Research Article

Iranian Journal of Forest and Poplar Research Vol. 42 No. 1, 2026

DOI: 10.22092/ijmapr.2025.366494.3461

Vol. 42, No. 1, Page 1-14 (2026)

Effect of chitosan and carrageenan spraying on physiological parameters of Indigo (*Indigofera tinctoria* L.)

Somayeh Rahdar[1], Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi[2*] and Zeynab Mohkami[3]

1- M.Sc. student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran
E-mail: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir
3- Department of Agriculture and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

Received: 27/10/2024 Revised: 23/09/2025 Accepted: 03/10/2025

Abstract

Background and objectives: Indigo plant (*Indigofera tinctoria* L.) is a species belonging to the Fabaceae family. It is widely distributed in tropical regions worldwide and has been cultivated for centuries as the primary source of indigo dye. In addition to its economic importance as a dye plant, it also possesses significant medicinal value. The plant exhibits several therapeutic properties, including anti-inflammatory, lipid-lowering, neuroprotective, anti-allergic, hepatoprotective, and antispasmodic effects. Phytochemical screening of *I. tinctoria* has revealed the presence of various biologically active compounds, including tannins, saponins, phenols, flavonoids, terpenoids, alkaloids, steroids, and essential minerals such as calcium, phosphorus, potassium, iron, magnesium, zinc, and sodium. It also contains trace elements such as copper, manganese, cobalt, and molybdenum, as well as vitamins and fatty acids. Since elicitors such as chitosan and carrageenan have been reported to influence the morphological and physiological characteristics of some plants positively, this study aimed to investigate the effects of different concentrations of carrageenan and chitosan on selected morphological and physiological indicators of the true indigo plant.

Methodology: This experiment was conducted as a factorial study based on a completely randomized design (CRD) with three replications under pot conditions in the research laboratory of the Faculty of Science, University of Zabol, in 2021. The experiment evaluated the effects of different levels of carrageenan (0, 100, 200, and 300 ppm) and chitosan (0, 200, and 400 ppm) on morphological and physiological traits of the plant. The measured morphological characteristics included fresh weight, dry weight, and leaf indices. Physiological parameters included photosynthetic pigments, total phenol, total flavonoid content, antioxidant activity, and the activity of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme. Analysis of variance (ANOVA) was performed using SAS statistical software (version 9.1), and Duncan's multiple range test was used to compare treatment means at the 5% probability level.

Results: The results of this study showed that several traits, including fresh weight, leaf indices, chlorophyll a and b, carotenoids, total phenol content, antioxidant activity, and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity, were significantly affected by foliar application of the biostimulants carrageenan and chitosan. The highest values for leaf length

Copyright: © 2026 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

(2.5 cm), leaf width (1.35 cm), leaf area (1.89 cm^2), and number of leaves (7.3) were observed under the combined foliar treatment of 200 ppm carrageenan + 400 ppm chitosan. The maximum stem height (1.6 cm) was recorded in the treatment with 300 ppm carrageenan + 400 ppm chitosan. The highest fresh and dry weights (7.34 g and 0.133 g, respectively) were obtained from the 100 ppm carrageenan + 200 ppm chitosan treatment. In addition, the greatest amounts of chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll were observed in plants treated with 200 ppm carrageenan + 200 ppm chitosan. Plants treated with 300 ppm carrageenan + 400 ppm chitosan showed the highest levels of total phenols, antioxidant activity, and PAL enzyme activity.

Conclusion: In general, the effects of elicitors vary depending on the type and concentration of the elicitor as well as the plant species. Based on the results of this study, carrageenan and chitosan at concentrations higher than 200 ppm can be suggested as effective stimulants for enhancing plant growth and the production of secondary metabolites. In particular, the combined application of carrageenan (300 ppm) and chitosan (400 ppm) improved the phytochemical properties of the indigo plant.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant activity, Carrageenan, Chitosan, Indigo.

اثر محلول‌پاشی کیتوزان و کاراگینان بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی نیل (*Indigofera tinctoria* L.)

سمیه رهدار[۱]، صدیقه اسمعیل‌زاده بهابادی[۲*] و زینب محکمی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران، پست الکترونیک: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۷ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: گیاه دارویی نیل (*Indigofera tinctoria* L.) متعلق به خانواده بقولات است. این گیاه به طور گسترده در مناطق گرمسیری جهان پراکنده شده است و قرن‌ها به‌عنوان منبع اصلی رنگ نیلی مورد کشت قرار گرفته و ارزش داروئی بالایی دارد. نیل دارای خواص درمانی بی‌شماری از جمله ضدالتهاب، کاهش‌دهنده چربی خون، محافظت‌کننده عصبی، ضد آلرژی، محافظ کبد و ضد گرفتگی ماهیچه است. غربالگری فیتوشیمیایی گیاه نیل وجود چندین ماده شیمیایی فعال زیستی از جمله تانن‌ها، ساپونین‌ها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، استروئید و مواد معدنی (کلسیم، فسفر، پتاسیم، آهن، منیزیم، روی، سدیم و غیره) را نشان می‌دهد. نیل همچنین حاوی عناصر مس، منگنز، کبالت، مولیبدن، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب است. کاربرد محرک‌های زیستی در راستای تولید فرآورده‌های زیستی سازگار با محیط زیست و در پیوند با کشاورزی نوین می‌تواند سبب افزایش رشد کیفی و کمی گیاهان داروئی و کاهش اثرات تنش‌های محیطی بر آنها شود. ازآنجا که محرک‌های کیتوزان و کاراگینان بر خواص مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی برخی از گیاهان اثر مثبت دارد، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف کاراگینان و کیتوزان بر شاخص‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه نیل بود.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با شرایط گلدانی در آزمایشگاه پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه زابل در سال ۱۴۰۰ اجرا گردید. در ادامه اثر سطوح مختلف کاراگینان (در چهار سطح ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام) و کیتوزان (در سه سطح ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) بر صفات مورفولوژیک از جمله وزن تر، وزن خشک، شاخص‌های برگ و برخی شاخص‌های فیتوشیمیایی شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز سنجش شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. جهت انجام مقایسه میانگین از روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد شاخص‌های مختلف از جمله: وزن تر، شاخص‌های برگ، محتوای کلروفیل a و b، کارتنوئید، محتوای فنل کل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز تحت تأثیر محلول‌پاشی با محرک زیستی کاراگینان و کیتوزان قرار گرفت. به‌طوری که بیشترین میزان طول برگ (۲/۵ سانتی‌متر)، عرض برگ (۱/۳۵ سانتی‌متر)، سطح برگ (۱/۸۹ سانتی‌مترمربع) و تعداد برگ (۷/۳) در تیمار محلول‌پاشی توأم با کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید. بلندترین ارتفاع ساقه (۶/۱ سانتی‌متر) از تیمار کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام سنجش شد. بیشترین وزن تر و خشک به‌ترتیب با مقادیر ۷/۳۴ و ۰/۱۳۳ گرم از تیمار کاراگینان ۱۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان ۲۰۰ پی‌پی‌ام اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار محلول‌پاشی توأم با کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان ۲۰۰ پی‌پی‌ام سنجش شد. گیاهان تیمارشده با کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام بالاترین میزان فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز را داشتند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی اثر محرک‌های زیستی بسته به نوع و غلظت محرک و نوع گونه گیاهی متفاوت است. بر اساس نتایج این

