

## بررسی اثر محلول پاشی کیتوزان بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آویشن (*Thymus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی

فاطمه سالارپور غربا<sup>۱</sup> و حسن فرح‌بخش<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پست الکترونیک: hfarahbakhsh@uk.ac.ir

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰

### چکیده

به منظور بررسی اثر محلول پاشی کیتوزان بر ویژگی‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (پروترین، پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و درصد و عملکرد اسانس) و عملکرد ماده خشک آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) در شرایط تنش خشکی، آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در منطقه لاله‌زار، بردسیر، استان کرمان در سال ۱۳۹۸ به مرحله اجرا درآمد. تنش خشکی در چهار سطح (۳۵، ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس) و غلظت کیتوزان در پنج سطح (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم کیتوزان بر لیتر استیک اسید) به ترتیب به عنوان فاکتورهای اصلی و فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و درصد و عملکرد اسانس و کاهش معنی‌دار عملکرد ماده خشک شد. با افزایش غلظت کیتوزان پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، عملکرد ماده خشک و درصد اسانس افزایش معنی‌داری نشان دادند که منتج به افزایش معنی‌دار عملکرد اسانس به عنوان مهمترین شاخص کیفیت در گیاه آویشن باغی شد. پروتئین و آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تأثیر محلول پاشی کیتوزان قرار نگرفتند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت‌های بالاتر کیتوزان (۱/۵ گرم کیتوزان بر لیتر استیک اسید) در رفع آسیب‌های ناشی از تنش خشکی و حصول عملکرد بالاتر نقش مؤثرتری داشتند.

واژه‌های کلیدی: *Thymus vulgaris* L.، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تخلیه رطوبت قابل دسترس، پروتئین، درصد اسانس، عملکرد اسانس.

### مقدمه

مضر است و منجر به کاهش شدید رشد و عملکرد محصولات در سراسر جهان می‌شود (He et al., 2018). یکی از تأثیرگذارترین عوامل محدودکننده محیطی بر عملکرد کمی و کیفی تولیدات گیاهی تنش خشکی می‌باشد (Zhang et al.,

تنش‌های زنده (حمله پاتوژن‌ها، حمله علفخواران و ...) و غیر زنده (خشکی، شوری، فلزات سنگین و ...) و به‌ویژه ترکیب غیرقابل پیش‌بینی تنش‌های مختلف برای گیاه بسیار

2020). تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار رشد و عملکرد ماده خشک و افزایش عملکرد اسانس در گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) (Mohammadi *et al.*, 2020)؛ (Arpanahi *et al.*, 2020) شد. از این رو افزایش توان گیاهان برای تحمل تنش‌های محیطی ناشی از کمبود آب در افزایش عملکرد مهم به نظر می‌رسد. کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی است که توسط N-deacetylation کیتین استخراج شده از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان مانند میگو و خرچنگ یا دیواره سلولی برخی از قارچ‌ها بدست می‌آید. این مولکول‌ها غیر سمی، قابل تجزیه زیستی و زیست سازگار هستند و این امر موجب کاربرد گسترده آنها در کشاورزی شده است تا جایی که آنها می‌توانند به‌عنوان محرک قوی بهره‌وری گیاه و محافظ در برابر عوامل نامساعد محیطی عمل کنند (Malerba *et al.*, 2019). ساختار شیمیایی کیتوزان از یک پلیمر خطی متشکل از دو زیر واحد بدست آمده است، D-گلوکوزامین و N-استیل-D-گلوکوزامین که با پیوند گلیکوزیدیک به هم متصل می‌شوند (Hidangmayum *et al.*, 2019). کیتوزان می‌تواند پاسخ‌هایی را در گیاه القاء کند که باعث سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مواد سازگار در سلول‌ها شوند و یک مجموعه از پیام‌های شیمیایی را برای گیاه ارسال می‌کند که باعث افزایش رشد و بهره‌وری و همچنین بهبود فرایندهای فیزیولوژیکی و آناتومیکی بسیاری از محصولات تحت شرایط بدون تنش یا تنش می‌شود (Farouk & Al-Sanoussi, 2019). همچنین کیتوزان دارای یک خاصیت منعکس‌کننده نور و ضد تعریق می‌باشد که باعث کاهش هدررفت آب از گیاه و در نتیجه خنک شدن گیاه در شرایط تنش می‌شود (Muchate *et al.*, 2016). همچنین کیتوزان با قابلیت دوگانه مهار عوامل بیماری‌زا و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی القایی در مقابل گستره وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها منجر به کاهش استفاده از سموم و قارچ‌کش‌ها شده است و قادر است گیاه را در مقابل عوامل

2018b). پاسخ به تنش خشکی در تمام سطوح گیاهان اتفاق می‌افتد که شامل پاسخ‌های سلولی، تغییر متابولیسم و تغییر در سطح مولکولی می‌باشد (Shukla *et al.*, 2012). نتایج مطالعات نشان می‌دهد در شرایط تنش کمبود آب، روزه‌ها در گیاه بسته می‌شوند و متعاقب آن غلظت  $CO_2$  در بافت مزوفیل کاهش می‌یابد و به دنبال این وضعیت واکنش‌های تاریکی فتوسنتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش‌های روشنایی که شامل ATP و NADPH است، مصرف نمی‌شوند. در چنین شرایطی به علت عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف  $NADP^+$  برای دریافت الکترون کاهش می‌یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به‌عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می‌کند و منجر به شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen species) مانند سوپراکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^\cdot$ ) در کلروپلاست و میتوکندری‌ها می‌شوند (Jubany-Mari *et al.*, 2010). گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و از دست رفتن یکپارچگی غشاءها و حتی مرگ سلول می‌گردند (Sharma *et al.*, 2013). گیاهان برای جلوگیری از اثرهای مخرب تنش اکسیداتیو، از یک سیستم دفاعی پیچیده مانند آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین همانند اسید آسکوربیک، گلوکاتایون، کاروتنوئیدها و توکوفرول استفاده می‌کنند (Verma *et al.*, 2014).

تنش آبی با توجه به مدت زمان، دوام و اندازه کمبود آن، تأثیرات منفی بر مشخصات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارد که در نهایت منجر به کاهش عملکرد کمی و کیفی گیاهان تحت این شرایط خواهد شد (Gao *et al.*,

این گیاه پوشیده از کرک‌های سفیدرنگ می‌باشد. اندام رویشی آویشن باغی حاوی مواد مؤثره است. اسانس این گیاه زردرنگ و مقدار آن بین ۱٪ تا ۳٪ متغیر می‌باشد (Pavela et al., 2018).

مواد مؤثره آویشن باغی خلط‌آور بوده و برای معالجه سرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد. از تنتور و عصاره‌های الکلی این گیاه برای معالجه سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده فراوان می‌شود. علاوه بر این، مواد مؤثره آویشن باغی در صنایع غذایی به مقدار فراوان کاربرد دارد. از تیمول و کارواکرول آن به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی در صنایع غذایی استفاده می‌شود (Askary et al., 2018).

هدف از این پژوهش، بررسی واکنش گیاه آویشن باغی به تنش خشکی و الیستور کیتوزان از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکرد گیاه بود.

### مواد و روش‌ها

آزمایش در بهار ۱۳۹۸ در منطقه لاله‌زار، واقع در ۸۰ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان بردسیر با طول جغرافیایی ۵۶/۸۲ شرقی و عرض جغرافیایی ۲۹/۵۱ شمالی با ارتفاع ۲۷۷۵ تا ۲۹۸۰ متر از سطح دریا اجرا شد. بافت خاک محل آزمایش از نوع لومی- شنی بود. خصوصیات خاک مورد آزمایش در جدول ۱ مشخص شده است.

