تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک/ جلد چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، ص ۵۱۷-۵۰۳

مقاله پژوهشی

اثر محرک‌های کیتوزان و اسید سالسیلیک بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)

زینب محکمی[1*]، فاطمه بیدرنامنی[1]

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: Zaynabmohkami@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰ /۰۸/۱۶ DOI: 10.22034/CSRAR.2021.297351.1113

چکیده

پژوهش حاضر جهت ارزیابی تأثیر محرک‌های زیستی کیتوزان و اسید سالسیلیک بر خصوصیات کمی و کیفی آویشن دنایی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار طی سال زراعی ۱۳۹۵- ۱۳۹۶ در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل فاکتور اول کیتوزان (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) و فاکتور دوم اسید سالسیلیک (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) بودند. اثر محلول‌پاشی با محرک‌های زیستی کیتوزان، اسید سالسیلیک و اثرات متقابل آن‌ها بر پارامترهای مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی معنی‌دار بود. بیشترین صفات وزن تر، وزن خشک، طول گل‌آذین، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در تیمار اسید سالسیلیک و کیتوزان (۱/۵ mM) حاصل شد. بیشترین فنل کل (۶۷/۹۱ mg GA/g DW) از تیمار محلول‌پاشی توأم با کیتوزان و اسید سالسیلیک (به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) حاصل شد. بیشترین فلاونوئید کل (۴/۷۹ mg Q/g DW) در تیمار محلول‌پاشی توأم با کیتوزان و اسید سالسیلیک (به ترتیب در غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی‌مولار) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۸/۱۳ درصد) از تیمار کاربرد توأم اسید سالسیلیک و کیتوزان هر دو با غلظت ۱ حاصل شد. همچنین بیشترین میزان اسانس (۱/۳۳ درصد حجمی/وزنی) در تحریک با اسید سالسیلیک (۱/۵ mM) بدست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۴۷ درصد افزایش نشان داد. کاربرد این محرک‌های زیستی می‌تواند سبب افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاه آویشن دنایی گردد و گامی مؤثر در راستای تحقق اهداف کشاورزی پایدار است.

واژه‌های کلیدی: اسانس، عملکرد، فلاونوئید، فنل، محرک زیستی

مقدمه

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) گیاهی معطر متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) که از گیاهان دارویی باارزش در طب سنتی محسوب می‌شود (Akbarnia and Mirza, 2008). آویشن دنایی گیاهی پایا، پرساقه و به صورت بوته‌هایی بالشتی، با ظاهری خشبی و پایه چوبی، ساقهٔ گل‌دار به طول ۳۰-۶ cm ایستاده و ساده، برگ‌ها به طول ۲۴-۹/۵ mm و عرض ۴/۸-۱/۷ mm، خطی نیزه‌ای تا تخم‌مرغی باریک، سرنیزه‌ای و بدون دمبرگ و موسم گل آن در خرداد و تیر است (Rechinger, 1982). در اسانس این گیاه ۴۳ ترکیب فعال شناسایی شده که در آن میان، پنج ترکیب تیمول (۷۳/۹ درصد)، کارواکرول (۶/۷ درصد)، پاراسیمن (۴/۶ درصد)، بتابیسابولن (۱/۵ درصد) و ترپینن-۴-ال (۱/۴ درصد) دارای بالاترین مقادیر هستند (Sajjadi and Khatamsaz, 2003). خواص داروئی این گیاه عبارت‌اند از: ضدنفخ، هضم‌کنندهٔ غذا، ضداسپاسم، ضدسرفه، خلط‌آور، ضدقارچ و ضد-باکتری. البته اثرات درمانی آن برای درمان آسم، سرفه‌های مکرر خشک و برونشیت به اثبات رسیده است (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014).

ترکیبات شیمیایی متعددی وجود دارند که سنتز متابولیت‌های ثانویه و متعاقباً فعالیت زیستی گیاهان داروئی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در میان روش‌های زیادی که به‌منظور افزایش تولید مواد مؤثره گیاهان استفاده می‌شود؛ استفاده از محرک‌های زیستی دارای مقبولیت بیشتری هستند. موادی از جمله اسید سالسیلیک، کیتوزان، جاسمونیک اسید، نانو ذرات نقره، تیتانیوم و غیره به شکل محرک که ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی بوده و با القای سامانه‌ی دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Asghari *et al.*, 2015). کاربرد محرک‌ها به میزان محدود و غلظت‌های پایین، بیوسنتز ترکیبات خاصی را در سیستم سلولی زنده تحریک و بهبود بخشیده و به‌طور کلی زمان دستیابی به مقادیر

بالای متابولیت‌ها را کاهش می‌دهد (Radman *et al*., 2003). این محرک‌های زیستی با افزایش نسخه‌برداری mRNA تا ۲/۵ برابر، فعال‌سازی هورمون‌های مؤثر در رشد زایشی، افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها، افزایش جذب و انتقال عناصر غذایی و افزایش میزان ترکیبات پروتئینی در گیاهان، سبب بهبود خصوصیات کمی و کیفی در کوتاه‌ترین بازه‌ی زمانی مخصوصاً در شرایط تنش محیطی می‌گردند (Thomas *et al*., 2009).

کیتوزان (پلی‌ساکارید پلی‌کاتیونی)، به‌عنوان یکی از محرک-های زیستی کارآمد، جهت بهبود بخشیدن تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان داروئی اثبات شده است (Babaei *et al*., 2018; Cheng *et al*., 2006). اسید سالسیلیک نیز به‌طور طبیعی در گیاهان در غلظت‌های بسیار پایین سنتز می‌شود. این ترکیب به‌عنوان یک ملکول سیگنالی در گیاهان منجر به القاء مقاومت در برابر بسیاری از استرس‌های زنده (آلودگی توسط قارچ، باکتری و ویروس‌ها) و غیرزنده (خشکی، شوری، سرمازدگی، گرما، اوزون، UV و فلزات سنگین) می‌گردد (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2014).

