مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۷، شماره ۶، صفحه ۹۷۰-۹۵۴ (۱۴۰۰)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355965.3062
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.6.5.6

تأثیر پلاسمای سرد و اسید سالیسیلیک بر متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز آنها در گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia leriifolia* Benth.)

سیده منصوره قدسی مآب[۱]، حسن مکاریان[۲*]، زیبا قسیمی حق[۳] و منوچهر قلی‌پور[۴]

۱- دانشجوی دکترا، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: h.makarian@yahoo.com

۳- استادیار، گروه باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۰

چکیده

پیش‌تیمار بذر با پلاسمای سرد و اسید سالیسیلیک از روش‌های بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد کمّی و کیفی گیاهان بشمار می‌رود. بنابراین، پژوهشی به‌منظور بررسی اثر پیش‌تیمار بذر با پلاسمای سرد (صفر و ۱۰۰ وات به مدت ۴ دقیقه) و پیش‌تیمار بذر و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک به فرم‌های میکرو و نانو (صفر و ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک) برای بهبود رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه مریم گلی (*Salvia leriifolia* Benth.) انجام شد. نتایج نشان داد استفاده از اسید سالیسیلیک به‌صورت پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی منجر به افزایش معنی‌دار ارتفاع گیاه، کلروفیل‌های a و b، فنل کل و اسید کافئیک برگ شد. همچنین، پیش‌تیمار بذر با فرم نانو اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی فرم میکرو اسید سالیسیلیک و پلاسمای سرد، وزن تر و خشک گیاهچه و آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز را به‌ترتیب به‌میزان ۳/۴۸، ۱۳/۳، ۲۲۷/۷ و ۲۷۷ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. پیش‌تیمار بذری و کاربرد اسیدسالیسیلیک تأثیر مثبتی بر افزایش میزان اسیدهای رزمارینیک و سالویانولیک برگ‌ها نسبت به شاهد نداشت. براساس نتایج، افزایش فعالیت آنزیم‌ها در مسیر بیوسنتز اسیدهای فنولیکی، بر افزایش میزان اسید کافئیک مؤثر بود. به‌طور کلی، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک بیشتر از سایر تیمارها در بهبود صفات رشدی و فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش داشتند.

واژه‌های کلیدی: پیش‌تیمار بذر، تیروزین آمونیالیاز، فنیل آلانین آمونیالیاز، نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.).

مقدمه

گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia leriifolia* Benth.) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و بومی استان‌های خراسان و سمنان، ازجمله گیاهان دارویی با ارزش ایران است که به‌دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه در معرض خطر انقراض قرار دارد (Ghasimi Hagh *et al.*,

2018). مریم‌گلی شامل ۹۰۰ گونه علفی، بوته‌ای، چندساله، به‌ندرت یک‌ساله و یا دوساله است که برگ‌ها و گل‌های معطر دارد و در مناطق گرم و معتدل جهان رشد می‌کنند (Hedge, 1986؛ Mozaffarian, 1996؛ Ebrahimabadi *et al*., 2010). این گیاه دارای خاصیت خواب‌آوری، شل‌کننده عضلات، ضدالتهاب و کاهش‌دهنده قند خون است (Hosseinzadeh *et al*., 2009). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گیاه مریم‌گلی دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی مانند ترپنوئیدها و فلاونوئیدها در ریشه، برگ و گل است که بیشترین تجمع آنها در زمان گلدهی است (Min-Hui *et al*., 2008 ؛Başkan *et al*., 2007؛ Modarres, 2007). اسید رزمارینیک و اسید سالویانولیک از متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاه مریم‌گلی است که متعلق به گروه فلاونوئیدها بوده و به‌ترتیب دایمر و تترامری از اسید کافئیک هستند (Kahkonen *et al*., 1999). در تیره نعناعیان، اسید کافئیک به‌عنوان واحد سازنده در تولید انواع متابولیت‌های فنلی از منومرهای ساده تا انواع فراورده‌های الیگومری نقش کلیدی دارد (Fotovvat *et al*., 2014). این متابولیت‌های ثانویه دارای فعالیت‌های زیستی متنوع از قبیل: پاداکسایشی، پادپلاکتی، پادتوموری و پادویروسی هستند (Min-Hui *et al*., 2008).

برای بهبود جوانه‌زنی، رشد و نمو و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی از سازوکارهای مختلفی استفاده شده است که ازجمله آنها، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشدی مانند اسید سالیسیلیک است که در سازوکارهای دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نقش کلیدی دارد (Singh & Dwivedi, 2018) و با تأثیر بر آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه، تولید این ترکیب‌ها را افزایش می‌دهد. گزارش‌های متعددی از تأثیر مثبت اسید سالیسیلیک بر افزایش میزان کلروفیل (Song *et al*., 2020)، ارتفاع بوته‌های ذرت (*Zea mays* L.) (Tucuch-Haas *et al*., 2017)، وزن تر و خشک گیاه توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.) (Roshdy *et al*., 2021)، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز در شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Shabani & Ehsanpour, 2010)، فنل کل در به‌لیمو (*Aloysia citrodora* L.) (Farsaraei *et al*., 2019) و محتوای اسید کافئیک و اسید رزمارینیک در نوروزک (Ghasimi Hagh *et al*., 2018) ارائه شده است.

اما معمولاً موانعی در اعمال تیمارهای مختلف بر گیاهان وجود دارد که بر نتیجه‌بخشی آنها اثرگذار است. یکی از این موانع، دیواره سلولی است که در مقابل ورود هر ماده خارجی به داخل سلول‌های گیاهی قرار دارد و منجر به کاهش کارایی تیمارها می‌شود. بنابراین برای گذر از آن می‌توان از راهکارهای مختلفی استفاده کرد که یکی از آنها استفاده از مواد به فرم نانو است. مواد در ابعاد نانو، با قطری کمتر از قطر منافذ دیواره سلولی، می‌توانند به آسانی از این منافذ عبور کنند و به غشای پلاسمایی برسند. بدیهی است که هر چقدر اندازه ذرات در درون گیاه کوچکتر باشد شرکت آنها در متابولیسم‌های مختلف نیز آسانتر و بهتر خواهد بود (Navarro *et al*., 2008). در پژوهش Nemati Mirak و همکاران (۲۰۱۹) نیز به اثربخشی بیشتر نانو اسید سالیسیلیک نسبت به اسید سالیسیلیک میکرو بر وزن تر و خشک ریشه و شاخساره، مقدار آنتوسیانین، اسید قابل تیتر و عملکرد میوه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) اشاره شده است.

در کنار استفاده از مواد نانو، یکی از روش‌های مفید در بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد و نمو گیاه، استفاده از فناوری پلاسمای سرد است که روشی سریع، اقتصادی و بدون آلودگی است (Asnavandi *et al*., 2021). پلاسمای سرد، پلاسمای غیر حرارتی است که در فشار اتمسفر با عبور گاز از میان یک میدان الکتریکی تولید می شود. در تولید پلاسمای سرد بیشتر انرژی الکتریکی

