Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (575-584)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.142319.929

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۵۸۴-۵۷۵)

ارزیابی تأثیر سطوح مختلف کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده در گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) در شرایط تنش خشکی

فرزاد طاهری[۱]، مهدی دهمرده[۲*]، محمد سالاری[۳] و رضا باقری[٤]
۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و مربی، گروه باغبانی و فضای سبز، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۰)

چکیده

امروزه کاربرد کیتوزان به‌عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌هایی همچون خشکی افزایش‌یافته است. به‌منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) در گیاه دارویی زنیان در شرایط تنش خشکی آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقاتی دانشگاه زابل اجرا شد. خشکی به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح (A1) ۵۰ میلی‌متر تبخیر (شاهد)، (A2) ۱۰۰ میلی‌متر تبخیر (تنش متوسط) و (A3) ۱۵۰میلی‌متر تبخیر (تنش شدید) از تشتک تبخیر کلاس A و سطوح مختلف محلول‌پاشی کیتوزان (شاهد، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در لیتر) به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد. در این پژوهش با افزایش دور آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز نیز افزوده گشت. تیمار شاهد و تنش متوسط در بیشتر فراسنجه (پارامتر)ها اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نداشتند اما در سطح تنش شدید بیشترین فعالیت آنزیم‌ها مشاهده شد. استفاده از کیتوزان در سطوح مختلف باعث بهبود بخشیدن فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده شد به‌طوری‌که اثر متقابل سطوح ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و تنش خشکی شدید توانست بیشتر فراسنجه‌ها را نسبت به شاهد افزایش قابل توجه دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های پاداکسنده، تنش خشکی، زنیان، کیتوزان.

Evaluate the effect of chitosan on the activities of antioxidant enzymes in Ajwain (*Carum copticum* L.) under drought stress

Farzad Taheri[1], Mehdi Dahmardeh[2*], Mohammad Salari[3] and Reza Bagheri[4]
1, 2, 3, 4. Former M. Sc. Student, Assistant Professor, Asocciate Professor and Instructor, Department of Landscape and Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
(Received: Apr. 24, 2016 - Accepted: Aug. 10, 2016)

ABSTRACT

Today, the use of chitosan as one of plant hormones to increase plant resistance to stresses such as drought has been increased. In order to evaluate the effect of different levels of chitosan on antioxidant enzyme activities in Ajwain under drought stress, the experiment was conducted as split plot based on randomized complete block design with Three replications in research farm of Zabol University in 2014. Drought as the main factor in three levels A1) 50 mm evaporation (control), A2) 100 mm evaporation (medium stress) and A3) 150 mm evaporation (severe stress) of pan evaporation class A and different levels of chitosan spray (control, 0.1, 0.5, 1, 2 g/L) were considered as Sub factor. In this study, by increasing period between two irrigations, the activities of Catalase, Peroxidase, Ascorbate Peroxidase, Gayacolperoxidase, and polyphenoixidase enzymes were increased. There was no significant difference between control and moderate stress for most parameters but maximum activities of Antioxidant Enzymes were observed in severe stress. Using different levels of chitosan caused to improve the activity of antioxidant enzymes, so that, the interaction effect of 0.5 g/l chitosan and drought stress had increased most parameters significantly than that for control.

Keywords: Ajwain, antioxdinat enzyme, chitosan, drought stress.

