

اثر کیتوزان بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری

بتول مهدوی* و حسین صفری

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۹/۱۶)

چکیده:

به منظور ارزیابی اثر کیتوزان بر رشد رویشی و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان در سال ۱۳۹۲ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل شوری (۰، ۴، ۶ و ۸ دسی زیمنس بر متر) و سطوح مختلف کیتوزان (۰، ۱/۰ و ۲/۰ درصد، که همه در اسید استیک ۱ درصد حل شده بودند) همراه با تیمار آب مقطر بودند. نتایج نشان داد افزایش شوری موجب افزایش میزان مالون دی آلدئید (۰/۸۳۴ میلی مول بر گرم)، پرولین (۰/۲۵۴ میلی گرم بر گرم وزن تر)، کربوهیدرات کل (۱۰/۴۸ میلی گرم بر گرم وزن تر)، سدیم ساقه (۱/۸۷ درصد)، سدیم ریشه (۲/۰۵ درصد) و کاهش میانگین سایر صفات گردید. تیمار با کیتوزان طول ساقه، وزن خشک ساقه و محتوی نسبی آب را افزایش و میزان مالون دی آلدئید را کاهش داد. در شرایط تنش شوری، تیمار کیتوزان موجب افزایش طول ریشه، وزن خشک ریشه، میزان پرولین و کربوهیدرات کل برگ شد. همچنین تیمار کیتوزان موجب افزایش میزان پتاسیم و کاهش میزان سدیم ساقه هم در شرایط بدون تنش و هم تنش شد. میزان پتاسیم ریشه در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت، ولی میزان سدیم ریشه ۷/۱۴ درصد کاهش نشان داد. چنین به نظر می‌رسد که پیش تیمار بذر با کیتوزان از طریق کاهش جذب یون سدیم و افزایش میزان پرولین، کربوهیدرات کل و پتاسیم اثرات مضر تنش شوری را در نخود کاهش داده است.

کلمات کلیدی: تنش شوری، پرولین، کیتوزان، نخود.

مقدمه:

دانه‌ای است. اهمیت زراعت نخود به علت غلظت پروتئین بالا حدود ۲۵/۳-۲۸/۹ درصد برای رژیم غذایی انسان و حیوان است که به عنوان یک منبع پروتئین جایگزین استفاده می‌گردد (Hulse, 1991). به علت حساسیت این گیاه به شوری، این گیاه به شدت تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفته، رشد و عملکرد آن کاهش می‌یابد (Singla and Gary, 2005). همچنین Gandour (۲۰۰۲) گزارش کردند که تنش شوری سبب تجمع سدیم و کلر در بخش‌های مختلف ساقه به ویژه برگ می‌شود. در حالی که میزان پتاسیم را در بخش‌های مختلف ژنوتیپ‌های نخود کاهش می‌دهد.

شوری یکی از محدودیت‌های محیطی است که ۲۰٪ از مزارع آبی جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Munns and Tester, 2008). تنش شوری فتوسنتز، متابولیسم نیتروژن و متابولیسم کربن را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. شوری همچنین سبب اختلال در جذب یون‌ها در گیاه شده و ممکن است به کاهش چندین عنصر غذایی و افزایش یون سدیم منجر شود (Santos et al., 2002). چنین تغییرات فیزیولوژیک موجب کاهش رشد و سرانجام کاهش عملکرد در گیاه می‌گردد.

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهمترین لگوم‌های

پرویلین و محتوی کربوهیدرات‌های کل در شرایط تنش شوری می‌شود (Ruan and Xue, 2002). با توجه به روند رو به رشد شوری در کشور و خطرات ناشی از آن برای گیاهان و از طرف دیگر اهمیت گیاه نخود در تغذیه انسان، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر کیتوزان در تعدیل اثرات زیانبار تنش شوری اجرا گردید.

مواد و روش‌ها:

کشت و اعمال تیمارها: این آزمایش به صورت گلدانی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان در سال ۱۳۹۲ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل شوری (۰، ۴، ۶ و ۸ دسی زیمنس بر متر) و سطوح مختلف کیتوزان (۰، ۱/۱ و ۰/۲ درصد، که همه در اسید استیک ۱ درصد حل شده بودند) همراه با تیمار آب مقطر بود. برای تهیه محلول‌های کیتوزان از پودر کیتوزان با وزن مولکولی پایین محصول شرکت سیگما (Sigma) استفاده شد. جهت اعمال تیمار کیتوزان، بذرهای نخود (*Cicer arietinum* L.) (رقم آزاد) در غلظت‌های مختلف محلول‌های کیتوزان و آب مقطر برای ۳ ساعت در دمای °C ۲۵ غوطه‌ور شد. رقم آزاد نخود گیاهی است پاییزه، ایستاده با میزان پروتئین ۲۱/۵ درصد که مناسب کشت در مناطق نیمه معتدل و گرمسیری می‌باشد. سپس بذرهای پیش تیمار شده با آب مقطر شسته و به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس بذرهای هر تیمار درون گلدان‌های زهکش‌دار با قطر دهانه ۱۵ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر که با کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ پر شده بودند کشت شدند. پس از کاشت همه گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. پس از ظهور اولین برگ‌های حقیقی، آبیاری با محلول غذایی هوگلند صورت گرفت و تعداد گیاهان به ۴ بوته تقلیل یافت. محلول غذایی هوگلند حاوی ۰/۷۵ میلی مولار $MgSO_4$ ، ۰/۵ میلی مولار KH_2PO_4 ، ۱/۲۵ میلی مولار KNO_3 ، ۱/۵ میلی مولار $Ca(NO_3)_2$ ، ۵۰ میکرومولار KCl ، ۵۰ میکرومولار H_3BO_3 ، ۱۰ میکرومولار $MnSO_4$ ، ۲ میکرومولار $ZnSO_4$ ، ۱/۵ میکرومولار

