In vitro study of chitosan on growth improvement of citrus rootstocks under sodium chloride stress

Bahram Abedy[1*], Behnam Esfandiari[1], Saeed Reza Vessal[2]
[1.] Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2.] Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract
Salinity is an abiotic stress that reduces the growth and yield of plants. Citrus are categorized as salt sensitive trees. Hence, a study was conducted to investigate the effects of chitosan on biochemical and nutritional features of two important citrus rootstocks in different sodium chloride concentrations under *in vitro* condition. A factorial experiment was conducted in a randomized complete design with three replications. The factors included sodium chloride concentration at four levels (0, 50, 75 and 100 mM), chitosan at three levels (0, 50 and 100 ppm) and two rootstocks (citrange and sour orange). The sodium chloride and chitosan were added to the Murashige and Skoog medium during the first culture. According to the results, there were significant interactions among salinity, chitosan and citrus rootstocks for most tested parameters. With increasing salt concentration, the number of leaves, shoot length, potassium and calcium content in leaves of sour orange and citrange decreased significantly, while there was a remarkable increase in proline content, soluble sugar, leaf chlorine and super oxide dismutase activity for both rootstocks. Chitosan, as a growth promoter, stimulated the leaf formation and shoot elongation under salt stress. Due to lower amount of chlorine ion, higher level of potassium ion and greater accumulation of proline and soluble sugars in response to salt stress, sour orange was more tolerant to salt than citrange. Finally, chitosan could be proposed as a useful compound to reduce the adverse effects of salinity stress by stimulating antioxidant enzymes and scavenging reactive oxygen species.

Keywords: Chitosan, Citrange, Salinity, Sour orange.

* Corresponding Author: abedy@ferdowsi.um.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially

(DOI) : 10.22108/ijpb.2019.109747.1082

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال یازدهم، شمارهٔ چهل و یکم، پاییز ۱۳۹۸، صفحهٔ ۴۸-۳۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸ و ۱۳۹۸/۰۱/۱۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۱۵

مطالعهٔ *درون شیشه‌ای* کیتوسان بر بهبود رشد پایه‌های مرکبات در معرض تنش کلریدسدیم

بهرام عابدی[1*]، بهنام اسفندیاری[1]، سعیدرضا وصال[1]
[1] گروه باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
[2] گروه حبوبات، پژوهشکدهٔ علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

چکیده

شوری ازجمله تنش‌های غیرزیستی است که باعث کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شود. مرکبات در گروه درختان حساس به شوری طبقه‌بندی می‌شوند؛ ازاین‌رو، پژوهشی به‌منظور بررسی تأثیر کیتوسان بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای دو پایهٔ مهم مرکبات در سطوح مختلف تنش شوری در شرایط *درون شیشه* اجرا شد. آزمایش به‌شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل غلظت کلریدسدیم در چهار سطح (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کیتوسان در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و پایه‌های مرکبات (سیترنج و نارنج) بودند. پس‌از پرآوری در نخستین واکشت، غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و کیتوسان به محیط‌های کشت موراشیگ و استوگ اضافه شدند. باتوجه‌به داده‌های تجزیه واریانس، برهم‌کنش سطوح شوری، کیتوسان و پایه‌های مرکبات در بسیاری از صفت‌های آزمایش‌شده معنادار بود. تعداد برگ، طول شاخساره، میزان پتاسیم و کلسیم برگ‌های نارنج و سیترنج با افزایش میزان شوری به‌طور معناداری (در سطح ۱ درصد) کاهش یافت؛ درحالی‌که میزان پرولین، قند محلول، کلر برگ‌ها و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز افزایش معناداری نشان داد. در پژوهش حاضر، کیتوسان به‌منزلهٔ محرک رشد باعث افزایش تعداد برگ و طول شاخساره در شرایط تنش نسبت به تیمار شاهد (بدون کیتوسان) شد. نارنج به‌علت مقادیر کمتر یون کلر، سطح بیشتر یون پتاسیم و تجمع بیشتر پرولین و قند محلول در پاسخ به تنش شوری پایهٔ متحمل‌تری نسبت به سیترنج بود. درنهایت،کیتوسان با تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، ترکیبی برای کاهش آثار مخرب تنش شوری پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیترنج، نارنج، شوری،کیتوسان

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: abedy@ferdowsi.um.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۵۱۳۸۸۰۵۰۰

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

مرکبات ازجمله درختان میوهٔ حساس به تنش شوری به شمار می‌آیند که سطح زیر کشت آنها در ایران بالغ بر ۲۳۵ هزار هکتار است (Goleyn *et al.*, 2015). آثار زیان‌بار تنش شوری سبب کاهش کیفیت و عملکرد درختان مرکبات می‌شود و میزان تحمل پایه‌های مرکبات نسبت به تنش شوری به عواملی مانند آب‌وهوا، نوع پایه، نوع خاک، مدیریت آبیاری و کوددهی و غیره بستگی دارد (Sanchez *et al.*, 2006)؛ تنش شوری از طریق القای تنش اکسیداتیو، تنش تغذیه‌ای، خشکی فیزیولوژیک (تنش اسمزی) و تنش یونی سبب آسیب به گیاهان حساس می‌شود (Al-Yassin, 2004; Amini and Ehsanpour, 2005). بر اساس پژوهش Shafieizargar و همکاران (۲۰۱۵)، حلالیت عناصر کم‌مصرف آهن، منیزیم و روی در خاک‌های شور کم است و گیاه کمبود این عناصر را نشان می‌دهد؛ از سویی، سمیت کلر و سدیم با افزایش غلظت نمک سبب کاهش نفوذپذیری غشای سلولی و درنهایت کاهش رشد می‌شود. مشخص شده است توان دفع کلر بین پایه‌های مختلف مرکبات متفاوت است و میزان تجمع بیش از حد نیاز یون‌های کلر و سدیم با میزان رشد شاخساره همبستگی منفی دارد (Balal *et al.*, 2012). اگرچه تنش شوری باعث اثر معنادار بر میزان جذب یون‌هایی مانند کلسیم، منیزیم، پتاسیم، روی، آهن و فسفر می‌شود، رابطهٔ شوری و عناصر کم‌مصرف پیچیده است. کشت نوک شاخسارهٔ پایهٔ جیزلا ۵ (Gisela 5) در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) و اعمال تیمارهای مختلف شوری باعث کاهش رشد گیاهچه، کلروفیل و افزایش پرولین و فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Erturk *et al.*, 2007). وجود تنش شوری از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) به تنش اکسیداتیو منجر می‌شود که عواقب مخربی برای گیاهان در سطح سلولی دارد (Molassiotis *et al.*, 2006). آسیب به غشای سلولی، تخریب پروتئین و DNA، تخریب آنزیم‌های سلولی و تغییرات مضر در رشد و ساختار فیزیولوژیکی سلول ازجمله آثار نامطلوب تنش اکسیداتیو به شمار می‌آیند (Sun *et al.*, 2008).

