Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 4, Winter 2020 (993-1008)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.251946.1397

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۰، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۱۰۰۸-۹۹۳)

تأثیر ترکیبات گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید بر برخی از پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیکی و ویژگی آنتی اکسیدانی گیاه پروانش *Catharanthus roseus* L. (G.DON).

الهه بیانلو[۱]، میترا اعلایی[۲*] و محسن ثانی خانی[۲]
۱ و ۲. کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گل و گیاه زینتی و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۰)

چکیده

گیاه پروانش (*Catharantus roseus* L.) از تیره Apocynaceae جزو گیاهان بسیار ارزشمند زینتی- دارویی می‌باشد. به‌منظور مطالعه اثر گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید بر برخی از ویژگی‌های گیاه پروانش، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل گاما آمینوبوتریک اسید (۰/۵، ۰/۷۵و ۱ میلی‌مولار)، هیومیک اسید (۵۰، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سالیسیلیک اسید (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بودند. همچنین گیاهان شاهد با آب مقطر تیمار شدند. نتایج نشان داد بیشترین ارتفاع گیاه، قطر ساقه و تعداد برگ در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید به‌دست آمد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. کمترین تعداد روز تا گلدهی مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بود. کاربرد برگی تیمار دو میلی‌مولار سالیسیلیک اسید تأثیر قابل توجهی در سطح احتمال یک درصد بر شاخص‌های ارتفاع گیاه، قطر ساقه، میزان فنل و فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز داشت. همچنین غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید موجب افزایش معنی‌دار صفات ارتفاع گیاه، قطر ساقه، روز تا گلدهی، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز نسبت به تیمار شاهد شد. در بین تیمارها، غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید بیشترین تأثیر را بر مقدار فلاونوئید داشت. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار دو میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای یک میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید و دو میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. بنابراین استفاده از گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید توانست موجب بهبود عملکرد و شاخص‌های فیزیولوژیکی در گیاه پروانش گردد.

واژه‌های کلیدی: شاخص‌های رشد، فعالیت آنتی اکسیدانی، فلاونوئید، فنل.

Effect of ϒ-aminobutyric acid (GABA), humic acid and salicylic acid on some morphophysiological responses and antioxidant characters of *Catharanthusroseus* L. (G.Don)

Elaheh Bayanloo[1], Mitra Aelaei[2*] and Mohsen Sani Khani[2]
1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(Received: Feb. 6, 2020 - Accepted: Oct. 12, 2018)

ABSTRACT

Periwinkle plant *Chatarantus roseus* L. from Apocynaceae family is one of the valuable ornamental-medicinal plants. In order to evaluate the effects of ϒ-aminobutyric acid, humic acid and salicylic acid on some characteristics of periwinkle an experiment was conducted based on complete randomized design (CRD) with three replications at Agriculture Faculty university of Zanjan. Treatments included ϒ-aminobutyric acid (0.5, 0.75 and 1 mM), humic acid (50, 100 and 150 $mg.L^{-1}$) and salicylic acid (0.5, 1 and 2 mM). The results showed that highest plant height, stem diameter and leaf number was achieved 0.5mM concentration of ϒ-aminobutyric acid which had a significant difference whit the control treatment. The lowest days to flowering were 0.5 mM salicylic acid. Foliar application of 2 mM salicylic acid was significant ($p<0.01$) on plant height, stem diameter, phenol, peroxidase and catalase activities in compared to the control treatment. Between the different treatments, the concentration of 50 $mg.L^{-1}$ humic acid had the highest effect on flavonoids content. Also, plant height, stem diameter, day to flowering, peroxidase and catalase activity significantly increased in the concentration of 150 $mg.L^{-1}$ humic acid compared to control treatment. Between all treatments, the highest catalase activity was observed in 2 mM salicylic acid and the highest peroxidase activity was observed in 1 ϒ-aminobutyric acid and 2 mM salicylic acid treatments. Therefore, the yield, physiological and phytochemical indices of the periwinkle improved by using of ϒ-aminobutyric acid, humic acid and salicylic acid.

Keywords: Antioxidant activity, flavonoids, growth indices, phenol.

* Corresponding author E-mail: mitraaelaei@gmail.com

مقدمه

پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* L. (G.Don) از خانواده Apocynaceae (Khaligi, 2008) و منشأ آن مناطق حاره و گرمسیر می‌باشد. به علت وجود آلکالوئیدهای ارزشمند وین‌بلاستین و وین‌کریستین در پیکره رویشی و ریشه که هر دو خاصیت ضد سرطانی و ضد توموری دارند، پروانش در اکثر فارماکوپه‌ها به‌عنوان یک گیاه زینتی- دارویی مهم معرفی شده است (Omidbeigi, 2010). از جمله روش‌های درمانی که برای انواعی از سرطان‌ها استفاده می‌شود، شیمی درمانی به کمک مجموعه آلکالوئیدهای وینکا از جمله وین‌کریستین و وین‌بلاستین می‌باشد (Pietrosiuk *et al*., 2007). مقدار این آلکالوئیدها در این گیاه بسیار کم است، به‌طوری‌که یک تن برگ خشک پروانش فقط حاوی سه گرم وین‌کریستین می‌باشد و ارزش هر گرم آلکالوئید وین‌کریستین در حدود ۴۰۰۰ دلار است. از آنجا که تقاضای بسیار برای وین‌بلاستین و وین‌کریستین وجود دارد و میزان آنها در مواد خام اولیه استخراج شده از پروانش کم است، اهمیت مطالعه بر روی این گیاه چند برابر می‌شود. بنابراین تغذیه پروانش با پیش ماده‌های مناسب و استفاده از تیمارهای هورمونی، راهکاری مناسبی برای افزایش کیفیت و عملکرد این گیاه می‌باشد (Kalidass *et al*., 2010; Pietrosiuk *et al*., 2007). سالیسیلیک اسید (SA) تنظیم‌کننده رشد گیاهی از گروه فنل‌ها است (Hayat & Ahmad, 2007) و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان با غلظت‌های کم مؤثر می‌باشد (Raskin, 1992). سالیسیلیک اسید نقش مهمی در تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه نظیر فتوسنتز، تعرق، جذب یون و انتقال مواد، رشد و نمو گیاهان (Galal, 2012)، جوانه‌زنی بذر، رسیدن میوه، گلیکولیز، گلدهی (Chen, 2007)، تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها (Popova, 1997) دارد و سبب افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیداتیو (Rajeshwari & Bhuvaneshwari, 2017) و افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌شود که به دنبال آن سنتز و تجمع ترکیبات فنلی افزایش یافته و مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده افزایش می‌یابد (Ding *et al*., 2001). کاربرد سالیسیلیک اسید خارجی ممکن است سبب افزایش مقدار اسید درونی شود و با توجه به مسیر بیوسنتزی آن ممکن است در افزایش متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهان مؤثر واقع شود. چگونگی تأثیر سالیسیلیک اسید به عامل‌های مختلفی مانند نوع گونه، مرحله رشدی، روش کاربرد و نیز غلظت بستگی دارد (Seo, 1995). در بررسی تأثیر غلظت‌های به کار رفته سالیسیلیک اسید بر گیاه بابونه آلمانی، رشد برگ‌ها و ریشه‌ها به‌طور معناداری افزایش یافت (Kovacik *et al*., 2009). گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) با فرمول مولکولی $C_4H_9NO_2$ یک آمینو اسید چهار کربنه و غیر پروتئینی است (Wang *et al*., 2014) و در گیاهان به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان داخلی گیاه شناسایی شده و در فرآیندهای فیزیکوشیمیایی مختلف گیاه درگیر می‌شود (Bown *et al*., 2002). مسیر اول بیوسنتز GABA از طریق گلوتامات و تبدیل آن به سوکسینات که به مسیر گابا- شانت (GABA-Shunt) معروف است و مسیر دوم از طریق مسیر تجزیه پلی‌آمین فراهم می‌شود (Bown & Shelp, 1997; Rothan *et al*., 1997; Buchanan-Wollaston *et al*., 2003). در مسیر گابا- شانت، فعالیت گابا ترانس آمیناز می‌تواند تنش‌های اکسیداتیوی را با فراهم‌آوری NADH و سوکسینات وارد چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) و زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی جهت تولید ATP کافی، کاهش داده و تجمع H_2O_2 را تحت تنش محیطی به حداقل رساند (Bouche *et al*., 2003; Fait *et al*., 2007; Palma *et al*., 2015; Carvajal *et al*., 2015). علاوه بر این، گاما آمینوبوتریک اسید ممکن است از گاما- آمینوبوتیرآلدئید (محصول مسیر کاتابولیکی پلی‌آمین) از طریق دهیدروژناز بتائین آلدئید تولید شود که در کلروپلاست تجمع پیدا کرده و در بیوسنتز گلایسین بتائین نقش دارد (Bouche & Fromm, 2004). گلایسین بتائین موجب تنظیم اسمزی، ثبات غشا، جاروب ROS، افزایش محتوای ATP و در نهایت افزایش فعالیت مسیر گابا شانت می‌شود (Kurepin *et al*., 2015; Shan *et al*., 2016). گاما آمینوبوتریک اسید نقش‌های متعددی از جمله پیام‌دهنده، دفاع در برابر حشرات،

