

The effect of salicylic acid treatment on the antioxidant enzyme activities in *Thymus vulgaris* seedlings

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mahmoodi Tarkhorani S.¹ MSc,
Sanjarian Dehaghani F.*² PhD,
Monsef Shokri M.³ PhD

How to cite this article

Mahmoodi Tarkhorani S, Sanjarian Dehaghani F, Monsef Shokri M. The effect of salicylic acid treatment on the antioxidant enzyme activities in *Thymus vulgaris* seedlings. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):37-44.

¹Biology Department, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Plant Bioproducts Group, Institute Agriculture Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

³International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

*Correspondence

Address: Shahrak-e Pajoohesh, 15 Kilometer of Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1497716316

Phone: +98 (21) 44787453

Fax: +98 (21) 44787399

fsanjarian@nigeb.ac.ir

Article History

Received: March 10, 2017

Accepted: October 18, 2017

ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Aims Thymus Garden (*Thymus vulgaris* L.) is one of the economically important plants which is extremely sensitive to oxidative stress and drought stress during germination time. Salicylic acid, as an herbal hormone, plays an important role in increasing plant tolerance to biotic and abiotic stresses. The current study was conducted aiming to increase the plant resistance to environmental stress by increasing its enzymatic and non-enzymatic antioxidant capacity by salicylic acid treatment.

Materials & Methods In this experimental study, the plant seeds were soaked in 2mM salicylic acid solution a randomized complete block design with three replicates for 16 hours, and they were then planted in pots. Pots were transferred to growth chamber with constant and controlled conditions for 16 hours of light: 8 hours of dark at a temperature of 25°C for 14 days. At the end of the experiment, the growth parameters of plants, germination percentage, phenol content, and the activity of the important antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, polyphenol oxidase and peroxidase, were measured and compared with the control group.

Findings Although salicylic acid did not have a significant impact on plant growth, it has led to an effective of antioxidant enzymes in the plant. Moreover, this treatment has increased the antioxidant content of the plant.

Conclusion Treatment with salicylic acid could result in an increase in Garden Thyme tolerance to stress conditions.

Keywords Antioxidants; Salicylic Acid; *Thymus vulgaris* L.

CITATION LINKS

[1] Flavonoids as ... [2] Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds ... [3] Effect of water deficit stress and foliar application of salicylic ... [4] A review of the antioxidant potential of medicinal ... [5] Antioxidant and anticholinesterase potential ... [6] SDS polyacrylamide gel electrophoresis of ... [7] Seasonal variation in essential oil yield and composition ... [8] *Thymus* and *Satureja* species ... [9] Identification of medicinal and aromatic plants ... [10] Major medicinal plants: Botany, culture and ... [11] Germination behaviour of cultivated ... [12] Investigation of seed germination, establishment and identification of different *Thymus* species ... [13] Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic ... [14] Studying the resistance of wheat seedlings grown from treated seeds with ... [15] Phenolics and cold tolerance of Brassica ... [16] Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme ... [17] Assay of catalases and ... [18] Drought tolerance in two mosses: Correlated ... [19] Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into ... [20] Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable ... [21] Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high ... [22] Purification and some properties of polyphenoloxidase ... [23] Photosynthetic responses of corn and ... [24] Developmentally related responses of maize catalase ... [25] Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on ... [26] Salicylic acid influences net photosynthetic ... [27] Effect of salicylic acid on growth and enzyme ... [28] Salicylic acid beyond defence: Its role in ... [29] Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots ... [30] Changes in the hormonal status of ... [31] Salicylic acid induced changes on some ... [32] Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic ... [33] Role of phenylpropanoid compounds in ... [34] Flavonoid content of several vegetables and their ... [35] Exogenous salicylic acid alleviates ... [36] Long-term exposure treatments revert ... [37] Effect of hormones, salicylic acid ... [38] Effect of salicylic acid on phenylpropanoids ... [39] Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated ... [40] Salt tolerance and salinity effects on ... [41] Treatment with salicylic acid decreases ... [42] Effect of salicylic acid potentiates ... [43] Role of salicylic acid in regulating cadmium ... [44] Induction of resistance in tomato plants ... [45] Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism ... [46] Induction of abiotic stress tolerance ...

تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دانه‌رست‌های آویشن باغی

سمیه محمودی طرخرانی MSc

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فروغ سنجریان دهقانی PhD

گروه زیست‌فراورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

مریم منصف‌شکری PhD

موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

چکیده

اهداف: گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) از جمله گیاهان مهم از نظر اقتصادی است که هنگام جوانه‌زدن به تنش‌های اکسایشی و خشکی بسیار حساس است. سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک هورمون گیاهی نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. این پژوهش با هدف افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی به‌واسطه افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی با تیمار سالیسیلیک اسید انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر بذره‌های گیاه آویشن باغی در قالب طرح بلوک‌های تصادفی با سه تکرار به مدت ۱۶ ساعت، در محلول ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید خیسانده و سپس در گلدان کاشته شدند. گلدان‌ها به اتاقک رشد با شرایط ثابت و کنترل‌شده ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵°C به مدت ۱۴ روز منتقل شدند. پس از اتمام زمان آزمایش پارامترهای رشدی گیاه، درصد جوانه‌زنی، محتوای فلی و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز اندازه‌گیری و با گروه شاهد مقایسه شدند.

