Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (479-492)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.271832.1565

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۴۹۲-۴۷۹)

تأثیر محلول‌پاشی کیتوزان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه نعناع (*Mentha spicata* L.) تحت تنش کم آبیاری

مهنوش رحمانی[۱]، عزیزاله خیری[۲*]، محسن ثانی خانی[۲]، سید نجم الدین مرتضوی[۳] و نرجس فرزین[٤]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
٤. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج اسانس، شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/٤)

چکیده

به‌منظور بررسی اثر کم‌آبیاری و کیتوزان بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه نعناع معمولی (*Mentha spicata* L.) آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل آبیاری در دو سطح (۱۰۰ درصد و ٦۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌عنوان فاکتور اصلی و تیمار کیتوزان در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد محلول‌پاشی با کیتوزان باعث افزایش میزان کلروفیل شد. بالاترین میزان کلروفیل (۱/۲٤۰ mg gr^{-1} f.w) در غلظت ۱۰۰ mg/l کیتوزان در شرایط آبیاری کامل (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌دست آمد. کاربرد محلول‌پاشی ۱۰۰mg/l کیتوزان و شرایط کم‌آبیاری (٦۰ درصد ظرفیت زراعی) باعث تشکیل بیشترین میزان کاروتنوئید (۰/٤٤۲ mg gr^{-1} f.w)، فنل (۹/۹۸۹ mg gr^{-1} f.w)، فلاونوئید (٦/۹۹۳ mg gr^{-1} f.w) و پرولین (۲۳/۹٦ mol gr^{-1} f.w) در گیاهان تحت این تیمار گردید. بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۱/۱٦ درصد) در غلظت ۵۰ mg/l کیتوزان در شرایط کم‌آبیاری مشاهده شد. همچنین کم‌آبیاری و کیتوزان اثر مثبتی بر عملکرد اسانس داشتند، به‌طوری‌که بیشترین میزان عملکرد اسانس (۱۰/٤٤ kg/h) در غلظت ۵۰ mg/l کیتوزان و در شرایط کم آبیاری حاصل شد. به‌طورکلی نتایج نشان داد تیمار کیتوزان در شرایط تنش خشکی و غیر تنش اثرات مثبتی بر صفات مذکور داشت و اثرات منفی ناشی از تنش را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: پرولین، ترکیبات فنلی، عملکرد اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای نسبی آب.

Effect of foliar application of chitosan on some physiological characteristics of *Mentha spicata* L. under deficit irrigation stress

Mehnoosh Rahmani[1], Azizollah Kheiry[2]*, Mohsen Sanikhani[2], Sayed Najmeddin Mortazavi[3] and Narjes Farzin[4]
1, 2, 3. M. Sc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4. Ph.D. Candidate, Barij Essence Pharmaceutical Company, Kashan, Iran
(Received: Dec. 25, 2018- Accepted: May 25, 2019)

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to investigate the effect of deficit irrigation and chitosan on some physiological traits of *Mentha spicata* L. This experiment was conducted in a completely randomized block design in a split plot arrangement with three replications in University of Zanjan. The experimental treatments were irrigation at two levels (100% and 60% field capacity) as the main factor and chitosan treatment at three levels (0, 50 and 100 mg/l) was considered as a sub factor. The results showed that spraying with chitosan increased chlorophyll content. The highest chlorophyll content (1.240 mg gr^{-1} f.w) was obtained at 100 mg/l chitosan under complete irrigation conditions (100% field capacity). The spraying application of 100 mg/l chitosan and deficit irrigation conditions (60% field capacity) caused the highest amount of carotenoids (0.45 mg gr^{-1} f.w), phenol (9.989 mg gr^{-1} f.w), flavonoid (6.993 mg gr^{-1} f.w) and proline (23.96 mol gr^{-1} fw). The highest level of antioxidant activity (91.16%) was observed in 50 mg/l chitosan under deficit irrigation. Also, deficit irrigation and chitosan had a positive effect on the essential oil yield, so that the highest essential oil yield (10.44 kg/h) was obtained at 100 mg/l chitosan concentration and under deficit irrigation conditions. Overall, the results showed that chitosan treatment had positive effects on drought stress and non-stress conditions and improved the negative effects of drought stress.

Keywords: Antioxidant activity, essential oil yield, phenolic compounds, proline, relative water content.

* Corresponding author E-mail: kheiry@znu.ac.ir

مقدمه

تیره Lamiaceae شامل بیش از ۴۰۰۰ گونه و ۲۰۰ جنس است که بسیاری از آن‌ها گیاهان دارویی هستند. بیشتر گونه‌های تیره نعناع حاوی روغن‌های فرار هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی در برابر پاتوژن‌ها از خود نشان می‌دهند (Snoussi *et al*., 2015). از نعناع در طب سنتی برای درمان‌های مختلف استفاده می‌شده و همچنین امروزه در محصولات تجاری و دارویی کاربرد دارد (Bardaweel *et al*., 2018). نعناع معمولی با نام علمی *Mentha spicata* L. گونه معمولی نعناع بوده و در سطوح وسیع کشت می‌گردد و دارای خواص ضدعفونی‌کننده، ضد اسپاسم و تقویت‌کننده معده می‌باشد (Begaa *et al*., 2018).

عامل اصلی از بین رفتن محصول در سراسر جهان و کاهش عملکرد و کیفیت عوامل تنش‌زا، شامل عوامل محیطی (دما، آب، املاح و غیره) و عوامل بیولوژیک (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، آفات (حشرات) و علف‌های هرز) می‌باشند (Zandalinas *et al*., 2018). گیاهان برای سازگارشدن با شرایط کم‌آبی، مکانیسم‌های گوناگونی را توسعه داده‌اند. یکی از راه‌کارهای گیاهان به‌ویژه گیاهان دارویی در برابر تنش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. ترکیبات دارویی یک گیاه معطر به حضور متابولیت‌های ثانویه وابسته است (Tatrai *et al*., 2016) و ممکن است باعث تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در عملکرد و ترکیب اسانس آن‌ها گردد (Petropoulos *et al*., 2007). متابولیت‌های ثانویه به‌طور عمده با تغییرات ژنتیکی کنترل می‌شود، بااین‌حال شرایط محیطی (شدت نور، تغییرات دما، فصل رشد) و شیوه‌های کشت (مدیریت خاک، آبیاری، تغذیه، زمان برداشت) اثر قوی بر این ترکیبات دارد (Chrysargyris *et al*., 2017).

