



## Effects of Chitosan Nanoparticle-Coated NPK on Growth and Secondary Metabolites of Grapefruit Mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*) under Water Stress Conditions

Mohammad Haghaninia<sup>1</sup> | Abdollah Javanmard<sup>2✉</sup>

1. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

2. Corresponding Author, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.  
Email: [a.javanmard@maragheh.ac.ir](mailto:a.javanmard@maragheh.ac.ir)

### Article Info

#### Article type:

Research Article

#### Article history:

Received: January 18, 2025

Received in revised form:

February 26, 2025

Accepted: March 05, 2025

Published online: September 23, 2025

### Extended Abstract

**Introduction.** Grapefruit mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*) is a medicinal plant of considerable value, renowned for its wide-ranging therapeutic properties, and is utilized in various industries, including food, pharmaceuticals, and cosmetics. However, optimizing the cultivation of this plant under diverse environmental conditions, particularly water stress, remains an area requiring further investigation. Concurrently, modern technologies such as the use of nanoparticles for fertilizer coating have emerged as promising strategies to enhance plant tolerance to environmental stressors and improve agricultural product quality. One such innovation is the use of chitosan-coated NPK nanoparticles, which has the potential to significantly influence plant growth and secondary metabolite production. This study aims to evaluate the effects of chitosan-coated NPK nanoparticles on the growth, physiological characteristics, and secondary metabolite production in grapefruit mint under varying water stress conditions.

**Materials and Methods.** The present study was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) in a greenhouse in 2024. The experimental factors consisted of three levels of water stress (full irrigation at 90% field capacity, moderate water stress at 60% field capacity, and severe water stress at 30% field capacity) and four fertilization treatments (control, complete chemical fertilizer (NPK), chitosan nanoparticles, and chitosan-coated NPK nanoparticles). The evaluated parameters included plant height, chlorophyll *a* and *b* content, dry matter yield, anthocyanin content, ascorbic acid, carotenoid content, essential oil content, and essential oil yield. Additionally, antioxidant enzyme activities, including peroxidase, catalase, and guaiacol peroxidase, as well as malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) levels, were assessed to evaluate oxidative damage.

**Results and Discussion.** The results indicated that water stress, particularly under severe conditions, significantly impaired plant growth and physiological functions of grapefruit mint. Plants subjected to severe water stress exhibited notable reductions in plant height, chlorophyll *a* and *b* content, and dry matter yield. These reductions are attributed to a decrease in photosynthetic efficiency and limited water and nutrient uptake due to the imposed water scarcity. However, application of chitosan-coated NPK nanoparticles under non-stressed conditions led to substantial improvements in these traits, likely due to the nanoparticles' ability to facilitate nutrient absorption and enhance nutrient transport within the plant, thereby improving photosynthetic efficiency and overall growth. Under moderate water stress, chitosan-coated NPK nanoparticles demonstrated significant mitigation of the negative effects of stress, particularly enhancing anthocyanin and ascorbic acid concentrations, which suggests the activation of the plant's defense mechanisms against oxidative stress. Both anthocyanins and ascorbic acid are known antioxidant compounds that plants produce in response to environmental stresses to reduce oxidative damage and to prevent cellular degradation. Furthermore, under moderate stress conditions, an increase in carotenoid levels and antioxidant enzyme activities, including peroxidase, catalase, and guaiacol peroxidase, was observed. These enzymes play a crucial role in scavenging reactive oxygen species and protecting plant cells from oxidative damage. In the case of severe water stress, the chitosan-coated NPK nanoparticles treatment significantly reduced the levels of MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, two key indicators of oxidative damage. The reductions of 62.3% in MDA and 76.2% in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in this treatment under severe stress conditions demonstrate the potential of this fertilizer to alleviate oxidative damage and enhance plant tolerance to water stress. Additionally, the treatment increased both the essential oil content and yield, with a 314.2% increase in essential oil content and a 332.4% increase in oil yield compared to control treatments under severe stress. These results highlight the potential of chitosan-coated NPK nanoparticles to enhance secondary metabolite production, such as essential oils, which serve as a plant's response to environmental stress. The enhancement in the quality of the essential oil was particularly notable, with the highest concentrations of key compounds such as linalyl acetate, geranyl acetate, and 1,8-cineole found under moderate water stress. These compounds are primarily responsible for the plant's aromatic and medicinal properties, and their increased levels could significantly elevate the plant's value in various industries. Moreover, under non-stressed conditions, the highest concentration of linalool, a principal compound in the essential oil, was observed in plants treated with chitosan-coated NPK nanoparticles.

**Conclusion.** The application of chitosan-coated NPK nanoparticles substantially improved plant growth and secondary metabolite production in grapefruit mint under water stress conditions. This treatment, particularly under moderate and severe water stress, significantly mitigated oxidative damage, enhanced antioxidant enzyme activity, and improved both the quality and quantity of essential oil production. The incorporation of chitosan-coated nanoparticles in agricultural practices presents a viable and sustainable solution to enhance plant resilience to environmental stresses and improve the quality of agricultural products. These findings suggest that this innovative technology could play a pivotal role in improving agricultural productivity and quality, particularly in the face of climate change and environmental challenges.

#### Keywords:

Abiotic stresses,  
anthocyanin,  
essential oil,  
food security,  
nanoparticles,  
sustainable agriculture.

**Cite this article:** Haghaninia, M., & Javanmard, A. (2025). Effects of chitosan nanoparticle-coated NPK on growth and secondary metabolites of grapefruit mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*) under water stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 56(3), 33-52. Doi: 10.22059/ijfcs.2025.388249.655122.





انتشارات دانشگاه تهران

علوم گیاهان زراعی ایران

شماره الکترونیکی: ۸۰۸۲-۲۴۲۳

Homepage: <https://ijfcs.ut.ac.ir/>

## اثر NPK پوشش‌دار با نانوذرات کیتوزان بر رشد و متابولیت‌های ثانویه نعناع گریپ‌فروتی (*Mentha suaveolens* × *piperita*) در شرایط کم‌آبیاری

محمد حقانی‌نیا<sup>۱</sup> | عبدالله جوانمرد<sup>۲</sup>✉

۱. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایانامه: [a.javanmard@maragheh.ac.ir](mailto:a.javanmard@maragheh.ac.ir)

| اطلاعات مقاله                                                                                                                                                                                                                                                                                             | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>نوع مقاله:</b> مقاله پژوهشی</p> <p><b>تاریخ دریافت:</b> ۱۴۰۳/۱۰/۲۹</p> <p><b>تاریخ بازنگری:</b> ۱۴۰۳/۱۲/۰۸</p> <p><b>تاریخ پذیرش:</b> ۱۴۰۳/۱۲/۱۵</p> <p><b>تاریخ انتشار:</b> ۱۴۰۴/۰۷/۰۱</p> <p><b>کلیدواژه‌ها:</b><br/>اسانس، امنیت غذایی، آنتوسیانین، تنش‌های محیطی، کشاورزی پایدار، نانوذرات.</p> | <p>نعناع گریپ‌فروتی (<i>Mentha suaveolens</i> × <i>piperita</i>) به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند با کاربردهای گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر فناوری‌های نوین مانند کودهای پوشش‌دار شده با نانوذرات، به‌عنوان راهکاری مؤثر برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی و بهبود کیفیت محصول مطرح شده است. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان بر رشد و متابولیت‌های ثانویه نعناع گریپ‌فروتی تحت شرایط تنش کم‌آبی انجام شد. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح تنش آبی (آبیاری کامل با ۹۰ درصد ظرفیت زراعی، تنش آبی متوسط با ۶۰ درصد ظرفیت زراعی و تنش آبی شدید با ۳۰ درصد ظرفیت زراعی) و چهار تیمار کودی (شاهد، کود شیمیایی کامل (NPK)، نانوذرات کیتوزان و NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان) در سال ۱۴۰۳ اجرا شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی تأثیرات منفی بر صفات فیزیولوژیک و رشدی این گیاه داشت. با این وجود، کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط بدون تنش، موجب افزایش کلروفیل <i>a</i>، کلروفیل <i>b</i>، ارتفاع بوته و ماده خشک نسبت به شاهد شد. این تیمار علاوه بر بهبود محتوای آنتوسیانین و اسیدآسکوربیک، در شرایط تنش متوسط نیز موجب افزایش قابل توجهی در محتوای کاروتنوئیدها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز شد. همچنین، در شرایط بدون تنش، این کود باعث کاهش ۶۲/۳ درصدی در میزان مالون‌دی‌آلدهید و ۷۶/۲ درصدی در پراکسید هیدروژن نسبت به تیمارهای بدون کود تحت تنش شدید شد. علاوه‌براین، کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط تنش متوسط میزان اسانس را ۳۱۴/۲ درصد در مقایسه با تیمار بدون کود در شرایط تنش شدید افزایش داد. این تیمار بالاترین مقادیر ترکیبات اصلی اسانس شامل لینالیل‌استات، ژرانیل-استات و ۱،۸-سینئول را در شرایط تنش متوسط و بیشترین میزان لینالول را در شرایط بدون تنش تولید کرد. به‌طور کلی، کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان با افزایش ماده خشک گیاه و بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه، نه تنها به حفظ سلامت گیاه کمک می‌کند، بلکه به دلیل استفاده از مواد طبیعی و زیست‌تخریب‌پذیر، می‌تواند به‌عنوان راهکاری پایدار و سازگار با محیط زیست در کشاورزی مدرن معرفی شود.</p> |

**استناد:** حقانی‌نیا، م. و جوانمرد، ع. (۱۴۰۴). اثر NPK پوشش‌دار با نانوذرات کیتوزان بر رشد و متابولیت‌های ثانویه نعناع گریپ‌فروتی (*Mentha suaveolens* × *piperita*) در شرایط کم‌آبیاری. علوم گیاهان زراعی ایران، ۵۶(۳)، ۳۳-۵۲.  
DOI: 10.22059/ijfcs.2025.388249.655122



© نویسندگان

ناشر: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## ۱. مقدمه

گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع طبیعی ارزشمند، نقش مهمی در تأمین نیازهای دارویی، غذایی و صنعتی ایفا می‌کنند (Aslani et al., 2023). این گیاهان به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی مانند اسانس‌ها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها، در صنایع مختلف از جمله داروسازی، آرایشی-بهداشتی و غذایی کاربرد گسترده‌ای دارند (Haghaninia et al., 2024c; Mumivand et al., 2021). همچنین، رشد روزافزون تقاضا برای محصولات گیاهی و طبیعی، اهمیت کشت و تولید پایدار گیاهان دارویی را دوچندان کرده است (Soltanbeigi et al., 2021).

نعناع گریپ‌فروتی (*Mentha suaveolens* × *piperita*) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است که به دلیل عطر و طعم منحصر به فرد و خواص درمانی متنوع، در صنایع دارویی، غذایی و عطرسازی کاربرد دارد (Jahanafrooz et al., 2024; Zhang et al., 2022). اسانس این گیاه که غنی از ترکیبات معطری مانند منتول، لینالیل استات و لینالول است، به‌عنوان یک ماده مؤثر با خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شود (Ludwiczuk et al., 2016; Ahmadi et al., 2022). این ویژگی‌ها، نعنای گریپ‌فروتی را به یکی از گیاهان با پتانسیل بالا در بهبود سلامت انسان تبدیل کرده است (De Sousa Barros et al., 2015). همچنین، این گیاه در تنظیم تنش‌های فیزیولوژیک، بهبود فرآیند گوارش و ایجاد آرامش نقش مؤثری دارد (Wang et al., 2016; Ahmadi et al., 2022). علی‌رغم اهمیت اقتصادی و دارویی این گیاه، سطح زیر کشت آن در ایران بسیار محدود بوده و تحقیقات اندکی در زمینه تولید و مدیریت این گیاه انجام شده است. با توجه به افزایش تقاضا برای محصولات طبیعی و دارویی در کشور، توسعه پژوهش‌هایی که بر بهبود عملکرد و کیفیت نعنای گریپ‌فروتی در شرایط محیطی نامطلوب نظیر خشکی متمرکز باشند، امری ضروری است (Akbarzadeh et al., 2023). این امر به‌ویژه در شرایطی که تنش‌های زیستی و غیر زیستی مانند خشکی می‌توانند به‌طور قابل توجهی بر تولید و کیفیت گیاهان دارویی تأثیر بگذارند، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Aslani et al., 2023).

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که در مناطق خشک و نیمه‌خشک به یکی از عوامل محدودکننده تولید کشاورزی تبدیل شده است (Haghaninia et al., 2024a). در این شرایط، گیاهان به دلیل کمبود آب، مجبور به کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز و رشد می‌شوند (Amir et al., 2021). همچنین، خشکی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده که می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو، تخریب سلولی و در نهایت کاهش عملکرد ماده خشک گردد (Asghari et al., 2023; Bayati et al., 2020). در پاسخ به خشکی، گیاهان تولید آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش می‌دهند تا رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند (Babaei et al., 2021). در این راستا، تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که تنش خشکی اثرات منفی قابل توجهی بر عملکرد، کیفیت و صفات فیزیولوژیکی گیاهان دارویی دارد. به‌عنوان مثال، محققان با ارزیابی تأثیر تنش خشکی بر گیاه نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) گزارش کردند که خشکی باعث کاهش رشد، وزن تر، تعداد برگ و سطح برگ شده و ترکیبات بیوشیمیایی مهم مانند فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور منفی تحت تأثیر قرار گرفتند (Chiappero et al., 2019). در تحقیق دیگری که بر روی گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) انجام شد، پژوهشگران اظهار داشتند که با افزایش شدت تنش خشکی، پارامترهای رشد، محتوای نسبی آب، شاخص کلروفیل، عملکرد اسانس و غلظت عناصر غذایی کاهش یافت (Aslani et al., 2023).

با توجه به افزایش جمعیت و نیاز روزافزون به امنیت غذایی، توسعه سطح زیرکشت یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود (Haghaninia et al., 2025). اما این گسترش سطح زیرکشت در حالی صورت می‌گیرد که منابع آب شیرین محدود بوده و بحران آب در بسیاری از مناطق تشدید شده است (Raza et al., 2023). بر اساس گزارش‌های بین‌المللی، بخش کشاورزی بیش از ۷۰ درصد از منابع آب تجدیدپذیر جهان را مصرف می‌کند و در عین حال، تغییرات اقلیمی و کاهش بارندگی باعث کاهش منابع آب قابل دسترس شده‌اند (Haghaninia et al., 2024a). بنابراین، توسعه کشاورزی بدون در نظر گرفتن استراتژی‌های مدیریت منابع آب، نه تنها پایدار نخواهد بود، بلکه می‌تواند منجر به افت عملکرد محصولات کشاورزی و افزایش بحران‌های زیست‌محیطی شود (Jabeen et al., 2024). از این رو، توسعه راهکارهای علمی و پایدار به منظور کاهش اثرات منفی خشکی و افزایش بهره‌وری کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک، از ضرورت‌های اساسی به شمار می‌رود.

(Haghaninia et al., 2024b; Das et al., 2023). یکی از روش‌های مرسوم استفاده از کودهای شیمیایی است که به‌طور معمول باعث افزایش رشد و عملکرد گیاهان می‌شوند (Mahmoud et al., 2020). با این حال، استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی در شرایط خشکی، به‌ویژه در خاک‌های با محدودیت رطوبت، اثرات منفی قابل توجهی بر گیاهان خواهد داشت (Elshamy et al., 2020; Alhasan et al., 2019). در چنین شرایطی، کارایی جذب عناصر غذایی از خاک کاهش می‌یابد و گیاهان قادر به استفاده بهینه از منابع غذایی نخواهند بود (Haghaninia et al., 2023; Batool et al., 2023). علاوه بر این، مصرف زیاد کودهای شیمیایی موجب تغییرات منفی در ساختار خاک، آلودگی منابع آب و تهدید سلامت اکوسیستم‌ها می‌شود (Salem et al., 2024). به‌ویژه در شرایط خشکی، این کودها نمی‌توانند به‌طور مؤثر بر عملکرد گیاهان تأثیر بگذارند و حتی در برخی موارد می‌توانند تنش‌های فیزیولوژیکی را تشدید کنند (Haghaninia et al., 2024a; Ashraf et al., 2019). بنابراین، نیاز به جستجوی روش‌های جدید و سازگار با محیط زیست برای بهبود عملکرد گیاهان در شرایط خشکی بیش از پیش احساس می‌شود (Asghari et al., 2023).

یکی از این روش‌ها، بهره‌گیری از نانوفناوری است که استفاده از آن می‌تواند به بهبود وضعیت گیاهان تحت تنش خشکی کمک کند (Raza et al., 2023). نانوذرات به دلیل اندازه بسیار کوچک و سطح فعال بالا، می‌توانند جذب مواد مغذی را تسهیل کرده و اثرات منفی خشکی را کاهش دهند (Razavizadeh et al., 2023). از جمله این نانوذرات می‌توان به نانوذرات کیتوزان اشاره کرد. کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از کیتین، ماده‌ای که در پوسته سخت‌پوستان مانند خرچنگ‌ها و میگوها و همچنین برخی از قارچ‌ها یافت می‌شود، استخراج می‌گردد (Attaran Dowom et al., 2022; Riseh et al., 2024). نانوذرات کیتوزان، به دلیل ویژگی‌های خاص خود همچون قابلیت‌های ضد میکروبی، زیست‌سازگاری بالا، قابلیت جذب آب و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، در کشاورزی به‌ویژه در مواجهه با تنش‌های محیطی، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sahu et al., 2023). علاوه بر این، پوشش‌دار کردن با نانوذرات کیتوزان به عنوان یک نوآوری در استفاده از نانوذرات کیتوزان در کشاورزی، به‌ویژه در شرایط تنش‌های محیطی مانند خشکی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Hassanpouraghdam et al., 2023). این نانوذرات با استفاده از پوشش‌های اضافی مانند پلیمرها، نانوذرات معدنی یا ترکیبات زیستی بهبود یافته و ویژگی‌های خاصی را از خود نشان می‌دهند که به افزایش کارایی آن‌ها در مقابله با چالش‌های محیطی کمک می‌کند (Giglou et al., 2022; Gohari et al., 2023). پوشش‌دهی کودهای شیمیایی با نانوذرات کیتوزان به عنوان یک راهکار دوستدار محیط زیست و با کمترین اثرات منفی (Sami et al., 2022) باعث می‌شود که مواد به‌طور تدریجی و کنترل‌شده‌تری در محیط رها شوند که در نتیجه موجب بهبود جذب مواد مغذی (Elshayb et al., 2024)، کاهش تبخیر و حفظ رطوبت در گیاهان تحت تنش می‌گردد (Ashraf et al., 2022; Ha et al., 2019). در تحقیقات مختلف، نانوذرات کیتوزان به عنوان نوعی راهکار مؤثر برای کاهش اثرات تنش خشکی و بهبود کمیت و کیفیت گیاهان، به‌ویژه گیاهان دارویی، معرفی شده است (Attaran Dowom et al., 2020; Khodadadi et al., 2022). به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای با کاربرد نانوذرات کیتوزان پوشش‌دار شده در نعنای (*Mentha piperita* L.) تحت شرایط خشکی، مشاهده شد تیمار مذکور به بهبود رشد رویشی، افزایش محتوای آنتی‌اکسیدانی و ارتقاء ترکیبات بیوشیمیایی مؤثر در نعنای انجامید. این بهبود به نقش نانوذرات کیتوزان در کاهش استرس آبی و بهبود فرآیندهای متابولیکی گیاه، مانند افزایش جذب آب و محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از خشکی نسبت داده شد (Giglou et al., 2022). در تحقیق دیگری پژوهشگران گزارش کردند که محلول‌پاشی کودهای شیمیایی پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان پارامترهای رشد و عملکرد، رنگدانه‌های فتوسنتزی و عناصر غذایی در سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش داد (Elshamy et al., 2019). با توجه به تغییرات اقلیمی و کاهش منابع آب، این پژوهش به دنبال ارائه راهکارهایی نوآورانه و پایدار برای مقابله با تنش‌های محیطی نظیر خشکی در گیاهان دارویی است. از این‌رو، این مطالعه با هدف ارزیابی کارایی NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در بهبود عملکرد کمی و کیفی نعنای گریپ‌فروتی در شرایط تنش خشکی اجرا شد.

## ۲. روش‌شناسی پژوهش

### ۲-۱. زمان و مکان انجام آزمایش

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، استان آذربایجان شرقی، ایران، در بهار و تابستان سال ۱۴۰۳ انجام شد. برای انجام آزمایش‌ها نیز از آزمایشگاه گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه مراغه استفاده شد.

### ۲-۲. ویژگی‌های محیطی گلخانه

شرایط محیطی در گلخانه تحقیقاتی به‌طور دقیق تنظیم و کنترل شد و شرایط رشدی بهینه برای گیاهان مورد مطالعه فراهم گردید. دمای گلخانه در محدوده ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی در بازه ۶۰ تا ۷۰ درصد در طول دوره آزمایش نگهداری شد. نور طبیعی در طول روز به‌طور متوسط ۱۲ تا ۱۴ ساعت بر گیاهان تابش داشت. سیستم تهویه گلخانه به‌وسیله فن‌ها و سیستم‌های تهویه مکانیزه کنترل شد تا از تجمع رطوبت و گرمای اضافی جلوگیری و گردش هوای مناسب برای رشد گیاهان تأمین گردد. علاوه بر این، برای جلوگیری از ورود آفات به گلخانه، از توری‌های ضد حشره در ورودی‌ها و دریچه‌های تهویه استفاده شد.

### ۲-۳. آماده‌سازی بستر کاشت

خاک مورد استفاده در این تحقیق از لایه فوقانی خاک زراعی تهیه و به‌طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. براساس نتایج تجزیه خاک، بافت خاک به صورت لوم رسی شنی بود که برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در پژوهش حاضر.

| Soil texture    | Sand (%) | Silt (%) | Clay (%) | Soil organic matter (%) | EC (dS·m <sup>-1</sup> ) | pH  | Field capacity (%) | Permanent wilting point (%) | Exchangeable potassium (mg·kg <sup>-1</sup> ) | Cation exchange capacity (Cmolc·kg <sup>-1</sup> ) | Available phosphorus (mg·kg <sup>-1</sup> ) | Total nitrogen (g·kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|----------|----------|----------|-------------------------|--------------------------|-----|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| sandy clay loam | 56       | 16.2     | 28.5     | 0.88                    | 1.15                     | 7.6 | 27.4               | 13.3                        | 543.74                                        | 23.2                                               | 8.6                                         | 0.75                                 |

### ۲-۴. طراحی آزمایش و تیمارهای آزمایشی

آزمایش حاضر به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عوامل آزمایش شامل سه سطح تنش آبی (آبیاری کامل با ۹۰٪ ظرفیت زراعی، تنش آبی متوسط با ۶۰٪ ظرفیت زراعی و تنش آبی شدید با ۳۰٪ ظرفیت زراعی) و چهار تیمار کودی شامل شاهد (C)، کود شیمیایی کامل (NPK)، نانوذرات کیتوزان (CS) و NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان (NPKCS-C) بودند. در مجموع، ۱۲ تیمار مختلف با چهار تکرار در هر تیمار و تعداد کل واحدهای آزمایشی ۴۸ واحد مورد بررسی قرار گرفت.

### ۲-۵. اعمال رژیم‌های آبیاری

در این تحقیق، اعمال تنش خشکی به‌روش وزنی صورت گرفت. ابتدا برای تعیین ظرفیت زراعی خاک، نمونه‌ای از خاک داخل گلدان‌های زهکش‌دار ریخته و سپس آبیاری گردید. پس از آبیاری، گلدان‌ها با پلاستیک پوشانده و به‌طور مرتب در فواصل زمانی مختلف وزن شدند. هنگامی که میزان رطوبت خاک در دو فاصله زمانی برابر شد، نمونه‌برداری از عمق مشخص خاک انجام و وزن نمونه‌ها ثبت شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از خشک‌شدن، میزان رطوبت نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Haghaninia et al., 2024b):

$$\text{نسبت جرمی رطوبت} = w_1 - w_2 / w_2$$

$$\% \Theta_m = w_1 - w_2 / w_2 \times 100$$

که در این فرمول  $w_1$  وزن نمونه مرطوب و  $w_2$  وزن نمونه خشک‌شده و  $\Theta_m$  درصد جرمی رطوبت بود. پس از تعیین درصد رطوبت و ظرفیت زراعی خاک، آبیاری گلدان‌ها بر اساس میزان رطوبت خاک انجام شد. به‌منظور ایجاد تنش خشکی، گلدان‌ها به‌طور مداوم وزن شدند تا رطوبت خاک به سطوح مختلف تنش خشکی برسد. آبیاری با توجه به کاهش ۱۰٪، ۴۰٪ و ۷۰٪ از

ظرفیت زراعی خاک انجام شد. برای محاسبه مقدار رطوبت مورد نیاز برای هر سطح از تنش خشکی، میزان خاک گلدان در درصد رطوبت ظرفیت زراعی ضرب شده و مقدار رطوبت مورد نظر برای هر سطح از آبیاری مشخص شد.

## ۲-۶. نحوه تهیه و اعمال تیمارهای کودی

### ۲-۶-۱. تهیه محلول کیتوزان/NPK

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۱۰۰ کیلو دالتون) و درجه استیلزدایی (DD) حدود ۸۵ درصد از شرکت سبزگستر آذین ترکان-مراغه ایران و تری پلی فسفات (TPP) با درجه تحلیلی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. محلول نانو کیتوزان با استفاده از روش گزارش شده قبلی به دست آمد (Haghaninia et al., 2023). پس از انحلال کامل، محلول کیتوزان (۰/۴ گرم TPP در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر) در حالی که به شدت هم زده می شد، حاصل شد. برای تهیه محلول کیتوزان/NPK، ابتدا محلول دو در هزار از کود NPK تهیه شد. بدین منظور، دو گرم از کود NPK در یک لیتر آب حل و با همزن مکانیکی تا زمانی که محلول کاملاً همگن شود، مخلوط شد. سپس، یک گرم از کیتوزان با جرم مولکولی پایین (۱۰۰ کیلو دالتون) به محلول اضافه شد. برای تسهیل انحلال کیتوزان، یک میلی لیتر از اسیداستیک خالص به محلول افزوده و اجازه داده شد تا کیتوزان کاملاً حل شود. پس از انحلال کامل، محلول در ظرف دربسته نگهداری و برای عملیات کودپاشی استفاده شد.

### ۲-۶-۲. تهیه کود کپسول دار شده کیتوزان/NPK

برای تهیه نانو کپسول های کیتوزان/NPK از روش ژل شدن کیتوزان استفاده شد. ابتدا محلول کیتوزان/NPK طبق دستورالعمل ذکر شده در بخش قبل تهیه شد. برای تشکیل نانو کپسول ها، از تری پلی فسفات به عنوان عامل ژل زای کیتوزان استفاده شد. غلظت تری پلی فسفات برابر با ۲۵ درصد وزنی کیتوزان مصرفی بود. به این ترتیب، ۰/۲۵ گرم از تری پلی فسفات در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. در حالی که محلول کیتوزان/NPK با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه در حال هم زدن بود، محلول تری پلی فسفات به آرامی و قطره قطره به داخل محلول کیتوزان/NPK افزوده شد. پس از افزودن محلول تری پلی فسفات، محلول به رنگ کدر درآمد که نشان دهنده تشکیل نانو کپسول های کیتوزان حاوی کود NPK بود. محلول نهایی در ظرف دربسته نگهداری و برای مصرف آماده شد.

### ۲-۶-۳. نحوه کاربرد تیمار نانوذرات

در این مطالعه، پس از تهیه نانوذرات کیتوزان و همچنین کیتوزان پوشش دار شده با NPK، تیمارهای مختلف در سه مرحله رشدی نعنای گریپ فروتی به طور یکنواخت از طریق محلول پاشی روی برگ ها اعمال شد. این سه مرحله شامل مرحله استقرار گیاه، مرحله رشد رویشی و مرحله پیش از گلدهی بود. در هر مرحله، نانوذرات کیتوزان به کمک اسپری به طور یکنواخت روی سطح برگ ها پاشیده شد، به طوری که برگ ها به طور کامل با محلول پوشش داده شدند و رطوبت کافی برای جذب نانوذرات فراهم گردید. محلول پاشی در ساعات خنک صبحگاهی انجام تا از تیخیر سریع جلوگیری شود و جذب بهینه نانوذرات توسط برگ ها تضمین گردد. لازم به ذکر است پیش از انجام هر مرحله از آزمایش، فرایند کالیبراسیون دستگاه برای اطمینان از توزیع یکنواخت محلول روی سطح گیاهان انجام شد.

### ۲-۶-۴. کاربرد تیمار NPK

کود NPK یکی از منابع اصلی تأمین عناصر غذایی ضروری برای گیاهان است که شامل نیتروژن (N)، فسفر (P) و پتاسیم (K) می باشد. در این مطالعه، کود NPK با نسبت ۲۰:۲۰:۲۰ به صورت محلول آبی آماده شد و در سه مرحله از دوره رشد گیاه نعنای گریپ فروتی به کار گرفته شد. مرحله اول در هنگام کاشت گیاه، زمانی که گیاه هنوز در حال استقرار در خاک بود انجام شد تا نیازهای اولیه گیاه تأمین شود. مرحله دوم در آغاز دوره رشد رویشی (زمانی که گیاه شروع به تولید برگ های جدید کرد) و مرحله سوم در اوایل توسعه ریشه ها و شاخه ها اعمال گردید تا نیازهای تغذیه ای گیاه در این مراحل بحرانی به خوبی برآورده شود.

## ۲-۷. نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه نعنای گریپ‌فروتی برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی در ابتدای گلدهی صورت گرفت. بدین منظور، برگ‌های سالم و جوان از هر گل‌دان به‌طور تصادفی برداشت شد. سپس، نمونه‌ها فریز شده و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا از تجزیه و تغییرات بیوشیمیایی جلوگیری شود (Haghaninia et al., 2024b).

## ۲-۸. رنگ‌های فتوسنتزی

مقدار کلروفیل و کاروتنوئید موجود در برگ‌های گیاه نعنای گریپ‌فروتی با استفاده از روش آرنون (Arnon, 1949) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از وزن برگ‌ها در هاون چینی با نیتروژن مایع هضم و سپس به داخل لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. پس از آن، ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شد تا عصاره‌گیری صورت گیرد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از این مدت، محلول رویی از لوله‌های فالكون جدا شده و به لوله‌های جدید منتقل شد. غلظت کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر (برای کلروفیل *a*)، ۶۴۵ نانومتر (برای کلروفیل *b*) و ۴۷۰ نانومتر (برای کاروتنوئید) ثبت شد.

## ۲-۹. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری فعالیت GPX، ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی گیاه به دو میلی‌لیتر محلول واکنش شامل ۱۰ میلی‌مولار گایاکول و ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن‌پراکسید اضافه شد. سپس تغییرات جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد (Chance & Maehly, 1955). همچنین، فعالیت CAT از طریق اندازه‌گیری کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر ناشی از تجزیه هیدروژن‌پراکسید انجام شد. ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به دو میلی‌لیتر محلول هیدروژن‌پراکسید ۱۰ میلی‌مولار اضافه شد و سپس تغییرات جذب نور طی ۳۰ ثانیه در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Aebi, 1984). علاوه‌براین، برای اندازه‌گیری فعالیت POX، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به محلول واکنش شامل ۱۰ میلی‌مولار گایاکول و ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن‌پراکسید افزوده شد. تغییرات جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

## ۲-۱۰. اندازه‌گیری آنتوسیانین و آسکوربیک اسید

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین، مقدار ۰/۵ گرم از برگ‌های گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول حاوی یک درصد اسیدکلریدریک) همگن شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. جذب محلول‌ها در طول موج‌های ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد (Giusti & Wrolstad, 2001). علاوه‌براین، برای تعیین مقدار اسیدآسکوربیک، از روش رنگ‌سنجی با معرف ۲،۶-دی‌کلروفنول‌ایندوفنول استفاده شد (Omaye et al., 1979). بدین‌منظور، ۰/۵ گرم از برگ‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محلول سه درصد متافسفربیک اسید استخراج شد. پس از سانتریفیوژ، یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل با نه میلی‌لیتر از محلول معرف مخلوط و کاهش جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

## ۲-۱۱. مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن

برای تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدئید، نمونه‌های برگ گیاه با محلول یک درصد تری‌کلرواستیک اسید هضم و سپس شدت جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد (Heath & Packer, 1968). همچنین برای اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن، ۵۰ میلی‌گرم از برگ‌های جوان فریزشده با پنج میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ تری‌کلرواستیک اسید هضم شد و پس از سانتریفیوژ، ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی حاصل با ۵۰۰ میکرولیتر بافر K-phosphate (۱۰۰ میلی‌مولار) و دو میلی‌لیتر محلول یدید پتاسیم مخلوط گردید. میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Alexieva et al., 2001).

## ۲-۱۲. استخراج اسانس

برای استخراج اسانس از دستگاه کلونجر طرح آپاراتوس (مدل فارماکوپه بریتانیا) استفاده شد. نمونه‌های برگ‌گی و سر شاخه‌های گلدار خشک‌شده به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی به قطعات ریز (جهت استخراج بهتر اسانس) خرد شدند و مقدار ۳۰ گرم از هر نمونه جهت اسانس‌گیری با استفاده از ترازوی دیجیتالی (Sartorius, Germany) با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. فرآیند اسانس‌گیری به مدت

سه ساعت انجام شد. پس از استخراج، اسانس‌های به‌دست‌آمده با سولفات سدیم خشک و آبگیری شدند. سپس اسانس‌ها در ویال‌های شیشه‌ای در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Haghaninia *et al.*, 2024b).

## ۲-۱۳. شناسایی ترکیبات اسانس

برای شناسایی ترکیبات اسانس نعنای گریپ‌فروتی، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مدل Agilent 5977A ساخت ایالات متحده آمریکا و ستون HP-5 MS (پلی‌سیلوکسان با پنج درصد فنیل‌متیل، طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت پوشش ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. شناسایی ترکیبات اسانس از طریق مقایسه شاخص‌های بازداری خطی با داده‌های مرجع (Adams, 2007) و طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد انجام شد. همچنین، برای جداسازی دقیق‌تر ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 7990B با آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (FID) و ستون VF-5MS بهره گرفته شد. دمای تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۳۰ و ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. جریان گاز هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه و نسبت تقسیم ۱:۲۴ استفاده شد. نمونه‌های اسانس به نسبت ۱:۱۰۰ در هگزان رقیق و یک میکرولیتر از آن‌ها برای تحلیل‌ها تزریق شد. شناسایی ترکیبات بدون استفاده از ضرایب اصلاح، تنها با نرمال‌سازی سطح پیک‌ها انجام شد (Haghaninia *et al.*, 2024b).

## ۲-۱۴. تجزیه آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری پارامترهای مختلف، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شده و آزمون LSD برای مقایسه میانگین‌ها به کار گرفته شد. آنالیز واریانس داده‌ها با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام و شکل‌ها نیز با نرم‌افزار Excel 2013 رسم شد.

## ۳. نتایج پژوهش و بحث

### ۳-۱. ارتفاع بوته

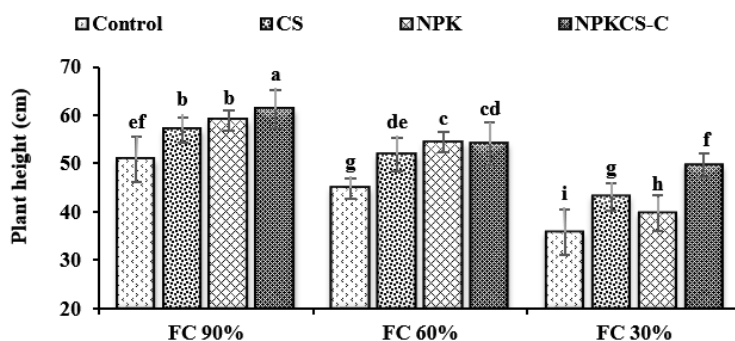
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ارتفاع بوته نعنای گریپ‌فروتی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین ارتفاع بوته در شرایط بدون تنش و با استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان به‌دست آمد، درحالی‌که کمترین ارتفاع مربوط به تیمار تنش خشکی شدید و بدون مصرف کود بود (شکل ۱). در شرایط تنش خشکی متوسط و شدید، ارتفاع بوته به ترتیب ۱۱/۱ درصد و ۳۵/۴ درصد در مقایسه با شرایط بدون تنش کاهش یافت (شکل ۱).

با این حال، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط عدم تنش منجر به افزایش ۷۰/۸ درصدی ارتفاع بوته در مقایسه با تیمار تنش خشکی شدید و بدون مصرف کود شد (شکل ۱). تنش خشکی از طریق کاهش جذب آب، اختلال در فتوسنتز و کاهش انرژی مورد نیاز برای تقسیم و کشیدگی سلولی، به کاهش ارتفاع گیاهان منجر می‌شود (Jafari *et al.*, 2019). همچنین، محققان اظهار داشتند کاهش تورژسانس سلولی، کاهش محتوای کلروفیل و افت فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی نظیر روبیسکو از مهم‌ترین عوامل کاهش رشد طولی ساقه در شرایط تنش خشکی هستند (Soltanbeigi *et al.*, 2021; Abd Elbar *et al.*, 2019). با این حال، کاربرد کودهای شیمیایی پوشش‌دار با نانوذرات کیتوزان می‌تواند این اثرات منفی را تعدیل کند (Salem *et al.*, 2024; Alhasan, 2020). کیتوزان به‌عنوان یک پلیمر زیستی، با بهبود جذب آب و عناصر غذایی، افزایش سنتز اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین، و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی، توانایی گیاه در مقابله با تنش را افزایش می‌دهد (Sheikhalipour *et al.*, 2021; Jabeen *et al.*, 2024; Elshamy *et al.*, 2019; Haghaninia *et al.*, 2024c). گیاهان مختلف نشان داده‌اند که استفاده از کودهای پوشش‌دار با نانوکیتوزان، بهبود معناداری در ارتفاع گیاهان تحت تنش ایجاد کرده است (Ali *et al.*, 2021; Gohari *et al.*, 2023; Das *et al.*, 2023).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات تنش خشکی و تیمارهای کودی بر ارتفاع بوته، عملکرد ماده خشک و محتوای اسانس نعنای گریپ‌فروتی.

| Sources of Variation       | df | Mean squares |                  |                       |
|----------------------------|----|--------------|------------------|-----------------------|
|                            |    | Plant height | Dry matter yield | Essential oil content |
| Drought stress (DS)        | 2  | 1171.79**    | 477.96**         | 1.89**                |
| Fertilizer treatments (FT) | 3  | 107.22**     | 180.82**         | 1.04**                |
| DS×FT                      | 6  | 4.75*        | 1.34**           | 0.117**               |
| Error                      |    | 2.32         | 0.588            | 0.006                 |
| CV (%)                     |    | 3.04         | 2.22             | 7.45                  |

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد.



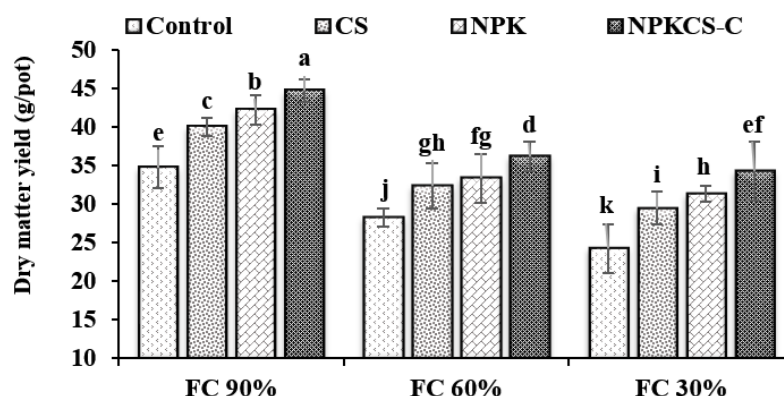
شکل ۱. مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بر ارتفاع بوته نعنای گریپ‌فروتی. C: شاهد، NPK: کود شیمیایی کامل، CS: نانوذرات کیتوزان و NPKCS-C: NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان. FC 90%: ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش)، FC 60%: ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی متوسط)، FC 30%: ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید). حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD هستند.

### ۳-۲. ماده خشک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ماده خشک گیاه نعنای گریپ‌فروتی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثر متقابل این دو قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین ماده خشک در شرایط بدون تنش و با کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان مشاهده شد؛ درحالی‌که کمترین ماده خشک مربوط به تیمار تنش خشکی شدید و بدون مصرف کود بود (شکل ۲). علاوه بر این، مقدار ماده خشک در شرایط بدون تنش در مقایسه با تنش خشکی متوسط ۲۴/۴ درصد و در مقایسه با تنش خشکی شدید ۳۷/۸ درصد افزایش یافت (شکل ۲). همچنین، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط بدون تنش، ماده خشک را به‌ترتیب ۲۸/۷ درصد نسبت به شاهد و ۸۴/۳ درصد نسبت به تیمار بدون مصرف کود در شرایط تنش خشکی شدید افزایش داد (شکل ۲). تنش خشکی از طریق کاهش فشار تورژانس، اختلال در تقسیم سلولی و محدودیت تولید مواد فتوسنتزی، ماده خشک را کاهش می‌دهد (Rezaei-Chiyaneh et al., 2023; Asghari et al., 2021). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات پیشین نشان داده‌اند تنش خشکی با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی، منجر به کاهش متابولیسم سلولی و در نهایت کاهش ماده خشک می‌شود (Mumivand et al., 2021; Aslani et al., 2023). در این شرایط، NPK پوشش‌دار با نانوذرات کیتوزان با تأمین تدریجی عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم، نقش کلیدی در تولید پروتئین‌ها، سنتز ATP و تنظیم اسمزی دارند (Ha et al., 2019; Mohammadi et al., 2020). همچنین، نانوذرات کیتوزان موجود در پوشش این کودها با بهبود کارایی مصرف آب از طریق کاهش تبخیر و حفظ رطوبت خاک، به بهینه‌سازی استفاده از منابع محدود آب کمک می‌کنند (Kubavat et al., 2020; Giglou et al., 2022). همسو با این نتایج، محققان گزارش کردند نانوذرات کیتوزان با کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز، تخریب سلول‌ها را مهار کرده و انرژی بیشتری برای ساخت ماده خشک فراهم می‌کنند (Khodadadi et al., 2022).

### ۳-۳. محتوای اسانس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر محتوای اسانس نعنای گریپ‌فروتی داشتند (جدول ۲). بالاترین محتوای اسانس در تیمار NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان تحت شرایط تنش خشکی متوسط مشاهده شد؛ درحالی‌که کمترین مقادیر این صفات به شاهد اختصاص داشت (شکل ۳). در شرایط تنش خشکی متوسط، محتوای اسانس ۹۸/۵ درصد در مقایسه با شرایط بدون تنش افزایش یافت. همچنین، در تیمار NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان تحت تنش متوسط، محتوای اسانس ۳۱۴/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت. علاوه‌براین، در مقایسه با شرایط تنش شدید و بدون مصرف کود، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان تحت تنش متوسط منجر به افزایش ۱۴۶/۷ درصدی محتوای اسانس شد (شکل ۳).



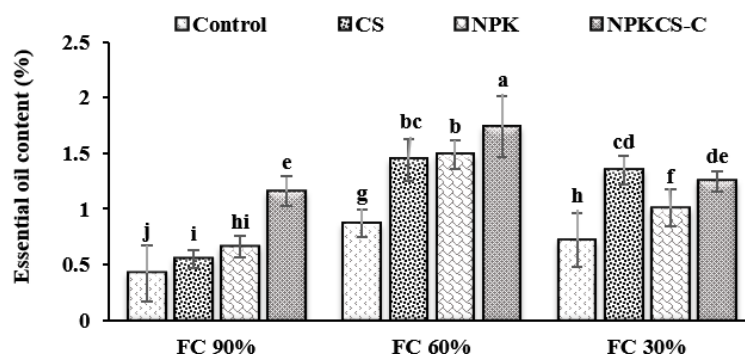
شکل ۲. مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بر ماده خشک نعنای گریپ‌فروتی. C: شاهد، NPK: کود شیمیایی کامل، CS: نانوذرات کیتوزان و NPKCS-C: NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان. FC 90%: ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش)، FC 60%: ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی متوسط)، FC 30%: ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید). حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD است.

محتوای اسانس به‌طور معمول در پاسخ به استرس‌های ناشی از خشکی افزایش می‌یابد (Aslani et al., 2023). این ترکیبات به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن و استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند (Bayati et al., 2020; Razavizadeh et al., 2023). به‌طور مشابه، مطالعات نشان داده‌اند که در خشکی متوسط، تولید اسانس در برخی گیاهان دارویی به‌عنوان یک واکنش تطبیقی به کاهش رطوبت و افزایش فشار اسمزی گیاه افزایش می‌یابد (Aslani et al., 2023; Mumivand et al., 2021). همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، محققان گزارش کردند عملکرد اسانس مریم‌گلی با کاهش آبیاری از ۸۰ درصد به ۶۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت؛ اما با کمبود آب شدیدتر (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) محتوای اسانس و عملکرد اسانس کاهش یافت (Bidabadi et al., 2020). در همین حال، کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان باعث افزایش تولید اسانس در شرایط تنش خشکی شد، زیرا این نانوذرات به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد کمک کردند (Ibrahim, 2019; Ashraf et al., 2022). همسو با نتایج آمده از این پژوهش، محققان مشاهده کردند استفاده از کودهای پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان می‌تواند به بهبود جذب مواد مغذی و افزایش فعالیت متابولیکی در گیاه کمک کرده که به‌طور غیر مستقیم باعث تقویت تولید اسانس می‌شود (Giglou et al., 2022).

### ۳-۴. اجزای اسانس

بررسی ترکیبات اسانس نعنای گریپ‌فروتی منجر به شناسایی ۲۱ ترکیب شد که مجموعاً ۹۰/۱۱ تا ۹۹/۱۵ درصد از کل ترکیبات را شامل می‌شوند (جدول ۳). ترکیبات غالب اسانس شامل لینالیل استات (۴۵/۷۴ تا ۶۴/۱۱ درصد)، لینالول (۱۹/۹۸ تا ۲۸/۶۷ درصد)، ترپینول (۳/۲۲ تا ۸/۶۲ درصد)، تیمول (۲/۰۸ تا ۴/۹۶ درصد)، ژرانیل استات (۲/۷۹ تا ۴/۸۹ درصد)، نریل استات (۰/۶۷ تا ۲/۶۱ درصد).

درصد)، n-دکان (۰/۶۲ تا ۲/۳۰ درصد)، نرول (۰/۶۸ تا ۲/۱۵ درصد) و ۱-۸-سینئول (۰/۸۲ تا ۱/۵۱ درصد) بودند (جدول ۳). بیشترین مقادیر لینالیل استات، ژرانیل استات و ۱-۸-سینئول در شرایط تنش خشکی متوسط و با استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان مشاهده شد؛ درحالی‌که بیشترین میزان لینالول در شرایط بدون تنش و با استفاده از همین تیمار حاصل شد (جدول ۳). همچنین، بالاترین مقدار ترپینول با کاربرد NPK در شرایط بدون تنش ثبت شد. در شرایط تنش متوسط و با استفاده از نانوذرات کیتوزان، بیشترین میزان تیمول حاصل شد. علاوه بر این، حداکثر مقدار نریل استات و نرول با کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط تنش خشکی شدید مشاهده شد و بیشترین مقدار n-دکان نیز تحت تنش شدید و با استفاده از نانوذرات کیتوزان به دست آمد (جدول ۳). در شرایط تنش خشکی متوسط ممکن است گیاهان در پاسخ به استرس ترکیبات خاصی را برای مقابله با اثرات منفی خشکی تولید کنند که باعث افزایش غلظت برخی اسانس‌ها در گیاهان دارویی گردد (Babaei et al., 2021). با این حال، تنش خشکی شدید منجر به کاهش رطوبت در بافت‌های گیاهی شده و در نتیجه موجب اختلال در فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان می‌گردد (Abd-Elbar et al., 2019) که این امر ممکن است در شرایط تنش شدید باعث کاهش میزان تولید ترکیبات اسانس شود (Mandoulakani et al., 2017; Haghaninia et al., 2024b). در مقابل، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان به دلیل ویژگی‌های خاص خود، قابلیت بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه را در شرایط استرس خشکی دارد (Mahmoud & Swaefy, 2020). این نانوذرات به‌طور تدریجی و کنترل شده مواد مغذی مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم را به گیاهان ارائه می‌دهند که این عناصر برای فرآیندهای بیوشیمیایی و تولید ترکیبات اسانسی ضروری هستند (Mahmoud et al., 2023; Ashraf et al., 2022). علاوه بر این، کیتوزان به‌عنوان یک ماده طبیعی خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارد که می‌تواند به کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تحت تنش خشکی کمک کند (Khodadadi et al., 2022). این فعالیت‌ها باعث افزایش توان گیاه برای تولید ترکیبات اسانس تحت شرایط خشکی می‌شود (Attaran Dowom et al., 2022; Ali et al., 2021).



**شکل ۳.** مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بر محتوای اسانس نعنای گریپ-فروتی. C: شاهد، NPK: کود شیمیایی کامل، CS: نانوذرات کیتوزان و NPKCS-C: NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان. FC 90%: ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش)، FC 60%: ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی متوسط)، FC 30%: ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید). حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD است.

### ۳-۵. کلروفیل a و b

تجزیه واریانس نشان داد که محتوای کلروفیل a و b گیاه نعنای گریپ‌فروتی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای کودی، سطوح مختلف تنش خشکی و اثر متقابل این دو عامل قرار گرفت (جدول ۴). بیشترین مقادیر کلروفیل a و b در تیمار NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط بدون تنش خشکی مشاهده شد؛ درحالی‌که کمترین مقادیر این صفات به شرایط تنش خشکی شدید و عدم استفاده از کود اختصاص داشت (جدول ۵). در شرایط بدون تنش، محتوای کلروفیل a و b به ترتیب ۲۸/۹ و ۴۸/۱

درصد نسبت به شرایط تنش خشکی شدید افزایش یافتند. علاوه بر این، در شرایط بدون تنش، استفاده از NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان موجب افزایش ۷۱/۵ درصدی کلروفیل *a* و ۱۲۳/۹ درصدی کلروفیل *b* نسبت به شرایط تنش شدید بدون کاربرد کود شد (جدول ۵). کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش خشکی ناشی از اختلال در سنتز آن به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز کلروفیل (مانند آنزیم کلروپیلاز) و افزایش تخریب آن در اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن است (Raza et al., 2023; Mohasseli et al., 2019). این گونه‌ها از طریق اکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تخریب ساختارهای فتوسنتزی مانند تیلاکوئیدها، به کاهش شدید محتوای کلروفیل منجر می‌شوند (Sharma et al., 2020). به‌طور مشابه، پژوهشگران گزارش کردند بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش جذب دی‌اکسید کربن در شرایط تنش خشکی، کارایی فتوسنتزی گیاه را کاهش داده و به تخریب بیشتر کلروفیل‌ها دامن می‌زند (Tashakorizadeh et al., 2022; Abd Elbar et al., 2019). در مقابل، کاربرد NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان اثرات منفی تنش خشکی بر محتوای کلروفیل را تعدیل می‌کند (Ibrahim, 2019). این کودها با تأمین تدریجی عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم، به‌ویژه نیتروژن، به‌عنوان یکی از اجزای اصلی ساختاری کلروفیل، نقش کلیدی در حفظ سنتز کلروفیل ایفا می‌کنند (Balusamy et al., 2022; Elshayb et al., 2024). تحقیقات مشابه نشان داده‌اند که استفاده از کودهای پوشش دار با نانوکیتوزان از طریق تقویت سیستم دفاعی گیاه و افزایش تولید پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز، کاهش محتوای کلروفیل در اثر تنش را کاهش داده‌اند (Jabeen et al., 2024).

### ۳-۶. محتوای کاروتنوئیدها

بررسی اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی نشان داد که تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری بر محتوای کاروتنوئید نعنای گریپ‌فروتی دارند (جدول ۴). نتایج حاکی از آن بود که بالاترین میزان کاروتنوئید در شرایط تنش متوسط و با استفاده از NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان به‌دست آمد. در مقابل، شاهد کمترین میزان کاروتنوئید را تولید کرد (جدول ۵). در شرایط تنش متوسط، محتوای کاروتنوئید نسبت به شرایط بدون تنش و تنش شدید به‌ترتیب ۷۲/۸ و ۱۷/۶ درصد افزایش یافت. از سوی دیگر، تیمار NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان تحت تنش متوسط، محتوای کاروتنوئید را در مقایسه با تنش شدید بدون کود ۴۸/۲ درصد و نسبت به شاهد ۱۲۲/۹ افزایش داد (جدول ۵). کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگدانه‌های محافظ در فتوسنتز، نقش کلیدی در مهار ROS و حفاظت از کلروفیل‌ها ایفا می‌کنند (Razavizadeh et al., 2023). در شرایط تنش خشکی، اگرچه در مراحل ابتدایی ممکن است محتوای کاروتنوئیدها افزایش یابد تا گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند، اما در مراحل شدیدتر تنش به دلیل تخریب ساختارهای فتوسنتزی و کاهش سنتز این ترکیبات، محتوای کاروتنوئیدها کاهش می‌یابد (Haghaninia et al., 2024b). این کاهش به دلیل اختلال در فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کاروتنوئیدها و اکسیداسیون آن‌ها توسط ROS است (Abd Elbar et al., 2019; Nikzad et al., 2023). با این حال، کاربرد NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان می‌تواند محتوای کاروتنوئیدها را در شرایط تنش خشکی حفظ یا حتی افزایش دهد (Balusamy et al., 2022; Alhasan, 2020). این کودها با آزادسازی تدریجی عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم، تعادل تغذیه‌ای گیاه را حفظ و از کاهش متابولیسم فتوسنتزی جلوگیری می‌کنند (Giglou et al., 2022; Sami et al., 2022). تحقیقات مشابه در گیاهانی مانند نعنای (*Mentha spicata* L.) نشان داده است که استفاده از کودهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان به دلیل کاهش تنش اکسیداتیو، حفاظت از ساختارهای فتوسنتزی و افزایش سنتز ترکیبات فتوسنتزی موجب افزایش محتوای کاروتنوئیدها تحت تنش شده است (Hassanpouraghdam et al., 2023).

### ۳-۷. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثر متقابل این دو قرار گرفت (جدول ۴). بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز در تیمار NPK پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط تنش خشکی متوسط مشاهده شد؛ درحالی‌که کمترین فعالیت مربوط به شاهد بود (جدول ۵). در شرایط تنش خشکی متوسط، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز به‌ترتیب ۲۱۸/۸، ۱۳۶/۷ و ۱۶۵/۲ درصد نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافت (جدول ۵).

جدول ۳. اثر تنش خشکی و تیمارهای کودی بر ترکیبات اسانس نعنای گریپ فروتی.

|           |                             | 90% FC      |               |               |               |               | 60% FC        |               |               |               | 30% FC        |               |               |               |
|-----------|-----------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Compounds |                             | RI          | C             | CS            | NPK           | NPKCS-C       | C             | CS            | NPK           | NPKCS-C       | C             | CS            | NPK           | NPKCS-C       |
| 1         | beta.-Pinene                | 974         | 0.038         | 0.042         | 0.039         | 0.039         | 0.037         | 0.023         | 0.022         | 0.028         | 0.03          | 0.042         | 0.046         | 0.031         |
| 2         | 1 -octen-3-ol               | 977         | 0.069         | 0.097         | 0.077         | 0.093         | 0.076         | 0.06          | 0.107         | 0.051         | 0.067         | 0.1           | 0.105         | 0.069         |
| 3         | .beta.-Myrcene              | 988         | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| 4         | <b>n-Decane</b>             | <b>1000</b> | <b>1.826</b>  | <b>1.874</b>  | <b>1.711</b>  | <b>1.32</b>   | <b>1.448</b>  | <b>1.235</b>  | <b>1.678</b>  | <b>0.622</b>  | <b>1.333</b>  | <b>2.305</b>  | <b>1.136</b>  | <b>0.976</b>  |
| 5         | p-cymene                    | 1024        | 0.522         | 0.026         | 0.023         | 0.037         | 0.023         | 0.027         | 0.036         | 0             | 0.023         | 0             | 0.033         | 0             |
| 6         | liminene                    | 1025        | 1.32          | 1.461         | 1.235         | 1.12          | 1.117         | 0.972         | 1.294         | 0.585         | 1.038         | 1.082         | 1.242         | 0.877         |
| 7         | <b>1,8-Cineole</b>          | <b>1026</b> | <b>1.154</b>  | <b>1.026</b>  | <b>1.236</b>  | <b>1.08</b>   | <b>1.118</b>  | <b>0.947</b>  | <b>1.22</b>   | <b>1.517</b>  | <b>1.042</b>  | <b>0.994</b>  | <b>1.175</b>  | <b>0.827</b>  |
| 8         | ocimene<(E)β                | 1044        | 0.049         | 0.043         | 0.03          | 0.034         | 0.031         | 0.036         | 0.053         | 0             | 0.031         | 0.034         | 0.049         | 0.026         |
| 9         | TERPINOLENE                 | 1054        | 0.452         | 0.439         | 0.415         | 0.391         | 0.406         | 0.344         | 0.459         | 0.224         | 0.4           | 0.358         | 0.551         | 0.314         |
| 10        | <b>LINALOOL</b>             | <b>1096</b> | <b>19.989</b> | <b>28.671</b> | <b>23.539</b> | <b>24.23</b>  | <b>26.084</b> | <b>25.635</b> | <b>25.268</b> | <b>20.098</b> | <b>25.119</b> | <b>26.774</b> | <b>24.489</b> | <b>24.627</b> |
| 11        | Borneol                     | 1186        | 0.481         | 0.145         | 0.175         | 0.213         | 0.183         | 0.195         | 0.241         | 0.156         | 0.185         | 0.184         | 0.229         | 0.182         |
| 12        | Pinocamphone <cis->         | 1227        | 0.011         | 0.023         | 0.012         | 0.02          | 0.025         | 0.022         | 0.039         | 0.019         | 0.021         | 0.027         | 0.029         | 0.024         |
| 13        | <b>Terpineol &lt;α-&gt;</b> | <b>1239</b> | <b>6.582</b>  | <b>6.151</b>  | <b>8.623</b>  | <b>6.007</b>  | <b>6.758</b>  | <b>6.299</b>  | <b>7.043</b>  | <b>3.22</b>   | <b>6.78</b>   | <b>5.421</b>  | <b>7.54</b>   | <b>5.657</b>  |
| 14        | <b>Nerol</b>                | <b>1254</b> | <b>1.705</b>  | <b>1.482</b>  | <b>1.5</b>    | <b>1.185</b>  | <b>1.29</b>   | <b>1.26</b>   | <b>1.323</b>  | <b>0.683</b>  | <b>1.252</b>  | <b>0.973</b>  | <b>1.745</b>  | <b>2.153</b>  |
| 15        | <b>Linalyl acetate</b>      | <b>1289</b> | <b>45.743</b> | <b>45.963</b> | <b>47.36</b>  | <b>53.211</b> | <b>50.112</b> | <b>51.922</b> | <b>50.724</b> | <b>64.111</b> | <b>51.817</b> | <b>52.182</b> | <b>49.194</b> | <b>53.416</b> |
| 16        | <b>Thymol</b>               | <b>1298</b> | <b>3.937</b>  | <b>3.511</b>  | <b>4.409</b>  | <b>3.539</b>  | <b>3.841</b>  | <b>4.961</b>  | <b>3.929</b>  | <b>2.081</b>  | <b>3.783</b>  | <b>3.088</b>  | <b>4.079</b>  | <b>3.543</b>  |
| 17        | <b>Neryl acetate</b>        | <b>1361</b> | <b>1.935</b>  | <b>2.175</b>  | <b>1.98</b>   | <b>1.634</b>  | <b>1.757</b>  | <b>1.507</b>  | <b>1.617</b>  | <b>0.679</b>  | <b>1.712</b>  | <b>1.475</b>  | <b>1.952</b>  | <b>2.617</b>  |
| 18        | <b>Geranyl acetate</b>      | <b>1381</b> | <b>3.796</b>  | <b>3.34</b>   | <b>3.643</b>  | <b>3.13</b>   | <b>3.444</b>  | <b>2.93</b>   | <b>3.162</b>  | <b>4.898</b>  | <b>2.964</b>  | <b>2.799</b>  | <b>3.841</b>  | <b>3.308</b>  |
| 19        | trans-Caryophyllene         | 1417        | 0.015         | 0.04          | 0.037         | 0.03          | 0.043         | 0.035         | 0.04          | 0.025         | 0.025         | 0.044         | 0.023         | 0.028         |
| 20        | Germacrene D                | 1454        | 0.299         | 0.326         | 0.252         | 0.255         | 0.31          | 0.248         | 0.211         | 0.154         | 0.312         | 0.175         | 0.214         | 0.248         |
| 21        | bicyclogermacrene           | 1481        | 0.189         | 0.042         | 0.039         | 0.039         | 0.037         | 0.023         | 0.022         | 0.028         | 0.03          | 0.042         | 0.046         | 0.031         |
| Total     |                             |             | 90.11         | 96.97         | 96.29         | 97.38         | 98.10         | 98.65         | 98.46         | 99.15         | 97.93         | 98.05         | 97.77         | 98.92         |

جدول ۴. تجزیه واریانس اثرات تنش خشکی و تیمارهای کودی بر صفات فیزیولوژیک نعنای گریپ فروتی.

| Sources of Variation      | df | Mean squares  |               |             |                      |                    |          |                     |            |                   |                  |
|---------------------------|----|---------------|---------------|-------------|----------------------|--------------------|----------|---------------------|------------|-------------------|------------------|
|                           |    | Chlorophyll a | Chlorophyll b | Carotenoids | Ascorbic acid        | Anthocyanin        | Catalase | Guaiacol peroxidase | Peroxidase | Hydrogen peroxide | Malon dialdehyde |
| Drought stress (DS)       | 2  | 88.53*        | 79.71**       | 124.47**    | 64521.36**           | 5.01*              | 48.99**  | 4.21**              | 1.07**     | 33.81**           | 89.54**          |
| Fertilizer treatments (T) | 3  | 7.75**        | 7.54**        | 13.38*      | 4434.76**            | 0.34**             | 3.44**   | 0.46*               | 0.08*      | 2.67**            | 8.73**           |
| DS×T                      | 6  | 3.89**        | 0.30*         | 1.24*       | 634.75 <sup>ns</sup> | 0.14 <sup>ns</sup> | 0.049*   | 0.04**              | 0.002*     | 0.60**            | 0.67**           |
| Error                     |    | 0.18          | 0.09          | 0.319       | 107.82               | 00.9               | 0.034    | 0.005               | 0.001      | 00.2              | 0.11             |
| CV (%)                    |    | 1.28          | 3.45          | 5.36        | 3.31                 | 8.93               | 4.37     | 7.89                | 8.07       | 2.09              | 1.35             |

\*, \*\* و <sup>ns</sup> به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیر معنی دار.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بر صفات فیزیولوژیک نعنای گریپ فروتی.

| Treatments          | Chlorophyll <i>a</i><br>(mg g <sup>-1</sup> FW) | Chlorophyll <i>b</i><br>(mg g <sup>-1</sup> FW) | Carotenoids<br>(mg g <sup>-1</sup> FW) | Peroxidase<br>(μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) | Catalase<br>(μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) | Guaicoll peroxidase<br>(μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) |
|---------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| FC 90%              | Control                                         | 15.84de*                                        | 8.26g                                  | 6.43i                                                           | 0.183k                                                        | 1.61j                                                                    |
|                     | CS                                              | 16.26bc                                         | 9.57d                                  | 7.70h                                                           | 0.307i                                                        | 2.08i                                                                    |
|                     | NPK                                             | 16.38ab                                         | 11.42b                                 | 8.76g                                                           | 0.326hi                                                       | 3.02g                                                                    |
|                     | NPKCS-C                                         | 16.57a                                          | 11.91a                                 | 7.22hi                                                          | 0.246j                                                        | 2.75h                                                                    |
| FC 60%              | Control                                         | 12.82h                                          | 7.37h                                  | 11.36d                                                          | 0.435g                                                        | 4.26f                                                                    |
|                     | CS                                              | 15.96d                                          | 8.85f                                  | 12.79bc                                                         | 0.668d                                                        | 5.67c                                                                    |
|                     | NPK                                             | 15.59ef                                         | 9.12ef                                 | 13.56ab                                                         | 0.815b                                                        | 6.05b                                                                    |
|                     | NPKCS-C                                         | 16.03cd                                         | 10.68c                                 | 14.34a                                                          | 0.898a                                                        | 6.42a                                                                    |
| FC 30%              | Control                                         | 9.66j                                           | 5.32k                                  | 9.67f                                                           | 0.385gh                                                       | 4.01g                                                                    |
|                     | CS                                              | 14.14g                                          | 6.80i                                  | 12.03cd                                                         | 0.607e                                                        | 4.74e                                                                    |
|                     | NPK                                             | 11.23i                                          | 6.27j                                  | 10.50e                                                          | 0.517f                                                        | 4.97de                                                                   |
|                     | NPKCS-C                                         | 15.40f                                          | 9.41de                                 | 12.05cd                                                         | 0.748c                                                        | 5.18d                                                                    |
| LSD <sub>0.05</sub> | 0.26                                            | 0.43                                            | 0.81                                   | 0.059                                                           | 0.27                                                          | 0.10                                                                     |

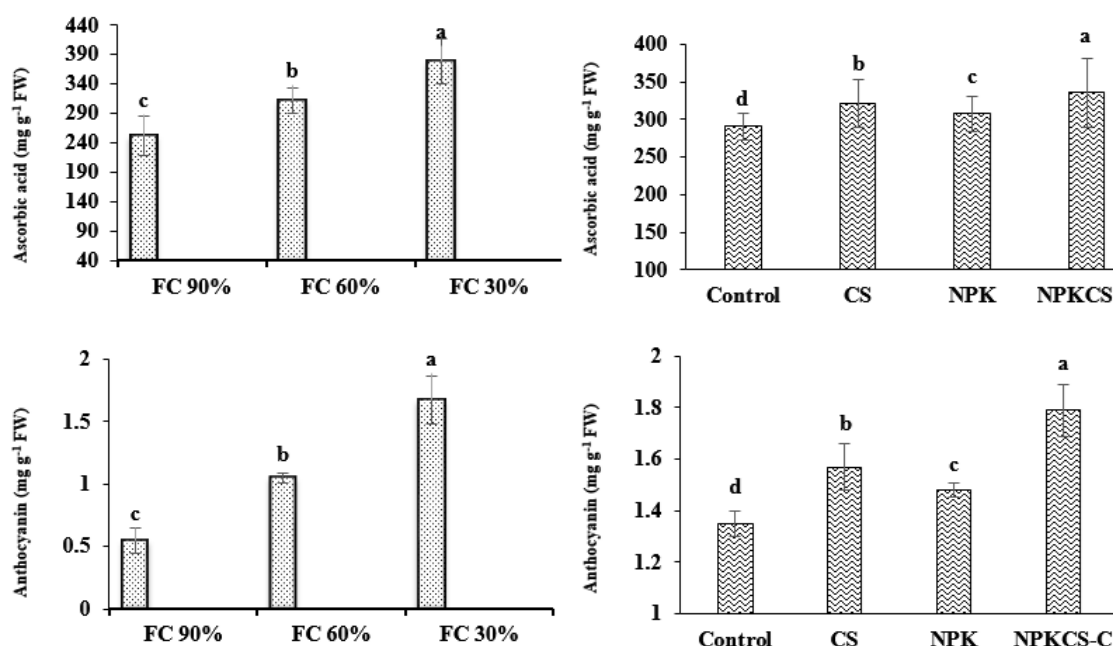
\* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌دار ندارد.

علاوه‌براین، در شرایط تنش خشکی متوسط، کاربرد NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در مقایسه با شرایط تنش خشکی شدید و بدون مصرف کود، به‌ترتیب ۱۳۳/۲، ۵۹/۹ و ۱۵۷/۱ درصد افزایش فعالیت آنزیمی نشان داد (جدول ۵). در شرایط تنش خشکی، گیاهان در معرض رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند که می‌توانند باعث آسیب به غشاهای سلولی، پروتئین‌ها و DNA شوند (Chiappero *et al.*, 2019). بنابراین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد تا این گونه‌های فعال اکسیژن خنثی شده و آسیب‌ها کاهش یابند (Batoool *et al.*, 2020). در این راستا، تحقیقات نشان داده است که تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) افزایش یافت تا تعادل اکسیداتیو گیاه حفظ شود (Haghaninia *et al.*, 2024b). در این شرایط، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان به‌عنوان یک حامل برای انتقال تدریجی و پایدار مواد مغذی عمل می‌کنند که این امر باعث فراهم‌سازی تدریجی عناصر غذایی به گیاه می‌شود (Balusamy *et al.*, 2022; Sami *et al.*, 2022). این مواد مغذی برای سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ضروری هستند و باعث تقویت سیستم دفاعی گیاه در برابر استرس اکسیداتیو می‌شوند (Sadak *et al.*, 2022)؛ به‌ویژه نیتروژن به‌عنوان عنصر کلیدی در سنتز پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فسفر در تشکیل و عملکرد سیستم‌های انرژی گیاه و پتاسیم در تقویت توان گیاه برای مقابله با خشکی مؤثر است (Haghaninia *et al.*, 2024a). در تایید یافته‌های ما، محققان گزارش کردند استفاده از کودهای پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تحت تنش شد (Jabeen *et al.*, 2024).

### ۳-۸. محتوای اسید اسکوریک و آنتوسیانین

تحلیل آماری نشان داد که تنش خشکی و تیمارهای کودی تأثیر معنی‌داری بر محتوای اسیداسکوریک و آنتوسیانین نعنای گریپ فروتی داشتند (جدول ۴). در شرایط تنش شدید، محتوای آسکوریک‌اسید نسبت به عدم تنش و تنش متوسط به‌ترتیب ۵۰/۴ و ۲۱/۷ افزایش یافت (شکل ۴). مشابه این روند، محتوای آنتوسیانین نیز در شرایط تنش شدید نسبت به عدم تنش و تنش متوسط به‌ترتیب ۲۰۲/۹ و ۵۹/۱ افزایش نشان داد (شکل ۴). در میان تیمارهای کودی، NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان بالاترین مقادیر آسکوریک‌اسید و آنتوسیانین را تولید کرد. این تیمار در مقایسه با شاهد، باعث افزایش ۱۵/۴ در محتوای اسکوریک‌اسید و ۳۲/۶ درصد در محتوای آنتوسیانین شد (شکل ۴). اسید آسکوریک به‌عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های کلیدی، با خنثی‌سازی ROS و تنظیم تعادل اکسیداتیو در سلول، نقش حیاتی در تحمل گیاه به خشکی دارد. مطالعات نشان داده‌اند در پاسخ به تنش خشکی محتوای آنتوسیانین و اسیداسکوریک افزایش می‌یابند (Li *et al.*, 2022). این ترکیبات نه‌تنها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، بلکه در تنظیم فشار اسمزی، کاهش تبخیر و محافظت از گیاه در برابر نور فرابنفش نقش دارند (Napar *et al.*, 2022; Haghaninia *et al.*, 2025). به‌طور مشابه، پژوهشگران گزارش کردند در شرایط تنش خشکی، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند

اسیدآسکوربیک و آنتوسیانین افزایش یافت (Amir *et al.*, 2021). علاوه‌براین، نانوذرات کیتوزان از طریق افزایش دسترسی گیاه به مواد مغذی و بهبود فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیرهای سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند PAL و گالاکتونولاکتون‌دهیدروژناز (Haghaninia *et al.*, 2024c) باعث افزایش محتوای آنتوسیانین و اسیدآسکوربیک می‌شوند (Sheikhalipour *et al.*, 2021; Rish *et al.*, 2024). همچنین، نانوذرات کیتوزان به‌عنوان القاگر زیستی، بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوسنتزی را تحریک کرده و با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله بهبود اسیدآسکوربیک و آنتوسیانین مقاومت گیاه را در برابر تنش افزایش می‌دهند (Ashraf *et al.*, 2022). تحقیقات انجام‌شده در زمینه تنش خشکی و کودهای شیمیایی و نانوکیتوزان، یافته‌های مشابهی را گزارش کرده‌اند. پژوهشگران اظهار داشتند استفاده از کودهای شیمیایی و نانوذرات کیتوزان منجر به بهبود محتوای اسیدآسکوربیک و آنتوسیانین در شرایط تنش خشکی شدند (Haghaninia *et al.*, 2023).

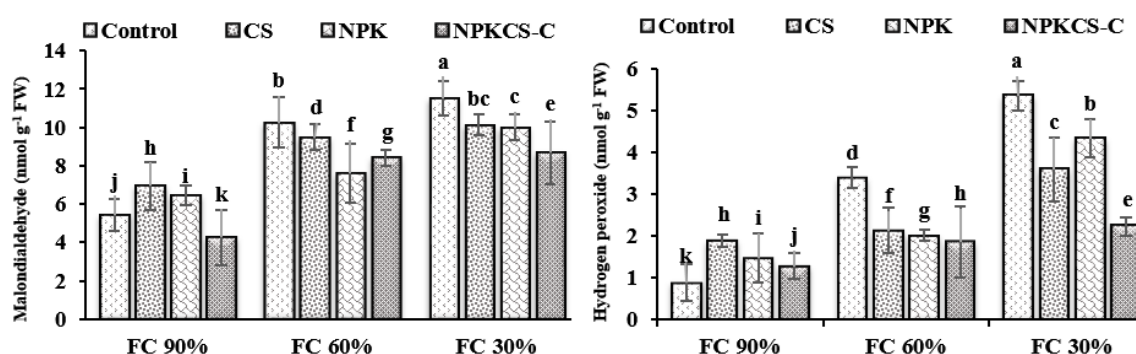


شکل ۴. مقایسه میانگین تنش خشکی و تیمارهای کودی بر محتوای آسکوربیک‌اسید و آنتوسیانین نعناع گریپ‌فروتی. C: شاهد، NPK: کود شیمیایی کامل، CS: نانوذرات کیتوزان و NPKCS-C: پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان. FC 90%: ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش)، FC 60%: ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی متوسط)، FC 50%: ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید). حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD است.

### ۳-۹. محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن

تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی، تیمارهای کودی و اثر متقابل آن‌ها به‌طور معنی‌داری بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در گیاه نعناع گریپ‌فروتی تأثیر داشت (جدول ۴). بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی شدید و بدون مصرف کود مشاهده شد. در مقابل، کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در تیمار NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان تحت شرایط عدم تنش و کمترین میزان پراکسید هیدروژن در شاهد به‌دست آمد (شکل ۵). در شرایط تنش خشکی شدید، محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن به‌ترتیب ۷۴/۸ درصد و ۱۸۰/۲ درصد نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافتند. در مقابل، استفاده از NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان در شرایط عدم تنش، محتوای مالون‌دی‌آلدئید را ۶۲/۳ درصد و پراکسید هیدروژن را ۷۶/۲ درصد در مقایسه با تنش خشکی شدید و بدون کاربرد کود کاهش داد (شکل ۵). مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن به‌عنوان شاخص‌های استرس اکسیداتیو شناخته می‌شوند و افزایش آن‌ها نشان‌دهنده آسیب به غشاهای سلولی و افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن است (Mumivand *et al.*, 2021; Haghaninia *et al.*, 2025). علاوه‌براین، مالون‌دی‌آلدئید

یکی از محصولات فرایند اکسیداسیون لیپیدها است و در اثر این فرآیند به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Bidabadi *et al.*, 2020). پراکسید هیدروژن نیز از جمله گونه‌های فعال اکسیژن است که در اثر تنش خشکی افزایش می‌یابد و این افزایش نشان‌دهنده سطح بالای استرس اکسیداتیو در گیاه است (Haghaninia *et al.*, 2024c; Mohasseli *et al.*, 2019). در مقابل، NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان به‌طور خاص با تنظیم متابولیسم گیاه و تقویت پاسخ‌های دفاعی آن، توانایی گیاه برای مقابله با استرس خشکی را افزایش می‌دهند (Ashraf *et al.*, 2022; Attaran Dowom *et al.*, 2022). نانوذرات کیتوزان با ایجاد یک پوشش محافظ روی ذرات کود NPK، آزادسازی تدریجی و کنترل‌شده مواد مغذی را امکان‌پذیر می‌کنند (Hajhashemi *et al.*, 2022) که این امر باعث می‌شود گیاه بتواند بهتر از مواد مغذی بهره‌برداری کرده و به‌ویژه در زمان‌های بحرانی، مانند شرایط تنش خشکی، به سرعت به مواد مغذی دست یابد (Ali *et al.*, 2021; Salem *et al.*, 2024). این تغذیه پایدار باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود که به مقابله با اثرات ROS کمک کرده و سطح MDA و  $H_2O_2$  را کاهش می‌دهد (Gohari *et al.*, 2023; Sahu *et al.*, 2023).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بر مالون‌دی‌الدهید و پراکسید هیدروژن نعنای گریپ‌فروتی. FC 90%: ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش)، FC 60%: ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی متوسط)، FC 50%: ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید). حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD است.

#### ۴. نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی تأثیر قابل توجهی بر صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ماده خشک گیاه نعنای گریپ‌فروتی دارد. این تنش باعث کاهش تولید ترکیبات اسانس، افزایش مالون‌دی‌الدهید و پراکسید هیدروژن و در نتیجه کاهش کمیت و کیفیت شد. با این حال، برخی از صفات مانند محتوای اسانس و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط تنش خشکی متوسط به‌طور معناداری افزایش یافت که نشان‌دهنده واکنش گیاه به استرس و تلاش آن برای مقابله با آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد است. با این حال، استفاده از کودهای شیمیایی NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان توانست به‌طور مؤثری اثرات منفی تنش خشکی را کاهش دهد. این کودها با تأمین تدریجی عناصر غذایی ضروری برای گیاهان موجب تقویت فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، بهبود فرآیندهای بیوسنتزی، افزایش تولید ترکیبات اسانس و سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاه شدند. علاوه‌براین، نانوذرات کیتوزان با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود کمک کردند تا آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد کاهش یابد و سیستم دفاعی گیاه تقویت شود. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق حاکی از این است که کاربرد کودهای شیمیایی NPK پوشش‌دار شده با نانوذرات کیتوزان نه تنها می‌تواند به‌طور مؤثری تولید و کیفیت ترکیبات اسانس در گیاهان تحت تنش خشکی را افزایش دهد، بلکه با کاهش اتلاف مواد شیمیایی به محیط زیست و کاهش خطرات آلاینده‌های ناشی از کودهای شیمیایی سنتی، به حفظ سلامت خاک و اکوسیستم‌ها کمک می‌کند. با این حال، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های میدانی با هدف ارزیابی پاسخ گیاه به این ترکیب در خاک‌های مختلف و شرایط اقلیمی متنوع انجام شود تا امکان تعمیم‌پذیری یافته‌ها در مقیاس بزرگ‌تر فراهم شود.

## ۵. منابع

- Abd Elbar, O.H., Farag, R.E., & Shehata, S.A. (2019). Effect of putrescine application on some growth, biochemical and anatomical characteristics of *Thymus vulgaris* (L.) under drought stress. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2019.10.001>.
- Adams, R.P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. *Gruver, TX USA: Texensis Publishing*.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Ahmadi, H., Morshedloo, M.R., Emrahi, R., Javanmard, A., Rasouli, F., Maggi, F., & Lorenzo, J.M. (2022). Introducing three new fruit-scented mints to farmlands: Insights on drug yield, essential-oil quality, and antioxidant properties. *Antioxidants*, 11(5), 866. <https://doi.org/10.3390/antiox11050866>.
- Akbarzadeh, S., Morshedloo, M.R., Behtash, F., Mumivand, H., & Maggi, F. (2023). Exogenous  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) improves the growth, essential oil content, and composition of grapefruit mint (*Mentha suaveolens*  $\times$  *piperita*) under water deficit stress conditions. *Horticulturae*, 9(3), 354. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030354>.
- 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 & Environment*, 24(12), 1337-1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.
- Alhasan, A.S. (2020). Effect of different NPK nano-fertilizer rates on agronomic traits, essential oil, and seed yield of basil (*Ocimum basilicum* L. cv Dolly) grown under field conditions. *Plant Archives*, 20(2), 2959-2962.
- Ali, E.F., El-Shehawi, A.M., Ibrahim, O.H.M., Abdul-Hafeez, E.Y., Moussa, M.M., & Hassan, F.A.S. (2021). A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.008>.
- Amir, S.B., Rasheed, R., Ashraf, M.A., Hussain, I., & Iqbal, M. (2021). Hydrogen sulfide mediates defense response in safflower by regulating secondary metabolism, oxidative defense, and elemental uptake under drought. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 795-808. <https://doi.org/10.1111/ppl.13267>.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1.
- Asghari, J., Mahdavia, H., Rezaei-Chiyaneh, E., Banaei-Asl, F., Amani Machiani, M., & Harrison, M.T. (2023). Selenium nanoparticles improve physiological and phytochemical properties of basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions. *Land*, 12(1), 164. <https://doi.org/10.3390/land12010164>.
- Ashraf, U., Zafar, S., Ghaffar, R., Sher, A., Mahmood, S., Noreen, Z., & Ashraf, A. (2022). Impact of nano chitosan-NPK fertilizer on field crops. In *Role of chitosan and chitosan-based nanomaterials in plant sciences* (pp. 165-183). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85391-0.00008-3>.
- Aslani, Z., Hassani, A., Mandoulakani, B.A., Barin, M., & Maleki, R. (2023). Effect of drought stress and inoculation treatments on nutrient uptake, essential oil and expression of genes related to monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*). *Scientia Horticulturae*, 309, 111610. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111610>.
- Attaran Dowom, S., Karimian, Z., Mostafaei Dehnavi, M., & Samiei, L. (2022). Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* (Kar.) under drought stress. *BMC Plant Biology*, 22(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03689-4>.
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N., & Pirbalouti, A.G. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 284, 110116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110116>.
- Balusamy, S.R., Rahimi, S., Sukweenadhi, J., Sunderraj, S., Shanmugam, R., Thangavelu, L., & Perumalsamy, H. (2022). Chitosan, chitosan nanoparticles and modified chitosan biomaterials, a potential tool to combat salinity stress in plants. *Carbohydrate Polymers*, 284, 119189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119189>.
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M.F., Naveed, N.H., Ali, A., Ahmed, K., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 16975. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>.
- Bayati, P., Karimmojeni, H., & Razmjoo, J. (2020). Changes in essential oil yield and fatty acid contents in black cumin (*Nigella sativa* L.) genotypes in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 155, 112764. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112764>.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).

- Bidabadi, S.S., VanderWeide, J., & Sabbatini, P. (2020). Exogenous melatonin improves glutathione content, redox state and increases essential oil production in two *Salvia* species under drought stress. *Scientific Reports*, 10(1), 6883. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63986-6>.
- Chance, B., & Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. U: Colowick SP, Kaplan NO (ur.) *Methods in Enzymology*.
- Chiappero, J., del Rosario Cappellari, L., Alderete, L.G.S., Palermo, T.B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, 139, 111553. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111553>.
- Das, D., Bisht, K., Chauhan, A., Gautam, S., Jaiswal, J.P., Salvi, P., & Lohani, P. (2023). Morpho-physiological and biochemical responses in wheat foliar sprayed with zinc-chitosan-salicylic acid nanoparticles during drought stress. *Plant Nano Biology*, 4, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2023.100034>.
- De Sousa Barros, A., de Moraes, S.M., Ferreira, P.A.T., Vieira, Í.G.P., Craveiro, A.A., dos Santos Fontenelle, R.O., & de Sousa, H.A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.004>.
- Elshamy, M.T., Husseiny, S.M., & Farroh, K.Y. (2019). Application of nano-chitosan NPK fertilizer on growth and productivity of potato plant. *Journal of Scientific Research in Science*, 36(1), 424-441. <https://doi.org/10.21608/jsrs.2019.58522>.
- Elshayb, O.M., Ghazy, H.A., Wissa, M.T., Farroh, K.Y., Wasonga, D.O., & Seleiman, M.F. (2024). Chitosan-based NPK nanostructure for reducing synthetic NPK fertilizers and improving rice productivity and nutritional indices. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1464021. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1464021>.
- Giglou, M.T., Giglou, R.H., Esmailpour, B., Azarmi, R., Padash, A., Falakian, M., & Lajayer, H.M. (2022). A new method in mitigation of drought stress by chitosan-coated iron oxide nanoparticles and growth stimulant in peppermint. *Industrial Crops and Products*, 187, 115286. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115286>.
- Gohari, G., Farhadi, H., Panahirad, S., Zareei, E., Labib, P., Jafari, H., & Fotopoulos, V. (2023). Mitigation of salinity impact in spearmint plants through the application of engineered chitosan-melatonin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 893-907. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.175>.
- Ha, N.M.C., Nguyen, T.H., Wang, S.L., & Nguyen, A.D. (2019). Preparation of NPK nanofertilizer based on chitosan nanoparticles and its effect on biophysical characteristics and growth of coffee in green house. *Research on Chemical Intermediates*, 45, 51-63. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3630-7>.
- Haghaninia, M., Javanmard, A., Kahrizi, D., Bahadori, M.B., & Machiani, M.A. (2024a). Optimizing oil quantity and quality of camelina (*Camelina sativa* L.) with integrative application of chemical, nano and bio-fertilizers under supplementary irrigation and rainfed condition. *Plant Stress*, 11, 100374. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100374>.
- Haghaninia, M., Javanmard, A., Mahdavinia, G.R., Shah, A.A., & Farooq, M. (2023). Co-application of biofertilizer and stress-modulating nanoparticles modulates the physiological, biochemical, and yield responses of camelina (*Camelina sativa* L.) under limited water supply. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(4), 6681-6695. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01521-y>.
- Haghaninia, M., Javanmard, A., Radicetti, E., Rasouli, F., Ruiz-Lozano, J.M., & Sabbatini, P. (2024b). Adoption of arbuscular mycorrhizal fungi and biochar for alleviating the agro-physiological response of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) subjected to drought stress. *Plant Stress*, 12, 100461. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100461>.
- Haghaninia, M., Memarzadeh, S., Najafifar, A., Soleimani, F., & Mirzaei, A. (2025). Impact of silicon nanoparticle priming on metabolic responses and seed quality of chia (*Salvia hispanica* L.) under salt stress. *Food Bioscience*, 106119. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106119>.
- Haghaninia, M., Rasouli, F., Javanmard, A., Mahdavinia, G., Azizi, S., Nicoletti, R., & Caruso, G. (2024c). Improvement of physiological features and essential oil content of *Thymus vulgaris* after soil amendment with chitosan nanoparticles under chromium toxicity. *Horticulturae*, 10(6), 659. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10060659>.
- Hajihashemi, S., & Kazemi, S. (2022). The potential of foliar application of nano-chitosan-encapsulated nano-silicon donor in amelioration the adverse effect of salinity in the wheat plant. *BMC Plant Biology*, 22(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03531-x>.
- Hassanpouraghdam, M.B., Abdollahfam, F., Fathi, S., & Mehrabani, L.V. (2023). Foliar application of iron-oxide nanoparticles coated with citral and chitosan enhances the growth and physiological responses of spearmint exposed to salinity stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 130. <https://doi.org/10.1134/S102144372360109X>.

- 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).
- Ibrahim, F.R. (2019). Influence of potassium fertilization and nano-chitosan on growth, yield components and volatile oil production of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) plant. *Journal of Plant Production*, 10(6), 435-442. <https://dx.doi.org/10.21608/jpp.2019.48289>.
- Jabeen, Z., Mahmood, B., Rehman, S., Butt, A.M., & Hussain, N. (2024). Biodegradable glycine betaine encapsulated chitosan nanoparticles induce the expression of antioxidant enzyme genes to improve drought tolerance in maize. *South African Journal of Botany*, 171, 571-582. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.06.012>.
- Jafari, S., Garmdareh, S.E.H., & Azadegan, B. (2019). Effects of drought stress on morphological, physiological, and biochemical characteristics of stock plant (*Matthiola incana* L.). *Scientia Horticulturae*, 253, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.033>.
- Jahanafrooz, Z., Mousavi, M.M.H., Akbarzadeh, S., Hemmatzadeh, M., Maggi, F., & Morshedloo, M.R. (2024). Anti-breast cancer activity of the essential oil from grapefruit mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*). *Fitoterapia*, 174, 105875. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.105875>.
- Khodadadi, F., Ahmadi, F.S., Talebi, M., Moshtaghi, N., Matkowski, A., Szumny, A., & Rahimmalek, M. (2022). Essential oil composition, physiological and morphological variation in *Salvia abrotanoides* and *S. yangii* under drought stress and chitosan treatments. *Industrial Crops and Products*, 187, 115429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115429>.
- Kubavat, D., Trivedi, K., Vaghela, P., Prasad, K., Vijay Anand, G.K., Trivedi, H., & Ghosh, A. (2020). Characterization of a chitosan-based sustained release nanofertilizer formulation used as a soil conditioner while simultaneously improving biomass production of *Zea mays* (L.). *Land Degradation & Development*, 31(17), 2734-2746. <https://doi.org/10.1002/ldr.3629>.
- Li, X., Ahammed, G.J., Zhang, X.N., Zhang, L., Yan, P., Zhang, L.P., & Han, W.Y. (2021). Melatonin-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis and antioxidant defense confer tolerance to arsenic stress in *Camellia sinensis* L. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123922. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123922>.
- Ludwiczuk, A., Kiełtyka-Dadasiewicz, A., Sawicki, R., Golus, J., & Ginalska, G. (2016). Essential oils of some *Mentha* species and cultivars, their chemistry and bacteriostatic activity. *Natural Product Communications*, 11(7), 1934578X1601100736.
- Mahmoud, M.A., & Swaefy, H.M. (2020). Comparison between effect of commercial and nano NPK in presence of nano zeolite on sage plant yield and components under drought stress. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 47(2), 435-457. <https://doi.org/10.21608/zjar.2020.94486>.
- Mahmoud, N., Abdou, M.A., Salaheldin, S., Soliman, W.S., & Abbas, A.M. (2023). The impact of irrigation intervals and NPK/yeast on the vegetative growth characteristics and essential oil content of lemongrass. *Horticulturae*, 9(3), 365. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030365>.
- Mandoulakani, B.A., Eyvazpour, E., & Ghadimzadeh, M. (2017). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 139, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.03.006>.
- Mohammadi, N., Shariatmadari, H., Khademi, H., & Bazarganipour, M. (2020). Coating of sepiolite-chitosan nanocomposites onto urea increases nitrogen availability and its use efficiency in maize. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(7), 884-896. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1643842>.
- Mohasseli, V., & Sadeghi, S. (2019). Exogenously applied sodium nitroprusside improves physiological attributes and essential oil yield of two drought susceptible and resistant specie of *Thymus* under reduced irrigation. *Industrial Crops and Products*, 130, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.058>.
- Mumivand, H., Ebrahimi, A., Morshedloo, M.R., & Shayganfar, A. (2021). Water deficit stress changes in drug yield, antioxidant enzymes activity and essential oil quality and quantity of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Industrial Crops and Products*, 164, 113381. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113381>.
- Napar, W.P.F., Kaleri, A.R., Ahmed, A., Nabi, F., Sajid, S., Ćosić, T., & Gao, Y. (2022). The anthocyanin-rich tomato genotype LA-1996 displays superior efficiency of mechanisms of tolerance to salinity and drought. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153662. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153662>.
- Nikzad, S., Mirmohammady Maibody, S.A.M., Ehtemam, M.H., Golkar, P., & Mohammadi, S.A. (2023). Response of seed yield and biochemical traits of *Eruca sativa* Mill. to drought stress in a collection study. *Scientific Reports*, 13(1), 11157. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38028-6>.
- Raza, M.A.S., Zulfikar, B., Iqbal, R., Muzamil, M.N., Aslam, M.U., Muhammad, F., & Habib-ur-Rahman, M. (2023). Morpho-physiological and biochemical response of wheat to various treatments of silicon nanoparticles under drought stress conditions. *Scientific Reports*, 13(1), 2700. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29784-6>.

- Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., & Mosayebi, Z. (2023). Titanium dioxide nanoparticles improve element uptake, antioxidant properties, and essential oil productivity of *Melissa officinalis* (L.) seedlings under in vitro drought stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(43), 98020-98033. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29384-x>.
- Rezaei-Chiyaneh, E., Mahdavia, H., Alipour, H., Dolatabadian, A., Battaglia, M.L., Maitra, S., & Harrison, M.T. (2023). Biostimulants alleviate water deficit stress and enhance essential oil productivity: A case study with savory. *Scientific Reports*, 13(1), 720. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27338-w>.
- Riseh, R.S., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Varma, R.S. (2024). A review of chitosan nanoparticles: Nature's gift for transforming agriculture through smart and effective delivery mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129522>.
- Sadak, M.S., Tawfik, M.M., & Bakhoum, G.S. (2022). Role of chitosan and chitosan-based nanoparticles on drought tolerance in plants: Probabilities and prospects. In *Role of chitosan and chitosan-based nanomaterials in plant sciences* (pp. 475-501). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85391-0.00013-7>.
- Safari, M., Khorasaninejad, S., & Soltanloo, H. (2024). Involvement of abscisic acid on antioxidant enzymes activity and gene expression in *Lavandula angustifolia* cv. Munstead under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 46(4), 44. <https://doi.org/10.1007/s11738-024-03666-4>.
- Sahu, S., Gautam, S., Singh, A., Lohani, P., Sharma, C., Pathak, P., & Singh, H. (2023). Synthesis and characterization of chitosan-zinc-salicylic acid nanoparticles: A plant biostimulant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127602. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127602>.
- Salem, T.S., El-Sekhary, E.M., Zayed, A.M., El-Mezin, A.I., & Mahghoub, N.A. (2024). Effect of chitosan loaded npk nanoparticles and conventional fertilizers on wheat plant growth parameters and production. *Journal of Soil and Water Sciences*, 9(1), 19-27. <https://dx.doi.org/10.21608/jsws.2024.302453.1007>.
- Sami, M.K., Ali, M.A., Gaber, M.K., Sidky, M., & Farroh, K.Y. (2022). Growth, productivity and quality of sweet basil in relation to minerals, nanoparticles of chitosan for NPK fertilization. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, H. Botany*, 13(2), 179-193. <https://dx.doi.org/10.21608/eajbsh.2022.279576>.
- Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chong, S., Yan, D., & Zheng, B. (2020). Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. *Science of the Total Environment*, 713, 136675. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136675>.
- Sheikhalipour, M., Esmailpour, B., Behnamian, M., Gohari, G., Giglou, M.T., Vachova, P., & Skalicky, M. (2021). Chitosan-selenium nanoparticle (Cs-SeNP) foliar spray alleviates salt stress in bitter melon. *Nanomaterials*, 11(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nano11030684>.
- Soltanbeigi, A., Yıldız, M., Diraman, H., Terzi, H., Sakartepe, E., & Yıldız, E. (2021). Growth responses and essential oil profile of *Salvia officinalis* (L.) Influenced by water deficit and various nutrient sources in the greenhouse. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7327-7335. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.034>.
- Tashakorizadeh, M., Vahabi, M.R., Golkar, P., & Mahdavian, K. (2022). The singular and combined effects of drought and copper stresses on the morphological traits, photosynthetic pigments, essential oils yield and copper concentration of *Fumaria parviflora* Lam. *Industrial Crops and Products*, 177, 114517. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114517>.
- Wang, J., Li, R., Tan, J., & Jiang, Z.T. (2016). Chemical composition of essential oil of grapefruit mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*) from China. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(4), 1047-1050. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.831559>.