یافته‌ها: اگرچه سالیسیلیک اسید تاثیر مثبت چشمگیری روی رشد رویشی گیاه نداشت، اما سبب القای موثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. همچنین با این تیمار محتوای مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: تیمار با سالیسیلیک اسید می‌تواند منجر به افزایش مقاومت آویشن باغی در مقابل تنش‌های استرس‌زا شود.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان‌ها، سالیسیلیک اسید، آویشن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۶

*نویسنده مسئول: fsanjaran@nigeb.ac.ir

مقدمه

آسیب‌های اکسایشی در اثر تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در سیستم‌های زیستی ایجاد می‌شود، چون این مولکول‌ها از جمله پراکسید و سوپراکسید به‌علت وجود تک‌الکترون بسیار فعال بوده و به اجزای سلولی حمله می‌کنند. گونه‌های اکسیژن فعال آسیب‌هایی نظیر پراکسیداسیون لیپید، شکست پروتئین و شکست اتصال عرضی DNA را تحمیل می‌کنند [1, 2]. آسیب به بخش‌های مختلف سلول منجر به عدم کارکرد صحیح سیستم زیستی و سبب مرگ سلولی می‌شود که در بسیاری از بیماری‌ها نیز مشاهده شده است. این مولکول‌های بسیار فعال طی متابولیسم طبیعی سلول نیز تولید می‌شود که توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن خنثی می‌شوند. بنابراین در صورتی که تولید رادیکال‌های آزاد بالا باشد یا سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در سیستم به حد کافی عمل نکند آسیب اکسایشی پدید می‌آید. گیاهان برای حذف یا کاهش گونه‌های فعال اکسیژن از سیستم‌های آنتی‌اکسیدان تکامل‌یافته برخوردار هستند. سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان به دو دسته سیستم‌های آنزیمی و سیستم‌های غیرآنزیمی، تقسیم‌بندی می‌شوند. عملکرد

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

این سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، جارب کردن رادیکال‌های سمی تولیدشده طی استرس اکسیداتیو و در نتیجه حذف آنها از سلول است [3] و به همین ترتیب می‌توانند در مهار آسیب‌های اکسایشی در بدن استفاده شوند [4]. در سال‌های اخیر، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مستخرج از گیاهان دارویی، به‌واسطه داشتن ترکیبات مفید برای استفاده دارویی در بیماری‌های مرتبط با استرس اکسایشی مورد توجه قرار گرفته‌اند [5].

برحسب گونه گیاهی، آنزیم‌های متفاوتی در پاسخ گیاه به تنش‌های اکسایشی شرکت می‌کنند که مهم‌ترین آنها شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) پراکسیداز (PO)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوکاتینون ردوکتاز (GR) و پلی‌فنول‌اکسیداز (PPO) هستند [6]. سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربیک اسید (ویتامین C)، آلفا-توکوفرول، کاروتن‌ها، سالیسیلیک اسید (SA) و غیره است [3]. از جمله گیاهانی که وجود مواد آنتی‌اکسیدان در آنها بررسی شده است و در طب سنتی کاربرد فراوان دارد، گیاهان جنس آویشن (*Thymus*) است که پراکنش وسیعی در سطح جهان دارد و بومی نواحی معتدل اروپا، شمال آفریقا و آسیا است [7]. از کل گونه‌های آویشن دنیا حدود ۱۳٪ آنها منحصر به ایران هستند و در کل وجود ۱۸ گونه آویشن در ایران گزارش شده است [8, 9]. عصاره آویشن حاوی ۱۷ ترکیب از جمله تانن‌ها، پلی‌متوکسی‌فلاوون‌ها، تری‌ترپن‌ها و پلی‌ساکاریدها است. مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس آویشن‌ها ترپنوئیدهای تیمول و کارواکرول هستند که تنها در تعداد محدودی از گونه‌های گیاهی وجود دارند [9, 11]. این ترکیب‌ها در طب سنتی به‌عنوان ضداسپاسم، درمان سیاه‌سرفه، آمفیزم، برونشیت، عفونت ریه، سرماخوردگی، آنفلوآنزا، درمان نفخ و گرفتگی‌های عضلانی استفاده شده و همچنین یک عامل قوی ضد میکروبی، ضد قارچ و ضد کرم روده بوده و به‌عنوان حشره‌کش نیز مورد استفاده قرار گرفته است [10, 11]. امروزه از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده‌های متنوعی می‌شود که نشان‌دهنده اهمیت اقتصادی این گیاه است. گونه آویشن در مرحله جوانه‌زنی بذر نسبت به تنش‌های محیطی به‌ویژه خشکی و شوری حساس هستند که در کاهش تولید اسانس روغنی در گیاه تاثیر بسزایی دارد [12]. لذا در این پژوهش درصد هستیم تا با به‌کارگیری سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک فیتوهورمون موثر در تعدیل تنش‌های محیطی [13] این اثر را کاهش دهیم تا کیفیت گیاه آویشن تولیدشده در اثر تنش کاهش پیدا نکند. به این منظور بذرها را با سالیسیلیک اسید تیمار می‌کنیم و پس از رویش ویژگی‌های رشدی و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی را در آن می‌سنجیم.

مواد و روش‌ها

مواد: در پژوهش تجربی حاضر بذره‌های گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. گایاکل، نیتروبلوتترازولیوم، ریبوفلاوین، کوماسی بریلیانت بلو EDTA، G250 (سیگما؛ ایالات متحده) و سایر مواد شیمیایی (مرک؛ آلمان) خریداری شدند.