الیسیتورها (Elicitors) محرک‌های فیزیکی یا ترکیبات شیمیایی با منشأ زیستی و غیر زیستی هستند که می‌توانند پاسخ‌هایی را در گیاه القا کنند که باعث سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه مشابه و یا جدید در سلول‌ها شوند. الیسیتورها برای گیاه یک سری از پیام‌های شیمیایی را ارسال می‌کنند که سبب رها شدن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود (Raie *et al*., 2016). الیسیتور کیتوزان به‌عنوان فراوان‌ترین آمینوپلی‌ساکاریدها در طبیعت، دارای خصوصیاتی ازجمله سازگاری زیستی بالا، سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری و خواص ضدمیکروبی است و به‌طور برجسته در پوسته سخت‌پوستانی مثل خرچنگ و میگو، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود (Sedaqat *et al*., 2016). هرچند سازوکار دقیق عمل کیتوزان بر متابولیسم گیاه ناشناخته مانده است اما طبق تحقیقات انجام‌شده مکانیسم عمل کیتوزان بر گیاه را به برخی مسیرهای انتقال پیام مربوط به بیوسنتز اکسین از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان نسبت داده‌اند (Mahdavi *et al*., 2014).

تنش خشکی باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌گردد. انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن رادیکال سوپراکسید ($O2^{0-}$)، هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH^0) هستند که بسیار واکنش‌پذیر می‌باشند. رادیکال‌های آزاد تولیدشده در سلول‌های گیاهی به‌وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شوند که به‌طور خاص شامل واکنش‌های مرتبط با آسکوربات، گلوتاتیون، فلاونوئیدها، آنزیم‌ها مانند پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز می‌باشند. چنانچه بین تولید و مهار ROS ها اختلال ایجاد شود باعث آسیب به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها و کلروفیل می‌شود. طی سال‌های اخیر کیتوزان به‌دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی موردتوجه واقع‌شده است (Naderi *et al*., 2015). آب در فرآیند رشد و تکثیر سلول‌ها، انتقال مواد غذایی، ثبات مولکول‌ها مانند پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها و تغییر شکل سلول نقش دارد (Gonzalez-Chavira *et al*., 2018). مشخص‌شده است تنش خشکی با تغییر در روابط آبی، فرآیندهای فیزیولوژیک و ایجاد تغییرات در ساختار غشای سلولی بر گیاه اثر می‌گذارد (Zlatev & Yordanov, 2004). نتایج پژوهش Fabriki-Ourang & Davoodnia (2018) روی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) تحت تنش ملایم خشکی نشان داد غلظت کلروفیل در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش پیدا کرد. پژوهش Gorgini

Shabankareh *et al.* (2015) بر گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در شرایط کم‌آبی نشان داد در همه‌ی اندام‌های گیاهی با افزایش مقدار آب در دسترس درصد اسانس گیاه کاهش یافت. بررسی Heidari *et al.* (2012) روی گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.) نشان داد تنش خشکی باعث افزایش میزان درصد اسانس گردید. نتایج تحقیقی روی گیاه فلفل (*Capsicum* sp.) نشان داد محلول‌پاشی این گیاه با کیتوزان موجب کاهش تعرق و افزایش مقاومت گیاه نسبت به تغییرات رطوبت در خاک گردیده و در نهایت موجب افزایش زیست‌توده و تولید محصول شده است (Bittelli *et al*., 2001). نتایج پژوهش Heng *et al.* (2012) روی گیاه پونه (*Origanum vulgare* ssp. Hirtum) حاکی از آن بود که تیمار گیاه با کیتوزان موجب افزایش وزن‌تر و خشک گیاه گردید. پژوهشی روی گیاه آفتابگردان نشان داد که محلول‌پاشی با کیتوزان منجر به افزایش برخی شاخص‌های گیاه ازجمله کلروفیل در شرایط تنش خشکی گردیده است (Yadollahi Dehchecsme *et al*., 2014). در یک بررسی روی اثرات محلول‌پاشی کیتوزان روی نعناع فلفلی در شرایط گلخانه‌ای مشخص‌شد که این تیمار موجب افزایش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی می‌شود (Salimgandomi, 2016).

با توجه به اینکه افزایش ترکیبات دارویی و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی در شرایط تنش‌های محیطی حاصل می‌شود و همچنین کاربرد الیسیتورها باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه خصوصاً در گیاهان دارویی می‌گردد انجام تحقیقاتی در این زمینه ضروری است. هدف از این پژوهش بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه نعناع به کاربرد محلول‌پاشی کیتوزان در شرایط تنش کم‌آبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۱۳۹۶در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام گرفت که ازنظر جغرافیایی در عرض ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی و در طول ۴۷ درجه و ۱ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۵۲ دقیقه شرقی با ارتفاع ۱۶۶۳ از سطح دریا واقع‌شده است. خاک مزرعه به‌صورت لوم رسی بوده است که برخی از مشخصات آن در جدول ۱ آورده شده است. آزمایش به صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل آبیاری در دو سطح (۱۰۰٪ و۶۰٪ ظرفیت زراعی) و تیمار محلول‌پاشی کیتوزان در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در نظر گرفته شد. اعمال تیمار کیتوزان به‌صورت محلول‌پاشی برگی پس از استقرار نشاء در زمین اصلی و در ۳ مرحله شامل: ۱-مرحله ۸ برگی، ۲- مرحله پنجه‌زنی و ۳- مرحله آغاز گلدهی صورت گرفت. تیمار آبیاری نیز پس از اولین محلول‌پاشی بر اساس ظرفیت زراعی مزرعه به‌صورت آبیاری کامل (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی مزرعه) و تنش کم‌آبیاری (۶۰٪ ظرفیت زراعی) اعمال شد. مدت زمان انجام آزمایش پس از استقرار گیاهان حدود سه ماه و تا مرحله گلدهی کامل گیاه انجام شد و در پایان دوره رشدی و بعد از تیمار گیاهان نمونه‌برداری از گیاه و اندازه‌گیری شاخص‌های مورد نظر انجام شد.

