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

صالحه نادری[1]، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی[*2] و براتعلی فاخری[1]

[1]گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران و [2]گروه 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 نعناعیان (*Lamiaceae*) است که دارای ترکیبات ترپنوئیدی و فنیل پروپانوئیدی می باشد. کیتوزان با خاصیت الیسیتوری 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، b و کارتنوئید، کربوهیدرات و پرولین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه ریحان در مرحله پیش‌گلدهی 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، b و کارتنوئید، کربوهیدرات و پرولین نیز نسبت به شاهد در اکثر موارد افزایش معنی‌داری نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد که کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش تولید متابولیت های ثانویه می‌شود.

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

مقدمه:

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.*, 2002; Labra *et al.*, 2004). 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 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 الیسیتوری

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

مکانیسم‌های دفاعی را تحریک می‌کند و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kowalski *et al*., 2006). یک پاسخ مهم در برابر الیسیتورهای زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید انواع اکسیژن واکنشگر (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید (O_2^{0-})، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH^0) 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 آنتی‌اکسیدانی حاصل می شود که شامل متابولیت‌هایی چون گلوتاتیون، آسکوربات، آلفاتوکوفرول، هیدروکوئینون‌ها، بتا کاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم های 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 آنتی‌اکسیدانی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌است (Guo *et al*., 2005). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان از طریق مکانیسم های 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 متابولسیم طبیعی گیاه، ترکیب شده و تولید ROS کنند. این گونه‌های اکسیژن سمی و بسیار واکنش‌پذیرند و در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل کنند (Foyer and Halliwell, 1976;Smirnoff, 1993). 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, 1982;Jones and Turner, 1980) 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 کربوهیدرات ها 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 درتنظیم اسمزی و احتمالاً حفظ فعالیت آنزیمی گیاه نقش داشته باشد (Ashraf, 2004). اسانس در ریحان به دو گروه ترپنوئیدها (مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها) و فنیل‌پروپانوئیدها (مانند: اوژنول، چاویکول، متیل سینامات و غیره) تقسیم می‌شوند (Sangwan *et al*., 2001).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد کـه اسـانس گیـاه ریحـان از ترکیبات خاص فنلی تشکیل شده‌است که در دوره رویشی تولیـد می‌شوند (Biavati *et al.*, 2005). نقش ترکیبات فنلی مربـوط بـه خواص اکسیداسیون احیاء آنهاست که نقش مهمـی در جـذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعـال و یـا پراکسیدازهای تجزیه کننـده دارنـد (Javanmardi *et al.*, 2002). مطالعات اخیر نشان داده‌است کیتـوزان باعـث افـزایش میـزان ترکیبـات فنلـی مـی‌شـود (اسـمعیل‌زاده و همکـاران، ۱۳۹۱). کیتـوزان باعـث افـزایش محتـوی کلروفیـل‌هـا و فتوسـنتز و کلروپلاسـت مـی‌شـود (Dzung and Thang, 2004). در ایـن تحقیق با توجه به خاصیت دارویی گیاه ریحان، اثر الیسـیتوری کیتوزان در تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه از جملـه ترکیبـات فلاونوییدی محتلـف بررسـی شـد. همچنـین بـه منظـور درک مکانیسم عمل کیتوزان، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسـیدان از جمله‌پراکسیداز (POD)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و پلی فنـل اکسیداز (PPO)، میزان کربوهیدرات، پـرولین، مـالون دی آلدئیـد (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مطالعه گردید.

مواد و روش–ها:

کشت و آماده‌سازی ریحان: برای انجام این پژوهش بذرهای 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، گیاخاک و کود حیوانی کشت شد. پس از کشت، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا انتهای مرحله گلدهی رشد کردند. گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و هفته ای ۲ بار به آنها مقدار ۵۰ 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 ۲ گرم در لیتر به صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ و در طی یک مرحله انجام شد. 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 ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان اندازه گیری شاخص های 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 اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA) میزان ۲۰۰mg از بافت گیاهی منجمد شده با ۳mLتری کلرو استیک اسید(TCA) ۱۰٪ سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۱mL از نمونه‌های صاف شده، ۱mL تیو باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۲۵٪ اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار داده شدند. میزان مالون دی آلدئید (MDA) بااندازه گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲nm و ۶۰۰nm با استفاده از ضریب ثابت (ε =۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه گردید.

