The Effect of Chitosan on Total Alkaloid, Phenol and Flavonoid Content in The Callus of Black Henbane *(Hyoscyamus niger* L.*)*

Pages 67-79

R. Biglari Farash[1*], V. Chalavi[2], V. Akbarpour[3] and K. Kazimitabar[4]

1) Master's student of medicinal plants, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
2 & 3) Associate Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, respectively.
4) Associate Professor of Plant Breeding Department, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

*Corresponding author**: razibiglari1365@gmail.com**

Received date: 2023.04.17 **Accepted date: 2023.07.12**

Abstract

The black henbane (*Hyoscyamus Niger* L.*)* is an important medicinal plant containing alkaloids, which play a very significant role in the pharmaceutical industry. The increase in production of these secondary metabolites is often achieved using specific compounds called elicitors or stimulants. Chitosan is one of the stimulants involved in the production of secondary metabolites such as alkaloids. Based on this, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design with two factors including chitosan at four levels (150, 100, 50, 0 µM) and in three time periods (24, 48, and 72 hours) with three replications. After suspension of callus in different concentrations of chitosan at various time intervals, they were removed from the medium and examined. The studied traits included total alkaloid, total phenol, and total flavonoids, which were measured using a spectrophotometer. According to the variance analysis results, the simple and interaction effects of both the time and chitosan treatments were significant. The highest total alkaloid content was obtained in the treatment containing 100 mg/L chitosan at 48 hours. The highest phenol content was extracted at the rate of 0.074 mg in the concentration of 100 mg of chitosan in 72 hours. The highest flavonoid content was 0.095 mg in the treatment containing 100 mg/L chitosan at 72 hours. According to these results and previous findings of other researchers, chitosan is an effective stimulant for increasing secondary metabolites in plants.

Keywords: Alkaloid, Henbane, Phenol, Flavonoid and Chitosan.

اثر کیتوزان بر میزان الکالوئید، فنل و فلاونوئید کل در کالوس گیاه بنگدانه سیاه *(Hyoscyamus niger L.)*

شماره صفحات
۷۹-۶۷

راضیه بیگلری فراش[۱*]، ویدا چالوی[۲]، وحید اکبرپور[۳] و سید کمال کاظمی‌تبار[۴]

۱) دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲ و ۳) به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۴) دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
* نویسنده مسئول: **razibiglari1365@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۱

چکیده

گیاه بذرالبنج از گیاهان دارویی مهم حاوی الکالوئید می باشد که در صنعت داروسازی نقش بسیار مهمی پیدا کرده است. افزایش تولید این متابولیت های ثانویه اغلب با ترکیبات خاصی به نام الیسیتور یا محرک صورت می گیرد. کیتوزان از جمله محرک‌هایی است که در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند الکالوئیدها نقش دارد. بر این اساس آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل کیتوزان در چهار سطح (۰،۵۰،۱۰۰،۱۵۰ میکرومولار) و در سه بازه زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با سه تکرار انجام گرفت. پس از تعلیق سوسپانسیونی کالوسها در غلظت های متفاوت کیتوزان در بازه های زمانی مختلف، از محیط خارج و مورد بررسی قرار گرفتند. صفات مورد بررسی شامل مقدار الکالوئید کل، فنل کل، فلاونوئیدکل بود که با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثرات ساده و متقابل هر دو تیمار زمان و کیتوزان سبب معنی دار شدن نتایج شد. بیشترین میزان الکالوئید کل در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان و در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد. بیشترین میزان فنول به میزان ۰/۰۷۴ میلی گرم در غلظت ۱۰۰ میلی گرم کیتوزان و در زمان ۷۲ ساعت استخراج شد. بیشترین میزان فلاونوئید به میزان ۰/۰۹۵ میلی گرم در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان و در زمان ۷۲ ساعت بدست آمد. با توجه به این نتایج و یافته های پیشین سایر محققان کیتوزان محرکی کارآمد جهت افزایش متابولیت های ثانویه در گیاهان می باشد.

کلیدواژه‌ها: الکالوئید، بنگدانه، فنل، فلاونوئید و کیتوزان.