تعیین ظرفیت زراعی مزرعه

تیمار آبیاری پس از انجام اولین محلول‌پاشی اعمال شد. برای تعیین ظرفیت زراعی مزرعه (FC) مراحل کار بدین‌صورت بود که ابتدا محل مناسبی از زمین با ابعاد ۱ مترمربع انتخاب و سطح خاک از بقایای گیاهی پاک شد. سپس حجم مشخصی از آب تا رسیدن آن قطعه از زمین به حالت غرقاب به زمین داده شد.

سپس برای جلوگیری از تبخیر سطحی سطح موردنظر به‌وسیله نایلون پوشانیده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت به‌وسیله استوانه فلزی (کر) نمونه‌برداری انجام گرفت و بلافاصله برای توزین به آزمایشگاه منتقل گردید.

جدول ۱. خصوصیات خاک محل آزمایش

Table 1. Soil parameters of the experiment location

pH	EC (ds/m)	Nitrogen (%)	Calcium (gr/Kg)	Sodium (gr/Kg)	Potassium (gr/Kg)	Organic Matter (%)	Soil texture	Sand (%)	Clay (%)	Silt (%)
7.4	1.5	0.07	0.12	0.13	0.2	0.94	Loamy clay	25	37	38

بعد از توزین، نمونه خاک به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۴ درجه سانتی گراد در آون خشک و سپس وزن خاک خشک اندازه‌گیری شد. با استفاده از چگالی ظاهری خاک و میزان رطوبت وزنی خاک ظرفیت زراعی مزرعه بر اساس روابط زیر محاسبه گردید. برای اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده، مراحل بالا طی فصل رشد انجام شد. در این آزمایش برای کنترل حجم آب مصرفی از کنتور استفاده گردید.

رطوبت وزنی خاک $Mw - Ms/Ms = \Theta m$

چگالی ظاهری خاک $Ms/V = Pb$

ظرفیت زراعی مزرعه $= \Theta m \times pb\ Fc$

در این روابط Mw وزن خاک مرطوب (گرم)، Ms وزن خاک خشک (گرم)، Vt حجم استوانه (سانتی‌متر مکعب) است (Cassel & Nielsen, 1990).

صفات مورد اندازه‌گیری شامل کلروفیل، کاروتنوئید، فلاونوئید، فنل، پرولین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای نسبی آب، درصد اسانس و عملکرد اسانس بود.

محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در ساعات اولیه صبح، از ۵ بوته ۳ برگ در موقعیت بالایی بوته و سرشاخه‌ها انتخاب و از قسمت وسط برگ برای اندازه‌گیری استفاده شد. به‌این‌ترتیب که ابتدا مقدار نیم گرم از برگ تازه را در هاون چینی ریخته، سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد را به‌آرامی به نمونه اضافه کرده به‌خوبی ساییده شد و سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس عصاره بالایی حاصل از سانتریفیوژ را به فالکن منتقل کرده و از عصاره داخل فالکن در کووت ریخته و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Safas monaco (RS 232) اندازه‌گیری انجام شد. مقدار جذب محلول‌ها در طول‌موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ به ترتیب برای کاروتنوئید و کلروفیل a و b خوانده شد. از استون ۸۰ درصد به‌عنوان محلول بلانک (شاهد) استفاده گردید. کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی محاسبه شد. درنهایت با استفاده از فرمول‌های زیر محتوای کلروفیل کل و محتوای کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر نمونه محاسبه گردید. در این رابطه (V) حجم نهایی عصاره، (A) جذب نور در طول‌موج‌های مشخص، (W) وزن‌تر نمونه برحسب گرم است (Arnon, 1967).

$$Chl\ a = (12.7\times(A663)-2.69\times(A645)) \times V/(W\times1000)$$

$$Chl\ b = (22.9\times A645-4.68\times(A663))\times V/(W\times1000)$$

$$Chl\ a+b = (8.02\times(A663)+20.2\times(A645))\times V/(W\times1000)$$

$$Carotenoeid = (7.6\times(A480)-1.49\times(A510))\times V/(W\times1000))$$

محتوای فنل کل

محتوای فنل کل براساس روش فولین سیوکالچو محاسبه گردید. به این منظور ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با ۱۰ سی‌سی متانول در هاون چینی سابیده شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره صاف شده گیاه را تهیه‌کرده، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرو لیتر معرف فولین سیوکالچو (۵۰٪) اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگه‌داری شدند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Safas monaco (RS 232) ثبت گردید. از غلظت‌های مختلف اسید گالیک ۵۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Meda *et al*., 2005).

محتوای فلاونوئید

میزان محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه گردید و نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شدند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل Safas monaco (RS 232) اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن گیاه گزارش شد (Ruiz Ruiz *et al*., 2015).

پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates *et al.* (1973) استفاده شده است. بدین منظور ۰/۱ گرم از برگ گیاه را وزن کرده و در هاون کوچک چینی به همراه ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ به‌طور کامل ساییده شد و سپس با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره بالایی محلول سانتریفیوژ شده داخل فالکن ریخته شد و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه گردید. سپس فالکن‌ها به‌مدت ۱ ساعت در حمام بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در حمام یخ به‌مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شدند. در مرحله آخر ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محتوای هر فالکن اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه توسط شیکر مخلوط شد. در این مرحله محلول به دو فاز تبدیل می‌شود، لایه رویی که به رنگ صورتی تا قرمز ایجادشده را برداشته و میزان جذب لایه فوقانی که حاوی پرولین و تولوئن بود با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی اثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH استفاده شد. گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با دادن H به رادیکال‌های آزاد DPPH باعث کاهش مولکول‌های DPPH می‌گردند که با تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ بنفش تیره به زرد روشن همراه است. برای این منظور محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH تهیه شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر DPPH داخل لوله آزمایش حل شد و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه‌داری شدند؛ و درنهایت نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار رادیکال آزاد $=(A_c-A_s)/A_c\times100$

که در این رابطه Ac و As به‌ترتیب جذب شاهد (شامل همه مواد به‌جز عصاره) و جذب نمونه می‌باشند (De pinedo *et al*., 2007).

