The effect of different concentrations of salicylic acid on the pigments content, rutin and quercetin in pepper (*Capsicum annuum*)

Kobra Mahdavian
Department of Biology, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

Abstract
Salicylic acid is an antioxidant which has been used in recent years to increases the resistance of plants to deal with stresses. In this study different concentrations (0.1, 1.5, 3, 6 and 9 mM) of salicylic acid were investigated on the quantity of fresh and dry weight, chlorophyll, carotenoid, malon di aldehyde, flavonoids, rutin and quercetin in pepper (*Capsicum annuum*). After 5 weeks, plants were treated with different concentrations (zero, 0.1, 1.5, 3, 6 and 9 mM) of salicylic acid. The results showed that concentrations of 0.7, 1.5 and 3 mM of SA increased fresh and dry weight, chlorophyll a, b, total and carotenoid content, but concentrations 6 and 9 mM of SA decreased fresh and dry weight, chlorophyll a, b, total and carotenoid content. Concentrations of 1.5 and 3 mM of SA decreased malon dialdehyd and other aldehyde content, but concentrations 6 and 9 mM of SA increased malon dialdehyd and other aldehyde content. Concentrations of 0.1, 0.7, 1.5 and 3 mM SA caused significant increase in total flavonoids in treated leaf. The results showed that under our experimental conditions different concentrations (0.7, 1.5 and 3mM) of salicylic acid increased rutin and quercetin content. In general, according to the results, treatment of salicylic acid in low concentrations has positive effects and high concentrations has negative effects on the growth of the pepper plant.
Key words: Rutin, pigment, Salicylic acid, *Capsicum annuum* L., Quercetin, malon di aldehyde

* mahdavian.k@gmail.com

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.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و دو، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۵۲-۳۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۱۲/۳
تاریخ پذیرش نهایی:۱۳۹۵/۱۲/۱۸

اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار رنگیزه‌ها، روتین و کوئرستین در گیاه فلفل (*Capsicum annuum*)

کبری مهدویان *
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۳۶۹۷ – ۱۹۳۹۵، ایران

چکیده

سالیسیلیک اسید یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که در سال‌های گذشته برای افزایش مقاومت گیاهان در مقابله با تنش‌ها به کار گرفته می‌شود. در پژوهش حاضر، نقش غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳، ۶ و ۹ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر وزن تر و خشک، کلروفیل، کاروتنوئید، مالون‌دی‌آلدهید، فلاونوئید، روتین و کوئرستین گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) بررسی شدند. گیاهان پس از گذشت ۵ هفته، با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳، ۶ و ۹ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید تیمار شدند. نتایج نشان داد که در شرایط آزمایش، غلظت‌های ۰/۷، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید؛ وزن تر و خشک، کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید را افزایش دادند؛ اما غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار، کاهش این شاخص‌ها را سبب شدند. غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار مالون‌دی‌آلدهید و سایر آلدهیدها را کاهش دادند؛ اما غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار مقدار آن‌ها را افزایش دادند. مقدار فلاونوئیدهای کل در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر در برگ‌های تیمارشده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌دار نشان دادند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷ و ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار روتین و کوئرستین را افزایش دادند. به‌طورکلی نتایج بررسی حاضر نشان داد که تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های اندک، آثار مثبت و در غلظت‌های زیاد، آثار منفی بر رشد و نمو گیاه فلفل دارد.

واژه‌های کلیدی: رنگیزه، روتین، سالیسیلیک اسید، فلفل، کوئرستین، مالون‌دی‌آلدهید.

مقدمه

سالیسیلیک اسید یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید و ترکیبات مربوطه متعلق به گروه متنوعی از ترکیبات فنلی هستند. در روزگاران قدیم از سالیسیلیک اسید استفادهٔ دارویی می‌شده است. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنیل پروپانوئیدی است که استقامت گیاهان را

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mahdavian.k@gmail.com، شماره تماس: ۰۳۴۴۲۳۳۳۵۴۱

Copyright©2016, 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.

به عوامل بیماری‌زا و تنش‌زا باعث می‌شود. اگرچه بیوسنتز سالیسیلیک اسید به‌خوبی شناخته نشده است، بررسی‌های گذشته پیشنهاد می‌کنند که گونه‌های اکسیژن فعال مانند هیدروژن پراکسید، بیوسنتز سالیسیلیک اسید را بر اثر عوامل بیماری‌زا تنظیم می‌کنند (Rao *et al*., 2000).

سالیسیلیک اسید ترکیب فنلی شبه‌هورمونی و مولکول علامتی است که در پاسخ‌های گیاهان به عوامل محیطی نقش دارد. این ترکیب، افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تاثیر بر تنفس و یکپارچگی غشاها را باعث می‌شود (Nazar *et al*., 2011؛ Khan *et al*., 2012؛ Syeed *et al*., 2011). سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌سرعت از نقطهٔ اولیهٔ استفاده به بافت‌های مختلف گیاه منتقل شود.