تهیه بذر گیاهی و طراحی آزمایش: بذره‌های گیاه آویشن باغی با دقت پاک شدند. ضایعات و همچنین بذره‌های ناقص و شکسته جدا شد. برای جداسازی بذره‌های پوک از بذره‌های سالم بذره‌های محلول در آب مقطر به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. بذرها قبل از مرحله کاشت با دقت شسته و سپس استریل شدند. بذرها

شد [17]. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش، شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۴۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات با pH برابر ۷/۸ و ۵۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار بود. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از کاهش جذب ۲۴۰ نانومتر به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد [18].

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل تشکیل‌شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. میزان جذب تتراگایاکل (حاصل از اکسید شدن گایاکل) در ۴۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه‌نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در ۴۷۰ نانومتر، ضریب خاموشی تتراگایاکل ($\epsilon = 2505 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ ، مقدار تتراگایاکل تشکیل‌شده محاسبه و فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت میکرومول تتراگایاکل تشکیل‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین عصاره گزارش شد [19].

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با اندازه‌گیری توانایی مهار احیای فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به روش بی‌چامپ و فریدویچ مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸ حاوی EDTA ۱/۱ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH برابر ۱۰/۲)، ۲۵۰ میکرولیتر ال-متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر NBT ۷۵ میکرومولار، ۲۵۰ میکرولیتر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار و ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سپس نمونه‌ها با فاصله ۳۰ سانتی‌متر زیر یک منبع نور در معرض نور لامپ فلورسنت ۳۰ وات قرار گرفتند. واکنش با روشن کردن لامپ آغاز و پس از ۳۰ دقیقه واکنش با خاموش کردن لامپ متوقف شد. سپس جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده و تفاوت جذب بین هر نمونه و شاهد محاسبه شد. واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که منجر به مهار ۵۰٪ احیای NBT در حضور نور می‌شود برحسب گرم وزن تر در ساعت محاسبه شد [20, 21].

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از روش ریموند استفاده شد. ابتدا تعدادی لوله آزمایش در حمامی با دمای 40°C گذاشته شد. سپس ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲/۲ مولار با pH برابر ۶/۱ و ۳۰۰ میکرولیتر پیروگال ۰/۲ مولار به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. پس از رسیدن دمای لوله‌ها دقیقاً به 40°C به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر عصاره افزوده و تغییرات جذب در ۴۳۰ نانومتر خوانده شد [22].

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار حداقل از سه نمونه مستقل انجام شد. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel 2007 رسم شدند.

یافته‌ها

در پژوهش حاضر به‌منظور تقویت سد آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان در گیاه حساس به تنش اکسایشی آویشن در مرحله جوانه‌زنی از یک هورمون گیاهی تحت عنوان سالیسیلیک اسید استفاده شد. بذور تیمار شده با بذور کنترل از لحاظ جوانه‌زنی تفاوتی نداشتند (درصد جوانه‌زنی در تکرارهای هر دو گروه بین ۸۶

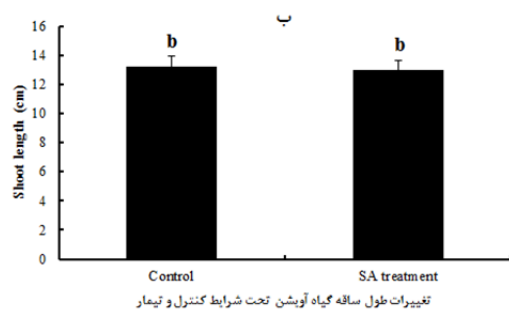
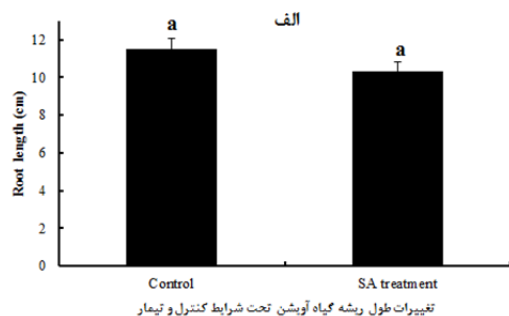
به مدت ۵ دقیقه به محلول هیپوکلرید سدیم ۵٪ منتقل، سپس مجدداً با آب مقطر استریل به دقت آبکشی شده و در نهایت به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند. آبکشی نهایی با آب مقطر استریل انجام شد. سپس بذرها به دو دسته مساوی؛ دسته اول به‌عنوان گروه شاهد و دسته دوم به‌عنوان گروه تیمار تقسیم شدند. برای اعمال تیمار، بذرها در گروه تیمار به مدت ۱۶ ساعت در ۱۵ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید قرار داده شد [14]. گروه شاهد نیز به مدت ۱۶ ساعت در آب قرار گرفتند. محلول پایه، سالیسیلیک اسید یک مولار بود که با حل کردن پودر سالیسیلیک اسید در ۷۰٪ متانول (حجمی/حجمی) تهیه شد. از غلظت پایه یک مولار با رقیق کردن توسط آب مقطر محلول ۲ میلی‌مولار مورد استفاده تهیه شد. سپس برای کاشت به بستر مناسب کشت منتقل شدند. بستر کاشت بذرها مخلوطی از خاک، پیت و پرلیت با نسبت مساوی ۱:۱:۱ بود. مخلوط خاک پس از آماده شدن اتوکلاو شد. خاک اتوکلاو شده با مقدار مساوی در گلدان‌ها ریخته شد. بذرها در محیط استریل در خاک گلدان کاشته شدند. در هر گلدان ۲۰ تا ۲۵ بذر کاشته و روی بذرها با خاک برگ سبک پوشیده شد. گلدان‌ها بعد از دریافت برچسب مشخصات، به اتاقک کشت (فیتوترون) با شرایط ثابت و کنترل شده ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در دمای 25°C منتقل شدند. گلدان‌ها به‌طور منظم یک روز در میان با استفاده از آبفشان محتوی آب استریل آبیاری شدند. پس از جوانه‌زنی گیاهان در مرحله دوبرگی (۱۰ روز پس از کاشت) و قبل از ظهور سایر برگ‌ها برداشت شدند. اندام هوایی تعدادی از گیاهان بعد از برداشت، در نیتروژن مایع فریز و برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی در فریزر -80°C قرار گرفته و سپس پارامترهای رشد، درصد جوانه‌زنی، پراکسیداسیون مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و پلی‌فنل اکسیداز اندازه‌گیری شد.

