Evaluation of enzymatic reactions induced by chitosan and its role in increasing the antioxidant capacity of Black henban (*Hyoscyamus niger* L.)

Pages 05-18

R. Biglari-Farrash[1] N. and Mortazavi[*2]

1 & 2) Department of Horticultural Science and Engineering, Zanjan University, Zanjan, Iran.

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

Received date: 2024.09.10 **Accepted date: 2024.12.03**

Abstract

Elicitors (biological or chemical stimuli) are substances that activate physiological and metabolic responses by stimulating the plant defense system. Chitosan is one of the stimuli that activates a series of enzymatic-defense reactions in the plant. In this study, the effect of chitosan on the activity of stress-resistant enzymes of black rapeseed callus was investigated in vitro. This experiment was carried out as a factorial experiment in a completely randomized design with two factors including chitosan at four levels (150, 100, 50, 0 mg/L) and in three time intervals (24, 48 and 72 hours) in the tissue culture laboratory of the Department of Horticultural Sciences, University of Zanjan. The studied traits included antioxidant levels and the activity of the enzymes guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD). In the results of analysis of variance, the simple and interactive effects of both time and chitosan treatments made the results of antioxidant levels and antioxidant enzyme activity significant, so that a concentration of 100 mg/L of chitosan at 24 hours caused the highest stimulation of the antioxidant enzymes APX, SOD, and DPPH radical scavenging activity at 0.017, 0.57, and 65.06, respectively. The highest level of guaiacol peroxidase was at a concentration of 150 and a time of 48 hours, at 0.0025. According to these results and previous findings of other researchers, chitosan is an efficient stimulant for increasing antioxidant enzymes and compounds, which even in small amounts is capable of stimulating the synthesis of plant compounds by activating defense mechanisms.

Keywords: Black henban, Callus, Defense response and Elicitor.

ارزیابی واکنشهای آنزیمی القاشده توسط کیتوزان و نقش آن در افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کالوس بنگدانه سیاه (*Hyoscyamus niger* L.)

شماره صفحات
۱۸-۰۵

راضیه بیگلری فراش*[۱] و سید نجم‌الدین مرتضوی [۲]

۱، ۲ و ۳) گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

*. نویسنده مسئول: **razibiglari1365@gmail.com:**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۳

چکیده

الیسیتورها (محرک‌های زیستی یا شیمیایی) موادی هستند که با تحریک سیستم دفاعی گیاهان، پاسخ‌های فیزیولوژیک و متابولیکی را فعال می‌کنند. کیتوزان از جمله محرک‌هایی است که سبب فعال‌سازی سلسله واکنش‌های آنزیمی-دفاعی در گیاه می‌شود. در این پژوهش اثر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم های ضد تنش کالوس بنگدانه سیاه در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل کیتوزان در چهار سطح (۰،۵۰،۱۰۰،۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) و در سه بازه زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان انجام گرفت. صفات مورد بررسی شامل میزان آنتی اکسیدان و میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (GPX)، اسکوربات پراکسیداز(APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بود. در نتایج تجزیه واریانس، اثرات ساده و متقابل هر دو تیمار زمان و کیتوزان سبب معنی دار شدن نتایج میزان آنتی اکسیدان و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی شد، به طوری که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در زمان ۲۴ ساعت باعث بیشترین برانگیختگی در آنزیم‌های آنتی اکسیدانی APX و SOD و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH به ترتیب به میزان ۰/۰۱۷ و ۰/۵۷ و ۶۵/۰۶ شد. بیشترین میزان گایاکول پراکسیداز در غلظت ۱۵۰ و زمان ۴۸ ساعت و به میزان ۰/۰۰۲۵ بود. با توجه به این نتایج و یافته های پیشین سایر محققان کیتوزان محرکی کارآمد جهت افزایش آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی است که حتی در مقادیر کم قادر به تحریک سنتز ترکیبات گیاهی از طریق فعال کردن مکانیسم های دفاعی است.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، بذرالبنج، پاسخ دفاعی و کالوس.