* Corresponding author E-mail: dahmard@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عامل‌های محیطی محدودکنندهٔ رشد و تولید گیاهان است. همان‌طور که مدل‌های کنونی تغییر اقلیم پیش‌بینی می‌کنند، پراکنش و شدت خشکی در بسیاری از مناطق جهان رو به افزایش است و همین امر نیاز به شناخت بهتر اثر خشکی بر کارکرد گیاه و به‌ویژه سازوکارهای فیزیولوژیکی و واکنش‌های گیاه در دورهٔ تنش و بازسازی پس از آن را افزایش می‌دهد. یکی از اثرگذاری‌های تنش کم‌آبی، همسان دیگر تنش‌های محیطی، ایجاد آسیب‌های اکسایشی (اکسیداتیو) است که توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل صورت می‌گیرد (Zhu, 2000). تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون چربی (لیپید)های غشاء (Chen *et al.*, 2000)، تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Jiang & Zhang, 2001). پراکسیداسیون چربی‌های غشاء می‌تواند در نتیجه گونه‌های اکسیژن فعال به وجود آید و در نتیجه موجب کاهش نفوذپذیری انتخابی غشاء یاخته‌ای شود (Del Rio *et al.*, 1991). در یاخته‌های گیاهی کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها مکان‌های مهم تولید گونه‌های اکسیژن فعال هستند (Asada, 1999). در این بین استفاده از سازوکارهایی که به کاهش آسیب این تنش منتهی شود، می‌تواند سودمند باشد، یکی از این روش‌ها که در سال‌های اخیر توجه محققان به آن معطوف شده است استفاده از بیوپلیمر کیتوزان است. کیتوزان از کیتین مشتق شده که عنصر سازنده در اسکلت خارجی سخت‌پوستان و دیوارهٔ یاخته‌ای قارچ‌ها است (Rinaudo, 2006). اهمیت کیتوزان از آنجاست که در گیاه، مانند واکسن در انسان عمل کرده، خطرهای تهدیدکننده را حذف نمی‌کند اما آن‌ها را کاهش می‌دهد، رشد را تحریک کرده، خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی دارد که در نتیجهٔ واکنش‌های چندی است که بین مولکول‌های کیتوزان و دیوارهٔ یاخته‌ای رخ می‌دهد. کیتوزان با فعال کردن شماری از آنزیم‌ها مانند فیتوالکسین‌ها و کیتینازها مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش داده و آسیب‌های ناشی از آن‌ها را کاهش می‌دهد (Agrawal *et al.*, 2002). در بررسی تأثیر تیمار کیتوران بر صفات فیزیولوژیکی ریحان، میزان ترکیب‌های ترپن‌دار، فنل کل و به‌ویژه میزان اوژنول و اسید رزمارینیک و همچنین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) افزایش یافتند (Bittelli *et al.*, 2001). کیتوزان دلیل فعالیت‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Huang *et al.*, 2005). فعالیت پاداکسندگی کیتوزان توسط چندین سازوکار توصیف شده است (Park *et al.*, 2004). بررسی‌ها نشان داد، کیتوزان فعالیت پراکسیداز و کاتالاز را در دو گونه ذرت افزایش داده است (Guan *et al.*, 2009). پیش‌تیمار بذرهای گلرنگ با غلظت‌های مختلف کیتوزان تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی داشته و با تأثیر بر سامانهٔ دفاع پاداکسندگی گیاه سبب افزایش مقاومت گیاهچه‌های گلرنگ تحت تنش کم‌آبی شد (Mahdavi *et al.*, 2011). افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانیل آمونیالیاز (PAL) تحت تأثیر کیتوزان گزارش شده است (Chakraborty *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داد، الیگومرهای کیتوزان و کیتین فعالیت‌های فنیل آلانیل آمونیالیاز (PAL) تیروزین آمونیالیاز (TAL) را در برگ‌های سویا افزایش می‌دهد (Wajahatullah *et al.*, 2003). همچنین بررسی‌های چندی تأیید کرده است که کیتوزان ممکن است قابلیتی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد (Yen *et al.*, 2008). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های OH و O^{2-} را از بین ببرد و گفته شده است که خاصیت محافظت از DNA را دارد (Harish *et al.*, 2007). هدف از این تحقیق بررسی تأثیر سطوح مختلف کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده و مقاومت به خشکی گیاه دارویی زنیان در شرایط تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسندهٔ آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه

Archive of SID

www.SID.ir

تکرار در سال ۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقاتی دانشگاه زابل اجرا شد. خشکی به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح(A1) ۵۰ میلی‌متر تبخیر (شاهد)، (A2)۱۰۰ میلی‌متر تبخیر (تنش متوسط) و(A3) ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر (تنش شدید) از تشتک تبخیر کلاس A و سطوح مختلف محلول‌پاشی کیتوزان (شاهد، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در لیتر) به‌عنوان عامل فرعی بود. قطعه زمین موردنظر در اوایل فصل پاییز ۹۲ شخم و سپس در دی‌ماه برای نرم کردن خاک و کلوخه‌ها دو بار دیسک زده شد. هر کرت دارای چهار ردیف کشت به طول ۴ متر بافاصلهٔ هر ردیف ۵۰ سانتی‌متر و روی ردیف ۲۵ سانتی‌متر بود. میزان ۱۴ کیلوگرم بذر در هکتار استفاده شد . پس از کرت بندی و پیش از کاشت، کودهای نیتروژن و فسفر و پتاسیم به ترتیب از راست (۲۰۰،۲۰۰،۱۵۰ در هکتار) به کرت‌های مربوطه اضافه شد و با خاک مخلوط شد. نصف کود نیتروژن به‌صورت سرک در زمان رشد رویشی به گیاه داده شد. کاشت به‌صورت دستی در تاریخ ۲۰ دی‌ماه ۱۳۹۲ انجام گرفت. بذرها در عمق بسیار کم، بیشینه ۰/۲ تا ۰/۵ سانتی‌متر کشت و روی آن‌ها با لایه‌ای از ماسهٔ بادی به‌منظور آسانگری در جوانه‌زنی پوشانده شد. نخستین آبیاری بی‌درنگ پس از کاشت اعمال شد. پس از آن آبیاری هر هفت روز یک‌بار به روش غرقابی و اعمال تنش خشکی با استقرار کامل گیاه انجام شد. عملیات تنک در مرحلهٔ ۴-۲ برگی انجام شد. وجین علف‌های هرز در طول دورهٔ رشد با دست طی سه مرحله صورت پذیرفت. برای تهیهٔ محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، با وزن مولکولی پایین، استفاده شد (Khan *et al*., 2003). برای این منظور در آغاز محلول استیک اسید ۱درصد تهیه، آنگاه محلول کیتوزان در اسید یادشده تهیه شد. پس از حل شدن کامل (۱ ساعت در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس)، اسیدیتهٔ محلول با NaOH به ۵/۷ رسید. اعمال محلول‌پاشی کیتوزان روی سطح برگ و در طی دو مرحله (۷ تا ۸ برگی و در زمان گلدهی) انجام شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم کاتالاز