محتوای نسبی آب

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ‌ها، در ساعات ابتدایی روز نمونه‌های تازه گیاهی جمع‌آوری گردید و داخل کلمن یخ، به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن‌تر ۵ برگ اندازه‌گیری شد (وزن تازه). سپس نمونه‌ها به‌اندازه یک سانتی‌متر خرد شدند و داخل پتری دیش به‌مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر و در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شدند. سپس رطوبت اضافی گرفته شد و مجدداً وزن آن اندازه‌گیری شد (وزن تورژسانس). سپس نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون نگه‌داری شدند. سپس نمونه‌ها مجدد اندازه‌گیری شدند (وزن خشک). درنهایت میزان محتوای نسبی آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Ritchie *et al*., 1990).

$$RWC\ (\%) = (FW-DW)/(TW-DW)\times100$$

RWC= محتوای آب نسبی، FW = وزن تر، DW= وزن خشک، TW= وزن تورژسانس.

اسانس‌گیری

گیاهان به‌منظور اسانس‌گیری در زمان گلدهی جمع‌آوری و در سایه و در دمای محیط خشک شدند. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر به‌مدت‌زمان ۲ ساعت انجام گرفت. سپس بازده اسانس نسبت به وزن خشک گیاه محاسبه شد. عملکرد اسانس از ضرب درصد اسانس در میزان عملکرد خشک گیاه تقسیم بر ۱۰۰ برحسب کیلوگرم در هکتار محاسبه گردید (Hadian *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. دسته‌بندی داده‌ها و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد و جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای Duncan استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل تیمارها بر صفات اندازه‌گیری‌شده، به‌جز محتوای نسبی آب برگ،

معنی‌دار گردید (جدول ۲). در شرایط تنش کم‌آبیاری میزان کاروتنوئید، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پرولین، درصد و عملکرد اسانس افزایش یافت و میزان کلروفیل کاهش پیدا کرد. همچنین کاربرد محلول‌پاشی کیتوزان باعث کاهش اثرات منفی ناشی از تنش و بهبود صفات مورد اندازه‌گیری گردید (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل تیمارها بر کلروفیل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها هر دو سطح تیمار کیتوزان برافزایش میزان کلروفیل مؤثر بوده و تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشتند. بیشترین میزان کلروفیل ۱/۲۴۰ و ۱/۱۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه به ترتیب در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. کمترین میزان کلروفیل ۰/۶۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در شاهد و در شرایط کم‌آبیاری حاصل شد (شکل۱). Gornik *et al.* (2008) گزارش کردند کیتوزان باعث کاهش اثر تنش خشکی بر محتوای کلروفیل و افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌گردد. یکی از دلایلی که باعث کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌شود افزایش اتیلن و آبسیزیک اسید است که باعث تحریک فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تجزیه کلروفیل می‌گردد (Mittler, 2002). همچنین کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش می‌تواند به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که می‌تواند منجر به آسیب به غشای تیلاکوئیدها و تجزیه رنگیزه‌ها شود (Gill & Tutija, 2010). پژوهشی که روی گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) انجام شد نشان داد میزان کلروفیل گیاه تحت تنش کم‌آبیاری به میزان قابل‌توجهی کاهش یافت (Arazmjo *et al*., 2010).

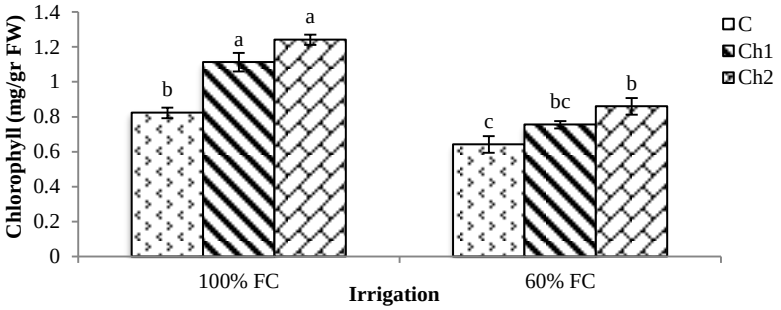
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر کم آبیاری و کیتوزان بر کلروفیل، کاروتنوئید، فلاونوئید، فنل، آنتی‌اکسیدان، پرولین، محتوای نسبی آب، درصد اسانس و عملکرد اسانس نعناع

Table 2. Results of variance analysis effect of deficit irrigation and chitosan on chlorophyll, carotenoids, flavonoid, phenol, antioxidant activity, proline, relative water content, essential oil content and essential oil yield of *Mentha spicata* L.

Source of variation	df	Mean square								
		Chlorophyll	Carotenoids	Flavonoid	Phenol	Antioxidant activity	Proline	Relative water content	Essential oil content	Essential oil yield
Replication	2	0.00036 ^{ns}	0.00016 ^{ns}	0.321^{ns}	0.217^{ns}	0.525^{ns}	0.078^{ns}	124.037^{ns}	0.061 ^{ns}	0.192 ^{ns}
Irrigation	1	0.42**	0.023**	17.17**	19.040**	13.585**	**75.848	117.815^{n}	4.254**	167.53**
error	2	0.0021	0.0002	0.060	0.102	0.893	0.124	34.361	0.051	0.77
Chitosan	2	0.15**	0.010**	10.87**	10.182**	16.865**	50.020**	35.617^{ns}	3.324**	10.18*
Irrigation × Chitosan	2	0.01**	0.0008*	1.91*	2.064**	1.50*	**0.649	61.026^{ns}	0.220*	6.22*
Experimental error	8	0.0014	0.00016	0.247	0.246	0.931	0.369	33.97	0.036	1.21
CV	-	4.17	3.56	12.04	7.14	1.08	3.12	9.76	8.25	17.46

ns، * و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, *, **: Non-significantly differences and Significantly differences at 5 and 1% of probability levels, respectively.