مطالعه، محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ پی‌پی‌ام عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد می‌شود. تیمار کاربرد هم‌زمان کاراگینان (۳۰۰ پی‌پی‌ام) و کیتوزان (۴۰۰ پی‌پی‌ام) موجب بهبود خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه دارویی نیل گردید.

واژه‌های کلیدی: ترکیب‌های فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاراگینان، کیتوزان، نیل.

مقدمه

نیل (*Indigofera tinctoria* L.) گیاهی متعلق به خانواده بقولات است (Alagbe & Omokore, 2019). این گیاه به‌طور گسترده در مناطق گرمسیری جهان پراکنده شده است و قرن‌ها به‌عنوان منبع اصلی رنگ نیلی کشت شده و ارزش بالایی داشته است که منجر به نام رایج آن «نیل واقعی» شده است. گیاه نیل تا حدود ۲/۵ متر با برگچه‌های کوتاه سبز رنگ رشد می‌کند. گل‌های آن حدود ۶ تا ۱۰ میلی‌متر در شاخه‌های فرعی هستند و با رنگ قرمز روشن یا گلگون مشخص می‌شود (Shinwari *et al*., 2013). غربالگری فیتوشیمیایی گیاه نیل وجود چندین ماده شیمیایی فعال زیستی ازجمله تانن‌ها، ساپونین‌ها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، استروئید و مواد معدنی (کلسیم، فسفر، پتاسیم، آهن، منیزیم، روی، سدیم و غیره) را نشان می‌دهد. همچنین نیل حاوی عناصر مس، منگنز، کبالت، مولیبدن، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب می‌باشد (Bueno *et al*., 2013).

ترکیب‌های فیتوشیمیایی گیاه نیل شامل تانن‌ها، فنل‌ها، گلیکوزیدها و ترپنوئیدها آثار داروشناسی متعددی مانند خواص ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروس و ضدالتهاب دارند (Oluwafemi *et al*., 2020). از برگ، پوست ساقه و ریشه گیاه نیل به‌طور سنتی برای درمان دندان‌درد، درد شکم، درد کمر، خون‌ریزی بینی، روماتیسم، سکته مغزی و بیماری‌های مقاربتی استفاده می‌شود (Abubakar *et al*., 2006). گونه‌های جنس *Indigofera* در پاکستان، هند، افغانستان، غرب چین، سواحل دریای عمان و مناطق جنوبی ایران به‌صورت خودرو رشد می‌کنند و یا به‌طور پراکنده کشت می‌شوند (Sharma *et al*., 2012).

استفاده از محرک‌های زیستی راهکاری نوین برای افزایش ساخت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است. کیتوزان در پوسته سخت‌پوستانی مانند خرچنگ، میگو، در کوتیکول و دیواره سلولی حشرات یافت می‌شود. کیتوزان پلی‌ساکاریدی خطی و نیتروژن‌دار با فرمول شیمیایی $(C_6H_{11}O_4N)_n$ و دارای بار مثبت است که کاربردهای فراوان در علوم مختلف دارویی، غذایی، بهداشتی، آرایشی، کشاورزی و بیوتکنولوژی دارد (Kamkar *et al*., 2017؛ Mehregan *et al*., 2017). کیتوزان همچنین به‌عنوان یک آمینو پلی‌ساکارید طبیعی با ساختاری بی‌نظیر و سمیت پایین بوده که با تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در پاسخ دفاعی گیاه در شرایط تنش، منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود (Howlett, 2006). محققان گزارش کردند که کاربرد کیتوزان بر ارتفاع گیاه، طول ریشه‌ها، سرعت فتوسنتز و مقدار زیست‌توده گیاهی تأثیر مثبت می‌گذارد (Boonlertnirun *et al*., 2017).

کاراگینان‌ها خانواده‌ای از پلی‌ساکاریدهای سولفاته خطی طبیعی هستند که از جلبک‌های دریایی قرمز خوراکی استخراج می‌شوند. معروف‌ترین و مهمترین جلبک دریایی قرمز مورد استفاده برای تولید کلوئیدهای آب‌دوست برای تولید کاراگینان، خزه ایرلندی (*Chondrus crispus*) است. کاراگینان‌ها به‌دلیل خاصیت ژل شدن، ضخیم شدن و تثبیت در صنایع غذایی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات اخیر فعالیت بیولوژی کاراگینان و اشکال الیگومری آنها را به‌عنوان محرک رشد گیاه و به‌عنوان عامل پاسخ‌های دفاعی در برابر آفات و بیماری‌ها آشکار کرده است (Shukla *et al*., 2016). کاراگینان با تنظیم فرایندهای متابولیک مختلف مانند فتوسنتز و مسیرهای جانبی، تقسیم سلولی، مسیرهای