کیتوسان، پلی‌ساکاریدی خطی متشکل از دی‌گلوکوزآمین و N- استیل‌دی‌گلوکوزآمین با فرمول شیمیایی (C6H11O4N)n و ترکیبی غیرسمی و تجزیه‌پذیر است که امروزه به‌علت داشتن ویژگی‌های متعدد نظیر ویژگی‌های ضدقارچی، محرک رشد گیاهی، فعال‌سازی ژن‌های دفاعی گیاه و غیره به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Katiyar *et al.*, 2014). استفاده ازکیتوسان آثار مثبتی بر میزان هورمون‌های درونی، فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز، میزان کلروفیل و سرعت فتوسنتز در ذرت دارد (Yue *et al.*, 2001). بر اساس مشاهده‌های Krupa-Małkiewicz و Fornal (۲۰۱۸)، کاربرد *درون شیشه‌ای* کیتوسان سبب کاهش آثار مخرب تنش شوری در گیاه اطلسی می‌شود و کاربرد کیتوسان با وزن‌های مولکولی و غلظت‌های متفاوت، آثار معناداری بر طول ریشه، طول شاخساره، وزن تر، وزن خشک و میزان آب گیاهچه‌های اطلسی دارد. کاربرد کیتوسان در نهال‌های قهوه در شرایط مزرعه

و گلخانه سبب افزایش میزان کلروفیل، کاروتنوئید، ارتفاع گیاه و جذب مواد معدنی در شرایط خشکی می‌شود (Dzung *et al*., 2011).

سیترنج (*Citrussinensis×Poncirustrifoliata*)، رقم کاریزو (Carrizo) و نارنج (*Citrus aurantium*) از مهم‌ترین پایه‌های مرکبات در کشور محسوب می‌شوند (Goleyn *et al*., 2015). تاکنون به‌علت محدودیت در زمینهٔ اطلاعات ژنتیکی مرکبات و ماهیت طولانی‌بودن روند اصلاحی مرکبات، تعداد اندکی از پایه‌های مقاوم به تنش شوری از طریق برنامه‌های اصلاحی شناسایی شده‌اند. طی دو دههٔ اخیر باتوجه‌به گستردگی ابزارهای نوین ژنتیکی و بیوشیمیایی، فرایند طولانی برنامهٔ اصلاحی با سرعت بیشتری انجام شده است. استفاده از روش‌های کشت بافت به ارائهٔ اطلاعات دقیق‌تر دربارهٔ سازوکار تنش‌های غیرزیستی و تنش شوری در گیاهان منجر می‌شود؛ همچنین تأثیر تیمارهای تعدیل‌کنندهٔ تنش نیز با جزئیات بیشتر قابل‌بررسی‌اند (Seraj *et al*., 2016). گزارش شده است ریشه‌های بسیاری از پایه‌های مرکبات توان دفع کلر و سدیم را دارند (Gonzalez *et al*., 2012)؛ هرچند این ویژگی کاملاً مشخص نشده است (Brito *et al*., 2015). در پژوهش حاضر، دو هدف شامل بررسی اثر تعدیل‌کنندگی کیتوسان بر آثار منفی تنش شوری روی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی گیاهان سیترنج و نارنج در شرایط *در شیشه* و بررسی امکان جذب یون کلر به‌عنوان عامل سمیت اصلی در تنش شوری کلریدسدیم در گیاه باززایی‌شدهٔ بدون سیستم ریشه‌ای مدنظر قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مطالعهٔ حاضر طی سال ۱۳۹۴ در پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. قطعه‌های ساقه با دو جوانهٔ جانبی (به طول ۱ سانتی‌متر) دانهال‌های سیترنج و نارنج به‌عنوان ریزنمونه استفاده شدند. دانهال‌های یک‌سالهٔ سیترنج و نارنج مطالعه‌شده از مرکز تحقیقات مرکبات کشور واقع در شهرستان رامسر تهیه و به گلدان‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ با حجم ۲۰ لیتر، قطر دهانهٔ ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر منتقل شدند. گلدان‌ها با مخلوطی از ماسه، خاکبرگ و خاک باغچه به نسبت مساوی (۱:۱:۱) و به یک اندازه (وزن یکسان) پر شدند. ریزنمونه‌ها پس از ۱ ساعت شستشوی سطحی با آب و به‌منظور ضدعفونی‌شدن، به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریدسدیم ۲ درصد قرار گرفتند و پس‌ازآن، ۳ بار آب‌کشی با آب مقطر، ۳ دقیقه غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد و ۳ بار آب‌کشی با آب مقطر انجام شد.

محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) که با ۹ گرم‌درلیتر آگار جامد شده بود، استفاده شد. محیط‌کشت برای پرآوری (Shooting) جوانه‌ها شامل ۲ میلی‌گرم‌برلیتر بنزیل‌آدنین (benzyladenine) و ۱ میلی‌گرم‌درلیتر ایندول ۳-بوتیریک‌اسید (Indole-3-butyric acid) بود؛ همچنین ۲ میلی‌گرم‌برلیتر تیامین (thiamine)، ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر میواینوزیتول (myo-inositol)، ۲ میلی‌گرم‌درلیتر گلیسین (glycine) در اسیدیتهٔ ۵/۷ برای محیط‌کشت آماده‌سازی شد.

کیتوسان (۰/۰۰۲ گرم) از شرکت مرک (Merck، آلمان) با وزن مولکولی ۱۲۰ کیلودالتون

تهیه و پس‌از حل‌شدن در ۴۰ میلی‌لیتر استیک‌اسید ۱ درصد، پیش‌از اتوکلاو به محیط کشت اضافه شد. اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۰/۱ مگاپاسکال انجام شد. ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت ساخته‌شده درون هریک از شیشه‌های آزمایش ریخته شد و پس‌از کشت ریزنمونه‌ها، نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی و جریان فوتون فتوسنتزی ۴۰ میکرومول مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس‌از پرآوری، غلظت‌های مختلف کلریدسدیم در نخستین واکشت به محیط‌های کشت اضافه شدند و پس‌از ۳۰ روز از نخستین واکشت، تعداد برگ و طول شاخساره اندازه‌گیری شد.

میزان پرولین با استفاده از سولفوسالیسیلیک‌اسید و معرف نین‌هیدرین (ninhydrin) و سپس خواندن جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۱۶۰۱ شرکت Shimadzu، ژاپن) تعیین شد (Bates *et al*., 1973).

سنجش قندهای محلول پس‌از آماده‌کردن نمونه‌ها با الکل ۸۰ درصد و سپس با پرکلریک‌اسید و استفاده از روش آنترونا (Antrona) انجام شد (McCready *et al*., 1950).

به‌منظور اندازه‌گیری کلر، ابتدا ۰/۵ گرم پودر گیاهی با اکسیدکلسیم و آب دوبار تقطیر در کوره و دمای ۵۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد خاکستر شد؛ نمونه پس‌از صاف‌شدن با کاغذ واتمن شمارهٔ ۲ به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و عصارهٔ حاصل به روش تیتراسیون با نیترات‌نقره برای سنجش غلظت کلر اندازه‌گیری شد.

به‌منظور سنجش میزان کلسیم، ابتدا بافت برگی همگن و داخل آون خشک شد و سپس نمونهٔ خشک‌شده پودر شد. نمونه پس‌از عبور از الک ۰/۵ میلی‌متری، به میزان ۰/۵ گرم وزن و سپس با ۲ میلی‌لیتر نیتریک‌اسید ۷۰ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنهٔ ۳۰ درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا مرحلهٔ هضم سپری شود؛ سپس حجم نمونه با آب مقطر دوبار تقطیر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و میزان کلسیم به روش دستگاه نورسنج شعله‌ای (مدل pfp7 شرکت Jenway (UK)) اندازه‌گیری و درنهایت با منحنی استاندارد مقایسه شد.

به‌منظور سنجش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (EC 1.15.1.1) از روش Bor و همکاران (۲۰۰۳) و بر اساس ممانعت از احیای فیتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) استفاده شد؛ به‌این‌ترتیب که ابتدا ۱۰ گرم نمونهٔ برگی با ازت مایع هموژنیزه و سپس با ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر (حاوی ۵۰ میلی‌مول‌درلیتر بافر HEPES و ۰/۱ میلی‌مول‌درلیتر Na_2EDTA با اسیدیتهٔ ۷/۶) ترکیب و سپس عمل سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. فاز رویی محلول برای سنجش کلی سوپراکسیددیسموتاز استفاده شد. محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیتهٔ ۷/۵ تهیه و سپس برای تهیهٔ مخلوط واکنش، ترکیبات اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA) ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ریبوفلاوین ۴ میکرومولار با حجم‌های مشخص ۱ میلی‌لیتر و

به‌ترتیب به بافر اضافه شدند. پیش‌از اضافه‌کردن ترکیبات یادشده به بافر فسفات‌پتاسیم، ظرف حاوی مخلوط واکنش به‌خوبی با فویل آلومینیومی پوشانده شد تا نور به آن نفوذ نکند؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ عصاره با سمپلر درون هریک از لوله‌های آزمایش ریخته و ۳ میلی‌لیتر از محلول یادشده به آن اضافه شد؛ پس‌از این مرحله، لوله‌ها بسیار سریع درون جالوله‌ای و با فاصلهٔ ۵۰ سانتی‌متر در روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰ وات) قرار داده شدند و واکنش آغاز شد. پس‌از گذشت ۱۵ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. ۳ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده با بافر فسفات‌پتاسیم که بدون عصاره بود (شاهد)، بدون آنکه نور ببیند، درون کوات ریخته و دستگاه با آن صفر شد. به‌منظور سنجش فعالیت این آنزیم علاوه‌بر شاهد به نمونهٔ کنترل نیز نیاز است که به آن شاهد روشنایی گفته می‌شود؛ برای تهیهٔ شاهد روشنایی، لولهٔ آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش (بدون عصاره) همراه با دیگر لوله‌های حاوی عصاره برای مدت زمان یادشده زیر نور فلورسنت قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نمونه‌ها در مقایسه با شاهد روشنایی ارزیابی شد.

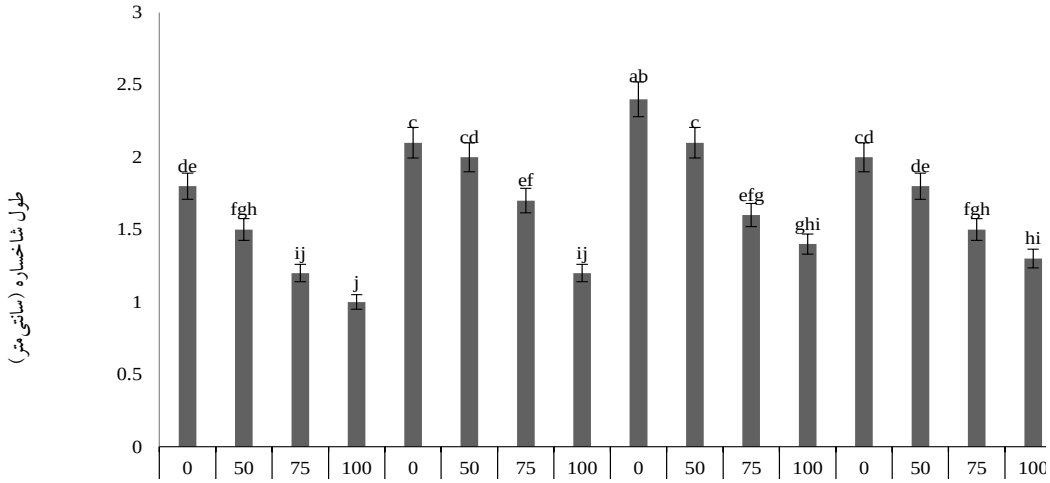
میزان پتاسیم پس‌از تهیهٔ نمونهٔ برگی و هضم آن با محلول اسیدی پرکلریک‌اسید (HNO_3- $HClO_4$) به نسبت ۱:۴ با استفاده از دستگاه جذب اتمی (مدل 220fs شرکت Varian،آمریکا) تعیین شد.

آزمایش به‌شکل فاکوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌شکل شوری در چهار سطح (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم)،کیتوسان در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و پایهٔ مرکبات در دو سطح (نارنج و سیترنج) در سه تکرار اجرا شد. تیمار صفر، شاهد در نظر گرفته شد. هر شیشهٔ آزمایش حاوی ۳ ریزنمونه بود. مقایسهٔ میانگین از طریق آزمون حداقل اختلاف معنادار (LSD) با نرم‌افزار آماری JMP7 در سطح ۱ و ۵ درصد انجام شد.

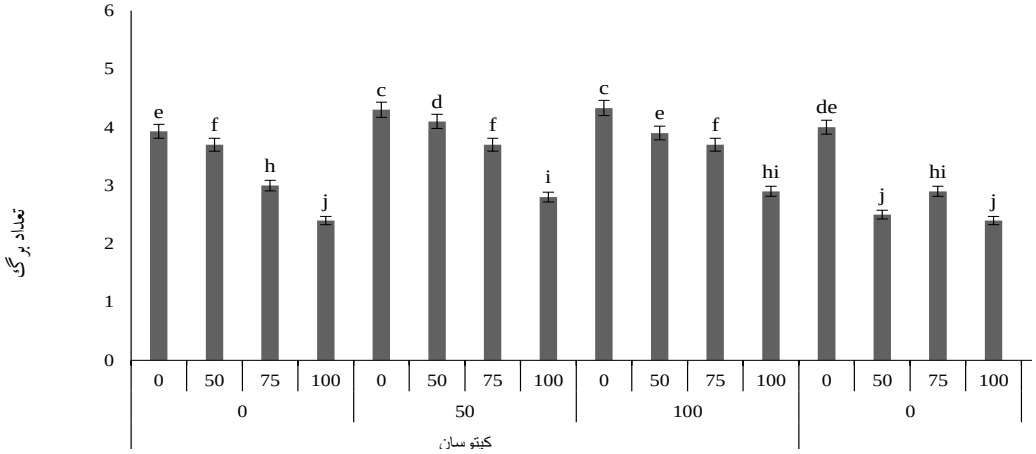
نتایج

صفت‌های ریخت‌شناختی: بر اساس شکل ۱، طول شاخساره با افزایش سطح کلریدسدیم، روند کاهشی نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که طول شاخسارهٔ هر دو پایهٔ آزمایش‌شده در غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم اختلاف معناداری نسبت به تیمار شاهد (صفر میلی‌مولار) دارد. بیشترین طول شاخساره به میزان ۲/۶ سانتی‌متر در پایهٔ نارنج و در تیمار شاهد کلریدسدیم و غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام کیتوسان مشاهده شد؛ درحالی‌که کمترین طول شاخساره در پایهٔ سیترنج و در تیمار شاهد کیتوسان و غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم گزارش شد (شکل ۱). تنها غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام کیتوسان در تیمار ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم اثر معناداری بر طول شاخسارهٔ پایهٔ سیترنج داشت (شکل ۱)؛ درحالی‌که سایر تیمارهای کیتوسان تأثیر معناداری نشان ندادند. پایهٔ نارنج در مقایسه با سیترنج میزان رشد بیشتری نشان داد؛ هرچند ازنظر آماری معنادار نبود. محیط‌کشت حاوی کیتوسان نسبت به تیمار شاهد (بدون کیتوسان) رشد شاخسارهٔ بیشتری را سبب شد. کاهش تعداد برگ در

پایه‌های سیترنج و نارنج با افزایش غلظت نمک مشاهده شد (شکل ۲). تعداد برگ در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف کیتوسان اختلاف معناداری نسبت به تیمار بدون کیتوسان داشت؛ بیشترین تعداد برگ (۴/۸) در تیمار شاهد (بدون کیتوسان و شوری کلریدسدیم) در پایهٔ نارنج و کمترین تعداد برگ (۲/۴) در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و بدون کیتوسان پایه‌های سیترنج و نارنج مشاهده شد؛ به‌طورکلی در اتاق رشد، تعداد برگ‌های بیشتری در پایهٔ نارنج نسبت به پایهٔ سیترنج حاصل شد. نارنج ازنظر ژنتیکی پررشدتر از سیترنج گزارش شده است.