مقدمه

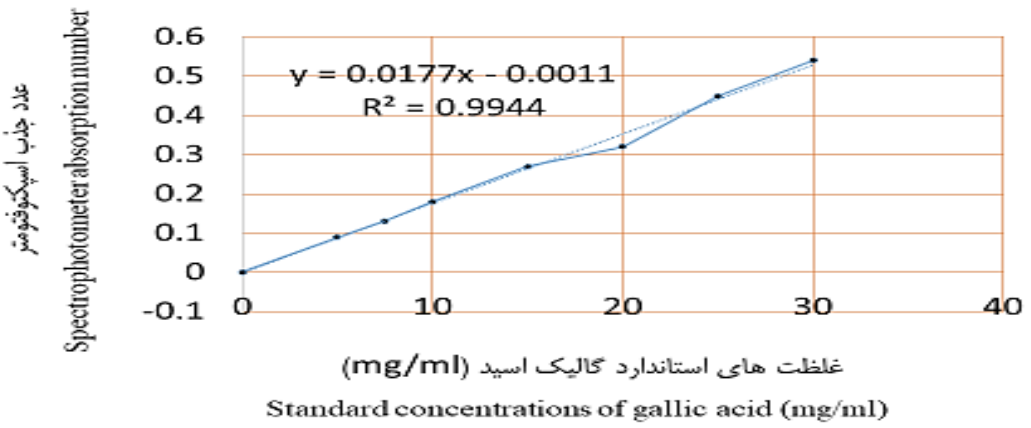
گیاهان از مهمترین منابع تهیه مواد دارویی محسوب می شوند. با وجود اینکه تقاضا برای ترکیبات دارویی افزایش یافته، اما محدودیت منابع طبیعی و غلظت پایین این ترکیبات در گیاه و چالش های مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی این گیاهان، محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید مواد موثره گیاهان واداشته است. استفاده از کشت درون شیشه ای گیاه، سبب دسترسی به منابع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط و افزایش تولید ترکیبات می شود (Bourgaud *et al*., 2001). با توجه به اینکه ذخیره متابولیت های ثانویه در گیاهان، نوعی پاسخ گیاه به تنش های محیطی است، در نتیجه مقدار آنها می تواند از طریق محرک های زیستی و غیرزیستی تحریک شود. از این عامل در کشت کالوس و کشت سوسپانسیونی جهت افزایش متابولیت های ثانویه استفاده می شود. محرک ها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانویه می شوند (Zhao *et al*., 2005). در میان این متابولیت ها، آلکالوئیدها، گروهی مهم با تنوع فراوان را تشکیل می دهند. گیاهان تنها منبع تروپان آلکالوئیدها هستند که منبع اقتصادی آنها از گیاهان خانواده سیب زمینی (Solanaceae) تامین می شود (Vernay *et al*., 2008). از جمله ی این گیاهان بنگدانه سیاه است که از جنس هیوسیاموس(*Hyoscyamus*) و گونه نایجر (*Niger*) می باشد و دارای مخلوطی از آلکالوئیدهای مهم مانند هیوسیامین، آسکوپولامین و به مقدار کم آتروپین است (Omidbeigi, 2009). در صنایع داروسازی داروهای ضد آسم، آرامبخش، ترمیم کننده ی سیستم اعصاب و تسکین ناراحتی هایی که در رابطه با ضعف پیری ایجاد می شود، از آن تهیه می گردد. همچنین ضد اسپاسم و تشنج بوده و تأثیر با ارزشی در نشانه های بیماری پارکینسون دارد. آلکالوئیدهای این گیاه در چشم پزشکی و درمان بیماریهای قلبی و عروقی و گوارشی کاربرد دارد (Omidbeigi, 2009). در بین محرک های زیستی، کیتین و کیتوزان به طور گسترده به منظور تولید متابولیت های ثانویه استفاده شده اند (Pu *et al*., 2009). پلی ساکارید کیتوزان یک کوپلیمر از ۲ گلوکز آمین و N - استیل D گلوکز آمین است که به وسیله واکنش د استیله شدن از کیتین مشتق می شود. این ماده آلی، ترکیب اصلی دیواره های سلولی برخی از جانوران از جمله خانواده خرچنگ مانند میگو و خرچنگ، حشرات و میکروارگانیسم ها را تشکیل می دهد. زیست تجزیه پذیری، غیر سمی بودن و طبیعت غیر آلرژیک کیتوزان استفاده از آن را به عنوان ماده فعال زیستی تشویق می کند. یکی از ویژگی های مهم کیتوزان به طبیعت پلی کاتیونیک آن مربوط می شود که آن را قادر می سازد با انواعی از مواد آلی و غیرآلی پیوند داشته باشد (Prashanth and Tharanathan, 2007). کیتوزان به عنوان عامل تراوش پذیر کننده در تولید الکالوئیدها استفاده شده است(Kumar and Gupta, 2008). کیتوزان با افزایش نفوذ پذیری سلول در افزایش تولید متابولیت های ثانویه موثر است و بر خلاف سایر پلی ساکاریدها که بصورت اسیدی یا خنثی می باشند خاصیت بازی دارد و به همین دلیل میل ترکیبی بالایی با پروتئین، DNA، RNA و یون های فلزی دارد که این ویژگی سبب توانایی منحصر به فرد این ماده در واکنش های شیمیایی می شود. کیتوزان سبب تجمع عوامل

