

Combined effect of chitosan and salicylic acid hormone on physiological and biochemical traits and expression of key genes of carnosic acid biosynthesis pathway in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

Morteza Najafpour Mohammadabady 

Ph.D. Student, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: morteza.najafpour1354@gmail.com

Enayatollah Yazdanpanah 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: e.yazdanpanah@pnu.ac.ir

Hamid Sobhanian 

Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

Gholamreza Bakshi Khaniki 

Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: bakhshi@pnu.ac.ir

Abstract

Objective

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), as one of the important medicinal and aromatic plants in the pharmaceutical and food industries. Among the terpenes of rosemary, carnosic acid has gained significant importance due to its therapeutic properties such as antioxidant, antimicrobial, and antitumor effects. Consequently, researchers' attention has been drawn to the application of elicitors to enhance the growth and increase the essential oil of rosemary. Given the medicinal importance of rosemary and the potential of chitosan and salicylic acid in enhancing plant traits, this research was conducted with the aim of investigating the effect of these elicitors on rosemary traits and the expression of key genes in the carnosic acid pathway (*KSLI* and *CPSI*).

Materials and methods

This research was carried out as a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Three months after transplanting the seedlings, chitosan (Ch) at concentrations of 10, 50, and 100 mg/L and salicylic acid (SA) at concentrations of 5, 10, and 20

μM were applied individually and in combination, in three stages at three-week intervals, as foliar sprays on the aerial parts of rosemary. Physiological and biochemical traits and expression of key genes of carnosic acid biosynthesis pathway were measured one week after the last spraying.

Results

The treatment combinations had synergistic effects on rosemary traits. As the most effective treatments, SA 10 μM + Ch 100 mg/L and SA 20 μM + Ch 50 mg/L treatments led to a 44 and 45% significant decrease in MDA, 2 and 2.5-fold significant increase in phenol, 2.8 and 2.9-fold increase in sugars, 2.6 and 2-fold increase in catalase activity, 2.8 and 2.5-fold increase in SOD activity, 2 and 2.3-fold increase in polyphenol oxidase activity, 3 and 1.9-fold increase in chlorophyll content, 2 and 2.2-fold increase in carotenoid content, 2.3 and 2.6-fold increase in essential oil content, 3 and 3.6-fold increase in *CPSI* gene expression, 3.4 and 3.6-fold increase in *KSLI* gene expression, respectively.

Conclusions

Combined treatments significantly reduce lipid peroxidation and increase pigments, the antioxidant system, essential oil, and the expression of key genes in the carnosic acid pathway.

Keywords: Antioxidant, Carnosic acid, Elicitor, Rosemary

Paper Type: Research Paper.

Citation: Najafpour Mohammadabady, M., Yazdanpanah, E., Sobhanian, H., & Bakshi Khaniki, K. (2026). Combined effect of chitosan and salicylic acid hormone on physiological and biochemical traits and expression of key genes of carnosic acid biosynthesis pathway in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 1-26.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(2), 1-26.

DOI: 10.22103/jab.2026.25770.1752

Received: December 10, 2025.

Received in revised form: February 06, 2026.

Accepted: February 07, 2026.

Published online: June 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian



Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) possesses significant medicinal and therapeutic importance, supported by a growing body of phytochemical and pharmacological evidence. Its bioactive constituents, including carnosic acid, demonstrate potent antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, researchers have become interested in the use of elicitors to enhance its traits and essential oil. The application of chitosan and salicylic acid as biostimulants and elicitors in medicinal plants enhances growth, stress resilience, and bioactive compound production through various molecular mechanisms. Chitosan, derived from chitin deacetylation,

primes antioxidant defense systems by upregulating enzymes. It also modulates phytohormone signaling, which influences plant architecture and morphological traits. Conversely, salicylic acid, synthesized via isochorismate and phenylalanine ammonia-lyase pathways, orchestrates defense responses by binding multiple targets beyond the canonical NPR receptors, including transcription factors like bZIP62 and DREB2, which regulate stress-responsive genes. Salicylic acid fine-tunes redox homeostasis by scavenging reactive oxygen species (ROS) and elevating non-enzymatic antioxidants, while its exogenous application preserves essential oil profiles. Their synergistic application amplifies secondary metabolite production and stress-adaptive genes, offering sustainable strategies for plant productivity. However, their effects are concentration-dependent; optimal doses enhance growth and metabolite yield, whereas excess application may inhibit root development or disrupt hormonal balance via auxin accumulation or ethylene modulation. Overall, these compounds induce distinct signaling networks to optimize medicinal plant quality, offering sustainable alternatives to agrochemicals. Given the above-mentioned, this research was performed with the aim of evaluating the conditional effect of chitosan and salicylic acid on the physiological and biochemical traits and the expression of key genes involved in the carnolic acid biosynthesis pathway (*CPSI* and *KSLI*) in rosemary plants.

Materials and methods

This research was carried out as a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Greenhouse conditions were set at a mean temperature of 25°C, a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, and a relative humidity of 60%. Uniform-sized rosemary seedlings were cultivated in plastic pots (containing garden soil, cocopeat, and perlite in a 3:1:2 ratio). Three months after transplanting the seedlings, chitosan at concentrations of 0, 50, and 100 mg/L and salicylic acid at concentrations of 0, 10, and 20 µM were sprayed individually and in combination onto the aerial parts of the rosemary plants in three rounds at three-week intervals. Chitosan solutions were prepared by dissolving chitosan powder (degree of deacetylation >85%) in 1% acetic acid and adjusting the pH to 5.6. Moreover, salicylic acid solutions were prepared by dissolving SA powder in distilled water with a few drops of ethanol. As a control, the aerial parts of rosemary were sprayed with sterile distilled water. Assessments of the rosemary traits were performed one week after the last spraying. Rosemary leaf samples were stored in a freezer at -70°C until the time came to measure the traits and determine the expression of the desired genes. These traits included malondialdehyde, phenol, soluble sugars, catalase activity, ascorbate peroxidase activity, polyphenol oxidase activity chlorophyll, carotenoids, essential oil yield, as well as *CPSI* and *KSLI* expression. Lipid peroxidation was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) content using the thiobarbituric acid (TBA) method, with absorbance read at 532 and 600 nm. Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, with gallic acid as a standard, and absorbance measured at 765 nm. Soluble sugar content was quantified using the anthrone-sulfuric acid method, with glucose as a

standard, reading absorbance at 630 nm. The activity of antioxidant enzymes was assayed from fresh leaf homogenates. Catalase (CAT) activity was determined by monitoring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm. Ascorbate peroxidase (APX) activity was measured by tracking the oxidation of ascorbate at 290 nm. Polyphenol oxidase (PPO) activity was estimated using pyrogallol as a substrate, measuring the increase in absorbance at 430 nm. Photosynthetic pigments were extracted with 80% acetone. Chlorophyll a, chlorophyll b, and total carotenoid concentrations were calculated using specific absorption coefficients at wavelengths of 663, 645, and 470 nm. Essential oil content was obtained by hydro-distillation of 25g of dried leaf material for 4 hours using a Clevenger apparatus, and the oil yield was expressed as a percentage (v/w) based on dry weight. Real-time PCR was performed to determine the expression of the target genes by using SYBR Green dye. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantification method was used to examine the changes in the expression of *CPSI* and *KSLI* genes between different treatments using REST software. All collected data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) by using SAS software. Mean comparisons were performed by Fisher's Least Significant Difference (LSD) test at a 5% probability level.

Results

The results of the analysis of variance of physiological and biochemical traits and expression of key genes of the carnosic acid biosynthesis pathway (*CPSI* and *KSLI*) in rosemary plant showed that the interaction effects of chitosan and salicylic acid on these traits were significant at the 5 or 1 percent level. The results showed that chitosan and salicylic acid generally modulated rosemary traits in a concentration-dependent manner. The treatment combinations enhanced their effectiveness on rosemary traits and thus showed a synergistic effect. The treatments salicylic acid 20 μ M + chitosan 50 mg/L and salicylic acid 10 μ M + chitosan 100 mg/L were identified as the most effective treatment combinations, causing a 44 and 45% significant reduction in malondialdehyde, and significant increases of 2- and 2.5-fold in phenol, 2.8- and 2.9-fold in soluble sugars, 2.6- and 2-fold in catalase activity, 2.8- and 2.5-fold in ascorbate peroxidase activity, 2- and 2.3-fold in polyphenol oxidase activity, 3- and 1.9-fold in chlorophyll, 2- and 2.2-fold in carotenoids, 2.3- and 2.6-fold in essential oil yield, 3- and 3.6-fold in *CPSI* transcript level, and 3.4- and 3.6-fold in *KSLI* transcript level, respectively. As observed, the salicylic acid 10 μ M + chitosan 100 mg/L treatment led to significant improvements in rosemary traits.

Conclusions

In conclusion, our findings indicate that the combined treatments salicylic acid 20 μ M + chitosan 50 mg/L and salicylic acid 10 μ M + chitosan 100 mg/L significantly reduced lipid oxidation, increased photosynthetic pigments, strengthened the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, increased essential oil, and enhanced the expression of key genes in the carnosic acid biosynthesis pathway. Therefore, it is suggested to use these treatment combinations

to improve the physiological and biochemical traits of rosemary. Although the effects of chitosan and salicylic acid elicitors on the physiological, biochemical, and molecular traits of rosemary were revealed in this study, understanding the exact mechanisms of the effect of these elicitors on rosemary traits requires adopting approaches such as RNA-seq to gain a better understanding of the theoretical discussions of the mechanisms of these potential elicitors.

Author contributions

Conceptualization: Yazdanpanah E, Sobhanian H; Methodology: Yazdanpanah E; Software: Najafpour, M; Validation: Bakshi Khaniki, G; Formal analysis: Najafpour, M; Investigation: Najafpour, M; Resources: Yazdanpanah E, Sobhanian H; Data curation: Bakshi Khaniki, G; Writing-original draft preparation: Najafpour, M; Writing-review and editing: Yazdanpanah E, Sobhanian H; Visualization: Najafpour, M; Supervision: Bakshi Khaniki, G; Project administration: Yazdanpanah E; Funding acquisition: Yazdanpanah E, Sobhanian H;. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice Chancellor for Research, Payam Noor University-East Tehran Branch, for their cooperation in conducting this study.

Ethical considerations

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


Funding

The study was funded by the Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

Conflict of interest

The authors have no affiliation with any organization with a direct or indirect financial interest in the subject matter discussed in the manuscript.

اثر ترکیبی کیتوزان و هورمون سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستنز کارنوسیک اسید در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

مرتضی نجف‌پور محمدآبادی 


دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: morteza.najafpour1354@gmail.com

عنایت‌اله یزدان پناه 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: e.yazdanpanah@pnu.ac.ir

حمید سبحانیان 

دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

غلامرضا بخشی خانیکی 

استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: bakhshi@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸

چکیده

هدف: رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) یکی از گیاهان دارویی و معطر مهم در صنعت دارو و غذا به حساب می‌آید. در میان ترین‌های رزمای، کارنوسیک اسید به دلیل خواص درمانی نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد توموری اهمیت بسزایی یافته است. در نتیجه، توجه محققان به کاربرد الیسیتورها برای تقویت رشد و افزایش اسانس رزماری جلب شده است. با توجه به اهمیت دارویی رزماری و پتانسیل کیتوزان و سالیسیلیک اسید در تقویت صفات گیاهی، این پژوهش با هدف بررسی اثر این الیسیتورها بر صفات رزماری و بیان ژن‌های کلیدی مسیر کارنوسیک اسید (*CPSI* و *KSL1*) انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بعد از گذشت سه ماه از کشت نشاء، کیتوزان (Ch) با غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و سالیسیلیک اسید (SA) با غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار

به طور انفرادی و در ترکیب باهم در سه نوبت با فاصله سه هفته بر روی اندام هوایی رزماری محلول‌پاشی شدند. بعد از گذشت یک هفته از آخرین محلول‌پاشی، سنجش صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتز کارنوسیک اسید انجام شد.

نتایج: ترکیب‌های تیماری، اثر هم‌افزایی بر صفات رزماری داشتند. به عنوان موثرترین تیمار، تیمارهای SA 10 μ M + Ch 100 mg/L و SA 20 μ M + Ch 50 mg/L به ترتیب سبب کاهش معنی‌دار حدود ۴۴ و ۴۵٪ مالون‌دی‌آلدئید و افزایش معنی‌دار ۲ و ۲/۵ برابری فنل، ۲/۸ و ۲/۹ برابری قندها، ۲/۶ و ۲ برابری فعالیت کاتالاز، ۲/۸ و ۲/۵ برابری فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز، ۲ و ۲/۳ برابری فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز، ۳ و ۱/۹ برابری کلروفیل، ۲ و ۲/۲ برابری کارتنوئید، ۲/۶ و ۲/۳ برابری اسانس، ۳ و ۳/۶ برابری بیان *CPSI*، و ۳/۴ و ۳/۶ برابری بیان *KSLI* شدند.

نتیجه‌گیری: تیمارهای ترکیبی سبب کاهش معنی‌دار اکسیداسیون لیپیدی و افزایش رنگدانه‌ها، سامانه آنتی‌اکسیدانت، اسانس و بیان ژن‌های کلیدی مسیر کارنوسیک اسید می‌شوند.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدانت، الیسیاتور، رزماری، کارنوسیک اسید

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نجف‌پور محمدآبادی مرتضی، یزدان پناه عنایت‌اله، سبحانیان حمید، بخشی خانیکی غلامرضا (۱۴۰۵) اثر ترکیبی کیتوزان و هورمون سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کارنوسیک‌اسید در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۸(۳)، ۱-۲۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian



Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی در سال‌های اخیر به دلیل پتانسیل بالای خود به عنوان جایگزین‌های طبیعی برای افزودنی‌های مصنوعی، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (Amirteymoori et al., 2021). این محصولات طبیعی سرشار از ترکیبات زیست‌فعال مانند روغن‌های ضروری، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک هستند که به خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آنها کمک می‌کنند (Mohammadabadi et al., 2025). در نتیجه، فیتوبیوتیک‌ها نقش مهمی در بهبود سلامت، عملکرد و کیفیت محصول دارند (Safaei et al., 2025). استفاده از فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی به عنوان محرک‌های رشد ضد میکروبی طبیعی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها، مزایای بی‌شماری را ارائه می‌دهد (Khezri et al., 2025). این مزایا شامل بهبود عملکرد، سرکوب بیماری‌ها (Mohammadabadi et al., 2023)، فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، اثرات هیپوکلسترولمی، افزایش آنزیم‌ها و بهبود عملکرد (Roudbar et al., 2015)، افزایش جذب

مواد مغذی و بهبود عملکرد کلی سیستم ایمنی (Vahabzadeh et al., 2021)، بهبود رژیم ضریب تبدیل (Vahabzadeh et al., 2020)، کاهش اثرات مرتبط با استرس و کاهش اثرات زیست‌محیطی سیستم‌های تولیدی هستند (Mohammadabadi et al., 2024). با توجه به نگرانی‌های فزاینده جهانی در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تقاضا برای محصولات ایمن تر و سالم تر، استفاده از فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی یک استراتژی جایگزین امیدوارکننده و پایدار ارائه می‌دهد (Mohammadabadi et al., 2022). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L) یکی از گیاهان دارویی و معطر مهم در صنعت دارو و غذا به شمار می‌رود. اهمیت درمانی این گیاه به خاطر حضور آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، آلکالوئیدها و ترکیبات ترپنوئیدی با خواص ضدویروسی، ضدقارچی و ضدباکتریایی هستند (Macedo et al., 2020). در میان ترپن‌های رزماری، کارنوسیک اسید به دلیل ویژگی‌های درمانی نظیر خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، محافظت نوروئی، ضددیابتی، ضدتوموری و فعالیت موثر علیه نقص ایمنی اکتسابی اهمیت بسزائی یافته است. مسیر بیوسنتزی کارنوسیک اسید با تبدیل ژرانیل ژرانیل دی فسفات^۱ (GGDP) به دی‌پی‌کوپالیل (DPK) از طریق کاپلی دی فسفات سنتتاز^۲ (CPS) آغاز می‌شود. در ادامه، DPK توسط شبه‌کاورن سنتتاز^۳ (KSL) به میلتریدین^۴ مبدل می‌شود. میلتریدین یا به طور خودبه‌خودی اکسید شده و آبتاترین^۵ را تولید می‌کند و یا اینکه توسط آنزیم فرجینول سنتتاز (FS) به فروجینون^۶ تبدیل می‌شود. در مرحله نهائی، فروجینون با اکسیداسیون به کارنوسیک اسید تبدیل می‌شود (Macedo et al., 2020). اهمیت دارویی به واسطه ترکیباتی نظیر کارنوسیک اسید سبب شده تا پژوهشگران تلاش نمایند از البیستورها برای افزایش اسانس یا صفات فیزیولوژیکی رزماری استفاده کنند. البیستورها، ملکول‌هایی با وزن ملکولی پایین و دارای منشاء زیستی یا غیرزیستی هستند که سبب القاء پیام‌رسانی سلولی می‌شوند. بعد از دریافت سیگنال آنها توسط گیرنده‌های سطح سلولی، بیان ژن‌های کلیدی درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی و متابولیسمی القاء می‌شود و اینگونه موجبات افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و قویت صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه را فراهم می‌کنند (Angouti et al., 2022). کیتوزان یکی از آمینو پلی‌ساکاریدهای مهم با خواصی نظیر زیست تخریب‌پذیری، سمیت پایین، سازگاری زیستی و محرک رشد گیاهی است. هرچند مکانیسم عمل کیتوزان برای تغییر سوخت‌وساز گیاه هنوز در حاله ابهام است، اما پژوهشگران اعتقاد دارند که مکانیسم عمل کیتوزان تا حدودی با مسیرهای انتقال پیام سالیسیلیک اسید در ارتباط است (Li et al., 2020). سالیسیلیک اسید یکی از ترکیبات مهم و موثر بر جوانه‌زنی بذر، تجمع رنگدانه، فتوسنتز، بیوسنتز اتیلن، فعالیت‌های آنزیمی، جذب مواد مغذی، القای گل و فعالیت‌های متابولیسمی است (Peng et al., 2021). به خاطر فعالیت شبه‌هورمونی، پژوهشگران به دنبال کشف نقش سالیسیلیک اسید در رابطه با صفات مختلف گیاهی هستند. در این رابطه، شواهد نشان می‌دهد که افزودن سالیسیلیک اسید باعث افزایش تولید اسانس می‌شود (Peng et al., 2021). تاکون، پژوهش‌های متعددی در رابطه با کاربرد البیستورهای کیتوزان و سالیسیلیک اسید در

¹ Geranylgeranyl Diphosphate

² Copalyl Diphosphate Synthase

³ Pseudo-Caverne Synthetase

⁴ Miltiradiene

⁵ Abietatriene

⁶ Ferruginol

راستای افزایش صفات مختلف در گیاهان دارویی انجام شده است. با این حال، اثر همزمان کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتز کارنوسیک اسید در گیاه رزماری هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است. برای مثال، (Naderi et al., 2015) نشان دادند که کیتوزان (۲ گرم در لیتر) سبب تعدیل سطح H_2O_2 و MDA در ریحان می‌شود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کارتنوئید و کلروفیل، پرولین، کربوهیدرات، فنل، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها به شدت تحت اثر کیتوزان قرار گرفتند. بنابراین، نویسندگان توصیه کردند که کیتوزان توانایی تقویت سیستم آنتی‌اکسیدان و افزایش تولید متابولیت‌های ریحان را دارد. همچنین، (Azadvari et al., 2019) تاثیر محلول‌پاشی و پیش‌تیمار بذر با سالیسیلیک اسید (۵/۰ میلی‌مولار) را بر گیاه دارویی سیاهدانه مطالعه کردند و نشان دادند که محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز و فنول پراکسیداز شد. محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید سبب حصول بیشترین عملکرد دانه و رنگدانه‌های فتوسنتزی شد. با توجه به اینکه کاربرد سالیسیلیک اسید به‌ویژه به شکل محلول‌پاشی با بهبود وضعیت رطوبتی گیاه، کلروفیل، فعالسازی سیستم آنتی‌اکسیدانی موجبات بهبود رشد و عملکرد سیاهدانه را فراهم کرد، لذا این پژوهشگران پیشنهاد کردند که کاربرد محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید یک رویکرد مفید در راستای تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاهان است.

