بررسی تغییرات میزان اسانس وخواص بیوشیمیایی گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) تحت تاثیر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک

سمیه صادقی فرد؛ مجید عزیزی؛ سارا کریمی

DOI: 10.22067/jhs.2021.59045.0

چکیده:

تنظیم کننده‌های رشد نقش حیاتی در طی مراحل رشد و نموی گیاهان ایفا می‌کنند و کاربرد آنها می‌توانند باعث بهبود و افزایش عملکرد گیاهان شوند. یکی از مهم‌ترین این ترکیبات اسید سالیسیلیک می‌باشد که به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در مقادیر مختلف، بر عملکرد و متابولیت‌های ثانویه کاکوتی، آزمایشی به صورت کرت های خرد شده در زمان با سه تکرار در سال زراعی ۹۴-۹۳ در مزرعه دانشکده کشاورزی شیروان و آزمایشگاه دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. فاکتورهای آزمایشی شامل زمان های مختلف محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در سه زمان (آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی) به عنوان فاکتور اصلی و غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک در چهار سطح (10^{-2}، 10^{-4} و 10^{-6} مولار و صفر (شاهد)) به عنوان فاکتور فرعی بودند. صفات مورد بررسی در این آزمایش شامل وزن تر و خشک، ارتفاع بوته، درصد و عملکرد اسانس و میزان ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها بودند. اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان محلول پاشی بر وزن تر و خشک، ارتفاع بوته، میزان فنولیک کل و فلاونوئیدهای کل در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. نتایج نشان دادکه بیشترین وزن تر (۲۶۴/۷ گرم بر متر مربع) و خشک (۹۳/۱ گرم بر متر مربع) در تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک در زمان محلول‌پاشی در حین رشد رویشی و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد در زمان گلدهی بدست آمد. بیشترین ارتفاع بوته (۲۹ سانتی متر) مربوط به تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک و در حین رشد رویشی و کمترین مقدار آن (۲۳/۲ سانتی متر) مربوط به تیمار شاهد در زمان گلدهی بود. بیشترین میزان ترکیبات فنولیک کل (۰/۵ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن خشک) در تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک در آغاز رشد رویشی و کمترین مقدار آن (۰/۲۴ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن خشک) در تیمار 10^{-2} مول اسیدسالیسیلیک در زمان گلدهی مشاهده شد. بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۳۱ میلی گرم معادل کوئرسیتین در گرم وزن خشک) را تیمار 10^{-4} مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین میزان (۰/۱۷ میلی گرم معادل کوئرسیتین در گرم وزن خشک) را تیمار 10^{-6} مول اسیدسالیسیلیک در آغاز رشد رویشی به خود اختصاص دادند. بیشترین درصد اسانس (۱/۶۶ درصد) مربوط به غلظت 10^{-2}مولار ودر زمان گلدهی و کمترین میزان آن (۰/۳۳ درصد) مربوط به شاهد (صفر) و در حین رشد رویشی بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بالاترین عملکرد اسانس (۱/۱۴۲ میلی گرم در متر مربع) در حین رشد رویشی ودر غلظت 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک و کمترین میزان آن (۰/۲۲۱ میلی گرم در متر مربع) در زمان گلدهی و در تیمار شاهد مشاهده گردید. در مجموع می‌توان اظهار نمود که به منظور دستیابی به بالاترین میزان عملکرد اسانس، میزان فنولیک کل و فلاونوئید کل محلول‌پاشی غلظت اسیدسالیسیلیک 10^{-2} مولار درحین رشد رویشی مناسب‌ترمی‌باشد.

کلمات کلیدی: اسیدسالیسیلیک ،تنظیم کننده رشد، کاکوتی، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه:

گیاه دارویی و معطر کاکوتی با نام علمی(*Ziziphora clinopodioides* Lam.) متعلق به تیره نعناعیان است (27). گیاهی چندساله با قاعده چوبی، به ارتفاع ۷ تا ۵۰ سانتی‌متر است. برگ‌ها بدون دمبرگ، خطی و سرنیزه‌ای هستند. متشکل از گل های متعدد بدون دمگل، به رنگ سبز یا بنفش، جام گل سفید، صورتی تا بنفش، میوه فندقه و به رنگ قهوه‌ای می‌باشد (15 و 31). گیاهان تیره نعناع در معالجه امراض معده و به عنوان ضدعفونی کننده برای رفع سرماخوردگی بکار می‌رود (3). اجزاء کاکوتی کوهی فعالیت آنتی‌توموری دارد (8). می‌توان از آن در درمان تب، دردهای قاعدگی و تونوس معده استفاده کرد (28). نتایج تحقیقات صالحی و همکاران روی شناسایی ترکیبات اسانس کاکوتی نشان داد که از ۹۹/۵ درصد ترکیبات شناسایی شده اسانس این گیاه ۹۳/۳ درصد آن مونوترپن‌های اکسیژنه از جمله پولگون (۴۸/۵ درصد)، پیپریتنون (۱۷/۴درصد)، پی منت-۳-ان-۸-ال (۱۲/۵درصد) و تیمول (۸ درصد) می‌باشد. ترکیب اصلی و غالب اسانس کاکوتی همانند سایر گونه‌های این جنس پولگون است (28).

اسیدسالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک ترکیب فنولی طبیعی با حلقه آروماتیک و یک گروه هیدروکسیل است و به عنوان یک القا کننده موثر در بیان ژن های مقاوم شناخته شده است که پس از افزودن به سطح بیرونی بسیاری از گیاهان، پروتئین های مربوط به تنش را به رمز در می آورد (18). اسید سالیسیلیک به عنوان یک شبه هورمون فنولیک تنظیمات درون گیاه را انجام می‌دهد و نقش ان در سیستم دفاعی در مقابل تنش‌های زیستی (عوامل بیماری‌زا) و غیر زیستی (عناصرسنگین، شوری، خشکی و ازن) به خوبی مشخص است (21).

