Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 39, No. 3, Page 367-386 (2023)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.360963.3269
DOR: 20.1001.1.17350905.1402.39.3.4.3

Effects of salicylic acid on physiological and phytochemical parameters of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) under water shortage stress

Behvar Asghari[1*], Sudabeh Mafakheri[2] and Mohammad Mehdi Zarabi[2]

1*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran, E-mail: asghari@eng.ikiu.ac.ir
2- Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Received: December 2022 Revised: May 2023 Accepted: July 2023

Abstract

Background and Objectives: *Hibiscus sabdariffa* L., commonly known as Roselle, is a plant cultivated in many regions of the world regions. Roselle has been used as a medicinal herb in traditional medicine for controlling and treating different diseases and physical ailments. These therapeutic effects are attributed to active compounds such as carotenoids, fatty acids, and phenolic compounds, including phenolic acids and flavonoids. One common method to stimulate plants for increased production of active compounds is subjecting them to various types of stresses, such as drought or salinity, along with plant growth regulators. This study investigated salicylic acid's effect on the phytochemical content and various biological properties of Roselle plants under water scarcity conditions.

Methodology: The experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design, including irrigation intervals at three levels: three days (D1), five days (D2), and seven days (D3), and foliar application of salicylic acid at three levels: 0 (SA0), 0.75 mM (SA1), and 1.25 mM (SA2), with three replicates in a research greenhouse at the International Imam Khomeini University. The required seeds for cultivation were obtained from Pakanbazr Company in Isfahan. The imposition of drought stress through irrigation intervals of 3, 5, and 7 days started at the 4-leaf stage of the plants, and the plant spraying with salicylic acid was performed at the 6-leaf stage, three days before the start of irrigation treatments. The measurement of electrolyte leakage and malondialdehyde content was carried out to determine membrane stability and lipid peroxidation level. Additionally, the measurement of proline content and the activity of three antioxidant enzymes, including peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase, was performed in different samples. Furthermore, the total phenolic, flavonoid, and anthocyanin contents, as the main secondary metabolites of Roselle plants, were measured. The biological and medicinal properties, including the free radical scavenging activity (DPPH) and α-glucosidase inhibitory activity, were also evaluated. The obtained data were analyzed using SAS statistical software version 9.4. Mean comparisons were conducted using Duncan's multiple range test at a significance level of 5%.

Results: The results showed both electrolyte leakage and malondialdehyde content increased significantly with increasing levels of applied drought stress on Roselle plants. However, overall, applying salicylic acid treatments led to a decrease in both indicators. The measurement of proline content in Roselle samples showed that the highest amount of proline was observed in plants

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

subjected to the highest drought stress and treated with the 1.5 mM salicylic acid solution. The activity of all three antioxidant enzymes increased with the intensity of the applied drought stress and the concentration of salicylic acid solutions. Roselle's highest levels of phenolic and anthocyanin content were observed in samples sprayed with 1.5 mM salicylic acid solution. The change in anthocyanin content of Roselle plants also demonstrated that increasing the severity of water scarcity resulted in higher levels of this compound. The highest DPPH free radical scavenging activity was observed in Roselle samples grown under the highest drought severity and sprayed with the highest concentration of salicylic acid (61.93%). The highest antioxidant activity was also observed in samples treated with the highest concentration of salicylic acid solution in all irrigation regimes. The highest α-glucosidase inhibitory activity (69.2% and 67.7%) was associated with Roselle samples grown under the highest applied drought severity, sprayed with 1.5 mM and 0.75 mM salicylic acid solutions, respectively.

Conclusion: It can be concluded that the use of salicylic acid as a growth regulator can contribute to the enhancement of phytochemical content, especially secondary metabolites such as phenolic and flavonoid compounds, anthocyanins, and the elevation of defensive parameters such as the activation of antioxidant enzymes, as well as an increase in osmolyte content like proline in Roselle plants. These effects assist the plants in exhibiting greater resistance to drought stress and mitigating the negative impacts of this type of stress on the plant.

Keywords: Water shortage stress, salicylic acid, antioxidant enzymes, secondary metabolites.

تأثیر اسید سالیسیلیک بر پارامترهای فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه چای‌ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.)، تحت تنش کمبود آب

بهور اصغری[1*]، سودابه مفاخری[2] و محمدمهدی ضرابی[2]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: asghari@eng.ikiu.ac.ir

۲- دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: چای‌ترش با نام علمی *Hibiscus sabdariffa* L. گیاهی است که در بسیاری از مناطق دنیا کاشته می‌شود. چای‌ترش به‌عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی نقاط مختلف دنیا برای کنترل و درمان بیماری‌ها و مشکلات جسمی استفاده شده است. این اثرهای درمانی به وجود مواد مؤثره‌ای مانند کارتنوئیدها، اسیدهای چرب و ترکیبات فنولی مانند فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها مرتبط می‌باشد. یکی از مرسوم‌ترین روش‌ها برای تحریک کردن گیاهان مختلف برای تولید مواد مؤثره بیشتر، قرار دادن آنها در معرض یکی از انواع تنش‌ها، مانند خشکی یا شوری، به همراه استفاده از محرک‌های رشد گیاهیست. در این مطالعه تأثیر سالیسیلیک اسید بر میزان محتوای فیتوشیمیایی و انواع خواص بیولوژیکی گیاه چای‌ترش در شرایط کم‌آبی، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، شامل دور آبیاری در سه سطح ۳ روز (D1)، ۵ روز (D2) و ۷ روز (D3) و محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در سه سطح (صفر (SA0)، ۰/۷۵ (SA1) و ۱/۵ (SA2) میلی‌مولار، در ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) انجام شد. بذرهای مورد نیاز برای کشت، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. اعمال تنش خشکی با آبیاری در فواصل زمانی ۳، ۵ و ۷ روز در مرحله ۴ برگی گیاهان شروع شد و محلول‌پاشی گیاهان با سالیسیلیک اسید در مرحله شش برگی و ۳ روز قبل از شروع تیمارهای آبیاری انجام گردید. برای تعیین سطح پایداری و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، به‌ترتیب اندازه‌گیری مقدار نشت الکترولیت و سطح مالون دی آلدئید انجام شد. همچنین اندازه‌گیری مقدار پرولین و فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز نیز در نمونه‌های مختلف انجام شد. همچنین مقدار تام ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی به‌عنوان اصلی‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاه چای‌ترش نیز اندازه‌گیری شد. به‌عنوان خاصیت بیولوژیکی و دارویی نیز خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ارزیابی گردید. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های بدست آمده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹.۴ استفاده شد. مقایسه میانگین‌های بدست آمده به‌وسیله روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵٪ انجام گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که هر دو پارامتر میزان نشت الکترولیت و مقدار مالون دی آلدئید با افزایش سطح خشکی اعمالی بر روی گیاه چای‌ترش، به شکل معنی‌داری افزایش یافت و اعمال تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور کلی منجر به کاهش سطح هر دو شاخص شد. همچنین بیشترین مقدار پرولین در گیاهان رشد کرده تحت تیمارهای بالاترین سطح خشکی و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بود. فعالیت هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدان با شدت گرفتن سطح خشکی اعمال شده و بالا رفتن غلظت محلول‌های سالیسیلیک اسید افزایش یافت. همچنین بالاترین مقدار محتوای فنولی و آنتوسیانینی چای‌ترش، در نمونه‌های اسپری شده با محلول ۱/۵ میلی‌مولار سالسیلیک اسید مشاهده شد. براساس روند تغییرات ایجاد شده در مقدار آنتوسیانین گیاه چای‌ترش می‌توان دید که افزایش شدت سطح کم‌آبی اعمالی نیز باعث بیشتر

شدن مقدار این ترکیب در گیاه می‌گردد. بالاترین قدرت ضدرادیکالی DPPH در نمونه‌های چای‌ترش رشد کرده تحت بالاترین شدت خشکی و غلیظ‌ترین سالیسیلیک اسید (۶۱/۹۳٪) مشاهده شد. در تمامی رژیم‌های آبیاری نیز بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های تیمار شده با غلیظ‌ترین محلول سالیسیلیک اسید دیده شد. براساس نتایج بدست آمده بالاترین قدرت مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز با ۶۹/۲٪ و ۶۷/۷٪ به نمونه‌های گیاهی رشد کرده در بالاترین سطح خشکی اعمالی که به‌ترتیب محلول‌های ۱/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر روی آنها اسپری شده است، مربوط می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که استفاده از سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد می‌تواند با تأثیر بر محتوای متابولیتی به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و آنتوسیانینی و بالا بردن پارامترهای دفاعی مانند فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش مقدار ترکیبات اسمولیتی مانند پرولین، به گیاه چای‌ترش کمک می‌کند که مقاومت بیشتری در برابر تنش خشکی داشته باشد و اثرهای منفی این نوع تنش را بر روی این گیاه تقلیل دهد.

