

## 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 \*

Department 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, 0.001, 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

---

\* Corresponding Author: ehsanpour@sci.ui.ac.ir

## اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تیروزین آمونیا لیا ز در گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum* *(lycopersicum Mill)*

محمد صادق مالکی، علی‌اکبر احسانپور\*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

گیاه گوجه‌فرنگی یکی از گیاهان زراعی است که به صورت 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 نمونه شاهد نشان دادند. ترکیبات فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز، تیروزین آمونیا لیا ز و پراکسیداز نیز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به تدریج 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 آمونیا لیا ز، سالیسیلیک اسید، فنیل آلانین آمونیا لیا ز، کشت در شیشه، گوجه‌فرنگی

\* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰

## مقدمه

سالیسیلیک اسید ترکیبی فنلی است که در گیاهان به صورت 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 بهینه سالیسیلیک اسید به چهار عامل گونه گیاه، غلظت استفاده‌شده، نحوه کاربرد و مرحله نمو بستگی دارد (Horváth *et al.*, 2007؛ Vanacker *et al.*, 2001). بررسی‌ها نشان داده‌اند سالیسیلیک اسید به صورت 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 غیر آنزیمی استفاده می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل ترکیباتی با وزن مولکولی کم مانند آسکوربات، توکوفرول و ترکیبات فنلی هستند. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه فنلی جزء مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مقابله‌کننده با تنش‌های اکسیداتیو هستند (War *et al.*, 2009؛ Sharma *et al.*, 2009؛ Wang *et al.*, 2011). این ترکیبات با آنزیم‌های فنیل آلانین

آمونیاک‌از و تیروزین آمونیاک‌از ساخته می‌شوند. آنزیم فنیل آلانین آمونیاک‌از اصلی‌ترین و نخستین آنزیم مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی است که فنیل آلانین را به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Randhir *et al.*, 2006). آنزیم تیروزین آمونیاک‌از 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 فنیل آلانین آمونیاک‌از در تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد و با بیشتر شدن فعالیت ویژه این آنزیم، متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابند. همچنین تجمع گونه‌های فعال اکسیژن با افزایش بیان ژن‌های کدکننده این آنزیم افزایش می‌یابد. سالیسیلیک اسید می‌تواند با تولید ROS و القای آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاک‌از و تیروزین آمونیاک‌از، متابولیت‌های ثانویه را تنظیم کند (Dokhanieh *et al.*, 2006؛ Berner *et al.*, 2006). فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها از بزرگ‌ترین زیرگروه‌های ترکیبات فنلی هستند که از مسیر فنیل پروپانوییدی 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 می‌تواند با آنزیم‌های دیگری مانند پراکسیداز نیز تنظیم شوند.

۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار واکشت شدند. در هر شیشه تعداد سه گیاه تقریباً یکسان کشت داده شدند. شیشه‌ها در اتاق رشد در شرایط نوری ۱۶ ساعت، نور و ۸ ساعت، تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور حدود ۴۴ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهان رشد یافته پس از چهار هفته از شیشه خارج و وزن گیاه، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، فنل کل، فلاونوئید، محتوای آنتوسیانین و فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاپاز، تیروزین آمونیاپاز و پراکسیداز اندازه گیری شدند.

**اندازه‌گیری کلروفیل:** برای سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاه در استون ۸۰ درصد (۷:۷) در محیط تاریک روی یخ ساییده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 به ترتیب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل UV-110، شرکت Shimadzu، ژاپن) خوانده شد. غلظت رنگیزه‌ها با رابطه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه و برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد.

رابطه ۱  $Chla = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$

رابطه ۲  $Chlb = 21.21 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$

رابطه ۳  $ChlT = Chla + chlb$

رابطه ۴  $Car = (1000A_{470} - 1.8 chla - 85.02 Chlb) / 198$

Chla، Chlb، ChlT، Car و A به ترتیب نشان‌دهنده

آنزیم پراکسیداز در جاروب کردن 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 خانواده Solanaceae تعلق دارد و در معرض ویروس‌ها، بیماری‌ها و تنش‌های مختلف محیطی و زیستی است. این گیاه به صورت الگو در بسیاری از پژوهش‌های زیست‌شناسی و کشاورزی استفاده می‌شود.