با توجه به بروز چالش‌های زیست‌محیطی مانند کاهش منابع آبی، افت کیفیت محصولات کشاورزی و کاهش میزان حاصل-خیزی خاک، تغییر در نظام‌های زراعی متداول ضروری و حرکت به‌سوی نظام‌های کشاورزی پایدار را توجیه می‌نماید (Sharma, 2002). محققان نشان دادند که محلول‌پاشی بوته‌های آویشن با اسید سالسیلیک در شرایط تنش خشکی می‌تواند به میزان قابل توجهی از خسارت خشکی بکاهد. در مطالعه آن‌ها بیشترین میزان اسانس (۳/۲٪ حجمی/وزنی) و عملکرد (۱۴/۹ g/m^2) از محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک ۳ مولار حاصل شد. همچنین محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک به‌طور معنی‌داری سنتز ترکیباتی چون کارواکرول، آلفا-توجن، آلفا-پینن و پی-سیمن در اسانس را بهبود بخشید؛ درحالی‌که میزان تیمول و بتا-کاریوفیلن را کاهش داد (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2014). در مطالعه دیگری اذعان شد که محلول‌پاشی بوته‌های آویشن دنایی با جاسمونیک اسید منجر به افزایش مقادیر تیمول و کارواکرول در اسانس گردید (Ashrafi *et al*., 2012). گروهی از محققان اثر تحریک با جاسمونیک اسید و سالسیلیک اسید را بر گیاه داروئی اسطوخودوس انگلیسی در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی نمودند. نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که گیاهانی که در حضور این محرک‌های زیستی رشد نموده‌اند؛ مقادیر بالاتری از ترکیبات فنولی و کلروفیل را نسبت به نمونه‌های شاهد تولید نمودند که خود مؤید اثرات مثبت محرک‌های زیستی در تجمع متابولیت-های ثانویه است. محیط‌های کشت تحریک‌شده با جاسمونیک اسید (۰/۵ mg/L) و سالسیلیک اسید (۱/۵ mg/L) بیشترین زیست‌توده و بالاترین محتوای ترکیبات پلی‌فنلی و کارتنوئیدی را تولید نمودند (Miclea *et al*., 2020).

در مطالعه دیگری اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی با کیتوزان بر گیاه آویشن دنایی بررسی گردید. نتایج حاکی از آن بود که میزان اسانس آویشن دنایی تحت شرایط تنش ملایم افزایش یافته است. در این مطالعه بیشترین عملکرد اسانس (۱/۵۲ گرم/بوته) در شرایط تنش ملایم و تحت تیمار محلول‌پاشی با کیتوزان ۴۰۰ میکرولیتر/لیتر حاصل شد (Emami Bistgani *et al*., 2017). با توجه به اهمیت توسعهٔ کشاورزی پایدار و کاربرد فرآورده‌های گیاهان دارویی به عنوان داروهای طبیعی بدون ترکیب‌های مشکل‌ساز برای سلامتی انسان، این آزمایش برای نخستین بار به بررسی تأثیر محلول‌پاشی اسید سالسیلیک، کیتوزان و اثرات متقابل آن‌ها به عنوان محرک‌های زیستی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه داروئی آویشن دنایی پرداخته است. به‌طوری‌که بهترین تیمار در تولید بیومس، تجمع رنگیزه‌های فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه (فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد اسانس) در آویشن دنائی را معرفی نموده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار طی سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل در موقعیت جغرافیایی ۶۱ درجه و ۲۹ دقیقه طول شرقی و عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۱۳ دقیقه شمالی و در ارتفاع ۴۹۸/۲ متر از سطح دریا انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل فاکتور اول کیتوزان (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) و فاکتور دوم اسید سالسیلیک (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) بودند. بذور آویشن دنایی در پائیز ۱۳۹۴ از عرصه‌های طبیعی استان همدان جمع‌آوری گردید و در آذر ماه ۱۳۹۵ در گلدان‌های سه کیلوگرمی (با قطر ۲۰ و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر) حاوی مخلوط مساوی خاک باغچه،

ماسه بادی و کود گاوی پوسیده کشت گردید. هر تیمار آزمایش شامل سه گلدان و هر گلدان دارای سه بوته بود. آبیاری هر ۷-۵ روز یک بار در طول رویش گیاه انجام شد. محلول‌پاشی در سه مرحله از ۴ ماه بعد (ارتفاع بوته ۱۰سانتی‌متر) از کشت به فاصلهٔ هر ۷ روز انجام گردید. پس از طی مراحل رشد و نمو، در مرحله تمام گل، ارزیابی صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی انجام شد.

وزن تر و خشک بوته

در پایان دوره رشد رویشی و زمانی که ۹۰ درصد بوته‌ها در فاز زایشی قرار داشتند؛ بخش هوایی گیاه از محل طوقه برداشت شد و پس از تعیین وزن تر اندام هوایی، به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در شرایط دمای معمولی اتاق و سایه خشک و با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. سپس نمونه‌های گیاهی آسیاب شده از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای تعیین مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل، مقدار یک گرم از بافت سبز برگ‌های بالغ جوان به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و پس از آن به‌طور جداگانه مقادیر کلروفیل a در طیف جذبی ۶۶۳ و کلروفیل b در ۶۴۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Unic, UV, 2100 قرائت شد. جهت تنظیم دستگاه، استون ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (mg/g FW) نمونه محاسبه شد (Arnon, 1967; Khaleghnezhad *et al*., 2019). همچنین جهت سنجش کارتنوئید کل از طول موج ۴۷۰ نانومتر استفاده گردید (Lichtenthaler,1987). آماده‌سازی نمونه‌ها برای سنجش کارتنوئید مطابق روش ذکر شده برای کلروفیل و توسط استون ۸۰٪ صورت گرفت.

رابطه (۱) $Chla\ (mg/g\ FW) = (12.25 \times A663) - (2.79 \times A\ 647)$

رابطه (۲) $Chlb\ (mg/g\ FW) = (21.5 \times A647) - (5.1 \times A\ 663)$

رابطه (۳) $Total\ Chl\ (mg/g\ FW) = chl\ a + chl\ b$

رابطه (۴) $Car\ (mg/g\ FW) = (1000 \times A470 - 1.82\ chla - 85.02\ chlb)/198$

تهیه عصاره هیدروالکلی جهت سنجش فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان

سرشاخه‌های گیاه پس از ورود به فاز گلدهی برداشت شد و در شرایط دمای معمولی اتاق و سایه خشک گردید. سپس به کمک آسیاب برقی پودر گردید. عصاره متانولی از پودر شاخساره گلدار با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱۰:۱ (حجمی/وزنی) ماده خشک گیاهی و حلال متانول ۷۰٪ تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون حلال و روی شیکر با سرعت ۱۲۰rpm در دمای اتاق خیسانده شد. پس از آن با کاغذ صافی واتمن No.1 صاف گردید و جهت تغلیظ به دستگاه روتاری اواپوراتور با دمای ۴۵°C انتقال یافت. یک ساعت پس از تغلیظ عصاره به زیر هود انتقال یافته تا مابقی حلال به‌تدریج تبخیر گردد. از این عصاره متانولی جهت استفاده در سنجش میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید (Firouzkoohi *et al*., 2018).

سنجش میزان فنل کل

مقادیر ترکیب‌های فنلی در عصاره متانولی آویشن دنایی با استفاده از معرف فولین سیوکالتو اندازه‌گیری گردید. طبق این روش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق‌شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد. داده‌ها معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه (mg/g DW) بیان شد. همه سنجش‌ها در سه نوبت تکرار گردید (Mc Donald *et al*., 2001).