واژه‌های کلیدی: تنش کم‌آبی، سالیسیلیک اسید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

چای‌ترش با نام علمی *Hibiscus sabdariffa* L. گیاهی است از خانواده پنیرک (Malvaceae) که به شکل سنتی در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا کاشته می‌شود (Hinojosa-Gómez *et al*., 2020). گرچه استفاده از کاسبرگ‌های این گیاه در کل دنیا برای تهیه نوشیدنی‌هایی مانند دمنوش‌ها یا چای سرد، مربا، ترشی، سس یا منبعی برای تهیه رنگ‌های غذایی مرسوم است (Ismail *et al*., 2008؛ Da-Costa-Rocha *et al*., 2014)؛ اما سایر بخش‌های این گیاه مانند برگ، ساقه و دانه نیز دارای کاربردهای مختلف صنعتی هستند (Wright *et al*., 2007). چای‌ترش به‌عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی نقاط مختلف دنیا برای کنترل و درمان بیماری‌ها و مشکلات جسمی مانند سرماخوردگی، دندان درد، سنگ کلیه و مثانه (Maganha *et al*., 2010)، بیماری‌های عفونی (Gómez-Aldapa *et al*., 2018)، مشکلات کبدی (Ezzat *et al*., 2016) و دیابت (Bule *et al*., 2020) استفاده شده است. همچنین توانایی جوشانده این گیاه برای کاهش تب (Leung & Foster, 1996) و مقابله با فشار خون و انقباضات عضلانی (Ali *et al*., 1991؛ Khalid *et al*., 2012) در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. این اثرهای درمانی براساس مطالعات انجام شده، به وجود مواد مؤثره‌ای مانند کاروتنوئیدها، اسیدهای چرب و ترکیبات فنولی مانند فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها مرتبط هستند (Riaz & Chopra, 2018؛ Piovesana *et al*., 2019). بنابراین مقدار بالاتر این ترکیبات در گیاهان برداشت شده، می‌تواند به محصولات با کیفیت‌تری منجر گردد.

یکی از مرسوم‌ترین روش‌ها برای تحریک کردن گیاهان مختلف برای تولید مواد مؤثره بیشتر، قرار دادن آنها در معرض یکی از انواع تنش‌ها، مانند خشکی یا شوری، به همراه استفاده از محرک‌های رشد گیاهیست (Khademian *et al*., 2019؛ Seraj *et al*., 2021). فیتوهورمون‌هایی مانند اسید سالیسیلیک، ترکیباتی هستند که از طریق سازوکارهای متفاوت نقش کلیدی را در ایجاد مقاومت در گیاهان برای مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفاء می‌کنند (Fahad *et al*., 2015). آبسیزیک اسید، جیبرلین‌ها و اتیلن علاوه بر سالیسیلیک اسید جزء مهمترین هورمون‌ها یا مولکول‌های پیام‌رسان هستند که در تنظیم و ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه در مقابل انواع تنش‌ها و محرک‌های محیطی نقش دارند (Sedaghat *et al*., 2017). این فیتوهورمون‌ها با تنظیم کردن فرایندهای فیزیولوژیکی و تحریک تولید

متابولیت‌های کلیدی، قدرت مقابله و سازگاری با شرایط سخت محیطی و تنش را برای گیاهان فراهم می‌کنند. براساس مطالعات موجود گیاهانی که تحت تیمار ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید قرار گرفته‌اند، ظرفیت آبی برگ بهتر، سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بالاتر، مقدار متابولیت‌های ثانویه بیشتر و سطح پراکسیداسیون لیپیدی پائین‌تری از خود نشان داده‌اند (Khalil *et al*., 2018). برای نمونه، در تحقیقی که به بررسی اثر اسپری سالیسیلیک اسید بر روی گیاه ذرت در شرایط تنش خشکی انجام شده است، نشان داده شده که اسپری این ترکیب باعث افزایش تجمع محتوای ترکیبات فنولی متصل به دیواره‌های سلولی و ترکیبات فنولی و پروتئینی محلول ذرت گردید و مقاومت به خشکی ایجاد شده در این گیاه نیز به افزایش این ترکیبات نسبت داده شد (Latif *et al*., 2016). بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان مواد فنلی مانند سالویانولیک اسید B و کافئیک اسید در گونه‌ای از مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) نشان داد که سالیسیلیک اسید با بالا بردن فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، تجمع ترکیبات فنولی مذکور را در این گونه از مریم‌گلی افزایش می‌دهد (Dong *et al*., 2010). با توجه به مطالب ذکر شده نقش محرک بودن سالیسیلیک اسید در تولید ترکیبات فنولیک در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است. تحقیقی که به بررسی تأثیر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر میزان رشد، محتوای نسبی آب برگ، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پروتئین‌ها و تجمع قندهای محلول و نشاسته گیاه چای‌ترش در شرایط تنش خشکی پرداخت، نشان داد که تنش خشکی اثر منفی بر فاکتورهای ذکر شده داشته است و سالیسیلیک اسید با حفظ محتوای نسبی آب و افزایش قندهای محلول احیایی، نقش مثبتی در ممانعت از کاهش رشد این گیاه ایفاء کرده است (Mirshekari *et al*., 2017). در مطالعه دیگری که به مقایسه اثر کاربرد خارجی آسکوربیک اسید و سالسیلیک اسید به شکل تنها و مخلوط بر چای‌ترش پرداخته، پارامترهایی مانند فاکتورهای رشدی و عناصر و مواد شیمیایی موجود در این گیاه بررسی شده است (Abdelkader & Hamad, 2014). براساس نتایج بدست آمده بالاترین مقادیر مربوط به ارتفاع گیاه، تعداد شاخه، وزن خشک، تعداد میوه در هر گیاه، مقادیر نیتروژن، فسفر، پتاسیم، درصد پروتئین و کربوهیدرات و محتوای آنتوسیانین در گیاهانی که تحت تیمار مخلوط آسکوربیک اسید با غلظت ۳۰۰ppm و سالسیلیک اسید با غلظت ۲۰۰ppm قرار گرفتند، بدست آمد. در گیاهان دیگر نیز اثر سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد، برای مقابله با استرس‌های مختلف محیطی بررسی شده است. برای نمونه، در پژوهشی که بر روی گیاه ریحان تحت تنش شوری انجام گردید، نشان داده شد که سالیسیلیک اسید از طریق افزایش تولید اسمولیت‌ها سبب کاهش اثرهای مضر ناشی از تنش شوری و بهبود درصد اسانس این گیاه می‌گردد (Mohammadi *et al*., 2022). در آزمایش دیگری که به بررسی اثر سالیسیلیک اسید به همراه نانو کود روی تنش کم‌آبی بر عملکرد کمّی و کیفی گیاه رازیانه پرداخته است، نشان داده شد که این تیمارها در مقابله گیاه با تنش مؤثر بوده‌اند و بیشترین درصد اسانس رازیانه در بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید اعمالی مشاهده شد (Heydarnejadiyan *et al*., 2021). براساس پژوهش انجام شده بر روی گیاه موسیر در شرایط کم‌آبی، اعمال تیمار محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید با افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، محتوای پرولینی و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی مانند محتوای نسبی آب و کلروفیل به مقاومت گیاه در برابر خشکی کمک مؤثری می‌کند (Yousefvand *et al*., 2022). در گیاه مامیران کبیر نیز استفاده از دو ترکیب سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات با تأثیر بر محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به مقاومت گیاه در برابر تنش شوری و بهبود عملکرد و زیست‌توده آن کمک کرده است (Fabriki-Ourang & shahabzadeh, 2018). با وجود انجام این مطالعات،

