

بررسی اثر نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان بر برخی صفات فیزیولوژیک و

فیتوشیمیایی گیاه دارویی سیاه دانه *Nigella sativa* L.

فرحناز مهدی پور^۱، سارا سعادت مند^{۲*}، علیرضا ایرانبخش^۳، بهاره نوروزی^۴، زهرا اوراقی اردبیلی^۵

^۱دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۵دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۹/۰۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۶

چکیده

سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) از خانواده آلاله، یکی از بهترین منابع آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می رود. با توجه به تاثیر مثبت کیتوزان بر گیاهان دارویی گوناگون در این مطالعه به بررسی عملکرد رویشی و شیمیایی این گیاه تحت تیمار نانوذرات کیتوزان پرداختیم. فاکتورهای آزمایش شامل محلول دهی کیتوزان و نانوذرات آن با غلظت های ۰،۰۱، ۰،۰۵، ۰،۲، ۱، ۴ (pH 5) درصد بودند. سنجش ها در سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات تهران بر روی عصاره دانه و برگ گیاه تیمار شده انجام گردید. عصاره گیری به روش پرس سرد انجام شد. برخی از صفات نظیر جوانه زنی (تعداد، درصد، شاخص و ضریب سرعت جوانه زنی)، پارامترهای رشد (طول ریشه چه و ساقه چه، وزن تر ریشه چه و ساقه چه و وزن خشک ریشه چه و ساقه چه)، رنگیزه ها، میزان فنل کل برگ (فولین-سیوکالتو)، فلاونوئید کل برگ (رنگ-سنجی آلومینیوم کلرید)، فعالیت آنتی اکسیدانی برگ (DPPH)، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء برگ (سنجش غلظت MDA) و میزان پروتئین محلول دانه و برگ (بردفورد) ارزیابی شدند. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد. نتایج نشان داد درصدهای تیماری مورد نظر بر همه صفات مورد ارزیابی (جز وزن تر ریشه چه) تاثیر معنی داری دارند. تیمار ۱ تا ۰،۰۱ درصد نانو ذرات کیتوزان سبب افزایش پارامترهای رشد و جوانه زنی شد. همچنین میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد که بیشترین مقدار افزایش در غلظت های ۱ و ۰،۰۱ درصد نانوذرات کیتوزان مشاهده شد. حداکثر افزایش میزان رنگدانه ها تحت تاثیر غلظت ۱ و ۰،۲ درصد نانوذرات کیتوزان بود. هر دو تیمار در غلظت ۱ درصد سبب کاهش مقدار MDA نسبت به کنترل شدند. مقدار پروتئین کل در برگ و دانه تحت تاثیر تیمارها کاهش یافت. به طور کلی نتیجه شد که تیمار نانو ذرات کیتوزان به عنوان نوعی محرک زیستی بر بهبود ویژگی های کیفی سیاه دانه تاثیر مثبتی داشته و نانوذرات کیتوزان به عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون لیپید، سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)، نانو ذرات کیتوزان

(Zhong, 2005). مطالعات گسترده‌ای برای بررسی اثر کیتوزان به‌عنوان محرک بر برخی گیاهان دارویی و نه در شکل نانو ذرات انجام شده است. قاسمی (Ghasemi et al., 2015). با بررسی گیاه دارویی درمنه، تحت تیمار نانوذره کیتوزان مشاهده کرد که نانوذره کیتوزان باعث افزایش میزان بیوستز آرتیمیزین شد. اثر نانوذره کیتوزان بر گیاه گلرنگ (*Cathamus tinctorius* L. نشان داد تیمار ۲ درصد نانو ذرات بر جوانه زنی و شاخصهای اولیه رشد تاثیر معنی دار داشته است (Mansouri et al., 2016). در مطالعه رضا محمودی و همکاران (Mahmoodi et al., 2019) مشخص شد که عصاره گیاه عروسک پشت پرده (*Rhynchospora alkekengi*) همراه با نانوذره کیتوزان خاصیت ضدسرطانی بیشتری نسبت به عصاره تنها دارد. مهدوی و همکاران (Mahdavi et al., 2013) در بررسی پیش تیمار زنیان با کیتوزان مشاهده کردند که عملکرد گیاه زنیان در تیمار با کیتوزان در شرایط تنش شوری باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعال نمودن تعدادی از آنزیم‌ها شد. در آزمایش امیری و همکاران (Amiri et al., 2014) بر گیاه گلرنگ، نانوذرات کیتوزان، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی را افزایش داد و سبب افزایش عملکرد گیاه گردید. عملکرد بیولوژیک در آفتاگردان با تیمار کیتوزان افزایش یافت (Yadollahi et al., 2015). در بررسی اثر کیتوزان بر محتوای ترکیبات پلی فنلی گیاه دارویی پونه مشاهده شد که ارتفاع بوته و وزن تر و خشک گیاه افزایش یافت (Heng et al., 2012). کیتوزان منجر به افزایش ترکیبات فنلی در کتان سفید شد (Ismailzadeh et al., 2013). بررسی تاثیر کیتوزان روی گیاه دارویی بادرنجبویه نشان داد که کیتوزان باعث افزایش معنی دار میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید در این گیاه گردید و نیز کاربرد کیتوزان در غلظت‌های بالا منجر به افزایش پرولین شد. محلول

سیاهدانه با نام علمی *Nigella sativa* L. متعلق به تیره Ranunculaceae از مهمترین گیاهان دارویی می‌باشد (Ahmad et al., 2020). اولین گزارش از اجزای شیمیایی *N. sativa* در ۱۸۸۰ توسط گرینیش و همکاران مستند شده و بیان می‌کند که از روغن‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدراتها و فیبرها تشکیل شده است. ارزش دارویی آن عمدتاً به دلیل وجود ترکیب کینون می‌باشد. دیگر اجزای موجود در *N. sativa* شامل پی سیمن، کارواکرول و تیموئیدروکینون است. دی هیدروتیموکینون، α -توزن، تیمول، تی آنتول، β -پینن، α -پینن، و γ -ترپینن، از اجزای مهم سیاه دانه به شمار می‌آیند (Balyan et al., 2021). این گیاه در طب سنتی برای تعدادی از بیماریها از جمله درد کمر، آسم، تب، سرفه، سرگیجه، فلج، سردرد مزمن، ناباروری و اختلالات گوارشی مانند سوزش معده، نفخ شکم، اسهال استفاده می‌شود. (Ahmad et al., 2020). طی بررسی‌های متعدد خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهاب و ضدسرطان نیز برای سیاه دانه بیان شده است (Ziaee et al., 1960).

کیتوزان در تحریک بیوستز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی نقش دارد (Pliankong et al., 2018). یک پلی ساکارید کاتیونی طبیعی (N استیل D - گلوکز آمین و D گلوکز آمین) است که به عنوان یک محرک زیستی قادر به بهبود رشد، بسیار مورد توجه است (Pichyangkura et al., 2015).

نانوتکنولوژی در جهت بهبود گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و نانوذرات جایگزین مواد حجیم شده‌اند (Tokatlı et al., 2020). مزایای نانوذرات کیتوزان شامل اثرات سطحی و اندازه کوچک، آنها را موثرتر از کیتوزان معمولی می‌سازد (K. Divya et al., 2018). این نانو ذره دارای خواص مهم از جمله فراوانی بالا، ایمنوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می‌باشد.

میزان فتوسنتز از تغییرات گیاه در برابر الیسیتورهای مختلف است و بر عملکرد گیاه تاثیر می‌گذارد (Selote et al., 2004). تولید کلروفیل بیشتر در گیاهان موجب کارایی بیشتر نور خورشید شده و در تولید محصول بسیار مهم است. تولید گونه‌های اکسیژن فعال در کلروپلاست به وسیله انتقال مستقیم انرژی از کلروفیل به مولکول اکسیژن یا به وسیله کاهش تک ظرفیتی اکسیژن در فتوسیستم I صورت می‌گیرد (Sarmadnia et al., 1991). در این پژوهش مقدار کلروفیل به منظور بررسی تاثیر نانوذرات کیتوزان بر آن مورد سنجش قرار گرفت. تیمار نانوذرات کیتوزان می‌تواند به‌عنوان تنش در گیاه سبب اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و القا تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین و لیپیدهای غشا شود. برای سنجش مقدار پر اکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون د آلدئید که محصول پر اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد اندازه‌گیری می‌گردد (Mittler, 2002). در مطالعات متعدد اثرات ضد اکسیداتیو سیاه دانه گزارش شده است (Khanna et al., 2007). برای کنترل آسیب اکسیداتیو، گیاهان سیستم آنتی‌اکسیدان خود را گسترش می‌دهند (F.A. Shassan et al., 2017). یکی از روش‌های معمول برای ارزیابی پتانسیل مهار رادیکال آزاد مولکول‌های آنتی‌اکسیدان، استفاده از رادیکال آزاد DPPH است (Tiji et al., 2021). فلاونوئیدها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کنند (Domenico et al., 2012). برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه به بررسی مقدار فنل، فلاونوئید، سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید پرداختیم. به‌طور کلی هدف از اجرای این پژوهش بررسی عملکرد رویشی و شیمیایی و بهبود تغذیه این گیاه تحت القای محرک زیستی نانوذرات کیتوزان و کیتوزان بود.

پاشی کیتوزان در غلظت و زمان مناسب منجر به درصد عملکرد بالاتر روغن در گیاه سیاه دانه شد (Khaje et al., 2014). جستجو در منابع نشان می‌دهد تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات نانوذرات کیتوزان بر خصوصیات فیزیولوژیک و فیتوشیمی گیاه دارویی سیاه دانه وجود ندارد. لذا در این مقاله تاثیر نانوذرات کیتوزان و کیتوزان، بر خصوصیات فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه دارویی سیاه دانه مورد بررسی قرار گرفت.

جوانه زنی به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی است (Khalaki et al., 2020). بنابراین هر عاملی که موجب بهبود شرایط محیطی شود، روند جوانه زنی را تسریع می‌کند (Botnick, 2012). جهت بهبود جوانه زنی و به دنبال آن افزایش رشد گیاه و رسیدن به دانه بیشتر و استفاده به‌عنوان گیاه دارویی، بهتر است به کمک الیسیتورهای گوناگون این روند افزایش یابد. یکی از کاربردهای فناوری نانو، به‌کارگیری روشهایی است که از طریق آن درصد جوانه زنی بذر افزایش و زمان آن کاهش می‌یابد (Ranjan et al., 2013). در این پژوهش تاثیر نانوذرات کیتوزان و کیتوزان بر جوانه زنی سیاه دانه بررسی شد. روش‌های کشت بدون خاک یا سیستم‌های رشد هیدروپونیک به گونه ای طراحی شده اند که بهترین شرایط رشد را برای گیاهان به منظور دستیابی به عملکرد بهینه فراهم کنند (Kabiri et al., 2013). به منظور کنترل شرایط آزمایشی و با توجه به این که در برخی موارد اثرات مواد تیماری با سایر فاکتورهای موثر (مثل تغذیه خاک، میزان pH خاک و دسترسی برخی عناصر) همپوشانی پیدا می‌کند، لذا در این پژوهش برای بررسی دقیق تر اثرات تیمار نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان، از شرایط کشت هیدروپونیک استفاده گردید. افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن، افزایش پراکسیداسیون لیپید، از بین رفتن کلروفیل و کاهش

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان بر خصوصیات کمی و کیفی سیاه دانه، آزمایشی فاکتوریل بر پایه ی طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار در آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۱۴۰۰ انجام شد. بذر گیاه دارویی سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) از پاکان بذر اصفهان تهیه شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل ۶ سطح محلول نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان (۰،۰۱، ۰،۰۵، ۰،۲، ۰،۴، ۰،۸، ۱، ۴ درصد) بود.

تهیه محلول تیمار دهی: بر اساس مقالات بررسی شده و پیش تیمارهای انجام شده محلول‌های ۴، ۱، ۰،۲، ۰،۰۵، ۰،۰۱ درصد کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان (pH 5) در استیک اسید ۱ درصد تهیه گردید (Fazeli et al., 2018; Farshid, 2017; Gorzi et al., 2018).

جوانه زنی: بذرها ۱۰ دقیقه با محلول ۳ درصد هیپوکلریت سدیم ضد عفونی و با آب مقطر شستشو داده و خشک شدند. بعد از تیمار ۳ ساعته در محلول‌های آماده شده، در پتری دیشهای ضد عفونی شده دارای کاغذ واتمن، در محیط سایه با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (S.A. Mahdavi, 2013). به کمک فرمول‌های زیر در صد، شاخص و ضریب سرعت جوانه زنی محاسبه گردید.

$$\text{درصد جوانه زنی} = \frac{n}{N} * 100$$

$$\text{شاخص جوانه زنی} = \frac{\sum niTi}{N}$$

$$\text{ضریب سرعت جوانه زنی} = \frac{\sum ni}{\sum ni Ti}$$

n: تعداد بذره‌های جوانه زده

N: تعداد کل بذرها

T: تعداد روز

کاشت گیاه: بذرها در گلدان‌هایی با دهانه ۱۰ cm و ارتفاع ۳۰ cm به روش هیدروپونیک، روش Wick، کشت شدند. بذرها ضد عفونی شده، ۵ ساعت جهت آبیاری در آب مقطر قرار گرفتند. تغذیه با محلول

هوگلند (pH 5.5 و EC = 1200) انجام گردید. نوردهی با ۲ لامپ مهتابی و ۲ لامپ آفتابی و دوره نوری ۸-۱۶ انجام شد. پس از رسیدن به مرحله ۲ برگ، به کمک محلول‌هایی با مشخصات بیان شده تیماردهی به صورت ریشه‌ای آغاز شد. هر ۵ روز، جهت تیماردهی ۱ میلی لیتر از محلول‌های تیمار به محلول هوگلند اضافه شده و در طی رشد، ویژگی‌های گیاه مورد بررسی قرار گرفت (S. A. Mahdavi, 2013).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل: میزان کلروفیل نمونه‌ها به روش سایرام و همکاران (Sairam et al., 2002) اندازه‌گیری شد. یک گرم برگ دره‌اون به همراه ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد ساییده، حجم آن با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی لیتر رسانده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع دارای کلروفیل مجدد به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. میزان نور جذب شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موجهای ۶۶۳ نانومتر (کلروفیل a)، ۶۴۵ نانومتر (کلروفیل b) و ۴۷۰ نانومتر (کاروتنوئید) قرائت شده و توسط فرمول‌های زیر محتوای کلروفیل a، b و کل بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر برگها محاسبه شد.

$$\text{Chl a} = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{645}$$

$$\text{Chl b} = 21.50 A_{645} - 5.10 A_{663}$$

$$\text{Chl a+b} = 7.15 A_{663} - 18.71 A_{645}$$

$$\text{Cx+c} = \frac{1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl a} - 85.02 \text{Chl b}}{198}$$

تعیین مقدار ترکیبات فنل‌های کل: طبق روش

مکدونالد (McDonald S, 2001) با معرف (Folin-Ciocalteu)

تعیین شد. ۱ گرم از برگ‌های تازه در ۱۰ میلی لیتر متانول به مدت ۲ دقیقه ساییده و محلول به دست آمده صاف شد. به ۰،۵ میلی لیتر از عصاره رقیق شده (۱:۱۰ g ml⁻¹) ۵ میلی لیتر فولین رقیق شده (۱:۱۰) رقیق شده با آب مقطر) و سپس ۴ میلی لیتر Na₂CO₃ آبی (۱ مولار) اضافه شده و نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی مانده و جذب آن در ۷۶۵ نانو

$$\% RSA = \frac{OD \text{ control} - OD \text{ sample}}{OD \text{ control}} \times 100$$

برای بررسی بهتر فعالیت آنتی رادیکالی میزان IC_{50} تیمارهای مختلف آزمایش محاسبه شد و با IC_{50} ویتامین C مقایسه شد. کاهش در مقدار IC_{50} نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر می باشد (Brand-Williams, 1995; Soheili et al., 2017) (Siyahpoosh.F.A, 2010).