بررسی پارامترهای رشد: درصد جوانه‌زنی، وزن تر، خشک همچنین میزان طول اندام هوایی و ریشه گیاهان در گروه‌های تیمار و کنترل اندازه‌گیری شد.

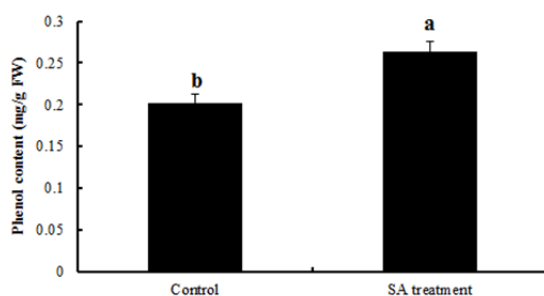
سنجش فنول کل: اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش *سونالد و لیاما* صورت گرفت. ۰/۵ گرم از اندام هوایی گیاه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ ساییده و به مدت ۲۲-۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به یک میلی‌لیتر محلول روبی یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه شد و با آب مقطر دوبار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از اسیدگالیک رسم و غلظت ترکیبات فنولی کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه براساس منحنی استاندارد محاسبه شد [15].

تهیه عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی ۰/۱ گرم بافت تر گیاه در یک هاون چینی سرد حاوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۸ حاوی اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار و پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) ۱٪، ساییده شد. عصاره با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 4°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول روبی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد [16].

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش *دهیندا* و همکاران و روش تغییر یافته *چانس و میلهی* انجام



نمودار ۲ (الف) میانگین تغییرات میزان طول ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌های میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ است، (ب) میانگین تغییرات میزان طول ساقه تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌های میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمار و کنترل براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

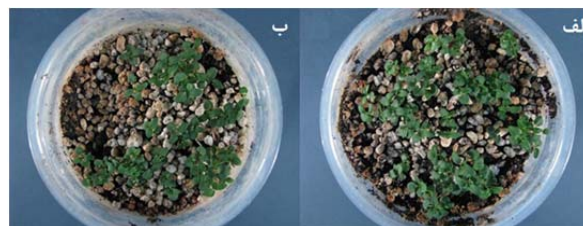


تغییرات محتوای فنولی گیاه آویشن تحت شرایط کنترل و تیمار

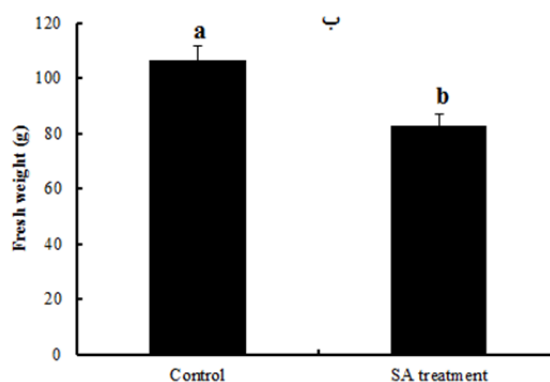
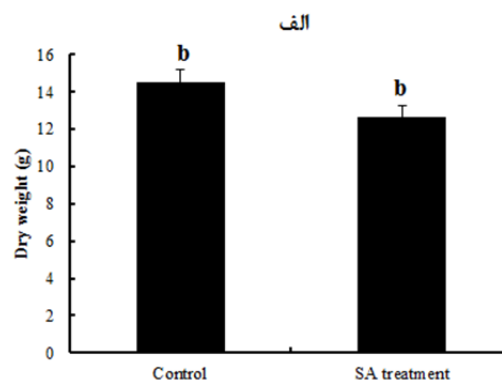
نمودار ۳ میانگین تغییرات محتوای فنل کل تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌های میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال مقدار p کوچکتر از ۰/۰۱ است.

به منظور بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی برخی از آنزیم‌های مهم در مهار مولکول‌های اکسایشی سنجیده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در عصاره گیاهی تیمار و شاهد براساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری و مقایسه شد. همان‌طور که نمودار ۴-الف نشان می‌دهد فعالیت آنزیم پراکسیداز در گروه تیمار افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل داشت. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار است (نمودار ۴-ب). این آنزیم در خنثی کردن رادیکال آزاد سوپراکسید نقش مهمی ایفا می‌کند. آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای را در گروه تیمار نشان داد که در نمودار ۴-ج به وضوح نمایان است. براساس نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز که تبدیل H_2O_2 به آب را کاتالیز می‌کند، نیز با تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (نمودار ۴-د).

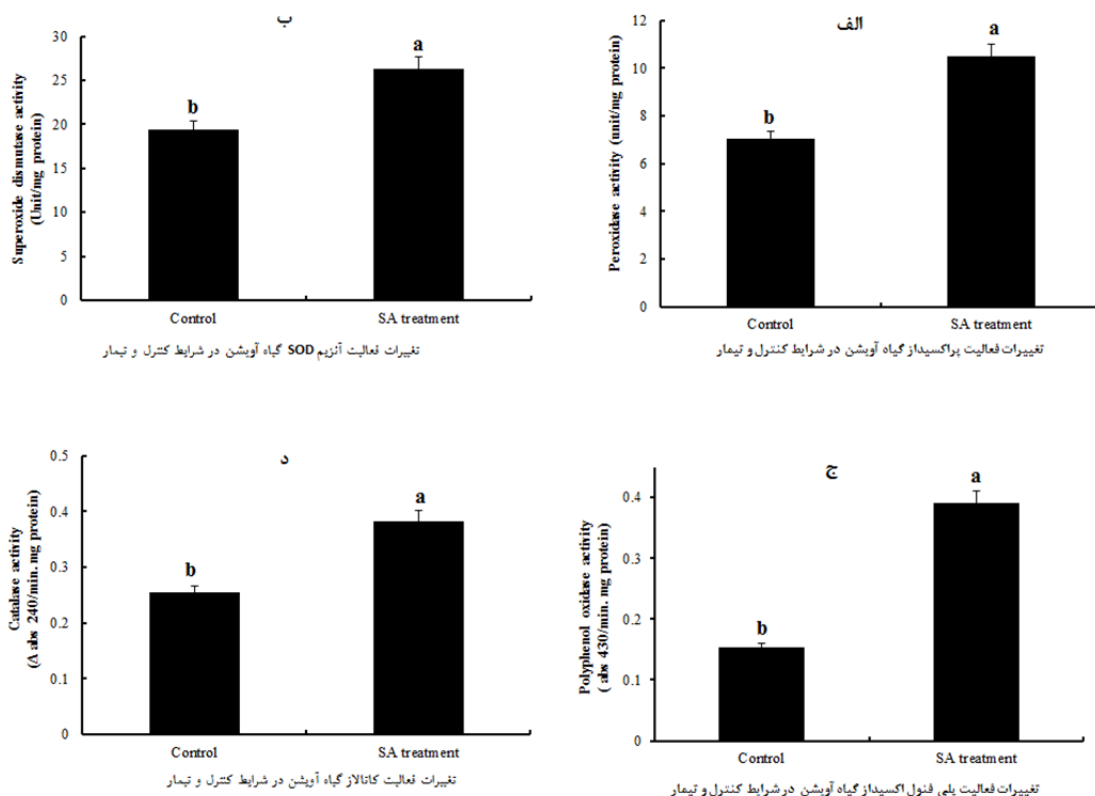
تا ۸۸٪ بود؛ شکل ۱). نتایج نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار رشد بذرهای تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود. همان‌طور که نمودار ۱-الف نشان می‌دهد وزن خشک در گیاهان حاصل از بذرهای تیمار شده با سالیسیلیک اسید نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری پیدا نکرده است. در حالی که وزن تر گیاهان تیمار شده کاهش معنی‌داری در مقایسه با وزن تر گیاهان شاهد نشان داد (نمودار ۱-ب). پارامترهای رشدی گیاه مانند میزان طول ریشه و میزان طول ساقه در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۲-الف و ب). در مقابل ترکیبات فنولی به عنوان ماده ضد اکسایشی غیر آنزیمی (نمودار ۳) با تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نشان داد که نشان‌دهنده تاثیر مثبت تیمار در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آویشن است.



شکل ۱ بذور گیاه آویشن باغی در مرحله دو برگی (پس از ۱۰ روز؛ الف) گروه کنترل، (ب) گروه تحت تیمار با سالیسیلیک اسید



نمودار ۱ (الف) میانگین تغییرات میزان وزن خشک تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌های میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ است، (ب) میانگین تغییرات میزان وزن تر تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌های میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال مقدار p کوچکتر از ۰/۰۱ است.



نمودار ۴) سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه آویشن کنترل و تیمار شده؛ الف) میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن، ب) میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن، ج) میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن، د) میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت شرایط کنترل و تیمار در گیاه آویشن؛ داده‌ها در هر چهار آزمایش میانگین سه تکرار خطای معیار هستند؛ حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال مقدار p کوچکتر از ۰/۰۱ است.

بحث

سالیسیلیک اسید و آنالوگ‌های نزدیک آن سطح برگ و وزن خشک افزایش یافت^[25]. در یک مطالعه دیگر فریدودین و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند که تجمع ماده خشک به‌طور قابل توجهی در کلزا با اسپری سالیسیلیک اسید افزایش یافته، با این حال، غلظت‌های بالاتر از سالیسیلیک اسید اثر مهاری داشته است^[26]. در مطالعه دیگری حیاط و همکاران بیان کردند که تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاهچه گندم تیمار که دانه‌های آن آغشته به غلظت ۰/۱۰ میلی‌مولار از سالیسیلیک اسید بودند، به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است^[27]. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که اثر سالیسیلیک اسید برونی روی رشد رویشی به گونه گیاهی، مرحله رشد و غلظت سالیسیلیک اسید بستگی دارد^[28]. به‌طور کلی اثر مثبت سالیسیلیک اسید به‌عنوان محرک رشد در سویا^[29]، گندم^[30]، ذرت^[31] و بابونه^[32] گزارش شده است. ترکیبات فنولی از مشتقات مسیر فنیل‌پروپانویید بوده و از اجزای سیستم دفاع غیرآنزیمی و آنتی‌اکسیدانی سلول محسوب می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان خاموش‌کننده یا جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن عمل نمایند و سایر اجزای سلولی از جمله لیپیدها را از حمله آنها حفظ کنند^[33]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش‌تیمار با سالیسیلیک اسید موجب افزایش مقدار ترکیبات فنولی شد، این ترکیبات آنتی‌اکسیدان احیاکننده بوده و با مکانیزم‌های متعددی مثل جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی یا قرارگرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند^[34, 35]. براساس گزارش‌های

سالیسیلیک اسید یا اسیداورتوئیدروکسی‌بنزوئیک و مشتقات آن از جمله ترکیبات جدیدی هستند که به‌عنوان فیتوهورمون در برخی گیاهان برای تعدیل پاسخ‌های گیاه به تنش‌های محیطی عمل می‌کنند^[13]. سالیسیلیک اسید در جوانه‌زنی، نفوذپذیری غشا، تنفس میتوکندری، بسته‌شدن روزنه‌ها، انتقال مواد، فتوسنتز، سرعت رشد و جذب یون‌ها تأثیرگذار است^[23, 24]. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنولی است که همراه با مشتقات مختلف آن از جمله استیل سالیسیلیک اسید (ASA) و مشتقات متبیل آن در داروسازی و درمان بیماری‌ها کاربرد فراوانی دارد. همچنین سالیسیلیک اسید یک هورمون گیاهی قوی است که در جنس‌های مختلف گیاهان به‌خاطر نقش تنظیم‌کنندگی در متابولیسم گیاهی بسیار مورد توجه است. سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد عمل نموده و نقش فعالی را در پاسخ‌های دفاعی گیاه ایفا نماید. بر همین اساس در این مطالعه تلاش شده است به‌دلیل اهمیت اقتصادی گیاه آویشن شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی این گیاه با تیمار سالیسیلیک اسید بهبود یابد. بنابراین شاخص‌های رشدی و آنتی‌اکسیدانی گیاهان تیمار شده با این هورمون گیاهی و گروه شاهد سنجیده و با هم مقایسه شد. نتایج حاکی از آن است که تیمار سالیسیلیک اسید تأثیر معنی‌داری در پارامترهای رشد گیاه آویشن نداشت. در تحقیقات مشابه درباره اثر سالیسیلیک اسید بر تغییرات پارامترهای رشد بین پژوهشگران توافق نظر وجود ندارد و تأثیر سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشد براساس میزان غلظت و همچنین مدت‌زمان تأثیر آن متغیر است. در ذرت و سویا با تیمار

و نوع گونه گیاهی در این پاسخ تاثیر داشته است. /وجهها و چترجیبی گزارش کردند که تیمار با سالیسیلیک اسید مقاومت گیاه گوجه را در برابر آلودگی قارچی *تریکودرما هارزینوم* (*Trichoderma harzianum*) با افزایش میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز افزایش می دهد [44]. در این پژوهش نیز پیش تیمار با سالیسیلیک اسید موجب افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی مثل آنزیم های CAT، SOD، PPO و PO شد. فعالیت این آنزیم ها در ارتباط با یکدیگر است بنابراین افزایش فعالیت همزمان آنها در اثر تیمار منطقی به نظر می رسد. حضور تنش اکسایشی و آسیب غشایی گرچه با کاهش پارامترهای رشد در گروه تیمار همراه است ولی ممکن است منجر به القای پاسخ های آنتی اکسیدانی شود که سلول ها را از آسیب های اکسیداتیو ناشی از تنش محافظت می نماید. هنگامی که سالیسیلیک اسید در غلظت و زمان مناسب به کار برده می شود با تغییر فعالیت آنزیم هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز یا NAD(P)H اکسیداز متصل به غشای سیتوپلاسمی (آنزیم های دخیل در تولید یا تجزیه H_2O_2) موجب افزایش موقت و جزئی در مقدار H_2O_2 (به عنوان پیامبر ثانویه) شده که منجر به القای ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول می شود [45, 46]. به این ترتیب برای القای فعالیت آنتی اکسیدانی توسط سالیسیلیک اسید، غلظت های بسیار کمی از H_2O_2 مورد نیاز است و H_2O_2 در غلظت های بالا، خود به عنوان عامل ایجادکننده تنش اکسیداتیو محسوب می شود. بنابراین غلظت سالیسیلیک اسید استفاده شده بسیار مهم است. بنابراین نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد سالیسیلیک اسید با اعمال یک تنش اکسایشی ضعیف منجر به فعال کردن سیستم دفاع آنتی اکسیدان در گیاه شده است. بنابراین استفاده از آن می تواند مقاومت گیاه در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تنش های محیطی را بهبود بخشد، ضمن اینکه با افزایش محتوی مولکول های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی ارزش دارویی این گیاه افزایش می یابد.

از محدودیت های پژوهش حاضر عدم بررسی تاثیر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید روی القای پاسخ های آنتی اکسیدانی در گیاه آویشن است. بنابراین پیشنهاد می شود غلظت های بالاتر و پایین تر از غلظت سالیسیلیک اسید مورد استفاده در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گیرند. علاوه بر این پاسخ گیاه در مراحل مختلف رشدی گیاه آویشن مطالعه شود.

نتیجه گیری

تیمار با سالیسیلیک اسید می تواند منجر به افزایش مقاومت آویشن باغی در مقابل تنش های استرس زا شود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از اساتید و پژوهشگران دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری برای همکاری علمی سپاسگزاری می شود. **تاییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است. **تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سمیه محمودی طرخورانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ فروغ سنجریان دهقانی (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ مریم منصف شکری (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)

موجود در غلظت های بالای سالیسیلیک اسید، افزایش قابل توجهی در میزان ترکیبات فنولی مشاهده می شود در حالی که با کاهش غلظت سالیسیلیک اسید میزان این ترکیبات کاهش می یابد [36]. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش فلاونوئیدها در گیاه درمنه شده است [37]. در پژوهش حاضر تیمار سالیسیلیک اسید منجر به افزایش ترکیبات فنولی شده که با سایر نتایج همخوانی دارد. گزارش شده است که سالیسیلیک اسید بیان ژن و فعالیت آنزیمی فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) را القا می کند که به نوبه خود، باعث تجمع ترکیبات فنولیک می شود [32, 38, 39]. با این حال، شکل شیمیایی ترکیبات فنولیک که در سلول ظاهر خواهد شد نه تنها به فعالیت آنزیم های بیوستتزی بلکه به فعالیت آنزیم های متابولیزمی فنولی و حتی به وضعیت اکسیداتیو سلول بستگی دارد. سالیسیلیک اسید همچنین می تواند ایجاد انواع گونه های ترکیبات فنولی در بافت های گیاهی را تغییر دهد و منجر به تجمع انواع مناسب تر این ترکیبات بسته به شرایط حاکم شود [39].

گیاهان برای مقابله با شرایط تنش زا دارای مکانیزم های حفاظتی خاصی هستند که شامل مولکول ها و آنزیم های آنتی اکسیدان است. آنتی اکسیدان ها به سه گروه کلی تقسیم می شوند که شامل ترکیبات غشایی و محلول در چربی مثل آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها، ترکیبات قابل حل در آب مثل آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها و آنزیم هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، یکی از جاروب کننده های اصلی O_2^- است و عمل آنزیمی آن منجر به تولید H_2O_2 و O_2 می شود. H_2O_2 تولید شده توسط SOD که ترکیبی سمی و خطرناک برای سلول است، طی واکنشی که توسط کاتالاز انجام می شود به H_2O تبدیل می شود. کاتالاز یکی از انواع پراکسیدازها است که شکستن H_2O_2 را کاتالیز می نماید. در حالی که دیگر پراکسیدازها H_2O_2 را با اکسید نمودن یک سوبسترای همراه نظیر ترکیبات فنولی یا سایر آنتی اکسیدان ها نظیر آسکوربات تجزیه می کنند [21, 40]. بنابراین افزایش همزمان ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز منطقی به نظر می رسد. افزایش فعالیت کاتالاز یک پاسخ سازشی برای غلبه بر آسیب های ناشی از سطوح سمی و احیا کننده H_2O_2 است که طی متابولیسم طبیعی سلول نیز تولید می شود.

در اغلب موارد تحت تنش های زیستی و غیرزیستی میزان آنزیم های آنتی اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز افزایش می یابد. در سلول های کالوس تیمار شده با سالیسیلیک اسید، فعالیت پراکسیداز به طور قابل توجهی نسبت به سلول های تیمار نشده افزایش یافته است [36]. در مطالعه ای گزارش شد که کاربرد سالیسیلیک اسید برونی سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مانند SOD در ذرت می شود [41]. همچنین *پاند* و *پاترا* بیان کردند که آغشته کردن دانه با غلظت پایین تر سالیسیلیک اسید قبل از کاشت، سطوح بالای ROS ناشی از قرارگرفتن در معرض کادمیوم را با افزایش سطح آنزیم های مختلف آنتی اکسیدان از جمله SOD کاهش می دهد، در نتیجه از گیاهان در برابر آسیب های اکسیداتیو محافظت می کند [42]. با این حال، برخلاف این مشاهده، چودهوری و *پاند* گزارش کردند پیش تیمار بذر برنج با خیساندن در سالیسیلیک اسید قبل از کاشت باعث کاهش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله SOD و گلوتاتیون ردوکتاز می شود [43] که احتمالاً غلظت و مدت زمان تیمار

16- Khanpour Ardestani N, Sharifi M, Behmanesh M. Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. *J Plant Res*. 2015;27(5):840-53. [Persian]

17- Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. 2nd Volume. Cambridge: Academic Press; 1955. pp. 764-75.

18- Dhindsa RS, Matowe W. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J Exp Bot*. 1981;32(1):79-91.

19- Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat Res*. 1991;247(1):57-64.

20- Beauchamp Ch, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971;44(1):276-87.

21- Sudhakar Ch, Lakshmi A, Giridarakumar S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci*. 2001;161(3):613-9.

22- Raymond J, Rakariyatham N, Azanza JL. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*. 1993;34(4):927-31.

23- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J Plant Physiol*. 2003;160(5):485-92.

24- Guan L, Scandalios JG. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(13):5930-4.

25- Rajjou L, Belghazi M, Huguier R, Robin C, Moreau A, Job C, et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol*. 2006;141(3):910-23.

26- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*. 2003;41(2):281-4.

27- Hayat S, Fariduddin Q, Ali B, Ahmad A. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron Hung*. 2005;53(4):433-7.

28- Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J Exp Bot*. 2011;62(10):3321-38.

29- Gutiérrez-Coronado MA, Trejo-López C, Larqué-Saavedra A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol Biochem*. 1998;36(8):563-5.

30- Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci*. 2003;164(3):317-22.

31- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J Plant Physiol*. 2007;164(6):728-36.

32- Kováčik J, Grúz J, Bačkor M, Strnad M, Repčák M. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Rep*. 2009;28(1):135-43.

33- Solecka D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiol*

منابع مالی: منابع مالی طرح از طریق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (طرح شماره ۶۴۰) تامین شده است.

منابع

1- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035-42.

2- Rocha-Guzmán NE, Herzog A, González-Laredo RF, Ibarra-Pérez FJ, Zambrano-Galván G, Gallegos-Infante JA. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chem*. 2007;103(2):521-7.

3- Bahari AA, Sokhtesaraei R, Chaghazardi HR, Masoudi F, Nazarli H. Effect of water deficit stress and foliar application of salicylic acid on antioxidants enzymes activity in leaves of *Thymus daenensis* subsp. *lanceifolius*. *Cercet Agron Mold*. 2015;48(1):57-67.

4- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011;89(3):217-33.

5- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six thymus species. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:403950.

6- Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker JM, editor. *Proteins*. 1st Edition. 1st Volume. New York: Humana Press; 1984. pp. 41-55.

7- McGimpsey JA, Douglas MH, Van Klink JW, Beauregard DA, Perry NB. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Fragr J*. 1994;9(6):347-52.

8- Jamzad Z. *Thymus and Satureja* species of Iran. 1st Edition. Tehran: Research Institute of Forests & Rangelands; 2009. [Persian]

9- Mozaffarian V. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. 1st Edition. Tehran: Farhang Moaser Publishers; 2015. [Persian]

10- Morton JF. Major medicinal plants: Botany, culture and uses. 1st Edition. Springfield: Charles C Thomas Publishers; 1977.

11- Tabrizi Raeini L, Koocheki A, Nassiri Mahallati M, Rezvani Moghaddam P. Germination behaviour of cultivated and natural stand seeds of Khorasan thyme (*Thymus transcaspicus*. Klokov) with application of regression models. *Iran J Field Crops Res*. 2008;5(2):249-57. [Persian]

12- Nasiri M, Seedian SE, Sharifi Ashorabadi E. Investigation of seed germination, establishment and identification of different *Thymus* species available in Natural Resources Gene Bank of Iran. *Iran J Med Aromat Plants*. 2016;32(1):115-26. [Persian]

13- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul*. 2000;30(2):157-61.

14- Zamani E, Sanjarian F, Mohammadi Goltapeh E, Safaie N. Studying the resistance of wheat seedlings grown from treated seeds with salicylic acid against *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Prot*. 2016;39(1):1-14. [Persian]

15- Fletcher RS, Kott LS. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, 26-29 September, 1999, Canberra, Australia. Unknown Publisher City: Unknown publisher; 1999.

- on plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005;60(3):324-49.
- 41- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol.* 2008;165(9):920-31.
- 42- Panda SK, Patra HK. Effect of salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative damage in *Oryza sativa* L. leaves. *Acta Physiol Plant.* 2007;29(6):567-75.
- 43- Choudhury S, Panda SK. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots. *Bulg J Plant Physiol.* 2004;30(3-4):95-110.
- 44- Ojha S, Chatterjee N. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* F. sp. *Lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. *J Plant Prot Res.* 2012;52(2):220-5.
- 45- Hayat S, Ali B, Ahmad A. Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In: Hayat S, Ahmad A, editors. *Salicylic acid: A plant hormone*. 1st Edition. Dordrecht: Springer; 2007. pp. 1-14
- 46- Horváth E, Szalai G, Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul.* 2007;26(3):290-300.
- Plant. 1997;19(3):257-68.
- 34- Chu YH, Chang CL, Hsu HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric.* 2000;80(5):561-6.
- 35- He Y, Zhu ZJ. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biol Plant.* 2008;52(4):792-5.
- 36- Lajara MM, López-Orenes A, Ferrer MA, Calderón AA. Long-term exposure treatments revert the initial SA-induced alterations of phenolic metabolism in grapevine cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;122(3):665-73.
- 37- Asghari GR, Ghasemi R, Yosefi M, Mehdinezhad N. Effect of hormones, salicylic acid, chitosan on phenolic compounds in *Artemisia aucheri* in vitro. *J Plant Proc Func.* 2015;3(10):93-100. [Persian]
- 38- Chen JY, Wen PF, Kong WF, Pan QH, Zhan JC, Li JM, et al. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biol Technol.* 2006;40(1):64-72.
- 39- López-Orenes A, Martínez-Moreno JM, Calderón AA, Ferrer MA. Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013;113(3):417-27.
- 40- Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects