

Paper Type: Original Article



## The Role of Chitosan on Some Physiological and Biochemical Properties and PAL Enzyme in Basil Plant (*Ocimum basilicum* L.) Under Salinity Stress

Nastaran Rashidi<sup>1</sup>, Ramazan-Ali Khavari-Nejad<sup>\*1</sup> , Parvin Ramak<sup>2</sup>, Sara Saadatmand<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Islamic Azad University, science and research branch, Tehran, Iran;\*(Professor: Corresponding author: ra.khavarinejad@gmail.com).

<sup>2</sup>Department of natural resources research, Agriculture and natural resources research center of Lorestan, Agricultural Research, Khorram-Abad, Iran.

### Citation:

Rashidi, N., Khavari-Nejad, R. A., Ramak, P. & Saadatmand, S. (2024). The role of chitosan on some physiological and biochemical properties and PAL enzyme in basil plant (*Ocimum basilicum* L.) under salinity stress. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 1), PP. 56-74

Received: 2023.06.07

Accepted: 2024.04.08

### Abstract

**Introduction:** Chitosan is a polysaccharide that elicits numerous defense responses in plants and affects the growth rate and increases the production of secondary metabolites. Basil (*Ocimum basilicum* L.), a medical herb, has many varieties in terms of morphology and secondary compounds. Considering the growing trend of salinity and the its risks and the importance of basil in the pharmaceutical and food industries, this study was conducted to investigate the role of chitosan on some physiological and biochemical properties and Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme in basil under salinity stress.

**Methods:** After chitosan treatments at a concentration of 200 mg/L, plants were exposed to four levels of NaCl salinity stress, 25, 50, 100 and 150 mM. The activity of PAL enzyme, physiological and biochemical responses were investigated under the effect of the interaction between chitosan and concentrations of salinity stress.

**Results:** The salinity stress has negative effects on total chlorophyll and carotenoid whereas it increased flavonoid content. In addition, chitosan at high salinity levels had a positive effect on total chlorophyll, and at all salinity levels increased carotenoids content. Catalase and peroxidase enzymes and potassium content of basil also increased in chitosan treatments, which indicates an increase defense response to salinity in plant. Chitosan also increased PAL enzyme activity, as an important parameter in the biosynthesis of phenylpropanoids, which it increased the amount of methyl cavicol of essential oil.

**Conclusion:** In general, the application of chitosan has an effect on the secondary compounds in basil to improve salt-stress tolerance.

**Keywords:** Mint family, Phenylpropanoid, Sodium chloride, Malon-di-aldehyde



## بررسی نقش کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در شرایط تنش

### شوری

نسترن رشیدی<sup>۱</sup>، رمضانعلی خاوری نژاد<sup>۲\*</sup>، پروین رامک<sup>۳</sup>، سارا سعادت‌مند<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانش آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

(\*نویسنده مسئول: [ra.khavarinejad@gmail.com](mailto:ra.khavarinejad@gmail.com))

<sup>۳</sup>استادیار، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، سازمان آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران.

<sup>۴</sup>دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

### چکیده

**مقدمه:** کیتوزان پلی‌ساکاریدی است که پاسخ‌های دفاعی گیاهان را القا کرده و بر افزایش سرعت رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه آن‌ها موثر است. ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاهی دارویی است و از لحاظ مورفولوژیکی و ترکیبات ثانویه دارای تنوع زیادی است. با توجه به روند رو به رشد شوری و خطرات ناشی از آن و اهمیت گیاه ریحان در صنایع دارویی و غذایی، این پژوهش به منظور ارزیابی اثر کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) در گیاه ریحان تحت تنش شوری انجام شد.

**روش‌ها:** پس از تیمار کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، گیاهان تحت تنش شوری در چهار سطح صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. سپس فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز، پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان تحت تاثیر کیتوزان در برهم‌کنش با سطوح مختلف تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تنش شوری اثرات منفی بر کلروفیل کل و محتوای کاروتنوئید داشت ولی باعث افزایش محتوای فلاونوئید شد. بعلاوه کیتوزان در سطوح بالای شوری موجب افزایش کلروفیل کل و در تمام سطوح شوری سبب افزایش کاروتنوئید شد. آنزیم کاتالاز و پراکسیداز و میزان پتاسیم نیز در تیمارهای کیتوزان افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش پاسخ‌های دفاعی گیاه به شوری است. کیتوزان همچنین منجر به افزایش فعالیت آنزیم PAL شد، از آنجایی که این آنزیم در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها کلیدی است میزان متیل‌کاوایکول‌اسانس را افزایش داد.

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی کاربرد کیتوزان بر ترکیبات ثانویه گیاه ریحان در جهت افزایش تحمل استرس شوری اثرگذار بود.

## مقدمه

گیاه ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. مهم ترین و اقتصادی ترین گونه خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) محسوب می شود [1]. این گیاه که یکساله، علفی، تقریباً بدون کرک و معطر با ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی متر می باشد دارای خواص دارویی بوده و از لحاظ مورفولوژی از تنوع بالایی برخوردار است. ریحان مانند سایر گیاهان هم خانواده خود منبعی از ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و دارای خواص آنتی اکسیدانی است، این ترکیبات همچنین دارای عملکرد ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی نیز می باشند [2]. اسانس ها ترکیبات پیچیده ای هستند که شامل مخلوطی از استرها، الکل ها، ترپن ها، آلدئیدها و استن ها می باشند، همچنین بو و مزه تندی داشته و چگالی آنها کمتر از آب است. این ترکیبات بسیار آب گریزند و می توانند بصورت محلول در الکل، حلال های غیر قطبی و کمی قطبی، واکس ها و روغن ها مشاهده شوند [3]. ساختار شیمیایی اسانس ها تحت تاثیر عوامل متفاوتی است که از جمله آنها می توان به موقعیت جغرافیایی و شرایط محل رشد گیاه از قبیل نوع خاک، آب و هوا، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود اشاره کرد [3]. همچنین عوامل ژنتیکی یا محیطی از قبیل فصل، مرحله ای که چینش در آن انجام می شود، مانند پیش یا پس از گلدهی، حتی ساعت چینش بر بیوسنتز اسانس ها در یک گیاه خاص اثر گذار است.

بیشترین مقدار و با کیفیت ترین اسانس در برخی اعضای متعلق به خانواده نعناعیان در مرحله شروع گلدهی، پیش از گلدهی کامل و در برخی دیگر در مرحله گلدهی کامل بدست می آید [4]، [5]. بخش عمده اسانس در گیاهان این خانواده در کرک های موجود روی اندام های هوایی مانند برگ و سرشاخه های گلدار، تجمع می یابد [6]، در ریحان به طور عمده در داخل غدد سپر مانند (Peltateglands) تولید و ذخیره می گردد و حاوی دو گروه ترکیبات عمده شامل فنیل پروپانویید و ترپنویید می باشد [3]. در میان فنیل پروپانوییدها دو ماده متیل کابیکول و متیل اوژنول از مهم ترین اجزای سازنده اسانس ریحان به شمار می روند. فراوانترین ماده تشکیل دهنده اسانس گیاه ریحان متیل کابیکول است که مقدار آن در مراحل رویشی افزایش می یابد. بیشترین میزان آن در اواخر مرحله رویشی بوده و در مرحله گلدهی به میزان قابل توجهی کاهش می یابد [1]. اوژنول به علت اثرات دفاعی که در برابر باکتری، قارچ و نماتود نشان می دهد، ترکیبی حفاظتی به شمار می رود و می تواند گیاه را در برابر حیوانات و میکروارگانیسم ها محافظت کند، این ترکیب به جز ریحان، در میخک (*Syzygium aromaticum*) و دارچین (*Cinnamomum verum*) نیز به وفور یافت می شود. این ماده یک ترکیب آرام کننده و ضد درد است که در دندان پزشکی برای آرام کردن درد دندان کاربرد داشته و نیز خاصیت ضد اکسایشی بسیار قوی دارد که در جذب و خنثی کردن رادیکال های آزاد نقش مهمی ایفا می کند [7]. اوژنول بوسیله آنزیم اوژنول-O-متیل ترانسفراز به متیل اوژنول ( $C_{11}H_{14}O_2$ ) تبدیل می شود که در جذب حشرات و گرده افشانی دخالت دارد و به عنوان ترکیبی مشابه فرومون حشره ماده در بعضی از گیاهان عمل می کند [8].

کیتوزان (β، α و ۴ دی گلوکز آمین) یک پلی ساکارید پلی کاتیونی و یک الیسیستور زیستی است که از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه های قارچی، میگو و خرچنگ بوده و از داستیلاسیون بخشی از کیتین (۱۵ تا ۹۰ درصد) به دست می آید. کیتوزان پاسخ های مختلف گیاهان (مانند افزایش میزان  $Ca^{2+}$  سیتوزول، فعال شدن پروتئین کینازهای فعال شونده توسط میتوزن ها (MAP-K)، ایجاد کالوس، انفجار تنفسی، سنتز آبسزیک اسید (ABA) و جاسمونات) برای مقاومت در برابر استرس های غیرزیستی و عفونت ها را القا می کند و بر افزایش سرعت رشد گیاهان و مقدار محصول و مدت زمان نگهداری گل و میوه ها و تحریک افزایش تولید متابولیت های ثانویه موثر است [9]. ترکیب کیتوزان، زمان استفاده و غلظت آن میزان اثرگذاری آن را تحت تاثیر قرار می دهد. علاوه بر آن کیتوزان باعث تولید گروه های اکسیژن فعال (ROS) در پاسخ به پاتوزن ها می شود. ROS های تولید شده در سلول های گیاهی به وسیله سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می شوند. کنترل سطح آنتی اکسیدان ها به وسیله سیستم های آنتی اکسیدانی حاصل می شود که شامل متابولیت هایی چون گلوکاتایون، آسکوربات، آلفاتوکوفرول، هیدروکوئینون ها، بتاکاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم های جاروبگر ROS مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز می باشد [10]. این آنزیم ها نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن ROS ها و حفاظت سلول ها در مقابل اثرهای مخرب آن در جلبک ها و گیاهان عالی دارند [11] و بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می کند. کیتوزان اخیراً به دلیل فعالیت های آنتی اکسیدانی در این زمینه توجه زیادی را به خود جلب کرده است [12]. این ترکیب همچنین باعث مقاوم شدن گیاهان در برابر پاتوزن ها با افزایش میزان فیتوالکسین های پلی فنلی بعلت فعال کردن مسیر سنتز فنیل پروپانوییدها می شود و این کار را با فعال کردن آنزیم های کلیدی فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL) و چالکون سنتاز (CHS) مسیر فنیل پروپانویید انجام می دهد [13].