محافظتی گیاه از جمله فیتوالکسین ها می شود که الکالوئیدها از جمله فیتوالکسین ها محسوب می شوند (Ebel and Mithofer, 1998) این ماده می تواند با کروماتین ارتباط برقرار کند و به طور مستقیم بر بیان ژن تاثیر گذارد (Hadwiger, 2015). در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن دار، به ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول می شود (Kim *et al*., 2004). همچنین سبب افزایش تجمع لیمونن و لینالول در کشت سلول گیاه گریپ فروت (*Citrus Grandis*) و باعث افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه افسنطین (*Artemisia annua*) شد (Putalun *et al*., 2007). افزایش تولید لیگنان و فنیل پروپانویید در کشت سوسپانسیون سلولی کتان سفید (*Linum album*) تیمار شده با کیتوزان گزارش شد (Esmaeilzadeh *et al*., 2015). در کشت بافت بذرالبنج مصری (*H. muticus*) منجر به افزایش ۵ برابری غلظت هیوسیامین در شرایط کشت بافت شد (Sevón and Oksman-Caldentey, 2003). کیتوزان موجب افزایش میزان کلروفیل در بافت های گیاهی می شود که کلروفیل بیشتر ساخت متابولیت ثانویه بیشتر در گیاه را به همراه دارد (Zhang *et al*., 2009) .

مواد و روش ها

بذرهای گیاه بنگدانه سیاه در اتاقک کشت و زیر هود لامینار ایرفلو پس از مراحل ضد عفونی در محیط کشت پایه MS (موراشیگ و اسگوک) با ۰/۷٪ حجمی وزنی آگار و۷ =pH کشت شدند، بذور کشت شده در شیشه مربا در اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. پس از ۶ تا ۸ برگه شدن گیاهچه های درون شیشه ای، ریز نمونه هایی از برگ جهت تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی تیمارهای مناسب هورمونی کشت شد. برای تهیه محلول پایه کیتوزان (۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) از روش Popp *et al*. (1997) استفاده شد. محلول بدست آمده در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد، برای تهیه تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان، به ترتیب مقدار ۱، ۲ و ۳ میلی لیتر ازمحلول پایه به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسید. جهت اعمال غلظت های کیتوزان محیط ½MS به صورت مایع تهیه و درون پتری دیش ها ریخته شد. کالوس های ۳۰ روزه به محیط مایع انتقال و در فضای استریل اتاق کشت و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کالوس ها پس از گذراندن تیمارهای زمانی مورد نظر از محیط کشت خارج و بلافاصله عصاره گیری شدند. عصاره گیری از کالوس برای سنجش فنل و فلاونوئید بدین صورت بود که نیم گرم کالوس را پس از توزین درهاون چینی با ازت مایع پودر نموده و۱ میلی لیتر متانول خالص به پودر کالوس افزوده و ترکیب را به اپندروف ۱۵ میلی لیتری منتقل کردیم. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک نگهداری شد. سپس مخلوط عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را با سمپلر برداشته و در فریزر جهت سنجش فنل و فلاونوئید نگهداری شد. میزان ترکیبات فنولی کل با روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد (Singleton and Rossi, 1965). در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با