مصنوعی پورین و پیریمیدین و مسیرهای متابولیکی دخیل در جذب نیتروژن و گوگرد، رشد گیاه را بهبود می‌بخشد. کاراگینان‌ها همچنین با تعدیل فعالیت مسیرهای دفاعی مختلف، ازجمله مسیرهای مرتبط با تولید سالیسیلات، جاسمونات و اتیلن، منجر به القای پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر ویروئیدها، ویروس‌ها، باکتری‌ها و حشرات می‌شوند (Shukla *et al.*, 2016). بنابراین با توجه به خاصیت دارویی گیاه نیل و نقش مثبت محرک‌های زیستی بر رشد گیاهان دارویی، این پژوهش با هدف بررسی اثر محلول‌پاشی با محرک‌های کیتوزان و کاراگینان بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه نیل انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲ تیمار و سه تکرار، در آزمایشگاه آموزشی پژوهشی فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه زابل طی سال ۱۴۰۰ انجام شد. گلدان‌های پلاستیکی یک کیلوگرمی با مخلوط خاکی (کوکوپیت، پرلیت و خاک باغچه به نسبت ۱:۱:۱) پر شدند. پس از آماده‌سازی گلدان‌ها، بذرهای تهیه شده از شرکت سبزینه گستر چابهار با قارچ‌کش کاپیتان ضدعفونی و بذرها در عمق ۳-۲ سانتی‌متری بستر کشت گردید. این گلدان‌ها به اتاقک رشد با دمای روزانه و شبانه ۲۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شد. حدود چهار روز پس از کشت، اولین علائم خروج ساقه‌چه مشاهده گردید و در طول رشد به‌طور مرتب هر دو روز یکبار آبیاری انجام گردید. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های مختلف کاراگینان (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام) و کیتوزان (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) بود که در مراحل ۲ و ۴ برگی در سه مرتبه محلول‌پاشی شد. پس از طی یک فصل رشد، صفات فیتوشیمیایی شامل محتوای رنگریزه‌های فتوسنتزی، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و صفات مورفولوژیکی شامل تعداد گره، ارتفاع ساقه، تعداد برگ در بوته، طول برگ، عرض برگ، سطح برگ و وزن تر و خشک گیاه اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای معمولی اتاق خشک شد.

سنجش وزن تر و خشک بوته

برای اندازه‌گیری وزن تر بوته، بوته‌های خارج شده از هر گلدان به‌طور تصادفی با ترازوی دیجیتال توزین گردید. سپس بوته در دمای اتاق و شرایط آزمایشگاه قرار داده شد و پس از گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت، وزن خشک آن توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری گردید.

سنجش تعداد برگ و سطح برگ

تعداد برگ‌های موجود در بوته‌ها شمارش شد. برای سنجش سطح برگ از هر تیمار، سه نمونه برگ بالغ به‌صورت تصادفی برداشت گردید و پس از عکس‌برداری، شاخص‌های طول برگ، عرض برگ و سطح برگ به کمک نرم‌افزار دیجی مایزر نسخه ۴-۳-۵ آنالیز و محاسبه شد.

تعداد گره‌ها و طول ساقه

برای اندازه‌گیری صفات ذکر شده از کولیس با دقت ۰/۰۲ استفاده شد. به این ترتیب که از محل طوقه تا انتهای گره آخر، طول ساقه اصلی و تعداد گره در هر بوته شمارش شد.

ارزیابی رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای تعیین مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید، مقدار ۰/۵ گرم از بافت سبز برگ‌های جوان به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و همگن شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از آن به‌طور جداگانه مقادیر کلروفیل a در طیف جذبی ۶۶۳ و کلروفیل b در ۶۴۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تنظیم دستگاه، از استون ۸۰ درصد استفاده گردید. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Arnon, 1967).

رابطه (۱): Chlorophyll *a* = (12.25 ×A663-2.798) (V/ (W× 1000))

رابطه (۲): Chlorophyll *b* = (21.50×A645-5.10) (V/ (W× 1000)

رابطه (۳): Total Chlorophyll = (7.15 A663 + 18.71 A645) × (V/ (W× 1000))

رابطه (۴): Carotenoid= (1000 A470 – 1.82 Chl *a* -85.02 Chl *b*)/ 198 × (V/ (W× 1000))

در رابطه‌های بالا، A میزان جذب قرائت شده توسط دستگاه، Chl a محتوای کلروفیل a، Chl b محتوای کلروفیل b، V حجم نهایی عصاره استون ۸۰ درصد و W وزن تازه بافت برای عصاره‌گیری برحسب گرم است.

عصاره‌گیری برای سنجش‌های فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه عصاره متانولی ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها را به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه خیس کرده و بعد از آن به مدت ده دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای سنجش مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Mohkami *et al.*, 2020).

سنجش میزان فنل کل

برای سنجش مقدار فنل کل، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی در لوله‌های آزمایش ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد و ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق‌شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) به مخلوط ذکرشده اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری مخلوط واکنش توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت با قراردادن مقدار جذب عصاره در رابطه خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید، مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه گردید. تمامی سنجش‌ها در سه تکرار انجام و میزان فنل کل برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بیان شد (Mohkami *et al.*, 2020).

رابطه (۵): Y=0.004 X +0.1

در رابطه بالا Y عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتروفتومتر و X میزان فنل کل می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی استفاده می‌شود. اساس کار این روش، تغییر رنگ محلول متانولی بنفش‌رنگ ۲ و ۲– دی فنیل–۱– پیکریل – هیدرازیل به محلول زرد رنگ دی فنیل– پیکریل هیدرازین می‌باشد. در ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد و بعد میزان جذب آن در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Mohkami *et al.*, 2020).

رابطه (۶):

درصد مهار رادیکال آزاد = (Ac-As)/ Ac×100

در رابطه بالا Ac میزان جذب برای نمونه شاهد و As میزان جذب نمونه گیاهی می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیمی

برای تهیه عصاره جهت سنجش فعالیت‌های آنزیمی، ابتدا ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاهی توزین شد و به آن چهار میلی‌لیتر بافر سرد (شامل ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات، ۲۰ میکرولیتر EDTA که به حجم چهار میلی‌لیتر رسیده) اضافه و بعد به‌طور کامل همگن شد.

سپس مخلوط واکنش با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (Mohkami *et al.*, 2020).

سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز

برای این سنجش، ابتدا یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۵۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط گردید و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگه‌داری شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر کلریدریک اسید به مخلوط اضافه تا واکنش متوقف شود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت گردید. برای محاسبه فعالیت این آنزیم از منحنی استاندارد سینامیک اسید استفاده شد (Alipour *et al.*, 2015).

