نشریه فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۵، شماره ۷۲، خرداد و تیر ۱۴۰۵ صفحه: ۱۵۷-۱۷۲
https://doi.org/10.22034/15.72.157

مقاله پژوهشی

بررسی کاربرد سالیسیلیک اسید قبل و بعد از زخمی‌شدن بر رشد، دفاع آنتی‌اکسیدانی و تولید اسید رزمارینیک در بادرنجبویه

الهام‌سادات عباسی[۱]، لیلا شبانی*[۱]، سمیه رئیسی[۲] و ندا میرآخورلی[۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲] گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۳] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

در این پژوهش، اثرات کاربرد برون‌زا اسید سالیسیلیک (SA) در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار، به‌تنهایی و در ترکیب با تنش زخمی‌شدن مکانیکی (قبل و بعد از زخمی‌شدن)، بر رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی، وضعیت اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و محتوای ترکیبات فنولیک و اسید رزمارینیک (RA) در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) بررسی شد. نتایج نشان داد که SA به‌تنهایی رشد زیست‌توده اندام هوایی و ریشه را افزایش داد و محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها را تقویت کرد. زخمی‌شدن به‌تنهایی باعث کاهش بیوماس، افزایش H_2O_2، پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) شد؛ اما پرایمینگ با SA (قبل از زخمی‌شدن) این اثرات منفی را به‌طور معنی‌داری تعدیل کرد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز بسته به شدت تنش افزایش یافت و چرخش به سمت دفاع غیرآنزیمی مشاهده شد. مهم‌ترین یافته، القای شدید فعالیت آنزیم PAL (۳ برابر) و افزایش چشمگیر محتوای ترکیبات فنولیک (۲/۶ برابر) و RA (۵/۶ برابر) در تیمار ترکیبی W+SA در مقایسه با شاهد بود. در مجموع، پرایمینگ با SA قبل از زخمی‌شدن مؤثرترین استراتژی برای کاهش خسارت تنش و بهینه‌سازی تولید RA به‌عنوان متابولیت ثانویه ارزشمند است. این نتایج مکانیسم‌های تعامل SA و سیگنالینگ زخم را روشن می‌سازد و کاربرد عملی برای بهبود تولید ترکیبات دارویی در شرایط تنش ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پرایمینگ، سیگنالینگ زخم، متابولیت ثانویه، *Melissa officinalis*، سالیسیلیک اسید

مقدمه

گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) از خانواده

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۲۷، بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷، پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۴، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲
* نویسنده مسئول، رایانامه: lshabani@gmail.com

حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. ۱۴۰۳ ©
این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:
Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

Lamiaceae یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که به‌دلیل غنی‌بودن از ترکیبات فنولیک، به‌ویژه اسید رزمارینیک (RA)، و اسانس‌های معطر، در صنایع دارویی، غذایی و درمانی جایگاه ویژه‌ای دارد (Jakovljevic *et al.*, 2025; Shakeri *et al.*, 2016). اسید رزمارینیک به‌عنوان اصلی‌ترین متابولیت ثانویه این گیاه، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ضدویروسی قوی از خود نشان می‌دهد و نقش کلیدی در فعالیت‌های بیولوژیکی آن ایفا می کند (Mosavi and Shabani, 2019; Weitzel and Petersen, 2010).

تولید متابولیت‌های ثانویه مانند RA به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار دارد و درک مکانیسم‌های تنظیم‌کننده این فرایندها برای افزایش کیفیت و کمیت ترکیبات دارویی ضروری است (Ali, 2021). گیاهان در پاسخ به تنش‌ها، شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ شامل افزایش سریع کلسیم سیتوزولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فعال‌سازی MAP کینازها Mitogen-activated protein kinase (MAPK or MAP kinase) و تغییر سطح هورمون‌های دفاعی را به‌کار می‌گیرند (Khan *et al.*, 2015). زخمی‌شدن مکانیکی یکی از مهم‌ترین محرک‌های این شبکه دفاعی است که منجر به القای سریع ژن‌های دفاعی، سنتز متابولیت‌های ثانویه و تولید پروتئین‌های مهارکننده پروتئاز می‌شود (Leon *et al.*, 2001; Savatin *et al.*, 2014). در این فرآیند، اسید سالیسیلیک (SA) به‌عنوان یکی از کلیدی‌ترین مولکول‌های سیگنالینگ دفاعی شناخته می‌شود که نه تنها در پاسخ به تنش‌های زیستی (مانند پاتوژن‌ها) بلکه در تحمل تنش‌های غیرزیستی نیز نقش دارد (Fang *et al.*, 2025; Khan *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2021). SA با تنظیم فرآیندهایی مانند فتوسنتز، تنفس، باز و بسته‌شدن روزنه‌ها و فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با پاتوژن (PR)، مقاومت سیستمیک اکتساب‌شده (SAR) را القا می‌کند (Mohamed *et al.*, 2020). همچنین، این هورمون با مهار مسیر بیوسنتز جاسمونیک اسید و کاهش فعالیت کاتالاز، تجمع ROS را افزایش می‌دهد که به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه عمل می‌کند (Caarls *et al.*, 2015; Hou and Tsuda, 2022). کاربرد اگزوژن SA به‌عنوان یک محرک مؤثر، تولید متابولیت‌های ثانویه را در بسیاری از گیاهان دارویی تحریک می‌کند (Ali, 2021; Khalil *et al.*, 2018). مطالعات نشان داده‌اند که SA با القای آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) نخستین آنزیم مسیر فنیل‌پروپانوئید، سنتز ترکیبات فنولیک و RA را افزایش می‌دهد (Ejtahed *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2018). علاوه‌براین، SA با تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX)، پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش و پایداری غشا را حفظ می‌کند (Khan *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2023). با توجه به اهمیت اقتصادی و دارویی بادرنجبویه و پتانسیل بالای SA در تقویت پاسخ‌های دفاعی، بررسی تعامل این هورمون با تنش زخمی‌شدن می‌تواند مکانیسم‌های تنظیم‌کننده تولید RA و سایر ترکیبات فنولیک را روشن سازد. این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات کاربرد اگزوژن SA (قبل و بعد از زخمی‌شدن) بر رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی، وضعیت اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنولیک و RA در بادرنجبویه انجام شد تا راهکارهایی برای بهبود تولید متابولیت‌های دارویی در شرایط تنش ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: آزمایش بر روی بادرنجبویه ژنوتیپ اصفهان انجام شد. نشاءها از مرکز تحقیقاتی استان فارس تهیه و در گلخانه دانشگاه شهرکرد طی سال‌های ۱۳۹۴- ۱۳۹۵ کشت شدند. پس از انتقال نشاءها به گلدان‌های پلاستیکی (۳۰×۳۰×۲۵ سانتی‌متر)، گیاهان در شرایط قابل کنترل از نظر آبیاری، تهویه، شدت نور و دمای محیط نگهداری شدند. تمامی گلدان‌ها از خاک یکسان و مدیریت زراعی مشابه برخوردار بودند تا تغییرات تنها ناشی از تیمارها باشد.

جهت اعمال تیمارها، ۶۲ روز پس از کاشت، شش تیمار اصلی شامل شاهد (Ctrl)، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ میلی‌مولار (SA1)، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید ۱/۵

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

میلی‌مولار (SA1.5)، زخمی‌سازی برگ‌ها (W)، زخمی‌سازی همراه با محلول‌پاشی SA1.5 (W+SA1.5) و پیش‌تیمار SA1.5 قبل از زخمی‌سازی (SA1.5+W) اعمال شد.

