



Evaluation of the potential of chitosan and nanochitosan on improving the growth and yield of marigold (*Calendula officinalis* L.) under salt stress conditions

Zohreh Bolhassani  | Mohammad Feizian 

1. Corresponding Author, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: z.bolhasani93@yahoo.com

2. Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: feiziam.m@lu.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: Jan. 25, 2025

Revised: Apr. 29, 2025

Accepted: June. 22, 2025

Published online: Aug. 2025

Keywords:

Proline,
Modulator,
Photosynthetic Pigments,
Relative Leaf Water Content,
Ion Leakage.

ABSTRACT

Salinity is one of the most significant stresses that reduce the performance of most plants worldwide. Plants utilize various mechanisms in response to environmental stresses. Chitosan, a natural biopolymer, acts as a biostimulant and a non-toxic, environmentally friendly compound, widely effective in response to biotic and abiotic stresses. To investigate the effect of chitosan and nano-chitosan on the morphophysiological characteristics of *Calendula officinalis* L. under salinity stress, a greenhouse experiment was conducted. Treatments included four salinity levels (0, 50, 100, and 150 mM from sodium chloride source) and five modifier levels (0, 0.25, 0.5 g/L chitosan and 0.25 and 0.5 g/L nano-chitosan) in a factorial arrangement based on a completely randomized design with three replications. The results showed that the highest fresh and dry weight of the whole plant and flower, number of flowers, number of leaves, and plant height were observed in the 0.5 g/L nano-chitosan foliar application treatment under non-stress conditions. The lowest levels of these traits were observed in the 150 mM sodium chloride stress treatment without modifier application. application of 150 mM sodium chloride stress reduced the relative water content of leaves by 12.6% compared to the control. Foliar application of modifiers significantly increased the relative water content of leaves compared to the control. Salinity stress increased ion leakage, but foliar application of modifiers reduced ion leakage. Also, the highest amount of photosynthetic pigments was observed in the 0.5 g/L nano-chitosan foliar application treatment under non-stress conditions, and the lowest amount of these traits was observed in the control. The results of mean comparison showed that the highest proline content was related to the 150 mM salt and 0.5 g/L nano-chitosan foliar application treatment at 3.44 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight. The lowest proline concentration was observed in the control treatment at 1.64 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight. According to the obtained results, it seems that foliar application of nano-chitosan can be introduced as a suitable modifier to increase the performance of *Calendula officinalis* L. under salinity stress conditions.

Cite this article: Bolhassani, Z. & Feizian, M., (2025) Evaluation of the potential of chitosan and nanochitosan on yield and flower yield components of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. under salt stress conditions, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 56 (6), 1519-1538. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.389240.669870>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.389240.669870>



EXTENDED ABSTRACT

Background and Objectives

Since salinity stress is considered a limiting factor in agricultural production, research on mechanisms that can increase plant resistance is needed. At the same time, the use of biological modifiers can eliminate the effects of stress and improve plant growth. Also, considering the important position of marigold in meeting medicinal, food and industrial needs and taking into account the results of previous research, chitosan and nanochitosan were used in this study to reduce damage caused by salinity and increase marigold yield.

Methodology

In order to investigate the effect of chitosan and nano-chitosan on morphological and physiological characteristics of marigold under salt stress, an experiment was conducted in greenhouse conditions in a factorial and completely randomized design with three replications. The treatments included four salinity levels (0, 50, 100 and 150 mM NaCl source) and five modifier levels (0, 0.25, 0.5 g.l⁻¹ chitosan and 0.25 and 0.5 g.l⁻¹ nano-chitosan). After the plant growth period, plant height, fresh and dry weight, flower fresh and dry weight, flower number, leaf number, ion leakage, relative leaf water content, photosynthetic pigments and proline content were determined by conventional methods.

Results

The results showed that the highest fresh and dry weight of the whole plant, fresh and dry weight of flowers, number of flowers, number of leaves and height in the plant were observed in the treatment of foliar spraying of 0. g.l⁻¹ of nano chitosan under non-stress conditions. Also, the lowest amount of these traits was found in the stress treatment of 150 mM NaCl salt and without the use of modifiers. Salinity stress reduced the relative water content of leaves, and the application of 150 mM NaCl salt reduced the relative water content of leaves by 12.6% compared to the control treatment. Foliar spraying of modifiers caused a significant increase in relative leaf water content compared to the control treatment. Salinity stress increased ion leakage. But foliar spraying of moderators reduced ion leakage. Also, the highest amount of chlorophyll and carotenoid was observed in the foliar application of 0.5 g.l⁻¹ of nano-chitosan under non-stress conditions and the lowest amount of these traits was observed in the control treatment. The results of the mean comparison showed that the highest amount of proline was related to the treatment of 150 mM salt and 0.5 g.l⁻¹ nano-chitosan foliar spraying at the rate of 3.44 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ fresh weight. The lowest concentration of proline was observed in the treatment of no stress and no application of modifier at the rate of 1.64 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh weight.

Conclusion

According to the study, increasing sodium chloride concentration negatively impacted various morphological and physiological indices of marigold. Specifically, the height, fresh and dry weight of the entire plant, fresh and dry weight of flowers, the number of flowers and leaves, relative water content of leaves, and photosynthetic pigments all decreased. Additionally, salinity stress led to an increase in proline content and ion leakage. However, the application of foliar sprays with chitosan and nanochitosan showed significant improvement in all aspects of plant growth and development. Notably, nanochitosan proved to be more effective in alleviating salinity stress compared to conventional chitosan. This suggests that nanochitosan may be a promising solution for enhancing salt stress tolerance when used with other products. The enhanced effectiveness of nanochitosan can be attributed to its smaller particle size, larger surface area, and greater permeability compared to regular chitosan, making it more efficient in mitigating salinity effects. Overall, incorporating chitosan and nanochitosan could be beneficial for improving the growth and resilience of marigold plants in saline environments, as these compounds not only help retain moisture but also minimize the adverse impacts of salinity by activating the plant's defense mechanisms.

Author Contributions

For this research article, the individual contributions are as follows: “Conceptualization, [Author A and B]; methodology, [Author B]; software, [Author A]; validation, [Author B]; formal analysis, [Author A]; investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, [Author A] writing—review and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition [Author A and B]. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available.

For further inquiries regarding the data, please contact author's email.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

ارزیابی پتانسیل کیتوزان و نانو کیتوزان بر بهبود رشد و عملکرد گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) در شرایط تنش شوری

زهرة بوالحسنی^۱ | محمد فیضیان^۲^۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه: z.bolhasani93@yahoo.com^۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه: feiziam.m@lu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	شوری یکی از مهمترین تنش‌هایی است که عملکرد اکثر گیاهان را در سراسر جهان کاهش می‌دهد. گیاهان از مکانیزم‌های مختلفی در پاسخ به تنش‌های زیست محیطی استفاده می‌کنند. کیتوزان یک بیوپلیمر طبیعی که به‌عنوان یک محرک زیستی و ترکیب غیر سمی و سازگار با محیط زیست، تحریک‌کننده می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مؤثر است. به‌منظور بررسی اثر کیتوزان و نانو کیتوزان بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار تحت تنش شوری، آزمایشی در شرایط گلخانه انجام شد. تیمارها شامل چهار سطح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار از منبع کلرید سدیم) و پنج سطح تعدیل‌کننده (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم در لیتر کیتوزان و ۲۵ و ۵۰ گرم در لیتر نانو کیتوزان) به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک کل بوته و وزن تر و خشک گل، تعداد گل، تعداد برگ و ارتفاع گیاه در تیمار محلول‌پاشی ۵۰ گرم در لیتر نانو کیتوزان تحت شرایط بدون تنش مشاهده شد. کمترین میزان این صفات در تیمار تنش ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم و عدم کاربرد تعدیل‌کننده وجود داشت. اعمال تنش ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم، محتوی نسبی آب برگ را در مقایسه با تیمار شاهد به میزان ۱۲/۶ درصد کاهش داد. محلول‌پاشی تعدیل‌کننده‌ها سبب افزایش معنی‌دار محتوی نسبی آب برگ نسبت به تیمار شاهد شد. تنش شوری، نشأت یونی را افزایش داد. ولی محلول‌پاشی تعدیل‌کننده‌ها موجب کاهش نشأت یونی شد. همچنین، بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمار محلول‌پاشی ۵۰ گرم در لیتر نانو کیتوزان تحت شرایط بدون تنش و کمترین میزان این صفات در تیمار شاهد مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار پرولین مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار نمک و محلول‌پاشی ۵۰ گرم در لیتر نانو کیتوزان به میزان ۳/۴۴ میکرومول بر گرم وزن تر بود. کمترین غلظت پرولین در تیمار شاهد به میزان ۱/۶۴ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد محلول‌پاشی نانو کیتوزان می‌تواند به‌عنوان تعدیل‌کننده مناسب برای افزایش عملکرد گیاه همیشه‌بهار در شرایط تنش شوری معرفی شود.
واژه‌های کلیدی: پرولین، تعدیل‌کننده، رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوی نسبی آب برگ، نشأت یونی.	
استناد: بوالحسنی؛ زهرة، فیضیان؛ محمد (۱۴۰۴) ارزیابی پتانسیل کیتوزان و نانو کیتوزان بر بهبود عملکرد گل و اجزای عملکرد گیاه همیشه بهار (<i>Calendula officinalis</i> L.) در شرایط تنش شوری، مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۶ (۶)، ۱۵۱۹-۱۵۳۸.	
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.	
DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.389240.669870	



مقدمه

شوری خاک یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که بر رشد و نمو گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد (Sahab et al., 2021). در سطح جهان، بیش از ۵۰ درصد از زمین‌های زراعی آبی با مشکلات شوری خاک مواجه هستند که باعث کاهش رشد، نمو و بقای گیاه می‌شود (Guo et al., 2022). در ایران خاک‌های شور بالغ بر ۳۲ میلیون هکتار است که تقریباً ۳۰ درصد از سطح کل کشور و ۵۵ درصد از اراضی قابل کشت را شامل می‌شوند (مومنی، ۱۳۸۹). شوری خاک می‌تواند بر در دسترس بودن عناصر غذایی خاک، فعالیت میکروبی و روابط بین ارگانیسم‌های خاک، حاصلخیزی خاک (Zhang et al., 2019) و همچنین تغذیه گیاه تأثیر بگذارد (Chandra et al., 2022). افزایش غلظت نمک در خاک، باعث اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه از جمله جذب آب و مواد غذایی، فتوسنتز و تنفس می‌شود. در نتیجه، عملکرد گیاهان کاهش یافته و کیفیت محصول نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Pandey et al., 2023). آسیب تنش زراعی تحت شوری خاک عمدتاً ناشی از تنش یونی، اسمزی و اکسیداتیو است. گیاهان باید بتوانند این تنش‌ها را از طریق هموستاز گونه‌های اکسیژن یونی، اسمزی و فعال (ROS) کاهش دهند تا نسبت به نمک‌های موجود در خاک متحمل شوند (Hasanuzzaman et al., 2021). آستانه تحمل گیاهان به تنش شوری متفاوت است. در پژوهشی در غلظت بیش از ۱۰۰ میکرومولار کلرید سدیم، کاهش در رشد رویشی، وزن تازه اندام هوایی و کاهش جذب آب توسط گل همیشه بهار مشاهده شد (Koksall et al., 2016).