نرم‌افزارهای مورداستفاده برای تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثر محلول‌پاشی با محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان بر صفات مورفولوژیکی گیاه نیل نشان داد اثر اصلی محلول‌پاشی با کاراگینان بر تعداد گره در سطح احتمال پنج درصد و اثر اصلی محلول‌پاشی با کیتوزان بر طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل محلول‌پاشی با محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان بر طول برگ، عرض برگ، سطح و تعداد برگ و وزن تر و خشک بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین، افزایش غلظت کاراگینان منجر به افزایش تعداد گره گردید. بیشترین تعداد گره (۱۱) در تیمار محلول‌پاشی با کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید که نسبت به محلول‌پاشی کاراگینان با غلظت‌های ۲۰۰ پی‌پی‌ام، ۱۰۰ پی‌پی‌ام و عدم کاربرد این محرک زیستی به‌ترتیب ۱/۳۷، ۱/۸۳ و ۳/۶۶ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کاراگینان و کیتوزان بر صفات گیاه نیل (*Indigofera tinctoria*)

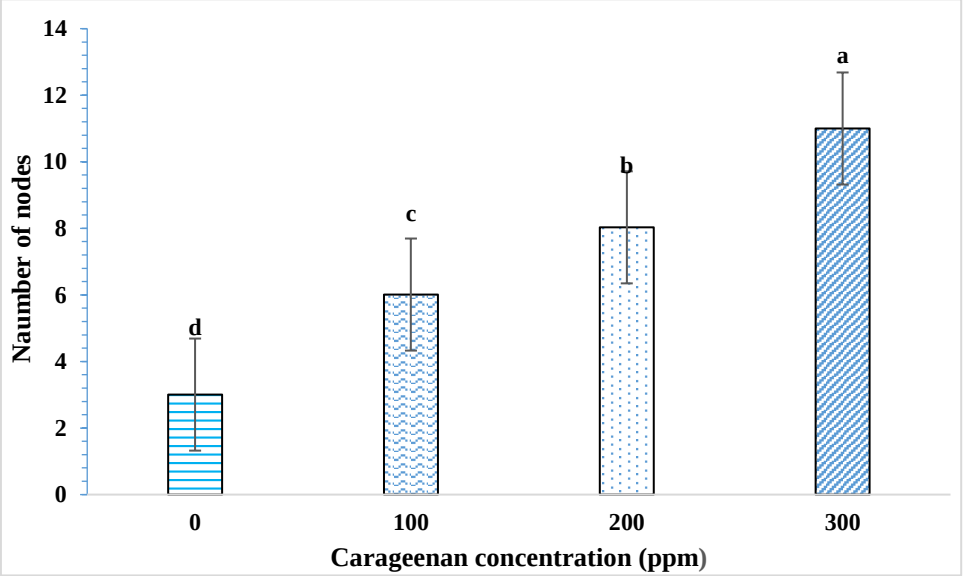
Table 1. ANOVA of carrageenan and chitosan effects on *Indigofera tinctoria* traits

S.O.V.	d.f.	M.S.							
		Number of nodes	Stem length	Leaf length	Leaf width	Leaf area	Number of leaves	Fresh weight of plant	Dry weight of plant
Carrageenan (K)	3	0.7178*	8.127^{ns}	0.9726**	0.2648**	0.8107**	5.657**	0.00171**	0.00000152^{ns}
Chitosan (Ch)	2	0.3014^{ns}	99.199**	0.3868**	0.1268**	0.4563**	1.083^{ns}	0.00118**	0.0000002^{ns}
K × Ch	6	0.448^{ns}	13.697^{ns}	0.7027**	0.2039**	0.6002**	4.157**	0.00015**	0.00000415**
Error	24	0.2097	11.4622	0.03335	0.012298	0.01602	1.111	0.00000412	0.00000107
C.V. (%)	---	17.8	8.9	16.1	18.5	23.5	18.3	2.1	8.3

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

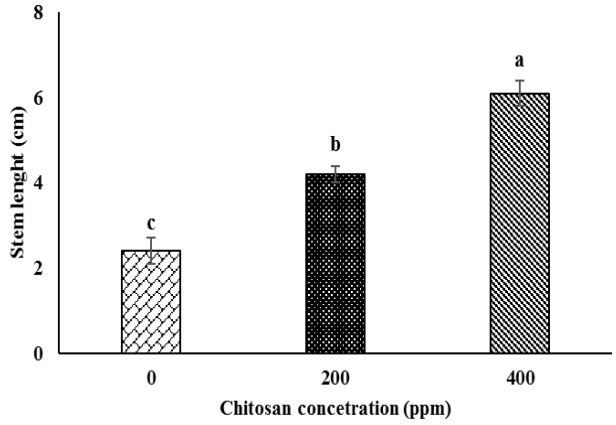
نتایج مقایسه میانگین همچنین حاکی از این بود که محلول‌پاشی کیتوزان افزایش قابل توجه طول ساقه را به همراه داشت. بیشترین و کمترین طول ساقه به‌ترتیب در تیمار محلول‌پاشی با کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام (۶/۱ سانتی‌متر)

و عدم کاربرد کیتوزان (۲/۴۱ سانتی‌متر) ثبت گردید. کاربرد کیتوزان ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به‌ترتیب منجر به افزایش ۲/۵۳ و ۱/۷۴ برابری طول ساقه در مقایسه با عدم کاربرد کیتوزان شد (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر کاراگینان بر تعداد گره گیاه نیل (***Indigofera tinctoria***)

Figure 1. Means comparison of carrageenan effects on number of nodes in *Indigofera tinctoria*
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر کیتوزان بر ارتفاع ساقه گیاه نیل (***Indigofera tinctoria***)

Figure 2. Means comparison of chitosan effects on *Indigofera tinctoria* stem length
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

نتایج همچنین نشان داد بیشترین و کمترین طول و عرض برگ به‌ترتیب در تیمار محلول‌پاشی توأم کاراگینان با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام و کیتوزان با غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام و تیمار عدم کاربرد این دو محرک زیستی ثبت شد. محلول‌پاشی کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام و کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام افزایش ۳/۵۰ و ۲/۸۱ برابری طول و عرض برگ را در مقایسه با

عدم کاربرد این دو محرک زیستی به همراه داشت (جدول ۲). محلول‌پاشی کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام در تمام سطوح مصرف کیتوزان سطح برگ را افزایش داد. به‌طوری‌که در تیمار محلول‌پاشی کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام، کاربرد کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام سطح برگ را نسبت به شاهد (عدم کاربرد کاراگینان و کیتوزان) ۱۰/۵۰ برابر افزایش داد. تعداد برگ نیز با محلول‌پاشی محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان افزایش یافت و کاربرد توأم کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام و کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام بیشترین تعداد برگ (۷/۳۰) را به خود اختصاص داد. کاربرد کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام در شرایط محلول‌پاشی کاراگینان با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام منجر به افزایش ۱/۱۶، ۱/۲۱ و ۱/۰۶ برابری تعداد برگ نسبت به عدم کاربرد کینوزان شد (جدول ۲). محلول‌پاشی محرک‌های زیستی وزن تر بوته نیل را به‌طور قابل توجهی افزایش داد. بیشترین وزن تر بوته در تیمار کاربرد توأم کاراگینان و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام (۷/۳۴ گرم) به‌دست آمد که فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار کاربرد توأم کاراگینان ۲۰۰ و کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام (۷/۱۲ گرم) بود. کمترین وزن تر بوته نیز در تیمار شاهد (۲/۱۹ گرم) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). روند مشابهی در مورد تغییرات وزن خشک بوته مشاهده شد و محلول‌پاشی کاراگینان و کیتوزان ۲۰۰ پی‌پی‌ام وزن خشک بوته را نسبت به شاهد ۱/۷۷ برابر افزایش داد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرمتقابل کاراگینان × کیتوزان بر صفات گیاه نیل (*Indigofera tinctoria*)