برای تیمار زخمی‌سازی، با استفاده از اسکالپل استریل (۷۰٪ اتانول)، روی ۵۰٪ برگ‌های میانی هر گیاه (میان‌گره‌های دوم و سوم) خراش ایجاد شد به‌طوری‌که حدود ٤٠٪ سطح هر برگ تحت تنش مکانیکی قرار گرفت. برای تیمار سالیسیلیک اسید، محلول‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار تهیه و طی سه نوبت با فاصله یک‌روز در میان روی سطح برگ‌ها اسپری شدند. در تیمار W+SA1.5، محلول‌پاشی پس از زخمی‌سازی انجام شد و در تیمار SA1.5+W، گیاهان پنج روز قبل از اعمال زخم و طی سه نوبت متوالی با SA1.5 تیمار شدند تا نقش پیش‌تیماری هورمون ارزیابی شود. در همه مراحل، برای جلوگیری از تماس محلول با خاک، سطح خاک با پوشش پلاستیکی پوشانده شد. برای هر گلدان در هر نوبت، ۱۰ میلی‌لیتر محلول اعمال شد. پس از ١٤ روز از تیمار برای اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نمونه ها برداشت شدند.

سنجش وزن تر و وزن خشک: پس از تیمارها، گیاهان با دقت از گلدان خارج شدند تا کمترین آسیب به ریشه برسد. وزن تر اندام هوایی و ریشه با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، نمونه‌ها ۷۲ ساعت در آون ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا وزن به مرحله پایدار برسد. این شاخص‌ها بیانگر وضعیت رشد و اثر تنش بر تجمع زیست‌توده هستند.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: حدود ۰/۱ گرم از بافت برگ با استون ٪۸۰ هموژن شد. پس از سانتریفیوژ به مدت زمان ۳ دقیقه در ٤ °C، جذب در طول‌موج‌های ٦٤٥، ٦٦٣ و ٤٧٠ نانومتر اندازه‌گیری شد (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987). میزان کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها طبق روابط زیر بر حسب میلی‌گرم در هر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه شد.

$$\text{Chl } a \text{ (mg/gfw)} = ((12.7 \times D663) - (2.69 \times D645)) \times V/1000 \times W$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/gfw)} = ((22.9 \times D645) - (4.93 \times D663)) \times V/1000 \times W$$

$$\text{Chl t (mg/gfw)} = ((20.2 \times D645) + (8.02 \times D663)) \times V/1000 \times W$$

$$\text{Car = (mg/gfw)} = (100 \times D470 - 1.82 \times \text{chl a} - 85.02 \times \text{chl b}) / 198 \times V/1000 \times W$$

که در معادلات بالاک V: حجم نهایی عصاره برحسب میلی‌لیتر، D: جذب نوری، W: وزن بافت بر حسب گرم.

اندازه‌گیری H_2O_2: استخراج با TCA (۰/۱درصد) و سپس واکنش با KI انجام شد. عصاره تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱٤۰۰۰ rpm در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد (Alexieva *et al.*, 2001). ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها و عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH =۷) و ۱ میلی‌لیتر محلول KI ۱ مولار ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. از محلول TCA ۰/۱ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. نتایج براساس منحنی استاندارد H_2O_2 به صورت میکرومول بر گرم وزن تازه بیان شدند.

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA): مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌ها در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ همگن‌سازی و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از ۵۰٪ w/v TBA (تیوباربیتوریک اسید) در ۲۰٪ TCA (تری کلرواستیک اسید) به محلول رویی اضافه شد. پس از پنج دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط به مدت پنج دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی به یک لوله جدید منتقل و با ۱۰ میلی‌لیتر BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) مخلوط شد. سپس، نمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب در دمای ۹۲ درجه سلسیوس و سپس یک بار به مدت پنج دقیقه انکوبه شدند و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد (Ertan *et al.*, 2002). تعیین میزان مالون دی‌آلدئید مطابق با قانون بیر-لامبرت صورت گرفت، این سنجش از واکنش MDA با TBA برای تولید ترکیب MDA-TBA صورتی رنگ استفاده می‌کند که حداکثر جذب آن در طول‌موج (۵۳۲) نانومتر و ضریب خاموشی مولی (EC) آن در ۱۵۵۰۰۰ M^{-1} cm^{-1} است. واحد محتوای مالون دی‌آلدئید به صورت میکرومول بر گرم وزن تازه بیان شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

سنجش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX): این آنزیم در مسیر سنتز جاسمونات نقش کلیدی دارد و یکی از شاخص‌های مهم پاسخ دفاعی به زخم محسوب می‌شود. اندازه‌گیری آنزیم LOX با روش Axelrod و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. این روش افزایش جذب در طول‌موج ۲۳٤ نانومتر را تعیین می‌کند که ناشی از تشکیل سیستم پیوند دوگانه مزدوج در هیدروپراکسید تشکیل شده است. برای این منظور ابتدا عصاره‌گیری انجام شد، ۰/۰۲۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون از قبل سرد شده با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۰/۸۱۹ میلی‌لیتر لینولئیک اسید و ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط و در طول‌موج ۲۳٤ نانومتر خوانده شد. از بافر فسفات به عنوان محلول بلانک استفاده شد. تعیین فعالیت آنزیم مطابق با قانون بیر-لامبرت صورت گرفت. که حداکثر جذب آن در طول‌موج (۲۳٤) نانومتر و ضریب خاموشی مولی (EC) هیدروپراکسید $M^{-1}\ cm^{-1}$ ۲۵۰۰۰ است. یک واحد (U) از فعالیت آنزیم به صورت افزایش ۰/۰۰۱ در جذب در طول‌موج ۲۳٤ نانومتر در دقیقه تعریف شد.

عصاره‌گیری برگ برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ۰/۱گرم از بافت برگ تازه در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH =۷/۸) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA آسیاب شد و سپس مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰۰۰ گرم در اتاق خنک (٤ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شد. محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با کاهش جذب H_2O_2 در ۲٤۰ نانومتر سنجیده شد (Aebi, 1984). یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز براساس سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه آب اکسیژنه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بیان گردید. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از رابطه زیر (EA) محاسبه شد:

$$EA = \{\Delta OD \times (1000/A) \times B\} / EC \times C$$

که در رابطه بالا EA: میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد (احیای یکی میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه) در گرم وزن تر برگ، ΔOD: مقدار قرائت‌شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، A: مقدار نمونه اضافه‌شده به کوت، B: مقدار بافر فسفات اضافه‌شده به نمونه جهت سائیدن (mL)، EC: ضریب خاموشی معادل ۰/۰۳۹ میکرومول بر سانتی‌متر،C: وزن بافت تر

فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX) با تشکیل تتراگایاکول در ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Lin and Kao, 1999). یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می‌شود تعریف شد. فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه ذکرشده در بالا (EA) محاسبه شد. ضریب خاموشی، ۲٦/٦ میلی‌مول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) جز اصلی چرخه آسکوربات–گلوتاتیون است و در برگ‌های تحت تنش زخم نقش مهمی دارد. کاهش آسکوربیک اسید در ۲۹۰ نانومتر ثبت شد (Nakano and Asada, 1987). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از رابطه ذکرشده در بالا (EA) محاسبه شد. ضریب خاموشی معادل ۲/۸ میکرومول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

آنزیم گلوتاتیون-S ترانسفراز (GST) مسئول کونژوگه‌کردن گلوتاتیون با سموم و متابولیت‌های اکسیداتیو است. واکنش با CDNB و اندازه‌گیری در ۳٤۰ نانومتر انجام شد (Carmagnol *et al.*, 1981). آنزیم گلوتاتیون-S ترانسفراز باعث انجام واکنش زیر می‌شود:

$$G - SH + CDNB \rightarrow G - CDNB\ conj + Hcl$$

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S ترانسفراز با استفاده از رابطه ذکرشده در بالا (EA) محاسبه شد. ضریب خاموشی معادل ۹/٦ میکرومول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با جلوگیری از تشکیل فورمازان آبی از NBT در حضور نور اندازه‌گیری شد (Beyer and Fridovich, 1987). افزایش در جذب به واسطه تشکیل فورمازان در طول‌موج ۵٦۰ نانومتر خوانده شد. طبق

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

شرایط توصیف‌شده افزایش در جذب در نمونه بدون عصاره آنزیمی معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم با تعیین درصد ممانعت در دقیقه محاسبه گردید. ۵۰ درصد ممانعت معادل با ۱ واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL): اندازه‌گیری آنزیم PAL به روش Morrison و همکاران (۱۹۹۴) انجام شد. ۰/۱ گرم بافت در بافر Tris-HCl با pH ۷/۶ حاوی PVP و β-mercaptoethanol هموژن شد. پس از اضافه‌کردن فنیل‌آلانین ۱۲ میلی‌مولار، نمونه‌ها ۶۰ دقیقه در ۳۰°C، انکوبه شدند. جذب در ۲۹۰ نانومتر ثبت و فعالیت PAL براساس ضریب خاموشی سینامیک اسید محاسبه شد. تعیین فعالیت PAL مطابق با قانون بیر–لامبرت صورت گرفت، ضریب خاموشی سینامیک اسید، ۱۷/۴ میلی‌مولار بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت آنزیم به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید ۱ میکروگرم سینامیک اسید در هر میلی‌لیتر مخلوط واکنش در ساعت تعریف شد (= ΔOD290 0.01/h).

بررسی ترکیبات فنولیک کل: استخراج با متانول ۸۰٪ انجام شد. پس از واکنش با معرف فولین– سیوکالتو و قرارگیری در تاریکی به‌مدت ۳۰ دقیقه، جذب در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (Singleton and Rossi, 1965). مقدار ترکیبات فنولیک کل در برگ‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید به دست آمد. نتایج براساس منحنی استاندارد گالیک اسید به صورت میکروگرم بر گرم وزن تازه بیان شدند.

سنجش رزمارینیک اسید: بخش‌های هوایی خشک و پودر شده بادرنجبویه با متانول (به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق) خیسانده شدند. پس از فیلتراسیون، حلال در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در خلاء تبخیر شد تا عصاره‌های متانول خام به دست آید. عصاره‌های غلیظ با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ مخلوط شده و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. میزان اسید رزمارینیک با روش Ozturk و همکاران (۲۰۱۰) تخمین زده شد. پس از رسم منحنی استاندارد رزمارینیک اسید (Sigma)، میزان این ترکیب در نمونه‌های مجهول براساس میکروگرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

آنالیز آماری: آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. شش حالت تیمار (شاهد (Ctrl)، محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار (SA1)، محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید ۱/۵ میلی‌مولار (SA1.5)، زخمی‌شدن (W)، زخمی‌شدن + محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید ۱/۵ میلی‌مولار (W+SA1.5)، محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید ۱/۵ میلی‌مولار + زخمی‌شدن (SA1.5+W) به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شد. آنالیز آماری داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SAS و با استفاده از آنالیز واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد. پس آزمون LSD، با میانگین خطای استاندارد (± SE) برای مقایسه معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر هورمون سالیسلیک اسید و زخمی‌شدن بر شاخص‌های رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی، وضعیت اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنولیک و RA در بادرنجبویه در جدول‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تأثیر زخمی‌شدن به تنهایی و همراه با هورمون سالیسیلیک اسید ۱/۵ میلی‌مولار و غلظت‌های مختلف هورمون سالسیلیک اسید بر تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های بادرنجبویه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود.

هر دو غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (SA) وزن تر و خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش دادند ($P < 0.05$). تیمار زخمی‌شدن (W) به‌تنهایی وزن تر و خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد کاهش داد. تیمار ترکیبی W+SA تغییر معناداری در وزن تر اندام هوایی ایجاد نکرد، اما وزن خشک را در مقایسه با تیمار زخمی‌شدن به تنهایی افزایش داد. در مقایسه با تیمار زخمی‌شدن به تنهایی، تیمار SA+W وزن تر اندام هوایی را کاهش داد، اما بر وزن خشک تأثیر معناداری نداشت (شکل ۱، A و B).

هر دو غلظت SA وزن تر و خشک ریشه را به‌طور معنادار نسبت به شاهد افزایش دادند. تیمار W وزن تر وخشک ریشه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر هورمون سالیسلیک اسید و زخمی‌شدن بر شاخص‌های رشد و رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های *M. officinalis*

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کلروفیل a/b	کاروتنوئید
تیمار	۵	۱۸/۹۰*	۷/۷۲*	۷/۷۰*	۷/٤۱*	۰/۰۲۵*	۰/۰٤٦*	۰/۰۵۰*	۰/۰۵۹*	۰/۰۱۰*
خطا	۱۲	۱/٤۱	۰/۲۳	۰/۲۷	۰/۰۳۳	۰/۰۰٤۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰٤۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰٤۳

*** بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.**

جدول ۲- تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر هورمون سالیسلیک اسید و زخمی‌شدن بر وضعیت اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنولیک و رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های *M. officinalis*

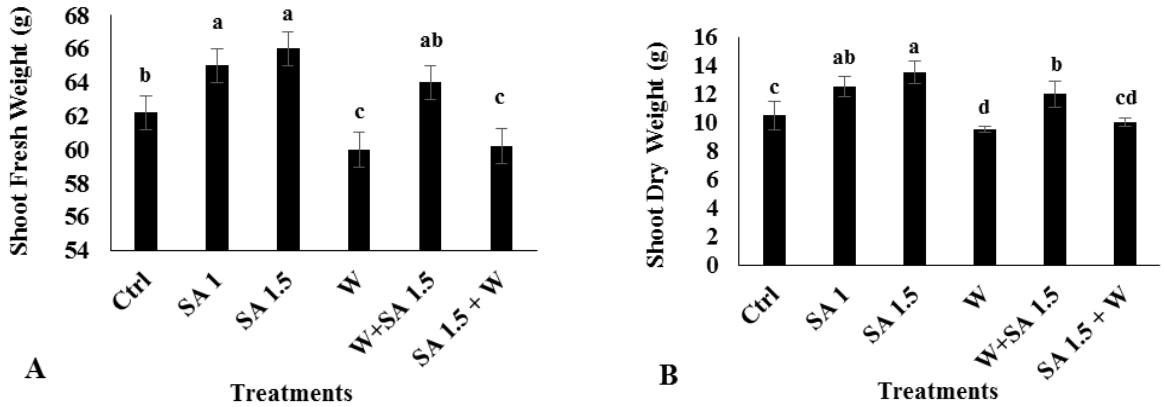
منابع تغییر	درجه آزادی	H_2O_2	MDA	LOX	CAT	GPX	APX	GST	SOD
تیمار	۵	۲۰۳٤۵۷/۲۲*	۲۲۹/۲۸*	۰/۰۰٤۷*	۱۸۱۹/۹۵*	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۵٦*	۱/۲۹*	۰/٤۷*
خطا	۱۲	۱۹۵۸/۹۷	۱۰/۵۵	۰/۰۰۰۰۲٤	۱/٦٤	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۷۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱

*** بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.**

جدول ۳- تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر هورمون سالیسلیک اسید و زخمی‌شدن بر فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنولیک و رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های *M. officinalis*

منابع تغییر	درجه آزادی	فنیل‌آلانین آمونیالیاز	ترکیبات فنولیک	رزمارینیک اسید
تیمار	۵	٥٤/٤٤*	۵۷۰۵۸٤/۱۱*	۱/۸٤*
خطا	۱۲	۰/۹۸	۱٦۷۸/٦۳	۰/۰٤

*** بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.**

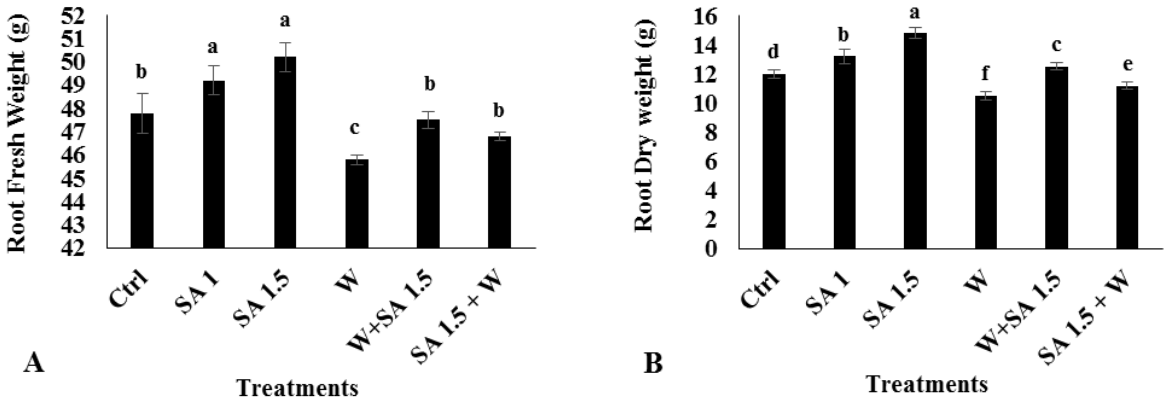


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسلیک اسید و زخمی‌شدن بر وزن تر (A) و وزن خشک (B) اندام هوایی در گیاهچه‌های *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

را نسبت به شاهد کاهش داد. تیمار W+SA تغییر معناداری در وزن تر ریشه ایجاد نکرد، اما وزن خشک ریشه را افزایش داد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر وزن تر (A) و وزن خشک (B) ریشه در گیاهچه‌های *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

تیمار SA+W تغییر معناداری در وزن تر ریشه نشان نداد، اما وزن خشک ریشه را کاهش داد (شکل ۲، A و B).

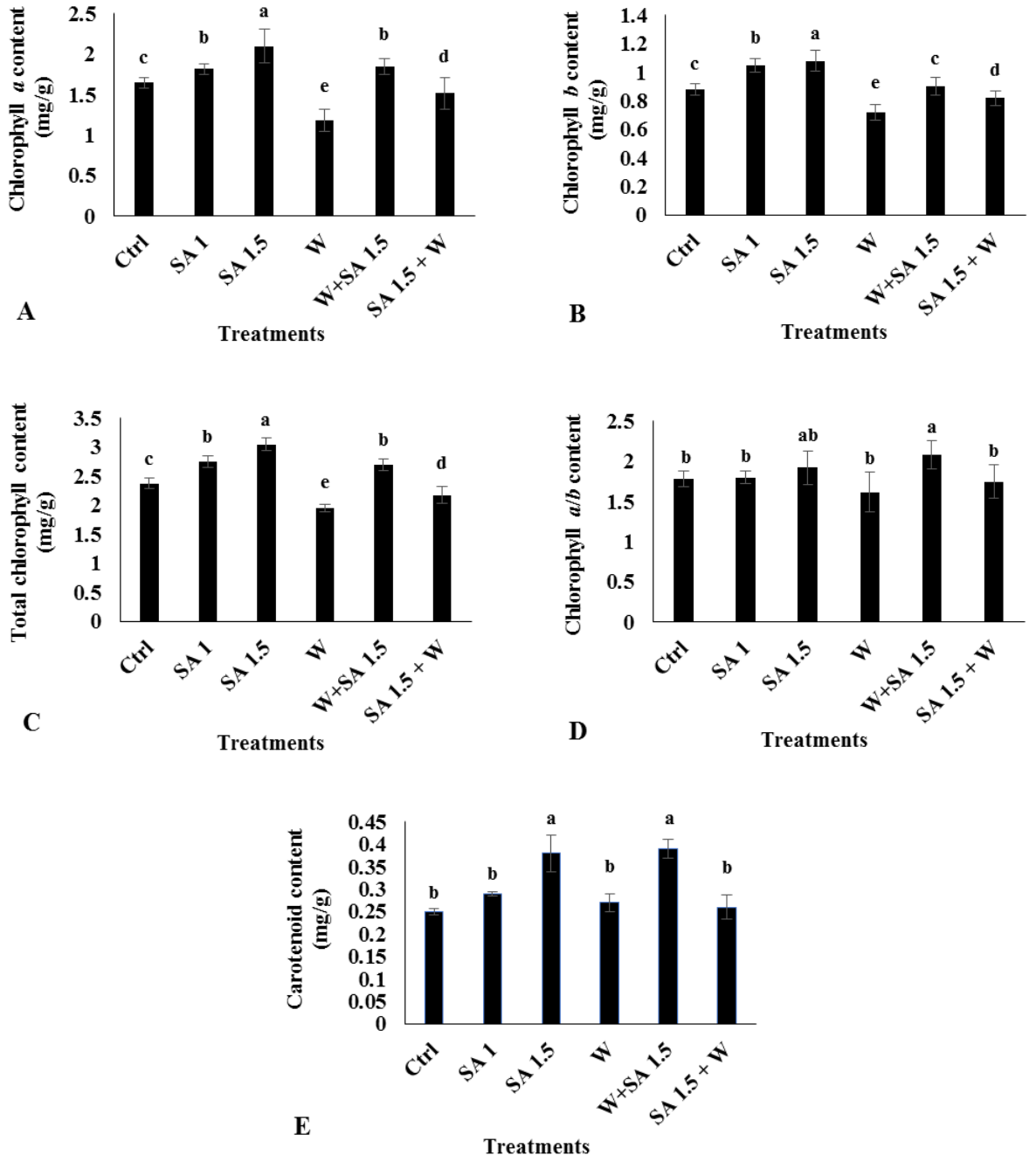
کاربرد SA در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار باعث افزایش معنادار کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل نسبت به شاهد شد، اما نسبت کلروفیل *a/b* تغییر معناداری نشان نداد. تیمار W بدون اینکه تأثیر معنادار بر نسبت کلروفیل *a/b* داشته باشد، محتوای کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل را نسبت به شاهد کاهش داد. تیمار W+SA کلروفیل *a* (۱/۲ برابر)، کلروفیل کل (۱/۲ برابر) و نسبت کلروفیل *a/b* (۱/۲ برابر) را افزایش داد، اما محتوای کلروفیل *b* تغییر نکرد. تیمار SA+W بدون تأثیر معنادار بر نسبت کلروفیل *a/b*، منجر به کاهش محتوای کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل به میزان ۹٪/۰ شد. غلظت ۱ میلی‌مولار SA بر کاروتنوئیدها تأثیر معناداری نداشت، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار آن را ۱/۵ برابر افزایش داد. تیمار W تغییری ایجاد نکرد. تیمار W+SA محتوای کاروتنوئیدها را ۱/٦ برابر افزایش داد، درحالی‌که محتوای کاروتنوئیدها در تیمار SA+W بدون تغییر بود (شکل ۳).

غلظت ۱ میلی‌مولار SA تغییر معناداری در محتوای H_2O_2 نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار محتوای آن را ۱/۲ برابر افزایش داد. تیمارهای W، W+SA و SA+W به‌ترتیب محتوای H_2O_2 را ۱/٤، ۱/٦ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ٤A). غلظت ۱ میلی‌مولار SA تغییر معناداری در پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار آن را ۱/۸ برابر افزایش داد. تیمار W افزایش معناداری نشان نداد. تیمارهای W+SA و SA+W به‌ترتیب پراکسیداسیون لیپیدی را ۲ و ۱/٤ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ٤B).

غلظت ۱ میلی‌مولار SA تغییر معناداری در فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار آن را چهار برابر افزایش داد. تیمارهای W، W+SA و SA+W به‌ترتیب فعالیت LOX را ۱/٤، ۱/۷ و ۱/۲ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ٤C).

تأثیر تیمارهای اعمال‌شده در این تحقیق بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون-S ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) معنادار بود. غلظت ۱ میلی‌مولار SA فعالیت آنزیم کاتالاز را ۱/۳ برابر افزایش داد، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار تغییر معناداری نداشت. تیمارهای W+SA و SA+Wمنجر به افزایش فعالیت این آنزیم (به ترتیب ۲/٦، ۲/۵ و ۳ برابر) در مقایسه با شاهد شدند. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت ۱ میلی‌مولار SA تغییر نداشت، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار منجر به افزایش ۲/۳ برابری فعالیت آنزیم شد. تیمارهای زخمی‌شدن، W+SA و SA+W منجر به افزایش فعالیت این آنزیم (به‌ترتیب ۳/۵، ۸/۳ و ۳ برابر) در مقایسه با شاهد شدند. فعالیت آنزیم APX در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش داشت، اما در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار

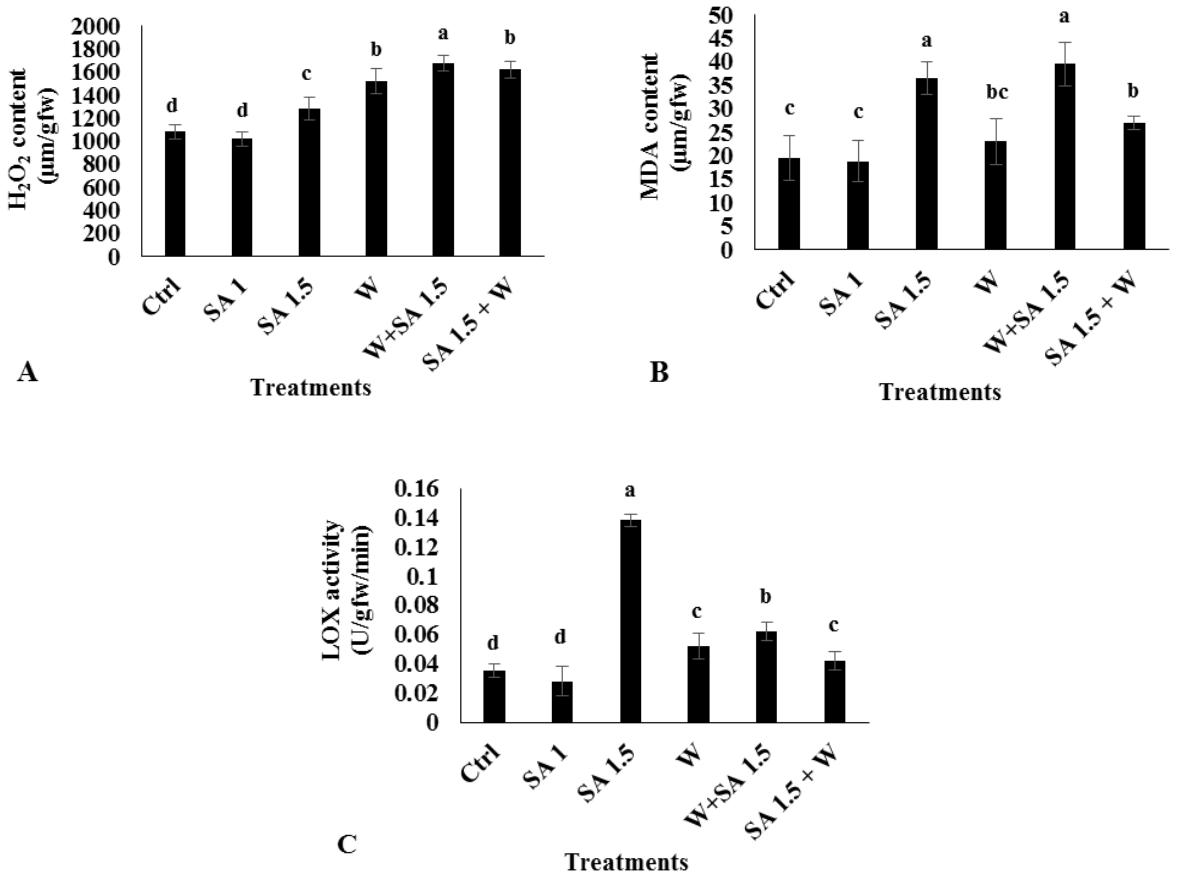
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر میزان کلروفیل *a* (A)، کلروفیل *b* (B)، کلروفیل کل (C)، نسبت کلروفیل *a/b* (D) و کاروتنوئید (E) در برگ‌های غیرزخمی *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

تغییری نداشت. تیمار زخمی‌شدن منجر به افزایش در فعالیت آنزیم شد؛ تیمارهای ترکیبی تغییر معناداری در فعالیت آنزیم نداشتند. هر دو غلظت SA تغییر معناداری در فعالیت آنزیم GST نداشتند. فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S ترانسفراز تحت تیمار زخمی‌شدن و W+SA به ترتیب ٦/٧ و ١/٨ برابر در مقایسه با شاهد افزایش یافت، درحالی‌که SA+W تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نشان نداد. فعالیت آنزیم SOD در غلظت ۱ میلی‌مولار تغییری نداشت، اما در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار ۱/۷

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر میزان H_2O_2 (A)، پراکسیداسیون لیپیدی (B) و فعالیت آنزیم LOX (C) در برگ‌های غیرزخمی *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

برابر افزایش یافت. در تیمارهای زخمی‌شدن و W+SA افزایش فعالیت این آنزیم (به ترتیب ۱/۳ و ۱/٤ برابر) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. تحت تیمار SA+W فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تغییر معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان نداد (شکل 5E).

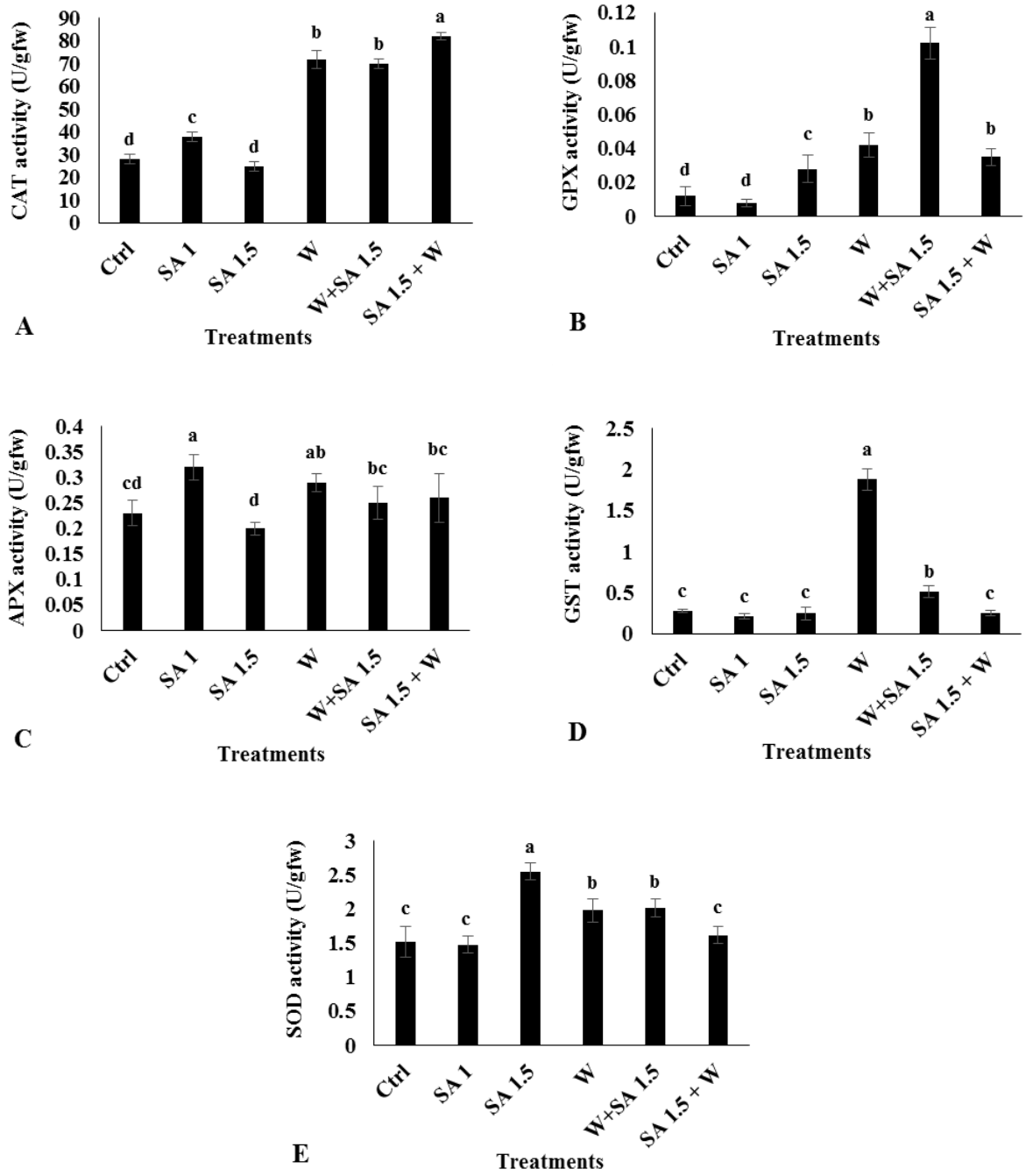
غلظت ۱ میلی‌مولار SA تغییر معناداری در فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما غلظت ۱/۵ میلی‌مولار آن را ۲/۲ برابر افزایش داد. تیمارهای W، W+SA و SA+W به‌ترتیب فعالیت PAL را ۲/۵، ۳/۰ و ۲/۳ برابر افزایش دادند (شکل ٦).

هر دو غلظت SA محتوای ترکیبات فنولیک را به‌ترتیب ۲ و ۲/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند. به‌طور مشابه افزایش ترکیبات فنولیک تحت تیمارهای W، W+SA و SA+W (به‌ترتیب ۲/۲۵، ۲/٦ و ۲/۱ برابر) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. هر دو غلظت SA محتوای اسید رزمارینیک (RA) را به‌ترتیب ٤/۳ و ۷/۳ برابر نسبت به شاهد افزایش دادند. میزان رزمارینیک اسید در تیمارهای W، W+SA و SA+W در مقایسه با شاهد ۳/۳، ۵/٦ و ۳ برابر افزایش یافت (شکل ۷، A و B).

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاربرد اگزوژن سالیسیلیک اسید (SA) در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار، به‌ویژه هنگامی که قبل از زخمی‌شدن اعمال شود، می‌تواند اثرات منفی تنش زخمی‌شدن مکانیکی را بر رشد، وضعیت اکسیداتیو و تولید متابولیت‌های ثانویه در بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تعدیل کند. این یافته‌ها با نقش شناخته‌شده SA به‌عنوان یک الیسیتور مؤثر در تقویت پاسخ‌های دفاعی و

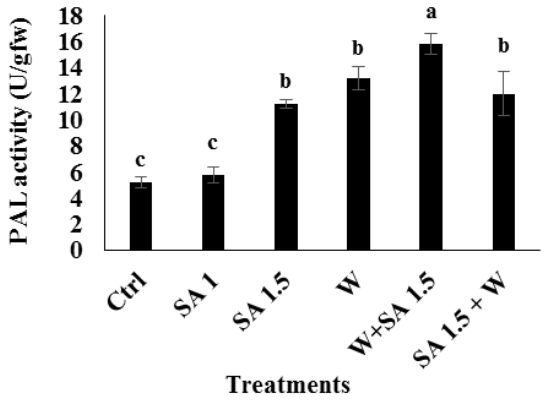
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]



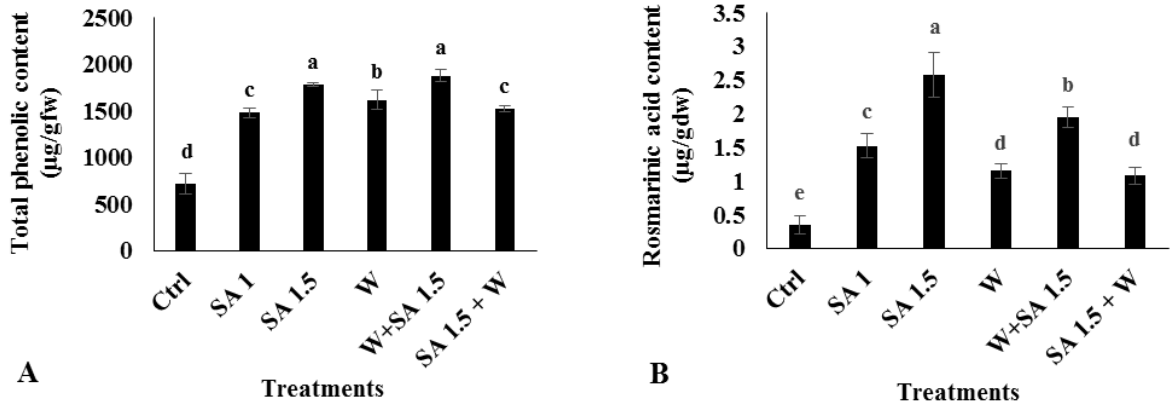
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (A)، گایاکول پراکسیداز (B)، آسکوربات پراکسیداز (C)، گلوتاتیون اس ترانسفراز (D) و سوپراکسید دیسموتاز (E) در برگ‌های غیرزخمی *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه همخوانی دارد (Ali, 2021; Khalil *et al.*, 2018). افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه تحت تیمارهای SA به‌تنهایی (شکل ۱ و ۲)، بیانگر نقش محرک رشد این هورمون است که احتمالاً از طریق تنظیم فرآیندهایی مانند فتوسنتز و جذب مواد مغذی رخ می‌دهد (Khan *et al.*, 2015). با این حال، زخمی‌شدن به‌تنهایی باعث کاهش معنادار بیوماس شد که می‌تواند ناشی از فعال‌سازی مسیرهای دفاعی انرژی‌بر و کاهش تخصیص کربن به رشد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]



شکل ٦- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در برگ‌های غیرزخمی *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید و زخمی‌شدن بر میزان ترکیبات فنولیک (A) و رزمارینیک اسید (B) در برگ‌های غیرزخمی *M. officinalis* (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

باشد (Leon *et al.*, 2001; Savatin *et al.*, 2014). تیمار ترکیبی SA قبل از زخمی‌شدن (SA+W) تا حد زیادی این کاهش را جبران کرد، درحالی‌که SA پس از زخمی‌شدن (W+SA) اثرات منفی بیشتری داشت. این تفاوت زمانی نشان‌دهنده نقش پرایمینگ SA در آماده‌سازی گیاه برای تنش است که با مفهوم "priming for enhanced defense" مطابقت دارد (Conrath *et al.*, 2015). پیش‌تیمار با SA قبل از ایجاد زخم، بیوماس ریشه را نیز به‌طور کامل بازیابی کرد، که نشان می‌دهد این هورمون نقش مهاری در تعدیل پاسخ‌های دفاعی پرهزینه ناشی از زخم وساطت شده با جاسمونات دارد (شکل ۱). اثرات محافظتی مشابه پیش‌تیمار SA تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف، از جمله خشکسالی، گزارش شده است (Saruhan *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2024). در سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش کلروفیل و کاروتنوئیدها تحت تیمار SA و به‌ویژه در تیمار W+SA (شکل ۳)، برخلاف کاهش معمول تحت تنش‌های شدید، بیانگر تقویت ماشین‌آلات فتوسنتزی و حفاظت نوری است (Khalil *et al.*, 2018). کاروتنوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، در خاموش‌کردن انرژی اضافی و جلوگیری از تخریب رنگدانه‌ها تحت نور شدید نقش دارند، که این یافته با گزارش‌های مشابه در Lamiaceae تحت تنش سازگار است (Jakovljevic *et al.*, 2025). افزایش محتوای H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) تحت زخمی‌شدن و تیمارهای ترکیبی (شکل ٤)، تأییدکننده تولید ROS به‌عنوان پیام‌رسان اولیه در سیگنالینگ

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

زخم است (Savatin *et al.*, 2014). اگرچه اغلب گزارش شده است که SA با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، MDA را تحت تنش‌های غیرزیستی، مانند خشکسالی یا شوری، کاهش می‌دهد (Habibi, 2012; Shan *et al.*, 2024)، اما به نظر می‌رسد کاربرد آن بلافاصله پس از آسیب مکانیکی، به جای کاهش آسیب اکسیداتیو، آن را تقویت می‌کند، احتمالاً برای حفظ سطوح بالاتر سیگنال‌های مشتق از لیپید مورد نیاز برای پاسخ‌های دفاعی موضعی و سیستمیک قوی. با این حال، تیمار SA قبل از زخمی‌شدن شدت این افزایش را تعدیل کرد که می‌تواند ناشی از مهار مسیر جاسمونیک اسید توسط SA و تعادل بهتر ROS باشد (Caarls *et al.*, 2015; Hou and Tsuda, 2022). آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) نقش محوری در مسیر اکتادکانوئید ایفا می‌کند و بیوسنتز جاسمونات را از اسیدهای چرب غیراشباع مشتق‌شده از غشاء آغاز می‌کند (Creelman and Mullet, 1997; Wasternack and Feussner, 2018). افزایش فعالیت آنزیم LOX تحت غلظت بالاتر SA و تیمارهای زخمی (شکل ٤C)، با نقش LOX در پاسخ به زخم همخوانی دارد (Yan *et al.*, 2013). این اثر هم‌افزایی احتمالاً ناشی از تداخل بین مسیرهای SA و JA است: درحالی‌که ایجاد زخم، شاخه وابسته به JA از مسیر اکتادکانوئید را به شدت فعال می‌کند، اعمال SA پس از ایجاد زخم، فعالیت LOX را بیشتر تقویت می‌کند، احتمالاً از طریق مکانیسم‌های مستقل از NPR1 (Non Expresser of Pathogenesis Related 1) یا آنتاگونیسم جزئی که در نهایت تولید JA را تحت تنش مکانیکی تقویت می‌کند (Kazemi *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2018).

پاسخ‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی به شدت تنش وابسته بود (شکل ٥): افزایش اولیه CAT، APX و SOD تحت غلظت پایین‌تر SA و تیمارهای ترکیبی، نشان‌دهنده تقویت سیستم دفاعی آنزیمی است (Khan *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2023). افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم‌های GPX و GST تحت تیمار W+SA، بیانگر شیفت به سمت پاکروبی فنولیک- وابسته ROS است که در گیاهان دارویی Lamiaceae رایج است (Khalil *et al.*, 2018). این الگو با نقش SA در تعدیل HSPها و چاپرون‌ها برای حفاظت پروتئینی نیز سازگار است (Snyman and Cronje, 2008). مهم‌ترین یافته این پژوهش، افزایش شدید فعالیت PAL (تا ۳ برابر در تیمار W+SA در مقایسه با شاهد) (شکل ٦) و تجمع RA و ترکیبات فنولیک (به ترتیب تا ۷/۳ برابر تحت SA و ۲/٦ برابر در W+SA در مقایسه با شاهد) (شکل ۷) بود. PAL به‌عنوان دروازه ورود به مسیر فنیل‌پروپانوئید، تحت تیمارهای SA و زخمی‌شدن القا می‌شود و مستقیماً تولید RA را افزایش می‌دهد (Ejtahed *et al.*, 2015; Jakovljevic *et al.*, 2025). Ejtahed و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که میزان رزمارینیک اسید توسط محلول‌پاشی هورمون SA روی برگ‌های *Salvia officinalis* و *S. virgata* افزایش یافته بود، و بیشترین میزان رزمارنیک اسید در *S. officinalis* در غلظت (۲۵۰ میکرومولار) و در *S. virgata* در غلظت (۵۰۰ میکرومولار) مشاهده شد. افزایش چشمگیر RA در این تحقیق، که یکی از بالاترین گزارش‌ها در Lamiaceae است، که با نقش SA به‌عنوان الیسیتور قوی متابولیت‌های ثانویه مطابقت دارد (Ali, 2021; Mosavi and Shabani, 2019). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد برون‌زا اسید سالیسیلیک و متیل سالیسیلات می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی شامل PAL را در تنباکو (Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998)، گوجه‌فرنگی (Ding *et al.*, 2002)، جعفری (Thulke and Conrath, 1998) القاء کنند. Vimala و Suriachandraselvan (۲۰۰۹) نشان دادند که محلول‌پاشی گیاه *Abelmoschus esculentus* با هورمون SA (۱ میلی‌مولار) باعث افزایش تدریجی فعالیت آنزیم PAL و رسیدن به حداکثر میزان فعالیت در روز پنجم از شروع تیمار گردیده بود و در روز ششم و هفتم پس از تیمار فعالیت این آنزیم کاهش داشته است ولی همچنان نسبت به شاهد میزان فعالیتش بیشتر بوده است. Chandra و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که محلول-پاشی هورمون SA (۱/٤ میلی‌مولار) روی چهار ژنوتیپ گیاه Cowpea، باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL (دو روز پس از اعمال SA) در ژنوتیپ‌های IFC-902، Bundel-1 و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

UPC-4200 بوده است ولی فعالیت این آنزیم را در ژنوتیپ IGFRI-95 کاهش داده بود. همچنین گزارش شده است که محلول‌پاشی کاهو توسط هورمون SA (۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL در غلظت ۱ میلی‌مولار شده است ولی غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تأثیری بر فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد نداشته است (Campos-Vargas and Saltveit, 2002). در مجموع، کاربرد SA قبل از زخمی‌شدن (پرایمینگ) بهترین عملکرد را در کاهش اثرات منفی تنش، تعدیل استرس اکسیداتیو و بهینه‌سازی تولید RA نشان داد. این نتایج نه تنها مکانیسم‌های تعامل SA و سیگنالینگ زخم را در *M. officinalis* روشن می‌سازد، بلکه کاربرد عملی برای افزایش تولید متابولیت‌های دارویی ارزشمند در شرایط تنش را پیشنهاد می‌کند (Khalil *et al.*, 2018; Stasinska-Jakubas *et al.*, 2023). مطالعات آینده می‌توانند بر تحلیل بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید و نقش NPR1 در این تعامل تمرکز کنند (Lai *et al.*, 2018).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد اگزوژن سالیسیلیک اسید (SA)، به‌ویژه در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار و هنگام اعمال قبل از زخمی‌شدن مکانیکی (پرایمینگ)، می‌تواند اثرات منفی تنش زخمی را بر رشد، وضعیت اکسیداتیو و رنگدانه‌های فتوسنتزی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) به‌طور مؤثری تعدیل کند. تیمار SA نه تنها رشد بیوماس اندام هوایی و ریشه را افزایش داد، بلکه محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئیدها) را حفظ و تقویت کرد که بیانگر نقش محافظتی این هورمون در پایداری فرآیندهای فتوسنتزی است. از سوی دیگر، زخمی‌شدن به‌تنهایی باعث افزایش استرس اکسیداتیو (بالارفتن مقدار H_2O_2، MDA و فعالیت آنزیم LOX) و فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (CAT، GPX، APX، GST و SOD) شد، اما کاربرد SA قبل از زخمی‌شدن این پاسخ‌ها را بهینه کرد و شیفت به سمت دفاع غیرآنزیمی (وابسته به فنولیک) را تسهیل نمود. برجسته‌ترین یافته، القای شدید فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و افزایش چشمگیر محتوای ترکیبات فنولیک و اسید رزمارینیک در تیمار ترکیبی بود که مستقیماً با نقش SA به‌عنوان الیسیتور قوی مسیر فنیل‌پروپانوئید همخوانی دارد. در نهایت، پرایمینگ با SA قبل از زخمی‌شدن بهترین استراتژی برای کاهش خسارت تنش و بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مانند RA در بادرنجبویه است. این نتایج نه تنها مکانیسم‌های تعامل SA و سیگنالینگ زخم را در این گیاه دارویی روشن می‌سازد، بلکه کاربرد عملی برای بهبود کشت صنعتی و افزایش تولید ترکیبات دارویی در شرایط تنش‌دار فراهم می‌کند. پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده بر تحلیل بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز RA و نقش دقیق NPR1 در این تعامل تمرکز کنند تا راهکارهای بیوتکنولوژیکی مؤثرتری توسعه یابد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد گرنت شماره (96GRN1M1032) انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121-126.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, *24*(12), 1337-1344. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

Ali, B. (2021). Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *31*, 101884. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*(1), 1. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., & Laakso, S. (1981). Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13. 11.12 Linoleate: Oxygen oxidoreductase. *Methods in Enzymology*, *71*, 441-451). https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)71055-3

Beyer Jr, W. F, & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, *161*(2), 559-566. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1

Caarls, L., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 170. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00170

Campos-Vargas, R, & Saltveit, M. E. (2002). Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiologia Plantarum*, *114*(1), 73-84. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140111.x

Carmagnol, F. O., Sinet, P. M., Rapin, J., & Jerome, H. (1981). Glutathione-S-transferase of human red blood cells; assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: Hyperbilirubinemia and impaired renal function. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *117*(2), 209-217. https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90040-1

Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A., & Saxena, P. (2007). Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, *29*(4), 361-367. https://doi.org/10.1007/s11738-007-0045-2

Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, *53*(1), 97-119. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132

Creelman, R. A, & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *48*(1), 355-381. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355

Ding, C. K., Wang, C., Gross, K. C., & Smith, D. L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, *214*(6), 895-901. https://doi.org/10.1007/s00425-001-0698-9

Ejtahed, R. S., Radjabian, T., & Hoseini Tafreshi, S. A. (2015). Expression analysis of phenylalanine ammonia lyase gene and rosmarinic acid production in *Salvia officinalis* and *Salvia virgata* shoots under salicylic acid elicitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *176*(7), 1846-1858. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1682-3

Ertan, T., Soran, A., Kocer, B., & Cengiz, O. (2002). Oxidative stress in hemorrhagic shock: Prospective clinical study. *Nagoya Medical Journal*, *45*(2), 43-54.

Fang, X., Xie, Y., Yuan, Y., Long, Q., Zhang, L., Abid, G., & Zhang, W. (2025). The role of salicylic acid in plant defense responses against biotic stresses. *Plant Hormones*, *1*(1). https://doi.org/10.48130/ph-0025-0003

Fraissinet Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B., & Saindrenan, P. (1998). Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Letters*, *437*(3), 319-323. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01257-5

Habibi, G. (2012). Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. *Acta Biologica Szegediensis*, *56*(1), 57-63.

Hou, S, & Tsuda, K. (2022). Salicylic acid and jasmonic acid crosstalk in plant immunity. *Essays in Biochemistry*, *66*(5), 647-656. https://doi.org/10.1042/EBC20210090

Jakovljevic, D., Warchol, M., & Skrzypek, E. (2025). Rosmarinic acid as bioactive compound: molecular and physiological aspects of biosynthesis with future perspectives. *Cells*, *14*(11), 850. https://doi.org/10.3390/cells14110850

Kazemi, N., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Saadatmand, S., & Nejad-Sattari, T. (2010). Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticulturae*, *126*(3), 402-407. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.037

Khalil, N., Fekry, M., Bishr, M., El-Zalabani, S., & Salama, O. (2018). Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *123*, 65-74. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.007

Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 462. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462

Lai, Y. S., Renna, L., Yarema, J., Ruberti, C., He, S. Y., & Brandizzi, F. (2018). Salicylic acid-independent role of NPR1 is required for protection from proteotoxic stress in the plant endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(22), E5203-E5212. https://doi.org/10.1073/pnas.1802254115

Leon, J., Rojo, E., & Sanchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, *52*(354), 1-9. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.1

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology, 148*, 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Lin, C. C, & Kao, C. H. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil, 216*, 147-153. https://doi.org/10.1023/A:1004714506156

Mohamed, H. I., El-Shazly, H. H., & Badr, A. (2020). Plant Phenolics in Sustainable Agriculture. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_23

Morrison, T. A., Kessler, J. R., Hatfield, R. D., & Buxton, D. R. (1994). Activity of two lignin biosynthesis enzymes during development of a maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *65*(2), 133-139. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650202

Mosavi, S. M, & Shabani, L. (2019). Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA. *Biologia Plantarum*, 10.32615/bp.2019.057. https://doi.org/10.32615/bp.2019.057

Nakano, Y, & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, *28*(1), 131-140. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268

Ozturk, M., Duru, M. E., Ince, B., Harmandar, M., & Topçu, G. (2010). A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chemistry*, *123*(4), 1352-1356. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.021

Rai, K. K., Pandey, N., Rai, N., Rai, S. K., & Pandey-Rai, S. (2021). Salicylic acid and nitric oxide: Insight into the transcriptional regulation of their metabolism and regulatory functions in plants. *Frontiers in Agronomy*, *3*, 781027. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.781027

Saruhan, N., Saglam, A., & Kadioglu, A. (2012). Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, *34*(1), 97-106. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0808-7

Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., & Cervone, F. (2014). Wounding in the plant tissue: The defense of a dangerous passage. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 470. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00470

Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, *188*, 204-228. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010

Shan, L., Xu, Y., Wu, D., Hu, J., Yu, T., Dang, C., Fang, Y., Zhang, X., Tian, Q., & Xue, D. (2024). Effects of salicylic acid on growth, physiology, and gene expression in rice seedlings under salt and drought stress. *Plant Stress*, *11*, 100413. https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100413

Singleton, V. L, & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Snyman, M, & Cronje, M. (2008). Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany*, *59*(8), 2125-2132. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144

Song, W., Shao, H., Zheng, A., Zhao, L., & Xu, Y. (2023). Advances in roles of salicylic acid in plant tolerance responses to biotic and abiotic stresses. *Plants*, *12*(19), 3475. https://doi.org/10.3390/plants12193475

Stasinska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Wojciak, M., & Rubinowska, K. (2023). Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, *205*, 117571.

Thulke, O, & Conrath, U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal*, *14*(1), 35-42. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00093.x

Vimala, R, & Suriachandraselvan, M. (2009). Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. *Journal of Biopesticides*, *2*(1), 111-114. https://doi.org/10.57182/jbiopestic.2.1.111-114

Wasternack, C, & Feussner, I. (2018). The oxylipin pathways: Biochemistry and function. *Annual Review of Plant Biology*, *69*(1), 363-386. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040440

Weitzel, C, & Petersen, M. (2010). Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medicinal plant *Melissa officinalis* L. *Planta*, *232*(3), 731-742. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1206-x

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

Study of the effect of salicylic acid application before and after wounding on growth, antioxidant defense, and rosmarinic acid production in *Melissa officinalis*

Elham Sadat Abbasi[1], Leila Shabani[*1], Somayeh Reiisi[2], Neda Mirakhorli[3]

[1] Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

In this study, the effects of exogenous salicylic acid (SA) application at concentrations of 1 and 1.5 mM, alone and in combination with mechanical wounding stress (applied before and after wounding), on growth, photosynthetic pigments, oxidative status, antioxidant enzyme activities, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and the content of phenolic compounds and rosmarinic acid (RA) in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) were investigated. The results revealed that SA alone enhanced shoot and root biomass and increased chlorophyll and carotenoid contents. Wounding alone reduced biomass, elevated H_2O_2 levels, lipid peroxidation (MDA), and lipoxygenase (LOX) activity; however, SA priming (before wounding) significantly mitigated these negative effects. Antioxidant enzyme activities (CAT, GPX, APX, GST, and SOD) increased in an intensity-dependent manner, with a shift toward non-enzymatic defense observed. The most important finding was the strong induction of PAL enzyme activity (3-fold) and a significant increase in the content of phenolic compounds (2.6-fold) and RA (5.6-fold) in the combined W+SA treatment compared to the control. Overall, SA priming before wounding proved the most effective strategy for alleviating stress damage and maximizing RA production as a valuable secondary metabolite. These findings elucidate the mechanisms of SA-wounding signaling interactions in this medicinal plant and offer practical applications for enhancing pharmaceutical compound production under stress conditions.

Keywords: Priming, Wound signaling, Secondary metabolites, *Melissa officinalis*, Salicylic acid

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.22034/15.72.157]

Received: Dec. 18, 2025; Revised: Jan. 07, 2026; Accepted: Feb. 03, 2026; Published Online: June. 02, 2026
*Corresponding Author: lshabani@gmail.com

Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.