مجله فرایند و کارکرد گیاهی

تأثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر صفات فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی زرشک ژاپنی (*Berberis thunbergii*)

حدیثه صادقی[۱]، جعفر احمدی[۲]، فرهاد حبیب‌زاده[۳*]، صدیقه فابریکی اورنگ[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران (نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: habibzadeh_f@eng.ikiu.ac.ir)

۴- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

چکیده

زرشک ژاپنی یا زرشک زینتی (*Berberis thunbergia*) متعلق به خانواده Berberidaceae است. این خانواده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد سرطان می‌باشد. خواص درمانی زرشک هزاران سال است که شناخته شده و مورد استقبال و مطالعه قرار گرفته است. به منظور مطالعه تغییرات صفات فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی زرشک ژاپنی تحت تأثیر الیسیتورهای غیرزنده، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه و آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. تیمارها شامل الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک، دی‌اکسید تیتانیوم و عدم استفاده از الیسیتور (شاهد) در چهار تکرار بودند. در این پژوهش، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی مورد استخراج و سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دو بافت مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل برگ را نسبت به شاهد به ترتیب ۲۰/۹ و ۲۱/۳ درصد افزایش داد. اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به ترتیب باعث افزایش ۲۹/۹ و ۱۹/۱ درصدی میزان کاروتنوئید برگ نسبت به شاهد گردید. بیشترین محتوای پروتئین ریشه با کاربرد اسید سالیسیلیک تولید گردید که نسبت به شاهد ۳۸/۶ درصد افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه با الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب ۷۶/۸ و ۵۲/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در برگ، الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد به ترتیب ۱۰۴/۱ و ۵۷/۱ درصد افزایش دادند. از این پژوهش نتیجه‌گیری شد که اسید سالیسیلیک بیشترین تأثیر را در افزایش میزان رنگدانه‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه زرشک ژاپنی داشته است که می‌توان برای تولیدات دارویی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، الیسیتورهای غیرزنده، رنگیزه‌های فتوسنتزی، گیاهان دارویی

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

مقدمه

زرشک ژاپنی (زرشک زینتی) با نام علمی *Berberis thunbergii*، از خانواده بربریداسه (Berberidaceae) و دیپلوئید (۲n =۲۸) می‌باشد. این جنس شامل ۵۰۰ گونه درختچه برگریز و همیشه سبز است که معمولاً در اروپا، ایالات متحده، آسیای جنوبی و برخی مناطق شمالی ایران و پاکستان رشد می‌کنند. زرشک ژاپنی درختچه‌ای چندساله و چوبی با شاخه‌های قوسی است که ارتفاع آن ۱۹۰-۶۰ سانتی‌متر بوده و از دو طریق بذر و رویشی تکثیر می‌یابد (Rahimi *et al.*, 2017). خواص درمانی زرشک هزاران سال است که شناخته شده و مورد استقبال قرار گرفته است. گونه‌های زرشک سرشار از ترکیبات پلی‌فنولیک مانند آنتوسیانین هستند و به میزان قابل توجهی، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد را نشان داده‌اند. ترکیب‌های فیتوشیمیایی زرشک شامل آلکالوئیدها، تانن‌ها و ترکیبات فنلی و ماده اصلی زرشک، بربرین و بربامین است (Bober *et al.*, 2018). برگ، پوست و ریشه حاوی آلکالوئیدهای مشتق از ایزوکوئینولین مانند بربرین، جاتریزین، پالماتین و ماگنوفلورین هستند. بربرین، آلکالوئید اصلی است که میزان آن در برگ‌ها و ریشه زرشک ۱/۵-۲ درصد تخمین زده می‌شود (Khan *et al.*, 2016).

الیسیتورها، محرک‌های فیزیکی یا ترکیبات شیمیایی با منشأ زیستی و غیرزیستی هستند که می‌توانند پاسخ‌هایی را در گیاه القاء کرده که باعث سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها شوند. الیسیتورها برای گیاه، یک‌سری پیام‌های شیمیایی را ارسال نموده که سبب رها شدن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و تجمع فیتوالکسین می‌شود. طی پاسخ به سیگنال الیسیتور، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود و در نتیجه‌ی بیان ژن‌های دفاعی، متابولیت‌های ثانویه تجمع می‌یابند (Bharti *et al.*, 2023). استفاده از الیسیتورها یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش تولید ترکیبات ثانویه مطلوب در اندام و سلول گیاهان است. الیسیتورها ممکن است ژن جدیدی را فعال نموده که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شود. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از انتقال سیگنال را القاء می‌کند که با تشخیص الیسیتور توسط پذیرنده‌های سطح سلول شروع می‌شود (Thakur *et al.*, 2019).

اسید سالیسیلیک یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید، از ترکیبات فنلی بوده که در تعداد زیادی از گیاهان وجود داشته و این ترکیب به عنوان ماده‌ای هورمونی شناخته شده است؛ عمدتاً در داخل سلول گیاهی تولید و به صورت اسیدهای فنولیک آزاد یا همراه با ترکیبات آمینه در گیاه وجود دارد (Khan *et al.*, 2022). اسید سالیسیلیک در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها نقش موثری دارد؛ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز را تحریک نموده (رسولی و همکاران، ۱۳۹۷) و واکنش گیاه را به منظور تحمل و مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف افزایش می‌دهد؛ زیرا مشخص شده است که افزایش غلظت داخلی آن نقش محافظتی را در برابر عوامل بیماری‌زا فعال می‌کند. تاثیر مثبت اسید سالیسیلیک بر رشد و نمو و بهبود عملکرد و کیفیت گیاه، مورد توجه و علاقه کشاورزان قرار گرفته است (Wang *et al.*, 2022).

اسید جاسمونیک، مشتقات و پیش‌سازهای آن که تحت عنوان جاسمونات‌ها شناخته می‌شوند، برای انجام پدیده‌های مختلف در گیاه ضروری هستند. جاسمونات‌ها، شامل اسید جاسمونیک و متیل جاسمونات، یک خانواده از ترکیبات سیکلوپنتانون هستند که از طریق مسیر اکتادکانوئیک از لینولنیک اسید ساخته می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان الیسیتور، از طریق القای دستگاه دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه نیز می‌شوند. متیل‌جاسمونات، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) را نیز القاء می‌کند (Yu *et al.*, 2019; Nabi *et al.*, 2021). ترکیباتی نظیر متیل جاسمونات، مولکول‌های پیام‌رسان بسیار مهمی هستند که در شرایط آسیب‌های مکانیکی و حمله حشرات و پاتوژن‌ها و همچنین

القای تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی را ایفا می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده است که متیل جاسمونات نقش کلیدی در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند (Fritz *et al.*, 2010).