با توجه به اهمیت گیاه دارویی رزماری، پتانسیل الیستورهای کیتوزان و سالیسیلیک اسید در افزایش محتوای اسانس و تقویت صفات گیاهی، این پژوهش با هدف بررسی اثر ترکیبی کیتوزان و هورمون سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کارنوسیک اسید در این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار آزمایشی: نشاهای گیاه رزماری از شرکت زرین گیاه تهیه شدند. در ادامه، نشاهای هم‌اندازه رزماری در گلدان‌های پلاستیکی (حاوی خاک باغچه، کوکوپیت و پرلیت با نسبت ۱:۲:۳) کشت شدند. شرایط گلخانه به صورت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روز، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰ درصد تنظیم شد. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بعد از گذشت سه ماه از کشت نشاها در مرحله رشد رویشی، کیتوزان با غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (به اقتباس از Jami et al., 2018) و سالیسیلیک اسید با غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار (به اقتباس از Touhidi et al., 2016) به طور انفرادی و در ترکیب باهم در سه نوبت با فاصله سه هفته بر روی اندام هوایی گیاهان (با اندازه‌ای شبیه به هم) رزماری محلول‌پاشی شدند. بعد از گذشت یک هفته از اعمال آخرین محلول‌پاشی، نمونه‌گیری از برگ‌های رزماری انجام گرفت و نمونه‌ها به طور موقت در ازت مایع قرار گرفتند تا به فریزر منتقل شوند. به عنوان شاهد، اندام هوایی رزمای (بدون تیمار) با آب مقطر استریل محلول‌پاشی شد. نمونه‌های برگ‌ی رزماری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند تا زمان سنجش صفات و تعیین بیان ژن‌های موردنظر فرا برسد.

سنجش صفات-مالون دی آلدئید (MDA): به طور خلاصه، ۲۵۰ میلی گرم برگ در ۵ میلی لیتر بافر استخراج Tris-HCl (۰/۱ مولار با pH = ۷/۶) هموژنایز شد. در ادامه، ۳ میلی لیتر از نمونه با ۲ میلی لیتر تیوباریوتیک اسید ۰/۵ درصد (حاوی تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد) ترکیب شده و در حمام آب داغ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، چگالی نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر ثبت شد. میزان MDA بر مبنای فرمول $C=D/E$ تعیین شد که در آن E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی متر $10^5 \times 1/56$) و D گویای میزان جذب نمونه می‌باشد (Heath et al., 1968).

فنول کل: جهت تخمین محتوای ترکیبات فنلی، ۰/۵ گرم از پودر برگ با یک میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد ترکیب شد و پس از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین ۱۰ درصد مخلوط شد. در ادامه، ۲ میلی لیتر سدیم بیکربنات ۵ درصد به محلول اضافه شد. در نهایت، جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. بر مبنای نمودار استاندارد گالیک اسید، غلظت فنول کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر بیان شد (Singleton et al., 1999).

قندهای محلول: جهت سنجش محتوای قندهای محلول، ۰/۵ گرم نمونه برگ با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد ترکیب شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با ۳۵۰ دور در دقیقه تکان خورد و متعاقباً به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از افزودن ۳ میلی لیتر معرف آنترون به فاز روئی، جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. از گلوکز خالص برای تهیه محلول استاندارد استفاده شد. واحد اندازه‌گیری، میلی گرم بر گرم وزن تر بود (Yang et al., 2015).

رنگدانه‌های فتوسنتزی: جهت استخراج کارنوئوئید و کلروفیل، ۱ گرم از بافت برگ با ۱۰ میلی لیتر از استون ۸۰ درصد در هاون سرد خرد و متعاقباً فیلتر شد. در نهایت، جذب در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۷۰ و ۶۷۵ نانومتر قرائت شد تا غلظت کلروفیل کل و کارنوئوئیدها بر اساس فرمول‌های بالا تعیین شود (Armon, 1949).

$$\text{Chlorophyll a (chl. a)} = 19.3 (A663) - 0.86 (A645) V/100 W$$

$$\text{Chlorophyll b (chl. b)} = 19.3 (A645) - 3.6 (A663) V/100 W$$

$$\text{Carotenoides} = 100(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b}) / 227$$

$$\text{Total chlorophyll} = 20,2(A675) + 8.02(A663) V/100 W$$

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ۵۰۰ میلی گرم نمونه برگ در نیتروژن مایع خرد و پودر شد و متعاقباً با یک میلی لیتر از بافر ۵۰ میلی مولار پتاسیم فسفات (حاوی EDTA ۵۰ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدین ۱ درصد) سرد هموژنایز شد. محلول حاصل با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. در نهایت، محلول روشن‌آور برای برآورد فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید. فعالیت کاتالاز (CAT) با تعیین سرعت محوشوندگی H_2O_2 برآورد شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار) و H_2O_2

(۱۵ میلی‌مولار) تهیه شد. با افزودن H_2O_2 به مخلوط واکنش، جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر ثبت شد (Dhindsa et al., 1981). فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) با تعیین اکسیداسیون آسکوربیک اسید تخمین خورد. ابتدا، مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار)، پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار، عصاره آنزیمی (۱۵۰ میکرولیتر) و آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار تهیه شد. بر مبنای اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، فعالیت آسکوربات پراکسیداز توسط اسپکتروفوتومتر تعیین شد (Nakano & Asada, 1981). فعالیت پلی‌فنول اکسیداز (PPO) توسط روش ریموند برآورد شد. ابتدا، نمونه‌ها در حمام آب‌داغ قرار گرفتند. در ادامه، بافر فسفات ۰/۲ مولار و پیروگللال ۰/۰۲ مولار با $pH=6$ به تیوب‌ها افزوده شد. بعد از رسیدن دمای به ۴۰ درجه، ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی افزوده و تغییرات جذب در ۴۳۰ نانومتر قرائت شد (Bayrak et al., 2020).

عملکرد اسانس: خشک کردن نمونه‌های برگ در شرایط تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برگ‌های خشکیده با آسیاب سرامیکی خرد شدند. ۲۵ گرم از نمونه برگ جوشانده شد. حدود چهار ساعت بعد از جوش آمدن، وزن اسانس توسط کلونجر برآورد شد. در نهایت، عملکرد اسانس با تقسیم وزن اسانس بر وزن خشک نمونه محاسبه شد (منبع da Silva et al., 2021).

بیان ژن: محتوای RNA برگ رزماری بر اساس دستورالعمل شرکت کیت استخراج RNA (RNA Extraction Kit) (Parstous) جداسازی شد. نمونه‌های RNA با آنزیم نوکلئازی DNaseI تیمار شدند تا RNA خالص و عاری از DNA بدست آید. خلوص RNA به کمک دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر تایید شد. یکپارچگی RNA نیز با ژل آگارز ۱/۵ درصد تایید شد. سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت کیت سنتز cDNA (cDNA Synthesis Kit Parstous) انجام پذیرفت. آغازگرهای ژن‌های *CPSI* و *KSL1* با بهره‌گیری از اطلاعات ژنی موجود در پایگاه NCBI و نرم‌افزار PREMIER Biosoft AlleleID v7.7 طراحی شدند (جدول ۱). با توجه به T_m ، درصد GC، وجود ساقه‌حلقه و دایمرها، بهترین آغازگرهای از میان آغازگرهای پیشنهادی توسط نرم‌افزار انتخاب و سنتز شدند. واکنش Real-time PCR شامل ۳ میکرولیتر SYBR (5X)، ۲ میکرولیتر cDNA (۱ $\mu g/\mu L$)، ۱ میکرولیتر Primer R (10 pmol/ μL)، ۱ میکرولیتر Primer F (10 pmol/ μL)، و ۱۵ میکرولیتر ddH₂O بود. از ۵ میکرولیتر واکنش Real-time PCR به منظور تعیین بیان ژن‌های موردنظر با رنگ SYBR Green استفاده شد. از 18s-rRNA به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی و سنجش بیان نسبی ژن‌ها استفاده گردید. از کمی‌سازی نسبی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های *CPSI* و *KSL1* بین تیمارها به کمک نرم‌افزار REST استفاده شد (Pfaffl, 2001).

تحلیل آماری: تجزیه‌تحلیل نتایج حاصل از این پژوهش از طریق تجزیه واریانس یک طرفه در سطح ۵ درصد و مقایسه میانگین LSD در نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۲ انجام شد. پس از تجزیه‌تحلیل داده‌ها، نمودارها به کمک Excel ترسیم شدند.

جدول ۱. آغازگرهای اختصاصی ژنهای *THCAS* و *CBDAS*

Table 1. Specific primers for *CBDAS* and *THCAS* genes

ژن‌ها Genes	آغازگرها Primers	توالی ۵' به ۳' Sequence 5' to 3'	اندازه محصول Product size (bp)
<i>18s-rRNA</i>	F R	CCAGGCCCCGATGAGTAGGA TTTCCCCTCTTCGGCCTTC	175
<i>CPS1</i>	F R	5'-GCATGAGGATCCATGACCTCTATGTCCTCTCTAA-3', 5'-GCATGAGCGGCCGCTTCATACGACCGGTCCAAAC-3'	163
<i>KSL1</i>	F R	5'-GCATGAGGATCCATGTCTCTCGCCTTCAACC-3', 5'-GCATGAGCGGCCGCTTCATTTGCCACTCACTTTTT-3'.	157

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثرات متقابل کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کارنوسیک اسید در سطح ۵ یا ۱ درصد معنی‌دار است. در نتیجه، ترکیبات تیماری برای هر یک از صفات رزماری مورد بحث قرار خواهند گرفت.

محتوای MDA: کاربرد کیتوزان در غلظت متوسط تا بالا (Ch 50-100 mg/L) و SA در غلظت بالا (SA 20 μM)

تأثیر معنی‌داری بر کاهش MDA به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو در رزماری داشتند. در تیمار جداگانه، افزایش غلظت کیتوزان سبب کاهش تدریجی و معنادار MDA شد. در تیمار جداگانه SA، غلظت MDA نخست کاهش و سپس افزایش یافت که احتمالاً به دلیل القاء تولید گونه‌های فعال اکسیژن است. موثرترین ترکیب، تیمار SA 20 μM + Ch 100 mg/L بود که پایین‌ترین سطح MDA و بهترین اثر محافظتی را در برابر پراکسیداسیون لیپیدها نشان داد (شکل ۱). همراه با نتایج ما، (2015) Naderi et al., نشان دادند که کیتوزان (غلظت ۲ گرم در لیتر) سبب تعدیل سطح H₂O₂ و MDA در گیاه ریحان می‌شود. در مطالعه‌ای بر روی اثر SA (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بر رازیانه، (2016) Salarpour & Farahbakhsh نشان دادند که این هورمون سبب کاهش نشت الکتروولیت‌ها و MDA می‌شود. از نظر مکانیزمی، کیتوزان باعث فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌شود که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را از بین می‌برند. این دفاع‌های آنزیمی، آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهند و در نتیجه پراکسیداسیون لیپید و سطح MDA را کاهش می‌دهند. سالیسیلیک اسید نیز با تنظیم هموستاز ROS و تحریک سنتز ترکیبات دفاعی، پایداری غشای سلولی را حفظ کرده و تجمع MDA را محدود می‌کند (Angouti et al., 2022).

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژنهای *CPS1* و *KSL1* تحت تیمار کیتوزان و سالیسیلیک اسید (SA) در گیاه رزماری

Table 2. Analysis of variance of physiological and biochemical traits and expression of *CPS1* and *KSL1* genes under chitosan and salicylic acid (SA) treatment in rosemary plant

میانگین مربعات Mean squares					درجه آزادی df	منابع تغییر SOV
آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	کاتالاز Catalase	قندها Sugars	فنول Phenol	مالون دی آلدئید MDA		
0.11**	171.61**	2155.54**	146.63**	68.62**	3	کیتوزان Chitosan
0.12**	65.88**	1731.03**	93.19**	5.00*	3	سالیسیلیک اسید Salicylic acid
0.015*	5.87*	198.88**	13.72**	3.53*	9	کیتوزان* سالیسیلیک Chitosan*SA
0.003	3.72	33.45	3.16	1.57	32	خطا Error
10.79	14.22	10.93	10.67	11.28		ضریب تغییرات CV

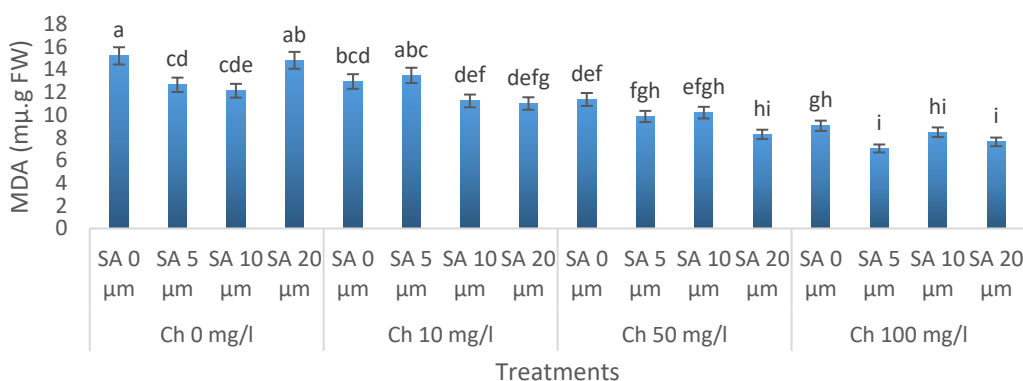
میانگین مربعات Mean squares						درجه آزادی df	منابع تغییر SOV
عملکرد اسانس Essential oil performance	بیان <i>KSL1</i> <i>KSL1</i> expression	بیان <i>CPS1</i> <i>CPS1</i> expression	کارتنوئیدها Carotenoids	کلروفیل کل Total chlorophyll	فنول اکسیداز Phenol oxidase		
0.13**	5.93**	6.41**	3.50**	0.39**	0.25**	3	کیتوزان Chitosan
0.05**	2.26**	1.45**	2.54**	2.08**	0.18**	3	سالیسیلیک اسید Salicylic acid
0.004*	0.26**	0.24**	0.23**	0.55**	0.008*	9	کیتوزان* سالیسیلیک Chitosan*SA
0.001	0.07	0.055	0.04	0.15	0.003	32	خطا Error
7.6	11.19	10.85	8.23	10.88	9.12		ضریب تغییرات CV

* و ** به ترتیب گویای وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

محتوای فنول کل: غلظت‌های مختلف کیتوزان و SA اثر معناداری بر افزایش محتوای فنول در رزماری داشتند.

به‌طور کلی، افزایش غلظت هر دو ترکیب (به‌ویژه در سطوح بالاتر) منجر به افزایش معناداری محتوای فنول شد، به‌طوری که تیمار

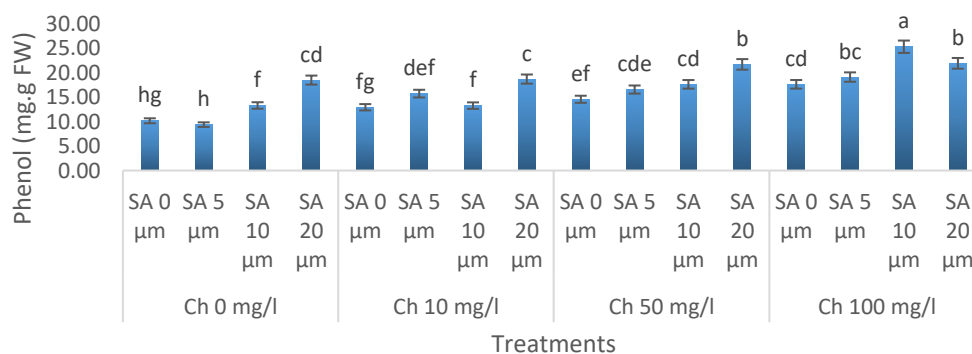
ترکیبی SA 10 µM + Ch 100 mg/L به‌عنوان مؤثرترین تیمار شناسایی شد (شکل ۲).



شکل ۱. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت های معنی دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 1. Effect of chitosan and salicylic acid on malondialdehyde (MDA) content in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

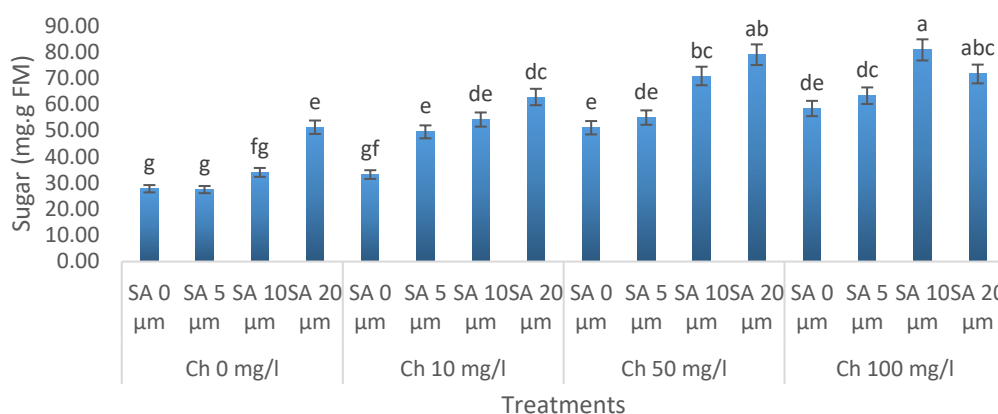
در توافق با نتایج ما، (2018) Jami et al., اثر غلظت های متفاوت کیتوزان (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) را بر غلظت فنول گیاه نوروزک ارزیابی کردند و نشان دادند که غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر باعث حصول بیشترین مقدار فنول و فلاونوئید می شود. همچنین، (2015) Naderi et al. و (2022) Khalafi et al. به ترتیب دریافتند که کیتوزان منجر به افزایش فنول کل در ریحان و سوسن می شود. از لحاظ سازوکار مولکولی، کیتوزان از طریق تعدیل آنزیم های کلیدی درگیر در بیوسنتز فنول ها (مانند فنیل آلانین آمونیا لایز که اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوئید را کاتالیز می کند) بر متابولیسم فنلی تأثیر می گذارد. SA نیز با القاء آبشار پیام رسانی (شامل مسیرهای MAP کیناز و فاکتورهای رونویسی) سبب افزایش بیان ژن های بیوسنتز فنول و متعاقباً افزایش ترکیبات فنلی می شود (Poznanski et al., 2024).



شکل ۲. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر محتوای فنول کل در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت های معنی دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 2. Effect of chitosan and salicylic acid on total phenolic content in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

محتوای قندهای محلول: کاربرد همزمان کیتوزان و SA تأثیر معنی‌داری بر افزایش محتوای قندهای رزماری داشت، به طوری که اکثر تیمارهای ترکیبی نسبت به تیمار شاهد سطح قند بالاتری را نشان دادند. به نظر می‌رسد تیمار ترکیبی SA 10 μM + Ch 100 mg/L یکی از موثرترین تیمارها در افزایش قندهای محلول باشد (شکل ۳). همراه با یافته‌های ما، (2019) Azadvari et al., نشان دادند که محلول پاشی SA (۵/۰ میلی‌مولار) بر روی سیاهدانه سبب افزایش قندها می‌شود. همچنین، Touhidi-Nejad et al., (2016) اثر گزارش کردند که SA سبب افزایش قندها در گیاه شنبليله می‌شود. از نظر مکانسیم‌های مولکولی، به نظر می‌رسد که کیتوزان، محتوای قندهای محلول را از طریق القاء پیام‌رسانی دفاعی با واسطه گیرنده افزایش می‌دهد. پیام‌رسانی دفاعی، بیان ژن‌های متابولیسم کربوهیدرات را تنظیم می‌کند و منجر به افزایش قندهای محلول، محافظت اسمزی و بهبود تحمل به محرک‌های محیطی می‌شود (Rayanoothala et al., 2024). سیگنال‌دهی وابسته به SA نیز اغلب منجر به افزایش تجمع قندهای محلول برای تأمین انرژی و حفاظت اسمزی مشابه کیتوزان می‌شود (Azadvari et al., 2019).

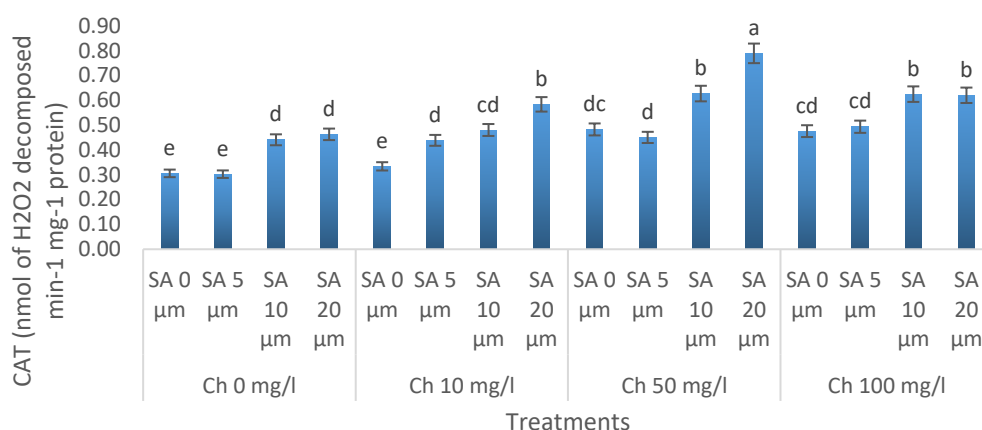


شکل ۳. تأثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر محتوای قندهای محلول در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 3. Effect of chitosan and salicylic acid on the content of soluble sugars in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

فعالیت کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه رزماری با افزایش غلظت کیتوزان و SA، افزایش معنی‌داری یافت. اثر الیسیتورها در غلظت بالاتر بر افزایش فعالیت کاتالاز بسیار بارزتر بود، به طوری که فعالیت آنزیم به میزان معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. ترکیب این دو الیسیتور نشان می‌دهد که بالاترین فعالیت کاتالاز با تیمار SA 20 μM همراه با Ch 50 mg/L حاصل می‌شود. بنابراین، موثرترین ترکیب تیماری برای تحریک فعالیت کاتالاز، استفاده هم‌زمان از غلظت بالا SA و غلظت متوسط کیتوزان است (شکل ۴). در توافق با یافته‌های ما، (2018) Jami et al., گزارش کردند که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان سبب بیشترین فعالیت کاتالاز در گیاه نوروبوک می‌شود. با اینحال، نتایج غیرهمسو با نتایج ما هم وجود دارد. برای مثال،

Azadvari et al., (2019) تاثیر محلول پاشی سیاهدانه با SA (۵/۰ میلی مولار) را مطالعه کردند و نشان دادند که محلول پاشی تاثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز ندارد. این اختلاف در نتایج می تواند ریشه در غلظت تیمار، شرایط آزمایش، حساسیت سنجش فعالیت آنزیمی داشته باشد. در توجیح سازوکار مولکولی پشت نتایج ما می توان گفت که کیتوزان مسیر وابسته به فیل آلانین آمونیاک-لیاز (PAL) را برای بیوسنتز SA القاء می کند که متعاقباً سطح SA را افزایش می دهد. سپس، SA بیان ژن های پاسخ دهنده به تنش مثل ژن های رمزکننده آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز را افزایش می دهد تا آسیب اکسیداتیو را کاهش دهد (Poznanski et al., 2024). بنابراین، الیستورهای کیتوزان و SA یک اثر هم افزایی بر فعالیت آنزیم کاتالاز دارند.



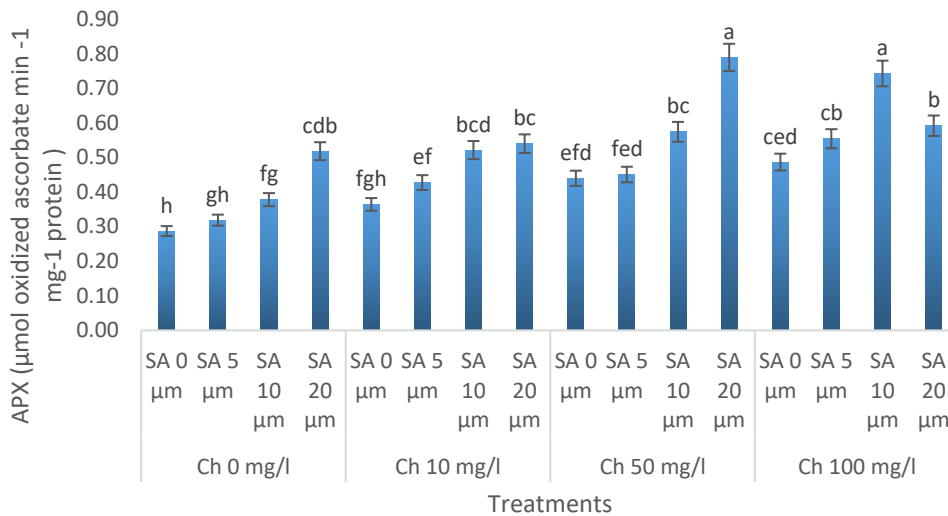
شکل ۴. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر فعالیت کاتالاز در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت های معنی دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 4. Effect of chitosan and salicylic acid on catalase activity in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): تیمارهای ترکیبی کیتوزان و SA منجر به افزایش معنی داری فعالیت آنزیم

APX شدند. بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار SA 20 μM + Ch 50 mg/L مشاهده شد که به طور معنی داری بالاتر از سایر تیمارهاست (شکل ۵). همسو با نتایج ما در رابطه با تاثیر هم افزایی هر دو الیستور بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، (2018) Jami et al., نشان دادند که غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کیتوزان سبب حصول حداکثر فعالیت این آنزیم در گیاه نوروبک می شود. همچنین، (2015) Naderi et al., نشان دادند که افزایش غلظت کیتوزان سبب افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاه ریحان می شود. در توجیح نتایج ما می توان گفت که افزایش فعالیت آنزیم APX در پی تیمار با کیتوزان احتمالاً ناشی از فعال سازی فاکتورهای رونویسی پاسخگو به تنش است که به عناصر پروموتوری در ژن های APX (مانند عناصر وابسته به ABA یا تقویت کننده/سرکوب کننده) متصل می شوند. این امر سنتز و فعالیت آنزیم APX را افزایش داده و ظرفیت آن را برای کاهش H₂O₂ با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون افزایش می دهد و دفاع آنتی اکسیدانی را تقویت می کند (Rahmani et al., 2020). سالیسیلیک اسید ممکن است از طریق القاء تغییرات پس از ترجمه مانند نیتروزیلاسیون که کارایی آنزیمی APX را

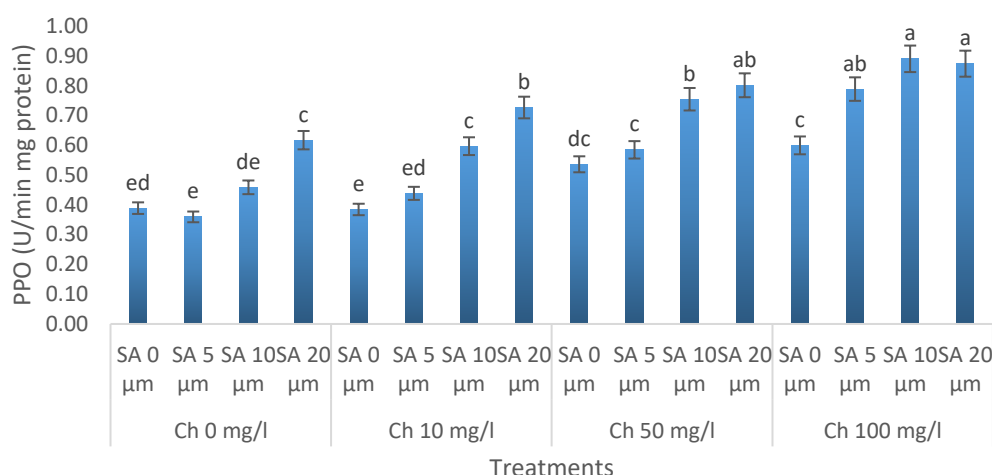
در پاسخ به محرک‌های محیطی تعدیل می‌کنند، بر فعالیت APX تأثیر بگذارد. این تغییرات ظرفیت APX را برای کاهش H₂O₂ بهینه می‌کنند (Yang et al., 2015).



شکل ۵. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاه دارویی رزماری. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 5. Effect of chitosan and salicylic acid on ascorbate peroxidase activity in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

فعالیت پلی‌فنول اکسیداز (PPO): فعالیت آنزیم PPO در گیاه رزماری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و SA قرار گرفت. افزایش غلظت کیتوزان (از ۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور پیوسته و معنی‌داری باعث افزایش فعالیت PPO شد، به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بیشترین اثر تحریکی را در تمام سطوح SA داشتند. قوی‌ترین تحریک فعالیت آنزیم PPO زمانی مشاهده شد که گیاهان با بالاترین غلظت کیتوزان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با سطح بالا یا میانی SA (۱۰ و ۲۰ میکرومولار) تیمار شدند (شکل ۶). در پژوهش‌های مشابه، Kumari et al., (2021) و Jami et al., (2018) مستندات آزمایشی خود را در حمایت از افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز با افزایش غلظت کیتوزان منتشر کردند. در توجیح نتایج ما می‌توان گفت که گیاه را فریب می‌دهد تا حس کند مورد حمله قرار گرفته است. گیاه با تقویت سیستم‌های دفاعی خود، از جمله تولید آنزیم PPO بیشتر برای کمک به ایجاد کینون‌های سمی از فنول‌ها، که می‌توانند عوامل بیماری‌زا را دفع کنند یا زخم‌ها را ببندند، پاسخ می‌دهد (Jami et al., 2018). سالیسیلیک اسید نیز دستگاه ژنتیکی گیاه را برای تولید بیشتر آنزیم فعال می‌کند و در نتیجه ظرفیت کلی گیاه را برای انجام واکنش‌های واسطه‌گری شده توسط PPO افزایش می‌دهد، که برای تولید ترکیبات دفاعی و تشکیل موانع محافظتی بسیار مهم هستند (Poznanski et al., 2024).

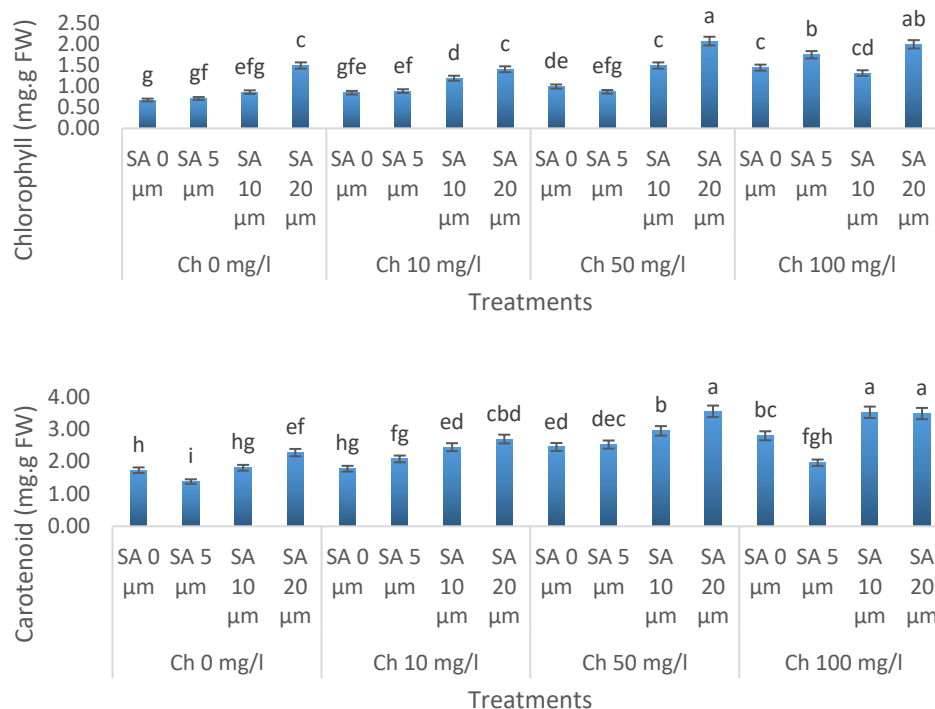


شکل ۶. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی فنول اکسیداز در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت های معنی دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 6. Effect of chitosan and salicylic acid on polyphenol oxidase activity in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

غلظت کلروفیل کل: افزایش غلظت کیتوزان (به ویژه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) تأثیر معنی داری در افزایش کلروفیل داشت و این افزایش در حضور SA تقویت شد. سالیسیلیک اسید (به ویژه ۲۰ میکرومولار) نیز به تنهایی و در ترکیب با کیتوزان اثر مثبت نشان داد، به طوری که غلظت های بالای آن اغلب بهترین نتیجه را در ترکیب با سطوح بالاتر کیتوزان ایجاد کردند. موثرترین ترکیب تیماری برای حداکثر افزایش محتوای کلروفیل، استفاده همزمان از کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و SA با غلظت ۲۰ میکرومولار بود. این موضوع نشان دهنده اثر هم افزایی مثبت بین این دو ترکیب در تحریک سنتز کلروفیل است (شکل ۷). همراستا با نتایج ما درباره افزایش غلظت کلروفیل، Khalafi et al., (2022) دریافتند که افزایش سطح کیتوزان منجر به افزایش غلظت کلروفیل می شود. در تحقیقی دیگر، Salarpour & Farahbakhsh (2016) با بررسی اثر غلظت SA بر رازبانه نشان دادند که استفاده از سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار باعث افزایش محتوای کلروفیل کل در شیوه های وابسته به غلظت هورمونی می شود. در رابطه با سازوکار مولکولی پشت افزایش کلروفیل توسط الیسیتورها در رزماری می توان گفت که کیتوزان سنتز کلروفیل را تحریک می کند. این الیسیتور بیان پروتئین های مرتبط با فتوسیستم II از جمله پروتئین تقویت کننده شکست اکسیژن (OEE1) و پروتئین های گیرنده نور کلروفیل (LHCB) را افزایش می دهد (Rahmani et al., 2020). سالیسیلیک اسید نیز با تعدیل مسیرهای پیام رسانی ممکن است تجمع بیش از حد گونه های فعال اکسیژن را کاهش داده و مانع از تخریب کلروفیل شود و به طور غیرمستقیم محتوای کلروفیل را حفظ کند (Jahan et al., 2024). محتوای کاروتنوئید در گیاه رزماری با محلول پاشی الیسیتورها، به طور معنی داری افزایش یافت. افزایش غلظت کیتوزان و SA منجر به افزایش بیشتر تجمع کاروتنوئید شد. بیشترین افزایش کاروتنوئید در تیمارهای ترکیبی با غلظت های متوسط تا بالای هر دو الیسیتور مشاهده شد. مؤثرترین تیمار، ترکیب ۲۰

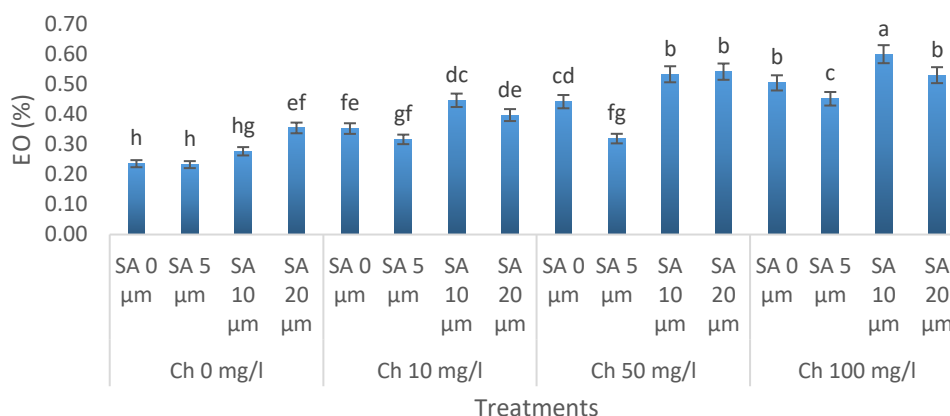
میکرومولار SA با ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان است که بالاترین پتانسیل را برای بهبود محتوای کاروتنوئید نشان داد (شکل ۷). افزایش غلظت کاروتنوئیدها بعد از تیمار الیسیتورها در پژوهش‌های دیگر هم مشاهده شده است. برای مثال، (2020) Miclea et al., با بررسی تاثیر محلول‌پاشی گیاه دارویی *Lavandula angustifolia* با SA (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) دریافتند که محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت کاروتنوئید می‌شود. همچنین، (2020) Alizadeh et al., به ترتیب در ارزیابی تاثیر کیتوزان بر گیاه *Satureja hortensis* متوجه شدند که بیش‌ترین محتوای کاروتنوئید با غلظت ۱ گرم در لیتر بدست می‌آید. هرچند سازوکارهای مولکولی افزایش کاروتنوئید در رزماری با کیتوزان هنوز ناشناخته مانده است اما به نظر می‌رسد که احتمالاً از طریق تعدیل بیان ژن‌های بیوسنتز رنگدانه بر محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی نظیر کاروتنوئید تأثیر می‌گذارد (Miclea et al., 2020). شایان ذکر است که کیتوزان مستقیماً به کاروتنوئیدها متصل نمی‌شود که نشان می‌دهد اثر کیتوزان از طریق سیگنال‌دهی و تحریک بیان ژن است و نه اتصال فیزیکی (Alizadeh et al., 2020). تیمار با SA نیز با القای بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتز کاروتنوئید، از جمله ژن‌های کدکننده آنزیم‌هایی مانند فیتون سنتاز و لیکوپن سیکلاز که برای سنتز کاروتنوئید حیاتی اند، تجمع کاروتنوئید را افزایش می‌دهد (da Silva et al., 2021).



شکل ۷. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر غلظت کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه دارویی رزماری. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 8. Effect of chitosan and salicylic acid on chlorophyll and carotenoid concentration in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

عملکرد اسانس: افزایش غلظت هر دو ترکیب موجب بهبود معنی‌داری عملکرد اسانس شد، اما اثرات آن‌ها به صورت خطی نبود. برای مثال، غلظت ۵ میکرومولار SA سبب کاهش اسانس شد که به نظر می‌رسد بخاطر مسائل پیچیده‌ای مانند وابستگی پاسخ متابولیکی به غلظت هورمون، تداخلات مسیرهای پیام‌رسانی و یا علل دیگر باشد. بیشترین افزایش اسانس زمانی مشاهده شد که SA ۱۰ میکرومولار با کیتوزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محلول‌پاشی شدند. استفاده از SA به‌تنهایی (خصوصاً در ۲۰ میکرومولار) یا کیتوزان به‌تنهایی (خصوصاً در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نیز نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ایجاد کردند، اما اثر ترکیب آن‌ها قوی‌تر بود (شکل ۸). مطالعات گذشته اثرات مثبت استفاده مجزا از SA یا کیتوزان را نشان داده‌اند. برای مثال، (2020) Rahmani et al., و (2021) da Silva et al., گزارش کردند که کیتوزان سبب افزایش اسانس در نعنای وحشی می‌شود. در توجیه نتایج ما می‌توان به گزارشات علمی اشاره داشت که حاکی از آنند که این الیسیتورها آزیم‌های کلیدی مسیرهای بیوسنتز ترپنوئیدها را افزایش می‌دهند که از اجزای اصلی اسانس هستند. برای مثال، استفاده از SA و کیتوزان باعث افزایش کارواکرول می‌شود (Momeni et al., 2020). از نظر اثر هم‌افزایی، کیتوزان به عنوان یک الیسیتور عمل می‌کند و مسیرهای پیام‌رسانی دفاعی مانند مسیرهای واسطه‌ای SA، جاسمونیک‌اسید و اتیلن را فعال می‌کند که به‌نوبه‌خود بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ترپنوئیدهای اسانس را تنظیم می‌کنند (da Silva et al., 2021).

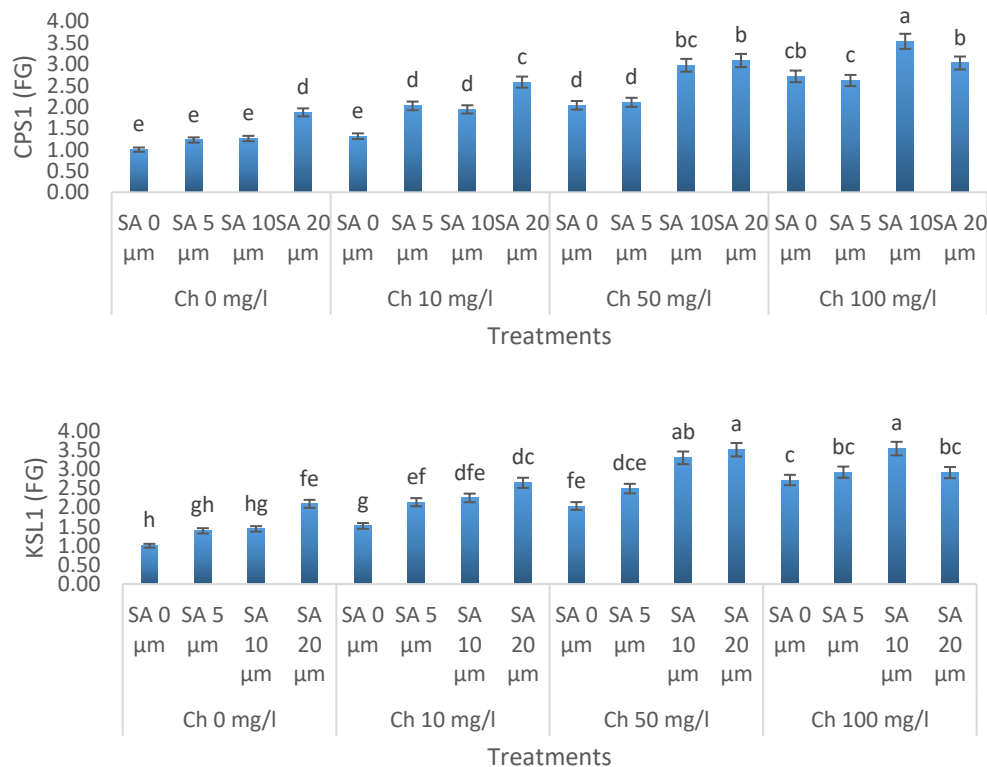


شکل ۸. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر تولید اسانس در گیاه داروئی رزماری. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 9. Effect of chitosan and salicylic acid on the activity of essential oil in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

بیان ژن CPS1 و KSL1: بیشترین افزایش بیان *CPS1* زمانی مشاهده شد که از بالاترین غلظت کیتوزان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با غلظت متوسط SA (۱۰ میکرومولار) استفاده شود (شکل ۹). کاربرد کیتوزان به‌طور معنی‌داری بیان *KSL1* را در گیاه رزماری افزایش داد و این اثر با افزایش غلظت کیتوزان تقویت شد. سالیسیلیک اسید در غلظت پایین و متوسط به‌تنهایی تأثیر محسوسی بر بیان ژن نداشت، اما در ترکیب با کیتوزان، اثر تحریک‌کنندگی کیتوزان را تشدید کرد. بیشترین افزایش

بیان *KSL1* زمانی مشاهده شد که از ترکیب ۲۰ میکرومولار SA با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان استفاده شد. بنابراین، اثر کیتوزان مثبت و وابسته به غلظت است و SA نقش هم‌افزایی در تقویت این اثر دارد. تاکنون، گزارشی در خصوص استفاده از کیتوزان و SA در تعدیل بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستنز کارنوسیک اسید منتشر نشده است. با این وجود، معلوم شده است که این بیستورها بیان ژن‌های درگیر در برخی ترپنوئیدها را افزایش می‌دهند. برای مثال، Yin et al., (2022) گزارش کردند که کیتوزان و SA سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در تولید سزکوئی‌ترین آرتیمیزین می‌شوند. در مطالعه ما، افزایش بیان ژن‌ها احتمالاً ناشی از تاثیر بیستورها بر مسیرهای پیام‌رسانی است. پس از سنتز و فعالسازی، SA در آبشارهای سیگنالینگ شرکت می‌کند که بیان ژن‌های مسیرهای بیوستنز متابولیت‌های ثانویه، از جمله ترپنوئیدها، را فعال می‌کند (Momeni et al., 2020). اگرچه جزئیات مکانیسم‌های مولکولی کیتوزان در تنظیم بیان ژن‌های بیوستنز ترپنوئیدها کمتر شناخته شده است، اما عقیده محققان این است که کیتوزان، مسیرهای دفاعی از جمله مسیرهای وابسته به SA را فعال می‌کند. این امر باعث برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای متابولیتی می‌شود که اغلب با پیام‌رسانی SA همپوشانی یا هم‌افزایی دارند و در نتیجه سنتز ترپنوئید را افزایش می‌دهند (Kumari et al., 2021).



شکل ۹. تاثیر کیتوزان و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن *CPS1* و *KSL1* در گیاه داروئی رزماری. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

Figure 10. Effect of chitosan and salicylic acid on *CPS1* and *KSL1* gene expression in the medicinal plant rosemary. Different letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

علیرغم نتایج نوآورانه، این پژوهش با محدودیت‌هایی مثل تعداد محدود غلظت‌های متفاوت یک تیمار همراه بود. لذا پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آینده، دامنه غلظت‌های کیتوزان و سالیسیلیک اسید افزایش یابد تا پاسخ گیاه دارویی رزماری به این تیمارها بهتر درک شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کاربرد توأم کیتوزان و اسید سالیسیلیک با ایجاد اثر سینرژیستی، مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی و متابولیسم گیاه رزماری را به گونه‌ای تنظیم می‌کند که نه تنها موجب کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود، بلکه از طریق افزایش بیان ژن‌های کلیدی *CPSI* و *KSLI*، به طور بالقوه بیوستز کارنوسیک اسید و تولید اسانس را به طور معناداری تقویت می‌کند. این رویکرد، راهبردی مؤثر و پایدار برای بهبود صفات گیاهان دارویی با کاهش مصرف نهاده‌های شیمیایی ارائه می‌دهد.