Table 2. ANOVA of carrageenan and chitosan effects on *Indigofera tinctoria* traits

Carrageenan (ppm)	Chitosan (ppm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf area (cm^2)	Number of leaves	Fresh weight of shoot (g)	Dry Weight of shoot (g)
0	0	0.73^{f}	0.48^{cd}	0.18^{e}	3.00^{h}	2.19^{f}	0.075^{e}
	200	1.05^{c}	0.54^{c}	0.35^{c}	4.50^{efg}	2.90^{ef}	0.102^{bc}
	400	1.008^{d}	0.48^{d}	0.45^{bc}	5.00^{def}	3.18^{ef}	0.106^{bc}
100	0	1.009^{d}	0.47^{d}	0.27^{d}	4.90^{def}	3.77^{de}	0.093^{c}
	200	0.92^{de}	0.55^{c}	0.38^{c}	5.80^{bcd}	3.86^{de}	0.091^{c}
	400	0.81^{e}	0.44^{d}	0.34^{c}	5.70^{bcd}	4.60^{cd}	0.117^{b}
200	0	0.84^{e}	0.34^{e}	1.25^{ab}	6.00^{bcd}	5.07^{c}	0.098^{c}
	200	0.90^{de}	0.43^{d}	1.32^{ab}	7.00^{ab}	7.34^{a}	0.133^{a}
	400	2.56^{a}	1.35^{a}	1.89^{a}	7.30^{a}	7.12^{a}	0.103^{bc}
400	0	1.06^{c}	0.68^{b}	0.62^{b}	6.10^{bcd}	6.51^{ab}	0.082^{de}
	200	1.37^{b}	0.67^{b}	0.66^{b}	6.30^{ab}	6.70^{ab}	0.088^{d}
	400	1.34^{b}	0.70^{b}	0.69^{b}	6.50^{ab}	5.57^{bc}	0.111^{b}

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

اثر محلول‌پاشی با محرک‌های کاراگینان و کیتوزان بر صفات فیتوشیمیایی نیل

نتایج تجزیه واریانس حاکی از این بود که اثر متقابل محلول‌پاشی با حرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان بر محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر محلول‌پاشی با محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان بر صفات بیوشیمیایی نیل نشان داد که اثر متقابل محلول‌پاشی با کاراگینان و کیتوزان بر میزان فنل کل در سطح احتمال پنج درصد و بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان، فعالیت آنزیم PAL در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاراگینان و کیتوزان بر صفات فیتوشیمیایی نیل

Table 3. Analysis of variance of the effects of carrageenan and chitosan on phytochemical traits of indigo

S.O.V.	d.f.	M.S.						
		Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Total chlorophyll	Carotenoids	Total phenolics	Antioxidant activity	PAL
Carrageenan (K)	3	1024.83*	78.56*	1667.38*	0.1130*	7411.72*	388.88*	0.054***
Chitosan (Ch)	2	16.86*	8.61*	252.27*	2.31*	1686.64**	404.22**	0.0147**
(K × Ch)	6	49.76*	4.55*	75.63*	0.417*	246.59*	178.03**	0.021**
Error	24	1.5	0.21	2.49	0.005	13.58	30.57	0.0034
C.V (%)	---	3.98	6.67	4.11	8.86	5.81	7.55	19.4

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

بیشترین محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب با میانگین‌های ۵۰/۵۲، ۱۱/۵۹ و ۶۲/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمار محلول‌پاشی توأم کاراگینان و کیتوزان هر دو با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۳/۲۵، ۷/۱۱ و ۳/۶۲ برابر افزایش داشت (جدول ۴). محتوای کاروتنوئید نیز با افزایش غلظت کاراگینان و کیتوزان افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین محتوای کاروتنوئید به‌ترتیب در تیمار محلول‌پاشی توأم کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام و کیتوزان ۴۰۰ پی‌پی‌ام (۱/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و تیمار شاهد (۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. محلول‌پاشی کیتوزان ۴۰۰ و کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام و محلول‌پاشی کیتوزان ۴۰۰ و کاراگینان ۲۰۰ پی‌پی‌ام توانست منجر به افزایش ۲۱/۸۶ و ۲۰ برابری محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر کاراگینان و کیتوزان بر صفات فیتوشیمیایی نیل

Table 4. Means comparison of the effects of carrageenan and chitosan on phytochemical traits of indigo

Carrageenan (ppm)	Chitosan (ppm)	Chlorophyll a (mg.g^{-1} F.W.)	Chlorophyll b (mg.g^{-1} F.W.)	Total chlorophyll (mg.g^{-1} F.W.)	Carotenoids (mg.g^{-1} F.W.)	Total phenolics (mg GA.g^{-1} F.W.)	Antioxidant activity (%)	PAL (µmol. g^{-1} F.W.)
0	0	15.53^{j}	1.63^{j}	17.16^{k}	0.075^{k}	25.24^{j}	62.77^{cd}	0.11^{e}
	200	18.9^{i}	4.14^{i}	23.04^{j}	0.99^{ed}	34.94^{l}	68.22^{cd}	0.25^{d}
	400	22.25^{h}	3.53^{i}	25.78^{i}	1.03^{d}	38.003^{hi}	66.013^{cd}	0.29^{d}
100	0	24.92^{g}	6.64^{fg}	31.57^{h}	0.84^{fg}	57.6^{f}	71.69^{bc}	0.24^{d}
	200	26.47^{fg}	5.30^{h}	31.78^{h}	0.88^{ef}	49.83^{g}	69.71^{bcd}	0.23^{d}
	400	28.58^{f}	6.07^{gh}	34.63^{g}	1.21^{c}	42.61^{h}	67.34^{cd}	0.30^{d}
200	0	32.27^{e}	7.29^{ef}	39.54^{c}	0.70^{gh}	62.81^{ef}	70.68^{bcd}	1.28^{c}
	200	50.52^{a}	11.59^{a}	62.12^{a}	0.41^{i}	83.29^{d}	79.37^{ab}	1.30^{c}
	400	43.38^{b}	10.07^{b}	53.46^{b}	1.50^{b}	67.7^{e}	86.01^{a}	1.21^{c}
400	0	36.27^{d}	8.03^{de}	44.31^{e}	0.59^{gh}	90.94^{c}	60.76^{d}	2.02^{b}
	200	41.23^{c}	8.73^{cd}	49.96^{c}	0.23^{j}	97.53^{b}	86.35^{a}	2.05^{b}
	400	37.70^{d}	9.45^{bc}	47.16^{c}	1.64^{a}	109.43^{a}	88.83^{a}	2.57^{a}