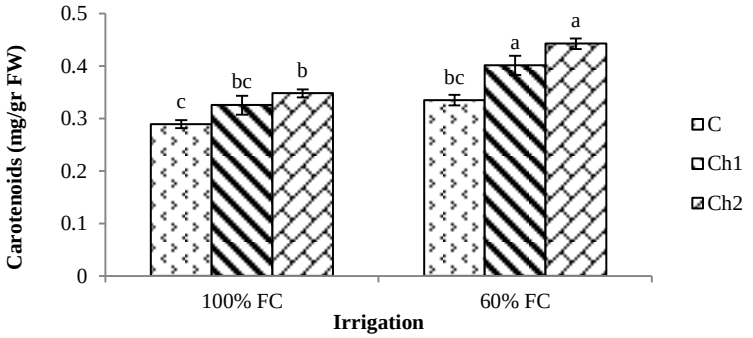
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان کلروفیل نعناع

(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 1. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on chlorophyll content of *Mentha spicata* L. (C: Control Ch1: 50 mg.l of Chitosan Ch2: 100 mg.l of Chitosan)

تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل تیمارها در سطح احتمال پنج درصد بر کاروتنوئید معنی‌دار بود (جدول ۲). میزان کاروتنوئید تحت تأثیر تنش کم‌آبیاری قرار گرفت و میزان آن افزایش یافت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد هر دو سطح تیمار کیتوزان اثر مطلوبی بر میزان کاروتنوئید داشت و تفاوت معنی‌دار بین دو سطح کیتوزان مشاهده نشد. بیشترین میزان کاروتنوئید ۰/۴۴۲ و ۰/۴۰۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه به ترتیب در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان حاصل شد. کمترین میزان آن ۰/۲۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در تیمار شاهد و با آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی به‌دست آمد (شکل۲). به نظر می‌رسد کیتوزان واکنش‌های دفاعی را از طریق تغییر مسیرهای متابولیسمی فعال می‌سازد (Bittelli *et al*., 2001; El-Mougy *et al*., 2013). مطالعات روی گیاهان C3 نشان داد با افزایش شدت تنش خشکی میزان کاروتنوئید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی افزایش می‌یابد، زیرا کاروتنوئید به‌عنوان حفاظت کننده کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری محسوب می‌شود و از طریق خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد از تخریب بیشتر کلروفیل جلوگیری می‌کنند (Lawlor & Cornic, 2002).

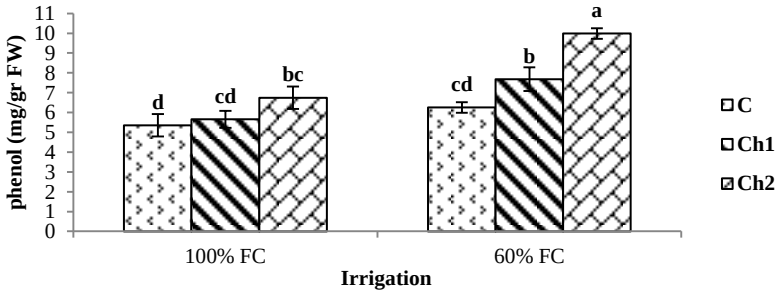
با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها اثر متقابل تیمارها بر محتوای فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد ترکیبات فنلی تحت تأثیر تیمارها به‌ویژه تنش کم‌آبیاری قرار گرفت و میزان آن افزایش پیدا کرد. بالاترین میزان فنل ۹/۹۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و در شرایط کم‌آبیاری و پایین‌ترین میزان آن ۵/۳۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در تیمار شاهد و با آبیاری کامل به‌دست آمد (شکل ۳).



شکل ۲.مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان کاروتنوئید نعناع

(C: شاهد، Ch1: 50 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: 100 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 2. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on carotenoids content of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان فنل نعناع

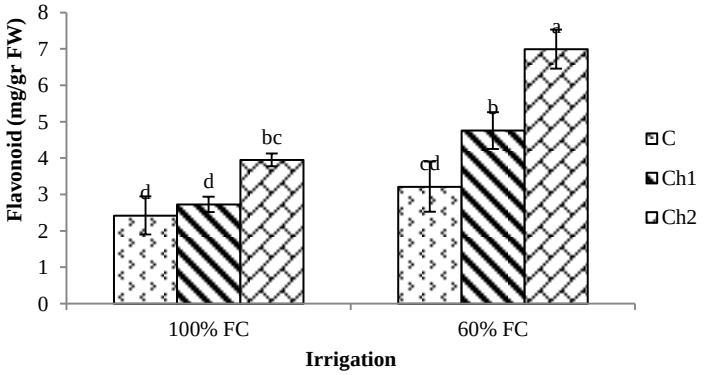
(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 3. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on phenol content of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)

یکی از عملکردهای مهم و شناخته‌شده فنل‌ها، شرکت در مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی برای مقابله با تنش اکسیداتیو القاشده در اثر تنش خشکی در گیاهان است. این ترکیبات به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و سبب افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Alizadeh *et al*., 2018). در یک بررسی روی اثرات محلول‌پاشی کیتوزان روی گیاه نعناع فلفلی در شرایط گلخانه‌ای مشخص‌شده که این تیمار موجب افزایش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی می‌شود (Salimgandomi, 2016). محرک کیتوزان ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کند که می‌توانند منجر به سنتز مسیرهای بیوسنتزی مختلف و راه‌اندازی آنزیم‌ها گردد و درنهایت باعث تولید متابولیت‌های ثانویه شود (Malekpoor *et al*., 2015).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل تیمارها بر فلاونوئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن است که بیشترین میزان فلاونوئید ۶/۹۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در شرایط کم‌آبیاری و کمترین میزان فلاونوئید ۲/۴۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه در تیمار شاهد با شرایط آبیاری کامل می‌باشد (شکل ۴).

