اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

محمد مهرگان[1]، علی مهرآفرین[2]، محمدرضا لبافی[2]*، حسنعلی نقدی‌بادی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، صندوق‌پستی: ۱۳۶۹ - ۳۱۳۷۵
تلفن: ۱۹-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: Mohammad1700@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۱۰/۲۹

چکیده

مقدمه: کیتوزان از پلی‌ساکاریدهای نیتروژن‌دار است که با واکنش استیل‌زدای کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود و به عنوان یکی از محرک‌های زیستی کارآمد برای در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی زیادی تأیید شده است.

هدف: بررسی اثر غلظت‌های مختلف محرک‌زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوماس رویشی و متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا.

روش بررسی: آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای با تیمار کیتوزان، در چهار سطح شامل ۰، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد انجام شد.

نتایج: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، که محلول‌پاشی محرک‌زیستی کیتوزان اثر معنی‌داری بر وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی، طول برگ ($P<0/05$)، فنل و ربادیوزید A ($P<0/01$) داشته است. کیتوزان در سطح ۰/۱ درصد بیشترین وزن تر و خشک ساقه، برگ و اندام هوایی را تولید نمود، به طوری که با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۱ به ۰/۲ درصد این صفات کاهش یافت. بیشترین میزان فنل در غلظت ۰/۱ درصد کیتوزان مشاهده شد، همچنین در این آزمایش کیتوزان با غلظت ۰/۲ درصد بیشترین تاثیر را بر ربادیوزید A داشته است.

نتیجه‌گیری: محلول‌پاشی کیتوزان سبب بهبود خصوصیات بیوماس رویشی و صفات بیوشیمیایی مانند ربادیوزید A گیاه استویا شده است.

گل‌واژگان: *Stevia rebaudiana* Bertoni، ربادیوزید A، محرک زیستی

مقدمه

گیاه شیرین برگ یا استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni گیاهی علفی و چندساله متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) می‌باشد [۱]، که از رستنی‌های بومی کشور پاراگوئه و همچنین نقاط مرزی کشور برزیل با پاراگوئه در نواحی آمریکای جنوبی است [۲]. برگ‌های استویا ۳۰۰ – ۲۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز هستند و با وجود مزه بسیار شیرین، جذب بدن نمی‌شود [۴، ۳]. تاکنون بیش از ۱۰۰ ترکیب شیمیایی مختلف در گونه استویا شناسایی شده است که در این میان دی‌ترپنوئیدها معروف‌ترین ترکیبات شناخته شده هستند که از ارزش بالایی نیز برخوردار می‌باشند. در برگ‌های گیاه استویا، ترکیبی از ده گلیکوزید مشتق شده از دی‌ترپن چهار حلقه‌ای استویول تجمع یافته است [۵]. برگ‌ها حاوی ترکیبات استویوزید، ربادیوزید A، B، C، D، E، F، دایکوزید A (Dulcoside A)، استویول‌بیوزید (Steviolbioside) و روبوزوزاید (Rubusoside) می‌باشند [۶] و در بین گلیکوزیدهای دی‌ترپنوئید استویوزید و ربادیوزید A از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد [۷]. مقدار گلیکوزیدهای استویول در استویا به عوامل متعددی وابسته است و ممکن است به ۲۰ درصد وزن خشک برگ برسد در مجموع دامنه غلظت کل گلیکوزیدهای استویول حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد وزن خشک گزارش شده است [۵].

روش‌های متعددی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود [۸]. کیتوزان به عنوان یکی از الیسیتورهای زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی زیادی تأیید شده است [۹]. کیتوزان با فرمول شیمیایی $(C_6H_{11}O_4N)$ n از پلی‌ساکاریدهای نیتروژن‌دار است که با واکنش استیل‌زدای کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود [۱۰] این پلی‌ساکارید به طور برجسته در پوسته سخت‌پوستانی مانند خرچنگ، میگو، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود [۱۱]. کیتوزان کاربردهای بسیاری در کشاورزی دارد. به دلیل خاصیت ضدمیکروبی که در مقابل گستره وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها دارد [۱۲] و در جهت ایجاد یک پوشش نازک روی خوراکی‌هایی نظیر میوه و سبزیجات که به صورت یک فیلم محافظ ضدباکتری و ضدقارچ مانع از فساد محصولات کشاورزی می‌شود [۱۳] و با فعال نمودن تعدادی از آنزیم‌های نظیر فیتواکسین و کیتینازها مقاوت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش داده و صدمات ناشی از آنها را کاهش می‌دهد [۱۴]. کیتوزان می‌تواند رادیکال‌های OH و O_2 را از بین ببرد و گفته شده است که خاصیت محافظت از DNA را دارد [۱۵] و تنش‌های محیطی حاصل از خشکی و خاک را کاهش دهد [۱۶] محلول‌پاشی کیتوزان هدایت روزنه‌ای را افزایش می‌دهد و باعث کاهش تعرق، بدون تأثیر در ارتفاع بوته، طول ریشه، سطح برگ و یا زیست‌توده گیاهی می‌شود [۱۷]. کیتوزان با تشکیل یک غشا نیمه تراوا، تبادلات گازی را تنظیم کرده و تعرق را کاهش می‌دهد و در نتیجه رسیدن میوه را به تأخیر می‌اندازد [۱۸].

با توجه به اثرات مثبت استفاده از محلول‌پاشی کیتوزان برای حصول اهداف موردنظر، مطالعه و شناخت اثر محلول‌پاشی محرک زیستی کیتوزان بر عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی مهم نظیر گیاه استویا اهمیت ویژه در پژوهش‌های کشاورزی پایدار دارد. با وجودی که برخی شواهد حاکی از بهبود کیفیت محصولات گیاهی به وسیله استفاده از محلول‌پاشی کیتوزان بوده است، اما مطالعات مربوط به تولید این گونه محصولات، بخصوص گیاهان دارویی در ایران و سایر کشورها چندان مورد توجه و مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین شناخت تأثیر محلول‌های کیتوزان جهت ارزیابی عملکرد کمّی و کیفی گیاهان دارویی بخصوص گیاه استویا در نظام‌های پایدار و تعیین شرایط بهینه کشت آنها نیازمند مطالعه و تحقیق است. به طور کلی هدف از اجرای این پژوهش علاوه بر افزایش عملکرد رویشی، افزایش عملکرد شیمیایی و بهبود خصوصیات دارویی و تغذیه‌ای گیاه استویا تحت القای کاربرد محرک‌زیستی کیتوزان بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی آزمایشی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۴ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در هلجرد کرج انجام شد که در این آزمایش محرک زیستی کیتوزان در ۴ سطح (۰، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت.

واحدهای آزمایشی شامل گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۲ سانتی‌متر به همراه زهکش مناسب جهت جلوگیری از تجمع آب در ته گلدان با خاک الک شده و یکنواخت شامل خاک باغچه، رس و ماسه به نسبت مساوی پر شد. سپس در هر گلدان ۲ نشای یکسان و هم‌اندازه استویا کشت شد. گلدان‌ها تا استقرار کامل نشاها به صورت یک روز درمیان و با آب معمولی آبیاری شدند. به منظور استقرار کامل گیاهان و اعمال تیمارها پس از گذشت ۷۰ روز از کاشت تیمارهای محلول پاشی کیتوزان انجام شد. تیمارهای محلول‌پاشی کیتوزان در ساعت اولیه روز و طی سه دوره به فاصله یک روز درمیان به صورت برگی به نحوی که سطح برگ مرطوب شود، انجام شد و برای تهیه محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) با وزن مولکولی پایین از اسید استیک جهت حلال و از آب مقطر برای رقیق کردن استفاده شد. با توجه به این که بهترین زمان محلول‌پاشی بوته‌ها ساعت اولیه روز می‌باشد، همه تیمارها در این زمان به صورت یکسان اعمال شد. در پایان این مرحله وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، شاخص سبزینگی برگ (SPAD)، طول و عرض برگ، تعداد برگ، ارتفاع بوته و صفات شیمیایی شامل فنل و ربادیوزید A اندازه‌گیری شد.

شاخص سبزینگی برگ (SDAD)

سبزینگی برگ‌ها با استفاده از دستگاه SPAD مدل KONICA MINOLTA-502 پس از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شد. این دستگاه بدون آسیب به ساختار برگ میزان سبزینگی برگ را اندازه‌گیری کرده و به صورت عدد نمایش می‌دهد.

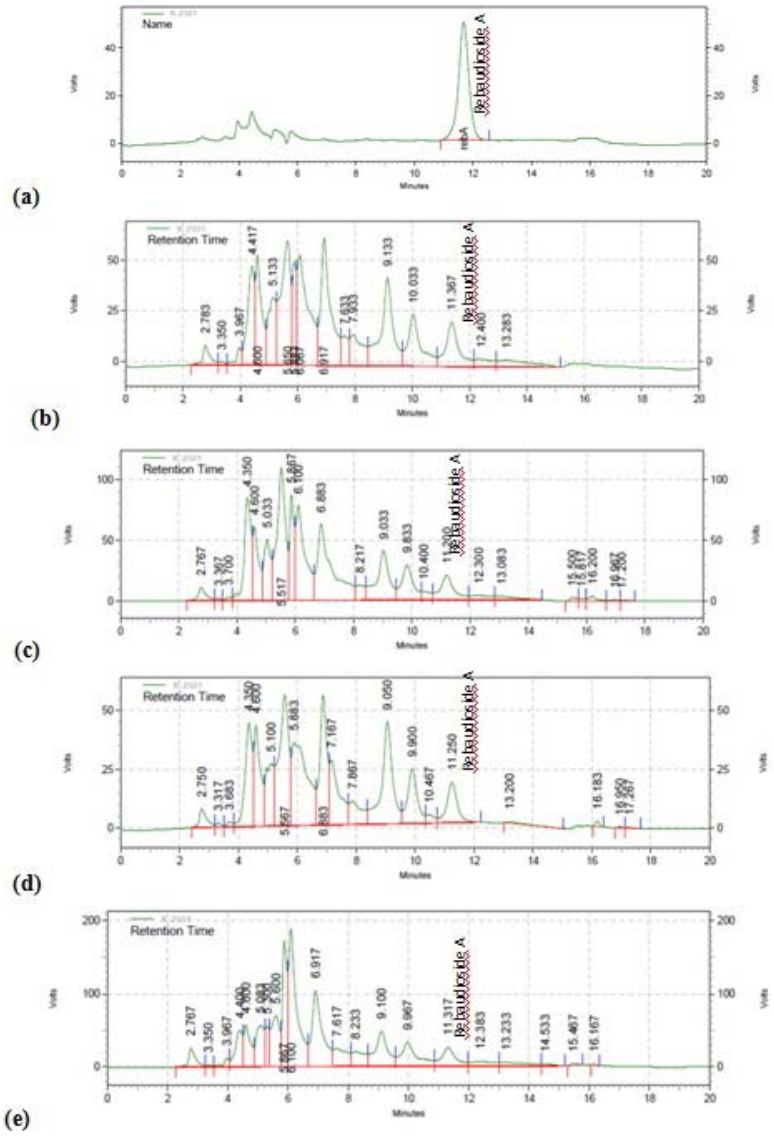
اندازه‌گیری ربادیوزید A به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography) (HPLC)

به منظور اندازه‌گیری و ربادیوزید A ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ خشک گیاه را در هاون چینی ساییده و مقدار ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط ۷ حجم آب و ۳ حجم استونیتریل به آن افزوده و ورتکس شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اولتراسونیک استخراج انجام گرفت و در پایان به مدت چهار دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی به نسبت ۱ به ۱۰ با فاز متحرک HPLC رقیق شد و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ µm جهت آنالیز HPLC مورد استفاده قرار گرفت (استاندارد ملی ایران، ۱۶۸۷۸). در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جداسازی بر پایه تفاوت قطبیت ماده مورد جداسازی در دو فاز ساکن و متحرک انجام می‌شود. محلول استاندارد ربودیوزید A سیگما به شماره ۰۱۴۳۲ برای اندازه‌گیری میزان ربودیوزید A مورد استفاده قرار گرفت. فاز ساکن ستون‌های HPLC از جنس فولاد ضدزنگ یا شیشه و فاز متحرک ترکیبی از حلال‌های قطبی (الکل) و غیرقطبی (هیدروکربن) می‌باشد و با تغییر حلال‌های (قطبیت) فاز متحرک، اجزای نمونه از هم جدا می‌شود. دستگاه HPLC مورد استفاده در این آزمایش از HPLC مدل KNAUER، نوع ستون LICHROSPHER 100 NH2 5µm 25×0.46 cm، مدل پمپ [KNAUER- K1001]، مدل دتکتور [KNAUER-UV K2501)] 210 nm، سرعت جریان 1 ml/min و فاز متحرک آب با درجه HPLC- استونیتریل با درجه HPLC (۸۰/۲۰) می‌باشد (شکل شماره ۱).

تعیین فنل کل به روش فولین سیو- کالتیو (Folin-Ciocalteau)

به منظور اندازه‌گیری فنل تام ۰/۱ گرم از بافت برگ خشک

شده گیاه در هاون چینی ساییده و پس از اضافه کردن ۲۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار گرفت. سپس عصاره توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک، صاف شد. ۰/۵ سی‌سی عصاره به همراه ۰/۵ سی‌سی واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سی و کالتیو و ۲/۵ سی‌سی سدیم کربنات ۲۰ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر با هم ترکیب شد. نمونه‌ها پس از یک ساعت تاریکی در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV-2601 (RAYLEIGH) در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر فنل تام عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک در گرم عصاره اندازه‌گیری شد [۱۹].

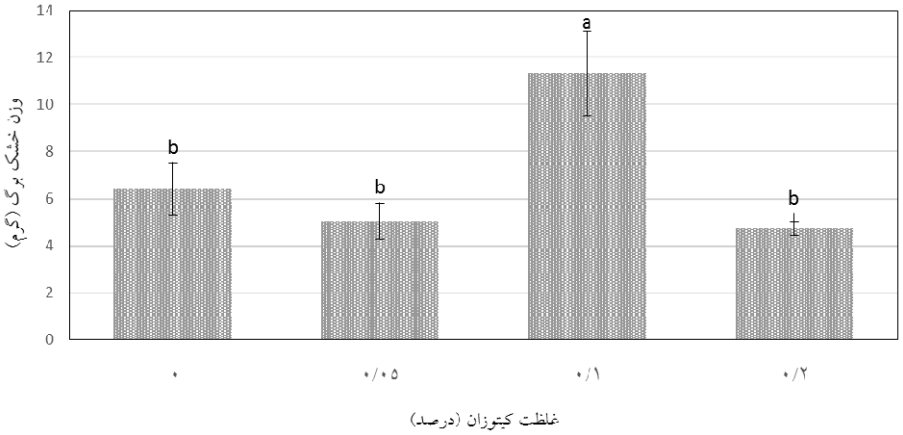


شکل شماره ۱- کروماتوگرام گلیکوزید ربادیوزید تحت تیمارهای محلول‌پاشی کیتوزان در گیاه استویا. شکل (a): استاندارد ربادیوزید A. شکل (b): محلول‌پاشی کیتوزان در غلظت صفر. شکل (c): محلول‌پاشی کیتوزان در غلظت ۰/۰۵ درصد. شکل (d): محلول‌پاشی کیتوزان در غلظت ۰/۱ درصد و شکل (e): محلول‌پاشی کیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد

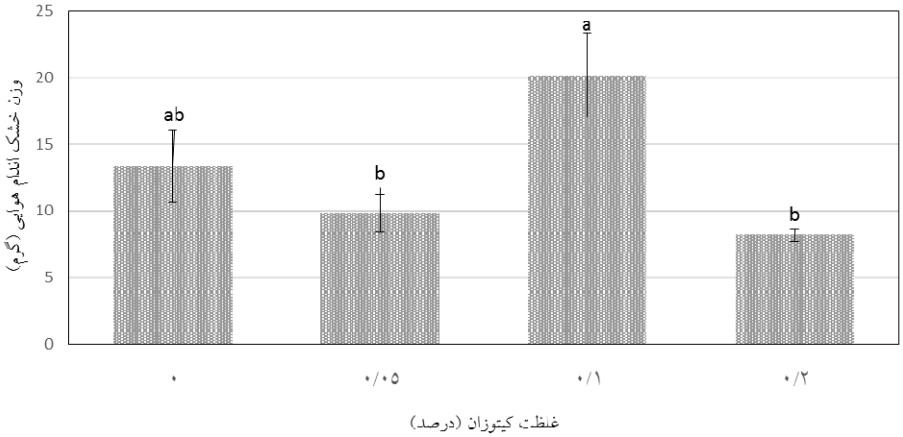
نتایج

تأثیر کیتوزان بر صفات مورفوفیزیولوژیکی

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها محلول‌پاشی محرک زیستی کیتوزان بر وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی (P<۰/۰۵) اثر معنی‌داری داشته (جدول شماره ۱) و بر صفات وزن تر برگ و اندام هوایی و وزن تر و خشک ساقه معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱). در این پژوهش بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها محلول‌پاشی کیتوزان در سطح ۰/۱ درصد بیشترین وزن خشک برگ و اندام هوایی را تولید نمود، به طوری که با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۱ به ۰/۲ درصد این صفات کاهش یافت (شکل شماره‌های ۲ و ۳).



شکل شماره ۲- اثر غلظت‌های کیتوزان بر وزن خشک برگ



شکل شماره ۳- اثر غلظت‌های کیتوزان بر وزن خشک اندام هوایی

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس اثر محرک زیستی کیتوزان بر صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه دارویی استویا

منابع تغییر	درجه آزادی	شاخص سبزینگی برگ SPAD	ارتفاع بوته	وزن تر ساقه	وزن خشک ساقه	تعداد برگ در بوته	وزن تر برگ	وزن خشک برگ	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	طول برگ	عرض برگ
بلوک	۲	۳/۵۷ ns	۷۶/۶ ns	۱۱/۹۹ ns	۰/۰۵ ns	۰/۱۵ ns	۱۳۸/۴۳ ns	۵/۵۹ ns	۱/۴۸ ns	۱۳/۲۴ ns	۹/۲۳ ns	۰/۱۴ ns	۲۱/۵۶ ns	۲/۰۴ ns
کیتوزان	۳	۳/۱۹ ns	۷۹/۳۱ ns	۷۴/۵۱ ns	۰/۶۴ ns	۱۱/۰۳ ns	۲۶۶/۹۴ ns	۲۸/۰۳*	۴/۷۶ ns	۸۴/۶۳۶*	۲۹/۱۱ ns	۰/۶۹ ns	۷۰۲/۱*	۳۴/۷۳ ns
خطا	۶	۱/۳۷	۱۴۰/۳۸	۲۸/۴۴	۰/۱۶	۵/۴۱	۲۶/۴۸	۳/۲۲	۱/۰۵	۱۵/۳۳	۶/۸۶	۰/۱۹	۱۰۱/۳۲	۱۲/۳۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۳/۴۳	۱۳/۸۶	۲۶/۷۲	۱۶/۳۶	۱۷/۷۹	۲۷/۸۴	۲۶/۱۱	۱۴/۵۵	۳۰/۳۴	۲۹/۸۶	۲۲/۶۹	۱۴/۰۸	۱۴/۳۴

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. * معنی‌دار سطح احتمال ۵ درصد. ns معنی‌دار نمی‌باشد.

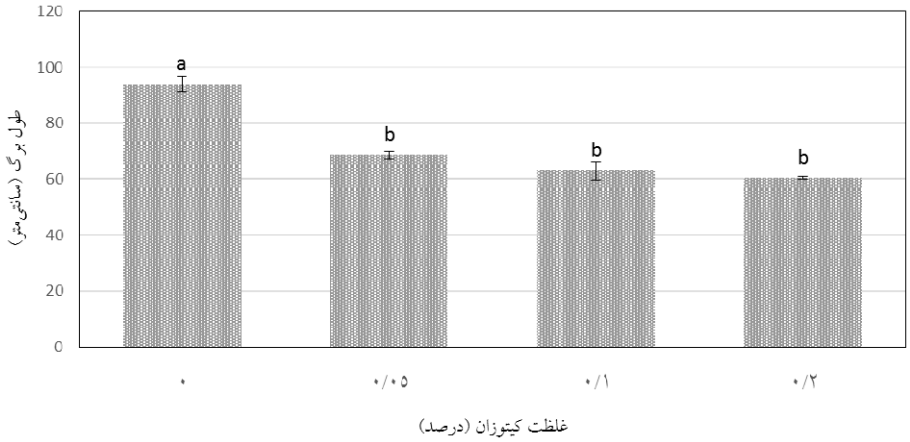
بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های محلول‌پاشی محرک زیستی کیتوزان بر طول برگ (P<۰/۰۵) اثر معنی‌داری داشته و بر صفات عرض برگ، وزن تر و خشک ریشه معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱) و در این آزمایش بر اساس مقایسه مینگین داده‌ها، تیمار شاهد بیشترین تأثیر را بر طول برگ داشته است (شکل شماره ۴).

تأثیر کیتوزان بر فنل

در این پژوهش نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که محلول‌پاشی کیتوزان اثر معنی‌داری بر فنل (P<۰/۰۱) داشته است (جدول شماره ۲) و بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین میزان فنل در غلظت ۰/۱ درصد کیتوزان مشاهده شد (شکل شماره ۵).

تأثیر کیتوزان بر ربادیوزید A

در این پژوهش نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محلول‌پاشی کیتوزان اثر معنی‌داری بر ربادیوزید A (P<۰/۰۱) داشته است (جدول شماره ۲) به طوری که بر اساس مقایسه میانگین داده‌های آزمایش محلول‌پاشی کیتوزان با غلظت ۰/۲ درصد بیشترین تأثیر را بر ربادیوزید A داشته است (شکل شماره ۶).

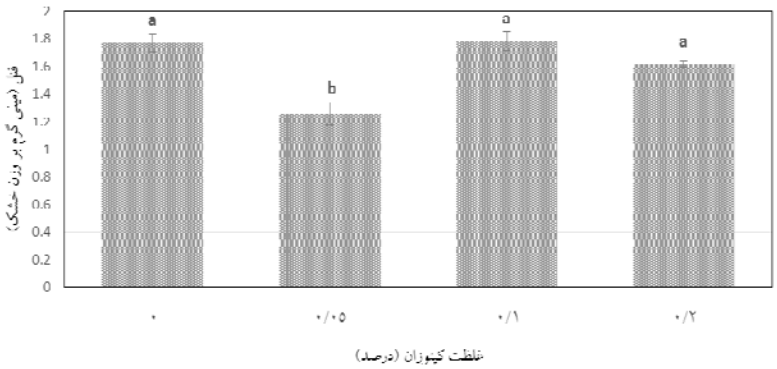


شکل شماره ۴- اثر غلظت‌های کیتوزان بر طول برگ

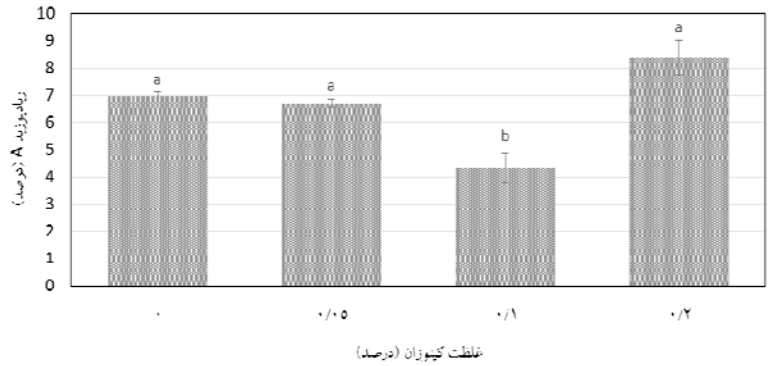
جدول شماره ۲- تجزیه واریانس اثر محرک زیستی کیتوزان بر صفات بیوشیمیایی گیاه دارویی استویا

منابع تغییر	درجه آزادی	ربادیوزید A	فنول
بلوک	۲	۰/۱۲ ns	۰/۰۰۴ ns
کیتوزان	۳	۸/۴۷**	۰/۱۸**
خطا	۶	۰/۷	۰/۰۱۵
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۲/۷۵	۷/۶۵

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. *معنی‌دار سطح احتمال ۵ درصد. ns معنی‌دار نمی‌باشد



شکل شماره ۵- اثر غلظت‌های کیتوزان بر فنل



شکل شماره ۶- اثر غلظت‌های کیتوزان بر ربادیوزید A

بحث

تأثیر کیتوزان بر صفات مورفوفیزیولوژیکی

محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش رشد رویشی در گیاه کلم [۲۰]، ذرت [۲۱]، لوبیا [۲۲] و افزایش وزن خشک اندام هوایی در گیاه گلرنگ شد، [۲۳] شده است. کاربرد برگی کیتوزان بر رشد و ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) تأثیر گذاشته و به عنوان عامل مثبتی در بسیاری از ویژگی‌های مورفولوژیکی و رشد (ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی) مؤثر است [۲۴]، همچنین در پژوهش دیگر که بر روی گیاه گوجه‌فرنگی صورت گرفت محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش تعداد شاخه، تعداد برگ، وزن خشک برگ و اندام هوایی شد [۲۵] و در تحقیقات مشابه که بر روی گیاه توت‌فرنگی و برنج انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش وزن تر و خشک برگ شده است [۲۶-۲۱]. کاربرد برگی کیتوزان باعث افزایش وزن خشک برگ و اندام هوایی در گیاه فلفل دلمه‌ای شده است [۲۷]. به تازگی گزارش شده است که کیتوزان باعث رشد، توسعه سلولی و در نتیجه افزایش عملکرد در گیاه می‌شود، کیتوزان با استفاده از افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن (نیترات‌ردکتاز، گلوتامین و پروتئازسنتتاز) و بهبود انتقال نیتروژن باعث توسعه و رشد می‌شود [۲۸]. طبق بررسی‌های صورت گرفته اسپری کیتوزان محتوای اسیدآبسزیک را در برگ‌ها افزایش می‌دهد [۲۹]، محققین در پژوهشی دیگر دریافتند که کاربرد ۰/۵ درصد کیتوزان بر روی رشد و عملکرد تربچه تأثیر گذاشته و باعث افزایش سطح برگ و وزن خشک گیاه می‌شود [۳۰]، همچنین محلول‌پاشی کیتوزان هدایت روزنه‌ای را افزایش می‌دهد و باعث کاهش تعرق، بدون تأثیر در ارتفاع بوته، طول ریشه، سطح برگ و یا زیست‌توده گیاهی می‌شود [۱۷]. تا به حال سازوکار عمل کیتوزان روی رشد ناشناخته باقی مانده است. احتمالاً کیتوزان سیگنالی را

برای سنتز هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین القاء می‌کند و رشد و نمو گیاه را توسط بعضی مسیرهای سیگنالینگ مربوط به بیوسنتز اکسین، از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان، افزایش دهد [۲۴]. محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش سطح برگ گیاه گلرنگ در شرایط بدون تنش نسبت به تیمار شاهد شد [۳۱]، در آزمایش دیگر از محلول‌پاشی کیتوزان در گیاه لوبیا نتایج مشابه حاصل گردید [۲۱]. کیتوزان در افزایش کلروفیل و فتوسنتز نقش دارد و علاوه بر این، کیتوزان بیان ژن کلروپلاست برگ را تحت تأثیر قرار می‌دهد به طوری که تغییر در اندازه کلروپلاست ممکن است عامل تحریک کننده رشد گیاهان باشد [۳۲]، همچنین در شرایط تنش کیتوزان از طریق افزایش محتوای نسبی آب برگ، منجر به حفظ تورژسانس و حجم برک می‌شود و از غشای سلولی را محافظت می‌کند [۳۳]. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش محلول‌پاشی محرک زیستی کیتوزان بر صفات ارتفاع بوته، تعداد برگ و شاخص سبزینگی برگ (SPAD) اثر معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۱).

تأثیر کیتوزان بر فنل

نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آنها است که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند [۳۴]. انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به عنوان یک علامت عمل کند و برای راه‌اندازی زنجیرهای از واکنش‌های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می‌شوند، عمل نماید [۳۵]. در پژوهشی که بر روی گیاه زنیان انجام شد محلول پاشی کیتوزان (۲۰۰ ppm) میزان ترکیبات فنلی را نسبت به شاهد افزایش داد [۳۶] و طبق تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت ترکیبات فنلی در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود [۳۷]. در پژوهشی دیگر مشخص شد که کاربرد برگی کیتوزان در گیاه چای و کتان سفید سبب افزایش قابل توجهی در محتوای فنلی برگ‌ها نسبت به تیمار شاهد شده است [۳۹، ۳۸]. مطالعات اخیر نشان داده است که کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی ممکن است دارای پتانسیل برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد [۴۱، ۴۰]. که باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی می‌شود [۴۲].

تأثیر کیتوزان بر ربادیوزید A

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کتین و کیتوزان، باعث تولید متابولیت‌های ثانویه [۴۳] و تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه می‌شود [۴۴]. کیتوزان به عنوان یک آمینو پلی‌ساکارید طبیعی با ساختاری بی‌نظیر و سمیت پایین [۴۵] باعث بیان انواع ژن‌های دخیل در پاسخ دفاعی گیاه در شرایط تنش شده که منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود [۴۶]. همچنین درخصوص الیسیتور کیتوزان می‌توان گفت که الیسیتورها ممکن است، ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی می‌کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند [۴۷]، در تحقیقاتی که بر روی گیاه زنیان و گلرنگ انجام شد میزان قندهای محلول تحت تأثیر تیمار کیتوزان قرار گرفت [۴۹، ۴۸]، همچنین در پژوهشی که بر روی گیاه بادرنجبویه صورت گرفت با افزایش غلظت کیتوزان میزان کربوهیدرات افزایش یافت [۵۰] و در بررسی دیگری که بر روی گیاه ریحان انجام شد کیتوزان از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، افزایش کربوهیدرات در ریشه و افزایش رشد شده است [۵۱]. در واقع با افزایش غلظت کیتوزان، تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلولی از قبیل تونوپلاست و آنزیم‌های مسیر متابولیسم قندها ایجاد می‌شود، که این نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی تحت تیمار کیتوزان می‌باشد و افزایش محتوای قند، تحت تیمار محلول‌پاشی کیتوزان مشاهده می‌شود که احتمالاً به دلیل هیدرولیز نشاسه و افزایش قندهای محلول حاصل از آن است [۵۲]، بر اساس نتایج به دست آمده این آزمایش نیز محلول‌پاشی کیتوزان باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش تأثیر کیتوزان بر شاخص‌های بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی در گیاه استویا را مورد بررسی قرار داد و بر اساس نتایج به دست آمده محلول‌پاشی کیتوزان با غلظت مناسب (۰/۰۵ تا ۰/۲ درصد) به عنوان یک محرک‌زیستی باعث بهبود در صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا شده است، همچنین بر اساس نتایج حاصل، کیتوزان از طریق تحریک ترکیبات شیمیایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی به عنوان یک محرک‌زیستی کارآمد در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا مانند ربادیوزید A تأثیر گذار می‌باشد.

منابع

1. David J Midmore. A new rural industry-Stevia-to replace imported chemical sweeteners. In: Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Web Publication No W02/022. 2002.

2. Soejarto D. Botany of Stevia and Stevia rebaudiana. In A. Kinghorn (Ed.), Stevia: The genus Stevia. London, New York: Taylor and Francis. 2002, pp: 18-39.

3. Buana L and Goenadi DH. A study on the correlation between growth and yield in Stevia. *Menara Perkebunan* 1985; 53 (3): 68-71.

4. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ and Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism Clinical and Experimental* 2004; 53: 73 - 6.

5. Starratt AN, Kirby CW, Pocs R and Brandle JE. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from Stevia rebaudiana. *Phytochem*. 2002; 59: 367 - 70.

6. Goyal SK and Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr*. 2010; 61: 1-10.

7. Adari Bhaskar Rao, Ernala Prasad, Goka Roopa and Sundergopal Sridhar. Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity. *Advances in Bioscience and Biotechnol.* 2012; 3: 327-35.

8. Zhao J, Davis LC and Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*. 2005; 23 (4): 283–333

9. Cheng X, Zhou U and Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in Cistanche deserticola cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Biotechnol. J*. 121: 253 - 60.

10. Pariser ER and Lombardi DP. A guide to the research literature chitin, Source book. Plenum Press. New York, U.S.A. 1988, p: 560.

11. Pichynagkura R and Kudan S. Quantitative production of 2-acetamido 2-deoxy-Dglucose from Cryatallin Chitin by Bactrial Chitinase. *Carbohydrate Res*. 2002; 337: 1-9.

12. Arriola OC, Rocha MC, Hernandez AB, Brauer JME and Jatomea MP. 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* 2013; 93 (7): 1525 - 36.

13. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G and Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Aplications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4 (5): 1457 - 65.

14. Agrawal G, Rakwal R, Tamogami S, Yonekurad M, Kubo A and Saji H. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves f *Oryza Sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochem*. 2002; 40: 1061-9.

15. Harish Prashanth KV, Dharmesh SM, Jagannatha Rao KS and Tharanathan RN. Free radical-induced chitosan depolymerized products

protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydrate Res*. 2007; 342: 190 - 5.

16. Luan L.Q., Ha. V.T.T., Nagasawa N, Kume T, Yoshii F and Nakanishi T.M. Biological effect of irradiated chitosan on plantsin vitro, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2005; 41: 49 - 57.

17. No HK, Young PN, Ho LS and Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. Food Microbiol*. 2002; 74: 65-72

18. Jiang Y and Li Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* 2001; 73: 139 - 43.

19. Wettasinghe M and Shahid F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem*. 1999; 67: 399 - 414.

20. Hirano S. The activation of plant cells and their self-defence function against pathogens in connection with Chitosan. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1988; 62: 293-295 (in Japanese with English summery).

21. Sheikha SAAK and AL-Malki FM. Growth and chlorophyll responses of bean plants to the chitosan applications. *Eur. J. Sci. Res*. 2011; 50: 124 - 34.

22. Guan Y.J., J. Hu, X.J. Wang and C.X. Shao. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J. Zhejiang Univ. Sci*. 2009; 10 (6): 427 - 33.

23. Mahdavi B, Modares Sani AM, AghaAlikhani M and Sharifi M. The effect of chitosan and water stress on morphological characteristics and root characteristics of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Agriculture and Plant Breeding Science Eleventh Congress. 2010.

24. Hussaini Begum M, Taheri GH, Vaezi Kakhaki MR and Tlaty M. Foliar application of chitosan on growth and morphological characteristics of marigold (*Calendula officinalis*). National Conference of passive defense in the agricultural sector. 2013 November 30.

25. El-Tantawy E.M. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2009; 12 (17): 1164 - 73.

26. Abdel-Mawgoud AMR, Tantawy AS, El-Nemr MA and Sassine YN. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. *European Journal of Scientific Res*. 2010; 39 (1): 161-8.

27. Ghoname A.A, M. A. El-Nemr, A. M. R Abdel-Mawgoud and W. A. El-Tohamy. Enhancement of Sweet Pepper crop growth and production by application of biological, organic and nutritional solutions. *Research J. Agric. Bio. Sci*. 2010; 6 (3): 349 - 355.

28. Mondal MA, Malek MA, Puteh AB, Ismail MR, Ashrafuzzaman M and Naher L. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Science. 2012; 6(5): 918-921

29. Qin CH, Xiao Q, Liu Y, Zhu J and Du Y. Water-Solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 2006; 63: 367-74.

30. Chibu H, Shibayama H and Susuma A. Effects of Chitosan Application on the Shoot Growth of Rice and Soybean. *Japanese Journal of Crop Science*. 2001; 71 (2): 206 - 11.

31. Mahdavi B, ModarresSanavy S.A.M., Aghaalikhani M and Sharifi M. Effect of water stress and chitosan on Germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Crop Improvement* 2011; 25: 728 - 41.

32. Limpanavech P, Chaiyasuta S, Vongpromek R, Pichyangkura R, Khunwasi C, Chadchanwan S, Lotrakul P, Bunjongrat R, Chaidee A and Bangyeekhun T. Effect of chitosan on floral production, gene expression and anatomical changes in the Dendrobium orchid. *Science Horticulture* 2008; 116: 65 - 72.

33. Mahdavi B and Rahimi A. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian J. Biosci*. 2013; 7: 69 - 76.

34. Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP and Vivanco JM. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 2002; 50: 5878 - 83.

35. Anderson OM and Jordheim M. The anthocyanins. In: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications (eds. Anderson, O. M. and Markham, K. R.) CRC Press, London. 2005, pp: 471-553.

36. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud*. 2006; 15 (4): 523 - 30.

37. Liu J, Tian S, Meng X and Xu Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Journal of Postharvest Biology. Technol*. 2007; 44: 300 - 6.

38. Palida S, Rath P and Supachitra C. Chitosan Increased Phenolic Compound Contents in Tea (*Camellia sinensis*) Leaves by Pre- and Post-Treatments. *Journal of Chitin and Chitosan Science* 2014; 2 (2): 93 - 8.

39. Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safaie N and Behmanesh M. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. 26. Plant Biology, Issue XI, 2012, page 13.

40. Kim KW and Thomas RL. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Journal of Food Chem*. 2007; 101: 308-13.

41. Yen MT, Yang JH and Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74: 840 - 4.

42. Esmailzadeh Bahabadi S, Naderi S and Fakheri B. Increasing of Chavicol o-Methyl Transfrase Gene Expression nd Catalase and Ascorbate Peroxidase Enzymes Activity of Ocimum basilicum by Chitosan. *Journal of Crop Biotechnol*. 2014; 6: 1 - 9.

43. Cheng X, Zhou U and Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in Cistanchedeserticolacell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnol*. 2006; 121: 253 - 60.

44. Zhao J, Davis L.C. and Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Journal of Biotechnology Advances* 2005; 23: 283 - 333.

45. Jayakumar R, New N, Tokura S and Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 40 (3): 175 - 81.

46. Howlett B. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic Fungi. *Curr Opin. in Plant Biol*. 2006; 9: 371 - 5

47. Zhang Y, Mian MR and Bouton J.H. Recent Molecular and Genomic Studies on Stress Tolerance of Forage and Turf Grasses. *Crop Sci.* 2006; 46: 497 - 511.

48. Naderi S, Fakheri B and Seraje M. Bio-stimulant effect of chitosan on some physiological and biochemical indices of Carum copticum (*Carum copticum* L.). *Crop Sciences Research in the Dry Areas* 2014; 1 (2): 187 - 201.

49. Mahdavi B, ModarresSanavy S.A.M., Aghaalikhani M and Sharifi M. Effect of water stress and chitosan on Germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Crop Improvement* 2011; 25: 728 - 41.

50. Khajeh H and Naderi S. The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activity and biochemictry characterization in Melissa (*Melissa officinalis*). *Crop Science Research in Arid Regions* 2014; 1: 100 - 116. (In Persian)

51. Naderi S, Fakheri B and Esma'ilzadeh Bahabadi S. Chavicole methyltransferase gene expression and activity of catalase and ascorbate

peroxidase -o plant (*Ocimum basilicum* L.) under chitosan. *Journal of Plant Biotechnology Crops* 2014; (6): 1-9.

52. Kovacik J, Backor M, Strnad M and Repcak M. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Report* 2009; 28: 135 - 43.

Effect of Different Concentrations of Chitosan Biostimulant on Biochemical and Morphophysiological Traits of Stevia Plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Mehregan M (M.Sc. Student)[1], Mehrafarin A (Ph.D.)[2], Labbafi M.R (Ph.D.)[2*], Naghdi Badi H (Ph.D.)[2]

1- Department of Aromatic Plants, Azad University of Tehran, Science and Research Branch
2- Medicinal Plants Research Centre, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Institute of Medicinal Plants, Research Complex of Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR)
P.O.Box: (Mehr Villa): 31375-369 Karaj, Iran
Tel: +98-26-34764010-9, Fax: +98-26-34764021
Email: Mohammad1700@yahoo.com

Abstract

Introduction: Chitosan is one of the polysaccharides containing nitrogen which is synthesized naturally by deacetylation reaction of chitin and is confirmed as one of the efficient biostimulants for improvement of secondary metabolites production in medicinal plants.

Objective: To evaluate the effect of different concentrations of chitosan biostimulant on vegetative biomass traits and secondary metabolites of Stevia plant.

Methods: The experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications in greenhouse conditions. The treatments were spraying of chitosan in four levels (0.05, 0.1 and 0.2 percent) and control treatment (spraying with distilled water).

Results: In this study, the obtained results of variance analysis showed that spraying of chitosan had significant effect on leaf dry weight, shoot dry weight, leaf length ($P < 0.05$), phenols and rebaudiosides A ($P < 0.01$). In this experiment, the highest fresh and dry weight of stems, leaves and shoots were observed at 0.1% Chitosan in a way that by increasing the chitosan concentration from 0.1 to 0.2 % the decreasing trend occurred. The highest amount of phenol was recorded at 0.1% concentration. Also, chitosan at 0.2% concentration had the maximum impact on rebaudiosides A.

Conclusion: Chitosan spraying improved vegetative biomass traits and biochemical parameters such as rebaudiosides A in stevia plant.

Keywords: ***Stevia rebaudiana* Bertoni, Biostimulants, Rebaudiosides A**