با توجه به افزایش جمعیت جهانی و محدودیت منابع آب شیرین، اهمیت تولید محصولات کشاورزی در شرایط شور روزافزون شده است. بنابراین، مطالعه اثرات شوری بر گیاهان و یافتن راهکارهایی برای کاهش اثرات سوء آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Du et al., 2023). استفاده از محرک‌های زیستی می‌تواند مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش داده و موجب بهبود فعالیت‌های متابولیکی گیاه گردد. کیتوزان یک پلیمر زیستی است که از جزء کیتین سخت‌پوستان، قارچ‌ها و بندپایان به‌دست می‌آید و بعد از سلولز فراوان‌ترین پلی‌ساکارید در سطح زمین می‌باشد (Wang et al., 2020; Terkula Iber et al., 2022). امروزه استفاده از کیتوزان به‌عنوان یک ماده غیر سمی، قابل تجزیه و سازگار با محیط برای کاهش و بهبود اثرات تنش‌های مختلف از جمله تنش خشکی و شوری مورد توجه است (Dzung, 2011). نانوتکنولوژی در جهت بهبود گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و نانوذرات جایگزین مواد حجیم شده‌اند (Tokath et al., 2020). نانوذرات به دلیل خواص زیست‌تخریب پذیری، حلالیت، نفوذپذیری بالا، عدم سمیت برای انسان و مقرون به‌صرفه بودن در سراسر جهان کاربردهای مختلفی دارند، از جمله اینکه برای کشاورزی و صنعت استفاده می‌شوند (Lee et al., 2023) و بسیار عالی‌تر از مواد با اندازه بزرگ عمل می‌کنند. فعالیت بهبود یافته آن‌ها به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، کیفیت‌های وابسته به اندازه و ویژگی نوری منحصر به فرد است. نانوذرات کیتوزان به‌عنوان یک محرک مؤثر دفاعی گیاه عمل می‌کنند و در مقایسه با کیتوزان طبیعی، تأثیر تعدیل‌کننده ایمنی بهتری را نشان می‌دهند (Divya et al., 2018). نانو کیتوزان یک ترکیب غیر سمی، چسبنده و زیست سازگار است که در دسترس و زیست تخریب پذیر است (Tian et al., 2023). نانو کیتوزان به راحتی در محیط تجزیه می‌شود و از تجمع و افزایش کمیت مواد آلی جلوگیری می‌کند و در نتیجه ساختار و سلامت خاک را به‌دلیل زیست تخریب‌پذیری بالا بهبود می‌بخشد (Abdollahzadeh et al., 2023). کیتوزان و نانوذرات آن اثرات امیدوارکننده‌ای را در کاهش تنش شوری در گیاهان نشان داده‌اند. مشخص شده است که نانو کیتوزان‌ها نسبت به کیتوزان معمولی در کاهش اثرات تنش نمک موثرتر هستند (Alenazi et al., 2024). محققین نشان دادند که تیمار ۲ درصد نانو ذرات کیتوزان، تأثیر معنی‌داری بر جوانه‌زنی و شاخص‌های اولیه رشد گیاه گلرنگ داشته است (Mansouri et al., 2016). مهدوی و همکاران (Mahdavi and Rahimi, 2013) در بررسی پیش‌تیمار زنیان با کیتوزان نشان دادند که عملکرد گیاه زنیان در تیمار با کیتوزان در شرایط تنش شوری باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعال شدن تعدادی از آنزیم‌ها شده است.

همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) گیاهی زینتی-دارویی و یک‌ساله و بندرت دو ساله می‌باشد که منشأ آن نواحی مدیترانه می‌باشد. این گیاه یکی از پرکاربردترین گل‌های فصلی بوده که در تزئین فضای سبز شهری و برای حاشیه باغچه‌ها استفاده می‌شود (امیدبگی، ۱۳۷۹). یکی از هدف‌های کشت آن، تولید دارو و ماده‌های مؤثره موجود در گل‌ها و به‌ویژه در گلبرگ‌ها می‌باشد (Lawlor and Cornic, 2002). گل‌های همیشه‌بهار دارای روغن‌های فرار (اسانس‌ها)، اسیدهای چرب، ویتامین E، سزکویی‌ترین‌ها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، زانتوفیل‌ها، تریپول‌ترین‌ها و ماده‌ای به‌نام کاندولین هستند (Gazim et al., 2008). همیشه‌بهار دارای گلچه‌های دیسکی درخشان زرد نارنجی بوده و این گیاه علاوه بر مصارف خوراکی (طعم‌دهنده و رنگ‌دهنده غذا) دارای مواد مؤثره و ترکیباتی است که در صنعت (تهیه رنگ‌های نقاشی و نایلون صنعتی) و داروسازی نیز کاربرد دارد (Kalvatchev et al., 1997). این گیاه از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده که در درمان بیماری‌های تورم ماهیچه‌ای و کمردرد، زخم‌ها، مسمومیت، استفراغ و اسهال مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aydin

(Acar et al., 2024). گیاه همیشه بهار برای رشد به نور کامل، دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتیگراد، خاک‌های سبک با زهکشی مناسب و pH حدود ۶ تا ۷ نیاز دارد. گیاه همیشه بهار عمدتاً در استان‌های فارس، خراسان رضوی، اصفهان، همدان و کرمان کشت می‌شود (خوشخوی، ۱۳۹۰). بسیاری از این مناطق، طبق گزارش وزارت جهاد کشاورزی (۱۴۰۲)، با مشکل شوری خاک مواجه هستند، به طور مثال، حدود ۴۲ درصد از اراضی کشاورزی کرمان و ۲۵ درصد از اراضی خراسان رضوی دچار شوری متوسط تا شدید می‌باشند. این گیاه نسبت به شوری حساس است و افزایش شوری منجر به کاهش وزن خشک گل، کاهش میزان فلاونوئیدها و کاروتنوئیدهای دارویی و در نتیجه افت کیفیت مواد موثره می‌شود (Guzman and Marques, 2023). عوامل محیطی در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه گیاهان نقش به سزایی دارد به‌طور طبیعی این عوامل گاهی در حد مطلوب و گاهی در حدی که گیاه را در معرض تنش قرار دهد، در اختیار گیاهان قرار می‌گیرد (Khalid and da Silva, 2012). مطالعه درباره تولید گیاهان زینتی که در فضای سبز به کار می‌روند و تحت تنش‌های مختلف قرار می‌گیرند کمک شایانی به تولید و پرورش این گیاهان در شرایط مختلف محیطی می‌کند (Zulfiqar et al., 2024).

از آنجایی که تنش شوری به‌عنوان یک عامل محدودکننده در خاک‌های مناطق کشت گیاه همیشه بهار در ایران مطرح است، بررسی اثرات این تنش بر کمیت و کیفیت تولید محصولات این گیاه اهمیت ویژه‌ای دارد. این تحقیق به‌ویژه به دلیل نقش کلیدی بررسی اثر تنش شوری در بهبود بهره‌وری و کیفیت گیاه همیشه بهار، در راستای افزایش تولید و حفظ ویژگی‌های دارویی آن ضرورت پیدا می‌کند. از سویی دیگر استفاده از اصلاح‌کننده‌های زیستی نظیر کیتوزان و نانوکیتوزان به‌عنوان روش‌های نوین و دوستدار محیط‌زیست برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری مطرح شده است. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی اثر کیتوزان و نانوکیتوزان بر پاسخ‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار تحت تنش شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان (طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۲۲ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۱۲۵ متر از سطح دریا) در مهر ماه سال ۱۴۰۱ صورت گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل چهار سطح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار از منبع کلرید سدیم) و پنج سطح تعدیل‌کننده (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان) بودند. برای انجام پژوهش، مقدار کافی خاک از افق سطحی (۰ تا ۳۰ سانتی‌متری) در ایستگاه زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان برداشته و در معرض هوا خشک شد. نمونه‌های خشک شده از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند و برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه با استفاده از روش‌های استاندارد معمول اندازه‌گیری شدند (جدول ۱).

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Fe (mg.kg ⁻¹)	Mn (mg.kg ⁻¹)	Zn (mg.kg ⁻¹)	Cu (mg.kg ⁻¹)	K (mg.kg ⁻¹)	P (mg.kg ⁻¹)	N %	OC %	EC dS.m ⁻¹	pH	بافت
۵/۲	۷/۱۷	۱/۰۵	۱/۵۰	۲۸۵	۱۵/۵	۰/۰۸	۰/۹	۰/۵۲	۷/۹	Clay Loam

در این پژوهش، از کیتوزان با شماره کاتالوگ BCBH1031V از شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا استفاده شد. کیتوزان به صورت پودر با رنگ سفید مایل به بژ تا نارنجی و خلوص بالای ۷۵ درصد ارائه شده است. ویسکوزیته محلول ۱ درصد آن در اسید استیک، بین ۸۰۰ تا ۲۰۰۰ سانتی‌پواز می‌باشد. کیتوزان در آزمایشگاه به نانوذره تبدیل شد. برای تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک انجام گردید. بدین منظور ۴ میلی‌لیتر محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات دو درصد به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان که روی همزن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت دو ساعت ادامه یافت. پس از این مدت، محلول نانوکیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار گرفت و در نهایت، محلول نانوکیتوزان حاصل در آون، خشک و نانو ذرات کیتوزان جمع‌آوری گردید (Du et al., 2008).

در ابتدا نمونه‌های خاک به وزن دو کیلوگرم آماده و سپس در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد. به منظور جلوگیری از کمبود احتمالی سایر عناصر غذایی و بر اساس نتایج آزمون خاک عناصر نیتروژن، آهن و روی به ترتیب به مقدار ۱۵۰، ۵ و ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم و از منابع اوره، سکوسترین آهن و سولفات روی به صورت محلول به خاک اضافه شد. سپس خاک درون کیسه‌ها کاملاً مخلوط شده و به داخل گلدان‌های دو کیلوگرمی پلاستیکی منتقل شد. در هر گلدان سه عدد بذر گیاه همیشه بهار در عمق حدود سه سانتی‌متری خاک کاشته شد.