صرف بمباران توسط الکترون‌ها و پروتون‌ها می‌شود و به‌دلیل چگالی بسیار کم ذرات، دما در حد دمای اتاق باقی می‌ماند و علت نامگذاری آن به پلاسمای سرد همین است (Jiayun *et al*., 2014). پلاسمای سرد می‌تواند با پاک کردن سطح بذر از پاتوژن و بهبود نفوذپذیری بذرها به آب، نقش مهمی در تکوین فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه داشته باشد که نتیجه آن افزایش بنیه بذر و جوانه‌زنی بهتر است (Jiayun *et al*., 2014). سازوکار اثر پلاسمای سرد (تخلیه تابان) به این صورت است که از یک‌سو با ایجاد ترک هایی در حدود ۵۰ نانومتر در سطح بذر و از سوی دیگر با هموار کردن و کاهش برجستگی پوسته بذر، سطحی آبدوست تشکیل می‌دهد که می‌تواند موجب جذب سریعتر آب به بذر و افزایش سرعت جوانه زنی و رشد گیاهان شود (Mohammadi *et al*., 2016؛ Fereyduni, 2016). بذرهای تیمار شده با پلاسمای سرد، شاخص‌هایی مثل جذب آب توسط بذر، میزان نفوذپذیری پوسته بذر، تحریک جوانه‌زنی و رشد، وزن خشک، طول ساقه و ریشه، تعداد جوانه‌های جانبی، میزان تولید پروتئین و قند را در مقایسه با گیاه شاهد (بدون تیمار) به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهند (Shadkam & Karimi, 2019). همچنین تأثیر پلاسمای سرد بر افزایش متابولیت‌های ثانویه در گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum* Moench.) (Ivankov *et al*., 2021) و در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) (Milda Žiene *et al*., 2018) گزارش شده است. با توجه به خواص دارویی ارزشمند گیاه در معرض انقراض مریم‌گلی و مشکلاتی که در ارتباط با خواب بذر آن وجود دارد، برای محافظت و اهلی‌سازی آن توجه به جنبه‌های مختلف رشدی و تولید ترکیب‌های ثانویه آن ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی تأثیر پلاسمای سرد و فرم میکرو و نانو اسید سالیسیلیک بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه گیاه مریم‌گلی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. بذرهای استفاده شده در این پژوهش از شهر بجستان واقع در جنوب خراسان رضوی جمع‌آوری شده بود. فاکتورهای آزمایش شامل فاکتور اول، شاهد (عدم کاربرد) و کاربرد پلاسمای سرد ۱۰۰ وات به مدت ۴ دقیقه، فاکتور دوم: پیش‌تیمار بذر با اسید سالیسیلیک در سه سطح: شاهد (عدم کاربرد) و کاربرد اسید سالیسیلیک به فرم میکرو و نانو به میزان ۱/۵ میلی‌مولار و فاکتور سوم در سه سطح: (شاهد) عدم محلول‌پاشی، محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک میکرو و نانو به میزان ۱/۵ میلی‌مولار بود.

پیش‌تیمار بذرهای بدون پوسته با پلاسمای سرد در آزمایشگاه پلاسما و لیزر در دانشکده فیزیک دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد. برای پلاسمادهی بذرها از دستگاه پلاسما کلینر satia مدل PC500 ساخت ایران استفاده شد. گاز مورد استفاده گاز طبیعی (اتمسفر) بود. عمل تخلیه بین دو الکترود مسی که حداقل یکی از آنها با لایه دی‌الکتریک پوشیده شده (تخلیه با اعمال ولتاژ بالای متناوب بین دو الکترود انجام شده) و ارتباط بین ولتاژ و توان را در محفظه موجب می‌شود، انجام شد. مقدار توان از ۱۰۰-۰ وات و ولتاژ ۲۰khz و مقدار گاز کنترل شده (Apex, 500sccm) و زمان نیز قابل تنظیم بود. سپس بذرها (بدون پوست) به مدت ۲ ساعت در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد (دمای معمول آزمایشگاه) با اسید سالیسیلیک میکرو و نانو به میزان دو میلی‌گرم در لیتر پیش‌تیمار شدند و همزمان از آب‌مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از آن، ۵ عدد بذر در عمق ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری خاک در گلدان کشت شد. گلدان‌های پلاستیکی هر یک به قطر ۲۰ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر بودند و با خاکی شامل مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و پیت‌ماس ۱:۱:۲ پر شدند. ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک مورد استفاده در آزمایش در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

ویژگی‌های خاک	pH	EC (ds/m)	B (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	N (%)	TNV	OC
	۸/۴	۰/۶	۱/۵۷	۴/۱۱	۰/۵۵	۲/۹۴	۴/۰۲	۳۴۹/۲	۱۹۸۰	۰/۳	۱۸/۲۵	۰/۱۴

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی خاک مورد استفاده درآزمایش

ویژگی‌های خاک	Texsture	Sand (٪)	Silt (٪)	Clay (٪)
	شنی لومی	۶۶	۲۲	۱۲

آبیاری هر هفته یک مرتبه انجام و دمای گلخانه به‌صورت ثابت ۲۳ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در زمانی که گیاهان به مرحله شش برگی رسیدند، یک‌بار محلول پاشی در اوایل صبح انجام شد. یک هفته پس از محلول پاشی، ارتفاع گیاهان و طول برگ ها اندازه‌گیری شد. سپس بوته‌ها برداشته شده و صفات وزن تر و خشک گیاهچه، کلروفیل a و b، فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز و متابولیت‌های ثانویه اسید کافئیک، اسید رزمارینیک و اسید سالویانولیک و فنل کل برگ اندازه‌گیری شد.

صفات اندازه‌گیری شده

ارتفاع گیاهان و طول کلیه برگ‌های موجود در گلدان با خط‌کش اندازه‌گیری شد. وزن تر و خشک کل گیاهچه‌های موجود در یک گلدان با ترازوی ۰/۰۰۱ (دیجیتال Sartorius مدل CP 423S) اندازه‌گیری شد و برای اندازه‌گیری وزن خشک، از آون (شرکت تارا طب) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۴۸ ساعت استفاده شد.

صفات کلروفیل a و b به روش Arnon (۱۹۶۷) اندازه‌گیری شدند و با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ میزان کلروفیل a و b برحسب میلی‌گرم وزن تر نمونه محاسبه شد.

رابطه ۱

Chlorophyll a (19.3*A663-0/86*A65) v/100w

رابطه ۲

Chlorophyll b (19.3*A645-3/6*A663) v/100w

V= حجم محلول صاف شده، A= جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر، W= وزن تر نمونه بر حسب گرم

سنجش فنل کل با روش فولین سیوکالتیو (Akkol *et al.*, 2008) و اسید کافئیک برگ با روش Sauvesty و همکاران (۱۹۹۲) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل hpd 011) انجام شد. برای سنجش فنل کل، ابتدا ۰/۵ گرم برگ‌های تازه در سه میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ همگن شده و به مدت سه ساعت در بن‌ماری (مدل WNB 14، شرکت Memmert، آلمان) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه (دو بار) سانتریفوژ (مدل R5810، شرکت Eppendorf، آلمان) و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. این عصاره برای سنجش فنل کل و فلاونوئید استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل، پس از پنج دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه با دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل 2150، شرکت Unico، آمریکا) با طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیب‌های فنلی بر مبنای مقدار جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین-سیوکالتیو و براساس مقایسه آن با محلول‌های استاندارد

گالیک اسید محاسبه شد. برای شاهد نیز به‌جای عصاره از متانول ۸۰٪ استفاده گردید و آزمایش سه بار تکرار و میانگین آن گزارش شد.

برای سنجش اسید رزمارینیک برگ عصاره‌گیری به روش Wang و همکاران (۲۰۰۴) و اندازه‌گیری میزان آن با استفاده از دستگاه HPLC (کمپانی Waters مدل Alliance 2695) و استاندارد اسید رزمارینیک انجام شد. اسید سالویانولیک B نیز با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز با روش Beaudoin-Eagan و Thorpe (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. ابتدا یک گرم از بافت تازه برگ گیاه در دو میلی‌لیتر بافر تریس-هیدروکلریک اسید ۰/۵۰ مولار و pH برابر با ۴/۸ حاوی ۲ مرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار ساییده و همگن شد، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و محلول رویی یا همان عصاره آنزیمی استفاده شد. محلول واکنش حاوی فنیل‌آلانین ۶ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین ۵/۵ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم تیروزین آمونیالیاز، ۵۰۰ میکرولیتر تریس-هیدروکلریک اسید و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به حجم نهایی آن به یک میلی‌لیتر رسید. پس از گذشت ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش‌های تبدیل تیروزین به کوماریک اسید و تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید با اضافه‌کردن ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد. فعالیت ویژه آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر براساس تولید ترانس سینامیک اسید برای آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و در طول موج ۳۳۳ نانومتر با تولید کوماریک اسید برای آنزیم تیروزین آمونیالیاز اسپکتروفتومتر (مدل hpd 011) خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم‌ها برحسب میکرومول فراورده تولید شده به‌ازای یک میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه بیان گردید.