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) در لوازم آرایشی، رنگ‌ها و ویتامین‌ها یافت می‌شود و برای از بین بردن آلودگی آب استفاده می‌شود. پاسخ گیاهان به نانوذرات بر اساس نوع گونه، مرحله رویشی، سن و ماهیت نانوذرات متفاوت است؛ پژوهش درباره سازوکار نانو دی‌اکسید تیتانیوم نشان می‌دهد که این ماده باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و کاهش تجمع رادیکال‌های اکسیژن و سطح مالون‌دی‌آلدئید می‌شود (Xing *et al.*, 2021). نتایج پژوهش روی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) نشان داد که TiO_2 سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز گردید (Lashkary *et al.*, 2021). پژوهشی روی گیاه ذرت نیز نشان داد که TiO_2 فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را به صورت معنی‌داری افزایش داد (Karvar *et al.*, 2022). با توجه به کشت و کاربرد گیاهان دارویی به منظور بهره‌گیری از خواص دارویی آنها و اهمیت خواص آنتی‌اکسیدانی در گیاه زرشک ژاپنی، هدف از این تحقیق بررسی تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر افزایش میزان و فعالیت آنتی اکسیدانی در این گیاه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اجرای آزمایش: به منظور بررسی تغییرات صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی زرشک ژاپنی تحت تاثیر الیسیتورهای شیمیایی، گلدان‌هایی با قطر و ارتفاع ۲۰ و ۱۸ سانتی‌متر، حاوی درختچه‌های زرشک ژاپنی از گونه *Berberis thunbergii* از شهرداری قزوین در آذر سال ۱۳۹۸ تهیه شد. سپس گلدان‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها به فاصله دو روز انجام شد.

تیمارهای آزمایش شامل متیل جاسمونات (۰/۱ گرم بر لیتر)، اسید سالیسیلیک (۰/۱گرم بر لیتر) و دی‌اکسید تیتانیوم (۰/۵ گرم بر لیتر) و شاهد (عدم استفاده از الیسیتور) بودند که به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه اجرا گردید. گلدان‌ها قبل از اعمال تیمارها، آبیاری گردیدند و پس از گذشت ۵ روز و اطمینان از خروج آب اضافی، مقدار ۱۰۰میلی‌لیتر از تیمارها در دو نوبت به فاصله یک هفته به گلدان‌های حاوی گیاهان اعمال گردید. جمع‌آوری نمونه‌های برگی و ریشه برای انجام مطالعات صفات فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی، سه روز بعد از اعمال تیمار انجام شد؛ سپس در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

استخراج عصاره آنزیمی: ۰/۲ گرم نمونه ریشه و برگ با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی پودر گردید و به تیوب‌های ۲میلی‌لیتری منتقل شد. سپس بافر پتاسیم و پلی‌وینیل پیرولیدین به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه به وسیله همزن همگن شد. مخلوط حاصل سانتریفیوژ شده و برای بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (POX, EC: 1.11.1.7) به روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD; EC 1.15.1.1) با اندازه‌گیری توانایی آن در مهار کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم مورد سنجش قرار گرفت. میزان جذب نور مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد (Misra and Fridovich, 1972).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, 1.11.1.6) با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) مورد بررسی قرار گرفت. عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم و آب اکسیژنه با یکدیگر مخلوط شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) به روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. بافر فسفات پتاسیم را با آب اکسیژنه مخلوط نموده، بلافاصله به آن عصاره آنزیمی اضافه شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POXs, EC 1.11.1.7)، عصاره آنزیمی با بافر فسفات پتاسیم و مایع گایاکول خالص و سپس آب اکسیژنه مخلوط شده و تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید (Gulen and Eris, 2004).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR): فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.8.1.7) به روش Malan و همکاران (۱۹۹۰) بر اساس احیا گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با مصرف NADPH اندازه‌گیری شد. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه به مدت ۶۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش میزان رنگدانه‌ها: مقدار ۰/۲ گرم نمونه‌های برگ را با نیتروژن مایع، در هاون چینی کاملاً ساییده و پس از قرار دادن نمونه گیاهی در لوله سانتریفیوژ محتوی اتانول ۹۶ درصد، کاملاً با دستگاه همزن همگن شد. نمونه‌ها پس از نگهداری در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت، به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۵ و ۶۴۹ نانومتر برای کلروفیل a و کلروفیل کل و ۴۷۰ نانومتر برای تعیین میزان کاروتنوئیدها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Gitelson and Merzlyak, 1997). میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید با فرمول مربوطه محاسبه گردید.

سنجش محتوای پروتئین محلول کل: بافت برگ و ریشه در حضور بافر استخراج همگن و بعد از سانتریفیوژ مقادیر مشخصی از مایع رویی با معرف برادفورد مخلوط و جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین گردید. با رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی، مقادیر نهایی پروتئین‌های محلول کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید (Bradford, 1976).

آنالیز داده‌ها با نرم افزار آماری SAS 9.1.3 انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری پنج و یک درصد انجام و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

میزان رنگدانه‌ها: نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که اثرات الیسیتورهای مورد بررسی بر میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱).