در سال ۱۸۲۸ یوهان باخنر، موفق به جدا نمودن مقداری از سالیسیلین و گلوکوزید از سالیسیلین الکل گردید که سالیسیلات عمده در پوست درخت بید به‌شمار می‌رفت و نامگذاری آن با توجه به نام لاتین درخت بید (salix) صورت گرفت (14). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به‌منظور بررسی اثر اسیدسالیسیلیک بر میزان کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی انجام گرفته است در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده، اسیدسالیسیلیک به‌عنوان القا کننده ترکیبات ثانویه گیاهی معرفی گردیده است. وجود اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک ترکیب افزوده در محیط کشت، افزایش ترکیبات فنولیک کل را به همراه داشته است (26). کاربرد خارجی اسیدسالیسیلیک در دامنه‌ای از فرایندهای مختلف در گیاهان مانند جوانه‌زنی بذور (18)، بسته شدن روزنه‌ها، تبادل و انتقال یون‌ها اثر داشته است. تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه ریحان، افزایش در تعداد شاخ و برگ و افزایش گل‌های تولیدی را به همراه داشت (10). در مطالعه‌ای روی تاج خروس قرمز مشخص گردید که تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت بالا، افزایش ارتفاع گیاه، تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاه و طول ریشه را به همراه دارد (17). نتایج تیمار اسیدسالیسیلیک روی صفات مورفولوژیکی شنبلیله حاکی از آن بود که در اکثر موارد کاربرد این ماده و افزودن به غلظت تا سطح ۳ (غلظت 10^{-4} مول) سبب افزایش در صفات رویشی و زایشی اندازه‌گیری شده گردید و کاربرد غلظت بالاتر اسیدسالیسیلیک (10^{-6}مول) اثر منفی بر میزان صفات و عملکرد داشت (23). محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک روی بخش‌های هوایی گیاهان ریحان و مرزنگوش باعث افزایش درصد و کیفیت اسانس شد (10).

گزارش‌هایی از اثر اسیدسالیسیلیک بر افزایش عملکرد برخی گیاهان مانند سویا (20)، لوبیا چشم بلبلی (37) و نخود فرنگی (19) منتشر شده است. مطالعات نشان داد که کاربرد اسیدسالیسیلیک اگزوژن (بیرونی)، باعث افزایش میزان محصول در ماش (16) و افزایش مقاومت به عوامل بیماری زا در گیاهانی مانند توتون و تنباکو (33) شد. همچنین نشان داده شد که تزریق سالیسیلیک اسید در محیط آبکشت بابونه آلمانی منجر به تغییراتی در ترکیب های کومارینی برگ‌های این گیاه شد (29). درپژوهشی تیمار سالیسیلیک اسید در برگهای جو منجر به افزایش آنتی‌اکسیدانت‌ها شد (1).

با بررسی مردانی و همکاران (۱۳۹۰) در خصوص تاثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک دانهال خیار تحت تنش خشکی مشاهده شد که اسید سالیسیلسک میزان سطح برگ و شاخص کلروفیل را به ترتیب ۶۰ و ۱۵ درصد افزایش داد (23). قطرساقه، ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن خشک شاخساره و ریشه و بیوماس با کاربرد اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد.

آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف اسیدسالیسیلیک در زمان‌های مختلف محلول‌پاشی، بر برخی صفات کمی و کیفی گیاه کاکوتی طراحی شد.

مواد و روش ها:

این تحقیق در سال زراعی ۹۴-۹۳ در شرایط مزرعه‌ای، به صورت کرت های خرد شده در زمان در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی شیروان (عرض جغرافیایی ۳۷/°۴۰، طول جغرافیایی۵۷/°۹۳ و با ارتفاع ۱۰۹۷ متر از سطح دریا) و شرایط آزمایشگاهی در گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. کاشت بذر گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) به صورت جوی و پشته‌ای به فاصله روی ردیف ۱۵ و بین ردیف ۵۰ سانتی متر در تاریخ ۲۵ اسفند سال ۹۳ در کرت هایی به ابعاد ۲×۲ متر انجام شد. بلافاصله پس از کاشت آبیاری انجام شد و بعد از ۲۰ روز که بذرها به خوبی جوانه زدند، آبیاری دوم صورت گرفت. آبیاری در فواصل ۷ روز و عملیات وجین علف های هرز نیز هفته‌ای یک بار به صورت دستی انجام شد. بذر این گیاه از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید.

اسید سالیسیلیک (Sigma Aldrich, 99.5%) در سه مرحله از رشد گیاه یکساله (آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی)، در غلظت‌های (صفر، 10^{-2}، 10^{-4} و 10^{-6} مولار) در سه تکرار محلول‌پاشی شد. اولین محلول پاشی (آغاز رشد رویشی یعنی در زمان دو یا سه برگی) در تاریخ ۱۵ فروردین ۹۴، دومین محلول پاشی (در حین رشد رویشی یعنی در اواسط رشد وقتی گیاه به ارتفاع ۱۰ یا ۱۵ سانتی‌متری رسید) در تاریخ ۱۵ اردیبهشت ۹۴ و سومین محلول پاشی (در زمان گلدهی) در اول تیرماه سال ۹۴ انجام شد.

برداشت بوته‌ها در ۲۰ تیر ماه سال ۹۴ بدون فاصله از سطح زمین انجام شد. به منظور اندازه گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت یک هفته در شرایط سایه قرار داده شدند. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب، در شرایط کاملا یکسان و به مدت ۴ ساعت انجام شد. برای اسانس گیری ۳۰ گرم نمونه خشک در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب استفاده گردید. پس از محاسبه درصد اسانس، عملکرد آن نیز در واحد مترمربع (گرم در مترمربع وزن خشک بوته)، از عملکرد وزن خشک اندام هوایی بوته در هر مترمربع تعیین گردید. جهت اندازه گیری صفات بیوشیمیایی ابتدا از نمونه‌ها عصاره تهیه گردید. به منظور تهیه عصاره، ابتدا نمونه‌های خشک با آسیاب برقی به خوبی خرد و مقدار یک گرم از هر نمونه به ارلن ۵۰ میلی لیتری انتقال یافته و با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و از آن برای اندازه گیری میزان ترکیبات فنولیک کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها استفاده شد.

اندازه گیری فنولیک کل : محتوای فنولیک با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه گیری شد. به ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم یک مول به محلول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت.