سنجش فلاونوئید کل

روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ی متانولی آویشن دنایی استفاده شد. در این روش به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد بر اساس محلول کوئرستین با غلظت‌های متفاوت (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰ و ۵۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) رسم شده و میزان فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه (mg Q/g DW) محاسبه گردید. تمامی سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد (Chang *et al*., 2002).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان

جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[1] استفاده گردید. این روش بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش‌رنگ ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل به محلول زرد رنگ دی فنیل- پیکریل هیدرازین می‌باشد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی متانولی آویشن دنایی با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (دو میلی‌گرم DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد) مخلوط گردید. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول ذیل محاسبه گردید (Barros *et al*., 2007):

رابطه (۵) $(Ac-As)/Ac\times100$ = درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

Ac: عدد جذب مربوط به شاهد، As: عدد جذب مربوط به نمونه

سنجش درصد اسانس

هر یک از نمونه‌ها پس از حذف مواد زائد، به وسیله آسیاب خرد و توزین شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. برای این منظور ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاهی با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب و در سه تکرار اسانس‌گیری شده و درصد اسانس بر اساس درصد حجمی/وزنی گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به آزمایش‌های مختلف این پژوهش با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

وزن تر بوته

نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن بود که اثر محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالسیلیک و کیتوزان بر پارامتر وزن تر بوته در گیاه آویشن دنایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین وزن تر بوته آویشن دنایی از تیمار محلول‌پاشی توأم اسید سالسیلیک و کیتوزان با غلظت‌های ۱/۵ میلی‌مولار حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۱۴۵ درصد افزایش نشان داد (شکل ۱). در بررسی اثر تحریک محیط کشت بر گیاه گلرنگ، بیشترین سرعت رشد بیومس کالوس از تیمار کاربرد توأم اسید سالسیلیک و کیتوزان در شرایط غیر تنش حاصل شد (Golkar *et al*., 2019). کاربرد محرک کیتوزان در گیاه شنبلیله و اسید سالسیلیک در سیاه‌دانه و گلرنگ منجر به افزایش صفات رشدی نظیر طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک گردیده‌اند. این ترکیبات با تنظیم فشار اسمزی سبب افزایش میزان جذب آب به‌وسیله گیاه شده و رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Rezaei Chiyaneh and Pirzad, 2014; Amiri *et al*., 2015; Mosapour Yahyaabadi *et al*., 2016; Rahmani *et al*., 2013).

وزن خشک بوته

اثر محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالسیلیک و کیتوزان بر پارامتر وزن خشک بوته در گیاه آویشن دنایی در سطح احتمال پنج درصد ($p<0.05$) معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان وزن خشک بوته آویشن دنایی از تیمار محلول‌پاشی توأم با اسید سالسیلیک و کیتوزان (۱/۵ میلی‌مولار) حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۴۷ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲). همسو با نتایج ما

1. 2, 2- Diphenyl-1-picryl-hydrazyl

بیشترین میزان ماده خشک آویشن دنایی تحت تنش آبی از تیمار محلول‌پاشی با کیتوزان حاصل گردید (Emami Bistgani *et al*., 2017). محققان علت افزایش صفات رشدی در کدوی تابستانه تحت تأثیر محرک‌های زیستی را با افزایش انعطاف‌پذیری دیواره سلولی مرتبط دانستند. به عقیده آنان محرک‌ها از طریق افزایش هیدرولیز نشاسته به قندهای ساده، میزان جذب آب از فضای بین سلولی افزایش می‌دهند؛ بدین‌ترتیب با توسعه سلولی منجر به افزایش بیومس می‌گردند (Shafeek *et al*., 2016). محققان اذعان نمودند که مصرف کیتوزان با تحریک رشد ساقه و ریشه و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی و انتقال بهتر این مواد در اندام گیاهی منجر به افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد (Mosapour Yahyaabadi *et al*., 2016).

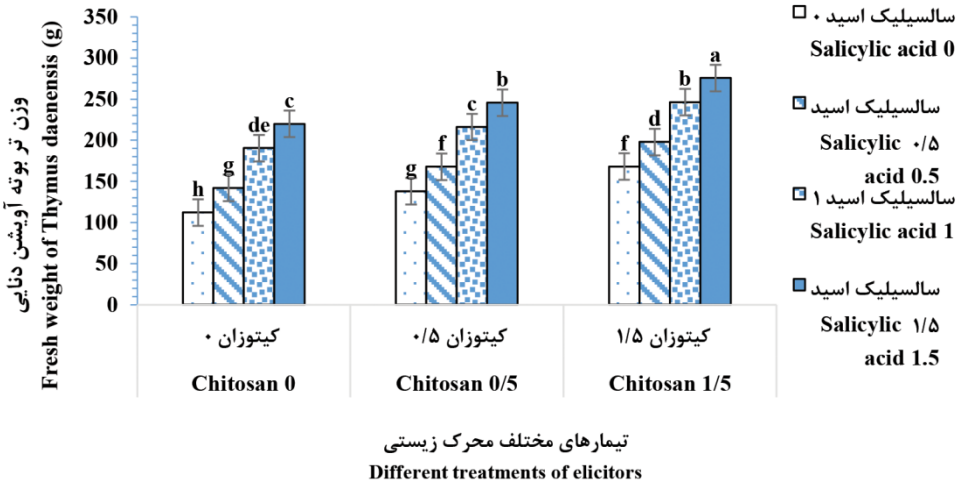
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی آویشن دنایی تحت تأثیر محرک‌های زیستی

Table 1- Analysis of variance of morphological traits of *Thymus daenensis* under elicitors effect

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی DF	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	طول گل‌آذین Inflorescence length
اسید سالسیلیک Salicylic acid	3	6625.52*	63.5*	14.36*
کیتوزان Chitosan	3	27864.5*	271.64*	2.27**
اسید سالسیلیک * کیتوزان Salicylic acid * Chitosan	9	9868*	91.9*	3.32*
خطا Error	32	14.94	0.72	0.24
ضریب تغییرات Coefficient of variation (%)	-	9.52	2.03	11.53

*معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

*Significant at the 0.05 % probability level, ** Significant at the 0.01 % level



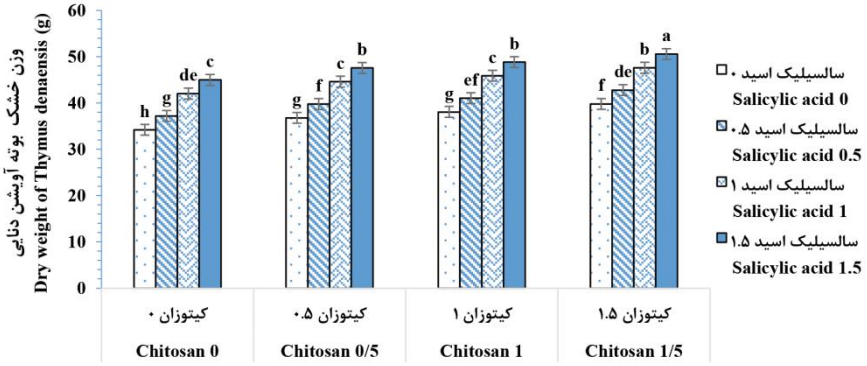
شکل ۱- اثر محرک‌های زیستی مختلف بر وزن تر بوته آویشن دنایی