کود نیتروژن از منبع اوره در سه تقسیط (۵۰ میلی گرم در کیلوگرم قبل کشت، ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم قبل از غنچه دهی و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در اوایل گلدهی) همراه آب آبیاری به خاک اضافه شد. بعد از استقرار بوته ها، تعداد آن ها به یک عدد کاهش یافت. آبیاری گلدان ها با آب شهری (شوری ۰/۵ دسی زیمنس بر متر) هر ۳ روز یکبار به گونه ای انجام گرفت که محتوی آب گلدان به حد ظرفیت زراعی برسد. برای سنجش ظرفیت زراعی و محاسبه مقدار آب لازم برای آبیاری گلدان ها، ابتدا نمونه ای از خاک را در گلدانی با وزن مشخص و دارای زهکش مناسب ریخته و در حد اشباع آبیاری شد. ۴۸ ساعت بعد که آب اضافه از خاک خارج شده بود، خاک را وزن کرده و مقدار ظرفیت زراعی خاک به دست آمد. اعمال تیمارهای شوری در مرحله سه الی چهار برگی (۲۰ روز پس از کاشت) صورت گرفت. به نحوی که کلیه گلدان ها به جزء تیمار شاهد با اضافه کردن تدریجی شوری به میزان ۵۰ میلی مولار در هر سطح (جهت سازگار شدن گیاهان) آبیاری شدند (رضایی چپانه و همکاران، ۱۳۹۴). اعمال تیمارهای شوری تا مرحله گلدهی کامل با نسبت های ذکر شده و همزمان با نیاز آبی گیاه (در حد ظرفیت مزرعه) ادامه داشت و به منظور جلوگیری از تجمع نمک در گلدان ها، آبشویی با آب معمولی بعد از هر سه بار آبیاری با آب شور انجام گرفت.

محلول پاشی برگی با کیتوزان و نانو کیتوزان، سه مرتبه صورت گرفت. مرحله اول، دو هفته بعد از اعمال تنش شوری (حدوداً ۵ هفته پس از کاشت)، مرحله دوم محلول پاشی در ابتدای ورود گیاهان به فاز زایشی و با مشاهده اولین غنچه های گلدهی (شروع غنچه دهی) و مرحله سوم محلول پاشی در زمانی بود که ۳۰-۴۰ درصد گیاهان غنچه دادند. حجم محلول پاشی تعدیل کننده، حدوداً ۲۰ میلی لیتر بود و میزان پاشش محلول به اندازه ای بود که قطرات محلول بر روی برگ های گیاه همیشه بهار قابل مشاهده باشد. لازم به ذکر است محلول پاشی در ساعات بین ۱۸ تا ۱۹ عصر، به دور از تابش مستقیم آفتاب صورت گرفت و همچنین محلول پاشی تیمارهای شاهد با آب مقطر انجام گرفت. نمونه برداری از گیاه جهت سنجش برخی صفات فیزیولوژیکی در اواسط گلدهی گیاه انجام شد. بدین صورت که از هر تیمار، تعدادی برگ جوان و کاملاً بالغ در میانه گیاه برداشت شد و با نیتروژن مایع فریز گردید و تا زمان استخراج در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از زمان شروع گلدهی تا پایان گلدهی، گل های شکفته شده و کاملاً آماده برداشت، روزانه برای هر گلدان جمع آوری و شمارش شدند، پس از خشک کردن در آخر دوره، وزن خشک کل اندازه گیری گردید. در پایان دوره گلدهی، ارتفاع توسط خط کش اندازه گیری گردید. همچنین تعداد برگ شمارش شد. در زمان برداشت (۱۰ بهمن ۱۴۰۱)، برای اندازه گیری خصوصیات رشدی از جمله وزن تر و خشک بوته و وزن تر و خشک گل از ترازوی دیجیتالی استفاده شد.

کلروفیل و کاروتنوئید بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر برگ، به ترتیب از طریق روابط (۱)، (۲)، (۳) و (۴) محاسبه شدند (Lichtenthaler, 1987):

$$A = 11/24 \times A_{662} - 2/04 \times A_{645} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$C_B = 20/13 \times A_{645} - 4/19 \times A_{662} \quad \text{رابطه ۲}$$

$$C_{(A+B)} = 7/05 \times A_{662} + 18/9 \times A_{645} \quad \text{رابطه ۳}$$

$$C_{(X+C)} = 1000 \times (A_{470} - 1/90 C_A - 63/14 C_B) / 214 \quad \text{رابطه ۴}$$

جهت تعیین میزان نشت الکتروولیت سلول های برگ، دیسک های یک اندازه جدا و با آب مقطر شستشو شد، سپس نمونه ها در لوله های شیشه ای حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی محلول با استفاده از دستگاه سنجش هدایت الکتریکی تعیین شد (EC_1). سپس ظروف حاوی نمونه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت (به مدت ۲۰ دقیقه) و پس از کاهش دما، مجدداً هدایت الکتریکی آن اندازه گیری شد (EC_2). درصد نشت الکتروولیت از طریق رابطه (۵) محاسبه شد (Luttse *et al.*, 1996).

$$EC (\%) = (EC_1 / EC_2) \times 100 \quad \text{رابطه ۵}$$

جهت اندازه گیری محتوی نسبی آب برگ، از برگ های جوان توسعه یافته، نمونه ای انتخاب و بعد از اندازه گیری وزن تر (FW)، نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر غوطه ور شد، سپس وزن تورژسانس (TW) آن اندازه گیری و جهت اندازه گیری وزن خشک (DW)، نمونه به مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد، در نهایت محتوی نسبی آب برگ از طریق رابطه (۶) محاسبه گردید (Ritchie *et al.*, 1990):



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

(رابطه ۶)

به منظور اندازه‌گیری میزان پرولین، ۰/۱ گرم از بافت برگ نمونه‌های گیاه همیشه بهار با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک ۳ درصد سائیده شد تا مخلوطی یکنواخت حاصل شود و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده رویی را با دو میلی‌لیتر شناساگر ناین هیدرین و دو میلی‌لیتر استیک اسید خالص در فالتکون ریخته و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه قرار داده شد. بعد از سرد شدن محلول، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد و بلافاصله مخلوط شد. فاز آلی به رنگ صورتی در بالا و فاز بی‌رنگ و شفاف در زیر فاز آلی تشکیل شد. بخش رویی جدا و جذب آن با استفاده از اسپکتروفتومتر پس از کالیبره کردن با تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد (Bates et al., 1973).

پس از به‌دست آوردن نتایج گلخانه‌ای و آزمایشگاهی، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و میانگین صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون دانکن و در سطح آماری پنج درصد با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج

وزن تر و خشک کل بوته

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل تنش شوری و تیمار تعدیل‌کننده بر وزن تر و خشک کل بوته گیاه همیشه بهار در سطح پنج درصد معنی‌دار گردید (جدول ۲). نتایج نشان داد که با افزایش تنش شوری، وزن تر و خشک کل بوته کاهش یافت. کاربرد تعدیل‌کننده‌ها در همه سطوح تنش، سبب بهبود وزن تر و خشک کل بوته گردید. به‌طوریکه در هر سطح تنش شوری، بیشترین تاثیر مربوط به تیمار ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر تنش شوری و تعدیل‌کننده بر صفات مورفولوژیکی گیاه همیشه بهار

میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کل بوته	وزن خشک کل بوته	وزن تر گل	وزن خشک گل	تعداد گل	تعداد برگ
تنش شوری	۳	۱۱۶۸/۶**	۱۲۶/۷۳**	۱۱/۳۶۶**	۰/۱۶۷۳**	۸/۴۶۱**	۶۳۰/۱۷**
تعدیل‌کننده	۴	۳۸۴/۱۷**	۴۳/۰۴۸**	۵/۴۵۷**	۰/۰۶۵۷**	۳/۲۰۸**	۹۳/۸۵۸**
تنش شوری*تعدیل‌کننده	۱۲	۱۰/۰۲*	۱/۱۱۳*	۰/۰۵۴۵ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۲۵۲ ns	۹/۸۵۸ ns
خطا	۴۰	۴/۱۴	۰/۴۸۶	۰/۰۴۳۰	۰/۰۰۱۲	۰/۳۵۰	۷/۰۶۷
ضرب تغییرات	-	۴/۱۹	۴/۵	۴/۵۹	۸/۷	۹/۲	۷/۶۹

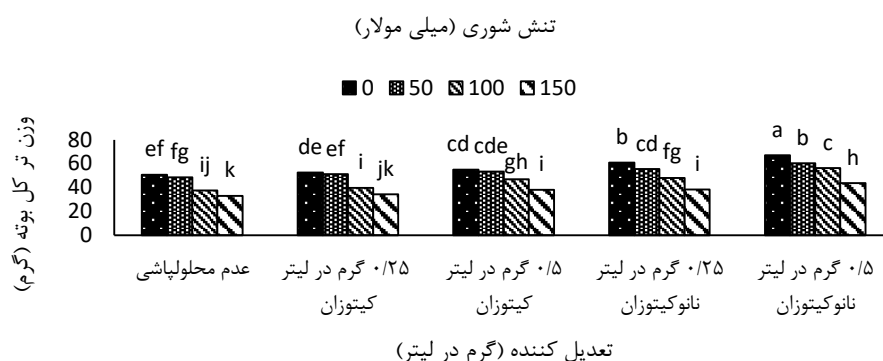
* و ** به ترتیب از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج و یک درصد معنی دار می‌باشد. ns از لحاظ آماری معنی دار نمی‌باشد.

بیشترین وزن تر و خشک کل بوته مربوط به سطح عدم تنش شوری و کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان به‌ترتیب به مقدار ۶۷/۰۶ و ۲۲/۳۴ گرم بود و کمترین وزن تر و خشک کل بوته در تیمار تنش ۱۵۰ میلی‌مولار نمک و عدم کاربرد تعدیل‌کننده به‌ترتیب به مقدار ۳۲/۹۱ و ۱۰/۹۶ گرم مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

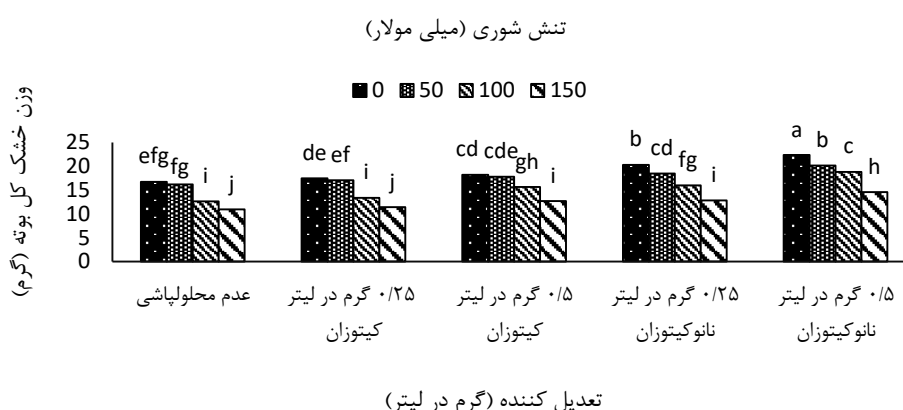
وزن تر و خشک گل در بوته، تعداد گل و تعداد برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی تنش شوری و تیمار تعدیل‌کننده بر وزن تر و خشک گل، تعداد گل و تعداد برگ گیاه در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۲).