شوری یکی از تنش های مهم در کاهش عملکرد گیاهان محسوب می شود که باعث بروز اختلالاتی در فرآیندهای حیاتی گیاه مثل جذب و انتقال مواد غذایی، تعرق، فتوسنتز، متابولیسم نیتروژن و کربن می شود. همچنین، فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بیوسنتز متابولیت های اولیه و ثانویه را تحت تأثیر قرار می دهد [14]، [15]. از طرفی اهمیت حضور برخی از ایسیستورها مانند کیتوزان به عنوان یک ماده سازگار با محیط برای کاهش اثرات تنش های مختلف و موثر در القای مسیرهای مربوط به بیوسنتز متابولیت های ثانویه تایید شده است. با توجه به روند رو به رشد شوری در کشور و خطرات ناشی از آن برای گیاهان و از طرف دیگر اهمیت گیاه ریحان در صنایع دارویی و غذایی، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر کیتوزان در تعدیل اثرات زینبار تنش شوری در گیاه ریحان به اجرا درآمد. برای این منظور فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)، آنزیم کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنیل- پروپانوئید (مانند متیل کاپیکول و متیل اوژنول) اسانس، و پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان تحت تأثیر ایسیستور کیتوزان در برهم کنش با سطوح مختلف تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش می تواند نقش مهمی در بکارگیری کیتوزان جهت پرورش گیاه ریحان در خاک های شور که بخش بسیاری از اراضی جهان و از جمله ایران را به خود اختصاص داده است، داشته باشد.

### مواد و روش ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار همراه با پلات اصلی: غلظت های شوری؛ ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مول NaCl شرکت مرک و پلات فرعی: اسپری کیتوزان ۰/۲ و صفر درصد در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان انجام پذیرفت. برای این پژوهش بذره های گیاه ریحان (*Ocimum basilicum L.*) از موسسه بذر و نهال کرج تهیه شد. بذره های یکنواخت و همگن انتخاب و برای جلوگیری از آلودگی قارچی توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از این مرحله بذرها درون ظروف پتری سترون حاوی یک لایه کاغذ صافی قرار گرفته و با ورق آلومینیومی پوشانده شدند. بعد از اینکه بذرها جوانه زدند (حدوداً بین ۱۴ تا ۲۰ روز)، از بین آنها، بذره های جوانه زده یکنواخت انتخاب و به گلدان های از جنس پلاستیک با قطر تقریباً ۳۰ و ارتفاع ۱۷ سانتی متر، حاوی ماسه مرطوب شده با آب مقطر (به تعداد ۶ بوته در هر گلدان) منتقل شدند. گلدان ها به مدت ۲۰ روز با محلول هوگلند آبیاری و سپس به دو گروه جهت اعمال تیمارها تقسیم شدند: در تیمار اول، گلدان ها در ابتدا در دو مرحله به فاصله ۳ روز با کیتوزان ۰/۲ درصد اسپری شدند، و در نهایت ۳ روز پس از آخرین اسپری کیتوزان، تحت تیمار کلرید سدیم (NaCl) در غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار (۲۰۰ میلی لیتر برای هر گلدان) قرار گرفتند. در تیمار دوم، گلدان ها فقط تحت تیمار NaCl در غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مول قرار گرفتند. در طول دوره تیمار دهی، هفته ای سه بار گلدان ها که در گلخانه نگهداری شدند با محلول غذایی مورد نظر (محلول هوگلند به همراه تیمارهای کلرید سدیم) آبیاری شد. روشنایی مورد نیاز با استفاده از لامپ های معمولی فلورسنت و تنگستن تامین شد. درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی گراد در شب بود. طول دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت تنظیم شد. به منظور به حداقل رساندن اثرات میکروکلیمایی در محیط رشد گیاه در گلخانه، گردش وضعی و جابه جایی تصادفی گلدان ها به صورت روزانه در دوره رشد انجام پذیرفت.

### سنجش شاخص های رشد

گیاهان ۴۰ روزه جهت سنجش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برداشت شدند. برخی خصوصیات مورفولوژیک گیاه از قبیل وزن تر و وزن خشک ساقه و ریشه گیاه اندازه گیری شد. پس از جداسازی ریشه و ساقه نمونه ها، وزن تر آن ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ اندازه گیری شد. اندام های ریشه و ساقه گیاه به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک و وزن خشک آنها محاسبه گردید.

## سنجش رنگیزه های فتوسنتزی

سنجش کلروفیل ها و کاروتنوئیدها با استفاده از روش Stoeva و همکاران (۲۰۰۵) [16] محاسبه شد. جذب عصاره های استونی در سه طول موج (۶۴۶/۶، ۶۶۳/۶ و ۶۶۳/۳) با استفاده از اسپکتروفوتومتر انجام و غلظت رنگیزه ها بر حسب میلی گرم در گرم  $\text{mg.g}^{-1}$  وزن گیاه تازه بدست آمد [17]. محتوای کلروفیل کل بصورت زیر محاسبه شد.

$$\text{Chlorophyll a (g ml}^{-1}\text{)} = 12.25 \times A_{663.6} - 2.55 \times A_{646.6}$$

$$\text{Chlorophyll b (g ml}^{-1}\text{)} = 20.31 \times A_{646.6} - 4.91 \times A_{663.3}$$

$$\text{Total Chlorophyll (g ml}^{-1}\text{)} = 17.76 \times A_{646.6} + 7.34 \times A_{663.6}$$

مقدار کاروتنوئید نیز با استفاده از فرمول زیر بدست آمد [17].

$$\text{Carotenoids} = 100 (A_{470}) - 3.27 (\text{mg chl. a}) - 104 (\text{mg chl. b}) / 227$$

## سنجش یون های سدیم و پتاسیم

برای سنجش یون های سدیم و پتاسیم یک گرم از ماده خشک گیاهی در یک کروزه چینی قرار داده و درون کوره الکتریکی گذارده تا خاکستر شد. نمونه ها از کروزه خارج و به دسیکاتور انتقال داده شد تا سرد شوند. آنگاه به نمونه های سرد شده مقدار ۱۰ میلی لیتر HCL دو مولار اضافه شد و بعد از اتمام فعل و انفعالات، کروزه ها را روی بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا هضم کامل صورت پذیرد و اولین بخارات سفید خارج گردد. محتویات هر کروزه را با استفاده از کاغذ صافی به درون بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری صاف نموده و سپس با استفاده از آب مقطر بالن به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. غلظت عناصر سدیم و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر (مدل JENWAY PFP7) اندازه گیری شد. جذب نمونه ها برای پتاسیم در طول موج ۷۶۶/۵ نانومتر و برای سدیم در طول موج ۵۸۹ نانومتر قرائت شد. غلظت عناصر سدیم و پتاسیم نمونه ها در مقایسه با منحنی کالیبراسیون محلول های استاندارد، بر حسب میلی گرم در گرم ماده خشک محاسبه شدند [18].

## محتوای مالون دی آلدئید

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از روش Health و Packer (۱۹۸۶) [19] بود. میزان پراکسیداسیون لیپید در بافت ها از طریق تعیین محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در واکنش با تیوباربیتوریک اسید سنجیده شد. برای این منظور ۰/۲ گرم بافت تازه ریشه در ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در  $\text{g} \times 10000$  سانتیفریوژ شد. به یک میلی لیتر از محلول رویی حاصل از سانتیفریوژ، ۴ میلی لیتر TCA ۰/۲ که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در  $\text{g} \times 10000$  سانتیفریوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت (MDA) از ضریب خاموشی معادل ( $\text{cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \times 0.155$ ) استفاده و بر اساس واحد ( $\mu \text{mol g}^{-1} \text{F.W.}$ ) بیان شد.

## سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Biles و Abeles (۱۹۹۱) [20] استفاده شد که در این روش از بافر تریس گلايسین سرد برای عصاره گیری استفاده و پس از افزودن عصاره به دست آمده به لوله های حاوی بافر استات سدیم ۰/۴ مولار با pH ۵، آب اکسیژنه ۳ درصد و بنزیدین ۲ درصد در متانول ۵۰ درصد تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد.

### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Pereira و همکاران (۲۰۰۲) [21] استفاده شد. بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان کاهش  $H_2O_2$  با مطالعه تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش بافر تریس ۵۰ میلی مولار (یا بافر فسفات پتاسیم ۷/۵ pH، ۱۰۰ میلی مولار) و آب اکسیژنه ۲۵ میلی مولار می باشد.

### تعیین میزان فلاونوئیدها

میزان فلاونوئید با استفاده از آزمون رنگ سنجی کلرید آلومینیوم Zou و همکاران (۲۰۰۴) [22] و Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) [23] ارزیابی شد. عصاره متانولی با آب مقطر و نیترات سدیم مخلوط و پس از ۶ دقیقه به آن کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و هیدروکسید سدیم ۱ مولار اضافه شد، پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب در ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

### تعیین میزان فنل کل

میزان فنل کل به وسیله معرف Folin-Ciocalteu و بر اساس روش Chun و همکاران [23] تعیین شد. عصاره استونی به دست آمده با معرف Folin-Ciocalteu و کربنات سدیم مخلوط شد و پس از نیم ساعت میزان فنل کل با استفاده از روش رنگ سنجی در ۷۱۵ نانومتر تعیین گردید.

### سنجش فعالیت آنزیم PAL

سنجش فعالیت آنزیم PAL از روش Zimmermann و Hahlbrock (۱۹۷۵) [24] و با استفاده از سوبستره فنیل آلانین و دستگاه اسپکتروفوتومتری انجام شد. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز از ۳۰۰ میلی گرم برگ تازه با استفاده از ۶/۵ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولی Tris-HCl (pH ۸/۸) حاوی ۱۵ میلی مول بتامرکاپتو اتانول که درون هاون سرد شده با یخ به مدت ۵ دقیقه ساییده شد، به دست آمد. ماده همگن شده به مدت ۳۰ دقیقه در  $5000 \times g$  سانتیفریوژ شد و از محلول رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تولید سینامیک اسید بر اساس روش Wannig و همکاران (۲۰۰۶) [25] بدست آمد. بطور خلاصه مقدار ۱ میلی لیتر از بافر استخراج شده، ۰/۵ میلی لیتر از ال- فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره آنزیمی به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار خاتمه یافت و سپس ۱۵ میلی لیتر اتیل استات به آن افزوده شد و با تبخیر حلال استخراج کننده خارج گردید. باقیمانده جامد در ۳ میلی لیتر سود ۰/۰۵ مولار حل شد. غلظت سینامیک اسید با جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت یک واحد آنزیم به عنوان مقدار آنزیم تولید کننده ۱ میکرومول سینامیک اسید در یک دقیقه تعریف شد و به صورت میکرو مول سینامیک اسید/ میلی گرم پروتئین / دقیقه بیان گردید [26].

