Archive of SID

نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد سیزدهم، شماره ۱(۴۹)، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۸۶ـ۷۳

تأثیر کیتوزان بر صفات فیـــزیولوژیکی و مـــــورفولوژیکی به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.) در شرایط مزرعه‌ای و درون‌شیشه‌ای

حسن نورافکن[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲

چکیده

کیتوزان از جمله محرک‌های زیستی است که باعث تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شود. در این راستا، دو آزمایش جداگانه به‌منظور بررسی اثر کیتوزان بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای انجام شد. در شرایط کشت درون شیشه‌ای، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) اضافه و اثر آنها بر خصوصیات رشدی به‌لیمو ارزیابی شد. نتایج نشان داد که کیتوزان اثر معنی‌داری بر تمام صفات مورد ارزیابی، به جز درصد گیاهان سالم، تعداد شاخساره جانبی و تعداد برگ کلروزه، دارد. در شرایط کشت بافت، با افزایش غلظت مصرفی کیتوزان، طول بلندترین شاخه، شاخص کلروفیل و طول گیاه به‌لیمو در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش و برعکس، کیتوزان در تمام غلظت‌ها باعث کاهش تعداد گره در بلندترین شاخه شد. اثر افزایشی کیتوزان بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه مثبت بوده و در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بالاترین میزان رسید. در وزن تر شاخساره، تعداد برگ و بلندترین ریشه نیز اثر مثبت کیتوزان مشاهده شد و غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر بهتری داشتند. همچنین، کاربرد کیتوزان تغییرات نامنظمی در میزان سیترال نشان داد. در شرایط مزرعه‌ای، اثر کیتوزان در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو ارزیابی و اثر مثبت غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در تعداد گل‌آذین، طول بزرگ‌ترین گل‌آذین و وزن تر برگ مشاهده شد. بنابراین، استفاده از غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در شرایط درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای به خاطر داشتن اثر مثبت بر بیشتر خصوصیات رشدی به‌لیمو قابل توصیه می‌باشد.

واژگان کلیدی: الیسیتور، سیترال، کشت بافت، کیتین، محرک زیستی.

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.

* نگارنده‌ی مسئول Nourafcan@m-iau.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به‌لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* درختچه‌ای از تیره‌ی شاه‌پسند[۱] به ارتفاع حدود ۱/۵ تا ۲/۵ متر با برگ‌های ساده سرنیزه‌ای می‌باشد. این گیاه بومی آمریکای جنوبی، شیلی، پرو و آرژانتین است و تا ۱۰۰ سال پیش فقط به‌عنوان یک گونه زینتی شناخته می‌شد (Taheri Azizabadi *et al*., 2016). امروزه، این گیاه به علت داشتن خواص دارویی، زیبایی، عطر و طعم مطبوع آن کشت می‌شود. لیمونن[۲]، سیترال[۳]، ژرانیول[۴]، سزکوئی‌ترپن‌ها[۵]، وربنون[۶]، آلدهیدها[۷] و کتون‌ها[۸] از متابولیت‌های ثانویه این گیاه می‌باشد. مونوترپن‌های اکسیژنه، مهم‌ترین گروه ترکیبات فرار به‌لیمو بوده و ۶۰ درصد آن را سیترال تشکیل می‌دهد (Nourafcan, 2018). سیترال یک آلدئید مونوترپن ($C_{10}H_{16}O$) بوده و دارای دو ایزومر Z (نرال یا سیترال b) و E (ژرانیال یا سیترال a) می‌باشد (Tran-Thi *et al*., 2006). برگ‌ها و اندام رویشی این گیاه دارای خاصیت تب‌بر، مسکن، ضد نفخ و کمک کننده به هضم غذا می‌باشد. چای به‌لیمو فوق‌العاده آرام‌بخش و تسکین دهنده اعصاب است (Oladzad *et al*., 2012).

ازدیاد به‌لیمو با بذر به خاطر وجود پدیده دگرگشنی و تفرق ژنتیکی صفات انجام نمی‌گیرد و معمولاً با قلمه یا خوابانیدن شاخه تکثیر می‌شود ولی تعداد گیاه تولیدی کم است (Nourafcan and Ansari, 2017). بنابراین، کشت بافت گیاهی روش مؤثری است که می‌تواند جهت تکثیر غیرجنسی به‌لیمو به‌صورت انبوه و عاری از آلودگی مورد توجه قرار گیرد (Taheri Azizabadi *et al*., 2016). روش‌های متعددی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. محرک‌ها[۹] ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی، باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Mehregan *et al*., 2017). استفاده از محرک‌های‌زیستی[۱۰] یکی از راه‌کارهای کاهش اثرات تنش‌های زیستی و غیرزیستی و افزایش عملکرد و کیفیت محصول است (Amiri *et al*., 2015 a). این محرک‌ها در شرایط طبیعی نیز بر گیاه اثر گذاشته و سبب تولید متابولیت خاصی می‌شوند (Mousavi *et al*., 2017). کیتوزان از جمله محرک‌های زیستی می‌باشد که باعث تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شود (Malekpoor *et al*., 2017).

کیتین و کیتوزان دو پلیمر زیستی هستند که در علوم مختلف دارویی، غذایی، کشاورزی، بیوتکنولوژی، بهداشتی، آرایشی و غیره کاربردهای فراوان دارند (Khakshoor and Pazooki, 2014). کیتوزان با فرمول شیمیایی $(C_6H_{11}O_4N)n$ از پلی‌ساکاریدهای نیتروژن‌دار است (Mehregan *et al*., 2017) که از کیتین مشتق شده (شکل ۱) و به کیتینی که بیش از ۵۰٪ گروه‌های استیل آن حذف شده باشد اطلاق می‌گردد (Lee *et al*., 2009; Alaviasl *et al*., 2016). کیتوزان یک بیوپلیمر پلی‌ساکاریدی خطی و با بار مثبت است (Kamkar *et al*., 2017) که در پوسته سخت‌پوستانی

۱-Verbenaceae
۲-Limonen
۳-Citral
۴-Geraniol
۵-Sesquiterpenes
۶-Verbenone
۷-Aldehydes
۸-Ketones

۹-Elicitors
۱۰-Bioelicitors

www.SID.ir

Archive of SID

مانند خرچنگ، میگو، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود (Lee *et al*., 2009; Mehregan *et al*., 2017). در کشاورزی، کیتوزان به‌صورت پوشش بذر، برگ، میوه و به‌عنوان کود و در کنترل آزادسازی مواد شیمیایی کشاورزی برای محافظت گیاهان در مقابل میکروارگانیسم‌ها و برای تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Malekpoor *et al*., 2017; Alaviasl *et al*., 2016; Yadollahi Dehchecsme *et al*., 2014).

اثر مثبت محلول‌پاشی کیتوزان بر رشد اندام هوایی گیاهان بامیه، سیر، گندم و برنج گزارش شده است (Taheri, 2016). این ماده باعث افزایش رشد رویشی در گیاه کلم، ذرت، لوبیا و افزایش وزن خشک اندام هوایی در گیاه گلرنگ شده است. همچنین، در بسیاری از ویژگی‌های مورفولوژیکی و رشدی مانند ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی همیشه‌بهار اثر مثبتی دارد (Mehregan *et al*., 2017). در گیاه پونه و قهوه ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک گیاه با مصرف کیتوزان افزایش می‌یابد (Malekpoor *et al*., 2017). در گوجه‌فرنگی، فلفل‌دلمه‌ای و توت‌فرنگی نیز، محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش وزن تر و خشک برگ و اندام هوایی می‌شود (Mehregan *et al*., 2017). محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش برخی صفات مورفولوژیکی ریحان بنفش از جمله سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک کل گردید ولی تأثیری بر طول ساقه و ارتفاع گیاه نداشت (Malekpoor *et al*., 2017). کیتوزان اثر مثبتی روی رشد ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ گیاهان داشته و رشد گیاهان مختلفی از قبیل کلم، جوانه‌های سویا و ریحان را تحریک می‌کند (Mahdavi *et al*., 2013). با افزایش غلظت کیتوزان تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، ارتفاع گیاه، تعداد شاخه و برگ، سطح برگ، وزن خشک گیاه، فتوسنتز، شاخص برداشت، کلروفیل، نیترات ردوکتاز و تعداد غلاف در ماش افزایش می‌یابد (Mondal *et al*., 2013).

افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، از طریق محرک‌ها در کشت سلولی گیاه، فضای مطالعاتی جدیدی باز کرده است که می‌تواند منافع اقتصادی مهم برای صنایع زیستی داشته باشد که بسیاری از این ترکیبات از ارزش بالای دارویی برخوردارند (Ayyobi *et al*., 2017). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کتین و کیتوزان، باعث تولید متابولیت‌های ثانویه و تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه می‌شود. کیتوزان به عنوان یکی از الیسیتورهای زیستی کارآمد، برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مطرح بوده (Mehregan *et al*., 2017) و باعث افزایش قندهای محلول، پرولین، فنل و فلاونوئید ریحان بنفش می‌شود (Malekpoor *et al*., 2017).

هدف از این آزمایش، مطالعه اثر کیتوزان در شرایط مزرعه‌ای و درون شیشه‌ای بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی به‌لیمو و معرفی غلظت‌های مناسب مورد استفاده کیتوزان بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های جداگانه‌ای جهت بررسی اثر محرک زیستی کیتوزان بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای انجام شد. در شرایط مزرعه‌ای نهال‌های به‌لیمو با فاصله بین ردیف ۱ متر و روی ردیف ۰/۵ متر کشت شدند. اولین محلول‌پاشی یک ماه پس از کاشت و اطمینان از استقرار گیاهان و

www.SID.ir

Archive of SID

محلول‌پاشی‌های بعدی در سه نوبت و به فواصل هفت روزه انجام شد. تیمارها شامل محلول‌پاشی با کیتوزان در چهار غلظت (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، در کنار محلول‌پاشی با آب مقطر و بدون محلول‌پاشی (شاهد) در چهار تکرار اعمال شد. یک هفته پس از آخرین محلول‌پاشی، داده‌برداری و اندازه‌گیری صفاتی مانند ارتفاع گیاه، طول و عرض برگ، محتوای کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج (مدل SPAD 502, Minolta, Japan)، طول میانگره، تعداد گره و گل‌آذین، طول بزرگ‌ترین گل‌آذین، وزن تر برگ و شاخص سطح برگ انجام گرفت.

در شرایط کشت درون شیشه‌ای، پس از انجام مراحل ضدعفونی، ریزنمونه‌ها به صورت تک گره در اندازه‌های حدود ۱/۵ سانتی‌متر برش داده و در زیر هود لامینارایرفلو[۱] درون شیشه‌های مخصوص کشت بافت، کاشته و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پنج غلظت صفر (شاهد)، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به محیط کشت MS حاوی یک گرم بر لیتر زغال فعال (Oladzad *et al*., 2012) قبل از اتوکلاو اضافه شد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل پنج واحد آزمایشی بود و در هر واحد آزمایشی سه عدد ریزنمونه بود (شکل ۲). پس از دو ماه، تعداد شاخساره، طول بلندترین شاخساره، تعداد گره در بلندترین شاخساره، تعداد برگ، درصد بوته سالم، درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه، طول بلندترین ریشه، محتوای سبزینه (کلروفیل) برگ، وزن تر شاخساره، تعداد برگ کلروزه (زرد شده)، طول گیاه و سیترال ریزنمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. به خاطر کم بودن ماده خشک اولیه، استخراج اسانس و اندازه‌گیری میزان سیترال از نمونه‌های کشت بافتی از حلال آلی (الکل اتیلیک مطلق) استفاده شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور قرائت شد (Mohebalipour, 2011).

داده‌های حاصل از آزمایش‌های کشت بافتی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و مزرعه‌ای بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

الف- کشت بافت

جدول تجزیه واریانس اثر کیتوزان بر داده‌های مربوط به صفات مورد ارزیابی در شرایط کشت بافت نشان داد که بین تیمارها به جز صفات درصد گیاهان سالم، تعداد شاخساره جانبی و تعداد برگ کلروزه (زرد شده) اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

طول بلندترین شاخه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش غلظت کیتوزان، طول بلندترین شاخه افزایش یافته و در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین طول شاخه دیده شد ولی غلظت‌های کم کیتوزان تأثیری بر طول بلندترین شاخه نداشتند. اثر مثبت کیتوزان بر رشد گیاه، احتمالاً به دلیل القای سیگنالی توسط کیتوزان برای ساخت هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین می‌باشد (Yadollahi Dehchecsme *et al*., 2014; Mahdavi *et al*., 2013). در عین حال، کیتوزان ممکن است رشد و نمو گیاه را توسط بعضی مسیرهای انتقال پیام مربوط به بیوسنتز اکسین از طریق مسیر وابسته

۱- Laminar airflow hood

www.SID.ir

Archive of SID

به تریپتوفان، افزایش دهد (Mahdavi *et al*., 2014).

تعداد گره در بزرگ‌ترین شاخه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد مصرف کیتوزان موجب کاهش تعداد گره بزرگ‌ترین شاخه شد و تمام غلظت‌های مصرفی کیتوزان با شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان دادند.

تعداد برگ: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش میزان مصرف کیتوزان تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، تعداد برگ افزایش یافته و با بالا رفتن غلظت کیتوزان به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از میزان آن کاسته می‌شود. در آزمایشی محلول‌پاشی برگی ۰/۲ گرم بر لیتر کیتوزان باعث افزایش تعداد برگ مرزه شد ولی با افزایش غلظت به ۰/۴ گرم بر لیتر اثری بر تعداد برگ نشان نداد (Salehi *et al*., 2017) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

درصد ریشه‌زایی: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد مصرف کیتوزان موجب افزایش درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های به‌لیمو شد و تمام غلظت‌های مصرفی کیتوزان با شاهد تفاوت آماری معنی‌داری داشته و در گروه آماری متفاوت قرار گرفتند.

شاخص کلروفیل برگ: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش میزان مصرف کیتوزان، شاخص کلروفیل برگ افزایش یافته و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین کلروفیل برگ مشاهده شد ولی با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت آماری نداشت و غلظت‌های کم کیتوزان تأثیری بر میزان کلروفیل برگ نشان ندادند. در تحقیقی، کاربرد کیتوزان موجب افزایش میزان کلروفیل برگ قهوه شده است (Salachna and Zawadzińska, 2014). با توجه به وجود عنصر نیتروژن در محرک کیتوزان و نقش ساختاری این عنصر در حلقه‌های تتراپیرولی کلروفیل، چنین افزایشی توجیه‌پذیر می‌باشد. از طرف دیگر، احتمالاً مصرف کیتوزان با تأثیر بر ژن‌های مسئول سازنده کلروفیل، تولید کلروفیل را زیاد نموده است (Malekpoor *et al*., 2017).

وزن تر شاخساره: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد کاربرد کیتوزان موجب افزایش وزن تر شاخساره ریزنمونه‌های به‌لیمو شد ولی در بالاترین غلظت کیتوزان مصرفی (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از میزان آن کاسته شد ولی با این حال با شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد. شاید اثر تحریک‌کنندگی کیتوزان بر رشد گیاه به دلیل افزایش جذب آب و عناصر ضروری و کاهش انباشت رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌باشد. افزایش عملکرد با مصرف کیتوزان به دلیل تأثیر آن بر تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی، بهبود رشد رویشی و افزایش تثبیت CO_2 می‌باشد (Amiri *et al*., 2015a). از طرفی، مصرف کیتوزان با تحریک رشد ساقه و ریشه و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی و انتقال بهتر این مواد در اندام گیاهی، منجر به افزایش وزن ساقه و ریشه می‌گردد (Mahdavi *et al*., 2014). همچنین، کیتوزان باعث رشد، توسعه سلولی و در نتیجه افزایش عملکرد می‌شود، کیتوزان با استفاده از افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن (نیترات‌ردکتاز، گلوتامین و پروتئازسنتتاز) و بهبود انتقال نیتروژن باعث توسعه و رشد گیاهان می‌شود (Mehregan *et al*., 2017).

طول گیاه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش غلظت مصرف کیتوزان، طول گیاهچه به‌لیمو در شرایط کشت بافتی افزایش می‌یابد و تنها غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

کیتوزان نتوانست طول گیاه را افزایش دهد. مکانیسم اثر افزایشی کیتوزان بر رشد گیاه ممکن است مربوط به وجود عنصر نیتروژن در ساختار آن باشد که در ساختارهای آمینواسیدی شرکت می‌کند. از سوی دیگر، احتمالاً کیتوزان افزایش رشد و نمو گیاه را از طریق مسیرهای سیگنالی که منجر به بیوسنتز اکسین می‌شود، تنظیم کند (Malekpoor *et al*., 2017).

تعداد ریشه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش غلظت مصرفی کیتوزان، تعداد ریشه ریزنمونه‌های به‌لیمو افزایش یافته و در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تعداد ریشه دیده شد ولی غلظت‌های کم کیتوزان تأثیری بر تعداد ریشه نشان نداد. در پژوهشی، کیتوزان باعث بهبود ریشه‌زایی قلمه‌های انگور با افزایش تعداد و طول ریشه‌های تولیدی شده است (Gornik *et al*., 2008).

طول بلندترین ریشه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با کاربرد کیتوزان در محیط کشت به‌لیمو، طول بلندترین ریشه افزایش یافته و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان می‌رسد ولی با ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر در یک کلاس آماری قرار دارد. کیتوزان به‌طور قابل توجهی پایداری غشاهای سلولی گیاهان را افزایش داده و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. این مواد به دلیل افزایش هدایت روزنه‌ای و کاهش مقدار تعرق باعث افزایش مقدار فتوسنتز شده، بر ارتفاع گیاه، طول ریشه‌ها و مقدار زیست‌توده گیاهی تأثیر می‌گذارند (Taheri, 2016).

سیترال: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با مصرف کیتوزان، میزان سیترال برگ ریزنمونه های به‌لیمو تغییرات نامنظمی نشان می‌دهد و تفاوت آماری محسوسی بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد که علت آن شاید دقت کم دستگاه اسپکتروفتومتری برای ارزیابی سیترال در مقایسه با دستگاه کروماتوگرافی گازی[۱] (GC) باشد. در ریحان کیتوزان موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل و ترپن‌دار، به‌ویژه اسید رزمارینیک و اوژنول می‌شود (Ayyobi *et al*., 2017). الیسیتورهایی مانند کیتوزان ممکن است، ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کرده و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شود (Mehregan *et al*., 2017). افزایش سطح کیتوزان تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش میزان فنول کل زرین گیاه (*Dracocephaltum kotschyi*) شد (Ayyobi *et al*., 2017). مصرف کیتوزان در گیاه پونه محتوای ۱۲ پلی‌فنول (۴ فنولیک اسید و ۸ فلاونوئید) را افزایش می‌دهد. افزایش میزان پلی‌فنول‌ها به علت تحریک آنزیم‌های بیوسنتزی از قبیل فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) و چالکون سنتتاز پلی‌فنول می‌باشد (Malekpoor *et al*., 2017).

ب- مزرعه

جدول تجزیه واریانس اثر کیتوزان بر داده‌های مربوط به صفات مورد ارزیابی در شرایط مزرعه نشان داد که بین تیمارها در تعداد گل آذین، طول بزرگ‌ترین گل‌آذین و وزن تر برگ در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

تعداد گل‌آذین: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد با افزایش غلظت محلول‌پاشی کیتوزان تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تعداد گل‌آذین

۱- Gas Chromatography

www.SID.ir

Archive of SID

به‌لیمو افزایش یافته و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از تعداد گل‌آذین کاسته می‌شود. همچنین، محلول‌پاشی با آب مقطر تفاوت معنی‌دار آماری با شاهد نشان نداد. در آزمایشی، خیساندن پیازهای فریزیا[1] در محلول کیتوزان قبل از کاشت باعث افزایش گلدهی گیاهان و افزایش تعداد گل‌آذین در بوته گردید (Salachna and Zawadzińska, 2014). یکی از راه‌کارهای مؤثر برای حفظ گیاه در شرایط تنش خشکی استفاده از مواد ضدتعرق، از جمله محرک کیتوزان می‌باشد که باعث می‌شود تبخیر آب از سطح گیاه بسیار محدود شود (Malekpoor *et al*., 2017). به نظر می‌رسد تنش خشکی از طریق کاهش سطح برگ و ریزش آنها منجر به کاهش منابع فتوسنتزی و اندام‌های زایشی گیاه می‌گردد. کاهش تعداد طبق در بوته گلرنگ در اثر تنش خشکی و افزایش آن با محلول‌پاشی کیتوزان در شرایط فوق تأیید شده است (Amiri *et al*., 2015 b). نتایج پژوهشی در گوجه‌فرنگی نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ارتفاع بوته و تعداد گل در گیاه افزایش می‌یابد (Sultana *et al*., 2017).

طول بزرگ‌ترین گل‌آذین: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان، اثرات متفاوتی بر طول بزرگ‌ترین گل‌آذین به‌لیمو داشته و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بزرگ‌ترین طول گل‌آذین را ایجاد کرد. کیتوزان ممکن است با کاهش تعرق و همچنین حفظ محتوی نسبی آب، باعث ایجاد تحمل به کم آبی گرد (Mahdavi *et al*.; 2014). کیتوزان با دخالت در مسیرهای سنتز آبسیزیک اسید باعث بسته شدن روزنه و در نتیجه کاهش تعرق شده (Malekpoor *et al*., 2017) و با حفظ آب در گیاه تولید اندام‌های زایشی را افزایش می‌دهد. در آزمایشی روی گلرنگ مشخص گردید که کیتوزان می‌تواند قطر طبق گلرنگ را افزایش دهد (Amiri *et al*., 2015 b).

وزن تر برگ: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد با افزایش غلظت محلول‌پاشی کیتوزان، وزن تر برگ به‌لیمو افزایش یافته و در ۵۰ میلی گرم بر لیتر به بالاترین میزان می‌رسد ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از وزن تر برگ کاسته می‌شود. در ضمن، محلول‌پاشی با آب مقطر تفاوت معنی‌دار آماری با شاهد نداشت. غلظت‌های بالاتر کیتوزان به‌دلیل ایجاد لایه‌ای براق و چسبنده در سطح برگ‌ها باعث کاهش نفوذ نور به داخل مزوفیل، کاهش فتوسنتز و مقدار رشد گیاه می‌شود. کاهش رشد کمای بینالودی (*Ferula flabelliloba*) در محلول‌پاشی با غلظت‌های بالاتر کیتوزان به دلیل کاهش اندازه روزنه‌ها، افزایش مقدار انعکاس نور خورشید و کاهش مقدار فتوسنتز گزارش شده است (Taheri, 2016).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی آزمایش، اثر مثبت کاربرد کیتوزان بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی به‌لیمو مرتبط با تعداد، وزن و طول ریشه، برگ، ساقه و گل و اثر منفی بر تعداد گره در بلندترین شاخه با کاهش طول میان‌گره ساقه را نشان داد. از طرفی، داشتن اثر مناسب مصرف غلظت‌های کم کیتوزان در افزایش وزن و تعداد برگ به‌عنوان اندام مورد مصرف به‌لیمو، استفاده از غلظت‌های کم کیتوزان و به خصوص غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر جهت بهبود خصوصیات مرتبط با برگ به‌لیمو قابل توصیه می‌باشد.

۱ -Freesia

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر کیتوزان بر شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های به‌لیمو

Table 1- Variance analysis of chitosan on growth indices of lemon verbena explants

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares					
		درصد گیاه سالم Normal plantlet percentage	تعداد شاخساره جانبی Lateral shoots number	طول بلندترین شاخه Longest shoot length	تعداد گره در بزرگ‌ترین شاخه Node number of longest shoot	تعداد برگ Leaf number	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage
کیتوزان Chitosan	4	8.57ns	0.32ns	559**	6.1*	25.57*	3858**
خطا Error	10	8.57	0.53	25	1.13	7.23	101
ضریب تغییرات C.V. (%)		2.95	15.25	12.68	20.61	7.78	18.63

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی‌دار

*and **significant at 5 and 1% probability levels, respectively, ns: non-significant

ادامه جدول ۱ -

Table 1- Continued

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares						
		شاخص کلروفیل Chlorophyll content	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight	طول گیاه Plantlet length	تعداد ریشه Root number	طول بلندترین ریشه Longest root	تعداد برگ کلروزه Chlorotic leaf number	سیترال Citral
کیتوزان Chitosan	4	40.27*	4283**	357*	56**	7.49**	6.38ns	0.08*
خطا Error	10	7.23	184	84	1.1	0.25	2.8	0.02
ضریب تغییرات C.V. (%)		11.04	7.4	17.73	18.44	18.63	23.44	0.82

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی‌دار

*and **significant at 5 and 1% probability levels, respectively, ns: non-significant

جدول ۲- اثر کیتوزان بر شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های به‌لیمو

Table 2- Effect of chitosan on the growth indices of lemon verbena explants

Treatment		تیمار	طول بلندترین شاخه Longest shoot length (mm)	تعداد گره در بزرگ‌ترین شاخه Node number of longest shoot	تعداد برگ leaf number	ریشه‌زایی Rooting (%)	شاخص کلروفیل Chlorophyll content (SPAD unit)
کیتوزان Chitosan	0	ppm	27.33^{b}	7.67^{a}	33^{bc}	0^{c}	22^{b}
	12.5	ppm	27.89^{b}	4.33^{b}	33.44^{abc}	47.9^{b}	21.8^{b}
	25	ppm	32.89^{b}	4.33^{b}	36.78^{ab}	47.9^{b}	21.8^{b}
	50	ppm	55.55^{a}	4.88^{b}	38.44^{a}	88.7^{a}	30.1^{a}
	100	ppm	52.22^{a}	4.55^{b}	31.33^{c}	84.9^{a}	26.1^{ab}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Means within a column followed by the same letter do not differ significantly.

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۲ -

Table 2- Continued

Treatment	تیمار	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight (mg)	طول گیاه Plantlet length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول بلندترین ریشه Longest root (mm)	سیترال Citral
کیتوزان Chitosan	0 ppm	124^{c}	40^{b}	0^{c}	0^{c}	16.6^{ab}
	12.5 ppm	203^{a}	41.5^{b}	3.9^{b}	3.4^{ab}	16.8^{a}
	25 ppm	207^{a}	51.5^{ab}	4.5^{b}	2.8^{b}	16.39^{b}
	50 ppm	214^{a}	63.5^{a}	10.7^{a}	4.1^{a}	16.75^{a}
	100 ppm	167^{b}	62^{a}	9.3^{a}	3.1^{b}	16.57^{ab}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Means within a column followed by the same letter do not differ significantly.

جدول۳- تجزیه واریانس اثر کیتوزان بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو در مزرعه

Table 3- Variance analysis of chitosan on growth indices of lemon verbena in the field

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		ارتفاع گیاه Plant height	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	شاخص کلروفیل Chlorophyll content	طول میانگره Internode length
بلوک Block	3	99.26 ^{ns}	42.3 ^{ns}	7.24 ^{ns}	19.2**	31.09 ^{ns}
کیتوزان Chitosan	5	226.5 ^{ns}	13.87 ^{ns}	1.27 ^{ns}	6.24 ^{ns}	20.9 ^{ns}
خطا Error	15	211	86.78	4.13	2.9	39.58
ضریب تغییرات C.V. (%)		12.47	8.84	7.68	4.95	15.56

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی‌دار

*and **significant at 5 and 1% probability levels, respectively, ns: non-significant

ادامه جدول ۳ -

Table 3- Continued

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		تعداد گل‌آذین Inflorescence number	تعداد گره Node number	شاخص سطح برگ Leaf area index	بزرگترین گل‌آذین Longest Inflorescence	وزن تر برگ Leaf fresh weight
بلوک Block	3	1.61 ^{ns}	1.39 ^{ns}	19844667**	2.9 ^{ns}	128.4**
کیتوزان Chitosan	5	78.5**	3.7 ^{ns}	1168013 ^{ns}	288.9**	12830**
خطا Error	15	3.4	2.39	1932822	3.94	23.4
ضریب تغییرات(%) C.V.		17.2	17.67	22.62	8.85	10.1

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی‌دار

*and **significant at 5 and 1% probability levels, respectively, ns: non-significant

www.SID.ir

Archive of SID

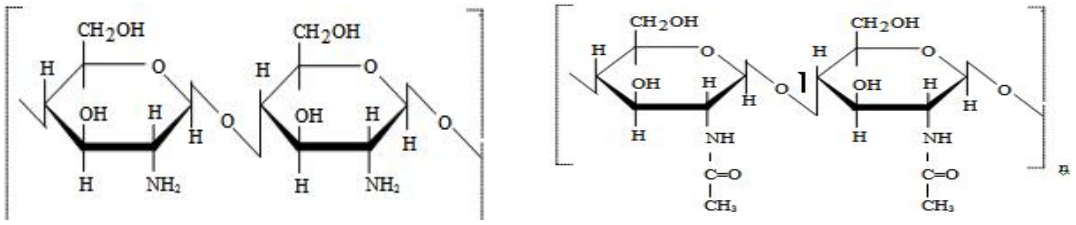
جدول ۴- اثر کیتوزان بر صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه

Table 4- Effect of chitosan on growth indices of lemon verbena in the field

تیمار Treatment	تعداد گل آذین Inflorescence number	بزرگترین گل‌آذین Longest Inflorescence (cm)	وزن تر برگ leaf fresh weight (g)
شاهد (بدون محلول‌پاشی) Control (no spray)	8.75 c	19.63 cd	9.75 de
آب مقطر Distilled water	6.75 c	23.5 b	13 d
کیتوزان ۱۲/۵ میلی گرم بر لیتر Chitosan (12.5mg/l)	12 b	22.5 bc	88.25 b
کیتوزان ۲۵ میلی گرم بر لیتر Chitosan (25mg/l)	12.25 b	17.88 d	28.75 c
کیتوزان ۵۰ میلی گرم بر لیتر Chitosan (50mg/l)	18.25 a	38 a	144.75 a
کیتوزان ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر Chitosan (100mg/l)	6.5 c	13 e	3.29 e

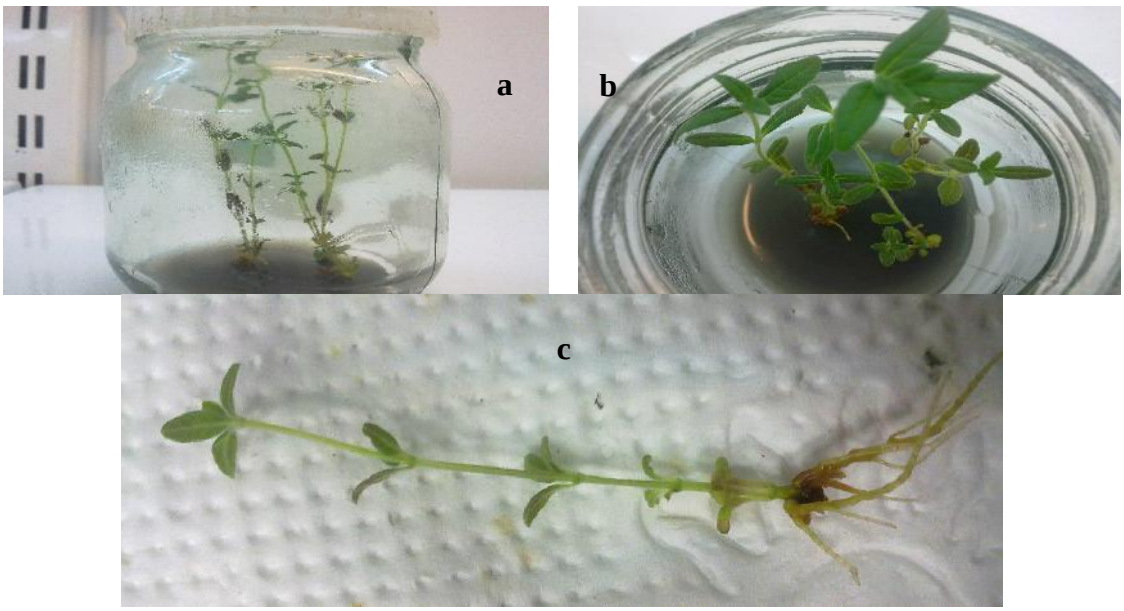
میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Means within a column followed by the same letter do not differ significantly at P<0.05.



شکل ۱- ساختمان شیمیایی کیتین (a) و کیتوزان (b)

Figure1- Chemical structures of (a) chitin and (b) chitosan



شکل ۲- کشت بافت به‌لیمو. a) استقرار در شیشه کاشت، b) شاخه‌زایی، c) گیاهچه

Figure 2- Tissue culture of lemon verbena. a) Establishment in planting glass, b) proliferation, c) plantlet

www.SID.ir

Archive of SID

References منابع مورد استفاده

- Alaviasl, S.A., S. Mansourifar, S.A.M. Modarres Sanavy, K. Sadatasilan, S.A. Tabatabaei, and M. Moradi Ghahderijani. 2016. Effect of chitosan and zeolite on growth and yield of sesame (*Sesamum indicum* L.) under different irrigation conditions in Yazd. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 9(2): 163-172. (In Persian).
- Amiri, A., A. Sirousmehr, and S. Esmaeilzadeh Bahabadi. 2015 a. Effect of foliar application of salicylic acid and chitosan on yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 28(4): 712-725. (In Persian).
- Amiri, A., P. Yadolahi, A.R. Siroosmehr, and S. Esmaeilzade. 2015b. Effect of drought stress and chitosan and salicylic spray on morphological parameters of *Carthamus tinctorius* L. in Sistan. *Journal of Oil Plants Production*. 2(1): 43-56. (In Persian).
- Ayyobi, N., B. Hosseini, and M. Fattahi. 2017. Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of zarrin-giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss. *Journal of Cellular and Molecular Researches*. 30(1): 1-13. (In Persian).
- Gornik, K., M. Grzesik, and B. Romanowska Duda. 2008. The effect of chitosan on rooting of grapevine cutting and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 16: 333-343.
- Kamkar, A., A. Khanjari, M. Oladi, and E. Molaee Aghaee. 2017. Effect of packaging with chitosan film containing *Bunium persicum* L. essential oil on chemical and microbial properties of chicken fillet. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 7(1): 104-115. (In Persian).
- Khakshoor, M.S. and J. Pazooki. 2014. Extraction of chitin-chitosan component in exoskeleton of blue swimming crab (*Portunus segnis* Furskal, 1775), Bandar Abbas beach, Persian Gulf. *Scientific Research Journal of Animal Environment*. 6(1): 11-19. (In Persian).
- Lee, D.W., H. Lim, H.N. Chong, and W.S. Shim. 2009. Advances in Chitosan Material and its Hybrid Derivatives: A Review. *The Open Biomaterials Journal*. 1: 10-20.
- Mahdavi, B., S.A.M. Modarres Sanavy, M. Aghaalikhani, and M. Sharifi. 2013. Effect of chitosan on safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed germination and antioxidant enzymes activity under water stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 26(3): 352-365. (In Persian).
- Mahdavi, B., S.A.M. Modarres Sanavy, M. Aghaalikhani, M. Sharifi; and S.A. Alavi Asl. 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).
- Malekpoor, F., A. Salimi, and A. Ghasemi Pirbalouti. 2017. Effect of bioelicitor of chitosan on physiological and morphological properties in purpule basil (*Ocimum*

www.SID.ir

Archive of SID

basilicum L.) under water deficit. *Journal of Plant Ecophysiology*. 8(27): 56-71. (In Persian).

- Mehregan, M., A. Mehrafarin, M.R. Labbafi, and H. Naghdi Badi. 2017. Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Medicinal Plants*. 2(62): 169-182. (In Persian).
- Mohebalipour, N. 2011. Effect of growth regulators on the amount of citral of *Melissa officinalis* L. ecotypes in *in vitro* culture conditions and their genetic analysis using ISSR markers. Ph.D. Thesis. University of Tabriz. 166 pp. (In Persian).
- Mondal, M.M.A., M.A. Malek, A.B. Puteh, and M.R. Ismail. 2013. Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Bangladesh Journal of Botany*. 42(1): 179-183.
- Mousavi, H., N. Mahdi Nezhad, B. Fakheri, M. Majdi, and F. Heidari. 2017. Effects of some nanoparticles on expression of germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes in *Tanacetum parthenium* L. under water deficit stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 33(2): 314-324. (In Persian).
- Nourafcan, H. 2018. Effect of salicylic acid on morpho-physiological characteristics of lemon verbena (*Lippia citriodora*) in *in vitro* and field conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*. 12(2): 303-316. (In Persian).
- Nourafcan, H. and F. Ansari. 2017. The effect of MS and B5 media on growth indices of lemon verbena in *in vitro* condition. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 48(1): 249-252. (In Persian).
- Oladzad, A., A. Qaderi, H. Naghdi Badi, and A. Zare. 2012. Rapid micropropagation of lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) using in vitro culture. *Journal of Medicinal Plants*. 2(42):145-153. (In Persian).
- Salachna P. and A. Zawadzińska. 2014. Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *Journal of Ecological Engineering*. 15(3): 97–102.
- Salehi, S., Z. Rezayatmand, and A. Ghasemi Pirbalouti. 2017. The effect of foliar application of chitosan on yield and essential oil of savory (*Satureja isophylla* L.) under salt stress. *Journal of Herbal Drugs*. 8(2): 101-108.
- Sultana, S., M. Islam, M.A. Khatun, M.A. Hassain, and R. Huque. 2017. Effect of foliar application of oligo-chitosan on growth, yield and quality of tomato and eggplant. *Asian Journal of Agricultural Research*. 11(2): 36-42.
- Taheri Azizabadi, H., N.A. Bagheri, and N.A. Babaeian Jelodar. 2016. The optimization of callus induction and regeneration in medicinal lemon verbena (*Lippia citriodora*) Plant. *Journal of Plant Process and Function*. 5(17): 53-62. (In Persian).
- Taheri, G.H. 2016. Effects of chitosan spraying on physiological characteristics of *Ferula flabelliloba* (Apiaceae) under drought stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 13(4): 728-737. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

- Tran-Thi, N.T., H. Casabianca, M. Florence, and G. Loustalot. 2006. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386: 2141–2152.
- Yadollahi Dehchecsme, P., A. Bagheri, A. Amiri, and S. Esmailzade Bahabadi. 2014. Effect of drought tension and chitosan foliar application on yield and photosynthetic pigments of sunflower (*Heliantus annuus* L.). *Crop Physiology Journal*. 6(21): 73-83. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Chitosan on Physiological and Morphological Traits of Lemon Verbena (*Lippia citriodora* L.) under *in Vitro* and Field Conditions

Hassan Nourafcan[1]*

Received: October 2018 , Revised: 26 November 2018, Accepted: 22 January 2019

Abstract

Chitosan is one of the bio-elicitors that cause physiological and morphological changes in plants. To this end, two separate experiments were carried out to investigate the effect of chitosan on morphological and physiological traits of lemon verbena under *in* vitro and field conditions. 12.5, 25, 50 and 100 ppm concentrations of chitosan were added to MS culture medium and their effects on lemon verbena growth indices were evaluated. The results showed that chitosan had a significant effect on all traits, except for the normal plantlet percentage, lateral shoots and chlorotic leaf numbers evaluated. Increasing chitosan concentrations up to 50 and 100 ppm under *in vitro* condition increased longest shoot length, chlorophyll content and plantlet length in lemon verbena explants but it reduced node numbers of the longest shoot when all concentrations of chitosan were used. Increasing the effect of chitosan on rooting percentage and root numbers were positive and reached the highest levels at concentrations of 50 and 100 ppm. It was also found that the shoot fresh weight, the leaf number and longest root have a positive effect on chitosan and had a better effect on concentrations less than 100 ppm. However, the use of chitosan showed irregular changes in the amount of citral. The effect of chitosan with 12.5, 25, 50 and 100 ppm concentrations were evaluated on growth indices of lemon verbena under field condition. The positive effect of chitosan concentration of 50 ppm was observed for inflorescence number, inflorescence length and leaf fresh weight. Because of positive effects of chitosan concentrations of 50 and 100 ppm, on most growth characteristics of lemon verbena in field and tissue culture conditions their applications could be recommended in plantations of this tree.

Key words: Bioelicitor, Chitin, Citral, Elicitors, Tissue culture.

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.
* *Corresponding Author: Nourafcan@m-iau.ac.ir*

www.SID.ir