بیمای‌زا محافظت کند (Arriola et al., 2013). از این رو افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای استفاده از محصولات تازه و عاری از ترکیب‌های شیمیایی (محصولات ارگانیک) و همچنین تمایل عمومی برای پیدا کردن یک روش جایگزین و کم هزینه برای نگهداری محصولات کشاورزی، کاهش مصرف آب و نیز کاهش عوامل بیماری‌زا در مدت کاشت و برداشت باعث شده است که استفاده از ترکیب‌های طبیعی از جمله کیتوزان مورد توجه بسیاری قرار گیرد.

اثرهای تنش خشکی در عملکرد و تغییرات مواد مؤثره گیاهان دارویی نیز متفاوت می‌باشد. به طوری که به نظر می‌رسد که گیاهان دارویی واکنش‌های متفاوتی نسبت به تنش خشکی در عملکرد و مواد مؤثره تولیدی داشته باشند. برای درک بهتر این ویژگی‌ها تحقیقات گسترده روی گیاهان با ارزش دارویی و اعمال تیمارهای مختلف نیاز است. در این بین، خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگترین و متمایزترین خانواده‌های گیاهی گلدار است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد و دارای حدود ۱۵۰ جنس و ۲۸۰۰ گونه می‌باشد که در بین آنها آویشن (*Thymus spp.*) از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای است (Casiglia, 2015).

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) گیاهی با ساختار بوته‌ای و ساقه مستقیم، علفی یا چوبی و پرشاخه به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد و در بعضی موارد تا ۴۵ سانتی‌متر نیز گزارش شده است (Askary et al., 2018). ساقه‌های منشعب

جدول ۱- نتایج آزمایش خاک مربوط به مزرعه آزمایشی در سال ۱۳۹۸

SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub>	رس	لای	شن	فسفر		ازت کل	کربن آلی	اسیدیته گل اشباع	هدایت الکتریکی (dS/m)
					پتاسیم قابل جذب	قابل جذب				
(me/lit)		%			(mg/kg)		%			
۲۳	۰/۸	۱۱	۱۵	۷۴	۲۶۰	۱۴	۰/۰۷	۰/۰۸	۷/۴	۳/۴

آزمایش به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمار آبیاری در چهار سطح، آبیاری پس از ۳۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (بدون تنش)، آبیاری پس از ۵۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (تنش خفیف)، آبیاری پس از ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (تنش متوسط) و آبیاری پس از ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (تنش شدید) به عنوان فاکتور اصلی و محلول پاشی کیتوزان در ۵ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر استیک اسید) به عنوان فرعی انتخاب شدند. برای اعمال تیمارهای آبیاری میزان رطوبت وزنی خاک در حالت ظرفیت زراعی (FC، قابلیت ۰/۳۳ بار) و نقطه پژمردگی دائم (PWP، قابلیت ۱۵- بار) با استفاده از صفحات فشاری تعیین و بعد دستگاه TDR در قابلیت‌های ذکر شده در مزرعه کالیبره گردید. بدین منظور کرتی به ابعاد ۲×۲ متر در مجاورت کرت‌های آزمایشی مشخص و در حد رطوبت اشباع آبیاری شد. سپس هر ۱۲ ساعت تا ۷۲ ساعت رطوبت خاک هم به روش وزنی و هم با TDR اندازه‌گیری شد و پس از آن تا رسیدن به رطوبت PWP روزانه رطوبت خاک به روش وزنی و با استفاده از دستگاه TDR تعیین گردید. در نهایت با استفاده از قرائت روزانه رطوبت توسط TDR و منحنی کالیبره شده دستگاه TDR (درصد حجمی رطوبت)، مساحت کرت (۹ مترمربع)، عمق مورد نظر (۵۰ cm) و تیمار مورد نظر، حجم آب مورد نیاز هر کرت محاسبه و به وسیله کنتور حجمی به هر کرت داده شد.

هر کرت با توجه به اینکه بذرهاى آویشن در شرایط اقلیمی مناسب ۱۴ تا ۲۰ روز پس از کاشت سبز می‌شوند و همچنین به دلیل عدم یکنواختی پوشش مزرعه و رشد و نمو کند گیاهان جوانه زده، اقدام به کشت غیرمستقیم در خزانه هوای آزاد شد. پس از آبیاری منظم و وجین دستی علف‌های هرز خزانه، نشاءها در اواسط اردیبهشت‌ماه (به علت سردی هوا در منطقه لاله‌زار) به زمین اصلی منتقل شدند (ارتفاع

نشاءها در زمان انتقال در حدود ۱۰ سانتی‌متر بود). هر واحد آزمایشی (کرت) شامل ۶ ردیف کاشت به طول ۳ متر، فاصله بین ردیف‌ها ۵۰ سانتی‌متر و فاصله گیاهان روی ردیف ۱۵ سانتی‌متر بود. فاصله بین کرت‌ها ۱ متر در نظر گرفته شد تا رطوبت کرت‌های مجاور اثری روی هم نداشته باشند.

برای تهیه محلول کیتوزان، از روش (Khan et al., 2003) استفاده شد. برای این منظور از محلول اسید استیک ۱٪ استفاده شد و بعد محلول کیتوزان در اسید ذکر شده تهیه گردید. پس از استقرار گیاه، محلول پاشی کیتوزان در دو نوبت و به فواصل چهار روز، بر روی سطح برگ انجام شد. یک هفته پس از محلول پاشی دوم تیمارهای آبیاری نیز اعمال گردید و کود اوره (براساس ۴۰ تا ۶۰ کیلوگرم در هکتار) برای هر کرت اندازه‌گیری و به کرت‌ها اضافه شد.

در این بررسی برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر، در مرحله ۵۰٪ گلدهی (اواخر مردادماه ۹۸)، پس از حذف دو ردیف کناری و ۰/۵ متر از ابتدا و انتهای هر کرت به عنوان اثر حاشیه‌ای، بوته‌های موجود در یک مترمربع برداشت شد و در محل سرپوشیده، دارای تهویه مطبوع به مدت یک هفته خشک و بعد توزین گردید. آویشن باید در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد برای کاهش اتلاف مواد مؤثره در جریان تبخیر، خشک شود و رنگ سبز خود را حفظ کند.

برای استخراج اسانس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر حاصل از آسیاب نمودن اندام‌های خشک شده در هر تیمار آماده و مورد بهره‌برداری قرار گرفت. استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه اسانس‌گیری طرح کلونجر که براساس دارونامه بریتانیا طراحی شده انجام شد. نمونه‌ها پس از ۳ ساعت اسانس‌گیری و جداسازی از ستون دستگاه، جمع‌آوری و اسانس حاصل برای هر نمونه توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و در ظرف‌های دربسته تیره‌رنگ دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کل برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bradford, 1976).

#### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Dhindsa و Motowe (۱۹۸۱) استفاده شد. ابتدا محلول بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH=7) و بافر اندازه گیری (حاوی بافر پتاسیم فسفات، EDTA ۰/۱ مولار و  $H_2O_2$  ۱۰ میلی مولار) تهیه شد. منحنی کاهشی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ خوانده شد و فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات جذب بر زمان به مدت یک دقیقه ثبت و فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی  $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد (Dhindsa & Motowe, 1981).

#### سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار با ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی مخلوط گردید و جذب واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه از شروع واکنش قرائت شد (Yoshimura et al., 2000).

#### سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش (حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) گایاکول ۲۰ میلی مولار، آب اکسیژنه ۱۰ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی) تهیه و در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه خوانده شد. فعالیت تغییرات جذب با استفاده از ضریب خاموشی برابر  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

درصد اسانس براساس وزن اسانس بدست آمده در ۱۰۰ گرم ماده خشک گیاهی و عملکرد اسانس از حاصل ضرب درصد اسانس در عملکرد ماده خشک حاصل شد.