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

کاربرد محرک‌های زیستی میزان فنل و فعالیت آنتی اکسیدان را به‌طور قابل توجهی افزایش داد. بیشترین میزان فنل کل (۱۰۹/۴۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده تر) در تیمار محلول‌پاشی توأم کاراگینان با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و کیتوزان با غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد (۲۵/۲۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده تر) ۴/۳۳ برابر افزایش نشان داد (جدول ۴). میزان فعالیت آنتی اکسیدان در تیمارهای کیتوزان ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به همراه

کاراگینان ۳۰۰ پی‌پی‌ام در مقایسه با تیمار شاهد به‌ترتیب ۱/۴۱ و ۱/۳۷ برابر افزایش یافت (جدول ۴). بالاترین میزان فعالیت آنزیم PAL (۲/۵۷ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار محلول‌پاشی توأم کاراگینان با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام + کیتوزان با غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد که نسبت به نمونه شاهد (۰/۱۱ میکرومول بر گرم وزن تر) افزایش ۲۳/۳۶ برابری داشت (جدول ۴).

بحث

کاربرد محرک‌های زیستی به منظور بهبود رشد، عملکرد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی امروزه از جنبه‌های مهم تحقیقات می‌باشد. این پژوهش نخستین گزارش در مورد تأثیر کاراگینان و کیتوزان بر رشد، محتوای رنگریزه‌های فتوسنتزی، فنل، فعالیت آنتی‌اکسیدان و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز گیاه نیل می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که محلول‌پاشی کاراگینان و کیتوزان منجر به بهبود رشد رویشی و وزن تر و خشک نیل شد. در همین راستا، محققان گزارش کردند که کاربرد کیتوزان موجب افزایش طول و تعداد برگ، طول و وزن ریشه به‌لیمو شد. دلیل این افزایش، وجود عنصر نیتروژن در ساختار کیتوزان و تأثیر مثبت آن بر سنتز هورمون‌های اکسین و سیتوکینین بوده است که افزایش تقسیم سلولی را به دنبال دارد (Nourafcan, 2019). همچنین گزارش شد رشد اندام هوایی بادرنجبویه دنایی با کاربرد کیتوزان به‌دلیل تأثیر این محرک زیستی بر افزایش جذب آب و عناصر غذایی، تنظیم فشار اسمزی و سنتز پروتئین‌ها افزایش یافت (Kahromi & Khara, 2021). طی پژوهشی با بررسی تأثیر کیتوزان بر گیاه نوروزک آبی، مشخص شد که محلول‌پاشی با کیتوزان ساقه‌زایی، طول ساقه و تعداد برگ گیاهچه‌ها را در گیاه نوروزک آبی افزایش داد (Jami *et al*., 2018). در گیاه پونه مصرف کیتوزان باعث افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک گیاه شد (Malekpoor *et al*., 2017). همچنین بیان شد که افزایش غلظت کیتوزان تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث افزایش ارتفاع بوته، تعداد شاخه و برگ، سطح برگ و وزن خشک گیاه ماش شد (Mondal *et al*., 2013). ذرات کیتوزان به‌دلیل داشتن بار مثبت به راحتی می‌توانند به سلول های گیاه نفوذ کرده و با افزایش محتوای کلروفیل و بهبود عملکرد روزنه منجر به افزایش سرعت فتوسنتز و افزایش وزن خشک شوند (Chakraborty *et al*., 2020). در برخی مطالعات گزارش شد که اثر مثبت محلول‌پاشی کاراگینان بر افزایش زیست‌توده گیاهان ناشی از اثر این محرک زیستی بر بیان پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی است (Shukla *et al*., 2016). همچنین گزارش شد کاراگینان در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر طول ساقه و زیست‌توده برگ در تنباکو را با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و گلوتامات دهیدروژناز که در جذب نیتروژن نقش دارد، افزایش داد (Vera *et al*., 2012). محلول‌پاشی الیگوکاراگینان توانست اندازه دانه و عملکرد قهوه را از طریق بهبود جذب آب و عناصر غذایی و افزایش سرعت فتوسنتز، افزایش دهد (Trung San *et al*., 2021).

در این مطالعه، کاربرد همزمان کیتوزان و کاراگینان اثر قابل‌توجهی بر افزایش محتوای رنگریزه‌های فتوسنتزی داشت. محتوای کلروفیل شاخصی مهم برای ظرفیت فتوسنتزی برگ محسوب می‌شود. کاربرد کاراگینان با کاهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و جلوگیری از جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین، منجر به جلوگیری از تخریب کلروفیل می‌گردد (Mendez *et al*., 2023). کیتوزان نیز در غلظت‌های پایین با از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث کاهش محتوای پرولین و قندهای محلول در گیاه می‌گردد. در نتیجه با توجه به اینکه پیش‌ماده سنتز پرولین و کربوهیدرات با رنگیزه‌های فتوسنتزی مشترک است، افزایش محتوای کلروفیل قابل توجیه می‌باشد (Yadollahi Dehchmeh *et al*., 2014). نتایج تحقیقی نشان داد محلول‌پاشی کاراگینان با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از طریق افزایش محتوای کلروفیل و سرعت فتوسنتز، تجمع زیست‌توده گیاهی اکالیپتوس را افزیش داد (Saucedo *et al*., 2015). بررسی‌ها همچنین نشان داد محلول‌پاشی کیتوزان در شرایط تنش کم‌آبی باعث افزایش محتوای

کلروفیل و کارتنوئید مرزنجوش از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز این رنگریزه‌ها شد (Aghaee Dizaj *et al.*, 2022). کاربرد کیتوزان همچنین باعث افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیلa، b و کارتنوئید در گیاه زنیان (Nadari *et al.*, 2017) و ماش (Mondal *et al.*, 2013) شد.