### استخراج و آنالیز ترکیبات فنیل پروپانوئید اسانس

روش ریز استخراج با فاز جامد ((Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME)) دارای حساسیت بالاتری نسبت به روش اسانس گیری مرسوم است و قابلیت جداسازی آنالیت های گیاهی در حد ppm و ppb را دارد. در این تحقیق چون مقدار گیاهان در دسترس کم بود از این روش برای استخراج اسانس استفاده گردید. از فیبرهای گیاه ریحان با اندازه های ۱۰۰ میکرومتری با وزن ۰/۵ گرم استفاده شد. استخراج اسانس در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در مدت ۲۰ دقیقه، سپس سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Euronda ایتالیایی برای هموژن کردن اسانس حاصل، انجام شد و اسانس آماده آنالیز گردید. آنالیز اسانس به روش Adam (۲۰۱۰) [27] و با استفاده از دستگاه آنالیتیک GC/MS انجام شد. همچنین تغییرات کمی مهمترین ترکیبات اسانس با استفاده از HPLC و یا GC به روش Tsantili و همکاران (۲۰۱۰) [12] مورد سنجش قرار گرفت. در این مطالعه از دستگاه گاز کروماتوگراف جرمی GC مدل Agilent 6890N به همراه سنجش گر جرمی مدل Agilent 5973 استفاده شد. برای آنالیز جرمی اسانس از ستون کروماتوگرافی HP-5 با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر بعنوان فاز ثابت استفاده شد. تزریق اسانس به مدت ۳ دقیقه با استفاده از انژکتور دائم/ منقطع split/splitless انجام گرفت. دمای ستون در طول آنالیز در جدول ۱ آورده شده است. در طول انجام آنالیز از گاز هلیوم (He 99.999 percent) بعنوان حامل استفاده شد. دمای تزریق اسانس ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود و سرعت حرکت گاز هلیوم در ستون کروماتوگرافی ۰/۹ میلی متر در دقیقه (ml/min) تنظیم گردید. در آنالیز اسانس گیاه ریحان از کتابخانه Wiley7n بعنوان کتابخانه استاندارد داخلی استفاده شد.



جدول ۱- دمای ستون مورد استفاده در این مطالعه

Value (°C/min)	Temperature (°C)	Hold (minute)
0	50	0.00
5	180	0.00
10	250	0.00

## تجزیه و تحلیل آماری

داده های بدست آمده در این پژوهش با روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین (تعقیبی) توسط نرم افزار آماری SAS نسخه ۶/۲ مورد بررسی قرار گرفت. همبستگی صفات و آنالیز تجزیه مولفه های اصلی با نرم افزار IBM SPSS Statistics 26 محاسبه و برای ترسیم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

## شاخص های رشد

با افزایش سطح شوری وزن تر شاخساره در گیاه ریحان به طور معنی داری کاهش یافت و به پایین ترین مقدار خود (۰/۵ گرم) در شدیدترین حالت تنش (۱۵۰ میلی مولار نمک) رسید. استفاده از کیتوزان سبب افزایش معنی دار وزن تر شاخساره نسبت به عدم کاربرد آن شد. بیشترین تاثیر کیتوزان در شرایط عدم کاربرد شوری (شاهد) مشاهده شد که وزن تر شاخساره را نسبت به شاهد حدود ۴۰ درصد افزایش داد (شکل ۱ A). نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات اصلی شوری و کیتوزان بر وزن تر ریشه معنی دار نشد، اما اثر متقابل شوری×کیتوزان در سطح پنج درصد آماری بر وزن تر ریشه معنی دار شد (جدول ۲).

اثر کیتوزان بر وزن تر ریشه در سطوح مختلف شوری متفاوت است، بدین صورت که در سطوح صفر و ۱۰۰ میلی مولار شوری، کاربرد کیتوزان سبب کاهش معنی دار وزن تر ریشه نسبت به شاهد شد و در سطوح ۲۵ و ۱۵۰ میلی مولار شوری، کاربرد کیتوزان نسبت به عدم کاربرد آن سبب افزایش معنی دار وزن تر ریشه شد (شکل ۱ B). با افزایش تنش شوری تا سطح ۲۵ میلی مولار وزن خشک شاخساره افزایش و پس از آن به طور معنی داری کاهش یافت و در سطوح صفر و ۲۵ میلی مولار شوری استفاده از کیتوزان سبب کاهش معنی دار وزن خشک شاخساره نسبت به شاهد شد، درحالی که در شدیدترین حالت تنش (۱۵۰ میلی مولار) کاربرد کیتوزان (۰/۱۲ گرم) نسبت به عدم کاربرد آن (۰/۰۷ گرم) سبب افزایش معنی دار وزن خشک شاخساره شد (شکل ۱ C). همانند وزن تر ریشه، در سطوح ۲۵ و ۱۰۰ میلی مولار شوری، کاربرد کیتوزان سبب کاهش معنی دار وزن خشک ریشه شد، اما در سطوح صفر و ۱۵۰ میلی مولار شوری کاربرد کیتوزان وزن خشک ریشه را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۱ D).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس پارامترهای اندازه گیری شده در ریحان تحت تاثیر تنش شوری و کیتوزان.

Table 2- Results of analysis of variance of measured parameters in basil under salinity stress and chitosan.

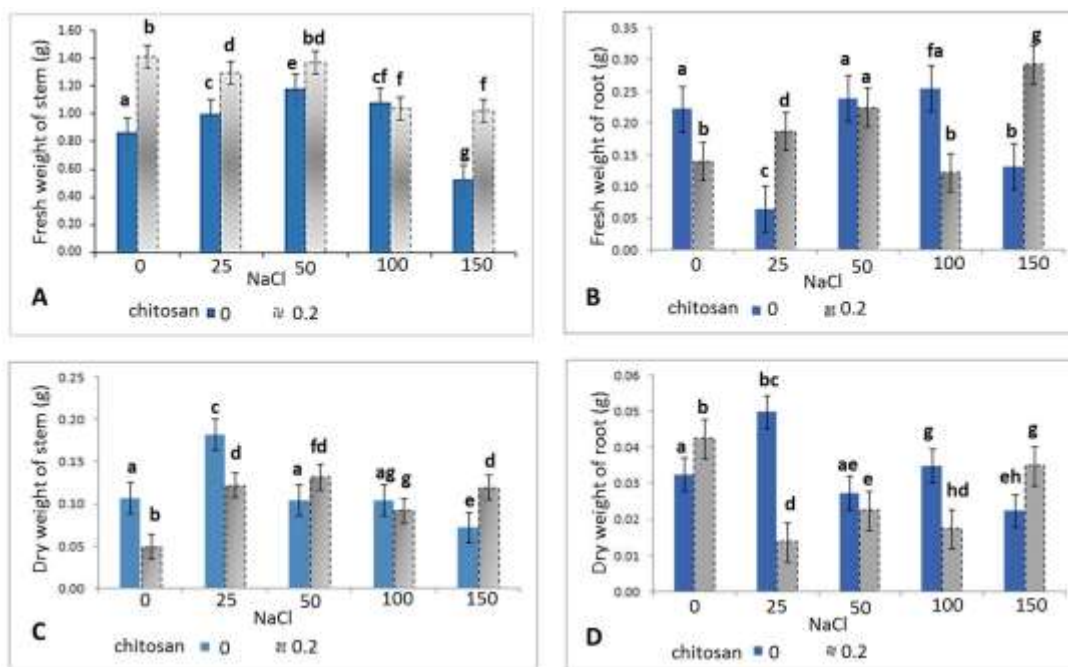
Source of Variation (SOV)	df	T.phenol (mg. g <sup>-1</sup> FW)	Catalase (OD min <sup>-1</sup> g FW)	Peroxidase (OD min <sup>-1</sup> g FW)	MDA (μ mol g <sup>-1</sup> FW)	Sodium content (mg. g <sup>-1</sup> DW)	Potassium content (mg. g <sup>-1</sup> DW)	Na/K ratio (%)
Chitosan (a)	1	36.21**	22.46**	671.34**	3933.63**	159.41**	5431.35**	327.07**
Salinity (b)	4	76.27**	128.06**	64.67**	11492.4**	184.5**	256.95**	72.56**
a*b	4	26.09 <sup>ns</sup>	20.94**	184.41**	782.9**	17.45**	418.49**	48.14**
SE	30	0.681	1.5	33.4	43.345	1.561	2.39	0.166
CV	-	-	1.102	3.288	1.406	15.02	4.242	26.061

تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد \*

\*: Significantly differences at 1% of probability level

تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد \*\*

\*\*: Significantly differences at 5% of probability level



شکل ۱- اثر متقابل کیتوزان و شوری بر وزن تر ساقه (A) و ریشه (B) و وزن خشک ساقه (C) و ریشه (D) گیاه ریحان. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می کند

Figure 1- The interaction of chitosan and salinity on the wet weight of stem (A) and root (B) and dry weight of stem (C) and root (D) of basil. The same letters indicate no significant differences

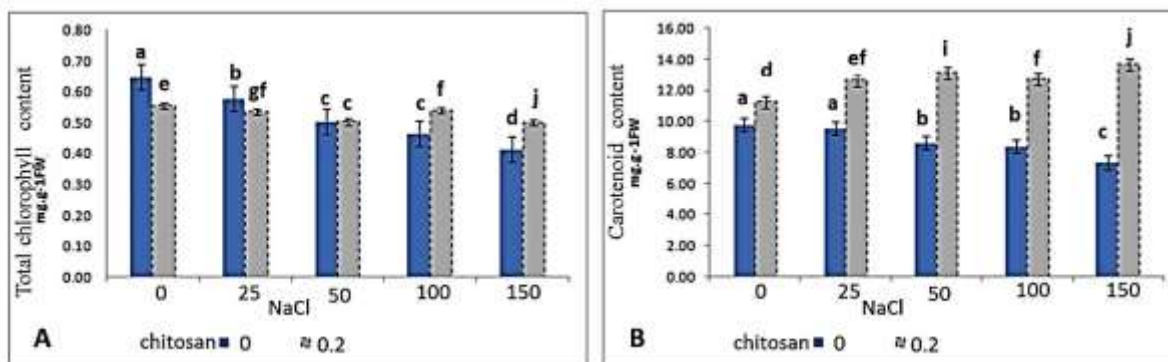
### رنگیزه های فتوسنتزی

اثر اصلی کیتوزان بر کلروفیل کل معنی دار نشد اما اثر اصلی شوری و همچنین اثر متقابل شوری  $\times$  کیتوزان در سطح یک درصد آماری بر کلروفیل کل معنی دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که تنش شوری به طور معنی داری کلروفیل کل را در گیاه ریحان کاهش داد. بیشترین کاهش کلروفیل (۰/۴۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) در شدیدترین سطح شوری (۱۵۰ میلی مولار) مشاهده شد. یکی از مهمترین علائم وقوع تنش های مختلف در گیاهان کاهش کلروفیل است که شدت کاهش آن به نوع و شدت تنش و حساسیت گونه گیاهی بستگی دارد [28]. با کاهش کلروفیل میزان تولید در گیاه کاهش می یابد. کاهش کلروفیل در اثر تنش شوری می تواند به علت اختلال در جذب عناصر معدنی ضروری برای بیوسنتز کلروفیل مانند نیتروژن و آهن باشد [29]. بر اساس تئوری ارائه شده توسط Fangmeier و Schütz (۲۰۰۱) [30]. کاهش کلروفیل در اثر تنش مربوط به افزایش تولید گونه های واکنش گر اکسیژن (ROS) در سلول می باشد، که موجب آسیب به سلول شده و کلروفیل را تخریب می کنند [31]. بنابراین کاهش مقدار کلروفیل مشاهده شده در اثر تنش شوری در گیاه ریحان را می توان به اختلال در جذب عناصر معدنی موثر در ساخت کلروفیل، تخریب کلروفیل و یا افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز تحت شرایط تنش نسبت داد. کاربرد کیتوزان در سطوح پایین شوری (صفر و ۲۵ میلی مولار) سبب کاهش معنی دار کلروفیل کل نسبت به شاهد شد اما در سطوح بالای شوری (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) کاربرد کیتوزان کلروفیل کل را افزایش داد (شکل ۲A). این نتایج نشان می دهد که در سطوح بالای شوری کیتوزان تحمل گیاه به شوری را افزایش داده است. براساس مطالعه Luo و Zeng (۲۰۱۲) [32] نیز کاربرد کیتوزان در گیاه گندم تحت تنش سبب افزایش محتوای کلروفیل شد. همچنین Al-Malki و Sheikha (۲۰۱۱) [33] نشان دادند که کیتوزان با افزایش محتوای کلروفیل در گیاه نخود سبب افزایش رشد آن می شود. با توجه به وجود عنصر نیتروژن در ساختار کیتوزان، و نقش ساختاری و ضروری نیتروژن در حلقه تتراپیرولی کلروفیل، افزایش این رنگدانه با کاربرد کیتوزان قابل توجیه است [33].