تعیین مقدار هیدروژن پراکسید (H_2O_2): بدین منظور ۲۰۰mg بافت گیاهی منجمد شده، روی یخ با۳mL تری کلرو استیک اسید تا مرحله همگن شدن سائیده و سپس سانتریفوژ (۱۲۰۰۰rpm ، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۰/۵mL از محلول روشناور، ۰/۵ mL بافر فسفات پتاسیم (۱۰mM، PH=۷) و ۱mL یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (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، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ٤cc بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و محلول EDTA ۰/۱mM در هاون سرد کاملاً ساییده، به صورت همگن در آورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

۱۵ دقیقه با دور ۱٦۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همه این عملیات‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) با استفاده از روش Fielding و Hall (1978) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفاتmM ۲۵ با اسیدیته ٦/۸، گایاکولmM ۲۰ ، آب اکسیژنهmM٤۰ و ۱۰µl عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب در طول موج ٤۷۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) اندازه‌گیری شد. آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) بر اساس روش Rymond و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. غلظت نهایی مواد در حجم ml ۳ بود که شامل بافر تریسmM ۰/۲ و پیروگالول M۰/۰۲ وµl۱۰۰ عصاره آنزیمی بود، فعالیت آنزیمی در طول موج ٤۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) اندازه-گیری شد. آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با روش Urbanek و همکاران (۱۹۹۱) سنجیده شد. محیط واکنش آنزیم شامل بافر فسفات پتاسیمmM ۱۰۰ و اسیدیته ۷، µM ۰/۱ EDTA و پراکسید هیدروژنmM ۱۵ و گایاکول mM۵ بود. واکنش با افزودنµl۵۰ عصاره آنزیمی در حجم نهایی ml۳ مخلوط آغاز گردید. افزایش جذب در طول موج ٤۷۰ 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 ml ۵ اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲٤ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ml ۱ محلول رویی ml۱ اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ml ۵ رسانده شد. سپس ml ۰/۵ معرف فولین ۵۰ درصد و ml ۱ 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 کلروفیلa و b و کارتنوئید از روش Lichtenthder (۱۹۸۷) استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۰۳ 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 ml ۲۵ رسید. پس از سانتریفیوژ در ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، جذب نوری در طول موج‌های ٦۵۲، ٦٤۵، ٦٦۳ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد در نهایت مقدار کلروفیل برحسب میلی‌گرم در گرم بافت‌تر برگ از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

کلروفیل a = (۰/۱۲۷)(A٦٦۳) – (۰/۰۰۲٦۹)(A٦٤۵)

کلروفیل b = (۰/۰۲۲۹)(A٦٦۳) – (۰/۰۰٤٦۸)(A٦٤۵)

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 اسپکتروفتومتری 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 ml۱۰ 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 اسپکتروفتومتر و ضریب خاموشی (ε=۳۳۰۰ mol^{-1} cm^{-1}) انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات‌های محلول: میزان کربوهیدرات‌های محلول به روش Schlegel (۱۹۵٦) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ به همراه ml ۱۰ اتانول ۹۵ درصد در لوله آزمایش دربسته 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 میلی لیتر فنل ۰/۵ درصد و ml ۵ اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. در نهایت میزان نور جذبی در ٤۸۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، میزان کربوهیدرات‌های استخراجی بر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

اساس میکروگرم گلوکز در گرم وزن ترمحاسبه گردید.

اندازه‌گیری پرولین: برای اندازه گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از اندام هوایی و ریشه توسط ml ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۳ درصد در هاون چینی کاملا ساییده و در نهایت با کاغذ صافی صاف گردید. به ۲ml از محلول حاصل،۲ml معرف نین‌هیدرین 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، ٤ml تولوئن اضافه گردید. از فاز رویی برای اندازه گیری 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 وآزمون 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 تاثیر معنی‌داری 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 معنی‌داری افزایش یافت ولی در روزهای بعد تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد مشاهده نشد (شکل ۱b).

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

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 درمیزان 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 روز های 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 تاثیر معنی‌داری 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 شده‌است و کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی‌دار میزان ترکیبات فنلی گردید. همچنین در این زمان باعث افزایش معنی‌داری نسبت به زمان های اول، سوم و پنجم شد (شکل ۳a). کیتوزان در زمانهای مختلف بعد از تیمار باعث افزایش معنی‌دار 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 تاثیر معنی‌داری 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

جدول۱ –تجزیه واریانس تاثیر کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید، پراکسیدهیدروژن، آنزیم‌های آنتی اکسیدان و میزان فنل کل و فلاونوئید.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		مالون دی آلدئید(µm/g FW)	پراکسید هیدروژن(µm/g FW)	پراکسیداز(min/mg Protein)	گایاکول پراکسیداز(min/mg Protein)	پلی فنل اکسیداز(min/mg Protein)	فنل کل(mg/g FW)	فلاونوئید(mg/g FW)
زمان	۳	۳۲/۰۵**	۰/۱۳۳**	۵۷۳۳٦۹/۸۹**	۸٤۹۵۸/۹٦**	۵۷۳۳۱/۷۵**	۳۰/۸۸**	۰/۰۰۵۵ n.s
کیتوزان	۱	۳۸/٤۷**	۰/۷۳۷**	۱۵۹۲۷/٤۲ **	۵۰۸۵٦/۱۷**	۸٤۸۹٤/٤۲**	٤/۳۸**	۰/۰۰۲۲**
زمان × کیتوزان	۳	۳/۳۷ n.s	۰/۰۵۸**	۹٤۸۰٤/۷۹**	٤۷۳۰/۲۸ n.s	۲۳۷٦۹/۱۹**	٤/۷۰**	۰/۰۰۱۰ n.s
خطا	۱٦	۱/۰٤٤	۰/۰۰۰٤	٦۹۳۱/۷۰	۱۷۳۹/٦۱	۲۹۷/۹۲	۰/۰۱	۰/۰۰۱۹
ضریب تغییرات		۸/۷	۵/٦	۱۱/۸	۱۲/۲	۵/٦	۲/۱	۵/٤

* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی دار.

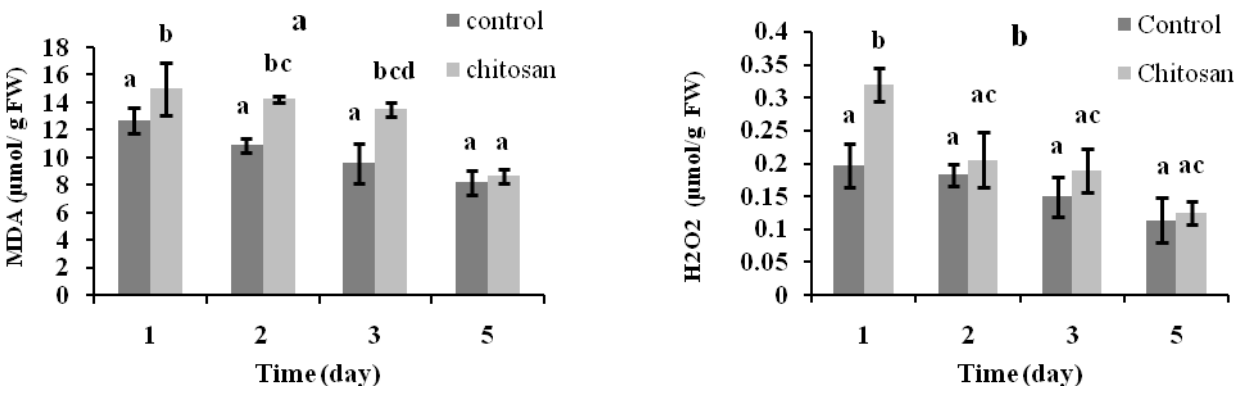
جدول۲ –تجزیه واریانس تاثیر کیتوزان بر میزان رنگیزه‌ها و کربوهیدرات و پرولین.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کلروفیل a (mg/g FW)	کلروفیل b (mg/g FW)	کاروتنوئید (mg/g FW)	آنتوسیانین (mg/g FW)	کربوهیدرات (mg/g FW)	پرولین (µmol/g FW)
زمان	۳	۰/۰۰۱۵*	۰/۰۳**	۱/٦۲*	٤۰۷۷٦/۱۷**	۲۲/۱۱**	۰/۲۷**
کیتوزان	۱	۰/۰٤۹**	۰/۰٤**	۷/٤٤**	۱۰۹۲٦/۵۱ n.s	۱۳/۳۰**	۰/۰٤**
زمان × کیتوزان	۳	۰/۰۰٦*	۱۰۱/۸٦**	۱۹/۰۹**	٦۰۰۷۳۳/٦٤**	۱/٦۵**	۰/۰٤**
خطا	۱٦	۰/۰۰۱٤	۷/۱۲	۰/۳۱	٦۳۹۱/۰۵	۰/۱۰	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات		۱۰/٦	۱۲/۰	٦/٦	٤/۵	٤/۲	۵/۷