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد محلول‌پاشی کاراگینان و کیتوزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را افزایش داد. در شرایط عدم وجود تنش‌های زیستی و غیر زیستی، بسیاری از فرایندهای متابولیکی در گیاهان تولید گونه‌های فعال اکسیژن را به همراه دارد. در این شرایط تعادل بین ظرفیت اکسیداسیون و احیا به هم خورده و تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شود. گونه‌های اکسیژن فعال موجب تخریب غشای سلولی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلوئیک می‌شوند (Ackah *et al.*, 2022). در مطالعات متعدد گزارش شده محلول‌پاشی کیتوزان و کاراگینان می‌تواند اثر منفی رادیکال‌های آزاد تولید شده در شرایط تنش اکسیداتیو را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی متابولیت‌های ثانویه مانند فنل، خنثی کرده و مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو را افزایش دهد (Amiri *et al.*, 2014؛ Forouzandeh *et al.*, 2020). ترکیب‌های فنلی یکی از فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که توسط مسیر فنیل پروپانوئیدی تولید شده و در فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی کلیدی در گیاهان نقش دارند (Mikołajczak *et al.*, 2021). شواهد متعدد حکایت از آن دارد که کیتوزان منجر به فعال شدن آنزیم‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید شده و از این طریق منجر به تجمع ترکیب‌های فنلی می‌شود که در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن نقش قابل توجهی دارند (Disanto *et al.*, 2021).

تحقیقات همچنین نشان داد کاربرد نانو ذرات کیتوزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل کل سیاه‌دانه (Mehdipour *et al.*, 2022) و نوروزک (Jami *et al.*, 2018) را به میزان قابل توجهی افزایش داد.

فنیل آلانین آمونیالیاز آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فنل است. این آنزیم نیز در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش داشته و می‌تواند در حذف گونه‌های اکسیژن فعال و مقابله با تنش اکسیداتیو مؤثر واقع شود (Safari *et al.*, 2021). گزارش‌ها حکایت از آن دارد که کیتوزان موجب فعال شدن آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شده و تجمع پلی‌فنول‌ها را در گیاه تسریع می‌کند (Gohari *et al.*, 2021). افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز با کاربرد محرک‌های زیستی کیتوزان و کاراگینان در رازیانه (Foruzandeh *et al.*, 2020) و ریحان (Ahmadi Mousavi *et al.*, 2017) توسط محققان گزارش شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، شاخص‌های رشد و پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نیل تحت‌تأثیر محرک‌های زیستی کاراگینان و کیتوزان بررسی شد. نتایج نشان داد محلول‌پاشی محرک زیستی کاراگینان و کیتوزان طول، عرض، تعداد و سطح برگ، وزن تر و خشک بوته، محتوای رنگریزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد. بنابراین به‌نظر می رسد کاربرد این محرک‌های زیستی می‌تواند از طریق القای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه فنلی موجب کاهش آثار منفی تنش اکسیداتیو در گیاه شود. در پژوهش‌های آینده استفاده از محلول‌پاشی این دو محرک زیستی در غلظت‌های بالاتر توصیه می‌شود.

References

- Abubakar, M.S., Balogun, E., Abdurahman, E.M., Nok, A.J., Shok, M., Mohammed, A. and Garba, M., 2006. Ethnomedical treatment of poisonous snakebites: plant extract neutralized *Naja nigricollis* venom. Pharmaceutical Biology, 44(5): 343-348.

https://doi.org/10.1080/13880200600746253
- Ackah, S., Bi, Y., Xue, S., Yakubu, S., Han, Y., Zong, Y. and Prusky, D., 2022. Post-harvest chitosan treatment suppresses oxidative stress by regulating reactive oxygen species metabolism in wounded apples. Frontiers in Plant Science, 13: 959762. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.959762
- Aghaee Dizaj, L., Mohammadi, H. and Aghaee, A., 2022. Physiological response of two *oregano* species medicinal plant to foliar spraying of chitosan under water deficit stress conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences, 15(1): 185-197. https://doi.org/10.22077/escs.2020.3603.1881
- Ahmadi Mousavi, E.S. and Ataei, S.A., 2017. Investigation of heavy metals concentration in vermicomposting of soft peel of pistachio, municipal activated sludge and spent mushroom compost. Journal of Environmental Studies, 43(3): 391-400. https://doi.org/10.22059/jes.2017.232559.1007437
- Alagbe, J.O. and Omokore, E.A., 2019. Effect of replacing soya bean meal with *Indigofera zollingeriana* leaf meal on the performance and carcass characteristics of growing rabbits. International Journal of Multidisciplinary Research and Development, 6(5): 74-77. https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012081
- Alipour, S. and Nasibi, F., 2015. Effect of different concentrations of sodium nitroprusside on physiological characteristics and the vase life of cut flowers of toberose (*Polianthes tuberosa* L.). Iranian Journal of Biology, 27(5): 904-914. https://doi.org/20.1001.1.23832592.1393.27.5.14.0
- Amiri, A., Sirousmehr, A. and Esmaeilzadeh Bahabadi, S., 2015. Effect of foliar application of salicylic acid and chitosan on yield of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Biology of Iran, 28(4): 712-724. https://doi.org/20.1001.1.23832592.1393.27.5.14.0
- Arnon, D.I., Tsujimoto, H.Y. and McSwain, B.D., 1967. Ferredoxin and photosynthetic phosphorylation. Nature, 214(5088): 562-566. https://doi.org/10.1038/214562a0
- Boonlertnirun, S., Boonraung, C. and Suvanasara, R., 2008. Application of chitosan in rice production. Journal of Metals, Materials and Minerals, 18(2): 47-52.
- Bueno, L., Li, J., Lantvit, D.D., Pan, L., Ninh, T.N., Chai, H.B., Soejarto, D.D., Swanson, S.M., Lucas, D.M. and Kinghorn, A.D., 2013. Bioactive constituents of *Indigofera spicata*. Journal of natural products, 76(8): 1498-1504. https://doi.org/10.1021/np400567c
- Chakraborty, M., Hasanuzzaman, M., Rahman, M., Khan, M.A.R., Bhowmik, P., Mahmud, N.U. and Islam, T., 2020. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. Agriculture, 10(12): 624-639. https://doi.org/10.3390/agriculture10120624
- Disanto, M.C., D'Antoni, C.L., Rubio, A.P.D., Alaimo, A. and Pérez, O.E., 2021. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications-A review. Biomedicine and Pharmacotherapy, 142: 111970. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111970
- Forouzandeh, M., Mohkami, Z. and Fazelinasab, B., 2019. Evaluation of biotic elicitors foliar application on functional changes, physiological and biochemical parameters of fennel (*Foeniculum vulgare*). Journal of Plant Production Research, 25(4): 49-65. https://doi.org/10.22069/jopp.2018.14077.2262
- Gohari, G., Zareei, E., Kulak, M., Labib, P., Mahmoudi, R., Panahirad, S. and Lorenzo, J.M., 2021. Improving the berry quality and antioxidant potential of flame seedless grapes by foliar application of chitosan-phenylalanine nanocomposites. Nanomaterials, 11(9): 2287. https://doi.org/10.3390/nano11092287
- Howlett, B.J., 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. Current Opinion in Plant Biology, 9(4): 371-375. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.004
- Jami, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Modarres, M., 2018. Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of in vitro cultured *Salvia leriifolia*. Iranian Journal of Biology, 31(3): 568-578. https://doi.org/20.1001.1.23832592.1397.31.3.7.7
- Kahromi, S. and Khara, J.M., 2021. Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 101(9): 3898-3907. https://doi.org/20.1001.1.23832592.1397.31.3.7.7
- Kamkar, A., Khanjari, A., Oladi, M. and Molaee Aghaee, E., 2017. Effect of packaging with chitosan film containing *Bunium persicum* L. essential oil on chemical and microbial properties of chicken fillet. Journal of Advanced Biomedical Sciences, 7(1): 104-115. https://doi.org/20.1001.1.22285105.2017.7.1.10.9
- Malekpoor, F., Salimi, A. and Ghasemi Pirbalouti, A., 2017. Effect of bio-elicitor chitosan on physiological and morphological properties in purpule basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit. Journal