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثرات متقابل نتایج مشابه آنچه که برای کلروفیل کل ثبت شد، را برای کاروتنوئید نشان داد. بدین صورت که در شرایط عدم کاربرد کیتوزان، با افزایش سطح شوری محتوای کاروتنوئید به طور معنی داری کاهش یافت. محتوای کاروتنوئید در گیاهان مختلف تحت تنش های محیطی تغییر می کند. بر اساس مطالعات انجام شده تنش شوری در گیاه خیار [4] و ذرت [34] نیز سبب کاهش معنی دار کاروتنوئید شد که نشان دهنده تخریب این رنگدانه در اثر تنش شوری می باشد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که کاربرد کیتوزان در تمام سطوح شوری سبب افزایش معنی دار کاروتنوئید شد، که نشان دهنده افزایش



پاسخ‌های دفاعی گیاه به شوری است [35]. بیشترین افزایش این صفت در شوری بالا (۱۵۰ میلی مولار) مشاهده شد که کاربرد کیتوزان (۱۴ میلی گرم بر گرم وزن تر) نسبت به عدم کاربرد آن (۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) محتوای کاروتنوئید را بیش از ۱۰۰ درصد افزایش داد (شکل ۲ B). تحقیقات مشابهی توسط Farouk و Amany (۲۰۱۲) [36] و Zagzoug و همکاران (۲۰۱۷) [37] انجام شد که در آن‌ها کاربرد کیتوزان با افزایش پاسخ‌های دفاعی مانند افزایش کاروتنوئیدها سبب بهبود تحمل تنش خشکی به ترتیب در نخود و انبه شد.



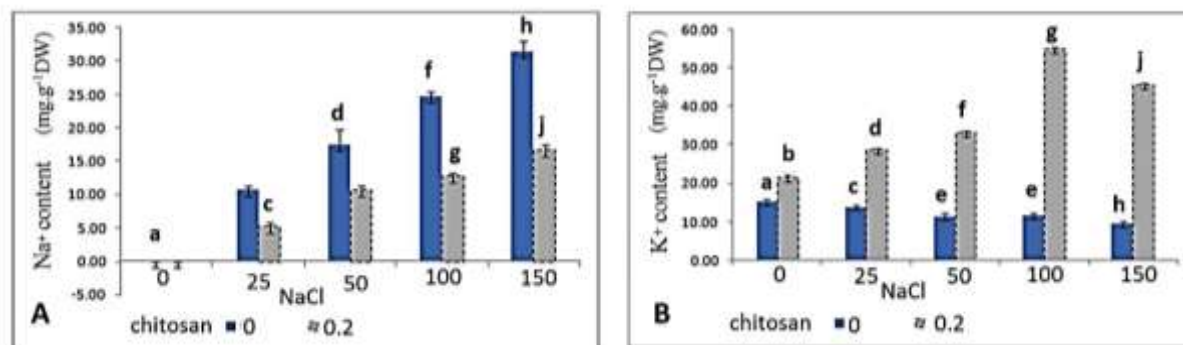
شکل ۲- اثر کیتوزان بر محتوای کلروفیل کل (A) و کاروتنوئید (B) گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می‌کند

Figure 2- The effect of chitosan on total chlorophyll (A) and carotenoid (B) content of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

### محتوای سدیم و پتاسیم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که اثرات اصلی کیتوزان و شوری، همچنین اثر متقابل شوری × کیتوزان در سطح یک درصد آماری بر محتوای سدیم معنی‌دار شد (جدول ۲). در تمام سطوح شوری، کاربرد کیتوزان محتوای سدیم را کاهش داد (شکل ۳ A) اما کاربرد کیتوزان، در تمام سطوح شوری سبب افزایش معنی‌دار پتاسیم نسبت به شاهد (صفر میلی مولار) شد (شکل ۳ B). یون‌های سدیم که وارد سیتوپلاسم می‌شوند اثر مهارکنندگی قوی بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها دارند. یک ساز و کار برای کاهش تجمع سدیم سلولی تجمع آن در واکوئل است. حضور سدیم در واکوئل نه تنها با سیتوسل تماس نخواهد داشت بلکه باعث حفظ تعادل اسمزی داخل سلول با خارج آن می‌گردد. در مجموع پایین بودن غلظت سدیم سیتوزولی و تعادل نسبت پتاسیم به سدیم یکی از مهمترین جنبه‌های تحمل به شرایط تنش شوری شناخته می‌شود [38]. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که تنش شوری در گیاه ریحان سبب افزایش تجمع سدیم شده و محتوای پتاسیم را کاهش داد و از این طریق نیز در شرایط تنش شوری نسبت سدیم به پتاسیم افزایش یافت. به طور مشابه Venport و Tester (۲۰۰۳) [39] گزارش کرد که غلظت زیاد سدیم در اندام هوایی، دامنه‌ای از مشکلات اسمزی و متابولیک گیاه را موجب می‌شود. در مقادیر بالای شوری خاک، میزان یون پتاسیم کاهش یافته و با سدیم جایگزین می‌شود که علاوه بر هم زدن تعادل یونی در سلول باعث اختلال متابولیسم سلولی نیز می‌شود [40].

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد کیتوزان سبب کاهش سدیم و افزایش پتاسیم شده و از این طریق نسبت سدیم به پتاسیم را کاهش داد. همچنین Dzung و Thang (۲۰۰۲) [41] گزارش دادند که یکی از مکانیسم‌های احتمالی کیتوزان برای افزایش تحمل به تنش در گیاهان افزایش پتاسیم است که از این طریق تعادل یونی در گیاه حفظ شده و به جذب آب گیاه در شرایط تنش کمک می‌شود. حفظ نسبت سدیم به پتاسیم در بافت‌های گیاهی برای تنظیم اسمزی سلول، حفظ فشار آماز، فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها، سنتز پروتئین‌ها، متابولیسم اکسیدان‌ها، فتوسنتز و باز و بسته شدن روزنه‌ها ضروری می‌باشد [42]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت کاربرد کیتوزان در گیاه تحت تنش شوری با حفظ هموستازی یون‌ها سبب تداوم متابولیسم گیاهی در شرایط تنش می‌شود.



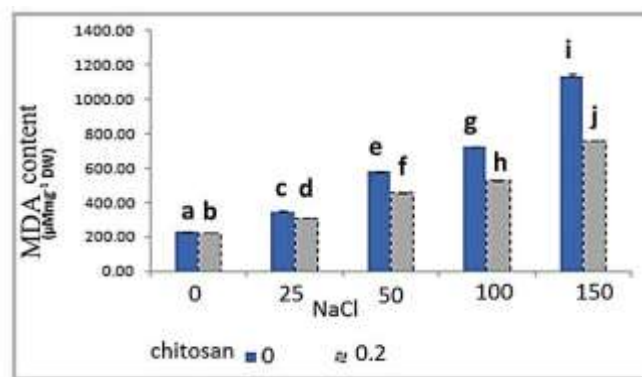
شکل ۳- اثر کیتوزان بر محتوای سدیم (A) و پتاسیم (B) گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می کند

Figure 3- The effect of chitosan on sodium (A) and potassium (B) content of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

مجدد با PCR به منظور استخراج پروتئین از سلول مورد نظر، پیش کشت مایع و سپس کشت اصلی صورت گرفت و پس از پایان یافتن زمان القا با IPTG محیط کشت حذف و بعد از سونیکاسیون پروتئین باکتری ها استخراج و با استون رسوب داده شد. در نهایت به رسوب ته تیوب ۳۰ میکرولیتر بافر PAGE افزوده شد. نتیجه الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با کماسی بلو نشان داد که ژن T7 RNA پلی مرز در این پلاسمید و در این سویه باکتری بخوبی بیان شده است. چون این پروتئین در این پلاسمید pGEX2TK بصورت فیوژن با GST تولید می شود لذا وزن مولکولی آن (۹۷ کیلو دالتون) به اندازه حدود ۲۴ کیلودالتون بیشتر شده و در محدوده ۱۲۰ کیلودالتون دیده میشود (شکل ۴).

#### مالون دی آلدئید

مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که در هر دو سطح کاربرد و عدم کاربرد کیتوزان، با افزایش سطح شوری محتوای مالون دی آلدئید به طور معنی داری افزایش یافت و بیشترین افزایش در شرایط بدون کاربرد کیتوزان مشاهده شد به طوری که در شوری ۱۵۰ میلی مولار محتوای مالون دی آلدئید نسبت به شاهد بیش از ۵ برابر افزایش یافت. از طرف دیگر نتایج نشان داد که کاربرد کیتوزان در تمام سطوح شوری سبب کاهش معنی دار مالون دی آلدئید نسبت به شاهد شد (شکل ۴).