اعمال تنش شوری سبب کاهش وزن تر و خشک گل، تعداد گل و تعداد برگ در بوته همیشه بهار گردید. تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک، وزن تر گل در بوته را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم تنش) به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب به مقدار ۱۶/۵، ۱۹/۹ و ۳۷/۹ درصد کاهش داد. در حالیکه از نظر آماری بین سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار نمک، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. محلول‌پاشی ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۰/۵ و ۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان، وزن تر گل را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی تعدیل‌کننده) به‌ترتیب به مقدار ۱۱/۹، ۲۱/۵، ۳۹ و ۴۴/۸ درصد افزایش معنی‌دار بخشید (جدول ۳).



شکل ۱. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر وزن تر کل بوته گیاه همیشه بهار (گرم)



شکل ۲. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر وزن خشک کل بوته گیاه همیشه بهار (گرم)

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر ساده تعدیل کننده (کیتوزان و نانو کیتوزان) و تنش شوری بر وزن تر و خشک گل، تعداد گل و تعداد برگ

تیمار	سطح	وزن تر گل (گرم در بوته)	وزن خشک گل (گرم در بوته)	تعداد گل	تعداد برگ
تنش شوری (میلی مولار)	۰	۵/۵۳۰a	۰/۵۲۷a	۳/۶۶a	۳۹a
	۵۰	۴/۶۱۶b	۰/۴۲۸b	۳b	۳۸/۶۶a
	۱۰۰	۴/۴۰۳b	۰/۳۵۸c	۲/۴۰c	۳۵/۳۳b
	۱۵۰	۳/۴۰۵c	۰/۲۷۸d	۱/۹۳d	۲۵/۱۳c
تعدیل کننده (گرم در لیتر)	۰ (عدم محلول پاشی)	۳/۶۵۵e	۰/۳۱۶d	۲/۳۳c	۳۱ c
	۰/۲۵ گرم در لیتر کیتوزان	۴/۰۹۳d	۰/۳۴۳d	۲/۴۱b	۳۳/۳۳b
	۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان	۴/۴۴۴c	۰/۳۸۳c	۲/۴۱b	۳۳/۷۵b
	۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان	۵/۰۸۱b	۰/۴۵۴b	۳/۰۸a	۳۶/۴۱a
	۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان	۵/۲۹۴a	۰/۴۹۲a	۳/۵۰a	۳۸/۱۶a

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن با هم ندارند.

همچنین تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم وزن خشک گل در بوته را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم تنش) به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب به میزان ۱۸/۷، ۳۲/۰۶ و ۴۷/۲ درصد کاهش داد. محلول‌پاشی ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان، وزن خشک گل را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی تعدیل کننده) به‌طور معنی‌دار به‌ترتیب به میزان ۸/۵، ۲۱/۲، ۴۳/۶ و ۵۵/۶ درصد، افزایش داد، هر چند از نظر آماری بین سطح عدم محلول‌پاشی تعدیل کننده و ۰/۲۵ گرم در لیتر کیتوزان، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳).

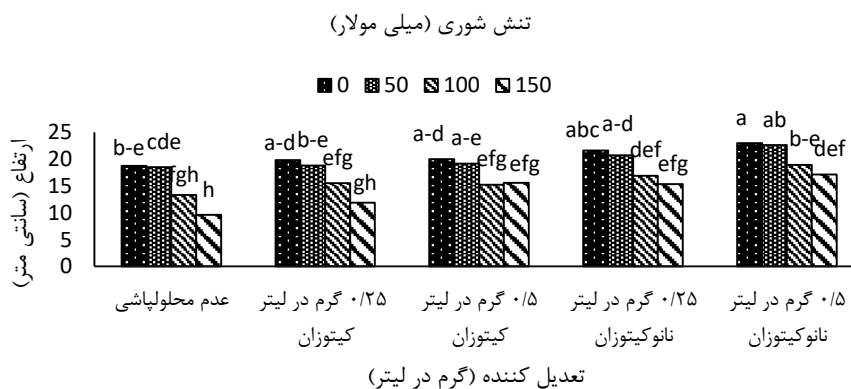
تنش شوری تعداد گل و تعداد برگ همیشه بهار را کاهش داد. در بین سطوح شوری، کاربرد نمک ۱۵۰ میلی مولار، تعداد گل و برگ را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم تنش) به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب به میزان ۴۷/۲۶ و ۳۵/۵۶ درصد کاهش داد. هر چند بین سطح ۵۰



میلی مولار نمک و تیمار شاهد بر میانگین تعداد برگ، تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در حالیکه محلولپاشی تعدیل کننده‌ها توانست اثرات منفی تنش را بر این صفات کاهش دهد. به طوریکه در بین سطوح تعدیل کننده، کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان، تعداد گل و تعداد برگ را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلولپاشی تعدیل کننده) به طور معنی داری به ترتیب به میزان ۵۰/۲ و ۲۳/۰۹ درصد افزایش داد. در حالیکه از نظر آماری بین سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان و همچنین بین سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۳).

ارتفاع

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثرات متقابل تنش شوری و تیمار تعدیل کننده بر ارتفاع گیاه همیشه بهار در سطح پنج درصد معنی دار گردید. بیشترین مقدار ارتفاع گیاه مربوط به سطح عدم تنش شوری و کاربرد نانو کیتوزان ۰/۵ گرم در لیتر (۲۳ سانتی متر) بود. همچنین کمترین مقدار این صفت در تیمار تنش ۱۵۰ میلی مولار نمک و عدم کاربرد تعدیل کننده (۹/۶ سانتی متر) مشاهده شد. هر چند از نظر آماری با تیمار تنش ۱۵۰ میلی مولار و ۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۳. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر ارتفاع گیاه همیشه بهار (سانتی متر)

محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید)

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل تنش شوری و تیمار تعدیل کننده بر محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح پنج درصد معنی دار گردید. در حالی که اثر متقابل تیمارها بر محتوی کاروتنوئید در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۴).

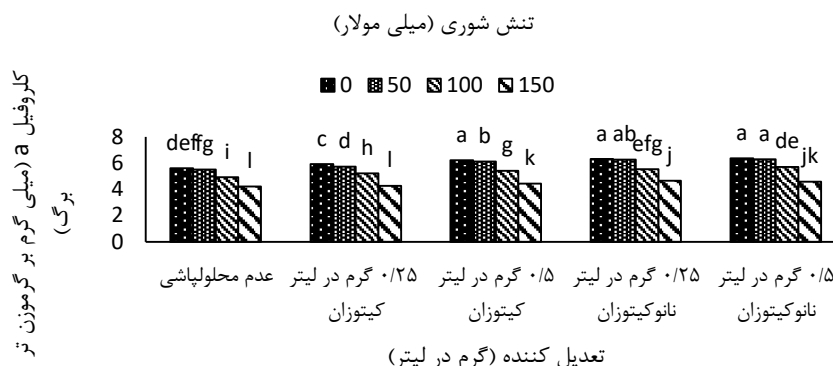
جدول ۴. تجزیه واریانس اثر تنش شوری و تعدیل کننده بر صفات فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار

منابع تغییرات							میانگین مربعات
درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	محتوی نسبی آب برگ	نشت یونی	پرویلین
تنش شوری	۳	**۸/۵۹۸	**۸/۴۸۶	**۳۴/۱۶۶	**۱/۷۱۴۳	**۲۸۹/۱۷	**۳/۶۷۴۶
تعدیل کننده	۴	**۰/۹۹۵۳	**۰/۸۸۴۵	**۳/۷۵۳۰	**۰/۴۵۷۷	**۱۶۷/۶۸	**۰/۹۶۰۵۱
تنش شوری*تعدیل کننده	۱۲	**۰/۲۱۹۳	**۰/۰۲۳۲	**۰/۰۸۶۰	**۰/۰۶۳۵	ns/۲۰۰	**۰/۰۹۹۲۲
خطا	۴۰	**۰/۱۰۶۷	**۰/۱۲۸۶	**۰/۰۴۰۴	**۰/۰۰۳۷	۳/۵۸۹	**۰/۰۴۳۹۷
ضریب تغییرات	-	۱/۸۸	۳/۷۹	۲/۳۷	۲/۵۳	۲/۸۳	۳/۳۵

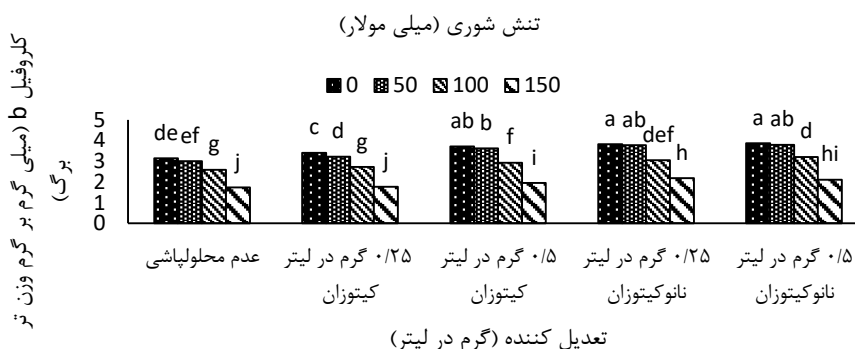
* و ** به ترتیب از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج و یک درصد معنی دار می باشد. ns از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار عدم تنش شوری و کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان به ترتیب به میزان ۳/۳۷، ۳/۸۷، ۱۰/۲۴ و ۲/۸۴ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. که از نظر آماری با برخی تیمارها تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین کمترین محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار

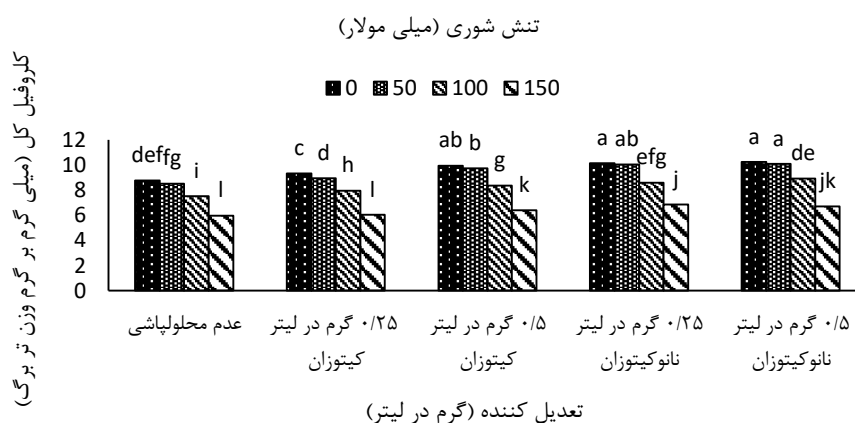
۱۵۰ میلی مولار نمک و عدم محلول پاشی تعدیل کننده به ترتیب به میزان ۴/۲۲، ۱/۷۴، ۵/۹۶ و ۱/۴ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. که از لحاظ آماری با برخی تیمارها تفاوت معنی داری نداشتند (شکل ۴، ۵، ۶ و ۷).



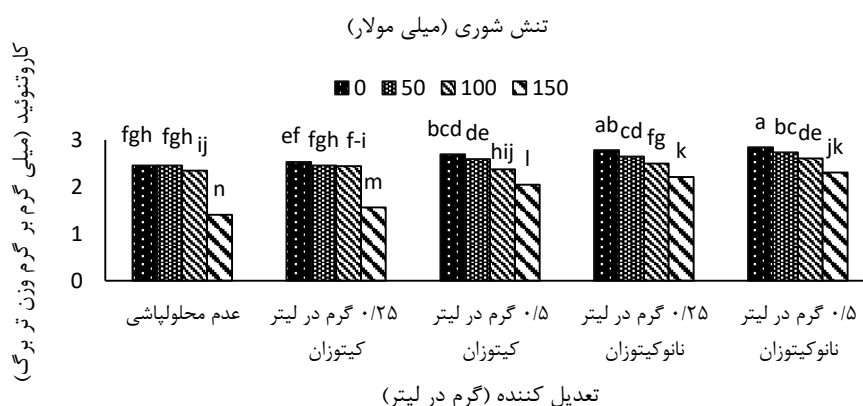
شکل ۴. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر محتوی کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)



شکل ۵. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر محتوی کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)



شکل ۶. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر محتوی کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)



شکل ۷. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل کننده بر محتوی کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)

محتوی نسبی آب برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی تنش شوری و تیمار تعدیل کننده بر محتوی نسبی آب برگ در سطح یک درصد معنی دار گردید (جدول ۴). کاربرد نمک کلرید سدیم سبب کاهش محتوی نسبی آب برگ گیاه همیشه بهار گردید. اعمال ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم، محتوی نسبی آب برگ گیاه را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم تنش) به طور معنی داری به ترتیب به میزان ۶/۷۵، ۱۰/۷۸ و ۱۲/۶۱ درصد کاهش داد. در حالیکه از نظر آماری بین سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. محلولپاشی ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان، محتوی نسبی آب برگ گیاه را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلولپاشی) به ترتیب به میزان ۶/۶۱، ۱۱/۴۲ و ۱۴/۱۷ درصد افزایش معنی دار بخشید (جدول ۵).

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر ساده تعدیل کننده (کیتوزان و نانو کیتوزان) و تنش شوری بر محتوی نسبی آب برگ (درصد)

تیمار	سطح	محتوی نسبی آب برگ (درصد)
تنش شوری (میلی مولار)	۰	۷۱/۵۲a
	۵۰	۶۶/۶۹b
	۱۰۰	۶۳/۸۱c
	۱۵۰	۶۲/۵۰c
تعدیل کننده (گرم در لیتر)	۰ (عدم محلولپاشی)	۶۲/۵۶d
	۰/۲۵ گرم در لیتر کیتوزان	۶۳/۹۷d
	۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان	۶۶/۷۰c
	۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان	۶۹/۷۱b
	۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان	۷۱/۴۳a

میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن با هم ندارند.

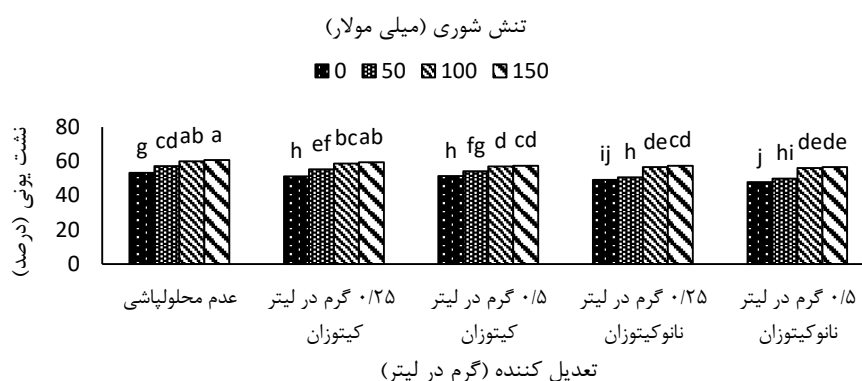
نشت یونی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل تنش شوری و تیمار تعدیل کننده بر نشت یونی در سطح یک درصد معنی دار شده است (جدول ۴). با توجه به شکل ۸، بیشترین میزان نشت یونی مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی مولار نمک و عدم محلولپاشی تعدیل کننده به مقدار ۵۹/۳۶ درصد بود. هر چند از نظر آماری با سطح تنش ۱۰۰ میلی مولار نمک و عدم کاربرد تعدیل کننده، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. همچنین کمترین نشت یونی در تیمار عدم تنش و کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان به میزان ۴۷/۸۳ درصد مشاهده شد. هر چند از لحاظ آماری با سطح عدم تنش شوری و کاربرد ۰/۲۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان تفاوت معنی داری نداشت.

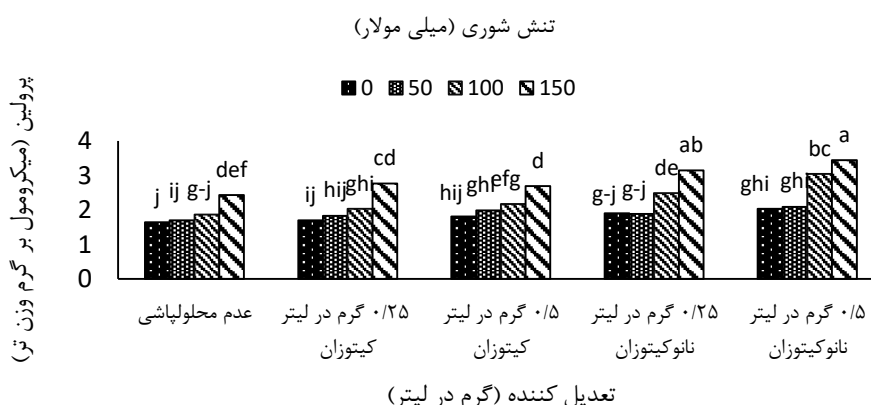
پرولین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل تنش شوری و تیمار تعدیل کننده بر غلظت پرولین در سطح پنج درصد معنی دار شده است (جدول ۴). با توجه به شکل ۹، بیشترین غلظت پرولین مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی مولار نمک و محلولپاشی ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان به میزان ۳/۴۴ میکرومول بر گرم وزن تر بود. هر چند از نظر آماری با تیمار ۱۵۰ میلی مولار نمک و محلولپاشی ۰/۲۵ گرم در لیتر نانو

کیتوزان، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. کمترین غلظت پرولین در تیمار عدم تنش و عدم کاربرد تعدیل‌کننده به میزان ۱/۶۴ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد.



شکل ۸. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل‌کننده بر نشت یونی (درصد)



شکل ۹. اثر متقابل تنش شوری و تعدیل‌کننده بر پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)

بحث

در این مطالعه تاثیر تنش شوری و تیمار تعدیل‌کننده کیتوزان و نانو کیتوزان بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه همیشه بهار بررسی گردید. نتایج نشان داد که افزایش سطح شوری، سبب کاهش وزن تر و خشک کل بوته، وزن تر و خشک گل در بوته و ارتفاع شد. به‌طوریکه سطح ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم، وزن تر و خشک کل بوته را در مقایسه با تیمار شاهد (عدم کاربرد نمک) به طور معنی‌داری به ترتیب به مقدار ۳۵/۱۹ و ۳۴/۴۸ درصد کاهش داد. با افزایش شدت تنش، اثر منفی تنش شوری بر صفات وزن تر و خشک گل، تعداد گل و تعداد برگ، شدت یافت. به گونه ای که با افزایش تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار نمک، وزن تر گل، وزن خشک گل، تعداد گل و تعداد برگ گیاه نسبت به تیمار شاهد به ترتیب به مقدار ۳۷/۹، ۴۷/۲، ۴۷/۲۶ و ۳۵/۵۶ درصد کاهش یافتند. شوری با کاهش ظرفیت آب، افزایش سمیت یون‌های خاص و کاهش عناصر غذایی لازم، بر عملکرد گیاه تاثیر منفی می‌گذارد (عسگریان و عبدوسی، ۱۴۰۰). به عبارت دیگر، تنش شوری تعادل متابولیک را به هم می‌زند و باعث تنش اکسیداتیو می‌گردد که باعث افزایش تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال مانند رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسید می‌شود که به نوبه خود باعث اختلالات متابولیکی مانند اکسیداسیون لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. در واقع همه عوامل مهم مانند فتوسنتز، سنتز پروتئین، متابولیسم انرژی و چربی تحت تاثیر قرار می‌گیرند (Per et al., 2017) و در نهایت باعث کاهش رشد گیاه می‌شوند. با افزایش غلظت املاح، فشار اسمزی محلول خاک زیاد می‌شود، در نتیجه مقدار انرژی که گیاه باید صرف جذب آب از خاک نماید، افزایش می‌یابد که این عمل سبب کاهش جذب آب، افزایش تنفس، کاهش ارتفاع و عملکرد گیاه می‌گردد. مشخص شده است که کاهش پتانسیل اسمزی و کمبود عناصر غذایی باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Khaled and Fawy, 2011). بسته شدن روزنه‌ها و غیر فعال شدن سیستم آنزیمی به دلیل کاهش پتانسیل اسمزی داخلی و خارجی رخ می‌دهد که منجر به کاهش رشد گیاه می‌شود. در این پژوهش با اعمال تنش شوری تعداد گل در بوته و تعداد برگ



کاهش یافت. در اثر تنش شوری به دلیل کمبود آب و عناصر غذایی و سمیت یون سدیم، میزان فتوسنتز و تولید مواد آسمیلات کاهش می‌یابد که این امر تاثیر مستقیم بر صفات زایشی دارد (Zafar-Ul-Hye et al., 2020). هم راستا با نتایج پژوهش حاضر، کاهش میزان عملکرد و ارتفاع گیاه در شرایط تنش شوری در تحقیقاتی روی گیاه همیشه بهار (Guzman and Marques, 2023)، آفتابگردان (Ullah et al., 2022) و گلرنگ (رضوی، ۱۴۰۰) گزارش شده است.

کاربرد کیتوزان و نانوکیتوزان، سبب بهبود عملکرد گیاه در هر دو شرایط تنش و عدم تنش گردید. بطوریکه در بین سطوح تعدیل‌کننده‌ها، بیشترین اثربخشی مربوط به محلولپاشی ۰/۵ گرم در لیتر نانو کیتوزان بود که توانست اثرات منفی تنش شوری را بر ویژگی‌های رشدی گیاه بهبود بخشد. ساز و کار عمل کیتوزان روی رشد ناشناخته مانده است. در عین حال ممکن است رشد و نمو گیاه را توسط بعضی مسیرهای انتقال پیام مربوط به بیوسنتز اکسین و از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان افزایش دهد (Uthairatanakij et al., 2007). تحقیقات نشان داده است که کیتوزان مسیرهای متابولیسم نیتروژن و کربن را بهبود بخشیده و با تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی هورمونی (اکسین و جبریلین‌ها) به بهبود رشد گیاه کمک می‌کند (Hassan et al., 2021). کیتوزان 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., 2015). افزایش پارامترهای رشد و بهبود عملکرد گیاهان مختلف از جمله ماریتیغال (جعفری و همکاران، ۱۴۰۱)، پروانش (Ali et al., 2021) و چای (زینالی و همکاران، ۱۴۰۳) گزارش شده است. ثابت شده است که نانو کیتوزان‌ها به دلیل کوچک بودن اندازه و سطح وسیع نسبت به کیتوزان نقش مؤثرتری دارند (Divya and Jisha, 2018).

در آزمایش حاضر، تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل و کاروتنوئید نسبت به تیمار شاهد شد. کاهش محتوای کلروفیل را می‌توان به افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست نسبت داد که در نتیجه منجر به آسیب کلروپلاست و بی‌ثباتی غشاء می‌گردد (Lee et al., 2021). تنش شوری با تاثیر بر عوامل روزنه‌ای و بسته شدن روزنه‌ها موجب کاهش ورود دی‌اکسید کربن به سلول‌های برگ، کاهش واکنش‌های فتوشیمیایی از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در چرخه تثبیت کربن و تولید رادیکال‌های آزاد در کلروپلاست و در نتیجه کاهش تولید کلروفیل می‌گردد (Gong et al., 2018). کاهش محتوای کاروتنوئید با کاهش فتوسنتز همراه بود و منجر به استرس اکسیداتیو ناشی از استرس نمک شد که منجر به پراکسیداسیون کاروتنوئید شد (Idrees et al., 2010). کاهش در محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه همیشه بهار (Shabani et al., 2024) و ریحان (Robatjazz et al., 2020) گزارش شده است.

از سوی دیگر نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد کیتوزان و نانو کیتوزان باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه همیشه بهار شد. این نتیجه ممکن است به دلیل افزایش غلظت نیتروژن و منیزیم در برگ‌ها باشد زیرا نیتروژن و منیزیم مهمترین عناصر در ترکیب شیمیایی کلروفیل‌ها هستند (Roychoudhury et al., 2022). نانوذرات کیتوزان به‌عنوان یک فوتوکاتالیست کارآمد در بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیسم نیتروژن نقش مهمی ایفا می‌کنند (Khairy et al., 2022). این افزایش می‌تواند به دلیل بهبود محتوای سیتوکینین‌ها باشد که سنتز کلروفیل را تحریک می‌کند یا به دلیل افزایش دسترسی به ترکیبات آمینه آزاد شده از کیتوزان باشد (Terry et al., 2004). مشخص شده است که کیتوزان با فعال کردن و افزایش بیان ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی تولید کلروفیل، در نهایت منجر به افزایش کلروفیل در گیاه می‌شود (امامی بیستگانی و همکاران، ۱۳۹۶). استفاده از نانو ذره کیتوزان در گیاه مرزنجوش، سرعت فتوسنتز را با افزایش سطح برگ، طول ریشه، جذب آب و مواد غذایی افزایش داد که بر درصد کلروفیل آن تاثیر گذاشت (Amer et al., 2020). همچنین نتایج مطالعه محققین بر روی گیاه پریوش نشان داد که استفاده از نانو ذرات کیتوزان به‌طور قابل توجهی میزان کلروفیل برگ را افزایش داد (Ali et al., 2021).

محتوای نسبی آب برگ، رابطه مستقیمی با میزان پتانسیل آب برگ دارد و با افزایش تنش شوری، میزان پتانسیل آب برگ کاهش می‌یابد و در نتیجه، محتوای نسبی آب برگ تحت تاثیر قرار می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد علت کاهش محتوای نسبی آب با افزایش شوری ناشی از کاهش جذب آب یا محدودیت در توانایی جذب آن به علت وجود شوری در محیط است که موجب بهم خوردن تعادل آبی گیاه می‌شود. در چنین شرایط تنش کمبود آب موجب کاهش تورگر برگ، بسته شدن بیشتر روزنه‌ها و کاهش هدایت روزنه‌ای می‌شود که یکی از عوامل محدود کننده شرایط فتوسنتز است (Kheirizadeh Arough et al., 2016). این نتایج، با نتایج بررسی گیاه همیشه بهار (Shahraki et al., 2022) و گیاه قرنفل (قاسمی و همکاران، ۱۴۰۰) مطابقت دارد. نانو ذرات کیتوزان با کاهش نرخ تعرق، جذب بهتر آب و مواد غذایی از ریشه و تنظیم فشار اسمزی درون سلول‌ها، حفظ آب و محتوای نسبی آب (RWC) را در گیاهان تحت تنش افزایش می‌دهند. علاوه بر

این، نانو ذرات کیتوزان، هدایت روزنه و نرخ فتوسنتز را بهبود می‌بخشد و به حفظ تعادل آب در سلول‌ها از طریق تنظیم روزنه کمک می‌کند (Akhtar et al., 2022; Ali et al., 2021).

در مطالعه حاضر، شوری منجر به افزایش نشت الکترولیت در برگ گیاه همیشه بهار شد. نفوذپذیری بیشتر غشای سلول در اثر آسیب ناشی از استرس معمولاً منجر به نشت الکترولیت بالاتر می‌شود. مشخص شده است که تنش شوری از طریق جابجایی کلسیم مرتبط با غشای سلولی توسط سدیم از پلاسمای سلول ریشه، جریان پتاسیم را القا می‌کند که منجر به آسیب به نفوذپذیری غشاء و نشت الکترولیت بالاتر می‌شود (Demidchik et al., 2014). اثر مثبت کیتوزان در کاهش میزان نشت الکترولیت در گیاه را می‌توان به نقش این ترکیب در افزایش بیان ژن‌های درگیر در تولید مواد ضد تنش همچون آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت داد (رضایی آدرانی و همکاران، ۱۳۹۶). از طرف دیگر کیتوزان باعث ایجاد پاسخ‌های دفاعی مانند سنتز نیتریک اسید در گیاه می‌شود، که این ماده نیز از طریق بهبود انعطاف‌پذیری دیواره سلول و تاثیر بر فسفولیپیدها و بهبود سیالیت غشاها باعث حفظ ساختارهای سلولی می‌گردد (Shehab et al., 2010).

پرویلین یکی از متداول‌ترین اسمولیت‌های تولید شده با وزن مولکولی کم در گیاه تحت تنش شوری است، که نقش مهمی در غلبه به اثرات اسمزی تنش در گیاه را دارد و به حفاظت از غشاهای زیستی کمک می‌کند. پرویلین در تنظیم اسمزی و سلول‌های نگهبان روزنه نقش داشته و همچنین با از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به بقای گیاه تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Bandurska et al., 1998). پرویلین به حفظ رطوبت کمک می‌کند و تنظیم فشار اسمزی اثرات مخرب تنش شوری را کاهش می‌دهد (Lei et al., 2016). در همین راستا ارشان و همکاران (۱۴۰۲) نیز دریافت که با تنش شوری محتوی پرویلین گیاه نعنای فلفلی افزایش می‌یابد. پژوهشگران متعددی مانند (Sheikhalipour et al., 2021) در گیاه استویا و (Alenazi et al., 2024) در گیاه لوبیا چیتی، افزایش محتوای پرویلین را در نتیجه تنش شوری مشابه با نتایج این تحقیق گزارش کردند. از آنجایی که کیتوزان تجمع اسید آمینه پرویلین را تشویق می‌کند، این پتانسیل را دارد که اثرات نامطلوب نمک را کاهش دهد. کیتوزان می‌تواند به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی عکس‌العمل‌های گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی عمل کند. مطالعات نشان دادند که افزایش میزان پرویلین در زمان مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی یک راهکار محافظتی برای اغلب گیاهان به‌شمار می‌آید (نادری و همکاران، ۱۳۹۳). کیتوزان تقریباً بر بسیاری از واکنش‌های متابولیسمی گیاه تاثیر دارد و سبب تغییراتی در آن‌ها می‌گردد. کیتوزان می‌تواند بر تاثیر نامطلوب تنش شوری در گیاه همیشه بهار غلبه کند و به فعال شدن ساز و کارهای دفاعی آن‌ها برای محافظت بهتر در برابر تنش شوری عمل کند و مقاومت و سازگاری گیاه را در برابر عوامل محیطی افزایش دهد (Yang et al., 2009).

نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه، غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم، بیشترین تاثیر منفی را بر شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مختلف گیاه همیشه بهار گذاشت. تنش شوری، ارتفاع، وزن تر و خشک کل گیاه، وزن تر و خشک گل‌ها، تعداد گل و برگ، محتوای آب نسبی برگ‌ها و رنگدانه‌های فتوسنتزی را کاهش داد. در حالیکه سبب افزایش پرویلین و نشت یونی گردید. با این حال، استفاده از محلولپاشی با کیتوزان و نانوکیتوزان باعث بهبود قابل توجهی در تمام جنبه‌های رشد و نمو گیاه شد. قابل ذکر است که نانوکیتوزان، به‌ویژه غلظت ۰/۵ گرم در لیتر، بیشترین تاثیر مثبت را بر رشد و عملکرد گیاه همیشه بهار داشت. این نشان می‌دهد که نانوکیتوزان ممکن است راه‌حلی امیدوارکننده برای افزایش تحمل تنش شوری در گیاه همیشه بهار باشد. اثربخشی افزایش یافته نانوکیتوزان را می‌توان به اندازه ذرات کوچکتر، مساحت سطح بزرگتر و نفوذپذیری بیشتر در مقایسه با کیتوزان معمولی نسبت داد که آن را در کاهش اثرات شوری کارآمدتر می‌کند. به‌طور کلی، کیتوزان و نانوکیتوزان می‌تواند برای بهبود رشد و انعطاف‌پذیری گیاه همیشه بهار در محیط‌های شور مفید باشد، زیرا این ترکیبات نه تنها به حفظ رطوبت کمک می‌کنند، بلکه با فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاه، اثرات نامطلوب شوری را نیز به حداقل می‌رسانند.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

منابع

آرشان، کلثوم؛ صمصام پور، داود و پاسالاری، حسین (۱۴۰۲). اثر سدیم نیتروپروساید (SNP) بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیک گیاه دارویی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) تحت تنش شوری. پژوهش‌های تولید گیاهی. ۳۰ (۱)، ۸۵-۱۰۲.



امامی بیستگانی، ز؛ سیادت، عطالله؛ بخشنده، عبدالمهدی، و قاسمی پیربلوطی، عبدالله (۱۳۹۶). اثر تنش خشکی و الیستورکیتوزان بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، قندهای محلول و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا در گیاه آویشن دناهی (*Thymus deanensis Celak*) در شرایط آب و هوایی شهرکرد. شهرکرد. تنش‌های محیطی در علوم زراعی. ۱۰ (۱)، ۱۲-۱۹.

امیدیگی، رضا (۱۳۷۹). رویکردهای تولید و فراوری گیاهان دارویی. آستان قدس رضوی انتشارات، مشهد

جعفری، سمیرا؛ موسوی فرد، صادق؛ رضایی نژاد، عبدالحسین؛ مومپوند، حسن و سرخه، کریم (۱۴۰۱). تأثیر محلول پاشی برگ کیتوزان و دی اکسیدتیتانیوم (بالک و نانو) بر عملکرد و پاسخ‌های بیوشیمیایی اکوتیپ‌های ماریتیغال (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر/ایران، ۳۸ (۳)، ۴۵۰-۴۶۳.

خوشخوی، مرتضی؛ شبیانی، بیژن؛ رحمانی، ایرج و تفضلی، عنایت‌اله (۱۳۹۰). اصول باغبانی. انتشارات دانشگاه شیراز. ۵۹۶ صفحه

رضایی آدریانی، فریبا؛ رضایی، آیت‌اله؛ خادمی، اورنگ و شرفی، یاور (۱۳۹۶). بررسی بهبود صدمات تنش شوری در دانه‌های خرمندی با پوتریسین و کیتوزان. به زراعی کشاورزی، ۱۹ (۳)، ۶۷۱-۶۸۶

رضایی چپانه، اسماعیل؛ جمالی، موسی؛ پیرزاد، علیرضا و توفیق، سمیرا (۱۳۹۴). تأثیر قارچ‌های میکوریز بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی و عملکرد مرزه تابستانی (*Satureja hortensis* L.) در شرایط تنش شوری. فرآیند و عملکرد گیاه، ۵ (۱۷)، ۱۵-۲۹.

رضوی، اسماعیل (۱۴۰۰). تأثیر باکتری‌های سودوموناس فلورسنس بر کاهش تنش شوری در گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) از طریق پاسخ‌های فیزیوبیوشیمیایی. پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۸ (۴)، ۲۵-۴۱.

سعادت، سعید؛ رضایی، حامد؛ اسماعیل نژاد، لیلا؛ میرخانی، رسول و باقری، یوسف (۱۴۰۲). نقشه شوری خاک‌های کشاورزی ایران. وزارت جهاد کشاورزی. موسسه تحقیقات خاک و آب کشور. نشریه فنی ۶۳۰

عسکری، حسین؛ زینالی، امینه؛ پارسا، میترا؛ کاشانچی، منا؛ آزادی گنبد، رضا؛ بنایی، اقدس؛ صفائی‌چائی‌کار، صنم؛ کهنه، احسان و سراجی، علی (۱۴۰۳). ارزیابی تأثیر نانو کیتوزان و NPK بر محتوای کاتچین‌های برگ سبز چای (رقم کاشف) از طریق آنالیز برخی پارامترهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر/ایران، ۴۰ (۱)، ۷۹-۱۰۳.

عسکریان، هوشمند و عبدوسی، وحید (۱۴۰۰). بررسی شاخص‌های رشد و درصد اسانس گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش شوری ناشی از NaCl با کاربرد اسیدهیومیک و سلنیوم، فصلنامه گیاه و زیست فناوری/ایران، ۱۶ (۴)، ۳۳-۴۴.

قاسمی، وحید؛ احتشام نیا، عبدالله؛ رضایی نژاد، عبدالحسین و مومپوند، حسن (۱۴۰۲). بررسی اثر سطوح مختلف تنش شوری و رقم بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و غلظت عناصر غذایی گیاه قرنفل (*Dianthus barbatus*). پژوهش‌های تولید گیاهی، ۳۰ (۱)، ۱-۱۹.

منصوری، علی؛ احمدی، احمد و امیدی، حشمت (۱۳۹۶). اثر نانو ذرات کیتوزان و اکسید آهن بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد اولیه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) در شرایط تنش شوری. نشریه تحقیقات بذر، ۲۴ (۷)، ۷۲-۸۱.

مومنی، عزیز (۱۳۸۹). پراکنش جغرافیایی و سطوح شوری منابع خاک ایران. پژوهش‌های خاک، ۲۴ (۳)، ۲۰۳-۲۱۵.

نادری، صالحه؛ فاخری، براتعلی و سراج، مجتبی (۱۳۹۳). اثرگذاری کیتوزان بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه زنیان (*carum* *copticum* L.). تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک، ۱۱ (۱)، ۵۱-۶۴.

REFERENCES

- Abdollahzadeh, M., Elhamirad, A. H., Shariatifar, N., Saeidiasl, M., & Armin, M. (2023). Effects of nano-chitosan coatings incorporating with free/nano-encapsulated essential oil of Golpar (*Heracleum persicum* L.) on quality characteristics and safety of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Microbiology*, 385, 109996.
- Akhtar, G., Faried, H. N., Razzaq, K., Ullah, S., Wattoo, F. M., Shehzad, M. A., ... & Chattha, M. S. (2022). Chitosan-induced physiological and biochemical regulations confer drought tolerance in pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Agronomy*, 12(2), 474. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020474>.
- Alenazi, M. M., El-Ebidy, A. M., El-Shehaby, O. A., Seleiman, M. F., Aldhuwaib, K. J., & Abdel-Aziz, H. M. (2024). Chitosan and chitosan nanoparticles differentially alleviate salinity stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Plants*, 13(3), 398. <https://doi.org/10.3390/plants13030398>.
- Ali, E. F., El-Shehawi, A. M., Ibrahim, O. H. M., Abdul-Hafeez, E. Y., Moussa, M. M., & Hassan, F. A. S. (2021). A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 166-175.
- Amer, A., & Shoala, T. (2020). Physiological and phenotypic characters of sweet marjoram in response to pre-harvest application of hydrogen peroxide or chitosan nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, 268, 109374. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109374>.

- Arough, Y. K., Sharifi, R. S., Sedghi, M., & Barmaki, M. (2016). Effect of zinc and bio fertilizers on antioxidant enzymes activity, chlorophyll content, soluble sugars and proline in triticale under salinity condition. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 116-124. doi:10.15835/nbha44110224.
- Arshan, K., Samsampour, D., & Pasalari, H. (2023). Effect of sodium nitroprusside (SNP) on morpho-physiological characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Production Research*, 30(1), 85-102. doi: 10.22077/escs.2017.527. (In Persian with English abstract).
- Asgarian, H., Abdossi, V. (2021). Study of phytochemical compounds and essential oil function of Marigold (*Calendula officinalis* L.) plant under the salinity stress by NaCl with the application of Humic acid and Selenium. *Iranian Journal of Plant and Biotechnology*, 16 (4), 33-44. (In Persian with English abstract).
- Askari, H. , Zeinali, A. , Parsa, M. , kashanchi, M. , Azadi Gonbad, R. , Banaei, A. , Safaei-Chaeikar, S. , Kahneh, E. and Seraji, A. (2024). Evaluation of the effect of foliar application of nano-chitosan and mineral nutrition (NPK) on the catechins content in green tea (Kashef var.) leaves through analysis of some biochemical, physiological and molecular parameters. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 40(1), 79-103. doi: 10.22092/ijmapr.2023.363015.3348. (In Persian with English abstract).
- Aydin Acar, C., Gencer, M. A., Pehlivanoglu, S., Yesilot, S., & Donmez, S. (2024). Green and eco-friendly biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Calendula officinalis* flower extract: Wound healing potential and antioxidant activity. *International wound journal*, 21(1), e14413.
- Bandurska, H. (1998). Implication of ABA and proline on cell membrane injury of water deficit stressed barley seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, 20, 375-381.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207.
- Chandra, P., Singh, A., Prajapat, K., Rai, A. K., & Yadav, R. K. (2022). Native arbuscular mycorrhizal fungi improve growth, biomass yield, and phosphorus nutrition of sorghum in saline and sodic soils of the semi-arid region. *Environmental and Experimental Botany*, 201, 104982.
- Correa, C., Ming, L. C., & Scheffer, M. C. (1994). Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. *Jaboticabal: Funep*.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1259-1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>.
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16, 101-112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>.
- Du, W. L., Xu, Z. R., Han, X. Y., Xu, Y. L., & Miao, Z. G. (2008). Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. *Journal of hazardous materials*, 153(1-2), 152-156.
- Du, Y., Liu, X., Zhang, L., & Zhou, W. (2023). Drip irrigation in agricultural saline-alkali land controls soil salinity and improves crop yield: Evidence from a global meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 880, 163226.
- Dzung, N. A., Khanh, V. T. P., & Dzung, T. T. (2011). Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate polymers*, 84(2), 751-755.
- Emami Bistgani, Z. , Siadat, S. , Bakhshandeh, A. and Ghasemi Pirbalouti, A. (2017). The effect of drought stress and elicitor of chitosan on photosynthetic pigments, proline, soluble sugars and lipid peroxidation in *Thymus deanensis* Celak. in Shahrekord climate. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 10(1), 12-19. doi: 10.22077/escs.2017.527. (In Persian)
- Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., & Cortez, D. A. G. (2008). Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 391-395.
- Ghasemi, V., Nia, A. E., Rezaeinejad, A., & Mumivand, H. (2023). The effect of different levels of salinity stress and cultivar on biochemical and physiological characteristics and nutrient concentration of William Sweet (*Dianthus barbatus*). *Plant Production Research*, 30 (1), 1-19. DOI: 10.22069/JOPP.2021.19072.2815. (In Persian with English abstract).
- Gong, D. H., Wang, G. Z., Si, W. T., Zhou, Y., Liu, Z., & Jia, J. (2018). Effects of salt stress on photosynthetic



- pigments and activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Kalidium foliatum*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65, 98-103.
- Guo, J., Shan, C., Zhang, Y., Wang, X., Tian, H., Han, G., ... & Wang, B. (2022). Mechanisms of salt tolerance and molecular breeding of salt-tolerant ornamental plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 854116. doi: 10.3389/fpls.2022.854116.
- Guzman, M. R., & Marques, I. (2023). Effect of varied salinity on marigold flowers: reduced size and quantity despite enhanced antioxidant activity. *Agronomy*, 13(12), 3076.
- Guzman, M. R., & Marques, I. (2023). Effect of Varied Salinity on Marigold Flowers: Reduced Size and Quantity Despite Enhanced Antioxidant Activity. *Agronomy*, 13(12), 3076. <https://doi.org/10.3390/agronomy13123076>.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., ... & Fujita, M. (2021). Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9326. <https://doi.org/10.3390/ijms22179326>
- Hassan, F. A. S., Ali, E., Gaber, A., Fetouh, M. I., & Mazrou, R. (2021). Chitosan nanoparticles effectively combat salinity stress by enhancing antioxidant activity and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 291-300.
- Iber, B. T., Kasan, N. A., Torsabo, D., & Omuwa, J. W. (2022). A review of various sources of chitin and chitosan in nature. *Journal of Renewable Materials*, 10(4), 1097. DOI: 10.32604/jrm.2022.018142
- Idrees, M., Khan, M. M. A., Naeem, M., Aftab, T., Hashmi, N., Alam, M., & Moinuddin. (2011). Modulation of defence responses by improving photosynthetic activity, antioxidative metabolism, and vincristine and vinblastine accumulation in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don through salicylic acid under water stress. *Russian agricultural sciences*, 37, 474-482.
- Jafari, S., Mousavi-Fard, S., Rezaei Nejad, A., Mumivand, H., & Sorkheh, K. (2022). Effects of chitosan and titanium dioxide (bulk and nano) foliar application on yield and biochemical responses of *Silybum marianum* (L. Gaertn.) ecotypes. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(3), 450-463. doi: 6.357559.2022.IJMAPR/22092.1 (In Persian with English abstract).
- Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D. (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 51(4), 176-180.
- Khairy, A. M., Tohamy, M. R., Zayed, M. A., Mahmoud, S. F., El-Tahan, A. M., El-Saadony, M. T., & Mesiha, P. K. (2022). Eco-friendly application of nano-chitosan for controlling potato and tomato bacterial wilt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2199-2209.
- Khaled, H., & Fawy, H. A. (2011). Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity. *Soil and Water Research*, 6(1), 21.
- Khalid, K. A., & da Silva, J. T. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6(1), 12-27.
- Khoshkho, M., Sheibani, B., Rahmani, B., & Tafazzoli, A. (2011). Principles of Gardening. Shiraz University Press. 596 pages. (In Persian).
- Koksal, N., Alkan-Torun, A., Kulahlioglu, I., Ertargin, E., & Karalar, E. (2016). Ion uptake of marigold under saline growth conditions. *SpringerPlus*, 5, 1-12.
- Koksal, N., Alkan-Torun, A., Kulahlioglu, I., Ertargin, E., & Karalar, E. (2016). Ion uptake of marigold under saline growth conditions. *SpringerPlus*, 5, 1-12. doi: 10.1186/s40064-016-1815-3
- Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell & environment*, 25(2), 275-294.
- Lee, S., Hao, L. T., Park, J., Oh, D. X., & Hwang, D. S. (2023). Nanochitin and nanochitosan: Chitin nanostructure engineering with multiscale properties for biomedical and environmental applications. *Advanced Materials*, 35(4), 2203325. <https://doi.org/10.1002/adma.202203325>.
- Lei, P., Xu, Z., Liang, J., Luo, X., Zhang, Y., Feng, X., & Xu, H. (2016). Poly (γ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Growth Regulation*, 78, 233-241.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of botany*, 78(3), 389-398. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134>.

- Mahdavi, B., & Rahimi, A. (2013). Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian Journal of Biosciences*, 7. <http://dx.doi.org/10.5053/ejobios.2013.7.0.9>.
- Mansouri, A., Ahmadi, A. and Omidi, H. (2017). Effect of chitosan and iron oxide nanoparticles on germination and early growth indices of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salt stress conditions. *Seed Research Journal*. 24(7), 72-81. (In Persian).
- Moameni A. (2011). Geographical distribution and salinity levels of soil resources of Iran. *Iranian Journal of Soil Research (Formerly soil and water sciences)*, 24(3): 203-215. (In Persian)
- Naderi, S., Fakheri, B. A., & Seraji, M. (2017). The effect of chitosan on some physiological and biochemical characteristics of Ajowan (*Carum copticum* L.). *Crop Science Research in Arid Regions*, 1(1), 51-64. doi: 10.22034/CSRAR.01.01.05 (In Persian with English abstract).
- Omidbeigi, R. (1990). Approaches to the production and processing of medicinal plants. Astan Quds Razavi Publications, Mashhad. (In Persian).
- Pandey, P., Tripathi, A., Dwivedi, S., Lal, K., & Jhang, T. (2023). Deciphering the mechanisms, hormonal signaling, and potential applications of endophytic microbes to mediate stress tolerance in medicinal plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1250020. doi: 10.3389/fpls.2023.1250020.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22, 4056-4075. DOI: 10.1007/s1135601437391
- Per, T. S., Khan, N. A., Reddy, P. S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M. I. R., & Anjum, N. A. (2017). Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant physiology and biochemistry*, 115, 126-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>.
- Razavi, S. E. (2021). Role of *Pseudomonas fluorescens* in mitigating salinity stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through physio-biochemical responses. *Journal of Plant Production Research*, 28(4), 25-41. doi: 10.22069/jopp.2021.17185.2584. (In Persian with English abstract).
- Rezaei Aderyani, F., Rezaei, A., & Sharafi, Y. (2017). Investigation of improving salinity stress damages in *Diospyros lotus* seedlings by putrescine and chitosan. *Journal of Crops Improvement*, 19(3), 671-686. <https://doi.org/10.22059/jci.2017.60483>. (In Persian with English abstract).
- Rezaei Chianeh, A., Jamali, M., Pirzad, A. R. and Tofigh, S. (2015). The effect of mycorrhizal fungi on some morphophysiological traits and yield of summer savory (*Satureja hortensis* L.) under salt stress conditions. *Plant Process and Yield*, 5(17), 15-29. (In Persian).
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science*, 30(1), 105-111. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1990.0011183X003000010025X>.
- Robatjazi, R., Roshandel, P., & Hooshmand, S. D. (2020). Benefits of silicon nutrition on growth, physiological and phytochemical attributes of basil upon salinity stress. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 7(1), 37-50. DOI: 10.22059/ijhst.2020.288551.318.
- Roychoudhury, A., Datta, K., & Tagore, R. (2022). Influence of chitosan and chitosan based nanoparticles against abiotic stress in plants. In *Role of Chitosan and Chitosan-based nanomaterials in plant sciences* (pp. 297-320). Academic Press.
- Saadat, S., Rezaei, H., Bagheri, Y. R., Mirkhani, R. & Esmaeil Nejad, L. (2023). Salinity map of agricultural soils of Iran, Technical Publication No. 630, National Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran. (In Persian).
- Sahab, S., Suhani, I., Srivastava, V., Chauhan, P. S., Singh, R. P., & Prasad, V. (2021). Potential risk assessment of soil salinity to agroecosystem sustainability: Current status and management strategies. *Science of the Total Environment*, 764, 144164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144164>.
- Shabani Fard, R., Aghaee Hanjani, E., & Danaee, E. (2024). Effects of Polyamines on Morphophysiological Traits of *Calendula officinalis* L. under Salinity Stress Caused by Potassium Chloride and Sodium Chloride Salts. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 11(2), 189-200.
- Shahraki, B., Bayat, H., Aminifard, M. H., & Azarmi Atajan, F. (2022). Effects of foliar application of selenium and nano-selenium on growth, flowering, and antioxidant activity of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53(20), 2749-2765.
- Shehab, G. G., Ahmwd, O. K., & El-Beltagi, H. S. (2010). Effects of various chemical agents for alleviation



- of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 139-148.
- Sheikhalipour, M., Esmailpour, B., Gohari, G., Haghighi, M., Jafari, H., Farhadi, H., ... & Kalisz, A. (2021). Salt stress mitigation via the foliar application of chitosan-functionalized selenium and anatase titanium dioxide nanoparticles in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Molecules*, 26(13), 4090. <https://doi.org/10.3390/molecules26134090>.
- Terry, L. A., & Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32(1), 1-13.
- Tian, B., & Liu, J. (2023). Smart stimuli-responsive chitosan hydrogel for drug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123902.
- Tokath, K., & Demirdöven, A. (2020). Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 259, 108656.
- Ullah, R., Sher, S., Muhammad, Z., Afriq Jan, S., & Nafees, M. (2022). Modulating response of sunflower (*Helianthus annuus*) to induced salinity stress through application of engineered urea functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Microscopy Research and Technique*, 85(1), 244-252. doi: 10.1002/jemt.23900
- Uthairatanakij, A., Teixeira da Silva, J. A., & Obsuwan, K. (2007). Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology*, 1(1), 1-5.
- Wang, X., Cui, Y., Zhang, X., Ju, W., Duan, C., Wang, Y., & Fang, L. (2020). A novel extracellular enzyme stoichiometry method to evaluate soil heavy metal contamination: evidence derived from microbial metabolic limitation. *Science of the Total Environment*, 738, 139709.
- 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.
- Zafar-Ul-Hye, M., Mahmood, F., Danish, S., Hussain, S., Gul, M., Yaseen, R., & Shaaban, M. (2020). Evaluating efficacy of plant growth promoting rhizobacteria and potassium fertilizer on spinach growth under salt stress. *Pak. J. Bot.*, 52(4), 1441-1447. DOI: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4\(7\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4(7)).
- Zhang, W. W., Chong, W. A. N. G., Rui, X. U. E., & Wang, L. J. (2019). Effects of salinity on the soil microbial community and soil fertility. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1360-1368.
- Zulfiqar, F., Moosa, A., Ali, H. M., Ferrante, A., Nazir, M. M., Makhzoum, A., & Soliman, T. M. (2023). Preharvest melatonin application mitigates arsenic-induced oxidative stress and improves vase life of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cut flowers. *South African Journal of Botany*, 163, 330-337.