of Plant Ecophysiology, 8(27): 56-71. https://doi.org/20.1001.1.20085958.1395.8.27.5.6
- Mehdipour, F., Saadatmand, S., Iranbakhsh, A., Nowrozi, B. and Uraghi Ardabili, Z., 2022. Study of the effect of the chitosan and chitosan nanoparticles on some physiological and phytochemical features of *Nigella sativa* L. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 10(2): 96-113. https://doi.org/10.30495/ejmp.2022.1945580.1664
- Mendez, T., Fuentes, A., Cofre, D., Moenne, A. and Laporte, D., 2023. Oligo-carrageenan kappa increases expression of genes encoding proteins involved in photosynthesis, C, N, and S assimilation, and growth in *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Molecular Sciences, 24(15): 11894. https://doi.org/10.3390/ijms241511894
- Mehregan, M., Mehrafarin, A., Labbafi, M.R. and Naghdi Badi, H., 2017. Effect of different concentrations of chitosan biostimulant on biochemical and morphophysiological traits of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). Journal of Medicinal Plants, 16(62): 1-19. https://doi.org/20.1001.1.2717204.2017.16.62.17.0
- Mikołajczak, N., Tańska, M. and Ogrodowska, D., 2021. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. Trends in Food Science and Technology, 113: 110-138. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.046
- Mohkami, Z., Sanikhani, M., Kheiry, A., Bahari, A. and Tavakolizadeh Esfahani, M., 2020. Study of some abiotic elicitors effects on morphological and phytochemical traits of karela. Journal of Plant Production Research, 23(2): 183-202. https://doi.org/10.22069/jopp.2021.18663.2756
- Mondal, M.M.A., Malek, M.A., Puteh, A.B. and Ismail, M.R., 2013. Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Bangladesh Journal of Botany, 42(1): 179-183. https://doi.org/10.3329/bjb.v42i1.15910
- Nourafcan, H., 2019. Effect of chitosan on physiological and morphological traits of lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) under in vitro and field conditions. Journal of Crop Ecophysiology, 13(49): 73-86. https://doi.org/10.30495/jcep.2019.664838
- Oluwafemi, R.A., Olawale, A.I. and Alagbe, J.O., 2020. Recent trends in the utilization of medicinal plants as growth promoters in poultry nutrition- A review. Research in: Agricultural and Veterinary Sciences, 4(1): 5-11. https://agris.fao.org/search/en/providers/123799/records/64746a3479cbb2c2c1af2fad
- Safari, Z.S., Ding, P., Zahidi, N.M., Atif, A., Wafa, S., Aziz, A. and Yusoff, S.F., 2021. Maintenance of defence enzyme activities in tomato fruit during storage by chitosan and vanillin coating. International Journal of Applied Science and Research, 4(2): 177-181. https://www.researchgate.net/publication/350567207
- Saucedo, S., Contreras, R.A. and Moenne, A., 2015. Oligo-carrageenan kappa increases C, N and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees. Journal of Forestry Research, 26(3): 635-640. https://doi.org/10.1007/s11676-015-0061-9
- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R. and Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress full conditions. Journal of Botany, 14: 1-26. https://doi.org/10.1155/2012/217037
- Shinwari, Z.K., Watanabe, T., Rehman, H. and Youshikawa, I., 2013. Ethnobotanical study of medicinal plants of semi-tribal area of Makerwal & Gulla Khel (Lying between Khyber Pakhtunkhwa and Punjab provinces), Pakistan. American Journal of Plant Sciences, 4: 98-116. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.41015
- Shukla, P.S., Borza, T., Critchley, A.T. and Prithiviraj, B., 2016. Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. Frontiers in Marine Science, 3(81): 21-36. doi.org/10.3389/fmars.2016.00081
- Trung San, P., Minh Khanh, C., Nhn Khanh, H.H., Anh Khoa, T., Nguyen, H., Duc Thinh, T. and Nguyen, T.D., 2021. Impacts of κ-oligocarrageenan application on photosynthesis, nutrient uptake and bean yield of coffee (*Coffea robusta*). Sains Malaysiana, 50(11): 3171-3179. http://doi.org/10.17576/jsm-2021-5011-02
- Vera, J., Castro, J., Contreras, R.A., González, A. and Moenne, A., 2012. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). Physiological and Molecular Plant Pathology, 79: 31-39. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.03.005
- Yadollahi Dehchecsme, P., Bagheri, A.A., Amiri, A. and Esmailzade Bahabadi, S., 2014. Effect of drought tension and chitosan foliar application on yield and photosynthetic pigments of sunflower (*Heliantus unnuus* L.). Crop Physiology Journal, 6(21): 73-83. https://doi.org/20.1001.1.2008403.1393.6.21.6.6