مقدمه

بنگدانه سیاه با نام علمی *Hyoscyamus niger L.* گیاهی از خانواده سیب زمینی (Solanaceae) و گونه‌ای علفی، پایا و بومی ایران است (Qassimi Dehkordi *et al*., 1995). آلکالوئیدهای این گیاه در چشم پزشکی و درمان بیماریهای قلبی و عروقی و گوارشی کاربرد دارد (Otto *et al*., 2013). در طبیعت متابولیت های ثانویه گیاهی به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر حمله پاتوژن‌ها، تولید می شوند و مشخص شده است که گیاهان هنگامی که با ترکیباتی با منشاء زیستی (پلی ساکاریدها، پروتئین ها، عصاره ی مخمر و یا قطعات دیواره ی سلولی قارچ ها، گیاهان و میکرو ارگانیسم‌ها) و غیر زیستی (اشعه ماوراء بنفش، نمک فلزات سنگین و نانو ذرات) روبه رو می شوند، واکنش مشابه‌ی را از خود نشان داده و می‌توانند منجر به تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوآلکسین‌ها شوند (Zhao *et al*., 2005). محرک ها سیگنال‌هایی تولید می کنند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از این روش می‌توان برای تولید بیشتر آنها استفاده نمود (Ravishankar and Ramachandra, 2002). از آنجا که ذخیره متابولیت های ثانویه در گیاهان، نوعی پاسخ گیاه به تنش های محیطی است، در نتیجه مقدار آنها می تواند از طریق محرک‌های زیستی و غیر زیستی تحریک شود (Esmin Tanska, 2008). بنابراین الیسیتور عاملی است که منجر به پاسخ فیزیولوژیکی درگیر در تولید و ذخیره متابولیت ثانویه در اندام های گیاه می‌گردد (Amdoun *et al*., 2009). مکانیسم اثر محرک ها در گیاه بر اساس بر هم کنش محرک-گیرنده خلاصه می شود. شروع پاسخ های دفاعی در گیاه با تشخیص مولکول های محرک توسط پذیرنده ها شروع می شود. کیتوزان، یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به عنوان یکی از محرک های زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن به تولید متابولیت های ثانویه درکشت سلول گیاهان دارویی زیادی تایید شده است (Chenj *et al*., 2006). کیتوزان باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه، به ویژه آنهایی که در ساز وکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می شود (Po *et al*., 2009). کیتوزان با فعال نمودن تعدادی از آنزیم ها نظیر کیتینازها مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش ها افزایش داده و صدمات ناشی از آنها را کاهش می دهد. مولکول های کیتوزان پاسخ های دفاعی را در گیاه به راه می اندازد که منجر به شکل گیری سدهای فیزیکی و شیمیایی بر ضد پاتوژن ها می‌شود. کیتوزان به عنوان تقویت کننده دفاع گیاه توصیف می شود. واژه ی تقویت کننده دفاع گیاه برای یک گروه از ترکیبات که به تحریک مکانیسم های دفاعی طبیعی گیاه کمک می کنند به کار میرود. تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی که در گیاهان تیمار شده با کیتوزان گزارش شده اند شامل موارد زیر است: آسیب دیدن DNA، تغییرات کروماتین (Hadwiger, 2008)، افزایش در کلسیم سیتوسولی (Geofin *et al*., 2003)، فعالسازی MAP کینازها (Yen *et al*., 2010)، انفجار اکسیداتیو (Paulert *et al*., 2010)، سنتز پروتئین، تجمع فیتوالکسین، پاسخ های فوق حساس و در برخی سیستم ها سنتز جاسمونیک اسید (JA) و آبسیزیک اسید (ABA) و تجمع پراکسید هیدروژن (Lin *et al*., 2005). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند و مشخص شده که خاصیت حفاظت کننده از DNA را دارد (Harish Prashant *et al*., 2007). مکانیسم های خنثی کننده رادیکال های آزاد کیتوزان ممکن است به ساختار خاص آن