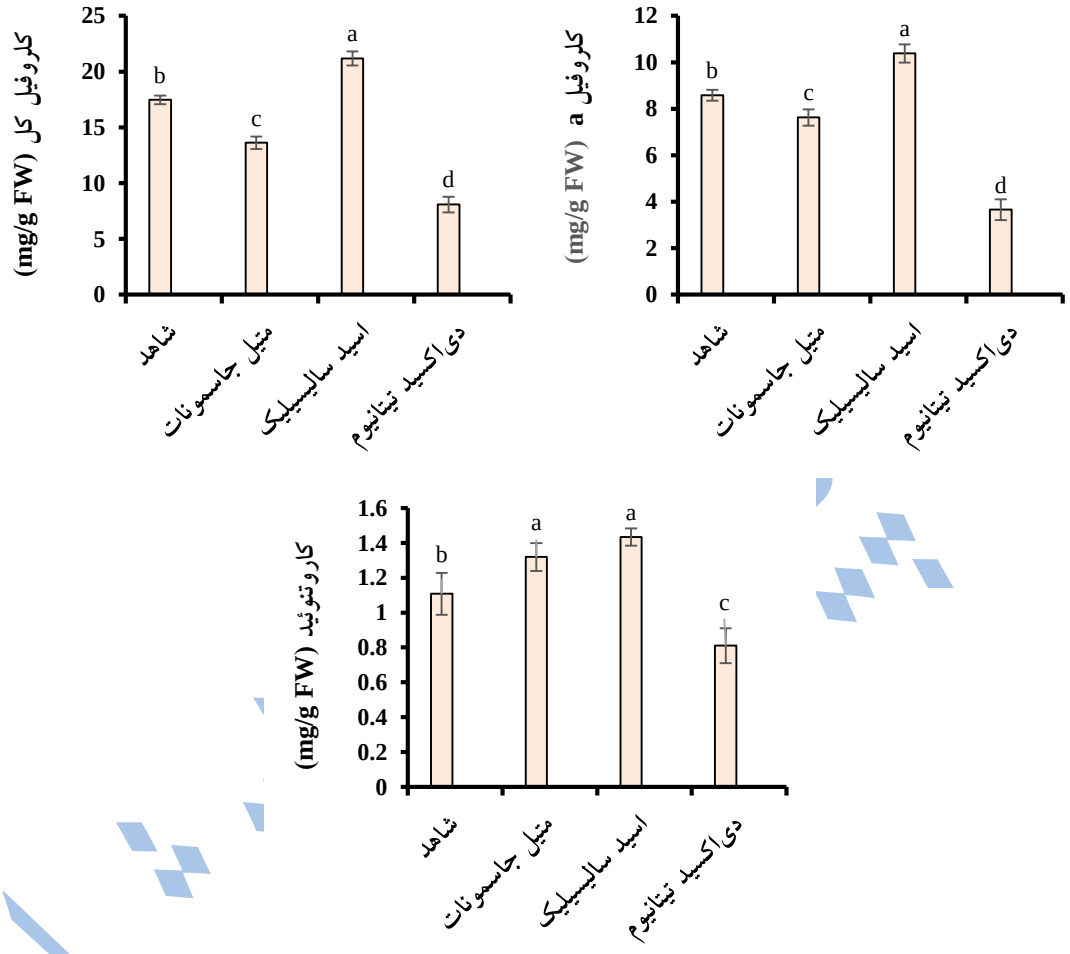
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر خصوصیات رنگدانه‌ای برگ زرشک ژاپنی

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل کل	کاروتنوئید برگ
تیمار	۳	۳۲/۳۲**	۱۲۵/۴۶**	۰/۳**
خطای آزمایشی	۱۲	۰/۱۳۴	۰/۳۴۰	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات (درصد)		۴/۸۵	۳/۸۶	۷/۷

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

نتایج نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل برگ را نسبت به شاهد به ترتیب ۲۰/۹ و ۲۱/۳ درصد افزایش داد. تیمار متیل جاسمونات میزان کلروفیل a و کلروفیل کل را در برگ نسبت به شاهد به ترتیب ۱۱/۲ و ۲۱/۹ درصد کاهش داد. همچنین دی‌اکسید تیتانیوم، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل را در برگ تحت تأثیر قرار داده و به ترتیب باعث کاهش ۵۷/۴ و ۵۳/۷ درصدی میزان آن‌ها نسبت به شاهد گردید. (شکل ۱). تیمار با اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به ترتیب باعث افزایش ۲۹/۹ و ۱۹/۱ درصدی میزان کاروتنوئید برگ گردید. دی‌اکسید تیتانیوم میزان کاروتنوئید برگ را ۲۶/۴ درصد کاهش داد (شکل ۱).

اثر افزایشی اسید سالیسیلیک بر غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌تواند در ارتباط با متابولیسم نیتروژن و بیوسنتز کلروفیل (Chavoushi *et al.*, 2020) باشد. گزارش شده است که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک موجب افزایش غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه جو گردید که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد (Fayez and Bazaid, 2014). گزارش گردیده که استفاده از متیل‌جاسمونات با غلظت پایین، تشکیل کلروفیل a و b را تحریک می‌نماید که احتمالاً در بیان یکسری از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل دخالت دارد (Qui *et al.*, 2020). نتایج پژوهش مزارعی و همکاران (۱۳۹۸) نشان داد که نانو دی‌اکسید تیتانیوم میزان کلروفیل را با افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه مریم‌گلی افزایش می‌دهند. تحقیق داوری و همکاران (۱۳۹۶) روی گیاه مرزه نشان داد که نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم باعث افزایش کاروتنوئید و آنتوسیانین می‌شود. کاروتنوئیدها افزون بر ایفای نقش به‌عنوان رنگدانه فرعی، به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان نیز عمل نموده و نقش منحصر به‌فردی در حفاظت از فرآیندهای فیتوشیمیایی ایفا می‌کنند (Sun *et al.*, 2022).



شکل ۱- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

محتوای پروتئین: نتایج جدول تجزیه واریانس (جداول ۲ و ۳) نشان داد که اثرات اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای پروتئین برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک، بیشترین محتوای پروتئین ریشه را تولید نمود که نسبت به شاهد ۳۸/۶ درصد افزایش داد. کمترین میانگین این صفت در ریشه مربوط به تیمار شاهد بود. بررسی پروتئین برگ زرشک ژاپنی نشان داد که اسید سالیسیلیک منجر به کاهش ۲۰/۲ درصدی محتوای پروتئین برگ نسبت به شاهد گردید، اما به دنبال کاربرد تیمارهای متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین برگ مشاهده نشد.

گزارش شده است که اسید سالیسیلیک در تولید پروتئین‌های دفاعی و انواع متفاوتی از کینازها و روبیسکو تأثیرگذار است. احتمال می‌رود که اسید سالیسیلیک بتواند با تأثیر بر آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتزی، موجب افزایش پروتئین‌ها گردد (Tripathi *et al.*, 2019). افزایش پروتئین‌های محلول توسط اسید سالیسیلیک در ریشه تربچه نیز گزارش گردیده (حسین‌زاده بهبود و همکاران، ۱۳۹۲) که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد. اگرچه در گیاه ریحان تیمار شده با متیل

جاسمونات، میزان پروتئین کل برگ افزایش یافت (بروکی میلان و همکاران، ۱۳۹۵) که با نتایج این پژوهش مطابقت ندارد. افزایش میزان پروتئین کل ممکن است به واسطه تجمع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش باشد؛ زیرا گیاه، متیل جاسمونات را به عنوان عامل تنش شناخته و به آن پاسخ می‌دهد (Nabi *et al.*, 2021). نانو دی‌اکسید تیتانیوم باعث افزایش جذب عناصر غذایی به خصوص نیتروژن شده و به دلیل تسریع فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز، سبب افزایش سنتز اسیدهای آمینه و پروتئین در گیاه می‌گردد (Wang *et al.* 2021).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ گیاه زرشک ژاپنی