تنظیم pH، تنظیم اکسیداسیون، تعادل انرژی و متابولیسم نیتروژن، کربن (Deewatthanawong *et al*., 2010; Bouche *et al*., 2003) و تنظیم اسمزی، هموستاز گلوتامات و فعالیت آن به‌عنوان یک منبع پیام‌رسان برای جذب نیترات و پاسخ گیاه به شرایط محیطی مهم است (Masclaux-Daubresse *et al*., 2002). تجزیه گاما آمینوبوتریک اسید می‌تواند تجمع واسطه‌های فعال اکسیژن را تحت شرایط تنش‌های اکسیداتیوی حذف کند، در نتیجه گاما آمینوبوتریک اسید موجب حفاظت در برابر تنش‌های اکسیداتیوی می‌شود (Bouche *et al*., 2003). گاما آمینوبوتریک اسید از طریق افزایش فعالیت پرولین-۵-کربوکسیلات و سرکوب کردن فعالیت پیروات دهیدروژناز، منجر به تجمع پرولین در گیاه می‌شود، بنابراین تجمع پرولین در هنگام تنش باعث حفظ ساختار سلولی و جلوگیری از آسیب‌های سلولی خواهد شد (Wang *et al*., 2014). در گیاهان گاما آمینوبوتریک اسید در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده به سرعت تجمع می‌یابد و باعث مقاومت گیاه در برابر این تنش‌ها می‌شود (Wang *et al*., 2014). یکی دیگر از نقش‌های GABA به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی است (Bouche *et al*., 2003). محلول‌پاشی گاما آمینوبوتریک اسید رشد گیاهان را با افزایش مقاومت به تنش‌ها با تنظیم فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم اولیه نیتروژن و جذب نیترات (Barbosa *et al*, 2010) و افزایش تجمع آلانین در مقابل آسیب تنشی (Miyashita & Good, 2008) و ممانعت از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال بهبود بخشید (Bouche *et al*., 2003). نتایج پژوهش‌ها نشان داده کاربرد خارجی گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) رشد مورفولوژیکی، عملکرد دستگاه فتوسنتز، ظرفیت تبادل گازی، بیوسنتز کلروفیل و پاسخ‌های غیرآنتی‌اکسیدانی و پایداری غشا را تحریک کرد (Yin *et al*., 2010). در مطالعه‌ای که بر روی گل رز انجام گرفت، کاربرد گاما آمینوبوتریک اسید اثر مثبتی روی صفات مورفولوژیکی و رشد گل داشت (Mirzaei Mashhoud, 2016). تیمار گاما آمینوبوتریک اسید موجب تجمع گلایسین بتایین (GB) شد و اثرات مثبتی بر کیفیت و خصوصیات پس از برداشت گل‌های آنتوریوم طی انبار سرد داشت (Aghdam *et al*., 2016). هیومیک اسید یک ترکیب پلیمری طبیعی آلی است که در نتیجه تجزیه مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به‌وجود می‌آید که می‌تواند جهت افزایش محصول و کیفیت آن به‌کار گرفته شود (Aiken *et al*., 1985). هیومیک اسیدها با شرکت در تنفس سلولی، فتوسنتز، سنتز پروتئین، جذب آب و مواد غذایی و فعال کردن آنزیم‌ها، رشد گیاه را تحریک و عملکرد را افزایش می‌دهند (Chen *et al*., 2004; Nardi *et al*., 2000). یکی از مهم‌ترین مزیت‌های استفاده از این میکروهومات‌ها (مواد هومین) تأثیر بسیار مثبت آن‌ها در افزایش قابلیت سنتز گیاه و متابولیسم آن‌ها است (Samavat & Malakuti, 2004). افزایش تعداد ساقه، سطح برگ، عملکرد کل، وزن‌تر و میزان فسفر با محلول‌پاشی هیومیک اسید در لوبیا مشاهده شد (Zaky *et al*., 2006). هیومیک اسیدها همچنین غلظت ریبونوکلئیک اسید پیام‌رسان (mRNA) را در سلول‌های گیاه افزایش می‌دهند. این فرآیند بیوشیمیایی باعث افزایش سنتز آنزیم‌ها و محتوای پروتئین برگ‌ها می‌شود. برخی از این آنزیم‌ها شامل کاتالاز، پراکسیداز، دی فنل اکسیداز، پلی فنل اکسیداز و اینورتاز است (Pettit, 2004). محققین اثر مواد هیومیکی را بر گیاه بنت گراس (*Agrostis stolonifera*) بررسی کردند و دریافتند کاربرد برگی مواد هیومیکی به میزان معنی‌داری غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها را در برگ‌ها افزایش داد و همچنین سبب افزایش در فتوسنتز، تنفس، سنتز نوکلئیک اسیدها و جذب یون‌ها شد (Zhang & Schmidt, 2003).

با توجه به تغییر الگوی آب‌وهوایی در کشور، اهمیت استفاده از گیاهان زینتی- دارویی به‌عنوان گیاهان متحمل‌تر دو چندان شده است. یکی از این گیاهان مدل با کاربرد دو گانه زینتی- دارویی پروانش است که در زیستگاه اصلی خود در معرض خطر انقراض است و با توجه به حساسیت این گیاه به بیماری‌های ویروسی و قارچی به‌نظر می‌رسد با استفاده از برخی محرک‌ها بتوان ویژگی‌های رشدی این گیاه را از هر دو جنبه زینتی و دارویی بهبود بخشید. از طرفی به‌منظور افزایش تحمل به تنش‌های مختلف (به‌خصوص زمانی که گیاه در شرایط

آب‌وهوایی متفاوت از زیستگاه اصلی خود کشت می‌گردد) و همچنین در گیاهان دو منظوره به جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه، کاربرد ترکیبات تحریک‌کننده می‌تواند مفید واقع شود. لذا به‌نظر می رسد که می‌توان با استفاده از شرایط کنترل رشد و با استفاده از تحریک‌کننده‌ها، ویژگی‌های رشد را ترفیع بخشیده و جلوه ظاهری این گیاه را به‌منظور کاربرد دو منظوره آن تحت کنترل هدفمند درآورد. با توجه به محدود بودن اطلاعات در زمینه تأثیر گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی پروانش مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش این محرک‌ها بر پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیکی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی گیاه پروانش انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در زمستان و بهار سال ۹۶-۱۳۹۵ به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی گاما آمینوبوتریک اسید، سالیسیلیک اسید و هیومیک اسید بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه پروانش *Catharantus roseus* L. اجرا شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان واقع در عرض شمالی ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه و طول شرقی ۴۷ درجه و ۱ دقیقه و ارتفاع ۱۶۲۰ متر از سطح دریا انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح گاما آمینوبوتریک اسید ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار، سه سطح سالسیلیک اسید ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی‌مولار و سه سطح هیومیک اسید ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. همچنین گیاهان شاهد با آب مقطر تیمار شدند. تعداد تیمارها شامل ۳ تیمار با سه تکرار و تعداد کل واحد آزمایشی ۲۷ واحد و تعداد کل بوته‌ها ۸۱ بوته می‌باشد. به این منظور بذرهای F1 پروانش از شرکت بذر قدیری تهیه شد. عملیات کاشت بذر در اول اسفندماه سال ۱۳۹۵، داخل سینی‌های کشت مخصوص در بستر حاوی پیت ماس و پرلایت به نسبت ۱:۴ (درصد حجمی) کشت شدند. گیاهان در محیط گلخانه با دمای متوسط ۲±۲۴ و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد رشد یافتند. پس از استقرار گیاهچه‌ها، گیاهان دو مرحله، مرحله‌ی اول در چهار برگی و مرحله‌ی دوم قبل از گلدهی (روز ۳۵ از کاشت بذر) اعمال گردید. گاما آمینوبوتریک اسید که به‌دلیل ساختار مولکولی انعطاف‌پذیر و توانایی ترکیب با ساختارهای گوناگون، بسیار محلول در آب است (Wang *et al*., 2014)، هیومیک اسید (پودر شامل ۸۵ درصد هیومیک اسید و ۱۵٪ فولیک اسید) که در شرایط قلیا در آب قابل حل است (Pettit, 2004)، در آزمایشگاه با آب مقطر تهیه شدند. برای حل سالیسیلیک اسید از اتانول به‌عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت. تمامی گیاهان به صورتی که تمامی سطوح فوقانی و زیرین اندام‌های هوایی کاملاً خیس شوند، به‌طور یکنواخت محلول‌پاشی شدند. همچنین گیاهان شاهد به همین روش و تنها با آب مقطر تیمار شدند. شاخص‌ها و ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد مطالعه شامل ارتفاع گیاه توسط خط‌کش، قطر ساقه با استفاده از کولیس دیجیتالی، روز تا گلدهی از تاریخ کشت تا ظهور اولین جوانه گل، شمار گل با شمارش تا زمان اتمام رشد و شمار برگ با شمارش تعداد برگ پس از استقرار کامل گیاهان و در انتهای آزمایش شمارش گردید.

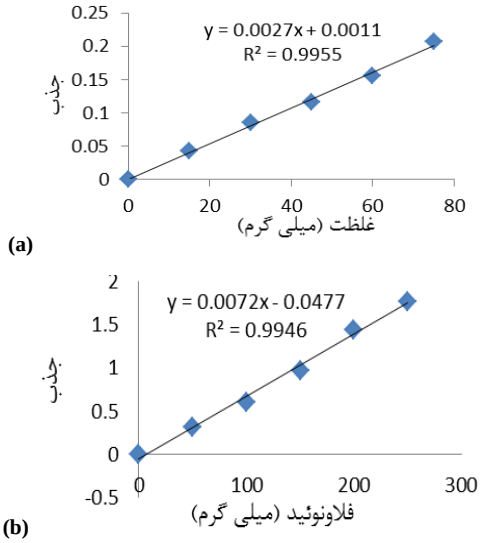
اندازه‌گیری مقدار فنل

برای تهیه عصاره یک گرم از نمونه گیاهی (برگ گیاه) در ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ در هاون، سابیده شد. سپس عصاره‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. قسمت بالایی محلول به‌عنوان عصاره جدا و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه گیری محتوای فنل کل (TPC) به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو[1] (۵۰٪) اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت جذب آن‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد ثبت گردید.

محتوای فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید گزارش شد (Meda *et al*., 2005) و طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$y = 0.002x + 0.001 \qquad r^2 = 0.995$

1. Folin-Ciocalteus



نمودار ۱. منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی (a) و منحنی استاندارد کوئرستین جهت اندازه‌گیری ترکیبات فلاوونوئیدی (b)

Figure 1. Gallic acid standard curve for measuring phenolic compounds (a) and Quercetin standard curve for measuring flavonoid compounds (b)

اندازه‌گیری مقدار فلاوونوئید

برای سنجش میزان فلاوونوئید کل (TFC) به ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین[1] استفاده شد. میزان فلاوونوئید کل از محلول‌های کوئرستین که به‌عنوان استاندارد استفاده شد، به‌دست آمد (Chang *et al.*, 2002).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH، ۷ حاوی ۰/۲ درصد پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) استفاده شد و به ازای ۱ گرم وزن تر بافت برگ ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. نمونه‌ها پس از همگن شدن با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. پس از آن، عصاره رویی جدا و از آن برای سنجش فعالیت آنزیم مورد نظر استفاده شد. استخراج آنزیم به‌وسیله بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH، ۷) انجام شد. بافر TS شامل ۱۹/۲۱۲ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسیتریک، ۳/۶۱۵ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید بوریک، ۱۵/۶۰۱ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر NaH_2Po_4 بود. محلول واکنشی شامل ۳ میلی‌لیتر بافر TS (pH، ۷)، ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۲۵ میکرولیتر گایاکول ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۲۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۳ میلی‌مولار آغاز و مدت ۵ دقیقه دنبال شد. افزایش جذب بر اساس میزان اکسیدشدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت ۳ دقیقه برحسب $units.g^{-1}FW.min^{-1}$ به‌روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر JENWAY مدل UV-6505) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد (Ghamsari *et al.*, 2007).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

استخراج آنزیم در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH، ۷) انجام شد. محلول واکنش حاوی ۳ میلی‌لیتر بافر TS (pH، ۷) و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با افزودن ۳۶ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار به محلول واکنش آغاز گردید. واحد فعالیت این آنزیم بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۶۰ ثانیه بر حسب $units.g^{-1}$ $FW.min^{-1}$ به‌روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر JENWAY مدل UV-6505) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2011). همچنین آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. میانگین صفات مورد مطالعه نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

بر پایه نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول‌های ۱ و ۲)، ارتفاع، قطر ساقه، شمار برگ، شمار گل، روز تا گلدهی، فعالیت آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید (در سطح آماری ۱ درصد) قرار گرفتند (جدول ۱).

1. Quercetin

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های مورفولوژیکی در گیاه پروانش

Table 1. Analysis of variance for effect of different treatments on morphological index in periwinkle plant

S.O.V	df	Mean of Squares				
		Plant height	Stem diameter	Number of leaf	Number of flower	Days to flowering
Treatment	6	6.77**	0.29**	62.51**	10.59**	30.23**
Experimental error	12	0.05	0.06	2.55	0.50	1.19
Coefficient of Variation (%)	-	1.97	2.26	2.78	4.29	2.20

ns، * و **: غیر معنی‌دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. ns, *,**: Non significant, Significant at 5 and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های فیتوشیمیایی در گیاه پروانش

Table 2. Analysis of variance for effect of different treatments on phytochemical index in periwinkle plant

S.O.V	df	Mean of Squares			
		Phenol	Flavonoids activity	Peroxidase activity	Catalase
Treatment	6	105.3**	0.003**	0.0000 **	62.51 **
Experimental error	12	7.77	0.001	0.00	2.55
Coefficient of Variation (%)	-	7.31	4.63	5.85	2.78

ns، * و **: غیر معنی‌دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. ns, *,**: Non significant, Significant at 5 and 1% of probability levels, respectively.

ارتفاع گیاه و قطر ساقه

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت گاما آمینوبوتریک اسید تا یک میلی‌مولار از ارتفاع گیاه کاسته و با افزایش غلظت هیومیک اسید تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بر میزان این شاخص افزوده شد. همچنین در تیمار سالیسیلیک اسید با افزایش غلظت به یک میلی‌مولار ارتفاع گیاه افزایش و در غلظت دو میلی‌مولار از این میزان کاسته شد. در مجموع بالاترین میزان ارتفاع به ترتیب، با کاربرد یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۱۳/۹۶ سانتی‌متر)، ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید (۱۳/۸۳ سانتی‌متر)، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید (۱۲/۱ سانتی‌متر) و پایین‌ترین میزان این شاخص در تیمار شاهد (۸/۸۳ سانتی متر) به‌دست آمد (جدول ۳). همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید با بیشترین تأثیر روی قطر ساقه در هر تیمار به‌ترتیب به میزان (۳/۶۸، ۳/۷۹ و ۴/۰۷ میلی‌متر) در مقایسه با شاهد (۲/۹۱ میلی‌متر) اثر مثبت و قابل توجهی را در سطح یک درصد به همراه داشتند (جدول ۳). گزارش‌های زیادی در مورد توانایی مواد هیومیکی بر افزایش رشد ساقه در ارقام مختلف گونه‌های گیاهی تحت شرایط گوناگون ارائه شده است که اثر تسریع‌کنندگی مواد هیومیکی روی رشد ساقه در درجه اول به دلیل تأثیر بر فعالیت H^+-ATPase ریشه و توزیع نیترات ریشه در ساقه بوده که به‌نوبه خود منجر به تغییرات در توزیع مشخص سایتوکینین‌ها، پلی‌آمین‌ها و ATP می‌شود، بنابراین در رشد ساقه تأثیر می‌گذارد (Rubio *et al*., 2009). در گزارشی کاربرد هیومیک اسید خالص باعث افزایش معنی‌داری در رشد شاخه خیار شد که با افزایش فعالیت در H^+-ATPase ریشه همراه بوده است، همچنین افزایش در غلظت نیترات ساقه و کاهش آن در ریشه رخ داده است (Veronica *et al*., 2010). وجود ترکیبات شبه‌هورمونی از جمله ترکیبات اکسینی (Atiyeh *et al*., 2002) و ترکیبات شبه جیبرلینی (Nardi *et al*., 2002) در هیومیک اسید می‌توانند رشد سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. احتمالاً هیومیک اسید با تأثیر بر غشا سلول و رشد آن بر افزایش ارتفاع بوته با گذشت زمان مؤثر بوده است. در مطالعه‌ای کاربرد هیومیک اسید در غلظت‌های مختلف موجب افزایش قطر ساقه و طول ساقه گیاه گوجه‌فرنگی شد (Türkmen *et al*., 2004). افزایش رشد به کاهش آسیب غشایی، بهبود توانایی کاهش سلولی، محتوای کلروفیل و بهره‌وری فیتوشیمیایی شاخه مربوط می‌شود. مقادیر بسیار کم هیومیک اسید اثر قابل ملاحظه‌ای بر بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی خاک داشته و به دلیل وجود ترکیبات هورمونی اثرات مفیدی بر شاخص‌های رویشی و زایشی محصولات کشاورزی دارد (Aiyafar *et al*., 2015). بنابراین می‌توان گفت هیومیک اسید با افزایش جذب آب و مواد غذایی موجب بهبود رشد و توسعه قطر ساقه گیاه پروانش شده است. تحقیقات نشان داد که محلول‌پاشی تیمارگاما آمینو بوتریک اسید

(GABA)، رشد گیاهان را با افزایش مقاومت به تنش‌ها با تنظیم فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم اولیه نیتروژن و جذب نیترات افزایش می‌دهد (Barbosa *et al.*, 2010). در گزارشی تأثیر گاما آمینو بوتریک اسید در خیار چمبر با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر طول تاک اصلی و قطر ساقه را افزایش داد (Ashrafuzzaman *et al.*, 2010). احتمال داده می‌شود سالیسیلیک اسید بتواند سبب بهبود جذب عناصر غذایی شود که این خود می‌تواند افزایش رشد را به همراه داشته باشد که افزایش ارتفاع گیاهچه یکی از این موارد می‌باشد (Abreu *et al.*, 2008; Gunes *et al.*, 2007). از طرفی به‌نظر می‌رسد سالیسیلیک اسید از طریق افزایش تقسیم سلولی در ناحیه مریستم انتهایی و بهبود شرایط فتوسنتزی سبب افزایش رشد می‌شود (Seyed Hajizadeh & Ailoo, 2013). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی رشد، ارتفاع گیاهان ریحان و مرزن‌جوش را افزایش داد (Gharib, 2006). گزارش کردند که محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید سبب افزایش طول ساقه رز شد (Alaey *et al.*, 2011). در گزارشی دیگر غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید باعث افزایش طول ساقه گل‌دهنده لیلیوم شده است (Seyed Hajizadeh & Aliloo, 2013). همچنین قطر ساقه، ارتفاع و تعداد برگ با کاربرد سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (Mardani *et al.*, 2011). ارتفاع در گیاهان تیمارشده با محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) افزایش پیدا کرد (Ria *et al.*, 2018). بنابراین افزایش پیکره رویشی و ارتفاع گیاه پروانش به‌عنوان یک صفت ارزشمند دارویی در جهت تولید هر چه بیشتر این متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود (Omidbeigi, 2010).

شمار برگ، شمار گل و روز تا گلدهی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین شمار برگ در سطوح ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید (۶۰/۳۳)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید (۶۲/۶۶) و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۶۳/۶۶) مشاهده شد (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید شمار گل را نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین تأثیر این شاخص در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در تیمار گاما آمینوبوتریک اسید بیشترین شمار گل در گیاه در سطح ۰/۷۵ میلی‌مولار مشاهده شد. با افزایش غلظت گاما آمینوبوتریک اسید به ۱ میلی‌مولار مقدار این شاخص نسبت به ۰/۷۵ میلی‌مولار کاهش یافت. در تیمار هیومیک اسید حداکثر شمار گل در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد و با افزایش مقدار غلظت هیومیک اسید شمار گل کاهش یافت. افزایش شمار گل در تیمار سالیسیلیک اسید و گاما آمینوبوتریک اسید نسبت به هیومیک اسید چشم‌گیر بود (جدول ۳). تیمار ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید کوتاه‌ترین و تیمار شاهد طولانی‌ترین روز تا گلدهی را نشان دادند (جدول ۳). طبق گزارش‌ها هیومیک اسید با افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، ظرفیت نگهداری آب در خاک و همچنین ایفای نقش روی نفوذپذیری غشا به‌عنوان ناقل پروتئین، فعال‌کردن تنفس، چرخه کربس، فتوسنتز و تولید آمینو اسید و آدنوزین تری فسفات باعث افزایش رشد گیاهان می‌شود (Muscolo *et al.*, 2013). گزارش شده است که هیومیک اسید منجر به بهبود شرایط رشد گندم از جمله تعداد برگ، ارتفاع بوته و محتوای کلروفیل شد (Sabzevari *et al.*, 2009). از طرف دیگر در یک بررسی قطر ساقه، تعداد برگ، وزن تر و خشک ساقه و ریشه با کاربرد هیومیک اسید در گیاهچه فلفل و بادمجان افزایش یافت (Padem *et al.*, 1999). همچنین تعداد برگ، ارتفاع گیاه و وزن خشک قسمت هوایی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در گیاهان رشد کرده در گلدان‌های حاوی هیومیک اسید افزایش یافت (Arancon *et al.*, 2003). در گزارشی دیگر غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید منجر به افزایش عملکرد گل شاخه بریده ژربرا گردید (Nikbakht *et al.*, 2008). همچنین تعداد گل به‌طور قابل‌توجهی در گل همیشه بهار تحت تأثیر هیومیک اسید افزایش یافت (Allahverdizadeh & Nazarideljou, 2013)، که با نتایج این تحقیق مطابقت و همخوانی دارد. اثر بهبودی گاما آمینوبوتریک اسید القاشده در تعدادی از گونه‌های گیاهی شناسایی شده است که ممکن است به‌دلیل بهبود فعالیت‌های فتوسنتزی، محتوای نسبی آب، تجمع

اسمولیت، آماس برگ و دیگر مکانیسم‌های فیزیو-متابولیکی مرتبط باشد (Deewatthanawong *et al*., 2010; Shang *et al*., 2011). مطابق با نتایج این مطالعه، کاربرد خارجی گاما آمینوبوتریک اسید به‌طور معنی‌داری رشد مورفولوژیکی نهال ذرت (Li *et al*., 2016) و گوجه‌فرنگی (Yin *et al*., 2010) را بهبود بخشید. در آزمایش‌های دیگر، کاربرد گاما آمینوبوتریک اسید در ۲۵۰ و ۵ میکرومولار، به ترتیب رشد *Stellarialongipes* و *Lemna* را تحت شرایط رشد طبیعی افزایش داد (Kinnersley & Lin, 2000; Kathiresan *et al*., 1997). در خیار چمبر با کاربرد گاما آمینوبوتریک اسید در غلظت ۱.۵ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین تعداد گل نر و ماده مشاهده شد (Ashrafuzzaman *et al*., 2010). همچنین استفاده از گاما آمینوبوتریک اسید بر روی گیاه بادام زمینی تعداد گل و عملکرد را افزایش داد (Samsuzzaman, 2004). از جمله فرآیندهای فیزیولوژیکی که سالیسیلیک اسید در آنها دخیل است می‌توان به تحریک گلدهی اشاره کرد (Hayat *et al*., 2010; Pacheco *et al*., 2013). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش سنتز پروتئین و ظهور باندهای ایزوزایم جدید باعث القا و افزایش شمار جوانه‌ی گل و همچنین افزایش قطر گل می‌شود (Martin-Mex *et al*., 2005) که این اثرات در بنفشه آفریقایی (Jabbarzede *et al*., 2009)، گل تکمه‌ای (Kamali *et al*., 2013) و گل‌های شاخه بریده رز (Alaey *et al*., 2011) مشاهده شده است، که با این نتایج مطابقت داشت.

محتوای فنل کل و فلاوونوئیدها

کاربرد گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید، افزایش میزان ترکیبات فنلی در گیاه پروانش نسبت به شاهد را به دنبال داشت. بیشترین مقدار این شاخص تحت تیمار ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. بین سطوح مختلف هیومیک اسید غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در افزایش میزان ترکیبات فنلی مفید واقع شد. همچنین در تیمار گاما آمینوبوتریک اسید غلظت یک میلی‌مولار بهترین تأثیر را بر ترکیبات فنلی داشت. همچنین غلظت ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را روی فلاوونوئید داشت (شکل ۱). گزارش شده است که هیومیک اسیدها و مشتقات آن‌ها تراوایی غشای گیاهان را افزایش داده، بنابراین جذب مواد غذایی را تقویت می‌کند. اسیدهای هیومیکی که در مراحل اولیه نمو وارد گیاه شده یک منبع مکمل از پلی فنل بوده که به‌عنوان کاتالیزور تنفسی عمل می‌کند (Senn, 1973). هیومیک اسید در محلول غذایی از طریق افزایش ظرفیت فتوسنتزی، بهبود جذب عناصر غذایی، افزایش کارایی و راندمان عناصر غذایی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل در گیاه همیشه بهار گردید (Allahverdizadeh & Nazarideljou, 2013). گاما آمینوبوتریک اسید از طریق افزایش نسبت اسیدهای چرب اشباع‌نشده به اسیدهای چرب اشباع‌شده موجب کاهش فعالیت آنزیم فسفولیپاز و لیپوکسیژناز، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش ثبات و استحکام غشا و افزایش ترکیبات فنلی می‌شود (Soleimani Aghdam *et al*., 2015). در مطالعه‌ای از طریق افزایش فعالیت گابا شانت تجمع بیشتر فنل‌ها موجب افزایش کیفیت و ارزش غذایی میوه توت‌فرنگی، شد (Aghdam & Rezapour Fard, 2017).

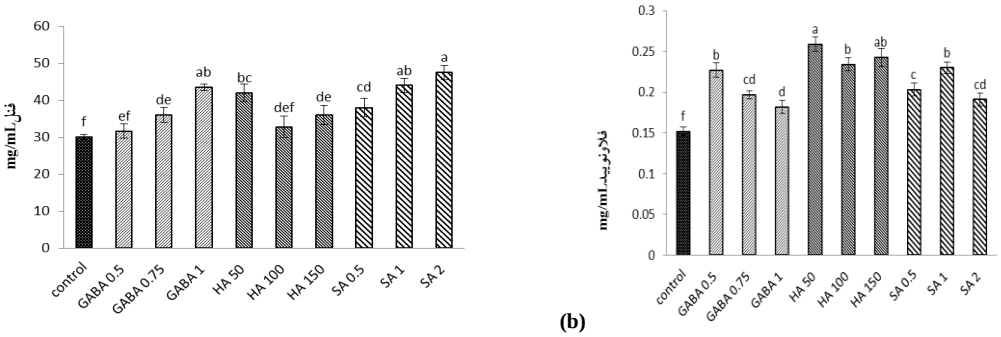
جدول ۳. مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای مختلف بر ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده

Table 3. Mean comparison of the different treatments on the measured traits

Treatments	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Number of leaf	Number of flower	Days to flowering (day)
Control	8.83f	2.91f	49f	13.33g	57.66a
$GABA_1$	13.83a	3.68cd	60.33bc	17.33cd	47de
$GABA_2$	12.83b	3.54d	55.66d	18.66ab	48.66bcd
$GABA_3$	11.76de	3.4e	52.33e	16.33de	49.66bc
HA_1	11.23f	3.56d	57d	14.33fg	50bc
HA_2	11.43ef	3.68cd	62.66ab	16.66d	49bcd
HA_3	12.1cd	3.79bc	60bc	15.33ef	48cd
SA_1	12.36c	3.88b	55de	19.33a	46e
SA_2	13.96a	4.07a	57.66cd	18bc	48.33bcd
SA_3	13.23b	3.76bc	63.66a	16.33de	50.33b

در هر صفت و گروه مقایسه‌شده، تیمارهای با حرف‌های یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

Values followed by the same letter within a column indicating not significantly different.



شکل ۱. اثر سطوح مختلف گاما آمینوبوتریک اسید (۰/۵، ۰/۷۵و ۱ میلی‌مولار)، هیومیک اسید (۵۰، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سالیسیلیک اسید (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بر فنل (a) و فلاوونوئید (b) در گیاه پروانش

Figure 1. Effect of different levels of ϒ-aminobutyric acid (0.5, 0.75 and 1 mM), humic acid (50, 100 and 150 mg.L^{-1}) and salicylic acid (0.5, 1 and 2 mM) on phenol (a) and Flavonoid (b) in periwinkle plant

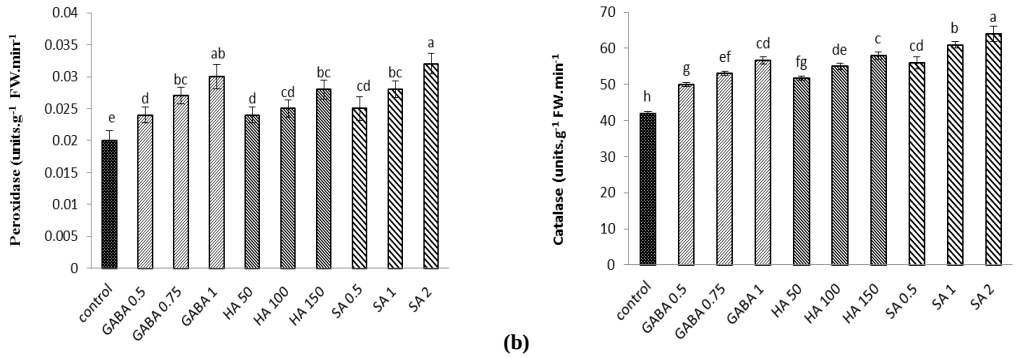
کاربرد خارجی گاما آمینو بوتریک اسید رشد مورفولوژیکی، عملکرد دستگاه فتوسنتز، ظرفیت تبادل گازی، بیوسنتز کلروفیل، فعالیت آنزیمی و پاسخ‌های غیرآنتی‌اکسیدانی و پایداری غشا در گوجه‌فرنگی را تحریک می‌کند (Luo *et al*., 2011). گل‌های تیمار شده با گاما آمینوبوتریک اسید در غلظت ۵ میلی‌مولار به علت افزایش در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و کاهش در فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO) منجر به تجمع فنل کل شد (Aghdam *et al*., 2015). بنابراین با کاهش پراکسید شدن لیپید و کاهش تجمع ROS، منجر به افزایش پایداری غشا و مقاومت گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌شود. در پژوهش حاضر، ترکیبات فنلی مانند فنل کل و فلاونوئید با افزایش غلظت تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نشان دادند، افزایش در این ترکیبات می‌تواند به‌دلیل تولید ROS توسط سالیسیلیک اسید با توجه به نقش آن در پیام‌رسانی در گیاه باشد. مطالعات قبلی نیز افزایش فنل را در تیمار سالیسلیک اسید گزارش کرده‌اند (Guleria *et al*., 2005). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از سازوکارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئید استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی دارند و جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Ali *et al*., 2006). افزایش این ترکیبات در تیمار با سالیسیلیک اسید در بررسی‌های سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Pérez-Balibrea *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2013). افزایش ترکیبات فنلی با القای فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز که آنزیم‌های کلیدی در تولید این ترکیبات هستند با تیمار سالیسیلیک اسید رخ می‌دهد (Maleki *et al*., 2018). سنتز ترکیبات فنلی با دآمیناسیون فنیل آلانین و تیروزین در مسیر فنیل پروپانوئید انجام می‌شود و ترانس سینامیک اسید از فنیل آلانین و کوماریک اسید از تیروزین تولید می‌شود (Dixon & Paiva, 1995). در گزارش‌های دیگر، همبستگی مثبت بین فعالیت این آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی اثبات شده است (Koushesh Saba *et al*., 2012). ارتباط بین فعالیت این آنزیم‌ها، سالیسیلیک اسید و فنل بیان‌کننده نقش تنظیمی سالیسیلیک اسید در سنتز فنل‌هاست (Chen *et al*., 2006). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در تشکیل فلاوونوئیدها اثر مستقیم دارد (Cheng *et al*., 2009). تحقیقات دیگر بیان داشت که سالیسیلیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL و تولید بیشتر ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی در سیاه‌دانه شد (Kabiri *et al*., 2014). همچنین گیاه بابونه آلمانی (Zarinkamar *et al*., 2013) و گل همیشه بهار (Pacheco *et al*., 2013) در پاسخ به تیمار سالیسلیک اسید، محتوای فلاوونوئیدی خود را افزایش دادند. بنابراین سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک جزء پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود و در جایگاه ترکیب القاکننده تنش، مسیر سیگنالیک را فعال نموده و سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) شده که منجر به پاسخ‌های دفاعی گیاه و بیوسنتز و تجمع

ترکیبات فنلیک می‌گردد. در نتیجه استفاده از ترکیبات الیسیتوری به‌عنوان راهکاری مؤثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی مانند ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدها و سایر ترکیبات شناخته شده است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز

مطالعه نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بود، به‌طوری‌که بررسی داده‌ها نشان داد تیمار دو میلی‌مولار سالیسلیک اسید این فعالیت را به‌طور محسوسی افزایش داد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر تیمارهای گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید افزایش پیدا کرد که البته بیشترین غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. حداکثر مقدار این شاخص تحت تیمار یک میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیترهیومیک اسید و دو میلی‌مولار سالیسلیک اسید مشاهده شد. با افزایش سطوح هر سه تیمار بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزوده شد (شکل ۲). همچنین با افزایش غلظت‌های به‌کاررفته در تمام تیمارها فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. تیمار دو میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و یک میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید بیشترین میزان این فعالیت را داشتند. تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر هیومیک اسید نیز مقدار این شاخص را افزایش داد. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۲).

در گیاهان عالی سیستم جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن از چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی تشکیل شده است که شامل گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز می‌باشد که می‌توانند رادیکال‌های اکسیژن فعال (ROS) که در شرایط تنش تولید می‌شوند را از بین ببرند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از غشاها در مقابل اثر مخرب ROSها که در برابر تنش غیر زنده تولید می‌شود محافظت می‌کنند و موجب مقاومت و پایداری گیاهان می‌شوند (Tan *et al*., 2006). آنزیم کاتالاز و پراکسیداز، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را که برای سلول‌ها سمی است به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند (Arora *et al*., 2002; Liu *et al*., 2007). هیومیک اسید سبب افزایش جذب عناصر شده، در نتیجه باروری و تولید گیاهان را افزایش داده (Thaipong *et al*., 2006) و موجب افزایش سبزینه (کلروفیل)های برگ (Bahrami *et al*., 2015) و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز (Raad *et al*., 2014) می‌شود. در گیاه بامیه افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز با ۳۰۰ میلی‌لیتر در هکتار هیومیک اسید مشاهده شد (Barzegar *et al*., 2018). تولید گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی در طی تنش باعث پراکسیداسیون لیپیدها، دناتوره شدن پروتئین‌ها و اکسیداسیون DNA می‌شود و گیاه برای مقابله با این تغییرات، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را برای خنثی‌سازی فعالیت این رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد (Dat *et al*., 2000).



شکل ۲. اثر سطوح مختلف گاما آمینوبوتریک اسید (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار)، هیومیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سالیسیلیک اسید (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (a) و کاتالاز (b) در گیاه پروانش

Figure 2. Effect of different levels of ϒ-aminobutyric acid (0.5, 0.75 and 1 mM), humic acid (50, 100, 150 mg.L^{-1}) and salicylic acid (0.5, 1 and 2 mM) on peroxidase (a) and catalase (b) activity in periwinkle plant

افزایش فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی و کاهش میزان انواع اکسیژن فعال در سلول گیاهی موجب حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شوند (Castilla & Lopez-Galvez, 1994). آنزیم پراکسیداز در اکسیداسیون پیش ماده‌های ترکیبات فنلی، ساخت لیگنین و همپنین در مقابله و حذف رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Rice-Evans *et al*., 1996; Kováčik *et al*., 2008; Ali *et al*., 2006). تنظیم بیان ژن مرتبط با تولید H_2O_2 و اتیلن در ریشه *Caragana intermedia* به کاربرد خارجی گاما آمینوبوتریک اسید مربوط می‌شود (Shi *et al*., 2010). گاما آمینوبوتریک اسید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در گل‌های شاخه بریده آنتوریوم در شرایط انبار سرد افزایش داد (Aghdam *et al*., 2016). همچنین مطابق با نتایج این پژوهش، تیمار ۲۰ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید در میوه‌های موز انبارشده در سردخانه، فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد (Wang *et al*., 2014). تیمار گاما آمینوبوتریک اسید در میوه هلو موجب افزایش محتوای فنل کل، فلاونوئیدها، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز و در نتیجه افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی شد (Aghdam *et al*., 2016). سالیسیلیک اسید به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله پراکسیداز را فعال می‌کند که می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای دهنده الکترون برای پراکسیداز عمل نماید (Hayat & Ahmad, 2007). تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه سیاه‌دانه، سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم گایاکول پراکسیداز و به‌دنبال آن کاهش پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید شد (Kabiri *et al*., 2012). گزارش شده که کاربرد یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، اثر مؤثری بر افزایش فعالیت کاتالاز داشت (Agarwal *et al*., 2005). در پژوهش حاضر میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. پژوهش‌های قبلی تجمع ترکیبات فنلی توسط سالیسیلیک اسید و افزایش میزان فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز را اثبات کرده‌اند و ارتباط مستقیم بین آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی را نشان داده‌اند (Shi & Zhu, 2008; Mutlu *et al*., 2009). سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گل بریده گلایول می‌شود (Saeed *et al*., 2016). طبق نتایج Hatamzadeh *et al*. (2012) و Hassan *et al*. (2014) تیمار سالیسیلیک اسید موجب کاهش فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال‌شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد. در نتیجه موجب پایداری غشا و حفاظت گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌شود که با نتایج فوق مطابقت دارد. بنابراین سالیسلیک اسید با افزایش توان دفاع پاد اکسایندگی و کاهش تنش اکسایش موجب بهبود رشد گیاه پروانش شد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه سطوح ۰/۵ میلی‌مولار گاما آمینوبوتریک اسید، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک اسید و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید را می‌توان جهت بهبود صفات موفوفیزیولوژیکی گیاه پروانش توصیه کرد. به‌نظر می‌رسد استفاده از گاما آمینوبوتریک اسید به‌دلیل خاصیت فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال و برای کاهش آسیب اکسیداتیو و تنظیم اسمزی منجر به بهبود صفات کمی و کیفی گیاه پروانش شد و بر مقاومت گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی افزود. هیومیک اسید از طریق افزایش ظرفیت فتوسنتزی، بهبود جذب عناصر غذایی، افزایش کارایی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل، ضمن افزایش عملکرد، منجر به بهبود صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاه شد. همچنین سالیسیلیک اسید با غلظت ۲ میلی‌مولار بیشترین کارایی را در بهبود صفات به همراه داشت. بنابراین با توجه به اثر مثبت الیسیتورهای گاما آمینوبوتریک اسید، هیومیک اسید و سالیسیلیک اسید بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه پروانش، می‌توان استفاده از این مواد را جهت بهبود خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی این گیاه پیشنهاد کرد.

REFERENCES

1. Alaey, M., Babalar, M., Naderi, R. & Kafi, M. (2011). Effect of pre-and postharvest salicylic acid treatment on physio-chemical attributes in relation to vase-life of rose cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 91-94.
2. Aghdam, M. S., Naderi, R., Sarcheshmeh, M. A. A. & Babalar, M. (2015). Amelioration of postharvest chilling injury in anthurium cut flowers by γ-aminobutyric acid (GABA) treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 70-76.
3. Aghdam, M. S., Naderi, R., Jannatizadeh, A., Sarcheshmeh, M. A. A. & Babalar, M. (2016). Enhancement of postharvest chilling tolerance of anthurium cut flowers by γ-aminobutyric acid (GABA) treatments. *Scientia Horticulturae*, 198, 52-60.
4. Aghdam, M. S., Razavi, F. & Karamneghad, F. (2016). Maintaining the postharvest nutritional quality of peach fruits by γ-aminobutyric acid. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5(4).
5. Aghdam, M. S. & Fard, J. R. (2017). Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (Fragaria× anannasa cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chemistry*, 221, 1650-1657.
6. Ali, M. B., Khatun, S., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2006). Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in Phalaenopsis orchid and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. *Plant Growth Regulation*, 49(2-3), 137-146.
7. Abreu, M.E. & Munné-Bosch, S. (2008). Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: a case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 64(2), 105-112.
8. Aiyafar, S., Minab Poudineh, H. & Forouzandeh, M. (2015). Effect of Humic Acid on Qualitative and Quantitative Characteristics and Essential Oil of Black Cumin (Nigella sativa L.) under Water Deficit Stress. *Journal of Science*, 4(2), 2277-5641.
9. Agarwal, S., Sairam, K. R., Srivastava, Aruna, G. C. T. &Meena, C. R. (2005). Role of ABA, Salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzyme induction in wheat seedlings. *Journal Plant Sciences*, 169, Pp. 559-570.
10. Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. & MacCarthy, P. (1985). *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization*. John Wiley & Sons.
11. Alaey, M., Babalar, M., Naderi, R. & Kafi, M. (2011). Effect of pre-and postharvest salicylic acid treatment on physio-chemical attributes in relation to vase-life of rose cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 91-94.
12. Allahverdizadeh, N. & Nazarideljou, M. (2013). Effect of humic acid on morphological indices, nutrient uptake and survival time after flower harvest (*Calendula officinalis* cv. Crysantha) in hydroponic system. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 5(2), 133-143. (in Farsi)
13. Arancon, N. Q., Lee, S., Edwards, C. A. & Atiyeh, R. (2003). Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. *Pedobiologia*, *47*(5-6), 741-744.
14. Arora, A., Sairam R. K. & Srivastave, G. C. (2002).Oxidayive stress and antioxidative system in plants.*Current Science*, 82 (10), 1227-1238.
15. Ashrafuzzaman, M., Razi Ismail, M., Abdullah IbnaFazal, K. M., Uddin, M. K. & Prodhan A. K. M. A. (2010). Effect of GABA Application on the Growth and Yield of Bitter Gourd (*Momordica charantia*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 12(1), 129-132.
16. Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q. & Metzger, J. D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84(1), 7-14.
17. Bahrami, S., Soleimani, A. & Habibi, F. (2015). The effect of humic acid on the mineral composition leaves, yield and fruit quality apple variety 'Granny Smith' (*Malus domestica L. cv.* Granny Smith). *Journal of Crops*, 17(2), 529-517. (in Farsi)
18. Barbosa, J., Singh, N., Cherry, J. & Locy, R. (2010). Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous γ-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 443-450.
19. Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. & Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence–a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1(1), 3-22.
20. Bouché, N., Lacombe, B. & Fromm, H. (2003). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in Cell Biology*, 13(12), 607-610.
21. Bouche, N. & Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in Plant Science*, 9(3), 110-115.

22. Bown, A. W. & Shelp, B. J. (1997). The metabolism and functions of [gamma]-aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1.
23. Bown, A., Hall, D. & MacGregor, K. (2002). Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiology*, 129, 1430-1434.
24. Carvajal, F., Palma, F., Jamilena, M. & Garrido, D. (2015). Preconditioning treatment induces chilling tolerance in zucchini fruit improving different physiological mechanisms against cold injury. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 340-354.
25. Castilla, N. & Lopez-Galvez, J. (1994). Vegetable crop responses in improved low-cost plastic greenhouses. *Journal of Horticultural Science*, 69(5), 915-921.
26. Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analaysis*, 10, 178-182.
27. Chen, Y., De Nobili, M. & Aviad, T. (2004). Stimulatory effect of humic substances on plant growth. *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*, 103-130.
28. Chen, J.Y., Wen, P.F., Kong, W.F., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Wan, S.B. & Huang, W.D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72.
29. Chen, J., Zhu, C., Li, L. P., Sun, Z. Y. & Pan, X. B. (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H2O2-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences*, 19(1), 44-49.
30. Cheng, S. Y., Xu, F. & Wang, Y. (2009). Advances in the study of flavonoids in Ginkgo biloba leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1248-1252.
31. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 779-795.
32. Deewatthanawong, R., Rowell, P. & Watkins, C. (2010). γ-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO_2 treated tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 97-105.
33. Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C. & Smith, D. L. (2001). Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science*, 161(6), 1153-1159.
34. Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085.
35. Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. & Fernie, A. R. (2008). Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science*, 13(1), 14-19.
36. Gharib, F. A. (2006). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *International Journal Agriculture Biology*, 4, 485-492.
37. Galal, A. (2012). Improving effect of salicylic acid on the multipurpose tree *Ziziphusspina-christi* (L.) Willd Tissue Culture. *American Journal of Plant Sciences*, 3(7), 947-952.
38. Ghamsari, L., Keyhani, E. & Golkhoo, S. (2007). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal*, 1, 137-146. (in Farsi)
39. Guleria, S., Sohal, B. S. & Mann, A. P. S. (2005). Salicylic acid treatment and/or Erysiphe polygoni inoculation on phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase content and accumulation of phenolics in pea leaves. *Journal of Vegetable Science*, 11(2), 71-79.
40. Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G. & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 728-736.
41. Hatamzadeh, A., Hatami, M. & Ghasemnezhad, M. (2012). Efficiency of salicylic acid delay petal senescence and extended quality of cut spikes of *Gladiolus grandiflora* cv wings sensation. *African Journal of Agricultural Research*, 7(4), 540-545.
42. Hayat, A. & Ahmad, T. (2007). Salicylic acid a plant hormone, salicylic acid: biosynthesis, metaboilism and physiological role in plant. *Journal Scientia Horticulturae*, 110, 97–98. (In Farsi).
43. Hassan, F. A. S. & Ali, E. F. (2014). Protective effects of 1-methylcyclopropene and salicylic acid on senescence regulation of gladiolus cut spikes. *Scientia Horticulturae*, 179, 146-152.
44. Hayat, Q., Hayat, Sh., Irfan, M. & Ahmad. A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing enveironment. A review. *Enviromental and Experimental Botany*, 68, 14-25. (in Farsi).
45. Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M. & Salehi, H. (2009). The effect of foliar-applied salicylic acid on flowering of African violet. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 4693-4696.
46. Kabiri, R., Farahbakhsh, H. & Nasibi, F. (2012). Salicylic acid ameliorates the effectsof oxidative stress induced by water deficit inhydroponic culture of *Nigella sativa*. *Journalof Stress Physiology and Biochemistry*, 12(11), 1420-1425. (in Farsi)

47. Kalidass, C., Ramasamy Mohan, V. & Daniel, A. (2010). Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(2).
48. Kamali, M., Kharazi, S. M., Selahvarzi, Y. & Tehranifar, M. (2013). Effect Salicylic asid on growth and some morpho-physiological traits of *Gompherna globosa* L. under salt stress. *Journal of Horticulture Science (Agricultural Sciences and Technology)*, 26(1), 104-112. (in Farsi)
49. Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C.C. & Reid, D.M. (1997). ϒ-aminobutyric acid Stimulates Ethylene Biosynthesis in Sunflower. *Plant physiology*, 115(1), 129-135.
50. Khaligi, A. (2008). *Iranian Ornamental Plants.* Roozbahan publication. Tehran. 140. (in Farsi)
51. Kinnersley, A.M. & Turano, F.J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509.
52. Koushesh Saba, M., Arzani, K. & Barzegar, M. (2012). Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8947-8953.
53. Kováčik, J., Bačkor, M. & Kadukova, J. (2008). Physiological responses of Matricaria chamomilla to cadmium and copper excess. *Environmental Toxicology*, 23(1), 123-130.
54. Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Strnad, M. & Repčák, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in Matricaria chamomilla plants. *Plant Cell Reports*, 28(1), 135.
55. Kumar, D., Mishra, D. S., Chakraborty, B. & Kumar, P. (2013). Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 797-802.
56. Kurepin, L. V., Ivanov, A. G., Zaman, M., Pharis, R. P., Allakhverdiev, S. I., Hurry, V. & Hüner, N. P. (2015). Stress-related hormones and glycinebetaine interplay in protection of photosynthesis under abiotic stress conditions. *Photosynthesis Research*, 126(2-3), 221-235.
57. Li, W., Liu, J., Ashraf, U., Li, G., Li, Y., Lu, W., Gao, L., Han, F. & Hu, J. (2016) Exogenous γ-aminobutyric Acid (GABA) Application Improved Early Growth, Net Photosynthesis, and Associated Physio-Biochemical Events in Maize. Front. *Plant Science*, 7,919.
58. Liu, J., Tong, L. P., Shen, T. W., Li, J., Wu, L. & Yu, Z. L. (2007). Impact of ion implantation on licorice (*Glycyrrhize uralensis* Fisch) growth and antioxidant activity under drought stress. *Plasma Science and Technology*, 9 (3), 301-306.
59. Luo, H. Y., Gao, H. B., Xia, Q. P., Gong, B. B. & Xiao-Lei ,W. U. (2011). Effects of exogenous GABA on reactive oxygen species metabolism and chlorophyll fluorescence parameters in tomato under NaCl stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 34, 37-544.
60. Maleki, M. S. & Ehsanpour, A. 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.
61. Mardani, H., Bayat, H. & Azizi, M. (2011). Effects of salicylic acid application on morphological and physiological characteristics of cucumber Seedling (*Cucumis sativus* cv. super dominus) under drought stress. *Journal of Horticulture Science (Agricultural Sciences and Technology)*, 25(3), 320-326. (in Farsi with English abstract)
62. Martin-Mex, R., Villanueva-Couoh, E., Herrera-Campos, T. & Larque-Saavedra, A. (2005). Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 499-502.
63. Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. & Hirel, B. (2002). Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment*, 25(11), 1451-1462.
64. Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.
65. Mirzaei Mashhoud, M., Aelaei, M. & Mortazavi, S. N. (2015). γ-Aminobutyric acid (GABA) treatment improved postharvest indices and vase-life of'Red Naomi'rose cut flowers. In: *III International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals*, (May, 2015). 1131 (pp. 33-40).
66. Miyashita, Y. & Good, A. G. (2008). Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 49(1), 92-102.
67. Barzegar, T., Moradi, P., Hasanzadeh, Z., Ghahremani., Z. & Nikbakht., J. (2018). Evaluation of Growth, Yield and Vitamin C Content of Okra with Application of Putrescine and Humic Acid Under Deficit Irrigation Stress. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 28(1), (in Farsi)
68. Muscolo, A., Sidari, M. & Nardi, S. (2013). Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 57-63.

69. Mutlu, S., Atici, Ö. & Nalbantoglu, B. (2009). Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53(2), 334-338.
70. Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F. & Rascio, N. (2000). Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(1), 112-117.
71. Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.
72. Nikbakht, A., Kafi, M., Babalar, M., Xia, Y. P., Luo, A. & Etemadi, N. A. (2008). Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake, and postharvest life of gerbera. *Journal of Plant Nutrition*, 31(12), 2155-2167.
73. Omidbeigi, R. (2010). *Production and processing of medicinal plants*. Ed2. Astane Ghodse Razavi, Mashad, 347. (in Farsi)
74. Pacheco, A.C., Cabral, C., Fermino, E.S. & Aleman, C.C. (2013). Salicylic acid induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Global Journal of Medicinal Plant Reserch*, 1(1), 95-100.
75. Padem, H., Ocal A. & Alan, R. (1999). Effect of humic acid added foliar fertilizer on quality and nutrient content of eggplant and pepper seedlings. *ISHS Acta Horticultural*, 491, 241-246.
76. Palma, F., Carvajal, F., Ramos, J. M., Jamilena, M. & Garrido, D. (2015). Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 131-140.
77. Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A. & García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, 129(1), 35-44.
78. Pettit, R. E. (2004). Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: Their importance in soil fertility and plant health. *CTI Research*, 1-17.
79. Pietrosiuk, A., Furmanowa, M. & Łata, B. (2007). Catharanthus roseus: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6(2-3), 459-473.
80. Popova, L., Pancheva, T. & Uzunova, A. (1997). Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23(1-2), 85-93.
81. Raad, M. T., Balaket, A. & Mohson Salman, A. (2014). Effect of humic acid and water quality on peroxidase and catalase enzymes activity in leaves of data palms c.v barhee. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*, 3(4), 402-405.
82. Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 439-463.
83. Rajeshwari, V. & Bhuvaneshwari, V. (2017). Enhancing Salinity Tolerance in Brinjal Plants by Application of Salicylic Acid. *Journal of Plant Sciences*, 12(1), 46-51.
84. Rai, K. K., Rai, N. & Rai, S. P. (2018). Salicylic acid and nitric oxide alleviate high temperature induced oxidative damage in Lablab purpureus L plants by regulating bio-physical processes and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 72-88.
85. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
86. Rothan, C., Duret, S., Chevalier, C. & Raymond, P. (1997). Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruits subjected to a high CO_2 concentration. *Plant physiology*, 114(1), 255-263.
87. Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M. L., Cardona-Lopez, X., Rojas-Triana, M. & Paz-Ares, J. (2009). Plant hormones and nutrient signaling.*Plant Molecular Biolojy*, 69(4), 361-73.
88. Sabzevari, S. & Khazaei, H. R. (2009). Effect of foliar application of humic acid on growth and yiel properties of *Triticumaestivum* L. Cv. Pishtaz. *Agroecology Journal*, 1(2), 53-63.
89. Saeed, T., Hassan, I., Abbasi, N. A. & Jilani, G. (2016). Antioxidative activities and qualitative changes in gladiolus cut flowers in response to salicylic acid application. *Scientia Horticulturae*, 210, 236-241.
90. Samavat, S. & Malakuti, M. J. (2004). The need to use organic acids (humic and fluvianum) in the quantitative and qualitative increase of agricultural product. *Technical Journal of Soil and Water Research Institute*, 1-13, 345. (in Farsi)
91. Samsuzzaman, M. (2004). *Effect of NAA and GABA on growth and yield contributing characters of groundnut (Doctoral dissertation).* M.Sc. thesis, Dept. Crop Bot., Bangladesh Agriculture. University of Mymensingh, Bangladesh).
92. Senn, T.L. & Kingman, A.R. (1973). A review of humus and humic acids. *Research Series Report*, (145).
93. Seo, S., Ishizuka, K. & Ohashi, Y. (1995). Induction of salicylic acid β-glucosidase in tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant and Cell Physiology*, 36(3), 447-453.
94. Seyed Hajizadeh, H. & Aliloo, A. A. (2013). The effectiveness of per-harvest salicylic acid application on physiological traits in Lilium (*Lilium longiflorum* L.) cut flower. *International Journal Science Environment*, 1(12), 344-350. (in Farsi)

95. Shan, T., Jin, P., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, X. & Zheng, Y. (2016). Exogenous glycine betaine treatment enhances chilling tolerance of peach fruit during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 104-110.
96. Shang, L., Dong, S. & Nienhaus, G.U. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications. *Nano Today*, 6(4), 401-418.
97. Shi, S.Q., Shi, Z., Jiang, Z.P., Qi, L.W., Sun, X.M., Li, C.X., Liu, J.F., Xiao, W.F. & Zhang, S.G. (2010). Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H2O2 and ethylene production. *Plant, Cell and Environment*, 33(2), 149-162.
98. Shi, Q. & Zhu, Z. (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 317-326.
99. Tan, Y., Liang, Z., Shao, H. & Du, F. (2006). Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix Astragali at seeding stage. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 60-65.
100. Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A. & Samadi, A. (2011). Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 751-763.
101. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Zevallosc, L. C. & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
102. Türkmen, Ö., Dursun, A., Turan, M. & Erdinç, Ç. (2004). Calcium and humic acid affect seed germination, growth, and nutrient content of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings under saline soil conditionspp. *Acta Agriculture Scandinavica*, 7, 168-174.
103. Veronica, M., Eva, B., Angel-Maria, Z., Elena, A., Maria, G., Marta, F. & Jose´-Maria, G. M. (2010). Action of humic acid onpromotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distributionof cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167, 633-642.
104. Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, S. & Du, R. (2014). Effect of exogenous γ-aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. *Scientia Horticulturae*, 168, 132-137.
105. Wendell, K. L., Wilson, L. & Jordan, M. A. (1993). Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *Journal of Cell Science*, 104(2), 261-274.
106. Yin, Y. G., Tominaga, T., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., ... & Matsukura, C. (2010). Metabolic alterations in organic acids and γ-aminobutyric acid in developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Plant and Cell Physiology*, 51(8), 1300-1314.
107. Zaky, M. H., El-Zeiny, O. A. H. & Ahmed, M. E. (2006). Effects of humic acids on growth and productivity of bean plants grown under plastic low tunnels and open field. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 21(4), 582-596.
108. Zarinkamar, F., Zaviehjak, A. A., Sharifi, M. & Behmanesh, M. (2013). Effect of salicylic acid on flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Plant Biology*, 5(17), 67-74. (in Farsi)
109. Zhang, X., Ervin, E. H. & Schmidt, R. E. (2003). Physiological effects of liquid applications of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(4), 492-496.