مربوط باشد که از تعداد زیادی گروه آمین و هیدروکسیل قابل دسترس تشکیل شده که با رادیکال های آزاد واکنش نشان می دهد (Sun *et al*., 2004). در یک پژوهش مشخص شد که کیتوزان برای به دام انداختن رادیکال‌های هیدروکسیل و یون‌های آهن مناسب است و می تواند به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی مناسب برای استفاده در صنعت غذا و داروسازی باشد (Yen and Yang, 2008). به نظر می‌رسد کیتوزان در غلظت های پایین، با از بین بردن رادیکال های آزاد به طور مستقیم و یا توسط آنزیم های آنتی اکسیدان، از اکسیداسیون چربی ها جلوگیری نموده و باعث کاهش پرولین و قندهای محلول در گیاه می گردد (Mahdavi *et al*., 1392). در مطالعه‌ای اثر کیتوزان بر میزان مقاومت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها و بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی بررسی گردید. این تحقیق نشان داد که کیتوزان به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و در بهبود سلامت گیاهان و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو نقش دارد (Zhao *et al*., 2019). تنش اکسیداتیو به عنوان یک قسمت جدانشدنی از پاسخ های دفاعی شناخته شده اند که به وسیله محرک ها آغاز می شوند. تولید بیشتر آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش مرکزی در پاسخ دفاعی علیه تنش های اکسیداتیو تحمیل شده به وسیله محرک ها ایفا می کنند. سیستم های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز است که مسئول پاکروبی ROS ها در گیاهان است. سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی سلول در برابر ROS است، معمولا رادیکال سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که در طی تنش تولید می شود و SOD سریعا رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می کند و با حذف سوپر اکسید نقش حیاتی تری را در سیستم آنتی اکسیدانی نسبت به آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز ایفا می کند، لذا سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش های محیطی می شود (Gill and Tutija, 2010). در تحقیق Mondal و همکاران، اثرات مثبت کیتوزان بر روی گیاهان دارویی تحت استرس‌های اکسیداتیو مطالعه شد. نتایج نشان داد که استفاده از کیتوزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD) را در گیاهان دارویی به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (Mondal et al., 2020). کیتوزان باعث افزایش فعالیت سه آنزیم دفاعی پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیولیاز و گلوکاناز، در برگ‌ها و ریشه گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) شد که خود منجر به تولید متابولیت های دفاعی همچون الکالوئیدها می شود (Falcon Rodriguez *et al*., 2009). گزارش شده که الیگومرهای کیتوزان وکیتین، فعالیت فنیل آلانین آمونیولیاز (PAL) وتیروزین آمونیولیاز (TAL) را افزایش می دهد (Kim *et al*., 2009). در تحقیقی که Khan و همکارانش (Khan *et al*., 2021) انجام دادند، بررسی شد که کیتوزان چگونه می‌تواند سیستم دفاعی گیاهان دارویی را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بهبود بخشد. آن‌ها نشان دادند که کیتوزان می‌تواند در برابر استرس‌های مختلف مانند شوری و خشکی از گیاهان محافظت کند.کیتوزان سبب تجمع عوامل محافظتی گیاه از جمله فیتوالکسین ها می شود که الکالوئیدها از جمله فیتوالکسین ها محسوب می شوند (Ebel.J *et al*., 1998). کیتوزان باعث افزایش فعالیت سه آنزیم دفاعی پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیولیاز و گلوکاناز، در برگ ها و ریشه گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) شد که خود منجر به تولید متابولیت

های دفاعی همچون الکالوئیدها می شود (Falcon Rodriguez *et al*., 2009). هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) و دوره‌های زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گایاکول پراکسیداز، اسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) و میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در کالوس بنگدانه سیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای بود. این مطالعه به دنبال تعیین بهترین غلظت کیتوزان و زمان بهینه برای القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید آنتی اکسیدان در گیاه بود تا بتوان از آن به‌عنوان یک روش مؤثر در بهبود مقاومت به تنش و افزایش ترکیبات مفید گیاهی استفاده نمود.

مواد و روش ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان انجام شد. بذرهای گیاه بنگ دانه سیاه از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. محیط کشت مورد استفاده جهت تکثیر و رشد بذر گیاه بنگدانه، محیط موراشیگ و اسکوگ (Morashig and Skoog, 1962) (MS) کامل با ۰/۷٪ حجمی وزنی آگار و فاقد تنظیم کننده‌های رشد در نظر گرفته شد. ابتدا محیط کشت، آب مقطر، وسایل و ظروف مورد استفاده در کشت مانند شیشه های کشت، پنس و غیره توسط اتوکلاو و تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. سپس در اتاقک کشت و زیر هود لامینار ایرفلو بذرهای گیاه بنگدانه سیاه در آب مقطر ۳ بار شستشو داده شدند و بذور با استفاده بنومیل ۳ درصد در یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد به‌مدت ۷ دقیقه و الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه ضد عفونی شده و سپس در سه مرحله با آب مقطر شستشو شدند. سپس تعداد ۵ بذر در شیشه مربا، حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS قرار داده شد و جهت رشد در اتاقک کشت با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. جوانه زنی بذرها از روز سوم پس از کشت آغاز شد.