#### سنجش میزان پرولین

برای سنجش میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد و ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با ۱۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۳٪ سائیده شد و پس از صافی کردن، ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب جوش (دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد) قرار گرفت و ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه گردید و میزان جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Bates et al., 1973).

#### تهیه عصاره پروتئینی

برای تهیه عصاره پروتئینی ۵۰۰ میلی گرم از بافت تازه برگ در ۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (اسیدیته ۷/۵) سائیده شد که حاوی پلی وینیل پیرولیدین ۱٪ و  $Na_2EDTA$  ۱ میلی مولار بود. تمام مراحل استخراج عصاره در یخ انجام شد. سپس عصاره ها سانتریفوژ و از محلول رویی برای سنجش پروتئین کل و آنزیم ها استفاده شد (Bradford, 1976).

#### سنجش میزان پروتئین

برای سنجش میزان پروتئین کل به لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر معرف بیوره، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی افزوده و بلافاصله ورتکس شد. پس از ۲۵ دقیقه، جذب محلول ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد آلومین میزان پروتئین

(1977). تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و MSTAT-C انجام گردید و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

## نتایج

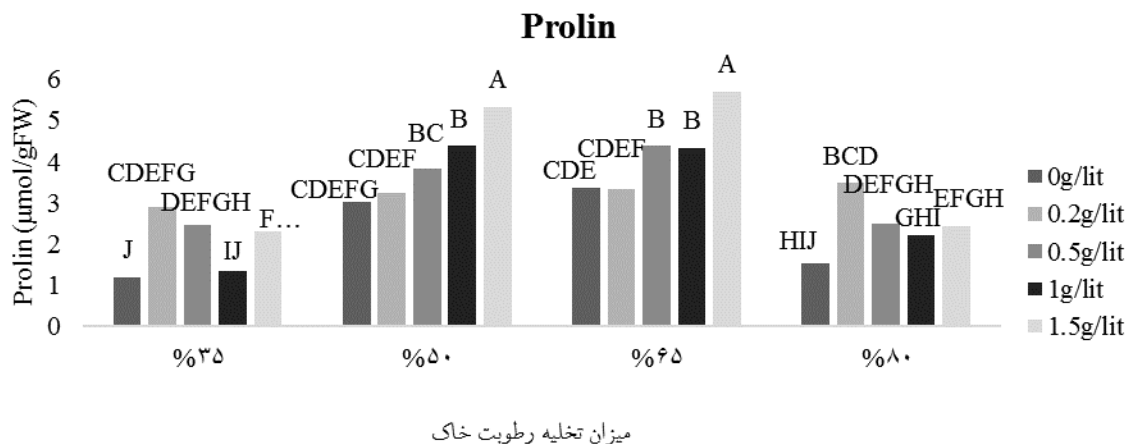
### میزان پرولین

اثرهای تنش خشکی، غلظت کیتوزان و برهم‌کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) بر میزان پرولین در گیاه آویشن باغی معنی‌دار بود (جدول ۲). از این رو بیشترین میزان پرولین در تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۱/۵ گرم کیتوزان مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۴/۷ برابر افزایش نشان داد. کمترین میزان پرولین نیز در تیمار ۳۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت صفر گرم کیتوزان مشاهده شد (شکل ۱).

محاسبه و برحسب یک واحد (میکرومول تترآگایاکول تولید شده در دقیقه) به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Polle *et al.*, 1994).

### سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بازدارندگی این آنزیم از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم است که ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.8)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریوفلاوین ۲۰ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی) تهیه و واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور شروع شد. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع و بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم برحسب یک واحد در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Giannopolitis & Ries, )



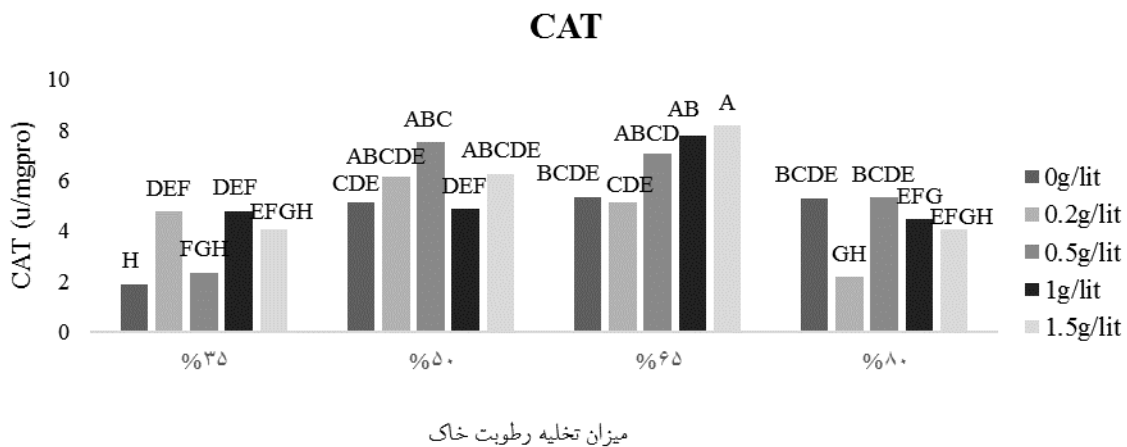
شکل ۱- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر میزان پرولین

## میزان پروتئین

نتایج حاصل از سنجش میزان پروتئین نشان داد که تنها اثر تنش خشکی (در سطح ۱٪) بر این صفت در گیاه آویشن باغی معنی دار شد (جدول ۲). به طوری که با افزایش تنش خشکی از میزان پروتئین در گیاه آویشن باغی کاسته شد، از این رو بیشترین مقدار آن در گیاهانی مشاهده شد که تحت تنش خشکی قرار نداشتند. کمترین میزان پروتئین در تیمار ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس مشاهده شد که نسبت به شاهد ۴۱/۹۷٪ کاهش نشان داد. غلظت کیتوزان بر میزان پروتئین در آویشن باغی معنی دار نشد اما میزان پروتئین در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۳).

## فعالیت آنزیم کاتالاز

همچنین نتایج بدست آمده بیانگر آن بود که تنش خشکی و برهم‌کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) میزان آنزیم کاتالاز را در گیاه آویشن باغی به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲). بیشترین میزان آنزیم کاتالاز از تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۱/۵ گرم کیتوزان بدست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۴/۳ برابر افزایش نشان داد. کمترین میزان آنزیم کاتالاز نیز از تیمار ۳۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت صفر گرم کیتوزان حاصل شد که با تعداد زیادی از تیمارهای کیتوزان تحت شرایط تنش شدید و بدون تنش اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر میزان آنزیم کاتالاز

جدول ۲- تجزیه واریانس میانگین مربعات غلظت کیتوزان تحت تنش خشکی بر صفات اندازه‌گیری شده در گیاه آویشن باغی