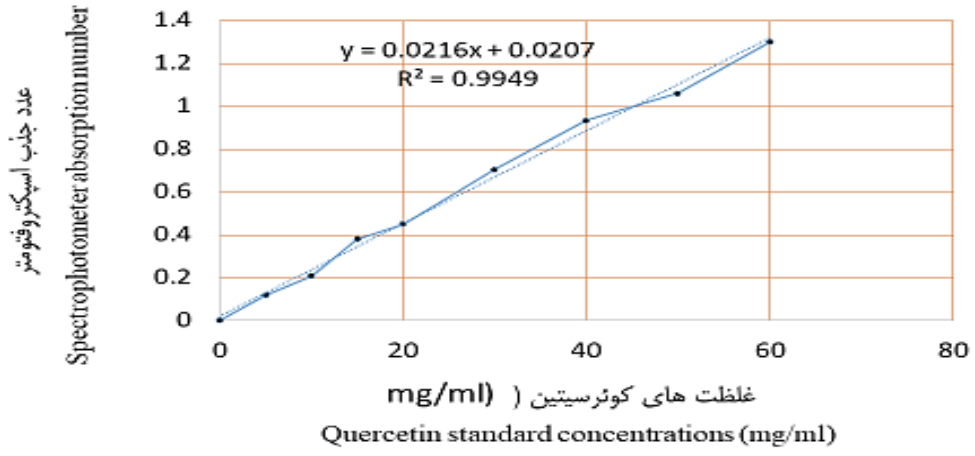
۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شدند. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪ وزنی/ حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد گالیک‌اسید، محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۱۰،۲۰،... و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بیان شد.



شکل ۱- منحنی استاندارد گالیک اسید

Figure 1: Standard gallic acid curve

میزان فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی الومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ ٪، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ ٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد. بدین صورت که محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۱۰،۲۰،... و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید کل موجود در عصاره محاسبه شد.



شکل ۲- منحنی استاندارد کوئرستین

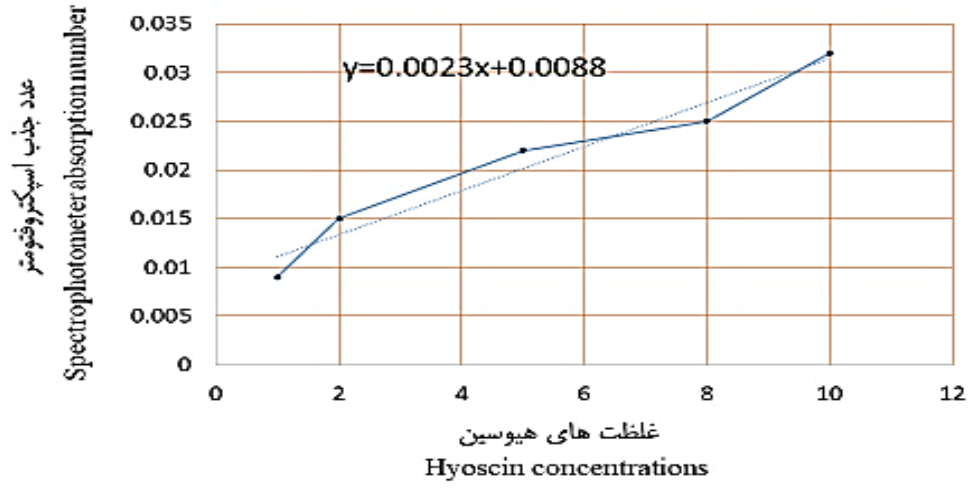
Figure 2: Standard quercetin curve

اسـتخراج آلکالوئیدها از عصاره کالوس به روش Kamada *et al.* (1986) با اندکی تغییر انجام شد. سپس جهت سنجش الکالوئید کل محلول متانولی حاوی آلکالوئید در حجم های یک میلی لیتری تهیه شـد و با اسـتفاده از دسـتگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis ، مدل i3، شـرکت Hanon Instrument اندازه گیری شـد. منحنی اسـتاندارد توسـط ماده اسـتاندارد هیوسین در طول موج ۲۱۰ نانومتر رسـم شد و چگالی نوری (OD) هر یک از نمونه ها در همین طول موج خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول خط منحنی استاندارد، مقدار آلکالوئید کل در هر نمونه بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر بافت محاسبه شد.

معادله خط منحنی استاندارد:

$Y= 0.0023\ X + 0.0088,\ R^2 = 0.9442$

در این معادله، Y نشان دهنده چگالی نوری (OD) و X ، نشان دهنده غلظت آلکالوئید کل خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر است و R^2 بیانگر دقت استاندارد است که هرچه به ۱ نزدیک تر باشد، دقت استاندارد تهیه شده بالاتر است.