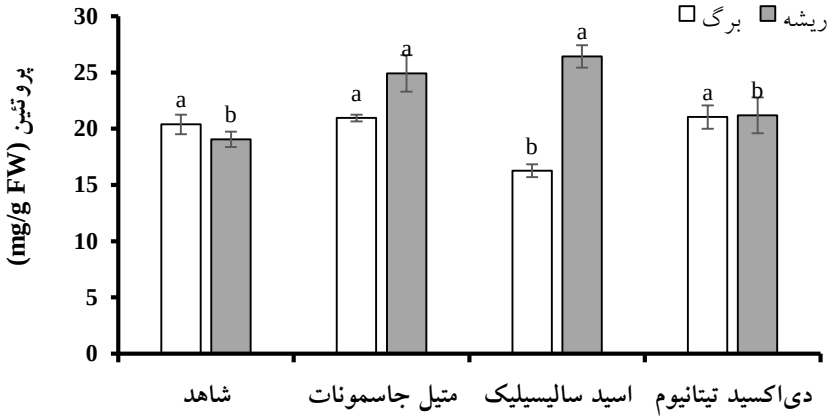
منبع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	گایاکول پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
الیسیتور	۳	۲۰/۷۶۹**	۰/۰۰۱**	۳۹/۲۳۴**	۶/۴**	۵/۵۴**	۰/۰۰۰**	۰/۰۱۰**
خطا	۱۲	۰/۵۵۹	۰/۰۰۰	۰/۱۹۸	۰/۰۲۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۸۰	۶/۹۲	۵/۷۳	۵/۲۲	۷/۱۶	۱۷/۰۹	۶/۵۸

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه گیاه زرشک ژاپنی

منبع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	گایاکول پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
الیسیتور	۳	۴۵/۵۳۷**	۰/۰۳۷*	۲/۵۲۳**	۰/۱۳۶**	۱/۸۱۸**	۰/۰۱۶**	۰/۰۳۳**
خطا	۱۲	۱/۶۵۸	۰/۰۰۷	۰/۰۵۵	۰/۰۰۲	۰/۰۳۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰
ضریب تغییرات (درصد)		۵/۶۲	۸/۳۷	۷/۲۰	۶/۴۲	۶/۸۸	۶/۴۸	۳/۲۹

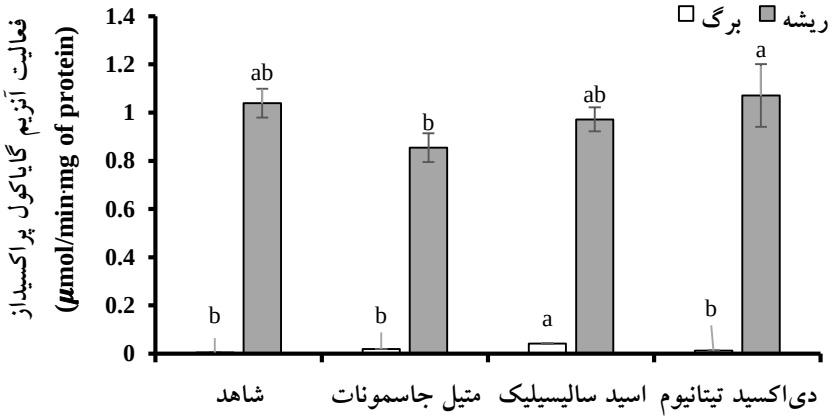
^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد



شکل ۲- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان پروتئین برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

گایاکول پراکسیداز: اثرات اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان فعالیت گایاکول-پراکسیداز ریشه در سطح احتمال پنج درصد و در برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۲ و ۳). طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۳)، کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه گیاه زرشک ژاپنی مربوط به تیمار با متیل جاسمونات بود که نسبت به شاهد ۱۷/۷ درصد کاهش یافت. سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند. در برگ این گیاه، بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در اثر تیمار با الیسیتور اسید سالیسیلیک به دست آمد (افزایش حدود ۹ برابری نسبت به شاهد) ولی دی‌اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم نداشته‌اند.

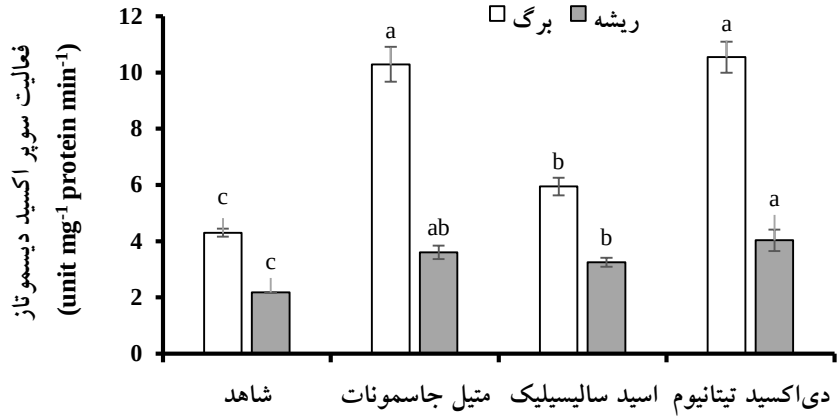
نتایج تحقیقات انجام شده روی گیاه سرخارگل بیانگر افزایش فعالیت آنزیم GPX تحت تیمار با اسید سالیسیلیک می‌باشد (رسولی و همکاران، ۱۳۹۷). گایاکول پراکسیداز به عنوان آنزیم مقابله با تنش شناخته شده است. این آنزیم از یک پیش‌ماده نظیر ترکیبات فنلی یا آنتی‌اکسیدان‌های دیگر، به عنوان دهنده الکترون به H_2O_2 استفاده می‌کند و سبب تجزیه آن می‌شود. به نظر می‌رسد که ورود نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به درون بافت‌های گیاهی منجر به ایجاد سمیت و افزایش رادیکال‌های آزاد در داخل گیاه می‌گردد که به دنبال آن فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به منظور خنثی کردن اثرات نامطلوب رادیکال‌های آزاد، افزایش می‌یابد (Ebrahimi *et al.*, 2016). نتایج محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر گیاه دارویی مریم گلی تحت تنش خشکی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گایاکول-پراکسیداز برگ افزایش یافت (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۸).



