cheruiyot, E.K., Mumera, L.M., Ngetich, W.K., Hassanali, A., Wachira, F. and Wanyoko, J.K., 2008. Shoot epicatechin and epigallocatechin contents respond to water stress in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(5): 1219-1226.
  - Davarynejad, G.H., Azizi, M. and Akheratee, M., 2009. Effect of foliar nutrition on quality, quantity and of alternate bearing of Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Horticultural Sciences*, 23(2): 1-10
  - Divya, K. and Jisha, M., 2018. Nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16: 101-112.
  - Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7): 1085-1097.
  - Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. and Ryan, C.A., 1995. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10): 4095-4098.
  - Dzung, N.A., Khanh, V.T.P. and Dzung, T.T., 2011. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate polymers*, 84(2): 751-755.
  - Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017a.

- molecular weights in rice. *Journal of plant physiology*, 162(8): 937-944.
- Liu, M., Li, X., Liu, Y. and Cao, B., 2013. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria songorica*. *Plant physiology and biochemistry*, 73: 161-167.
  - Liu, S.-C., Yao, M.-Z., Ma, C.-L., Jin, J.-Q., Ma, J.-Q., Li, C.-F. and Chen, L., 2015. Physiological changes and differential gene expression of tea plant under dehydration and rehydration conditions. *Scientia Horticulturae*, 184: 129-141.
  - Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *methods*, 25(4): 402-408.
  - Lv, Z., Zhang, C., Shao, C., Liu, B., Liu, E., Yuan, D., Zhou, Y. and Shen, C., 2021. Research progress on the response of tea catechins to drought stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13): 5305-5313.
  - Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y. and Guo, T., 2014. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 60-66.
  - Mazid, M., Khan, T.A. and Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, 3(2): 232-249.
  - Naderi, S., Fakheri, B.A., Esmaeilzadeh, B.S. and Kamaladini, H., 2014. Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. *modern genetics Journal*, 9(3): 259-266.
  - Orlita, A., Sidwa-Gorycka, M., Paszkiewicz, M., Malinski, E., Kumirska, J., Siedlecka, E.M., Łojkowska, E. and Stepnowski, P., 2008. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(2): 91-96.
  - Pongprayoon, W., Siringam, T., Panya, A. and Roytrakul, S., 2022. Application of chitosan in plant defense responses to biotic and abiotic stresses. *Applied Science and Engineering Progress*, 15(1): 11-25
  - Robert, E. and Farrell, J., 2017. *RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. Academic press, Netherlands, 693p.
  - Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D. and Hemantaranjan, A., 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 25: 313-326.
  - Jeyaramraja, P.R., Pius, P.K., Raj Kumar, R. and Jayakumar, D., 2003. Soil moisture stress-induced alterations in bioconstituents determining tea quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12): 1187-1191.
  - Jafari, S., Mousavi-Fard, S., Rezaei Nejad, A., Mumivand, H. and Sorkheh, K., 2022. Effects of chitosan and titanium dioxide (bulk and nano) foliar application on yield and biochemical responses of *Silybum marianum* (L. Gaertn.) ecotypes. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(3): 450-463.
  - Jiang, C.K., Ma, J.Q., Liu, Y.F., Chen, J.D., Ni, D.J. and Chen, L., 2020. Identification and distribution of a single nucleotide polymorphism responsible for the catechin content in tea plants. *Horticulture research*, 7: 24.
  - Kim, H.J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N.C., 2005. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9): 3696-3701.
  - Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L. and Fashui, H., 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research*, 121: 69-79.
  - Lenka, S.K., Katiyar, A., Chinnusamy, V. and Bansal, K.C., 2011. Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant biotechnology journal*, 9(3): 315-327.
  - Li, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Merewitz, E., Peng, Y., Ma, X. and Yan, Y., 2017. Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. *Journal of proteome research*, 16(8): 3039-3052.
  - Li, R., He, J., Xie, H., Wang, W., Bose, S.K., Sun, Y., Hu, J. and Yin, H., 2019. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International journal of biological macromolecules*, 126: 91-100.
  - Lin, W., Hu, X., Zhang, W., Rogers, W.J. and Cai, W., 2005. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different

- T. and Wan, X.C., 2011. Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. *BMC genomics*, 12: 1-19.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
  - Singh, S., 2023. Salicylic acid elicitation improves antioxidant activity of spinach leaves by increasing phenolic content and enzyme levels. *Food Chemistry Advances*, 2: 100156.
  - Srisornkompon, P., Pichyangkura, R. and Chadchawan, S., 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.
  - Tovar, G.I., Briceño, S., Suarez, J., Flores, S. and González, G., 2020. Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles using *Moringa oleifera* and chitosan and its evaluation on corn germination. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 14: 100350.
  - Vanti, G.L., Masaphy, S., Kurjogi, M., Chakrasali, S. and Nargund, V.B., 2020. Synthesis and application of chitosan-copper nanoparticles on damping off causing plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156: 1387-1395.
  - Vasquez-Robinet, C., Mane, S.P., Ulanov, A.V., Watkinson, J.I., Stromberg, V.K., De Koeyer, D., Schafleitner, R., Willmot, D.B., Bonierbale, M., Bohnert, H.J. and Grene, R., 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of experimental botany*, 59(8): 2109-2123
  - Zhang, H., Zhao, X., Yang, J., Yin, H., Wang, W., Lu, H. and Du, Y., 2011. Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitoooligosaccharide. *Plant cell reports*, 30: 1153-1162.
  - Zhang, B., Zheng, L.P., Yi Li, W. and Wen Wang, J., 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*, 9(3): 363-370.
  - Zhang, X. and Shao, X., 2015. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(2): 109-117.
  - Zhang, L.-Q., Wei, K., Cheng, H., Wang, L.-Y. and Zhang, C.-C., 2016. Accumulation of catechins
  - Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G.K. and Iwahashi, H., 2002. Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(5): 1041-1045.
  - Ritonga H., Nurfadillah, A., Fransiskus S.R., Ramadhan, L.O.A.N. and Nurdin, M., 2019. Preparation of Chitosan-EDTA hydrogel as soil conditioner for soybean plant (*Glycine max*). *Groundwater for Sustainable Development*, 9(2): 100277.
  - Safikhani, S., Khoshbakht, K., Chaichi, M.R., Amini, A. and Moteszarehadeh, B., 2018. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10: 49-58.
  - Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S.S. and Pal, A., 2013. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International journal of biological macromolecules*, 62: 677-683.
  - Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M.K., Sharma, S.S., Pal, A. and Biswas, P., 2015. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International journal of biological macromolecules*, 75: 346-353.
  - Sen, S.K., Chouhan, D., Das, D., Ghosh, R. and Mandal, P., 2020. Improvisation of salinity stress response in mung bean through solid matrix priming with normal and nano-sized chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 145: 108-123.
  - Senthilkumar, M., Amaran, N. and Sankaranarayanan, A., 2021. *Plant-Microbe Interactions*. Springer, US., 700p.
  - Stodt, U.W., Blauth, N., Niemann, S., Stark, J., Pawar, V., Jayaraman, S. and Engelhardt, U.H., 2014. Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(31): 7854-7861.
  - Sharp, R.G., 2013. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*, 3(4): 757-793.
  - Shi, C.Y., Yang, H., Wei, C.L., Yu, O., Zhang, Z.Z., Jiang, C.J., Sun, J., Li, Y.Y., Chen, Q., Xia,



- Zhang, Z., Song, C., Zhao, J., Xia, E., Wen, W., Zeng, L. and Benedito, V.A., 2023. Secondary metabolites and metabolism in tea plants. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1143022.
- Zhao, J. and Dixon, R.A., 2010. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in plant science*, 15(2): 72-80.
- Yadegari, M., 2022. Effects of NPK complete fertilizer, botamisol, and humic acid on morphophysiological characteristics and essential oil in three *Thymus* species under drought stress conditions, *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(2): 301-321.
- and expression of catechin synthetic genes in *Camellia sinensis* at different developmental stages. *Botanical Studies*, 57(1): 1-8.
- Zhang, Y., Li, Z., Li, Y.P., Zhang, X.Q., Ma, X., Huang, L. K. and Peng, Y., 2018. Chitosan and spermine enhance drought resistance in white clover, associated with changes in endogenous phytohormones and polyamines, and antioxidant metabolism. *Functional Plant Biology*, 45(12): 1205-1222.