کالوس زایی

جهت یافتن محیط بهینه کالوس زایی در بنگدانه از دو تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین (BA) در چهار غلظت (۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ میلی گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (NAA) در سه غلظت (۰، ۲۰، ۴۰ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با هم استفاده شد. پس از ۶ تا ۸ برگه شدن گیاهچه های درون شیشه ای، ریز نمونه هایی از برگ هر کدام به تعداد ۳ عدد در هر پتری دیش و با ۴ تکرار جهت تولید کالوس استفاده شد. غلظت مساوی بنزیل ادنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) هر کدام به میزان ۰/۰۴ میلی گرم در لیتر بهترین کالوسها را ایجاد نمود.

اعمال تیمار کیتوزان

در این پژوهش از کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۱۹۰ کیلودالتون)، ویسکوزیته (cps)۸۰۰-۲۰۰ و درصد داستیلاسیون ۸۵ تا ۷۵ درصد تهیه شده از شرکت لیان کیمیا آزما (ایران)، استفاده شد و از غلظت های ۰ و ۵۰ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر

لیتر کیتوزان استفاده شد. محیط نیم غلظت (بدلیل اعمال بهتر کیتوزان و عدم تاثیر سایر نمک ها) MS به صورت مایع (جهت جذب بهتر و سریعتر کیتوزان) تهیه و درون پتری دیش‌ها ریخته شد. کالوس های ۳۰ روزه پس از انتقال به محیط مایع بر روی شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۲۰ با دمای محیطی ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کالوس‌ها پس از گذراندن تیمارهای زمانی مورد نظر در زیر هود لامینار و توسط پنس استریل از محیط کشت خارج شدند. نیم گرم کالوس در هاون چینی با ازت مایع پودر شد. ۱ میلی لیتر متانول خالص به پودر کالوس افزوده و ترکیب را به اپندروف ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. 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 فعالیت آنتی اکسیدانی نگهداری شد.

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH

در این بررسی از روش ساها و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد. مخلوط هر واکنش پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر UV/Vis در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد (Saha *et al*., 2004).

درصد مهار اکسیداسیون هر نمونه از معادله زیر محاسبه شد.

AI=(A-A0/A0)*100

AI : درصد مهار اکسیداسیون

A0 : جذب محلول کنترل

A : جذب محلول حاوی مهار کننده ی اکسیداسیون

عصاره گیری برای سنجش آنزیم های آنتی اکسیدانی

نیم گرم کالوس را پس از توزین درهاون چینی از پیش سرد شده قرار داده، با ازت مایع پودر شد، سپس ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۱ مولار با pH= ۷ به آن افزوده و در اپندروف ۲ میلی لیتر که در ظرف حاوی یخ قرار داشت ریخته شد. مخلوط عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را با سمپلر برداشته و در فریزر جهت سنجش آنزیم های انتی اکسیدانی نگهداری شد.

بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق با روش لین و کائو (Lin and Cao, 1999) تهیه و در کووت قرار گرفت. کینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی مول بر سانتی متر در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

رابطه ۱: $EA = \{\Delta OD \times (1000/A) \times B\} / EC \times C$

که در این فرمول:

EA: میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد (احیای یک میکرومولار پراکسید هیدروژن در دقیقه) در گرم وزن تر برگ

OD: مقدار قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

A: مقدار نمونه اضافه شده به کووت

B: مقدار بافر فسفات اضافه شده به نمونه جهت سائیدن

EC: میکرومول بر سانتیمتر : ضریب خاموشی معادل ۰۹۳

C: وزن بافت تر

EC: ضریب خاموشی معادل ۲۶/۶ میکرومول بر سانتی متر

بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1987) استفاده شد. پس از تهیه محلول های مورد نظر، طول موج ۲۹۰ نانومتر جهت قرائت به کار گرفته شد. سپس میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از رابطه ی بالا محاسبه شد.

EC: ضریب خاموشی معادل ۲/۸ میکرومول بر سانتی متر در نظر گرفته شد.

بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش بوچمب و همکاران (Beauchamp *et al*,. 1971) انجام شد. در این روش از ریبوفلاوین و متیونین در حضور نور جهت تولید رادیکال های سوپراکسید استفاده شد. رادیکال های سوپراکسید سبب احیا نیترو بلو تترا زولیوم (NBT) و ایجاد مونوفورمازان (رنگ بنفش) می نمایند. کاهش ایجاد مونوفورمازان در مخلوط واکنش از طریق مصرف رادیکال سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز عصاره استخراج شده، نشان دهنده فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. روش کار بدین صورت بود که ابتدا نمونه کنترل تهیه شد. سپس تحت تابش دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. درصد فعالیت آنزیم بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه ۲: درصد فعالیت آنزیم = A کنترل - A نمونه / A کنترل

محاسبات آماری

پژوهش به روش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی و با ۴ تکرار اجرا شد و توسط نرم افزار SAS 9.1 داده ها آنالیز شد. مقایسه میانگین داده های آزمایش نیز با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال ۱و ۵ درصد معنی داری صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کالوس

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کالوس بنگدانه سیاه در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده و اثرات متقابل غلظت تیمار با محرک کیتوزان نشان داد که اثرات متقابل غلظت و زمان و همچنین اثرات ساده غلظت تیمار و محرک کیتوزان، در سطح احتمال ۵ درصد تاثیر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز داشت. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی در پژوهش حاضر نیز احتمالاً به دلیل افزایش گونه های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن می باشد.

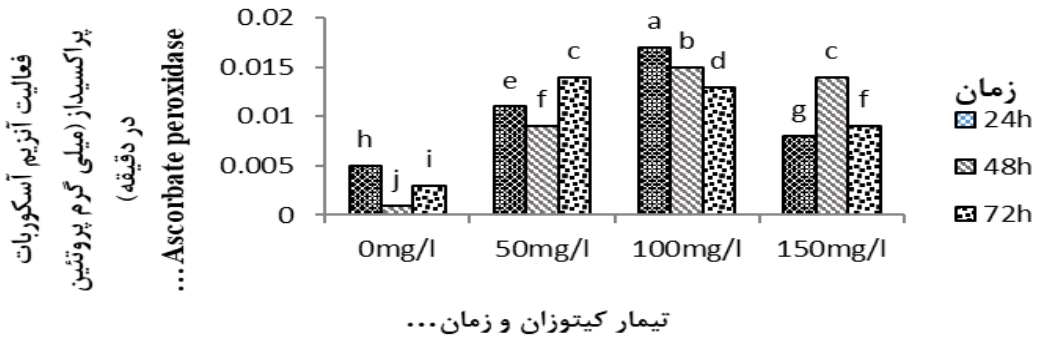
جدول۱: آنالیز واریانس اثر تیمارهای کیتوزان و مدت زمان بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کالوس بنگدانه سیاه

Table 1: Variance analysis of the effect of chitosan treatments and duration on the activity of antioxidant enzymes in calluse of Black henban

منابع تغییرات Sources of Variance	درجه آزادی degree of freedom	میانگین مربعات mean square			
		ظرفیت آنتی اکسیدان antioxidant capacity	سوپر اکسید دیسموتاز superoxide dismutase	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
زمان time	3	0.0016**	0.037**	0.76**	8.78**
کیتوزان Chitosan	3	0.0072**	0.009**	2.05**	3.42**
زمان×کیتوزان Time × chitosan	9	0.0019**	0.005**	0.91**	8.31**
خطا error	36	0.000005	0.0004	0.0001	0.0004
ضریب تغییرات coefficient of variation	-	1.6	4.04	3.72	1.36

**و* و ns به ترتیب نشان دهنده ی اختلاف معنی دار و عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

**and* and ns respectively indicate a significant difference and the absence of a significant difference at the 5% and 1% probability level and the absence of a significant difference.