در بسیاری از گیاهان استفاده از محرک‌های زیستی یکی از روش‌های کاهش اثرات مضر تنش‌های غیر زیستی و افزایش عملکرد و کیفیت آنها می‌باشد (Gornik et al., 2008). چندین ماده با خاصیت الیسیتوری (elicitor) از جمله کیتوزان شناسایی شده است که واکنش به تنش و مکانیسم‌های دفاعی را تحریک می‌کند (Kowalski et al., 2006). کیتوزان که از دستپله شدن کیتین تولید می‌شود، یک ماده زیست تجزیه پذیر طبیعی است که از پوسته سخت پوستان مثل خرچنگ و میگو گرفته می‌شود. این ماده با داشتن خصوصیات بیولوژیک و فیزیولوژیک منحصر به فرد کاربردهای متعددی در صنایع مختلف مانند دارویی، پزشکی و کشاورزی دارد (Bautista-Baños et al., 2006). کیتوزان به عنوان یک منبع کربن ممکن است رشد میکروب‌های مفید در خاک را تحریک کرده، فرایند تبدیل مواد آلی به معدنی را افزایش داده و به سیستم ریشه گیاهان در جذب بیشتر مواد غذایی از خاک کمک کرده و بنابراین رشد گیاه را تحریک می‌کند (Cho et al., 2008). بذرهای سویا تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۳ درصد کیتوزان نسب به شاهد رشد بیشتری داشتند و عملکرد آن‌ها نیز تا ۳۶ درصد افزایش یافت. بعلاوه میزان بیماری زنگ به طور معنی داری در این گیاه کاهش یافت (Dzung and Thang, 2002). همچنین خیساندن بذرهای ارزن مروریدی در کیتوزان، ارتفاع بوته و عملکرد دانه این گیاه را نسبت به شاهد افزایش داد (Sarathchandra and Jaj, 2004). امروزه استفاده از کیتوزان بعنوان یک ماده غیر سمی، قابل تجزیه و سازگار با محیط برای کاهش و بهبود اثرات تنش‌های مختلف از جمله تنش خشکی (Dzung et al., 2011) و شوری (Lianju et al., 2011) مورد توجه است. Lianju و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که پیش تیمار بذرهای گندم با کیتوزان اثرات تنش شوری را در این گیاه با افزایش طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه و میزان کلروفیل کاهش می‌دهد. همچنین آنها دریافتند که کیتوزان سبب افزایش میزان پرویلین و کاهش میزان مالون دی آلدئید گیاه می‌گردد. همچنین گزارش شده است که پرایمینگ بذرهای برنج با کیتوزان سبب افزایش رشد، محتوی

مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ گشت. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های صاف شده را به لوله‌های دردار منتقل نموده و به تمام لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در بن ماری دمای 100°C قرار داده شدند. پس از سرد کردن لوله‌ها به هر کدام مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گشت و لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس تکان داده شد. پس از آن فاز روئی را که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بوده برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار گرفت و اعداد در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

سنجش کربوهیدرات‌های کل: اندازه‌گیری کربوهیدرات کل از روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) با استفاده از فنل - اسید سولفوریک و استاندارد گلوکز انجام شد. نمونه‌های منجمد به میزان ۰/۱ در ۳ میلی‌لیتر الکل اتیلیک عصاره‌گیری شدند. نمونه‌های همگن حاصل به کمک قیف و کاغذ صافی صاف گردید. برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل نمونه، به ۵۰ میکرولیتر نمونه‌های همگن صاف شده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه گردید. بلافاصله بعد از افزودن اسید سولفوریک، یک واکنش گرمازا همراه با تولید رنگ نارنجی ایجاد می‌شود که تولید حرارت زیادی می‌کند. لذا ضروری است بعد از افزودن اسید، مخلوط واکنش برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد بماند تا خنک شود. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز از ۰ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترسیم گردید. جذب استانداردها به همراه جذب کربوهیدرات کل نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 490nm اندازه‌گیری شد. مقدار کربوهیدرات نمونه، بر مبنای وزن تر نمونه‌ها تعیین گردید.

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید: مالون دی‌آلدئید به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با روش

CuSO_4 ، ۰/۰۷۵ میکرومولار $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ و ۱۰ میکرومولار Fe-EDTA با فسفر ۵۰ درصد بود. برای اعمال شوری به مقادیر لازم کلرید سدیم برای دستیابی به غلظت‌های مورد نظر، به محلول هوگلدن اضافه و برای تغذیه گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگگی به کار برده شد. پس از گذشت ۴۵ روز از کاشت، گیاهان برداشت شده و ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن خشک ریشه و ساقه، محتوی نسبی آب، محتوی پرولین، محتوی کربوهیدرات کل، محتوی مالون دی‌آلدئید، غلظت عناصر سدیم و پتاسیم در اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری گردید. برای خشک کردن نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سنجش محتوی نسبی آب: محتوای نسبی آب برگ به روش Ritchie و همکاران (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه ۳ دیسک دو سانتی‌متری از قسمت میانی هر برگ جدا گردیده و بلافاصله وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی غوطه‌ور شده و پس از گرفتن آب روی آن با کاغذ صافی، بلافاصله وزن شدند (وزن تورژسانس). سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و وزن گردیدند (وزن خشک). در نهایت محتوای نسبی آب از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{محتوی نسبی آب} = \left\{ \frac{\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}}{\text{وزن تر}} \right\} \times 100$$

اندازه‌گیری غلظت یون‌ها: سنجش غلظت یون‌ها با استفاده از روش هضم سوزاندن نمونه خشک گیاهی، در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و واکنش با اسید کلریدریک ۲ مولار و به کمک دستگاه فلیم فتومتر (Model PFP7, Germany) تعیین گردید.

سنجش پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. برای سنجش پرولین، ابتدا ۰/۲ گرم از برگ وزن شد و سپس ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد به آن اضافه و به طور کامل در هاون چینی سائیده شد. عصاره‌های حاصل در دور ۱۸۰۰۰ به

خشک ساقه در سطح کیتوزان ۰/۱ درصد بیشترین بود که اختلاف معنی داری با کیتوزان ۰/۲ درصد نداشت. بین دو شاهد اسید استیک و آب مقطر اختلاف معنی داری از نظر طول و وزن خشک ساقه وجود نداشت (شکل ۲). سایر محققین افزایش طول و وزن خشک ساقه را در گیاهان تیمار شده با کیتوزان مشاهده کردند (Cho *et al.*, 2008). مکانیزم عمل کیتوزان بر رشد ناشناخته باقی مانده است. کیتوزان ممکن است رشد و نمو گیاه را از طریق سنتز هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین و اکسین افزایش دهد (Uthairatanakij *et al.*, 2007).