جدول ۳- تجزیه واریانس برخی صفات مریم‌گلی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی

تیمارها	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		ارتفاع بوته	طول برگ	کلروفیل a	کلروفیل b	وزن تر	وزن خشک
بلوک	۲	۰/۳۰^{ns}	۱/۱۵*	۱۳/۶^{ns}	۰/۴۳^{ns}	۰/۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۱**
پلاسمای سرد	۱	۰/۱۳^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۹۵۰/۸**	۳۰/۲**	۰/۰۰۱۳**	۰/۰۰۰۷**
پرایم (پیش‌تیمار بذری اسید سالیسیلیک)	۲	۰/۶۲^{ns}	۱۳/۳۷**	۷۸۲/۶**	۱۵/۳*	۰/۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۳**
محلول‌پاشی	۲	۲۲/۷**	۲۹/۲۹**	۱۰۸۹/۶**	۲۹/۳**	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۱**
پرایم × محلول‌پاشی	۴	۷/۲۶**	۴۰/۰۵**	۱۱۸۷/۱**	۱۳۱/۴**	۰/۰۰۱۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۷^{ns}
پلاسما × پرایم	۲	۹/۸۶**	۰/۳۸^{ns}	۳۵۴/۱**	۱۳/۴^{ns}	۰/۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۱**
پلاسما × محلول‌پاشی	۲	۱۳/۷**	۳/۸۶**	۱/۴۵^{ns}	۶/۰۷^{ns}	۰/۰۰۰۳^{ns}	–^{ns}
پلاسما × پرایم × محلول‌پاشی	۴	۱۴/۳**	۲۵/۶۳**	۳۹۹/۷**	۱۲۶/۹**	۰/۰۰۱۶*	۰/۰۰۰۲**
خطا	۳۶	۲۳/۸	۹/۹۰	۳۲۷/۹	۱۵۱/۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰۶
ضریب تغییرات (٪)	–	۷/۸۶	۶/۴۸	۷/۰۳	۱۵/۴	۱/۳۴	۱/۸۹

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می‌باشد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

در نهایت تجزیه آماری داده‌های بدست‌آمده و تحلیل آنها توسط نرم‌افزار SAS نسخه 9.4 انجام شد و از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید.

نتایج

رنگدانه‌های فتوسنتزی و صفات رشدی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد (جدول ۳) که اثر متقابل سه‌گانه پیش‌تیمار بذری پلاسمای سرد و اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در مرحله شش برگی گیاهان مریم‌گلی بر ارتفاع گیاهان، طول برگ‌ها، محتوای کلروفیل a و b، وزن تر و خشک معنی‌دار شد.

نتایج مقایسه میانگین اثرهای سه جانبه تیمارهای آزمایش بر ارتفاع گیاهان و طول برگ نشان داد که بالاترین ارتفاع گیاه (۹/۰۱ سانتی‌متر) و بیشترین طول برگ (۸/۶۱ سانتی‌متر) در پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی با فرم نانو اسید سالیسیلیک در شرایط عدم کاربرد پلاسمای سرد حاصل شد که البته اثر سه جانبه تیمارهای ذکرشده بر ارتفاع گیاهان از نظر آماری مشابه تیمار محلول‌پاشی فرم معمولی اسید سالیسیلیک و تیمار کاربرد پلاسمای سرد، پیش‌تیمار فرم معمولی اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی فرم نانو اسید سالیسیلیک بود (جدول ۴). کمترین ارتفاع (۶/۰۳ سانتی‌متر) در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک میکرو، عدم محلول‌پاشی و عدم کاربرد پلاسمای سرد دیده شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد (عدم کاربرد پلاسمای سرد، بدون پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و عدم محلول‌پاشی) نداشت (جدول ۴). البته در شرایط بدون پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک نیز، محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک میکرو و نانو منجر به افزایش ارتفاع به‌ویژه در تیمارهای با و بدون پلاسمای سرد نسبت به شاهد شد (جدول ۴). در شرایط عدم کاربرد پلاسمای سرد، پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و بعد محلول‌پاشی با نانو اسید سالیسیلیک باعث افزایش ۴۷ درصدی طول برگ نسبت به کمترین مقدار آن در شاهد (عدم کاربرد پلاسمای سرد، بدون پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و عدم محلول‌پاشی) گردید (جدول ۴).

نتایج مقایسه میانگین اثرهای سه جانبه تیمارهای آزمایش بر محتوای کلروفیل a و b نشان داد که بیشترین کلروفیل a در ترکیب تیماری عدم کاربرد پلاسمای سرد، عدم پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی فرم میکرو اسید سالیسیلیک به میزان ۴۰/۸ بدست آمد که با دو تیمار دیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). کمترین میزان کلروفیل a در بدون پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک، عدم محلول‌پاشی و کاربرد پلاسمای سرد مشاهده شد که کاهشی حدود ۴۵/۳۴٪ را نسبت به بیشترین میزان کلروفیل a نشان داد (جدول ۴). نتایج نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل b در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک میکرو و محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک در شرایط عدم کاربرد پلاسمای سرد بدست آمد که افزایش ۴۵/۷۲ درصدی را نسبت به تیمار بدون پرایم، عدم محلول‌پاشی و کاربرد پلاسمای سرد داشت (جدول ۴). در مجموع صفات ارتفاع بوته، طول برگ و کلروفیل a و b در شرایط عدم کاربرد پلاسما و اعمال پرایم و محلول‌پاشی با فرم‌های مختلف میکرو و نانو اسید سالیسیلیک وضعیت بهتری داشت.

مقایسه میانگین اثرهای متقابل سه‌گانه تیمارهای آزمایش بر وزن تر و خشک بوته نشان داد (جدول ۴) که استفاده از ترکیب تیماری پلاسمای سرد و پیش تیمار بذری با نانو اسید سالیسیلیک و محلول پاشی اسید سالیسیلیک به فرم میکرو بیشترین وزن تر بوته (۰/۸۹۳ گرم) را به همراه داشت که البته با پنج ترکیب تیماری دیگر تفاوت معنی‌داری نداشت. بالاترین میزان وزن خشک بدست آمده نیز مربوط به استفاده از پلاسمای سرد و پیش تیمار بذری با نانو اسید سالیسیلیک و محلول پاشی با اسید سالیسیلیک میکرو بود که ۱۳/۳٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. به‌طور خلاصه می توان گفت تیمارهایی که در آنها پلاسمای سرد استفاده شده بود در صورت پیش تیمار و محلول پاشی با هر دو فرم اسید سالیسیلیک موجب افزایش وزن تر و خشک نسبت به شاهد شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش سه‌گانه پرایم، محلول‌پاشی و پلاسمای سرد بر برخی صفات اندازه‌گیری شده در گیاه مریم‌گلی

تیمارهای آزمایش			ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	طول برگ (سانتی‌متر)	کلروفیل **a**	کلروفیل **b**	وزن تر (گرم در گلدان)	وزن خشک (گرم در گلدان)
عدم کاربرد پلاسمای سرد	بدون پیش‌تیمار	عدم محلول‌پاشی	۶/۵ g	۴/۵۱ l	۳۵/۳ b	۱۱/۱۷ bc	۰/۸۶۲ d	۰/۱۵۱ i
		اسید سالیسیلیک میکرو	۸/۸۲ ab	۷/۲۲ b	۴۰/۸ a	۱۲/۸ ab	۰/۸۷۸ b	۰/۱۵۹ c-f
		اسید سالیسیلیک نانو	۸/۲۲ bc	۵/۱ ij	۴۰/۵ a	۸/۵۲ fg	۰/۸۷۸ b	۰/۱۵۵ h
	اسید سالیسیلیک میکرو	عدم محلول‌پاشی	۶/۰۳ g	۵/۶۸ gh	۲۳/۲ h	۷/۴۳ gh	۰/۸۷۶ bc	۰/۱۵۷ e-h
		اسید سالیسیلیک میکرو	۷/۶ cd	۴/۵۵ l	۲۹/۰ g	۸/۸۵ e-g	۰/۸۷۶ bc	۰/۱۵۶ e-h
		اسید سالیسیلیک نانو	۷/۳۲ de	۶/۱۲ d-f	۳۹/۶ a	۱۲/۹۹ a	۰/۸۷۵ bd	۰/۱۵۶ e-h
	اسید سالیسیلیک نانو	عدم محلول‌پاشی	۶/۴۳ g	۴/۷۷ j-k	۳۱/۹ d-f	۹/۴۴ d-f	۰/۸۷۷ bc	۰/۱۵۶ e-h
		اسید سالیسیلیک میکرو	۷/۲ d-f	۵/۶ gh	۳۰/۴ e-g	۹/۵۹ c-f	۰/۸۶۴ cd	۰/۱۵۵ gh
		اسید سالیسیلیک نانو	۹/۰۱ a	۸/۶۱ a	۳۲/۸ c-e	۹/۹۸ c-f	۰/۸۸۳ ab	۰/۱۵۸ d-g
کاربرد پلاسمای سرد	بدون پیش‌تیمار	عدم محلول‌پاشی	۶/۶۲ fg	۴/۶۳ kl	۱۸/۵ i	۵/۹۴ h	۰/۸۷۴ bd	۰/۱۵۸ d-g
		اسید سالیسیلیک میکرو	۷/۵۳ d	۶/۳ d	۳۴/۷ bc	۱۱/۱۲ b-d	۰/۸۷۸ b	۰/۱۵۸ d-g
		اسید سالیسیلیک نانو	۷/۵ d	۶/۴۲ cd	۳۳/۴ b-d	۱۰/۳ c-e	۰/۸۸۶ ab	۰/۱۵۸ d-g
	اسید سالیسیلیک میکرو	عدم محلول‌پاشی	۷/۴ d	۵/۳۲ hi	۸/۷۹ e-g	۸/۷۹ e-g	۰/۸۸۵ ab	۰/۱۵۸ d-g
		اسید سالیسیلیک میکرو	۷/۴ d	۵/۸۶ e-g	۷/۳۳ gh	۷/۳۳ gh	۰/۸۸۷ ab	۰/۱۶ c-e
		اسید سالیسیلیک نانو	۸/۴۶ ab	۵/۰۴ i-k	۸/۹۹ e-g	۸/۹۹ e-g	۰/۸۷۷ bc	۰/۱۶۲ bc
	اسید سالیسیلیک نانو	عدم محلول‌پاشی	۷/۷۵ cd	۵/۷ f-h	۱۰/۷۳ cd	۱۰/۷۳ cd	۰/۸۸۴ b	۰/۱۶۱ b-d
		اسید سالیسیلیک میکرو	۷/۱۸d-f	۶/۱۵ de	۷/۶۶ g	۷/۶۶ g	۰/۸۹۳ a	۰/۱۷ a
		اسید سالیسیلیک نانو	۶/۶۵ eg	۶/۸۱ l	۱۰/۳۹ c-e	۱۰/۳۹ c-e	۰/۸۸ ab	۰/۱۶۵ b

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

فعالیت آنزیمی و ترکیبات فنلی

مطابق نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش، اثرهای ساده و متقابل سه‌گانه پرایم، محلول‌پاشی و پلاسمای سرد و اثرهای متقابل دوگانه محلول‌پاشی× پلاسمای سرد بر فنیل آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز، فنل کل برگ، اسید کافئیک، اسید رزمارینیک و اسید سالویانولیک مریم‌گلی در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۵). برهم‌کنش دوگانه پیش‌تیمار بذری اسید سالیسیلیک× محلول‌پاشی نیز بر تمامی صفات مذکور به‌استثناء فنیل آلانین آمونیالیاز معنی‌دار بود (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس برخی صفات مریم‌گلی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی

تیمارها	df	میانگین مربعات					
		فنیل آلانین آمونیالیاز	تیروزین آمونیالیاز	فنل کل برگ	اسید کافئیک	اسید رزمارینیک	اسید سالویانولیک
بلوک	۲۲	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۰۵*	۰/۰۰۱ns	۲/۸۷**	۶/۸۱ns
پلاسما	۱	۰/۰۹۶**	۰/۰۶۲**	۰/۰۸۷**	۰/۰۰۲**	۴۰/۷**	۲۸۰/۳**
پرایم (پیش‌تیمار بذری اسید سالسیلیک)	۲	۰/۰۴۲**	۰/۰۴۲**	۸/۹۵**	۰/۳۹۵**	۲۵۸۷/۲**	۱۴۷۴/۴**
محلول‌پاشی	۲	۰/۰۶۸**	۰/۰۶۱**	۵/۳۹**	۰/۶۰۵**	۱۲۴۴/۰**	۵۲۷/۸**
پلاسما × پرایم	۲	۰/۰۰۵ns	۰/۰۰۱ns	۱/۱۴**	۰/۰۹۳**	۷۷۴/۴**	۷۰/۰*
پلاسما × محلول‌پاشی	۲	۰/۰۱۹**	۰/۰۴۸**	۰/۴۲۷**	۰/۰۱۵**	۷۹۶/۳**	۶۰۱/۲**
پرایم × محلول‌پاشی	۴	۰/۰۰۲ns	۰/۰۰۵**	۷/۶۳**	۰/۳۵۲**	۲۷۴۷/۷**	۲۵۵۳/۳**
پلاسما × پرایم × محلول‌پاشی	۴	۰/۰۳۹**	۰/۰۳۳**	۰/۵۰۳**	۰/۱۸۵**	۳۶۶/۲**	۴۸۴/۵**
خطا	۳۶	۰/۰۷۱	۰/۰۲۲	۰/۰۰۴	۰/۰۱۹	۱۸/۰۳	۷۲۰/۶
ضریب تغییرات ٪	–	۱۰/۲	۷/۰۷	۰/۸۹	۵/۷۹	۰/۸۴	۴/۵۳

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز متعلق به پیش‌تیمار بذری با نانو اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی با فرم میکرو اسید سالیسیلیک در شرایط استفاده از پلاسمای سرد بود که به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۲۲۷/۷ و ۲۷۷ درصدی را نسبت به شاهد به همراه داشت (جدول ۶). همچنین تفاوت معنی‌داری بین میزان فنیل آلانین آمونیالیاز در تیمارهای محلول‌پاشی میکرو و نانو در شرایطی که از پیش‌تیمار بذری با نانو اسید سالیسیلیک و پلاسمای سرد استفاده شده، وجود نداشت (جدول، ۶). در بیشتر موارد تیمارهایی که در آن بذر پلاسمای سرد دیده شده بود میزان فنیل آلانین آمونیالیاز بیشتری نشان داد (جدول ۶). بیشترین فنل کل برگ‌ها (۱/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) متعلق به تیمار شاهد عدم استفاده از پیش‌تیمار بذری و با محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک بدست آمد (جدول ۶) و کمترین میزان این صفت (۰/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک میکرو و محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک با کاربرد پلاسمای سرد دیده شد که کاهشی را در حدود ۳/۸ برابر نشان داد (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش سه‌گانه پرایم، محلول‌پاشی و پلاسمای سرد بر صفات اندازه‌گیری شده در گیاه مریم‌گلی

		تیمارهای آزمایش	فنیل آلانین آمونیالیاز (میکرومول سینامیک اسید/میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه)	تیروزین آمونیالیاز (میکرومول کوماریک اسید/ میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه)	فنل کل برگ (میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن خشک)	اسید کافئیک (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	اسید رزمارینیک (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	اسید سالویانولیک (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)
عدم کاربرد پلاسمای سرد	بدون پیش‌تیمار	عدم محلول‌پاشی	۰/۱۸ h	۰/۱۳ i	۰/۵۵ i	۰/۱۸۵ ef	۷۵/۴ a	۸۸/۲ a
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۳۱۵ c-e	۰/۲۷ b-e	۰/۵۹ h	۰/۱۸۱ f	۶۶/۸ e	۷۱/۴ c
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۲۹۷ c-e	۰/۲۷ b-e	۱/۷۶ a	۰/۲۰۷ d	۵۱/۹ k	۶۶ de
	اسید سالیسیلیک میکرو	عدم محلول‌پاشی	۰/۲۴۳ g	۰/۲۶ c-e	۰/۵۸ h	۰/۴۸۴ a	۶۷/۲ de	۷۸/۲ b
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۲۵۸ ef	۰/۲۸ b-d	۰/۵۹ h	۰/۴۵۷ b	۶۶/۰ f	۷۸/۱ b
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۳۳۸ bc	۰/۲۵ ef	۰/۷۹ f	۰/۲۰۵ d	۵۶/۱ j	۶۸/۴ d
	اسید سالیسیلیک نانو	عدم محلول‌پاشی	۰/۲۷۳ fg	۰/۲۱ g	۱/۵۷ c	۰/۲۰۵ d	۵۱/۹ k	۶۶/۴ de
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۲۹۸ df	۰/۲۴ f	۰/۵۹ h	۰/۴۵ b	۶۳/۵ h	۶۸/۳ d
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۳۲۷ bd	۰/۲۸ bc	۱/۲۵ d	۰/۲۰۵ d	۴۹/۳ mn	۶۶/۸ de
کاربرد پلاسمای سرد	بدون پیش‌تیمار	عدم محلول‌پاشی	۰/۳۱۷ c-e	۰/۲۷ b-e	۰/۴۷ m	۰/۱۸۲ f	۷۱/۳ c	۷۸/۲ b
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۳۰۷ c-f	۰/۲۶ c-e	۰/۵۸ h	۰/۴۵۷ b	۵۰/۶ l	۷۳/۴ c
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۳۳۲ bd	۰/۱۷ h	۱/۵۸ c	۰/۲۰۲ de	۴۹/۸ m	۵۸/۱ f
	اسید سالیسیلیک میکرو	عدم محلول‌پاشی	۰/۳۲۷ bd	۰/۲۵ ef	۰/۵۸ h	۰/۴۶۶ ab	۶۴/۵ g	۶۹/۳ d
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۳۵۸ b	۰/۲۵ ef	۰/۶۵ g	۰/۴۵۸ b	۶۷/۶ de	۷۳/۰ c
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۳۱۷ c-e	۰/۲۶ d-f	۰/۴۶ m	۰/۱۸۲ f	۷۴/۱ b	۷۸/۲ b
	اسید سالیسیلیک نانو	عدم محلول‌پاشی	۰/۳۳۲ bd	۰/۲۸ b	۱/۵۸ c	۰/۲۰۶ d	۴۹/۰ n	۵۶/۰ f
		اسید سالیسیلیک میکرو	۰/۴۱ a	۰/۳۶ a	۱/۲۴ d	۰/۳۰۲ c	۵۸/۰ i	۶۷/۹ d
		اسید سالیسیلیک نانو	۰/۳۹۷ a	۰/۲۷ b-e	۱/۶۴ b	۰/۲۰۵ d	۵۲/۰k	۶۸/۷ d

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

بیشترین میزان اسید کافئیک برگ در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک میکرو، عدم محلول‌پاشی و شرایط عدم استفاده از پلاسمای سرد به میزان ۰/۴۸۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با کاربرد پلاسمای سرد در همان تیمار (پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک میکرو و عدم محلول‌پاشی) نداشت (جدول ۶). پیش‌تیمارهای بذری و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک میکرو (در استفاده و عدم استفاده از پلاسمای سرد) نیز اثر مثبتی بر اسید کافئیک برگ‌ها داشتند (جدول ۶).

میزان اسید رزمارینیک و سالویانولیک برگ در شاهد (بدون پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و عدم محلول‌پاشی و عدم کاربرد پلاسمای سرد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۶). در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک با نانو اسید سالیسیلیک و عدم محلول‌پاشی بذرها که از پلاسمای سرد استفاده شده بودند، کمترین میزان اسید رزمارینیک و سالویانولیک را به خود اختصاص دادند که به‌ترتیب ۳۵٪ و ۳۶٪ نسبت به بهترین تیمار کاهش نشان دادند (جدول ۶). تیمارهایی که تحت تأثیر پیش‌تیمار بذری با نانو اسید سالیسیلیک قرار گرفتند (به‌ویژه در محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک) به مراتب اسید رزمارینیک کمتری داشتند (جدول ۶).

بحث

محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک به شکل میکرو و نانو نقش مؤثرتری نسبت به سایر تیمارها (پرایم و پلاسمای سرد) در افزایش ارتفاع داشت که با نتایج Tucuch-Haas و همکاران (۲۰۱۷) در گیاهچه‌های ذرت و Farhadi و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) مبنی بر افزایش ارتفاع این گیاهان بر اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک مشابه بود. گزارش شده که اسید سالیسیلیک با افزایش سرعت استفاده از مواد ذخیره‌ای بذر، موجب افزایش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه می‌شود و از سوی دیگر بیان شده که احتمالاً اسید سالیسیلیک طویل شدن و تقسیم سلولی را با تأثیر بر سایر هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین تنظیم می‌کند (Shakirova & Sahabutdinova, 2003). در این پژوهش، استفاده از پلاسمای سرد و عدم استفاده آن در برخی از ترکیب‌های تیماری سبب افزایش و در برخی دیگر منجر به کاهش معنی‌دار ارتفاع شد. اما Ling و همکاران (۲۰۱۴) افزایش ارتفاع گیاه سویا و Kumar و همکاران (۲۰۱۹) افزایش طول گیاهچه بامیه را با کاربرد پلاسمای سرد مشاهده کرده بودند که با نتایج این پژوهش در تضاد بود.

استفاده از اسید سالیسیلیک به فرم نانو به‌صورت پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی اثر مثبتی بر اندازه برگ داشت و منجر به افزایش آن شد که با توجه به تأثیر مثبت این تیمار بر کلروفیل a و b قابل انتظار بود. اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنولی است و نقش مهمی در مسیر انتقال سیگنال‌ها ایفاء می‌کند و کاربرد خارجی آن منجر به افزایش سطح برگ، وزن خشک، رشد و نمو، جذب یون‌ها و فتوسنتز گیاهان می‌شود (Lakzayi *et al*., 2014). اسید سالیسیلیک، با افزایش معنی‌دار مقادیر کلروفیل a و b در مقایسه با عدم مصرف، افزایش سطح برگ و وزن خشک اندام‌های هوایی را نیز به‌دنبال دارد (Arvin *et al*., 2011). نتایج گویای تأثیر مثبت فرم میکرو و نانو اسید سالیسیلیک بر کلروفیل a و b بود، به‌طوری که کاربرد اسید سالیسیلیک به فرم نانو به‌صورت محلول‌پاشی در هر سه سطح پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک منجر به افزایش این صفات شد. در پژوهش Nemati Mirak و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده شد که میزان کلروفیل بوته‌های توت‌فرنگی با استفاده از اسید سالیسیلیک میکرو و نانو افزایش معنی‌داری یافت. به‌علاوه، افزایش کلروفیل a و b در تیمار محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در گل همیشه‌بهار (Dehghan Niri *et al*., 2016) و پسته چینی (Song *et al*., 2020) گزارش شده است. همچنین Shoghian و Rozbahani (۲۰۱۸) بیان کردند که مصرف اسید سالیسیلیک منجر به افزایش ۷۰ درصدی کلروفیل a و ۶۰ درصدی کلروفیل b نسبت به شاهد عدم مصرف آن شد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. اسید سالیسیلیک نقش محوری در تنظیم فرایندهای

فیزیولوژیکی مختلف مانند رشد و نمو گیاه و فتوسنتز دارد (Miura & Tada, 2014) و اثر مثبت خود را از طریق رنگیزه‌ها، ساختار کلروپلاست، آنزیم‌های دخیل در مراحل مختلف فتوسنتز و عوامل روزنه‌ای بر فتوسنتز اعمال می‌کند (Ghai, 2002). همچنین اسید سالیسیلیک می‌تواند با افزایش محتویات کلروفیل در بافت گیاه، کارایی فتوسنتز را در کلروپلاست افزایش دهد (Dong *et al*., 2011). در صفات کلروفیل a و b، استفاده از پلاسما در اغلب ترکیب‌های تیماری سبب کاهش این صفات شد (جدول‌های ۴ و ۵). اما Saberi و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که کلروفیل گندم در دو سال آزمایش در سطوح مختلف پلاسمای سرد (۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ ثانیه) افزایش یافته است که برخلاف نتایج ما بود.

در گیاهان مریم‌گلی، استفاده از پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک (میکرو و نانو) منجر به افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی شد که با نتایج دیگر پژوهشگران مطابقت داشت. به‌طوری که Roshdy و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک منجر به افزایش وزن خشک گیاهچه‌های توت‌فرنگی شد. افزایش وزن تر و خشک گیاهچه‌های سیاهدانه نیز در پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک در مطالعه Kabiri و Naghizadeh (۲۰۱۶) و محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک در بوته‌های توت‌فرنگی (Nemati Mirak *et al*., 2019) قابل مشاهده بود. پرایمینگ بذر موجب افزایش فعالیت فتوسنتزی در هر واحد سطح برگ می‌شود و همین امر موجب افزایش تولید ماده خشک و عملکرد گیاهان می‌گردد (Tajbakhsh *et al*., 2014). همچنین کاربرد اسید سالیسیلیک از یکسو فعالیت آنزیم روبیسکو را افزایش داده و در نتیجه بر فتوسنتز اثر مثبت دارد و منجر به افزایش وزن خشک شاخساره و ریشه می‌شود (Miura & Tada, 2014) و از سوی دیگر با بهبود جذب آب و مواد معدنی بر افزایش رشد گیاهان اثر بهینه دارد (Hamada & Al-Hakimi, 2001). نقش مثبت استفاده از پلاسمای سرد در افزایش ماده خشک اندام‌های هوایی در پژوهش Fadhlalmawla و همکاران (۲۰۱۹) روی شنبلیه و Ling و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه سویا مشاهده شده است که مشابه نتایج حاصل از این پژوهش بود. بررسی سازوکار عمل پلاسما روی رشد گیاهچه بر افزایش جذب ماده غذایی نیتروژن، تغییر در مقدار هورمون‌های رشد و دیگر فرایندهای فیزیولوژیکی و فعال کردن بیان ژن‌های مرتبط با رشد دلالت دارد (Adhikari *et al*., 2020).

نتایج حاصل از این آزمایش گویای این واقعیت بود که در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده، نقش اسید سالیسیلیک نانو در اثربخشی روی صفات نسبت به اسید سالیسیلیک معمولی پررنگ‌تر بود که می‌توان آن را به این دلیل دانست که با توجه به محدودیت‌هایی که در جذب اسید سالیسیلیک وجود دارد، اسید سالیسیلیک نانو می‌تواند با کارایی بیشتری به‌وسیله گیاه جذب شده و اثرهای بهتری داشته باشد. معمولاً در اعمال تیمارها دیواره سلولی گیاهان به عنوان مانعی برای ورود هر ماده خارجی به داخل سلول‌های گیاهی عمل می‌کند که این موضوع کارایی تیمارها را کاهش می‌دهد. مواد نانو به سبب داشتن قطر کمتری نسبت به منافذ دیواره سلولی، به راحتی از دیواره سلول‌های گیاهی عبور کرده و به غشای پلاسمایی می‌رسند، البته هر چقدر اندازه ذرات در درون سلول‌های گیاهان کوچکتر باشد اثربخشی آنها در متابولیسم‌های مختلف نیز به مراتب بیشتر خواهد بود (Navarro *et al*., 2008).

در این پژوهش، نقش مهم و برجسته تیمار اسید سالیسیلیک (میکرو و نانو) و استفاده از پلاسما بر میزان فعالیت هر دو آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز قابل مشاهده بود که با نتایج Maleki و Ehsanpour (۲۰۱۸) مطابقت داشت. این دو محقق بیان کردند که آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در گیاه گوجه‌فرنگی بتدریج افزایش یافتند. همچنین اثر مثبت اسید سالیسیلیک بر افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در پژوهش‌های Shabani و Ehsanpour (۲۰۱۰) در گیاه شیرین‌بیان و Wang و همکاران (۲۰۱۰) در برگ‌های انگور

نیز گزارش شده است که با نتایج آزمایش ما مشابه بود. در ضمن، همین محققان بیان کردند که اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و فعال کردن مسیر فنیل پروپانوییدی سبب افزایش مواد مؤثره فنولیک و فلاونوئید می‌شود، زیرا این دو آنزیم در مسیر بیوسنتز ترکیب‌های فنلی جزو آنزیم‌های اصلی شناخته می‌شوند که با دِآمیناسیون فنیل آلانین و تیروزین به‌ترتیب تولید t–سینامیک اسید و p–کوماریک اسید می‌کنند و از این طریق پیش‌ساز ترکیب‌های فنلی تولید می‌شود (Hoagland & Duke, 1981؛ Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1985). ترکیب‌های فنلی و آنزیم‌های بیوسنتزی آنها با افزایش اسید سالیسیلیک به دو دلیل افزایش می‌یابند که شامل اثر مستقیم اسید سالیسیلیک بر مقدار ترکیب‌های یادشده و داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها در برابر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید شده است. اسید سالیسیلیک می‌تواند با تولید ROS و القای آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز، متابولیت‌های ثانویه را تنظیم کند (War *et al*., 2011؛ Dokhanieh *et al*., 2013). استفاده از پلاسمای سرد نیز منجر به افزایش آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شد که با نتایج Jiang و همکاران (۲۰۱۴) مبنی بر افزایش فنیل آلانین آمونیالیاز با کاربرد پلاسمای سرد در گوجه‌فرنگی مطابقت داشت. همچنین در پژوهش دیگری دیده شد که ترکیب تیمار نانو سیلیکا و پلاسمای سرد منجر به افزایش ۹۷ درصدی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ‌های گون شده که از طریق تأثیر بر میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز بوده است (Moghanloo *et al*., 2019). در این پژوهش، استفاده از پلاسما بر وزن خشک گیاه و آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز اثر مثبت داشت، در حالی‌که در سایر صفات چنین اثری قابل مشاهده نبود. گزارش‌های متفاوتی از تأثیر پلاسما بر گیاهان مختلف ارائه شده است که از دلایل تفاوت در این نتایج می‌توان به این مطلب اشاره کرد که اثر پلاسما روی رشد و جوانه‌زنی گیاهان با توجه به نوع گونه گیاهی، غلظت پلاسما، مدت زمان تیمار و گازهای مورد استفاده متغیر است (Adhikari *et al*., 2020).

در ارتباط با افزایش فنل کل برگ‌ها در استفاده از میکرو و نانو اسید سالیسیلیک، Farsaraei و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که میزان فنل کل در برگ‌های به‌لیمو تحت تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک افزایش یافت. همچنین Shabani و Ehsanpour (۲۰۱۰) طی تحقیقی مشاهده کردند که متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به‌طور قابل توجهی سبب افزایش میزان ترکیب‌های فنولیک و فلاونوئید در شیرین‌بیان شده‌اند که این موضوع را به تأثیر مثبت اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نسبت داده‌اند که در نهایت سبب افزایش مواد مؤثره فنولیک و فلاونوئید شده است. Ghasimi Hagh و همکاران (۲۰۱۸) نیز افزایش تدریجی غلظت فنل کل و فلاونویید را با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۵۰ میکرومولار مشاهده کردند که با نتایج ما همراستا بود.

در این پژوهش آنچه که در میزان تغییرات اسید کافئیک برگ مشخص بود، نقش مثبت و فزاینده اسید سالیسیلیک میکرو به هر دو صورت محلول‌پاشی و پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک بود. کافئیک اسید در گونه‌های مریم‌گلی، واحد سازنده انواع متابولیت‌های ثانویه فنلی از مونومرهای ساده تا انواع فرآورده‌های الیگومری است (Lu & Foo, 2002؛ Kamatou *et al*., 2008) که گزارش شده اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه، تولید این ترکیب‌ها را افزایش می‌دهد (Wen *et al*., 2005). Ghasimi Hagh و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که مقدار اسید کافئیک در کالوس‌های گیاه نوروزک به‌طور طبیعی کم است، در حالی‌که با تیمار اسید سالیسیلیک افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشته است. همچنین افزایش در میزان اسید کافئیک در استفاده از تیمار اسید سالیسیلیک در گیاه *Pimpinella brachycarpa* نیز گزارش شده است (Kim *et al*., 2020) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد؛ آنان اعلام کردند که افزایش اسید سالیسیلیک تا ۰/۱ میلی‌مولار منجر به افزایش اسید کافئیک شده و مقادیر بیشتر آن کاهش این صفت را در پی داشته است.

اسید رزمارینیک فراوانترین دایمرکافئیک اسید و مهمترین ترکیب فنلی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مریم گلی را بیشتر به‌علت وجود این ترکیب می‌دانند (Lu & Foo 2002؛ Kamatou *et al*., 2008). در پژوهش Ghasimi Hagh و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر گیاه نوروزک مشاهده شد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، مقدار اسید رزمارینیک نیز روند روبه افزایش داشته است، به‌طوری که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، بیشترین میزان اسید رزمارینیک حاصل و کمترین میانگین در شاهد بدست آمد. شواهد نشان می‌دهد که آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز ممکن است یک آنزیم کلیدی برای بیوسنتز اسید سالویانولیک و اسید رزمارینیک باشد و فعالیت بیشتر آن منجر به بهبود مقدار این ترکیب‌های فنلی شود (Dong *et al*., 2010). اما با توجه به افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در این پژوهش انتظار بر این بود که بیشترین میزان سالویانولیک اسید و رزمارینیک اسید در پیش‌تیمار بذری با اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک میکرو و نانو دیده شود که چنین امری مشاهده نشد. بنابراین با استناد به پژوهش‌های دیگر می‌توان دلایل مختلفی را برای این عدم تطبیق گزارش کرد. برای نمونه، وجود یا نبود ارتباط مستقیم بین غلظت‌های القاءکنندگی اسید سالیسیلیک و القای فعالیت‌های متابولیسمی اولیه (Namdeo, 2007)، این فرضیه که آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز یک گام تعیین‌کننده در بیوسنتز اسید رزمارینیک است همیشه معتبر نیست و احتمالاً فاکتورهای ناشناخته دیگری در سنتز فنولیک‌ها نقش دارند (Ejtahed *et al*., 2015). همچنین Ivankov و همکاران (۲۰۲۱) نیز بیان کردند که علت تفاوت در میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف در واکنش به یک تیمار خاص، تفاوت ویژگی‌های ژنتیکی در درک و انتقال سیگنال‌های تنش مولکولی یا ویژگی مسیرهای واکنش گیاهان به تنش‌هاست که ممکن است مسئول چنین تغییراتی باشد. به‌علاوه، تیمارهای بذری می‌توانند تغییراتی را با توجه به نوع گیاه در تعادل شبکه‌های فیتوهورمونی در بافت‌های گیاهی (به‌ویژه در فیتوهورمون‌های مسئول تنش مانند آبسیزیک اسید، سالیسیلیک و جاسمونات) (Verma *et al*., 2016) ایجاد کنند که منجر به انواع تغییرات القاءشده در سطح فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌شود.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که براساس نتایج این پژوهش پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی اسید بذری سالیسیلیک به فرم نانو و میکرو به همراه استفاده از پلاسمای سرد بر صفات اندازه‌گیری شده اثر مثبت داشت. به‌طوری که با کاربرد اسید سالیسیلیک نانو، صفات ارتفاع گیاه، طول برگ، محتوای کلروفیل a و b، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز، تیروزین آمونیالیاز، فنل کل برگ و اسید کافئیک افزایش یافتند. این موضوع می‌تواند به دلیل نفوذ بهتر و بیشتر اسید سالیسیلیک نانو به گیاه و در نتیجه شرکت آسانتر در فعالیت‌های متابولیسمی مختلف گیاه باشد. به‌طور کلی براساس نتایج این پژوهش، پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک و محلول‌پاشی نانو اسید سالیسیلیک بیشتر از سایر تیمارها در بهبود صفات رشدی و فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مریم گلی نقش داشتند که البته وقتی این تیمارها با کاربرد پلاسمای سرد همراه شدند افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاه را به همراه داشتند.

منابع مورد استفاده

- Adhikari, B., Adhikari, M. and Park, G., 2020. The effects of plasma on plant growth, development and sustainability. Applied Sciences, 10(17): 6045.
- Akkol, E.K., Goger, F., Kosar, M. and Baser, K.H., 2008. Phenolic composion and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgate* from Turkey. Food Chemistry, 108: 942-949.
- Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal, 23: 112-121.
- Arvin, M.J., Bidmeshki, A., Keramat, B. and Maghsoudi, K., 2011. The role of salicylic acid in reducing the effects of drought stress on morphological and physiological parameters in garlic. 7th Iranian Congress of Horticultural Sciences, Isfahan, 14-17 September: 942-943.

- Asnavandi, A., Barzin, G., Davari Mahabadi, T., Entezari, M. and Pishkar, L., 2021. Study of anatomical changes of fennel plants following cold plasma radiation. Journal of Cell & Tissue (JCT), 12(1): 11-19.
- Başkan, S., Öztekin, N. and Erim, F.B., 2007. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. Food Chemistry, 101(4): 1748-1752.
- Beaudoin-Eagan, L.D. and Thorpe, T.A., 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiology, 78: 438-441.
- Dehghan Niri, F., Saffari, V.R. and Moghsoudi Moud, A.A., 2016. Effect of salicylic acid on photosynthetic pigments and chlorophyll flurescence of pot marigold under salt stress conditions. Iranain Journal of Horticultur and Technology, 17(1): 77-88.
- Dokhanieh, A.Y., Aghdam, M.S., Fard, J.R and Hassanpour, H., 2013. Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. Scientia Horticulturae, 154: 31-36.
- Dong, C.J., Wang, X.L. and Shang, Q.M., 2011. Metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. Scientia Horticulturae, 129: 629-636.
- Dong, J., Wan, G. and Liang, Z., 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology, 148: 99-104.
- Ebrahimabadi, A.H., Mazoochi, A., JookarKashi, F., Djafari-Bidgoli, Z. and Batooli, H., 2010, Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. Food and Chemical Toxicology, 48: 1371-1376.
- Ejtahed, R.S., Radjabian, T. and Hoseini tafreshi, S.A., 2015. Ammonia lyase gene and rosmarinic acid production in *Salvia officinalis* and *Salvia virgata* shoots uunder salicylic acid elicitation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175: 1846-1858.
- Fadhlalmawla, S.A., Mohamed, A.A.H., Almarashi, J.Q. and Boutraa, T., 2019. The impact of cold atmospheric pressure plasma jet on seed germination and seedlings growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Plasma Science Technology, 21(10): 105503.
- Farhadi, N., Estaji, A. and Alizadeh Salteh, S., 2016. The Effect of pretreatment of salicylic acid on seed germination of milk thistle (*Silybum marianum* cv. Budakalaszi) under salinity and drought stress. Iranian Journal of Seed Research, 3(1): 75-84.
- Farsaraei, S., Moghaddam, M. and Mehdizadeh, L., 2019. Effect of salicylic acid on growth and biochemical characteristics and essential oil percentage of *Lemon verbena* at different irrigation water salinity. Journal of Water Research in Agriculture (Soil and Water Science), 33(1): 95-108.
- Fereyduni, M., 2016. Microscopic investigation of cold plasma effect on chickpea seed germination. 3rd International Conference on Applied Research in Agricultural Sciences, Tehran, 20 February.
- Fotovvat, M., Radjabian, T., Saboora, A., Ranjbar, M. and Sadat Ejtahed, R.S., 2014. Comparative analysis of rosmarinic acid and salvianolic acids A and B contents in four wild growing *Salvia* species from Iran. Iranian Journal of Biology, 27(5): 936-937.
- Ghai, N., Setia, R.C. and Setia, N., 2002. Effect of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brescia napus* L. (cv. GSL-1). Phytomorphology, 52: 83-87.
- Ghasimi Hagh, Z., Jokar, S., Bodaghi, H. and Modarres, M., 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth. Iranian Journal of Plant Biology, 10(35): 68-80.
- Hamada, A.M. and Al-Hakimi, A.M.A., 2001. Salicylic acid versus salinity drought-induced stress on wheat seedlings. Rostlinna Vyroba, 47(10): 444-450.
- Hedge, I.C., 1986. Labiatae In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K.H.). vol. 150. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Hoagland, R.E. and Duke, S.O., 1981. Effect of herbicides on extractable phenylalanine ammonia lyase activity in light- and dark-grown soybean (*Glycine max*) seedlings. Weed Science, 29(4): 433-439.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Imenshahidi, M. and Fazly Bazzaz, B.S., 2009. Review of the pharmacological and toxicological effects of *Salvia leriifolia*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 12(1): 1-8.
- Ivankov, A., Nauciene, Z., Degutyt eFomins, L., Žukiene, R., Januškaitiene, I., Malakauskiene, A., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Romanovskaja, D., Šlepetiene, A., Filatova, I., Lyushkevich, V. and Mildažiene, V., 2021. Changes in agricultural performance of common buckwheat induced by seed treatment with cold plasma and electromagnetic field. Applied Sciences, 11(10): 4391.
- Jiang, J., Lu, Y., Li, J., Li, L. and He, X., 2014. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to ralstonia solanacearum (Bacterial Wilt), PLoS ONE, 9(5): e97753.
- Jiayun, T., Rui, H., Xiaoli, Z. and Ruoting, Z., 2014. Effects of atmospheric pressure air plasma pretreatment on the seed germination and early

- Miura, K. and Tada, Y., 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Frontiers in Plant Science, 5: 410.
- Modarres, M., 2007. Investigation about phenology physiological and biochemical characteristics of *Saliva leriifolia*. Thesis, Biology Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
- Moghanloo, M., Iranbakhsh, A., Ebadi, M. and Oraghi Ardebili, Z., 2019. Differential physiology and expression of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and universal stress protein (USP) in the endangered species *Astragalus fridae* following seed priming with cold plasma and manipulation of culture medium with silica nanoparticles. 3 Biotech, 9(7): 288.
- Mohammadi, S.A., Khorram, S. and Haji Baba, A., 2016. Study the effect of different low temperature plasmas on growth of wheat seed. Research Institute of Applied Physics and Astronomy, 24-26 August: 101-105.
- Mozaffarian, V., 1996. Dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser, Tehran, 477p.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews, 1(1): 69-79.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J. and Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology, 17(5): 372-386.
- Nemati Mirak, Y., Khademi, O., Rohollahi, I., Bostani, A. and Karimi, N., 2019. Comparison on the effects of salicylic acid and nano-salicylic acid in reducing the effects of salinity stress on 'Camarosa' strawberry fruit. Pomology Research, 3(2): 79-93.
- Roshdy, A.E., Alebidi, A., Almutairi, K., Al-Obeed, R. and Elsabagh, A., 2021. The effect of salicylic acid on the performances of salt stressed strawberry plants, enzymes activity, and salt tolerance index. Agronomy, 11(4): 775.
- Saberi, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Zare, R. and Ghomi, H., 2018. Amelioration of photosynthesis and quality of wheat under nonthermal radio frequency plasma treatment. Scientific Reports, 8: 11655.
- Sauvesty, A., Page, F. and Huot, J., 1992. A simple method for extracting plant phenolic compounds. Canadian Journal of Forest Research, 22: 654-659.
- Shabani, L. and Ehsanpour, A.A., 2010. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in in vitro culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of biology, 22(4): 691-703.
- Shadkam, S. and Karimi, J., 2019. Effect of cold plasma on seed germination. National Conference on growth of Andrographis paniculata. Plasma Science and Technology, 16(3): 260.
- Kabiri, R. and Naghizadeh, M., 2016. Study the effect of salicylic acid pretreatment on germination and early growth of black cumin (*Nigella sativa*) under salinity stress. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 4(1): 61-72.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 3954-3962.
- Kamatou, G.P.P., Makunga, N.P., Ramogola, W.P.N. and Viljoen, A.M., 2008. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. Journal of ethnopharmacology, 119: 664-672.
- Kim, N.S., Jung, D.H., Jung, C.R., Jeon, K.S., Park, H.W. and Park, S.U., 2020. Improvement of phenylpropanoid production with elicitor treatments in *Pimpinella brachycarpa* Nakai. Horticulturae, 6(4): 108.
- Kumar, R., Thakur, A., Vikram, A., Vaid, A. and Rane, R., 2019. Effect of cold plasma treatment of seeds on quality of seed crop of okra. International Journal of Economic Plants, 6(2): 073-077.
- Lakzayi, M., Sabbagh, E., Rigi, K. and Keshtehgar, A., 2014. Effect of salicylic acid on activities of antioxidant enzymes, flowering and fruit yield and the role on reduce of drought stress. International Journal of Farming and Allied Sciences, 3: 980-987.
- Ling, L., Jiafeng, J., Jiangang, L., Minchong, S., Xin, H., Hanliang, S. and Yuanhua, D., 2014. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. Nature, 4: 5859.
- Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia*-a review. Phytochemistry, 59: 117-140.
- Maleki, M.S. and Ehsanpour, A., 2018. Effect of salicylic acid on total phenol, flavonoid, anthocyanin and PAL and TAL enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants. Iranian Journal of Plant Biology, 9(4): 55-67.
- Milda Žiene, V., Pauzaite, G., Naucienė, Z., Malakauskiene, A., Zukiene, R. and Januskaitiene, I., 2018. Pre-sowing seed treatment with cold plasma and electromagnetic field increases secondary metabolite content in purple coneflower (*Echinacea purpurea*) leaves. Plasma Processes and Polymers, 15: 1700059.
- Min-Hui, L., Jian-Min, C., Yong, P. and Pei-Gen, X., 2008. Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. World Science and Technology, 10(5): 46-52.

Larqué-Saavedra, A., 2017. Effect of salicylic acid on growth, nutritional status and performance of maize (*Zea mays*). Agrociencia, 51: 771-781.
- Verma, V., Ravindran, P. and Kumar, P.P., 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. BMC Plant Biology, 16: 86.
- Wang, H.F., Provan, K. and, Helliwell, K., 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chemistry, 87: 307-311.
- Wang, L.J., Fan, L., Loesche, W., Duan, W., Lie, G.J., Cheng, J.S., Lou, H.B. and Li, S.H., 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. BMC Plant Biology, 10: 34.
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y. and Ignacimuthu, S., 2011. Jasmonic acid-mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera*. Journal of Plant Growth Regulation, 30(4): 512-523.
- Wen, P.F., Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B. and Huang, W.D., 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science, 169(5): 928-934.
Industry and Commercialization Agricultural, Ahvaz, 19 December.
- Shakirova, F.M. and Sahabutdinova, D.R., 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science, 164 (3): 317-322.
- Shoghian, M. and Rozbahani, A., 2018. The effect of salicylic acid foliar application on morphological traits, yield and yield components of red bean under drought tension conditions. Crop Physiology Journal, 9(34): 131-147.
- Singh, A. and Dwivedi, P., 2018. Methyljasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(1): 750-757.
- Song, X., GuoYong, H. and Chang, L.X., 2020. Effects of salicylic acid and sucrose on pigment content in Pistacia chinensis leaves. Scientia Horticulturae, 259: 108783
- Tajbakhsh, M., Hasanzadeh, A. and Aghaii, R., 2014. Effect of different treatments. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 28(4): 74-84.
- Tucuch-Haas, C., Alcántar-González, G., Trejo-Téllez, L., Volke-Haller, H., Salinas-Moreno, Y. and

Effects of cold plasma and salicylic acid on secondary metabolites and activity of enzymes involved in their biosynthesis in *Salvia leriifolia* Benth.

S.M. Ghodsi Maab[1], H. Makarian[2*], Z. Ghasimi Hagh[3] and M. Gholipoor[4]

1- Ph.D. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran, E-mail: h.makarian@yahoo.com
3- Department of Horticulture Science and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

Received: September 2021 Revised: November 2021 Accepted: November 2021

Abstract

Seed pretreatment with the cold plasma and salicylic acid is one of the methods to improve the seed germination and quantitative and qualitative growth of plants. Therefore, an experiment was conducted to investigate the effects of seed pretreatment with the cold plasma (0 and 100 W for 4 min) and seed pretreatment and foliar application of salicylic acid in the micro and nano forms (0 and 1.5 mM salicylic acid) to improve the growth and production of secondary metabolites in *Salvia leriifolia* Benth. The results showed that the use of salicylic acid as seed pretreatment and foliar application increased the plant height, chlorophylls ***a*** and ***b***, total phenol, and caffeic acid of the leaves significantly. Also, the seed pretreatment with nano salicylic acid form and foliar application of micro salicylic acid form and cold plasma increased the seedlings fresh and dry weight and phenylalanine ammonialyase and tyrosine ammonialyase enzymes by 3.48, 13.3, 227.7, and 277%, respectively compared to the control. The seed pretreatment and application of salicylic acid did not have a positive effect on increasing the amount of rosmarinic and salvianolic acids of the leaves compared to the control. According to the results, increasing the enzymes activity involved in the biosynthesis of phenolic acids could affect the amount of caffeic acid positively. Overall, the findings of the present study showed that the seed pretreatment with salicylic acid and foliar application of nano salicylic acid could improve the growth traits and activity of enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *S. leriifolia* more than other treatments.

Keywords: Seed pretreatment, tyrosine ammonialyase, phenylalanine ammonialyase, *Salvia leriifolia* Benth.