با وجود گزارش‌های زیادی که درباره به کارگیری 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 اسید که هورمون تنظیم‌کننده 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 ضدعفونی شده به مدت یک ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند. تعداد ۵ بذر روی محیط کشت MS در شیشه کشت قرار داده شدند و گیاهچه‌های حاصل روی همین محیط کشت تکثیر شدند. پس از یک هفته گیاهچه‌های با رشد یکنواخت روی محیط کشت جدید MS حاوی سالیسیلیک اسید با غلظت‌های

**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 تازه برگ گیاه در ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده و همگن شد و در بن ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت؛ سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت 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 به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد؛ سپس ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۱۲ درصد به محلول بالا اضافه شد. پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه، جذب محلول حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر 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. در این روش با آلومینیوم کلرید و روش رنگ‌سنجی، مقدار فلاونوئید اندازه‌گیری شد. ۰/۰۵ گرم برگ تازه گیاه با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون به خوبی ساییده شد؛ سپس عصاره حاصل با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴/۴ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ میکرولیتر سدیم نیتريت ۱۰ درصد، ۳۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۵ درصد و ۴ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به محلول اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر

کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و طول موج هستند.

**اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیلایز و تیروزین آمونیلایز:** فعالیت ویژه آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و تیروزین آمونیلایز با روش Thorpe و Beaudoin-Eagan (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه 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 به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی یا همان عصاره آنزیمی استفاده شد. محلول واکنش حاوی فنیل‌آلانین ۶ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز، تیروزین ۵/۵ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم تیروزین آمونیلایز، ۵۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید-Tris و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود و حجم نهایی آن به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش‌های تبدیل تیروزین به کوماریک اسید و تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد. فعالیت ویژه آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر براساس تولید ترانس سینامیک اسید برای آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و در طول موج ۳۳۳ نانومتر با تولید کوماریک اسید برای آنزیم تیروزین آمونیلایز با اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم‌ها برحسب میکرومول فرآورده تولید شده به ازای یک میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه بیان شد.

عصاره آنزیمی استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۹۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار، گایاکول ۰/۰۵ درصد، هیدروژن پراکسید ۰/۱ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب ناشی از اکسیداسیون گایاکول، در طول موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و ضریب خاموشی ۲۶/۶ بر میلی مولار بر سانتی متر محاسبه و بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد. هر واحد فعالیت ویژه آنزیمی، مقدار فعالیت آنزیمی است که موجب ۰/۰۱ تغییر در جذب می شود.

همه آزمایش‌ها برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. در هر یک از تکرارها ۳ گیاه درون شیشه کشت و به صورت طرح کاملا تصادفی آزمایش شد. میانگین داده‌های به دست آمده از سنجش شاخص‌ها با تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) و نرم افزار SPSS از نظر آماری تحلیل و نمودارها با نرم افزار Excel رسم شدند.

## نتایج

**اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز، تیروزین آمونیا لیا ز و پراکسیداز:** با توجه به نتایج به دست آمده از جدول ۱ میزان فعالیت ویژه سه آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، تیروزین آمونیا لیا ز و پراکسیداز با افزایش غلظت تیمار سالیسیلیک اسید به طور تدریجی افزایش معنی داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد و بیشترین میزان فعالیت ویژه هر سه آنزیم در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

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

**اندازه گیری آنتوسیانین کل:** محتوای آنتوسیانین کل از روش Wagner (۱۹۷۹) اندازه گیری شد. در این روش ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول: هیدروکلریک اسید، ۱: ۹۹؛ حجمی - حجمی) درون هاون چینی ساییده شد. مخلوط حاصل درون فالکون ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک قرار داده شد؛ سپس عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. آنتوسیانین کل با ضریب خاموشی (ε) معادل ۳۳۰۰۰ بر میلی مولار بر سانتی متر با رابطه ۵ محاسبه شد.

رابطه ۵  $A = \epsilon bc$   
A، b و c به ترتیب نشان دهنده جذب نوری محلول، عرض کووت (سانتی متر) و غلظت محلول مدنظر (میلی گرم بر گرم) هستند.

**اندازه گیری میزان فعالیت ویژه پراکسیداز:** برای اندازه گیری میزان فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز از روش Maehly و Chance (۱۹۵۵) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاه در ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۲۰۰ میلی مولار حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، PVP (پلی وینیل پیرو لیدین) ۲ درصد، DTT (دی تیو تری تول) ۴ میلی مولار و گلیسرول ۱۰ درصد ساییده و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه در مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول رویی یا همان

جدول ۱- اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز، تیروزین آمونیلایز و پراکسیداز

تیماز	غلظت (میلی مولار)	فعالیت ویژه آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (میکرو مول سینامیک اسید بر میلی گرم پروتئین در یک دقیقه)	فعالیت ویژه آنزیم تیروزین آمونیلایز (میکرو مول کوماریک اسید بر میلی گرم پروتئین در یک دقیقه)	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین)
	۰	۴/۱۷۳ <sup>f</sup>	۲/۴۵۶ <sup>e</sup>	۱۵/۳۲۵ <sup>d</sup>
	۰/۰۰۰۱	۵/۴۲۶ <sup>e</sup>	۲/۶۸۰ <sup>e</sup>	۱۵/۳۱۸ <sup>d</sup>
	۰/۰۰۱	۵/۷۴۶ <sup>d</sup>	۲/۹۷۶ <sup>d</sup>	۱۷/۶۵۷ <sup>c</sup>
سالیسیلیک اسید	۰/۰۱	۵/۹۵۶ <sup>c</sup>	۴/۳۷۰ <sup>c</sup>	۲۰/۷۵۲ <sup>c</sup>
	۰/۱	۶/۲۶۳ <sup>b</sup>	۴/۹۷۰ <sup>b</sup>	۲۵/۱۴۵ <sup>b</sup>
	۰/۵	۷/۰۴۳ <sup>a</sup>	۵/۸۵۰ <sup>a</sup>	۲۷/۳۴۹ <sup>a</sup>

مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.05$  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 میلی مولار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و در غلظت‌های

۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید، مقدار وزن خشک و تر با کاهش نسبتاً شدید و معنی‌داری از نظر 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

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

مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.05$  هستند.

### اثر سالیسیلیک اسید بر فنل کل، فلاونوئید و

آنتوسیانین: با توجه به جدول ۳، در بررسی حاضر با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، مقدار فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین با الگوی یکسان افزایش

معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد و بیشترین مقدار این سه ترکیب در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

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

تیما	غلظت (میلی مولار)	فنل کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر)	فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم وزن تر)
	۰	۵۳/۹۱ <sup>e</sup>	۴/۴۳۹ <sup>f</sup>	۱۰/۹۱۵ <sup>f</sup>
	۰/۰۰۰۱	۵۵/۴۷ <sup>d,e</sup>	۴/۸۳۲ <sup>e</sup>	۱۱/۹۸۳ <sup>e</sup>
	۰/۰۰۱	۵۷/۱۶ <sup>d</sup>	۵/۸۱۱ <sup>d</sup>	۱۴/۰۶۳ <sup>d</sup>
سالیسیلیک اسید	۰/۰۱	۶۴/۱۸ <sup>c</sup>	۶/۶۸۱ <sup>c</sup>	۱۷/۲۶۶ <sup>c</sup>
	۰/۱	۶۹/۱۲ <sup>b</sup>	۷/۸۸۸ <sup>b</sup>	۱۹/۷۹۸ <sup>b</sup>
	۰/۵	۷۴/۴۷ <sup>a</sup>	۸/۷۷۹ <sup>a</sup>	۲۲/۹۱۴ <sup>a</sup>

مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار با آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.05$  هستند.

میلی مولار گزارش شد؛ ولی در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید، این رنگیزه‌ها کاهش معنی داری در مقایسه با نمونه شاهد نشان دادند (جدول ۴).

### اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای رنگیزه‌های

فتوستتزی: 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 میلی مولار افزایش معنی داری یافت و بیشترین مقدار در غلظت ۰/۰۱

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

تیما	غلظت (میلی مولار)	کلروفیل a (میلی گرم کلروفیل a بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم کلروفیل b بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم کلروفیل کل بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی گرم کاروتنوئید بر گرم وزن تر)
	۰	۰/۴۱۰ <sup>d,e</sup>	۰/۲۳۰ <sup>d,e</sup>	۰/۶۷۳ <sup>d,e</sup>	۰/۲۰۵ <sup>c,d</sup>
	۰/۰۰۰۱	۰/۴۶۹ <sup>d</sup>	۰/۲۵۶ <sup>c</sup>	۰/۷۵۳ <sup>d</sup>	۰/۲۲۶ <sup>c</sup>
	۰/۰۰۱	۰/۷۸۶ <sup>b</sup>	۰/۳۸۳ <sup>b</sup>	۱/۱۷۰ <sup>b</sup>	۰/۲۹۰ <sup>b</sup>
سالیسیلیک اسید	۰/۰۱	۱/۱۹۳ <sup>a</sup>	۰/۵۱۶ <sup>a</sup>	۰/۱۷۱ <sup>a</sup>	۰/۳۶۶ <sup>a</sup>
	۰/۱	۰/۶۲۳ <sup>c</sup>	۰/۲۸۱ <sup>c</sup>	۰/۹۰۳ <sup>c</sup>	۰/۲۶۳ <sup>b</sup>
	۰/۵	۰/۴۰۳ <sup>c</sup>	۰/۱۸۹ <sup>c</sup>	۰/۵۹۳ <sup>c</sup>	۰/۱۹۰ <sup>d</sup>

مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار با آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.05$  هستند.

از جمله تنش شوری میزان رشد گیاه می باشد که با اندازه گیری وزن تر و خشک به عنوان شاخص های مطلوب پاسخ های گیاه ارزیابی می شود.

### بحث

یکی از شاخص های مهم جهت تحلیل چگونگی پاسخ و عکس العمل گیاه نسبت به تنش ها



اسید می‌تواند به همین دلیل باشد. برخی از پژوهشگران نیز نتایج مشابهی در تیمار سالیسیلیک 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، تجزیه کلروفیل و کاهش سنتز این رنگدانه‌ها را موجب می‌شود. مطالعات Rao و همکاران (۱۹۹۷) در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) و آراییدوپسیس و همچنین مطالعات Moharekar و همکاران (۲۰۰۳) در گیاه لویاچیتی نشان داده‌اند در غلظت‌های سمی سالیسیلیک اسید، کلروفیل کاهش می‌یابد؛ بنابراین شاید بتوان کاهش کلروفیل را در پژوهش حاضر با نتایج گزارش شده سایر پژوهش‌ها تفسیر و نتایج مشابه با آنها را تأیید کرد. کاروتنوئیدها نقش محافظتی در مجموعه 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 به دلیل تنش اکسیداتیو و استفاده گیاه از سازوکارهای دفاعی دیگر باشد. با توجه به اینکه 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

در پژوهش حاضر، وزن تر و خشک اندام هوایی شامل ساقه و برگ و همچنین ریشه با نشان دادن الگوی کم‌ویش مشابه، در ابتدا در غلظت‌های کم سالیسیلیک اسید افزایش و سپس در غلظت‌های زیاد، کاهش معنی‌داری نشان دادند. با توجه به آثار سالیسیلیک اسید پیش‌بینی می‌شود این افزایش وزن به دلیل بیشتر شدن تعداد ریشه‌ها، شاخه‌های جانبی و برگ‌های ایجاد شده 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 بهینه سالیسیلیک اسید وجود دارند که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کنند (Hayat *et al.*, 2005؛ Khan *et al.*, 2007؛ 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 بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه و احتمالاً القای تنش اکسیداتیو و اثر منفی آن بر روند رشد و نمو گیاه باشد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئید در مجموعه 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 تجزیه 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

می‌شود (Dixon and Paiva, 1995). این آنزیم‌ها با ROS حاصل از تنش‌ها القا می‌شوند (Solecka and Kacperska, 2003). در پژوهش حاضر میزان فعالیت ویژه این دو آنزیم و ترکیبات فنلی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید افزایش یافت. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز و تیروزین آمونیا لیاز 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 بیان‌کننده 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 ویژه 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 ویژه آنزیم پراکسیداز را اثبات کرده‌اند و ارتباط مستقیم را بین آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی نشان داده‌اند (Mutlu *et al.*, 2009؛ Shi and Zhu, 2008). با توجه به اینکه 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.

آبسزیزیک 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 پاک کردن 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 تیمار شده با سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان دادند. این افزایش می‌تواند به دلیل تولید ROS توسط سالیسیلیک اسید با توجه به 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 جاروب‌کننده 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 ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز و تیروزین آمونیا لیاز که آنزیم‌های کلیدی در تولید این ترکیبات هستند با تیمار سالیسیلیک اسید رخ می‌دهد (Beaudoin-Eaga and Thorpe 1985). سنتز ترکیبات فنلی با دامیناسیون فنیل آلانین و تیروزین در مسیر فنیل پروپانوئید انجام می‌شود و ترانس سینامیک اسید از فنیل آلانین و کوماریک اسید از تیروزین تولید

## 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.
- Aron, 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.. *Ecotoxicology 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.

## جمع‌بندی

باتوجه به نتایج به‌دست آمده 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 نمونه شاهد نشان دادند که بیان‌کننده وابستگی سالیسیلیک اسید به غلظت است و احتمالاً سالیسیلیک اسید در غلظت‌های سمی با ایجاد تنش اکسیداتیو، کاهش رشد را موجب می‌شود. ترکیبات فلی و آنزیم‌های بیوسنتزی آنها نیز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به تدریج افزایش یافتند. این افزایش می‌تواند به دلیل اثر مستقیم سالیسیلیک اسید بر این ترکیبات و آنزیم‌ها و مسیرهای بیوسنتزی آنها و همچنین نقش غیرمستقیم و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS به وسیله سالیسیلیک اسید باشد. اگرچه بیشترین مقدار ترکیبات فلی در غلظت‌های زیاد سالیسیلیک اسید به دست آمد، باتوجه به اینکه 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 بهینه سالیسیلیک اسید انتخاب شد.

## سپاسگزاری

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

- 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 *Ascoclady 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 polygona 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., Prithviraj, 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*

- 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 Pyrzyńska, 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., Vatter, D. A. and Shetty, K. (2006) Antioxidant enzyme response studies in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed porcine muscle tissue following 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *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.

- 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.