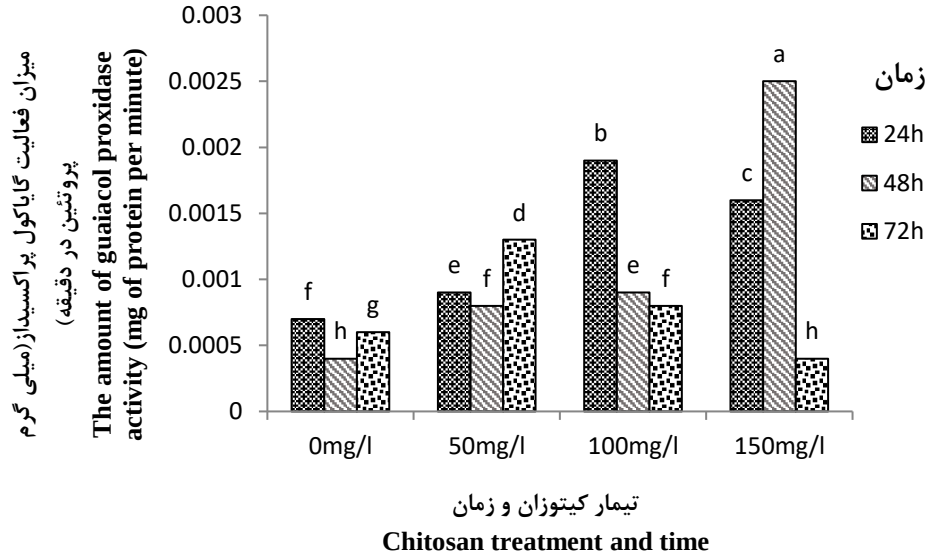


شکل ۱: تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان در بازه های زمانی متفاوت بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی اسکوربات پراکسیداز در کالوس بنگدانه سیاه

Figure 1: The effect of different concentrations of chitosan in different periods of time on the activity of the antioxidant enzyme ascorbate peroxidase in calluse of Black henban

طبق شکل (۱) حداکثر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر در زمان ۲۴ و حداقل میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شاهد و در ۴۸ ساعت مشاهده شد.

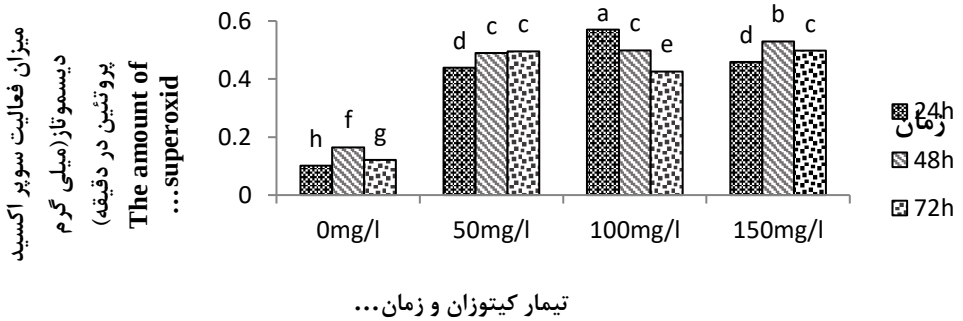
طبق شکل(۲) حداکثر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز غلظت ۱۵۰ میلیگرم بر لیترکیتوزان و در زمان ۴۸ ساعت و حداقل میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت ۱۵۰ و در ۷۲ ساعت مشاهده شد.



شکل ۲: تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان در بازه های زمانی متفاوت بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی گایاکول پراکسیداز در کالوس بنگدانه سیاه

Figure 2: The effect of different concentrations of chitosan in different periods of time on the activity of the antioxidant enzyme guaiacol peroxidase in calluse of Black henban

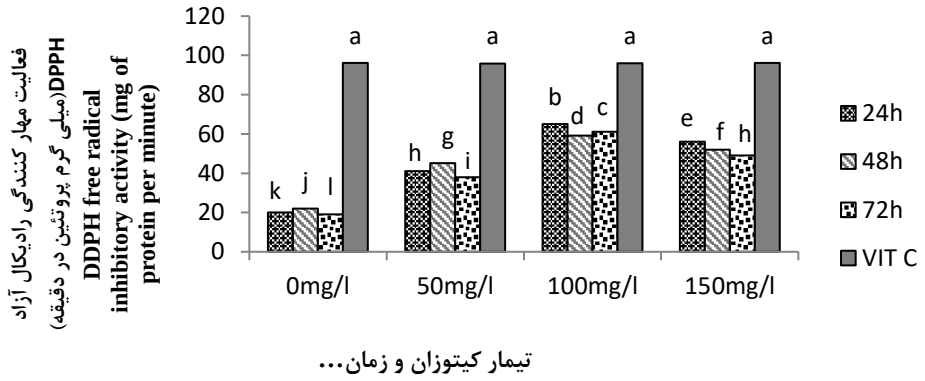
طبق شکل (۳) حداکثر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار ۱۰۰میلی گرم بر لیتر کیتوزان و در زمان ۲۴ ساعت و حداقل میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در شاهد و در ۲۴ساعت مشاهده شد.