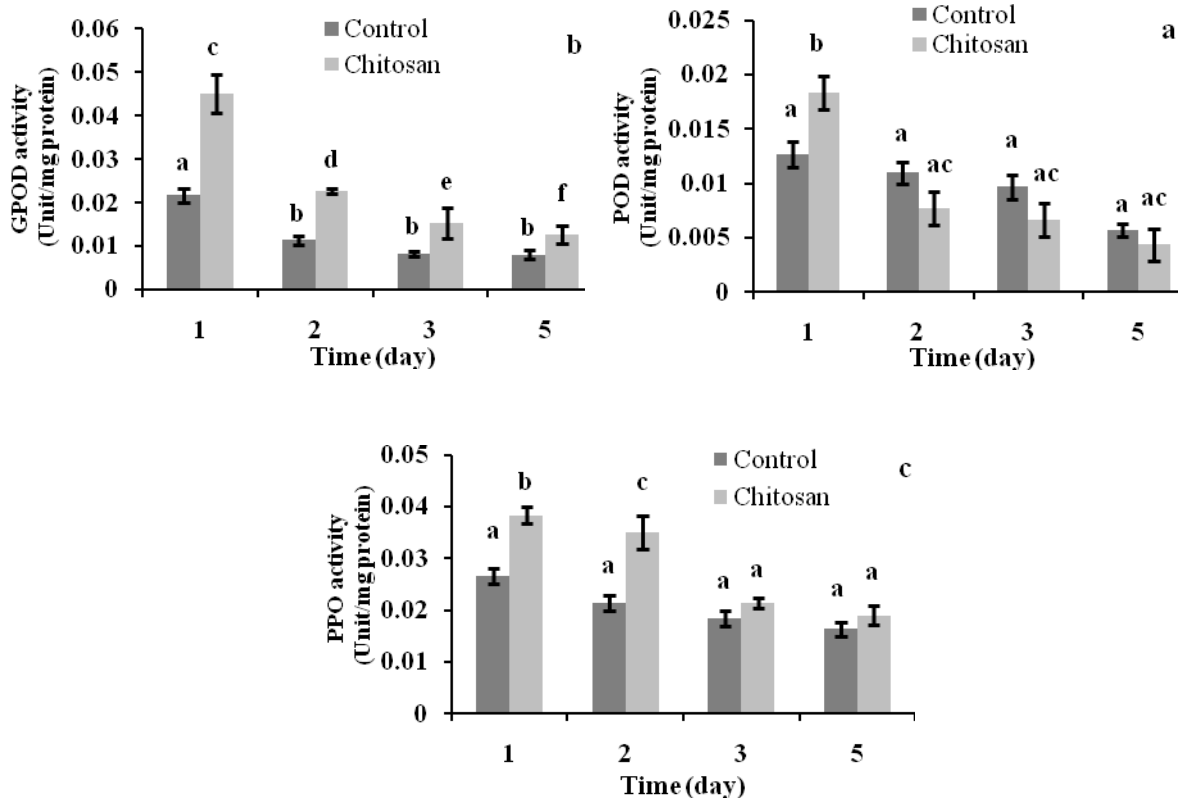
* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی دار.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]



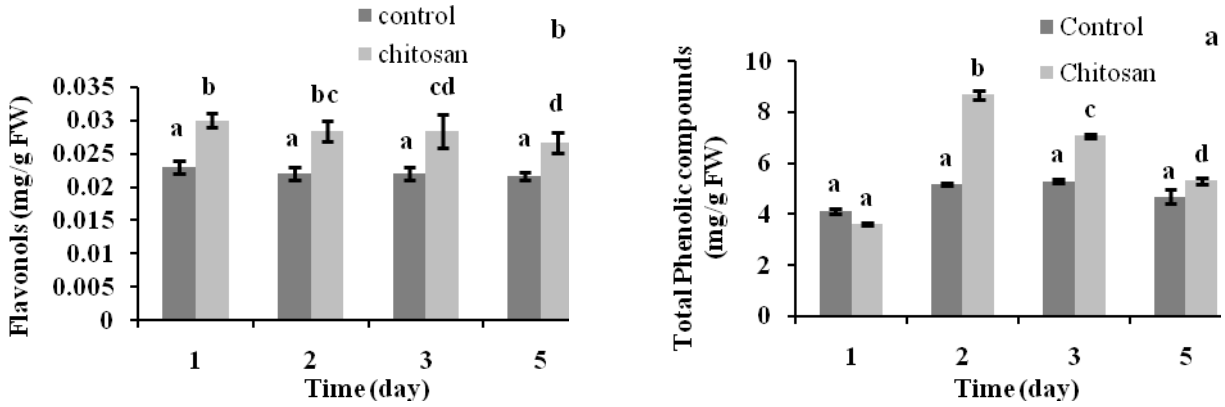
شکل۱- میزان مالون دی آلدئید (a) و پراکسید هیدروژن (b) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان در گیاه ریحان. تیمار کیتوزان در مرحله پیشگلدهی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری درسطح ۵ درصد می باشد.



شکل۲- 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 پیش‌گلدهی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری درسطح ۵ درصد می باشد.

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 در روزهای اول و دوم بعد از تیمار نسبت به 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]



شکل۳- میزان فنل کل (a) و میزان فلاونوئید (b) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان در گیاه ریحان. تیمار کیتوزان در مرحله پیش‌گلدهی اعمال گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از تیمار برداشت شدند. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

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

زمان (روز)	تیمار (g/Lit)	کلروفیل a (mg/g FW)	کلروفیل b (mg/g FW)	کاروتنوئید (mg/g FW)	آنتوسیانین (mg/g FW)	کربوهیدرات (mg/g FW)	پرولین (µmol/g FW)
۱	کیتوزان	۰/۰۵^{c}	۱۹/۰۱^{c}	٦/۵۵^{d}	۱۵۱٤/٤۹^{d}	۰/۸۸^{a}	٦/۰۹^{d}
	شاهد	۰/۰۸^{c}	۲٦/۵۳^{ab}	٦/٤۲^{d}	۱۸٦۹/۳٤^{c}	۰/٦۹^{b}	۵/۵۱^{d}
۲	کیتوزان	۰/۰٦^{c}	۱۸/۳۱^{c}	۷/۵۳^{c}	۱۵۵۰/۰۰^{d}	۰/۵۷^{e}	۷/۱۳^{c}
	شاهد	۰/۰۹^{c}	۲٤/۸۷^{ab}	۷/۹٤^{cd}	۲۱۳۷/۲۰^{a}	۰/۳۹^{c}	٦/۰۹^{d}
۳	کیتوزان	۰/۱٤^{b}	۲۲/٤۸^{bc}	۹/۹۷^{b}	۱۹٤۵/۷۸^{bc}	۰/٤۸^{f}	۸/۳۹^{b}
	شاهد	۰/۰۷^{c}	۱۹/٦۱^{c}	٦/۸٦^{d}	۱٦۳۳/۲۷^{d}	۰/۲۹^{d}	۷/۰۵^{c}
٤	کیتوزان	۰/۱۷^{a}	۲۷/۸۸^{a}	۱۰/۱۵^{b}	۲۰٦۸/۲۵^{ab}	۰/۳۸^{g}	۱۱/۷۱^{a}
	شاهد	۰/۰٦^{c}	۱۸/۰٦^{c}	۷/۰٤^{cd}	۱۲٦۸/۰۱^{e}	۰/۲۲^{e}	۸/۷۲^{b}

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

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 روز های 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 (جدول۲). 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 معنی داری 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).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

ضرایب همبستگی بین صفات: جدول ٤ 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 الیسیتورهای زیستی بر سیستم دفاعی گیاه از جمله میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت های ثانویه گیاهی صورت گرفته‌است. تحقیق حاضر نخستین گزارش تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، فنل کل، لیپید پراکسیداسیون غشا، 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 مکانیسم های 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 گونه های فعال اکسیژن دارند (Iturbe-ormaetxe *et al*., 1998). تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند. 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 مکرسی و لیشم (۱۹۹٤) آنزیم‌های آنتی اکسیدان در پراکسیزوم، سیتوزول و میتوکندری وجود دارند و سبب تبدیل H_2O_2 بهH_2O و O_2 می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌است که کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد (Kim andThomas, 2007; Yen *et al*., 2008). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان توسط چندین مکانیسم توصیف شده‌است (Muzzarelli and Terbojerich, 1997; Park and Kim, 2004). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های آزاد OH و O_2^- را از بین ببرد و گفته شده‌است خاصیت محافظت از DNA را دارد (HarishPrashanth *et al*., 2007). طبق تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات فنلی در گوجه‌فرنگی شده‌است (Liu *et al*., 2007). همچنین طبق بررسی‌های صورت گرفته فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در ریشه بادمجان تحت تیمار با الیسیتور کیتوزان افزایش یافته‌است (Mandal, 2010). کیتوزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را در دو گونه ذرت افزایش داده‌است (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 ٤)، 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 مهار کننده 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 رنگیزه¬های کلروفیلی و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

جدول ٤-ضریب همبستگی ساده میان صفات مورد ارزیابی

صفات	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	فنل کل	فلاونوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	آنتوسیانین	کربوهیدرات
پراکسید هیدروژن	۰/۸۸**											
پراکسیداز	۰/۷۵**	۰/۵۹**										
گایاکول پراکسیداز	۰/۸۸**	۰/۷۷**	۰/۷۹**									
پلی فنل اکسیداز	۰/۸۵**	۰/۹۲**	۰/۸۱**	۰/۷۹**								
فنل کل	۰/۱۹n.s	۰/۱٤n.s	-۰/۰۷n.s	۰/۱٦n.s	-۰/۰٤n.s							
فلاونوئید	۰/٦۸**	۰/۸٤**	۰/۳۱n.s	۰/۵۰*	۰/٦۹**	۰/۱۰n.s						
کلروفیل a	۰/٦۹**	۰/۹۰**	۰/۳۱n.s	۰/۵٦**	۰/۷۳**	۰/۲٤n.s	۰/۹۳**					
کلروفیل b	-۰/۱۸n.s	-۰/۳۳n.s	-۰/۲۳n.s	-۰/۰۵n.s	-۰/۳۹n.s	۰/۱۰n.s	-۰/۱۹n.s	-۰/۲۰n.s				
کاروتنوئید	-۰/۱۷n.s	-۰/٤٤*	-۰/۱۲n.s	۰/۰۰٦n.s	-۰/٤۳*	۰/۱۳n.s	-۰/۳۵n.s	-۰/٤۳*	۰/۷۸**			
آنتوسیانین	-۰/۰۰٦n.s	-۰/۱۹n.s	-۰/۱۱n.s	۰/۰۰۸n.s	-۰/۲۹n.s	۰/٤۷*	-۰/۰۳n.s	-۰/۰۵n.s	۰/۷۹**	۰/۷۳**		
کربوهیدرات	۰/۷۸**	۰/۷۸**	۰/۸٦**	۰/۸۲**	۰/۹۱**	-۰/۲۰n.s	۰/۵۷**	۰/۵۷**	-۰/۱٤n.s	-۰/۱٤n.s	-۰/۱۲n.s	
پرولین	۰/٤۸*	۰/۳۱n.s	۰/۸۹**	۰/۵۷**	۰/٦۳**	-۰/٤۰*	۰/۰۳n.s	۰/۰۳n.s	-۰/۱۲n.s	۰/۰٤n.s	-۰/۱٦n.s	۰/۷۸**

* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns، غیر معنی دار.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

کارتنوئید 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 کارتنوئید در قهوه می‌شود (Dzung *et al*., 2011). قندهای محلول از دیگر اسمولیت‌های مهمی هستند که افزایش آن در پاسخ به تنش گزارش شده‌است (Jonesand Turner, 1980). در این تحقیق، همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین پرولین با کربوهیدرات بدست آمد (جدول ٤) 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 الیسیتور زیستی کارآمد می‌تواند از طریق القای سیستم دفاعی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بعد از یک روز از اعمال تیمار باعث افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در گیاه ریحان شود.

منابع:

اسمعیل‌زاده، ص. شریفی، م. صفایی، ن. و بهمنش، مهرداد. ۱۳۹۱. افزایش تولید ترکیبات لیگنانی و فنیل پروپانوئیدی تحت تأثیر کتین و کیتوزان در کشت سلول کتان سفید. مجله زیست‌شناسی گیاهی ۱۱: ۲٦-۱۳.

قهرمان، ا. (۱۳۷۳) کورموفیت های 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 Cistanch edeserticola cell suspension cultures by chitosan elicitor. Journal of Biotechnology121: 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 sativam*. Journal of Experimental Botany 29:981-989.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductasein 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 Grapeving 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

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 Phytochemictry 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 adjastmant 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 Biochemictry 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]

Smirnoff, 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) Elicition of defense responses in bean leaves by Botrytis cinerea polyglacturonase. Journal of Physiologr 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*. Heredity70: 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 phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9]