میان سطوح شوری مختلف شوری و سطوح کیتوزان از نظر طول و وزن خشک ریشه اختلاف معنی دار وجود داشت (جدول ۱). همچنین اثر متقابل شوری و کیتوزان بر این صفات معنی دار بود. در شرایط بدون تنش، گیاهان پیش تیمار شده با کیتوزان طول و وزن خشک ریشه بیشتری نسبت به گیاهان پیش تیمار شده با آب مقطر و اسید استیک داشتند. همچنین در شرایط تنش، هر دو تیمار کیتوزان سبب افزایش طول و وزن خشک ریشه نسبت به تیمارهای آب مقطر و اسید استیک شدند (شکل ۳). ریشه‌ها مستقیماً در تماس با محیط رشد شامل نمک‌های سمی هستند که رشد بلند مدت ریشه را متوقف می‌کند (Tyerman and Skerrett, 1999)، که بطور غیر مستقیم تولید بیوماس را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج تحقیقات Luan و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که کیتوزان موجب افزایش طول ریشه در گیاهان مورد مطالعه گردید. کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان در گیاه لوبیا نیز منجر به افزایش وزن خشک ساقه و ریشه گردید (Singla and Gary, 2005). از آنجا که افزایش در طول ریشه در واقع افزایش در جذب آب و مواد غذایی است، به نظر می‌آید در شرایط تنش شوری، گیاهان تیمار شده با کیتوزان با افزایش طول ریشه توانستند از اثرات مخرب شوری بر رشد و گسترش ریشه جلوگیری کنند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که محتوی نسبی آب تحت تأثیر تیمار تنش شوری و کیتوزان قرار گرفت ولی اثر متقابل آنها بر این صفت معنی دار نبود (جدول ۱). با افزایش شوری به ۸ دسی زیمنس بر متر، محتوای نسبی آب برگ نسبت به شاهد

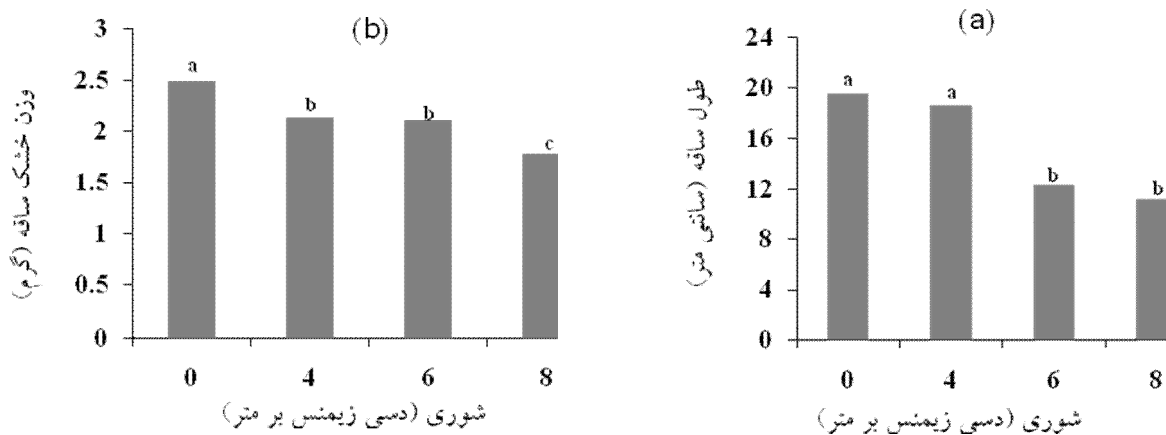
De Vos و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم از نمونه‌های منجمد شده در ۳ میلی‌لیتر TCA (تری‌کلرواسید استیک) ۱۰ درصد عصاره‌گیری شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۱ میلی‌لیتر TBA (تیوباربی‌توریک اسید) ۵/۰ درصد اضافه شد و در بن ماری دمای °C ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، لوله‌ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن میزان مالون‌دی‌آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}$) محاسبه گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: از نرم افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده و با مشاهده تفاوت معنی دار در آنالیز واریانس (ANOVA) مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

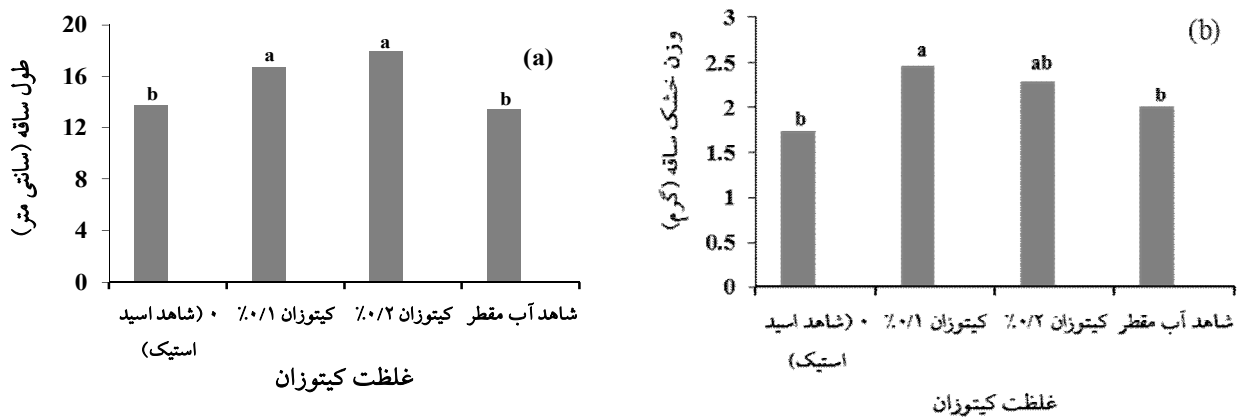
نتایج و بحث:

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر شوری و کیتوزان بر طول و وزن خشک ساقه معنی دار بود ولی اثر متقابل شوری و کیتوزان بر صفات مذکور معنی دار نگردید (جدول ۱). با افزایش غلظت شوری از سطح شاهد طول و وزن خشک ساقه کاهش یافت (شکل ۱). یافته‌های سایر محققان نیز حاکی از آن است که طول ساقه در گیاه لوبیا چشم بلبلی به طور معنی داری در شرایط تنش شوری کاهش یافته است (Patel *et al.*, 2010). کاهش رشد گیاه و تجمع ماده خشک در شرایط تنش شوری در چندین لگوم مهم دیگر نیز گزارش شده است (Delgado *et al.*, 1994). ممانعت از رشد تحت شرایط شوری ممکن است به علت کاهش دسترسی آب و یا سمیت نمک کلرید سدیم باشد (Munns, 2003). تحت شرایط تنش شوری، جذب CO_2 گیاه که منبع اصلی انرژی برای رشد و نمو است، کاهش یافته و سرانجام رشد کاهش می‌یابد (Kasukabe *et al.*, 2006).

تیمار بذرها با کیتوزان سبب افزایش طول و وزن خشک ساقه نسبت به هر دو شاهد آب مقطر و اسید استیک گردید. بیشترین طول ساقه در سطح کیتوزان ۰/۲ درصد مشاهده شد که اختلاف معنی داری با کیتوزان ۰/۱ درصد نداشت. وزن



شکل ۱- اثر سطوح مختلف شوری بر طول ساقه (a) و وزن خشک ساقه (b) نخود. ستون‌های دارای حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر طول ساقه (a) و وزن خشک ساقه (b) نخود. ستون‌های دارای حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

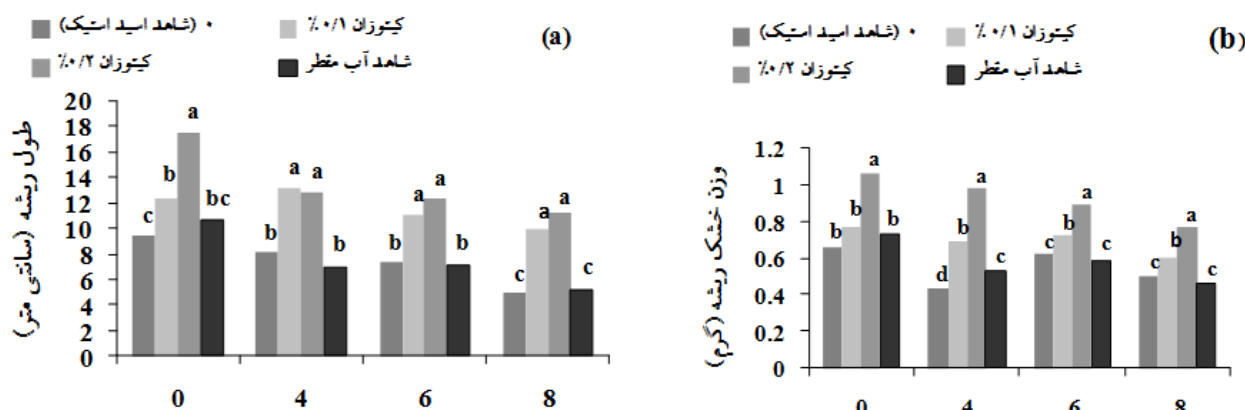
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر شوری و کیتوزان بر پارامترهای رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ساقه	طول ریشه	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	محتوی نسبی آب	مالون دی آلدئید	پرولین	کربوهیدرات
شوری	۳	۲۱۰/۷۶**	۴۵/۸۰**	۱/۰۱**	۰/۱۱**	۱۴۶۳/۰۱**	۰/۱۹**	۰/۰۱**	۵/۹۱**
کیتوزان	۳	۵۳/۴۱**	۱۱۰/۷۳**	۱/۲۲**	۰/۳۵**	۱۹۹/۹۸**	۰/۰۴**	۰/۰۲**	۳۷/۵۲**
کیتوزان × شوری	۹	۰/۹۳ ^{ns}	۳/۲۶*	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۰۱*	۴۷/۶۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۰۱**	۱/۲۲*
خطای آزمایشی	۳۲	۴/۲۵	۱/۲۸	۰/۱۴۶	۰/۰۰۴	۳۲/۳۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۰/۵۳۱
ضریب تغییرات		۱۳/۴۲	۱۱/۳۲	۱۷/۹۱	۸/۹۷	۹/۶۸	۱۰/۴۶	۵/۰۶	۷/۳۴

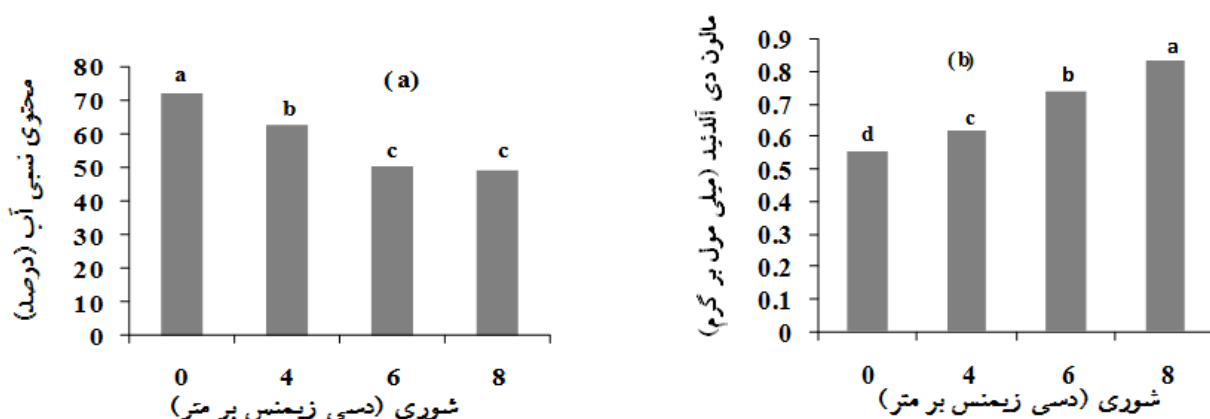
^{ns}، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