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروبلین	پروتئین	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز	سوپر اکسید دیسموتاز	درصد اسانس	عملکرد اسانس	عملکرد ماده خشک
تکرار (r)	۲	۰/۲۸ ns	۱۵۰۱/۵۲ ns	۵/۲۰ ns	۰/۰۲۷ ns	۰/۹۱ ns	۵/۲۱ ns	۰/۰۱۹ ns	۴/۵۲ ns	۶۰۲۰/۲۰ ns
آبیاری (a)	۳	۱۷/۸۲**	۵۸۲۷۷/۵۱**	۳۱/۶۴**	۰/۳۵۵**	۲۲/۰۸*	۱۰۸۹/۷۷**	۲/۵۶**	۲۷۳/۶۸**	۶۹۰۵۰۳/۹۲**
خطای اول (r×a)	۶	۰/۵۱۹	۱۵۶۹/۶۵	۲/۲۶	۰/۰۱۸	۲/۸۸	۴۳/۰۸	۰/۰۴۹	۲/۷۶	۴۲۲۹/۳۱
کیتوزان (b)	۴	۴/۲۸**	۱۷۱۹/۳۵ ns	۴/۱۸ ns	۰/۰۴۰*	۵/۸۵ ns	۱۸۲/۳۸**	۰/۲۷۳**	۱۴۱/۴۲**	۲۸۸۲۳۲/۸۱**
آبیاری×کیتوزان (a×b)	۱۲	۱/۴۲**	۸۸۸/۰۵ ns	۵/۱۵**	۰/۰۵۸**	۱۱/۴۶ ns	۱۰۸/۸۰*	۰/۰۹۸*	۱۶/۴۰**	۲۴۷۵۴/۸۱**
خطای کل (E)	۳۲	۰/۲۸۸	۱۲۲۴/۷۵	۱/۷۴	۰/۰۱۱	۹/۹۹	۴۰/۵۸	۰/۰۴۶	۳/۷۰	۸۵۷۴/۲۹
ضریب تغییرات (%)		۱۶/۹۶	۱۳/۳۹	۲۵/۸۲	۲۲/۶۴	۱۸/۹۵	۱۶/۵۷	۱۷/۴۰	۱۷/۰۷	۱۰/۳۶

ns, \* و \*\* به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪



جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت کیتوزان تحت تنش خشکی بر صفات اندازه‌گیری شده در گیاه آویشن باغی

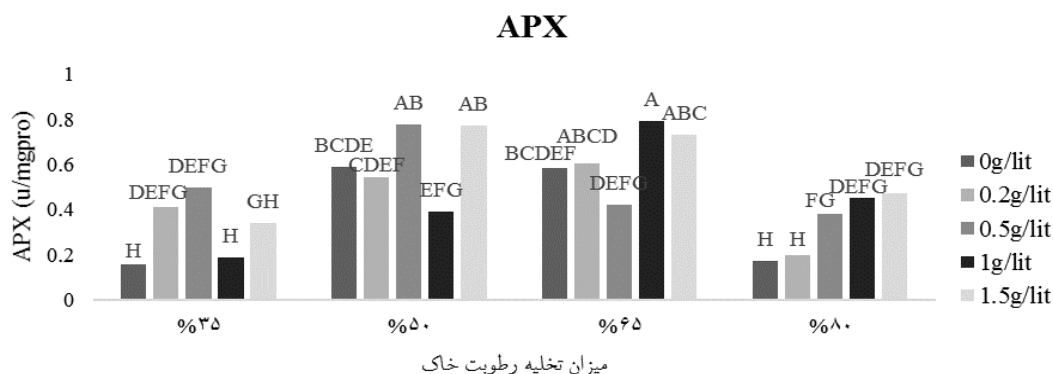
عملکرد ماده خشک	عملکرد اسانس	درصد اسانس	سوپر اکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	پروتئین (Mg/gFw)	پرولین (Mol/gFw)	تیمارها
(Kg/ha)		(%)	(U/mgFW)						
سطوح آبیاری									
۱۰۶۹/۰۷ a	۹/۹۲ b	۰/۹۳ c	۳۲/۸۸ c	۱۵/۴۰ b	۰/۳۱۸ b	۳/۵۶ b	۳۲۰/۷۶ a	۲/۰۴ b	آبیاری پس از ۳۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (شاهد)
۱۰۵۱/۵۳ a	۱۴/۰۳ a	۱/۳۰ b	۴۲/۴۹ b	۱۷/۴۷ a	۰/۵۸۱ a	۵/۹۷ a	۳۰۳/۲۵ a	۳/۹۶ a	آبیاری پس از ۵۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس
۸۴۳/۵۳ b	۱۵/۲۷ a	۱/۷۹ a	۴۸/۳۹ a	۱۷/۹۳ a	۰/۶۲۶ a	۶/۶۸ a	۲۳۴/۷۳ b	۴/۲۲ a	آبیاری پس از ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس
۶۱۱/۰۰ c	۵/۸۶ c	۰/۹۲ c	۲۹/۹۸ c	۱۵/۹۰ b	۰/۳۶۳ b	۴/۲۵ b	۱۸۶/۱۱ c	۲/۴۳ b	آبیاری پس از ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس
غلظت کیتوزان									
۷۶۲/۰۰ c	۸/۰۳ c	۱/۰۸ c	۳۳/۷۲ c	۱۶/۳۷ a	۰/۳۹۲ b	۴/۴۱ a	۲۵۸/۶۳ a	۲/۲۷ c	صفر گرم بر لیتر (شاهد)
۷۴۱/۸۳ c	۸/۰۹ c	۱/۱۰ c	۴۳/۹۰ a	۱۶/۶۱ a	۰/۴۵۵ ab	۴/۵۴ a	۲۴۲/۰۹ a	۳/۲۴ b	۰/۲ گرم بر لیتر
۸۴۹/۸۳ b	۱۰/۵۰ b	۱/۲۲ bc	۳۸/۵۴ abc	۱۷/۸۵ a	۰/۵۱۹ a	۵/۵۵ a	۲۶۳/۰۷ a	۳/۳۰ b	۰/۵ گرم بر لیتر
۱۰۵۸/۶۷ a	۱۵/۰۹ a	۱/۴۲ a	۳۵/۹۷ bc	۱۶/۵۶ a	۰/۴۵۶ ab	۵/۴۵ a	۲۷۱/۴۴ a	۳/۰۶ b	۱ گرم بر لیتر
۱۰۵۶/۵۸ a	۱۴/۶۴ a	۱/۳۶ ac	۴۰/۰۶ ab	۱۵/۹۹ a	۰/۵۲۸ a	۵/۶۳ a	۲۷۰/۸۴ a	۳/۹۴ a	۱/۵ گرم بر لیتر

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

## میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اثر غلظت کیتوزان (در سطح ۵٪) و همچنین اثر تیمار تنش خشکی و برهم‌کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه آویشن باغی معنی‌دار شد (جدول ۲). به‌نحوی که بیشترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز

در تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۱ گرم کیتوزان مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۵/۲ برابر افزایش نشان داد. کمترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز از تیمار ۳۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت صفر گرم کیتوزان بدست آمد (شکل ۳).



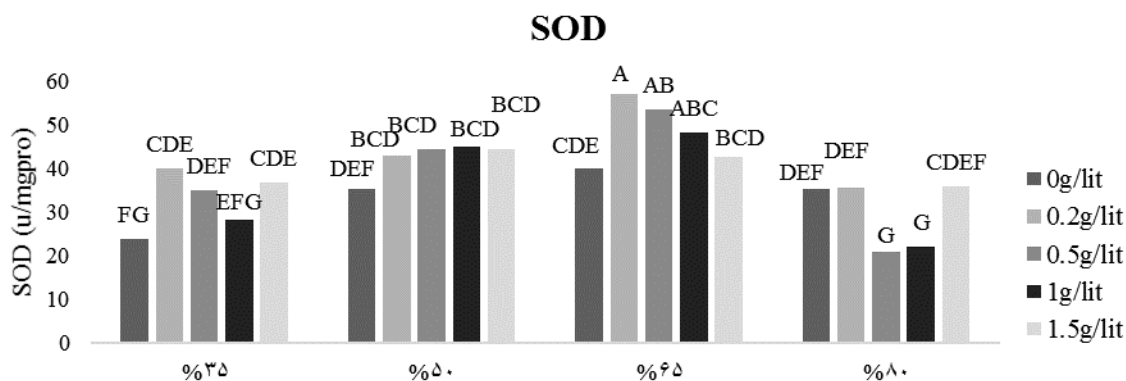
شکل ۳- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز

## میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز

تنش خشکی (در سطح ۵٪) میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز را در گیاه آویشن باغی تحت تأثیر قرار داد ولی غلظت کیتوزان و برهم‌کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان نتوانستند میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار دهند (جدول ۲). با افزایش تنش خشکی میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز افزایش یافت، به‌نحوی که بیشترین میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱۶/۴۲٪ افزایش نشان داد. با افزایش غلظت کیتوزان تا ۰/۵ گرم میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز افزایش یافت، به‌نحوی که بیشترین میزان این آنزیم از تیمار ذکرشده حاصل گردید که نسبت به شاهد ۹/۰۴٪ افزایش نشان داد، اگرچه این افزایش در میزان آنزیم از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳).

## میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرهای تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) و برهم‌کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۵٪) بر میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گیاه آویشن باغی معنی‌دار گردید (جدول ۲). مقدار این آنزیم در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ گرم کیتوزان با ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس تفاوت معنی‌داری با غلظت ۰/۲ گرم کیتوزان در این سطح از تخلیه رطوبت نداشت، اگرچه بیشترین مقدار این آنزیم از تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۰/۲ گرم کیتوزان حاصل شد. افزایش در مقدار آنزیم در تیمار ذکرشده نسبت به شاهد ۱۳۸/۰۴٪ بود. کمترین میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از تیمار ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۰/۵ گرم کیتوزان حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۴).



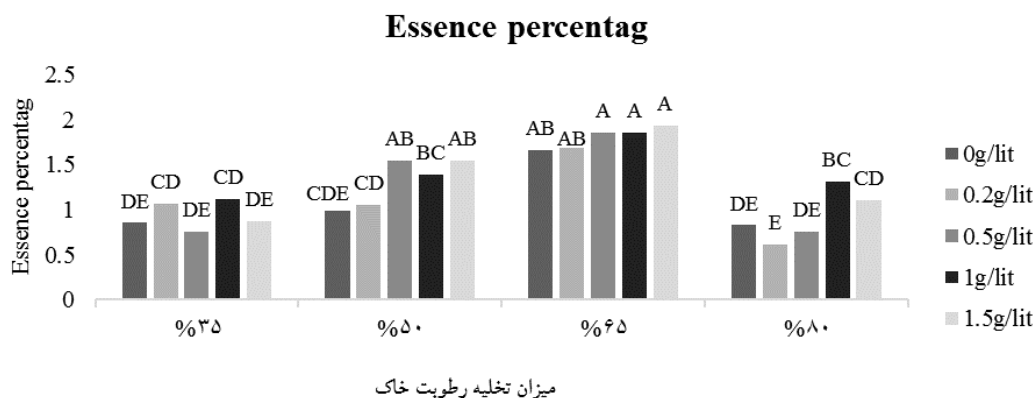
میزان تخلیه رطوبت خاک

شکل ۴- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

درصد اسانس

۱۲۷٪ افزایش نشان داد. کمترین درصد اسانس نیز از تیمار ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۰/۲ گرم کیتوزان بدست آمد که با تیمار شاهد اختلاف معنی داری نداشت. بنابراین به نظر می رسد درصد اسانس در گیاه آویشن باغی تا سطح متوسط تنش خشکی افزایش اما در تنش شدیدتر کاهش را به دنبال داشته است (شکل ۵).

درصد اسانس به طور معنی داری تحت تأثیر تنش خشکی، غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) و برهم کنش این دو فاکتور (در سطح ۵٪) قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین درصد اسانس از تیمار ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۱/۵ گرم کیتوزان حاصل گردید که نسبت به تیمار شاهد



میزان تخلیه رطوبت خاک

شکل ۵- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر درصد اسانس

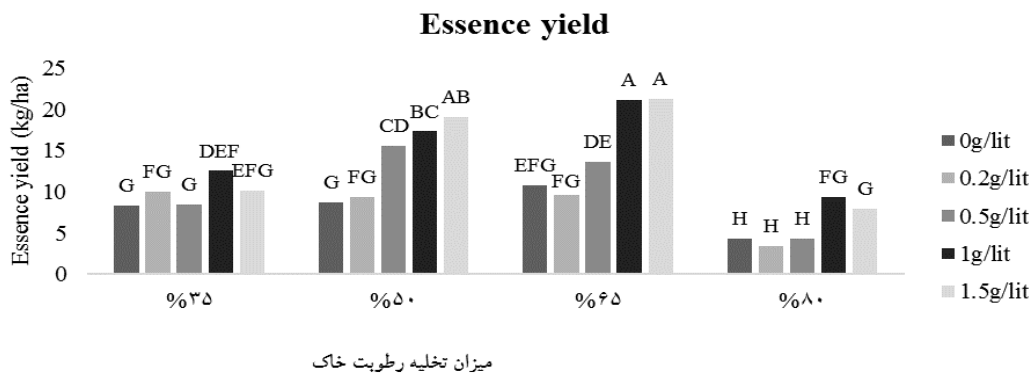
عملکرد اسانس

عملکرد اسانس در گیاه آویشن باغی معنی دار بودند (جدول ۲). همان طور که در شکل ۶ مشاهده می شود بیشترین عملکرد اسانس از تیمارهای ۶۵٪ تخلیه رطوبت

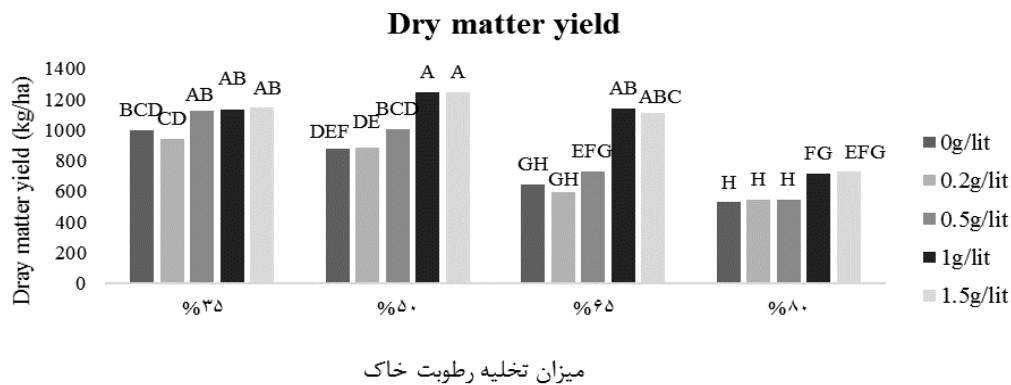
اثرهای تنش خشکی، غلظت کیتوزان و برهم کنش دو فاکتور تنش خشکی و غلظت کیتوزان (در سطح ۱٪) بر

شاهد ۵۹/۶۸٪ کاهش نشان داد. طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق، بیشترین عملکرد اسانس از گیاهان رشد کرده در شرایط تنش خفیف و متوسط حاصل گردید و گیاهان رشد کرده در شرایط تنش شدید به دلیل کاهش قابل توجه عملکرد ماده خشک، عملکرد اسانس پایینی داشتند (شکل ۶).

قابل دسترس و غلظت‌های ۱ و ۱/۵ گرم کیتوزان بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بدست آمد. به‌طور متوسط میزان عملکرد اسانس در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد ۲/۵ برابر افزایش نشان داد. به‌نحوی که کمترین میزان عملکرد اسانس از تیمار ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت ۰/۲ گرم کیتوزان حاصل گردید که نسبت به تیمار



شکل ۶- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر عملکرد اسانس



شکل ۷- اثر متقابل تنش خشکی × غلظت کیتوزان بر عملکرد ماده خشک

نشان داده شده است بیشترین میزان عملکرد ماده خشک مربوط به تیمار اثر متقابل ۵۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت‌های ۱ و ۱/۵ گرم کیتوزان می‌باشد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند و به‌طور متوسط نسبت به تیمار شاهد ۲۴/۵٪ افزایش نشان دادند. بنابراین

#### عملکرد ماده خشک

نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی، غلظت کیتوزان و اثر متقابل این دو فاکتور به‌طور معنی‌داری (در سطح ۱٪) عملکرد ماده خشک را تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۲). همانطور که در شکل ۷

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) (Mohammadi *et al.*, 2018)، آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) (Emami *et al.*, 2017a) و جو (*Hordeum vulgare*) (Bistgani *et al.*, 2017a) و جو (Hafez *et al.*, 2020) گزارش شده است.

مقدار پروتئین با افزایش تنش خشکی کاهش یافت (جدول ۳). از این رو به نظر می‌رسد کاهش قابلیت آب در گیاه، موجب کاهش قابل توجهی در پلی‌ریبوزوم‌ها و مونوریبوزوم‌ها می‌شود که این امر بیانگر کاهش سنتز پروتئین‌ها می‌باشد. همچنین تنش خشکی، بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های درون سلولی را القاء می‌کند و سبب تجزیه پروتئین‌ها و تحریک دوباره نیتروژن و متعاقب آن سنتز مواد محلول سازگار می‌شود (González-Chavira *et al.*, 2018). در شرایط تنش خشکی کاهش سنتز پروتئین در برنج (*Oryza sativa*) (Singh *et al.*, 2015) و ماش (*Vigna radiata* L.) (Ahmad *et al.*, 2015) گزارش شده است که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد.

تنش خشکی باعث افزایش محتوای آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گردید (جدول ۳ و شکل‌های ۴-۲) که این نشان‌دهنده واکنش گیاه آویشن باغی به خشکی از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی بوده که احتمالاً تولید اضافی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تحت شرایط تنش، کنترل و گیاهان را در مقابل اثرهای مضر این گونه‌ها تا حدی محافظت نموده است. آنزیم کاتالاز (CAT) از ماکرومولکول‌ها و غشاء‌های سلول‌ها محافظت می‌کند (Mehla *et al.*, 2017). آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز نقش اساسی در فرایندهای فیزیولوژیک گیاه مانند رشد و نمو و متابولیسم دارد و تنها آنزیمی است که قادر به از بین بردن پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در کلروپلاست است (Pandey *et al.*, 2017). آنزیم گایاکول پراکسیداز از مهمترین گروه‌های پراکسیداز است که گایاکول را به‌عنوان یک سوبسترای کاهنده، اکسید می‌کند و گایاکول در واکنش با پراکسید هیدروژن منجر به تولید ترکیبی به نام تتراگایاکول کوئینون می‌شود (Amiri *et al.*, 2011). فعالیت آنزیم سوپر

به نظر می‌رسد غلظت‌های بالاتر کیتوزان اثرهای سوء تنش خشکی بر عملکرد ماده خشک را تا سطح ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس (تنش متوسط) بهبود بخشیده است اما اثر قابل توجهی بر بهبود عملکرد تحت تنش شدید نداشته است؛ به نحوی که کمترین میزان عملکرد ماده خشک مربوط به تیمار ۸۰٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس و غلظت‌های پایین کیتوزان (۰، ۰/۲ و ۰/۵ گرم) می‌باشد که به‌طور متوسط نسبت به تیمار شاهد ۴۷٪ کاهش نشان دادند (شکل ۷).

## بحث

بر اساس نتایج این پژوهش تنش خشکی میزان عملکرد ماده خشک را در گیاه آویشن باغی کاهش داد (جدول ۳ و شکل ۷). تنش خشکی احتمالاً از طریق افزایش هورمون آبسزیک اسید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه تخریب اکسیداتیو DNA، پروتئین، لیپیدها و مهار رشد (Abdalla, 2011) منجر به کاهش عملکرد ماده خشک گردید. طبق گزارش‌های موجود، میزان عملکرد ماده خشک در گیاهان پریوش (*Catharanthus roseus*) (Ali *et al.*, 2021)، آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) (Emami *et al.*, 2017a) و مرزنجوش (*Origanum vulgare*) (Ninou *et al.*, 2017)، نعناع (*Mentha sp*) (Elansary, 2017) و یونجه (*Medicago sativa*) (Zhang *et al.*, 2018a) در پاسخ به تنش خشکی کاهش یافت که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. افزایش میزان اسید آمینه پرولین به‌عنوان مهارکننده انواع رادیکال‌های آزاد و یک محافظ اسمزی در اثر تنش خشکی اعمال شده تا حد ۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس حکایت از مقابله گیاه با شرایط بوجود آمده دارد (جدول ۳ و شکل ۱). با کاهش قابلیت آب، میزان سنتز پرولین از گلوتامیک اسید افزایش می‌یابد که به‌علت تغییر در سرعت اکسیداسیون پرولین به گلوتامات یا عدم دخالت آن در سنتز پروتئین و یا مجموع این عوامل می‌باشد (Liang *et al.*, 2013). در راستای نتایج حاصل از این تحقیق، افزایش میزان پرولین در گیاهان

کاهش عملکرد اسانس تحت تنش شدید می‌تواند به دلیل کاهش محتوای آب خاک و اثرهای مخرب تنش آبی بر رشد و عملکرد ماده خشک گیاه و محتوای اسانس باشد (Askary et al., 2018). افزایش درصد و عملکرد اسانس تحت تنش خشکی در گیاهان زیادی از جمله مریم‌گلی آفریقایی (*Salvia dolomitica*) (Caser et al., 2018)، ریحان (*Ocimum basilicum* L.) (Mandoulakani et al., 2017)، آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) و آویشن دناهی (*Thymus daenensis*) (Askary et al., 2018) گزارش شده است که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد.

راهبردهای مختلف مدیریتی برای مقابله با تنش خشکی ارائه شده است. در این میان کاربرد محرک‌های زیستی از جمله کیتوزان پاسخ‌های دفاعی متعددی را در رابطه با تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان به دنبال داشته است. در این پژوهش کاربرد و افزایش غلظت کیتوزان منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در گیاه آویشن باغی شد (جدول ۳). کیتوزان احتمالاً از طریق تأثیر بر روی ژن‌های هسته و کلروپلاست باعث افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی شده است (Choudhary et al., 2017). مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه، پس از محلول‌پاشی کیتوزان افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) (Ali et al., 2021)، ذرت (*Zea mays*) (Rabelo et al., 2019) و آفتابگردان (*Helianthus annuus*) (Shehzad et al., 2020)، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید توزان و گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) (Elansary et al., 2020) تحت تنش خشکی گزارش شده است.

محلول‌پاشی کیتوزان، افزایش میزان پرولین را در گیاهان تحت تنش آویشن باغی به دنبال داشت (جدول ۳ و شکل ۱). احتمالاً کیتوزان با افزایش محتوای تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند پرولین، پایداری سلول را در برابر تنش خشکی سبب شد و نقش مهمی را در محافظت از ثبات غشای پلاسمایی، تنظیم فشار آب و بهبود محتوای نسبی آب

اکسید دیسموتاز کارایی چرخه مهلر ۳ را در کلروپلاست بهبود می‌بخشد و افزایش کارایی این چرخه، باعث کاهش شدت آسیب به مولکول‌های زیستی می‌شود. بنابراین سوپر اکسید دیسموتاز نقش حیاتی‌تری را در سیستم آنتی‌اکسیدانی نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ایفاء می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش خشکی در گیاهان زیادی گزارش شده است که می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه جو (*Hordeum vulgare*) (Hafez et al., 2020) و آفتابگردان (*Helianthus annuus*) (Shehzad et al., 2020)، افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) (Hassan et al., 2020) و کلم (*Brassica rapa* L.) (Bhuiyan et al., 2019) و افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) (Mohammadi et al., 2018)، آفتابگردان (*Helianthus annuus*) (Shehzad et al., 2020) و گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) (Elansary et al., 2020) اشاره کرد که با نتایج حاصل از این پژوهش تطابق دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده، تنش خشکی باعث افزایش درصد و عملکرد اسانس در گیاه آویشن باغی شد (جدول ۳ و شکل‌های ۵ و ۶). احتمالاً تأثیر تنش خشکی بر کمیت و کیفیت ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس از طریق تغییر بیان ژن‌ها یا فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز این ترکیب‌ها می‌باشد. پیشرفت در تولید اسانس به افزایش تعداد غدد و چگالی بالاتر اسانس غدد در شرایط خشکی نسبت داده شده است (Garcia-Caparrós et al., 2019) ولی همیشه همراه با بالا رفتن میزان تنش خشکی درصد اسانس نمی‌تواند افزایش یابد، زیرا در تنش‌های بالا گیاه بیشتر مواد فتوسنتزی خود را صرف تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند پرولین، گلیسین-بتائین و ترکیب‌های قندی از جمله ساکارز، فروکتوز و فروکتان می‌کند تا بتواند قابلیت آب سلولی را کاهش دهد و در مقابل تنش خشکی مقاومت نماید (RezaeiChiyaneh & Pirzad, 2013). همچنین

بدست آمده از این پژوهش تنش خشکی به طور قابل توجهی عملکرد ماده خشک آویشن باغی را کاهش داد. با این حال میزان اسانس بیشتری از گیاهان در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال بدست آمد که ناشی از تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در نتیجه، گیاهانی که تحت تنش خفیف تا متوسط (۶۵٪ تخلیه رطوبت قابل دسترس) رشد کرده بودند بیشترین عملکرد اسانس را داشتند. همچنین کاربرد کیتوزان در غلظت‌های بالا توانست تا حدودی تأثیر منفی تنش خشکی را بر تولید ماده خشک جبران کند. محلول پاشی کیتوزان با غلظت ۱/۵ گرم در لیتر بیشترین اثربخشی را در راستای افزایش عملکرد ماده خشک، درصد اسانس و در نهایت عملکرد اسانس داشت و برای کاهش اثرهای سوء ناشی از تنش خشکی در گیاه آویشن باغی قابل توصیه است.

### منابع مورد استفاده

- Abdalla, M.M., 2011. Beneficial effects of diatomite on the growth, the biochemical contents and polymorphic DNA in *Lupinus albus* plants grown under water stress. *Agriculture and Biology Journal of North American*, 2: 207-220.
- Ahmad, A., Selim, M.M., Alderfasi, A.A. and Afzal, M., 2015. Effect of drought stress on mung bean (*Vigna radiata* L.) under arid climatic conditions of Saudi Arabia. *Ecosystem and Sustainable Development X*, 192: 185-193.
- Ahmed, H.H.A., Aboul-Ella Nesiem, M.R., Allam, H.A. and El-Wakil, A.F., 2016. Effect of pre-harvest chitosan foliar application on growth, yield and chemical composition of Washington navel orange trees grown in two different regions. *African Journal of Biochemistry Research*, 10(7): 59-69.
- Ali, E.F., El-Shehawi, A.M., Ibrahim, O.H.M., Abdul-Hafeez, E.Y., Moussa, M.M. and Hassan, F.A.S., 2021. A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 16(161): 166-175.
- Amiri, A., Parsa, S.R., Nezami, M. and Ganjeali, A., 2011. The effects of drought stress at different phenological stages on growth indices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in greenhouse conditions. *Iranian Journal of Pulses Research*. 1: 69-84.

و در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو دارد (Ahmed et al., 2016). در راستای نتایج حاصل از این پژوهش، کاربرد برگ‌گی کیتوزان، غلظت پرولین را در گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) (Ali et al., 2021)، آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) (Emami Bistgani et al., 2017b) و جو (*Hordeum vulgare*) (Hafez et al., 2020) تحت تنش خشکی افزایش داد. براساس نتایج این پژوهش، محلول پاشی کیتوزان درصد و عملکرد اسانس گیاهان تحت تنش را افزایش داد (شکل‌های ۵ و ۶). در تطابق با نتایج حاصل، افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پس از کاربرد کیتوزان در گیاهان مختلف مانند آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) (Emami Bistgani et al., 2017b) و بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) (Hassanzadeh et al., 2016) تحت تنش خشکی گزارش شده است.

نتایج حاصل از این آزمایش افزایش میزان عملکرد ماده خشک را پس از کاربرد برگ‌گی کیتوزان نشان داد (شکل ۷). اولیگومرهای کیتوزان سیگنال‌های مهمی برای سلول‌های گیاهی هستند (Malerba & Cerana, 2018) و زمانی که به هسته و کلروپلاست‌ها می‌رسند باعث ایجاد انفجارهای اکسیداتیو، تولید هورمون، اصلاح کروماتین، بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش فتوسنتز و در نهایت بهبود رشد و عملکرد در گیاهان می‌شوند (Hadwiger, 2015). در راستای نتایج این مطالعه، محلول پاشی کیتوزان افزایش عملکرد ماده خشک را در گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) (Ali et al., 2021)، آویشن دناپی (*Thymus daenensis*) (Emami Bistgani et al., 2017a) و ریحان (*Ocimum basilicum*) (Malekpoor et al., 2016) تحت تنش خشکی به دنبال داشت.

در نتیجه می‌توان گفت شناخت سازوکارهای فیزیولوژیک سلول‌های گیاه در پاسخ به تنش خشکی به منظور غلبه بر محدودیت‌های موجود در امر تولید گیاهان دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. براساس نتایج

- Elansary, H.O., 2017. Green roof *Petunia*, *Ageratum*, and *Mentha* responses to water stress, seaweeds, and trinexapac-ethyl treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 145.
- Elansary, H.O., Abdel-Hamid, A.M.E., Yessoufou, K., Al-Mana, F.A., El-Ansary, D.O., Mahmoud, E.A. and Al-Yafrasi, M.A., 2020. Physiological and molecular characterization of water-stressed *Chrysanthemum* under robinin and chitosan treatment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42: 31.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017a. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5): 407-415.
- Emami Bistgani, Z., Siada, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalout, A. and Hashemi, M., 2017b. Morpho physiological and phytochemical traits of (*Thymus daenensis* Celak.) in response to deficit irrigation and chitosan application. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 231.
- Farouk, S. and Al-Sanoussi, A.J., 2019. The role of biostimulants in increasing barley plant growth and yield under newly cultivated sandy soil. *Cercetari Agronomice in Moldavia (Agronomical Research in Moldavia)*, 2(178): 114-125.
- Gao, S., Wang, Y., Yu, S., Huang, Y., Liu, H., Chen, W. and He, X., 2020. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of two *Adonis* species in Northeast China. *Scientia Horticulturae*, 259: 108795.
- Garcia-Caparros, P., Romero, M.J., Llanderal, A., Cermeno, P., Lao, M.T. and Segura, M.L., 2019. Effects of drought stress on biomass, essential oil content, nutritional parameters, and costs of production in six Lamiaceae species. *Water*, 11(3): 573.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- González-Chavira, M.M., Herrera-Hernández, M.G., Guzmán-Maldonado, H. and Pons-Hernández, J.L., 2018. Controlled water deficit as abiotic stress factor for enhancing the phytochemical content and adding-value of crops. *Scientia Horticulturae*, 234: 354-360.
- Hadwiger, L.A., 2015. Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to *Fusarium solani*: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. *Frontiers in Plant Science*, 6: 373.
- Arpanahi, A.A., Feizian, M., Mehdipourian, G.H. and Khojasteh, D.N., 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improve essential oil and physiological parameters and nutritional values of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. under normal and drought stress conditions. *European Journal of Soil Biology*, 100: 103217.
- Arriola, O.C., Rocha, M.O.C., Hernandez, A.B., Brauer, J.M.E. and Jatomea, M.P., 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1525-1536.
- Askary, M., Behdani, M.A., Parsa, S., Mahmoodi, S. and Jamialahmadi, M., 2018. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 111: 336-344.
- Bates, L.S., Waldren, S.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant soil*, 39: 205-207.
- Bhuiyan, T.F., Ahamed, K.U., Nahar, K., Al-Mahmud, J., Bhuyan, M.B., Anee, T.I., Fujita, M. and Hasanuzzaman, M., 2019. Mitigation of PEG-induced drought stress in rapeseed (*Brassica rapa* L.) by exogenous application of osmolytes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20: 101197.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, I., Demasi, S., Lovisolo, C. and Scariot, V., 2018. Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products*, 129: 85-96.
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F. and Senatore, F., 2015. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8): 2704-2712.
- Choudhary, R.C., Kumaraswamy, R.V., Kumari, S., Sharma, S.S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P. and Saharan, V., 2017. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, 7: 9754.
- Dhindsa, R.S. and Motowe, W., 1981. Drought tolerance in two mosses, correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Experimental Botany*, 32: 79-91.