شکل ۳- منحنی استاندارد هیوسین

Figure 3: Standard hyoscine curve

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت و مدت زمان تیمار بر روی تغییرات بیوشیمیایی (فنل ، فلاونوئید و الکالوئید تام) کالوس بنگدانه سیاه در جدول ۱ نشان داد که اثرات ساده و متقابل غلظت و زمان محرک کیتوزان در میزان فنول و فلاونوئید و الکالوئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود .

جدول۱-تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی کالوس برگ تحت تاثیر تیمارهای کیتوزان و زمان

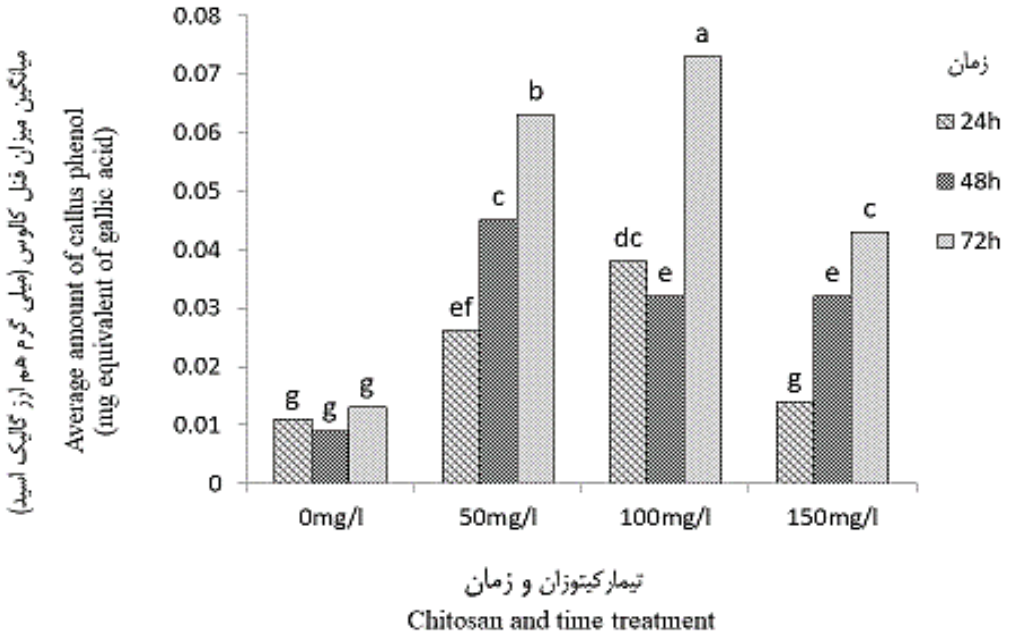
Table 1: Analysis of variance of leaf callus biochemical traits under the influence of chitosan and time treatments

منابع تغییر Sources of changes	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات		
		فنل Phenol	فلاونوئید flavonoid	الکالوئید alkaloid
زمان Time	۲	۰/۰۰۰۰۵**	۰/۰۰۰۷**	۰/۰۰۱۶**
کیتوزان chitosan	۳	۰/۰۰۰۴۸**	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۷۲**
زمان×کیتوزان Chitosan×Time	۶	۰/۰۰۰۱۲**	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۱۹**
خطا Error	۲۴	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۰۵
ضریب تغییرات Coefficient of variation	-	۶/۲۲	۶/۰۰	۱/۶۰

** اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

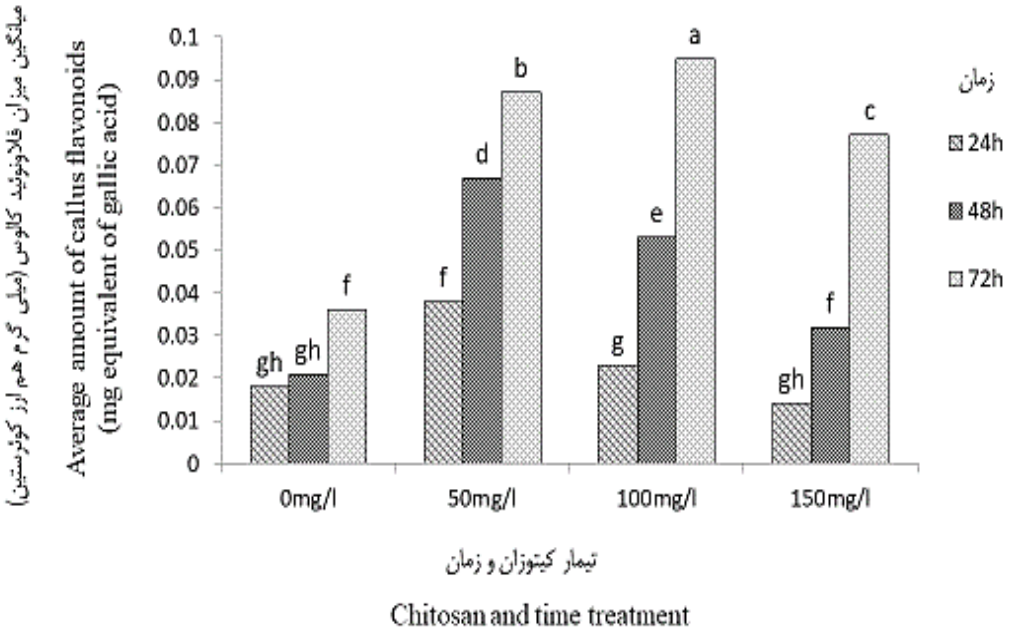
** Significant difference at the level of 1% probability