شکل ۳: تاثیر غلظت های مختلف کیتوزان در بازه های زمانی متفاوت بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز در کالوس بنگ دانه سیاه

Figure 3: The effect of different concentrations of chitosan in different periods of time on the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase in calluse of Black henban

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس ۱ نشان می دهد که اثرات ساده و متقابل هر دو فاکتور غلظت کیتوزان و مدت زمان بر میزان آنتی اکسیدان کل تاثیر معنی دار دارد. در شکل ۴ مربوط به این صفت مشاهده می شود که کالوس های شاهد دارای میزان آنتی‌اکسیدان کمتری نسبت به تیمارهای حاوی کیتوزان می باشند. افزودن کیتوزان به محیط رشد کالوس سبب افزایش آنتی اکسیدان می گردد به‌طوری که این میزان در تیمار ۱۰۰ میلی لیتر به حداکثر رسیده و در غلظت های بالاتر این روند کاهش می یابد.



شکل ۴: اثر متقابل غلظت های متفاوت کیتوزان و زمان بر میزان آنتی اکسیدان کل در کالوس بنگدانه سیاه

Figure 4: The mutual effect of different concentrations of chitosan and time on the amount of total antioxidants in the callus of Black henban

پژوهش حاضر نشان داد که روند تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی کلّ عصاره ها، تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان روند صعودی داشته و در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافته است. به نظر می رسد تجمع بالای محرک سبب سمیت سلولی و کاهش فرایندهای سلول می‌گردد که در بسیاری آزمایشات گزارش شده است (Qureshi *et al*., 2010). در تحقیق حاظر کیتوزان فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش داد به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان و در ۲۴ ساعت مشاهده شدبه طور کلی به نظر می رسد کیتوزان از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و جاروب گونه‌های (ROS) فعال باعث مقاومت گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو و تحریک رشد گیاه می شود (Cheng *et al*., 2002). افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در پژوهش حاضر نیز احتمالا به دلیل افزایش گونه های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن می باشداز طرفی کیتوزان می تواند باعث افزایش فعالیت و یا القای بیان برخی ترکیبات آنتی اکسیدانت از جمله متابولیت های ثانویه شود (Sharma *et al*., 2013). این سیستم های آنتی اکسیدانی به عنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنشگرهای اکسیژن عمل کرده و به سلول کمک می کنند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کند.

نتیجه گیری

کیتوزان با ایجاد تنش اکسیداتیو و تحریک فعالیت دفاعی باعث فعال شدن مسیر های آنتی اکسیدانی که در پاسخ به تنش ایجاد شده می‌گردد. در بیشتر گزارش‌ها کیتوزان در غلظت‌های کم باعث افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانی شده است. در

کشت‌های سلولی مانند کالوس و سوسپانسیون سلولی، محرک‌ها به دلیل نفوذ بیشتر نسبت به کشت شاخه، اثرات بیشتری بر تحریک تولید آنتی اکسیدان دارند و بنابراین در این نوع کشت ها به غلظت های کمتری نیاز بوده و غلظت های بالا باعث مسمومیت سلولی می‌گردد. مدت زمان قرار گرفتن ریز نمونه در معرض محرک نیز در پژوهش‌های انجام شده توسط سایر محققان از ۱۲ساعت تا ۹۶ ساعت متغیر بود، اما به نظر می رسد بهترین مدت زمان تیمار گیاه بنگدانه سیاه با کیتوزان به طور میانگین بین ۴۸ و ۷۲ ساعت باشد. با توجه به این که بیشترین عملکرد در تولید و فعالسازی مسیرهای تنشی که منجر به تولید متابولیت های ثانویه میگردد، در غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی لیتر کیتوزان و در بازه ی زمانی۲۴ و ۴۸ ساعت به دست آمد ، بنابراین کیتوزان را می توان به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز مواد آنتی اکسیدانی می شود در بسیاری از گیاهان استفاده کرد. همه این تحقیقات به طور مشترک نشان می‌دهند که کیتوزان به عنوان یک عامل محرک زیستی، از طریق افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و همچنین تقویت مکانیسم‌های دفاعی گیاهان، نقش مهمی در بهبود سلامت و کیفیت گیاهان دارویی دارد.

منابع

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

Beauchamp, C .,&Fridovich, I.(1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Annual Journal of Biochemistry 44: 276-287.

Chang C, Yang M, Wen H.,& Chern J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food andDrug Analysis 2002; 10: 178-82.