شکل ۳- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

سوپراکسید دیسموتاز: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جداول ۲ و ۳)، اثرات اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای سوپراکسید دیسموتاز برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین فعالیت این آنزیم در برگ در تیمار با دی‌اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات (به ترتیب افزایش ۱۴۵/۱ و ۱۳۹/۱ درصدی نسبت به شاهد) به دست آمد. در ریشه هم بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با تیمار دی‌اکسید تیتانیوم ایجاد گردید که نسبت به شاهد ۸۵/۴ درصد افزایش نشان داد (شکل ۴).

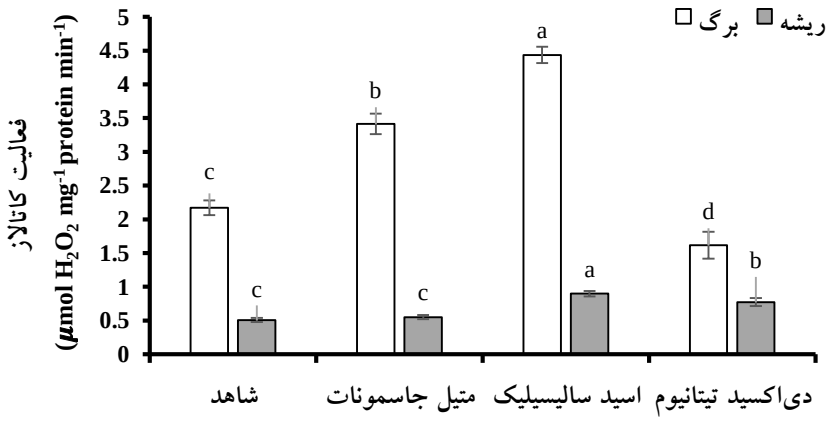
بررسی اثر تیمار متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در گیاه خشخاش نیز نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با تیمار متیل جاسمونات در مقایسه با اسید سالیسیلیک به میزان بیشتری افزایش می‌یابد (عسکری و همکاران، ۱۳۹۷). گزارش گردیده که تیمار با اسید سالیسیلیک موجب افزایش سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌گردد (Chavoushi *et al.*, 2020). نتایج یک تحقیق نشان داد که متیل جاسمونات، سمیت Na^+، O_2 و H_2O_2 را در برگ‌های اقاقیا به طور قابل توجهی کاهش داده و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (Jiang *et al.*, 2016). افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد در گیاهان تیمارشده به وسیله نانو دی‌اکسید تیتانیوم در مطالعات انجام شده توسط Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) گزارش شده است.



شکل ۴- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

کاتالاز: اثرات اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۲ و ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه با الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب ۷۶/۸ و ۵۲/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت؛ ولی الیسیتور متیل جاسمونات نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را در فعالیت آنزیم کاتالاز موجب نگردید. در برگ، الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد به ترتیب ۱۰۴/۱ و ۵۷/۱ درصد افزایش دادند؛ ولی الیسیتور دی‌اکسید تیتانیوم باعث کاهش ۲۵/۸ درصدی فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد گردید (شکل ۵).

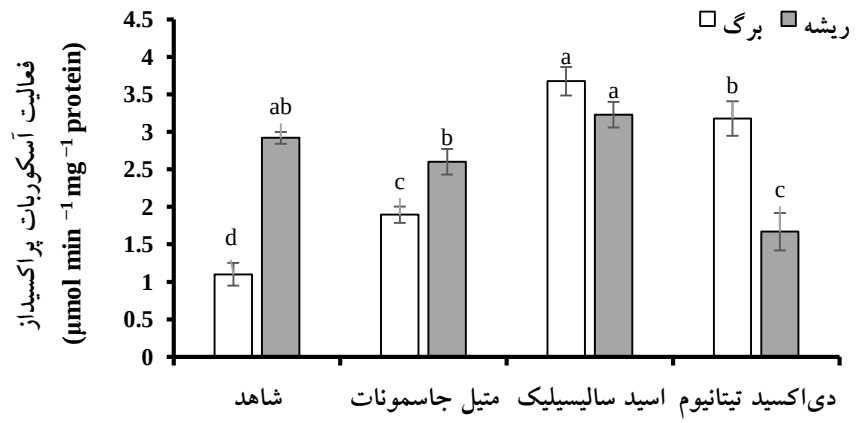
پژوهش‌ها نشان داده که اسید سالیسیلیک تاثیر مثبتی بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشته است (Askari and Ehsanzadeh, 2015). قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید فلزی می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد را القاء کند؛ در نتیجه باعث تنش اکسیداتیو و فعال‌سازی پاسخ‌های گیاه برای سم‌زدایی مانند افزایش فعالیت آنزیمی می‌شود. گزارش گردیده که مقاومت به تنش، با افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله کاتالاز، بهبود می‌یابد (Silva *et al.*, 2019).



شکل ۵- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.)

آسکوربات پراکسیداز: اثرات اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۲ و ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک، دی‌اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ را به ترتیب ۲/۳، ۱/۹ و ۰/۷ برابر افزایش دادند. در ریشه، اسید سالیسیلیک افزایش ۱۰/۳ درصدی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و الیسیتور دی‌اکسید تیتانیوم، کاهش ۴۳/۱ درصدی فعالیت این آنزیم را نسبت به شاهد موجب گردیدند (شکل ۶).

یک پژوهش نشان داده که اسید سالیسیلیک باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ذرت می‌شود (Tahjib-Ul-Arif, *et al.*, 2018). در گیاه تاجریزی گزارش گردیده که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با تیمار متیل جاسمونات افزایش یافته است (Yan *et al.*, 2015). متیل جاسمونات از راه کاهش سطح پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید، فعالیت آسکوربات پراکسیداز را در گیاه اقاقیا افزایش داد (Jiang *et al.*, 2016). محلول‌پاشی با نانو دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز توت فرنگی در شرایط کم‌محلول‌دهی گردید (حسن‌پور و صادقی، ۱۴۰۱).

