

تأثیر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر میزان فنول، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی نعنای فلفلی

مریم آب پیکر^۱، صالحه گنجعلی^{۲*}، لیلا فهمیده^۳، فروزان حیدری^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

* مسئول مکاتبه: Saleheganjali@uoz.ac.ir

DOI: 10.22034/csrar.2021.288792.1095

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

چکیده

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از گیاهان دارویی معطر متعلق به تیره نعناعیان می‌باشد و با توجه به اهمیت خاصیت دارویی این گیاه، تأثیر محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی تعدادی از ویژگی‌های نعناع فلفلی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل به اجرا درآمد. به منظور پیاده‌سازی طرح مورد نظر، محلول پاشی سالیسیلیک اسید با سطوح صفر، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و طی دو مرحله محلول پاشی صورت گرفت. ابتدا بعد از گذشت ۸ هفته پس از کاشت استولون‌ها و در ادامه بعد از گذشت ۱۴ روز پس از اولین محلول پاشی مرحله دوم آن انجام شد. صفات مورد اندازه‌گیری در این پژوهش شامل میزان فنول، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پرولین کل و همچنین برخی صفات فیزیولوژیک دیگر از جمله کربوهیدرات، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات اکسیداز، پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز و رنگیزه‌های فتوسنتزی بود. با آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده شد که تیمار گیاه نعنای با سطوح مختلف سالیسیلیک اسید روی اغلب صفات مورد بررسی به جز کربوهیدرات تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0.01$) داشته است. سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تأثیر افزایشی را بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد سنجش نشان داد. با توجه به نتایج حاصل شده از این پژوهش به نظر می‌رسد محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی گیاهان دارویی به‌ویژه گیاه نعنای فلفلی می‌تواند باعث افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، تنظیم‌کننده‌های اسمزی و رنگیزه‌های فتوسنتزی شده و به عنوان یک روش امیدبخش و مقرون به‌صرفه به منظور افزایش محتوی متابولیت‌های ثانویه و بهبود خاصیت دارویی این گیاه به کار رود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، صفات فیزیولوژیک، گیاه دارویی

مقدمه

نعناع فلفلی گیاهی چندساله با ساقه‌های چهارگوش و برگ‌های متقابل به رنگ سبز معطر که بیضی شکل بوده و کمی پوشیده از کرک با حاشیه‌ی دنداندار می‌باشد. این گیاه بومی مناطق معتدله به‌ویژه اروپا، امریکای شمالی و شمال آفریقا به شمار می‌رود که امروزه در سراسر دنیا گسترش یافته و کشت می‌گردد (Singh et al., 2015).

منتول و منتون اصلی‌ترین اجزاء اسانس نعنای می‌باشند (Dai et al., 2010). مقدار منتول معیار اصلی در تعیین کیفیت اسانس نعنای فلفلی می‌باشد (Kumar et al., 2004). خواص ضد باکتری و قارچی (Singh et al., 2011; Dai et al., 2009; Eteghad et al., 2010)، ضد ویروسی (Mimica-Seun-Ah et al., 2008)، آنتی‌اکسیدانی (Dukic et al., 2008)

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به‌عنوان روش درمان در جوامع محلی مطرح بوده است (Fitzgerald et al., 2020). این گیاهان به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه همچون اسانس‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای در علوم پزشکی و داروسازی برخوردارند. نعنای فلفلی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی بوده و تولید سالانه‌ی اسانس آن در جهان به حدود ۴۰۰۰ تن می‌رسد که تولیدکننده عمده آن کشور آمریکا می‌باشد (Rita and Animesh, 2011). نعنای فلفلی با نام علمی *Menthe piperita* L. گونه‌ای هیبرید از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatic* و *Menthe spicata* است که متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد (Doymaz., 2006).

تحت تنش خشکی موجب بهبود صفات فیزیولوژیکی گیاه شده و مقاومت گیاه به شرایط تنش را افزایش می‌دهد. همچنین گزارش شده است که ترکیبات فنولیکی سالیسیلیک اسید موجب تسهیل در جذب عناصر غذایی می‌شوند و نقش مثبتی در فعالیت‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های مربوط با فتوسنتز دارند و سبب شکل‌گیری پکتین دیواره سلولی، انتقال قندها و آنزیم‌ها می‌شوند (Mashayekhi and Atashim, 2012).

با بررسی تأثیر سالیسیلات بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نعنای فلفلی تحت تنش خشکی گزارش شده است که سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب بهبود اکثر صفات فیزیولوژیکی شامل شاخص کلروفیل، محتوای نسبی آب، کلروفیل a, b و کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، محتوای فنول و فلاونوئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، نشت یونی و مالون دی‌آلدید گردید (Shahrivar et al., 2019). همچنین با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، قندهای محلول، رنگرزه‌های فتوسنتزی و اسانس گیاه دارویی نعنای فلفلی در واکنش به محلول پاشی سالیسیلیک اسید و تنش منگنز، عنوان شده است که افزایش فعالیت آنزیم APX و محتوای پرولین، پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه نعنای فلفلی در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از منگنز بوده و در مقابل سالیسیلیک اسید به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد در تعدیل میزان اثرات تنش منگنز بر گیاه نعنای فلفلی، نقش مؤثری ایفا می‌کند (Rasouli et al., 2016). تأثیر تنش کمبود آب و سالیسیلیک اسید بر برخی صفات رشدی، رنگرزه‌های فتوسنتزی و عملکرد اسانس نعنای فلفلی نیز نشان داد که به‌کارگیری سالیسیلیک اسید سبب بهبود خصوصیات کمی و کیفی نعنای فلفلی تحت تنش کمبود آب می‌شود (Fattahi Siahkamari et al., 2020). با بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مانند سالیسیلیک اسید و ایندول استیک اسید بر تولید اسانس و مواد مؤثره نعنای فلفلی و بادنجه‌بویه (*Melissa officinalis* L.) مشخص شده است که استفاده از تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید ۱۰ میلی‌مولار و ایندول استیک اسید ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، در بالا بردن میزان کمی و کیفی اسانس گیاهان بهترین عملکرد را داشته است (Ahmadi et al., 2018).

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف به دلیل داشتن ترکیبات مؤثره سابقه طولانی داشته که این

ضد تومور و ضد حساسیتی (Kumar et al., 2004) در این گیاه تاکنون به اثبات رسیده است. عصاره الکلی این گیاه دارای ترکیبات تاننی و فلاونوئید بوده، درحالی‌که فاقد ترکیبات گلیکوزیدی، ساپونین، مشتقات آنتراکینون و آلکالوئیدها می‌باشد (Pramila et al., 2012). با توجه به اینکه که گیاهان دارویی از جمله نعنای فلفلی محصولی کیفی محسوب می‌شوند، بنابراین به‌کارگیری فاکتورهای زراعی مناسب در جهت افزایش کمی و کیفی عملکرد این گیاه می‌تواند حائز اهمیت فراوانی باشد. استفاده بی‌رویه از زمین‌های کشاورزی با به‌کارگیری مداوم و مخرب کود شیمیایی به طور قابل توجهی بر سلامت خاک و رشد محصولات تأثیر گذاشته است (Iqbal et al., 2020). در این میان استفاده از ترکیباتی که بتواند مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش داده و همچنین موجب بهبود فعالیت‌های متابولیسم گیاه شود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. از جمله این ترکیبات می‌توان به سالیسیلیک اسید اشاره نمود که از ترکیبات فنولی بوده و در گیاهان مختلف در سلول‌های ریشه تولید شده و به‌عنوان ماده‌ای شبه هورمونی نقش مهم در رشد و نمو گیاهان دارد (Khan et al., 2015).

سالیسیلیک اسید این توانایی را دارد که ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تحت تنش‌های غیر زیستی را کنترل و سبب مقاومت آن‌ها در برابر بیماری‌ها شود (Hashempour et al., 2014). همچنین در تنش‌های غیر زیستی خصوصاً تنش خشکی، سالیسیلیک اسید موجب افزایش محتوای رنگرزه‌ها در گیاه می‌شود (Ghai et al., 2002). به‌طور کلی مکانیسم عمل سالیسیلیک اسید در برابر تنش‌ها را می‌توان این‌گونه توصیف نمود که سالیسیلیک اسید با تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات دارای گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه، از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، این توانایی را دارد که بتواند گیاه را از صدمات جبران‌ناپذیر ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو حفظ نماید (Ghorbani et al., 2011). به‌طور کلی سالیسیلیک اسید نقش سیگنالی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه ایفا می‌کند. بررسی‌ها نشان داده است که محلول پاشی برگ سالیسیلیک اسید با افزایش محتوای رطوبت نسبی برگ، منجر به حفظ تورم و حجم برگ گردیده و غشای سلولی را محافظت می‌کند (Colom and Vazzana, 2003). همچنین با افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و حفظ آن‌ها

تعیین مقدار ترکیبات فنول کل

برای سنجش مقادیر ترکیبات فنول کل، یک گرم از برگ‌های تازه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲ دقیقه ساییده و محلول حاصله با کاغذ صافی، صاف می‌گردد. در ادامه به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده ($1:10 \text{ g ml}^{-1}$)، ۵ میلی‌لیتر فولین رقیق شده (با نسبت ۱۰:۱۰ رقیق شده با آب مقطر) و ۴ میلی‌لیتر Na_2CO_3 یک مولار اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند و جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی (500 mg.l^{-1} -۰) از اسید گالیک در متانول تهیه و منحنی و معادله خط به دست آمد (McDonald *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی

به منظور بررسی قابلیت جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، ابتدا ۴۰ میلی‌گرم عصاره گیاهی در ۲۵ میلی‌لیتر متانول حل گردید. از این محلول سه غلظت ۱۶، ۳۲ و ۴۰ میکرولیتر برداشته و با DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مول) به حجم ۴ سی‌سی رسانده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر انجام گردید (Burits and Bucar, 2000).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

به منظور استخراج عصاره آنزیمی، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت سبز برگ با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات پتاسیم (۱۰۰ میلی‌مولار، $\text{pH}=7$) در هاون چینی ساییده شده و بعد عبور از کاغذ صافی، ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و سپس فاز رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. میزان فعالیت‌های آنزیمی کاتالاز (Beers and Sizer, 1952)، پلی‌فنول اکسیداز (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990)، گاباکول پراکسیداز (Fielding and Hall, 1978) و آسکوربات پراکسیداز (Yoshimura *et al.*, 2000) نیز مورد سنجش قرار گرفت.

اندازه‌گیری پرولین

به منظور تعیین میزان پرولین، روش بیتز و همکاران (۱۹۷۳) به کار گرفته شد. به این صورت که 0.1 g از نمونه برگ با ۵ میلی‌لیتر

ترکیبات، اثرات جانبی کم‌تری نسبت به داروهای شیمیایی دارند (Sucha and Tomsik, 2016)؛ بنابراین هدف اصلی این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر میزان تولید فنول، فلاونوئید، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نعنای فلفلی می‌باشد تا بتوان بهترین سطوح محلول پاشی سالیسیلیک اسید در جهت افزایش ماده مؤثره این گیاه دارویی پرکاربرد و مهم را به دست آورد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در سال ۹۸-۱۳۹۷ با هدف بررسی اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر صفات با ارزش نعنای فلفلی در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل به اجرا درآمد. برای این منظور از طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج سطح سالیسیلیک اسید (صفر، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) در ۳ تکرار استفاده شد. در ابتدا استولون‌های نعنای از مجموعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شدند و سپس به تعداد ۳-۴ عدد از آن‌ها در گلدان‌هایی با ابعاد ۲۰ در ۲۵ سانتی‌متر حاوی مخلوط مساوی از خاک‌برگ و هوموس در عمق یک سانتی‌متر کشت گردیدند. تیمار سالیسیلیک اسید در دو مرحله اجرا شد، ابتدا پس از گذشت ۸ هفته از استقرار گیاهان در گلدان‌ها، اولین دوره محلول پاشی صورت گرفت و در ادامه بعد از گذشت ۱۴ روز از اولین مرحله اعمال تیمار، مجدداً به وسیله اسپری معمولی روی استولون‌ها با غلظت‌های مورد نظر از سالیسیلیک اسید محلول پاشی شد. حدود ۳ هفته بعد از محلول پاشی، نمونه‌های برگ گیاهی برای بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برداشت شدند (Fahmideh and Mahmoodi, 2017).

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل، با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد (Chang *et al.*, 2002). به این منظور عصاره‌های متانولی گیاه، جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط، سپس محلول‌ها ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده و نهایتاً در طول موج ۴۱۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت انجام تجزیه آماری، پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها و مفروضات تجزیه واریانس، تجزیه واریانس انجام گردید. جهت مقایسه میانگین آزمون چند دامنه دانکن ($P \leq 0.05$) به کار گرفته شد. برای تجزیه آماری داده‌ها از نسخه ۹/۱ نرم‌افزار SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

گزارش‌های متعددی از تأثیر سالیسیلیک اسید بر افزایش عملکرد از طریق تأثیرگذاری روی صفات مختلف فیزیولوژیکی برخی گیاهان مانند نعنای فلفلی، سویا، لوبیا چشم‌بلبلی، ریحان و مرزنجوش و نخودفرنگی وجود دارد (Rasouli *et al.*, 2013; Kordi *et al.*, 2016). سالیسیلیک اسید ترکیبی فنولی و شبه هورمونی بوده که به عنوان یک پیام‌رسان مولکولی در پاسخ‌های گیاهان به عوامل محیطی نقش ایفا می‌کند. این ماده فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان را تنظیم کرده، می‌تواند عوارض جانبی شرایط تنش‌زا را کاهش دهد (Habibi *et al.*, 2015; Shekari *et al.*, 2010; Eskandari Zanjani *et al.*, 2013).

فنول و فلاونوئید کل

با بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که تیمار نعنای فلفلی توسط سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل در سطح یک درصد اثر معنی‌داری دارد. مقایسات میانگین داده‌ها نیز مشخص نمود که غلظت فلاونوئید کل در شرایط تیمار با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد از ۰/۹۶ به ۱۱/۶۴ میلی‌گرم در گرم عصاره افزایش یافته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش سطوح تیمار، غلظت فلاونوئید کل نیز در گیاه نعنای فلفلی افزایش یافته که نشان‌دهنده نقش اثر محرک سالیسیلیک اسید برای تولید فلاونوئید می‌باشد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که به‌کارگیری سالیسیلیک اسید باعث افزایش فنول کل در گیاه نعنای فلفلی شده که نسبت به تیمار شاهد این اختلاف کاملاً معنی‌دار می‌باشد. بیشترین افزایش مقدار فنول در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام رؤیت شد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۱۰۰ پی‌پی‌ام از میزان تولید فنول کل کاسته شد (جدول ۲). با توجه به خروجی داده‌های پژوهش، استفاده از سالیسیلیک

اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ در هاون ساییده و از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شد. داخل ۲ میلی‌لیتر محلول به‌دست‌آمده، ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر اسید نین هیدرین افزوده و ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. در نهایت ۶ میلی‌لیتر تولوئن افزوده‌شده و میزان جذب نور در ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گرفته شد (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری کاروتنوئید و کلروفیل a, b

اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و کلروفیل a و b با روش لیچ تنتالر (۱۹۸۷) انجام شد. به این صورت که ۰/۰۵ گرم از برگ‌های فریز شده در هاون با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز روئی نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. کلروفیل کل نیز از مجموع کلروفیل a و b به دست آمد (Lichtenthaler, 1987).

$$a \text{ کلروفیل} = (12/25 A_{663.2} - (2/79 A_{646.8}) \times V/1000 \times W \quad (1)$$

$$b \text{ کلروفیل} = (21/21 A_{646.8} - (5/1 A_{663.2}) \times V/1000 \times W \quad (2)$$

$$\text{کلروفیل کل} = a \text{ کلروفیل} + b \text{ کلروفیل} \quad (3)$$

$$\text{کاروتنوئید} = (1000 A_{470} - 1/8 \text{ chla} - 1/2 \text{ chlb})/198 \quad (4)$$

در روابط فوق A طول موج جذب اسپکتروفتومتر، V حجم عصاره مورد استفاده برای سنجش توسط اسپکتروفتومتر، W وزن ماده گیاهی مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید است. غلظت برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی تعیین شد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌ها

به‌منظور تعیین میزان کربوهیدرات نمونه‌ها ابتدا ۰/۲ گرم از بافت تر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۵٪ در لوله آزمایش، داخل بن ماری در دمای ۸۰ درجه به مدت یک ساعت گرما‌گذاری شده و پس از سرد شدن به یک میلی‌لیتر از نمونه، ۱ میلی‌لیتر فنول ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. سپس در طول موج ۴۸۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد (Irrigoyen *et al.*, 1992).

گایکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز

نتایج حاصل از مقایسات میانگین داده‌ها نیز حاکی از آن بود که تیمار سالیسیلیک اسید فقط در دوزهای بالا می‌تواند محرک خوبی برای تولید آسکوربات پراکسیداز باشد و در دوزهای پایین‌تر از ۱۰ پی‌پی‌ام تأثیر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نمی‌دهد (جدول ۲). همان‌طور که از جدول ۱ مشخص است، تجزیه واریانس داده‌ها نشان از تأثیر معنی‌دار ($p \leq 0.01$) سالیسیلیک اسید بر میزان گایکول پراکسیداز دارد. نتایج مقایسات میانگین داده‌ها نیز حاکی از تأثیر مثبت تیمار انجام‌یافته بر افزایش میزان گایکول پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد بود (جدول ۲). به‌عبارت‌دیگر با افزایش سطوح سالیسیلیک اسید تا ۵۰ پی‌پی‌ام، غلظت گایکول پراکسیداز نیز افزایش‌یافته است ولی این روند از غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام به ۱۰۰ پی‌پی‌ام باعث کاهش تولید گایکول شده است (جدول ۲).

بر اساس نتایج حاصل به‌دست‌آمده استفاده از محلول پاشی سالیسیلیک اسید باعث افزایش مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گایکول پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات، پلی‌فنول اکسیداز) در گیاه نعنای گردید. در مطالعه اثر سالیسیلیک اسید بر سیستم آنتی‌اکسیداتیو چند رقم انگور پس از اعمال سرما، نتایج نشان داده است که وقتی این ماده در غلظت‌های مناسب میلی مولار اعمال می‌شود، این هورمون باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی‌اکسیدان بافت‌های گیاهی از طریق فعال کردن آنزیم‌های اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود (Habibi, 2012).

اسید در غلظت‌های بالای ۱۰ میلی‌مولار باعث افزایش میزان فلاونوئید و فنول کل نسبت به نمونه شاهد شد. نتایج سایر مطالعات نیز حاکی از آن است که دوزهای پایین سالیسیلیک اسید، گیاهان را برای دفاع سلولی، جهت تحریک و القای ترکیبات دفاعی خاص (مانند فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی، ایزو گلیکوزیدهای سیانوژنیک و ...) آماده می‌سازد. این درحالی هست که دوزهای بالاتر این ترکیب، می‌تواند به‌طور مستقیم جهت القای شدیدتر همان ترکیبات دفاعی مؤثر باشند. استفاده از سالیسیلیک اسید در میوه گیاه هلو می‌تواند فنول کل، محتوای فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رادیکال آزاد را افزایش دهد (Malamy *et al.*, 1992). تحقیقاتی در رابطه با محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی نعنای فلفلی نشان دهنده افزایش میزان فلاونوئید و فنول کل بوده است (shahrivar *et al.*, 2019). همان‌طور که از نتایج این پژوهش مشخص می‌باشد، تیمار با سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان ترکیب‌های فنولی شده که ارتباط مستقیم با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه داشته که با نتایج پژوهشی روی گیاه شلغم هم‌خوانی دارد (Sangtarash *et al.*, 2009). بطور کلی ترکیبات فنولی از طریق مسیر فنیل پروپانوید تولید می‌گردد که در این مسیر متابولیکی آنزیم فنیل آلانین آمولیناز نقش کلیدی بازی کرده که تجمع آن، می‌تواند ناشی از تیمار با سالیسیلیک اسید باشد (Solecka and Kacperska, 2003; Sgarbi *et al.*, 2003).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر محلول پاشی سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر صفات نعنای فلفلی

Table 1- ANOVA results of the effect of foliar application of different levels of salicylic acid on the traits of peppermint

منابع تغییر	درجه آزادی	فلاونوئید	فنول	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	پلی فنول اکسیداز	کاتالاز	آنتی‌اکسیدان
S.O.V	df	Flavonoid	Phenol	Guaiacol Peroxidase	Ascorbate Peroxidase	Polyphenol oxidase	Catalase	Antioxidant
تیمار	4	90.175**	7.359**	0.343**	0.4656**	0.0670**	17.6940**	0.0949**
Treatment								
خطا	10	0.1926	0.555	0.0045	0.0174	0.0101	0.0344	0.0045
Error								
ضریب تغییرات	-	7.633	13.171	21.4271	4.8965	18.511	6.263	29.600
CV(%)								

ns, *, and ** به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, *, and ** is no significant, significant at 5 and 1% probability level, respectively.

ادامه جدول ۱
Continuation of Table 1

منابع تغییر	درجه آزادی	کربوهیدرات	پرولین	کاروتنوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
S.O.V	df	Carbohydrate	Proline	Carotenoids	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
تیمار	4	0.2171 ^{ns}	0.7084 ^{**}	9.0386 ^{**}	0.0249 ^{**}	0.0356 ^{**}	0.0979 ^{**}
Treatment							
خطا	10	0.0070	0.0112	0.1089	0.0002	0.0002	0.0004
Error							
ضریب تغییرات	-	8.467	3.895	9.7365	10.401	7.955	6.269
CV(%)							

ns, *, and ** is no significant, significant at 5 and 1% probability level, respectively. ns, *, and ** به ترتیب غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

پلی فنول اکسیداز

با توجه به معنی دار بودن محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت پلی فنول اکسیداز (جدول ۱)، مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که تمامی سطوح به کاررفته برای محلول پاشی تأثیر مثبت و معنی داری روی مقادیر پلی فنول اکسیداز نسبت به تیمار شاهد داشته است. علاوه بر این با توجه به جدول مقایسه میانگین کاملاً مشهود است که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تأثیر بر افزایش مقادیر پلی فنول اکسیداز نداشته است، به طوری که تغییر سطوح بکار رفته اختلاف معنی داری از لحاظ آماری با یکدیگر نشان نداد (جدول ۲). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به دلیل نقش تنظیم‌کنندگی سالیسیلیک اسید در سطح رونویسی و بیان ژن‌های مربوط به این آنزیم‌ها باشد (Hayat et al., 2005). به طور کلی پراکسیدازها از جمله آنزیم‌های مهمی هستند که نقش بسیار بسزایی در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و محیطی دارند. وجود ترکیباتی نظیر پراکسید هیدروژن، سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسید باعث غیرفعال شدن آنزیم‌ها، پراکسید کردن چربی‌ها، تخریب غشاء سلول و خسارت به اسیدهای نوکلئیک می‌شود. در این میان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز باعث غیرفعال و حذف شدن گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد (McDonald, 1999). نتایج این پژوهش نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه نعنای بود که به نوعی نمایانگر فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه برای از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مواجهه با تنش سالیسیلیک اسید می‌باشد. بطور کلی این تنظیم‌کننده هورمونی با حفظ نفوذپذیری غشاء و از طرفی افزایش متابولیسم سلولی باعث رشد گیاه در شرایط محیطی نامساعد می‌گردد (Cooper et al., 1998).

کاتالاز

در مورد کاتالاز نیز تیمار با سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت کاتالازی گیاه نعنای فلفلی تأثیر معنی داری نشان داد (جدول ۱). با بررسی جدول مقایسات میانگین داده‌های ثبت شده برای کاتالاز مشخص شد که سطوح تیماری بکار رفته نسبت به شاهد از میانگین بالاتری برخوردار بودند. کمترین میزان ثبت شده برای آنزیم کاتالاز مربوط به نمونه شاهد و بیشترین مقدار کاتالاز ثبت شده در تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام دیده شد (جدول ۲). در پژوهشی بروی گیاه آویشن گزارش شده است که غلظت ۴۵۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید سبب افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز می‌گردد (Harati et al., 2016).

آنتی‌اکسیدان

نتایج حاصل از تجزیه واریانس فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نعنای فلفلی تحت تیمار سالیسیلیک اسید در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که از جدول مشخص می‌باشد تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان آنتی‌اکسیدان تأثیر معنی داری در سطح یک درصد داشته است. همچنین با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید بر میزان غلظت آنتی‌اکسیدان نیز افزوده شده است. به طوری که بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان مربوط به نمونه تیمار شده با ۱۰۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید و کمترین غلظت ثبت شده برای آنتی‌اکسیدان برای نمونه شاهد بود (جدول ۲). مطالعات در گیاه مریم‌گلی نشان داد، سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و باعث بالا رفتن میزان فنول کل می‌گردد، در واقع سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان بیان این آنزیم‌ها شده از این طریق باعث افزایش میزان سنتز آن‌ها می‌شود. به طور کلی فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها با داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های

معنی‌داری تأثیرگذار است و باعث افزایش آن در اندام هوایی گیاه می‌شود (Ranjbar *et al.*, 2011). اصولاً غلظت بالای کربوهیدرات، باعث کاهش خسارت اکسیداتیو و حفظ ساختار پروتئینی طی کمبود آب می‌گردد (Fazelian and Asrar, 2011) در گزارش‌هایی که از سالیسیلیک اسید به‌عنوان عامل بهبود دهنده یاد شده است، این احتمال وجود دارد که افزایش قند به دلیل افزایش میزان کلروفیل و متعاقباً افزایش بازده فتوسنتزی باشد (Mahajan and Tuteja, 2005).

پرولین

با توجه به جدول ۱، تیمار با سالیسیلیک اسید بر میزان پرولین نمونه‌ها نیز اثر معنی‌داری داشته است. غلظت پرولین در شرایط تیمار با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد از ۲/۲۳۳ به ۳/۴۷۵۱ افزایش یافته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش سطوح تیمار، غلظت پرولین نیز در گیاه نعنای فلفلی افزایش یافته اما در مورد غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام اختلاف معنی‌داری دیده نشد (جدول ۲). با توجه به خروجی نتایج این تحقیق استفاده از سالیسیلیک اسید در شرایط عادی (بدون تنش‌های محیطی)، سبب افزایش میزان پرولین می‌گردد (Shorbaei *et al.*, 2012). همچنین مطالعه روی گیاه ذرت نشان داد، تیمار با سالیسیلیک اسید باعث افزایش همه آمینواسیدها می‌شود که این افزایش آمینواسیدها در بافت گیاه تحت استرس با بخش‌های پرولین در ارتباط است (El-Tayeb, 2005).

احیایی مانع تنش آکسیداتیو می‌شود (Wei *et al.*, 2011). تحقیقات نشان داده است که استفاده از غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید باعث سرعت فتوسنتزی و رشد مناسب گیاه زنجبیل می‌شود. براین اساس عنوان شده است که به کارگیری خارجی سالیسیلیک اسید می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پرولین گیاه را افزایش دهد (Ghasemzadeh and Jaafar, 2013).

کربوهیدرات

خروجی تجزیه واریانس داده‌ها نشان از عدم معنی‌داری تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان کربوهیدرات نمونه‌ها بود (جدول ۱). مقایسات میانگین داده‌های مربوط به کربوهیدرات نشان داد که بهترین سطح تیماری برای این صفت مربوط به غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام از سالیسیلیک اسید می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با سایر سطوح تیماری و نمونه شاهد داشت. کمترین میزان کربوهیدرات ثبت شده نیز مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۲). در پژوهشی روی گیاه تربچه گزارش شده است که میزان قندهای محلول کل در تیمار با سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Hosseinzad *et al.*, 2012). همچنین در گیاه دارویی مریم‌گلی بیشترین میزان قند در تیمار با سطوح بالای سالیسیلیک اسید در برگ‌ها بوده و کمترین میزان قندهای محلول در نمونه شاهد مشاهده شده است (Gholami *et al.*, 2013). تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید روی گیاه کلزا نشان داده است که تیمار با سالیسیلیک اسید بر میزان قندهای نامحلول در گیاه به‌طور

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر صفات اندازه‌گیری شده در نعنای فلفلی

Table 2- Comparison of the mean effect of different levels of salicylic acid on the measured traits in peppermint

غلظت سالیسیلیک اسید Salicylic acid concentration	آنتی‌اکسیدان Antioxidant (mg.g ⁻¹ FW)	کاتالاز Catalase (mg.g ⁻¹ FW)	پلی فنول اکسیداز Polyphenol oxidase (mg.g ⁻¹ FW)	آسکوربات پرآکسیداز Ascorbate Peroxidase (mg.g ⁻¹ FW)	گایاکول پرآکسیداز Guaiacol Peroxidase (mg.g ⁻¹ FW)	فنول Phenol (mg.g ⁻¹ FW)	فلاونوئید Flavonoid (mg.g ⁻¹ FW)
0	0.0475 ^c	0.9423 ^c	0.3145 ^b	2.3446 ^c	0.1500 ^c	3.5213 ^d	0.8873 ^c
5	0.1285 ^{bc}	1.0888 ^d	0.5403 ^a	2.4518 ^{bc}	0.2830 ^b	4.7821 ^{dc}	0.9648 ^c
10	0.2100 ^b	2.4198 ^d	0.5645 ^a	2.6464 ^b	0.4200 ^a	6.4214 ^{ab}	3.6338 ^b
50	0.2395 ^b	3.4825 ^b	0.7328 ^a	2.6726 ^b	0.3960 ^{ab}	7.6071 ^a	11.6245 ^a
100	0.5172 ^a	6.8913 ^a	0.5695 ^a	3.3554 ^a	0.3200 ^{ab}	5.9714 ^{bc}	11.6408 ^a

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column, averages with the same letters are not significantly different at 5% level of probability.

ادامه جدول ۲
Continuation of Table 2

غلظت اسید سالیسیلیک Salicylic acid concentration	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.g ⁻¹ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg.g ⁻¹ FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg.g ⁻¹ FW)	کاروتنوئید Carotenoids (mg.g ⁻¹ FW)	پروترین Proline ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) (FW)	کربوهیدرات Carbohydrate (mg.g ⁻¹ FW)
0	0.0432 ^c	0.0765 ^d	0.1373 ^d	1.6713 ^d	2.2333 ^c	0.7197 ^c
5	0.0557 ^c	0.0941 ^d	0.1323 ^d	2.1800 ^{dc}	2.3778 ^c	0.9172 ^b
10	0.2228 ^a	0.1664 ^c	0.5050 ^a	2.6279 ^c	2.6833 ^b	1.2595 ^a
50	0.2397 ^a	0.2822 ^b	0.4641 ^b	4.8864 ^b	2.8583 ^b	1.2952 ^a
100	0.1457 ^b	0.3184 ^a	0.4062 ^c	5.5840 ^a	3.4751 ^a	0.7767 ^{bc}

در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column, averages with the same letters are not significantly different at 5% level of probability.

کاروتنوئید و در مقابل بیشترین میانگین ثبت شده برای این صفت در تیمار با غلظت ۱۰۰ پی پی ام از سالیسیلیک اسید به دست آمد.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش میزان شاخص رنگدانه های سبز (کلروفیل a، b و کلروفیل کل) و کاروتنوئید با محلول پاشی سالیسیلیک اسید روند افزایشی نشان داده است. اثرات افزایشی سالیسیلیک اسید بر ظرفیت فتوسنتزی را می توان به محتوای رنگدانه ها و اثرات تحریکی فعالیت روبیسکو نسبت داد. همچنین زمان نمونه برداری در پاسخ گیاه می تواند بسیار مهم باشد، بطوریکه اگر نمونه برداری در زمانی که مقدار کلروفیل گیاه در حداکثر است صورت پذیرد، با نتایج حاصل از نمونه برداری قبل و بعد از این دوره بسیار نتایج متفاوتی خواهد داشت (Sepehri *et al.*, 2015). از دیگر پارامترهای فیزیولوژیکی متأثر از شرایط محیطی، می توان به کاروتنوئید و محتوای کلروفیل گیاه اشاره نمود. به طور کلی برخی از گیاهان در مواجهه با شرایط محیطی نامساعد سیستم فتوسنتزی خود را از دست می دهند که ممکن است به دلیل تخریب کلروفیل به دلیل افزایش فعالیت آنزیم های تخریب کننده و یا ناپایداری کمپلکس های پروتئینی باشد. رنگدانه کلروفیل از نظر جذب و توان به کارگیری انرژی نورانی در سیستم فتوسنتزی گیاهان نقش اساسی دارد (Shekari *et al.*, 2010).

به طور کلی استفاده از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی می تواند روی بیوسنتز و حتی تجزیه کلروفیل و در نتیجه به طور مستقیم روی فتوسنتز تأثیرگذار باشد. رنگدانه های کاروتنوئید نیز

نتایج پژوهش ما نیز نشان می دهد که با افزایش سطوح محلول پاشی بر میزان پروترین افزوده شده است. در حالت کلی کاربرد خارجی غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید باعث افزایش رشد و در نتیجه پاسخ فیزیولوژیکی مناسب در گیاه می شود (Ghasemzadeh and Jaafar, 2012).

کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئید

همان طور که از جدول شماره ۱ مشخص است، تجزیه واریانس داده ها به دست آمده از تیمار سالیسیلیک اسید روی نعنای فلفلی نشان دهنده تأثیر معنی دار ($p \leq 0.01$) محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر میزان رنگدانه های کلروفیل a، b و کلروفیل می باشد. نتایج مقایسات میانگین داده ها نیز حاکی از تأثیر مثبت تیمار انجام یافته بر افزایش میزان رنگدانه های کلروفیل a، b نسبت به نمونه شاهد است؛ به عبارت دیگر با افزایش سطوح سالیسیلیک اسید تا ۱۰۰ پی پی ام روند تولید رنگدانه ها نیز حالت افزایشی و معنی داری به خود گرفته است. در مورد کلروفیل کل نیز، مقایسات میانگین داده ها نیز نشان داد که بالاترین غلظت کلروفیل کل در سطح ۱۰ پی پی ام مشاهده شد که نسبت به شاهد و سایر سطوح مورد مطالعه در این پژوهش اثر معنی داری داشت (جدول ۲). در مورد صفت کاروتنوئید نیز همانند سایر صفات مورد مطالعه در این پژوهش، استفاده از سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان کاروتنوئید گیاه نعنای فلفلی تأثیر معنی داری داشت (جدول ۱). با بررسی مقایسات میانگین داده های جدول ۲ مشخص شد که نمونه شاهد دارای کمترین

آمین‌ها در مهار تخریب کلروفیل مرتبط با مهار فعالیت آنزیم پراکسیداز باشد (Ayad et al., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

خروجی پژوهش حاضر نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی اغلب صفات مورد ارزیابی در گیاه نعنای فلفلی بود. دوزهای مختلف استفاده‌شده روی گیاه نعنای باعث بهبود و افزایش ویژگی‌های عملکردی گیاه مورد مطالعه نسبت به نمونه شاهد گردید. بطور کلی نتایج این پژوهش حاکی از روند رو به رشد و افزایشی در تمامی صفات مورد ارزیابی می‌باشد، بطوریکه بکارگیری دوز ۱۰۰ پی‌پی‌ام از سالیسیلیک اسید می‌تواند بیشترین تأثیر مثبت را روی ویژگی‌های عملکردی گیاه مورد نظر داشته باشد. با توجه به یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد کاربرد محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی گیاهان دارویی به‌ویژه گیاه نعنای فلفلی می‌تواند به‌عنوان یک روش اقتصادی و امیدبخش در جهت افزایش رشد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این گیاه باشد و مطالعات تکمیلی برای ادامه بررسی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9718-107 انجام شده است. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

با به دام انداختن طول‌موج‌های کوتاه با انرژی زیاد، می‌تواند اکسیژن تکی را به سه تایی تبدیل و با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده، نقش پاک‌کنندگی نشان دهند (Kordi et al., 2013). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده خارجی از سالیسیلیک اسید، می‌تواند کلروفیل a و b و محتوای کاروتنوئید را در گیاهان افزایش دهد. در پژوهش حاضر نیز اسپری برگ‌ی سالیسیلیک اسید با غلظت‌های مختلف، باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها، کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل می‌شود. پژوهشگران با بررسی تأثیر محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی بنفشه آفریقایی گزارش نمودند که بیشترین میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و b مربوط به محلول پاشی با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام می‌باشد (Nanvakenary et al., 2013). در پژوهشی روی گیاه لوبیا گزارش شده است که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی به طور معنی‌داری افزایش یافته است (Sepehri et al., 2015). همچنین استفاده از سالیسیلیک اسید می‌تواند باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها، کلروفیل a، b و کلروفیل کل در گیاه نعنای فلفلی گردد که با نتایج تحقیق حاضر کاملاً مطابقت دارد (shahrivar et al., 2019). افزایش غلظت رنگ‌دانه‌ها در گیاهانی که با سالیسیلیک اسید تیمار شده‌اند، احتمالاً به دلیل تأثیر این هورمون از طریق کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد که از تخریب کلروفیل جلوگیری می‌کند. محققان پی بردند در گیاه شمعدانی عطری کلروفیل و محتوای پرولین در همه غلظت‌ها به‌ویژه در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر پوتریسین افزایش یافته است. ممکن است تأثیر پلی

References

- Ahmadi, S., Yadegari, M. and hamed, B. 2018. The effect of salicylic acid and indole acetic acid on the essential oil and active ingredients of Peppermint (*Mentha piperita* L.) and Lemongrass (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Plant Process and Function*, 7(26): 251-262. (In Persian).
- Ayad, H.S., Reda, F. and Abdalla, M.S.A. 2010. Effect of putrescine and zinc on vegetative growth, photosynthetic pigments, lipid peroxidation and essential oil content of geranium (*Pelargonium graveolens* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(5): 601-608.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1): 205-207.
- Beers, G.R. and Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133-140.

- Burits, M. and Bucar, F.** 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5): 323-328.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C.** 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182.
- Colom, M.R. and Vazzana, C.** 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought sensitive weeping love grass plants. *Environmental and Experimental Botany*, 49(2): 135-144.
- Cooper, R.J., Liu, C.H. and Fisher, D.S.** 1998. Influence of humic substances on rooting and mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*, 14: 2837- 2847.
- Dai, J., Orsat, V., Raghavan, G.S.V. and Yaylayan, V.** 2010. Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) Leaves. *Journal of Food Engineering*, 96(4): 540–543.
- Doymaz, I.** 2006. Thin-layer drying behavior of mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 74(3): 370-375.
- El-Tayeb, M.A.** 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45(3): 215-224.
- Eskandari Zanjani, K., Shirani, A.H., Rad, A., Moradi Agdam, Q. and Taherkhani, T.** 2013. Effect of salicylic acid application under salinity conditions on physiologic and morphologic characteristics of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*, 6(4): 415-428.
- Eteghad, S., Mirzaei, H., Farzampour, S. and Kahnemui, S.** 2009. Inhibitory Effects of Endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* Essential oils on *Escherichia coli* O157: H7. *Research Journal of Biological Sciences*, 4(3): 340-344.
- Fattahi Siahkamari, S., Azad Ghojeh Biglou, H. and Salehi Sardoei, A.** 1999. The effect of water deficit stress and salicylic acid on some growth traits, photosynthetic pigments and yield of peppermint essential oil (*Mentha piperita* L.). *Iranian Plant and Biotechnology Quarterly*, 15(2): 51-39. (In Persian).
- Fahmideh, L. and Mahmoodi, N.** 2017. Survey on enzymatic activity and secondary metabolites of cumin (*Cuminum cyminum*) under manganese stress. *Journal Crop Science Research In Arid Regions*, 1(2): 191-203. (In Persian).
- Fazelian, N. and Asrar, Z.** 2011. The effect of arsenic and SA interaction on growth and some physiological characteristics of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of Plant Biology*, 3(8): 1-12. (In Persian).
- Fielding, J.L. and Hall, J.** 1978. A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in root pea. *Journal of Experimental Botany*, 29: 89 – 98.
- Fitzgerald, M., Heinrich, M. and Booker, A.** 2020. Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Frontiers In Pharmacology*, 10, 1480.
- Galeotti, N., Mannelli, L.D.C., Mazzanti, G., Bartolini, A. and Ghelardini, C.** 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, 322(3): 145-148.
- Ghai, N., Setia R.C. and Setia, N.** 2002. Effect of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brescia napus* L. (cv. GSL-1). *Phytomorphology*, 52: 83-87.
- Ghasemzadeh, A. and Jaafar, H.** 2013. Interactive effect of salicylic acid on some physiological features and antioxidant enzymes activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 18(5): 5965-5979.
- Gholami, R., Kashefi, b. and Saedi Sar, S.** 2013. The effect of acid-salicylic foliar application in reducing the effects of salinity on the growth traits of *Salvia limbata* L. *Journal of Plant Echo Physiology*, 5(15): 63-73. (In Persian).

- Ghorbani Javid, M., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarre-Sanavy, S.A.M. and Allahdadi, I.** 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6): 726-734.
- Habibi, G.Z., Sadeghipour, S. and Hajiboland, R.** 2015. Effect of salicylic acid on tobacco (*Nicotiana rustica*) plant under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(25): 17-28.
- Habibi, Q.** 2012. The effect of salicylic acid on the antioxidant system of several grape cultivars after cold application. *New Journal of Cellular-Molecular Biotechnology*, 9: 101-105. (In Persian).
- Harati, A., Kashefi, b. and Matinzadeh, M.** 2016. Investigation of reducing the effects of salinity stress on morphological and physiological traits of thyme through the application of SA, *Crop Production Technology*, 16(2): 111-125. (In Persian)
- Hashempour, A., Ghasemzhade, M., Fotouhi, G. and Sohani, M.M.** 2014. The physiological and biochemical response to freezing stress olive plants treated with salicylic acid. *Russian Journal Plant Physiology*, 61(4): 443-450.
- 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(4): 433-437.
- Hosseinzad Behbood, A., Paparzadeh, N. and Dilamghani, K.** 2012. Effect of salicylic acid on growth parameters, osmolites and osmotic potential in radish under salinity stress. *Journal of Plant Research*, 27(1): 23-40. (In Persian).
- Iqbal, Sh., Riaz, U., Murtaza, Gh., Jamil, M., Ahmed, M., Hussain, A. and Abbas, Z.** 2020. Chemical Fertilizers, Formulation, and Their Influence on Soil Health. *Microbiota and Biofertilizers*, Springer, Cham, 1-15.
- Irrigoyen, J.H., Emerich, D.W. and Sanchez Diaz, M.** 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84: 55-66.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. and Nicolas, J.J.** 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38(4): 926-931.
- Khan, M.I., Fatma, M., Per, T.S, Anjum, N.A. and Khan, NA.** 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 462.
- Khodary, S.E.A.** 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(1): 5-8.
- Kordi, S., Saidi, M. and Ghanbari, F.** 2013. Induction of drought tolerance in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) by Salicylic Acid. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 2: 18-26.
- Kumar, A., Samarth, R.M. and Yasmeen, S.** 2004. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita* L. *Journal of Bio Factors*, 22(1-4): 87- 91.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Ma, J.Y., Zhou, R. and Cheng, B.S.** 1996. Effect of spermine on the peroxidase activity of detached wheat leaves. *Journal Shandong Agriculture University*, 27: 176-180.
- Mahajan, S. and Tuteja, N.** 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2):139-158.

- Malamy, J. and Klessig, D.F.** 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal*, 2(5): 643-654.
- Mashayekhi, K. and Atashi, S.** 2012. The effect of foliar application of boric acid and sucrose on some biochemical properties of strawberry plants cv. Camarosa. *Journal of Plant Production Research*, 19(4): 157-172.
- Maxwel, C.A., Hartwig, U.A., Joseph, C.M. and Phillips, D.A.** 1989. A chalcone and two related flavonoids from alfalfa roots induce nod gene of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 91: 824-847.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M. and Robards, K.** 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1): 73-84.
- McDonald, M.B.** 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27: 177-237.
- Mimica-Dukic, N. and Bozin, B.** 2008. *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29): 3141-3150.
- Miura, K. and Tada, Y.** 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Plant Science Journal*, 5: 4.
- Nanvakenary, R., Moradi, H. and Ghasemiomran, S.** 2013. Effects of putrescine on morphological and physiological characteristics of ornamental plant African violet (*Saintpaulia ionantha*). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 2(10): 118-122.
- Peters, N.K. and Verma, D.P.S.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 3: 4-8.
- Popova, L., Pancheva, T. and Uzunova, A.** 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23(1-2): 85-93.
- Pramila, D.M., Xavier, R., Marimuthu, K., Kathiresan, S., Khoo, M.L., Senthilkumar, M., Sathya, K. and Sreeramanan, S.** 2012. Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2):331-335.
- Rasouli, D., Solouki, M., Fakheri, B. and Esmaelzadeh, B.S.** 2016. Evaluation of antioxidant enzymes activities, proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and essential oils of *Mentha piperita* L. in response to foliar application of salicylic acid and manganese stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32:(1): 71-82.
- Rasouli, D., Solouki, M., Fakheri, b. and Esmaelzadeh Bahabadi, p.** 2016. Investigation of the activity of antioxidant enzymes, proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.) in response to salicylic acid spraying and manganese stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 32 (1): 71-82. (In Persian).
- Ranjbar, M., Lari Yazdi, H. and Boroumand, Jazi, Sh.** 2011. The effect of SA on photosynthetic pigments, sugar content and antioxidant enzymes in canola under lead stress, *Journal of Plant Biology*, 3(9): 42-49. (In Persian).
- Rita, P. and Animesh, D.K.** 2011. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Research Journal of Pharmacy*, 2(8): 1-10.

- Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C. and Reid, D.M.** 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2): 212-219.
- Scavroni, J., Boaro, C.S.F., Marques, M.O.M. and Ferreira, L.C.** 2005. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) grown with biosolid. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(4): 345-352.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. and Dixon, K.** 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 30(2): 157-161.
- Sepehri, A., Abbasi, R. and Karami, A.** 2015. Effect of drought stress and salicylic acid on yield and yield components of red bean genotypes. *Journal of Agriculture*, 17(2): 51-56. (In Persian).
- Seun-Ah, Y., Sang-Kyung, J., Eun-Jung, L., Chang-Hyun, S. and In-Seon, L.** 2010. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Reports*, 24(2): 140-151.
- Sgarbi, E., Fornasiero, R.B., Lins, A.P. and Bonatti, P.M.** 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant science*, 165(5): 951-957.
- Shahrivar, Z., Abtahi, F. and Hatami, M.** 2019. The regulatory effect of salicylate growth on some physiological and biochemical parameters of peppermint (*Mentha piperita* L.) under drought stress conditions. *Iran biology magazine*, 32(4): 16-1. (In Persian).
- Shekari, F., Pakmehr, A., Rastgoo, M., Vazayefi, M. and Goreishi, N.M.** 2010. Effect of salicylic acid seed priming on some physiological traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under water deficit at podding stage. *Journal of Crop Ecophysiology*, 4(13 (1)): 13-30. (In Persian).
- Shorbaei, M., Ganjali, A. and Abrishamchi, p.** 2012. The effect of SA on the activity of enzymes and antioxidant compounds of chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L.) in the face of drought stress. *Journal of Environmental Stress in Crop Sciences*, 5(1): 41-45. (In Persian).
- Singh, R., Shushni, M.A. and Belkheir, A.** 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3): 322-328.
- Singh, R., Shushni, M.A.M. and Belkheir, A.** 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3): 322-328.
- Solecka, D. and Kacperska, A.** 2003. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum*, 119(2): 253-262.
- Sucha, L. and Tomsik, P.** 2016. The steroidal glycoalkaloids from Solanaceae: Toxic effect, antitumour activity and mechanism of action. *Planta medica*, 82(05): 379-387.
- de Sousa, A.A.S., Soares, P.M.G., de Almeida, A.N.S., Maia, A.R., de Souza, E.P. and Assreuy, A.M.S.** 2010. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2): 433-436.
- Wei, Y., Liu, Z., Su, Y., Liu, D. and Ye, X.** 2011. Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus. *Journal of Food Science*, 76(2): 126-132.
- Yoshimura, K., Y. Yabute, T. Ishikawa and S. Shigeoka.** 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidases isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123: 223-233.

Effect of different levels of salicylic acid foliar application on phenols, flavonoids, antioxidant activity, and photosynthetic pigments of peppermint

Maryam Abpaykar¹, Salehe Ganjali*², Leila Fahmideh³, Forouzan Heidari²

¹M.Sc graduate of medicinal plants, University of Zabol, Zabol, Iran

²Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

³Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*Corresponding Author: Saleheganjali@uoz.ac.ir

Received: 31 May 2021

Accepted: 13 August 2021

DOI: 10.22034/csrar.2021.288792.1095

Abstract

Peppermint, scientifically known as *Mentha piperita*, is an aromatic and medicinal plant that belongs to the Lamiaceae family. In the Research Greenhouse of University of Zabol, an experiment was conducted in a completely randomized design with three replications to investigate the effect of salicylic acid foliar application on peppermint. Salicylic acid was sprayed in two stages (8 weeks after stolon set-up and 2 weeks after the first foliar application) at levels of 0, 5, 10, 50, and 100 ppm. Phenols, flavonoids, antioxidant activity, total protein, and physiological traits like catalase, carbohydrate, ascorbate oxidase, peroxidase, polyphenol oxidase, and photosynthetic pigments were all measured in this study. The treatment with different levels of salicylic acid had a significant impact on all studied traits ($p \leq 0.01$) and improved all studied traits except carbohydrates, according to analysis of variance. At a dose of 100 ppm, salicylic acid had the greatest additive effect on physiological and biochemical traits. According to the findings of this study, salicylic acid foliar application on peppermint appears to increase antioxidant compounds, osmotic regulators (carbohydrates), and photosynthetic pigments, and is a promising and cost-effective method for increasing secondary metabolites and medicinal properties of this plant.

Keywords: Antioxidant enzymes, Physiological traits, Proline, Medicinal plant