Figure 1- Effect of biological elicitors on fresh weight of *Thymus daenensis*

طول گل‌آذین

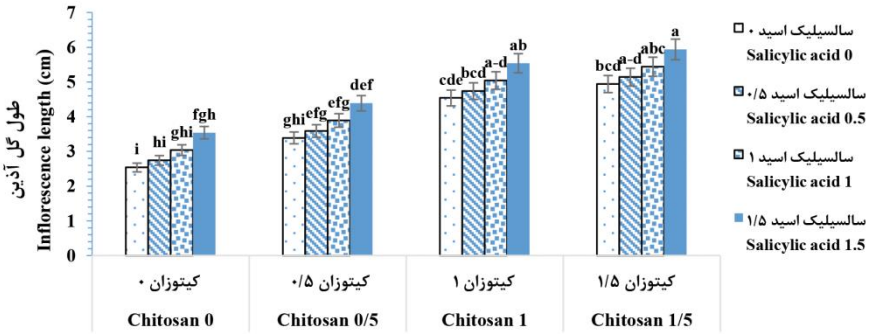
نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن بود که اثر محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالسیلیک و کیتوزان بر پارامتر طول گل‌آذین در گیاه آویشن دنایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۳ مشهود است؛ بیشترین طول گل‌آذین از تیمار محلول‌پاشی توأم با اسید سالسیلیک و کیتوزان مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد افزایش ۱۳۳/۸ درصدی نشان داد. بررسی اثر محرک‌های زیستی بر رازیانه نشان داد

محلول‌پاشی اسید سالسیلیک (۱/۵ میلی‌مولار) و کیتوزان (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تعداد چتر در بوته رازیانه را تولید نمود و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد که با نتایج ما مطابقت داشت (Forouzandeh *et al.*, 2018). محرک‌ها در فرآیندهای مختلفی نظیر رفتارهای گلدهی، نسبت جنسیت گل-ها، درصد تشکیل میوه، رشد و نمو میوه و عملکرد تغییراتی را ایجاد می‌کنند. آن‌ها این تغییرات را از طریق تأثیر بر روابط منبع و محل مصرف اسمیلات‌ها ایجاد می‌کنند (Mohkami *et al.*, 2021).



شکل ۲- اثر محرک‌های زیستی مختلف بر وزن خشک بوته آویشن دنایی

Figure 2- Effect of biological elicitors on dry weight of *Thymus daenensis*



شکل ۳- اثر محرک‌های زیستی بر طول گل‌آذین در آویشن دنایی

Figure 3- Effect of biological elicitors on inflorescence length of *Thymus daenensis*

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک و کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر میزان کلروفیل a در برگ آویشن دنایی معنی-دار بود (جدول ۲).

افزایش ۸۹ درصدی میزان کلروفیل a و ۷۲ درصدی میزان کلروفیل b در تیمار محلول‌پاشی توأم با اسید سالسیلیک و کیتوزان با غلظت‌های ۱/۵ میلی‌مولار مشاهده گردید که مؤید تأثیر مثبت محرک‌های زیستی بر تجمع رنگیزه‌های فتوسنتزی است (شکل ۵).

همان‌طور که در جدول ۳ قابل مشاهده است بیشترین محتوای کلروفیل کل در تیمار محلول‌پاشی همزمان با اسید سالسیلیک و کیتوزان (هر دو با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار) تجمع یافت که نسبت به تیمار شاهد ۸۰ درصد افزایش داشت. افزایش ۸۷ درصدی در میزان کارتنوئید نسبت به تیمار شاهد، نیز نتیجه محلول‌پاشی توأم با اسید سالسیلیک و کیتوزان (هر دو با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار) بود. گروهی از محققان اذعان نمودند در شرایط تهییج بوته‌های آویشن دنایی با کیتوزان در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر/لیتر، اگرچه میزان کلروفیل a افزایش اندکی نشان داد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و همچنین غلظت

کارتنوئید در آزمایش آن‌ها به تهییج توسط کیتوزان واکنش نشان نداد که با نتایج ما مغایرت داشت (Emami Bistgani *et al.*, 2017). گروه دیگری از محققان گزارش نمودند که محلول‌پاشی کیتوزان بر گیاه شنبلیله تحت تنش شوری، منجر به افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گردید. آن‌ها بیان نمودند که کیتوزان بیان ژن کلروپلاست را در برگ تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش کلروفیل و فتوسنتز گشته و از این طریق بر رشد گیاهان مؤثر است (Mosapour Yahyaabadi *et al.*, 2016).

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی صفات فیتوشیمیایی آویشن دنایی تحت تأثیر محرک‌های زیستی

Table 2- Analysis of variance of some phytochemical traits of *Thymus daenensis* under elicitors effect

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی DF	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid
اسید سالسیلیک Salicylic acid	3	14.36*	13.12*	57.47*	11.36*
کیتوزان Chitosan	3	2.27**	2.57**	9.08**	3.27**
اسید سالسیلیک * کیتوزان Salicylic acid * Chitosan	9	3.32*	3.45*	13.31*	3.24*
خطا Error	32	0.24	0.72	0.97	0.21
ضریب تغییرات Coefficient of variation (%)	-	8.88	7.75	8.24	6.63

*معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

*Significant at the 0.05 % probability level, ** Significant at the 0.01 % level

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی صفات فیتوشیمیایی آویشن دنایی تحت تأثیر محرک‌های زیستی

Table 3- Mean comparison of some phytochemical traits of *Thymus daenensis* under elicitors effect

سطوح اسید سالسیلیک Salicylic acid concentration	سطوح کیتوزان Chitosan concentration	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid
(mM)	(mM)	(mg/g FW)			
SA 0	CH 0	3.82^{i}	4.67^{i}	8.5^{i}	3.9^{i}
	CH 0.5	4.67^{hi}	5.52^{hi}	10.2^{hi}	4.75^{hi}
	CH 1	5.82^{ghi}	6.67^{ghi}	12.5^{ghi}	5.9^{ghi}
	CH 1.5	6.22^{fgh}	7.07^{fgh}	13.3^{fgh}	6.3^{fgh}
SA 0.5	CH 0	4.02^{ghi}	4.87^{ghi}	8.9^{ghi}	4.1^{ghi}
	CH 0.5	4.87^{fgh}	5.72^{fgh}	10.6^{fgh}	4.95^{fgh}
	CH 1	6.02^{efg}	6.87^{efg}	12.9^{efg}	6.1^{fgh}
	CH 1.5	6.42^{def}	7.27^{def}	13.7^{def}	6.5^{def}
SA 1	CH 0	4.32^{cde}	5.17^{cde}	9.5^{cde}	4.4^{cde}
	CH 0.5	5.17^{b-e}	6.02^{b-e}	11.2^{b-e}	5.25^{bcd}
	CH 1	6.32^{a-d}	7.17^{a-d}	13.5^{a-d}	6.4^{abcd}
	CH 1.5	6.72^{ab}	7.57^{ab}	14.3^{ab}	6.8^{ab}
SA 1.5	CH 0	4.82^{bcd}	5.67^{bcd}	10.5^{bcd}	4.9^{bcd}
	CH 0.5	5.67^{a-d}	6.52^{a-d}	12.2^{a-d}	5.75^{a-d}
	CH 1	6.82^{abc}	7.67^{abc}	14.5^{abc}	6.9^{abc}
	CH 1.5	7.22^{a}	8.07^{a}	15.3^{a}	7.3^{a}

میانگین‌های با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد هستند (آزمون دانکن).