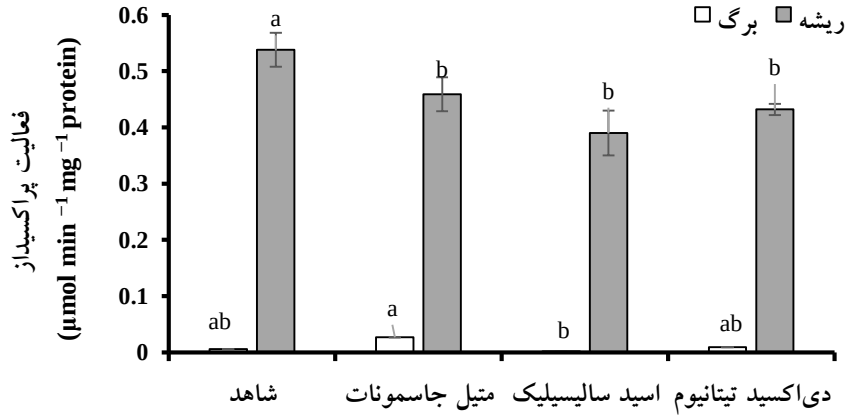


شکل ۶- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

پراکسیداز: نتایج به دست آمده حاکی از اثر معنی‌دار الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی در سطح احتمال یک درصد بود (جداول ۲ و ۳). فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ با اعمال تیمار متیل جاسمونات، افزایش حدود ۳ برابری را نسبت به شاهد نشان

داد. در ریشه، تیمارهای اسید سالیسیلیک، دی‌اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات فعالیت آنزیم پراکسیداز را به ترتیب ۲۶/۴، ۱۸/۸ و ۱۵/۱ درصد نسبت به شاهد کاهش دادند (شکل ۷).

در پژوهشی که روی گیاه گلرنگ انجام شد، بررسی تیمار هم‌زمان خشکی و اسید سالیسیلیک نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله پراکسیداز افزایش می‌یابند (چاوشی و همکاران، ۱۳۹۸). در بررسی اثر متیل جاسمونات بر گیاه شیرین بیان، نتیجه گرفته شد که تیمار متیل جاسمونات تنش اکسیداتیو را از طریق افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش می‌دهد (Yu *et al.*, 2019). بررسی‌ها نشان داده که کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیم پراکسیداز می‌شود (Zia-ur-Rehman *et al.*, 2022). نتایج مطالعات Karamian و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که دی‌اکسید تیتانیوم به طور قابل توجهی بر فعالیت پراکسیداز در گیاه ماهور تاثیر داشت.

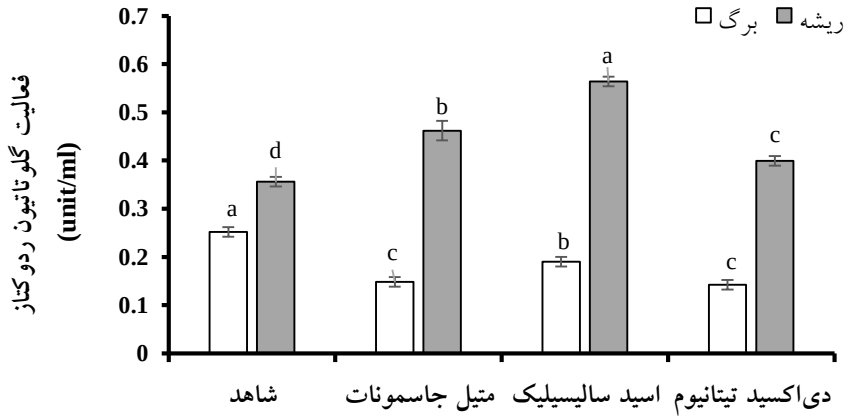


شکل ۷- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

گلوتاتیون ردوکتاز: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی-اکسید تیتانیوم بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در برگ و ریشه، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جداول ۲ و ۳). در ریشه، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با تیمارهای اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب ۵۸/۴، ۲۹/۷ و ۱۲/۱ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در برگ، فعالیت این آنزیم با تیمارهای دی‌اکسید تیتانیوم، متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به ترتیب ۴۳/۶، ۴۱/۳ و ۲۴/۶ درصد کاهش یافت (شکل ۸).

گزارش گردیده که استفاده از اسید سالیسیلیک قبل از تنش خشکی در گیاه درمنه کوهی، باعث کاهش H_2O_2 و افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در برگ شده است (Abbaspour and Ehsanpour, 2016). متیل جاسمونات می‌تواند مقاومت تنش خشکی گل کلم (*Brassica oleracea* L.) را با فعال کردن سیستم آنزیمی گلوتاتیون ردوکتاز، افزایش دهد (Wu *et al.*, 2012). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون ردوکتاز، از یکپارچگی سلول‌های گیاهی در

طول تنش محافظت می‌کنند (Ahmad *et al.*, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون ردوکتاز را افزایش می‌دهند (Silva *et al.*, 2019). در گیاه بامبو، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثرات منفی رادیکال‌های آزاد را با تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش دادند که می‌تواند ظرفیت مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو افزایش دهد (Emamverdian *et al.*, 2021).



شکل ۸- تاثیر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز برگ و ریشه گیاه زرشک ژاپنی (میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل برگ را نسبت به شاهد به ترتیب ۲۰/۹ و ۲۱/۳ درصد افزایش داد. اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به ترتیب باعث افزایش ۲۹/۹ و ۱۹/۱ درصدی میزان کاروتنوئید برگ نسبت به شاهد گردید. بیشترین محتوای پروتئین ریشه با کاربرد اسید سالیسیلیک تولید گردید که نسبت به شاهد ۳۸/۶ درصد افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه با الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب ۷۶/۸ و ۵۲/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در برگ، الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد به ترتیب ۱۰۴/۱ و ۵۷/۱ درصد افزایش دادند. با توجه به اینکه بالا بودن آنتی اکسیدان‌ها، از خواص اصلی گیاه زرشک ژاپنی می‌باشد، لذا از این پژوهش چنین نتیجه‌گیری شد که اسید سالیسیلیک بیشترین تأثیر را در افزایش میزان رنگدانه‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه زرشک ژاپنی داشته است که می‌توان برای تولیدات دارویی استفاده نمود و از عصاره استخراج شده این گیاه به عنوان آنتی اکسیدان قوی در تولیدات دارویی بهره‌مند گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول برگرفته شده است. بدینوسیله از حمایت‌های ارزنده‌ی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

بروکی میلان، ابراهیم، حسنی، لیلا، عبدالهی مندولکانی، بابک، درویش زاده، رضا، خردمند، فاطمه، و حسنی، عباس. (۱۳۹۵) تأثیر غلظت های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانت و محتوی پروتئین کل ریحان. مجله *به زراعی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۱۱۵-۱۰۳. https://doi.org/10.22059/jci.2016.56551

چاوشی، مریم، نجفی، فرزانه، سلیمی، اعظم، و انگجی، سید عبدالحمید. (۱۳۹۸) اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی. *مجله فرآیند و کارکرد گیاهی*، ۸ (۳۳) :۲۶۳-۲۷۶. DOR:20.1001.1.23222727.1398.8.33.21.1

حسن‌پور، حمید، و صادقی، پریسا. (۱۴۰۱) پاسخ توت فرنگی رقم سابرینا کشت شده در شرایط کم محلول‌دهی بر محلول‌پاشی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم. نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، ۱۲(۴)، ۱۱۶-۹۷. https://doi.org/10.47176/jcpp.12.4.34373

حسین‌زاده بهبود، عفت، چاپارزاده، نادر، و دیلمقانی، کمال‌الدین. (۱۳۹۲) اثر سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشد، اسمولیت ها و پتانسیل اسمزی در گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.) تحت تنش شوری. *مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)*، ۲۷(۱)، ۴۰-۳۲. DOR:20.1001.1.23832592.1393.27.1.4.2

داوری، آذر، سلوکی، محمود، و فاضلی نسب، بهمن. (۱۳۹۶) بررسی اثر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اسید جاسمونیک بر روند تغییرات فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره ژنوتیپ‌های گیاه دارویی (*Satureja hortensis* L.). *مجله* اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۵(۴)، ۲۰-۱. DOR:20.1001.1.23223235.1396.5.4.1.6

رسولی، سیده فاطمه، قلی پور، منوچهر، جهانبین، کامبیز، و اصغری، حمیدرضا. (۱۳۹۷) اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو، افزایش مقاومت و عملکرد در سرخارگل. *مجله تولید گیاهان زراعی*، ۱۱(۲)، ۱۲۲-۱۰۹. https://doi.org/10.22069/ejcp.2018.13888.2059

عسکری، علی اصغر، زارع، ناصر، اصغری زکریا، رسول، و خماری، سعید. (۱۳۹۷) افزایش پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های خشخاش ایرانی تیمار شده با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. *مجله* زیست‌شناسی کاربردی، ۳۱(۱)، ۱۶۳-۱۴۳. https://doi.org/10.22051/jab.2017.7251.1010

مزارعی، ایوب، موسوی نیک، سید محسن، قنبری، احمد، و فهمیده، لیلا. (۱۳۹۸) اثر محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.). تحت تنش خشکی. *مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی*، ۱۲(۲)،۵۵۳-۵۳۹. https://doi.org/10.22077/escs.2019.1369.1304

Abbaspour, J. and Ehsanpour, A. A. (2016) Physiological targets of salicylic acid on *Artemisia aucheri* BOISS as a medicinal and aromatic plant grown under in vitro drought stress. *Botanical studies*, 57(1): 1-12. https://doi.org/10.1186/s40529-016-0154-6

Aebi, H. (1984) [13] Catalase in vitro. In Methods in enzymology (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.

Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Alam, P., Ahanger, M.A. and Alamri, S. A. (2017) Jasmonic acid alleviates negative impacts of cadmium stress by modifying osmolytes and antioxidants in faba bean (*Vicia faba* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(13): 1889-1899. https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1313406

Askari, E. and Ehsanzadeh, P. (2015) Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. *Acta physiologiae plantarum*, 37: 1-14. https://doi.org/10.1007/s11738-014-1762-y

Bharti, P. K., Singh, S. K. and Kumari, S. (2023) Elicitors: Role in secondary metabolite production in medicinal plants. In *Genetic Manipulation of Secondary Metabolites in Medicinal Plant* (pp. 147-178). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-4939-7_7

Bober, Z., Stępień, A., Aebisher, D., Ożóg, Ł. and Bartusik-Aebisher, D. (2018) Fundamentals of the use of *Berberis* as a medicinal plant. European *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 16(1), 41-46. doi: 10.15584/ejcem.2018.1.7

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chavoushi, M., Najafi, F., Salimi, A. and Angaji, S. A. (2020) Effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on growth parameters, photosynthetic pigments and secondary metabolites of safflower under drought stress. *Scientia Horticulturae*, *259*, 108823. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108823

Ebrahimi, A., Galavi, M., Ramroudi, M. and Moaveni, P. (2016) Effect of TiO_2 nanoparticles on antioxidant enzymes activity and biochemical biomarkers in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Molecular Biology Research*, 6(1): 58. https://doi.org/10.5539/JMBR.V6N1P58

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Ramakrishnan, M., Ahmad, Z. and Xie, Y. (2021) Different physiological and biochemical responses of bamboo to the addition of TiO_2 NPs under heavy metal toxicity. *Forests*, 12(6): 759. https://doi.org/10.3390/f12060759

Fayez, K. A. and Bazaid, S. A. (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13(1): 45-55. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.01.001

Fritz, V. A., Justen, V. L., Bode, A. M., Schuster, T. and Wang, M. (2010) Glucosinolate enhancement in cabbage induced by jasmonic acid application. *HortScience*, 45(8): 1188-1191. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.8.1188

Gitelson, A. A. and Merzlyak, M. N. (1997) Remote estimation of chlorophyll content in higher plant leaves. *International Journal of Remote Sensing*, 18(12): 2691-2697. https://doi.org/10.1080/014311697217558

Gulen, H. and Eris, A. (2004) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166(3): 739-744. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.014

Hayat, M. J., Howlader, N., Reichman, M. E. and Edwards, B. K. (2007) Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist*, 12(1): 20-37. https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-1-20

Jiang, M., Xu, F., Peng, M., Huang, F. and Meng, F. (2016) Methyl jasmonate regulated diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-13. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2120-z

Karamian, R., Ghasemlou, F. and Amiri, H. (2020) Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in *Verbascum sinuatum* plants treated with methyl jasmonate, salicylic acid and titanium dioxide nanoparticles. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(3): 277-287. https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1591535

Karvar, M., Azari, A., Rahimi, A., Maddah-Hosseini, S., and Ahmadi-Lahijani, M. J. (2022) Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) enhance drought tolerance and grain yield of sweet corn (*Zea mays* L.) under deficit irrigation regimes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(2): 14. https://doi.org/10.1007/s11738-021-03349-4

Khan, I., Najeebullah, S., Ali, M. and Shinwari, Z. K. (2016) Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus Berberis (Berberidaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9): 2047-2057. http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i9.33

Khan, M.I.R., Poor, P. and Janda, T. (2022) Salicylic acid: A versatile signaling molecule in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(5): 1887-1890. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10692-4

Lashkary, M., Moghaddam, M., Asgharzade, A. and Tatari, M. (2021) Titanium dioxide nanoparticle is involved in mitigating NaCl-induced Calendula officinalis L. by activation of antioxidant defense system and accumulation of osmolytes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166: 31-40. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.024

Malan, C., Greyling, M. M. and Gressel, J. (1990) Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Science*, 69(2): 157-166. https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90114-4

Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10): 3170-3175. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9

Nabi, N., Singh, S. and Saffeullah, P. (2021) Responses of in vitro cell cultures to elicitation: Regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: A review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57: 341-355. https://doi.org/10.1007/s11627-020-10140-6

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5): 867-880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232

Qiu, X., Xu, Y., Xiong, B., Dai, L., Huang, S., Dong, T. and Wang, Z. (2020) Effects of exogenous methyl jasmonate on the synthesis of endogenous jasmonates and the regulation of photosynthesis in citrus. *Physiologia plantarum*, 170(3): 398-414. https://doi.org/10.1111/ppl.13170

Rahimi-Madiseh, M., Lorigoini, Z., Zamani-Gharaghoshi, H. and Rafieian-Kopaei, M. (2017) *Berberis vulgaris*: specifications and traditional uses. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5): 569-587. https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.8690

Silva, S., de Oliveira, J. M. P. F., Dias, M. C., Silva, A.M. and Santos, C. (2019) Antioxidant mechanisms to counteract TiO_2-nanoparticles toxicity in wheat leaves and roots are organ dependent. *Journal of Hazardous Materials*, 380: 120889. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120889

Sun, T., Rao, S., Zhou, X. and Li, L. (2022) Plant carotenoids: Recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, *2*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2

Tahjib-Ul-Arif, M., Siddiqui, M. N., Sohag, A. A. M., Sakil, M. A., Rahman, M. M., Polash, M. A. S. and Tran, L. S. P. (2018) Salicylic acid-mediated enhancement of photosynthesis attributes and antioxidant capacity contributes to yield improvement of maize plants under salt stress. *Journal of plant growth regulation*, 37: 1318-1330. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9867-y

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., and Puri, S. (2019) Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12: 1-12. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004

Tripathi, D., Raikhy, G. and Kumar, D. (2019) Chemical elicitors of systemic acquired resistance—Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*, 17: 48-59. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002

Upadhyaya, D., Sankhla, T. D., Davis, N., Sankhla, B. N. and Smith, J. (1985) Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *Plant Physiology*, 121: 453-461. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80081-X

Wang, J., Allan, A. C., Wang, W. Q. and Yin, X. R. (2022) The effects of salicylic acid on quality control of horticultural commodities. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *50*(2-3), 99-117. https://doi.org/10.1080/01140671.2022.2037672

Wang, Y., Lv, P., Kong, L., Shen, W. and He, Q. (2021) Nanomaterial-mediated sustainable hydrogen supply induces lateral root formation via nitrate reductase-dependent nitric oxide. *Chemical Engineering Journal*, 405: 126905. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126905

Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L. and Zhang, M. (2012) Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 113-123. https://doi.org/10.1007/s00344-011-9224-x

Xing, Y., Yang, S., Xu, Q., Xu, L., Zhu, D., Li, X. and Bi, X. (2021) Effect of chitosan/Nano-TiO_2 composite coating on the postharvest quality of blueberry fruit. *Coatings*, 11(5): 512. https://doi.org/10.3390/coatings11050512

Yan, Z., Zhang, W., Chen, J. and Li, X. (2015) Methyl jasmonate alleviates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* by regulating metal uptake and antioxidative capacity. *Biologia plantarum*, 59(2): 373-381. https://doi.org/10.1007/s10535-015-0491-4

Yu, X., Fei, P., Xie, Z., Zhang, W., Zhao, Q. and Zhang, X. (2019) Effects of methyl jasmonate on growth, antioxidants, and carbon and nitrogen metabolism of *Glycyrrhiza uralensis* under salt stress. *Biologia plantarum*, 63(1): 89-96. https://doi.org/10.32615/bp.2019.011

Zia-ur-Rehman, M., Anayatullah, S., Irfan, E., Hussain, S. M., Rizwan, M., Sohail, M. I. and Alharby, H. F. (2022) Nanoparticles assisted regulation of oxidative stress and antioxidant enzyme system in plants under salt stress: A review. *Chemosphere*, 137649. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137649

Effect of Methyl jasmonate, Salicylic acid and Titanium dioxide elicitors on the physiological-biochemical characteristics of Japanese barberry (*Berberis thunbergii*)

Hadiseh Sadeghi[1], Jafar Ahmadi[2], Farhad Habibzadeh[3*] and Sedigheh Fabriki Ourang[4]

1- M.Sc. Graduated, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran (Corresponding Author, Email: habibzadeh_f@eng.ikiu.ac.ir)
4- Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Abstract

Japanese barberry or ornamental barberry (*Berberis thunbergii)* belongs to the Berberidaceae family. This family have several properties, including antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. The healing properties of barberry have been known and studied for thousands of years. In order to study the changes in the physiological-biochemical characteristics of Japanese barberry under the influence of abiotic elicitors, an experiment was conducted in the form of a completely randomized design in the greenhouse and laboratory of the Faculty of Agriculture and Natural Resources of Imam Khomeini International University in 2018-2019. The treatments included methyl jasmonate elicitors, salicylic acid, titanium dioxide and no elicitor (control) in four replications. In this research, the amount of leaf photosynthetic pigments and antioxidant enzymes of leaf and root tissues of Japanese barberry plant were extracted and measured. The results showed that the effect of the experimental treatments on the amount of photosynthetic leaf pigments and antioxidant enzymes in the two studied tissues was significant at the 1% probability level. Comparison of the means showed that salicylic acid treatment increased the amount of chlorophyll a and total leaf chlorophyll compared to the control by 20.9% and 21.3%, respectively. Salicylic acid and methyl jasmonate increased 29.9 and 19.1 percent of carotenoid content in leaves, respectively, compared to the control. The highest protein content of the root was produced with the use of salicylic acid, which increased by 38.6% compared to the control. The activity of catalase enzyme in the root increased by salicylic acid and titanium dioxide elicitors by 76.8 and 52.2%, respectively, compared to the control. In leaves, salicylic acid and methyl jasmonate elicitors increased catalase enzyme activity by 104.1% and 57.1%, respectively. From this research, it was concluded that salicylic acid had the greatest effect in increasing the amount of pigments and the activity of antioxidant enzymes of the Japanese barberry plant, which can be used for medicinal products.

Keywords: Antioxidant enzymes, Abiotic elicitors, Photosynthetic pigments, Medicinal plants

پیش انتشار