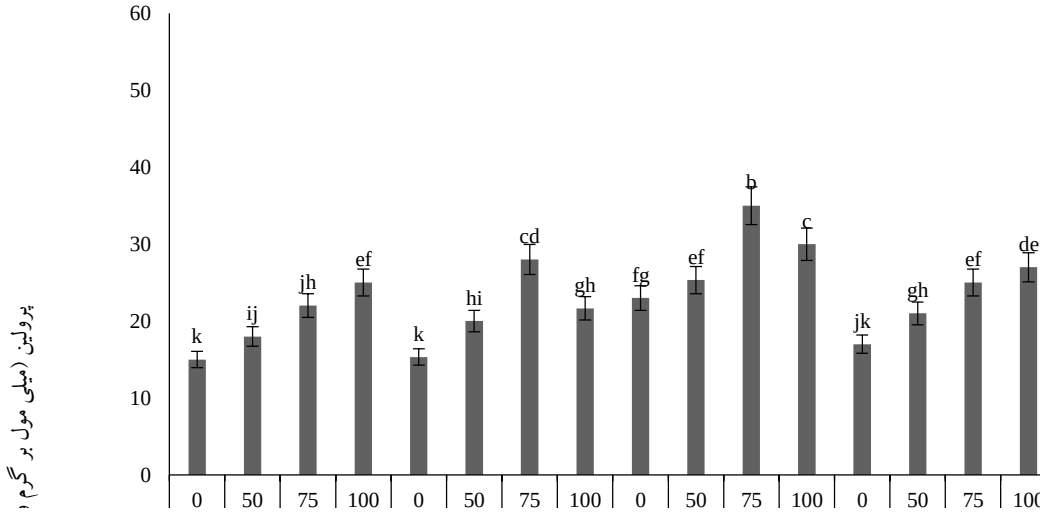


شکل ۱- مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر طول شاخسارهٔ دو پایه از مرکبات (نارنج و سیترنج) در شرایط *درون شیشه*؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P \leq 0.01$ را نشان می‌دهند.



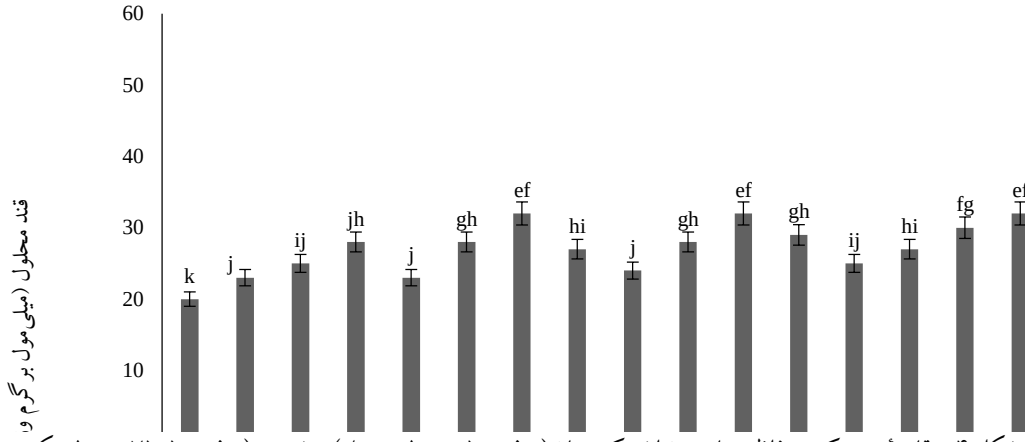
شکل ۲- مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر تعداد برگ دو پایه از مرکبات (نارنج و سیترنج) در شرایط *درون شیشه*؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P \leq 0.01$ را نشان می‌دهند.

تغییرات پرولین و قندهای محلول: بیشترین میزان پرولین (۴۵ میلی‌مول‌برگرم) در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و بدون کیتوسان در پایهٔ نارنج و کمترین میزان پرولین (۱۵ میلی‌مول‌برگرم) در تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم و کیتوسان) در پایهٔ سیترنج گزارش شد (شکل ۳). اختلاف معنادار ($P\leq۰/۰۱$) میزان پرولین نسبت به شاهد با افزایش سطوح شوری در هر دو پایهٔ آزمایش‌شده مشاهده شد (شکل ۳). کاربرد کیتوسان اثر معناداری در هر دو پایهٔ آزمایش‌شده در مقایسه با تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم و کیتوسان) نشان داد. به‌غیراز تفاوت معنادار بین تیمارهای شاهد کلریدسدیم با سایر تیمارها، میزان پرولین در پایهٔ سیترنج تنها در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام کیتوسان و سطوح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار نمک معنادار بود؛ درحالی‌که در پایهٔ نارنج، معناداری در تمام غلظت‌های شوری و همهٔ غلظت‌های کیتوسان رخ داد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسهٔ برهم‌کنش غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر میزان پرولین شاخسارهٔ دو پایه از مرکبات (نارنج و سیترنج)؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P\leq0.01$ را نشان می‌دهند.

برهم‌کنش کیتوسان، شوری و پایه‌های مرکبات بررسی‌شده سبب اختلاف معنادار میزان قند محلول تیمارها شد (شکل ۴). بیشترین میزان قند محلول در تیمارهای ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کیتوسان در پایهٔ نارنج (۵۲ میلی‌مول‌برگرم) و کمترین میزان قند محلول در تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم و کیتوسان)در پایهٔ سیترنج مشاهده شد (شکل ۴). باتوجه‌به شکل ۴، افزایش میزان قند محلول با افزایش غلظت نمک و سطح کیتوسان مشاهده شد. به‌طورکلی، میزان قند محلول در اثر تنش شوری در پایهٔ نارنج در مقایسه با پایهٔ سیترنج بیشتر بود؛ به‌طوری‌که، افزایش غلظت کیتوسان در پایهٔ سیترنج اثر معناداری در میزان قند محلول نداشت، اما افزایش معناداری در پایهٔ نارنج مشاهده شد (شکل ۴).

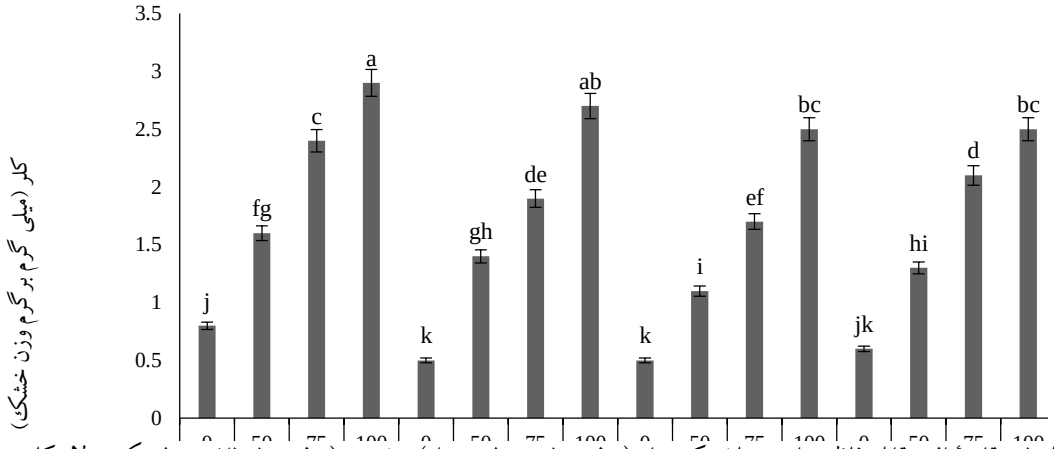


شکل ۴- مقایسهٔ برهم‌کنش غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر میزان قند محلول شاخسارهٔ نارنج و سیترنج؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P\leq0.01$ را نشان می‌دهند.

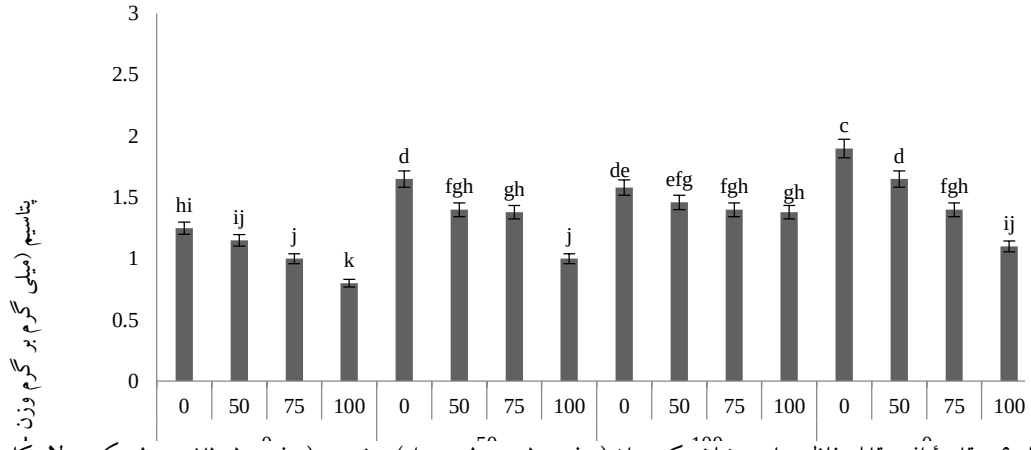
تغییرات یون‌های کلر، پتاسیم و کلسیم: با افزایش سطوح کلریدسدیم در محیط کشت، افزایش میزان یون کلر در هر دو پایهٔ مرکبات دیده شد (شکل ۵)؛ به‌طوری‌که، اختلاف معناداری بین سطوح مختلف شوری و تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم) در سیترنج و نارنج مشاهده شد. بیشترین میزان یون کلر جذبی (۲/۹ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) توسط برگ‌های پایهٔ سیترنج در تیمار بدون کیتوسان و غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد و کمترین میزان کلر (۰/۵ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای شاهد (بدون کلریدسدیم و کیتوسان) ثبت شد. اگرچه با افزایش سطوح مختلف شوری و تیمار کیتوسان، همچنان جذب کلر توسط شاخساره‌های سیترنج و نارنج روند افزایشی نشان داد، این روند در نارنج شیب ملایم‌تری انجداشت (شکل ۵)؛ همچنین تیمارهای کیتوسان در مقایسه با شاهد (بدون کیتوسان) به‌ویژه در پایهٔ نارنج تا حدی موجب تعدیل جذب کلر شدند. باوجود معناداری کلر بین سطوح مختلف کیتوسان، اثر معناداری زیادی بین تیمارهای سطوح تیمارهای کیتوسان و شوری یافت نشد (شکل ۵).

با افزایش سطح شوری، میزان پتاسیم برگ در پایه‌های آزمایشی به‌طور معناداری کاهش نشان داد (شکل ۶). بیشترین میزان پتاسیم جذبی (۱/۹ میلی‌گرم‌درگرم وزن خشک) در تیمار شاهد پایهٔ نارنج و در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام کیتوسان مشاهده و کمترین مقدار پتاسیم (۰/۸ میلی‌گرم‌درگرم وزن خشک) در تیمار شاهد کیتوسان حاوی ۱۰۰ میلی‌مولارکلریدسدیم در پایهٔ سیترنج گزارش شد (شکل ۶). کاربرد کیتوسان اختلاف معناداری را در سطح ۱ درصد بین تیمارهای شاهد و تیمارهای حاوی این ترکیب به همراه داشت.

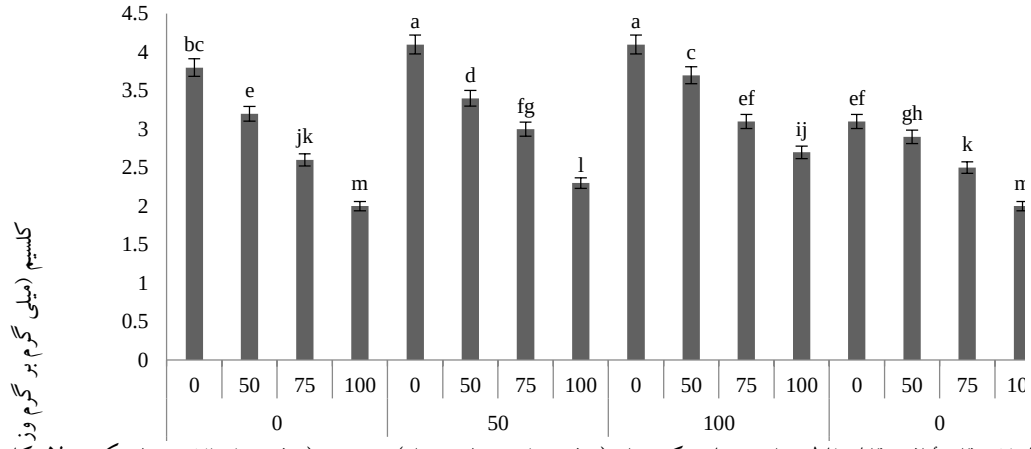
بیشترین میزان کلسیم برگ در تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم) به همراه ۱۰۰ پی‌پی‌ام کیتوسان در پایهٔ سیترنج با ۴/۱ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک بود؛ درحالی‌که کمترین میزان کلسیم در همان پایه و در تیمار بدون کیتوسان به همراه ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم با ۲ میلی‌گرم‌بر گرم وزن خشک یافت شد (شکل ۷). با افزایش سطح شوری، میزان کلسیم روند کاهشی نشان داد. در تیمارهای حاوی کیتوسان، میزان کلسیم بیشتری نسبت به تیمارهای بدون کیتوسان در هر دو پایه گزارش شد (شکل ۷).



شکل ۵- مقایسهٔ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر کلر برگ نارنج و سیترنج در محیط‌کشت MS؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح P≤0.01 را نشان می‌دهند.

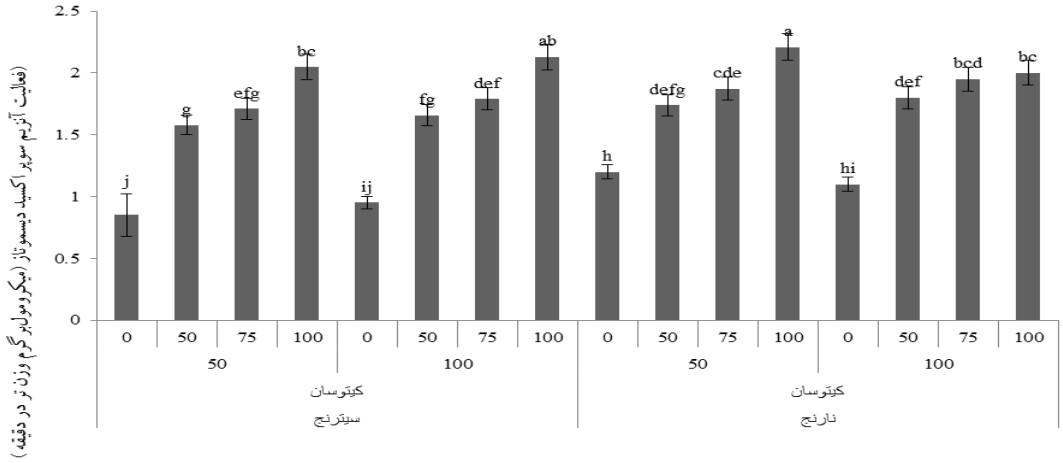


شکل ۶- مقایسهٔ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر میزان پتاسیم برگ نارنج و سیترنج در محیط‌کشت MS؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح P≤0.01 را نشان می‌دهند.



شکل ۷- مقایسهٔ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر میزان کلسیم برگ نارنج و سیترنج در محیط‌کشت MS؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح P≤0.01 را نشان می‌دهند.

تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD): باتوجه‌به شکل ۸، با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۵۰ پی‌پی‌ام کیتوسان در پایهٔ نارنج با ۲/۱۷ میکرومول‌برگرم وزن تر در دقیقه و کمترین میزان فعالیت آنزیم به تیمار شاهد (بدون کلریدسدیم) به همراه ۵۰ پی‌پی‌ام کیتوسان در پایهٔ سیترنج با ۰/۷۸ میکرومول‌برگرم وزن تر در دقیقه اختصاص یافت.



شکل ۸- مقایسهٔ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوسان (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و شوری (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کلریدسدیم) بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ نارنج و سیترنج در محیط‌کشت MS؛ حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P\leq0.01$ را نشان می‌دهند.

نتایج حاضر با نتایج بسیاری از پژوهشگران همخوانی دارند. Mahdavi و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز تحت‌تأثیر کیتوسان افزایش می‌یابد. اعمال خارجی کیتوسان باعث افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز می‌شود. روند افزایشی فعالیت سوپراکسیددیسموتاز هنگام تنش خشکی ادامه داشت؛ درحالی‌که با توقف تنش خشکی، سطوح فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در تیمارهای حاوی کیتوسان کمی بیشتر از تیمارهای شاهد (بدون کیتوسان) بود که نشان می‌دهد کیتوسان از طریق افزایش بیان مؤثر آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز باعث کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و درنهایت آسیب سلولی می‌شود (Jiao *et al*., 2012).

بحث

میزان رشد شاخساره همبستگی منفی با تجمع یون کلر و افزایش غلظت آن در برگ‌ها دارد (Shafieizargar *et al*., 2015). کاهش تعداد برگ، طول اندام‌های هوایی و زردی برگ‌ها ازجمله اصلی‌ترین نشانه‌های تنش شوری در گیاهان به شمار می‌آیند (Gonzalez *et al*., 2012). نتایج یادشده با نتایج Erturk و همکاران (۲۰۰۷) روی

پایهٔ جیزلای گیلاس در معرض تنش شوری و Seraj و همکاران (۲۰۱۶) و Mondal و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه ماش همخوانی دارد. کاهش رشد ناشی از افزایش سطح شوری را می‌توان به تأثیر پتانسیل اسمزی و سمیت نمک نسبت داد (Ruiz *et al.*, 2016). در مطالعهٔ حاضر، غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم باعث کلروز برگ‌ها شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بر اساس پژوهش Knight و همکاران (۱۹۹۲)، تنش شوری به کاهش رشد شاخساره و ریشهٔ گوجه‌فرنگی در محیط هیدروپونیک منجر می‌شود. مشخص شده است غلظت کیتوسان تأثیر مثبتی بر رشد و عملکرد گیاهان در شرایط تنش دارد. در بذرهای پیش‌تیمارشدهٔ گلرنگ با کیتوسان، اثر معنادار کیتوسان بر ارتفاع شاخساره در سطوح مختلف تنش شوری دیده می‌شود (Jabeen and Rafiq, 2012). کیتوسان با افزایش غلظت کلروفیل در شرایط تنش باعث بهبود کارایی فتوسنتز و تجمع ترکیبات آلی در گیاهان می‌شود (Sheikha and AL-Malki, 2011). کیتوسان فعالیت آنزیم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز را که باعث حفظ غشای پلاسمایی سلول در برابر آثار مخرب رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌شوند، افزایش می‌دهد (Parihar *et al.*, 2014). مشاهده شده است کیتوسان با بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز) باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها طی تنش خشکی در سیب می‌شود (Yang *et al.*, 2009). پیش‌تیمار بذرهای گلرنگ و آفتابگردان با تیمارهای کیتوسان (۰/۵ و ۰/۷۵ درصد) علاوه‌بر افزایش سرعت و میزان جوانه‌زنی بذرها باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تنش شوری می‌شود (Jabeen and Rafiq, 2012). کیتوسان از طریق حفاظت سیستم غشایی سبب کاهش آثار زیان‌بار تنش شوری و تحمل گیاه نسبت به تنش می‌شود؛ هرچند این موضوع به‌خوبی روشن نیست. کیتوسان می‌تواند با افزایش کلسیم سیتوزولی، فعال‌سازی آنزیم MAP-Kinase، توقف فعالیت آنزیم H-ATPase در غشای پلاسمایی، تغییرات کروماتین، سنتز آلکالوئیدها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (نظیر جاسمونیک‌اسید و آبسیزیک‌اسید) باعث جلوگیری از تخریب سیستم غشایی شود (Amborabe *et al.*, 2008).

برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند کیتوسان با تحریک سلول‌های اپیدرمی تنباکو برای تولید آب‌اکسیژنه و اکسیدنیتریک که به تحریک بسته‌شدن روزنه‌ها منجر می‌شود، باعث ایجاد مقاومت در برابر تنش می‌شود (Ge *et al.*, 2006). بسته‌شدن روزنه‌ها ازجمله مزایای کیتوسان است که باعث بهبود کارایی مصرف آب، افزایش مقاومت برگ در برابر تعرق و درنهایت مقاومت به تنش شوری می‌شود (Zeng and Luo, 2012). Lee و همکاران (۱۹۹۹) معتقدند کیتوسان مانند آبسیزیک‌اسید به‌عنوان هورمون گیاهی عمل می‌کند و از طریق کاهش تعرق آبی سلول‌های برگ باعث حفظ پتانسیل اسمزی سلول می‌شود. پایهٔ نارنج تعداد برگ و طول شاخسارهٔ بیشتری نسبت به پایهٔ سیترنج داشت که علت آن به تفاوت ژنتیکی این دو پایه برمی‌گردد؛ به‌طوری‌که پایهٔ نارنج پررشدتر و قوی‌تر از پایهٔ سیترنج است (Sanchez *et al.*, 2006).