سپاسگزاری: نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه دانشگاه پیام نور- واحد شرق تهران به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری هستند.

References

- Alizadeh, A., Moghaddam, M., Asgharzade, A., & Sourestani, M. M. (2020). Phytochemical and physiological response of *Satureja hortensis* L. to different irrigation regimes and chitosan application. *Industrial Crops and Products*, 158, 112990. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112990>
- Amirteymoori, E., Khezri, A., Dayani, O., Mohammadabadi, M., Khorasani, S., Mousaie, A., & Kazemi-Bonchenari, M. (2021). Effects of linseed processing method (ground versus extruded) and dietary crude protein content on performance, digestibility, ruminal fermentation pattern, and rumen protozoa population in growing lambs. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 1506-1517. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1984324>
- Angouti, F., Nourafcan, H., Saeidi Sar, S., Asadi, A., & Ebrahimi, R. (2022). The effect of different levels of chitosan and salicylic acid on morphological traits of the medicinal plant Galega (*Galega officinalis*). *Journal of Crops Improvement*, 24(4), 1341-1358. <https://doi.org/10.22059/jci.2022.329753.2607>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 24(1), 1-5.
- Azadvari, H., Naemi, M., Gholizadeh, A., & Nakhzari Moghaddam, A. (2019). Effect of salicylic acid on some physiological traits and yield of black cumin medicinal plant (*Nigella sativa* L.) under different humidity regimes. *Journal of Crop Production*, 12(3), 85-100. <https://doi.org/10.22069/EJCP.2019.16031.2192>
- Bayrak, S., Öztürk, C., Demir, Y., Alım, Z., & Küfrevioglu, Ö. İ. (2020). Purification of polyphenol oxidase from potato and investigation of the inhibitory effects of

- phenolic acids on enzyme activity. *Protein and Peptide Letters*, 27(3), 187-192. <https://doi.org/10.2174/0929866526666191002142301>
- Da Silva, E. A., Silva, V. N., De Alvarenga, A. A., & Bertolucci, S. K. (2021). Biostimulating effect of chitosan and acetic acid on the growth and profile of the essential oil of *Mentha arvensis* L. *Industrial Crops and Products*, 171, 113987. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113987>
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Jahan, S., Anjali, K., Panwar, M., Mishra, R., Shankhdhar, S. C., & Shankhdhar, D. (2024). Integrative impacts of salicylic acid and water deficit stress on physiological processes of medicinal herb *Bacopa monnieri* (L.). *Plant Physiology Reports*, 29(1), 65-75. <https://doi.org/10.1007/s40502-023-00770-4>
- Jami, S., Esmailzadeh Bahabadi, S., & Modarres, M. (2018). Effect of chitosan on micropropagation, secondary metabolites content and antioxidant activity of *in vitro* cultured *Salvia leriifolia*. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(3), 568-578. <https://doi.org/20.1001.1.23832592.1397.31.3.7.7>
- Khalafi, M., Pourbeyrami Hir, Y., Chamani, E., & Maleki Lajayer, H. (2022). The effect of chitosan on regeneration and secondary metabolite production of two species of lily flower. *Journal of Plant Research*, 35(2), 374-388. <https://doi.org/20.1001.1.23832592.1401.35.2.9.5>
- Khezri, A., Shafabakhsh, H., Alizadeh, A., Mohammadabadi, M., & Shakeri, M. (2025). Effects of Encapsulated Mixtures of Plant Essential Oils and Organic Acids as an Alternative to Antibiotic Growth Promoters on Humoral Immune Response and Expression of Interleukin-4 and Interferon-Gamma Genes in Broilers. *Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases* 3(3), 12-19. <https://doi.org/10.61838/kman.jpsad.3.3.3>
- Kumari, S., Singh, A. K., Kumar, A., Singh, K. P., & Bains, G. (2021). Evaluating the efficacy of chitosan and salicylic acid on photosynthetic pigments and antioxidant enzymes towards resistance of mango malformation. *Scientia Horticulturae*, 285, 110160. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110160>

- Li, K., Xing, R., Liu, S., & Li, P. (2020). Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(44), 12203-12211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05316>
- Macedo, L. M., Santos, É. M. D., Militão, L., Tundisi, L. L., Ataíde, J. A., Souto, E. B., & Mazzola, P. G. (2020). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: A review. *Plants*, 9(5), 651. <https://doi.org/10.3390/plants9050651>
- Miclea, I., Suhani, A., Zahan, M., & Bunea, A. (2020). Effect of jasmonic acid and salicylic acid on growth and biochemical composition of *in-vitro*-propagated *Lavandula angustifolia* Mill. *Agronomy*, 10(11), 1722. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111722>
- Mohammadabadi, M., Afsharmanesh, M., Khezri, A., Kheyrodin, H., Babenko, O., Borshch, O. O., Kalashnyk, O., Nechyporenko, O., Afanasenko, V., Slynko, V., & Usenko, S. (2025). Effect of mealworm on GBP4L gene expression in the spleen tissue of Ross broiler chickens. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(2), 343-360. <https://doi.org/10.22103/jab.2025.25277.1714>
- Mohammadabadi, M., Babenko, O., Borshch, O. O., Kalashnyk, O., Ievstafieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measurement of the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 317-332. <https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627>
- Mohammadabadi, M., Golkar, A., & Askari Hesni, M. (2023). The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(4), 239-256. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.22647.1530>
- Mohammadabadi, M., Shaban Jorjandy, D., Arabpoor Raghavadi, Z., Abareghi, F., Sasan, H. A., & Bordbar, F. (2022). The role of fennel on DLK1 gene expression in sheep heart tissue. *Agricultural Biotechnology Journal*, 14(2), 155-170. <https://doi.org/10.22103/jab.2022.19402.1399>
- Momeni, M., Pirbalouti, A. G., Mousavi, A., & Badi, H. N. (2020). Effect of foliar applications of salicylic acid and chitosan on the essential oil of *Thymbra spicata* L. under different soil moisture conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 1142-1153. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1828178>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

- Naderi, S., Esmailzadeh Bahabadi, S., & Fakheri, B. (2015). The effect of chitosan on some physiological and biochemistry characterization in basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Process and Function*, 4(12), 29-41. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23222727.1394.4.12.9.9>
- Peng, Y., Yang, J., Li, X., & Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: Biosynthesis and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 72(1), 761-791. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081320-092855>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Poznanski, P., Shalmani, A., Bryla, M., & Orczyk, W. (2024). Salicylic acid mediates chitosan-induced immune responses and growth enhancement in barley. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(24), 13244. <https://doi.org/10.3390/ijms252413244>
- Rahmani, M., Kheiry, A., Sanikhani, M., Mortazavi, N., & Farzin, N. (2020). Effect of foliar application of chitosan on some physiological characteristics of *Mentha spicata* L. under deficit irrigation stress. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 51(2), 479-492. <https://doi.org/10.22059/ijhs.2019.271832.15651>
- Rayanoothala, P. S., Dweh, T. J., Mahapatra, S., & Kayastha, S. (2024). Unveiling the protective role of chitosan in plant defense: A comprehensive review with emphasis on abiotic stress management. *Crop Design*, 3(4), 100076. <https://doi.org/10.1016/j.crope.2024.100076>
- Roudbar, M. A., Mohammadabadi, M. R., & Salmani, V. (2015). Epigenetics: A new challenge in animal breeding. *Genetics in the Third Millennium*, 12(4), 3736-3751. https://www.researchgate.net/publication/281109256_Epigenetics_A_new_Challenge_In_Animal_Breeding
- Safaei, S. M. H., Mohammadabadi, M., Moradi, B., Kalashnyk, O., Klopenko, N., Babenko, O., Borshch, O. O., & Afanasenko, V. (2025). Corrigendum: Role of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder in increasing testosterone and IGF1 gene expression in the testis of lamb. *Gene Expression*, 24(4), Article e00020C. <https://doi.org/10.14218/GE.2023.00020C>
- Salarpour, F., & Farahbakhsh, H. (2016). Effects of salicylic acid on some physiological traits, yield and yield components of fennel (*Foeniculum vulgare*) under drought stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 32(2), 216-230. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106557>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-

- Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Touhidi-Nejad, Z., Farahbakhsh, H., & Maghsoudi, A. (2016). Evaluation of salicylic acid effects on some physiological traits of fenugreek under drought stress. *Journal of Plant Process and Function*, 5(16), 85-96.
<https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23222727.1395.5.16.2.7>
- Vahabzadeh, M., Chamani, M. M., Dayani, O., Sadeghi, A. A., & Mohammadabadi, M. R. (2021). Effects of sweet marjoram (*Origanum majorana*) powder on growth performance, nutrient digestibility, rumen fermentation, meat quality and humoral immune response in fattening lambs. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 11(3), 567-576. <https://sanad.iau.ir/Journal/ijas/Article/1023983>
- Vahabzadeh, M., Chamani, M., Dayani, O., & Sadeghi, A. A. (2020). Effect of *Origanum majorana* leaf (sweet marjoram) feeding on lamb's growth, carcass characteristics, and blood biochemical parameters. *Small Ruminant Research*, 192, Article 106233. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106233>
- Yang, H., Mu, J., Chen, L., Feng, J., Hu, J., Li, L., Zhou, J. M., & Zuo, J. (2015). S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology*, 167(4), 1604-1615. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255216>
- Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., & Tang, M. (2015). The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PLoS ONE*, 10(12), e0145726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145726>
- Yin, H., Kjaer, A., Fretté, X. C., Du, Y., Christensen, L. P., Jensen, M., & Grevsen, K. (2012). Chitosan oligosaccharide and salicylic acid up-regulate gene expression differently in relation to the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*, 47(11), 1559-1562. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.006>