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 & .,Mithofer, A. (1998). Planta 206, 335–348

Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment. 106: 119-133.

Esmaeilzadeh S, Sharifi M, Safaei N., & Behmanesh M. (2012). 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.

Falcón-Rodríguez, A.B .,, Cabrera, J.C.; Ortega, E. & Martínez-Téllez, M.A. (2009). Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. Am. J. Agric. Biol. Sciences 2009; 4: 192-200

Ghasemi Dehkordi, N., Sajjadi, S. A .,& Saqai, (1995). Botanical and phytochemical investigation of the plant (*Hyoscyamus reticulatus* L.) available in the flora of Iran. Isfahan Faculty of Pharmacy Journal 972-9: 998: 9 . [In Persian].

Gill S.S .,& Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinert in abiotic stress in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48(12): 909-30.

Hadwiger, L.A. (2015). 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

Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, K.S. Jagannatha, R ., & Tharanathan, R.N. (2007). Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrat, 342: 190-195.

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

Kim, S.H. Jun, C.D. Suk, K. Choi, B.J. Lim, H. Park, S. Lee, S.H. Shin, H.Y. Kim, D.K & Shin, T.Y. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. Toxicol Sci. 91: 123-131.

Lin C.C ., & Kao C.H. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedling. Plant and Soil. 216(1-2): 147-153.

Lin W., Hu X., Zhang W., Rogers W.J.,& Cai W. (2005). Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. Journal of Plant Physiology. 162: 937944..

Mahdavi, B., secondary school teacher, S.A., Alikhani, M.A .,& Sharifi, M. (2013). The effect of chitosan concentrations on seed germination and antioxidant enzymes of safflower under water deficit conditions. Journal of Plant Research. 263: 352-365. [In Persian].

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: 405 410.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with *tobacco* tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

Nakano Y ., & Asada K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology. 28(1): 131-140.

Palazon J, Navarro-Ocana A, HernandezVazquez L., & Mirjalili MH. (2008). Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. Molecules. 2008; 13: 1722 - 42.

Paulert R., Ebbinghaus D., Urlass C ., & Moerschbacher B.M. (2010). Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan a polysaccharide from green macroalgae and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. Plant Pathology. 59: 634–642.

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

Ramachandra Rao, S., Tripathi, U ., & Ravishankar, G. (2002). Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of Capsicum frutescens in the Presence of β-cyclodextrin. Biocatalysis and Biotransformation, 20 (2): 137-143..

Ramel F., Birtic S., Ginies C., Soubigou-Taconnat L., Triantaphylides C& Havaux M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the united states of American. 109(14): 5535-40.

Roberts, S. C ., & Shuler, M. L. (1997). Large-scale plant cell culture. Current Opinion In Biotechnology, 8(2): 154-159.

Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 263-267

Sahu R., Gangopadhyay M&. Dewanjee S. (2013). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Solenostemon scutellarioides. Acta Physiologiae Plantarum 35: 1473–1481

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

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry 113: 1202 1205

Sun T., Xie W.M., & Xu P.X. (2004). Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. Carbohydrate Polymers. 58: 379–382.

Swetie, R., Raesh, Ch., & Arun, S. (2007). Antioxidant potential of mint (Mentha Spicata L.) in radiation processed lamb meat. Food Chemistry 100: 451-458.

Vasconsuelo A, Giulietti AM., & Boland R. (2004). Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in Rubia tinctorum. Plant Sci. 2004; 53: 405-413

Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172: 861-875

Yen, M.T., Yang, J.H., & Mau, J.L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydrat, 74: 840-844.

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

Zhao, Yuchen, Jianxin Ma, Hui Liu., & Xingdong Zhang. (2019). "Effect of chitosan on antioxidant enzymes and growth in plants: A meta-analysis." *Frontiers in Plant Science*, 10, 598.

Mondal, Md Monirul Alam, Md Mamunur Rashid, Shahidul Islam, & Anwar Hossain. (2020). "Chitosan induces antioxidant enzyme activities and improves medicinal properties of plants under oxidative stress." *Plant Growth Regulation*, 90 (2), 117-129.

Khan, Muhammad Imran, Fawad Aziz, Bushra Z. Hashmi ., & Muhammad Tariq. (2021). "Chitosan enhances antioxidant enzyme activities and growth in medicinal plants exposed to environmental stress." *Journal of Medicinal Plants Research*, 15(9), 412-420