نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، ص. ۷۳۷-۷۲۸

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 13, No. 4, Winter. 2016, p. 728-737

اثر محلول‌پاشی کیتوزان بر خصوصیات فیزیولوژیکی کمای بینالودی (*Ferula flabelliloba*) تحت تنش خشکی

قدیر طاهری[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۶

چکیده

یکی از روش‌های سازگار با محیط زیست برای کاهش خسارت ناشی از تنش خشکی در گیاهان محلول‌پاشی با ترکیبات کیتوزانی است. به منظور بررسی اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی کیتوزان بر صفات فیزیولوژیکی کمای بینالودی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و در شرایط آزمایشگاه اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل تنش خشکی (آبیاری در حد ظرفیت زراعی، تخلیه ۳۵ و ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی کیتوزان (صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ گرم در لیتر) بودند. نتایج نشان داد که تخلیه رطوبت بستر تا ۶۵ درصد حد ظرفیت زراعی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی شد ولی مقدار فنل کل و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و غلظت مالون‌دی‌آلدئید را افزایش داد. بالاترین وزن خشک اندام هوایی در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به‌دست آمد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و بیشترین مقدار فنل کل در گیاهان آبیاری شده پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی شده با غلظت‌های ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش نشان داد که محلول‌پاشی کیتوزان در شرایط بروز تنش خشکی قادر است با تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه از شدت بروز خسارت در گیاه کمای بینالودی بکاهد.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، آنتی‌اکسیدان، آنزیم، رشد رویشی، فنل

مقدمه

تنش خشکی از مهمترین عوامل کاهنده رشد و عملکرد گیاهان در بین تنش‌های غیرزنده است. این نوع تنش از توسعه سلول‌ها و به دنبال آن رشد رویشی و افزایش ارتفاع گیاه ممانعت می‌کند، حال‌آنکه بر تقسیم سلولی تأثیر کمی دارد. کاهش بیان ژن‌های دخیل در توسعه دیواره سلولی توانایی سلول‌ها را برای نمو می‌کاهد که این خود با کاهش توان رشد گیاه در شرایط تنش مطابقت دارد (۴). در شرایط تنش خشکی عدم توازن بین فرآیندهای جذب انرژی و مصرف آن توسط اندام فتوسنتزی منجر به تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست می‌شود (۳۰). گونه‌های اکسیژن فعال به دلیل میل ترکیبی بالا قادرند تا با مولکول‌های مختلف زیستی در دسترس واکنش دهند و سبب بروز آسیب‌های اکسیداسیونی متعددی نظیر اکسیده‌شدن لیپیدها و تغییر ساختار غشاها، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و غیرفعال شدن آنزیم‌ها شوند (۳). گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون‌ردوکتاز و یا تولید بیشتر این آنزیم‌ها نسبت به خنثی کردن اکسیژن‌های فعال اقدام می‌کنند (۳۹)، به‌طوری‌که افزایش غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش‌های طبیعی توسط محققان گزارش شده است (۱۴ و ۱۸).

کیتوزان‌ها در شرایط صنعتی از استیل‌زدایی جزئی کیتین حاصل از پوسته خارجی سخت‌پوستانی نظیر میگو و خرچنگ دریایی در محیط قلیایی تولید می‌شوند و خواص آنها به شرایط فرآوری آنها وابسته است (۲۲). به دلیل تأثیر کیتوزان‌ها بر بیان ژن‌های گیاهی، گزارش شده که این مواد قادرند مقاومت به برخی عوامل نامساعد محیطی را تحت تأثیر قرار دهند (۱۰ و ۱۶). برای این گروه از مواد ویژگی‌های ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، اصلاح و تقویت خاک، بهبود رشد و عملکرد، افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان گزارش شده‌است (۶ و ۲۷). نتایج تحقیقات بیانگر آن است که کیتوزان‌ها به‌طور قابل‌توجهی پایداری غشاهای سلولی گیاهان را افزایش داده و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۳۰). این مواد به دلیل افزایش هدایت روزنه‌ای و کاهش مقدار تعرق باعث افزایش مقدار

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور
(*- نویسنده مسئول: Email: Ghadirtaheri@gmail.com)

فتوسنتز شده، بر ارتفاع گیاه، طول ریشه‌ها و مقدار زیست‌توده گیاهی تأثیرگذارند (۷). محلول‌پاشی با ترکیبات کیتوزانی باعث کاهش مقدار تولید مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌های گیاهی شد که به‌عنوان کاهش مقدار خسارت در شرایط تنش خشکی تلقی می‌شود (۱). افزایش کارآیی مصرف آب (۷)، کاهش صدمه ناشی از استرس خشکی (۲۱)، افزایش مدت ماندگاری میوه‌ها (۱۵) و گلها (۲۵) و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (۳۲) با مصرف ترکیبات کیتوزانی گزارش شده‌است.

با توجه به خشکسالی‌های اخیر، گیاهان در زیستگاه‌های طبیعی در معرض انواعی از تنش‌های محیطی و به‌ویژه کم‌آبی هستند. کمای بینالودی (*Ferula flabelliloba* Rech. F. & Aell.) گیاهی چندساله، مونوکارپیک و از گیاهان دارویی و بومزاد ایران است (۹). این گیاه در تثبیت خاک دامنه‌ها نقش مهمی دارد و در سال‌های اخیر تحت تأثیر برداشت بی‌رویه، افزایش تردد و فشار دام و کاهش مقدار بارش قرار گرفته است. به منظور حمایت از گیاهان و جلوگیری از نابودی آنها، شناخت پاسخ‌های فیزیولوژیکی آنها به متغیرهای محیطی و ارائه راهکارهایی برای بهبود وضعیت رشدی آنها ضروری به نظر می‌رسد، بنابراین در این تحقیق به بررسی تأثیر تنش خشکی و نیز اثر کیتوزان بر ویژگی‌های رشد و برخی صفات فیزیولوژیکی کمای بینالودی پرداخته شده‌است.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه پاسخ گیاه کمای بینالودی به تنش خشکی و محلول‌پاشی کیتوزان در شرایط آزمایشگاه، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۱ انجام شد. در این آزمایش تنش خشکی (آبیاری در حد ظرفیت زراعی، تخلیه ۳۵ و ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی) به‌عنوان عامل اول و محلول‌پاشی کیتوزان (در غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ گرم در لیتر) به‌عنوان عامل دوم در نظر گرفته شد. بذور گیاه در طی فصل رویش (خرداد- تیر سال ۱۳۹۲) از زیستگاه طبیعی آن در رشته‌کوه بینالود جمع‌آوری و تا زمان آزمایش درون کیسه‌های نخی در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۲۵ درصد نگهداری شدند. از خاک محل رویش گیاه نمونه‌ای همگن تهیه شده و برای پرکردن گلدان‌هایی به حجم ۳/۵ لیتر مورد استفاده قرار گرفت. به‌طور کلی بافت خاک شنی- سیلتی با pH= ۷/۲ بود (به خاک گلدان‌ها هیچ نوع کود یا ماده دیگری افزوده نشد). کلیه مراحل آزمایش در اطاقک رشد (ساخت شرکت نور صنعت) با دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، دمای ۱۶ تا۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۰ درصد و شدت نور ۱۵۰۰۰ لوکس انجام شد. پس از جوانه‌زنی بذور، تعداد نه گیاهچه سالم و یکنواخت در هر گلدان باقی ماند. تیمارهای رطوبتی پس از استقرار کامل گیاهچه‌های بذری (۲۰ روز پس از کاشت) اعمال شد و همزمان محلول‌پاشی با حجم مساوی از محلول‌های کیتوزانی انجام شد به‌طوری‌که تمامی سطح اندام هوایی گیاهان به‌صورت یکنواخت اسپری شدند. این عمل یک ماه بعد مجدداً تکرار شد تا برگ‌های رویش یافته جدید نیز با محلول آغشته شوند. کلیه گلدان‌ها ۶۰ روز پس از شروع آزمایش برداشت و برای سنجش‌های مورد نظر استفاده شدند. اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی با قرار دادن نمونه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و سپس توزین شدند.

برای اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ابتدا عصاره آنزیمی به روش سایرام و ساکسنا (۲۳) استخراج گردید. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به روش وایدر و کالن (۲۸) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش بااچمپ و فریدویچ (۴) اندازه‌گیری شد. مقدار پراکسیداسیون لیپیدها به روش ژیانگ و هانگ (۱۶) و بر مبنای تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی با اسید تیوباربیتوریک انجام شد. اندازه‌گیری فنل کل به روش ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۱) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS *ver.* 17 و MSTAT-C انجام شد، مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی

اثر تیمار تنش خشکی و محلول‌پاشی با کیتوزان بر وزن خشک اندام هوایی کمای بینالودی معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) بود (جدول ۱). میانگین وزن خشک اندام هوایی ۹/۸۶ گرم در بوته به‌دست آمد. بالاترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در گیاهان آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی اندازه‌گیری شد که حدود ۳۰ درصد بیشتر از گیاهان تیمار آبیاری پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی بود. دامنه تغییرات وزن خشک اندام هوایی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان بین ۷/۳۵ تا ۱۳/۲ گرم در بوته متغیر بود، گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۴ درصد کیتوزان و تیمار شاهد به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین وزن خشک اندام هوایی بودند (جدول ۲). هرچند اثر متقابل تنش رطوبتی و محلول‌پاشی کیتوزان بر وزن خشک اندام هوایی در سطح ۵٪ غیرمعنی‌دار بود ولی گیاهان تیمار شده با ۰/۴ درصد کیتوزان و آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی دارای وزن خشک بیشتری نسبت به سایر تیمارها بودند (جدول ۳).

کاهش تولید ماده تر و خشک گیاهی و کاهش رشد اندام هوایی در شرایط کم‌آبی در گیاهان لوپن (*Lupinus albus* L.) (۲)، بادام‌زمینی (*Vigna subterranean* (L.) Verde) (۲۶) و

همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) (۲۷) نیز گزارش شده است. در تنش خشکی به علت بسته شدن نسبی روزنه‌ها، فراهمی دی‌اکسید کربن برای انجام فتوسنتز تحت تأثیر قرار می‌گیرد و مقدار تثبیت دی‌اکسید کربن و ساخت قندها کاهش می‌یابد (۱۰). علاوه بر این به دلیل تشکیل انواعی از اکسیژن‌های واکنشگر، صدمه به غشاهای سلولی افزایش می‌یابد. وجود همبستگی منفی بین مقدار وزن خشک اندام هوایی و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (جدول ۴) بیانگر بروز خسارت به غشاهای سلولی و کاهش مقدار واکنش‌های متابولیکی گیاه کمای بینالودی است که با نتایج محققان فوق مطابقت دارد.

تأثیر افزاینده محلول‌پاشی کیتوزان بر رشد اندام‌هوایی گیاهان بامیه (*Hibiscus esculentus*) (۲۰)، سیر (*Allium sativum* L.) (۱۳)، گندم (*Triticum aestivum* L.) (۳۱) و برنج (*Oryza sativa* L.) (۸) در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان گزارش شده است. غلظت‌های بالاتر کیتوزان به دلیل ایجاد لایه‌ای‌براق و چسبنده در سطح برگ‌ها باعث کاهش نفوذ نور به داخل مزوفیل، کاهش فتوسنتز و مقدار رشد گیاه می‌شود (۱۷). کاهش رشد کمای بینالودی در محلول‌پاشی با غلظت‌های بالاتر کیتوزان نیز ممکن است به دلیل کاهش اندازه روزنه‌ها، افزایش مقدار انعکاس نور خورشید و کاهش مقدار فتوسنتز باشد. به نظر می‌رسد که تأثیر غیرمعنی‌دار کیتوزان بر وزن خشک اندام هوایی کمای بینالودی در شرایط متفاوت آبیاری در این آزمایش (جدول ۱) به دلیل کاهش مقدار تعرق و تقلیل اثرات منفی تنش خشکی و یا تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان باشد. تأثیر غیر معنی‌دار محلول‌پاشی کیتوزان تحت تنش خشکی در گیاه گلرنگ (۱) نیز گزارش شده است.

فنل کل

اثر سطوح مختلف تنش خشکی، محلول‌پاشی کیتوزان و اثر متقابل تنش خشکی در کیتوزان بر مقدار فنل کل بخش هوایی گیاه معنی دار ($P\leq$۰/۰۱) بود (جدول ۱). بیشترین مقدار فنل از تیمار آبیاری تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی و کمترین آن در گیاهان تیمارشده در حد ظرفیت زراعی به‌دست آمد. براساس داده‌های تحقیق در بین سطوح مختلف محلول‌پاشی کیتوزان بیشترین و کمترین مقدار فنل به‌ترتیب در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۶ گرم در لیتر و تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۲). بالاترین مقدار فنل کل اندام هوایی در گیاهان تیمار شده با ۰/۶ گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری شده پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی به‌دست آمد ولی اختلاف آن با گیاهان تیمار شده با ۰/۴ و ۰/۶ گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری شده پس از تخلیه ۳۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی در سطح ۵٪ غیر معنی‌دار بود. کمترین مقدار این ماده نیز در گیاهان محلول‌پاشی شده با آب مقطر (شاهد) و آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی اندازه‌گیری شد (جدول ۳).

با افزایش تنش خشکی مقدار فنل گیاهان افزایش یافت. مواد فنل‌دار به‌عنوان گیرنده‌های رادیکال‌های آزاد عمل کرده و سبب افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های اکسیدانی می‌شوند (۱۹ و ۲۴). افزایش تجمع فنل‌ها در حین تنش خشکی می‌تواند به دلیل تحریک سنتز آنها از مسیر شیکیمیک اسید یا مالونیک اسید باشد (۲۱) که با مصرف بخشی از فتواسیمیلات‌های گیاهی و اختصاص کمتر آنها به مسیرهای رشدی و کاهش وزن گیاه همراه است. محلول‌پاشی با کیتوزان‌ها توانسته است به‌طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش مقدار پراکسیداسیون‌لیپیدها گردد. همبستگی منفی بین مقدار ترکیبات فنلی با مقدار تولید مالون‌دی‌آلدئید و وزن خشک اندام هوایی گیاه کمای بینالودی در این تحقیق بیانگر آن است که افزایش تولید این مواد در شرایط تنشی برای گیاهان هزینه‌بر است و از رشد گیاه می‌کاهد، ولی فنل‌ها به‌عنوان سد دفاعی در برابر تنش‌های محیطی عمل می‌کنند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس خصوصیات مورد بررسی گیاه کمای بینالودی تحت تأثیر تیمارهای آبیاری و محلول‌پاشی کیتوزان

Table 1- Analysis of variance of characters investigated in *F. flabelliloba* under irrigation and chitosan treatments

منابع تغییرات S. O. V.	درجه آزادی DF	وزن اندام هوایی Shoot D.W.	فنل کل Phenol	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	آسکوربات پراکسیداز APX	پراکسیداسیون لیپیدها MAD
آبیاری Irrigation	2	66.5**	548498**	4.39**	0.209**	0.112**	0.169**
کیتوزان Chitosan	4	40.6**	43464**	0.283**	0.064**	0.032**	0.02**
آبیاری×کیتوزان Irrigation×Chitosan	8	1.11ns	80765**	0.057**	0.22**	0.003**	0.005**
خطا Error	30	2.21	559	0.002	0.031	0.018	0.006

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و ns در سطح پنج درصد معنی‌دار نمی‌باشد.

* and ** are significantly different in 5% and 1% respectively, and ns is not significantly different

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر آن است که تنش خشکی، محلول‌پاشی کیتوزان و اثر متقابل تنش خشکی و کیتوزان تأثیر معنی‌داری (P≤۰/۰۱) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز داشت (جدول ۱). با کاهش مقدار آب در دسترس، مقدار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش یافت ولی از مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کاسته شد (جدول ۲). محلول‌پاشی با غلظت‌های بالاتر کیتوزان (۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را نشان داد و کمترین مقدار فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان شاهد مشاهده شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان بیشترین مقدار را نشان داد و گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر و تیمارهای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر و شاهد از نظر مقدار فعالیت این آنزیم در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی اندازه‌گیری شد. به‌طور کلی در گیاهان محلول‌پاشی شده با غلظت‌های ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در کلیه سطوح آبیاری مقدار فعالیت این آنزیم‌ها کمتر از گیاهان تیمار شده با ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان بود (جدول ۳). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی اندازه‌گیری شد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. کمترین مقدار فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شاهد و آبیاری شده پس از تخلیه ۳۵ درصد وزنی رطوبت ظرفیت‌زراعی به‌دست آمد ولی اختلاف آن با گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۲، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان آبیاری شده پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی غیرمعنی‌دار بود (جدول ۳). افزایش مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بیانگر بروز تنش اکسیدانی در شرایط کم آبی در گیاه کمای بینالودی است. در تنش خشکی انواعی از اکسیژن‌های فعال در گیاهان تجمع می‌یابند (۳۱). گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان سیگنال‌های سلولی عمل کرده و باعث تحریک ساخت و یا افزایش مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کمای بینالودی شده است و گیاه به این روش از خود محافظت کرده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین وزن خشک، فنل کل و مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمای بینالودی تحت تأثیر تیمارهای محلول‌پاشی کیتوزان (میلی‌گرم در لیتر) و آبیاری

Table 2- Compare mean of irrigation and chitosan (mg L^{-1}) on shoot dry weight, phenolic content and antioxidative enzyme activity in *F. flabelliloba*

تیمارها Treatment	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight ($g.plant^{-1}$)	فنل کل Phenolic content mg. g^{-1} dry) (weight	کاتالاز CAT (unit mg^{-1} fw)	سوپراکسید دیسموتاز SOD (unit mg^{-1} fw)	آسکوربات پراکسیداز APX (unit mg^{-1} fw)	مالون دی آلدئید MAD ($mM\ cm^{-1}$)
آبیاری (Irrigation)						
ظرفیت زراعی (Field Capacity)	12.1^{a}	403^{c}	0.495^{c}	0.148^{c}	0.373^{a}	0.032^{c}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)	9.47^{b}	671^{b}	1.24^{b}	0.28^{b}	0.286^{b}	0.04^{b}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)	7.97^{c}	773^{a}	1.55^{a}	0.384^{a}	0.202^{c}	0.052^{a}
کیتوزان ($mg\ L^{-1}$) (Chitosan)						
0	7.35^{c}	511^{e}	0.845^{d}	0.171^{d}	0.234^{c}	0.048^{a}
0.2	9.2^{b}	593^{d}	0.994^{c}	0.222^{c}	0.282^{b}	0.042^{ab}
0.4	13.1^{a}	664^{b}	1.12^{b}	0.245^{b}	0.376^{a}	0.037^{b}
0.6	10.3^{b}	691^{a}	1.26^{a}	0.351^{a}	0.285^{b}	0.038^{b}
0.8	9.3^{b}	619^{c}	1.25^{a}	0.364^{a}	0.229^{c}	0.038^{b}

حروف مشابه در هر ستون بیانگر تفاوت غیرمعنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05)

آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز باعث رفع مسمومیت پراکسید هیدروژن و کاهش خسارت ناشی از حضور این ماده در سلول‌های گیاهان می‌شوند و بسته به گونه گیاهی و مرحله رشدی آن مقدار فعالیت آنها متفاوت است (۱۷).

جدول ۳- مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی، فنل کل و مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمای‌بینالودی تحت تأثیر تیمارهای محلول‌پاشی کیتوزان (میلی‌گرم بر لیتر) و آبیاری

Table 3- Compare mean of irrigation * chitosan (mg L^{-1}) on Shoot dry weight, Phenolic content and antioxidative enzyme activity in *F. flabelliloba*

تیمار (Treatment)		وزن خشک اندام هوایی (Shoot dry weight (g $plant^{-1}$)	فنل کل (Phenol) mg g^{-1}) dry (weight	کاتالاز (CAT) (unit $mg^{1}fw$)	سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (unit $mg^{-1}fw$)	آسکوربات پراکسیداز (APX) (unit $mg^{-1}fw$)
آبیاری (Irrigation)	کیتوزان (Chitosan) (mg L^{-1})					
ظرفیت زراعی (FC)	0	8.89^{ab}	522^{d}	0.468^{g}	0.14^{h}	0.305^{c}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)		7.57^{b}	346^{e}	0.952^{f}	0.184^{fg}	0.219^{f}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)		5.59^{b}	667^{c}	1.11^{e}	0.189^{f}	0.178^{g}
ظرفیت زراعی (FC)	0.2	11.85^{a}	489^{d}	0.465^{g}	0.143^{gh}	0.376^{b}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)		8.76^{ab}	524^{d}	1.096^{e}	0.248^{e}	0.27^{de}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)		7.1^{b}	768^{b}	1.42^{c}	0.274^{e}	0.201^{fg}
ظرفیت زراعی (FC)	0.4	13.17^{a}	369^{e}	0.489^{g}	0.141^{gh}	0.513^{a}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)		12.11^{a}	871^{a}	1.25^{d}	0.278^{de}	0.365^{b}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)		11.18^{a}	752^{b}	1.64^{b}	0.317^{cd}	0.251^{e}
ظرفیت زراعی (FC)	0.6	12.72^{a}	322^{e}	0.511^{g}	0.157^{fgh}	0.382^{b}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)		9.50^{ab}	856^{a}	1.46^{c}	0.323^{c}	0.272^{de}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)		8.66^{ab}	894^{a}	1.82^{a}	0.574^{a}	0.2^{fg}
ظرفیت زراعی (FC)	0.8	11.03^{a}	313^{e}	0.541^{g}	0.16^{fgh}	0.291^{cd}
تخلیه ۳۵٪ ظرفیت زراعی (35% FC)		9.43^{ab}	760^{b}	1.47^{c}	0.367^{b}	0.216^{f}
تخلیه ۶۵٪ ظرفیت زراعی (65% FC)		7.42^{b}	785^{b}	1.74^{ab}	0.565^{a}	0.179^{g}

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیرمعنی‌دار بین آنهاست.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$)

مقایسه مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (جدول ۲) نشان‌دهنده آن است که حذف پراکسید هیدروژن در کمای بینالودی با کمک آنزیم کاتالاز انجام شده است. اثر تحریک‌کنندگی کیتوزان‌ها بر مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تنش خشکی در گیاه گلرنگ گزارش شده است (۱) و با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. به نظر می‌رسد که افزایش مقدار فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی در گیاه کمای بینالودی به دلیل اثر تحریک کنندگی کیتوزان‌ها بر ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد.

مقدار مالون‌دی‌آلدئید

اثر تیمار آبیاری و کیتوزان بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید موجود در اندام هوایی گیاه کمای بینالودی معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) شد (جدول ۱). با افزایش تنش رطوبتی مقدار مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت و بالاترین مقدار این ماده در گیاهان آبیاری شده پس از تخلیه ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی و کمترین مقدار آن در گیاهان آبیاری شده در حد ظرفیت زراعی به‌دست آمد (جدول ۲). در گیاهان محلول‌پاشی شده با کیتوزان بالاترین مقدار این ماده در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان اندازه‌گیری شد. هرچند که مقدار مالون‌دی‌آلدئید موجود در گیاهان تیمار شده با ۰/۶ و ۰/۸ گرم در لیتر کیتوزان کمتر از مقدار آن نسبت به سطح ۰/۴ گرم در لیتر آن بود ولی اختلاف آنها از نظر آماری در سطح ۵ درصد غیرمعنی‌دار بود (جدول ۲). افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید با افزایش شدت تنش‌های محیطی در گیاهان سیب‌زمینی (۳۱) و گلرنگ (۱) گزارش شده است. تنش خشکی با افزایش مقدار اکسیژن‌های واکنشگر باعث افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز و بالا رفتن غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بافت‌های گیاهی می‌شود (۲۹).

کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان محلول‌پاشی شده با کیتوزان در این تحقیق بیانگر کاهش صدمه به غشاهای سلولی و افزایش مقدار پایداری غشاهای سلول‌های گیاه است. به نظر می‌رسد که کیتوزان‌ها به‌عنوان سیگنالی سلولی برای وادار کردن بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش عمل کرده (۱۱) و باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی شده‌اند (۱۶).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که محلول‌پاشی کیتوزان به دلیل فعال کردن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی کمای بینالودی توانسته است تا اثرات مضر ناشی از تنش خشکی را در این گیاه کاهش داده و سبب بهبود رشد گیاه در شرایط تنش خشکی گردد. بنابراین می‌توان اظهار کرد که محلول‌پاشی کیتوزان می‌تواند باعث کاهش اثرات سوء تنش خشکی شده و به افزایش رشد گیاه منجر گردد.

جدول ٤- ضرایب همبستگی مقادیر فعالیت آنزیم‌های‌آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، پراکسیداسیون لیپیدها و وزن خشک اندام‌هوایی گیاه کمای بینالودی

Table 4- Correlation index of antioxidative enzyme activity, phenolic content, lipid peroxidation and shoot dry weight in *F. flabelliloba*

	وزن خشک اندام هوایی (Shoot D. W.)	فنل (Phenol)	کاتالاز (CAT)	سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	آسکوربات پراکسیداز (APX)	مالون‌دی‌آلدئید (MAD)
وزن خشک اندام هوایی (Shoot D. W.)	1					
فنل (Phenol)	-0.32*	1				
کاتالاز (CAT)	-0.43**	0.86**	1			
سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	-0.33*	0.74**	0.87**	1		
آسکوربات پراکسیداز (APX)	0.84**	-0.49**	-0.69**	-0.56**	1	
مالون‌دی‌آلدئید (MAD)	-0.58**	0.37*	0.51**	0.28*	-0.63**	1

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد می‌باشد

* and ** are significantly different in 5% and 1% respectively

References

1. 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 & Biology Journal of North America 2: 207-220.
2. Agarwal, S., Sairam, R. K., Srivatava, G. C., and Meena, R. C. 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. Biologia Plantarum 49 (4): 541- 550.
3. Amudha, J., and Balasubramani, G. 2010. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop

plants. Biotechnology and Molecular Biology Review 6 (2): 31-58.
4. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Annual Journal of Biochemistry 44: 276-287.
5. Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., and Fallik, E. 2003. Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. Crop Protection 22: 285-290.
6. Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S., and Nichols, E. J. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. Agricultural Forest Meteorology 107: 167-175 .
7. Boonlertinirun, S., Chaweewan, B., and Suvanasara, R. 2008. Application of chitosan in rice production. Journal of Metals, Materials and Minerals 18 (2): 47-52.
8. Chamberlain, D. F., and Rechinger, K. H. 1987. *Ferula* L. In: Flora Iranica, Umbelliferae. (eds.) Hedg I. C., Lamond J. M. and Rechinger, K. H.) 162: 387-426. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz.
9. Chen, H. P., and Xu, L. L. 2005. Progress of study on chitosan in regulating plant's growth and eliciting plant's defense responses. Acta Botanica Yunnanica 27 (6): 613-619.
10. 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 Physiolical Plantarum 31: 1129-1138 .
11. Ebrahimzadeh, M. A., and Bahramian, F. 2009. Antioxidant activity of *Crataegus pentagina* subsp. *elbursis* fruits extracts used in traditional medicine in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 12 (5): 413- 419.
12. Fawzy, Z. F., El-Shal, Z. S., Yunsheng, L., Ouyang, Z., and Omaima, M. S. 2012. Response of garlic (*Allium Sativum* L.) plants to foliar spraying of some bio-stimulants under sandy soil condition. Journal of Applied Sciences Research 8 (2): 770-776.
13. Gupta, A., and Kaur, N. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stress in plant. Journal of Bioscience 30: 761-776.
14. Hernandez-Munoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., and Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragari* X *ananassa*) quality during refrigerated storage. Food Chemistry 110: 428-435.
15. Iriti, M., and Faoro, F. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. Plant Signal Behaviors 4 (1): 66-68.
16. Jiang, Y., and Hung, B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism lipid peroxidaion. Crop Science 41: 436-442.
17. Kiddle, G. 2004. The role of ascorbate in plant defense and development. Bristol, UK: University of Bristol.
18. Mahdavi, B., Modarres Sanavy, S. A. M., Aghaalikhani, M., Sharifi, M., and Alavi Asl, S. A. 2014. Effect of Foliar Application of chitosan on growth and biochemical characteristics of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under water deficit stress. Iranian Journal of Field Crops Research 12 (2): 229-236. (in Persian with English summary).
19. Makkar, 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.
20. Mondal, M. M., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., and Ashrafuzzaman, M. 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Science 6 (5): 918-921.
21. Morello, J. R., Romero, M. P., Ramo, T., and Motilva, M. J. 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonialyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science 168: 65-72.
22. Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in Polymer Science 31 (7): 603-632.
23. 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.
24. Thomas, F. M., and Schafellner, C. 1999. Effects of excess nitrogen and drought on the foliar concentrations of allelochemicals in young oaks (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* [Matt.]. Liebl. Journal of Applied Botany 73: 222-227.
25. Uthairatanakij, A., Teixeira, J. A., and Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving *Orchid* production and quality. Science 1: 1- 5.
26. Vurayai, R., Emongor, V., and Moseki, B. 2011. Effect of water stress imposed at different growth and development stages on morphological traits and yield of bambara groundnuts (*Vigna subterranean* (L.) Verde). American Journal of Plant Physiology 6 (1): 17- 27.
27. 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 & Molecular Biology 1 (2): 108-116.
28. Weydert, C. J., and Cullen, J. J. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Natural Protocol 5 (1): 51-66.
29. Wojdyla, A. T. 2004. Chitosan (biochikol 020 PC) in the control of some ornamental foliage diseases. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 69: 705-715.
30. 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.
31. Zeng, D., and Luo, X. 2012. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. Journal of Soil Science 2 (3): 282-288.
32. 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.

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 13, No. 4, Winter. 2016, p. 728-737

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، ص. ۷۳۷-۷۲۸

Effects of Chitosan Spraying on Physiological Characteristics of *Ferula flabelliloba* (Apiaceae) Under Drought Stress

Gh. Taheri[1*]

Received: 15-02-2014
Accepted: 06-01-2015

Introduction

Ferula flabelliloba Rech. F. & Aell., (Apiaceae), a perennial plant with medicinal value, is one of important soil protective grown in Binalood mountains. Decreased precipitation in the previous years caused plants subjected to drought stress condition. Drought stress limits the growth and productivity of plants more than any other environmental factors. Drought stress can alter plant light absorption and consumption processes and increases production of reactive oxygen species (ROS). ROS is responsible for lipid peroxidation and associated injury to membranes, nucleic acids, proteins and enzymes. To detoxify ROS, plants develop different types of antioxidants to reduce oxidative damage and confer drought tolerance. ROS scavengers are either non-enzymatic (ascorbate, glutathione, flavonoids, alkaloids, carotenoids and phenolic compound) or enzymatic containing superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase. The activity of these antioxidants and enzymes allows short-term acclimation to temporary water deficit, but these biochemicals cannot overcome the effects of extreme or prolonged drought.

Chitosan is a natural biopolymer formed by low alkaline deacetylation of chitin, an important component of the exoskeletons of crustaceans such as crab, crawfish and shrimp. Chitosan can affect plant physiology and gene expression, hence these materials can increase the plant resistant to many unfavorable environmental condition. The biological properties of chitosan have led to use it for various purposes. Chitosan has been used as plant protectant against fungi, bacteria and viruses, to improve soil fertility and to stimulate plant defense system. Thus, it seems that chitosan is a promising material for improving plant growth, especially under drought stress conditions where water deficit limits plant growth and establishment. In the present study, the effects of chitosan as foliar spraying of *F. flabelliloba* with different concentrations were investigated. The main objective of this study was to examine the potential benefits of chitosan by reducing damage to *F. flabelliloba* at the seedling stages under water-deficit conditions.

Materials and Methods

In order to evaluate the effects of chitosan spraying and drought stress on physiological characteristics of *F. felabelliloba*, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted in laboratory. The experimental treatments included drought stress (irrigated in Field capacity, depletion of soil water content up to 35% and 65% of FC condition) and foliar chitosan spray (Zero, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 mg l^{-1}).

Seeds of *F. flabelliloba* were harvested in June-July of 2012 from natural habitat in Binalood mountain and kept in laboratory condition until the study started. *F. flabelliloba* seeds were germinated and grown in soils at light/dark temperature cycle of 20-16 degree centigrade and photoperiod of 16-8 h. Irrigation treatments were performed after 20 days, when seedling established and chitosan sprayed simultaneous and repeated one month later.

The shoot from 60-day-old plants were taken and used for analysis the physiological parameters. Shoot dry weight was measured in oven at 70 ºC for 24 hours. Enzyme activity was determined from the extract prepared according to the method of Sairam and Saxena (2000). Catalase and Peroxidase activities were determined according to Weydert and Cullen (2010) and Superoxide dismutase activity assayed as described by Beauchamp and Fridovich (1971). Lipid peroxidation was estimated by measuring spectrophotometrically malondialdehyde (MDA) content of plant based on Jiang and Hung (2001). Total phenolic content was determined according to Ebrahimzadeh and Bahramian (2009). Data from the experiment was analyzed using SPSS *ver*. 17 and MSTAT-C software and mean comparison was carried out using Duncan´s multiple range test at the 95% of probability.

1- Assistant Professor, Department of Plant Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran
(*- Corresponding Author Email: Ghadirtaheri@gmail.com)

Results and Discussion

Results showed that shoot dry weight of the plants maintained under depletion of soil water content up to 65% of FC decreased and total phenolic content, Malondialdehyde (MDA) concentration, the activity of Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) increased. The highest shoot dry weight was obtained in plants treated with 0.4 mg l^{-1} chitosan. The highest phenolic content, CAT and SOD activity were obtained in plants subtended in depletion of soil water content up to 65% of FC and sprayed with 0.6 and 0.8 mg l^{-1} chitosan.

Defensive mechanisms against oxidative damage related with drought stress, including production of antioxidative enzymes can be increased by exogenous application of chitosan. Chitosan may have had the beneficial effects on plant growth under water deficit stress condition, often by anti-transparent and causing the closure of stomata which conserves water. The lower amount of MDA in plants sprayed with chitosan, whether under well-watered or drought conditions, suggests that chitosan protects against oxidative damage. Moreover, our study demonstrates that application of chitosan to 0.6 mg $l^{-1,}$ increased total phenolic content in *F. flabelliloba* leaf tissue, and decreased the lipid peroxidation. The decrease in shoot dry weight against drought stress in the *F. flabelliloba* plants sprayed with 0.8 mg l^{-1} of chitosan, might be result of factors that occurred alone or in combination. High rates of chitosan can reduce plant growth by decreasing photosynthesis and the rates of some biochemical processes.

Conclusions

The Results of this study indicated that chitosan sprayed under drought condition could stimulate enzymatic and non-enzymatic anti-oxidative defence system of *F. flabelliloba* and decreased oxidative damage in water stress condition. According to the result, it can be concluded that chitosan foliar spraying can decrease harmful effects of drought stress and can be used as a plant growth enhancer for *F. Flabelliloba*.

Keywords: Anti-oxidant, Enzyme, Irrigation, Phenol, Vegetative growth