کل محلول واکنش ۱/۵ میلی‌لیتر (۱۵۰۰ میکرولیتر) است. ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH= 7)، ۰/۱۵ میکرولیتر EDTA، ۵۴۹/۸ میکرولیتر آب را در لولهٔ آزمایش (تیوپ) ریخته و آنگاه ۳۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه شد و بی‌درنگ در دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) با طول‌موج ۲۴۰ نانومتر میزان جذب آن خوانده شد و پس از سپری شدن مدت‌زمان یک دقیقه دوباره میزان جذب خوانده شد. تغییرات جذب به‌دست‌آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $36 M^{-1}cm^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Beers & Sizer, 1952).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

۳ میلی‌لیتر محلول واکنشی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز حاوی ۲/۷۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (PH=۵)، ۱۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه، و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی است (غلظت نهایی گایاکول و آب‌اکسیژنه در محلول واکنش به ترتیب برابر است با ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار) فعالیت آنزیم با اضافه کردن آب‌اکسیژنه به محلول واکنش آغاز می‌شود. تغییرات جذب نور در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر ثبت‌شده و بر پایهٔ میزان (میلی‌مولار) تولید تتراگایاکول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. ضریب خاموشی تولید تتراگایاکول برابر ۲۶/۶ لیتر بر میلی‌مول بر سانتی‌متر است (Azevedo Neto *et al*., 2006).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

کل محلول واکنش ۱/۵ میلی‌لیتر است. ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی، ۳۷/۵ میکرولیتر آسکوربات، ۱۱۱۸/۸۵ میکرولیتر آب در لولهٔ آزمایش ریخته شد و آنگاه ۱/۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه شد و بی‌درنگ در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۲۹۰ نانومتر میزان جذب آن خوانده شد و پس از سپری شدن مدت‌زمان یک دقیقه دوباره میزان جذب خوانده شد. تغییرات جذب به‌دست‌آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر

Archive of SID

www.SID.ir

$۲/۸mM^{-1}.cm^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Nakano & Asada, 1981).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

کل محلول واکنش ۲ میلی‌لیتر است. ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی، ۸۰۰ میکرولیتر بافر سدیم، ۰/۲ میکرولیتر EDTA، ۵۰ میکرولیتر گایاکول، ۷۹۹/۸ آب به لولهٔ آزمایش اضافه شد و آنگاه ۳۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه و بی‌درنگ در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۴۷۰ نانومتر میزان جذب آن خوانده شد. تغییرات جذب به‌دست‌آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر ۲۶/۶ mM-1.cm-1 است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Nakano & Asada, 1981).

فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

کل محلول واکنش ۳ میلی‌لیتر است. ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (PH=۶/۸)، ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول اضافه شد. تغییرات جذب نور در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تعیین فعالیت آنزیم بر پایهٔ تولید پورپوروگالین از پیروگالول محاسبه می‌شود که ضریب خاموشی این تبدیل برابر ۲/۴۷ لیتر بر میلی‌مول بر سانتی‌متر است (Azevedo Neto *et al.*, 2006).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیهٔ واریانس شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم شکل‌ها و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

پاداکسندهٔ کاتالاز

اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین تأثیر محلول‌پاشی کیتوزان و اثر متقابل آن‌ها به ترتیب در سطح ۵ و۱ درصد معنی‌دار بود (جدول۱). بنا بر نتایج این آزمایش بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار تنش خشکی از سطوح تنش شدید و متوسط به دست آمد (جدول۲). در سطوح محلول‌پاشی کیتوزان هم با افزایش غلظت محلول تا سطح ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان بیشترین فعالیت این آنزیم مشاهده شد (جدول۲). نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ داده‌ها نشان داد، بیشترین اثر متقابل بین تنش و محلول‌پاشی مربوط به تنش متوسط و سطح ۲ گرم در لیتر کیتوزان بود.

پاداکسندهٔ پراکسیداز

نتایج تجزیهٔ واریانس (جدول۱) نشان داد، تأثیر تنش خشکی و محلول‌پاشی کیتوزان و برهمکنش بین آن‌ها به ترتیب در سطح احتمال ۱ ، ۵ و ۵ درصد معنی‌دار شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز را در تیمار تنش خشکی مربوط به سطوح بالا یعنی تنش شدید و متوسط نشان داد. در تیمارهای محتوای کیتوزان سطوح ۰/۵ و ۰/۱ گرم در لیتر بیشترین میزان با ۱۶/۰۵ و ۱۰/۱۴ درصد افزایش نسبت به شاهد داشتند. سطوح بالای محلول‌پاشی اثر کاهشی بر این صفت داشت تا جایی که سطح ۲ گرم در لیتر آن نسبت به شاهد کاهش یافت این کاهش احتمال دارد به خاطر سمیت غلظت‌های بالای این ماده باشد.

پاداکسندهٔ آسکوربات پراکسیداز

نتایج تجزیهٔ واریانس گویای آن است که تأثیر تنش خشکی در سطح ۵ درصد و سطوح کیتوزان و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول۱). میزان فعالیت این آنزیم با شدیدتر شدن تنش خشکی افزایش یافت به‌طوری‌که سطح تنش شدید بیشترین میزان فعالیت را داشت که نسبت به شرایط بدون تنش ۱۵/۳۰ درصد بیشتر بود (جدول۲). همچنین نتایج نشان داد، کیتوزان در سطح ۰/۵گرم در لیتر بیشترین میزان این آنزیم را داشت که نسبت به تیمار شاهد ۲۴/۳۶ درصد افزایش داشت (جدول۲). اثر متقابل بین تنش و محلول‌پاشی هم مربوط به تیمار تنش شدید و غلظت ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان مشاهده شد (شکل۳).

Archive of SID

www.SID.ir

پاداکسندهٔ گایاکول پراکسیداز

تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری در سطح ۵ درصد روی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز داشت. در این آنزیم تا سطح تنش متوسط میزان این صفت تغییر قابل توجه نسبت به شاهد نیافت، اما با افزایش شدت تنش میزان آن نیز افزایش نشان داد به‌طوری‌که در جدول مقایسهٔ میانگین (جدول۲) مشخص است بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار تنش شدید و کمترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به تیمار شاهد و تنش متوسط است. محلول‌پاشی کیتوزان بر این صفت اثر افزایشی در سطح احتمال ۵ درصد داشت، سطوح بالای کیتوزان باعث کاهش صفت موردنظر نسبت به شاهد شد. نتیجهٔ این آزمایش‌ها با محلول‌پاشی کیتوزان با دیگر نتایج به‌دست‌آمده همخوانی دارد در گیاه ریحان تحت تیمار با کیتوزان همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز توانست ROS را حذف کند و باعث بالانس هموستاتیک بین تولید و حذف ROS شود و میزان رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد، در واقع هر سه آنزیم پاداکسنده باهم فعال شده و سبب کاهش تأثیر سوء تنش اکسایشی می‌شوند (Mandal, 2010). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار تنش شدید با محلول‌پاشی ۰/۵ گرم در لیتر به‌دست آمد (شکل ۴).

پاداکسندهٔ پلی فنل اکسیداز

فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با بیشتر شدن شدت تنش این صفت افزایش یافت. بیشترین سطح فعالیت مربوط به سطح تنش شدید بود که با ۱۰/۳۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. تیمارهای حاوی کیتوزان هم در سطح ۵ درصد معنی‌دار شدند. بیشترین میزان این صفت مربوط به سطح ۰/۵گرم در لیتر و کمترین میزان آن هم مربوط به بالاترین سطح کیتوزان (۲ گرم در لیتر) به دست آمد (جدول۲). اثر متقابل بین تیمارها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (شکل۵).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس تأثیر محلول‌پاشی کیتوزان بر آنزیم‌های پاداکسندهٔ گیاه زنیان در شرایط تنش خشکی

Table 1. Analysis of variance, the effect of Chitosan foliar application on antioxidant enzymes

SOV	df	MS				
		Catalase	peroxidase	Ascorbate	Guaiacol	Polyphenol oxidase
Replication	2	4.20^{NS}	0.55^{NS}	0.69^{NS}	2.39^{NS}	0.64^{NS}
Drought stress	2	2.68**	0.9**	0.34*	0.87*	3.71*
r*a	4	1.32	0.67	0.62	0.78	0.43
Chitosan	4	1.34*	0.66*	0.52**	0.81*	0.40*
a*b	8	0.172**	0.407*	0.35**	0.14**	0.41**
Error	24	0.0475	0.158	0.087	0.219	0.104
Coefficient of Variation (%)		13.10	11.57	14.71	11.33	10.47

ns، * و ** به ترتیب نبود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

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

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر محلول‌پاشی کیتوزان بر آنزیم‌های پاداکسنده

Table 2. Comparison the average of effect of foliar application on antioxidant enzymes

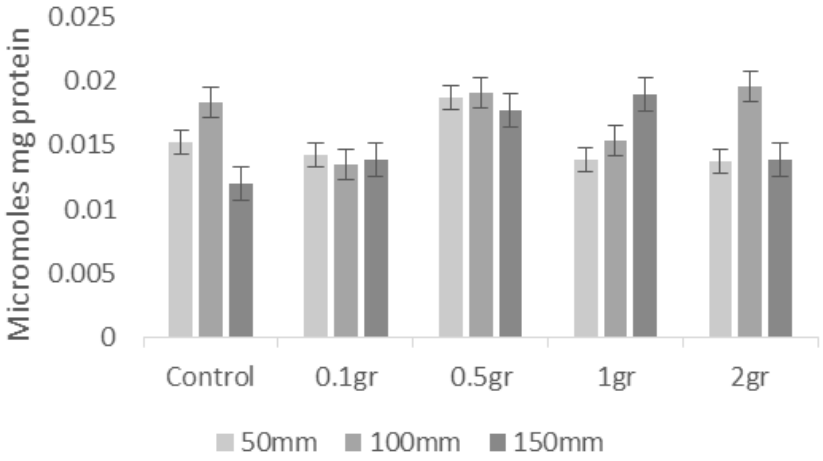
Treatments	Catalase	peroxidase	Ascorbate	Guaiacol	Polyphenol oxidase
Drought	Micromoles mg protein				
Control	0.0151b	0.0316b	0.183b	0.0399b	0.291b
100mm E	0.0171a	0.0354a	0.206ab	0.0397b	0.310ab
150mm E	0.0176a	0.0362a	0.211a	0.0440a	0.322a
Chitosan					
Control	0.0159bc	0.0319bc	0.180b	0.0401bc	0.295b
0/1gr/liter	0.0153c	0.0355a	0.178b	0.0415b	0.297b
0/5gr/liter	0.0185a	0.0380a	0.238a	0.0459a	0.345a
1gr/liter	0.0165bc	0.0351ab	0.206ab	0.0413bc	0.307b
2gr/liter	0.0170ab	0.0315c	0.198b	0.0376c	0.295b

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک، بر پایهٔ آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری نیستند.

In each column, means of a similar letters are not significant, based on LSD test at 5%.

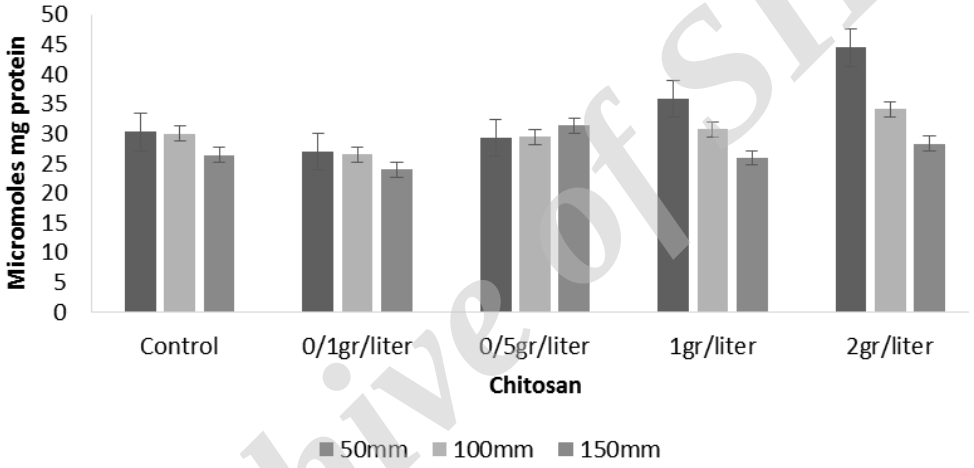
Archive of SID

www.SID.ir



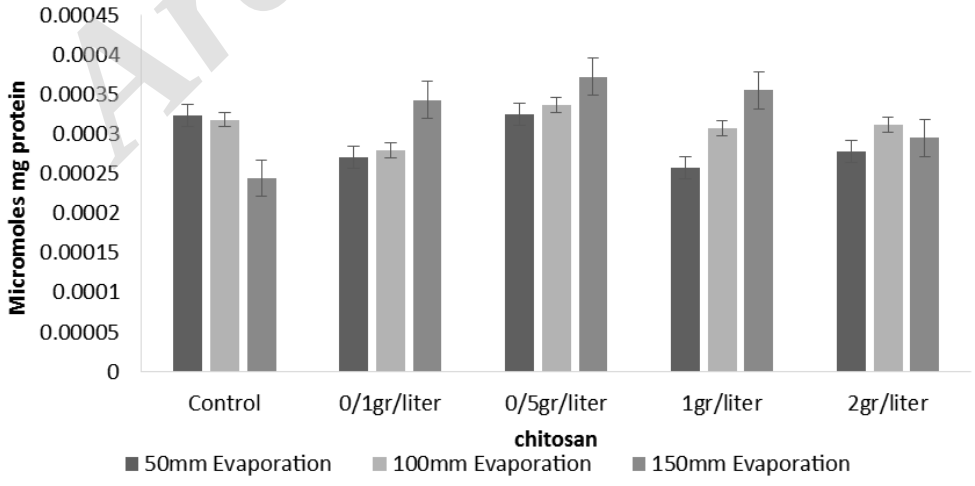
شکل ۱. اثر متقابل تنش خشکی و کیتوزان بر فعالیت آنزیم کاتالاز

Figure 1. Interaction effects of the drought by Chitosan on catalase activity



شکل ۲ .برهمکنش تنش خشکی و کیتوزان برفعالیت آنزیم پراکسیداز

Figure 2. The interaction of drought stress and chitosan on peroxidase activity



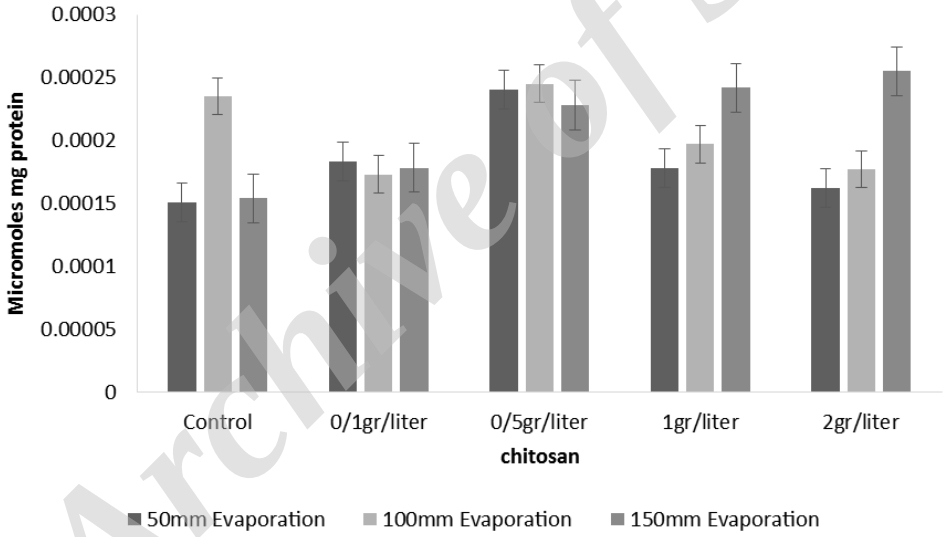
شکل ۳. برهمکنش تنش خشکی و کیتوزان برفعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

Figure 3. Interaction of drought stress and chitosan on the activity of APX

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴. برهمکنش تنش خشکی و کیتوزان برفعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز
Figure 4. The interaction of drought stress and chitosan on guaiacol peroxidase activity



شکل ۵. برهمکنش تنش خشکی و کیتوزان بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز
Figure 5. The interaction of drought stress and chitosan on the activities of ppo

بحث و نتیجه‌گیری

کمبود آب اغلب نخستین عامل محدودکننده برای تولید گیاهان زراعی و در شرایط خشک و نیمه‌خشک است (Hussain *et al.*, 2004). واکنش گیاهان به سطوح مختلف تنش آب متفاوت بوده و به‌شدت و مدت تنش، گونهٔ گیاهی و مرحلهٔ رشد و نمو آن بستگی دارد (Chaves *et al.*, 2003). هنگامی‌که تنش آب در فرآیند مرحلهٔ زایشی رخ دهد، کاهش تولید محصول بیشتر خواهد بود (Selote & Khana-Chopra, 2004).

یکی از تغییرات بیوشیمیایی در گیاهانی که در شرایط تنش‌های محیطی قرار دارند رخ می‌دهد، تولید گونه‌های اکسیژن فعال است (Dat *et al.*, 2000). در شرایط تنش آب، بسته شدن روزنه‌ها، باعث محدود شدن هدررفت آب و نفوذ دی‌اکسید کربن می‌شود. کاهش نفوذ دی‌اکسید کربن، تثبیت آن و اکسیده شدن دوبارهٔ NADP+ توسط چرخهٔ کالوین را کاهش

Archive of SID

www.SID.ir

می‌دهد (Scandalios, 1993). تنش خشکی، با افزایش انتقال الکترون به مولکول اکسیژن، موجب تولید گونه‌های اکسیژن فعال مانند رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد می‌شود (Asada, 1999). بنابراین یکی از پیامدهای پرهیزناپذیر تنش خشکی، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در اجزای مختلف یاخته مانند کلروپلاست‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها است (De Carvalho, 2008). گیاهان برای کاستن از آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال سازوکارهای پاداکسندگی دارند که شامل اجزای غیر آنزیمی مانند آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها و فلاوونوئیدها و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)کاتالاز (CAT) پراکسیداز (POX) آسکوربات پراکسیداز (APX) گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و پلی فنل اکسیداز (PPO) و گایاکول پراکسیداز (GPX) هستند (Agarwal & Pandey, 2004). فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده نقش مهمی را در پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال ایفا می‌کنند این آنزیم‌ها توانایی تحمل به تنش در گیاه را افزایش داده و پیری را به تأخیر می‌اندازند (Alscher *et al*., 2002). آنزیم‌های CAT، APX و SOD از سامانه‌های نورساختی (فتوسنتزی) گیاهانی که در معرض تنش‌های محیطی قرار گرفته‌اند، حفاظت می‌کنند (Cavalcanti *et al*., 2004). آنزیم SOD رادیکال سوپراکسید تولیدشده به‌وسیلهٔ زنجیرهٔ انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها را با تولید پراکسید هیدروژن از بین می‌برد. پراکسید هیدروژن نیز به‌وسیلهٔ آنزیم APX در بخش‌های مختلف یاخته از بین برده می‌شود (Shigeoka *et al*., 2002). آنزیم کاتالاز نیز پراکسید هیدروژن تولید در مسیرهای تنفس نوری درون پراکسی‌زوم‌ها را از بین می‌برد (Mittler, 2002). در این آزمایش تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌ها در سطوح مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود. هنگامی‌که گیاهان در معرض تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند، لازم است که همهٔ نظام‌های دفاعی برای مقابله با آسیب‌های اکسیژن فعال، فعالیت خود را آغاز کنند. در شرایط تنش خشکی، بافت‌های گیاه از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده تأثیر زیان‌بار رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد (Sharma & Dubey, 2005). در بسیاری از گیاهان مشخص‌شده که تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسیداز را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jiang & Ren, 2004). بنابراین این واکنش‌ها موجب سازگاری کوتاه‌مدت به کم‌آبی می‌شوند، اما فعالیت‌های آنزیمی و پاداکسنده‌ها نمی‌توانند روی خشکی شدید و درازمدت مؤثر باشد (Tan *et al*., 2006). امروزه فعالیت پاداکسندهٔ کیتوزان موردتوجه زیادی قرارگرفته است (Park *et al*., 2004). کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند و مشخص‌شده که خاصیت حفاظت کننده از DNA را دارد (Harish Prashanth *et al*., 2007). سازوکار خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد کیتوزان ممکن است به ساختار خاص آن مربوط باشد که از شمار زیادی گروه آمین و هیدروکسیل قابل‌دسترس تشکیل‌شده که با رادیکال‌های آزاد (ROS) واکنش نشان می‌دهد (Xie *et al*., 2001). بنا بر نتایج تحقیقات انجام‌شده، تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده و ترکیب‌های فنلی در گوجه‌فرنگی شده است (Liu *et al*., 2007). فعالیت آنزیم‌های پاداکسندهٔ کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در ریشهٔ بادمجان تحت تیمار با محرک (الیسیتور) کیتوزان افزایش‌یافته است (Mandal, 2010). کیتوزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را در دو گونه ذرت افزایش داده است (Guan *et al*., 2009). در گیاه ریحان تحت تیمار با کیتوزان همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز توانست ROS را حذف کند و باعث توازن (بالانس) هموستاتیک بین تولید و حذف ROS شود و میزان رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد، در واقع هر سه آنزیم پاداکسنده با هم فعال شده و سبب کاهش تأثیر سوء تنش اکسایشی می‌شوند. در این آزمایش هم تیمارهای حاوی کیتوزان در سطوح مختلف باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی شد . با افزایش غلظت کیتوزان تا سطح ۲ گرم در لیتر بر میزان فعالیت آنزیم‌ها تأثیر کاهشی داشت که این

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر به خاطر سمی بودن غلظت‌های بالای این ماده است. بتول مهدوی در آزمایشی تأثیر کیتوزان را بر آنزیم‌های پاداکسندهٔ گیاهچه‌های گلرنگ نشان دادند که در سطوح ۰/۰۵ تا ۰/۴ درصد کیتوزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش، اما در سطوح بالاتر سبب کاهش آن نسبت به شاهد می‌شود. به‌طورکلی می‌توان چنین نتیجه گرفت، تنش خشکی آسیب‌های شدیدی بر صفات کمی و کیفی گیاهان زراعی و باغی و دارویی وارد می‌آورد که می‌توان این آسیب‌ها را با بهره گرفتن از فنّاوری و علم روز جهان و استفادهٔ درست از منابع مانند کیتوزان، بیشترین محصول را نظر کمی و کیفی در شرایط تنش خشکی به دست آورد.

REFERENCES

1. Agarwal, S. & Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme resposes to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. - *Biologia Plantarum*, 48, 555-560.
2. Agrawal, G., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekurad, M., Kubo, A. & Saji, H. (2002). Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 1061-1069
3. Alscher, R. G., Erturk, N. & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
4. Asada, K. (1999). The water- water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photon. Annu. Rev. Plant Physiol. *Plant. Journal of Molecular Biology*, 50, 601-639.
5. AzevedoNeto, A. D., PriSco, J. T., Eneas-Filho, J., Abreu, C. E. B. & Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt. *Environ mental and Experimental Botany*, 56, 81-94.
6. Beers, G. R. & Sizer, I. V. (1952). Aspectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biological Chemistry*, 195, 133-140.
7. Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S. & Nichols, E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 107, 167-175.
8. Cavalcanti, F. R., Oliveira, J. T., Martins-Miranda, A., Viegas, A. S. & Silveira, R. A. (2004). Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt- saltstressed.
9. Chakraborty, M., Karun, A. & Mitra, A. (2009). Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 63-71.
10. Chaves, M. M., J. P. Maroco and J. S. Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought: From genes to the whole plant. Func. *Plant Biology. Collingwood*, 30(3), 239-264.
11. Chen, W. P., Li, P. H. & Chen, T. H. H. (2000). Glycinbetaine increases chilling tolerance and reduces chilling induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environment*, 23, 609-618.
12. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*57, 779-795.
13. De Carvalho, M. H. C. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav*, 3(3), 156-165.
14. Del Rio, L. A., Sevilla, F., Sandalio, L. M. & Palma, J. M. L. (1991). Nutritional effects and expression of superoxide dismutase: induction and gene expression, diagnostics, prospective protection against oxygen toxicity. *Free Radical Research. Communications*. 12-13, 819-828.
15. Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J. & Shao, C. X. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. J. Zhejiang Univ. *Plant Science*, 10, 427-433.
16. Harish Prashanth, K. V., Dharmesh, S. M., Jagannatha Rao, K. S. & Tharanathan, R. N. (2007). Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydr. Research*, 342, 190-195.
17. Huang, R. H., Mendis, E. & Kim, S. K. (2005). Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. *Journal of Biology*, 36, 120-127.
18. Hussain, A., Ghaudhry, M. R., Wajad, A., Ahmed, A., Rafiq, M., Ibrahim, M. & Goheer, A. R. (2004). Influence of water stress on growth, yield and radiation use efficiency of various wheat cultivars. *Intrnational Journal of Agriculture and Biology*, 6, 1074-1079.
19. Jiang, H. F. & Ren, X. P. (2004). The effect on SOD activity and protein content in groundnut leaves by drought stress. *Acra Agromomica Sinra*, 30, 169-174.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Jiang, M. & Zhang, J. (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative Defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology*, 42, 1265-1273.
21. Khan, W., Prithiviraj, B. & Smith, D. L. (2003). Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyaseand tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 859-63.
22. Liu, Y., Cui, Y. & Mukherjee, A. (2007). Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* spp. Carotovora that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol Microbiol*, 29(1), 219-34.
23. Mahdavi, B., Modarres Sanavy, S. A. M., Aghaalikhani, M. & 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.
24. Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Journal of Biotechnology*, 9, 8038-8047.
25. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7, 405-409.
26. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
27. Park, P. J., Je, J. Y. & Kim, S. K. (2004). Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*, 55, 17-22.
28. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and application. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
29. Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101, 7-12.
30. Selote, D. S. & Khana-Chopra, R. (2004). Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice plants. *Physiologia Plantarum*. 121, 462-467.
31. Sharma, P. & Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46, 209-221.
32. Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T. & Yabuta, Y. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1305-1319.
33. Tan, Y., Liang, Z. S., Shao, H. B. & Du, F. (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 Surface Science B*, 49, 60-65.
34. Wajahatullah, Kh., Balakrishnan, P. & Donald, S. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of. Plant Physiology*, 160, 859-863.
35. Xie, W. M., Xu, P. X. & Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11, 1699-1701.
36. Yen, M. T., Yang, J. H. & Mau, J. L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 74, 840-844.
37. Zhu, J. K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124, 941-948.

Archive of SID

www.SID.ir