آمینواسید پرولین ازجمله تنظیم‌کننده‌های اسمزی است که در بسیاری از گیاهان عالی شناسایی شده است و معمولاً در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد (Murakeozyo *et al*., 2003)؛ شکسته‌شدن سریع پرولین پس‌از پایان‌یافتن شرایط تنش، تأمین‌کنندهٔ عوامل لازم برای فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ATP برای ترمیم آسیب‌های ناشی از تنش است (Parihar *et al*., 2014). در مطالعهٔ حاضر با افزایش سطح شوری، میزان پرولین آزاد برگ‌ها در هر دو پایه به‌تدریج افزایش یافت (شکل ۳)؛ نتایج حاضر با نتایج Naidu و همکاران (۱۹۹۲) در کالوس جو همخوانی دارند. تجمع مواد محلول سازگار باعث افزایش اسمولاریتهٔ سلول و کاهش خروج جریان آبی می‌شود؛ این پدیده باعث ایجاد تورژسانس می‌شود که در توسعهٔ سلولی ضروری است. به‌منظور حفظ یکپارچگی غشایی در شرایط تنش شوری لازم است از تغییر ساختمان پروتئین‌ها جلوگیری شود (Koca *et al*., 2007). مشاهده شده است محلول‌پاشی نانوکیتوسان در لوبیا باعث افزایش میزان پرولین طی تنش شوری می‌شود (Zayed *et al*., 2017). سازوکار دقیق برهم‌کنش نانوذرات در راستای حفظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه در برابر تنش شوری به مطالعه‌های بیشتری نیاز دارد. مشاهده شده است محلول‌پاشی کیتوسان باعث تحریک تجمع پرولین در برگ‌های آویشن می‌شود؛ به‌طوری‌که سطح پرولین در برگ‌های آویشن با کاربرد خارجی کیتوسان (۴۰۰ پی‌پی‌ام) به میزان ۲۰ درصد افزایش نشان می‌دهد (EmamiBistgani *et al*., 2017). اثر متقابل پرولین با آنزیم‌ها سبب حفظ ساختار پروتئین‌ها و فعالیت‌های مربوط به آنها می‌شود. کیتوسان و پرولین به‌عنوان مخزن کربن و نیتروژن و پالایندهٔ رادیکال آزاد عمل می‌کنند (Mahdavi *et al*., 2011; Krupa-Małkiewicz and Fornal, 2018).

بیشترین میزان قند محلول در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم حاصل شد (شکل ۴). با افزایش غلظت نمک، میزان قند محلول هم افزایش معناداری نشان داد که با نتایج Koca و همکاران (۲۰۰۷) در کنجد و Rathore و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه استویا در شرایط *درون شیشه* مطابقت دارد. قندهای محلول به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی موجب ثبات غشاهای سلولی و حفظ تورژسانس سلول‌ها می‌شوند (Al-Yassin, 2004)؛ درحقیقت، درگیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش شوری تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر انجام می‌شود (Murakeozyo *et al*., 2003). نقش قندها به‌عنوان پیش‌ماده در متابولیسم کربن و انرژی شناخته شده است و حفاظت از گیاه در برابر ازدست‌دادن آب به افزایش قندها در اندام‌های گیاه بستگی دارد. تنش شوری، تبدیل قندها و سایر کربوهیدرات‌ها مانند ساکارز و نشاسته به قندهای الکلی و پرولین را در پی دارد (Koca *et al*., 2007). کاربرد خارجی کیتوسان در نخود در شرایط شوری باعث افزایش تجمع کربوهیدرات و پرولین می‌شود (Mahdavi and Safari, 2015). کیتوسان با استفاده از افزایش تجمع قندهای محلول در سلول و تنظیم اسمزی سلول‌های گیاهی باعث تعدیل آثار مخرب تنش شوری می‌شود (Dzung *et al*., 2011; Gonzalez *et al*., 2015).

کاهش میزان پتاسیم در اثر افزایش کلریدسدیم در پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران دربارهٔ کاهش جذب و انتقال پتاسیم در بسیاری از گیاهان در معرض تنش شوری مطابقت دارد (Amini and Ehsanpour, 2005; Knight *et al*., 1992). پیش‌ازاین، اثر آنتاگونیستی بین عناصر پتاسیم و سدیم اثبات شده است (Taylor and Dimsey, 1993; Murkute *et al*., 2005)؛ همچنین کمبود پتاسیم در سطح سلولی ممکن است ناشی از اثر تنش اکسیداتیو و مرگ سلولی باشد (Erturk *et al*., 2007). پژوهشگران با محلول‌پاشی نانوکیتوسان به مقدار ۵ پی‌پی‌ام، افزایش معنادار مقدار پتاسیم برگ نسبت به نمونهٔ شاهد (بدون کیتوسان) را در دو رقم انبه گزارش کرده‌اند (Zagzog *et al*., 2017). افزایش جذب پتاسیم در تیمارهای کیتوسان با غلظت بیشتر (۱۰۰ پی‌پی‌ام) هنوز به‌طور جامع مشخص نشده و علت آن، مطالعه‌های اندک در این زمینه در شرایط عادی و تنش است (Guan *et al*., 2009)؛ این افزایش ممکن است ناشی از تقویت جذب عناصر غذایی با بهبود نفوذپذیری غشای سلولی باشد. نقش کیتوسان در افزایش جذب یونی را می‌توان ناشی از آثار این ترکیب در تثبیت غشای سلولی از طریق افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و حفظ غشای سلولی از تنش اکسیداتیو قلمداد کرد؛ همچنین یکی از علل افزایش نفوذپذیری غشای سلولی با ترکیبات آمین در کیتوسان مرتبط است (Mondal *et al*., 2013; EmamiBistgani *et al*., 2017).

اثر سمیت یون کلر با افزایش غلظت این عنصر در محیط‌کشت تشدید می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهند برخی گونه‌های مرکبات در معرض تنش شوری، کلر و سدیم را در برگ‌های خود تجمع می‌دهند. غلظت کلر، سدیم و پتاسیم در برگ‌های گیاهان تیمارشده با نمک کلریدسدیم باتوجه‌به سن، موقعیت برگ و نوع گونهٔ گیاهی متفاوت است (Gonzalez *et al*, 2012). احتمالاً غلظت کلر زیاد در برگ سیترنج نسبت به نارنج و همچنین غلظت بیشتر یون پتاسیم در نارنج نسبت به سیترنج با ایجاد تعادل بهینه باعث مقاومت بیشتر نارنج نسبت به پایهٔ سیترنج می‌شود؛ همچنین باتوجه‌به مطالعهٔ حاضر، این احتمال وجود دارد که حتی بدون داشتن سیستم ریشه‌ای، همچنان شاخساره قادر به جذب کلر باشد. کلر در نارنج با محدودیت جذب بیشتری نسبت به سیترنج مواجه است که گویای مقاومت بیشتر پایهٔ نارنج به تنش شوری در مقایسه با سیترنج است.

در مطالعهٔ حاضر با افزایش غلظت نمک، تعداد برگ، طول شاخساره و رشد سیترنج و نارنج با محدودیت مواجه شد. دو گونه واکنش‌های نسبتاً متفاوتی نسبت به تنش نشان دادند و پایهٔ نارنج به‌علت جذب کمتر کلر، پایهٔ مقاوم‌تری بود. کیتوسان به‌علت داشتن پتانسیل لازم برای تحریک رشد گیاهی و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان، ابزاری سودمند برای تعدیل آثار نامطلوب تنش شوری به شمار می‌آید. سنجش *درون شیشه‌ای* می‌تواند سیستمی ایده‌آل برای ارزیابی پتانسیل ژنتیکی گونه‌های گیاهی در بستری کنترل‌شده با مکان و زمان محدود فراهم کند.

References

Al-Yassin, A. (2004) Influence of salinity on citrus: A review paper. Journal of Central European Agriculture 5(4): 263-272.

Amborabe, B. E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. (2008) Early events induced by chitosan on plant cells. Journal of Experimental Botany 59: 2317-324.

Amini, F. and Ehsanpour, A. A. (2005) Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na^+/K^+ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 1(4): 204-208.

Balal, R. M., Khan, M. M., Shahid, M. A., Mattson, N. S., Abbas, T., Ashfaq, M., Garcia Sanchez, F., Ghazanfer, U., Gimeno, V. and Iqbal, Z. (2012) Comparative studies on the physio-biochemical, enzymatic, and ionic modifications in salt-tolerant and salt-sensitive citrus rootstocks under NaCl stress. Journal of American Society of Horticulture Science 137(2): 86-95.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline in eater stress studies. Plant Soil 39: 205-208.

Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2003) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Science 164: 77-84.

Brito, M. E. B., Da Silva, E. C. B., Fernandes, P. D., Filho, W. S. S., Filho, M. A. C., Silva, F. V., Melo, A. S. and Barbosa, R. C. A. (2015) Salt balance in substrate andgrowth of 'Tahiti' acid lime grafted onto Sunki mandarin hybrids under salinity stress. Australian Journal of Crop Science 9(10): 954-961.

Dzung, N. A., Khanh, V. T. P. and Dzung, T. T. (2011) Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. Carbohydrate Polymers 84: 751-755.

EmamiBistgani, Z., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G. and 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.

Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007) Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. Biologia Plantarum 51(3): 597-600.

Ge, T. D., Sui, F. G. and Bai, L. P. (2006) Effects of waterstress on the protective enzyme activities and lipid peroxidation in roots and leaves of summer maize. Agricultural Sciences in China 5(4): 291-298.

Goleyn, B., Rabie, V., Mir-Abbasi, F., Fifae, R. and Halaji-Sani, M. F. (2015) Effect of salinitystress on physiological and biochemical traits in citrus genotypes. Journal of Horticultural Science 29(3): 416-425.

Gonzalez, J. P, Syvertsen P. and Exeberria E. D. (2012) Sodium distribution in salt-stressed citrus rootstock seedlings. Hortscience 47(10): 1504-1511.

Gonzalez, L. M., Guerrero, Y. R., Rodriguez, A. F. and Vazquez, N. M. (2015) Effect of seed treatment with chitosan on the growth of rice (*Oryzasativa*) seedlings cv. incalp-5 in saline medium. Cultivos Tropicales 36(1): 136-142.

Guan, Y., Hu, J., Wang, X. and Shao, C. (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. Journal of Zhejiang University Science 10(6): 427-433.

Jabeen, N. and Rafiq, A. (2012) The activity of antioxidant enzymesinresponse to salt stress in safflower (*Carthamustinctorius* L.) and

sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treatedwith chitosan. Journal of Science and Food Agricultur 93: 1699-1705.

Jiao, Z., Li, Y., Li, J., Xu, X., Li, H., Lu, D. and Wang, J. (2012) Effects of exogenous chitosan on physiological characteristics of potato seedlings under drought stress and rehydration. Potato Research 55(3): 293-301.

Katiyar, D. A., Singh, H. B. and Bhanu, N. (2014) A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. Advance in Plants and Agriculture Research 1: 1-8.

Knight, S. L., Rogers, R. B., Smith, M. A. L. and Spomer, L. A. (1992) Effects of NaCl salinity on miniature dwarf tomato ‘‘Micro-Tom’’: Growth analysis and nutrient composition. Journal of Plant Nutrition 15: 2315-2327.

Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation,antioxidative enzymes and proline content ofsesame cultivars. Environmental and Experimental Botany 60: 344-351.

Krupa-Małkiewicz, M. and Fornal, N. (2018) Application of chitosan *in vitro* to minimize the adverse effects of salinity in *Petunia×atkinsiana* D. don. Journal of Ecological Engineering 19(1): 143-149.

Lee, S., Choi, H. and Suh, S. (1999) Oligo galaturonic acidand chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and Commelina Communis. Plant Physiology 121: 147-152.

Mahdavi, B., ModarresSanavy, S. A. M., Aghaalikhani, M. and Sharifi, M. (2011) Effect of water stress and chitosan on germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Crop Improvement 25: 728-741.

Mahdavi, B. and Safari, H. (2015) Effect of chitosan on growth and some physiological characteristics of chickpea under salinity stress condition. Journal of Plant Process and Function 4(12): 117-127.

Molassiotis, A. N., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G., Diamantidis, G. and Therios, I. (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biologia Plantarum 50: 61-68.

Mondal, M. M. A., Malek, M. A., Puteh, A. B. and Ismail, M. R. (2013) Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* L.). Bangladesh Journal of Botany 42 (1): 179-183.

McCready, R. M., Fray, V. A. and Dalins, S. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry 229: 1156-1158.

Murakeozyo, E. P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A. and Tuba, Z. (2003) Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. Journal of Plant Physiology 160: 395-401.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 437-497.

Murkute, A. A., Sharma, S. and Singh, S. K. (2005) Citrus in terms of soil and water salinity: A review. Journal of Scientific and Industrial Research 64: 393-402.

Naidu, B. P., Aspinall, D. and Paleg, L .G. (1992) Variability in prolineaccumulating ability of barley (*Hordeumvulgare* L.) cultivars induced by vapor pressure deficit. Plant Physiology 98: 716-722.

Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Pratap Singh, V. and Prasad, S. M. (2014) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: A review. Environmental Science and Pollution Research 1-20.

Rathore, S., Singh, N. and Singh, S. K. (2014) Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Steviarebaudiana*regenerated *in vitro*. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 10(2): 287-296.

Ruiz, M., Quinones, A., Martinez-Alcantara, B., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., Primo-Millo, E. and Martinez-Cuenca, M. R. (2016) Effects of salinity on diploid (2x) and doubled diploid (4x) *Citrus macrophylla* genotypes. Scientia Horticulturae 207: 33-40.

Sanchez, G. F., Peres J. G., Botina, P. and Martinez, V. (2006) The response of young mandarin trees grown under saline conditions depends on the rootstock. European Journal of Agronomy 24: 129-139.

Seraj, F., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y. and GhasemiOmran, V. (2016) The effect of *Piriformospora indica* inoculation on salt and drought stress tolerance in *Steviarebaudiana*. Iranian Journal of Plant Biology 8(29): 1-20.

Shafieizargar, A. Z., Awang, Y., Juraimi, A. S., Othman, R. and KalantarAhmadi, A. (2015) Assessing five citrus rootstocks for NaClsalinity tolerance using mineral concentrations, prolineand relative water contents as indicators. Asian Journal of Plant Sciences 14(1): 20-26.

Sheikha, S. A. K. and AL-Malki, F. M. (2011) Growth and chlorophyll responses of Bean Plants to the chitosan applications. European Journal of Scientific Research 50(1): 124-134.

Sun, T., Yao, Q., Zhou, D. and Mao, F. (2008) Antioxidant activity of N-carboxy methyl chitosan oligosaccharides. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 18: 5774-5776.

Taylor, B. K. and Dimsey R. T. (1993) Rootstock and scion effects on the leaf nutrient composition of citrus trees. Australian Journal of Experimental Agriculture 33: 363-371.

Yang, F., Hu, J., Li, J., Wu, X. and Qian, Y. (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. Plant Growth Regulation 58(2): 131-136.

Yue, D. Y. Z., Zhi, M. Z., Yong, G. Q., Yin, G. W. and Xiu, J. (2001) Effect of chitosan on physiological activities in germinating seed and seedling leaves of maize. Journal of Habei Vocation - Technical Teachers College 15(4): 9-12.

Zagzog, O. A., Gad, M. M. and Hafez, N. K. (2017) Effect of nano-chitosan on vegetative growth, fruiting and resistance of malformation of mango. Trends in Horticultural Research 7(1): 11-18.

Zayed, M. M., Elkafafi, S. H., Amina, M. G., Zedan. and Sherifa F. M. D. (2017) Effect of nano chitosanon growth, physiological and biochemical parameters of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. Journal of Plant Production 8(5): 577-585.

Zeng, D. and Luo, X. (2012) Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. Journal of Soil Science 2: 282-288.