محتوای آب نسبی در شرایط تنش در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Kerepesi and Galiba, 2000). تیمار

۳۲/۰۲ درصد کاهش یافت (شکل ۴). محتوای نسبی آب برگ معرف بسیار خوبی از وضعیت آبی گیاه است. کاهش میزان



شکل ۳- اثر شوری و کیتوزان بر طول ریشه (a) و وزن خشک ریشه (b) نخود. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۴- اثر سطوح مختلف شوری بر محتوای نسبی آب برگ (a) و میزان مالون دی آلدئید (b) برگ نخود. ستون‌های دارای حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

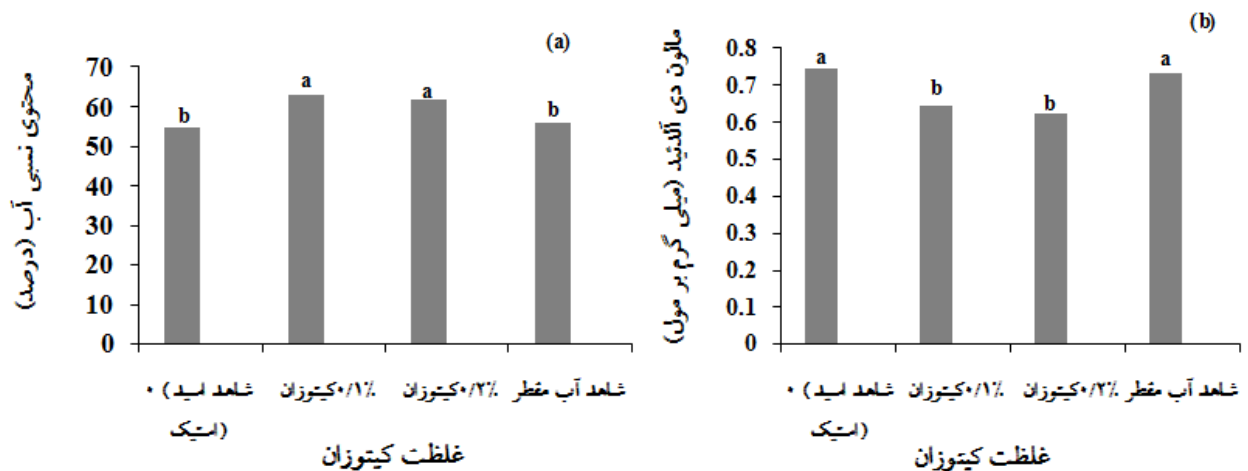
میزان مالون دی آلدئید در برگ‌های نخود نسبت به شاهد ۵۱/۰۹ درصد افزایش می‌یابد. مالون‌دی‌آلدئید بعنوان محصول نهایی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء سلولی تولید می‌شود. تنش اکسیداتیو سبب افزایش در محتوی مالون دی آلدئید می‌گردد (Weber et al., 2004).

تیمار با هر دو غلظت کیتوزان سبب کاهش میزان مالون دی آلدئید نسبت به شاهدها گردید (شکل ۵). کاهش مالون دی آلدئید توسط کیتوزان احتمالاً به این دلیل است که کیتوزان می‌تواند با کلاته کردن یون‌های فلزی یا ترکیب شدن با لیپیدها، اکسیداسیون لیپیدها را کاهش دهد (Xue et al., 2002).

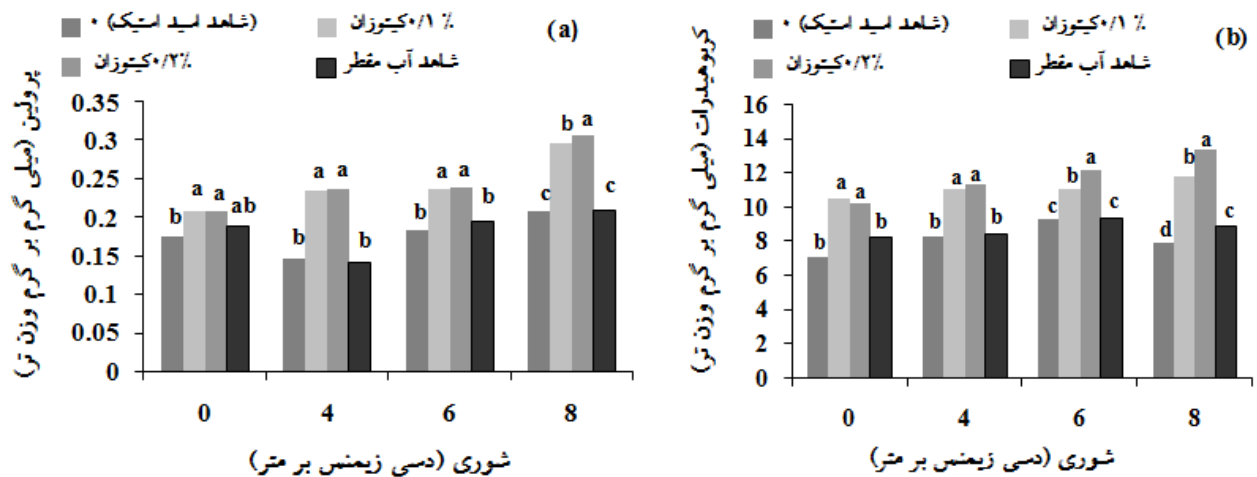
اثر شوری، کیتوزان و اثر متقابل آنها بر میزان پرولین و کربوهیدرات کل معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان پرولین و

گیاهان با هر دو غلظت کیتوزان سبب افزایش میزان محتوای نسبی آب نسبت به هر دو شاهد گردید (شکل ۵). با توجه به اینکه محتوای نسبی آب بالا، توانایی گیاهان را برای تنظیم اسمزی و حفظ رشد شان نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد کیتوزان با افزایش محتوای نسبی آب توانسته رشد گیاه نخود را افزایش دهد زیرا افزایش محتوی نسبی آب برگ شرایط مساعد برای فتوسنتز و نیز تقسیم و توسعه سلولی برگ را فراهم کرده که باعث تولید بیشتر مواد فتوسنتزی و در نتیجه افزایش رشد گیاه می‌گردد.

مالون دی آلدئید تحت تأثیر شوری و کیتوزان قرار گرفت ولی اثر متقابل شوری و کیتوزان بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد که با افزایش شوری



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر محتوای نسبی آب برگ (a) و میزان مالون دی آلدئید (b) برگ نخود. ستون‌های دارای حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۶- اثر شوری و کیتوزان بر میزان پرولین (a) و کربوهیدرات کل (b) برگ نخود. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

شوری پرولین بعنوان یک اسمولیت عمل کرده و پتانسیل اسمزی سلول را کاهش داده و یون‌های سمی را جذب می‌کند (Woodward and Bennett, 2005). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر افزایش میزان اسیدهای آمینه پرولین برای تنظیم اسمزی درون سلولی در شرایط تنش شوری در گندم (Carillo et al., 2008) و لوبیا چشم بلبلی (Patel et al., 2010) وجود دارد. در شرایط تنش تجمع کربوهیدرات‌ها سبب محافظت سلول‌های گیاه از تنش از طریق تنظیم اسمزی، نگهداری تورژسانس و همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌ها می‌شود (Bohnert et al., 1995). بنابراین کیتوزان ممکن است با افزایش میزان پرولین و

کربوهیدرات کل برگ نخود با افزایش شوری افزایش یافت (شکل ۶). در شرایط بدون تنش، تیمار با هر دو غلظت کیتوزان سبب افزایش میزان پرولین و کربوهیدرات کل نسبت به شاهد اسید استیک و آب مقطر گردید. همچنین تیمار بذرهای نخود با هر دو غلظت کیتوزان در تمامی سطوح تنش، میزان پرولین و کربوهیدرات کل را نسبت به شاهد‌ها افزایش داد (شکل ۶). افزایش تجمع پرولین در حین تنش شوری می‌تواند به دلیل تحریک سنتز آن از اسید گلوتامیک، کاهش صادرات آن از طریق آوند آبکشی، جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش باشد (Lutts et al., 1996). در شرایط تنش

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر شوری و کیتوزان بر میزان پتاسیم، سدیم، نسبت پتاسیم و سدیم ساقه و ریشه نخود

منابع تغییر	درجه آزادی	پتاسیم ساقه	پتاسیم ریشه	سدیم ساقه	سدیم ریشه	نسبت پتاسیم به سدیم ساقه	نسبت پتاسیم به سدیم ریشه
شوری	۳	۹/۸۳**	۴/۱۸**	۱/۲۵**	۰/۶۱**	۱۷/۷۸**	۵/۰۷**
کیتوزان	۳	۶/۹۴**	۱/۹۹**	۰/۵۶**	۰/۰۶ ^{NS}	۹/۱۸**	۱/۱۱**
شوری × کیتوزان	۹	۰/۳۲**	۰/۶۳ ^{NS}	۰/۰۴*	۰/۰۲ ^{NS}	۰/۰۵ ^{NS}	۰/۲۲ ^{NS}
خطای آزمایشی	۳۲	۰/۰۹۸	۰/۳۶	۰/۰۱۸	۰/۰۶۸	۰/۱۱۹	۰/۱۷۳
ضریب تغییرات		۸/۰۸	۱۳/۶۳	۸/۶۰	۱۴/۷۴	۱۲/۳۶	۱۶/۱۵

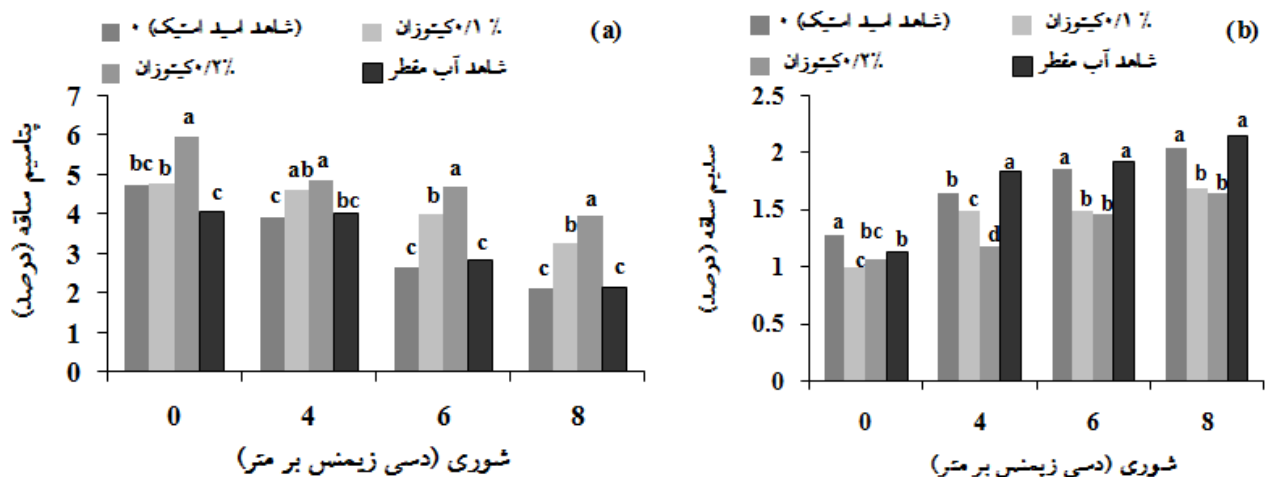
^{NS}، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

نتایج این بررسی مطابقت دارد. به نظر می‌رسد کاربرد کیتوزان در گیاهان تنش دیده با افزایش غلظت پتاسیم در ساقه سبب پاسخ مناسب این گیاهان در رویارویی با تنش شوری شده است.

تجمع یون‌های غیر آلی در واکوئل‌ها نسبت به ترکیبات آلی سنتزی یک انتخاب به صرفه برای گیاهان در شرایط شوری است که پتانسیل آب سلول را به منظور مصرف انرژی کمتر، کاهش می‌دهد (Munns and James, 2003). گزارش شده است که Na^+ اسمولیت غیر آلی اصلی در واکوئل‌ها در شرایط شوری است (Li et al., 2010). نتایج حاصل از تجزیه واریانس سدیم ساقه نشان داد که این صفت تحت تأثیر شوری، کیتوزان و اثر متقابل شوری و کیتوزان قرار گرفت (جدول ۲). سدیم ریشه تنها تحت تأثیر شوری قرار گرفت و اثر کیتوزان و اثر متقابل شوری و کیتوزان بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۲). در این تحقیق، افزایش شوری سبب افزایش غلظت سدیم ساقه و ریشه شد (شکل ۷ و جدول ۳). در شرایط بدون تنش، پیش تیمار بذرها با کیتوزان سبب کاهش میزان سدیم ساقه نسبت به شاهدها (آب مقطر و اسید استیک) گردید. همچنین در شرایط تنش شوری، تیمار کیتوزان سدیم ساقه را نسبت به شاهدها کاهش داد (شکل ۷). مصرف کیتوزان اثر معنی‌داری بر میزان سدیم ریشه نداشت (جدول ۳). تجمع یون Na^+ تغییراتی را در تعادل یونی ایجاد کرده و عدم تعادل یونی سبب کاهش یا ممانعت از رشد گیاه می‌گردد (Mer et al., 2000). به نظر می‌رسد استفاده از کیتوزان با کاهش دادن میزان سدیم در ساقه توانسته گیاه را در تحمل به تنش شوری یاری رساند.

کربوهیدرات‌های محلول در برگ‌های نخود و در نتیجه تنظیم اسمزی سلول در کاهش اثرات زیانبار تنش شوری روی این گیاه مؤثر واقع شود.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری و کیتوزان بر پتاسیم ساقه و ریشه معنی‌دار بود اما اثر متقابل شوری و کیتوزان تنها پتاسیم ساقه را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲). با افزایش شوری از غلظت پتاسیم ساقه و ریشه کاسته شد، به گونه‌ای که بیشترین درصد متعلق به تیمار بدون تنش و کمترین درصد به سطح شوری ۸ دسی زیمنس بر متر تعلق داشت (شکل ۷ و جدول ۳). غلظت پایین سدیم و بالای پتاسیم در سیتوپلاسم برای حفظ فرایندهای آنزیمی در سیتوپلاسم لازم و ضروری است (James et al., 2006). در حالی که وقتی گیاهان در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند سدیم زیادی جذب کرده و در ضمن از جذب پتاسیم جلوگیری بعمل می‌آید (Munns, 2003). کاهش پتاسیم در شرایط تنش شوری سبب خسارت به سلول هم از نظر فیزیولوژی و هم بیوشیمیایی می‌شود و می‌تواند بعنوان یکی از دلایل اصلی سمیت شوری مطرح گردد (Shabala et al., 2006). به هر حال کاربرد کیتوزان محتوی این عنصر را در اندام‌های گیاه تغییر داد. بطوریکه کاربرد کیتوزان هم در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش شوری موجب افزایش مقدار پتاسیم ساقه نسبت به شاهدها شد (شکل ۷). همچنین پیش تیمار بذرها با هر دو غلظت کیتوزان افزایش غلظت این عنصر را در ریشه به همراه داشت (جدول ۳). گزارش شده است که کاربرد کیتوزان به طور معنی‌داری میزان پتاسیم را در گیاهان افزایش می‌دهد (Dzung et al., 2011; Farouk et al., 2008)، که با



شکل ۷- اثر شوری و کیتوزان بر میزان پتاسیم (a) و سدیم ساقه (b) نخود. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۳- مقایسه‌ی میانگین اثرات اصلی تنش شوری و کیتوزان بر میزان یون‌ها در ساقه و ریشه نخود

تنش شوری (dS/m)	کیتوزان	پتاسیم ریشه (%)	سدیم ریشه (%)	پتاسیم به سدیم ساقه	پتاسیم به سدیم ریشه
۰	۰ (شاهد اسید استیک)	۴/۹۶ ^a	۱/۵۵ ^b	۴/۴۱ ^a	۳/۲۷ ^a
۴	۰/۱٪	۴/۶۶ ^{ab}	۱/۶۳ ^b	۲/۹۵ ^b	۲/۸۸ ^b
۶	۰/۲٪	۴/۳۲ ^b	۱/۸۵ ^a	۲/۲۳ ^c	۲/۳۷ ^c
۸	شاهد آب مقطر	۳/۵۹ ^c	۲/۰۵ ^a	۱/۵۸ ^d	۱/۷۷ ^d
	۰	۳/۸۷ ^c	۱/۸۲ ^a	۲/۱۱ ^c	۲/۲۴ ^b
	۰/۱٪	۴/۷۷ ^a	۱/۷۳ ^a	۳/۱۲ ^b	۲/۸۲ ^a
	۰/۲٪	۴/۶۴ ^{ab}	۱/۶۹ ^a	۳/۸۸ ^a	۲/۸۴ ^a
	شاهد آب مقطر	۴/۲۵ ^{bc}	۱/۸۲ ^a	۲/۰۶ ^c	۲/۳۹ ^b

برای هر فاکتور، میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

نسبت پتاسیم به سدیم ساقه و ریشه تحت تأثیر تنش شوری و کیتوزان قرار گرفتند ولی اثر متقابل شوری و کیتوزان بر صفا مذکور معنی‌دار نبود (جدول ۲). با افزایش شوری نسبت پتاسیم به سدیم در هر دو اندام ساقه و ریشه کاهش یافت (جدول ۳). حفظ نسبت پتاسیم به سدیم در بافت‌ها برای تنظیم اسمزی سلول، نگهداری تورگر سلولی، باز و بسته شدن روزنه‌ها، فعالیت آنزیم‌ها، سنتز پروتئین‌ها، متابولیسم اکسیدانت‌ها و فتوسنتز مهم است (Shabala et al., 2006).

نتیجه‌گیری:

تنش شوری طول و وزن خشک ساقه، طول و وزن خشک ریشه، محتوی نسبی آب برگ، میزان پتاسیم ساقه و ریشه، نسبت پتاسیم به سدیم ساقه و ریشه کاهش یافت، در حالی‌که میزان مالون دی‌آلدئید، میزان پرولین، میزان کربوهیدرات کل، میزان سدیم ساقه و ریشه افزایش یافت. در شرایط تنش شوری،

تنش شوری نسبت پتاسیم به سدیم را در اندام‌های کاهش می‌دهد. علت این کاهش افزایش تجمع سدیم در بافت‌های گیاه یا افزایش نشت پتاسیم از سلول در شرایط تنش شوری است

ناشی از تنش را جبران کند. پیشنهاد می‌شود این آزمایش در مزرعه و تا مرحله برداشت محصول اجرا گردد تا کاربرد عملی آن در حد بیشتری قابل توصیه باشد.

پیش تیمار بذر گیاهان با کیتوزان با افزایش رشد ریشه، میزان پرولین، میزان کربوهیدرات و میزان پتاسیم ساقه و کاهش میزان سدیم ساقه سبب تحمل به شوری گیاه شده است و توانسته با بهبود رشد رویشی گیاه و افزایش اسمولیت‌ها در گیاه خسارات

منابع:

- elicitors. *Egyptian Journal of Phytopathology* 1: 95-111.
- Gandour, G. (2002) Effect of salinity on development and production of chickpea genotypes. PhD Thesis. Aleppo University, Faculty of Agriculture, Aleppo, Syria.
- Górnik, K., Grzesik, M. and Romanowska-Duda, B. (2008) The Effect of chitosan on rooting of Grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16: 333-343
- Hulse, J. H. (1991) Nature, composition and utilization of grain legumes. In: *Uses of Tropical Legumes. Proceedings of a Consultants Meeting* (ed. Patencheru, A. P.) Pp. 502-524. ICRISAT Center, ICRISAT, India.
- James, R. A., Munns, R., Caemmerer, S., Trejo, C., Miller, C. and Condou, T. (2006) Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na^+ , K^+ and Cl^- barley and durum wheat. *Plant Cell and Environment* 29: 2185-2197.
- Kasukabe, Y., He, L. X., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. and Tachibana, S. (2006) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and upregulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 712-22.
- Kerepesi, I. and Galiba, G. (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* 40: 482-487.
- Kowalski, B., Jimenez Terry, F., Herrera, L. and Agramonte Peñalver, D. (2006) Application of soluble chitosan *in vitro* and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. *Potato Research* 49: 167-176.
- Li, R., Shi, F. and Fukudab, K. (2010) Interactive effects of various salt and alkali stresses on growth, organic solutes, and cation accumulation in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Environmental and Experimental Botany* 68: 66-74.
- Lianju, M., Yueying, L., Cuimei, Y., Yan, W., Xuemei, L., Na, L., Qiang, C. and Ning, B. (2011) Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. *Protoplasma* 249: 393-399.
- Luan, L. Q., Ha, V., Nagasawa, T. N., Kume, T., Yoshii, F., and Nakanishi, T. M. (2005) Biological effects of irradiated chitosan on plants *in vitro*.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, F. D. (1973) Rapid determination of free proline from water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N. and Velázquez-del Valle, M. G. (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.
- Bohnert, K. H., Nelson, D. E. and Jensen, R. G. (1995) Adaptations to environment stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Carillo, P., Mastrodonato, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotto, A. and Fuggi, A. (2008) Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology* 35: 412-426.
- Cho, M. H., No, H. K. and Prinyawiwatkul, W. (2008) Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. *Journal of Food Science* 73: 570-577.
- De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W. (1991) Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 82: 523-528.
- Delgado, M. J., Ligerio, F. and Lluch, C. (1994) Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 371-376.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annual Chemistry* 28: 350-356.
- Dzung, N. A. and Thang, N. T. (2002) Effects of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation on the growth of soybean. In: *Advances in Chitin Science* (eds. Suchiva, V. K., Chandkrachang, S., Methacanon, P. and Peter, M. G.) Pp. 463-467. Bangkok, Thailand.
- Dzung, N. A., Phuong Khanh, V. T. and Dzung, T. T. (2011) Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate Polymer* 84: 751-755.
- Farouk, S., Ghoneem, K. M. and Abeer, A. (2008) Induction and Expression of systematic resistance to downy mildew disease in cucumber plant by

- plants and calli under Na₂SO₄ stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 366–372.
- Sarathchandra, R. G. and Jaj, S. N. (2004) A chitosan formulation Alexa induce Downy Mildew disease resistance and growth promotion in *pearl millet*. *Crop Protection* 23: 881–888.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M. and Newman, I. A. (2006) Extracellular Ca₂⁺ ameliorates NaCl induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology* 141: 1653–1665.
- Singla, R. and Gary, N. (2005) Influence of salinity on growth and yield attributes in chickpea cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 231-235.
- Tyerman, S. D. and Skerrett, I. M. (1999) Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 175-235.
- Uthairatanakij, A., Teixeira da Silva, J. A. and Obsuwan, K. (2007) Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology* 1: 1-5.
- Weber, H., Chetelat, A., Reymond, P. and Farmer, E. E. (2004) Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* 37: 877-888.
- Woodward, A. J. and Bennett, I. J. (2005) The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 189–200.
- Xue, Y. S., Wen Qing, Z., Wei, X. and Qing, W. (2002) Effect of chitosan as seed coating on seed germination and seedling growth and several physiological and biochemical indexes in rapeseed. *Plant Physiology Communications* 38: 225-227.
- Biotechnology and Applied Biochemistry 41: 49- 57.
- Lutts, S. J., Kint, M. and Bouharmont, J. (1996) Effect of various salts and mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice callus cultures. *Journal of Plant Physiology* 149: 186-195.
- Mer, R. K., Prajith, P. K., Pandya, D. H. and Pandey, A. N. (2000) Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 209- 217.
- Munns, R. (2003) Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant Cell and Environment* 25: 239-250.
- Munns, R. and James, R. A. (2003) Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil* 253: 201–218.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681.
- Patel, P. R., Kajal, S. S., Patel, V. R., Patel, V. J. and Khristi, S. M. (2010) Impact of salt stress on nutrient uptake and growth of cowpea. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22: 43-48.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Haloday, A. S. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- Ruan, S. L. and Xue, Q. Z. (2002) Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronomica Sinica* 28: 803-808.
- Santos, C. V., Falcao, I. P., Pinto, G. C., Oliveira, H. and Loureiro, J. (2002) Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower