

## Effect of irrigation interval and chitosan spraying on physiological characteristics and antioxidant enzymes activity of common mallow (*Malva sylvestris* L.)

Ayoub Mazarei<sup>1</sup>, Ali Reza Sirousmehr<sup>2\*</sup>, Masoumeh Broshaki<sup>3</sup>, Zahra Babaei<sup>3</sup>, Ali Akbar Mahmoudi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>2</sup> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>3</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

### Abstract

In order to evaluate the effects of chitosan spraying and irrigation interval on physiological characteristics and antioxidant enzymes common mallow, a factorial experiment in a randomized complete block design with three replications was conducted in 2015 at the Faculty of Agriculture, University of Zabol. The experimental treatments included irrigation interval (Irrigation interval 7 day, Irrigation interval 11 day and irrigation interval 15 day) and foliar chitosan spray (0, 0.5 and 1 mg.l<sup>-1</sup>). The results of interaction showed that spraying with 1 mg. l<sup>-1</sup> chitosan during irrigation increased 27 and 7 % respectively, chlorophyll a and the relative content of leaf water and on the other hand spraying with 1 mg. l<sup>-1</sup> chitosan during 15 day irrigation cause increased in total phenol content (79 %), proline (68 %) and activity of antioxidant enzymes peroxidase (51 %), ascorbate peroxidase (72 %), guaiacol peroxidase (70 %), superoxide dismutase (54 %) and catalase (80 %) relative to the control. The results of correlation showed that proline had significant and positive correlation with RWC, but showed a negative correlation with photosynthetic pigments. Also there was a significant positive correlation between enzyme and non-enzymatic antioxidants. The results of this study showed that chitisan spraying at the rate of 1 mg. l<sup>-1</sup> reduced the lipid peroxidation, through increasing the antioxidant defense system activities of the plant and prevent the relative water content of the leaf through retaining cells' water balance which consequently, leads to cells' structures stability against deficit stress.

**Keywords:** Antioxidant defense system, Irrigation interval, Osmotic modulation, Spraying

---

\* Corresponding Author: asirousmehr@uoz.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## اثر دور آبیاری و محلول‌پاشی کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پنی‌ک معمولی (*Malva sylvestris* L.)

ایوب مزروعی<sup>۱</sup>، علیرضا سیروس مهر<sup>۲\*</sup>، معصومه بروشکی<sup>۳</sup>، زهرا بابایی<sup>۳</sup>، علی اکبر محمودی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

<sup>۲</sup> گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

<sup>۳</sup> گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

### چکیده

برای بررسی اثر دور آبیاری و محلول‌پاشی کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پنی‌ک معمولی (*Malva sylvestris* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۴ در دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) و محلول‌پاشی کیتوزان (صفر (شاهد)، ۰/۰۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بودند. نتایج آثار متقابل نشان دادند محلول‌پاشی با یک میلی گرم در لیتر کیتوزان همراه آبیاری کامل به ترتیب، افزایش ۲۷ و ۷ درصدی مقدار کلروفیل a و محتوای نسبی آب برگ را باعث شد و از سویی محلول‌پاشی با یک میلی گرم در لیتر کیتوزان همراه آبیاری به مدت ۱۵ روز، افزایش مقدار فنل کل (۷۹ درصد)، پرولین (۶۸ درصد) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز (۵۱ درصد)، آسکوربات پراکسیداز (۷۲ درصد)، گایاکول پراکسیداز (۷۰ درصد)، سوپراکسید دیسموتاز (۵۴ درصد) و کاتالاز (۸۰ درصد) را نسبت به شاهد باعث شد. نتایج همبستگی نشان دادند میزان پرولین با محتوای نسبی آب برگ رابطه مستقیم ولی با رنگیزه‌های فتوسنتزی همبستگی عکس دارد. همچنین بین آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد؛ بنابراین، نتایج بررسی حاضر نشان دادند غلظت یک میلی گرم کیتوزان با افزایش فعالیت مجموعه دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش پراکسیداسیون لیپیدها را باعث می‌شود و با حفظ تعادل آبی سلول، از کاهش شدید محتوای نسبی آب برگ جلوگیری می‌کند و با این روش به پایداری ساختار سلول در برابر تنش کم آبی منجر می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** تعدیل اسمزی، دور آبیاری، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، محلول‌پاشی

\* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: asirousmehr@uoz.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۴۱

## مقدمه

پنیرک معمولی (*Malva sylvestris* L.) گیاهی بوته‌ای از خانواده پنیرک (Malvaceae) است که ارتفاع آن متفاوت و بین ۵/۰ تا ۱ متر است که به شرایط محل رویش بستگی دارد. این گیاه، ریشه‌ای کم‌وبیش منشعب، مخروطی‌شکل و راست با ضخامت ۱۵۰ تا ۲۵۰ سانتی‌متر دارد (Omidbaigi, 2006; Paul, 2016). بین تنش‌ها، خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهنده رشد و عملکرد گیاهان دارویی و زراعی است؛ به طوری که بر ۴۰ تا ۶۰ درصد زمین‌های کشاورزی جهان اثر می‌گذارد (Sankar *et al.*, 2007; Mazaraie *et al.*, 2017). وقتی پتانسیل آب خاک کاهش می‌یابد، گیاهان برای حفظ قدرت جذب آب باید پتانسیل آب درونی را به اندازه‌ای کاهش دهند تا به یک شیب مطلوب برسد. برای ایجاد جریان آب از خاک به داخل ریشه‌ها مهم‌ترین سازوکار، تنظیم اسمزی است که با هدف حفظ تورژسانس سلولی، تداوم جذب از محیط ریشه و پایداری غشاها انجام می‌شود (Ma *et al.*, 2006).

مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی، بیشتر شامل یون‌های غیرآلی (مانند پتاسیم، کلسیم و کلر) و ترکیبات آلی بدون بار (مانند آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و هورمون‌ها) هستند. پرولین یکی از آمینواسیدهای فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد (Martin *et al.*, 1993).

تجمع پرولین آزاد، پاسخی متداول به تنش در گیاهان عالی است (Vendruscolo *et al.*, 2007). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود

همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و سازش به شرایط تنش اسمزی در تنش‌های خشکی و شوری گیاهان وجود دارند (Bohenert and Shen, 1999; Mishra and Dubey, 2006). پرولین در شرایط تنش علاوه بر حفظ تعادل اسمزی گیاه؛ نوعی پایدارکننده پروتئین‌ها، کلات‌کننده فلزی، مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی و حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد است (Mishra and Dubey, 2006). در ماریتغال، لویا و سویا با کاهش پتانسیل آب، افزایش معنی‌داری در میزان پرولین مشاهده شد (Lazcano-ferrat and Lovatt, 1999; Mazaraie *et al.*, 2017).

یکی از پیامدهای بیوشیمیایی تنش خشکی در گیاهان، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب‌ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول است. کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از مهم‌ترین اندامک‌های تولیدکننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Naderi *et al.*, 2015). الکترون‌های نشت‌شده از زنجیره انتقال الکترون ممکن است با اکسیژن مولکولی به دست آمده از متابولیسم طبیعی گیاه ترکیب شوند و گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل تولید کنند. این گونه‌های اکسیژن، سمی و بسیار واکنش‌پذیرند و در نبود سازوکارهای حفاظتی متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل می‌کنند (Sharma and Dubey, 2005). این رادیکال‌ها با پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشا، تخریب پروتئین‌ها (Moran *et al.*, 1994)، غیرفعال کردن آنزیم‌ها، از بین بردن رنگیزه‌های فتوسنتزی و اختلال در

پزشکی و کشاورزی دارد (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

کیتوزان ها پلیمرهای آلی زیستی، غیرسمی، طبیعی و تجزیه پذیر هستند که در شرایط صنعتی از استیل زدایی (حذف گروه عاملی استیل با فرمول شیمیایی  $\text{COCH}_3$ ) جزئی کیتین به دست آمده از پوسته خارجی سخت پوستانی مانند میگو و خرچنگ دریایی در محیط قلیایی تولید می شوند (Rinaudo, 2006). گزارش شده است کیتوزان ها به دلیل تأثیر بر بیان ژن های گیاهی قادرند به برخی عوامل نامساعد محیطی، مقاومت ایجاد کنند (Demirevska *et al.*, 2009). برای این گروه از مواد ویژگی های ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، اصلاح و تقویت خاک، بهبود رشد و عملکرد، افزایش مقدار متابولیت های ثانویه و فعال کردن سازوکارهای دفاعی در گیاهان گزارش شده اند (Waseem *et al.*, 2010).

نتایج بررسی ها نشان می دهند کیتوزان ها به طور چشمگیری پایداری غشاهای سلولی را افزایش می دهند (Yang *et al.*, 2009) و به دلیل افزایش هدایت روزه های و کاهش مقدار تعرق، افزایش مقدار فتوسنتز را موجب می شوند و بر ارتفاع گیاه، طول ریشه ها و مقدار زیست توده تأثیر می گذارند (Boonlertinirun *et al.*, 2008). در آزمایشی محلول پاشی با ترکیبات کیتوزانی کاهش مقدار تولید مالون دی آلدئید را در سلول های گیاهی باعث شد که شاخص کاهش مقدار خسارت در شرایط تنش خشکی به شمار می رود (Abdalla, 2011). افزایش کارایی مصرف آب (Boonlertinirun *et al.*

عملکرد DNA تنش ثانویه اکسیداتیو ایجاد می کند که خسارت های جدی به ساختارهای سلولی و گیاه وارد می کند. گیاهان در مقابله با تنش خشکی، سازوکارهای حفاظتی متفاوتی مانند سازوکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی دارند (Tian and Li, 2006).

آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی شامل بتاکاروتن، آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول، گلو تاتیون و آنتی اکسیدان های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز هستند (Xu *et al.*, 2006). گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلو تاتیون ردوکتاز یا تولید بیشتر این آنزیم ها اکسیژن های فعال را خنثی می کنند (Zhili *et al.*, 2012). توازن بین تولید گونه های اکسیژن فعال و حذف آنها در شرایط تنش با آنتی اکسیدان ها انجام می شود (Harinasut *et al.*, 2003). توانایی سیستم آنتی اکسیدانی ممکن است از آسیب ناشی از تنش جلوگیری کند که این مسئله به مقاومت گیاهان به تنش مربوط می شود (Malekpoor *et al.*, 2015).

در حال حاضر، برای سیستم های کشاورزی پیشرفته، استفاده از مواد فعال زیستی و سازگار با محیط برای حفظ گیاهان و همچنین افزایش رشد ضرورت دارد. یکی از این روش ها که به تازگی توجه پژوهشگران به آن معطوف شده است استفاده از پلیمر زیستی کیتوزان است. این ماده با داشتن ویژگی های زیستی و فیزیولوژیک منحصر به فرد، کاربردهای متعددی در صنایع متفاوت دارویی،

(2008, *al.*، کاهش صدمه ناشی از تنش خشکی (Morello *et al.*, 2005)، افزایش مدت ماندگاری میوه‌ها (Iriti and Faoro, 2009) و گل‌ها (Uthairatanakij *et al.*, 2007) و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Zhili *et al.*, 2012) با مصرف ترکیبات کیتوزانی گزارش شده‌اند. تیمار گیاهان برنج با کیتوزان قبل از تنش خشکی، خسارت تنش خشکی را در این گیاه کاهش داده است. این تأثیر به بسته‌شدن روزنه‌های گیاه به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه در برنج و به دنبال آن کاهش تعرق نسبت داده شده است (Boonlertnirun *et al.*, 2011). با توجه به روند رو به افزایش کم‌آبی و وقوع خشک‌سالی‌های مداوم در سال‌های گذشته و نقش کیتوزان در کاهش آثار منفی تنش در گیاهان و همچنین اهمیت پنی‌رک معمولی به دلیل داشتن مواد موسیلاژی خلط‌آور و نرم‌کننده سینه و مجاری تنفسی و فواید

آن در درمان التهاب غشاهای مخاطی و برونشیت (Paul, 2016)، پژوهش حاضر برای بررسی اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی پنی‌رک معمولی انجام شد.

### مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی زابل واقع در سد سیستان اجرا شد. قبل از کاشت از خاک مزرعه نمونه‌برداری شد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه بستر خاکی استفاده‌شده در کشت پنی‌رک معمولی

هدایت pH	نیترژن	کربن	فسفر	پتاسیم	سدیم	لای	رس	شن	بافت خاک
الکتریکی									
دسی									
زیمنس بر سانتی‌متر	درصد	میلی گرم در کیلوگرم	درصد						
۱/۴۶	۸/۴	۰/۰۵	۰/۴۷	۹/۲	۱۱۵	۳۸/۷	۲۷	۳۲	۴۱
									لومی - شنی

تیمارها شامل دور آبیاری (آبیاری با دور ۷ روز (شاهد)، آبیاری با دور ۱۱ روز و آبیاری با دور ۱۵ روز) و محلول‌پاشی کیتوزان در سه غلظت (کنترل

(بدون محلول‌پاشی)، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بودند. پس از آماده کردن کرت‌های آزمایشی با طول ۳/۵ و عرض ۲/۵ متر با فاصله ردیف کاشت

۵۰ سانتی متر و فاصله بوته روی ردیف ۳۰ سانتی متر، بذر کاری در تاریخ ۱۰ اسفند انجام شد. نخستین آبیاری برای همه تیمارها بلافاصله پس از کاشت انجام شد. پس از استقرار کامل بوته ها تیمارهای تنش خشکی اعمال شد. برای اعمال تیمارهای تنش و بدون تنش از دور آبیاری استفاده شد. محلول پاشی کیتوزان در دو مرحله در فصل رشد گیاه (نخستین و دومین محلول پاشی با کیتوزان به ترتیب در روز ۶۳ و ۷۰) انجام شد. محلول پاشی در ساعت ۸ صبح در هوای ملایم و با سم پاش دستی اعمال شد؛ به طوری که برگ های گیاه، کاملاً خیس و برای بهبود جذب برگی کیتوزان از تربتون ۱۰۰ X با غلظت ۰/۰۱ درصد استفاده شد. در زمان برداشت نمونه ها، پس از حذف اثر حاشیه از هر کرت، سه گیاه به طور تصادفی برداشت و برای اندازه گیری صفات فیزیولوژیک و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده شدند.

### اندازه گیری میزان پرولین:

بدین منظور، مقدار ۰/۱ گرم بافت برگي نگهداری شده در فریزر در ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳/۳ درصد ساییده و محلول به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 5810r، شرکت Eppendorf، آلمان) شد. در لوله ای جداگانه به دو میلی لیتر از عصاره، دو میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱/۲۵ گرم پودر نین هیدرین اسید در ۳۰ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال حل شد و ۲۰ میلی لیتر فسفریک اسید شش مولار به آن اضافه شد) و دو میلی لیتر استیک اسید گلاسیال خالص اضافه شد. لوله ها به مدت یک

ساعت در بن ماری قرار گرفتند و پس از اضافه کردن چهار میلی لیتر تولوئن به هر کدام از لوله ها، به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. بخش بالایی رنگی، با دقت جدا و جذب آن در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/Vis -2100، شرکت Unico، آمریکا) با طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان پرولین با نمودار استاندارد و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bates et al., 1973).

### محتوای نسبی آب برگ: با روش Levitt

(۱۹۸۰) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ از هر گلدان پنج عدد دیسک برگي با قطر یک سانتی متر تهیه شد. دیسک های برگي پس از توزین، در لوله های آزمایش محتوی آب مقطر قرار داده شدند. درب لوله های آزمایش با فویل پوشیده شد و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا به بیشترین وزن اشباع خود برسند؛ سپس با ترازوی دقیق (مدل GF300 AND، ژاپن)، وزن آماس نمونه ها محاسبه شد. دیسک ها در آونی (مدل ۷۰ uf30، شرکت MEMMERT، آلمان) با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. وزن خشک دیسک ها با ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ به دست آمد. محتوای نسبی آب برگ در نهایت از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{RWC} = \frac{(\text{LWF} - \text{LWD})}{(\text{LWT} - \text{LWD})} \quad \text{رابطه ۱}$$

در رابطه ۱؛ RWC، محتوای نسبی آب برگ؛ LWF، وزن تر؛ LWT، وزن آماس و LWD وزن خشک برگ ها است.

### محتوای کلروفیل a برگ: با روش

Prochazka و همکاران (۱۹۹۸) و از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$\text{Chl } a = 12.25A_{663} - 2.79A_{646} \quad \text{رابطه ۲}$$

در رابطه ۲؛ Chl a، مقدار کلروفیل a؛  $A_{663}$  جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر و  $A_{646}$  جذب در طول موج ۶۴۶ نانومتر است.

### سنجش میزان فنل‌ها: مقدار فنل‌ها در

نمونه‌های عصاره گیاهی با روش فولین - سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (McDonald *et al.*, 2001). در این روش در لوله آزمایش به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اتانولی یا محلول اتانولی استاندارد گالیک اسید (غلظت ۲۵ تا ۳۰۰ میکروگرم و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین - سیوکالتیو رقیق شده با آب مقطر با نسبت ۱ به ۱۰)، ۰/۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و مخلوط شد. جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فنل کل عصاره با نمودار استاندارد براساس میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره محاسبه شد.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه عصاره آنزیمی، ۰/۵ گرم از نمونه برگ در هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن شد و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد با pH برابر با ۷/۵ محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Sairam and Saxena, 2002).

### آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز،

۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر بافر

سدیم فسفات (pH=۷)، ۰/۱۵ میکرولیتر EDTA و ۵۴۹/۸۵ میکرولیتر آب مقطر در تیوب ریخته و ۳۸۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه شد (۳۸۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد که آب اکسیژنه ۰/۷۵ مولار به دست آید؛ سپس ۳۰ میکرولیتر در مخلوط واکنش ریخته شد تا آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار به دست آید)؛ سپس جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت و پس از یک دقیقه دوباره میزان جذب یادداشت شد (Beers and Sizer, 1952).

### آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای

اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۳۷/۵ میکرولیتر آسکوربات و ۱۱۱۸/۸۵ میکرولیتر آب در تیوب ریخته شد و ۱۵۳ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۹۰ نانومتر میزان جذب آن یادداشت و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Nakano *et al.*, 1981).

### آنزیم گایاکول پراکسیداز: برای سنجش

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۸۰۰ میکرولیتر بافر سدیم، ۰/۲ میکرولیتر EDTA، ۵۰ میکرولیتر گایاکول و ۷۹۹/۸ میکرولیتر آب به لوله آزمایش اضافه شد و ۷۶۵ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و بلافاصله، جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Urbanek *et al.*, 1991).

### آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم

سوپراکسید دیسموتاز براساس روش Beauchamp

مقدار پرولین و محتوای رنگیزه های فتوسنتزی، داده های به دست آمده برای تحلیل آماری نرمال شدند. در مرحله اول، تجزیه واریانس داده ها (ANOVA) انجام شد؛ سپس داده های به دست آمده از تجزیه واریانس و میانگین ها با آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شدند. بدین منظور، از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد. برای رسم شکل ها از نرم افزار Excel سال ۲۰۰۷ استفاده شد.

### نتایج و بحث

**مقدار کلروفیل a:** براساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده ها (جدول ۲) تأثیر دور آبیاری، محلول پاشی کیتوزان و اثر متقابل آنها بر میزان کلروفیل a در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. نتایج آثار متقابل نشان دادند محلول پاشی ۱ میلی گرم در لیتر کیتوزان در دور آبیاری کامل (۷ روز) افزایش ۲۷ درصدی کلروفیل a را نسبت به شاهد سبب شد (شکل ۱).

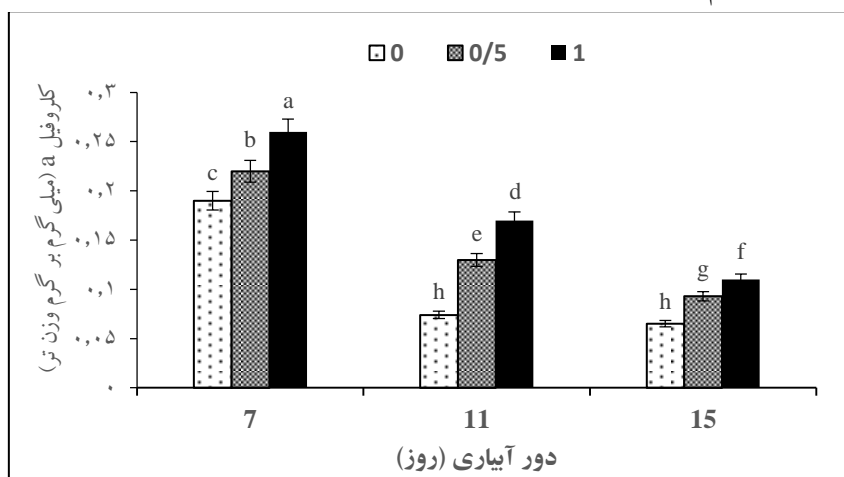
و Fridovich (۱۹۷۱) اندازه گیری شد. بدین منظور، ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی با ۱/۵ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با ۷/۸ pH=۰/۱، ۸۰۰ میکرو لیتر بافر سدیم فسفات، ۰/۱ میلی مولار EDTA، نیترو بلو تترازولیوم ۷۵ میلی مولار، ریوفلاوین (۲ میلی مولار) و متیونین (۱۳ میلی مولار) به لوله آزمایش اضافه شدند و سپس جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد.

### آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز

براساس روش Holy (۱۹۷۲) انجام شد. بدین منظور، ابتدا ۲ میلی لیتر استات ۰/۲ مولار (pH=۵)، ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه ۰/۳ درصد و ۰/۱ میلی لیتر بنزیدین ۰/۲۰ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد در حمام یخ مخلوط شدند؛ سپس ۰/۱ میلی لیتر از عصاره آنزیمی برگ به این مخلوط واکنش اضافه و سپس میزان جذب آن در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

### تحلیل آماری: پس از اندازه گیری ترکیبات

فنی کل، میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی،



شکل ۱- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر میزان کلروفیل a پنیترک معمولی - مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0/01$  براساس آزمون دانکن هستند.



جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برخی صفات پیرک معمولی بر اثر تیمارهای دور آبیاری و محلول‌پاشی کیتوزان

فل	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	گیاکول پراکسیداز	کاتالاز	محتوای نسبی آب برگ	پروлін	کلروفیل a	درجه آزادی	تیمارها
۰/۰۰۶۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲۹ <sup>**</sup>	۰/۰۰۳۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲۷ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۱ <sup>*</sup>	۰/۰۰۰۲ <sup>*</sup>	۰/۰۰۸۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۳۷ <sup>*</sup>	۲	بلوک
۰/۰۰۴۶ <sup>**</sup>	۰/۰۰۴۵ <sup>**</sup>	۰/۰۰۳۸ <sup>**</sup>	۰/۰۰۷۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱۹۵ <sup>**</sup>	۰/۰۰۷۴۶ <sup>**</sup>	۰/۰۰۶۶۱ <sup>**</sup>	۰/۰۰۹۲۱ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۴۶ <sup>**</sup>	۲	دور آبیاری
۱۳/۳۹ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱۳۹ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲۶۵ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱۱۴ <sup>**</sup>	۰/۰۰۴۲۸ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۲ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱۸۸ <sup>**</sup>	۲۲/۴۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱۱ <sup>**</sup>	۲	کیتوزان
۰/۰۰۲۳۷ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۱۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۰۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۲۹ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۲۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۰۸ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۴۲۷ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۸۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۰۷۵ <sup>**</sup>	۴	دور آبیاری × کیتوزان
۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۳۸	۰/۰۰۰۰۷۳	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۹۲	۰/۰۰۰۰۵۳	۰/۰۰۰۰۵۷	۰/۰۰۰۰۷۱	۱۶	خطا
۴/۳۳	۲/۰۵۱	۳/۶۷	۴/۰۴۶	۳/۰۷	۴/۳۸	۳/۷۷	۴/۵۷	۵/۶۵		ضرب تغییرات (/)

ns و \* به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار را در سطح ۱ و ۵ درصد نشان می‌دهند.

(Askary *et al.*, 2006 و آویشن باغی *et al.*, 2017) در تنش خشکی مطابقت دارد.

Agrawal و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند کیتوزان با فعال کردن تعدادی از آنزیم‌ها مانند فیتواکسین‌ها و کیتینازها، مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش می‌دهد. در پژوهشی که اثر کیتوزان را بر گیاه بادرنجبویه بررسی و گزارش کردند، میزان رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید بر اثر کیتوزان افزایش یافت (Khajeh and Naderi, 2014). نتایج بررسی حاضر نشان دادند محلول پاشی با کیتوزان افزایش میزان کلروفیل را سبب شد که با نتایج Gornik و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. آنها بیان کردند کاربرد کیتوزان کاهش اثر تنش خشکی را بر کلروفیل و افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی را باعث می‌شود. از سویی نتایج آزمایش بر باقلا (Sheikha and AL-Malki, 2009)، ماریتیغال (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2017) و بادرنجبویه (Khajeh and Naderi, 2014) نشان دادند مصرف کیتوزان افزایش کلروفیل را در باقلا و بادرنجبویه باعث می‌شود که تأییدی بر نتایج بررسی حاضر است. همچنین نتایج پژوهش حاضر، در راستای نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های Khan و همکاران (۲۰۰۲) و El-Tantawy (۲۰۰۹) هستند که با به کار بردن کیتوزان، افزایش چشمگیری در میزان کلروفیل سویا و گندم مشاهده کردند. با توجه به وجود عنصر نیتروژن در محرک کیتوزان و نقش ساختاری این عنصر در حلقه‌های تتراپیرولی کلروفیل، چنین افزایشی توجیه‌پذیر است. از سوی دیگر، مصرف کیتوزان احتمالاً با تأثیر بر ژن‌های

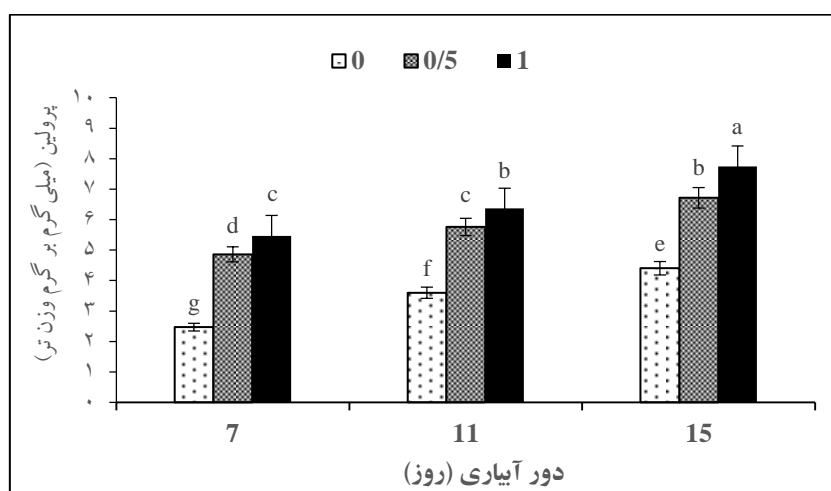
میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است. تنش خشکی، پیری زودرس و شکسته شدن کلروپلاست و کاهش میزان کلروفیل را در گیاهان باعث می‌شود (Jiang and Huang, 2001). در بررسی حاضر، بر اثر افزایش دور آبیاری، میزان کلروفیل a نسبت به شاهد حدود ۶۰ درصد کمتر شد.

به نظر می‌رسد این کاهش بر اثر تنش خشکی، به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد که این رادیکال‌های آزاد پراکسیداسیون (Wise and Naylor, 1989) و در نتیجه، تجزیه این رنگیزه را باعث می‌شود (Schutz and Fangmeir, 2001). این مسئله ممکن است به دلیل افزایش فعالیت کلروفیل‌از هنگام تنش خشکی باشد (Boyer, 1987؛ در حالی که Balaguer و همکاران (۲۰۰۲) معتقدند کاهش مقدار کلروفیل هنگام تنش کمبود آب ممکن است به دلیل تحریک آنزیم یوستنتر پرولین یعنی گلوتامیل کیناز در تغییرات میزان نسبی آب کم باشد که با نتایج همبستگی منفی بین کلروفیل و پرولین در پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

با افزایش تبدیل گلوتامات به پرولین در تنش خشکی، درواقع گلوتامات که پیش ساز کلروفیل نیز است از دسترس خارج و سنتز کلروفیل‌ها نقصان پیدا می‌کند. کاهش میزان کلروفیل در پنی‌رک معمولی با نتایج به‌دست آمده از سیاه‌دانه (Ariafar and Sirousmehr, 2015)، کتان (Movahhedi Dehnavi *et al.*, 2017)، رزماری (Sanchez-

مسئول سازنده کلروفیل، تولید آن را افزایش داده است (Emami bastegani *et al.*, 2016; Malekpoor *et al.*, 2015)؛ بنابراین کیتوزان با افزایش محتوای کلروفیل و افزایش فتوسنتز و تأثیر بر بیان ژن در کلروپلاست، تغییراتی در اندازه و توسعه کلروپلاست برگ گیاهان را باعث می‌شود و این تغییرات ممکن است تحریک کننده رشد گیاهان باشند (Limpanavech *et al.*, 2008).

**مقدار پرولین:** با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر دور آبیاری‌های مختلف، محلول‌پاشی کیتوزان و اثر متقابل تنش خشکی و کیتوزان بر مقدار پرولین برگ در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین آثار متقابل نشان داد با افزایش مقادیر آبیاری و غلظت محلول‌پاشی بر میزان پرولین افزوده شد؛ به طوری که محلول‌پاشی با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر کیتوزان در دور آبیاری ۱۵ روز، میزان پرولین را نسبت به شاهد، ۶۸ درصد افزایش داد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر میزان پرولین پنیسک معمولی - مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.

پرولین، ماده‌ای محلول است که تنظیم فشار اسمزی، کاهش از دست دادن آب از سلول و نگهداری آماس را سبب می‌شود. یکی از خواص فیزیکی پرولین، زیاد حلال بودن آن است. مولکول پرولین شامل قسمت‌های آب دوست و آب گریز است. پرولین محلول بر حلالیت پروتئین‌های مختلف اثر بگذارد و از غیرطبیعی شدن آلبومین جلوگیری کند. این ویژگی پرولین به این دلیل است

که رابطه متقابل بین پرولین و سطح پروتئین‌های آب گریز برقرار می‌شود و به علت افزایش سطح کل مولکول‌های پروتئین آب دوست، پایداری آن‌ها افزایش می‌یابد و از تغییر ماهیت آن‌ها جلوگیری می‌شود. این سازوکار پرولین بر آنزیم‌ها نیز به دلیل ساختمان پروتئینی‌شان اثر می‌گذارد و از ساختار آن‌ها محافظت می‌کند (Kuznetsov and Shevykova, 1999).

روش، کاهش آثار سوء تنش را سبب می شود که با نتایج Malekpoor و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد.

**محتوای نسبی آب برگ:** نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان دادند اثر دور آبیاری، محلول پاشی کیتوزان و اثر متقابل آنها بر محتوای نسبی آب برگ در سطح یک درصد معنی دار شدند (جدول ۲). مقایسه میانگین آثار متقابل غلظت های کیتوزان در هر مقدار آبیاری نشان داد بیشترین محتوای نسبی آب برگ مربوط به دور آبیاری کامل با محلول پاشی ۱ میلی گرم بر لیتر کیتوزان بود (شکل ۳).

کاهش محتوای رطوبت نسبی (RWC) برگ ها از بارزترین علائم فیزیولوژیک کمبود رطوبت خاک است (Nautical et al., 2002). محتوای نسبی آب زیاد، توانایی گیاهان را برای تنظیم اسمزی و حفظ رشدشان نشان می دهد. کاهش محتوای آب نسبی در شرایط تنش در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Kerepesi and Galiba, 2000). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند دور آبیاری ۱۵ روز کاهش ۵۷/۶۰ درصدی محتوای نسبی آب برگ را سبب شد که با نتایج Babaei (۲۰۱۱) در ریحان و ماریتغال (Mazarie et al., 2017) هم خوانی دارد. Khan و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند آبسزیک اسید تولید شده در ریشه در تنش خشکی با تجمع در سلول های روزنه ای، بسته شدن سلول های روزنه ای را سبب می شود که این پدیده، کاهش محتوای رطوبت نسبی آب برگ را سبب می شود.

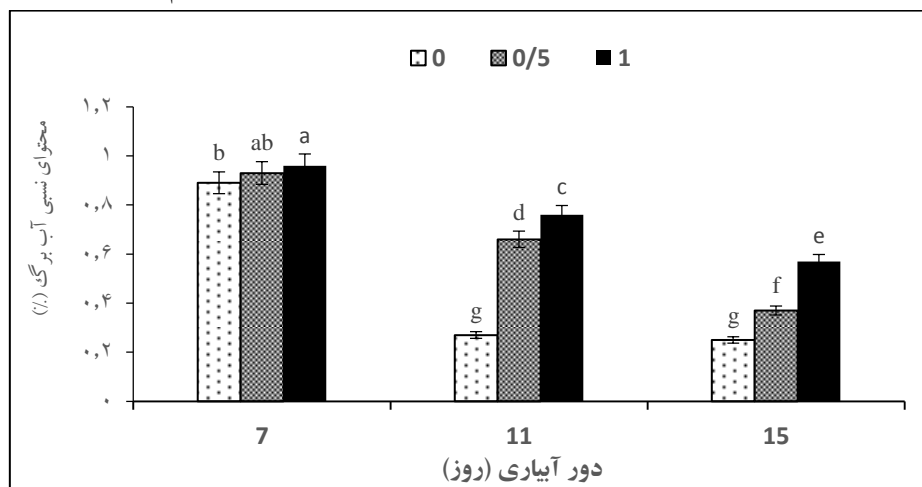
نتایج بررسی حاضر نشان دادند با افزایش محلول پاشی، محتوای نسبی آب برگ افزایش ۳۸/۱۵ درصدی یافت که با نتایج پژوهش Mahdavi و Rahimi (۲۰۱۳) مبنی بر افزایش

در پژوهش حاضر، افزایش ۳۲/۱۱ درصدی پرولین بر اثر دور آبیاری ۱۵ روز، در تطابق با افزایش تولید پرولین در گیاه ماریتغال در مواجهه با تنش خشکی است (Mazaraie et al., 2017) که نتیجه تجزیه پروتئین ها و همچنین کاهش استفاده از آنها به دلیل کاهش رشد گیاه است (Movahhedi Dehnavi et al., 2011).

براساس نتایج بررسی حاضر، همبستگی مثبت و معنی داری بین میزان پرولین و محتوای نسبی آب برگ مشاهده شد (جدول ۳) و براساس نتایج پژوهش Kaphi و همکاران (۲۰۱۰) پرولین، ماده ای محلول است که تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدر رفتن آب از سلول، حفظ آماس سلولی، جلوگیری از تجزیه پروتئین ها، افزایش پایداری برخی از آنزیم های سیتوپلاسمی و میتوکنندری و پایداری شکل طبیعی پروتئین را سبب می شود.

کیتوزان تقریباً بر بیشتر واکنش های متابولیسمی گیاه تأثیر دارد و تغییراتی در آنها موجب می شود. این تغییرات، تحمل و سازگاری گیاهان را در برابر عوامل محیطی افزایش می دهند (Yang et al., 2009). Naderi و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند کیتوزان ممکن است تنظیم کننده کلیدی پاسخ های گیاه به تنش های محیطی باشد و با افزایش میزان پرولین که به نوعی در گیاه تنظیم اسمزی ایجاد می کند، آثار منفی تنش خشکی را کمتر کند. براساس نتایج پژوهش Mahdavi و Safari (۲۰۱۶) به نظر می رسد کیتوزان با افزایش محتوای تنظیم کننده های اسمزی مانند پرولین، پایداری ساختار سلول را در برابر تنش خشکی سبب می شود و با این

محتوای نسبی آب برگ گیاه زنیان بر اثر محلول‌پاشی کیتوزان هم‌خوانی دارد.



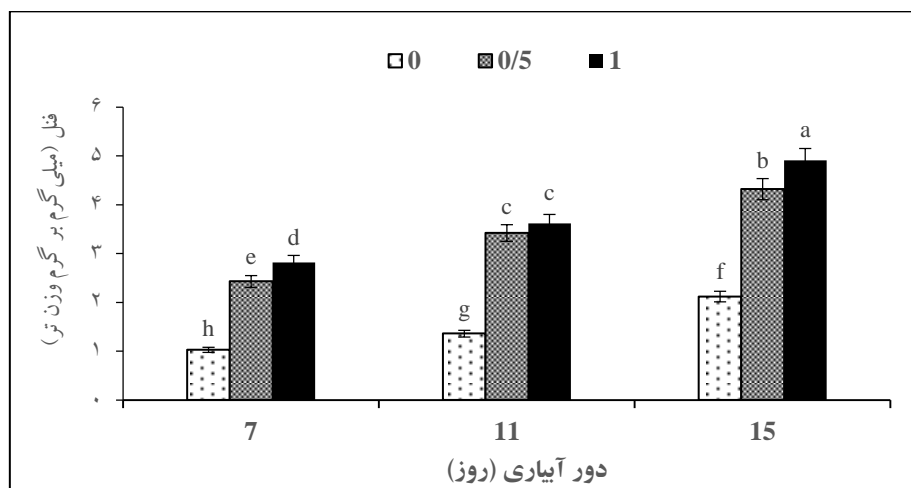
شکل ۳- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر محتوای نسبی آب برگ پنیرک معمولی- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.

(۲۰۱۴) نشان دادند کیتوزان با حفظ تعادل آبی سلول از کاهش شدید محتوای نسبی آب برگ جلوگیری کرد که سبب پایداری ساختار سلول را در برابر تنش کم‌آبی باعث شد و ازسویی مصرف کیتوزان کاهش آثار سوء تنش را باعث شد.

#### ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

**فنل:** نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌های جدول ۲ نشان دادند تأثیر دور آبیاری، محلول‌پاشی کیتوزان و اثر متقابل آنها بر میزان فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج آثار متقابل (شکل ۴) نشان دادند محلول‌پاشی با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در دور آبیاری ۱۵ روز، افزایش ۷۹ درصدی میزان فنل کل را نسبت به شاهد سبب شد.

افزایش محتوای نسبی آب برگ در پنیرک معمولی با نتایج به‌دست‌آمده در خیار (Gu *et al.*, 2010)، نخود (Mahdavi and Safari, 2016) و گلرنگ (Modrres Sanavi *et al.*, 2014) مطابقت دارد و بیان کردند محلول‌پاشی با کیتوزان در گیاهان قرار گرفته در معرض تنش خشکی، محتوای آب نسبی برگ را افزایش داد. کیتوزان با بهبود سیستم ریشه‌ای کارآمد، افزایش جذب آب و ذخایر آبی گیاه را باعث شد و همچنین با کاهش تعرق در گیاه، حفظ محتوای نسبی آب برگ را در شرایط تنش باعث می‌شود (Asgharipor *et al.*, 2015)؛ بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش حاضر و گزارش‌های سایر پژوهشگران استنباط می‌شود کیتوزان احتمالاً با کاهش تعرق و همچنین حفظ محتوای نسبی آب، تحمل به خشکی ایجاد می‌کند (Mahdavi and Rahimi, 2013). نتایج پژوهش Modrres Sanavi و همکاران



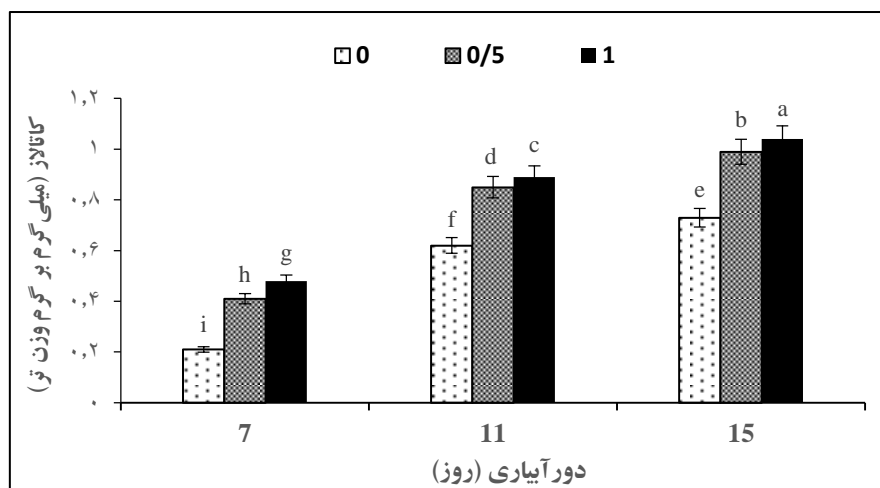
شکل ۴- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵) بر میزان فنل پتیرک معمولی - مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.

گیاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را نسبت به شاهد سبب شد (شکل های ۵ تا ۹).

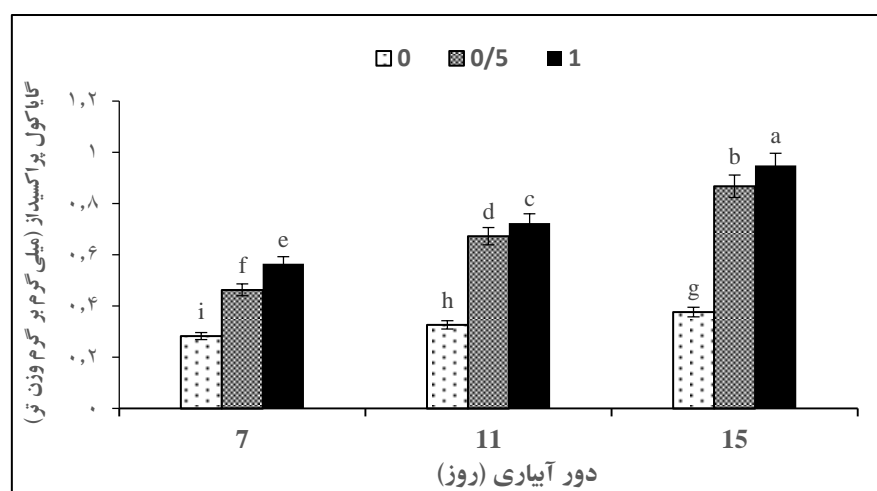
یکی از سازوکارهای دفاع غیر آنزیمی برای مقابله با تنش اکسیداتیو القاء شده با خشکی در گیاهان، تجمع ترکیبات فنلی است. ترکیبات فنلی به صورت گیرنده رادیکال های آزاد عمل می کنند و مقاومت گیاهان را در برابر تنش های اکسیداتیو سبب می شوند (Sharafati chaleshtori et al., 2008). نتایج بررسی حاضر نشان دادند بین میزان فنل و آنزیم های آنتی اکسیدان همبستگی وجود دارد که در تطابق با نتایج پژوهش Ghasemzadeh و همکاران (۲۰۱۰) است که بیان کردند رابطه مثبتی بین محتوای فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها وجود دارد.

#### آنزیم های آنتی اکسیدانی: نتایج به دست آمده

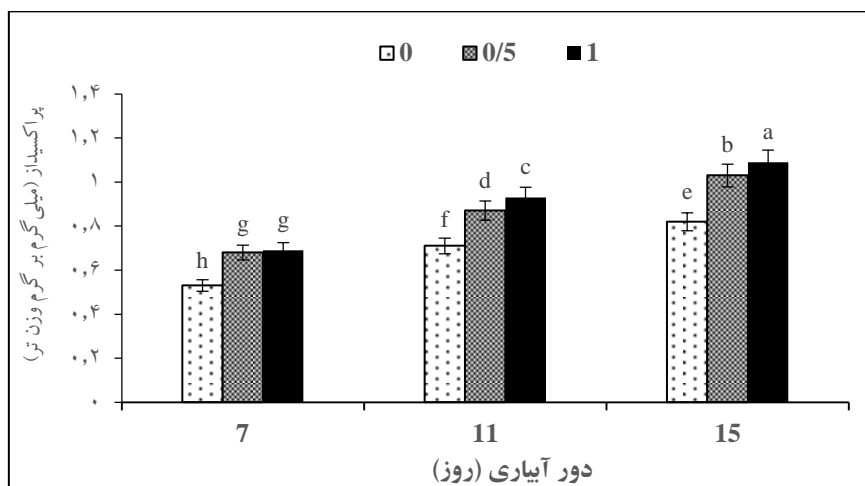
از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان دادند تیمار دور آبیاری و محلول پاشی کیتوزان و اثر متقابل دور آبیاری در کیتوزان بر فعالیت برخی از ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تأثیر گذاشتند و تفاوت آماری در سطح یک درصد معنی دار شد. مقایسه میانگین آثار متقابل نشان داد در تنش خشکی و کیتوزان، میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد؛ به طوری که محلول پاشی با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر کیتوزان در دور آبیاری ۱۵ روز، به ترتیب افزایش ۵۱، ۷۲، ۷۰، ۵۴ و ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز،



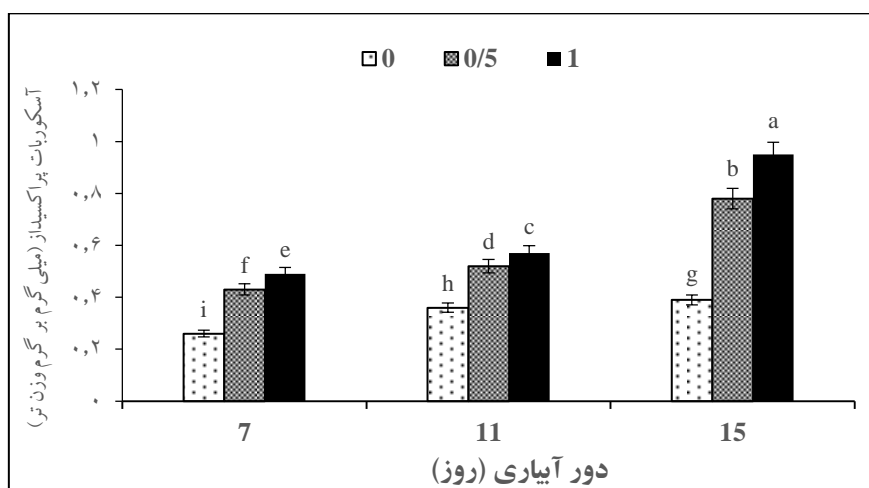
شکل ۵- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر آنزیم کاتالاز پنیرک معمولی- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.



شکل ۶- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر آنزیم گایاکول پراکسیداز پنیرک معمولی- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.

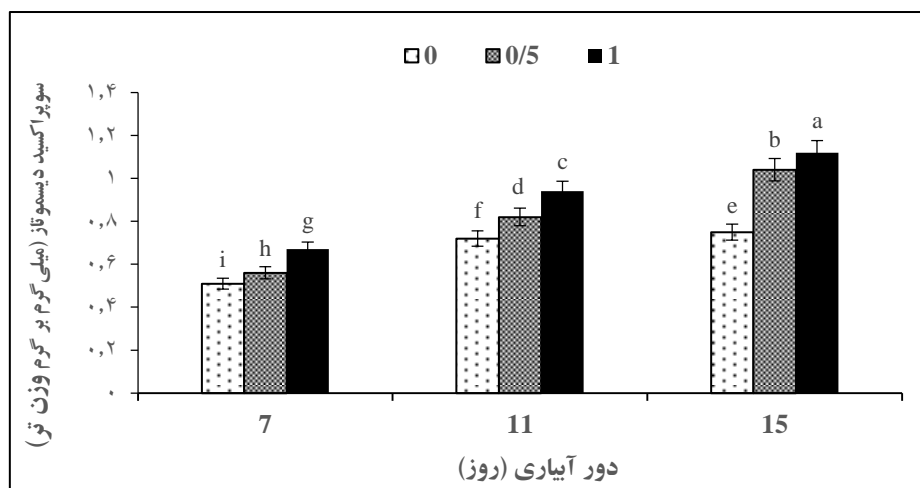


شکل ۷- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر آنزیم پراکسیداز پنیرک معمولی- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.



شکل ۸- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر آنزیم آسکوربات پراکسیداز پنیرک معمولی- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.





شکل ۹- اثر متقابل کیتوزان (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) و دور آبیاری (۷، ۱۱ و ۱۵ روز) بر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز پنبه‌ک معمولی - مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$  براساس آزمون دانکن هستند.

این ترکیبات با سازوکارهای متعددی مانند پاک‌روبی رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، کلات کردن یون‌های فلزی یا در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف هیدروژن پراکسید، نقش آنتی اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند (Kovacik *et al.*, 2009) و در نتیجه، ثبات غشاهای سلولی و ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها را سبب می‌شوند (Chang *et al.*, 2002). Malekpoor و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند در تنش خشکی ترکیبات فنلی در گیاهان تجمع می‌یابند. در پژوهش حاضر، با افزایش تنش خشکی میزان فنل افزایش یافت که با نتایج Habibi و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد. آنها بیان کردند در بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*) با افزایش شدت تنش، میزان مواد فنلی و آنزیم‌های دفاعی افزایش می‌یابد. وقتی فنل‌ها در این واکنش‌ها به صورت آنتی اکسیدان شرکت می‌کنند، به رادیکال فنوکسیل اکسید تبدیل می‌شوند و سپس با واکنش با آسکوربات به حالت اولیه برمی‌گردند (Makkar *et al.*, 1998).

در بررسی اثر تنش خشکی در گیاه گندم دریافتند علت افزایش ترکیبات فنلی، از افزایش فعالیت و میزان آنزیم‌های بیوسنتزی ترکیبات فنلی مانند فنیل آلانین آمونیالاز ناشی می‌شود. به فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان بسیار توجه شده است (Park *et al.*, 2004). کیتین و کیتوزان افزایش میزان ترکیبات فنلی را باعث می‌شوند که در سازوکارهای دفاعی گیاه نقش دارند (Pu *et al.*, 2009). نتایج Emami Bastegani و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند با افزایش غلظت کیتوزان، محتوای فنل افزایش می‌یابد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. Taheri (۲۰۱۵) و Coqueiro و همکاران (۲۰۱۱) در نتایج خود بیان کردند کیتوزان با افزایش تولید ترکیبات فنلی به صورت سد دفاعی در برابر تنش‌های محیطی عمل می‌کند. Malekpoor و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند محرک‌هایی مانند کیتوزان ممکن است با فعال کردن ژن‌ها و مسیرهای بیوسنتزی مختلف

و آنزیم ها تشکیل متابولیت های ثانویه ای مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را موجب شود که با نتایج بررسی حاضر مبنی بر افزایش ترکیبات فنلی هم خوانی دارد.

افزایش دفاع آنتی اکسیدانی نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول گیاه دارد و میزان فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به گونه گیاهی و شدت تنش در گیاه بستگی دارد (Apel and Hirt, 2004). مهم ترین نقش رادیکال های آزاد اکسیژن، اکسید کردن اسیدهای چرب غیراشباع است که به پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا منجر می شوند (Sharma and Dubey, 2005). گزارش شده است آنزیم های آنتی اکسیدانی در افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش های محیطی شرکت دارند. افزایش این آنزیم ها در شرایط تنش در بسیاری از گونه ها گزارش شده است (Yahubyan *et al.*, 2009). زمانی که گیاهان در معرض تنش کم آبی قرار می گیرند برای مقابله با صدمه های اکسیژن فعال، همه سازوکارهای دفاعی باید فعال شوند. در بسیاری از گیاهان مشخص شده است تنش خشکی بر فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز اثر می گذارد (Blokhina *et al.*, 2003).

افزایش ۵۱، ۷۲، ۷۰، ۵۴ و ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، نشان دهنده بروز تنش اکسیدانی در شرایط تنش خشکی در گیاه پنیرک معمولی است؛ از این رو به نظر می رسد آنزیم های آنتی اکسیدانی در افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی نقش مهمی دارند (Mittler, 2002). مقایسه فعالیت آنزیم های

آنتی اکسیدانی، نشان می دهد بیشترین فعالیت مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز نخستین خط دفاعی را در برابر رادیکال های فعال اکسیژن در سلول تشکیل می دهند (Yong *et al.*, 2009). سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید تبدیل می کند. کاهش فعالیت این آنزیم، تجمع رادیکال سوپراکسید را موجب می شود. این رادیکال با هیدروژن پراکسید ترکیب می شود و با انجام واکنش هابر - ویز رادیکال بسیار خطرناک هیدروکسیل را به وجود می آورد (Mittler *et al.*, 2004).

فعالیت کم آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کارایی چرخه مهلر را در کلروپلاست کاهش خواهد داد. کاهش کارایی این چرخه، افزایش شدت آسیب ها را به مولکول های زیستی حیاتی موجب می شود که آسیب به غشاها یکی از مهم ترین آنهاست. همچنین تجمع رادیکال سوپراکسید، فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز را کاهش می دهد (Asada, 2000). این آنزیم ها نقش ویژه ای در جمع آوری هیدروژن پراکسید موجود در سلول دارند (Shao *et al.*, 2005).

آنزیم کاتالاز از دسته پروتئین های آهن دار به شمار می رود و هنگامی در سلول های گیاهی و جانوری وارد عمل می شود که مقدار ماده هیدروژن پراکسید در محیط زیاد باشد. کاتالاز، فرایند تبدیل هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن بدون نیاز به گهرمایه کمکی انجام می دهد و از فعالیت هیدروژن پراکسید در سلول ممانعت می کند (Habibi *et al.*, 2004). آنزیم پراکسیداز که گهرمایه های دهنده الکترون

تحریک کنندگی کیتوزان‌ها بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تنش خشکی در گیاه گلرنگ گزارش شده است (Abdalla, 2011; Mahdavi et al., 2011) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه پنی‌رک معمولی به دلیل اثر تحریک کنندگی کیتوزان‌ها بر ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد که با نتایج Taheri (۲۰۱۵) در گیاه کمای بینالودی (*Ferula flabelliloba*) مطابقت دارد. این ترکیبات با تعیین مسیرهای بیوسنتزی به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه برای مقابله با شرایط تنش منجر می‌شوند (Waseem et al., 2010). کیتوزان، رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل ( $\text{OH}^\cdot$ ) و سوپراکسید ( $\text{O}_2^\cdot$ ) را خنثی می‌کند (Harish Prashanth et al., 2007). سازوکار خنثی کردن رادیکال‌های آزاد کیتوزان ممکن است به ساختار ویژه آن مربوط شود که از تعداد زیادی گروه آمین و هیدروکسیل در دسترس تشکیل شده است که با رادیکال‌های آزاد (ROS) واکنش می‌دهند (Sun et al., 2004).

**نتایج همبستگی:** نتایج ارزیابی همبستگی بین صفات بررسی شده در پژوهش حاضر با ضریب پیرسون در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. تحلیل همبستگی، نشان‌دهنده ارتباط مثبت و منفی (معنی‌داری یا معنی‌دار نبودن) صفات با یکدیگر است. نتایج نشان دادند آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، بیشترین میزان همبستگی را با هم دارند. ازسویی بین میزان پرولین با محتوای نسبی آب برگ رابطه مستقیم اما بین پرولین و کلریل رابطه عکس وجود دارد.

مختلف دارد و آنزیم آسکوربات پراکسیداز با مولکول آسکوربات که دهنده الکترون است، هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن احیا می‌کند (Mittler et al., 2004). کاهش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ممکن است تجمع هیدروژن پراکسید را موجب شود و به کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌های چرخه کالوین مانند ریبولوز مونو فسفات، کیناز و بی‌فسفاتازها منجر شود (Asada, 2000). کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در چرخه کالوین با کاهش نسبت  $\text{H}^+$ ،  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  در کلروپلاست افزایش آسیب به مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها و تولید شکل‌های فعال اکسیژن را سبب می‌شود (Mittler, 2002).

آسکوربات پراکسیداز چند نقش اساسی در فرایندهای فیزیولوژیک گیاه مانند رشد و نمو و متابولیسم دارد و همچنین به صورت احیاکننده بسیاری از رادیکال‌های آزاد و به‌ویژه هیدروژن پراکسید عمل می‌کند؛ بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Yong et al., 2006).

بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کیتین و کیتوزان که الیستور زیستی هستند ممکن است توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد (Yen et al., 2007; Harish Prashanth et al., 2008) تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه و متابولیت‌های ثانویه را داشته باشند (Pu et al., 2009).

کیتوزان در غلظت‌های کم، با از بین بردن رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم یا با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از اکسیدشدن چربی‌ها جلوگیری می‌کند (Mahdavi and Safari, 2016). اثر

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات فیزیولوژیک و آنزیمی پیروک معمولی در دوره های آبیاری و محلول پاشی کیتوزان

فنل	کلروفیل a	محتوای نسبی آب برگ	پروکلین	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز	گایاکول
گایاکول پراکسیداز	۱								
آسکوربات پراکسیداز					۱		۰/۹۵**		۰/۹۵**
پراکسیداز						۱	۰/۹۴**		۰/۹۴**
سوپراکسید دیسموتاز					۱		۰/۹۴**		۰/۹۱**
کاتالاز				۱	۰/۹۵**		۰/۹۴**		۰/۹۸**
پروکلین			۱	۰/۹۸**	۰/۹۷**		۰/۹۳**		۰/۹۶**
محتوای نسبی آب برگ		۱	۰/۴۲**	۰/۴۵ <sup>ns</sup>	۰/۵۱ <sup>ns</sup>	۰/۵۵ <sup>ns</sup>	۰/۵۴ <sup>ns</sup>		۰/۴۲ <sup>ns</sup>
کلروفیل a		۰/۳۶**	-۰/۹۸**	-۰/۹۸**	-۰/۹۲**	-۰/۸۷**	-۰/۸۹**		-۰/۹۷**
فنل	-۰/۹۷**	۰/۴۳ <sup>ns</sup>	۰/۹۸**	۰/۹۹**	۰/۹۴**	۰/۹۵**	۰/۹۵**		۰/۹۹**

ns و \*\* به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار را در سطح ۵ و ۱ درصد نشان می دهند.

## جمع‌بندی

براساس نتایج پژوهش حاضر، با افزایش دور آبیاری، محتوای نسبی آب برگ و کلروفیل a برگ کاهش یافتند؛ به طوری که بیشترین مقدار کلروفیل a و محتوای نسبی آب برگ در محلول‌پاشی یک میلی گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری کامل به دست آمد. ازسویی با افزایش دور آبیاری؛ میزان پرولین، فنل کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافتند؛ به طوری که بیشترین مقدار فنل کل، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در محلول‌پاشی یک میلی گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری ۱۵ روز به دست آمد. براساس نتایج همبستگی نتیجه‌گیری می‌شود کیتوزان با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه پنی‌ک معمولی، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها را موجب می‌شود و با افزایش محتوای تنظیم‌کننده‌های اسمزی (پرولین) حفظ تعادل آبی سلول را سبب می‌شود و از کاهش شدید محتوای نسبی آب برگ جلوگیری می‌کند؛ بنابراین به پایداری ساختار سلول در برابر تنش کم آبی منجر می‌شود و میزان کلروفیل را افزایش می‌دهد؛ از این رو نتیجه‌گیری می‌شود مصرف کیتوزان آثار سوء تنش را کاهش دهد.

## سپاسگزاری

از کارمندان مزرعه آموزشی شماره ۱ دانشگاه زابل واقع در سد سیستان و آزمایشگاه بیوسنتر دانشگاه زابل بابت همکاری در اندازه‌گیری‌ها و اجرای آزمایش حاضر سپاسگزاری می‌شود. همچنین

هزینه اجرای این آزمایش از محل اعتبار پژوهانه شماره UOZ-GR-9517-21 معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تامین شده است.

## منابع

- Abdalla, M. M. (2011) Beneficial effects of diatomite on the growth, the biochemical contents and polymorphic DNA in *Lupinus albus* plants grown under water stress. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2: 207-220.
- Aghighi Shahverdi, M., Omid, H. and Mousavi, S. E. (2017) Effect of chitosan on seed germination and biochemical traits of milk thistle (*Silybum marianum* L.) Seedling under salt stress. *Iranian Journal of Seed Research* 3(2): 105-118 (in Persian).
- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A. and Saji, H. (2002) Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 1061-1069.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Ariaifar, S. and Sirousmehr, A. R. (2015) Effect of urban waste compost on yield, essential oil percentage and some physiological characteristics of *Nigella sativa* under drought stress. *Journal of Agricultural Crops Production* 19(1): 31-42 (in Persian).
- Asada, K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355(1402): 1419-1431.
- Asgharipor, M. R., Mousapor, H. and Basiri, M. (2015) The role of chitosan in improving salinity resistance by influencing some of the morphological and physiological characteristics of fenugreek. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Cultures* 25: 165-174 (in Persian).

- Askary, M., Behdani, M. A., Parsa, S., Mahmoodi, M. and Jamialahmadi, S. (2017) Effects of water stress and manure on stomatal conductance, relative water content, photosynthetic pigments and quantitative and qualitative yield of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 33(5): 793-811 (in Persian).
- Babaei, B. (2011) Effect of cycocel on quantitative and qualitative characteristics of *Ocimum basilicus* L. under drought stress. MSc thesis, University of Zabol, Zabol, Iran (in Persian).
- Balaguer, L., Pugnaire, F. I., Martinz-Ferri, E., Armas, C., Valladares, F. and Manrique, E. (2002) Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima*. Plant and Soil 240: 343-352.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teave, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-107.
- 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.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Annual Journal of Biochemistry 44: 276-287.
- Beers, G. R. and Sizer, I. V. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry 195: 133-140.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Annals of Botany 91: 179-194.
- Bohenert, H. J. and Shen, B. (1999) Transformation and compatible solutes. Scientia Horticulturae 78: 237-260.
- Boonlertinirun, S., Chaweewan, B. and Suvanasara, R. (2008) Application of chitosan in rice production. Journal of Metals Materials and Minerals 18(2): 47-52.
- Boyer, J. S. (1987) Plant productivity and environment potential for increasing crop plant productivity, genotypic selection. Science 218: 443-448.
- Chang, W. C., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K. and Kim, S. K. (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science 163: 1161-1168.
- Coqueiro, D. S. O., Maraschin, M. and Piero, R. M. D. (2011) Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. Journal of Phytopathology 159(7): 488-494.
- Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M. and Feller, U. (2009) Drought stress effects on rubisco in wheat: changes in the rubisco large subunit. Acta Physiologiae Plantarum 31: 1113-1129.
- El-Tantawy, E. M. (2009) Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. Pakistan Journal of Biological Sciences 12: 1164-1173.
- Emami Bastegani, Z., Syadat, S. A., Bakhshandeh, A. M. and Ghsemi Pirbaloti, A. (2016) Effect of chemical, organic and chitosan fertilizers on physiological characteristics and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* in Shahrekord. Journal of Agricultural Research 7(1): 11-27 (in Persian).
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2010) Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules Journal 15(6): 4324-4333 (in Persian).
- Gornik, K., Grzesik, M. and Duda, B. R. (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.
- Gu, L. Q., Li, C. X., Qiao, Y. X., Gao, F. J. and Lu, H. (2010) Effects of exogenous chitosan on physiological characteristics of cucumber seedlings under drought stress. *Southwest China Journal Agriculture Science* 1: 70-73.
- Habibi, D., Mashdi Akbar Boojari, M., Mahmoudi, A., Ardakani, M. R. and Taleghani, D. (2004) Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. In: *Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress*, Brisbane, Australia.
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensataporn, R. (2003) Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia* 29: 109-113.
- Harish Prashanth, K. V., Dharmesh, K. S., Jagannatha, R. and Tharanathan, R. N. (2007) Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydrate Research* 342: 190-195.
- Holy, M. C. (1972) Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Journal of Plant Physiology* 50: 15-18.
- Iriti, M. and Faoro, F. (2009) Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signal and Behaviors* 4(1): 66-68.
- Jiang, Y. and Huang, N. (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* 41: 436-442.
- Kafi, M., Borzoie, A., Salehi, A., Kamandi, A. and Nabati, J. (2010) *Physiology of environmental stresses in plants*. Mashhad University Press, Mashhad (in Persian).
- Kerepesi, I. and Galiba, G. (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* 40: 482-487.
- Khajeh, H. and Naderi, S. (2014) The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activity and biochemistry characterization in melissa (*Melissa officinalis*). *Research Journal of Crop Science in Arid Area* 1: 100-116.
- Khan, H. U., Link, W., Hocking, T. and Stoddard, F. (2007) Evaluation of physiological biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Khan, W. M., Prithiviraj, B. and Smiyh, D. L. (2002) Effect of foliar application of chitin oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica* 40: 621-624.
- 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.
- Kuznetsov, V. I. and Shevykova, N. I. (1999) Proline under stress: Biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 274-287.
- Lazcano-Ferrat, I. and Lovatt, C. J. (1999) Relationship between reative water content, nitrogen pools and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. *Crop Science* 39: 467-475.
- Levitt, J. (1980) *Response of plants to environmental stresses*, Vol. 2. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, New York.
- Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongpromek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S., Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, A. and Bangyeekhun, T. (2008) Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium orchid*. *Scientia Horticulturae* 116: 65-72.
- Ma, Q., Niknam, S. R. and Turner, D. (2006) Response of osmotic adjustment and seed yield of *Brassica napus* and *Brassica jounce* to soil water deficit at different growth stages. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 221-226.
- Mahdavi, B. and Rahimi, A. (2013) Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt

- stress. Eurasian Journal of Biosciences 7: 69-76 (in Persian).
- Mahdavi, B. and Safari, H. (2016) Effect of chitosan on growth and some physiological characteristics of chickpea under salt stress conditions. Journal of Process and Plant Function 4(12): 117-127 (in Persian).
- 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 (in Persian).
- Makkart, H. P. S., Singh, B. and Dawra, R. K. (1988) Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. British Journal of Nutrition 60(2): 287-296.
- Malekpoor, F., Salimi, A. and Ghasemi Pirbalouti, A. (2015) Effect of bioelicitor of chitosan on physiological and morphological properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit. Scientific Journal of Plant Ecophysiology 27: 56-71.
- Martin, M., Micell, F., Morgan, J. A., Scalet, M. and Zerbi, G. (1993) Synthesis of osmotically active substances in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. Journal of Agronomy and Crop Science 171: 176-184.
- Mazariae, A., Sirousmehr, A. R. and Babaei, Z. (2017) Effect of mycorrhizal fungi on some morphological and physiological characteristics of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) under drought stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 33(4): 620-635 (in Persian).
- McDonald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry 73: 73-84.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trend in Plant Science 7(9): 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Vanbreusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9: 490-498.
- Modrres Sanavi, S. A., Mavdavi, B., Alikhani, M. A. and Sharifi, M. (2014) Chitosan concentrations on germination of seeds and antioxidant enzymes of safflower under dehydrated conditions. Journal of Plant Research 26(3): 352-365 (in Persian).
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta 194(3): 346-352.
- Morello, J. R., Romero, M. P., Ramo, T. and Motilva, M. J. (2005) Evaluation of phenylalanine ammonialyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science 168: 65-72.
- Movahhedi Dehnavi, M., Ranjbar, M., Yadavi, A. R. and Kavusi, B. (2011) Effect of cycocel on proline, soluble sugars, protein, oil and fatty acids of flax (*Linum usitatissimum* M.) plants under drought stress in a pot trial. Environmental Stresses in Crop Sciences 3: 129-138 (in Persian).
- Movahhedi Dehnavi, M., Niknam, N., Behzadi, Y., Mohtashami, R. and Bagher, R. (2017) Comparison of physiological responses of linseed (*Linum usitatissimum* L.) to drought and salt stress and salicylic acid foliar application. Iranian Journal of Plant Biology 9(3): 39-62 (in Persian).
- Naderi, S., Fakheri, B. A. and Bahrami, M. (2015) Effect of chitosan on some physiological and biochemical indices of *Carum copticum*. Journal of Plant Process and Function 1(2): 187-210 (in Persian).
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.
- Nautical, P. C., Rachaputi, N. R. and Joshi, Y. C. (2002) Moisture-deficit-induced changes in leafwater content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific



- leaf area. Field Crop Research 74: 67-79.
- Omidbaigi, R. (2006) Production and processing of medicinal plants. Vol. 3. Astan Quds Razavi Press, Mashahd (in Persian).
- Park, P. J., Je, J. Y. and Kim, S. K. (2004) Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. Carbohydrate Polymers 55: 17-22.
- Paul, D. (2016) A review on biological activities of common mallow (*Malva sylvestris* L.). Innovare Journal of Life Sciences 4(5): 1-5.
- Prochazka, S., Machaackova, I., Kreekule, J. and Sebanek, J. (1998) Plant physiology. Academia, Praha.
- 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.
- Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in Polymer Science 31(7): 603-632.
- Sairam, R. K. and Saxena, D. C. (2000) Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.
- Sanchez-Blanco, J., Fernandez, T., Morales, A., Morte, A. and Alarcon, J. (2006) Variation in water stress, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glaucus deserticola* under drought conditions. Journal of Plant Physiology 161: 675-682.
- Sankar, B. E., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Drought induced biochemical modification and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Acta Botanica Croatica 66: 43-56.
- Schutz, M. and Fangmeir, E. (2001) Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO<sub>2</sub> and water limitation. Environmental Pollution 114: 187-194.
- Shao, H. B., Liang, Z. S., Shao, M. A. and Sun, Q. (2005) Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. Colloids and Surfaces Biointerfaces 42: 187-195.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation 46(3): 209-221.
- Sheikha, S. A. K. and AL-Malki, F. M. (2009) Growth and chlorophyll responses of bean plants to the chitosan applications. European Journal of Scientific Research 50: 124-134.
- Sharafati chaleshtori, F., Sharafati chaleshtori, R. and Momeni, M. (2008) Comparison of the antimicrobial effects of the ethanolic and aqueous extracts of *Scrophularia striata* on *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro*. Shahrekord University of Medical Sciences Journal 10(4): 32-37 (in Persian).
- Sun, T., Xie, W. M. and Xu, P. X. (2004) Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. Carbohydrate Polymers 58: 379-382.
- Taheri, Gh. (2015) The effect of chitosan foliar application on physiological characteristics of Binaloud under drought stress. Iranian Journal of Agricultural Research 1 3(4): 728-737 (in Persian).
- Tian, X. and Li, Y. (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum 50(4): 775-778.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. and Herka, K. (1991). Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polyglacturonase. Acta Physiologiae Plantarum 13: 43-50.
- Uthairatanakij, A., Teixeira, J. A. and Obsuwan, K. (2007) Chitosan for improving orchid production and quality. Science 1: 1- 5.
- Vendruscolo, A. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J. and Vieira, L. G. C. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in

- transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164: 1367-1376.
- Waseem, S., Hamid, M., Ishrat, N., Waqas, K. K., Haroon, A., Saqib, H. and Atif, K. (2010) Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (Family Compositae). *International Journal of Cell and Molecular Biology* 1(2): 108-116.
- Wise, R. R. and Naylor, A. W. (1989) Chilling enhanced photo-oxidation, the peoxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiology* 83: 278-282.
- Xu, Y. C., Zhang, J. B., Jiang, Q. A., Zhou, L. Y. and Miao, H. B. (2006) Effects of water stress on the growth of *Lonicera japonica* and quality of honeysuckle. *Zhong Yao Cai* 29(5): 420-423.
- Yahubyan, G., Gozmanova, M., Denev, I., Toneva, V. and Minkov, I. (2009) Prompt response of superoxide dismutase and peroxidase to dehydration and rehydration of the resurrection plant *Haber learhodopensis*. *Plant Growth and Regulation* 57: 49-56.
- Yang Feng, H., Li, J., Wu, J. and Yurong, X. Q. (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regulation* 58: 131-136.
- Yang, F., Hu, J., Li, J., Wu, X. and Qian, Y. (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regulation* 58: 131-136.
- Yen, M. T., Yang, J. H. and Mau, J. L. (2008) Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 74: 840-844.
- Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S. and Feng, D. (2006) Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix astragali* at seeding stage. *Colloids and Surfaces*
- Zhili, J., Yong, L., Juanjuan, L., Xu, X., Li, H., Lu, D. and Jingying, W. (2012) Effects of exogenous chitosan on physiological characteristics of potato seedlings under drought stress and rehydration. *Potato Research* 55: 293-301.

