اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر میزان ترکیبات زیست‌فعال میوه لیموشیرین (*Citrus limettioides* Tanaka)

مریم خانی امیرسالاری*، اصغر رمضانیان
بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
*نویسنده مسئول: maryam.khaniamirsalari@gmail.com

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر میزان ترکیبات زیست‌فعال میوه لیموشیرین (*Citrus limettioides* Tanaka)، انجام شد. برای این منظور، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار سطح اسید سالیسیلیک (۰، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میکرولیتر در لیتر) با سه تکرار اجرا شد. بیشترین افزایش در مقدار کلروفیل کل در پوست میوه با میانگین‌های ۰/۳۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر به ترتیب در پاسخ به غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکرولیتر در لیتر اسید سالیسیلیک مشاهده شد. تیمارهای مختلف اسید سالیسیلیک نسبت به تیمار شاهد، محتوای کاروتنوئید در پوست میوه را افزایش داد. بالاترین محتوای کاروتنوئید پس از کاربرد تیمارهای ۱ و ۲ میکرولیتر در لیتر اسید سالیسیلیک (به ترتیب ۱/۱۷ و ۱/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بدست آمد. کمترین میزان کاروتنوئید کل پوست میوه در تیمار شاهد (عدم کاربرد اسید سالیسیلیک) مشاهده گردید. بالاترین میزان فنول کل در گوشت میوه به ترتیب پس از کاربرد اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۲ و ۱ میکرولیتر در لیتر (با میانگین‌های ۹/۲۲ و ۹/۱۹ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب میوه) مشاهده گردید. همچنین بالاترین میزان فلاونوئید کل (به ترتیب با میانگین‌های ۴/۹۵ و ۴/۹۳ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ میلی لیتر آب میوه) مربوط به تیمارهای ۲ و ۱ میکرولیتر در لیتر اسید سالیسیلیک بود. به طور کلی اسید سالیسیلیک باعث افزایش ترکیبات زیست‌فعال میوه لیموشیرین شد.

واژگان کلیدی: کاروتنوئید، کلروفیل کل، فلاونوئید، فنول کل، مرکبات.

مقدمه

لیموشیرین با نام علمی *Citrus limettioides* Tanaka و نام انگلیسی Sweet Lime یکی از انواع تجاری مرکبات می‌باشد. این گیاه همیشه سبز، به صورت درختی با ارتفاع ۳ تا ۸ متر و قطر سایه گستر ۲ تا ۵ متر، خاردار یا بدون خار، با برگ‌های پهن و میوه‌های سته مرکب با طعم تلخ ملایم و بذر نسبتاً زیاد می‌باشد. رقم‌های تجاری این گونه شامل پلستین[1]، کلمبیا[2] و بوتانال[3] می‌باشند (Gulsen *et al.*, 2001). برداشت زودهنگام مرکبات جهت جلوگیری از خسارت سرمای شدید زمستان یک امر متداول در کشور ما می‌باشد. میوه‌های مرکباتی که با سرمای شدید و خشک زمستان مواجه می‌شوند علاوه بر اینکه از نظر ظاهری بازارپسندی خود را از دست می‌دهند، دچار تغییر طعم نیز می‌شوند. به‌طور کلی تنش دمای پائین یکی از عوامل محدودکننده محصولات مناطق نیمه‌گرمسیری از جمله مرکبات است. از این رو هر عاملی که بتواند خسارت تنش دمای پایین را کاهش دهد با ارزش خواهد بود. اسیدسالیسیلیک یا ۲-هیدروکسی بنزوئیک اسید[4] از ترکیبات فنولی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تأثیر قرار داده و

1- Palestine
2- Colombia
3- Botanal
4- 2-Hydroxybenzoic acid

IrHC2019

تغییراتی را در ریخت‌شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند (Popova *et al*., 2003). کاربرد اسید سالیسیلیک در دامنه‌ای از فرآیندهای مختلف در گیاهان مانند جوانه‌زنی بذور، مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده، تحریک گلدهی، تبادل و انتقال یون‌ها، عملکرد روزنه‌ها و تنظیم تعرق، نفوذپذیری غشاء، فتوسنتز و سرعت رشد گزارش شده است (Cag *et al*., 2009). هدف از این مطالعه بررسی اثر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های مختلف بر خصوصیات بیوشیمیایی میوه لیموشیرین بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر میزان ترکیبات زیست‌فعال میوه لیموشیرین، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. اعمال تیمارهای اسیدسالیسیلیک (۰ (آب‌مقطر)، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میکرولیتر در لیتر) روی میوه‌های موجود بر روی درخت، در وضعیت شکست رنگ میوه صورت گرفت. اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی میوه نظیر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید کل در پوست میوه و فنول کل و فلاونوئید کل در گوشت میوه در مرحله رسیدگی کامل میوه‌ها صورت گرفت. محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید پوست میوه با استفاده از روش دی‌متیل‌سولفوکساید اندازه‌گیری شد (Hiscox and Israelstam, 1979). ابتدا ۰/۱ گرم از تکه‌های پوست در داخل ارلن قرار داده و سپس ۷ میلی‌لیتر از دی-متیل‌سولفوکساید بر روی آن‌ها ریخته شد. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس عصاره صاف و بافت‌های برگ داخل ارلن‌ها دور ریخته و با اضافه کردن دی‌متیل-سولفوکساید حجم عصاره به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. درنهایت با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب عصاره‌ها در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خواند شدند. محتوای کلروفیل و کاروتنوئید نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم در هر گرم وزن تازه محاسبه و گزارش شد. میزان ترکیبات فنولی کل با روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۹۰۰ میکرولیتر آب‌میوه با ۱۸۰ میکرولیتر از محلول ۵۰ درصد فولین سیوکالتیو و ۹۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۲ درصد مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۷۵۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل T60 UV Visible اندازه‌گیری گردید (Ghasemnezhad, 2010). سپس منحنی استاندارد فنول با استفاده از غلظت‌های مختلف اسید گالیک رسم شد و میزان ترکیبات فنولی نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌میوه گزارش شد. مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی از طریق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گوشت میوه درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر گوشت میوه بیان شد (Menichini *et al*., 2009). تمامی داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. همچنین از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ جهت رسم شکل‌ها استفاده شد.

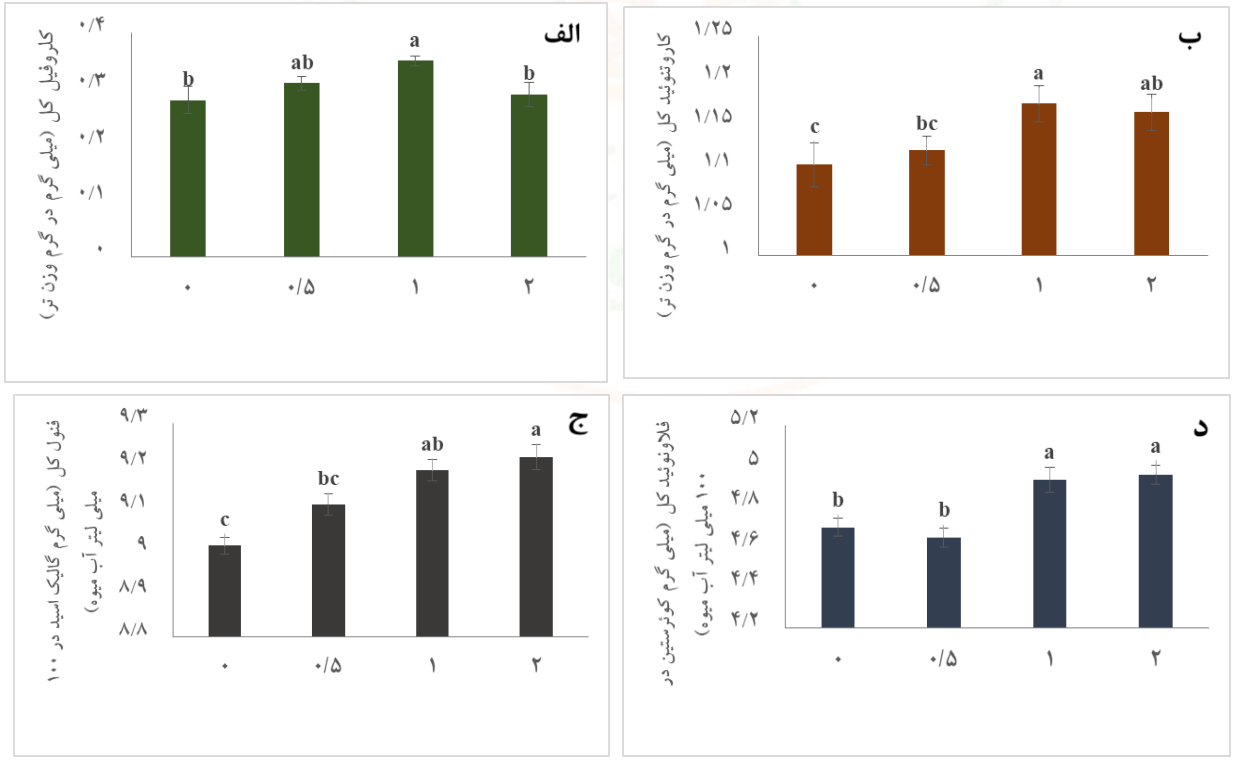
نتایج و بحث

نتایج نشان داد محتوای کلروفیل کل در پوست میوه لیموشیرین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت اسید سالیسیلیک قرار گرفت (شکل ۱-الف). نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد ۱ و ۰/۵ میکرولیتر در لیتر اسید سالیسیلیک در مقایسه با سایر غلظت‌ها باعث بهبود محتوای کلروفیل شد. بر اساس نتایج، بالاترین محتوای کلروفیل کل در پوست میوه با میانگین‌های ۰/۳۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر به ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکرولیتر

IrHC2019

در لیتر اسید سالیسیلیک مشاهده گردید؛ به طوری که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار از نظر آماری مشاهده نشد (شکل ۱-الف). نتایج بررسی این مطالعه نشان داد محتوای کاروتنوئید کل در پوست میوه لیموشیرین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک قرار می‌گیرد (شکل ۱-ب). بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش غلظت از ۰/۵ میکرولیتر در لیتر به ۱ و ۲ میکرولیتر در لیتر، محتوای کاروتنوئید در پوست میوه افزایش پیدا کرد. کاربرد غلظت بالاتر اسید سالیسیلیک (۲ میکرولیتر در لیتر) تأثیر معنی‌داری بر افزایش محتوای کاروتنوئید در پوست میوه در مقایسه با غلظت ۱ میکرولیتر در لیتر نداشت. همچنین کمترین میزان کاروتنوئید کل در پوست میوه با میانگین ۱/۱۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمار شاهد (عدم کاربرد اسید سالیسیلیک) مشاهده گردید (شکل ۱-ب).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد میزان فنول کل در گوشت میوه تحت تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک قرار می‌گیرد (شکل ۱-ج). بالاترین میزان فنول کل در گوشت میوه (با میانگین‌های ۹/۲۲ و ۹/۱۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه) به ترتیب پس از کاربرد اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۲ و ۱ میکرولیتر در لیتر مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین آن‌ها مشاهده نشد. همچنین پایین‌ترین میزان فنول کل در گوشت میوه مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۱-ج). نتایج این مطالعه حاکی از اثر مثبت محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر محتوای فلاونوئید کل در گوشت میوه است. نتایج نشان داد بالاترین میزان فلاونوئید کل پس از کاربرد ۲ و ۱ میکرولیتر در لیتر اسید سالیسیلیک حاصل شد. به‌طوری که کاربرد این غلظت‌ها، میزان فلاونوئید کل در گوشت میوه را به ترتیب تا ۴/۹۵ و ۴/۹۳ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه افزایش داد. با این حال مصرف اسید سالیسیلیک در غلظت پایین (۰/۵ میکرولیتر در لیتر) منجر به پایین‌ترین میزان فلاونوئید کل در گوشت میوه شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نداشت (شکل ۱-د).



شکل «۱» اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان کلروفیل (الف) و کاروتنوئید (ب) پوست میوه و فنول (ج) و فلاونوئید کل (د) در گوشت میوه لیموشیرین

IrHC2019

اسیدسالیسیلیک از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تأثیر قرار داده و تغییراتی را در ریخت‌شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند (Popova *et al*., 2003). اسیدسالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و افزایش کلروفیل، میزان فتوسنتز کل را افزایش داده و در نتیجه موجب افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد (Singh and Usha, 2003). در پژوهشی توسط EL-Tayeb (۲۰۰۵)، کاربرد اسید سالیسیلیک از طریق افزایش نرخ فتوسنتز باعث افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در جو شد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. یافته‌های پژوهشگران نشان می‌دهد، اسید سالیسیلیک باعث افزایش سبزمانی گیاه و جلوگیری از تخریب ساختار کلروپلاست می‌گردد (Pirasteh-Anosheh *et al*., 2016). با این حال برخی مطالعات نشان می‌دهد کاربرد اسید سالیسیلیک در غلظت‌های بالا، باعث تحریک سنتز هورمون اتیلن شده و از این طریق ساختار کلروفیل تخریب می‌گردد (Cag *et al*., 2009). در پژوهشی بر روی انبه، کاربرد غلظت ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری باعث افزایش میزان ترکیبات زیست‌فعال نظیر ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد که با نتایج این پژوهش در یک راستا است (Barman and Asrey, 2014). در پژوهشی مشابه بر روی انار، کاربرد استیل‌اسید سالیسیلیک باعث حفظ ترکیبات غذایی و زیست‌فعال میوه‌ها شد. بالاترین میزان قندها، اسیدهای آلی، ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها پس از کاربرد استیل‌اسید سالیسیلیک مشاهده شد (Sayyari *et al*., 2011). در پژوهشی توسط Ali و همکاران (۲۰۰۷)، اسیدسالیسیلیک به طور معنی‌داری باعث افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در *Panax ginseng* شد. از اسیدسالیسیلیک در تولید رزمارینیک‌اسید در کشت موئین گیاه ریحان سبز و کورکومین در کشت سلولی گیاه پروانش استفاده شده است (Matkowski, 2008). اسید سالیسیلیک از طریق افزایش بیان ژن آنزیم Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) به عنوان آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنولی، سبب تحریک تولید ترکیبات فنولی در گیاهان می شود (Samuel, 2012). کاربرد سالیسیلیک اسید در افزایش فعالیت این آنزیم و به دنبال آن افزایش ترکیبات فنولی در مسیر فنیل پروپانوئیدی در لوبیا چشم بلبلی گزارش شده است که نتایج این مطالعه را حمایت می کند (Chandra *et al*, 2007).

منابع

Ali, M. B., Hahn, E. J., and Paek, K. Y. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules, 12(3): 607-621.

Barman, K., and Asrey, R. 2014. Salicylic acid pre-treatment alleviates chilling injury, preserves bioactive compounds and enhances shelf life of mango fruit during cold storage. Journal of Scientific and Industrial Research, 73(11): 713-718.

Cag, S., Cevahir-Oz, G., Sarsag, M., and Goren-Saglam, N. 2009. Effect of salicylic acid on pigment, protein content and peroxidase activity in excised sunflower cotyledons. Pakistan Journal of Botany, 41(5): 2297-2303.

Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A., and Saxena, P. 2007. Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. Acta Physiologiae Plantarum, 29(4): 361-367.

El-Tayeb, M. A. 2005. Response of barley grains to the interactive e. ect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation, 45(3): 215-224.

Ghasemnezhad, M., Shiri, M. A., and Sanavi, M. 2010. Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage. Caspian Journal Environmental Sciences, 8(1): 25-33.

Gulsen, O., and Roose, M. L. 2001. Lemons: diversity and relationships with selected *Citrus* genotypes as measured with nuclear genome markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126(3): 309-317.

Hiscox, J. T., and Israelstam, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian journal of botany, 57(12): 1332-1334.

IrHC2019

Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants–a review. Biotechnology advances, 26(6): 548-560.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., Di Cindi, B., Houghton, P.J., and Menichini, F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry, 114(2): 553-560

Pirasteh-Anosheh, H., Ranjbar, G., Pakniyat, H., and Emam, Y. 2016. Physiological mechanisms of salt stress tolerance in plants: An overview. Plant-environment interaction: Responses and approaches to mitigate stress, 141-160.

Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V., and Stoinova, Z. H. 2003. Salicylic acid-and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 133, 152.

Samuel, C. Z . 2012. Efecto del acido salicilico en la tolerancia a estres abiotico: induccion de genes de resistencia, produccion de fenoles, flavonoids y capacidad antioxidante en lechuga (*Lactuca sativa*). Tesis Individual Que Para Obtener El Titulo De Licenciado En Iotecniligia. Universidad Santiago De Queretaro , Queretaro.

Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., and Serrano, M. 2011. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. Postharvest Biology and Technology, 60(2): 136-142.

Singh, B., and Usha, K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. Plant Growth Regulation, 39(2): 137-141.

Effect of Salicylic Acid on Bioactive Components of Sweet Lime (*Citrus limettioides* Tanaka)

Maryam Khani Amirsalari*, Asghar Ramezanian
Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University
*Corresponding Author: maryam.khaniamirsalari@gmail.com

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effect of salicylic acid foliar application on bioactive components of sweet lime (*Citrus limettioides* Tanaka). Experimental design was randomized complete blocks in 4 levels of salicylic acid (0, 0.5, 1 and 2 µL L^{-1}) with 3 replications. The highest increases in chlorophyll content (0.35 and 0.31 mg g^{-1} FW) were monitored in response to 1 and 0.5 µL L^{-1} salicylic acid treatments. Various salicylic acid treatments increased the carotenoids content than the control treatment. Salicylic acid 1 and 2 µL L^{-1} showed the highest carotenoids content (by 1.17 and 1.16 mg g^{-1} FW, respectively), and the control treatment gave the least content. The highest of total phenol content (9.22 mg GAE 100 mL^{-1}) was found in 2 µL L^{-1} salicylic acid treatment followed by 1 µL L^{-1} salicylic acid treatment which increased total phenol content to 9.19 mg GAE 100 mL^{-1}. Also, the highest amount of total flavonoids (4.95 and 4.93 mg QE 100 mL^{-1}) were related to 2 and 1 µL L^{-1} salicylic acid treatments, respectively. In general, salicylic acid increased the bioactive components of sweet lime.

***Keywords*:** Carotenoid, Chlorophyll, Flavonoids, Total phenol**,** Rutaceae.

IrHC2019