اندازه گیری فلاونوئید: میزان فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید اندازه گیری شد. به ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره متانولی (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آی مقطر اضافه شد. جذب مخلوط ۳۰ دقیقه بعد از نگهداری در تاریکی، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرسیتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

اندازه گیری آنتی اکسیدانت: برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل)، ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی با یک میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید. برای نمونه شاهد یک میلی‌لیتر متانول خالص به جای یک میلی‌لیتر عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از متانول خالص استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شدند. اعداد بدست آمده از جذب نمونه توسط رابطه زیر به درصد مهار رادیکال آزاد (RSA) تبدیل شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \frac{(AC-AS)}{AC} \times 100$$

در این رابطه AC و AS به ترتیب برابر با عدد جذب کنترل و نمونه می‌باشد. اعداد بدست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره متانولی (۰/۱ ppm) نمونه‌ها می‌باشد

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماریJMP استفاده گردید.

نتایج و بحث:

عملکرد وزن تر و خشک:

براساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، وزن تر و خشک تحت تاثیر تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل آن ها در سطح احتمال یک درصد معنی دار شدند. با توجه به شکل (۱) بیشترین وزن تر (۲۶۴/۷۶۳ گرم بر مترمربع) و خشک (۹۳/۱۱ گرم بر متر مربع) مربوط به غلظت $۱۰^{-۲}$ مولار اسید سالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین آن مربوط به نمونه شاهد در زمان گلدهی بود. گزارش شده است که اسید سالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و افزایش کلروفیل، میزان فتوسنتز کل را افزایش می‌دهد و در نتیجه موجب افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد (34). وزن ۱۰۰ دانه یکی از ارکان اصلی در بالا بردن عملکرد گیاهان می باشد و می توان افزیش وزن ۱۰۰ دانه را به دلیل بهبود در افزایش جذب عناصر غذایی، فرآیند فتوسنتز و انتقال بیشتر آسیمیالتها از منبع به مخزن دانست که با یافته های دیگر محققان همخوانی دارد (40؛ 2؛ 11). این مطالب بیانگر آن هستند که تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزیش عملکرد از طریق افزایش در تعداد غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن ۱۰۰ دانه می شود (40). فیویل و همکاران (۱۹۹۹) دریافتند که میزان فتوسنتز با عملکرد گیاهان زراعی رابطه مستقیمی دارد (9). با توجه به این گزارشات می توان این گونه استدلال کرد که احتمالًا به خاطر بیشتر بودن میزان رنگدانه های فتوسنتزی در رقم مقاوم، میزان فتوسنتز و در نتیجه تولید مواد حاصل از فتوسنتز افزایش یافته که منجر به افزایش عملکرد نهایی شده است. این نتایج با یافته های به دست آمده توسط شاتینگ و همکاران(۱۹۹۷) مطابقت دارد که گزارش کردند بیشترین عملکرد دانه در ارقامی به دست می آید که دارای میزان فتوسنتز بیشتری بودند (35).

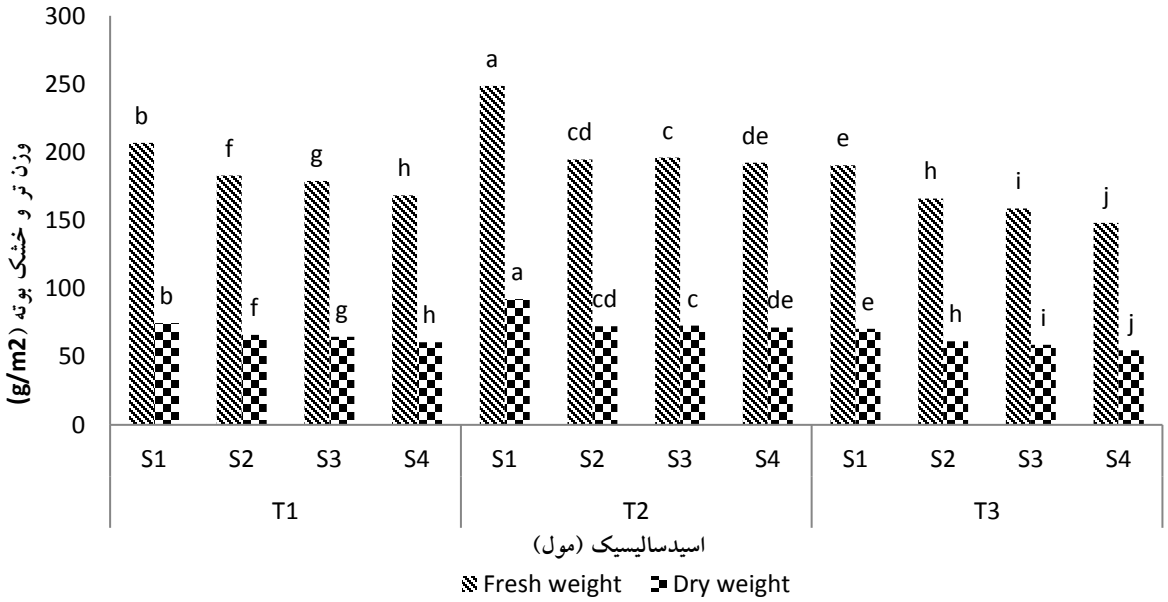
جدول ۱ –تجزیه واریانس اثر زمان محلولپاشی و غلظت اسید سالیسیلیک بر صفات گیاه کاکوتی

Table 1 –The analysis of variance (mean square) of some attributes in *Ziziphora clinopodioides* Lam. under the effect of time and concentration of salicylic acid application.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		وزن تر	وزن خشک	ارتفاع بوته	درصداسانس	عملکرداسانس	میزان فنولیک کل	میزان فلاونویید
زمان محلولپاشی	2	5340.641**	791.8974**	16.47191**	0.0266028 ns	0.0423648 ns	0.0138877**	0.0168887**
خطای عامل اصلی	6	327.203	1.4212	0.06261	0.1562750	0.0686139	0.0001842	0.0001516
غلظت اسیدسالیسیلیک	3	3647.586**	494.4340**	16.84046**	0.1095556 ns	0.1905346**	0.0191562**	0.0087954**
غلظت×زمان	6	164.811**	23.6561**	1.68133**	0.0690028 ns	0.0369823 ns	0.0159083**	0.0014421**
میانگین مربعات خطا	22	90.79	0.538	0.02810	0.078913	0.034306	0.000349	0.000105
ضریب تغییرات		0.142	0.1406	0.0656	0.2770	0.3149	0.1798	0.1839

*و ** به ترتیب معنیداری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns عدم وجود تفاوت معنیدار

*,**: Significant at 5 and 1% possibility level respectively; ns: None significant

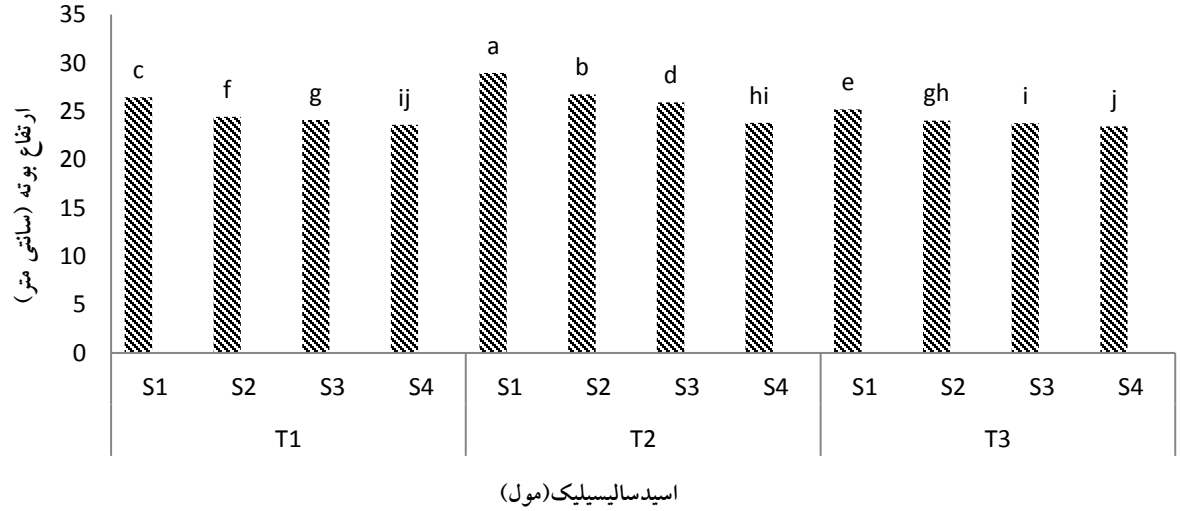


شکل ۱–مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر وزن تر و خشک گیاه کاکوتی (غلظت های S4,S3,S2,S1 به ترتیب$^{-۲}$۱۰، $^{-۴}$۱۰، $^{-۶}$۱۰ مولار اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) و زمان‌های T3,T2,T1زمان‌های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی می‌باشند)

Fig 1- Mean comparisons of fresh and dry herb yield of *Ziziphoraclinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid.
(S1, S2, S3,S4 show 10^{-2},10^{-4},10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1,T2,T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

ارتفاع بوته:

با توجه به جدول تجزیه واریانس، ارتفاع بوته‌ها در تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان در سطح یک درصد معنی دار گردید. نتایج مقایسه میانگین داده ها (شکل ۲) نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته (۲۹/۰۱ سانتی متر) را تیمار $۱۰^{-۲}$ مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین آن را نمونه شاهد (۲۳/۲۴ سانتی متر) در زمان گلدهی داشت. در یک بررسی گزارش شد، استفاده از اسیدسالیسیلیک موجب افزایش تقسیم سلولی درون مریستم و در نتیجه موجب افزایش ارتفاع بوته می‌شود (36). همچنین همچنین در تحقیق دیگری گزارش شد که استفاده از اسیدسالیسیلیک ارتفاع بوته سویا را افزایش داد (12). به نظر می‌رسد که سالیسیلیک اسید با افزایش میزان کلروفیل در برگ‌هایی که در آغاز فرایند پیری هستند، می‌تواند سبب افزایش مجدد فتوسنتز و در نتیجه افزایش رشد گردد (25). Gharib در یک بررسی نشان داد که سالیسیلیک اسید از طریق افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی رشد و ارتفاع گیاهان ریحان و مرزنجوش را افزایش داد (10). باکری و همکاران بیان کردند که سالیسیلیک اسید با افزایش تقسیم و طویل شدن سلولی، افزایش فعالیت‌های آنزیمی و تولیدات فتوسنتزی توانست رشد گیاه کتان را بهبود و منجر به افزایش ارتفاع گیاه گردد (5).



شکل ۲ –مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر ارتفاع بوته در گیاه کاکوتی

(غلظت‌های S4,S3,S2,S1 به ترتیب $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۶}$ مولار اسیدسالیسیلیک و صفر (شاهد) وزمان‌های T3,T2,T1زمان های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی می باشند.)

Figure 2-Mean comparison of plant height of *Ziziphoraclinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid.
(S1, S2, S3,S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1,T2 ,T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

درصد اسانس:

براساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس،درصد اسانس تحت تاثیر فاکتور اسیدسالیسیلیک، زمان و اثر متقابل این دو معنی دار نگردید. براساس نتایج جدول (۲)، در بین غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک، بیشترین درصد اسانس (۱/۶۶ درصد) مربوط به غلظت $۱۰^{-۲}$مولار ودر زمان گلدهی و کمترین میزان آن (۰/۳۳ درصد) مربوط به شاهد (صفر) و در حین رشد رویشی بود. غریب (۲۰۰۶)، در بررسی تاثیر اسیدسالیسیلیک بر دو گیاه دارویی ریحان و مرزنجوش نشان داد که کاربرد اسیدسالیسیلیک $۱۰^{-۴}$ مولار سبب افزایش کمیت اسانس در هر دو گیاه گردید، و نیز درصد اسانس در ریحان تحت تاثیر غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار اسیدسالیسیلیک افزایش یافت، با این وجود درصد اسانس در مرزنجوش تحت تاثیر اسیدسالیسیلیک در غلظت $۱۰^{-۴}$ مولار کاهش یافت (10).

عملکرد اسانس:

از جدول تجزیه واریانس مشخص گردید که عملکرد اسانس توسط فاکتور اسیدسالیسیلیک در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد اما تحت تاثیر زمان محلول پاشی و اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و زمان معنی دار نگردید. نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بالاترین عملکرد اسانس (۱/۱۴ میلی گرم در متر مربع) در حین رشد رویشی ودر غلظت $۱۰^{-۲}$ مولار اسیدسالیسیلیک و کمترین میزان آن (۰/۲۲ میلی گرم در متر مربع) در زمان گلدهی و در تیمار شاهد مشاهده گردید.Bouttcher و همکاران گزارش کردند محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در گیاهان ریحان و مرزنجوش باعث افزایش عملکرد اسانس در مقایسه با شاهد شد (7). همچنین در ریحان باعث افزایش درصد اسانس گردید، اما در مرزنجوش نتیجه مخالف را نشان داد و باعث کاهش درصد اسانس شد. افزایش عملکرد اسانس تحت تاثیر اسید سالیسیلیک می‌تواند با افزایش در رشد رویشی، جذب مواد غذایی؛ تغییر در تعداد غدد حاوی اسانس و سنتز مونوترپن‌ها مرتبط باشد. کاربرد اسید سالیسیلیک خارجی می‌تواند باعث افزایش غلظت درونی آن گردد که احتمال دارد تولید متابولیت‌های ثانویه ناشی از افزایش این اسید گیاه باشد. همچنین اسید سالیسیلیک می‌تواند با تاثیر بر جذب عناصر غذایی گیاه، در افزایش ازت و فسفر که از عناصر مهم در تولیداسانس و عملکرد اسانس گیاه می‌باشد، موثر واقع شده و در نهایت منجر به افزایش سنتز شود.

جدول ۲– مقایسه میانگین اثرات ساده غلظت اسید سالیسیلیک و زمان محلولپاشی بر درصد و عملکرد اسانس گیاه کاکوتی

Table 2- Mean comparison of essential oil content and yield of *Ziziphoraclinopodioides* Lam. under different application times and levels of salicylic acid

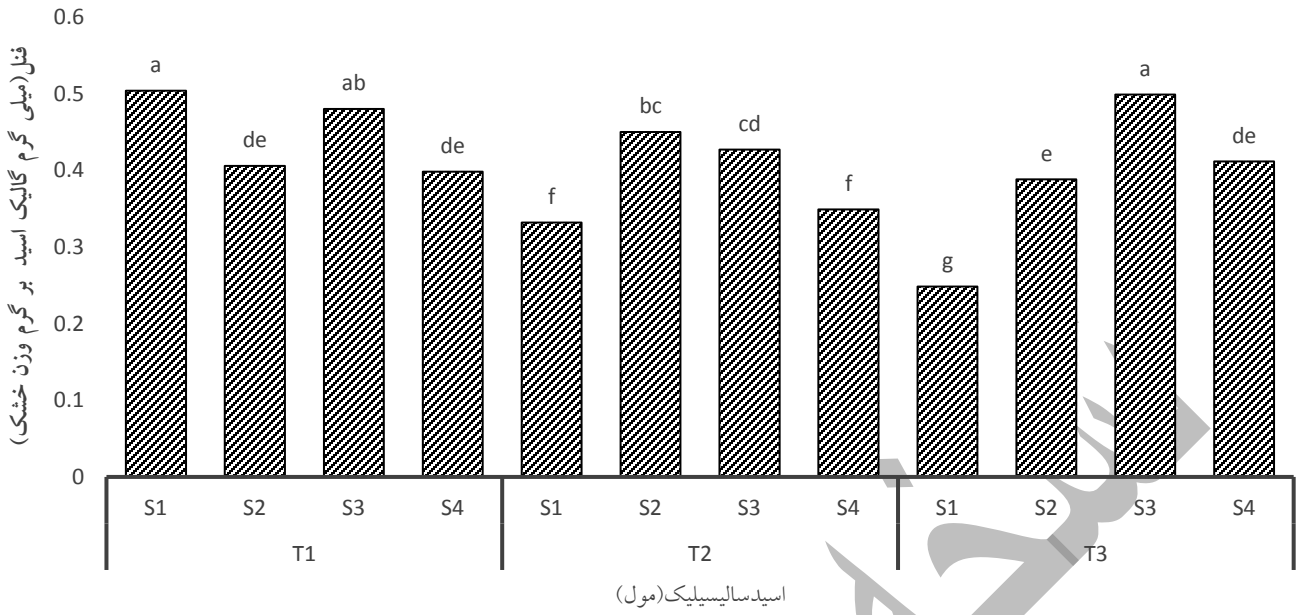
تیمارها		درصد اسانس (%)	عملکرد اسانس (میلی گرم در متر مربع)
غلظت اسیدسالیسیلیک	S1	1.16 a	0.92 a
	S2	1.07 a	0.71 bc
	S3	1.15 a	0.75 ab
	S4	0.92 a	0.56 c
زمان های مختلف کاربرد اسیدسالیسیلیک	T1	1.08a	0.71 a
	T2	1.03 a	0.80 a
	T3	1.12a	0.69 a

S4,S3,S2,S1(به ترتیب غلظت های 10^{-2}، 10^{-4}، 10^{-6} مول اسیدسالیسیلیک و صفر(شاهد) و T3,T2,T1زمان های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی می باشند.)

(S1 , S2 , S3 ,S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) concentrations of salicylic acid respectively and T1,T2 ,T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

محتوای فنولیک کل:

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، میزان فنولیک کل در اثر اسیدسالیسیلیک، زمان محلول پاشی و اثر متقابل اسید و زمان در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده ها ، در بین تیمارها، تیمار 10^{-2} مول اسیدسالیسیلیک و در آغاز رشد رویشی دارای بیشترین میزان فنولیک کل (۰/۵۰ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و تیمار 10^{-2} مولار اسیدسالیسیلیک در زمان گلدهی دارای کمترین میزان فنولیک کل (۰/۲۴ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک) بودند.



شکل ۳ –مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیک بر میزان تغییرات فنولیک کل در گیاه کاکوتی (غلظت های S4,S3,S2,S1 به ترتیب $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۶}$ مول اسیدسالیسیلیک و صفر(شاهد) وزمان های T3,T2,T1زمان های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی می باشند.)

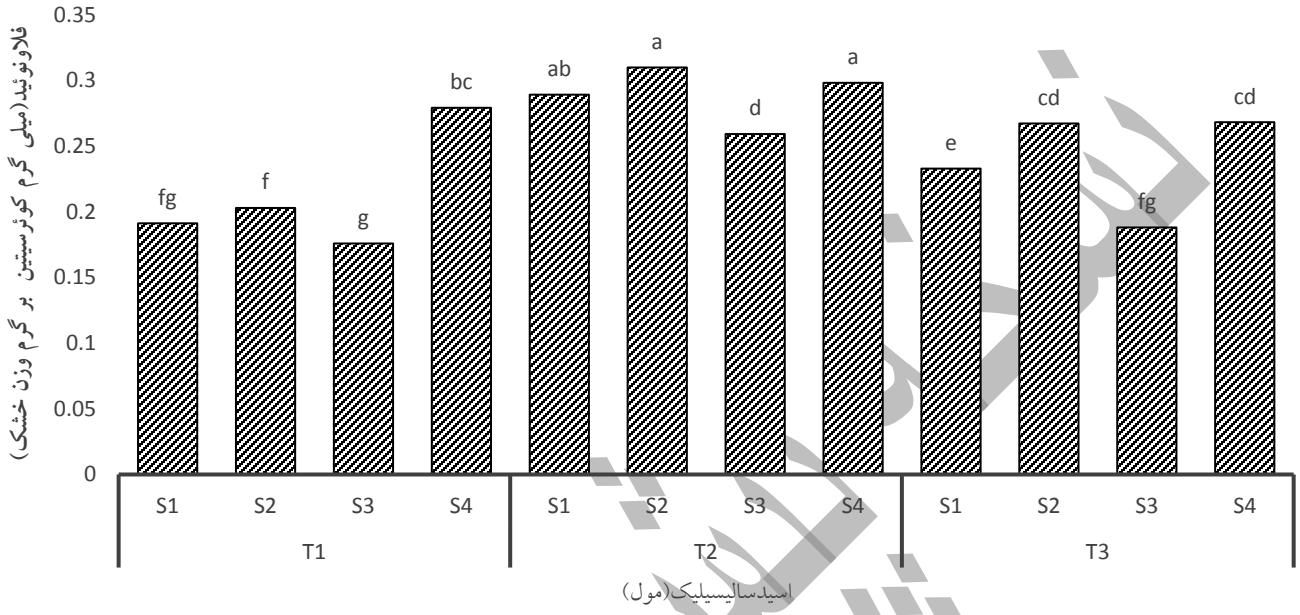
Fig 3-Mean comparison of phenol changes of *Ziziphoraclinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid.
(S1, S2, S3,S4 show10^{-2} , 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1,T2,T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

فلاونوئید:

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که، میزان فلاونوئید در تیمار اسیدسالیسیلیک، زمان محلول پاشی و اثر متقابل اسید سالیسیلیک و زمان در سطح احتمال یک درصد معنی دار گردید. براساس نتایج مقایسه میانگین داده ها، در بین داده‌ها بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۳۱ میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) را تیمار $۱۰^{-۴}$ مولار اسیدسالیسیلیک در حین رشد رویشی و کمترین میزان (۰/۱۷ میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) را تیمار $۱۰^{-۶}$ مولار اسیدسالیسیلیک در آغاز رشد رویشی به خود اختصاص دادند.

کاربرد سالیسیلیک اسید به عنوان عامل تنش‌زا موجب تولید طیف وسیعی از فلاونوئیدها می شود. Pastirova و همکاران (۲۰۰۴) بیشترین مقدار آمبلی فرون را در ۷۲ ساعت بعد از کاربرد ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده کردند(28). در یک بررسی در غلظت های ۵۰ و ۲۵۰ مایکرومولار تغییری در ترکیب آمبلی فرون مشاهد نشد ولی افزایش بسیار معنی داری در میزان اسیدهای فنلی مشاهده شد (22). شبانی و احسان پور (۱۳۸۸) طی تحقیقی مشاهده کردند که متیل جاسمونات و اسید

سالیسیلیک تاحدی سبب افزایش ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل در کشت شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra) گردید. درضمن آنها پیشنهاد دادند دو ترکیب مذکور سبب فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شده که در نهایت سبب افزایش مواد موثره فنولیک و فلاونوئید می شود. (37).



شکل 4 –مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر میزان تغییرات فلاونوئید در گیاه کاکوتی غلظت های S4,S3,S2,S1 به ترتیب $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۶}$ مول اسیدسالیسیلیک و صفر(شاهد) وزمان های T3,T2,T1زمان های متفاوت کاربرد اسیدسالیسیلیک به ترتیب در آغاز رشد رویشی، در حین رشد رویشی و در زمان گلدهی می باشند.

Figor 4- Mean comparison of flavonoid changes of *Ziziphora clinopodioides* Lam. under different levels of salicylic acid**.**
(S1, S2, S3, S4 show 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} M and zero (control) salicylic acid concentrations respectively and T1,T2,T3 are salicylic acid application times at the beginning of vegetative growth, during vegetative growth and flowering time respectively)

نتیجه گیری:

به طور کلی از نتایج این آزمایش چنین استنباط می شود، که اثر متقابل تیمار اسید سالیسیلیک و زمان محلولپاشی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار گردید به طوریکه استفاده از $۱۰^{-۲}$ مولار اسید سالیسیک و در حین رشد رویشی بیشترین تاثیر را در افزایش عملکرد وزن تر و خشک، ارتفاع و عملکرد اسانس گیاه کاکوتی دارد. در مورد محتوای فنولیک کل، تیمار $۱۰^{-۲}$ مولار و در آغاز رشد رویشی و درمورد مقدار فلاونوئید تیمار $۱۰^{-۴}$ مولار و در حین رشد رویشی بیشترین تاثیر را دارا بود.

درضمن بااینکه اثر متقابل تیمار اسید سالیسیلیک و زمان محلولپاشی روی درصد و عملکرد اسانس معنی دارنشد اما $۱۰^{-۲}$ مولار اسید سالیسیک باعث دستیابی به بیشترین مقدار درصد و درنتیجه عملکرد اسانس گردید و توانست با بهبود رشد گیاه عملکرد اسانس را افزایش دهد.

Abstract

Study of Essential Oils Changes and Some Biochemical Properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Under Application of Salicylic Acid

Introduction: Growth regulators play a vital role in developmental stages of plants and their use can be improved the yield of crops. One of the most important compounds that used as growth regulators in recent years is Salicylic acid. The application of salicylic acid in the activation of systemic acquired resistance, and metabolite synthesis and antioxidant enzymes has been proved. Also, salicylic acid as a natural compound has potential to prevent ethylene production and its effect. In order to evaluate the effect of salicylic acid in different concentration on yield and oils content of *Ziziphora*, a split plot experiment with three replications during 2014-2015 in the field of Agricultural Faculty of Shirvan and Ferdowsi University of Mashhad laboratories was conducted.

Material and Methods: This research was conducted during 2014-2015in field conditions in a split plot design in time,at Shirvan Agricultural Research Station(latitude º40 / 37, longitude º93 / 57 and with a height of 1097 m above sea level) and in labrovatory Department of Horticultural Sciences, Ferdowsi University of Mashhad. Each plot had an area of 4 square meters in furrow planting way which the distance between rows were 50 cm and on rows 15 cm and were carried out on 25 March 2014.IMediately after planting,irrigation was done, and after 20 days which the seeds germinated as well,second irrigation was done. Irrigation and weed controls also be done manually once a week. Salicylic acid (Sigma Aldrich, 99.5%) in the three phases of plant growth (vegetative growth, during vegetative growth and flowering time), at concentrations (0, 10^{-2}, 10^{-4} and 10^{-6} M) in three repeats were sprayed. The first spraying (the growth)on 3 April 2014, the second spraying (during growth) on 4 May and the third one (at the time of flowering) was conducted in early June 2014.Plant harvesting was done on 20 July. In order to measure the dry weight of plants, the samples were dried for a week in shade condition. Essential oil content was determined using 30 grams dry sample in 500 ml of water by hydrodistillation using Clevenger for 4. For biochemical characteristics first samples extract were obtained. To prepare extracts, dry samples were milled then one gram of each sample was transferred to the 50 ml Erlen and 10 ml of 80%methanol was added and shaked

for 24 hours. After 24 hours the extract was filtered using filter paper then used for measuring phenols, flavonoids and antioxidant activity.

Phenol measurment: phenolic content was measured using the Folin reagent. In 5.0 mL of each extract (10 milligrams per ml) 5.2 ml Folin reagent was added. After 5 minutes, 300 ml of a molar solution of sodium carbonate is added and for 30 minutes in a bath that was 40 °C. The sample absorbance at 760 nm was measured by a spectrophotometer against the blank. Gallic acid was used as the standard for calibration curve.

Flavonoids measurement: Flavonoid content of the samples were measured using aluminum chloride reagent. In 5.0 ml of methanol extract (10 milligrams per ml), 5.1 ml of methanol, 1.0 ml of 10% aluminum chloride, 1.0 ml of a molar potassium acetate and 8.2 ml of distilled water was added. The mixture kept in dark for 30 minutes and absorbance at a wavelength of 415 nm was read against the blank. Quercetin was used as the standard for calibration curve evaluation.JMP statistical software was used to analyze the data.

Results and Discussion: Based on the results application of salicylic acid affect fresh and dry weight, plant height, phenol and flavonoid content significantly ($P<0.01$), but had no significant effect on essential oil percentage and yield.The results also showed that the highest fresh weight (264.763 grams per square meter)and dry weight (93/11 grams per square meter)was obtained in treatment with 10^{-2} molar salicylic acid when applied during vegetative growth and the lowest fresh and dry herb yield was detected in control.Maximum height of plants (29.01 cm) wasrelated to 10^{-2} M salicylic acid during vegetative growth and the lowest of plant height (23/24 cm) wasrelated to control treatmentat the time of flowering. The highest amount of phenols (0.504 mg equivalents gallic acid per gram of dry weight) was detedted in plants treated with 10^{-2}M salicylic acid during vegetative growth and the lowestphenols (0.248 mg equivalents gallic acid per gram of dry weight) was reported in 10^{-2}M salicylic acid and during vegetative growth.The highest amount of flavonoids (0.31 mg equivalent Quercetin per gram of dry weight) was obtained in 10^{-4} M salicylic acid treatments during vegetative growth and the lowest of them(0.176 mg equivalent Quercetin per gram of dry weight) was in 10^{-6}M salicylic acid treatment at the beginning of vegetative growth. In conclusion the results showed that the highest amount of fresh and dry weight and plant height was under the conditions of 10^{-2}Msalicylic acid concentration and during vegetative growth and the best yield of essential oils, phenols and flavonoids in during vegetative growth and 10^{-4}M salicylic acid concentration was obtained.

منابع:

1. Ananieva EA, Christov KN, and Popova L.P. 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. Journal of Plant Physiology, 161: 319–328.
2. Arfan, M., Athar, H.A., 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? Plant Physiol., 164: 685-694.
3. Babakhanloo, M., Mirza, M., Sefidkon, V.,A.,L., Graceful, D. and Asgar, P. 1998. *Ziziphora clinopodioides*.Investigate the chemical composition of the essential oil of Allium (*Z.clinopodioides*).Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2:114-103.
4. Bagheri, M., Golparvar, A., Shyranyrad, A.j., Zainal, H. and Jafarpoor, D. 2008. Effects of planting date and different nitrogen rates on quantitative and qualitative characteristics of German Chamomile in Isfahan. Journal of Research in Agricultural Science, 1(4):40-29.
5. Bakry, B. A., E-Hariri, D. M., Mervat, S.S. and El-Bassiouny, H. M. S. 2012. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid in two linseed varieties grown under newly reclaimed sandy soil. Journal of Applied Sciences Research, 7:3503-3514.
6. Barry, G.H. and Le Roux, S., 2010. Pre-harvest foliar sprays of pro-hexadione–calcium, a gibberellin-biosynthesis inhibitor, induce chlorophyll degradation and carotenoid synthesis in citrus rinds. HortScience, 45(2):242-247.
7. Bottcher, H., Gunther,I. and Bauermann, U. 1999. Physiological postharvest responses of marjoram (*Majorana hortensis*)Postharvest Biologyand Technology, 15: 41–52.
8. Chachoyan, A.A. and Oganesyan, G. B.1996. Antitumor activity of some spices ofthe family Lamiaceae. Rastitelnye Resursy,32(4):59-64.
9. .Faville, M., Silvester, W., Green, T., and Jermyn, W. 1999. Photosynthetic characteristics of three asparagus cultivars differing in yield. Crop Sci., 39: 1070-7.
10. Gharib, F.A.L. 2006. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activitiesand oil content of basil and majoram. International Journal of Agriculture andBiology, 4: 485-492.
11. Grieve, C.M., Lesch, S.M., Francois, L.E., and Maas, E.V. 1992. Analysis of main-spike yield components in salt-stressed wheat. Crop Sci., 32: 697-703.
12. Gutierrez-Coronado, M.A., Trejo-Lopez, C. and Larque-Saavedra, A. 1998. Effects of salicylicacid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiology and Biochemistry, 36(8): 563-565.
13. Hayat,S.,Ali, B. & Ahmad, A. 2007. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In Salicylic acid: A plant hormone (1-14). Springer Netherlands.
14. Jamzad, Z. 2009. *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Publications, 1-76.
15. Jaiwal, P.K.K. and Bhambie, S. 1989. Effect ofgrowth regulating substances on podding and yieldof *Vignaradiate*. ActaBotanica Indica, 17: 54-58.
16. Khandaker, L., Masum Akond, A.S. and Oba, S. 2011. Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red Amaranth (*Amaranthus tricolor*).Vegetable Crops Research Bulletin, 1(74):77-86.
17. Khavarinejad,R. and Asaadi, A. 2005.Theeffect of salicylic acid on some of the secondary metabolites (saponins and anthocyanins) and induction antimicrobial resistance in medicinal plant (*Bellis perennis*). Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants,21(4):586-553.
18. Kumar, P., Dube, S.D., Mani,V.P. and Chauhan,V.S.1997.Effect of salicylic acid on flowering, pod formation and yield of pea. National Seminar on Plant Physiology for Sustainable Agriculture, 69:19-21.
19. Kumar, P., Dube, S.D. and Chauhan,V.S. 1999. Effect of salicylic acid on growth, development and some biochemical aspects of soybean (*Glycine max*). Indian Journal of Plant Physiology, 4(4):327-330.
20. Klessig, D.F. and Malamy, J.1994.The salicylic acid signal in plants.Plant Molecular Biology, 26:1439-1458.
21. Mahdipour, M. 2013. The impact of organic fertilizers, mineral and salicylic acid on yield components and some secondary metabolites of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.).(Master Thesis. Government -

Ministry of Science, Research, and Technology - Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources - Department of Plant and Animal Production. 1393).

22. 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.
23. Mardani, H., Bayat, H. and Azizi, M. 2001.The effect of foliar application of salicylic acid on morphological and physiological characteristics of cucumber seedlings under drought stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 25(3):320-326.
24. Moradi, M. and Goldani, M. 2012. Evaluation of different salicylic acid levels on some growth characteristics of pot marigold under water stress conditions. Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences, 4(1):45-33.
25. Mounir, E.B., and Ismail, E. H. 2004. Characterization of two non-constitutivehydroxycinnamic acid derivative in date palm (*Phoenixdatylifera*) callus in relation with tissue browning. Biotechnology, 3(2):155-159.
26. Mozaffarian,V.1998. A dictionary of Iranian plant names. 2ndFarhang Moaser Publication,Tehran.
27. Naghibi, F., Mosaddegh, M., MohaMadi Motamed, M. and Ghorbani, A. 2010. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2:63-79.
28. Pastirova, A., Repcak, M. and Eliasova, A. 2004.Salicylic acid induces changes of coumarinmetabolites in (*Matricariachamomilla*). PlantScience, 167(4): 819-824.
29. Raskin, K.1992. Role of salicylic acid in plants. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, 43:439-463.
30. Rechninger, K.H. 1982. *Ziziphora* (Labiatae) flora Iranica. Akademische Druck-u, verlagsanstalt, Graz-Australia. 150: 480-493.
31. Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., 2005. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of (*Ziziphoraclinopodioides*). Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28(10):1892-1896.
32. Salisbury and Ross. 1992. Plant Physiology. Fourth edition. Belmont, CA: Wadsworth, Inc.
33. Singh, B. and Usha, K.2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. Plant Growth Regulation, 39(2):137-141.
34. Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A. and Fatkhutdinova, D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science,164(3):317-322.
35. Shuting, D., Rongqi, G., Changltao, H., Qunying, W., and Koogjun, W. 1997. Study of canopy photosynthesis properties and high yield potential after anthesis in maize. Acta Agron. Sci., 23(3): 318-25.
36. Singh, G. and Kaur, M.1980. Effect of growth regulators on podding and yield of mung bean (*Vignaradiata*).Indian Journal of Plant Physiology, 23:366-370.
37. Shabani., L. and Ehsan, P.A.2009. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoids compounds in *in vitro* culture of licoric(*Glycyrrhiza glabra*) usingmethyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Biology, 22(4): 691-703.
38. Yue, W.A.N.G., Shao-Ting, D.U., Ling-Ling, L.I., Huang, L.D., Ping, F.A.N.G., Xian-Yong, L.I.N., Zhang, Y.S. and Hai-Long, W.A.N.G., 2009. Effect of CO_2 elevation on root growth and its relationship with indole acetic acid and ethylene in tomato seedlings. Pedosphere, 19(5):570-576.
39. Zeinali, H., Bagheri,K,M., Golparvar, M.R., Jafarpour, M. and Shiranirad, A. H.2008. Effect of different planting time and nitrogen fertilizer rates on flower yield and its components in German chamomile (*Matricaria recutita*). Iranian Journal of Crop Science, 10(3):220-23.
40. Zhou, X., Mackeuzie, A., Madramootoo, C., and Smith, D. 1999. Effect of some injected plant growth regulators with or without sucrose on grain production, biomass and photosynthetic activity of field grown corn plants. J. Agron. Crop Sci., 183: 103-10.