Effect of salicylic acid on total phenol, flavonoid, anthocyanin and PAL and TAL enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill) plants

Mohammad Sadegh Maleki, Ali Akbar Ehsanpour *
Departmant of Biology, Faculty of sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract
Tomato is one of the valuable crop plant that is used as a model plant. Salicylic acid leads to the synthesis and accumulation of secondary metabolites such as phenol, flavonoids, lignin and anthocyanin by changing the activity of the key enzymes involved in their biosynthesis pathway. For study of the effect of SA on secondary metabolites and its biosynthesis pathway, the current experiment carried out using 0, 000.1, 00.1, 0.01, 0.1 and 0.5 mM Salicylic acid in MS medium under *in vitro* culture condition. After four weeks, seedlings removed from culture container and were analyzed. Results showed that with increasing of salicylic acid concentration dry and fresh weight of roots and shoot as well as the amount of chlorophyll a and b were increased significantly compared with control plants but they were decreased significantly in some concentrations. The total phenol compounds, flavonoids and anthocyanin, as well as PAL, TAL and Peroxidase activity were also gradually increased by increasing of salicylic acid concentration. The maximum level of these parameters were observed at 0/01 mM salicylic acid. The results suggested that, salicylic acid improved plant growth in optimum levels and decreased pigments and plant weight in toxic levels. Phenolic compounds and biosynthesis enzymes were increased by inductive role of SA against ROS production and oxidative stress.
Keywords: *in vitro*, PAL enzyme, Phenolic compound, Salicylic acid, TAL enzyme Tomato

Archive of SID

* Corresponding Author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شمارهٔ سی و چهارم، زمستان ۱۳۹۶، صفحهٔ ۶۷-۵۵
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز در گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum* (*lycopersicum* Mill)

محمد صادق مالکی، علی‌اکبر احسانپور *
گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده
گیاه گوجه‌فرنگی یکی از گیاهان زراعی است که به‌صورت گیاه مدل در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. هورمون سالیسیلیک اسید سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه را مانند فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین با تغییر در آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آنها در گیاهان موجب می‌شود. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر متابولیت‌های ثانویه و مسیر بیوسنتز آنها، در غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در محیط کشت MS در شرایط کشت بافت انجام شد. پس از چهار هفته رشد، گیاهچه‌ها برای بررسی و اندازه‌گیری شاخص‌ها از شیشه خارج شدند. نتایج نشان دادند با افزایش سالیسیلیک اسید، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین مقدار کلروفیل‌های a، b و کل گیاه تا غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش و سپس کاهش معنی‌داری نسبت به نمونهٔ شاهد نشان دادند. ترکیبات فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز و پراکسیداز نیز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به‌تدریج افزایش یافتند و بیشترین مقدار آنها در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بود. نتایج پیشنهاد می‌کنند سالیسیلیک اسید در غلظت‌های بهینه افزایش رشد و در غلظت‌های زیاد با ایجاد تنش اکسیداتیو کاهش وزن و مقدار رنگیزه‌های گیاه را موجب می‌شود. ترکیبات فنلی و آنزیم‌های بیوسنتزی آن نیز با افزایش سالیسیلیک اسید به دو دلیل افزایش می‌یابند که عبارتند از: ۱- سالیسیلیک اسید بر مقدار ترکیبات یادشده اثر مستقیم می‌گذارد و ۲- این ترکیبات با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در برابر گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده بر اثر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه افزایش می‌یابند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، تیروزین آمونیالیاز، سالیسیلیک اسید، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، کشت در شیشه، گوجه‌فرنگی

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سالیسیلیک اسید ترکیبی فنلی است که در گیاهان به‌صورت اسید فنلی آزاد و در شرایطی به شکل غیرفعال وجود دارد. سالیسیلیک اسید تاثیر چشمگیری بر شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان و مقابله با شرایط تنش‌زای زیستی و غیرزیستی دارد (Arfan *et al.*, 2007؛ Wang *et al.*, 2010). غلظت بهینهٔ سالیسیلیک اسید به چهار عامل گونهٔ گیاه، غلظت استفاده‌شده، نحوهٔ کاربرد و مرحلهٔ نموی بستگی دارد Horváth (Vanacker *et al.*, 2001؛ *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان داده‌اند سالیسیلیک اسید به‌صورت مولکولی پیام‌رسان عمل می‌کند و این نقش با تحریک تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند هیدروژن پراکسید، آنیون سوپر اکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل انجام می‌شود. سالیسیلیک اسید اثری دوجانبه دارد و در غلظت‌های کم با تولید مقادیر کم ROS پیام‌رسانی را در گیاه موجب می‌شود و برای القای پاسخ مقاومتی ضروری است؛ ولی در غلظت‌های زیاد با تولید بیش از حد ROS تنش اکسیداتیو در گیاه می‌کند (Borsani *et al.*, 2001). گیاهان برای مقابله با تنش‌های حاصل از تولید ROS از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل ترکیباتی با وزن مولکولی کم مانند آسکوربات، توکوفرول و ترکیبات فنلی هستند. بسیاری از متابولیت‌های ثانویهٔ فنلی جزء مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مقابله‌کننده با تنش‌های اکسیداتیو هستند (Sharma *et al.*, 2009؛ War *et al.*, 2011). این ترکیبات با آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز ساخته می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز اصلی‌ترین و نخستین آنزیم مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی است که فنیل‌آلانین را به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Randhir *et al.*, 2006). آنزیم تیروزین آمونیالیاز نیز در یکی دیگر از مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات فنلی، تیروزین را به کوماریک اسید تبدیل می‌کند (Berner *et al.*, 2006). بررسی‌های Jacobo-Velázquez و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده‌اند آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد و با بیشترشدن فعالیت ویژهٔ این آنزیم، متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابند. همچنین تجمع گونه‌های فعال اکسیژن با افزایش بیان ژن‌های کدکنندهٔ این آنزیم افزایش می‌یابد. سالیسیلیک اسید می‌تواند با تولید ROS و القای آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز، متابولیت‌های ثانویه را تنظیم کند (Berner *et al.*, 2006؛ Dokhanieh *et al.*, 2013؛ War *et al*, 2011). فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها از بزرگ‌ترین زیرگروه‌های ترکیبات فنلی هستند که از مسیر فنیل پروپانوئیدی ساخته می‌شوند و در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارند (Gill and Tuteja, 2010). پیشنهاد شده است این ترکیبات، جاروب‌کننده‌های ROS در گیاهان هستند (Agati *et al.*, 2012). مطالعات نشان داده‌اند سالیسیلیک اسید به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها اثر می‌گذارد (Kováčik *et al.*, 2009؛ Wang *et al.*, 2015؛ Radwan, 2012). علاوه‌براین، میزان ترکیبات فنلی و پاسخ به تنش اکسیداتیو می‌توانند با آنزیم‌های دیگری مانند پراکسیداز نیز تنظیم شوند.

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم پراکسیداز در جاروب‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن و پلیمریزاسیون پیش‌ماده‌های لیگنین نقش دارد (Cvikrová *et al.*, 2006).

گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* Mill) یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی است که به خانوادهٔ Solanaceae تعلق دارد و در معرض ویروس‌ها، بیماری‌ها و تنش‌های مختلف محیطی و زیستی است. این گیاه به‌صورت الگو در بسیاری از پژوهش‌های زیست‌شناسی و کشاورزی استفاده می‌شود.

باوجود گزارش‌های زیادی که دربارهٔ به‌کارگیری سالیسیلیک اسید در گیاهان منتشر شده است؛ ولی تاکنون بررسی کاملی از اثر تیمار سالیسیلیک اسید بر ترکیبات فنلی و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آنها در گیاه گوجه‌فرنگی ارائه نشده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سالیسیلیک اسیدکه هورمون تنظیم‌کنندهٔ رشد است، بر برخی از شاخص‌های رشد، ترکیبات ثانویه و آنزیم‌های شرکت‌کننده در مسیر سنتز آنها در گیاه گوجه‌فرنگی است.

مواد و روش‌ها

ابتدا بذرهای گیاه گوجه‌فرنگی با هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی‌شده به‌مدت یک ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند. تعداد ۵ بذر روی محیط‌کشت MS در شیشه کشت قرار داده شدند و گیاهچه‌های حاصل روی همین محیط‌کشت تکثیر شدند. پس از یک هفته گیاهچه‌های با رشد یکنواخت روی محیط‌کشت جدید MS حاوی سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار واکشت شدند. در هر شیشه تعداد سه گیاه تقریبا یکسان کشت داده شدند. شیشه‌ها در اتاق رشد در شرایط نوری ۱۶ ساعت، نور و ۸ ساعت، تاریکی، دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۴۴ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهان رشدیافته پس از چهار هفته از شیشه خارج و وزن گیاه، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، فنل کل، فلاونوئید، محتوای آنتوسیانین و فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز و پراکسیداز اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری کلروفیل: برای سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت تازهٔ گیاه در استون ۸۰ درصد (v:v) در محیط تاریک روی یخ ساییده شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل ۵۸۱۰، شرکت Eppendorf، آلمان) شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید استفاده شد. جذب نوری محلول رویی برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید به‌ترتیب در طول‌موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل UV-110، شرکت Shimadzu، ژاپن) خوانده شد. غلظت رنگیزه‌ها با رابطه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد.

رابطهٔ ۱ $Chla = 12.25\ A663.2 - 2.79\ A646.8$

رابطهٔ ۲ $Chlb = 21.21\ A646.8 - 5.1\ A663.2$

رابطهٔ ۳ $ChlT = Chla + chlb$

رابطهٔ ۴ $Car = (1000A470 - 1.8\ chla - 85.02\ Chlb) / 198$

Chla، Chlb، ChlT، Car و A به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ

Archive of SID

www.SID.ir

کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و طول‌موج هستند.

اندازه‌گیری فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز: فعالیت ویژهٔ آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز با روش Beaudoin-Eagan و Thorpe (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازهٔ برگ گیاه در ۲ میلی‌لیتر بافر هیدروکلریک اسید Tris (۰/۰۵ مولار و pH برابر با ۸/۴) حاوی ۲-مرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار ساییده و همگن شد؛ سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی یا همان عصارهٔ آنزیمی استفاده شد. محلول واکنش حاوی فنیل‌آلانین ۶ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین ۵/۵ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم تیروزین آمونیالیاز، ۵۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید-Tris و ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود و حجم نهایی آن به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، واکنش‌های تبدیل تیروزین به کوماریک اسید و تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید با اضافه‌کردن ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد. فعالیت ویژهٔ آنزیم در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر براساس تولید ترانس سینامیک اسید برای آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و در طول‌موج ۳۳۳ نانومتر با تولید کوماریک اسید برای آنزیم تیروزین آمونیالیاز با اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت ویژهٔ آنزیم‌ها برحسب میکرومول فراوردهٔ تولیدشده به‌ازای یک میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه بیان شد.

اندازه‌گیری فنل کل: سنجش محتوای فنل کل با معرف فولین - سیوکالتو و روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. به‌طور خلاصه، ۰/۰۵ گرم از بافت تازهٔ برگ گیاه در ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده و همگن شد و در بن ماری در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت؛ سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی رویی، ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه و محلول به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد؛ سپس ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۱۲ درصد به محلول بالا اضافه شد. پس از ۲ ساعت قرارگرفتن در دمای آزمایشگاه، جذب محلول حاصل در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت فنل براساس میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر بیان شد و از گالیک اسید برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: از روش Pękal و Pyrzynska (۲۰۱۴) برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل استفاده شد. دراین روش با آلومینیوم کلرید و روش رنگ‌سنجی، مقدار فلاونوئید اندازه‌گیری شد. ۰/۰۵ گرم برگ تازهٔ گیاه با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون به‌خوبی ساییده شد؛ سپس عصارهٔ حاصل با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴/۴ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. در مرحلهٔ بعد، ۳۰۰ میکرولیتر سدیم نیتریت ۱۰ درصد، ۳۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۵ درصد و ۴ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به محلول اضافه و شدت جذب در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر

Archive of SID

www.SID.ir

خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید از کوئرسیتین برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد.

اندازه‌گیری آنتوسیانین کل: محتوای آنتوسیانین کل از روش Wagner (۱۹۷۹) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۰۵ گرم از بافت تازهٔ برگ گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: هیدروکلریک اسید، ۱: ۹۹؛ حجمی – حجمی) درون هاون چینی ساییده شد. مخلوط حاصل درون فالکون ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک قرار داده شد؛ سپس عصارهٔ حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. آنتوسیانین کل با ضریب خاموشی (ε) معادل ۳۳۰۰۰ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر با رابطهٔ ۵ محاسبه شد.

رابطهٔ ۵ $A= \varepsilon bc$

A، b و c به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ جذب نوری محلول، عرض کووت (سانتی‌متر) و غلظت محلول مدنظر (میلی‌گرم بر گرم) هستند.

اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژهٔ پراکسیداز: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژهٔ آنزیم پراکسیداز از روش Maehly و Chance (۱۹۵۵) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازهٔ گیاه در ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، PVP (پلی وینیل پیرولیدین) ۲ درصد، DTT (دی تیو تریتول) ۴ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰ درصد ساییده و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه در مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول رویی یا همان عصارهٔ آنزیمی استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار، گایاکول ۰/۰۵ درصد، هیدروژن پراکسید ۰/۱ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. افزایش جذب ناشی از اکسیداسیون گایاکول، در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و ضریب خاموشی ۲۶/۶ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه و برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. هر واحد فعالیت ویژهٔ آنزیمی، مقدار فعالیت آنزیمی است که موجب ۰/۰۱ تغییر در جذب می‌شود.

همهٔ آزمایش‌ها برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. در هریک از تکرارها ۳ گیاه درون شیشهٔ کشت و به‌صورت طرح کاملا تصادفی آزمایش شد. میانگین داده‌های به‌دست‌آمده از سنجش شاخص‌ها با تجزیهٔ واریانس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد با آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) و نرم‌افزار SPSS ازنظر آماری تحلیل و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز و پراکسیداز: باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده از جدول ۱ میزان فعالیت ویژهٔ سه آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز و پراکسیداز با افزایش غلظت تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور تدریجی افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد و بیشترین میزان فعالیت ویژهٔ هر سه آنزیم در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز و پراکسیداز

تیمار	غلظت (میلی‌مولار)	فعالیت ویژهٔ آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (میکرو مول سینامیک اسید بر میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه)	فعالیت ویژهٔ آنزیم تیروزین آمونیالیاز (میکرو مول کوماریک اسید بر میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه)	فعالیت ویژهٔ آنزیم پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین)
سالیسیلیک اسید	۰	۴/۱۷۳^{f}	۲/۴۵۶^{e}	۱۵/۳۲۵^{d}
	۰/۰۰۰۱	۵/۴۲۶^{e}	۲/۶۸۰^{e}	۱۵/۳۱۸^{d}
	۰/۰۰۱	۵/۷۴۶^{d}	۲/۹۷۶^{d}	۱۷/۶۵۷^{c}
	۰/۰۱	۵/۹۵۶^{c}	۴/۳۷۰^{c}	۲۰/۷۵۲^{c}
	۰/۱	۶/۲۶۳^{b}	۴/۹۷۰^{b}	۲۵/۱۴۵^{b}
	۰/۵	۷/۰۴۳۳^{a}	۵/۸۵۰^{a}	۲۷/۳۴۹^{a}

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

اثر سالیسیلیک اسید بر وزن اندام هوایی و ریشه: نتایج نشان دادند مقدار وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار وزن خشک و تر با کاهش نسبتا شدید و معنی‌داری ازنظر آماری در مقایسه با نمونه‌های شاهد همراه بود (جدول ۲).

جدول ۲- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار وزن تر ساقه و ریشه و وزن خشک ساقه و ریشه

تیمار	غلظت (میلی‌مولار)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
سالیسیلیک اسید	۰	۰/۲۴^{c,d}	۰/۱۵^{d}	۰/۰۲۳^{d}	۰/۰۱۴^{d}
	۰/۰۰۰۱	۰/۲۸^{c}	۰/۲۱^{c}	۰/۰۲۹^{c}	۰/۰۱۹^{c}
	۰/۰۰۱	۰/۳۹^{b}	۰/۲۸^{b}	۰/۰۳۹^{b}	۰/۰۲۷^{b}
	۰/۰۱	۰/۴۸^{a}	۰/۳۶^{a}	۰/۰۴۷^{a}	۰/۰۳۶^{a}
	۰/۱	۰/۲۰	۰/۱۱^{d,e}	۰/۰۲^{d}	۰/۰۱۱^{e}
	۰/۵	۰/۰۹^{e}	۰/۰۹^{e}	۰/۰۰۹^{e}	۰/۰۰۸^{e}

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

اثر سالیسیلیک اسید بر فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین: باتوجه‌به جدول ۳، در بررسی حاضر با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، مقدار فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین با الگویی یکسان افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد و بیشترین مقدار این سه ترکیب در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین کل

تیمار	غلظت (میلی‌مولار)	فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر)	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
سالیسیلیک اسید	۰	۵۳/۹۱^{e}	۴/۴۳۹^{f}	۱۰/۹۱۵^{f}
	۰/۰۰۰۱	۵۵/۴۷$^{d.e}$	۴/۸۳۲^{e}	۱۱/۹۸۳^{e}
	۰/۰۰۱	۵۷/۱۶^{d}	۵/۸۱۱^{d}	۱۴/۰۶۳^{d}
	۰/۰۱	۶۴/۱۸^{c}	۶/۶۸۱^{c}	۱۷/۲۶۶^{c}
	۰/۱	۶۹/۱۲^{b}	۷/۸۸۸^{b}	۱۹/۷۹۸^{b}
	۰/۵	۷۴/۴۷^{a}	۸/۷۷۹^{a}	۲۲/۹۱۴^{a}

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج پژوهش حاضر نشان دادند محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و همچنین کاروتنوئید در گیاهچه‌ها با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا غلظت ۰/۱ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین مقدار در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار گزارش شد؛ ولی در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، این رنگیزه‌ها کاهش معنی‌داری در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴- اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید

تیمار	غلظت (میلی‌مولار)	کلروفیل a (میلی‌گرم کلروفیل a بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی‌گرم کلروفیل b بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی‌گرم کلروفیل کل بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی‌گرم کاروتنوئید بر گرم وزن تر)
سالیسیلیک اسید	۰	۰/۴۱۰$^{d.e}$	۰/۲۳۰$^{d.e}$	۰/۶۷۳$^{d.e}$	۰/۲۰۵$^{c.d}$
	۰/۰۰۰۱	۰/۴۶۹^{d}	۰/۲۵۶^{c}	۰/۷۵۳^{d}	۰/۲۲۶^{c}
	۰/۰۰۱	۰/۷۸۶^{b}	۰/۳۸۳^{b}	۱/۱۷۰^{b}	۰/۲۹۰^{b}
	۰/۰۱	۱/۱۹۳^{a}	۰/۵۱۶^{a}	۰/۱۷۱^{a}	۰/۳۶۶^{a}
	۰/۱	۰/۶۲۳^{c}	۰/۲۸۱^{c}	۰/۹۰۳^{c}	۰/۲۶۳^{b}
	۰/۵	۰/۴۰۳^{e}	۰/۱۸۹^{e}	۰/۵۹۳^{e}	۰/۱۹۰^{d}

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

بحث

یکی از شاخص‌های مهم جهت تحلیل چگونگی پاسخ و عکس‌العمل گیاه نسبت به تنش‌ها ازجمله تنش شوری میزان رشد گیاه می‌باشد که با اندازه‌گیری وزن تر و خشک به‌عنوان شاخص‌های مطلوب پاسخ‌های گیاه ارزیابی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

در پژوهش حاضر، وزن تر و خشک اندام هوایی شامل ساقه و برگ و همچنین ریشه با نشان‌دادن الگویی کم‌وبیش مشابه، در ابتدا در غلظت‌های کم سالیسیلیک اسید افزایش و سپس در غلظت‌های زیاد، کاهش معنی‌داری نشان دادند. باتوجه‌به آثار سالیسیلیک اسید پیش‌بینی می‌شود این افزایش وزن به‌دلیل بیشترشدن تعداد ریشه‌ها، شاخه‌های جانبی و برگ‌های ایجادشده یا افزایش طول ساقه و ریشه در گیاهان تیمارشده با سالیسیلیک اسید باشد. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش مقدار وزن تر و خشک گیاه در تنش در غلظت‌های بهینهٔ سالیسیلیک اسید وجود دارند که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کنند (Hayat *et al*., 2005؛ Khan *et al*., 2003؛ Hussein *et al*., 2007). کاهش مقدار وزن تر و خشک در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در پژوهش حاضر می‌تواند به دلیل تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه و احتمالا القای تنش اکسیداتیو و اثر منفی آن بر روند رشدونمو گیاه باشد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئید در مجموعهٔ فتوسنتزی نقش دارند و شاخصی مهم برای رشد گیاه معرفی شده‌اند (Bekheta *et al*., 2008). در پژوهش حاضر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در غلظت‌های کم سالیسیلیک اسید افزایش یافت؛ ولی در ادامه در غلظت‌های تنش‌زای این تیمار، محتوای این رنگدانه‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد. سالیسیلیک اسید در غلظت‌های کم با مهار تجزیهٔ کلروفیل با آنزیم کلروفیلاز افزایش این رنگدانه را در گیاه موجب می‌شود (Belkhadi *et al*., 2010). به نظر می‌رسد افزایش کلروفیل در غلظت کم سالیسیلیک اسید می‌تواند به همین دلیل باشد. برخی از پژوهشگران نیز نتایج مشابهی در تیمار سالیسیلیک اسید به دست آورده‌اند (Fariduddin *et al*., 2003؛ Ghai *et al*., 2002؛ Gharib, 2006). در غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید با تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن که نقش مولکول‌های پیام‌رسان را دارند، رشد گیاه متوقف می‌شود. این تنش، تجزیهٔ کلروفیل و کاهش سنتز این رنگدانه‌ها را موجب می‌شود. مطالعات Rao و همکاران (۱۹۹۷) در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) و آرابیدوپسیس و همچنین مطالعات Moharekar و همکاران (۲۰۰۳) در گیاه لوبیاچیتی نشان داده‌اند در غلظت‌های سمی سالیسیلیک اسید، کلروفیل کاهش می‌یابد؛ بنابراین شاید بتوان کاهش کلروفیل را در پژوهش حاضر با نتایج گزارش‌شدهٔ سایر پژوهش‌ها تفسیر و نتایج مشابه با آنها را تأیید کرد. کاروتنوئیدها نقش محافظتی در مجموعهٔ فتوسنتزی و آثار مهاری بر پراکسیداسیون لیپیدها دارند و تنش اکسیداتیو را در گیاه کاهش می‌دهند (Koyro, 2006).

گزارش‌ها نشان داده‌اند سالیسیلیک اسید مقدار کاروتنوئید را در گیاه گندم افزایش می‌دهد (Moharekar *et al*., 2003). پژوهش حاضر نشان می‌دهد کاهش محتوای کاروتنوئید در غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌دلیل تنش اکسیداتیو و استفادهٔ گیاه از سازوکارهای دفاعی دیگر باشد. باتوجه‌به‌اینکه کاروتنوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های ضعیفی هستند، پیش‌بینی می‌شود در پژوهش حاضر، گیاه گوجه‌فرنگی در تنش شوری شدیدتر، از سازوکارهای کمکی دیگری مانند تجمع پرولین، قند، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و

Archive of SID

www.SID.ir

آبسیزیک اسید برای مقابله با تنش استفاده می‌کند. سایر پژوهشگران نیز در بررسی‌های مشابه این سازوکارها را گزارش کرده‌اند Sairam and Srivastava, 2002). ترکیبات فنلی نقش مهمی در پاک‌کردن گونه‌های اکسیژن آزاد ایفا می‌کنند و در تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه تجمع می‌یابند.

در پژوهش حاضر، ترکیبات فنلی مانند فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین تیمارشده با سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان دادند. این افزایش می‌تواند به‌دلیل تولید ROS توسط سالیسیلیک اسید باتوجه‌به نقش آن در پیام‌رسانی در گیاه باشد. مطالعات قبلی نیز افزایش فنل کل را در تیمار سالیسیلیک اسید گزارش کرده‌اند (Guleria *et al*., 2005). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از سازوکارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی دارند و جاروب‌کنندهٔ گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Ali *et al*., 2006). افزایش این ترکیبات در تیمار با سالیسیلیک اسید در بررسی‌های سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Pérez-Balibrea *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2013).

افزایش ترکیبات فنلی با القای فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز که آنزیم‌های کلیدی در تولید این ترکیبات هستند با تیمار سالیسیلیک اسید رخ می‌دهد (Beaudoin-Eaga and Thorpe 1985). سنتز ترکیبات فنلی با دآمیناسیون فنیل‌آلانین و تیروزین در مسیر فنیل پروپانوئید انجام می‌شود و ترانس سینامیک اسید از فنیل‌آلانین و کوماریک اسید از تیروزین تولید می‌شود (Dixon and Paiva, 1995). این آنزیم‌ها با ROS حاصل از تنش‌ها القا می‌شوند (Solecka and Kacperska, 2003). در پژوهش حاضر میزان فعالیت ویژهٔ این دو آنزیم و ترکیبات فنلی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید افزایش یافت. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز در میوه‌جات و سبزی‌ها افزایش می‌یابد (Chen *et al*., 2006؛ Thulke and Conrath, 1998). در گزارش‌های دیگر، همبستگی مثبت بین فعالیت این آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی اثبات شده است Koushesh *et al*., (2012). ارتباط بین فعالیت این آنزیم‌ها، سالیسیلیک اسید و فنل بیان‌کنندهٔ نقش تنظیمی سالیسیلیک اسید در سنتز فنل‌ها است (Chen *et al*., 2006).

آنزیم پراکسیداز در اکسیداسیون پیش‌ماده‌های ترکیبات فنلی، ساخت لیگنین و همچنین در مقابله و حذف رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Ali *et al*., 2006؛ Kováčik *et al*., 2008؛ Rice-Evans *et al*., 1996). در پژوهش حاضر میزان فعالیت ویژهٔ این آنزیم در تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. پژوهش‌های قبلی، تجمع ترکیبات فنلی توسط سالیسیلیک اسید و افزایش میزان فعالیت ویژهٔ آنزیم پراکسیداز را اثبات کرده‌اند و ارتباط مستقیم را بین آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی نشان داده‌اند (Shi and Zhu, 2008؛ Mutlu *et al*., 2009). باتوجه‌به‌اینکه آنزیم پراکسیداز در حذف ROS حاصل از تنش و در سنتز فنل‌ها و لیگنین در سلول‌های گیاهی نقش دارد، چنین استنباط می‌شود که فعالیت پراکسیداز می‌تواند از این روش به افزایش مقاومت گیاه به تنش منجر شود.

Archive of SID

www.SID.ir

جمع‌بندی

باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده نتیجه‌گیری می‌شود سالیسیلیک اسید در غلظت‌های کم، مقدار وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین محتوای کلروفیل a، b و کل را افزایش می‌دهد که بیشترین افزایش در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار بود؛ سپس با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار، این شاخص‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به نمونهٔ شاهد نشان دادند که بیان‌کنندهٔ وابستگی سالیسیلیک اسید به غلظت است و احتمالا سالیسیلیک اسید درغلظت‌های سمی با ایجاد تنش اکسیداتیو، کاهش رشد را موجب می‌شود. ترکیبات فنلی و آنزیم‌های بیوسنتزی آنها نیز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به‌تدریج افزایش یافتند. این افزایش می‌تواند به‌دلیل اثر مستقیم سالیسیلیک اسید بر این ترکیبات و آنزیم‌ها و مسیرهای بیوسنتزی آنها و همچنین نقش غیرمستقیم و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها دربرابر تنش اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS به‌وسیلهٔ سالیسیلیک اسید باشد. اگرچه بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در غلظت های زیاد سالیسیلیک اسید به دست آمد، باتوجه‌به‌اینکه بیشترین مقدار وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی که شاخص‌های مهم و حیاتی گیاه هستند در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به دست آمدند، این غلظت در پژوهش حاضر، غلظت بهینهٔ سالیسیلیک اسید انتخاب شد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه اصفهان بابت حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

References

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Massimiliano, T. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. Plant Science 196: 67-76.

Ali, M. B., Khatun, S., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis orchid* and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. Plant Growth Regulation 49: 137-146.

Arfan, M., Athar, H. R. and Ashraf, M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? Journal of Plant Physiology 164: 685-694.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-9.

Beaudoin-Eagan, L. D. and Thorpe, T. A. (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiology 78: 438-441.

Bekheta, M., Abbas, S., El-Kobisy, O. and Mahgoub, M. H. (2008) Influence of selenium and paclobutrazole on growth, metabolic activities and anatomical characters of *Gebera Jasmonii* L.. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2: 1284-1297.

Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, Z., Barhoumi, M., Zarrouk, W., Chaibi, W. and Djebali, W. (2010) Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L.. Ecotoxico.logy and Environmental Safety 73: 1004-1011.

Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente , A., Muller, R. and Bechthold, A.(2006) Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis* Journal of Bacteriology 188: 2666-2673.

Archive of SID

www.SID.ir

Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M. A.(2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology, 126: 1024-1030.

Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Qiu-Hong, P., Ji-Cheng, Z., Jing-Ming, L., Si-Bao, W. and Wei-Dong, H. (2006) Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Postharvest Biology and Technology 40: 64-72.

Cvikrová, M., Malá, J., Hrubcová, M. and Eder, J. (2006) Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascocalyx abietina* infected Norway spruces. Plant Science 170: 563-570.

Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7: 1085-1098.

Dokhanieh, A. Y., Aghdam, M. S., Fard, J. R. and Hassanpour, H. (2013) Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. Scientia Horticulturae 154: 31-36.

Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A. (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica 41: 281-284.

Ghai, N., Setia, R. and Setia, N. (2002) Effects of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brassica napus* L. Phytomorphology 52: 83-87.

Gharib, F. (2006) Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. International Journal of Agricultural and Biological 4: 485-492.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Guleria, S., Sohal, B. and Mann, A. (2005) Salicylic acid treatment and/or Erysiphe polygoni inoculation on phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase content and accumulation of phenolics in pea leaves. Journal of Vegetable Science 11: 71-79.

Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B. and Ahmad, A. (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. Acta Agronomica Hungarica 53: 433-437.

Horváth, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation 26: 290-300.

Hussein, M., Balbaa, L. and Gaballah, M. (2007) Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3: 321-328.

Jacobo-Velázquez, D. A., Martínez-Hernández, G. B., del, C., Rodríguez, S., Cao, C. M. and Cisneros-Zevallos, L. (2011) Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 6583-6593.

Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D. L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. Journal of Plant Physiology 160: 485-492.

Koushesh, M., Arzani, K. and Barzegar, M. (2012) Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 8947-8953.

Kováčik, J., Bačkor, M. and Kadukova, J. (2008) Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to cadmium and copper excess. Environmental Toxicology 23: 123-130.

Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Strnad, M. and Repcak, M. (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla*

Archive of SID

www.SID.ir

plants. Plant Cell Reports 28: 135-143.

Koyro, H. W. (2006) Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* L.. Environmental and Experimental Botany 56: 136-146.

Kumar, D., Mishra, D. S., Chakraborty, B. and Kumar, P. (2013) Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. Journal of Food Science and Technology 50: 797-802.

Maehly, A. C. and Chance, B. (1955) The assay of catalases and peroxidases. Methods Biochemical Analysis. 1: 357-424

Moharekar, S., Lokhande, S., Hara, T., Tanaka, R. and Chavan, P. D. (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. Photosynthetica 41: 315-317.

Mutlu, S., Atici, Ö. and Nalbantoglu, B. (2009) Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. Biologia Plantarum 53: 334-338.

Pękal, A. and Pyrzynska, K. (2014) Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Analytical Methods 7: 1776-1782.

Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A. and García-Viguera, C. (2011) Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Food Chemistry 129: 35-44.

Radwan, D. E. M. (2012) Salicylic acid induced alleviation of oxidative stress caused by clethodim in maize (*Zea mays* L.) leaves. Pesticide Biochemistry and Physiology 102: 182-188.

Randhir, R., Vattem, D. A. and Shetty, K. (2006) Antioxidant enzyme response studies in H_2O_2-stressed procine muscle tissue folloeing treatment with fava bean sprout extract and L-DOPA. Journal of Food Biochemistry 30: 671-698.

Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P. and Watkins, C. B. (1997) Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H_2O_2). Plant Physiology 115: 137-149.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 20: 933-956.

Sairam, R. and Srivastava, G. (2002) Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science 162: 897-904.

Sharma, H., Sujana, G. and Rao, D. M. (2009) Morphological and chemical components of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of pigeonpea. Arthropod-Plant Interactions 3: 151-161.

Shi, Q. and Zhu, Z. (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environmental and Experimental Botany 63: 317-326.

Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Solecka, D. and Kacperska, A. (2003) Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. Physiologia Plantarum 119: 253-262.

Thulke, O. and Conrath, U. (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. The Plant Journal 14: 35-42.

Vanacker, H., Lu, H., Rate, D. N. and Greenberg, J. T. (2001) A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. The Plant Journal 28: 209-216.

Archive of SID

www.SID.ir

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology 64: 88-93.

Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Lie, G. J., Cheng, J. S., Lou, H. B. and Li, S. H. (2010) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. Plant Biology 10: 1-15.

Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J. and Jiang, W. (2015) The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. Scientia Horticulturae 181: 113-120.

War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y. and Ignacimuthu, S. (2011) Jasmonic acid-mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera*. Journal of Plant Growth Regulation 30: 512-523.

Archive of SID

www.SID.ir