

## تأثیر سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی مرزه اورامی (*Satureja avromanica* Maroofi) در سیستم کشت درون شیشه‌ای

نرگس نوری<sup>۱\*</sup>، علی‌اکبر مظفری<sup>۲</sup>، جلال خورشیدی<sup>۳</sup>

<sup>۱\*</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه کردستان، سنندج

<sup>۲،۳</sup> استادیاران گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه کردستان، سنندج

\* نویسنده مسئول: [narges.noori1999@yahoo.com](mailto:narges.noori1999@yahoo.com)

### چکیده

مرزه هورامی (*Satureja avromanica* Maroofi) گیاهی دارویی از تیره نعناعیان (Lamiaceae) است، اندمیک استان کردستان و شدیداً در معرض خطر انقراض می‌باشد. اسانس این گیاه به دلیل تیمول بالای که دارد، بسیار ارزشمند می‌باشد. لذا بررسی روش‌های مختلف تکثیر این گیاه امری کاملاً ضروری می‌باشد. بر این اساس در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی این گیاه در سیستم کشت درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش فنول کل، فلاونوئید کل، کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل، کاروتنوئید و کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید. غلظت ۱ میلی‌مولار موجب از بین رفتن ریز نمونه‌ها شد. لذا براساس نتایج این تحقیق مناسبترین غلظت سالیسیلیک اسید برای تکثیر مرزه اورامی در بین غلظت‌های بکار رفته، غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بود.

کلمات کلیدی: تیمول، فنول، پراکسیداز، فلاونوئید، کلروفیل

### مقدمه

جنس مرزه یکی از جنس‌های مهم خانواده نعناعیان است که ۳۰ گونه مختلف را شامل می‌شود (Sefidkon and Jamzad, 2005). مرزه هورامی (*Satureja avromanica* Maroofi) گیاهی است چندساله، بوته‌ای، گل‌آذین انتهایی با گل‌های بنفش، غیر معطر و برگ‌های متقابل است که محل رویش آن به‌طور اختصاصی رشته‌کوه‌های کردستان است (Maroofi, 2010). از مرزه هورامی فقط حدود ۱۵۰ بوته در طبیعت باقی‌مانده است که به دلیل قوه نامیه پایین، جوانه‌زنی ضعیف بذر و سرعت رشد آهسته گیاه و برداشت گسترده توسط افراد محلی، بقاء آن به خطر افتاده و در حال انقراض است (Karimi et al., 2014). باتوجه به اهمیت دارویی گونه‌های این جنس و اهمیت اقتصادی تکثیر آن‌ها از طریق کشت بافت با هزینه کم و در سطح زیاد ضروری است. کشت در شرایط درون شیشه‌ای یک روش مؤثر و کارا برای تکثیر گونه‌های گیاهی در معرض خطر انقراض است (Inesdias et al., 2015).

سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنولی ساده است، که به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاه به دلیل اثر کاربرد خارجی آن بر روی بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه شناخته شده است (Zavala et al., 2004). کاربرد سالیسیلیک اسید در ریحان و مرزنجوش سبب تحریک رشد و افزایش عملکرد اسانس با بالا بردن فتوسنتز و جذب مواد غذایی شده است (Gharib et al., 2007). سالیسیلیک اسید به‌طور قابل توجهی سبب افزایش رشد رویشی، تغییر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و همچنین عملکرد اسانس در رازبانه شده است (Hashemi et al., 2012). تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید اثرات مضر تنش شوری بر رنگدانه‌های فتوسنتزی ریحان را کاهش داده است (Delavari et al., 2010).

## مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق محیط‌کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) مورد استفاده قرار گرفت. محیط‌کشت با روش اتوکلاو کردن استریل گردید و سپس سالیسیلیک اسید در غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) با روش فیلتراسیو سرد استریل و به محیط‌کشت اضافه گردید. قلمه‌های نوک شاخساره در حال رشد به آزمایشگاه منتقل و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت. برای ضدعفونی کردن در زیر هود لامینار ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱ درصد کلر فعال قرار داده شدند. جهت حذف هیپوکلرید سدیم ریزنمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدن. در نهایت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت MS قرار داده شدند. پس از کشت ریزنمونه‌ها در اتاقک رشد با شدت نور ۳۸ میکرو مول بر مترمربع بر مجذور ثانیه، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار (۸ شیشه و هر شیشه شامل ۴ ریزنمونه) طراحی و اجرا گردید.

برای اندازه‌گیری میزان فنول کل و فلاونوئید کل مقدار ۰/۱ گرم از بافت برگ منجمد شده با ازت مایع به کمک ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی سرد حاوی یک درصد اسید کلریدریک کاملاً هموزن شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد گردید. از محلول رویی برای اندازه‌گیری غلظت فنول و فلاونوئید کل استفاده گردید. اندازه‌گیری فنول کل با استفاده از روش (Singleton *et al.*, 1999) انجام گرفت. نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن تر برگ بیان گردید. اندازه‌گیری فلاونوئید کل در طول موج ۵۱۰ نانومتر به روش (Toor and Savage, 2005) با استفاده از اسپکتروفتومتر انجام گردید. نتایج برحسب میلی‌گرم کاتکین در ۱۰۰ گرم وزن تر بیان شد.

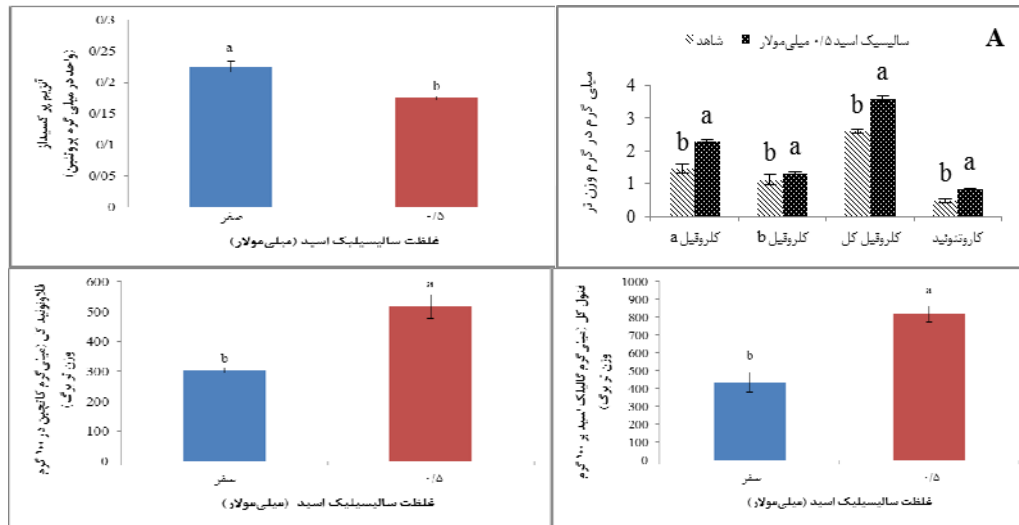
جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئید مقدار ۰/۱ گرم بافت برگ منجمد شده با ازت مایع و ۰/۱ گرم اکسید منیزیم به کمک ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در داخل هاون چینی همگن شده و سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتیگراد گردید. جذب عصاره‌ی رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر قرائت گردید. میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تازه با روش (Lichtenthaler and Buschmann, 2001) محاسبه شد.

به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز مقدار ۰/۲ گرم بافت منجمد شده با ازت مایع با استفاده از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و ۲ گرم PVP در داخل هاون همگن شده و سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد گردید. از محلول رویی برای اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش (Hemeda and Kelin, 1990) استفاده گردید.

## نتایج و بحث

مطالعه تأثیر سالیسیلیک اسید بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی مرزه هورامی (*Satureja avromanica*) (Maroofi) نشان داد که غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید موجب از بین رفتن ریزنمونه‌ها می‌گردد. غلظت‌های بالای محرک‌ها واکنش‌های با حساسیت بالا را القا می‌کند که منجر به مرگ سلول‌ها می‌گردد درحالی‌که غلظت‌های پایین سبب القاء واکنش‌های دفاعی می‌گردد (Namadeo, 2007). در شرایط سیستم درون شیشه‌ای تولید ترکیبات فنولی می‌تواند توسط محرک‌های مثل سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در سلول تحریک و افزایش یابد (Matkowski, 2008). که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشته و کاربرد تیمار ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنادار در فنول و فلاونوئید کل شد. در این آزمایش نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک اسید غلظت کلروفیل *a* و کاروتنوئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش توان ضد اکسایشی سلول و سنتز پروتئین‌های جدید، از دستگاه فتوسنتزی گیاه حمایت می‌کند و با

افزایش تقسیم سلولی در مریستم انتهایی ریشه رشد گیاه را افزایش می‌دهد و باعث بهبود کارایی فتوسنتز گیاه می‌شود (Shakirova, 2007). کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاه پرپوش باعث افزایش معنی‌دار فتوسنتز، کلروفیل کل و کاروتنوئید می‌شود (Khodary, 2004). طبق گزارشات (Hayat and Ahmad, 2007) بهبود سطح رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از نقش‌های سالیسیلیک اسید در گیاه به شمار می‌رود. تحقیقات نشان داده است که تیمار سالیسیلیک اسید موجب افزایش محتوای کلروفیل را در شاه‌توت قرمز در شرایط طبیعی و تنش خشکی می‌شود (Ying et al., 2013). نتایج ما نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید موجب کاهش آنزیم پراکسیداز می‌شود (شکل ۱). تیمار سالیسیلیک اسید از طریق کاهش میزان رادیکال آزاد هیدروژن پراکسیداز می‌تواند موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه تنباکو در سیستم درون شیشه‌ای شود (Kawano and Muto, 2000).



شکل ۱- مقایسه میانگین‌های تأثیر سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه مرزه هورامی (*Satureja avromanica*) (Maroofi): کلروفیل a, b، کل و کاروتنوئید (A)، آنزیم پراکسیداز (B)، فنول کل (C) و فلاونوئید کل در تیمار شاهد و سالیسیلیک اسید ۰/۵ میلی مولار.

## منابع

- Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, C.Y. and González-Aguilar, G.A. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Science and Technology*; 37(7):687-695.
- Delavari, P.M., Baghzadeh, A., Enteshari, S.H., Kalantari, K.M., Yazdanpanah, A. and Mousavi, E.A. 2010. The effects of salicylic acid on some of biochemical and morphological characteristic of *Ocimum basilicum* under salinity stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*; 4(10): 4832-4845.
- Hemeda, H.M. and Klein, B.P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*; 55(1): 184-185.
- Karimi, N., Ghaspour, H.R. and Yari, M. 2014. Effect of different growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Satureja* species. *Annual Research and Review in Biology*; 4(16): 2646.
- Kawano, T. and Muto, S. 2000. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany*; 51(345): 685-693.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Maroofi, H. 2010. Two new plant species from Kurdistan province, West of Iran. *Iran Journal of Botany*; 16(1): 76-80.

- Matkowski, A. 2008.** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants: a review. *Biotechnology advances*; 26(6): 548-560.
- Namdeo, A.G. 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*; 1(1): 69-79.
- Sefidkon, F. and Jamzad, Z. 2005.** Chemical composition of the essential oil of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*). *Food Chemistry*; 91(1): 1-4.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*; 299: 152-178.
- Toor, R.K. and Savage, G.P. 2005.** Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*; 38(5): 487-494.
- Ying, Y., Yue, Y., Huang, X., Wang, H., Mei, L., Yu, W., Zheng, B. and Wu, J. 2013.** Salicylic acid induces physiological and biochemical changes in three Red bayberry (*Myric rubra*) genotypes under water stress. *Plant growth regulation*; 71(2):181-189.



## Effect of Salicylic Acid on Physiological Characteristics of *Satureja avromanica* Maroofi in *In-Vitro* Culture System

Narges Noori<sup>1\*</sup>, Ali Akbar Mozaffari<sup>2</sup>, Jalal Khorshidi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mrs of Horticultural science, University of Kurdistan, Sanandaj

<sup>2,3</sup> Professor, Department of Horticultural science, University of Kurdistan, Sanandaj

\* Corresponding Author: [narges.noori1999@yahoo.com](mailto:narges.noori1999@yahoo.com)

### Abstract

*Satureja avromanica* Maroofi, belong to Lamiaceae family, an endemic and threatened medicinal plant species of Kurdistan province. Essential oil of this species is very valuable due to high thymol percentage. So, study of different propagation methods of this species is necessary. According to this aim, in this study, effect of different concentrations of salicylic acid (0.0, 0.5 and 1 mM) on physiological characteristics of this plant was evaluated in *in vitro* culture system. This study was performed on base completely randomized design. Results showed that 0.5 mM concentration of salicylic acid led to increase in total phenol, total flavonoid, chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll, carotenoid and reduce peroxidase activity enzyme compare to 0.0 mM concentrations. So, on base these results, 0.5 Mm concentration was the best concentration of salicylic acid in between used concentrations .

**Keywords:** Thymol, Phenol, Peroxidase, Flavonoid, Chlorophyll