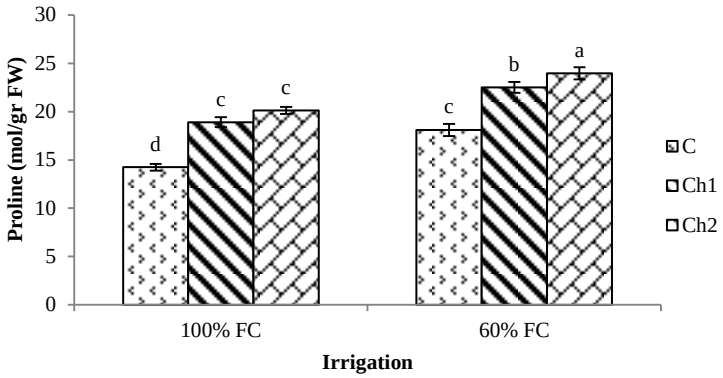
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل تیمارها بر میزان پرولین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۲). بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها میزان اسیدآمینه پرولین تحت تأثیر تیمارها افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که بیشترین میزان پرولین ۲۳/۹۶ مول بر گرم وزن تازه در سطح تیمار۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و در شرایط کم‌آبیاری و کمترین میزان آن ۱۴/۲۴ مول بر گرم وزن تازه در تیمار شاهد با آبیاری کامل به‌دست‌آمده است (شکل ۵). تنظیم اسمزی یکی از فرآیندهای مهم در سازگاری گیاهان به تنش خشکی است و از طریق کاهش پتانسیل اسمزی به‌وسیله تجمع اسمولیت‌های سازگار در سلول‌های گیاهی و حفظ فشار آماس سلول‌ها به رشد گیاه و تحمل تنش خشکی کمک می‌کند. (Liu *et al*., 2011). اسیدآمینه پرولین یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌های آلی است که در گیاهان در واکنش به عوامل نامساعد محیطی تجمع می‌یابد. پرولین به‌عنوان یک محافظت‌کننده اسمزی می‌تواند از ساختار پروتئین‌ها محافظت کند و بر طبق نتایج گزارش‌شده تنش خشکی به‌طور معنی‌داری سبب افزایش تجمع پرولین در گیاه می‌شود (Jabbari *et al*., 2014). کیتوزان با فعال نمودن تعدادی از آنزیم‌ها نظیر فیتوالکسین‌ها مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش داده و صدمات ناشی از آن‌ها را کاهش می‌دهد (Taheri *et al*., 2015). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش Nxele *et al* (2017) محتوای پرولین کل گیاه سورگوم در پاسخ به تنش خشکی و شوری افزایش یافت. که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان فلاونوئید نعناع

(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 4. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on flavonoid content of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان پرولین نعناع
(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

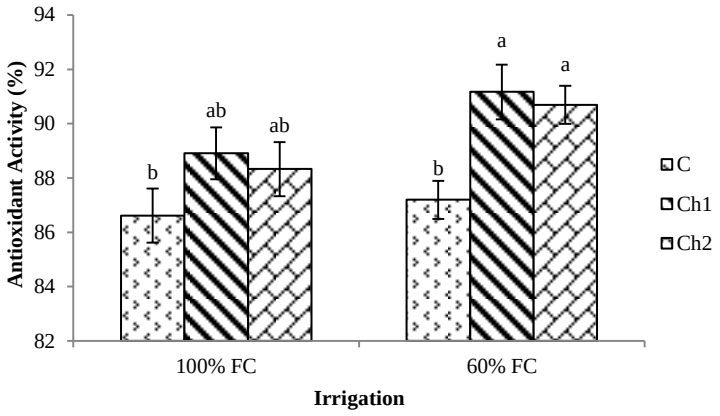
Figure 5. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on proline content of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر آن است که اثر متقابل تیمارها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد تیمارها موجب افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با شاهد گردید. بین دو سطح کیتوزان در شرایط کم آبیاری تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۹۱/۱۶ و ۹۰/۶۹ درصد به ترتیب در تیمار۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در شرایط کم‌آبیاری به‌دست آمد و پایین‌ترین میزان آن ۸۶/۶۱۲ درصد در تیمار شاهد با آبیاری کامل مشاهده شد (شکل۶). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند که به‌طور مداوم در گیاهان حتی در شرایط عادی نیز تولید می‌شوند (Hussain *et al*., 2018). گیاهان از طریق سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گونه‌های فعال اکسیژن ایجادشده را کاهش می‌دهند (Afsharmohammdian *et al*., 2016). براساس گزارش Alizadeh Ahmad Abadi *et al.* (2018) روی گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط کم‌آبیاری افزایش یافت. مطالعات متعدد نشان داده است که کاربرد کیتوزان به‌عنوان یک الیسیتور زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد. مطالعه Naderi *et al.* (2017) روی گیاه زنیان (*Carum copticum* L.) نشان داد میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تیمار کیتوزان افزایش یافتند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل تیمارها و اثر ساده آن‌ها بر محتوای نسبی آب معنی‌دار نشد (جدول۲).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر متقابل تیمارها بر درصد و عملکرد اسانس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها درصد و عملکرد اسانس تحت شرایط کم‌آبیاری و کاربرد محلول‌پاشی با کیتوزان افزایش قابل‌توجهی یافتند (شکل ۹) و (شکل ۱۰). بالاترین میزان درصد اسانس (۳/۸۳۸ درصد در ۱۰۰ گرم وزن خشک در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و با آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد و کمترین میزان درصد اسانس ۱/۴۷۰ درصد در تیمار شاهد و با آبیاری کامل حاصل شد (شکل ۹). بیشترین عملکرد اسانس (۱۰/۴۴ کیلوگرم در هکتار) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و در شرایط کم آبیاری و کمترین میزان آن ۳/۷۶ کیلوگرم در هکتار در تیمار شاهد و با شرایط آبیاری کامل حاصل شد. کیفیت گیاهان دارویی و معطر بستگی به ترکیب و غلظت متابولیت‌های ثانویه گیاه دارد. سنتز اسانس در گیاهان تحت تأثیر عوامل متعددی ازجمله نور، تنوع فصلی، تغییرات آب و هوایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و

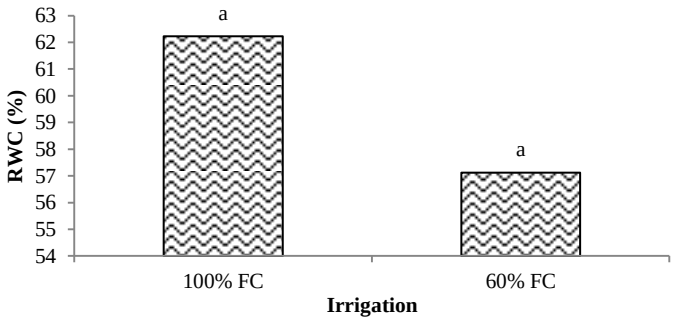
تنش‌های زیست‌محیطی می‌باشد، تنش آبی عامل مهمی برای سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است. (Mandoulakani *et al*., 2017; Casser *et al*., 2018). تغییر در اسانس استخراج‌شده از گیاهان معطر و ترکیبات آن‌ها با تنش آبی در تحقیقات متعددی مشاهده شده است. پژوهش Kahlid (2006) بر گیاه ریحان (*Ocimum* sp.) تحت تیمار تنش آبی نشان داد، درصد اسانس در این گیاه در شرایط تنش افزایش پیدا کرد. پژوهش Heidari *et al.* (2012) روی گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.) نیز نشان داد تنش خشکی باعث افزایش میزان درصد اسانس گردید. تحریک تولید اسانس تحت تنش آبی می تواند به دلیل افزایش تولید ترپن‌ها در اثر تنش باشد. استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و بهبود عملکرد گیاه در هنگام تنش است (Esmaeilzadeh Bahabadi & Sharifi, 2013). مطالعات متعدد حاکی از آن است که کاربرد تیمار کیتوزان در گیاهان موجب افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Bittelli *et al*., 2001). تحقیق Emami Bistgani *et al.* (2017) بر گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) نشان داد کاربرد محلول‌پاشی با کیتوزان در شرایط تنش خشکی باعث افزایش عملکرد اسانس در این گیاه گردید. احتمالاً کیتوزان به‌عنوان القاکننده قوی برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کند (Emami Bistgani *et al*., 2017).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نعناع

(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

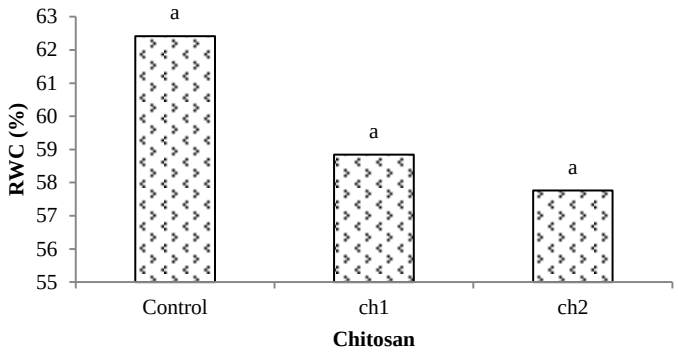
Figure 6. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on antioxidant activity content *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر کیتوزان بر میزان محتوای نسبی آب نعناع

(C: شاهد، Ch1: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

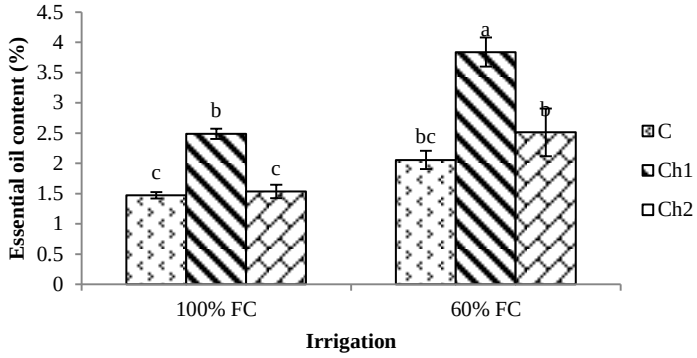
Figure 7. Mean comparison effect of chitosan on RWC content of *Mentha spicata* L.
(C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر کم آبیاری بر میزان محتوای نسبی آب نعناع

(C: شاهد، Ch1: 50 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: 100 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

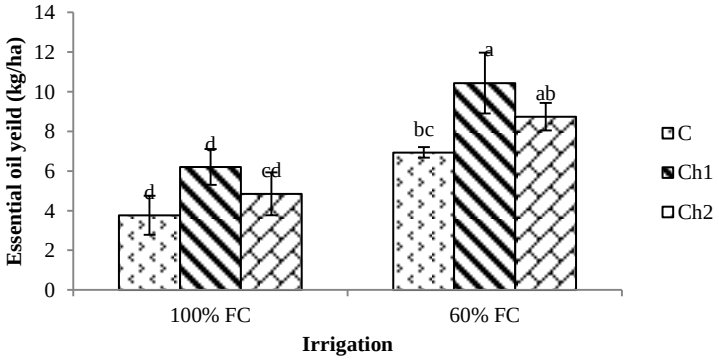
Figure 8. Mean comparison effect of deficit irrigation on RWC content of *Mentha spicata* L.
(C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان درصد اساتس نعناع

(C: شاهد، Ch1: 50 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: 100 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 9. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on essential oil content of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)



شکل ۱۰. اثر متقابل کیتوزان و کم آبیاری بر میزان عملکرد اسانس نعناع

(C: شاهد، Ch1: 50 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، Ch2: 100 میلی‌گرم در لیتر کیتوزان)

Figure 10. Mean comparison interaction effect of chitosan and deficit irrigation on essential oil yield of *Mentha spicata* L. (C: Control, Ch1: 50 mg.l of Chitosan, Ch2: 100 mg.l of Chitosan)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد تنش کم‌آبیاری و کاربرد محلول‌پاشی با کیتوزان اثرات مثبتی بر میزان ترکیبات فنلی، پرولین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عملکرد اسانس داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان این صفات اکثراً در ۱۰۰ میلی‌گرم در

لیتر کیتوزان در شرایط کم‌آبیاری به‌دست آمد. همچنین درصد و عملکرد اسانس تحت تأثیر تیمارها افزایش چشمگیری داشت و بالاترین میزان درصد و عملکرد اسانس در تیمار سطح یک کیتوزان با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط کم‌آبیاری مشاهده شد. کمترین میزان این صفات در تیمار شاهد و با آبیاری نرمال حاصل شد. به‌طورکلی محلول‌پاشی با کیتوزان اثرات مثبتی بر صفات فیزیولوژیکی و همچنین مقاومت به تنش خشکی در گیاه نعناع *Mentha spicata* L. داشت. سازگاری زیستی بالا، سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری کیتوزان و همچنین نقش حفاظتی که برای گیاهان ایفا می‌کند اهمیت اقتصادی و زیست‌محیطی استفاده از این ماده را نشان می‌دهد. بنابراین کیتوزان به‌عنوان یک الیسیتور زیستی برای دستیابی به محصولات سالم‌تر در شرایط کم‌آبی و کاهش مصرف مواد شیمیایی توصیه می‌گردد.

REFERENCES

1. Afsharmohammdian, M., Ghanati, F., Ahmadiani, S. & Sadrzamani, K. (2016). Effect of Drought Stress on the Activity of Antioxidant Enzymes and Soluble Sugars content of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Nova Biologica Reperta*, 3 (3), 228-237. (in Farsi)
2. Alizadeh Ahmad Abadi, A., Khorasani Nejad, S. & Hemmati, Kh. (2018). Effect of deficit irrigation and acidic stress on morphological and phytochemical characteristics of *Echinacea purpurea*. *Journal of Crops Improvement*, 19 (1), 1-14. (in Farsi)
3. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24 (1), 1.
4. Arazmjo, A., Heidari, M., Ghanbari, A., Siahsar, B. & Ahmadian, A. (2010). Effects of three types of fertilizers on essential oil, photosynthetic pigments, and osmoregulators in chamomile under drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12 (2), 100-111. (in Farsi)
5. Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A. & Flamini, G. (2018). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18 (1), 201.
6. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39 (1), 205-207.
7. Begaa, S., Messaoudi, M., Ouanezar, A., Hamidatou, L., & Malki, A. (2018). Chemical elements of Algerian *Mentha spicata* L. used in the treatment of digestive system disorders by employing instrumental neutron activation analysis technique. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 317 (2), 1107-1112.
8. Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., & Hashemi, M. (2017). 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.
9. Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S. & Nichols, E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 107 (3), 167-175.
10. Chrysargyris, A., Xylia, P., Botsaris, G. & Tzortzakis, N. (2017). Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, 103, 202-212.
11. Cassel, D. K. & Nielsen, D. R. (1986). Field capacity and available water capacity. *Methods of Soil Analysis: Part 1-Physical and Mineralogical Methods*, (methodsofsoilan1), 901-926.
12. Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, I., Demasi, S., Lovisolo, C. & Scariot, V. (2018). Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products*, 129, 85-96.
13. De Pinedo, A. T., Penalver, P., Perez-Victoria, I., Rondon, D. & Morales, J. C. (2007). Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food Chemistry*, 105(2), 657-665.
14. Esmaeilzadeh-Bahabadi, S., & Sharifi, M. (2013). The increasing of secondary metabolites in plant with use of biological elicitors. *Cell & Tissue Journal*, 4, 119-128. (in Farsi)
15. Gorgini Shabankareh, H., Saedi, F., Sabouri, F. and Asgharipour, M. (2015). Effect of drought stress on growth indices, relative water content and essential oil percentage in pepper mint (*Mentha piperita* L.). *1st National Conference on Herbs and Herbal Medicine*. (in Farsi)
16. 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 (12), 909-930.

17. Hussain, M., Farooq, S., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M. & Nawaz, A. (2018). Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. *Agricultural Water Management*, 201, 152-166.
18. Fabriki-Ourang, S. & Davoodnia, B. (2018). Changes in growth characteristics and secondary metabolites in Thymus vulgaris L. under moderate salinity and drought shocks. *Ecophytochemical Journal of Medical Plants*, 2 (22), 27-39. (in Farsi)
19. Heidari, N., Pouryousef, M., Tavakkoli, A. & Saba, J. (2012). Effect of drought stress and harvesting date on yield and essential oil production of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28 (1), 121-130. (in Farsi)
20. Jabbari H., Akbari A., Khosh kholgh Sima, N A., Alahdadi, I., Shirani rad, A H., Tabatabaee, S A. & A, Hamed. (2014). Comparison of antioxidant enzymes and proline roles in drought tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Oil Plants Production*, 3 (1), 15-31.
21. Khalid, K. A. (2006). Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics*, 20 (4), 289-296.
22. Lawlor, D. W. & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 25 (2), 275-294.
23. Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y. & Yang, R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71 (2), 174-183.
24. Mahdavi, B., Moddares Sanavi, A., Agha Alikhani, M., Sharifi, M. & Alavi Asl, A. (2014). The effect of chitosan foliar application on growth and biochemical characteristics of *Carthamus* under water stress conditions (*Carthamus tinctorius* L.). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12(2), 229-236. (in Farsi)
25. Mandoulakani, B. A., Eyvazpour, E. & Ghadimzadeh, M. (2017). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 139, 1-7.
26. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.
27. Naderi S, Esmaeilzadeh Bahabadi S. & Fakheri B. (2015). The effect of chitosan on some physiological and biochemictry characterization in basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Process and Function*, 4 (12), 29-41.
28. Nxele, X., Klein, A. & Ndimba, B. K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, *108*, 261-266.
29. Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G. & Passam, H. C. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, 115 (4), 393-397.
30. Raie, M., Asnoashari, M. & Khodayari, M. (2016). Non-allergic elicitors and biotechnology of medicinal herbs. *Cell & Tissue Journal (Cell & Tissue Journal)*, 7 (4), 333-342. (in Farsi)
31. Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30 (1), 105-111.
32. Ruiz Ruiz, J. C., Moguel Ordonez, Y. B., Basto, A. M. & Segura Campos, M, R. (2015). Antioxidant capacity of leaf extracts from two Stevia rebaudiana Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 1163-1170.
33. Sedaqat, F., Yousef Zadi, M., Tuyserkani, H. & Najafipoor, S. (2016). Microbial deproteinization of the shellfish scavengue of the Pheuos-Morguanise shrimp with the aim of secretion of chitin. *Biology of Micro Organisms*, 5 (18), 141-152.
34. Salimgandomi, S., & Shabrangi, A. (2016). The effect of Chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. *Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*, *4*(2), 135-142.
35. Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. & De Feo, V. (2015). Mentha spicata essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of Vibrio spp. strains. *Molecules*, 20 (8), 14402-14424.
36. Taheri, F., Dahmardeh, M., Salari, M. & Bagheri, R. (2015). Effect of chitosan foliar application on some morphological traits and enzyme activity of peroxidase in Ajowan (*Carum copticum* L.) under drought stress. *1st National Conference on Herbs and Herbal Medicin*. May 28. (In Farsi)
37. Tatrai, Z. A., Sanoubar, R., Pluhar, Z., Mancarella, S., Orsini, F. & Gianquinto, G. (2016). Morphological and physiological plant responses to drought stress in Thymus citriodorus. *International Journal of Agronomy*.

38. Yadollahi Dehchecsme, P., Bagheri, A., Amiri, A. & 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), 83-73. (in Farsi)
39. Yin, H., Fretté, X. C., Christensen, L. P. & Grevsen, K. (2011). Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. hirtum). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (1), 136-143.
40. Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagon, D., Arbona, V. & Gomez-Cadenas, A. (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162 (1), 2-12.
41. Złotek, U., Michalak-Majewska, M. & Szymanowska, U. (2016). Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*, 213, 1-7.