تاکنون تأثیر سالیسیلیک اسید بر میزان محتوای فیتوشیمیایی و انواع خواص بیولوژیکی گیاه چای‌ترش رشد کرده در شرایط استرس کم‌آبی بررسی نشده است، در این پژوهش، هدف بررسی این موضوع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش کاشت و اعمال تیمار

این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، شامل دور آبیاری در سه سطح ۳ روز (D1)، ۵ روز (D2) و ۷ روز (D3) و محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در سه سطح (صفر (SA0)، ۰/۷۵ (SA1) و ۱/۵ (SA2) میلی‌مولار، در ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) انجام شد. به این منظور گلدان‌هایی پلاستیکی به ارتفاع ۳۲ سانتی‌متر و قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر تهیه شدند. بذرهای مورد نیاز برای کشت، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. گلدان‌ها پس از نامگذاری با خاک مناسب پر شدند و سپس کاشت بذرها انجام شد. در مرحله ظهور دو برگ اصلی، تنک کردن انجام و در هر گلدان سه بوته نگهداری شد. اعمال تنش خشکی با آبیاری در فواصل زمانی ۳، ۵ و ۷ روز در مرحله ۴ برگی گیاهان شروع شد. برای تهیه محلول سالیسیلیک اسید، پودر سالیسیلیک اسید در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با غلظت ده برابر نسبت به بیشترین غلظت مورد نظر حل شد. برای تهیه محلول ۱/۵ میلی‌مولار، ۱۵ میلی‌لیتر از محلول غلیظ سالیسیلیک اسید ابتدایی به اضافه آب مقطر دو بار تقطیر به حجم ۱/۵ لیتر رسید. یک لیتر محلول ۰/۷۵ میلی‌مولار نیز از اضافه کردن ۰/۵ لیتر آب مقطر دوبار تقطیر به ۰/۵ لیتر از محلول ۱/۵ میلی‌مولار بدست آمد. محلول‌پاشی گیاهان با سالیسیلیک اسید در مرحله شش برگی (۳ روز قبل از شروع تیمارهای آبیاری) انجام شد و تمامی گیاهان به صورتی که تمام سطوح فوقانی و زیرین اندام‌های هوایی کاملاً خیس شوند محلول‌پاشی شدند. همچنین گیاهان شاهد به همین روش و تنها با آب مقطر تیمار شدند.

آزمون نشت الکترولیت (EL)

اندازه‌گیری میزان نشت یونی برگ‌های چای‌ترش با استفاده از روش گزارش شده توسط Jambunathan (۲۰۱۰)، با اعمال برخی تغییرات انجام شد. برای این منظور ۰/۲ گرم از نمونه‌های برگی که به قطعات هم اندازه بریده شده‌اند به مدت ۲۴ ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد هدایت الکتریکی اولیه این محلول (EC1)، اندازه‌گیری شد. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و دوباره مقدار هدایت الکتریکی محلول (EC2) قرائت گردید. برای محاسبه مقدار نشت الکترولیتی از رابطه زیر استفاده شد.

$$\mathrm{EL}\ (\%) = \left(\frac{EC1}{EC2}\right) \times 100$$

تعیین مقدار پراکسیداسیون لیپیدی غشاء

برای تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان یک ترکیب شاخص انجام شد. برای این منظور ۰/۲ گرم از برگ گیاه پس از ساییده شدن در ازت مایع به لوله آزمایش منتقل گردید و به آن ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ تری‌کلرواستیک اسید اضافه شد. محلول‌های بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی بدست آمده با ۴ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵٪ و باربیتوریک اسید مخلوط گردید و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت. در نهایت محلول‌ها با قرار گرفتن در آب یخ به سرعت سرد شدند

و جذب آنها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار MDA از تفاضل دو جذب ذکرشده و با اعمال ضریب خاموشی $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ و بر حسب نانومول بر گرم تر نمونه محاسبه شد (Yazici *et al*., 2007).

اندازه‌گیری مقدار پرولین

مقدار پرولین آزاد موجود در نمونه‌های گیاهی براساس روش Khazaei و همکاران (۲۰۲۰) با اعمال برخی تغییرات انجام شد. برای این منظور به ۰/۲ گرم از برگ‌های خرد شده ۵ میلی‌لیتر محلول ۳٪ سولفوسالیسیلیک اسید اضافه شد. به ۲ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد کردن این محلول در آب سرد به هر یک ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و پس از انجام استخراج میزان جذب نمونه در ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. مقادیر پرولین در نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم تر نمونه بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای استخراج آنزیم‌های موجود در بافت گیاه چای‌ترش به یک گرم از برگ‌های خرد شده آن در ازت مایع، ۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار، با pH برابر ۷/۸) اضافه شد و در حمام یخ قرار گرفت. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی حاصل برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) بر اساس میزان افزایش جذب محلولی حاوی یک میلی‌مولار گایاکول، ۰/۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به دست آمده از گیاه در بافر فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد (Upadhyaya *et al*., 1985).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی میزان تغییرات جذب محیط واکنش در بازه زمانی ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. محلول واکنش حاوی بافر فسفات با pH برابر ۷ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آنزیمی به دست آمده از نمونه‌های گیاهی بود (Gheshlaghpour *et al*., 2021).

فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز (APX) نیز براساس کاهش میزان جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر در بازه زمانی ۳۰ ثانیه در محلولی حاوی بافر فسفات با pH برابر ۷ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی و آب مقطر در حجم کلی ۳ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. شروع واکنش از لحظه اضافه شدن H_2O_2 بود (Nakano & Asada, 1981). نتایج مربوط به فعالیت کلیه آنزیم‌های بررسی شده بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

مقدار محتوای فنولی

محتوای فنولی نمونه‌های گیاهی با استفاده از معرف فولین- سیوکالچو و با روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد (Zarrabi *et al*., 2019). برای رسیدن به این هدف، محلول ۱۰٪ حجمی/ حجمی از معرف فولین تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی اضافه و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در تاریکی، ۸۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات با غلظت ۷/۵٪ وزنی/ حجمی به آن اضافه شد، در نهایت جذب محیط واکنش در ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. از ترکیب گالیک اسید برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و مقدار محتوای فنولی نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره ارائه شده است.

مقدار محتوای فلاونوئیدی

برای تعیین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل نمونه‌های گیاهی از معرف کلرید آلومینیوم استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵٪ وزنی/ حجمی این معرف به ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی اضافه شد و پس از رقیق کردن محیط با ۶۰ میکرولیتر متانول، حجم کل واکنش با افزایش ۱۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مولار استات پتاسیم و مقدار مناسب از آب مقطر به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از استاندارد کوئرستین برای تهیه منحنی کالیبراسیون استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره بیان گردید (Asghari *et al*., 2021).

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین کل

استخراج و اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین کل نمونه‌های چای‌ترش براساس روش Abou-Arab و همکاران (۲۰۱۱)، با اعمال برخی تغییرات انجام شد. به این منظور استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از کاسبرگ‌های خشک شده چای‌ترش با اضافه کردن اتانول ۸۵٪ اسیدی (اسید کلریدریک ۱/۵ مولار) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس حجم مشخصی از عصاره بدست آمده با اضافه کردن حلال استخراجی تا ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد و جذب آن در ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مقدار آنتوسیانین کل نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر بر حسب ماده رفرنس سیانیدین-۳-گلوکوزید محاسبه شد.

$$\text{محتوای کل آنتوسیانین } (\frac{mg}{100g}) = \frac{\text{جذب} \times \text{فاکتور رقیق‌سازی} \times 100}{\text{وزن نمونه} \times 55.9}$$

اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از طریق تخمین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های گیاهی بررسی شد. به این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی با غلظت مشخص با ۱۸۰ میکرولیتر از محلول DPPH که دارای غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بود، مخلوط گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه مقدار جذب محلول حاصل در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بر حسب درصد مهار رادیکال‌های DPPH بیان شده است (Asghari *et al*., 2019).