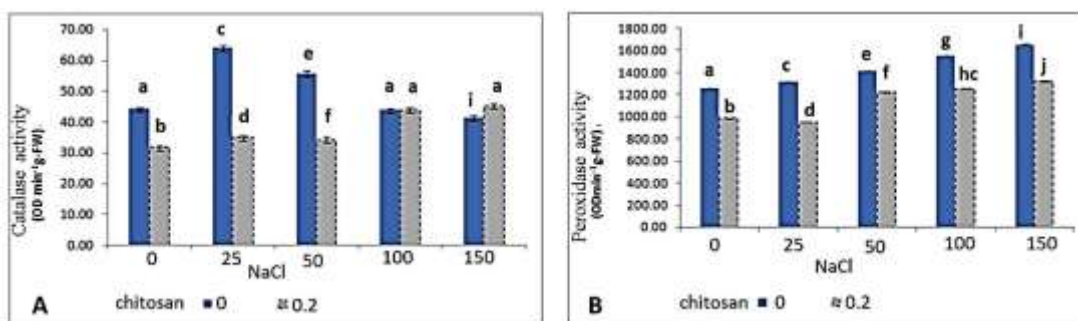
شکل ۴- اثر کیتوزان بر محتوای مالون دی آلدئید گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می کند

Figure 4- The effect of chitosan on MDA content of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

همانطور که پیش تر بیان شد تنش شوری همانند سایر تنش های محیطی منجر به تولید گونه‌های واکنش گر اکسیژن می‌شود و در نهایت تنش اکسیداتیو در گیاه اتفاق می‌افتد [43]. انواع گونه های واکنش گر اکسیژن تولید شده در شرایط تنش می‌توانند به ترکیبات داخلی سلول مانند فسفولیپیدهای غشا حمله کنند و موجب مرگ سلولی شوند. یکی از واکنش هایی که در این بین انجام می‌گیرد پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلول می‌باشد که منجر به تولید آلدئیدهایی مثل مالون دی آلدئید و ترکیباتی دیگر می‌شود. در اثر این واکنش غشا سلول آسیب دیده و میزان نشت یونی در سلول افزایش می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان داد که تنش شوری در گیاه ریحان سبب افزایش معنی دار مالون دی آلدئید و نشت یونی شد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که تیمار گیاه ریحان با کیتوزان سبب کاهش معنی دار مالون دی آلدئید و کاهش نشت یونی در شرایط شوری شده و از این طریق آثار منفی شوری در گیاه را کاهش داد. به طور مشابه، Yang و همکاران (۲۰۰۹) [44] گزارش دادند که کاربرد کیتوزان در نهال های سیب تحت تنش خشکی سبب حفظ بهتر غشا سلولی شده و محتوای مالون دی آلدئید را کاهش داد.

### فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز

مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که در شرایط بدون کاربرد کیتوزان، با افزایش تنش شوری تا سطح ۵۰ میلی مولار فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت و پس از آن نسبت به شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد. در شرایط شوری ۱۵۰ میلی مولار کاربرد کیتوزان (۴۵/۲ OD min<sup>-1</sup>g FW) سبب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد (۴۱/۵ OD min<sup>-1</sup>g FW) شد. از طرف دیگر، کاربرد کیتوزان در سطوح صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار نمک، سبب کاهش معنی دار (به ترتیب کاهش ۲۶، ۵۱ و ۳۸ درصدی) فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به عدم کاربرد کیتوزان شد (شکل ۵ A). اثرات اصلی شوری و کیتوزان و اثر متقابل شوری × کیتوزان در سطح یک درصد بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی دار شد (جدول ۲). در هر دو سطح کاربرد و عدم کاربرد کیتوزان با افزایش تنش شوری فعالیت آنزیم پراکسیداز به طور معنی داری افزایش یافت. از طرف دیگر در تمام سطوح شوری کاربرد کیتوزان نسبت به عدم کاربرد آن سبب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز شد (شکل ۵ B).



شکل ۵- اثر کیتوزان بر فعالیت آنزیم کاتالاز (A) و پراکسیداز (B) گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می‌کند

Figure 5- The effect of chitosan on catalase enzyme activity (A) and peroxidase (B) of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

بنابراین استفاده از کیتوزان سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده و سطح دفاع آنتی اکسیدانی گیاه را بالا برد که با نتایج مطالعه Pirbalouti و همکاران (۲۰۱۷) [17] بر روی دو ژنوتیپ ریحان همپوشانی داشت. در مطالعه دیگر که توسط Zeng و Luo (۲۰۱۲) [32] انجام شد، تیمار کیتوزان سبب افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه گندم تحت تنش خشکی شد. پژوهش Yang و همکاران (۲۰۰۹) [44] نیز نشان داد که تیمار کیتوزان سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در نهال سیب شده و از این طریق تحمل شرایط تنش توسط گیاه را افزایش داد. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را بدون نیاز به انرژی تجزیه می‌کند اما این آنزیم فقط در غلظت‌های بالای پراکسید هیدروژن فعال است و غلظت‌های پایین آن توسط پراکسیداز و پراکسیدازهای همکار با احیاکننده‌های قوی مانند گلوکوتانیون و آسکوربات حذف می‌شود [45]، [46]. کنترل دقیق سطح رادیکال های آزاد در گیاهان تحت تنش یکی از اساسی ترین و حیاتی ترین راهکارهای تحمل تنش توسط گیاه می‌باشد. در تحقیق حاضر نیز گیاه ریحان در شرایط تنش شوری سطح آنزیم های آنتی اکسیدان خود شامل کاتالاز و پراکسیداز را بالا برده و از این طریق به شوری واکنش نشان داد.

## فلاونوئیدها

مقایسه میانگین اثرات اصلی کیتوزان نشان داد که استفاده از آن سبب افزایش معنی دار فلاونوئید شد. در شرایط عدم کاربرد کیتوزان (شاهد) مقدار فلاونوئید ۱۸/۶۲ میلی گرم بر گرم وزن تر بود که با کاربرد کیتوزان به ۲۲/۷۴ میلی گرم بر گرم وزن تر رسید. مقایسه میانگین اثرات اصلی شوری نیز موارد مشابه اثر کیتوزان را ثبت کرد و بر اساس آن با افزایش سطح شوری محتوای فلاونوئید به طور معنی داری افزایش یافت و به بالاترین مقدار خود در شوری ۱۵۰ میلی مولار رسید. اثر متقابل شوری × کیتوزان بر این صفت معنی دار نشد (جدول ۲). فلاونوئیدها یکی از مهمترین متابولیت های ثانویه در گیاهان هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی قوی داشته و افزایش آنها در شرایط تنش یک پاسخ دفاعی گیاه برای کنترل رادیکال های آزاد تولید شده در این شرایط می باشد [47]. بیوسنتز این ترکیبات ثانویه به وسیله تنش های محیطی تحت تأثیر قرار می گیرد [48]. در شرایط تنش کم آبی در انگور افزایش نسبت ترکیبات tri-hydroxylated به di-hydroxylated اتفاق می افتد که سبب تغییر بیان ژن های درگیر در مسیر ساخت فلاونوئید می شود [49]. براساس گزارش ثبت شده توسط Chutipaijit و همکاران (۲۰۰۹) [50] تنش شوری سبب افزایش معنی دار فلاونوئید در ارقام برنج شده و سطح دفاعی گیاه را بالا برد. استفاده از کیتوزان به عنوان یک الیسیستور زیستی از طریق القای سیستم دفاعی گیاه باعث بهبود بیوسنتز متابولیت های ثانویه و فلاونوئید گیاهان می شود. با توجه به این مطالب می توان گفت که محرک کیتوزان ممکن است ژن های جدیدی را فعال کند که آنزیم ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه اندازی کند و با افزایش متابولیت های ثانویه سبب بهبود پاسخ گیاهان به تنش های مختلف شود.

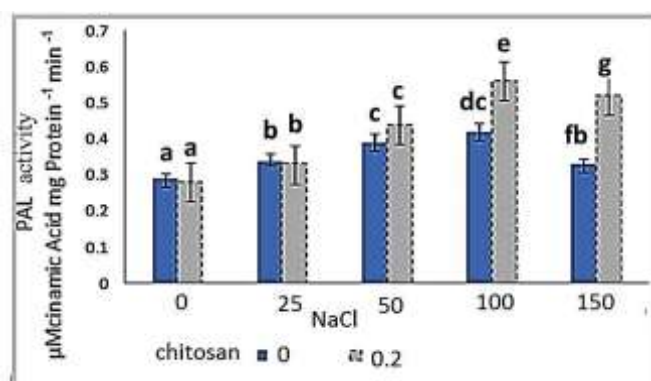
## محتوای فنل کل

اثر متقابل شوری × کیتوزان بر این صفت معنی دار نشد (جدول ۲)، اما مقایسه میانگین اثرات اصلی کیتوزان نشان داد که کاربرد این الیسیستور (۳۰/۲ میلی گرم بر گرم اسید گالیک) نسبت به عدم کاربرد آن (۲۸/۲ میلی گرم بر گرم اسید گالیک) سبب افزایش معنی دار فنل کل شد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری، محتوای فنل کل در گیاه ریحان نیز به طور معنی داری افزایش یافت و به بالاترین میزان خود (۳۳ میلی گرم بر گرم اسید گالیک) در شدیدترین سطح شوری (۱۵۰ میلی مولار) رسید. افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تنش یک پدیده کلی بوده که در تحقیقات زیادی گزارش شده است. اندازه گیری ترکیبات فنلی می تواند به عنوان یکی از مکانیسم های دفاعی گیاه در تنش های مختلف مطرح باشد [51]. ویژگی های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی ناشی از قدرت احیاء کنندگی و ساختار شیمیایی آن هاست، که آن ها را قادر به خنثی کردن اکسیژن های فعال می کند. همچنین ترکیبات فنلی از طریق اهداء الکترون به رادیکال های آزاد، واکنش های اکسیداسیون چربی را مهار می کنند [52]. بنابراین افزایش میزان فنل کل در گیاه ریحان تحت تنش شوری می تواند پاسخی مثبت برای تحمل تنش توسط گیاه باشد. کیتوزان باعث تولید گروه های اکسیژن فعال (ROS) در پاسخ به پاتوژن ها می شود بدین ترتیب با افزایش میزان فیتوالکسین های پلی فنلی به علت فعال کردن مسیر سنتز فنل پروپانوئیدها باعث مقاوم شدن گیاهان در برابر پاتوژن ها می شود [13]. از طرف دیگر گزارش شده است که مسیر فنیل پروپانوئید مسئول سنتز برخی از متابولیت های فنولی در گیاهان است که اغلب آن ها در اثر تنش تولید می شوند و دارای پیش سازهای مشترکی هستند [53]. الیسیستور کیتوزان سنتز ترکیبات فنلی را به وسیله افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز مدیریت می کند [54]. همانطور که در ادامه خواهید دید در تحقیق حاضر نیز فعالیت این آنزیم در اثر کاربرد کیتوزان افزایش یافت و بدنبال آن ترکیبات فنلی گیاه ریحان نیز افزایش یافت. این یافته ها با نتایج Kim و همکاران (۲۰۰۵) [8] و Pirbalouti و همکاران (۲۰۱۷) [17] مطابقت دارد.

## فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)

در هر دو سطح کاربرد و عدم کاربرد کیتوزان، فعالیت آنزیم PAL به طور معنی داری افزایش یافت. کاربرد کیتوزان در سطوح مختلف شوری تاثیر متفاوتی بر فعالیت این آنزیم داشت. در سطوح پایین شوری (صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار) کاربرد کیتوزان تاثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم PAL نداشت ولی در سطوح بالای شوری (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) کاربرد کیتوزان به طور معنی داری فعالیت این آنزیم را بالا برد (شکل ۶). آنزیم PAL آنزیم کلیدی و تعیین کننده در ابتدای مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدهاست و با آمین زدایی از اسید آمینه فنیل آلانین آن را به ترانس سینامیک اسید تبدیل می کند که اولین و مهمترین حد واسط برای تولید ترکیبات

فنی در گیاهان می باشد [55]. نتایج نشان داد که تنش شوری به طور کلی سبب افزایش فعالیت این آنزیم شد. در این راستا گزارش شده است که افزایش فعالیت PAL و سایر آنزیم های مسیر فیل پروپانوئید که منجر به افزایش متابولیت های ثانویه در گیاهان می شود، از اولین پاسخ های گیاهان در شرایط تنش است [56]. Falcon-Rodriguez و همکاران (۲۰۰۹) [57] گزارش کردند که استفاده از کیتوزان باعث افزایش فعالیت سه آنزیم دفاعی پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیلیاز و گلوکوناز در برگ ها و ریشه گیاه تنباکو شد. در گیاه بادمجان نیز فعالیت این آنزیم در اثر کاربرد کیتوزان افزایش یافته و متابولیت های ثانویه این گیاه را افزایش داد [58]. ترکیباتی مانند کیتوزان می توانند به طور موثری پاسخ های دفاعی گیاهان مشابه با حمله پاتوژن ها را تحریک کنند. به محض انتخاب، یک سری از تغییرات متابولیکی به صورت فراگیر آغاز شده و از این طریق گیاه سیستم ایمنی ذاتی خود را فعال می کند و گیاه را برای مقابله با تنش مهیا می کند [42]. در این تحقیق نیز برخی متابولیت های ثانویه گیاه ریحان مانند میزان فنل کل، فلاونوئید، متیل کایکول در کاربرد کیتوزان افزایش یافت که تحمل بهتر گیاه به شرایط تنش را در پی داشت.



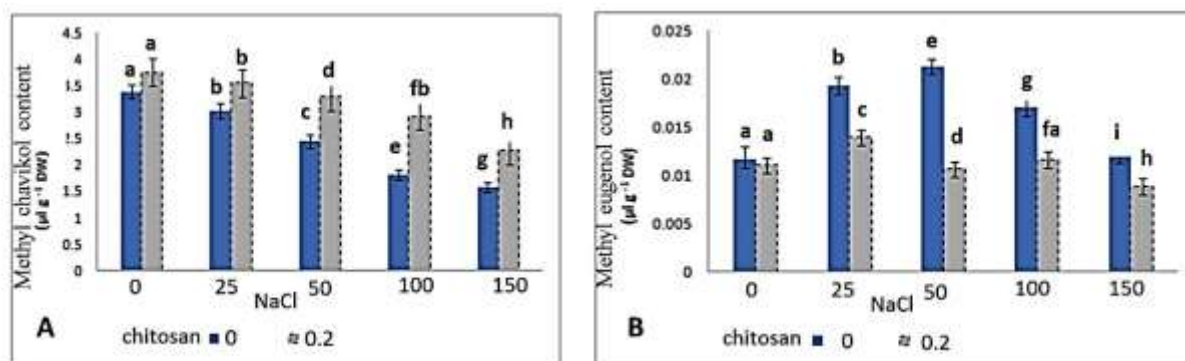
شکل ۶- اثر کیتوزان بر فعالیت آنزیم PAL گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می کند  
 Figure 6- The effect of chitosan on PAL enzyme activity of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

### ترکیبات فنل پروپانوئیدی

بررسی های مربوط به ترکیبات فنل پروپانوئیدی اسانس، نشان داد در سطوح پایین شوری (صفر و ۲۵ میلی مولار) کاربرد کیتوزان تاثیر معنی داری بر محتوای متیل کایکول نسبت به شاهد نداشت ولی در شوری متوسط و بالا (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) کاربرد کیتوزان (به ترتیب ۳/۳، ۲/۸ و ۲/۲ میکرولیتر بر گرم وزن خشک) نسبت به عدم کاربرد آن (به ترتیب ۲/۵، ۱/۸ و ۱/۵ میکرولیتر بر گرم وزن خشک) محتوای متیل کایکول را تا ۵۵ درصد افزایش داد (شکل A) بر اساس شکل B در شرایط عدم کاربرد کیتوزان، تنش شوری در سطوح ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار سبب افزایش معنی دار متیل اوژنول می شود. از طرف دیگر نتایج نشان داد که در شرایط شوری صفر میلی مولار کیتوزان تاثیر معنی داری بر متیل اوژنول نداشت ولی در تمام سطوح شوری کاربرد کیتوزان نسبت به عدم کاربرد آن محتوای متیل اوژنول را کاهش داد.

بخش عمده و مهم اسانس گیاه ریحان فنیل پروپانوئیدها می باشند. که ۹۰ درصد ترکیبات اسانس ریحان را تشکیل می دهند [59]. ترکیبات مهم فنیل پروپانوئیدی شامل اوژنول، کایکول، متیل اوژنول، متیل کایکول، مرسیتین، فنیل سینامات و المیسین می باشند که در اسانس گیاه ریحان مشاهده می شوند [55]. تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان تحت تنش های محیطی تغییر می کند و در بسیاری از گیاهان از تنش های محیطی به عنوان یک راهکار برای دست ورزی متابولیت های ثانویه استفاده می شود [42]. پژوهشی که توسط Elhindi و همکاران (۲۰۱۶) [60] گزارش شد، نشان داد که تنش شوری تاثیر متفاوتی بر ترکیبات اسانس گیاه ریحان دارد به طوری که در اثر تنش شوری در این گیاه محتوای لینالول افزایش و محتوای اوژنول کاهش یافت. Bernstein و همکاران (۲۰۱۰) [61] در آزمایشی مشابه روی ریحان دریافتند که با افزایش شوری، انباشت اسانس در بافت های گیاه افزایش پیدا کرد. در بعضی تحقیقات نیز تنش شوری هیچ گونه اثر معنی دار بر ترکیبات اسانس ریحان نداشته است [62]. این نتایج به ظاهر متناقض نشان می دهد که واکنش گیاه به شرایط هر آزمایش بستگی دارد و نمی توان برای افزایش ترکیبات اسانس یک تیمار واحد در نظر گرفت.





شکل ۷- اثر کیتوزان بر محتوای متیل کایوکول (A) و متیل اوژنول (B) گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری. حروف یکسان عدم معنی داری را بیان می کند

Figure 7- The effect of chitosan on the methyl chavicol (A) and methyl eugenol (B) content of basil at different levels of salinity stress. The same letters indicate no significant differences

نتایج مربوط به همبستگی پارامترهای مطالعه شده در گیاه ریحان تحت تنش شوری در دو سطح کیتوزان صفر و ۰/۲ در جدول ۲ آورده شده است. براساس آن در شرایط حضور کیتوزان فعالیت آنزیم PAL بعنوان یکی از آنزیم های مهم گیاه در شرایط تنش شوری با محتوی فلاونوئیدها و سدیم همبستگی مثبت و معنی دار ( $p < 0.05$ ) را نشان داد. آنزیم PAL و محتوی مالون دی آلدئید نیز همبستگی مثبت و معنی داری ( $p < 0.01$ ) را با آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز نشان داد. همچنین مالون دی آلدئید با ترکیبات فنل پروپانویید اسانس همبستگی منفی ( $p < 0.05$ ) داشت. مقدار فنل کل دارای همبستگی مثبت با فعالیت آنزیم PAL در سطح ۱ درصد بود. بعلاوه براساس نتایج، بین فلاونوئید و محتوی سدیم همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد. همبستگی منفی بین برخی صفات مطالعه شده مانند مالون دی آلدئید با متیل کایوکول، بعنوان یک ترکیب پروپانوییدی اسانس، نشان دهنده اولویت بندی گیاه برای کاهش اثرات تنش است [63]. بدین صورت که ترجیح گیاه در این شرایط، افزایش متابولیت های کم هزینه تر که به عنوان سد دفاعی در برابر تنش های محیطی عمل می کنند مانند مالون دی آلدئید، است.

بر اساس نتایج آنالیز مؤلفه های اصلی (جدول ۳) برای صفات مطالعه شده در شرایط تنش شوری بدون کیتوزان مجموع دو مؤلفه اول و دوم ۷۳/۲۲ درصد از تغییرات کل را نشان داد. کم بودن مقادیر واریانس یک مؤلفه اصلی به معنی نقش اندک آن مؤلفه در تبیین واریانس متغیرها است. برای درک بیشتر نتایج در شکل ۸ آورده شده است. در این مطالعه، اولین مؤلفه اصلی ۵۵/۸ درصد از تغییرات کل را توجیه کرد که همبستگی مثبتی با آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی (فنل کل و فلاونوئید) و آنزیمی (پروکسیداز)، مالون دی آلدئید و همبستگی مثبت ضعیف تری با شاخص های رشد و فعالیت آنزیم PAL داشت. در حالی که هم بستگی این مؤلفه با ترکیبات اسانس و رنگدانه ها و پتاسیم منفی بود. در شرایط اعمال کیتوزان تعداد دو مؤلفه معرفی که در مجموع ۷۸/۹۴ درصد تغییرات را دربرداشت، که بر اساس نتایج تاکید مؤلفه اول روی صفات مالون دی آلدئید، آنتی اکسیدان های آنزیمی، متیل کایوکول، کاروتنوئید، فلاونوئید، سدیم و پتاسیم، فعالیت آنزیم PAL و فنول کل بود و در مجموع ۵۰ درصد از تغییرات کل را توجیه کرد. در مؤلفه دوم وزن تر و خشک اندام ها بعلاوه متیل اوژنول به طور کلی ۲۰/۹ درصد تغییرات را در بر داشت. با توجه به بیشتر بودن سهم مؤلفه اول، می توان از آن به عنوان شاخصی جهت نشان دادن مقدار اختلاف بین کاربرد کیتوزان و عدم کاربرد آن تیمارهای تحت تنش استفاده کرد. بطورکلی نتایج، اهمیت عملکرد آنزیم هایی چون PAL و آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی مانند کاتالاز پراکسیداز و فنل کل و فلاونوئید در شرایط تنش شوری را نشان داد که استفاده از کیتوزان می تواند آن را بهبود بخشد. بنابراین کاربرد کیتوزان منجر به افزایش متابولیت هایی می شود که گیاه را در برابر تنش شوری مقاوم می کند.



جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه تحت تنش شوری، بدون حضور کیتوزان (بالای قطر جدول) و با حضور کیتوزان (پایین قطر جدول)

Table 3- Correlation coefficient of studied traits under salinity stress, without chitosan (top the diagonal) and with chitosan (bottom the diagonal)

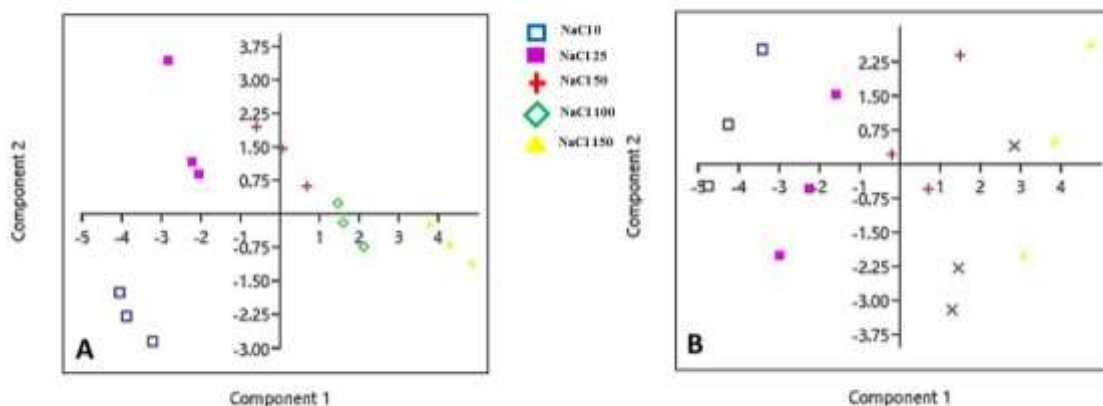
	chl a+b	Carotenoid	Flavenoid	T. phenol	MDA	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Peroxidase	Catalase	RFW	RDW	SFW	SDW	Methyl chavikol	Methyl eugenol	PAL
chl a+b	1	0/960**	-0/967**	-0/953*	-0/956*	-0/997**	0/989**	-0/969**	0/324 <sup>ns</sup>	-0/365 <sup>ns</sup>	0/189 <sup>ns</sup>	-0/114 <sup>ns</sup>	0/342 <sup>ns</sup>	0/980**	-0/051 <sup>ns</sup>	-0/540 <sup>ns</sup>
Car.	-0/873 <sup>ns</sup>	1	-0/958*	-0/987**	-0/995**	-0/955*	0/988**	-0/975**	0/518 <sup>ns</sup>	-0/328 <sup>ns</sup>	0/400 <sup>ns</sup>	0/043 <sup>ns</sup>	0/505 <sup>ns</sup>	0/957*	0/190 <sup>ns</sup>	-0/317 <sup>ns</sup>
Flav.	-0/572 <sup>ns</sup>	0/858 <sup>ns</sup>	1	0/979**	0/966**	0/971**	-0/983**	0/929*	-0/263 <sup>ns</sup>	0/132 <sup>ns</sup>	-0/194 <sup>ns</sup>	-0/130 <sup>ns</sup>	-0/253 <sup>ns</sup>	-0/914*	-0/005 <sup>ns</sup>	0/516 <sup>ns</sup>
T.ph.	-0/358 <sup>ns</sup>	0/589 <sup>ns</sup>	0/797 <sup>ns</sup>	1	0/996**	0/959**	-0/985**	0/963**	-0/444 <sup>ns</sup>	0/206 <sup>ns</sup>	-0/298 <sup>ns</sup>	-0/153 <sup>ns</sup>	-0/383 <sup>ns</sup>	-0/932*	-0/194 <sup>ns</sup>	0/341 <sup>ns</sup>
MDA	-0/739 <sup>ns</sup>	0/852 <sup>ns</sup>	0/909*	0/630 <sup>ns</sup>	1	0/960**	-0/986**	0/978**	-0/501 <sup>ns</sup>	0/280 <sup>ns</sup>	-0/335 <sup>ns</sup>	-0/098 <sup>ns</sup>	-0/443 <sup>ns</sup>	-0/950*	-0/219 <sup>ns</sup>	0/308 <sup>ns</sup>
Na <sup>+</sup>	-0/757 <sup>ns</sup>	0/921*	0/960**	0/783 <sup>ns</sup>	0/957*	1	-0/987**	0/973**	-0/317 <sup>ns</sup>	0/336 <sup>ns</sup>	-0/139 <sup>ns</sup>	0/078 <sup>ns</sup>	-0/298 <sup>ns</sup>	-0/976**	0/024 <sup>ns</sup>	0/528 <sup>ns</sup>
K <sup>+</sup>	-0/315 <sup>ns</sup>	0/616 <sup>ns</sup>	0/916*	0/915*	0/787 <sup>ns</sup>	0/849 <sup>ns</sup>	1	-0/976**	0/395 <sup>ns</sup>	-0/304 <sup>ns</sup>	0/276 <sup>ns</sup>	0/002 <sup>ns</sup>	0/392 <sup>ns</sup>	0/969**	0/061 <sup>ns</sup>	-0/449 <sup>ns</sup>
PO	-0/728 <sup>ns</sup>	0/758 <sup>ns</sup>	0/824 <sup>ns</sup>	0/786 <sup>ns</sup>	0/917*	0/925*	0/811 <sup>ns</sup>	1	-0/524 <sup>ns</sup>	0/445 <sup>ns</sup>	-0/268 <sup>ns</sup>	0/085 <sup>ns</sup>	-0/461 <sup>ns</sup>	-0/989**	-0/174 <sup>ns</sup>	0/330 <sup>ns</sup>
CA	-0/412 <sup>ns</sup>	0/675 <sup>ns</sup>	0/934*	0/714 <sup>ns</sup>	0/912*	0/878*	0/924*	0/819 <sup>ns</sup>	1	-0/576 <sup>ns</sup>	0/705 <sup>ns</sup>	-0/043 <sup>ns</sup>	0/870 <sup>ns</sup>	0/471 <sup>ns</sup>	0/793 <sup>ns</sup>	0/583 <sup>ns</sup>
RFW	-0/966**	0/773 <sup>ns</sup>	0/503 <sup>ns</sup>	0/267 <sup>ns</sup>	0/757 <sup>ns</sup>	0/708 <sup>ns</sup>	0/274 <sup>ns</sup>	0/748 <sup>ns</sup>	0/427 <sup>ns</sup>	1	-0/295 <sup>ns</sup>	0/833 <sup>ns</sup>	-0/659 <sup>ns</sup>	-0/516 <sup>ns</sup>	-0/045 <sup>ns</sup>	-0/016 <sup>ns</sup>
RDW	-0/225 <sup>ns</sup>	-0/126 <sup>ns</sup>	-0/189 <sup>ns</sup>	-0/360 <sup>ns</sup>	0/219 <sup>ns</sup>	-0/031 <sup>ns</sup>	-0/207 <sup>ns</sup>	0/216 <sup>ns</sup>	0/050 <sup>ns</sup>	0/462 <sup>ns</sup>	1	0/055 <sup>ns</sup>	0/902*	0/253 <sup>ns</sup>	0/449 <sup>ns</sup>	0/386 <sup>ns</sup>
SFW	-0/222 <sup>ns</sup>	-0/009 <sup>ns</sup>	-0/438 <sup>ns</sup>	-0/218 <sup>ns</sup>	-0/460 <sup>ns</sup>	-0/296 <sup>ns</sup>	-0/560 <sup>ns</sup>	-0/312 <sup>ns</sup>	-0/711 <sup>ns</sup>	0/092 <sup>ns</sup>	-0/284 <sup>ns</sup>	1	-0/257 <sup>ns</sup>	-0/210 <sup>ns</sup>	0/454 <sup>ns</sup>	0/282 <sup>ns</sup>
SDW	-0/942*	0/909*	0/590 <sup>ns</sup>	0/230 <sup>ns</sup>	0/702 <sup>ns</sup>	0/717 <sup>ns</sup>	0/252 <sup>ns</sup>	0/569 <sup>ns</sup>	0/400 <sup>ns</sup>	0/874 <sup>ns</sup>	0/086 <sup>ns</sup>	0/200 <sup>ns</sup>	1	0/464 <sup>ns</sup>	0/471 <sup>ns</sup>	0/362 <sup>ns</sup>
M.ch.	0/653 <sup>ns</sup>	-0/795 <sup>ns</sup>	-0/904*	-0/595 <sup>ns</sup>	-0/990**	-0/925*	-0/797 <sup>ns</sup>	-0/879*	-0/944*	-0/687 <sup>ns</sup>	-0/241 <sup>ns</sup>	0/571 <sup>ns</sup>	-0/632 <sup>ns</sup>	1	0/055 <sup>ns</sup>	-0/417 <sup>ns</sup>
M.eu.	0/619 <sup>ns</sup>	-0/382 <sup>ns</sup>	-0/355 <sup>ns</sup>	-0/224 <sup>ns</sup>	-0/692 <sup>ns</sup>	-0/534 <sup>ns</sup>	-0/326 <sup>ns</sup>	-0/749 <sup>ns</sup>	-0/502 <sup>ns</sup>	-0/787 <sup>ns</sup>	-0/806 <sup>ns</sup>	0/332 <sup>ns</sup>	-0/425 <sup>ns</sup>	0/678 <sup>ns</sup>	1	0/844 <sup>ns</sup>
PAL	-0/677 <sup>ns</sup>	0/875 <sup>ns</sup>	0/958**	0/884*	0/897*	0/981**	0/903*	0/915*	0/861 <sup>ns</sup>	0/605 <sup>ns</sup>	-0/160 <sup>ns</sup>	-0/264 <sup>ns</sup>	0/616 <sup>ns</sup>	-0/860 <sup>ns</sup>	-0/440 <sup>ns</sup>	1

\* و \*\* به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد را بیان می‌کند.

جدول ۴- مقادیر ویژه، واریانس نسبی و ضرایب متغیرها برای دو مولفه اصلی در گیاه ریحان تحت تنش شوری با حضور و عدم حضور کیتوزان

Table 4- Eigen values, relative variance and coefficients of variables in two principle components of basil under salinity stress with chitosan and without chitosan

Traits	Without Chitosan		With Chitosan	
	Component 1	Component 2	Component 1	Component 2
Chl a+b	-0.328	-0.089	-0.232	-0.125
Carotenoid	-0.326	-0.000	0.286	-0.016
Flavenoid	0.308	0.084	0.288	-0.072
Total phenol	0.321	0.008	0.249	-0.15
MDA	0.328	-0.001	0.313	-0.055
Na <sup>+</sup>	0.323	0.083	0.321	-0.069
K <sup>+</sup>	-0.319	-0.065	0.274	-0.205
Peroxidase	0.329	-0.005	0.306	-0.059
Catalase	-0.158	0.455	0.284	-0.112
RFW	0.094	-0.185	0.171	0.378
RDW	-0.047	0.259	0.0493	0.416
SFW	0.041	-0.132	0.0326	0.446
SDW	-0.071	0.265	0.152	0.420
Methyl chavikol	-0.327	0.008	-0.309	-0.071
Methyl eugenol	-0.054	0.528	-0.198	-0.343
PAL	0.099	0.544	0.273	-0.271
Eigen value	8.93	2.78	9.28	3.34
Relative variance (%)	55.81	17.41	58.02	20.92
Cumulative variance (%)	55.81	73.22	58.02	78.94



شکل ۸- مختصات تیمارهای مورد مطالعه از نظر دو مولفه اصلی برای تیمارهای بدون کیتوزان (A) و حاوی کیتوزان (B) گیاه ریحان در سطوح مختلف تنش شوری

Figure 8- coordinates of the studied traits in terms of first two principal components for treatments without chitosan (A) and with chitosan (B) of basil at different levels of salinity stress

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج می توان گفت که ریحان، گیاهی حساس به تنش شوری است چرا که با افزایش شوری برخی شاخص های رشد کاهش پیدا کرد. به طور کلی تنش شوری برخی متابولیت های ثانویه ریحان را تغییر داده و منجر به افزایش برخی دیگر مانند MDA شد. در این مطالعه مهم ترین شاخص ها جهت نشان دادن مقدار اختلاف بین کاربرد کیتوزان و عدم کاربرد آن در شرایط تنش شامل میزان فعالیت آنزیم های PAL و آنتی اکسیدان های آنزیمی (کاتالاز و پروکسیداز) و غیر آنزیمی (محتوی فنل کل و فلاونوئیدها)، رنگدانه ها و عناصر سدیم و پتاسیم بود. بدین صورت که کاربرد کیتوزان در گیاه، مقدار آنتی اکسیدان ها را افزایش داده و باعث افزایش عملکرد گیاه ریحان در شرایط تنش شده است. در آخر، در صورت بروز مشکل شوری در خاک یا آب آبیاری گیاه ریحان، کاربرد کیتوزان به عنوان یک پلیمر زیستی بی خطر در افزایش مقاومت به تنش شوری پیشنهاد می شود.

## اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که در انجام این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی برای ایشان وجود نداشته است.

## سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از رساله دوره دکترا نگارنده اول در رشته زیست شناسی می باشد. نویسندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تحقیقات و گروه زیست شناسی و آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی برای در اختیار گذاشتن امکانات لازم جهت اجرای این پروژه، اعلام نمایند.

## منابع

- [1] Tahsili, J., Sharifi, M., Behmanesh, B., Pourbozorgi Rudsari, N. and Ziaei, M. (2010). Gene expression of eugenol O - methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth. *Journal of Biology*, 23 (1): 25-18.
- [2] Labra, M., Milele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M. and Sala, F. (2004). Morphological characterization of essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*, 167 (7), 25-31.
- [3] Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimarães, E.F., Carreira L., Bernstein, N., Kravchik M. and Dudai. N. (2009). Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alteration of morphological development. *Annals of Applied Biology*, 156 (2), 167-177.
- [4] Hawrylak-Nowak, B. (2009). Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biological trace element research*, 132 (1-3), 259-269.
- [5] Nejadhabivash, F. and Daneshgar, M. (2019). Variation in the essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. apical shoots at different developmental stages. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 32 (2), 474-486.

- [6] Barazandeh, M. and Bagherzadeh, K. (2007). Evaluation of essential oil chemical components of *Thymus daenensis* Celak. collected from four regions in Esfahan province. *Journal of Medicinal Plant*, 6 (3), 15-19.
- [7] Politeo, O., Jukic, M. and Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.). Compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101, 379-385.
- [8] Kim, H.J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, C. (2005). Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 696 -701.
- [9] Pchyangkura, R. and Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65.
- [10] Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G. and Dalessandro, G. (2006). Antioxidant composition in cherry and highpigment tomato cultivars. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54, 398-415.
- [11] Mishra, A. and Jha, B. (2011). Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54, 195-199.
- [12] Tsantili, E., Shin, Y., Nock, J.F. and Watkins, C.B. (2010). Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 27-34.
- [13] Iriti, M. and Faoro, F. (2008). Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (12), 1106-1111.
- [14] Hendawy, S.F. and Khalid, K.A. (2005). Response of sage *Salvia officinalis* L. plants to zinc application under different salinity levels. *Journal of Applied Science Research*, 1 (2), 147-155.
- [15] Said-Al, Ahl, H.A.H. and Mahmoud, A. (2010). Effect of zinc and /or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean Journal Of Applied Science*, 3 (1), 97-111.
- [16] Stoeva, N., Berova, M. and Zlatev, Z. (2005). Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum*, 49 (2), 293-296.
- [17] Pirbalouti, A.G., Malekpoor, F., Salimi, A. and Golparvar, A. (2017). Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Scientia horticulturae*, 217, 114-122.
- [18] Khan, M.A., Hussain, N., Abid, M. and Imran, T. (2004). Screening of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars for saline conditions under irrigated arid environment. *Journal Scientific Research*, 15, 471-477.
- [19] Health, R.L. and Packer, L. (1986). Phytoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 182-198.
- [20] Biles, C. and Abeles, F. (1991). Xylem sap proteins. *Plant Physiology*, 96, 597-601.
- [21] Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea P.J. and Azevedo, R.A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Coriandrum juncea*. *Plant Soil*, 1239, 123-132.
- [22] Zou, Y., Lu, Y. and Wei, D. (2004). Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 5032-5039.
- [23] Chun, O.K., Kim, D.O. and Lee, C.Y. (2003). Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 8067-872.
- [24] Zimmermann, A. and Hahlbrock, K. (1975). Light induced changes of enzyme activity in parsley cell suspension cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 166, 54-62.
- [25] Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y. and Tan, R.X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidantive burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by Low-energy ultrasound in *Texus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15 (4), 351-8.
- [26] Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. and Razavi, K. (2012). Gene expression and activity of phenylalanine ammonia-lyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stage. *Journal of Biotechnology*, 10, 32-39.
- [27] Adam, R.P. (2001). Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy (4th ed.). Carol Stream IL by Allured Publishing Corporation.
- [28] Carter, G.A., and Knapp, A.K. (2001). Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American journal of botany*, 88 (4), 677-684.
- [29] Jaleel, C.A., Manivannan, P., Abdul Wahid, F., Al-Jubruni, H.J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2009). Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 100-105.
- [30] Schütz, M. and Fangmeier, A. (2001). Growth and yield responses of spring wheat (*Triticumaestivum* L. cv. *Minaret*) to elevated CO<sub>2</sub> and water limitation. *Environmental Pollution*, 114 (2), 187-194.
- [31] Santos, C.V., Falcao, I.P., Pinto, G.C., Oliveira, H. and Loureiro, J. (2002). Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower plants and calli under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stress. *Journal of plant nutrition and soil science*, 165 (3), 366-372.
- [32] Zeng, D. and Luo, X. (2012). Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. *Open Journal of Soil Science*, 2 (3), 282-288.
- [33] Sheikha, S.A. and Al-Malki, F.M. (2011). Growth and chlorophyll responses of bean plants to the chitosan applications. *European Journal of Scientific Research*, 50 (1), 124-134.
- [34] Cha-Um, S. and Kirdmanee, C. (2009). Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (1), 87-98.
- [35] Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79 (4), 597-606.

- [36] Farouk, S. and Amany, A.R. (2012). Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. *Egyptian Journal of Biology*, 14, 14-26.
- [37] Zagzog, O.A., Gad, M.M. and Hafez, N.K. (2017). Effect of nano-chitosan on vegetative growth, fruiting and resistance of malformation of mango. *Trends in Horticultural Research*, 6, 673-681.
- [38] Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and Mc Manse, M.T. (2010). Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, Callus Culture. *African Journal of Biotechnol*, 9, 145-152.
- [39] Tester, M. and Venport, R.D. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91, 503-527.
- [40] Hu, Y. and Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168 (4), 541-549.
- [41] Dzung, N.A. and Thang, N.T. (2002). Effects of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation on growth of soy bean. In: Proceedings of 5th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, January, Advances of Chitin Science, Thailand. 5, 463-467.
- [42] Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M. and Newman, I.A. (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup>-permeable channels. *Plant Physiology*, 141, 1653-1665.
- [43] Jini, D. and Joseph, B. (2017). Physiological mechanism of salicylic acid for alleviation of salt stress in rice. *Rice Science*, 24 (2), 97-108.
- [44] Yang, F., Hu, J., Li, J., Wu, X. and Qian, Y. (2009). Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regul*, 58 (2), 131-136.
- [45] Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 344-351.
- [46] Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H. and Kang, C.M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4 (1), 8-14.
- [47] Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F. and Tattini, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (5), 709-711.
- [48] Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z. W., Wu, B. H., Lauvergeat, V., Gomès, E. and Delrot, S. (2013). Berry ripening: recently heard through the grapevine. *Journal of experimental botany*, 65 (16), 4543-4559.
- [49] Castellarin, S. D., Matthews, M. A., Di Gaspero, G. and Gambetta, G. A. (2007). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227 (1), 101-112.
- [50] Chutipajit, S., Cha-Um, S. and Sompornpailin, K. (2009). Differential accumulations of proline and flavonoids in indica rice varieties against salinity. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2497-2506.
- [51] Weidner, S., Karolak, M., Karamac, M., Kosinska, A. and Amarowicz, R. (2009). Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78 (2), 97-103.
- [52] Anjum, N.A. (2015). Oxidative Damage to Plants-Antioxidant Networks and Signaling. *Frontiers in Plant Science*. antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Journal of Experimental Botany*, 60, 344-351.
- [53] Dixon, R.A., Choudhary, A.D., Dalkin, D., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Loake, G.J., Maxwell, C.A., Orr, J. and Paiva, N.L. (1992). Molecular biology of stress induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa, In H.A, Stafford and R.K, Ibrahim (eds). *Phenolic Metabolism in Plants*, 91-138.
- [54] Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. and Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (4), 405-413.
- [55] Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. and Dixon, R.A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 16 (3), 098 -109.
- [56] Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P. and Wang, W. (2008). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *J. Plant Growth Regul*, 55, 1-10.
- [57] Falcon-Rodriguez, A.B., Cabrera, J.C., Ortega, E. and Martínez-Téllez, M.A. (2009). Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4 (3), 192-200.
- [58] Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology*, 9, 8038-8047.
- [59] Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L. and Franklin, G. (2019). Elicitation as a tool to improve the profiles of highvalue secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71 (1), 70-82.
- [60] Elhindi, K.M., Al-Suhaibani, N.A., El-Din, A.F.S., Yakout, S.M. and Al-Amri, S.M. (2016). Effect of foliar-applied iron and zinc on growth rate and essential oil in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under saline conditions. *Progress in Nutrition*, 18 (3), 288-298.
- [61] Bernstein, N., Kravchik, M. and Dudai, N. (2010). Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alterations of morphological development. *Annals of Applied Biology*, 156 (2), 167-177.
- [62] Alves, L.S., Paz, V.P.S., Silva, A.J.P., Oliveira, G.X.S., Oliveira, F.E.R. and Amorim, E.L. (2015). Content, yield and chemical composition of essential oil of sweet basil plants subjected to NaCl saline stress. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, 17 (4), 807-813.

- 
- [63] Taheri, GH. (2015). Effects of Chitosan Spraying on Physiological Characteristics of *Ferula flabelliloba* (*Apiaceae*) Under Drought Stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 13 (4), 728-737.