بر اساس نتایج مندرج در شکل ۴ در تیمار شاهد (بدون کیتوزان)، پایین ترین سطح از میزان فنول در هر ۳ بازه زمانی مشاهده می شود که در واقع میزان فنل واقعی کالوس می باشد. در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان روند افزایشی در میزان فنول کل مشاهده می شود که در تیمار ۱۵۰ میلی لیتر کیتوزان این روند کاهشی شده و هر دو تیمار زمان و کیتوزان در این امر مشارکت معنی دار دارند. بیشترین میزان فنول در تیمار ۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان و در زمان ۷۲ ساعت ثبت شد. بر اساس نتایج مندرج در شکل۵ در تیمار شاهد (بدون کیتوزان)، پایین ترین سطح از میزان فنول در هر ۳ بازه زمانی مشاهده می شود که در واقع میزان فلاونوئید واقعی کالوس می باشد. در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان میزان فلاونوئید روند افزایشی داشته در حالی که که در تیمار ۱۵۰ میلی لیتر کیتوزان این روند کاهشی شد. بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان و در زمان ۷۲ ساعت ثبت شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین شکل ۶ حاکی از آنست که میزان الکالوئید اولیه ی کالوس در تیمار شاهد مطلوب می باشد. با افزودن غلظت های محرک کیتوزان میزان الکالوئید کل افزایش یافته و در تیمار ۱۰۰ میلی لیتر و در بازه زمانی ۴۸ ساعت به بالاترین میزان خود می رسد. در حالی که با افزایش غلظت کیتوزان و در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت روند نزولی می یابد.



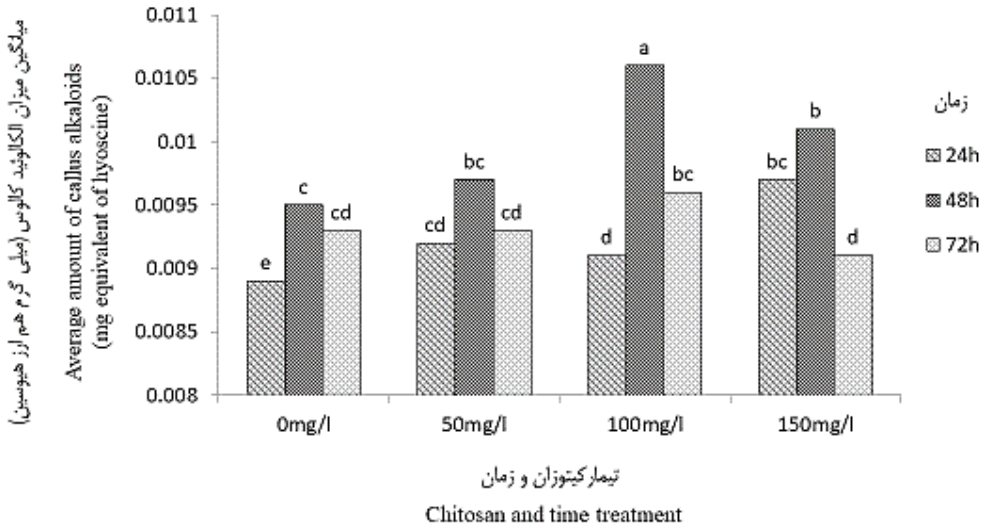
شکل ۴- اثر متقابل غلظت های متفاوت کیتوزان و زمان بر میزان ترکیبات فنولیک کل در کالوس بنگدانه سیاه