سالیسیلیک اسید بر برخی فرایندهای گیاهی موثر است؛ اما بر گل‌دهی، تولید گرما در گیاهان مناطق گرمسیری و توسعهٔ مقاومت نسبت به بیماری بیشترین تأثیر را دارد (Popova *et al*., 1997؛ Lichtenthaler, 1987). علاوه‌براین، سالیسیلیک اسید هورمون تنظیم‌کنندهٔ درونی است که نقش آن در سازوکارهای دفاعی برعلیه استرس‌های زیستی و غیرزیستی به‌خوبی شناخته شده است (Yalpani *et al*., 1994؛ Szalai *et al*., 2000).

مدارک مهمی وجود دارد که ترکیبات فنلی نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک متفاوت مانند رشد و نمو گیاه، جذب یون، گل‌دهی، میزان تکثیر، تولید مثل و مقدار آنتوسیانین و کلروفیل ایفا می‌کنند. (Popova *et al*., 1997). همچنین تیمار سالیسیلیک اسید کاهش سنتز اتیلن، ممانعت از غیرقطبی‌شدن غشاء، تحریک دستگاه‌های فتوسنتزی و افزایش کلروفیل را در سویا موجب شده است (Leslie and Romani, 1988؛ Zhao *et al*., 1995). تنش‌های زیستی و غیرزیستی، القای پاسخ دفاعی را در گیاهان باعث می‌شوند. سازوکارهای دفاعی مختلفی وجود دارند. یکی از این سازوکارها تولید فلاونوئیدها است که نقش‌های متنوعی در فیزیولوژی، بیوشیمی و تغذیهٔ انسان دارند (Martens and Mithofer, 2005). روتین و گلیکون کوئرستین، نقش فعال آنتی‌اکسیدانی در بدن موجود زنده و خارج از آن دارند و می‌توانند به‌طور مستقیم با واکنش‌های اکسایش-کاهش و به‌طور غیرمستقیم با کلات‌کننده‌ها عمل کنند. روتین علاوه‌بر اثر آنتی‌اکسیدانی، آثار دارویی درخورتوجهی نیز دارد (Kreft *et al*., 2002).

در پژوهش حاضر، تاثیر غلظت‌های مختلف مادهٔ شیمیایی سالیسیلیک اسید بر وزن تر و خشک اندام هوایی، مقدار کلروفیل، کاروتنوئید، مالون‌دی‌آلدهید، روتین، کوئرستین و فلاونوئید کل در گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) بررسی شد. بنابراین، هدف کلی از پژوهش حاضر، به‌دست‌آوردن غلظت‌های مناسب سالیسیلیک اسید برای بهبود رشد و افزایش ترکیبات فلاونوئیدی ازجمله روتین و کوئرستین در گیاه فلفل است که می‌توانند در صنایع داروسازی استفاده شوند.

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی: بذرهای گیاه *C. annuum* L. در گلدان‌های حاوی ورمیکولیت کاشته شدند؛ سپس در وضعیت کنترل‌شدهٔ اتاق رشد، در دورهٔ نوری ۱۶

ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به‌ترتیب با دمای بیشینهٔ ۲۷ درجهٔ سانتیگراد و کمینهٔ ۲۳ درجهٔ سانتیگراد، شدت نور $۱۰^{۳}$ × ۱۵ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و رطوبت ۷۵ درصد قرار داده شدند. همهٔ گلدان‌ها هفته‌ای ۳ بار علاوه‌بر آب مقطر با محلول غذایی لانگ اشتون آبیاری شدند. پس از ۵ هفته، وقتی‌که گیاهان به مرحلهٔ ۳ تا ۴ برگی رسیدند، تیمار سالیسیلیک اسید اعمال شد.

تیمار سالیسیلیک اسید: ابتدا محلول‌هایی از سالیسیلیک اسید با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳، ۶ و ۹ میلی‌مولار تهیه شدند؛ سپس برگ‌های ۳ و ۴ گیاهان پس از ۵ هفته رشد، به‌مدت یک هفته و به‌صورت یک روز در میان با محلول‌های بالا اسپری شدند؛ آنقدرکه از انتهای برگ‌ها محلول جاری شد.

تعیین وزن تر و خشک اندام هوایی: پس از گذشت ۴۲ روز نمونه‌ها برداشت شد. پس از جداکردن اندام هوایی به تعداد چهار عدد از هر تیمار، وزن هریک برحسب گرم با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (مدل BP211D، شرکت Sartarius، آلمان) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، اندام هوایی گیاه فلفل به‌مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد. پس از خشک‌شدن کامل نمونه‌ها، وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتز: اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های تازهٔ گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. پس از صاف‌کردن، جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Carry 50، شرکت Varian، استرالیا) در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده و غلظت رنگیزه‌ها با رابطه‌های ۱ تا ۴ و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه 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 $Car= [1000\ A470-1.8\ chla-85.02\ chlb]\ /198$

در این رابطه‌ها، Chla، Chlb، ChlT و Car به‌ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) است.

سنجش میزان فلاونوئیدهای کل با روش جذب اسپکتروفتومتری: برای مقایسهٔ این ترکیبات ۰/۱ گرم وزن تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و استیک اسید گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) به‌خوبی ساییده و عصارهٔ حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌آرامی در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجهٔ سانتیگراد حرارت داده شد؛ سپس شدت جذب آن با اسپکتروفتومتر UV-Visible در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومترخوانده شد. نمونهٔ شاهد استفاده‌شده برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر، اتانول اسیدی بود. مقدار فلاونوئید با ضریب خاموشی (ε) ۳۳ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه شد (Krizek *et al*., 1998).

سنجش میزان فلاونوئیدها با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC): روش HPLC، روش تجزیه‌ای سریع و کارآمد است. در پژوهش حاضر، برای مقایسهٔ میزان فلاونوئیدهای برگ از این روش استفاده شد (Greenberg *et al*., 1996).

روش تهیهٔ عصارهٔ گیاهی: مقدار ۰/۲ گرم از برگ تازهٔ گیاه با ترازوی دقیق آزمایشگاهی توزین شد و در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (شامل متانول خالص و آب دوبار تقطیر به نسبت ۲۰:۸۰) به‌خوبی ساییده شد. عصارهٔ حاصل به لولهٔ آزمایش سرپیچ‌دار منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد یخچال قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت محتوای لولهٔ آزمایش با کاغذ واتمن شمارهٔ ۱، صاف و محلول حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در بشر کوچکی ریخته و روی اجاق برقی قرار داده شد. با به‌کاربردن جریان گاز ازت و حرارت ۵۰ درجهٔ اجاق برقی، حجم محلول به ۰/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول غلیظ به‌دست‌آمده، با سرنگ به سطح ستون sep-Pak (مدل C18، شرکت varian، استرالیا) اضافه شد. فلاونوئیدها با دستگاه HPLC (مدل ۱۱۰۰، شرکت Agilent، آلمان) و با روش فاز معکوس تحلیل شدند. در این روش، از استو نیتریل خالص و فسفریک اسید ۱ میلی‌مولار با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه برای فاز متحرک استفاده شد. برای این تحلیل، دستگاه به ستون C18 (مدل 300 sb، شرکت Zorbax، آلمان) با ابعاد ۴/۵ × ۲۵۰ میلی‌متر و قطر منفذ ۵ میکرومتر مجهز بود. زمان بازداری فلاونوئیدها در وضعیت یادشده، ۳۴ دقیقه در نظر گرفته شد. گرادیان غیرخطی فاز متحرک، طبق برنامه به دستگاه داده شد. مطابق این روش، جذب فلاونوئیدهای رهاشده از ستون، در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. این دستگاه مستقیما به رایانه‌ای متصل بود که پیک حاصل از تزریق نمونه را با نرم افزار Chemstation نمایش می‌داد.

سنجش مقدار روتین با روش HPLC: عصاره با روش بالا به دست آمد؛ سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل با سرنگ هامیلتون به Injector دستگاه HPLC تزریق شد. جذب روتین در طول موج ۳۵۵ نانومتر خوانده و غلظت آن با نمودار استاندارد، محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه شد (Kreft *et al*., 2002).

سنجش مقدار کوئرستین با روش HPLC: عصاره با روش یادشده به دست آمد؛ سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل با سرنگ هامیلتون به Injector دستگاه HPLC تزریق شد. جذب کوئرستین در طول موج ۳۵۵ نانومتر خوانده شد؛ سپس غلظت کوئرستین با نمودار استاندارد، محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه شد.

سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدهید: اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. طبق این روش، ۰/۲ گرم از بافت تازهٔ برگی توزین شد و در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد ساییده و عصارهٔ حاصل، به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. ۲۰ گرم تری کلرو استیک اسید و ۰/۵ گرم تیو باربیتوریک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد؛ سپس ۴ میلی‌لیتر از این محلول (محلول ۲۰ درصد تری کلرو استیک اسید دارای ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید) به ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتیگراد حمام آب گرم حرارت داده و بلافاصله در یخ، سرد شد. دوباره این محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و سپس در یخ قرار داده و جذب آن در

طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. در این طول موج، جذب کمپلکس قرمز تیو باربیتوریک اسید-مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شد. جذب بقیهٔ رنگیزه‌های غیراختصاصی، در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبهٔ غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده شد (Heath and Packer, 1968).

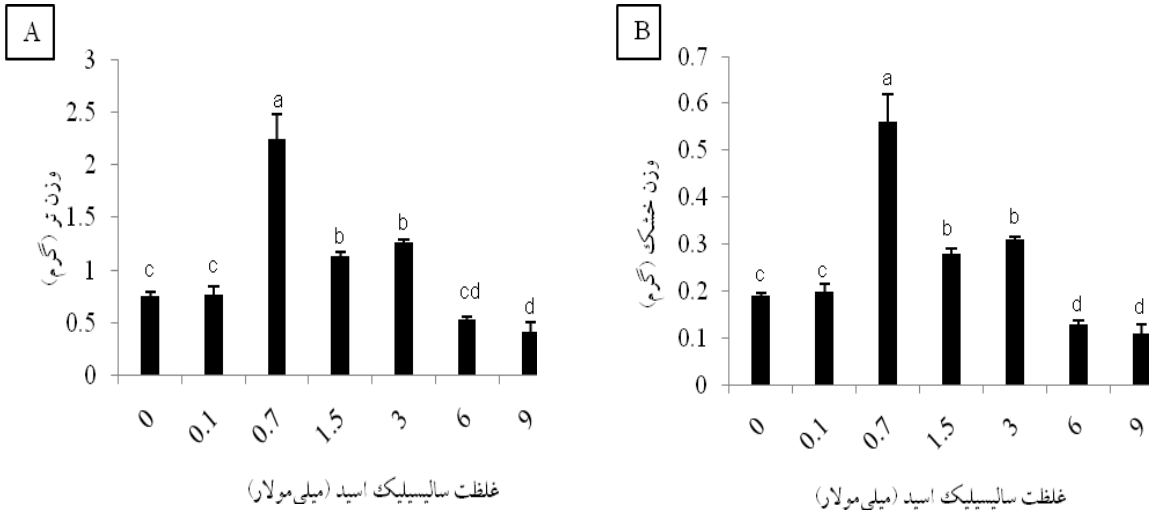
سنجش سایر آلدهیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال): سنجش میزان این آلدهیدها مطابق روش قبل انجام شد؛ اما شدت جذب در طول موج ۴۵۵ نانومتر خوانده شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیراختصاصی نیز در ۶۰۰ نانومتر خوانده و از این مقدار کسر شد. برای محاسبهٔ غلظت این آلدهیدها از ضریب خاموشی معادل ۴۵۸×۱۰^{۲} بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده شد (Meirs and Aharoni, 1992). این ضریب خاموشی، میانگین ضریب خاموشی پنج آلدهید یادشده است.

نتایج

اثر سالیسیلیک اسید بر وزن تر و خشک اندام هوایی: باتوجه‌به شکل‌های ۱-A و B، سالیسیلیک اسید در غلظت ۹ میلی‌مولار، کاهش وزن تر و خشک اندام‌های گیاه را نسبت به شاهد موجب شد؛ اما در غلظت‌های ۰/۷، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۱).

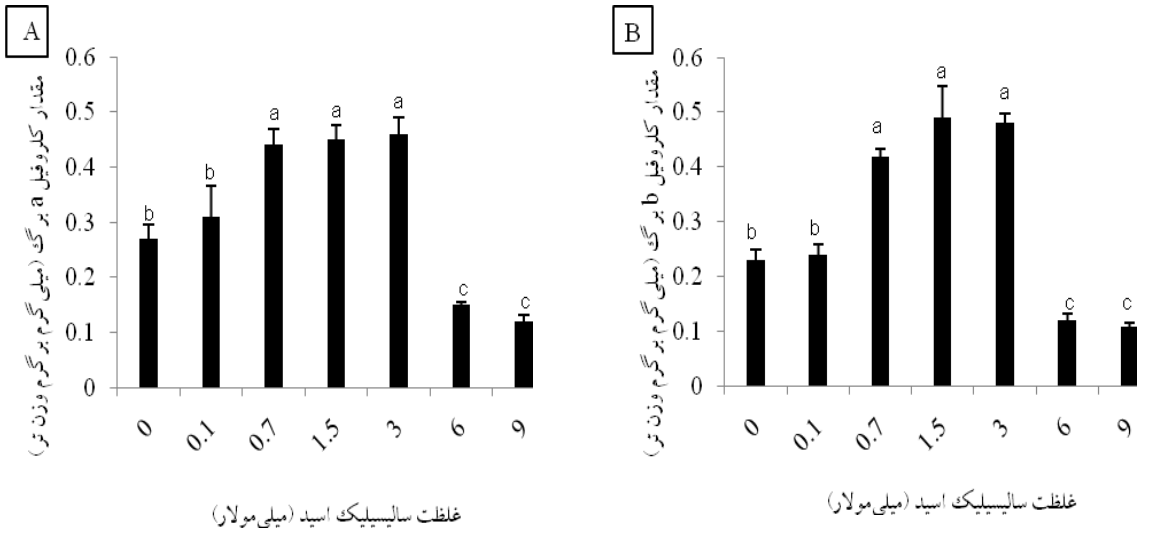
جدول ۱ - تجزیهٔ واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر وزن تر و خشک، کلروفیل، کاروتنوئید، مالون‌دی‌آلدهید، سایر آلدهیدها، فلاونوئید، روتین و کوئرستین در گیاه فلفل- * نشان‌دهندهٔ معنی‌داری با استفاده از آزمون دانکن است.

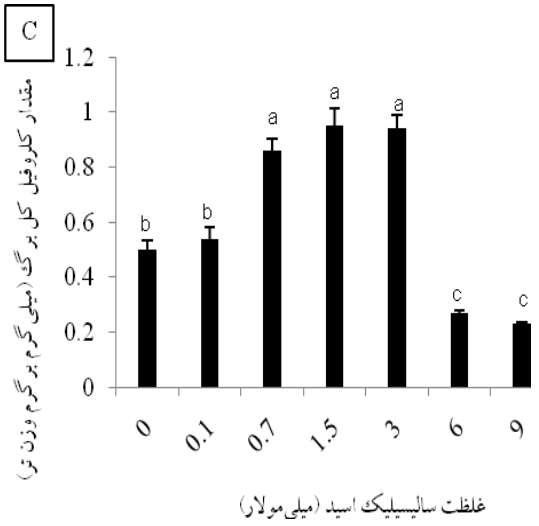
		میانگین مربعات													
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	فلاونوئید ۲۷۰	فلاونوئید ۳۰۰	فلاونوئید ۳۳۰	مالون‌دی‌آلدهید	سایر آلدهیدها	روتین	کوئرستین
تیمارهای سالیسیلیک اسید	۶	۱/۱۳*	۰/۰۷۱*	۰/۰۲۲*	۰/۰۸۲*	۰/۲۸*	۰/۰۰۶*	۲۱۸/۳۹*	۶۵/۱۵*	۷۶/۹۰*	۰/۰۵۱*	۰/۰۰۱*	۱۹۱/۵۴*	۳۷۴/۱۵*
ضریب تغییرات	درصد	۱۲/۹۱	۱۲/۸۷	۹/۷۷	۱۱/۶۶	۱۰/۴۵	۱۲/۵۲	۷/۲۲	۵/۳۷	۵/۱۱	۴/۴۸	۴/۴۹	۵/۳۰	۹/۱۱



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر وزن تر (A) و خشک (B) اندام هوایی گیاه فلفل - مقادیر، میانگین ۴ تکرار ±انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

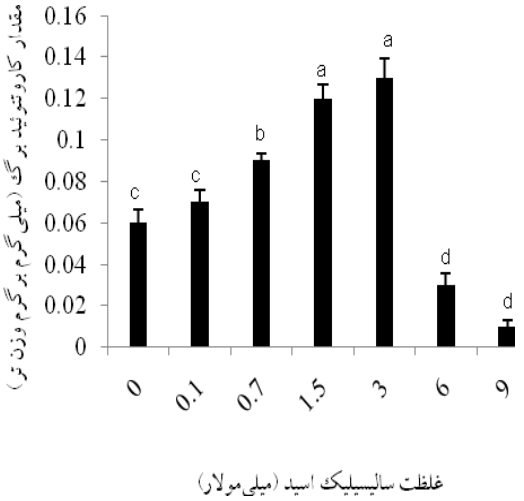
اثر سالیسیلیک اسید بر میزان کلروفیل: همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، مقدار کلروفیل a، b و کل گیاهانی که در غلظت‌های ۰/۷، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید قرار گرفته‌اند نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان دادند؛ اما در غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار، کاهش معنی‌داری در مقدار آن‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد.





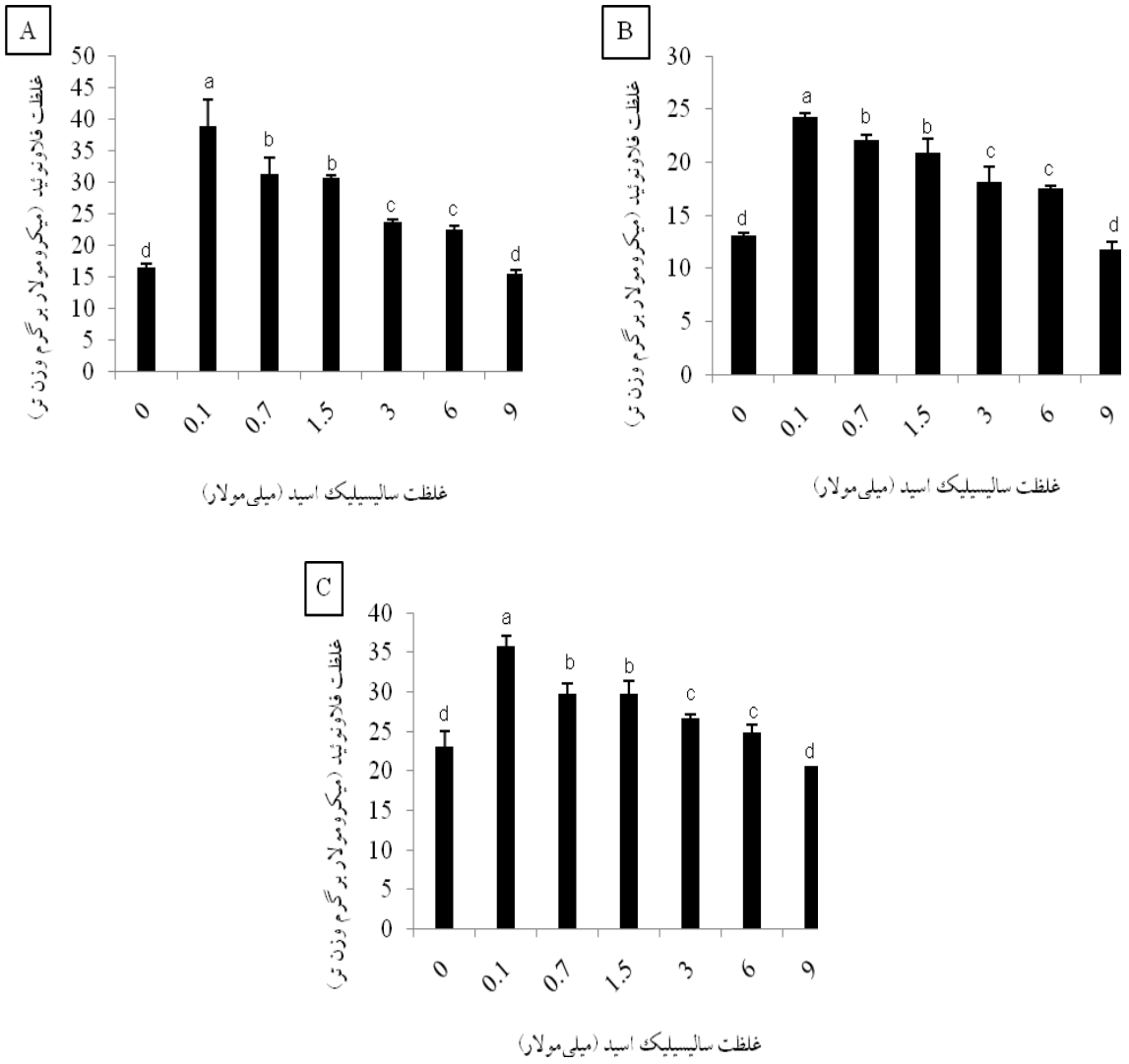
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار کلروفیل a، b و کل در برگ گیاه فلفل- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ±انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان کاروتنوئید: نتایج حاصل از اعمال تیمار سالیسیلیک اسید نشان دادند که مقدار کاروتنوئیدها در غلظت‌های ۰/۷، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار، به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (شکل ۳).



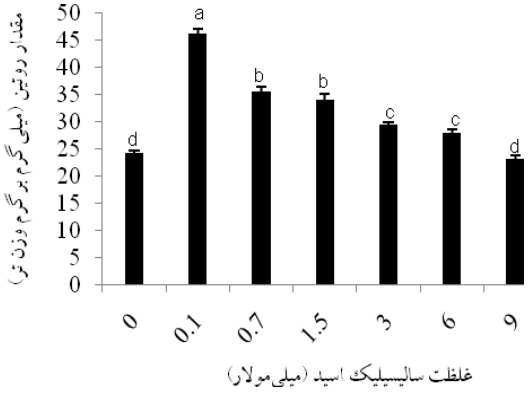
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار کاروتنوئید در برگ گیاه فلفل - مقادیر، میانگین ۴ تکرار ±انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل: نتایج نشان دادند که در طول موج‌های ۲۷۰ و ۳۰۰ نانومتر، غلظت فلاونوئید کل در تیمار با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷ و ۱/۵ میلی‌مولار نسبت به شاهد چشمگیر بود؛ اما در غلظت ۹ میلی‌مولار، تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد. در طول موج ۳۳۰ نانومتر، غلظت فلاونوئید کل در تیمار با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد؛ اما در غلظت ۶ و ۹ میلی‌مولار، تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۴).



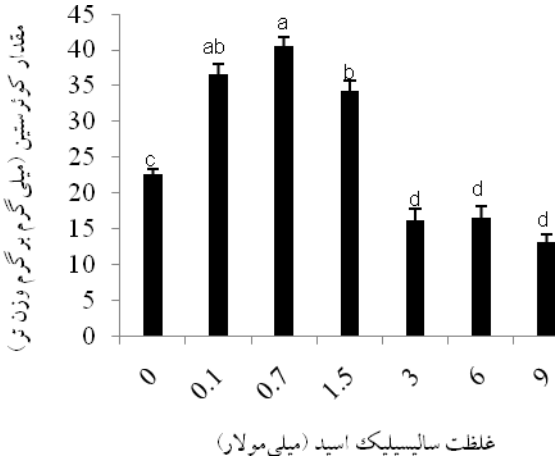
شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر غلظت فلاونوئید کل در (A) ۲۷۰، (B)۳۰۰ و (C) ۳۳۰ نانومتر در برگ گیاه فلفل - مقادیر، میانگین ۴ تکرار ±انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان روتین: با توجه به شکل ۵، مقدار روتین در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. این افزایش در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار چشمگیر بود.



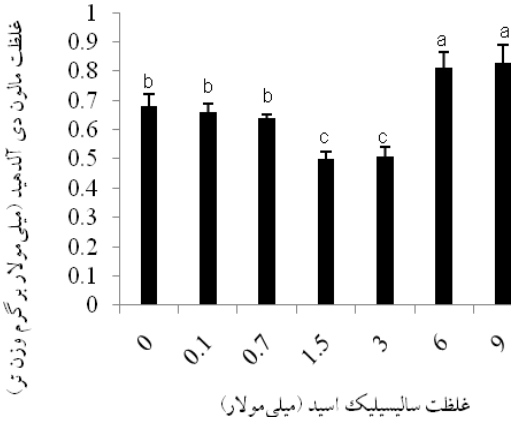
شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار روتین در برگ گیاه فلفل- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان کوئرستین: در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷ و ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار کوئرستین به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. این افزایش در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۷ میلی‌مولار چشمگیر بود. مقدار کوئرستین در غلظت‌های ۳، ۶ و ۹ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۶).



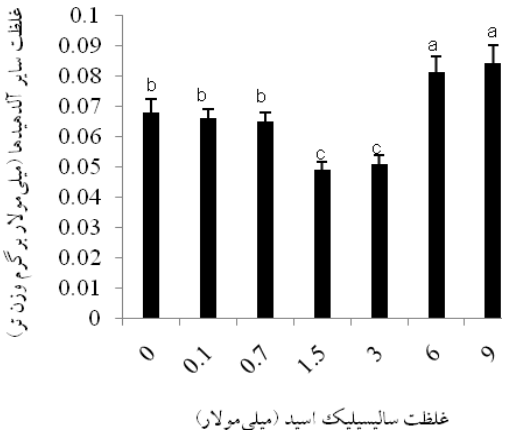
شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار کوئرستین در برگ گیاه فلفل- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان مالون‌دی‌آلدهید: در گیاه تیمارشده با غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار مالون‌دی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت؛ درحالی‌که غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار مالون‌دی‌آلدهید را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دادند. در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۷ تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۷).



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار مالون‌دی‌آلدهید در برگ گیاه فلفل- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان سایر آلدهیدها: مقدار سایر آلدهیدها در گیاه تیمارشده با غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت؛ درحالی‌که در تیمارهای ۶ و ۹ میلی‌مولار، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. علاوه‌براین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، تفاوت معنی‌داری در مقدار سایر آلدهیدها نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۸).



شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مقدار سایر آلدهیدها در برگ گیاه فلفل - مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث

سالیسیلیک اسید مولکولی موثر است که گیاهان را نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مقاوم می‌کند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تاثیر سالیسیلیک اسید به غلظت، نوع گیاه و مرحلهٔ نموی آن بستگی دارد. با وجود این، زمانی‌که در غلظت‌های زیاد استفاده می‌شود، عاملی سمی برای گیاه است که به مرگ آن منجر می‌شود (Kovacik *et al*., 2009). مثلا وزن تر و خشک دانه‌رست‌های گندم در غلظت‌های اندک سالیسیلیک اسید، افزایش یافتند؛ اما در غلظت‌های زیاد، این شاخص‌ها کاهش نشان دادند (Hayat *et al*., 2005) که نتایج بررسی حاضر را تأیید می‌کنند. همچنین مشاهده شده است که سالیسیلیک اسید افزایش وزن تر و خشک را در گیاه بادرنجبویه باعث شده است (Pourakbar and Abedzadeh, 2014).

گزارش شده است که محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در غلظت‌های اندک سالیسیلیک اسید در باقلا افزایش یافته است؛ درحالی‌که غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید، کاهش محتوای رنگیزه‌ها را در باقلا سبب شده است (Turkyilmaz *et al*., 2005). تأثیر سالیسیلیک اسید بر افزایش مقدار کلروفیل در سویا نیز ثابت شده است که علت آن کاهش سنتز اتیلن و تحریک دستگاه فتوسنتزی بیان شده است (Leslie and Romani, 1988; Zhao *et al*., 1995). شاید افزایش رنگیزه‌ها در پژوهش حاضر نیز به همین علت باشد. Sinha و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که تیمار با سالیسیلیک اسید، مقدار کلروفیل و کاروتنوئید را در برگ‌های ذرت افزایش داد. درمقابل، برخی بررسی‌ها، کاهش مقدار کلروفیل دانه‌رست‌های گندم و ماش را در غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید نشان دادند؛ زیرا گزارش شده است که سالیسیلیک اسید ممکن است تنش اکسیداتیو ایجاد کند و گیاهان مختلف به‌طور متفاوتی با این تنش مقابله می‌کنند (Moharekar *et al*., 2003). در بررسی حاضر، کاهش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید در غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید شاید به‌علت تجمع آبسزیک اسید در گیاه باشد؛ زیرا گزارش شده است که سالیسیلیک اسید، تجمع آبسزیک اسید را سبب می‌شود که خود به بسته‌شدن روزنه‌ها منجر می‌شود و به‌این‌ترتیب، کاهش کلروفیل و کاروتنوئیدها نیز توجیه می‌شوند (Sakhabutdinova *et al*., 2003).

فلاونوئیدها یکی از متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. مشاهدات، ثابت می‌کنند که غلظت ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، افزایش درخورتوجه مقدار فلاونوئیدها را در گیاه *Panax ginseng* باعث می‌شود (Yu *et al*., 2006؛ Ali *et al*., 2007). همچنین Zarinkamar و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش میزان فلاونوئیدهای کل و آپی‌ژنین را در اندام هوایی گیاه بابونهٔ آلمانی نسبت به شاهد موجب شد. این گزارش‌ها با نتایج حاصل از پژوهش حاضر، مبنی بر افزایش مقدار فلاونوئیدهای کل بر اثر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۷، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مطابقت دارد. ازآنجاکه سالیسیلیک اسید عاملی تنش‌زا است و کاربرد آن تولید طیف وسیع فلاونوئیدها را سبب می‌شود، وجود رابطه‌ای مستقیم بین تیمار سالیسیلیک

اسید و مقدار فلاونوئیدها نتیجه‌گیری می‌شود. کوئرستین با داشتن یک گروه اورتو هیدروکسیل در حلقهٔ B از اسکلت فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را نسبت به ترکیبات بدون این گروه دارد (Larsson, 1988؛ Rice-Evans *et al*., 1997). کوئرستین در پاسخ به تولید رادیکال‌های آزاد حاصل از تیمار سالیسیلیک اسید در سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد (Hideg and Vass, 1996). وجود روتین در نواحی رأسی ساقه‌ها گزارش شده است. برگ‌های جوان نیز به همین مقدار، روتین دارند (Kreft *et al*., 2002). نتایج حاصل از پژوهش حاضر مبنی بر افزایش مقدار روتین و کوئرستین گیاه فلفل بر اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید می‌تواند در صنعت داروسازی استفاده شود.

در گیاه قرارگرفته در غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، مقدار مالون‌دی‌آلدهید و سایر آلدهیدها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت؛ اما غلظت‌های ۶ و ۹ میلی‌مولار، مقدار آن‌ها را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. معمولا افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، شاخص افزایش تنش اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (Delong and Steffen, 1998). گزارش شده است که تیمار سالیسیلیک اسید، کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را موجب می‌شود (Leslie and Romani, 1988). همچنین گزارش شده است که سالیسیلیک اسید، کاهش مالون‌دی‌آلدهید را در گیاه بادرنجبویه سبب می‌شود (Pourakbar and Abedzadeh, 2014). کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در گیاه فلفل نیز در غلظت‌های اندک سالیسیلیک اسید، شاید نتیجهٔ بهبود توانایی سلول در خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد حاصل از سازوکارهای متابولیک است؛ اما غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید، تنش اکسیداتیو ایجاد کرد و افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدهید را باعث شد.

جمع‌بندی

به‌طورکلی، نتیجه‌گیری می‌شود که تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های اندک، آثار مثبت و در غلظت‌های زیاد، آثار منفی بر رشد و نمو گیاه فلفل دارد. بنابراین، غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید به غشاهای زیستی خسارت وارد می‌کنند که از تولید رادیکال‌های بیش از ظرفیت دفاعی گیاه بر اثر سالیسیلیک اسید ناشی می‌شود. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید می‌تواند افزایش مقادیر ترکیبات دارویی روتین و کوئرستین را باعث شود. بررسی‌های بیشتری برای تعیین مقدار بهینهٔ مصرف سالیسیلیک اسید در گیاهان کشاورزی لازم است تا بتوان از آن، هنگام تنش‌های اجتناب‌ناپذیر محیطی که کاهش‌دهندهٔ محصول هستند، برای افزایش تولید استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارنده از حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به‌علت حمایت مالی از پژوهش حاضر، صمیمانه سپاسگزاری می‌کند.

منابع

Ali, M. B., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2007) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules 12: 607-621.

Delong, J. M. and Steffen, K. L. (1998) Lipid peroxidation and α-tocopherol content in α-tocopherol-supplemented thylakoid membranes during UV-B exposure. Environmental and Experimental Botany 39: 177-185.

Greenberg, B. M., Wilson, M. I., Gerhardt, K. E. and Wilson, K. E. (1996) Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet radiation: photomodification of ribulose 1-5-bis phosphate carboxilase/oxygenase and potential acclimation processes. Plant Physiology 148: 78-85.

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

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated choloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hideg, É. and Vass, I. (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. Plant Science 115: 251-260.

Khan, M. I. R., Syeed, S., Nazar, R. and Anjum, N. A. (2012) An insight into the role of salicylic acid and jasmonic acid in salt stress tolerance. In: Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants (Eds. Khan, N. A., Nazar, R., Iqbal, N. and Anjum, N. A.) 277-300. Springer, New York.

Kovacik, J., Gruz, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M. (2009) Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Reports 28: 135-143.

Kreft, S., Štrukelj, B., Gaberščik, A. and Kreft, I. (2002) Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. Journal of Experimental Botany 53: 1801-1804.

Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum 103: 1-7.

Larsson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27: 969-978.

Leslie, C. A. and Romani, R. J. (1988) Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. Plant Physiology 88: 833-837.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Martens, S. and Mithofer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. Phytochemistry 66: 2399-2407.

Meirs, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent Lipid-peroxidation products detected during parsley by a newly developed method. Journal of the American Society for Horticultural Science 117: 128-132.

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

Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N. A. (2011) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. Journal of Plant Physiology 168: 807-815.

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.

Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. (2014) Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. Iranian Journal of Plant Biology 21: 23-34.

Rao, M. V., Koch, J. R. and Davis, K. R. (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. Plant Molecular Biology 44: 345-358.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2: 152-159.

Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova, M. V. and Shakirova, F. M. (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue ( ): 314-319.

Sinha, S. K., Srivastava, H. S. and Tripathi, R. D. (1993) Influence of some growth regulators and cations on inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in maize. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 51: 241-246.

Syeed, S., Anjum, N. A., Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A. and Khan, N. A. (2011) Salicylic acid mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. Acta Physiologiae Plantarum 33: 877-886.

Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenacz, A. and Paldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. Biologia Plantarum 43: 637-640.

Turkyilmaz, B., Aktas, L. Y. and Güven, A. (2005) Salicylic acid induced some biochemical and physiological changes in *Phaseolus vulgaris* L. F. Ü. Fen ve Mühendisilik Bilimleri Dergisi 17: 319-326.

Yalpani, N., Enyedi, A. J., Leon, J. and Raskin, I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. Planta 193: 373-376.

Yu, Z. Z., Fu, C. X., Han, Y. S., Li, Y. S., Li, Y. X. and Zhao, D. X. (2006) Salicylic acid enhances jaceosidin and syringing production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnology Letter 28: 1027-1031.

Zarinkamar, F., Abdollahzadeh, A., Sharifi, M. and Behmanesh, M. (2013) Effect of salicylic acid on flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Matricaria chamomilla* L. Iranian Journal of Plant Biology 17: 74-67 (in Persian).

Zhao, H. J., Lin, X. W., Shi, H. Z. and Chang, S. M. (1995) The regulating effects of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. Acta Agronomica Sinica 21: 351-355.