

بررسی واکنش‌های فیزیولوژیک دو گونه گیاه داروئی مرزنجوش به محلول پاشی کیتوزان تحت شرایط تنش کم آبی

لیلا آقائی‌دیج^۱، حمید محمدی^{۲*}، احمد آقایی^۳

۱. دانش‌آموخته آگروتکنولوژی، فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۲. دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۳. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه مراغه

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: پارامترهای فیزیولوژیک تنش کم آبی کیتوزان گونه مرزنجوش	مرزنجوش یکی از مهم‌ترین گیاهان داروئی در جهان است که به دلیل اهمیت اقتصادی، کمیت و کیفیت اسانس بسیار شناخته شده است. تنش خشکی جزو تنش‌های غیرزیستی است که در صورت بروز، موجب خسارت‌های متعدد به گیاهان می‌شود. کیتوزان به‌عنوان الیستور زیستی، با افزایش فعالیت دفاعی گیاه از بروز خسارت‌های شدید به گیاهان در شرایط تنش جلوگیری می‌کند. بدین منظور جهت ارزیابی اثر القاکننده کیتوزان و تنش کم آبی بر رشد و پارامترهای فیزیولوژیک مرزنجوش، آزمایشی در گلخانه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان - ایران به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. عامل‌های موردبررسی شامل محلول پاشی کیتوزان در سه سطح (صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، عامل دوم گونه‌های مرزنجوش (<i>Origanum vulgare</i> و <i>Origanum majorana</i>) و عامل سوم سطوح تنش (تنش کم آبی و عدم تنش) بودند. زمان اعمال تنش کم آبی و تیمار با کیتوزان سه هفته قبل از گلدهی کامل بود. نتایج نشان داد که تنش کم آبی موجب کاهش درصد ماده خشک بوته، صفات محتوای رطوبت نسبی برگ، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید شد، درحالی‌که محتوای هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، مالون دی‌آلدئید (MDA)، پرولین و بازده اسانس را افزایش داد. محلول پاشی کیتوزان در شرایط تنش کم آبی باعث افزایش وزن خشک شاخساره، کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید، محتوای رطوبت نسبی برگ، پرولین و بازده اسانس شد. نتایج نشان داد که استفاده از کیتوزان به‌عنوان الیستور زیستی، با توجه به مهندسی متابولیت می‌تواند اثرات سوء تنش کم آبی را در گیاه مرزنجوش به‌عنوان یک گیاه داروئی کاهش دهد.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱	
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۱	
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۱ ۱۹۷-۱۸۵ (۱): ۱۵	

مقدمه

تنش خشکی در طول دوره رشد گیاه اغلب باعث کاهش پتانسیل آب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود، در نتیجه میزان رشد سلول‌ها و بافت‌ها کاهش پیدا می‌کند. با کاهش رشد سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، شاخص سطح برگ نیز کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه میزان نور دریافتی توسط برگ‌ها نیز کاهش می‌یابد. با کاهش نور دریافتی، سنتز کلروفیل نیز تا حدی متوقف شده و در نتیجه فرآیند فتوسنتز نیز مختل می‌شود. همچنین در شرایط تنش خشکی با بسته شدن روزنه‌ها به دلیل افزایش سنتز ABA جذب CO_2 نیز کاهش می‌یابد. با

مرزنجوش با نام انگلیسی (*Oregano*) *Origanum vulgare* یکی از حدود ۲۰۰ جنس متعلق به خانواده بزرگ نعناعیان است. اورگانو نام رایج چاشنی‌های معطری است که نخستین بار از بیش از ۶۰ گونه گیاهی که در سرتاسر جهان استفاده می‌شدند، مشتق شده است (Kintzios, 2002). تنش خشکی مهم‌ترین تنش محیطی محدودکننده عملکرد گیاه است (Wang et al., 2001). رشد و نمو گیاه غالباً به وسیله آب کنترل می‌شود. بسیاری از پارامترهای مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان تحت شرایط کمبود آب قرار می‌گیرند.

میگو استخراج می‌شود و کاربردهای مختلفی در صنایع داروئی، پزشکی و کشاورزی دارد. یک پاسخ مهم در برابر القاکنده‌های زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) است که به‌عنوان پیام‌رسان عمل نموده و باعث تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه می‌شود (Breusegem et al., 2001; Kowalski et al., 2006). مطالعات نشان می‌دهد که کیتوزان از طریق بهبود سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌ویژه افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیدانت به‌عنوان جاروب‌کننده‌ی انواع اکسیژن فعال عمل می‌کند (Harish Prashanth et al., 2007).

بنابراین هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی تأثیر القاء‌کننده کیتوزان بر تحمل به تنش کم‌آبی در دو گونه گیاه داروئی مرزنجوش و بررسی القاء‌کننده کیتوزان بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه داروئی مرزنجوش در شرایط تنش کم‌آبی بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۳۹۸ انجام شد. فاکتورهای موردبررسی شامل سه غلظت مختلف کیتوزان به‌صورت محلول‌پاشی (صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) (Naeemi et al., 2019)، تنش خشکی در دو سطح (تنش کم‌آبی و عدم تنش) روی دو گونه گیاه داروئی مرزنجوش، *Origanum vulgare* و *Origanum majorana* بودند. بذره‌های مرزنجوش از سازمان تحقیقات جنگل و مرتع تهیه شدند. کیتوزان مصرفی نیز از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. بذرها در داخل سینی‌های کشت مخصوص نشاء کشت شدند. بعد از رسیدن گیاهان به رشد موردنظر تا مرحله ۴ و ۵ برگی، به داخل گلدان‌های پلاستیکی انتقال یافتند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. طول دوره رشد محصول از اواسط اسفندماه ۱۳۹۷ تا اواخر تیرماه ۱۳۹۸ بود. زمان اعمال تیمار تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی کیتوزان طی سه مرحله به‌صورت اسپری بر بخش هوایی بوته‌های مرزنجوش، سه هفته قبل از گلدهی کامل بود. در این آزمایش برای اندازه‌گیری رطوبت خاک هر یک از گلدان‌ها از روش وزنی استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا تمامی گلدان‌ها وزن شده و گیاهان تا مرحله طویل شده ساقه به‌خوبی آبیاری شدند و از قبل از گلدهی تا مراحل ابتدایی گلدهی (زمانی که

کاهش پتانسیل آب بافت‌ها غلظت اسیدآمینه پرولین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اسمزی در شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد (Hong et al., 2000). در شرایط تنش خشکی فعالیت مولکول‌های احیاکننده کاهش یافته و در مقابل فعالیت مولکول‌های هیدرولیزکننده افزایش می‌یابد. گفتنی است؛ تحت شرایط تنش، تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) نیز افزایش می‌یابد. عدم توازن بین تولید ROS و دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به اختلال در ساختارهای سلولی و تغییرات متابولیکی شدیدی مانند تجزیه پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA می‌شود. این تغییرات باعث کاهش فتوسنتز و اختلال متابولیکی می‌شود که منجر به کاهش رشد و باروری، پیری زودرس و عملکرد پایین می‌گردد (Debnath et al., 2011). سلول‌های گیاهی در چنین شرایطی برای محافظت در برابر گونه‌های اکسیژن فعال از سیستم‌های جاروب‌کننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که شامل سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیمی هستند، استفاده می‌کنند (Mittler, 2002).

کیفیت گیاهان داروئی معمولاً از طریق مقدار ترکیبات مواد مؤثره تعیین می‌شود و غلظت این ترکیبات به‌واسطه عوامل محیطی مثل قابلیت دسترسی به آب تعیین می‌شود (Selmar and Kleinwachter, 2013). مطالعات نشان می‌دهد تنش خشکی منجر به تغییرات در عملکرد مواد مؤثره و ترکیبات داروئی می‌شود (Corell et al., 2012). تحقیقات بر روی دو گونه آویشن (*T. vulgaris* and *T. daenensis*) توسط علوی پناه و همکاران (Alavi-Samani et al., 2015) نشان داد که تنش خشکی ملایم منجر به افزایش عملکرد اسانس می‌شود. شرایط تنش‌زا در نتیجه کمبود آب در محیط باعث افزایش در سنتز تعدادی از ترکیبات فعال زیستی می‌شود که این‌ها توسط گیاهان به‌منظور مقابله با کمبود آب تولید می‌شود (Khan et al., 2011). گیاهان کشت‌شده در شرایط خشکی می‌تواند بخشی از کربن تجمع یافته را به متابولیسم ثانویه اختصاص دهد (Herms and Mattsou, 1992). همچنین تنش خشکی می‌تواند باعث ایجاد تنش ثانویه‌ای بنام تنش اکسیداتیو شده و منجر به کاهش در سرعت فتوسنتزی شود که تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان مکانیسم دفاعی گیاه می‌تواند در این زمینه کمک کند (Jafar et al. 2012).

کیتوزان ماده‌ای با خاصیت القاکندگی و محرک رشد است که از پوست موجودات سخت‌پوست نظیر خرچنگ و

۵۰ درصد بوته‌ها وارد این مرحله شدند) تنش کم‌آبی با توقف آبیاری تا زمانی که محتوای رطوبتی خاک تقریباً به ۵۰ درصد تخلیه رطوبتی برسد اعمال شد. برای اندازه‌گیری پروب رطوبتی خاک از دستگاه رطوبت‌سنج (TDR) استفاده شد. همچنین در گلدان‌های بدون تنش نیز محتوای رطوبتی خاک در حد ۸۵ درصد حفظ شد.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه.

Table 1. Physical and chemical characteristics of the studied soil.

بافت	شن	سیلت	رس	کربن آلی	ماده آلی	کربنات کلسیم	هدایت الکتریکی	pH
Texture	Sand	Silt	Clay	OC	OM	CaCO ₃	EC	
	-----%-----						dSm ⁻¹	
Loam	33.32	40	26.48	1.401	2.415	12.5	2.8	7.96

(Lichtenthaler, 1983) استفاده شد که برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برآورد شدند.

محتوای پرولین

برای سنجش محتوای پرولین از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. ۰/۱ گرم ماده‌ی تر گیاهی را با هاون خرد کرده و درون یک تیوب ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۰/۰۳ به آن اضافه گردید. تیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از محلول شناور سانتریفیوژ شده را درون لوله‌های آزمایش ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای پایان یافتن واکنش، لوله‌های آزمایش در داخل بستر یخی قرار گرفته و ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه گردید. لوله‌های آزمایش مربوطه به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد. اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

محتوای مالون دی‌آلدئید

میزان محتوای مالون دی‌آلدئید با استفاده از روش دوس و همکاران (De Vos et al., 1991) اندازه‌گیری شد. از نمونه تر فریز شده ۰/۱ گرم توزین کرده و داخل هاون چینی ریخته و توسط ازت مایع خرد و یکنواخت شدند. سپس نمونه‌ها را درون تیوب ریخته و به آن ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور

درصد ماده خشک اندام هوایی

جهت اندازه‌گیری درصد ماده خشک اندام هوایی به هنگام گلدهی بخش هوایی بوته‌ها را از هر گلدان جدا کرده و سپس در دستگاه آون به مدت ۴۸ ساعت با دمای بین ۷۰ الی ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. جهت اندازه‌گیری وزن خشک از ترازویی با دقت یک‌هزارم استفاده شد.

محتوای نسبی آب برگ

در تحقیق حاضر محتوای آب نسبی برگ به روش بار و ویدرلی (Barr and weatherly, 1962) اندازه‌گیری شد و در نهایت محتوای نسبی آب برگ به‌وسیله معادله زیر محاسبه گردید. که در آن Dw وزن برگ در حالت خشک، Fw وزن برگ در حالت تر، Tw وزن برگ در حالت تورژسانس است.

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌ها (کلروفیل a و کلروفیل b) از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده شد. ۰/۱ گرم ماده تر گیاهی توزین و در هاون چینی به کمک ازت مایع پودر شدند. نمونه‌ی گیاهی خردشده را درون تیوب ریخته و سپس ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه گردید و برای دستیابی به مخلوطی کاملاً همگن، از ورتکس استفاده شد. سپس تیوب‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نور روشناور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b به دست آمد. در نهایت میزان کلروفیل برحسب میلی‌گرم در گرم ماده‌ی تر برگ بیان شد. همچنین برای برآورد مقدار کاروتنوئیدها در طول موج ۴۷۰ نانومتر از روش لیچنتالر

بر درصد ماده خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشت (جدول ۲). در پژوهش حاضر تنش کم‌آبی سبب کاهش درصد ماده خشک اندام هوایی شد و محلول‌پاشی کیتوزان باعث بهبود این صفت گردید. به طوری که طبق جدول مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان درصد ماده خشک اندام هوایی مربوط به شرایط شاهد و در هر دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در گونه‌ی *O. vulgare* و در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در گونه‌ی *O. majorana* بود (جدول ۳). مشخص شده است که گیاهان تیمار شده با کیتوزان با مکانیسم فیزیولوژیکی ذاتی، ضمن اجازه به بازیابی جذب سریع کربن با حفظ زیست‌توده باعث به حداکثر رساندن عملکرد می‌شوند (Bittel et al., 2001). محققان اظهار داشتند که کاربرد کیتوزان منجر به افزایش سطح برگ و ماده خشک کل در گیاه دارویی آویشن دناپی گردید (Emami Bistgani et al., 2017).

محتوای رطوبت نسبی برگ

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، بین دو فاکتور کیتوزان با غلظت‌های (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و رژیم رطوبتی با دو سطح (عدم تنش و تنش کم‌آبی) بر محتوای رطوبت نسبی برگ، در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) تأثیر معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). نتایج نشان داد که بیشترین محتوای رطوبت نسبی برگ در شرایط بدون تنش در تمامی سطوح کاربرد خارجی کیتوزان بود و کمترین آن در شرایط تنش کم‌آبی بدون محلول‌پاشی با کیتوزان مشاهده شد (شکل ۱). در پژوهش صورت گرفته روی شش جمعیت از مرزنجوش مشخص شد که محتوای رطوبت نسبی برگ‌ها تحت شرایط تنش کم‌آبی کاهش یافت (Morshedloo et al., 2017). همچنین نتایج نشان داد که کاربرد کیتوزان در هر دو غلظت باعث بهبود محتوای رطوبت نسبی آب برگ گردید (شکل ۱). بنا بر مطالعات به هنگام وقوع تنش خشکی میزان تعرق افزایش می‌یابد بنابراین محتوای رطوبت نسبی آب برگ نیز کاهش می‌یابد که کاربرد خارجی کیتوزان از طریق مسیر سیگنال‌دهی باعث افزایش سنتز اسیدآبسیزیک شده و به دنبال آن با بستن روزنه‌ها، میزان تعرق را در شرایط وقوع تنش کم‌آبی کاهش داده و از کاهش محتوای رطوبت نسبی آب برگ جلوگیری می‌کند.

۱۲۰۰۰ با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور را برداشته و به آن یک میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید اضافه شد. مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصل را بلافاصله در حمام یخ قرار داده تا سرد شود و در سرعت ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتی‌فیوژ گردید. محتوای MDA با استفاده از جذب در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و در ضریب خاموشی ($\epsilon = 155$) $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}$ سنجش شد.

محتوای هیدروژن پراکسید

در این تحقیق محتوای هیدروژن پراکسید (H_2O_2) بر اساس روش ولیکوا و همکاران (Velikova et al., 2000) اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم نمونه بخش هوایی را خرد کرده به آن ۵ میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرواستیک یک درصد (w/v) اضافه گردید. نمونه هموزنیزه شده در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی سانتی‌فیوژ شده به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات-پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار از KI اضافه گردید. محتوای H_2O_2 با توجه به نمودار استاندارد و تعیین جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

محتوای اسانس

برای اندازه‌گیری بازده اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر از روش بریتیش فارماکوپه (British Pharmacopeia, 1988) استفاده شد.

محاسبات آماری

داده‌های حاصل از آزمایش با نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۱ محاسبه شدند و مقایسه میانگین بین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت و همچنین نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل (Excel) نسخه ۲۰۰۷ رسم شدند

نتایج و بحث

درصد ماده خشک اندام هوایی

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثرات متقابل فاکتورهای مورد مطالعه (کیتوزان، رژیم رطوبتی و گونه‌های مرزنجوش)

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک دو گونه مرزنجوش تحت شرایط تنش کم‌آبی

Table 1. Analysis of variance physiological traits of two *Oregano* species under water deficit stress

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	درصد ماده خشک dry matter	رطوبت نسبی برگ RWC	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll
Block	بلوک	2	0.02 ^{ns}	29.06 ^{ns}	0.00032 ^{ns}	0.0013 ^{ns}	0.0012 ^{ns}
Chitosan application (C)	کیتوزان	2	2.87 ^{**}	179.67 ^{**}	0.00594 ^{**}	0.0031 ^{**}	0.0142 ^{**}
Water regimes (W)	رژیم رطوبتی	1	14.24 ^{**}	761.79 ^{**}	0.00516 ^{**}	0.0076 ^{**}	0.0251 ^{**}
Species (S)	گونه‌ها	1	0.78 ^{**}	6.25 ^{ns}	0.00027 ^{ns}	0.0207 ^{**}	0.0163 ^{**}
C × W	کیتوزان × رژیم رطوبتی	2	0.96 ^{**}	66.64 [*]	0.00022 ^{ns}	0.0015 ^{ns}	0.0009 ^{ns}
C × S	کیتوزان × گونه‌ها	2	0.11 ^{ns}	1.23 ^{ns}	0.00001 ^{ns}	0.0121 ^{**}	0.0122 ^{**}
W × S	رژیم رطوبتی × گونه‌ها	1	0.57 ^{**}	0.81 ^{ns}	0.00033 ^{ns}	0.0019 [*]	0.0006 ^{ns}
C × W × S	کیتوزان × رژیم رطوبتی × گونه‌ها	2	0.67 ^{**}	20.04 ^{ns}	0.00007 ^{ns}	0.0168 ^{**}	0.0187 ^{**}
Error	اشتباه آزمایشی	22	0.07	14.09	0.00020	0.0004	0.0004
CV%	ضریب تغییرات		11.62	4.71	11.57	17.46	9.50

Table 1. Continued

جدول ۱. ادامه

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	کاروتنوئید Carotenoid	هیدروژن پراکسید H ₂ O ₂	مالون دی‌آلدئید MDA	پرولین Proline	بازده اسانس Essential oil
Block	بلوک	2	0.0004 ^{ns}	0.0015 ^{ns}	0.085 ^{ns}	5.36 ^{ns}	0.0008 ^{ns}
Chitosan application (C)	کیتوزان	2	0.0032 ^{**}	0.0018 ^{ns}	4.745 ^{**}	89.32 ^{**}	0.106 ^{**}
Water regimes (W)	رژیم رطوبتی	1	0.0001 ^{ns}	0.3522 ^{**}	24.169 ^{**}	633.48 ^{**}	0.726 ^{**}
Species (S)	گونه‌ها	1	0.0045 ^{**}	0.2393 ^{**}	0.112 ^{ns}	36.93 ^{**}	0.859 ^{**}
C × W	کیتوزان × رژیم رطوبتی	2	0.0004 ^{ns}	0.0161 ^{**}	4.591 ^{**}	16.89 ^{**}	0.064 ^{**}
C × S	کیتوزان × گونه‌ها	2	0.0023 [*]	0.0001 ^{ns}	0.257 ^{ns}	17.30 ^{**}	0.084 ^{**}
W × S	رژیم رطوبتی × گونه‌ها	1	0.0007 ^{ns}	0.0800 ^{**}	0.609 [*]	55.03 ^{**}	0.234 ^{**}
C × W × S	کیتوزان × رژیم رطوبتی × گونه‌ها	2	0.0013 ^{ns}	0.0037 ^{ns}	0.051 ^{ns}	6.03 ^{ns}	0.126 ^{**}
Error	اشتباه آزمایشی	22	0.0004	0.0013	0.091	1.92	0.005 ^{**}
CV%	ضریب تغییرات		14.26	18.97	16.44	13.63	15.81

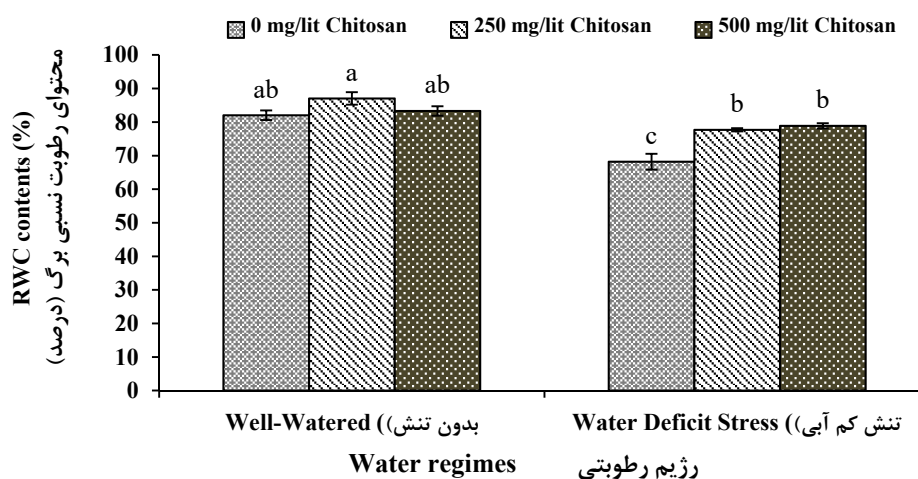
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۵ درصد و یک درصد و ns عدم اختلاف معنی دار

*, **: significantly different at the 5 and 1% probability level, respectively, ns: non-significant

جدول ۳. مقایسه میانگین اثرات متقابل رژیم رطوبتی، گونه و محلول پاشی با کیتوزان

Table 2. Mean comparison of water regimes, species and chitosan spray interaction

رژیم رطوبتی	محلول پاشی	درصد ماده خشک	کلروفیل b	کلروفیل کل	بازده اسانس	
Water regimes	Chitosan concentration	Total dry matter	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Essential oil yield	
گونه‌ها	mg/lit	g	mg gr ⁻¹ FW	w/w%	w/w%	
عدم تنش	<i>O.vulgare</i>	0	2.576 ^b ± 0.194	0.009 ^e ± 0.005	0.121 ^{de} ± 0.006	0.309 ^{cd} ± 0.025
		250	3.297 ^a ± 0.237	0.084 ^d ± 0.012	0.221 ^{bc} ± 0.012	0.319 ^{cd} ± 0.015
		500	3.651 ^a ± 0.155	0.087 ^{cd} ± 0.007	0.254 ^{ab} ± 0.006	0.911 ^b ± 0.090
Well-watered	<i>O.vulgare</i>	0	1.612 ^c ± 0.024	0.125 ^{ab} ± 0.018	0.230 ^b ± 0.015	0.349 ^c ± 0.015
	<i>O.majorana</i>	250	2.770 ^b ± 0.046	0.156 ^a ± 0.004	0.285 ^a ± 0.002	0.427 ^c ± 0.037
		500	3.501 ^a ± 0.206	0.086 ^{cd} ± 0.009	0.233 ^b ± 0.014	0.209 ^{de} ± 0.008
تنش کم آبی	<i>O.vulgare</i>	0	1.376 ^c ± 0.165	0.006 ^e ± 0.002	0.092 ^c ± 0.004	1.111 ^a ± 0.065
		250	1.298 ^c ± 0.029	0.122 ^{abc} ± 0.023	0.240 ^b ± 0.012	0.348 ^c ± 0.028
		500	2.320 ^b ± 0.181	0.008 ^e ± 0.002	0.130 ^d ± 0.009	0.396 ^c ± 0.024
Water deficit stress	<i>O.vulgare</i>	0	1.600 ^c ± 0.089	0.104 ^{bcd} ± 0.010	0.189 ^c ± 0.007	0.161 ^e ± 0.011
	<i>O.majorana</i>	250	1.664 ^c ± 0.168	0.010 ^e ± 0.004	0.127 ^{de} ± 0.013	0.446 ^c ± 0.044
		500	1.601 ^c ± 0.030	0.122 ^{abc} ± 0.028	0.249 ^b ± 0.023	0.360 ^c ± 0.015



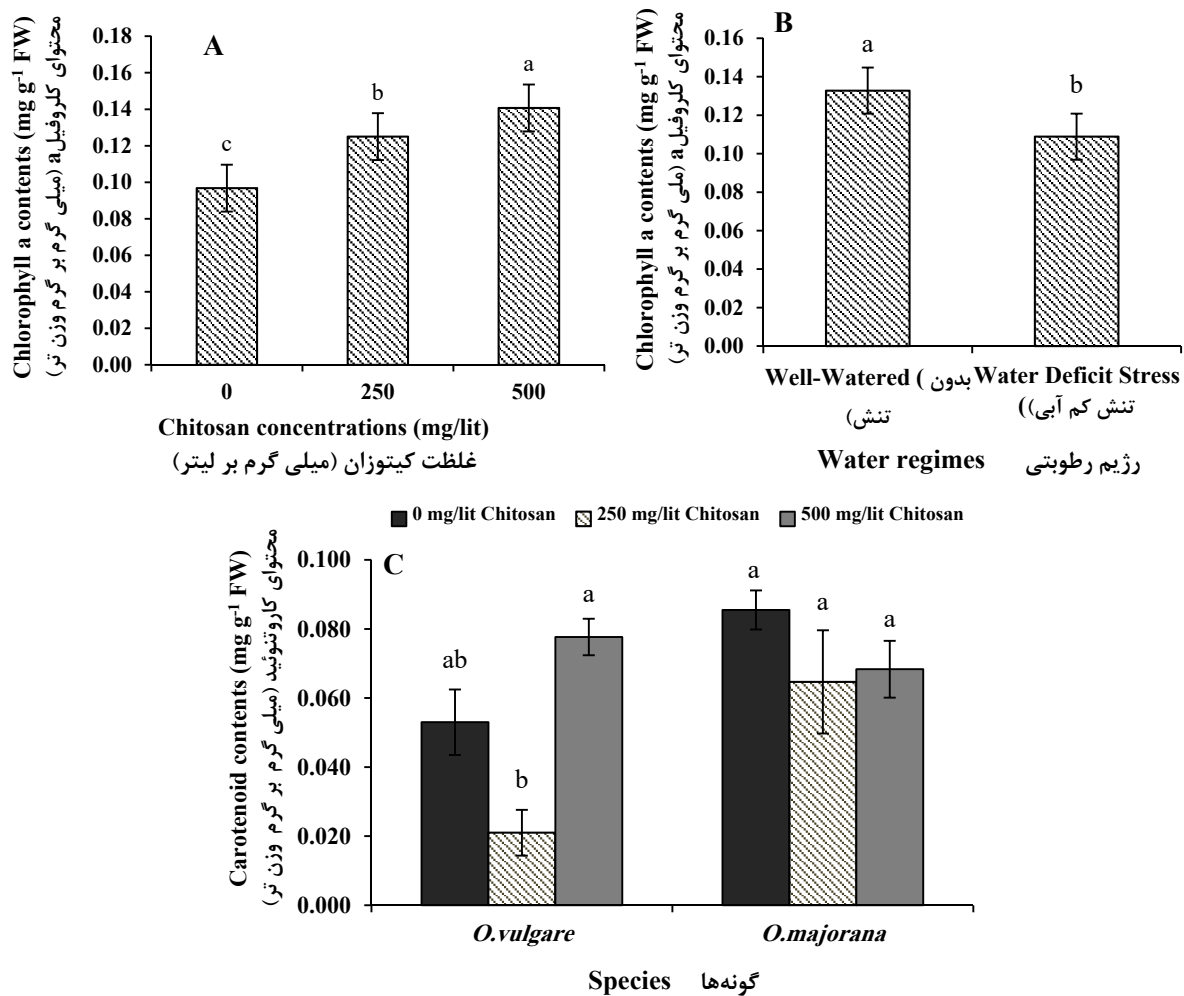
شکل ۱. اثر رژیم رطوبتی و محلول پاشی کیتوزان بر محتوای رطوبت نسبی برگ

Fig.1. Effect of water regimes and chitosan application on relative water content

۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش ۱۴/۱ درصدی میزان کلروفیل a نسبت به شاهد (عدم محلول پاشی) شد (شکل A2). همچنین بیشترین محتوای کلروفیل a در شرایط بدون تنش (۰/۱۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) نسبت به شرایط رژیم رطوبتی تنش کم آبی (۰/۱۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل B2).

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی کیتوزان و رژیم رطوبتی تأثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) داشت (جدول ۲). در این پژوهش محلول پاشی با کیتوزان در غلظت



شکل ۲. اثر کیتوزان (A) و تنش کم‌آبی (B) بر محتوای کلروفیل a و تأثیر کیتوزان و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای کاروتنوئید (C)
 Fig. 2. Effect of chitosan application (A) and water regimes (B) on chlorophyll a contents, and Effect of chitosan application and Oregano species on carotenoid contents (C)

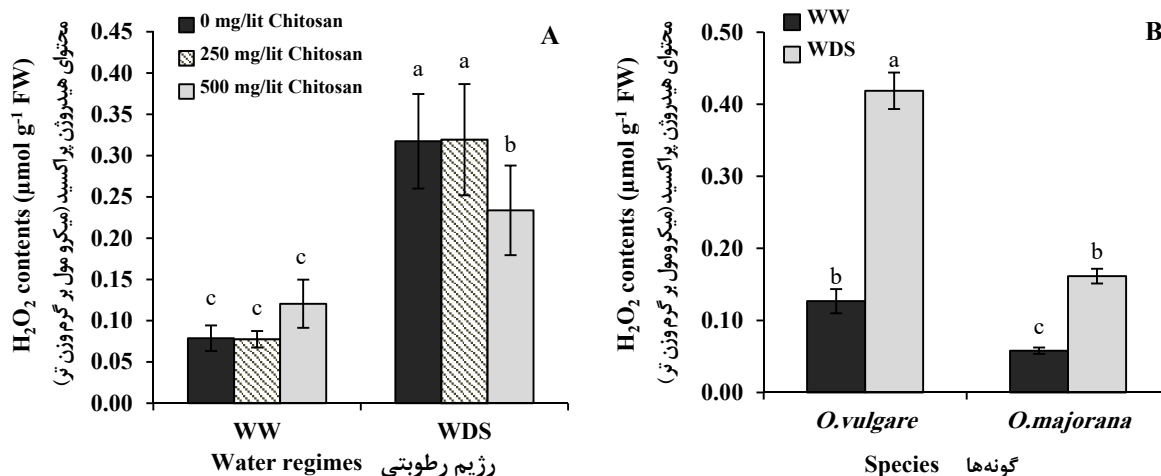
معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) وجود دارد (جدول ۲). مطابق جدول مقایسه میانگین، بیشترین محتوای کلروفیل کل به ترتیب در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در شرایط بدون تنش در گونه *O. vulgare* و *O. majorana* مشاهده شد. شرایط تنش کم‌آبی منجر به کاهش این صفت گردید درحالی‌که کاربرد کیتوزان در هر دو غلظت و در هر دو گونه توانست باعث بهبود محتوای کلروفیل کل گردد (جدول ۳). علت این امر آن است که کیتوزان موجب افزایش محتوای نیتروژن و پتاسیم در شاخه‌های گیاهی شده و به افزایش تعداد کلروپلاست هر سلول و در نتیجه سنتز بیشتر کلروفیل کمک می‌کند (Possingham, 1980). محققان با مطالعه روی شش گونه از جمعیت مرزنجوش دریافتند تنش آبی به‌عنوان عامل تقویت‌کننده در جمعیت‌های مرزنجوش محسوب می‌شود و

نتایج بررسی‌ها روی شش گونه از جمعیت مرزنجوش نشان داد که محتوای کلروفیل a به‌طور قابل‌توجهی تحت تنش ملایم افزایش می‌یابد اما تحت تنش شدید کاهش پیدا کرد (Morshedloo et al., 2017). بر طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، اثرات متقابل سه‌گانه فاکتورهای مورد مطالعه بر محتوای کلروفیل b در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار شد (جدول ۲). به‌طوری‌که بیشترین محتوای کلروفیل b تحت شرایط بدون تنش در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مربوط به گونه *O. majorana* (۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول ۳). همچنین محلول‌پاشی با کیتوزان در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش ۱۵/۶ درصدی در محتوای کلروفیل b در گونه *O. majorana* شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد، بین فاکتورهای بررسی‌شده بر محتوای کلروفیل کل تأثیر

محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل کیتوزان و رژیم رطوبتی، رژیم رطوبتی و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای H_2O_2 در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین محتوای پراکسید هیدروژن تحت شرایط تنش کم‌آبی به دست آمد و محلول‌پاشی با کیتوزان در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش معنی‌دار این صفت در شرایط تنش کم‌آبی شد (شکل A3). همچنین بیشترین محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تحت تنش کم‌آبی در گونه‌ی *O. vulgare* به دست آمد (شکل B3). طاهری و همکاران (Taheri et al., 2017) گزارش کردند محلول‌پاشی گیاه دارویی زنیان تحت شرایط تنش کم‌آبی با کیتوزان سبب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌شود. پونگ پروایون و همکاران (Pongprayoon et al., 2013) گزارش کردند که هیدروژن پراکسید در شرایط تنش به‌عنوان مولکول سیگنال دهی جهت تنظیم اسمزی عمل می‌کند.

نسبت‌های کلروفیل a به b و نسبت کاروتنوئید به کلروفیل کل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Morshedloo et al., 2017). برهمکنش فاکتورهای بررسی‌شده کیتوزان و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای کاروتنوئید در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد محتوای کاروتنوئید در گونه‌ی مرزنجوش *O. majorana* در هر سه غلظت کیتوزان بالا بود. همچنین در گونه‌ی *O. vulgare* بیشترین محتوای کاروتنوئید در شرایط محلول‌پاشی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به دست آمد (شکل C2). با توجه به اینکه کیتوزان در افزایش پاسخ دفاعی به رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش نقش ایفا می‌کند لذا تیمار با کیتوزان سبب افزایش محتوای کاروتنوئید که به‌عنوان رنگیزه‌ی کمکی و مولکول آنتی‌اکسیدانی مطرح هستند، در جهت جلوگیری از خسارت و صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش کم‌آبی به ساختمان کلروپلاست شده است.



شکل ۳. اثر رژیم رطوبتی [تنش کم‌آبی (WDS) و بدون تنش (WW)] و کیتوزان بر محتوای H_2O_2 (A) و اثر رژیم رطوبتی و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای H_2O_2 (B).

Fig. 3. Effect of water regimes (water deficit stress-WDS and well watered-WW) and chitosan on H_2O_2 content (A), Effect of water regimes and species on H_2O_2 content (B).

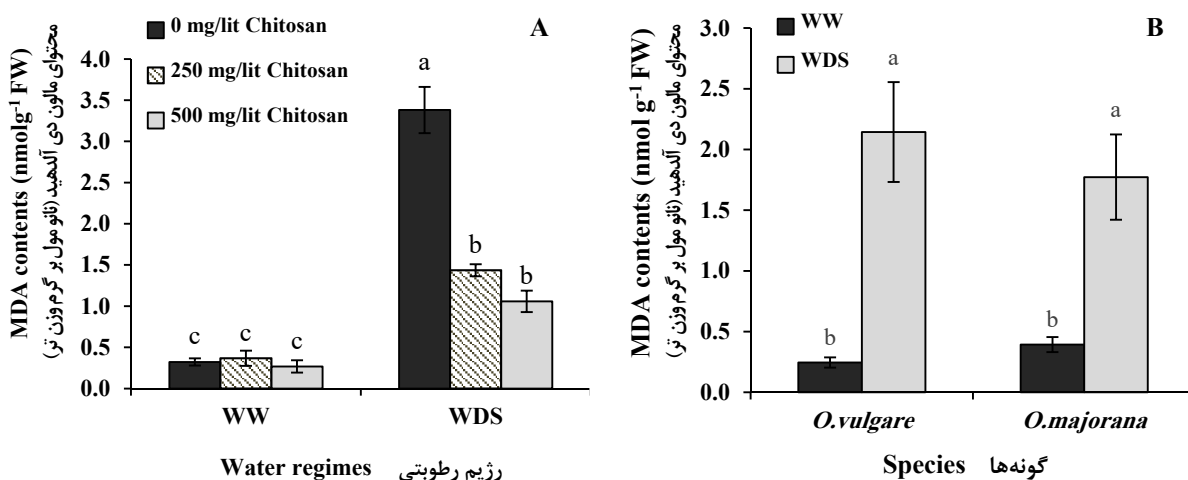
(جدول ۲). به نظر می‌رسد در شرایط تنش کم‌آبی به علت اکسیداسیون لیپیدها، محتوای مالون دی آلدئید در هر دو گونه افزایش یافت و کیتوزان در هر دو غلظت، احتمالاً با از

محتوای مالون دی آلدئید (MDA)

اثرات متقابل کیتوزان و رژیم رطوبتی در سطح احتمال ۱ درصد، و گونه‌های مرزنجوش و رژیم رطوبتی در سطح احتمال ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر محتوای مالون دی آلدئید داشتند

باین حال عملکرد کیتوزان به‌عنوان یک القاکننده و تحریک سیستم دفاعی بوده و می‌تواند اثرات منفی تنش خشکی را کاهش می‌دهد (Hidangmayum et al., 2019). محققان گزارش کردند که تیمار با کیتوزان در گیاهان لوبیا، سیب‌زمینی، آویشن، *Hydrilla verticillata* و نهال‌های سیب با از بین بردن انواع اکسیژن فعال سبب افزایش پایداری غشا شد (Xu et al., 2007; Yang et al., 2009; Jiao et al., 2012; Karimi et al., 2012; Emami Bistgani et al., 2017).

بین بردن رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم و یا توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، از اکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری نموده و مانع افزایش مالون دی‌آلدئید شده است (شکل ۴). یکپارچگی غشای سلولی غالباً به هنگام روبه‌رو شدن با شرایط کمبود آب مختل می‌شود. برای نشان دادن میزان نفوذپذیری نسبی و پایداری غشا از غلظت مالون دی‌آلدئید استفاده می‌شود. در صورت، با افزایش رادیکال‌های آزاد و به‌تبع آن افزایش سطح مالون دی‌آلدئید به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها، نشت غشائی را منجر خواهد شد.



شکل ۴. اثر رژیم رطوبتی [تنش کم‌آبی (WDS) و بدون تنش (WW)] و کیتوزان بر محتوای MDA (A) و اثر رژیم رطوبتی و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای MDA (B)

Fig. 4. Effect of water regimes (water deficit stress-WDS and well watered-WW) & chitosan on MDA content (A), and Effect of water regimes and species on MDA content (B)

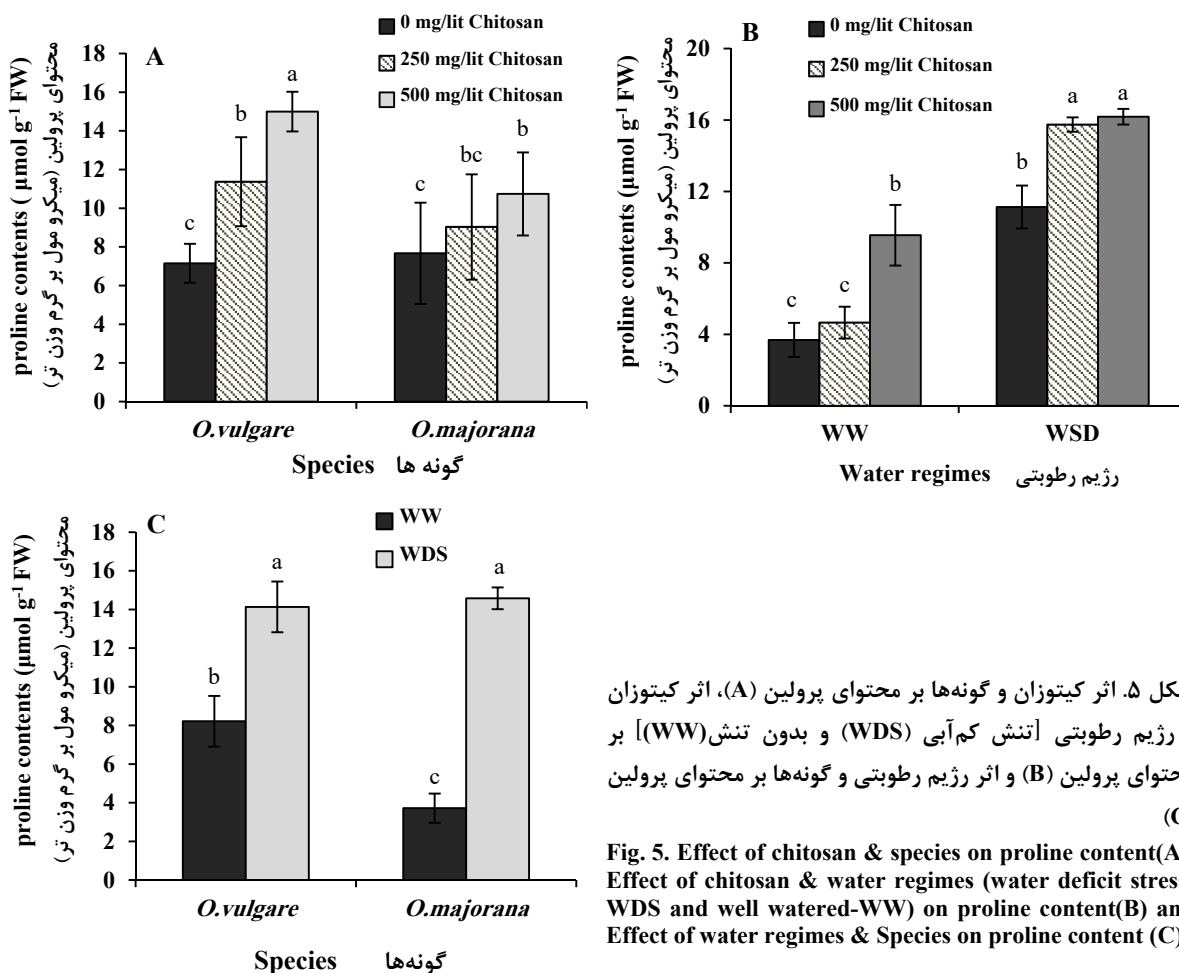
پروولین یک پروتئین محافظت‌کننده حیاتی است که از طریق غیرفعال کردن ROS و حفظ پتانسیل ردکس در برابر فشارهای غیرطبیعی، مسئول تنظیم اسمزی است (Matysik et al., 2002; Ashraf and Foolad, 2007; Hidangmayum and Dwivedi, 2018). امامی بیستگانی و همکاران (Emami Bistgani et al., 2017) گزارش کردند که کیتوزان موجب افزایش محتوای پروولین گیاه آویشن می‌شود، درحالی‌که کریمی و همکاران (Karimi et al., 2012) دریافتند که کاربرد کیتوزان در گیاه *Ricinus communis* تأثیری بر محتوای پروولین نداشت. محققان گزارش کردند که تحت تیمار خشکی میزان پروولین گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد (Watanabe et al., 2000). تجمع پروولین

محتوای پروولین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثرات متقابل کیتوزان و رژیم رطوبتی و کیتوزان و گونه‌های مرزنجوش و همچنین رژیم رطوبتی و گونه‌های مرزنجوش بر محتوای پروولین در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین محتوای پروولین تحت شرایط تنش کم‌آبی در هر دو غلظت کیتوزان مشاهده شد و این میزان در گونه *O. vulgare* با افزایش غلظت کیتوزان افزایش یافت. کمترین محتوای پروولین در هر دو گونه در شرایط بدون تنش و عدم محلول‌پاشی با کیتوزان بود (شکل ۵).

اثر کیتوزان بر گونه‌های گیاهی متفاوت ممکن است مکانیسم-های مختلفی را دنبال کند (Hidangmayum et al., 2019).

از طریق تنظیم اسمزی باعث افزایش فشار تورژسانس شده و از این طریق باعث حفظ تورم سلولی در گیاه می‌شود؛ بنابراین



شکل ۵. اثر کیتوزان و گونه‌ها بر محتوای پرولین (A)، اثر کیتوزان و رژیم رطوبتی [تنش کم‌آبی (WDS) و بدون تنش (WW)] بر محتوای پرولین (B) و اثر رژیم رطوبتی و گونه‌ها بر محتوای پرولین (C)

Fig. 5. Effect of chitosan & species on proline content(A), Effect of chitosan & water regimes (water deficit stress-WDS and well watered-WW) on proline content(B) and Effect of water regimes & Species on proline content (C)

Bistgani et al., 2017). گزارش شده است که کاربرد کیتوزان منجر به افزایش ۱۲ پلی فنل در گیاه پونه گردید و به نظر می‌رسد افزایش در پلی فنل‌ها به علت تحریک آنزیم‌های بیوسنتزی از قبیل فنیل آلانین آمونیلیاز و چالکون سنتتاز باشد (Heng et al., 2012). مطالعه دیگری نیز نشان داد کمبود آب بعد از شروع گلدهی می‌تواند افزایش محتوی اسانس را القا کند و در نتیجه سبب حصول بالاترین کیفیت و راندمان مصرف آب در گیاهان مرزنجوش بشود (Azizi et al., 2008). نتایج آزمایش بر روی گیاه *Origanum majorana* L. نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش

بازده اسانس

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد اثرات متقابل فاکتورهای بررسی‌شده بر بازده اسانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین بازده اسانس تحت رژیم رطوبتی تنش کم‌آبی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان مربوط به گونه‌ی *O. vulgare* بود (جدول ۳). کاربرد کیتوزان در شرایط تنش خشکی منجر به افزایش درصد و عملکرد اسانس در گیاه آویشن دناپی گردید و دلیل آن نقش کیتوزان در فعال‌سازی ژن‌های جدید و مسیره‌های بیوسنتزی مختلف در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه ذکر شده است (Emami

(H₂O₂) در گیاهان در معرض تنش کم‌آبی بدون محلول‌پاشی با کیتوزان در گونه *Origanum vulgare* یافت شد. تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی با کیتوزان باعث افزایش معنی‌دار در محتوای پرولین شد. همچنین محلول‌پاشی با کیتوزان منجر به کاهش معنی‌دار محتوای هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و مالون دی آلدئید (MDA) تحت شرایط تنش کم‌آبی شد. بنابراین، محلول‌پاشی با کیتوزان نه تنها توانست از طریق اثر بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی از آثار نامطلوب تنش کم‌آبی بر گیاه دارویی مرزنجوش بکاهد، بلکه باعث بهبود صفات مورفو-فیزیولوژیک و بازده اسانس گیاه دارویی مرزنجوش شد.

میزان اسانس این گیاه شد (Dunford and Vazquez, 2005).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج یافته شده در این تحقیق نشان داد تنش کم‌آبی تأثیر منفی بر رشد گیاهان دارویی مرزنجوش از طریق تداخل در متابولیسم اولیه و ثانویه داشت که علت آن مربوط به کاهش محتوای رطوبت نسبی آب برگ و رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش محتوای هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و مالون دی آلدئید (MDA) بود. بالاترین محتوای هیدروژن پراکسید

منابع

- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in chloroplasts, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24, 1- 15.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Azizi, A., Yan, F., Honeermeri, B., 2008. Herbage Yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) population as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*. 29, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.001>
- Barrs, H., Weatherley, P., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 15, 413-428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>
- Bates, L.S., Waldern, R.P., Tear, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G.S., Nichols, E.J., 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*. 107, 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0168-923\(00\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0168-923(00)00242-2)
- Breusegem, F.V., James, F., Dat, D., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161, 423-431.
- Dunford and Vazquez, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6)
- Brithish Pharmacopeia, 1988. *Brithish Pharmacopeia*. HMSO, London A, 138.
- Corell, M., Garcia, M.C., Contreras, J.I., Segura, M.L., Cermenio, P., 2012. Effect of water stress on *Salvia officinalis* L. Bioproductivity and its bioelement concentrations. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 43, 419-425. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.641811>
- De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R., Ernst, W., 1991. Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Plant Physiology*. 82, 523-528. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02942.x>
- Debnath, M., Pandey, M., Bisen, P.S., 2011. An omics approach to understand the plant abiotic stress. *Omics*. 15, 739–762. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0146>
- Dunford, N.T., Vazquez, R.S., 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. 7, 20-22.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., 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, 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, S.M., Jagannatha, R., Tharanathan, R.N., 2007. Free

- radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydrat.* 342, 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.11.010>
- Hermes, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology.* 67, 283-335.
- Heng, Y., Xavier, C., Lars, F., Christensen, P., Kai, G., 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 60, 136-143. <https://doi.org/10.1021/jf204376j>
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., 2018. Plant responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic stresses: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 7(1), 758-766.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., Hemantaranjan, A., 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants.* 25, 313-326. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S., 2000. Removal of feedback inhibition of pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology.* 122, 1129-1136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129>
- Jaafar, H.Z.E., Ibrahim, M.H., Fakri, N.F.M., 2012. Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules,* 17, 7305-7322. <https://doi.org/10.3390/molecules17067305>
- Jiao, Z., Li, Y., Li, J., Xu, X., Li, H., Lu, D., Wang, J., 2012. Effects of exogenous chitosan on physiological characteristics of potato seedlings under drought stress and rehydration. *Potato Research.* 55, 293-301. <https://doi.org/10.1007/s11540-012-9223-8>
- Kamari, A., Pulford, I.D., Hargreaves, J.S., 2012. Metal accumulation in *Lolium perenne* and *Brassica napus* as affected by application of chitosans. *International Journal of Phytoremediation.* 14, 894-907. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011>
- Khan, M.A.M., Ulrichs, C., Mewis, I., 2011. Water stress alters aphid-induced glucosinolate response in *Brassica oleracea* var. *italica* differently. *Chemoecology.* 21, 235-242. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0084-4>
- Kowalski, B., Jimenez, F., Herrera, L., Agramonet Penalver, D. 2006. Application of soluble chitosan in vitro and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. *Potato Research.* 49, 167-176. <https://doi.org/10.1007/s11540-006-9015-0>
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b in leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions.* 11, 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Matysik, J., Bhalu, B.A., Mohanty, P., Bohrweg, N., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science.* 82, 525-532.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* 7, 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Morshedloo, M.R., Craker, L.E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H, Maggi, F., 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry.* 111, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.023>
- Naemi, M., Dehghani, M.S., Ghilamali Pour Alamdari, E., Jabbari, H., 2019. Effects of different irrigation regimes and foliar application of chitosan on qualitative and physiological characteristics of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences.* 12, 471-480. <http://doi.org/10.22077/escs.2018.1374.1292>. [In Persian with English summary].
- Pongprayoon, W., Roytrakul, S., Pichayangkura, R., Chadchawan, S., 2013. The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation.* 70, 159-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9789-4>
- Possingham, J.V., 1980. Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology.* 31, 113-129.

- Selmar, D., Kleinwachter, M., 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 42, 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.020>
- Kintzios, S.E., 2002. *Oregano: The genera Origanum and Lippia* (1st ed.), CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12591>
- Taheri, F., Damardeh, M., Salari, M., Bagheri, R., 2017. Evaluate the effect of chitosan on the activities of antioxidant enzymes in Ajwain (*Carum capticum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 48, 575-584. [In Persian with English summary].
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 151, 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance. *Physiological and molecular considerations*. *Acta Horticulturae*. 560, 285–292. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.54>
- Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y., Satohiko Sasaki, S., 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 63, 199-206. <https://doi.org/10.1023/A:1010619503680>
- Xu, Q.J., Nian, Y.G., Jin, X.C., Yan, C.Z., Liu, J., Jiang, G.M., 2007. Effects of chitosan on growth of an aquatic plant (*Hydrilla verticillata*) in polluted waters with different chemical oxygen demands. *Journal of Environmental Sciences*. 19, 217–222. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60035-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60035-7)
- Yang, F., Hu, J., Li, J., Wu, X., Qian, Y., 2009. Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regulation*. 58, 131–136. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9361-4>