- components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 139: 1-7.
- Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P. and Wani, S.H., 2017. An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance: 1-23. In: Khan, M.I.R. and Khan, N.A., (Eds.). *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer Singapore, 329p.
  - Mohammadi, H., Ghorbanpour, M. and Brestic, M., 2018. Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 122: 119-132.
  - Mohammadi, H., Nikjoyan, J.M., Hazrati, S. and Hashempour, H., 2020. Improvement of yield and phytochemical compounds of *Thymus vulgaris* through foliar application of salicylic acid under water stress. *Agriculture and Forestry*, 66(1): 129-142.
  - Muchate, N.S., Nikalje, G.C., Rajurkar, N.S., Suprasanna, P. and Nikam, T.D., 2016. Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *The Botanical Review*, 82(4): 371-406.
  - Ninou, E., Paschalidis, K. and Mylonas, I., 2017. Essential oil responses to water stress in Greek oregano populations. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20: 12-23.
  - Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S. and Reddy, M.K., 2017. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers Plant Science*, 8(581): 1-13.
  - Pavela, R., Zabka, M., Vrchotová, N. and Triska, J., 2018. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products*, 112: 762-765.
  - Polle, A., Otter, T. and Seifert, F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1): 53-60.
  - Rabelo, V.M., Magalhaes, P.C., Bressanin, L.A., Carvalho, D.T., Oliveira, C., Karam, D., Doriguetto, A.C., Henrique, M., Rodrigues, P. and Souza, T.C., 2019. The foliar application of a mixture of semisynthetic chitosan derivatives induces tolerance to water deficit in maize, improving the antioxidant system and increasing photosynthesis and grain yield. *Scientific Report*, 9(8164): 1-13.
  - Rezaei Chiyaneh, E. and Pirzad, A., 2013. Effect of salicylic acid on yield, yield component and essential oil of black cumin (*Nigella sativa* L.) under water deficit stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12(3): 427-437.
  - Hafez, Y., Attia, K., Alamery, S., Ghazy, A., Al-Doss, A., Ibrahim, E., Rashwan, E., El-Maghraby, L., Awad, A. and Abdelaal, K., 2020. Beneficial effects of biochar and chitosan on antioxidative capacity, osmolytes accumulation, and anatomical characters of water-stressed barley plants. *Agronomy*, 10(5): 630.
  - Hassan, N., Ebeed, H. and Aljaarany, A., 2020. Exogenous application of spermine and putrescine mitigate adversities of drought stress in wheat by protecting membranes and chloroplast ultra-structure. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26: 233-245.
  - Hassanzadeh, K., Hemmati, Kh. and Alizadeh, M., 2016. Effect of organic fertilizers and salicylic acid on the yield and some secondary metabolites of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Plant Production Research*, 23(1): 107-130.
  - He, M., He, C.Q. and Ding, N.Z., 2018. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1771.
  - Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D. and Hemantaranjan, A., 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25: 313-326.
  - Jubany-Mari, T., Munne-Bosch, S. and Alegre, L., 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5): 351-358.
  - Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D.L., 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160: 859-863.
  - Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. and Becker, D.F., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19: 998-1011.
  - Malekpoor, F., Pirbalouti, A.G. and Salimi, A., 2016. Effect of foliar application of chitosan on morphological and physiological characteristics of basil under reduced irrigation. *Research Crop*, 17(2): 354-359.
  - Malerba, M. and Cerana, R., 2019. Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 996.
  - Malerba, M. and Cerana, R., 2018. Recent applications of chitin and chitosan-based polymers in plants. *Polymers*, 11: 839-847.
  - Mandoulakani, B.A., Eyvazpour, E. and Ghadimzadeh, M., 2017. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil

- ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. PLoS One, 10(4): e0125168.
- Verma, K.K., Singh, M., Gupta, R.K. and Verma, C.L., 2014. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. Turkish Journal of Botany, 38(1): 130-140.
  - Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S., 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 123: 223-233.
  - Zhang, C., Shi, S., Wang, B. and Zhao, J., 2018a. Physiological and biochemical changes in different drought-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under PEG-induced drought stress. Acta Physiologiae Plantarum, 40(2): 25.
  - Zhang, J., Jiang, H., Song, X., Jin, J. and Zhang, X., 2018b. The responses of plant leaf CO<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub>O exchange and water use efficiency to drought: a meta-analysis. Sustainability, 10(551): 1-13.
  - Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M., 2013. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany, 2012(e217037): 1-26.
  - Shehzad, M.A., Nawaz, F., Ahmad, A., Ahmad, N. and Masood, S., 2020. Protective effect of potassium and chitosan supply on growth, physiological processes and antioxidative machinery in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 187: 109841.
  - Shukla, N., Awasthi, R.P., Rawat, L. and Kumar, J., 2012. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry, 54: 78-88.
  - Singh, A., Jha S.K., Bagri, J. and Pandey, G.K., 2015. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers

## Effects of chitosan foliar application on some physiological and biochemical traits of thyme (*Thymus vulgaris* L.) under drought stress

F. Salarpour Qhoraba<sup>1</sup> and H. Farahbakhsh<sup>2\*</sup>

1- Ph.D. student, Department of Production and Plant Genetic Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Production and Plant Genetic Engineering, Agriculture College, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, E-mail: hfarahbakhsh@uk.ac.ir

Received: April 2021

Revised: June 2021

Accepted: June 2021

### Abstract

To investigate the effects of chitosan foliar application on the various physiological and biochemical (proline, protein, antioxidant enzymes, and percentage and essential oil yield) characteristics and dry matter yield of thyme (*Thymus vulgaris* L.) under drought stress conditions, a split-plot experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications in Lalehzar city, Bardsir county, Kerman province in 2019. The drought stress at four levels (35, 50, 65, and 80% of available moisture discharge) and the chitosan concentration at five levels (0, 0.2, 0.5, 1.0, and 1.5 gram chitosan per liter of acetic acid) were considered as the main and sub plots, respectively. The results showed that the drought stress increased proline, antioxidant enzymes, and percentage and essential oil yield and decreased the dry matter yield significantly. The proline, antioxidant enzymes, dry matter yield, and essential oil percentage increased significantly with increasing the chitosan concentration, which resulted in a significant increase in the essential oil yield as the most important quality index in thyme. The protein and glycol peroxidase enzyme were not affected by chitosan foliar application. In general, the results of this research showed that the higher chitosan concentrations (1.5 gram chitosan per liter of acetic acid) were more effective in ameliorating the damages induced by the drought stress and achieving the higher yield.

**Keywords:** *Thymus vulgaris* L., antioxidant enzymes, available moisture discharge, proline, essential oil percentage, essential oil yield.