تجزیه‌وتحلیل آماری

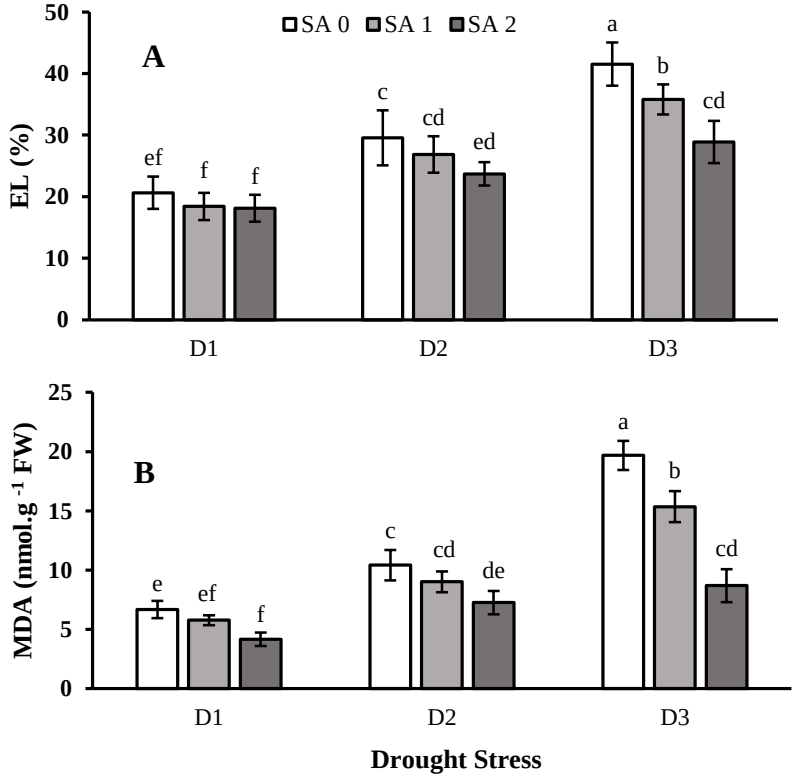
برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های بدست آمده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه 9.4 استفاده شد. مقایسه میانگین‌های بدست آمده توسط روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵٪ انجام گردید.

نتایج

میزان نشت الکترولیت (EL) و مقدار مالون دی آلدئید (MDA)

نتایج نشان داد که هر دو پارامتر میزان نشت الکترولیت و مقدار مالون دی آلدئید چای‌ترش با افزایش سطح خشکی، به شکل معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). این در حالیست که اعمال تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور کلی منجر به کاهش سطح هر دو شاخص شد. این کاهش به‌ویژه در گیاهانی که تحت تیمار کم‌آبی شدیدتری بوده‌اند، به شکل مشخصی قابل مشاهده است. مقدار نشت الکترولیت و MDA گیاهانی که سالیسیلیک اسید دریافت نکرده‌اند در بالاترین سطح خشکی به‌ترتیب با مقادیر ۴۱/۵۳٪ و ۱۹/۶۸ نانومول بر گرم وزن تر نمونه، در میان تمامی

تیمارها بیشترین مقدار را نشان داد. این شاخص‌ها در نمونه‌های مذکور با محلول‌پاشی غلظت ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به‌ترتیب کاهشی معادل ۳۰/۵٪ و ۵۵/۸٪ را نشان دادند.



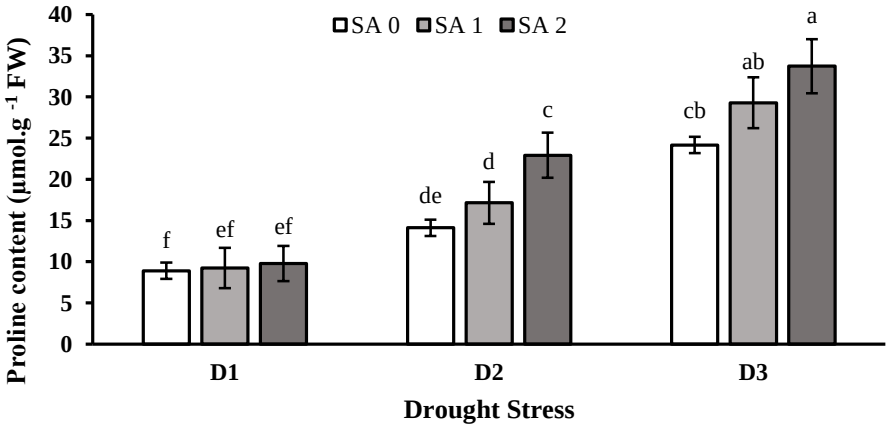
شکل ۱- درصد نشت الکترولیت (**A**) و غلظت مالون دی آلدئید (**B**) چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 1. Electrolyte leakage percentage (A) and malondialdehyde concentration (B) of *Hibiscus sabdariffa* in different drought stress and salicylic acid treatments

D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

مقدار پرولین

اندازه‌گیری مقدار پرولین نمونه‌های چای‌ترش نشان داد که هر دو تیمار خشکی و سالیسیلیک اسید، اثر معنی‌داری بر مقدار این ترکیب دارند. براساس نتایج بدست آمده (شکل ۲)، می‌توان دید که بیشترین مقدار پرولین در گیاهان رشد کرده تحت تیمارهای بالاترین سطح خشکی و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید وجود دارد (به‌ترتیب ۳۳/۷۴ و ۲۹/۳ میکرومول بر گرم وزن تر نمونه برای غلظت‌های ۱/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید) و اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های تیمار شده با دو غلظت مختلف سالیسیلیک اسید مشاهده نمی‌گردد. با توجه به روند تغییرات مقدار پرولین در نمونه‌های گیاهی می‌توان دید که تنش خشکی و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید هر دو باعث افزایش این ترکیب در گیاه چای‌ترش شده‌اند. براساس نتایج بدست آمده مقدار پرولین نمونه‌های گیاهی که تنش کم‌آبی به آنها اعمال نشده حتی با وجود محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف سالسیلیک اسید تغییر چندانی نداشته و این نمونه‌ها از نظر مقدار پرولین اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۲- مقدار پرولین چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 2. Proline content of *Hibiscus sabdariffa* in different drought stress and salicylic acid treatments

D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج بدست آمده از بررسی تأثیر اعمال تیمارهای خشکی و سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه چای‌ترش در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج مؤید این نکته هستند که به‌طور کلی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به شکل معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی و غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بوده‌اند. فعالیت هر سه آنزیم (POD، CAT و APX) با شدت گرفتن سطح خشکی اعمال شده و با بالا رفتن غلظت محلول‌های سالیسیلیک اسید افزایش یافته‌اند. بیشترین میزان فعالیت هر سه آنزیم POD، CAT و APX به‌ترتیب با مقادیر ۱۹/۵۷، ۸۰/۹۲ و ۱/۸۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در بالاترین حد تنش خشکی مشاهده شد. این در حالیست که کمترین فعالیت اندازه‌گیری شده در هر سه آنزیم مذکور، در گیاهان شاهد بود که این موضوع مؤید اثر تحریکی تیمارهای اعمالی بر فعالیت این آنزیم‌هاست.

میزان محتوای فنولی و فلاونوئیدی

مقدار ترکیب‌های فنولی بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره و مقدار محتوای فلاونوئیدی کل نمونه‌های مورد آزمایش بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم خشک عصاره محاسبه گردید. براساس این نتایج می‌توان مشاهده کرد که تیمارهای خشکی و سالیسیلیک اسید تغییرات معنی‌داری در مقدار این متابولیت‌ها ایجاد کرده است. بالاترین مقدار ترکیب‌های فنولی کل در دو نمونه گیاهی که محلول ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر آنها اعمال شده و در دو سطح خشکی اعمالی ۵ و ۷ روز به‌ترتیب با مقادیر ۶۶/۱۶ و ۶۱/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره مشاهده گردید که به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها مقدار بالاتری را نشان می‌دهد (شکل ۳).

جدول ۱- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

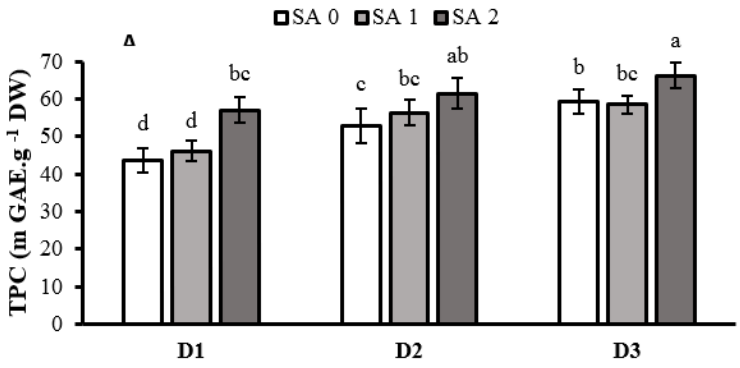
Table 1. Antioxidant enzymes activity of *Hibiscus sabdariffa* in different drought stress and salicylic acid treatments

Drought levels	Salicylic acid	POD (U mg^{-1} Protein)	CAT (U mg^{-1} Protein)	APX (U mg^{-1} Protein)
D1	0	6.09 ± 0.95^{e}	43.29 ± 4.40^{g}	0.73 ± 0.05^{f}
	0.75	$8.35\pm0.79^{c-e}$	49.06 ± 5.32^{fg}	1.16 ± 0.16^{cd}
	1.5	11.40 ± 1.49^{c}	59.71 ± 3.61^{de}	1.58 ± 0.14^{b}
D2	0	7.69 ± 1.17^{de}	53.59 ± 6.27^{ef}	0.83 ± 0.04^{ef}
	0.75	9.43 ± 0.68^{cd}	61.68 ± 5.34^{cd}	0.82 ± 0.09^{ef}
	1.5	15.77 ± 2.43^{b}	72.70 ± 4.06^{b}	1.32 ± 0.25^{c}
D3	0	10.62 ± 1.38^{cd}	59.89 ± 5.80^{de}	1.05 ± 0.09^{de}
	0.75	14.68 ± 2.28^{b}	68.91 ± 4.33^{bc}	1.25 ± 0.11^{cd}
	1.5	19.57 ± 2.75^{a}	80.92 ± 6.26^{a}	1.87 ± 0.15^{a}

D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بالاترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی نیز در نمونه‌های رشد کرده در بالاترین مقدار سطح خشکی و غلیظ‌ترین محلول سالیسیلیک اسید و برابر ۳۳/۸۱ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره یافت شد. بررسی مقدار آنتوسیانین کل در نمونه‌های چای‌ترش نیز نشان داد که هر دو تیمار خشکی و سالیسیلیک اسید اثر مستقیمی در مقدار این ترکیب در نمونه‌های گیاهی داشتند. همانگونه که در شکل ۴ قابل مشاهده است، بالاترین مقدار محتوای آنتوسیانینی چای‌ترش در روندی مشابه با ترکیبات فنولی در نمونه‌های اسپری شده با محلول ۱/۵ میلی‌مولار سالسیلیک اسید مشاهده شد. براساس روند تغییرات ایجاد شده در مقدار آنتوسیانین گیاه چای‌ترش، می‌توان دید که افزایش شدت سطح کم‌آبی اعمالی نیز باعث بیشتر شدن مقدار این ترکیب در گیاه می‌گردد.



شکل ۳- محتوای کل فنولی چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 3. Total phenolics content of *Hibiscus sabdariffa* in different drought stress and salicylic acid treatments

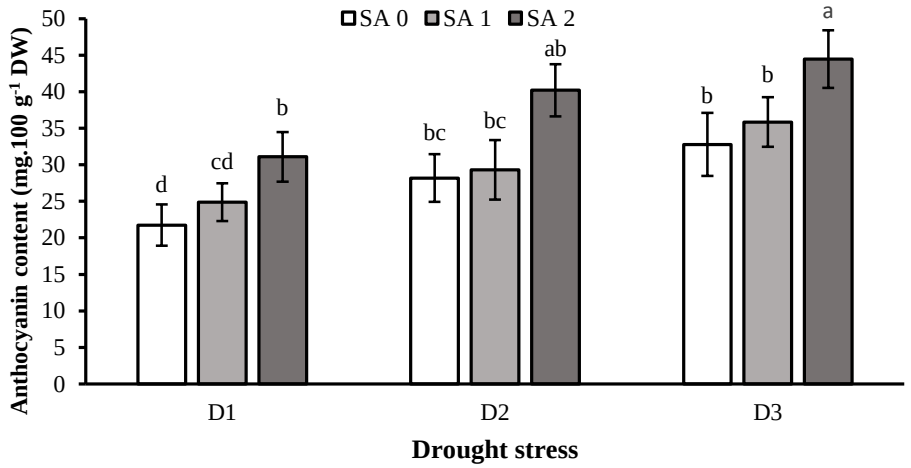
D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

خاصیت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان چای‌ترش رشد کرده تحت تیمارهای خشکی و سالیسیلیک اسید با استفاده از آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH انجام شد. نتایج این آزمون حکایت از تأثیر معنی‌دار این تیمارها بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های این گیاه داشت (شکل ۵). بالاترین قدرت ضدرادیکالی DPPH در نمونه‌های چای‌ترش رشد کرده تحت بالاترین شدت خشکی و غلیظ‌ترین سالیسیلیک اسید اسپری شده (۶۱/۹۳٪) مشاهده شد. در تمامی رژیم‌های آبیاری اعمالی نیز بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های تیمار شده با غلیظ‌ترین محلول سالیسیلیک اسید دیده شد و این ارتباط مستقیم قدرت آنتی‌اکسیدانی را با غلظت تیمار سالسیلیک اسید به اثبات می‌رساند.

مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

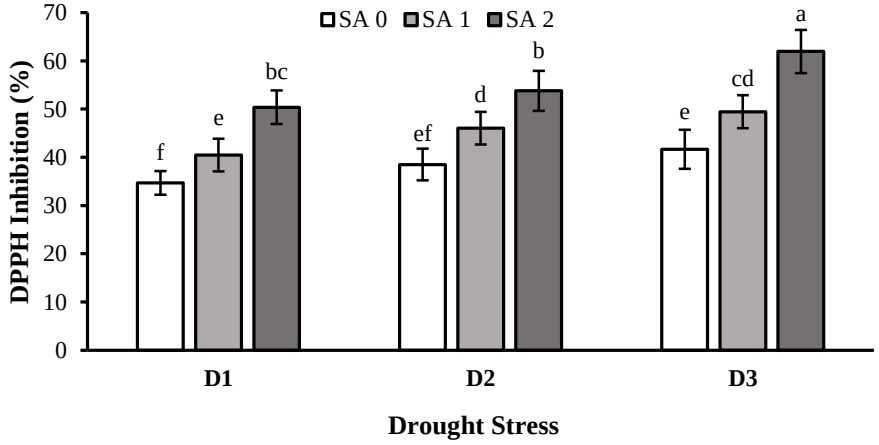
شکل ۶ نتایج مربوط به درصد مهار فعالیت آنزیم گلوکزیداز توسط عصاره نمونه‌های گیاهی تحت تیمارهای اعمالی را نشان می‌دهد. براساس نتایج بدست آمده به خوبی می‌توان مشاهده کرد که با شدت یافتن سطح خشکی، قدرت مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در چای‌ترش به شکل معنی‌داری افزایش یافته است. این در حالیست که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید اسپری شده بر روی چای‌ترش نیز تأثیر معنی‌داری در قدرت مهار این آنزیم داشته و گیاه رشد کرده تحت تیمار غلیظ‌تر این ترکیب قدرت مهار بالاتری نشان داد. براساس نتایج بدست آمده بالاترین قدرت مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز با ۶۹/۲٪ و ۶۷/۷٪ به نمونه‌های گیاهی رشد کرده در بالاترین سطح خشکی اعمالی که به‌ترتیب محلول‌های ۱/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر روی آنها اسپری شده است، مربوط می‌باشد.



شکل ۴- محتوای آنتوسیانین چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 4. Anthocyanin content of *Hibiscus sabdariffa* in different drought stress and salicylic acid treatments

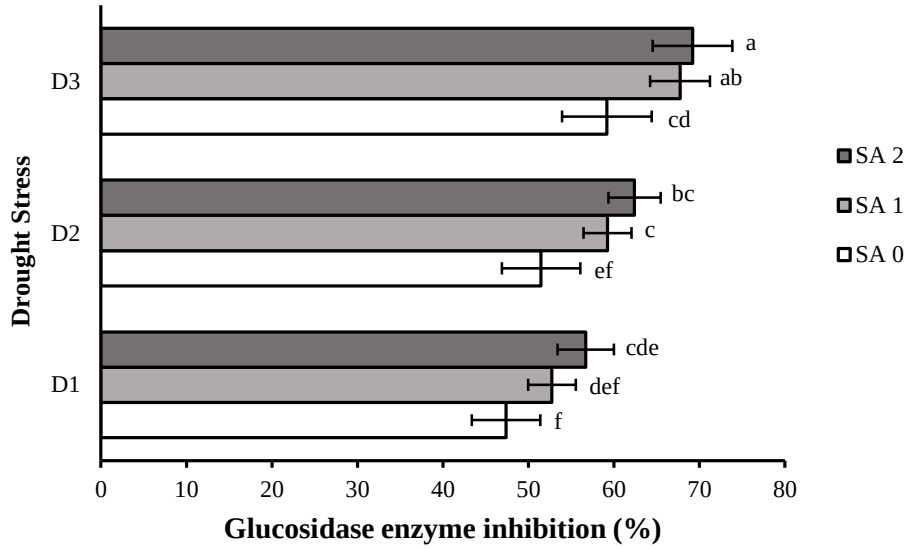
D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۵- فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره هیدروالکلی چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 5. DPPH radical scavenging activity of *Hibiscus sabdariffa* hydroalcoholic extract in different drought stress and salicylic acid treatments

D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۶- فعالیت مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز عصاره هیدروالکلی چای ترش تحت تیمارهای مختلف تیمار خشکی و اسیدسالیسیلیک

Figure 6. *α*-Glucosidase inhibition activity of *Hibiscus sabdariffa* hydroalcoholic extract in different drought stress and salicylic acid treatments

D1, D2, and D3: drought stress at 3, 5, and 7 days levels; SA0, SA1, and SA2: salicylic acid at 0, 0.75, and 1.5 mM levels
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بحث

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که باعث کاهش میزان رشد و بازدهی تولید در بیشتر محصولات کشاورزی می‌شود (Minhas *et al*., 2017). این تنش می‌تواند باعث کند شدن فرایند رشد سلولی و تحریک سنتز ترکیبات گوناگونی در سلول‌های گیاهی گردد که این ترکیبات در افزایش ظرفیت اسمزی و فرایندهای متابولیکی و بالا رفتن فعالیت انواع سیستم‌های دفاعی گیاه، مانند برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی ایفاء می‌نماید (Gao *et al*., 2020). بررسی تأثیرات ناشی از اعمال تنش خشکی بر گیاهان می‌تواند از طریق اندازه‌گیری فاکتورهای مختلفی مانند ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزان محتوای متابولیتی، به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و اثرهای بیولوژیکی گیاهان انجام شود (Khademian *et al*., 2019؛ Khalil *et al*., 2018؛ Yadegari, 2022). در تحقیقی که پیش از این منتشر شده است اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه چای‌ترش بررسی شده است (Mirshekari *et al*., 2017). طبق نتایج این پژوهش تنش خشکی به‌طور قابل توجهی منجر به کاهش فاکتورهای مختلف رشدی مانند طول ریشه، ارتفاع بوته، وزن تر ریشه و اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و دیگر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در گیاه چای‌ترش شده است و نشان داده شده که اسپری سالیسیلیک اسید توانسته به گیاه برای مقابله با اثرهای منفی تنش خشکی کمک شایانی بکند. همچنین در این تحقیق اثر تیمارهای اعمالی بر روی محتوای نسبی آب برگ، مقدار پروتئین‌های محلول و قندهای غیر احیایی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه نیز بررسی شده است و نشان داده شد که سالیسیلیک اسید می‌تواند با آثار مخرب تنش خشکی از طریق کاهش هدررفت آب و افزایش قندهای محلول احیایی و در نتیجه حفظ فشار تورژسانس سلولی مقابله نماید. با وجود این مطالعه هنوز به شکل روشن اثر سالیسیلیک اسید در شرایط تنش خشکی بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مهم گیاه چای‌ترش بررسی نشده است، ازاین‌رو در این پژوهش به این موارد پرداخته شده است.

میزان نشت الکترولیت و مقدار ترکیب مالون دی آلدئید (MDA) از مهمترین فاکتورهای نشان‌دهنده آسیب‌های بوجود آمده به غشاء پلاسمایی سلول‌های گیاهی تحت تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی هستند (Khan *et al*., 2021). نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که تنش خشکی در گیاه چای‌ترش باعث افزایش هر دو این فاکتورها می‌گردد و سالیسیلیک اسید هم با کاهش اثرهای منفی تنش، مقادیر هر دو این فاکتورها را کاهش داده است. در مطالعات دیگر نیز اثرهای مشابهی از تنش‌های محیطی و محلول‌پاشی فیتوهورمون‌هایی مانند سالیسیلیک اسید مشاهده شده است. برای نمونه اعمال تنش خشکی بر روی گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) به شکل قابل توجهی مقدار MDA را افزایش داد، در حالی که اعمال تیمار آسکوربیک اسید به صورت محلول‌پاشی، منجر به کاهش این ترکیب شد (Khazaei *et al*., 2020). تیمار سالیسیلیک اسید بر روی گیاه گندم در شرایط خشکی نیز اثرهای مشابهی را نشان داد (Sedaghat *et al*., 2017) که همه این موارد حکایت از تعدیل اثرهای تنش‌های محیطی توسط تنظیم‌کننده‌های گیاهی مانند سالیسیلیک اسید دارد.

آمینو اسید پرولین یک ترکیب محلول در آب است که نقش بسیار مهمی در تنظیم فشار اسمزی سلول ایفاء می‌نماید (Zhang *et al*., 2009). تنظیم فشار اسمزی از سازوکارهای دفاعی گیاه در شرایط استرس است که به‌طور معمول از طریق سنتز ترکیبات درون سلولی مانند پرولین در گیاه انجام می‌شود (Yazici *et al*., 2007). در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده بر روی گیاهان، نشان داده شده است که تجمع پرولین یک پاسخ به شرایط تنش کم‌آبی یا شوری است (Ghosh *et al*., 2022). علاوه بر این پرولین می‌تواند به‌عنوان یک منبع کربن و نیتروژن جهت استفاده برای رشد در دوران استرس محسوب شود (Jain *et al*., 2001). همچنین این ترکیب به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان و مهارکننده رادیکال‌های آزاد نیز مطرح است (Lehmann *et al*., 2010)، بنابراین می‌تواند با اثرهای تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) حاصل از تنش خشکی مقابله نماید (Seki *et al*., 2007). در مطالعات دیگری نیز که به بررسی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در شرایط تنش خشکی بر روی گیاهانی مانند ریحان (Damalas, 2019) و به‌لیمو (Dianat *et al*., 2016) پرداخته‌اند نشان داده شد که تیمار سالیسیلیک اسید در شرایط خشکی باعث افزایش مقدار پرولین گردیده است که این روند با نتایج این تحقیق تطابق کامل دارد.

براساس مطالعات انجام شده استرس اکسیداتیو زمانی در سیستم‌های زیستی بوجود می‌آید که سرعت تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد، از سرعت حذف آنها توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بیشتر باشد (Demidchik, 2015). باید توجه داشت که این سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی دارای دو قسمت آنزیمی و غیرآنزیمی است (Irato & Santovito, 2021). ازجمله مهمترین آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاع آنزیمی می‌توان به پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز اشاره کرد که در این پژوهش میزان فعالیت آنها تحت تیمارهای اعمالی اندازه‌گیری شد. در مطالعات دیگری نیز اثر افزاینده تیمار همزمان تنش خشکی و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان مختلف به اثبات رسیده است. برای نمونه، در مطالعه‌ای که اثر این تیمارها را بر روی فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD)، در گیاه به‌لیمو بررسی کرد، نشان داده شد که هر دو تیمار اثر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها داشته‌اند، به گونه‌ای که بیشترین مقدار فعالیت هر سه آنزیم در این گیاه در بالاترین شدت خشکی و غلیظ‌ترین مقادیر محلول سالیسیلیک اسید اعمالی مشاهده گردید (Dianat *et al*., 2016). در مطالعه دیگری نیز اثر فعال‌کنندگی سالیسیلیک اسید بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در هر دو تنش شوری و خشکی در گیاه دارویی پونه به اثبات رسیده است. در این پژوهش در تمامی سطوح تنش اعمالی، وجود ترکیب سالسیلیک اسید منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت دو آنزیم SOD و POD شد (Azad *et al*., 2021).

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در گیاهان بیشتر

به وجود متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مرتبط است (Aryal *et al*., 2019). این ترکیب‌ها با سازوکارهای متفاوتی مانند انتقال اتم هیدروژن، انتقال تک الکترون و کیلیت فلزات، اثرهای آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند و به همین دلیل میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در نمونه‌های گیاهی به‌ویژه گیاهان دارویی در میزان خواص بیولوژیکی و دارویی آنها تأثیر مستقیم و بسزایی دارد (Kabera *et al*., 2014). مطالعات دیگری نیز به بررسی اثر همزمان تنش‌های محیطی با فیتوهورمون‌ها و محرک‌های رشدی بر روی محتوای متابولیتی گیاهان مختلف ازجمله چای‌ترش پرداخته‌اند. برای نمونه، در بررسی اثر جاسمونیک اسید و تنش شوری بر روی گیاه چای‌ترش نشان داده شد که جاسمونیک اسید در غلظت‌های پایین نمک، باعث افزایش تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و محتوای آنتوسیانینی این گیاه گردید (Sheyhakinia *et al*., 2020). در مطالعه‌ای دیگر که برای بررسی اثر اسپری کردن محلول سالیسیلیک اسید در شرایط تنش خشکی روی گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) انجام گردید، نشان داده شد که با افزایش شدت خشکی اعمالی و غلظت محلول سالیسیلیک اسید اسپری شده بر روی گیاه، محتوای فنولی آویشن به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد (Khalil *et al*., 2018). به‌هرحال، خشکی یکی از متداول‌ترین تنش‌های محیطی است که باعث محدود شدن عملکرد گیاهان می‌گردد. این تنش می‌تواند منجر به ایجاد انرژی محرک مازاد و تنش‌های فتواکسیداتیو گردد (Chaves *et al*., 2003). سازوکارهای مختلفی توسط گیاهان برای پراکنده کردن و صرف این انرژی اضافی، مورد استفاده قرار می‌گیرد که ازجمله آنها می‌توان به بیوسنتز و تولید انواع متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، ترکیبات ترپنوئیدی و مشتقات ایزوپرنی اشاره کرد (Agati *et al*., 2007؛ Delfine *et al*., 2005). آنتوسیانین‌ها نیز ازجمله مهمترین ترکیبات فنولی موجود در گیاه چای‌ترش هستند که اثرهای بیولوژیکی مختلفی از آنها گزارش شده است (Hinojosa-؛ Sindi *et al*., 2014 Gómez *et al*., 2018). رنگ کاسبرگ‌های چای‌ترش با توجه به مقدار محتوای فیتوشیمیایی موجود در آنها می‌تواند از قرمز روشن تا قرمز تیره متغیر باشد و کاسبرگ‌های با رنگ قرمز تیره در مقایسه با کاسبرگ‌های قرمز روشن دارای محتوای آنتوسیانینی بالاتری هستند (Christian & Jackson, 2009). تأثیر عوامل محیطی و تیمارهای اعمالی بر مقدار محتوای آنتوسیانینی گیاه چای‌ترش در مطالعات دیگری نیز بررسی شده است. برای نمونه، براساس گزارش‌های موجود اثر متقابل محلول‌پاشی سه ترکیب سالیسیلیک اسید، هیومیک اسید و سولفات روی و تنش خشکی بر مقدار آنتوسیانین گیاه چای‌ترش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این در حالیست که هر یک از این مؤلفه‌ها به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر مقدار آنتوسیانین این گیاه داشتند و بیشترین مقدار آنتوسیانین کل در گیاهانی که تحت تیمار محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بودند مشاهده شد (Fathi & Bahamin, 2018).

با توجه به اینکه مطالعات و گزارش‌های پیشین، اثر مهارکنندگی عصاره‌های تهیه شده از گیاه چای‌ترش را بر روی رادیکال‌های آزاد DPPH و آنزیم آلفا–گلوکوزیداز به اثبات رسانده است (Ademiluyi & Oboh, 2013؛ Sindi *et al*., 2014؛ Rasheed *et al*., 2018)، اثر تیمارهای اعمالی در این پژوهش نیز بر هر دو خاصیت بیولوژیکی و دارویی مذکور بررسی شد. رادیکال‌های آزاد، گونه‌های شیمیایی هستند که در سیستم‌های زیستی در اثر فرایندهای متابولیکی و استرس‌های محیطی به وجود می‌آیند و به‌عنوان عامل ایجاد ناهنجاری‌های مختلفی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و غیره شناخته می‌شوند (Kedare & Sing, 2011). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با از بین بردن رادیکال‌های آزاد با استرس‌های اکسیداتیو مقابله می‌کنند. یکی از مهمترین منابع زیستی که منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند، گیاهان به‌ویژه گیاهان دارویی می‌باشند (Mishra *et al*., 2012). آلفا–گلوکوزیداز به‌همراه آلفا–آمیلاز دو آنزیم کلیدی دخیل در فرایند هیدرولیز گلوکز از نشاسته در سیستم گوارش می‌باشد. در بیماران دیابتی

نوع ۲ می‌توان با مهار فعالیت این دو آنزیم سرعت تولید و جذب گلوکز از روده را کاهش داد و به این ترتیب از افزایش سطح قند خون بعد از غذا در این بیماران جلوگیری کرد (Mobinikhaledi *et al*., 2015). با توجه به اینکه اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیمی انواع عصاره‌های گیاهی به محتوای متابولیتی این عصاره‌ها وابسته است می‌توان تغییرات ایجاد شده در این خواص را با تغییرات مقادیر متابولیت‌های گیاهی مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی توجیه کرد. با مقایسه نتایج اندازه‌گیری‌های انجام شده می‌توان به روشنی دریافت که تیمارهایی که منجر به افزایش انواع ترکیبات گیاهی شده است، بالا بردن خواص آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیمی را در پی داشته‌اند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت استفاده از سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد می‌تواند با تأثیر بر محتوای متابولیتی به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی و بالا بردن پارامترهای دفاعی مانند فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش مقدار ترکیبات اسمولیتی مانند پرولین، به گیاه چای‌ترش کمک می‌کند که مقاومت بیشتری در برابر تنش خشکی داشته باشد و اثرهای منفی این نوع تنش را بر روی این گیاه تقلیل دهد.

References

- Abdelkader, M.A.I. and Hamad, E.H.A., 2014. Response of growth, yield and chemical constituents of roselle plant to foliar application of ascorbic acid and salicylic acid. Global Journal of Food and Agricultural Sciences, 1(2): 126-136.
- Abou-Arab, A.A., Abu-Salem, F.M. and Abou-Arab, E.A., 2011. Physico-chemical properties of natural pigments (Anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). Journal of American science, 7(7): 445-456.
- Ademiluyi, A.O. and Oboh, G., 2013. Aqueous extracts of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit α-amylase and α-glucosidase activities *in vitro*. Journal of medicinal food, 16(1): 88-93.
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A. and Tattini, M., 2007. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. New Phytologist, 174: 77-89.
- Ali, M.B., Salih, W.M., Mohamed, A.H. and Homeida, A.M., 1991. Investigation of the antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. Journal of Ethnopharmacology, 31(2): 249-257.
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. and Koirala, N., 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. Plants, 8(4): 96.
- Asghari, B., Habibzadeh, F. and Ghorbani Nohooji, M., 2019. Persian Thyme (*Thymus persicus*): a plant containing active metabolites with antioxidant, anti-diabetic and anti-Alzheimer effects. Journal of Medicinal Plants, 18(70): 97-109.
- Asghari, B., Mafakheri, S. and Rejali, F., 2021. Assessment of morphological, physiological, and biochemical characteristics of *Thymus kotschyanus* Boiss. and hohen under different bio and chemical fertilizers. Journal of Agricultural Science and Technology, 23(6): 1309-1325.
- Azad, N., Rezayian, M., Hassanpour, H., Niknam, V. and Ebrahimzadeh, H., 2021. Physiological mechanism of salicylic acid in *Mentha pulegium* L. under salinity and drought stress. Brazilian Journal of Botany, 44(2): 359-369.
- Bule, M., Albelbeisi, A.H., Nikfar, S., Amini, M. and Abdollahi, M., 2020. The antidiabetic and antilipidemic effects of *Hibiscus sabdariffa*: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Food Research International, 130: 108980.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. Functional Plant Biology, 30(3): 239-264.
- Christian, K.R. and Jackson, J.C., 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. Journal of Food Composition and Analysis, 22: 663-667.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M., 2014. *Hibiscus sabdariffa* L.-A phytochemical and pharmacological review. Food chemistry, 165: 424-443.
- Damalas, C.A., 2019. Improving drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum*) with salicylic acid. Scientia Horticulturae, 246: 360-365.
- Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R. and Alvino, A., 2005. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. Agriculture, Ecosystems & Environment, 106; 243-252.