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپدهای غشا با استفاده از اندازه گیری مالون دی آلدئید : اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید به روش پاکر و هلنز (Packer & Health, 1968) انجام شد. ۲،۰ گرم از بافت تازه برگ درهاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر اسید تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰،۱ درصد، ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. به ۱ میلی لیتر از محلول رویی، ۴ میلی لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰،۵ درصد تیوباربتوریک اسید بود، افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس بلافاصله در یخ خرد شده سرد گردید. دوباره مخلوط سرد شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس شدت جذب نور در طول موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد. با رقیق سازی سریالی استاندارد MDA در محدوده غلظتی ۰-۵۰ میکرومول در آب دیونیزه استانداردهای MDA تهیه شده و شدت جذب نور در طول موج ۵۲۳ نانومتر برای استاندارد خوانده شد. متوسط جذب استاندارد و نمونه محاسبه و جذب اصلاح شده بدست آمد. مقدار جذب اصلاح شده هر استاندارد به عنوان یک تابع از غلظت MDA رسم شد. مقادیر MDA برای هر نمونه از منحنی استاندارد محاسبه شد (FumioSato et al., 2004).

متر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. منحنی استاندارد توسط غلظت های ($0-500 \text{ mg.l}^{-1}$) از اسید گالیک در متانول تهیه و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط $y=bx+a$ بدست آمد (Pandjaitan et al., 2005; Shui et al., 2002).

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل: از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. به ۰،۵ میلی لیتر از هر عصاره ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از محلول، ۱،۵ میلی لیتر متانول، ۰،۱ میلی لیتر از محلول آلومینیوم کلراید درصد ۱۰ در اتانول، ۰،۱ میلی لیتر از استات پتاسیم یک مولار و ۲،۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ nm خوانده شد. سپس میزان فلاونوئید بر اساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره به عنوان استاندارد ثبت گردید (Braca, 2002). منحنی استاندارد با محلول های کوئرستین متانولی در غلظت های $1000-250 \mu\text{g. ml}^{-1}$ تهیه شد و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط $y=bx+a$ بدست آمد (B. Sultana Chang C, 2002) (et al., 2009).

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH: بر اساس روش کولیسیک (Kulisic, 2004) با استفاده از روش اندازه گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی فنیل -۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۰،۲ گرم برگ گیاه در ۲ میلی لیتر متانول سائیده شد. به ۱ میلی لیتر از محلول نمونه در متانول، همان میزان از محلول ۰،۱ میلی مولار DPPH در متانول اضافه شد. به خوبی مخلوط و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شده و سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ nm قرائت شد. درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد (B. A. Sultana, 2009).

با قرارداد عدد بدست آمده در منحنی استاندارد میزان پروتئین نمونه مجهول برحسب میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: بررسی نرمال بودن داده‌ها به کمک آزمون Shapiro-wilk انجام شد، پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها بررسی فاکتورهای گوناگون در گیاه دارویی سیاه دانه به کمک تجزیه واریانس دوطرفه انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار (v 26) spss و ترسیم نمودارها با نرم افزار graph pad صورت پذیرفت.

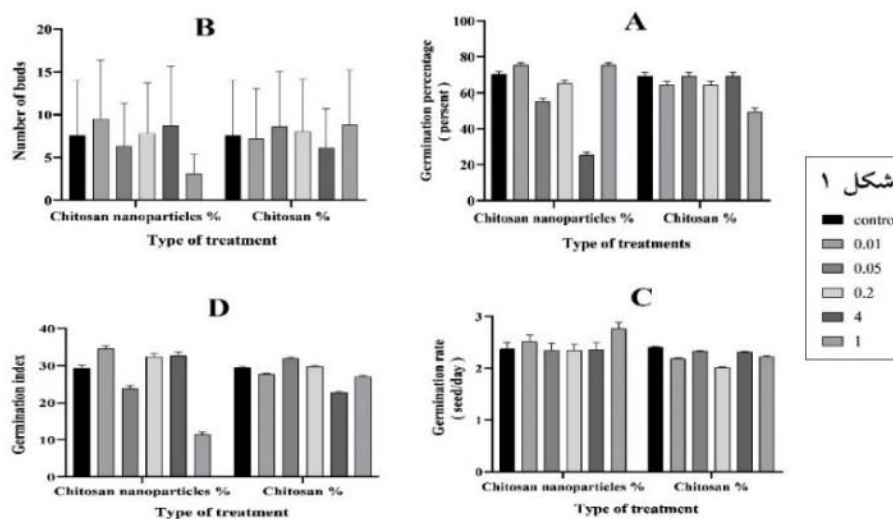
اندازه گیری پروتئین: به روش بردفورد (Bradford, 1976) صورت گرفت. ۰,۵ گرم بذر همراه با ۲ میلی لیتر بافر ۰,۲ مولار سائیده و سانتریفیوژ شد. ۰,۱ میلی لیتر از محلول رویی همراه با ۰,۲ میلی لیتر بافر در لوله آزمایش ریخته حجم به ۱ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۱ میلی لیتر کازئین اضافه گردید. ۲ ساعت در ۵۰ درجه انکوبه شد. ۳ میلی لیتر استیک اسید ۲درصد اضافه و سپس سانتریفیوژ انجام شد. ۲۰ میکرو لیتر از عصاره استخراجی نمونه با ۱۸۰ میکرو لیتر از محلول Bradford مخلوط شده و بعد از پنج دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

نتایج

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر تیمار نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان بر جوانه زنی گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)

منبع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)	تعداد جوانه	درصد جوانه	میانگین مربعات	ضریب سرعت جوانه زنی
نانو ذرات کیتوزان	۵	۶۶,۱۵**	۷۶,۰۵**	۱۷۹,۰۸**	۰,۴۳۱**
کیتوزان	۵	۱۲,۶۸**	۲۷۸,۴۰۹**	۸۰,۹۲۳**	۰,۰۴۲**
خطا	۴۸	۳۴,۱۶۹	۳,۳۳۳	۰,۳۹۳	۰,۰۰۸
CV %	-	۲۱,۲	۲۱,۲	۲۲,۱	۱۲,۷

*عدم اختلاف معنی دار، ** معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد.



شکل ۱: جوانه زنی : در صد جوانه زنی (A)، تعداد جوانه (B)، ضریب سرعت جوانه زنی (C)، شاخص جوانه زنی (D)

افزایش نشان داد (شکل ۱، A و D و B) و نیز ضریب سرعت جوانه زنی در تیمار ۰,۰۱ و ۴ درصد نانوذرات کیتوزان، افزایش نشان داد (شکل ۱، C).

جوانه زنی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمارها ($p < 0.05$) باعث افزایش معنی دار گردید (جدول ۱). در صد، سرعت و شاخص جوانه زنی در تیمار ۰,۰۱ و ۱ درصد نانوذرات کیتوزان،

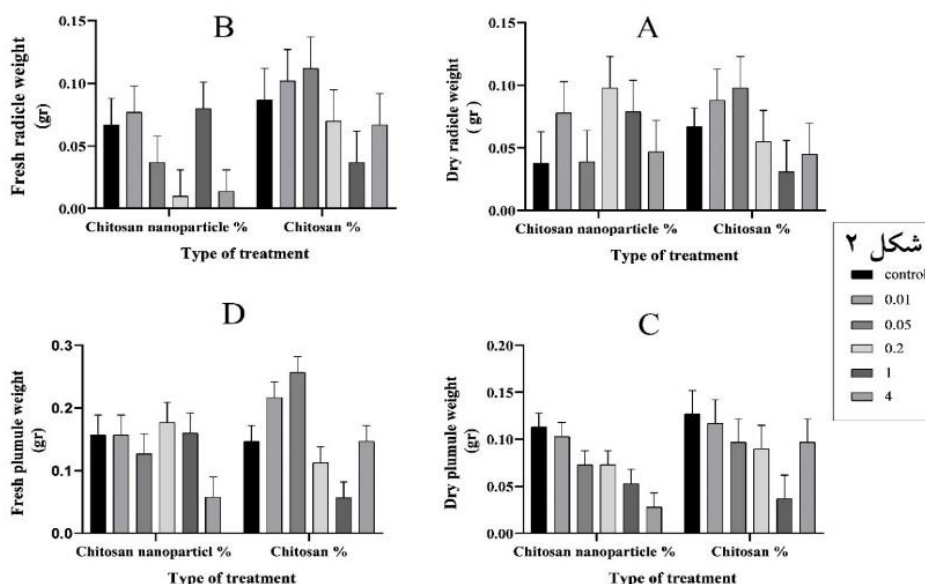
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تیمار نانوذرات کیتوزان و کیتوزان بر پارامترهای رشد گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.).

میانگین مربعات						درجه آزادی (df)	منبع تغییر (S.O.V)
وزن خشک ریشه چه	وزن خشک ساقه چه	وزن تر ریشه چه	وزن تر ساقه چه	طول ریشه چه	طول ساقه چه		
۰,۰۰۰**	۰,۰۰۴**	۰,۰۰۲*	۰,۰۰۳**	۵,۹۷۶**	۵,۰۱۱**	۵	نانو ذرات کیتوزان
۰,۰۰۱**	۰,۰۰۳**	۰,۰۰۱*	۰,۰۱۳**	۳,۲۹۶**	۰,۷۱۴**	۵	کیتوزان
۰,۰۰۱	۰,۰۰۰	۰,۰۰۱	۰,۰۰۱	۰,۰۲۷	۰,۰۵۳	۴۰	خطا
۵۰,۲	۳۷,۶	۴۶,۹	۴۴,۹	۴۴,۷	۳۸,۲	-	CV %

*عدم اختلاف معنی دار، **معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

ساقه چه، افزایش وزن خشک ریشه چه (شکل ۲، A و C)، افزایش وزن تر ساقه چه، جز تیمار ۴ و ۰,۰۵ درصد و افزایش وزن تر ریشه چه در ۰,۰۱ درصد را نشان داد (شکل ۲، B و D).

پارامترهای رشد: نتایج نشان داد که تیمار نانوذرات کیتوزان ($p < 0.05$) در همه پارامترهای مورد سنجش، جز وزن تر ریشه چه اثر معنی دار دارد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها کاهش وزن خشک



شکل ۲: پارامترهای رشد: وزن خشک ریشه چه (A)، وزن تر ریشه چه (B)، وزن خشک ساقه چه (C)، وزن تر ساقه چه (D)

اثر بر رنگدانه‌ها: نتایج واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان تاثیر معنی داری در سطح ($p < 0.05$) بر میزان رنگدانه‌ها داشت (جدول ۳).

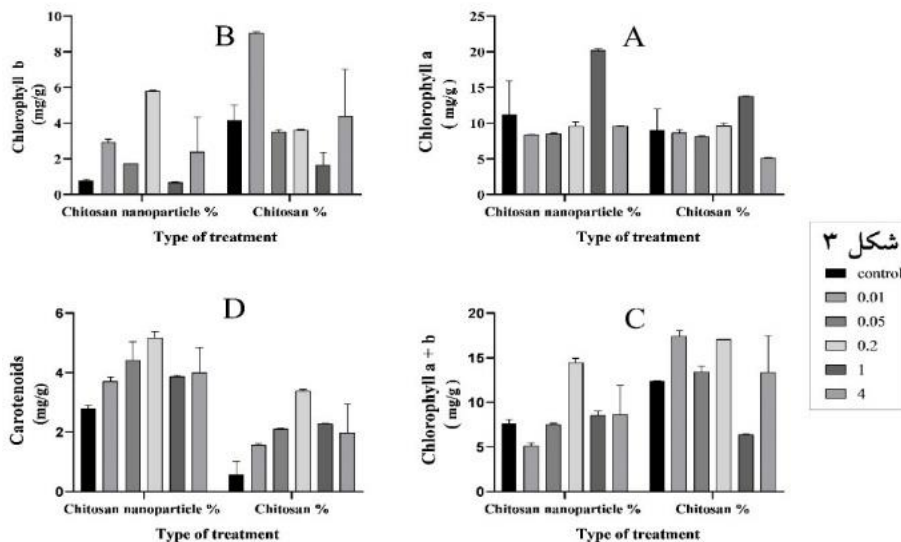
جدول ۳: تجزیه واریانس اثر تیمار نانوذرات کیتوزان و کیتوزان بر رنگدانه‌ها در گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)

منبع تغییر (s.o.v)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات		
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b
نانو ذرات کیتوزان	۵	۳۶,۳۸۲**	۳۴۷,۳۷۲**	۱۶۳,۷۰۴**
کیتوزان	۵	۹۰,۷۸۶**	۱۴,۰۵۸**	۵۴,۵۸۲**
خطا	۲۰	۰,۰۷۶	۰,۱۲۳	۰,۱۴۴
CV %	-	۳۹,۲	۵۸,۹	۳۹,۶

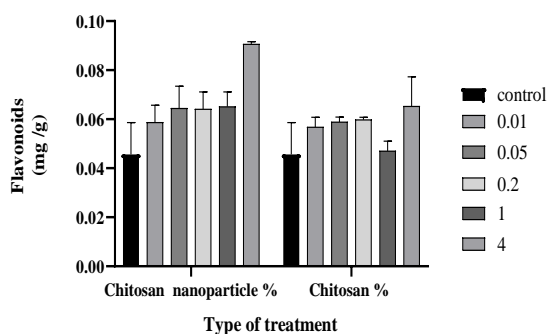
* عدم اختلاف معنی دار، ** معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

تیمار کیتوزان تیمار ۰,۱ و ۴ درصد افزایش داشته است. مقدار کلروفیل a (شکل ۳، A) در تیمار ۱ درصد نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان نسبت به شاهد افزایش داشته و میزان افزایش تیمار نانو ذرات بیشتر بوده است و اما مقدار کاروتنوئید (شکل ۳، D) در همه درصدهای تیماری افزایش داشته است.