Means with dissimilar letters are significantly different at P<0.05, respectively (Duncan's multiple range test).

فنل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر متقابل اسید سالسیلیک و کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر میزان فنل کل در عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی معنی‌دار بود (جدول ۴). بیشترین میزان ترکیبات فنولی (mg GA/g DW ۶۷/۹۱) در تیمار محلول‌پاشی توأم با کیتوزان در غلظت ۱ میلی-مولار و اسید سالسیلیک در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار مشاهده گردید. کمترین میزان ترکیبات فنولی (mg GA/g DW ۳۱/۰۴) در تیمار محلول‌پاشی با کیتوزان در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار و عدم کاربرد اسید سالسیلیک حاصل شد (شکل ۴). مطالعات پیشین مؤید تأثیر اسید سالسیلیک در افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه است. به‌طور مثال در کشت سلولی گیاه داتوره کاربرد اسید سالسیلیک منجر به افزایش میزان آتروپین گشته است. به‌طور مشابه در ازدیاد درون‌شیشه‌ای شیرین‌بیان اسید سالسیلیک سنتز متابولیت ثانویه گلیسریزین را افزایش داد (Shabani *et al*., 2009; Zanganeh *et al*., 2010). سایر محققان نیز دریافتند که کاربرد اسید سالسیلیک در کشت درون شیشه‌ای *Thymus membranaceus* منجر به افزایش تجمع ترکیبات فنولی می‌گردد (Tortosa *et al*., 2012). گروهی از پژوهشگران گزارش نمودند که در کشت تهییج شده درمنه کوهی با انواع هورمون‌ها و محرک‌های زیستی، بیشترین مقادیر فنولیک‌ها، تانن تام، ترکیبات فنلی غیرتانینی در تیمار کیتوزان تجمع یافت (Asghari *et al*., 2015). محققان اذعان نمودند که در شرایط تهییج، افزایش سنتز و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالاز و چالکون سنتتاز در افزایش سنتز ترکیبات فنولی مؤثر است (Asghari *et al*., 2015; Shabani and Ehsanpour, 2010).

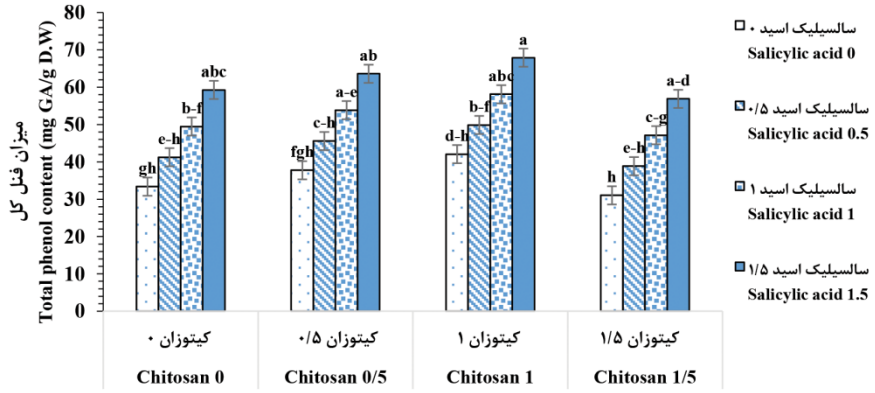
جدول ۴- تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی آویشن دنایی تحت تأثیر محرک‌های زیستی

Table 4- Analysis of variance of some phytochemical traits of Thymus daenensis under elicitors effect

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی DF	فنل کل Total phenol	فلاونوئید کل Total flavonoids	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	میزان اسانس Essential oil
اسید سالسیلیک Salicylic acid	3	284.18**	2.84**	270.71**	0.40*
کیتوزان Chitosan	3	1477.03*	12.71*	1370*	0.13*
اسید سالسیلیک * کیتوزان Salicylic acid * Chitosan	9	352.24*	3.52*	311.04*	9.52^{ns}
خطا Error	32	25.91	0.65	22.26	0.11
ضریب تغییرات Coefficient of variation (%)	-	16.73	28.47	9.17	9.5

*معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ^{ns} غیرمعنی‌دار

*Significant at the 0.05 % probability level, ** Significant at the 0.01% level, ^{ns}Notsignificant



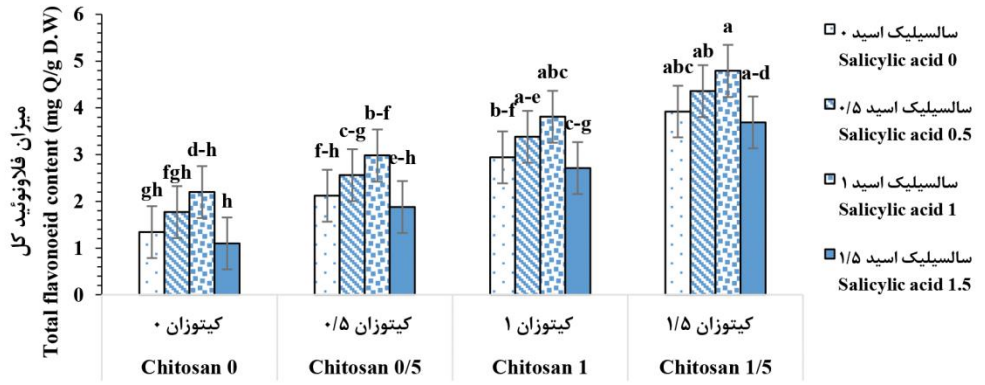
شکل ۴- اثر محرک‌های زیستی بر فنل کل در آویشن دنایی

Figure 4- Effect of biological elicitors on total phenolic content in *Thymus daenensis*

فلاونوئید کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر متقابل اسید سالسیلیک و کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر میزان فلاونوئید کل در عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی معنی‌دار بود (جدول ۴). همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده گردید؛ بیشترین میزان فلاونوئید کل (۴/۷۹ mg Q/g DW) در تیمار محلول‌پاشی توأم با اسید سالسیلیک با غلظت mM و کیتوزان با غلظت mM ۱/۵ تجمع یافت. درحالی‌که کمترین میزان فلاونوئید کل (mg Q/g DW ۱/۱) در اثر محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک (۱/۵ میلی‌مولار) و عدم کاربرد کیتوزان مشاهده گردید (شکل ۵).

همچنین در مورد بابونه آلمانی بیشترین مقدار فلاونوئید در گیاهان تهییج‌شده توسط محرک زیستی حاصل شد (Golzadeh *et al*., 2011). در مطالعه‌ای که اثر تهییج با اسید سالسیلیک و کیتوزان بر متابولیت‌های مختلف گیاه درمنه کوهی را بررسی نموده است، بیشترین میزان فلاونوئیدهای تام در تیمار با اسید سالسیلیک مشاهده گردید و مغایر با نتایج ما، در تیمار کاربرد توأم اسید سالسیلیک و کیتوزان کمترین میزان فلاونوئید تام تجمع یافت (Asghari *et al*., 2015). در شرایط تنش شوری نیز بیشترین میزان فلاونوئیدها در کشت‌های تهییج شده با اسیدسالسیلیک و کیتوزان حاصل شد که پژوهشگران علت این امر را فعال شدن ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی ترکیبات فلاونوئیدی (نظیر فنیل پروپانوئید) بیان نمودند (Golkar *et al*., 2019). محلول‌پاشی محرک‌های زیستی با تأثیر بر سنتز و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالاز و چالکون سنتتاز منجر به افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئید می‌گردد (Asghari *et al*., 2015; Shabani and Ehsanpour, 2010).



شکل ۵- اثر محرک‌های زیستی بر میزان فلاونوئید کل در آویشن دنایی

Figure 5- Effect of biological elicitors on total flavonoids content in *Thymus daenensis*

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

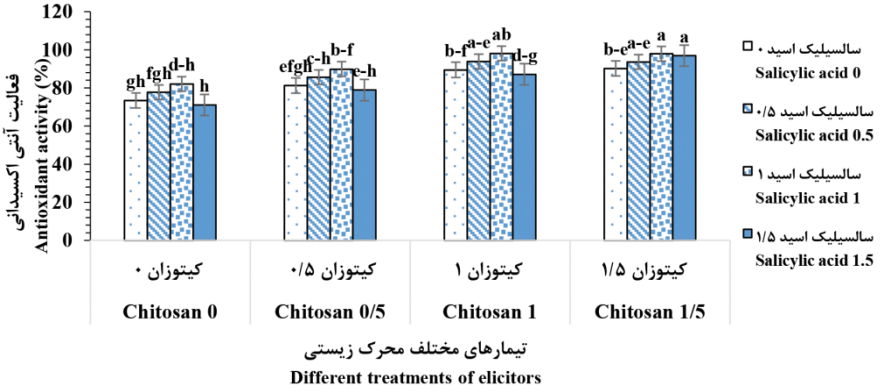
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر متقابل اسید سالسیلیک و کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی معنی‌دار بود (جدول ۴). در این آزمایش بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (۹۸/۱۳ درصد) در تیمار محلول‌پاشی توأم با کیتوزان (۱ میلی‌مولار) و اسیدسالسیلیک (۱ میلی‌مولار) مشاهده گردید. درحالی‌که کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۱/۰۴ درصد) در تیمار محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار و عدم کاربرد کیتوزان حاصل شد (شکل ۶). همسو با نتایج ما تحریک با محرک‌های زیستی منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در کشت کالوس بارهنگ و ریشه جینسینگ گردید که در نتیجه افزایش تجمع ترکیبات فنولی است. این ترکیبات فنولی نقش کلیدی در مهار گونه‌های اکسیژن فعال دارند (Gengmao *et al*., 2015; Salem *et al*., 2014).

در مطالعه دیگری گزارش شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آویشن همبستگی بالایی با درصد اسانس و ترکیبات فنولی آن دارد (Amiri, 2012). محققان اذعان نمودند که محلول‌پاشی اسید سالسیلیک بر گیاه داروئی *Thymus membranaceus* میزان رزمارنیک اسید و سطوح ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهد؛ که این دو می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

متانولی این گیاه دارویی را بهبود بخشد (Tortosa *et al.*, 2012). محققان اذعان نمودند که کاربرد خارجی اسید سالسیلیک می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم نموده و مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های غیرزنده افزایش دهد (He *et al.*, 2002).

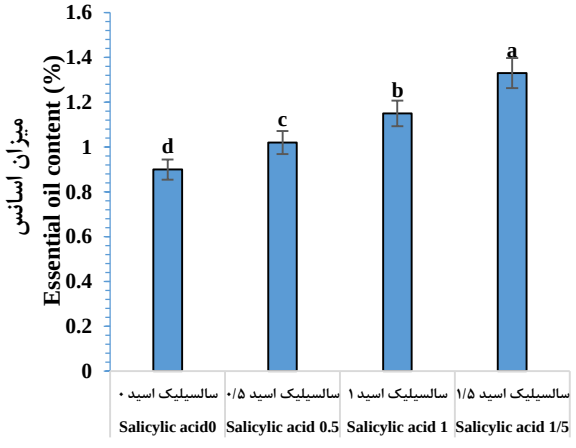
میزان اسانس

نتایج حاکی از آن بود که اثر ساده محلول‌پاشی با محرک-های زیستی اسید سالسیلیک و کیتوزان بر میزان اسانس اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت؛ درحالی‌که اثر متقابل این تیمارها بر میزان اسانس معنی‌دار نبود (جدول ۴). در بررسی اثر ساده محلول‌پاشی اسید سالسیلیک، بیشترین میزان اسانس از تیمار محلول‌پاشی با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۴۷ درصد افزایش نشان داد (شکل ۷). همچنین در بررسی اثر ساده کیتوزان بر میزان اسانس مشخص شد که بیشترین میزان اسانس در تیمار محلول‌پاشی با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار بدست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۲۳ درصد افزایش یافته بود (شکل ۸).



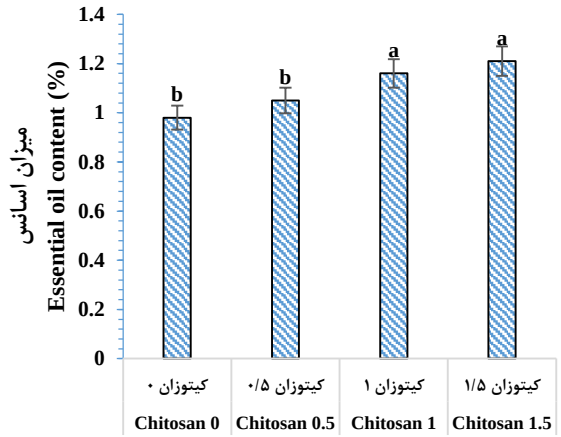
شکل ۶- اثر محرک‌های زیستی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی

Figure 6- Effect of biological elicitors on antioxidant activity of *Thymus daenensis hydroalcholic extract*



شکل ۷- اثر اسید سالسیلیک بر میزان اسانس در آویشن دنایی

Figure 7- Effect of salicylic acid on essential oil content of *Thymus daenensis*



شکل ۸- اثر ساده کیتوزان بر میزان اسانس آویشن دنایی

Figure 8- Effect of chitosan on essential oil content of *Thymus daenensis*

در مطالعه سایر محققان نیز اذعان شد که محلول‌پاشی بوته-های آویشن دنایی با محرک زیستی اسید سالسیلیک، درصد و عملکرد اسانس افزایش یافت. نتایج مطالعه آن‌ها همسو با نتایج ما حاکی از آن بود که بیشترین درصد اسانس آویشن دنایی در

تیمار محلول‌پاشی با اسید سالسیلیک در غلظت ۱/۵ مولار حاصل شد (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2014). در مطالعه دیگری بیشترین میزان اسانس آویشن دنایی (v/w ٪ ۱/۵۲) از گیاهان تحت تنش ملایم آبی محلول‌پاشی با کیتوزان در غلظت $\mu L.L^{-1}$ ۴۰۰ بدست آمد (Emami Bistgani *et al*., 2015). محققان اذعان نمودند که محلول‌پاشی بوته‌های مرزنجوش با محرک زیستی کیتوزان منجر به افزایش غلظت ترکیبات ترپنی و متعاقباً درصد اسانس گردید (Yin *et al*., 2012). علت افزایش محتوای اسانس در محلول‌پاشی برگی با اسید سالسیلیک را در نتیجه بهبود فرآیند رشد، جذب عناصر غذایی، تراکم غدد ترشحی اسانس در برگ و بیوسنتز مونوترپن‌ها دانستند (Idrees *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج، محلول‌پاشی اسید سالسیلیک و کیتوزان در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار بیش از سایر تیمارها بر خصوصیات کمی و کیفی این گیاه مؤثر بود؛ به‌طوری‌که با تحریک چرخه فیزیولوژیکی گیاه و سنتز بالاتر رنگیزه‌های فتوسنتزی، کارایی فتوسنتزی را افزایش داد و در نتیجه با افزایش رشد رویشی، میزان سنتز متابولیت‌های ثانویه را نیز افزایش داد. با توجه به نقش مثبت محرک‌های زیستی اسید سالسیلیک و کیتوزان در حصول عملکرد کمی و کیفی بالاتر در گیاه داروئی آویشن دنایی، بهره‌گیری از این ترکیبات به عنوان بهترین گزینه در راستای اهداف نظام کشاورزی پایدار و کاهش مخاطرات زیست‌محیطی توصیه می‌گردد.

سپاس‌گزاری

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۱۰۰۰۱۶۲ مصوب و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه زابل انجام شد. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند؛ بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل صمیمانه قدردانی نمایند.

References

Akbarinia, A. and Mirza, M. 2008. Identification of aromatic compounds of *Thymus daenensis* cultivated in Qazvin. *Scientific Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, 12(3): 59-62. (In Persian).

Amiri, H. 2012. Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1: 1-8.

Amiri, A., Yadolahi, P., Siroosmehr, A. and Esmaeilzadeh, S. 2015. Effect of drought stress and chitosan and salicylic spray on morphological parameters of *Carthamus tinctorius* L. in Sistan. *Journal of Oil Plants Production*, 2(1): 43-56. (In Persian).

Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23: 112-121.

Asghari, G.R., Ghasemi, R., Yosefi, M. and Mehdinezhad, N. 2015. Effect of hormones, salicylic acid, chitosan on phenolic compounds in *Artemisia aucheri* in vitro. *Journal of Plant Process and Function*, 10(3): 93-100. (In Persian).

Ashrafi, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Rahimmalek, M. and Hamedi, B. 2012. Effect of foliar application of Jasmonic Acid (JA) on essential oil yield and its compositions of *Thymus daenensis* Celak. *Journal of Herbal Drugs*, 3: 75-80.

Babaei, Z., Seleucid, M. and Fazeli Nasab, B. 2018. Investigation of the effect of biotic and abiotic elicitors on the expression of Hyp-1 gene in *Hypericum perforatum*. *New Genetics*, 13(4): 543-549. (In Persian).

Barros, L., Baptista, P. and Ferreira, I.C.F.R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays, *Lactarius piperatus*. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9): 1731-1737.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total Flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182.

Cheng, X.Y., Zhou, H.Y., Cui, X., Ni, W. and Liu, C.Z. 2006. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*, 121: 253-260.

Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A. and Ghasemi Pirbaloti, A. 2015. Effects of chemical and organic fertilizers and chitosan on physiological traits and phenolic compound amounts in thyme (*Thymus deanensis* Celak) in Shahrekord region. *Journal of Agricultural Research*, 7(1): 11-26. (In Persian).

Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbaloti, A. and Hashemi, M. 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5: 407-415.

Firouzkoohi, F., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Mohkami, Z. and Yosefzaei, F. 2018. The effect of different solvents on total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of different organs of *Momordica charantia* L. cultured in Sistan region. *Ecophytochemistry of Medicinal Plants*, 20(4): 74-85. (In Persian).

Forouzandeh, M., Mohkami, Z. and Fazeli Nasab, B. 2018. Evaluation of foliar application of bioelicitors on functional changes, physiological and biochemical indices of fennel. *Journal of Plant Production Research*, 25(4): 49-65. (In Persian).

Gengmao, Z., Yu, H., Xing, S., Shihui, L., Quanmei, S. and Changhai, W. 2015. Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64: 175–181.

Ghasemi Pirbalouti, A., Rahmani Samani, M., Hashemi, M. and Zeinali, H. 2014. Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. *Plant Growth Regulation*, 72(3): 289–301.

Golkar, P., Taghizadeh, M. and Yousefian, Z. 2019. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(3): 575–585.

Golzadeh, H., Mehrafarin, A., Naqdi Badi, H., Fazeli, F., Ghaderi, A. and Zarrin Panjeh, N. 2011. The effect of biostimulants on quantitative and qualitative yield of German chamomile. *Medicinal Plants*, 11(8): 198-207. (In Persian).

He, C.Y., Zhang, J.S. and Chen, S.Y. 2002. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1125–1131.

Idrees, M., Khan, M.M.A., Aftab, T., Naeem, M. and Hashmi, N. 2010. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. *Journal of Plant Interactions*, 5: 293-303.

Khaleghnezhad, V., Yousefi, A.R., Tavakoli, A. and Farajmand, B. 2019. Interactive effects of abscisic acid and temperature on rosmarinic acid, total phenolic compounds, anthocyanin, carotenoid and flavonoid content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Scientia Horticulturae*, 250: 302-309.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods in Enzymology*, 148: 350-381.

McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84.

Miclea, I., Suhani, A., Zahan, M. and 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): 1722-1736.

Mohkami, Z., Sanikhani, M., Kheiry, A., Bahari, A. and Tavakolizadeh Esfahani, M. 2021. Study of the effect of some non-biological elicitors on the morphological and phytochemical properties of Momordica charantia. *Journal of Plant Production*, 28(2): 183-202.

Mosapour Yahyaabadi, H., Asgharipour, M. and Basiri, M. 2016. Role of chitosan in improving salinity resistance through some morphological and physiological characteristics in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 7(1): 165-175. (In Persian).

Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37: 91-102.

Rahmani, A., Seighali, N. and Ebrahimzadeh, H. 2013. A study on peroxidase activity alterations in corms of saffron (*Crucus sativus* L.) exposed to different H_2O_2 concentrations and pH measurement during dormancy and waking. *New Cellularand Molecular Biotechnology Journal*, 3(10): 79-84. (In Persian).

Rechinger, K.H. 1982. Flora Iranica, Graz: Akademische Druckund Verlagsanstalt, 152.

Sajjadi, S.E. and Khatamsaz, M. 2003. Composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak. Ssp. Lancifolius (Celak.) Jalas. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 34-35.

Rezaei Chiyaneh, E. and Pirzad, A. 2014. Effect of salicylic acid on yield, component yield and essential oil of Black cumin (*Nigella sativa* L.) under water deficit stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12(3): 427-437. (In Persian).

Salem, N., Msaada, K., Dhifi, W., Limam, F. and Marzouk, B. 2014. Effect of salinity on plant growth and biological activities of *Carthamus tinctorius* L. extracts at two flowering stages. *Acta Physiol Plant*, 36: 433–445.

Shabani, L., Ehsanpour, A., Asghari, G. and Emami, J. 2009. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56: 621-626.

Shabani, L. and Ehsanpour, A.A. 2010. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in in vitro culture of licorice (*Glycyrrhiza glabara* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. *Iranian Journal of Biotechnology*, 22. 4: 691-703. (In Persian).

Shafeek, M.R., Helmy, Y.I., Ahmed, A.A. and Ghoname, A.A. 2016. Effect of foliar application of growth regulators (GA3 and Ethereal) on growth, sex expression and yield of summer squash plants (*Cucurbita pepo* L.) under plastic house condition. *International Journal of ChemTech Research*, 9(6): 70-76.

Sharma, A.K. 2002. A hand book organic farming. Agrobios, India, 627pp.

Thomas, J., Mandal, A.K.A., Raj Kumar, R. and Chrodia, A. 2009. Role of biologically active amino acid formulations on quality and crop productivity of Tea (Camelia sp.). *International Journal of Agricultural Research*, 4: 228-236.

Tortosa, V.P., Orenes, A.L., Perez, A.M., Ferrer, M.A. and Calderon, A.A. 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, 130: 362-369.

Yin, H., Fretté, X.C., Chrestensen, L.P. and Grevsen, K. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Oreganum vulgare* ssp. *hirtum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1): 136-143.

Zanganeh, V., Asghari, G. and Ehsanpour, A.A. 2010. Influence of salicylic acid on atropine production in *Datura metel* L. callus culture. *Pharmaceutical Sciences*, 16: 29-36.

Journal of Crop Science Research in Arid Regions/ Volume 4, Issue 2, Autumn and Winter 2023, P. 503-517

The effect of chitosan and salicylic acid elicitors on morphological and phytochemical properties of *Thymus daenensis* Celak.

Zaynab Mohkami[1*], Fatemeh Bidarnamani[1]

[1] Department of Agriculture and Plant Breeding, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol, Iran

[*]Corresponding Author: Zaynabmohkami@uoz.ac.ir

Received: 29 July 2021 Accepted: 7 November 2021 **DOI: 10.22034/CSRAR.2021.297351.1113**

Abstract

Introduction: *Thymus daenensis* Celak. is an aromatic species with medicinal properties that is native to the northwest, center, and southwest of Iran. In Iranian traditional medicine, the infusion and decoction of the aerial parts of *Thymus* species are used to produce tonic, carminative, digestive, antispasmodic, anti-inflammatory, and expectorant substances, as well as to treat colds. This plant's essential oil contains several active compounds, the most important of which are thymol, paracemen, beta-caryophyllen, carvacrol, and gamma-terpinene. Among the numerous techniques used to increase the production of active compounds in essential oil, bioelicitors are the most acceptable. This study examined the impact of biological elicitors, chitosan and salicylic acid, on the quantitative and qualitative characteristics of *Thymus daenensis*.

Materials and Methods: This research was designed in factorial experiment based on a completely randomized design with three replications during the 2016-2017 crop year at the institute of agricultural research in University of Zabol. The first experimental factor was chitosan (0, 0.5, 1, and 1.5 mM) and the second factor was salicylic acid (0, 0.5, 1, and 1.5 mM). Thyme seeds were collected from the natural areas of Hamadan province in autumn 2015 and then was cultivated in December 2016 in 3 Kg pots containing equal parts garden soil, sand, and cow manure. Foliar elicitation was performed in two stages, every seven days, 4 months after planting (10 cm plant height), at the stage of full bloom. The pigments of photosynthetic organisms were measured using spectrophotometry. The Folin–Ciocalteu and Aluminum chloride methods were used to measure the total phenolic and flavonoid contents, respectively. Using the Diphenyl Picryl Hydrazyl (DPPH) assay, antioxidant activity of extracts was determined. The essential oil was extracted using a clevenger-type apparatus and water distillation for 3 hours. The data were analyzed using SAS statistical software (Ver. 9.1), and the mean of the treatments was compared using Duncan's multiple range test.

Results and Discussion: The effects of chitosan, salicylic acid, and their interactions on morphological and phytochemical parameters were significant. Salicylic acid and chitosan treatment produced the highest levels of fresh weight, dry weight, inflorescence length, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids. The highest total phenol content was found in chitosan and salicylic acid (67.91 mg GA/g DW) (with concentrations of 1 and 1.5 mM, respectively). The greatest amount of total flavonoids (4.79 mg Q/g DW) was obtained when chitosan and salicylic acid were applied together (1.5 and 1 mM, respectively). The combination of chitosan and salicylic acid exhibited the highest antioxidant activity (98.13%) (both of them in 1 mM concentration). In addition, elicitation with salicylic acid (1.5 mM) produced the highest amount of essential oil (1.33 % V/W), a 47% increase compared to the control.

Conclusion: The use of these elicitors can improve the yield and quality of *Thymus daenensis*. According to the findings, foliar application of salicylic acid and chitosan at a concentration 1.5 mM higher than other treatments had a positive effect on the quantitative and qualitative characteristics of this plant by stimulating the plant's physiological cycle and photosynthetic pigment synthesis. By increasing vegetative growth, it increased photosynthetic efficiency and the synthesis of secondary metabolites. Given the positive role of biostimulants of salicylic acid and

chitosan in achieving a higher quantitative and qualitative yield in thyme, it is recommended that these compounds be used as the best option for achieving sustainable agricultural goals and reducing environmental risks.

Keywords: Elicitors, Essential oil, Flavonoid, Phenol, Yield