

تأثیر کیتوزان بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)

صالحه نادری^۱، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^{۲*} و براتعلی فاخری^۱

^۱گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران و ^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۸/۲۱)

چکیده:

ریحان (*Ocimum basilicum*)، گیاه دارویی از خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) است که دارای ترکیبات ترپنوئیدی و فنیل پروپانوئیدی می باشد. کیتوزان با خاصیت الیستوری مکانیسم‌های دفاعی در گیاه را تحریک می‌کند. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان پراکسیداز (POD) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و پلی فنل اکسیداز (PPO)، ترکیبات فنل کل، فلاوونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، کلروفیل a و b و کارتنوئید، کربوهیدرات و پرولین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه ریحان در مرحله پیش گلدهی با غلظت ۲ گرم در لیتر کیتوزان تیمار شد و سپس در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار کیتوزان برداشت شدند. نتایج نشان داد میزان مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در اندام هوایی و ریشه تحت تیمار کیتوزان در مراحل مختلف برداشت نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان پراکسیداز (POD) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و پلی فنل اکسیداز (PPO)، ترکیبات فنل کل، فلاوونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، کلروفیل a و b و کارتنوئید، کربوهیدرات و پرولین نیز نسبت به شاهد در اکثر موارد افزایش معنی داری نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد که کیتوزان به عنوان الیستور زیستی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پراکسید هیدروژن، ترکیبات فنلی، پرولین، ریحان و کیتوزان.

مقدمه:

پروپانوئیدی از جمله چاویکول و اوژنول و ترپن‌ها است (Javanmardi et al., 2002). در بسیاری از گیاهان استفاده از محرک‌های زیستی یکی از روش‌های افزایش عملکرد و کیفیت آنها می‌باشد (Górnik et al., 2008). کیتوزان 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-Banos et al., 2006). کیتوزان با خاصیت الیستوری

ریحان (*Ocimum basilicum*) یکی از گیاهان مهم متعلق به تیره نعناع (*Lamiaceae*)، به عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و همچنین به صورت سبزی تازه مورد استفاده است و دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی است (Lewinsohn et al., 2000; Juliani et al., 2004; Labra et al., 2002). در ایران فقط یک گونه ریحان به نام *Ocimum basilicum* وجود دارد که در نقاط مختلف ایران کاشته می‌شود (قهرمان، ۱۳۷۳). ریحان منبع ترکیبات فنیل

این رادیکال‌ها از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشاء (Beligni and Lamattina, 1999)، غیر فعال کردن آنزیم‌ها (Tian and Li, 2006)، از بین بردن رنگیزه‌ها (Loggini *et al.*, 1999) و اختلال در عملکرد DNA (Tian and Li, 2006) تنش ثانویه اکسیداتیو ایجاد می‌کنند که منجر به خسارات جدی به ساختارهای سلولی و گیاه می‌گردد. گیاهان در مقابله با تنش مکانیسم‌های حفاظتی متفاوتی را در پیش می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به تجمع اسمولیت‌هایی مثل پرولین (Delauney and Verma, 1993; Nayyar, 2003) و قندهای محلول (Morgan, 1992; Hanson and Hitz, 1980; Jones and Turner, 1982) اشاره کرد. کربوهیدرات‌ها ترکیباتی هستند که با فتوسنتز مرتبط بوده و در تنظیم اسمزی سلول، نقش مهمی ایفاء می‌کنند. برخی از گزارشات حاکی از تجزیه کربوهیدرات‌های مرکب به کربوهیدرات‌های ساده در طی بروز تنش در اکثر گیاهان زراعی است (Sanchez *et al.*, 1998). با توجه به اهمیت کربوهیدرات‌های محلول در فرآیند تنظیم اسمزی، افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول در برگ ممکن است به دلیل ساز و کار تنظیم اسمزی در گیاه باشد که خود نیاز به تحقیق بیشتری دارد. تغییرات غلظت کربوهیدرات‌ها در القای ساز و کارهای تحمل در برابر تنش؛ بسیار مهم است، زیرا این ترکیبات به طور مستقیم با واکنش‌های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتزی و تنفس در ارتباط هستند (Mckersie and Leshem, 1994). پرولین در تمام اعضای گیاه در مدت تنش وجود دارد، اگرچه تجمع در برگ‌ها سریعتر و بیشتر از نقاط دیگر صورت می‌گیرد، بیشتر فرضیه‌ها حاکی از آن است که محل تجمع پرولین در سیتوپلاسم سلول می‌باشد (Palleg and Aspinall, 1981). تجمع پرولین در شرایط تنش، بیش از سایر اسیدهای آمینه صورت می‌گیرد که می‌تواند در تنظیم اسمزی و احتمالاً حفظ فعالیت آنزیمی گیاه نقش داشته باشد (Ashraf, 2004). اسانس در ریحان به دو گروه ترپنوئیدها (مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها) و فنیل پروپانوئیدها (مانند: اوژنول، چاوبکول، متیل سینامات و غیره) تقسیم می‌شوند (Sangwan *et al.*, 2001).

مکانیسم‌های دفاعی را تحریک می‌کند و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kowalski *et al.*, 2006). یک پاسخ مهم در برابر الیستورهای زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید انواع اکسیژن واکنشگر (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH^{\bullet}) و اکسیژن یکتایی (1O_2) می‌باشد که سمی هستند (Breusegem *et al.*, 2001). ROS‌های تولید شده در سلول‌های گیاهی به وسیله سیستم‌های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شوند (Vranova and Breusegem, 2002). کنترل سطح ROS توسط سیستم‌های آنتی اکسیدانی حاصل می‌شود که شامل متابولیت‌هایی چون گلوتاتیون، آسکوربات، آلفا توکوفرول، هیدروکوئینون‌ها، بتا کاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم‌های روبندگی ROS مانند پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز می‌باشند (Vangronsveld and Clijsters, 1994). این آنزیم‌ها نقش بسیار مهمی در غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول گیاهان دارند، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می‌کند (Alscher *et al.*, 2002). در صورتیکه سمیت‌زدایی از ROS صورت نپذیرد آسیب جدی به کلروفیل‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و اسیدهای هسته‌ای وارد می‌شود (Alscher *et al.*, 2002). کیتوزان اخیراً بدلیل فعالیت‌های آنتی اکسیدانی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Guo *et al.*, 2005). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌باشد، از جمله باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌شود و همچنین به عنوان یک حاروب گر ROS عمل می‌کند (Harish Prashanth *et al.*, 2007). کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از مهمترین تولیدکنندگان گونه‌های فعال اکسیژن هستند. الکترون‌های نشت کرده از زنجیره انتقال الکترون می‌توانند با اکسیژن مولکولی حاصل از متابولیسم طبیعی گیاه، ترکیب شده و تولید ROS کنند. این گونه‌های اکسیژن سمی و بسیار واکنش پذیرند و در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل کنند (Foyer and Halliwell, 1976; Smirnov, 1993).

غلظت مورد استفاده بر اساس نتایج به دست آمده قبلی در آزمایشگاه بوده است. سپس اندام‌های هوایی گیاه در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار کیتوزان به منظور مطالعات بعدی، برداشت شدند. لازم به ذکر است که اندام‌های هوایی گیاه پس از برداشت توسط ازت مایع منجمد شده و در دمای -80°C درجه سانتی گراد تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک نگهداری شدند.

سنجش مالون دی آلدئید (MDA): برای سنجش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون غشای سلولی از روش Heath و Packer (1969) استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) میزان 200 mg از بافت گیاهی منجمد شده با 3 mL تری کلرو استیک اسید (TCA) 10% سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (12000 rpm)، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به 1 mL از نمونه‌های صاف شده، 1 mL تیو باربیتوریک اسید (TBA) 25% اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای 100°C قرار داده شدند. میزان مالون دی آلدئید (MDA) با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های 532 nm و 600 nm با استفاده از ضریب ثابت $(\epsilon = 155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1})$ محاسبه گردید.

تعیین مقدار هیدروژن پراکسید (H_2O_2): بدین منظور 200 mg بافت گیاهی منجمد شده، روی یخ با 3 mL تری کلرو استیک اسید تا مرحله همگن شدن سائیده و سپس سانتریفوژ (12000 rpm)، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به 0.5 mL از محلول روشن‌آور، 0.5 mL بافر فسفات پتاسیم (10 mM ، $\text{pH}=7$) و 1 mL یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج 390 نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل Bju1110020) قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) محاسبه گردید (Alexieva et al., 2001).

اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان: جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، 0.2 گرم از بافت سبز برگ برداشت و با 4 cc بافر پتاسیم فسفات 100 میلی‌مولار ($\text{pH}=7$) و محلول 0.1 mM EDTA در هاون سرد کاملاً ساییده، به صورت همگن در آورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که اسانس گیاه ریحان از ترکیبات خاص فنلی تشکیل شده است که در دوره رویشی تولید می‌شوند (Biaovati et al., 2005). نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آنهاست که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند (Javanmardi et al., 2002). مطالعات اخیر نشان داده است کیتوزان باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی می‌شود (اسمعیل زاده و همکاران، ۱۳۹۱). کیتوزان باعث افزایش محتوی کلروفیل‌ها و فتوستتر و کلروپلاست می‌شود (Dzung and Thang, 2004). در این تحقیق با توجه به خاصیت دارویی گیاه ریحان، اثر الیستوری کیتوزان در تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فلاونویدی مختلف بررسی شد. همچنین به منظور درک مکانیسم عمل کیتوزان، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله پراکسیداز (POD)، گاباکول پراکسیداز (GPX) و پلی فنل اکسیداز (PPO)، میزان کربوهیدرات، پرولین، مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها:

کشت و آماده‌سازی ریحان: برای انجام این پژوهش بذره‌های کولتیوار ریحان سبز از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و در پائیز ماه در گلدان‌ها در خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاجاک و کود حیوانی کشت شد. پس از کشت، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه 25 تا 30 و شبانه 18 تا 20 درجه سانتی‌گراد تا انتهای مرحله گلدهی رشد کردند. گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و هفته ای ۲ بار به آنها مقدار 50 میلی لیتر محلول غذایی هوگلند داده شد.

تیمار با کیتوزان: برای تهیه محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، با وزن مولکولی پایین، از روش Khan و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد. اعمال محلول کیتوزان در مرحله پیش‌گلدهی با غلظت 2 گرم در لیتر به صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ و در طی یک مرحله انجام شد.

استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۳ گرم برگ تر گیاه وزن و سپس به تدریج با استون ۸۰ درصد سائیده شد. عمل استخراج تا حصول یک محلول سبز رنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استون به ۲۵ ml رسید. پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، جذب نوری در طول موج‌های ۶۵۲، ۶۴۵، ۶۶۳ نانومتر بوسیله اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد در نهایت مقدار کلروفیل برحسب میلی‌گرم در گرم بافت‌تر برگ از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$a \text{ کلروفیل} = (A_{663} - (A_{645} \times 0.127)) \times 0.127$$

$$b \text{ کلروفیل} = (A_{663} - (A_{645} \times 0.229)) \times 0.229$$

اندازه‌گیری فلاونوئیدها: برای سنجش این پارامتر از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم وزن تر برگ را برداشته و در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی خوب سائیده و سپس عصاره سانتریفیوژ گردید و محلول بالایی به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی در حمام آبگرم با دمای ۸۰ درجه حرارت داده شد و سپس میزان جذب آن توسط اسپکتروفوتومتری در سه طول موج ۳۰۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ نانومتر قرائت گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها: برای اندازه‌گیری آنتوسیانین از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم وزن تر برگ را در ۱۰ ml محلول متانول اسیدی خوب سائیده و عصاره حاصل سانتریفیوژ و محلول رویی به مدت ۱ شب در تاریکی قرار داده شد. جذب این ماده در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر و ضریب خاموشی ($\epsilon = 3300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات‌های محلول: میزان کربوهیدرات‌های محلول به روش Schlegel (۱۹۵۶) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ به همراه ۱۰ ml اتانول ۹۵ درصد در لوله آزمایش در بسته قرار گرفته، به مدت یک ساعت در حمام بن‌ماری و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. پس از سرد شدن ۱ میلی‌لیتر از این نمونه‌ها برداشته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۰/۵ درصد و ۵ ml اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. در نهایت میزان نور جذبی در ۴۸۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، میزان کربوهیدرات‌های استخراجی بر

۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همه این عملیات‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) با استفاده از روش Fielding و Hall (۱۹۷۸) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ mM با اسیدیتیه ۶/۸، گایاکول ۲۰ mM، آب اکسیژنه ۴۰ mM و ۱۰ μl عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Bju1110020) اندازه‌گیری شد. آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) بر اساس روش Rymond و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. غلظت نهایی مواد در حجم ۳ ml بود که شامل بافر تریس ۰/۲ mM و پیروگالول ۰/۰۲ M و ۱۰۰ μl عصاره آنزیمی بود، فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Bju1110020) اندازه‌گیری شد. آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با روش Urbanek و همکاران (۱۹۹۱) سنجیده شد. محیط واکنش آنزیم شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM و اسیدیتیه ۷، ۰/۱ μM EDTA و پراکسید هیدروژن ۱۵ mM و گایاکول ۵ mM بود. واکنش با افزودن ۵۰ μl عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ ml مخلوط آغاز گردید. افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر ثبت گردید.

تعیین میزان فنل کل: میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین - سیو کالتیو (Marinova et al., 2005) با کمی تغییرات و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۱ گرم از اندام گیاهی را در ۵ ml اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ ml محلول رویی ۱ ml اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ ml رسانده شد. سپس ۰/۵ ml معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ ml کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و این عصاره برای سنجش فنل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b و کارتنوئید از روش Lichtenthder (۱۹۸۷)

بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) یک روز پس از اعمال کیتوزان افزایش یافت و در زمان‌های بعدی پس از برداشت نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نداشت. (شکل ۲a).

بررسی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در یک روز پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد و در روزهای بعدی فعالیت آنزیم کاهش یافت ولی همچنان نسبت به نمونه‌های شاهد بیشتر بود (شکل ۲b). نتایج حاصل از میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی داری در میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) گردید به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در یک روز پس از اعمال کیتوزان بود ولی در روزهای سوم و پنجم تفاوت معنی داری با شاهد نشان نداد (شکل ۲c).

تأثیر کیتوزان بر میزان فنل کل و فلاونوئید کل اندام هوایی: تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان تأثیر معنی داری بر میزان فنل کل و فلاونوئید کل اندام هوایی داشت (جدول ۱). نتایج حاصل از تأثیر کیتوزان بر میزان فنل کل اندام هوایی نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی در روز دوم بعد از اعمال تیمار کیتوزان حاصل شده است و کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی دار میزان ترکیبات فنلی گردید. همچنین در این زمان باعث افزایش معنی داری نسبت به زمان های اول، سوم و پنجم شد (شکل ۳a). کیتوزان در زمانهای مختلف بعد از تیمار باعث افزایش معنی دار میزان فلاونوئید نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان فلاونوئید یک روز پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد (شکل ۳b).

تأثیر کیتوزان بر میزان کلروفیل a: نتایج واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان تأثیر معنی داری بر میزان رنگیزه ها داشت (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان کلروفیل a اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد میزان کلروفیل a در

اساس میکروگرم گلوکز در گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از اندام هوایی و ریشه توسط ۱۰ ml میلی لیتر اسید سولفوریک ۳ درصد در هاون چینی کاملاً ساییده و در نهایت با کاغذ صافی صاف گردید. به ۲ ml از محلول حاصل، ۲ ml معرف ناین هیدرین اضافه و پس از قرارگیری در حمام آب جوش به مدت یک ساعت، لوله‌های محتوی محلول حاصل در یخ قرار گرفت تا سرد شدند. بعد از این مرحله، ۴ ml تولوئن اضافه گردید. از فاز رویی برای اندازه‌گیری میزان پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو سطح کیتوزان (صفر و ۲ گرم در لیتر) و زمان‌های مختلف (۱، ۲، ۳ و ۵ روز) با ۳ تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج:

تأثیر کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اندام هوایی: نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که تیمار کیتوزان تأثیر معنی داری بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) داشت (جدول ۱).

بیشترین میزان MDA در روزهای دوم و سوم پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش نشان داد (شکل ۱a). میزان H_2O_2 در روز اول بعد از تیمار کیتوزان به طور معنی داری افزایش یافت ولی در روزهای بعد تفاوت معنی داری با نمونه‌های شاهد مشاهده نشد (شکل ۱b).

تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان اندام هوایی: تجزیه واریانس نشان داد که کیتوزان تأثیر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان داشت (جدول ۱).

جدول ۱- نمونه ولزاسه تقیر کتوزان بر میزان ملون دی آلدئید، پراکسیدروژن، آنزیمهای آنتی اکسیدان و میزان فنل کل و فلاونوئید.

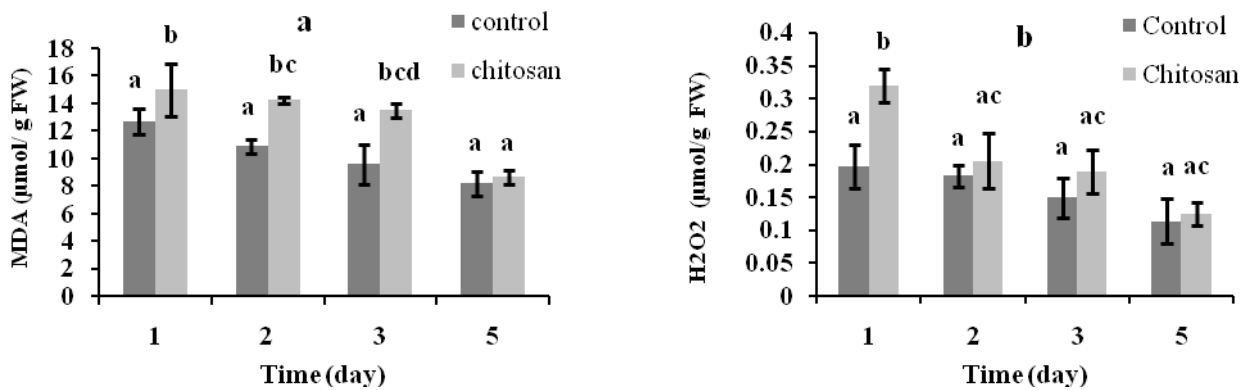
میانگین مربعات										
منبع تقیر	درجه آزادی	ملون دی آلدئید (µm/g) (FW)	میدروژن (µm/g) (FW)	پراکسید (µm/g) (FW)	پراکسیداز (min/mg) (Protein)	پراکسیداز (min/mg) (Protein)	گایاکول (min/mg) (Protein)	آنتوسیانین (mg/g) (FW)	کربوهیدرات (mg/g) (FW)	پروتئین (µmol/g FW)
زمان	۳	۳۷/۰۵**	۳۷/۰۵**	۰/۱۱۳۳**	۵۷۳۳۱۹/۸۹**	۸۴۹۵۸/۹۶**	۵۷۳۳۱/۷۵**	۴۰/۸۸**	۳۰/۸۸**	۰/۰۰۵۵ NS
کتوزان	۱	۳۸/۴۷**	۰/۸۳۷**	۱۵۹۳۷/۴۲**	۵۰۸۵۶/۱۷**	۵۴۸۹۴/۴۲**	۴/۳۸**	۴/۳۸**	۰/۰۰۲۲**	۰/۰۰۲۲**
زمان X کتوزان	۳	۳/۳۷ NS	۰/۰۵۸**	۹۴۸۰۴/۷۹**	۴۷۳۰/۲۸ NS	۲۳۷۶۹/۱۹**	۴/۷۰**	۴/۷۰**	۰/۰۰۱۰ NS	۰/۰۰۱۰ NS
مطلبا	۱۶	۷/۰۴۴	۰/۰۰۰۴	۶۹۳۱/۷۰	۱۷۳۹/۶۱	۲۹۷/۹۲	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹
ضریب تغییرات	۸۷	۵/۶	۱۶/۸	۱۲/۰	۱۲/۲	۵/۶	۲/۱	۲/۱	۵/۴	۵/۴

* و ** به ترتیب معنی دارد سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و NS غیر معنی دارد.

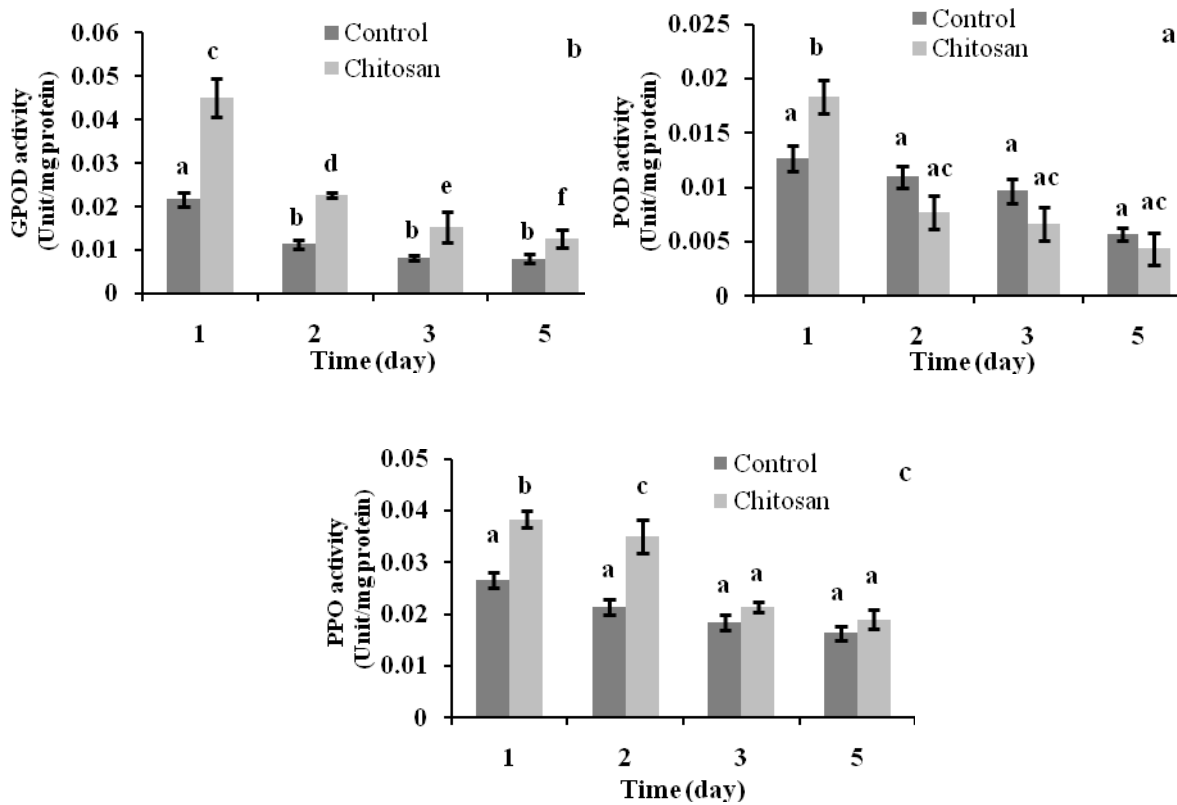
جدول ۲- نمونه ولزاسه تقیر کتوزان بر میزان رنگدانهها و کربوهیدرات و پروتئین.

میانگین مربعات									
منبع تقیر	درجه آزادی	کلروفیل a (mg/g) (FW)	کلروفیل b (mg/g) (FW)	کاروتنوئید (mg/g) (FW)	آنتوسیانین (mg/g) (FW)	کربوهیدرات (mg/g) (FW)	پروتئین (µmol/g FW)	منابع تقیر	ضریب تغییرات
زمان	۳	۰/۰۰۱۵*	۰/۰۰۳**	۱/۶۲*	۴۰۷۸۶/۱۷**	۲۷/۱۱**	۰/۰۷**	زمان	۳
کتوزان	۱	۰/۰۰۴۹**	۰/۰۰۴**	۷/۴۴**	۱۰۹۲۶/۵۱ NS	۱۳/۳۰**	۰/۰۰۴**	کتوزان	۱
زمان X کتوزان	۳	۰/۰۰۰۶*	۰/۰۰۱/۸**	۱۹/۰۹**	۶۰۰۷۳۳/۶۴**	۱/۸۵**	۰/۰۰۴**	زمان X کتوزان	۳
مطلبا	۱۶	۰/۰۰۱۴	۷/۱۲	۰/۰۳۱	۶۳۹۱/۰۵	۰/۱۰	۰/۰۰۸	مطلبا	۱۶
ضریب تغییرات	۱۰۶	۱۲/۰	۶/۸	۴/۰	۴/۰	۴/۳	۵/۷	ضریب تغییرات	۱۰۶

* و ** به ترتیب معنی دارد سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و NS غیر معنی دارد.



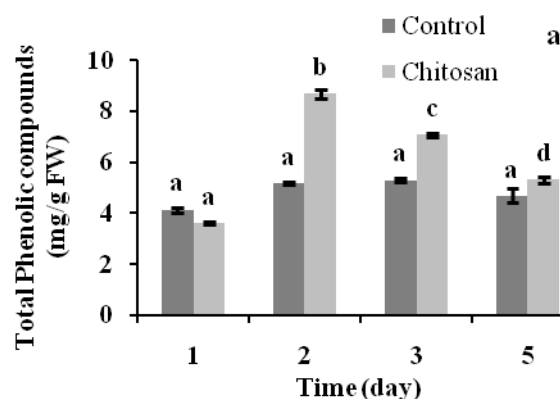
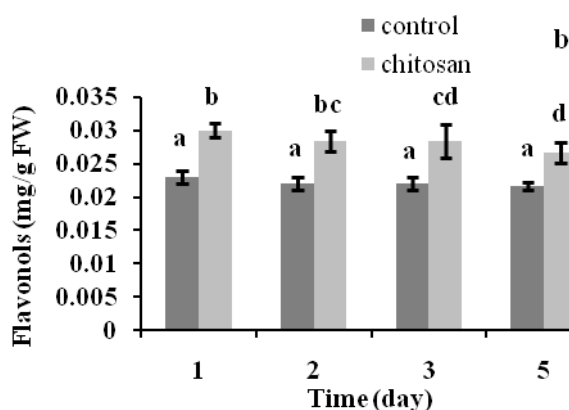
شکل ۱- میزان مالون دی آلدئید (a) و پراکسید هیدروژن (b) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان در گیاه ریحان. تیمار کیتوزان در مرحله پیش‌گلدھی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین \pm SD تکرار ۳ است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (a)، آنزیم گایاگول پراکسیداز (b) و آنزیم پلی فنل اکسیداز (c) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان در گیاه ریحان. تیمار کیتوزان در مرحله پیش‌گلدھی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین \pm SD تکرار ۳ است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.

نمونه‌های شاهد کمتر بوده ولی در روز سوم و پنجم بعد از تیمار نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (جدول ۳). مقایسه میانگین میزان کاروتنوئید اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که میزان کاروتنوئید در روز اول و دوم

روز اول و دوم پس از اعمال کیتوزان نسبت به نمونه‌های شاهد تغییری نشان نداد ولی در روز سوم تا پنجم پس از اعمال کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۳). میزان کلروفیل b در روزهای اول و دوم بعد از تیمار نسبت به



شکل ۳- میزان فنل کل (a) و میزان فلاونوئید (b) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان در گیاه ریحان. تیمار کیتوزان در مرحله پیش‌گلدھی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر زمان و کیتوزان بر میزان رنگیزه‌ها و کربوهیدرات و پرولین.

پرولین ($\mu\text{mol/g FW}$)	کربوهیدرات (mg/g FW)	آنتوسیانین (mg/g FW)	کاروتنوئید (mg/g FW)	کلروفیل b (mg/g FW)	کلروفیل a (mg/g FW)	تیمار (g/Lit)	زمان (روز)
۶/۰۹ ^d	۰/۸۸ ^a	۱۵۱۴/۴۹ ^d	۶/۵۵ ^d	۱۹/۰۱ ^c	۰/۰۵ ^c	کیتوزان	۱
۵/۵۱ ^d	۰/۶۹ ^b	۱۸۶۹/۳۴ ^c	۶/۴۲ ^d	۲۶/۵۳ ^{ab}	۰/۰۸ ^c	شاهد	
۷/۱۳ ^c	۰/۵۷ ^c	۱۵۵۰/۰۰ ^d	۷/۵۳ ^c	۱۸/۳۱ ^c	۰/۰۶ ^c	کیتوزان	۲
۶/۰۹ ^d	۰/۳۹ ^c	۲۱۳۷/۲۰ ^a	۷/۹۴ ^{cd}	۲۴/۸۷ ^{ab}	۰/۰۹ ^c	شاهد	
۸/۳۹ ^b	۰/۴۸ ^f	۱۹۴۵/۷۸ ^{bc}	۹/۹۷ ^b	۲۲/۴۸ ^{bc}	۰/۱۴ ^b	کیتوزان	۳
۷/۰۵ ^c	۰/۲۹ ^d	۱۶۳۳/۲۷ ^d	۶/۸۶ ^d	۱۹/۶۱ ^c	۰/۰۷ ^c	شاهد	
۱۱/۷۱ ^a	۰/۳۸ ^g	۲۰۶۸/۲۵ ^{ab}	۱۰/۱۵ ^b	۲۷/۸۸ ^a	۰/۱۷ ^a	کیتوزان	۴
۸/۷۲ ^b	۰/۲۲ ^e	۱۲۶۸/۰۱ ^e	۷/۰۴ ^{cd}	۱۸/۰۶ ^c	۰/۰۶ ^c	شاهد	

در هرستون برای هر تیمار، حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

(جدول ۲). مقایسه میانگین نتایج بررسی میزان کربوهیدرات اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد بیشترین میزان کربوهیدرات در روزهای سوم و پنجم پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد ولی در روزهای اول و دوم تفاوت معنی‌داری بین تیمار کیتوزان و شاهد مشاهده نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین نتایج حاصل از تأثیر کیتوزان بر میزان پرولین اندام هوایی نشان داد بیشترین میزان پرولین در روز اول و دوم پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد و در روزهای سوم و پنجم میزان پرولین کاهش یافت ولی همچنان نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۳).

بعد از تیمار نسبت به نمونه‌های شاهد تغییری نشان نداد ولی در روزهای سوم و پنجم بعد از تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳). کیتوزان به طور معنی‌داری در روزهای سوم و پنجم بعد از تیمار باعث افزایش میزان آنتوسیانین نسبت به نمونه‌های شاهد گردید ولی در روزهای اول و دوم میزان آنتوسیانین نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش نشان داد (جدول ۳).

تأثیر کیتوزان بر میزان کربوهیدرات و پرولین اندام هوایی:

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان معنی‌داری بر میزان کربوهیدرات و پرولین اندام هوایی دارد

(Kim and Thomas, 2007; Yen *et al.*, 2008). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان توسط چندین مکانیسم توصیف شده است (Muzzarelli and Terbojerich, 1997; Park and Kim, 2004). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های آزاد OH و O_2^- را از بین ببرد و گفته شده است خاصیت محافظت از DNA را دارد (Harish Prashanth *et al.*, 2007). طبق تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات فنلی در گوجه‌فرنگی شده است (Liu *et al.*, 2007). همچنین طبق بررسی‌های صورت گرفته فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در ریشه بادمجان تحت تیمار با الیستور کیتوزان افزایش یافته است (Mandal, 2010). کیتوزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را در دو گونه ذرت افزایش داده است (Guan *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داد میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز تحت تأثیر تیمار کیتوزان در گیاهچه‌های گلرنگ افزایش یافت (Mahdavi *et al.*, 2012). نتایج تحقیق حاضر نشان داد همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین میزان فعالیت هر سه آنزیم در طی تیمار با کیتوزان وجود دارند (جدول ۴)، این امر بیان می‌کند در گیاه ریحان تحت تیمار با کیتوزان همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز توانست ROS را حذف کند و باعث بالانس هموستاتیک بین تولید و حذف ROS گردد و مقدار رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد، در واقع هر سه آنزیم آنتی اکسیدان با هم فعال شده و سبب کاهش اثرات سوء تنش اکسیداتیو می‌شوند. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان آزاد می‌سازند که نقش دفاعی مهمی دارند (Bais *et al.*, 2004). ترکیبات فنلی مهارکننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند (Kovacik *et al.*, 2009). کیتوزان باعث افزایش ترکیبات فنلی در کتان سفید (*Linum album*) گردید (اسمعیل‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱). در این تحقیق نیز تحت تأثیر کیتوزان میزان ترکیبات فنل کل نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین میزان رنگیزه‌های کلروفیلی و

ضرایب همبستگی بین صفات: جدول ۴ ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از داده‌های این تحقیق نشان داد، همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین میزان فعالیت هر سه آنزیم وجود دارد. در این آزمایش همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین پرولین با کربوهیدرات بدست آمد.

بحث:

مطالعات اندکی در مورد اثر الیستورهای زیستی بر سیستم دفاعی گیاه از جمله میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و متابولیت‌های ثانویه گیاهی صورت گرفته است. تحقیق حاضر نخستین گزارش تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، فنل کل، لیپید پراکسیداسیون غشاء، پراکسید هیدروژن، محتوای کلروفیلی و قندهای محلول و پرولین گیاه ریحان است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کتین و کیتوزان، باعث تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kang *et al.*, 2004; Pu *et al.*, 2009). در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند اما گیاهان مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند (Iturbe-ormaetxe *et al.*, 1998). تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. حضور این گونه‌های فعال برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مثل غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Laspina *et al.*, 2005). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول‌ترین و قابل قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء است (Shulaev and Oliver, 2006). بر اساس نظر مکرسو و لیشم (۱۹۹۴) آنزیم‌های آنتی اکسیدان در پراکسیزوم، سیتوزول و میتوکندری وجود دارند و سبب تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد

جدول ۴- ضریب همبستگی ساده میان صفات مهم در ارزیابی

صفات	تاریخ برداشت	پراکسید	پراکسید	پراکسید	گیاکول	پلیفنل	کل فنل	کلرولین	کلرولین	کلرولین	کلرولین	کلرولین	کلرولین
پراکسید	۰/۷۷***												
پراکسید	۰/۷۵***	۰/۵۹***											
گیاکول	۰/۷۷***	۰/۷۷***	۰/۸۱***										
پلی فنل	۰/۸۵***	۰/۹۲***	۰/۸۱***	۰/۷۹***									
کل فنل	۰/۹۵***	۰/۸۴***	۰/۷۸***	۰/۷۴***	۰/۵۰*								
کلرولین a	۰/۶۹***	۰/۹۰***	۰/۳۱***	۰/۵۶***	۰/۷۳***	۰/۷۴***	۰/۷۴***						
کلرولین b	۰/۱۷***	۰/۴۴*	۰/۳۳***	۰/۰۵*	۰/۳۹***	۰/۴۳*	۰/۳۳***	۰/۱۰*					
آنتوسیانین	۰/۰۰۶***	۰/۰۹***	۰/۱۱***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***	۰/۰۰۶***
کلرولین	۰/۴۸*	۰/۳۱***	۰/۶۸***	۰/۵۷***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***	۰/۶۳***

جدول ۴- ضریب همبستگی ساده میان صفات مهم در ارزیابی

کربوهیدرات بدست آمد (جدول ۴) که نشان دهنده استفاده از هر دو نوع این ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی در گیاه ریحان است.

نتیجه‌گیری کلی:

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد، کیتوزان به عنوان الیستور زیستی کارآمد می‌تواند از طریق القای سیستم دفاعی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بعد از یک روز از اعمال تیمار باعث افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی در گیاه ریحان شود.

کارتونوئید تحت تأثیر کیتوزان افزایش نشان داد. در مطالعات انجام شده کیتوزان منجر به افزایش مقدار کلروفیل در سویا و بادام‌زمینی شده‌است (Dzung and Thang, 2004). همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد کاربرد کیتوزان باعث افزایش میزان کلروفیل‌ها و کارتونوئید در قهوه می‌شود (Dzung et al., 2011). قندهای محلول از دیگر اسمولیت‌های مهمی هستند که افزایش آن در پاسخ به تنش گزارش شده‌است (Jones and Turner, 1980). در این تحقیق، همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین پرولین با

منابع:

- اسمعیل‌زاده، ص. شریفی، م. صفایی، ن. و بهمنش، مهرداد. ۱۳۹۱. افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و فنیل پروپانوییدی تحت تأثیر کتین و کیتوزان در کشت سلول کتان سفید. مجله زیست‌شناسی گیاهی ۱۱: ۲۶-۱۳.
- قهرمان، ا. (۱۳۷۳) کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)، جلد ۳.
- Alexieva, V. Sergiev, I. Mapelli, S. Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment* 24: 1337-1344.
- Alscher, R. G. Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Ashraf, M. (2004) Some important physiological criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199: 361-376.
- Bais, H. P. Park, S. W. Weir, T. L. Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9: 26-32.
- Bautista-Baños, S., Hernandez-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.
- Bates, L. S. Waldren, S. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L. (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 208, 337-344.
- Biavati, B. Piccaglia, R. and Marotti, M. (2005) Antimicrobial activity of plant essential oils. *Journal of Food Chemistry* 92: 128-137.
- Breusegem, F. V. James, F. Dat, D. and Inze, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161:423-431.
- Cheng, X. Zhou, U. and Cui, X. (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche edeserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology* 121: 253-260.
- Delauney, A. J. and Verma, D. P. S (1993) Proline biosynthesis and degradation in plants. *Journal of Plant Physiology* 4: 215-223.
- Dzung, N. A. Thang, N. T. (2004) Effect of oligoglucosamine on the growth and development of peanut (*Arachis hypogea* L.). In: (Eds. Khor, E., Hutmacher, D. and Yong, L.), *Proceedings of the 6th Asia-Pacific on chitin, chitosan symposium Singapore*, ISBN: 981-05r-r0904-9.
- Dzunga, N. Phuong Khanh, V. and Dzung, T. (2011) Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate Polymers* 84: 751-755.
- Fielding, J. L. Hall, J. (1978) A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in root of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* 29:981-989.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- 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.
- Guan, Y.J. J. Hu, X. Wang, J. and Shao, C. X. (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal Zhejiang University Science B*: 427-433.

- Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science 167: 725-731.
- Laspina, N. V. Groppa, M. D. Tomaro, M. L. Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science 169: 323-330.
- Lichtenthder, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio membranes, Methods in Enzymologist 147: 350-382.
- Liu, J. Tian, S. Meng, X. Xu, Y. (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 44: 300-306.
- Loggini, B. Scartazza, A. brugnol, E. and Navari-Lzzo, F. (1999) Antioxidativ defense system, Pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Journal of Plant Physiology 119: 1091-1099.
- Mahdavi, B. Modarres Sanavy, S. A. M. Aghaalikhani, M. and Sharifi, M. (2011) Effect of water stress and chitosan on germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Crop Improvement 25:728-741.
- Mandal, S. (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. Journal of Biotechnology 9:8038-8047.
- Marinova, D., Ribarov, F. and Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bolgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 40:255-260.
- Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidase in plants and fungi: going place? A review. Journal of Phytochemistry 67: 2318-2331.
- Mc kersie, D. B. and Leshem, Y. (1994) Stress and Coping in Cultivated Plants. Kluwer Acad. Pub., London.
- Morgan, J. M. (1992) Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. Journal of Plant Physiology 19: 67-76.
- Muzzarelli, R. A. A. Muzzarelli, C. M. and Terbojerich, M.(1997) Chitin chemistry, upgrading a renewable source. Carbohydrates in Europe 19:10-17.
- Nakano, Y. and Asada, K.(1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidaes in spinach. Cell Environment. 16: 15-24.
- Nayyar, H. (2003) Acclimation of osmolytes and osmotic adjustmant in water-stressed wheat and maiz as affected by calcium and its antagonists. Journal of Experimental Botany 50: 253-264.
- Palleg, L. G. and Aspinall, D. (1981) The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press. London.
- Park, P. J. Je, J. Y. and Kim. S. K. (2004) Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer.Carbohydrat 55:17-22.
- Guo, Z. Y. Xing, R. E. Liu, S. Yu, H. H. Wang, P. B. Li, C. P. and Li. P. C. (2005) The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 15:4600-4603.
- Hanson, A. D. and Hitz, W. D. (1982) Metabolic responses of plant water deficit. Journal of Plant Physiology 23: 163-203.
- Harish Prashanth, K.V. S.M. Dharmesh, K.S. Jagannatha, R. and Tharanathan, R. N.(2007) Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrat 342:190-195
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast, Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Journal of Biochemicry Biophysical 125: 189-198.
- Iturbe-ormaetxe, I. Escuredo, P. R. Arrese-Igor, C. and Becana, M. (1998) Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat. Journal of Plant Physiology 116: 173-181.
- Javanmardi, J. Khalighi, A. Kashi, A. Bais, H. P. and Vivanco, J. M. (2002) Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 5878-5883.
- Kang, S. M. Jung, H. Y. Kang, Y. M. Yun, D. J. Bahk, J. D. Yang, J. K. and Choi, M. S. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166: 745-751.
- Khan, W. Prithiviraj, B. and Smith, D. L. (2003) Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyaseand tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. Journal of Plant Physiology 160: 859-63.
- Kim, K. W. and Thomas, R. L. (2007) Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. Journal of Food Chemistry 101:308-313.
- Kovacik, J. Backor, M. Strnad, M. and Repcak, M. (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report 28: 135-143.
- 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.
- Krizek, D. T. Kramer, G. F. Upadhyaya, A. and Mirecki, R. M. (1993) UV-B Response of cucumber seedling grown under metal halid and high pressure sodium/deluxe lamps. Journal of Plant Physiology 88: 350-358.
- Labra, M. Miele, M. Ledda, B. Grassi, F. Mazzei, M. and Sala, F. (2004) Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of

- Smirnov, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Tian, X. and Li, Y. (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Journal of Biology Plant* 50: 775-778.
- Urbanek, H. Kuzniak-Gebarowska, E. and Herka, K. (1991) Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polyglacturonase. *Journal of Physiogr Plant* 13: 43-50.
- Vangronsveld, J. and Clijsters, H. (1994) Toxic effects of metals. In: *Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity.* (Ed Farago, M. E.) Pp. 149-177. Published Online: 21 JAN 2008.
- Vranova, E. Inze, D. and Breusegem, V. F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236.
- Xu, Q. J., Nian, Y. G., Jin, X. C., Yan, C. Z., Liu, J. and Jiang, G.M. (2007) Effects of chitosan on growth of an aquatic plant (*Hydrilla verticillata*) in polluted waters with different chemical oxygen demands. *Journal of Environmental Sciences* 19:217-221.
- Yen, M. T. Yang, J. H. and Mau. J. L. (2008) Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrat* 74:840-844.
- Pu, G. B. Dong-Ming, M. Chen, J. L. Ma, L. Q. Wang, H. and Li, G. F. (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia*. *Plant Cell Report* 28: 1127-1135.
- Raymond, M. Poulin, E. Boirox, V. Dupont, E. and Pasteur, N. (1993) Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Cluex pipiens*. *Heredity*70: 301-307.
- Sanchez, F. J. Manzanares, M. Andres, E. F. Tenorio J. L. Ayerbe, L. Andres, E. F. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugare and prolin accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crop Research* 59: 225-235.
- Sangwan, N. S. Farooqi, A. H. A. Shabih, F. and Sangwan, R. S. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.
- Schlegel, H. G. (1956) Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. *Planta* 47: 510.
- Shulaev, V. and Oliver, D. J. (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Journal of Plant Physiology* 141: 367-372.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. R. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungestic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.