از نظر میزان کلروفیل کل، تیمارها باعث افزایش مقدار کلروفیل گردید و همانطور که در مقایسه میانگین (شکل ۳، C) مشاهده می گردد مقدار کلروفیل کل در تیمارهای ۰,۲ و ۱ و ۴ درصد نسبت به شاهد افزایش دارد. در مورد مقدار کلروفیل b (شکل ۳، B) در همه درصدهای تیمار نانو ذرات کیتوزان نسبت به شاهد افزایش نشان داده است و در



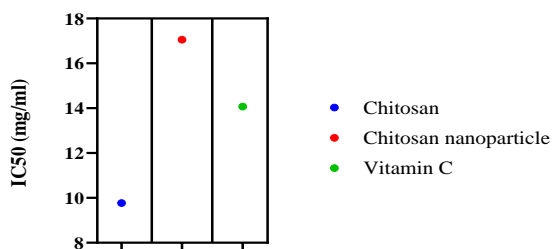
شکل ۳: رنگدانه‌ها: کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل a+b (C)، کاروتنوئید (D)



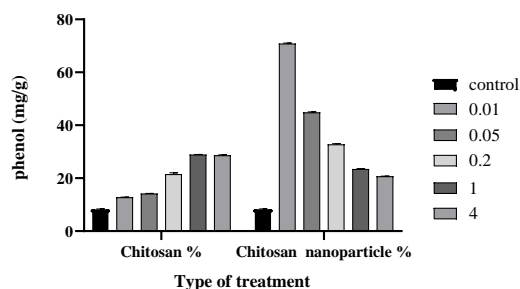
شکل ۵: مقدار فلاونوئید کل در گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان

(شکل ۵).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار نانو ذرات کیتوزان در سطح ($p < 0.05$) باعث افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی شد (جدول ۴). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها (شکل ۶) نشان می‌دهد مقدار 0.01 و 1 درصد در هر دو تیمار سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، نسبت به کنترل شده‌اند. مقدار افزایش نسبت به شاهد در نانو ذرات کیتوزان بیشتر است. شکل ۷ نشان می‌دهد تیمار با نانوذره کیتوزان سبب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه سیاه دانه شده است.



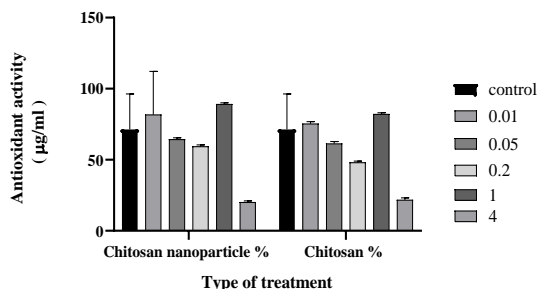
شکل ۷: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی IC_{50} های بدست آمده از تیمارهای مختلف در روش DPPH



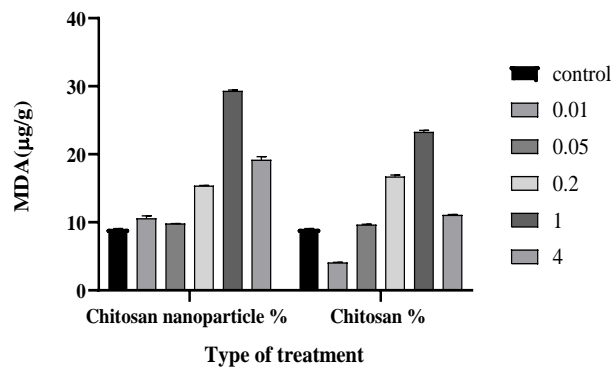
شکل ۴: مقدار فنل کل در گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان

فنل کل و فلاونوئید: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمارها در سطح ($p < 0.05$) باعث افزایش معنی دار مقدار فنل کل و فلاونوئید شدند (جدول ۴).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها (شکل ۴) نشان می‌دهد هر دو تیمار سبب افزایش مقدار فنل نسبت به کنترل شده‌اند. این افزایش در نانو ذرات کیتوزان بیشتر است. تیمارها سبب افزایش مقدار فلاونوئید نسبت به کنترل شده‌اند. مقدار 4% در هر دو تیمار سبب رشد بیشتری شده و در 1 درصد کیتوزان، کمترین میزان رشد مشاهده می‌شود. مقدار افزایش نسبت به شاهد در نانو ذرات کیتوزان بیشتر است



شکل ۶: مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذره کیتوزان و کیتوزان



شکل ۸: مقدار مالون د آلدئید گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذره کیتوزان و کیتوزان

شاهد در نانو ذرات کیتوزان بیشتر است. پروتئین کل: بررسی مقدار پروتئین در برگ (شکل ۹) و دانه (شکل ۱۰) گیاه سیاه دانه نشان می‌دهد هر دو تیمار سبب تغییر و افزایش چشمگیری نسبت به کنترل نشده‌اند.

مالون دی آلدئید (MDA): بررسی شکل ۸ نشان می‌دهد هر دو تیمار سبب افزایش مقدار MDA نسبت به کنترل شده‌اند. تیمار ۱ درصد در هر دو تیمار سبب رشد بیشتری شده و تیمار ۰,۰۱ کیتوزان کمترین میزان رشد را نشان می‌دهد. مقدار افزایش نسبت به

شکل ۱۰: مقدار پروتئین کل برگ گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذره کیتوزان و کیتوزان

شکل ۹: مقدار پروتئین کل برگ گیاه سیاه دانه تحت تیمار با نانو ذره کیتوزان و کیتوزان

دول ۴: تجزیه واریانس اثر تیمار نانوذرات کیتوزان و کیتوزان بر مقدار فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مالون د آلدئید و پروتئین کل در گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)

میانگین مربعات						درجه آزادی (df)	منبع تغییر (S.O.V)
پروتئین دانه	پروتئین برگ	مالون د آلدئید	آنتی‌اکسیدانی	فلاونوئید	فنل		
۴۲/۳۶۷**	۰,۴۳**	۱۱۳,۸۲**	**۲۰,۲۸	۰,۰۰۱**	۲۲۴۷,۸۴۲**	۵	نانو ذرات کیتوزان
۲/۷۲۴**	۱,۵۱۱**	۳۲۲,۸۹۳**	۳۸۶۱,۴۶۷**	۰,۰۰۰**	۲۸۶**	۵	کیتوزان
۰,۰۱۶	۰,۰۴۴	۰,۰۶۱	۲,۳	۰,۰۰۰	۰,۰۸۳	۲۰	خطا
۲۷,۳	۳,۷	۴۸,۵	۳۸,۸	۱۸,۹	۵۵,۵	-	CV %

*عدم اختلاف معنی‌دار، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

بحث

جوانه زنی: جوانه زنی بذر مرحله پیچیده و پویایی از رشد گیاه می باشد و از طریق اثراتی که روی استقرار گیاهچه دارد می تواند عملکرد را بهبود بخشد. نتایج پژوهش ها بیانگر آن است که می توان با استفاده از تیمارهای افزایش دهنده قدرت بذر به جوانه زنی سریع ظهور یکنواخت و استقرار قوی گیاه دست یافت (Seyed mohamadi et al., 2017). نتایج این مطالعه نشان داد، تعداد و درصد جوانه و نیز ضریب سرعت و شاخص جوانه زنی با تیمار کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان به طور معنی داری افزایش داشت (جدول ۱). تیمار نانو ذرات کیتوزان در درصدهای تیماری مشخص سبب افزایش تعداد و درصد جوانه زنی شده و نیز سرعت و شاخص جوانه زنی تحت تیمار نانو ذرات کیتوزان افزایش نشان داد (شکل ۱).

تاثیر نانو ذرات کیتوزان بر گیاه دارویی سیاه دانه مورد بررسی قرار نگرفته لیکن تاثیر این نانو ذره بر گیاهان متعدد دیگر بررسی شده است. پاسخ مثبت نانو کیتوزان بر روی جوانه زنی بذر و افزایش گیاهچه منجر به بهبود نانوفرمولاسیون کیتوزان می شود. نانو ذرات کیتوزان می توانند به سادگی به درون سلول های گیاهان نفوذ کنند و فعالیت های زیستی خود را بهبود بخشند (Wang et al., 2012). در مطالعه چن و چاندرا، تیمار برگ ها و دانه ها با کیتوزان بهبود قابل توجهی در رشد گیاه دارد (Chandra.S et al., 2014; Chen.J et al., 2015). همچنین نتایج نشان می دهد که نانو ذرات کیتوزان اثر مثبتی بر جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه گندم در غلظت پایین تری نسبت به کیتوزان، به دلیل جذب بالاتر در سطح دانه گندم دارند (Amer et al., 2020). نتایج این مطالعه با نتایج چن و چاندرا، آمر و شالا هم خوانی دارد. هم چنین این نتایج با نظرهاگری و همکاران (۲۰۱۲) که دریافتند نانومواد موجب افزایش جوانه زنی بذر در

گوجه فرنگی تحت تنش های غیر زنده می شود، موافق است (Zayed et al., 2017). مکانیسم دقیق عمل نانو ذرات کیتوزان در تاثیر گذاری بر جوانه زنی بذر هنوز روشن نیست. با این حال، پیشنهاد های زیادی در این زمینه وجود دارد. یکی از مکانیسم های پیشنهاد شده برای عمل نانو ذرات کیتوزان این است که یک پوشش نیمه تراوا را بر روی سطح دانه ها تشکیل می دهد. گزارش شده است که نانو ذرات کیتوزان فعالیت متابولیک بذرهای در حال جوانه زنی را آغاز می کند که باعث افزایش رشد در مقایسه با کنترل می شود (K. Divya et al., 2018).

پارامترهای رشد: رشد گیاه تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می گیرد. بنابراین جهت بهبود عملکرد گیاه با استفاده از الیسیستورهای گوناگون می توان روند رشد گیاه را تحت تاثیر قرار داد. در این مطالعه مشاهده شد، نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان بر پارامترهای رشد در گیاه سیاه دانه شامل طول ریشه چه و ساقه چه، وزن تر ساقه چه و وزن خشک ریشه چه و ساقه چه به طور معنی داری افزایش نشان داد (جدول ۲). تیمار نانو ذرات کیتوزان در درصدهای تیماری مشخص سبب افزایش پارامترهای رشد در گیاه سیاه دانه (طول ریشه چه و ساقه چه، وزن تر ریشه چه و ساقه چه و وزن خشک ریشه چه و ساقه چه) شد (شکل ۲).

نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه علی و همکاران (E.F.Ali et al., 2021) که بر روی گیاه *Catharanthus roseus* انجام شد و تعداد شاخه و وزن تر و خشک ریشه و ساقه بعد از استفاده از تیمار کیتوزان به طور قابل توجهی بهبود یافته است، مطابقت داشت. هم چنین در مطالعه دیوایا و همکاران (K. Divya & Jisha, 2018) مشاهده شد که نانو ذرات کیتوزان رشد گیاهچه برنج را افزایش می دهد که نتایج ذکر شده با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در

کل با تیمار نانو ذرات کیتوزان ، فتوسنتز را افزایش داد (Katiyar et al., 2015). کیتوزان می تواند مقدار کلروفیل را افزایش دهد (E.F.Ali et al., 2021). همچنین بررسی درصد کلروفیل کل و درصد کاروتنوئید توسط زاید و همکاران (Zayed et al., 2017) بر گیاه *Phaseolus vulgaris* تاثیر مثبت نشان داد.

اثر بر فنل، فلاونوئید، مالون دآلدئید و پروتئین :
نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آنها است که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال های آزاد، فرو نشانی اکسیژن های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند. انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می تواند به عنوان یک علامت عمل کند و برای راه اندازی زنجیره های از واکنش های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می شوند، عمل نماید (Mehregan et al., 2017). فلاونوئیدها همانند سایر ترکیبات فنلی توانایی جذب رادیکال های آزاد را دارند.

پراکسیداسیون لیپید تحت شرایط تنش به طور قابل توجهی افزایش می یابد و بنابراین تجمع MDA در گیاهان به طور قابل توجهی بیشتر می شود. یکی از ترکیبات مهم سیاه دانه پروتئین ها هستند که بعد از روغن با مقدار ۱۹,۹ - ۱۶ درصد در گیاه سیاه دانه سنتز و ذخیره می گردد (El-Tahir et al., 2006). تیموکینون که موثرترین ماده در این گیاه است جز ترین ها بوده که ابتدا باید در برگ ساخته شده و سپس جهت ذخیره به سایر اندام ها منتقل شوند (Sbourgou et al., 2010). تنش ها سبب کاهش درصد روغن و افزایش پروتئین می شود که به دلیل تسریع در رسیدگی گیاه می باشد. در این حالت فرصت کافی برای سنتز روغن از پروتئین های ذخیره شده در دانه وجود ندارد و بنابراین درصد پروتئین افزایش و مقدار روغن کاهش خواهد یافت (Alyari et al., 2001).

بررسی زاید و همکاران (Zayed et al., 2017) در مورد گیاه *Phaseolus vulgaris* نتایج جوانه زنی بذر نشان داد که نانو کیتوزان در تمام غلظت ها طول ریشه چه را افزایش می دهد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. و نیز تیمار گیاه *Phaseolus vulgaris* با نانو کیتوزان منجر به افزایش معنی دار برای تمام متغیرهای رشد (ارتفاع گیاه، سطح برگ و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه) شد (Zayed et al., 2017). وزن خشک گیاه *Solanum lycopersicum* رشد یافته تحت تنش کادمیوم تیمار شده با نانو ذرات کیتوزان افزایش قابل توجهی در مقایسه با کنترل نشان دادند (Faizan et al., 2021). طبق مطالعات دیوا و جی شا این امر می تواند به جذب و استفاده از نانو ذرات توسط جنین نسبت داده شود (K. Divya et al., 2018).

اثر بر رنگدانه ها : تولید کلروفیل بیشتر در گیاهان موجب می شود که نور خورشید با کارایی بیشتری مورد استفاده قرار گیرد و در تولید محصول بسیار مهم است (Sarmadnia et al., 1991). همانطور که نتایج این مطالعه نشان داد نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان سبب افزایش معنی دار رنگدانه های گیاه سیاه دانه شد (جدول ۳). استفاده از نانو ذرات کیتوزان در درصدهای تیماری مشخص سبب افزایش مقدار کلروفیل a و b و مقدار کلروفیل کل و نیز مقدار کاروتنوئید نسبت به شاهد شد (شکل ۳).

استفاده از نانو ذره کیتوزان در گیاه مرزنجوش، سرعت فتوسنتز را با افزایش سطح برگ، طول ریشه، جذب آب و مواد مغذی افزایش داد، که بر درصد کلروفیل آن تاثیر گذاشت (Amer et al., 2020). هم چنین نتایج مطالعه علی و همکاران (E.F.Ali et al., 2021) بر روی گیاه *Catharanthus roseus* نشان داد که استفاده از نانو ذرات کیتوزان به طور قابل توجهی میزان کلروفیل برگ را افزایش داد. افزایش کلروفیل

مطابقت دارد. هم چنین در مطالعه محمدفیضان و همکاران (Faizan et al., 2021) بر گیاه *Solanum lycopersicum*، نانوذرات کیتوزان غلظت MDA را در غیاب یا حضور تنش Cd کاهش داد. بر خلاف پژوهش حاضر محلول پاشی نانوذرات کیتوزان در گیاه *Solanum lycopersicum* محتوای پروتئین را در مقایسه با گیاهان کنترل ۱۷ درصد افزایش داد (Faizan et al., 2021).

نتیجه گیری نهایی

مطابق با نتایج تحقیق حاضر، سطوح مختلف نانو ذرات کیتوزان، به ویژه در غلظت ۰٫۰۱ و ۱ درصد، بر عملکرد گیاه مؤثر بود. در مقایسه نانوذرات کیتوزان با کیتوزان به تاثیر بیشتر نانو ذرات پی بردیم. می توان چنین نتیجه گرفت که برخی الیستورها از جمله نانو ذرات کیتوزان قادرند بهبود رشد، عملکرد و صفات فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه دارویی سیاه دانه را تحت تأثیر قرار دهند. کاربرد نانوذرات کیتوزان با موفقیت رشد، فتوسنتز، محتوای فنل، فلاونوئید را افزایش داده و نیز سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید در شرایط بدون تنش و تنش می شود. بنابراین می توان از اثرات مثبت کیتوزان به عنوان یک محرک زیستی کارآمد جهت بهبود بیوستز ماده مؤثره و دیگر متابولیت های ثانویه در تولید این گیاهان دارویی بهره برد.

استفاده از نانوذرات کیتوزان سبب افزایش مقدار پروتئین نشد و به دنبال آن کاهش روغن در دانه ها ایجاد نخواهد شد.

طبق نتایج به دست آمده نانو ذرات کیتوزان و کیتوزان سبب افزایش معنی دار فنل و فلاونوئید و مالون دالدئید در گیاه سیاه دانه شد ولی بر مقدار پروتئین تاثیری نداشت (جدول ۴). استفاده از نانو ذرات کیتوزان در درصدهای تیماری مشخص سبب افزایش مقدار فنل (شکل ۴) و فلاونوئید (شکل ۵) نسبت به کنترل شد. این افزایش در نانو ذرات کیتوزان بیشتر است و نیز سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد (شکل ۶). تیمارها سبب کاهش مقدار مالون دالدئید نسبت به کنترل شدند (شکل ۸). هر دو تیمار کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان سبب تغییر چشمگیر بر مقدار پروتئین کل گیاه نسبت به کنترل نشدند. همین بررسی بر عصاره دانه گیاه نیز انجام شد که نشان دهنده کاهش مقدار پروتئین کل بود (شکل ۹ و ۱۰). پراکسیداسیون لیپید تحت شرایط تنش به طور قابل توجهی افزایش می یابد و بنابراین تجمع MDA در گیاهان به طور قابل توجهی بیشتر می شود، در مطالعه علی و همکاران (E.F.Ali et al., 2021) مشاهده شد که گیاهان تحت تیمار با نانوذرات کیتوزان به طور قابل توجهی مقادیر MDA کمتری تولید کردند. تولید MDA در گیاهان تحت تنش یا بدون تنش که با نانو ذرات کیتوزان اسپری شدند در مقایسه با کنترل ناچیز بود که با نتایج پژوهش حاضر

References

- Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Ashraf, S. A., Saad, H.H., Wahab, S., Khan, M.I., Ali, M., Mohan, S., Hakeem, K.R., & Athar, M. T. 2021. An updated knowledge of Black seed (*Nigella sativa* Linn.): Review of phytochemical constituents and pharmacological properties. Journal of herbal medicine, 25, 100404. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100404>
- Zehtab-Salmasi, S., Javanshir, A., Omidbaigi, R., Alyari, H., & Ghassemi-Golezani, K. 2001. Effects of water supply and sowing date on performance and essential oil production of anise (*pimpinella anisum* l.). Acta Agronomica Hungarica, 49: 75-81. DOI:10.17557/tjfc.92800

3. Amer, A.H., & Shoala, T. 2020. Physiological and phenotypic characters of sweet marjoram in response to pre-harvest application of hydrogen peroxide or chitosan nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, 268, 109374. DOI:10.1016/j.scienta.2020.109374
4. Amiri, A., Ismailzadeh Mahabadi, p., Sirus Mehr, A.R. 2014. The effect of chitosan foliar application on Yield and yield components of safflower in arid regions (drought stress). Paper presented at the National Conference on Engineering and Management Agriculture. Sustainable environment and natural resources, Hamadan.Iran.
5. Balyan, P., Shinde, S., & Ali, A. 2021. Potential activities of nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* L. and its phytoconstituents: An overview. *Journal of Phytonanotechnology and Pharmaceutical Sciences*, 1(2): 1-9.
6. Botnick, I. X. 2012. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, 17(9): 10159-10177.
7. Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3): 379-381.
8. 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.
9. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25-30.
10. Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K., & Acharya, K. (2015). Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific reports*, 5(1): 1-14.
11. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
12. Chen, J., Zou, X., Liu, Q., Wang, F., Feng, W., & Wan, N. 2014. Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. *Crop Protection*, 56: 31-36.
13. Divya, K., & Jisha, M. S. 2018. Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16(1): 101-112.
14. Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., & Perluigi, M. 2012. Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5): 737-747.
15. Ali, E. F., El-Shehawi, A. M., Ibrahim, O. H. M., Abdul-Hafeez, E. Y., Moussa, M. M., & 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.
16. El-Tahir, K. E. D. H., & Bakeet, D. M. 2006. The black seed *Nigella sativa* Linnaeus-A mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 1(1):1-19.
17. Hassan, F. A. S., Morsi, M. M., & Aljouidi, N. G. S. 2017. Alleviating the Adverse Effects of Salt Stress in Rosemary by Salicylic Acid Treatment. *Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*, 8(3): 1980-1995.
18. Faizan, M., Rajput, V. D., Al-Khuraif, A. A., Arshad, M., Minkina, T., Sushkova, S., & Yu, F. 2021. Effect of foliar fertigation of chitosan nanoparticles on cadmium accumulation and toxicity in *Solanum lycopersicum*. *Biology*, 10(7): 666.
19. Farshid, A. 2017. The effect of different levels of chitosan on the vegetative yield of peppermint. Paper presented at the The Second International Conference on

- Modern Agreements in Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment.
20. Fazeli, A., Zarei, B., & Tahmasebi, Z. 2017. The effect of salinity stress and salicylic acid on some physiological and biochemical traits of Black cumin (*Nigella sativa* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(4): 69-84.
 21. Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Urugami, A., & Tokuda, S. 2004. Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. *Scientia Horticulturae*, 101(4): 349-357.
 22. Ghasemi, B., Hosseini, R., & Niri, F. D. 2015. The effect of cobalt and chitosan nanoparticles on the production of artemisinin and *Artemisia annua* in DBR and 2 SQS expressed two key genes. *Genetic engineering and biosafety*, 4(1): 25-39.
 23. Gorzi, R., Bernard, F., & Reza Ghalamboran, M. 2018. The effect of chitosan nanoparticles for the production and spread of yellow pigments in root cultivation of safflower. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 4(First): 16-27.
 24. Yin, H., Fretté, X. C., Christensen, L. P., & Grevsen, K. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1): 136-143.
 25. Ismailzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaei, Z., & Behmanesh, M. 2013. Increase the production of lignin and compounds Phenylpropanoid by chitosan in linoleum cell culture. *Journal of Plant Biology*, 11: 13-26.
 26. Kabiri, R., Nasibi, F., & Farah, B. H. 2013. Study of some oxidative parameters due to drought stress in black seed plant under hydroponic cultivation. *Plant process and function*, 3(1): 11-19.
 27. Khaje, H., & Naderi, S. 2014. The effect of chitosan on some properties of antioxidant enzymes and Biochemical in *Melissa*. *Journal of Crop Science in Arid Areas*, 1(1): 100-116.
 28. Abbasi Khalaki, M., Moameri, M., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. 2021. Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant growth regulation*, 93(1): 13-28.
 29. Khanna-Chopra, R., & Selote, D. S. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2): 276-283.
 30. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4): 633-640.
 31. Mahdavi, B., & Rahimi, A. 2013. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *EurAsian J BioSci* 7: 69-76.
 32. Mahdavi, S. A. 2013. Effect of different concentrations of chitosan on seed germination and antioxidant enzymes of safflower (*carthamus tinctorius* L) under dehydration. 26(3): 365-352.
 33. Mahmoudi, R., Tajali Ardakani, M., & Bardania, H. 2019. Cytotoxicity and apoptotic effect of chitosan nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *physalis alkekengi* on HT29 cell line. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 29(180): 102-107.
 34. Mansouri, A., Ahmadi, A., & Omid, H. 2016. Effect of chitosan oxide nanoparticles on germination and early growth indices of *Cathamus tinctorius* L. under salinity stress. *Journal of Seed Research*, 7(24): 72-81.
 35. McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M., & Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*, 73(1): 73-84.
 36. Mehregan, M., Mehrafarin, A., Labbafi, M. R., & Naghdi Badi, H. 2017. Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of medicinal plants*, 16(62): 169-181.

37. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science, 7(9): 405-410.
38. Packer & Heath. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
39. Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(22): 8618-8623.
40. Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. 2015. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. Scientia Horticulturae, 196(30): 49-65.
41. Pliankong, P., Suksa-Ard, P., & Wannakrairoj, S. 2018. Chitosan Elicitation for Enhancing of Vincristine and Vinblastine Accumulation in Cell Culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Journal of Agricultural Science, 10(12): 287-293.
42. Ranjan, P., Das, M. P., Kumar, M. S., Anbarasi, P., Sindhu, S., Sagadevan, E., & Arumugam, P. 2013. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Nigella sativa* and its application against UTI causing bacteria. J. Acad. Ind. Res, 2(1): 45-49.
43. Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant science, 163(5): 1037-1046.
44. Sarmadnia, G. H., & Koochaki, e. 1991. Crop physiology. Mashhad: Mashhad University Jihad.
45. Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B., & Legault, J. 2010. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. South African Journal of Botany, 76(2): 210-216.
46. Selote, D. S., & Khanna-Chopra, R. 2004. Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. Physiologia Plantarum, 121(3): 462-471.
47. Seyed mohamadi, K., Rahimi, A., Zardashti, M., & Rezaee, M. 2017. The effect of sterilization and potassium nitrate treatments on black cumin (*Nigella sativa* L.) germination. Paper presented at the National Conference on Medicinal Plants, Iran. Shahroud University of Technology.
48. Shui, G., Leong, L. P. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography A, 977(1): 89-96.
49. Sitthichai, I., Supatcharee, A., Jaturon, B., Supataechasit, Y., Saranya, T., Sudtida, B., Natthapol, L., Pannawat, C., Nareelak, T., Chadaporn, C., Wannisa, S. 2020. Evaluation of antioxidant capacity and reproductive toxicity of aqueous extract of Thai *Mucuna pruriens* seeds. Journal of Integrative Medicine. 18(3): 265-273.
50. Soheili, M., Khandan, M. A., & Salami, M. 2017. Evaluation of anti-oxidant activity of *Lavandula angustifolia* using DPPH method. Journal of Arak University of Medical Sciences, 19(12): 70-77.
51. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules, 14(6): 2167-2180.
52. Tiji, S., Benayad, O., Berrabah, M., El Mounsi, I., & Mimouni, M. 2021. Phytochemical profile and antioxidant activity of *Nigella sativa* L growing in Morocco. The Scientific World Journal, 2021.
53. Tokatlı, K., & Demirdöven, A. 2020. Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Scientia Horticulturae, 259: 108656.
54. Wang, Q., Chen, J. N., Zhan, P., Zhang, L., & Kong, Q. Q. 2013. Establishment of a suspension cell system for transformation of *Jatropha curcas* using nanoparticles. In Advanced Materials Research (Vol. 608, pp. 314-319). Trans Tech Publications Ltd.

55. Yadollahi Dehchechme, P., Bagheri, A. A., Amiri, A., & Esmailzade Bahabadi, S. 2014. Effect of drought tension and chitosan foliar application on yield and photosynthetic pigments of sunflower (*Heliantus unnuus L.*). *crop physiology journal*, 6(21): 73-83.
56. Zayed, M. M., Elkafafi, S. H., Zedan, A. M., & Dawoud, S. F. 2017. Effect of nano chitosan on growth, physiological and biochemical parameters of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Production*, 8(5): 577-585.
57. Zhong, Y. 2005. Isolation, Characterization of Beta-Chitin from Squid Pens and Calcium Carbonate Crystallization on the Chitin. *Scaffold Intel International Science and Engineering Fair Intel ISEF*.
58. Ziaee, G., & Amir, F. 1960. Effectiveness of 'Nigella' in Asthma. *Alexandria Journal of Medicine*, 6: 543-547.

Study of the effect of the chitosan and chitosan nanoparticles on some physiological and phytochemical features of *Nigella sativa* L.

Mehdipour, F.¹, Saadatmand, S.^{2*}, Iranbakhsh, A.³, Nowrozi, B.⁴, Uraghi Ardabili, Z.⁵

¹PhD student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

Received: 22-11-2021; Accepted: 10-4-2022

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa* L.) from the Ranunculaceae family is considered one of the best sources of natural antioxidants. Due to the positive effect of chitosan on various medicinal plants, in this study we investigated the vegetative and chemical performance of this plant under the treatment of chitosan nanoparticles. Experimental factors included solubilization of chitosan and its nanoparticles with concentrations of 0.01, 0.05, 0.2, 1, 4 (pH 5) percent. Assays were performed on the seed and leaf extracts of the treated plant at Razi Laboratory of Azad University, Science and Research Branch of Tehran in 2021. Extraction was done by cold pressing method. Some traits such as germination (number, percentage, index and germination rate), growth parameters (radicle and plumule length, fresh radicle and plumule weight and radicle and plumule dry weight), pigments, total leaf phenol content (Folin-Ciocalteu) total leaf flavonoids (aluminum chloride colorimetric assay), leaf antioxidant activity (DPPH), leaf membrane lipid peroxidation (MDA concentration) and soluble protein content Seeds and leaves (Bradford) were evaluated. The experiment was conducted as a completely randomized design with 3 replications and the comparison of data means was performed using Duncan's test at a probability level of 5%. The results showed that the treatment percentages had a significant effect on all evaluated traits (except the fresh weight of the radicle). Treatment of 1% and 0.01% of chitosan nanoparticles increased the growth and germination parameters. In addition, the amount of phenol, flavonoids and antioxidant activity increased compared to the control showed that the highest increase was observed in concentrations of 1% and 0.01% chitosan nanoparticles. The maximum increase in the amount of pigments was due to the concentration of 1% and 0.2% of chitosan nanoparticles. Both treatments at a concentration of 1% reduced the amount of MDA compared to the control. The amount of total protein in leaves and seeds decreased under the influence of the treatments. In general, it was concluded that the treatment of chitosan nanoparticles as a bio stimulant has a positive effect on improving the quality characteristics of black seed and they are also suggested as a suitable stimulus to increase growth.

Key words: Antioxidant activity, Chitosan nanoparticles, Lipid peroxidation, *Nigella sativa* L.

*Corresponding author; sadatmandsara@gmail.com