Figure 4: Interaction of different concentrations of chitosan and time on the amount of total phenolic compounds in black buckwheat callus



شکل ۵- اثر متقابل غلظت های متفاوت کیتوزان و زمان بر میزان فلاونوئیدکل در کالوس بنگدانه

Figure 5: Interaction of different concentrations of chitosan and time on the amount of flavonoids in cannabis callus



شکل ۶- تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان و بازه های زمانی بر مقدار الکالوئید کل بدست آمده از کالوس بنگدانه

Figure 6: Effect of different concentrations of chitosan and different time intervals on the amount of total alkaloids obtained from callus callus

براساس نتایج تحقیق حاضر کیتوزان به طور معنی داری محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را نسبت به شاهد افزایش داد. به طوری که در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان روند افزایشی در میزان فنول و فلاونوئید کل مشاهده شد. در تیمار ۱۵۰ میلی لیتر کیتوزان این روند کاهشی بوده و هر دو تیمار زمان و کیتوزان در این امر مشارکت معنی دار دارند. مستندات متعددی مبنی بر افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در سایر گیاهان توسط محرک کیتوزان گزارش گردیده است، مثلا در پژوهشی که روی گیاه زنیان انجام شد کیتوزان میزان ترکیبات فنلی را نسبت به شاهد افزایش داد (Kovacik *et al*., 2009). در پژوهشی دیگر مشخص شد که کیتوزان در کشت سلول کتان سفید سبب افزایش قابل توجهی در محتوای فنلی و فلاونوئیدی شد (Ayoubi *et al*., 2017). در این آزمایش با افزایش غلظت کیتوزان ترکیبات فنل و فلاونوئید روند کاهشی یافت. این پدیده در سایر پژوهش ها نیز گزارش گردیده است و علت آن را ایجاد سمیت در غلظت های بالا برای سلول دانسته اند. علت کاهش این متابولیت ها را میتوان در تماس بیشتر محرک ها با سلول ها درطی زمان طولانی تر و در نتیجه ایجاد تغییرات فوق حساسیت در سلول و سمی شدن محرک ها برای آنها جستجو کرد همچنین افزایش غلظت محرک سبب کاهش میزان تولید این ترکیبات در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکرو مول می گردد (Sonja *et al*., 2007). که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می کنند (Kovacik *et al*., 2009). گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان آزاد می سازند که نقش دفاعی مهمی در برابر الیسیتورها دارند(Basu and Chand, 1996) . کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی باعث افزایش تولید متابولیت های ثانوی بسیاری از گیاهان دارویی در شرایط درون شیشه شده است (Ismailzadeh *et al*., 2012). هر چند الیسیتورهای زیستی نظیر کیتوزان به طور گسترده در تولید متابولیت های ثانوی به کار گرفته شده است با این حال

مکانیسم اثر الیسیتورهای زیستی بر تولید متابولیت های ثانویه در گیاه به خوبی شناخته نشده است. به طور کلی الیسیتورها با تحریک سیگنال های سلولی و برهم کنش مولکولی میان گیرنده های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی موجب شناسایی آنها می شوند. در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول های گیاهی، بیان ژن های مرتبط در مسیر را تحریک می کنند و موجب سنتز متابولیت های ثانوی درگیاهان می شوند (Sakai, 2003). همچنین با افزودن غلظت های محرک کیتوزان میزان الکالوئید کل افزایش یافته و در تیمار ۱۰۰ میلی لیتر و در بازه زمانی ۴۸ ساعت به بالاترین میزان خود می رسد. در حالی که با افزایش غلظت کیتوزان و در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت روند نزولی می یابد که علت این امر سمی شدن محرک برای سلول در غلظت هاو زمانهای بیشتر نسبت داده می شود . تیمارهای شاهد از لحاظ میزال الکالوئید اولیه با میزان الکالوئید تیمار ۵۰ میلی لیتر کیتوزان در یک کلاس آماری قرار داشتند. کیتوزان با تحریک فعالیت مهار کننده های پروتئیناز به طور موثری در تجمع زیستی الکالوئید در کالوس موثر است (Cheng *et al*., 2006). آلکالوئیدها به طور معمول در بخش های درون سلولی و معمولاً در واکوئل قرار گرفته اند. بنابراین تولید بسیاری از آنها به خاطر ظرفیت واکوئل محدود شده است. نفوذپذیر کردن سلول ها توسط شکل گیری منافذ در یک یا چند سیستم غشایی سلول های گیاهی، عبور مولکول های مختلف به داخل و خارج سلول را فراهم می کند. مسیر کامل بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان هنوز کاملا درک نشده است، با این حال کیتوزان به علت خواص شیمیایی منحصر به فردی که دارد که دارد، به عنوان مثال، واکنش پذیری بالا و توانایی بالا برای تبادل الکترون، می توانند بازده گیاهان را در تولید متابولیت ثانویه تغییر دهند (Mukherje and Mahapatra, 2009).

نتیجه گیری کلی

کاربرد کیتوزان موجب افزایش فنل، فلاونوئید و الکالوئید کل در کالوس بنگدانه سیاه شد. به احتمال زیاد دلیل این موضوع ساز وکار عمل و تأثیر تحریک کنندگی آن روی افزایش فعالیت سلولی کالوس به دلیل افزایش جذب عناصر ضروری و آب، همچنین کاهش تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی است. بنابراین کیتوزان را می توان به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت های ثانویه می شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد و به نظر میرسد این گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

منابع

Abdul Rahman N, Zakaria Z, Abdul Kadir MO. Influence of elicitor availability on Limonene and Linalool accumulation from *Citrus Grandis* cell cultures, Malaysian J Pharm Sci. (2003); 1: 39

Ayoubi, N., Hosseini, B., Fattahi, M. (2017). Induction effect of chitosan and colchicine on rosmarinic acid production in hairy root of *Dracocephalum Kotschyi Boiss* Journal of Cellular and Molecular Research. Volume 30, Number 1: 13-1-2

Basu, P., and S. Chand. (1996). Regeneration of plantlets from root-derived callus of Egyptian Henban. Cell Chromosome Research 19:31-34.

Bourgaud, F. Gravot, A. Miles, S. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci.; 161(5): 839–851.

Cheng X., Zhou U., Cui X., (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Biotechnology Journal. 121: 253-260.

Ebel, J. and Mithofer, A. (1998). Planta 206, 335–348

Esmaeilzadeh S, Sharifi M, Safaei N, Behmanesh M. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan and chitin in *Linum album* cell culture. Iranian J Plant Biol. 2012; 4 (11):13-26.

Hadwiger, L.A. Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to Fusarium solani: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. Front. Plant Sci.(2015),12

Ismailzadeh Bahabadi, P., Sharifi, M., Safaei, N., Behmanesh, M. (2012). Increased production of lignan and phenylpropanoid compounds under the influence of chitin and chitosan in white flax cell culture, Iranian Journal of Plant Biology. Volume 4. Issue: 13-26.

J. Sakai, K. (2003). Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor induced betathujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. Journal of Experimental Botany.4: 647-656

Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada,H., Shimomura, K., (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant cell reports, 5(4): 239-242.

Kim S.J., Lee S.Y., Park S., (2004). Agrobacterium mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports. 23: 386-390.

Kumar, J. and Gupta, P. K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2(2): 93.

Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. International Journal of Food Microbiology. 144: 51–63.

Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report, 28: 135-143.

Mukherjee, M. and Mahapatra, A. (2009). Catalytic effect of silver nanoparticle on electron transfer reaction: Reduction of [Co (NH 3) 5 Cl] (NO 3) 2 by iron (II). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 350(1): 1-7.

Omidbeigi, R. (2009). Production of medicinal plants. first volume. Astan Quds Razavi Publications. fourth edition. 783 pages

Popp M.P., Lesney M.S., Davis J.M., (1997). Defense responses elicited in pine cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47(3):199-205.

Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua L.*, Biotechnol Let. (2007); 29: 1143-1146.

Pu, G.-B., Ma, D.-M., Chen, J.-L., Ma, L.-Q., Wang, H., Li, G.-F. and Liu, B.-Y. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua L.* Plant Cell Reports, 28(7): 1127-1135.

Prashanth K.V.H. and Tharanathan R.N., (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential. Trends in Food Science and Technology. 18:117-131.

Sevón, N. and Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica, 68(10): 859-868.

Singleton V. and Rossi J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16(3): 144-158.

Sonja, G. Maury, S. Delaunay, A. Spasenoski, M. Joseph, C. Hagege, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum L*. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant Cell Tissue Organ Culture. 89:1–13.

Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G. and Hitmi, A. (2008). Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. Chemosphere, 72(5): 763-771.

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