stress: understanding the physiological mechanisms. Plant Biology, 24(2): 227-239.
- Gómez-Aldapa, C.A., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M.R., Villarruel-López, A., Acevedo-Sandoval, O.A., Gordillo-Martínez, A.J., Godínez-Oviedo, A. and Castro-Rosas, J., 2018. Antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers directly on green leaves contaminated with foodborne pathogens. Journal of food protection, 81(2): 209-217.
- Heydarnejadiyan, H., Maleki, A. and Babaei, F., 2021. Effects of zinc nanofertilizer and salicylic acid on yield and yield components of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under drought stress conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37(1): 145-161.
- Hinojosa-Gómez, J., San Martin-Hernández, C., Heredia, J.B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T. and Muy-Rangel, M.D., 2018. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivars calyx produced hydroponically: Physicochemical and nutritional quality. Chilean Journal of Agricultural Research, 78: 478-485.
- Hinojosa-Gómez, J., San Martín-Hernández, C., Heredia, J.B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T. and Muy-Rangel, M.D., 2020. Anthocyanin induction by drought stress in the calyx of roselle cultivars. Molecules, 25(7): 1555-1565.
- Irato, P. and Santovito, G., 2021. Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function. Antioxidants, 10(4): 579.
- Ismail, A., Ikram, E.H.K. and Nazri, H.S.M., 2008. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. Food, 2(1): 1-16.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S. and Sarin, N., 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Reports, 20(5): 463-468.
- Jambunathan, N., 2010. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In Plant stress tolerance. 291-297, Humana press.
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. and He, X., 2014. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(7): 377-392.
- Kedare, S.B. and Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of food science and technology, 48: 412-422.
- Khademian, R., GhorbaniNohooji, M. and Asghari, B., - Demidchik, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. Environmental and experimental botany, 109: 212-228.
- Dianat, M., Saharkhiz, M.J. and Tavassolian, I., 2016. Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L. effects on biochemical traits and essential oil yield. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 8: 286-293.
- 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(2-3): 99-104.
- Ezzat, S.M., Salama, M.M., Seif el-Din, S.H., Saleh, S., El-Lakkany, N.M., Hammam, O.A., Salem, M.B. and Botros, S.S., 2016. Metabolic profile and hepatoprotective activity of the anthocyanin-rich extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. Pharmaceutical biology, 54(12): 3172-3181.
- Fabriki-Ourang, S. and Shahabzadeh, H.S., 2018. The effect of salicylic acid and methyl-jasmonate on antioxidant properties and physiological traits of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) under salinity stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 34(2): 218-234.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F.A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C. and Tabassum, M.A., 2015. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. Environmental Science and Pollution Research, 22(7): 4907-4921.
- Fathi, A. and Bahamin, S., 2018. The effect of irrigation levels and foliar application (zinc, humic acid and salicylic acid) on growth characteristics, yield and yield components of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Environmental Stresses in Crop Sciences, 11(3): 661-674.
- Gao, S., Wang, Y., Yu, S., Huang, Y., Liu, H., Chen, W. and He, X., 2020. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. Scientia Horticulturae, 259: 108795.
- Gheshlaghpour, J., Asghari, B., Khademian, R. and Sedaghati, B., 2021. Silicon alleviates cadmium stress in basil (*Ocimum basilicum* L.) through alteration of phytochemical and physiological characteristics. Industrial Crops and Products, 163: 113338.
- Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X. and Khan, M.A.R., 2022. Proline, a multifaceted signaling molecule in plant responses to abiotic

2019. Effect of jasmonic acid on physiological and phytochemical attributes and antioxidant enzymes activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Water Deficient. Journal of Medicinal plants, 18(72): 122-134.
- Khalid, H., Abdalla, W.E., Abdelgadir, H., Opatz, T. and Efferth, T., 2012. Gems from traditional north-African medicine: medicinal and aromatic plants from Sudan. Natural products and bioprospecting, 2(3): 92-103.
- Khalil, N., Fekry, M., Bishr, M., El-Zalabani, S. and Salama, O., 2018. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. Plant Physiology and Biochemistry, 123: 65-74.
- Khan, Z., Khan, M.N., Zhang, K., Luo, T., Zhu, K. and Hu, L., 2021. The application of biochar alleviated the adverse effects of drought on the growth, physiology, yield and quality of rapeseed through regulation of soil status and nutrients availability. Industrial Crops and Products, 171: 113878.
- Khazaei, Z., Esmaielpour, B. and Estaji, A., 2020. Ameliorative effects of ascorbic acid on tolerance to drought stress on pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Physiology and Molecular Biology of Plants, 26(8): 1649-1662.
- Latif, F., Ullah, F., Mehmood, S., Khattak, A., Khan, A.U., Khan, S. and Husain, I., 2016. Effects of salicylic acid on growth and accumulation of phenolics in *Zea mays* L. under drought stress. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 66(4): 325-332.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. and Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. Amino acids, 39(4): 949-962.
- Leung, A.Y. and Foster, S., 1996. Encyclopaedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- Maganha, E.G., da Costa Halmenschlager, R., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., de Paula Ramos, A.L.L. and Saffi, J., 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. Food chemistry, 118(1): 1-10.
- Minhas, P.S., Rane, J. and Pasala, R.K., 2017. Abiotic stresses in agriculture: An overview. Abiotic stress management for resilient agriculture, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 3-8.
- Mirshekari, M., Einali, A. and Valizadeh, J., 2017. Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabdariffa* to drought stress in the presence of salicylic acid. Iranian Journal of Plant Biology, 9(2): 21-38.
- Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N.K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food chemistry, 130(4): 1036-1043.
- Mobinikhaledi, A., Asghari, B. and Jabbarpour, M., 2015. Design and synthesis of new benzimidazole and pyrimidine derivatives as α-glucosidase inhibitor. Iranian journal of pharmaceutical research, 14(3): 723.
- Mohammadi, H., Pirmoradi, M.R., Moghaddam, M., Shamshiri, M.H. and Mirzaabolghasemi, M.A., 2022. Effects of salicylic acid on physiological, biochemical, nutrient uptake, and essential oil percentage of *Ocimum basilicum* cv. Keshkeni luvelou under salinity stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 38(3): 464-475.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22: 867-880.
- Piovesana, A., Rodrigues, E. and Noreña, C.P.Z., 2019. Composition analysis of carotenoids and phenolic compounds and antioxidant activity from hibiscus calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. Phytochemical Analysis, 30(2): 208-217.
- Rasheed, D.M., Porzel, A., Frolov, A., El Seedi, H.R., Wessjohann, L.A. and Farag, M.A., 2018. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α-glucosidase inhibition. Food chemistry, 250: 236-244.
- Riaz, G. and Chopra, R., 2018. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. Biomedicine & Pharmacotherapy, 102: 575-586.
- Sedaghat, M., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Emam, Y. and Mokhtassi-Bidgoli, A., 2017. Physiological and antioxidant responses of winter wheat cultivars to strigolactone and salicylic acid in drought. Plant Physiology and Biochemistry, 119: 59-69.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K., 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Current opinion in plant biology, 10(3): 296-302.
- Seraj, R.G.M., Behnamian, M., Ahmadikhah, A., Shariati, V. and Dezhsetan, S., 2021. Chitosan and salicylic acid regulate morpho-physiological and phytochemical parameters and improve water-deficit tolerance in milk thistle (*Silybum marianum* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 43(7): 1-17.

Plants Research, 38(1): 61-80.
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H. and Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. Environmental and Experimental Botany, 61(1): 49-57.
- Yousefvand, P., Sohrabi, Y., Heidari, G., Weisany, W. and Mastinu, A., 2022. Salicylic acid stimulates defense systems in *allium hirtifolium* grown under water deficit stress. Molecules, 27(10): 3083.
- Zarrabi, M., Asghari, B., Maryamabadi, A., Mohebbi, G. and Rashvand, S., 2019. Phytochemical Properties and Inhibitory and Antioxidant Effects of the Decoction, Infusion and Hydro-Alcoholic Extract of *Nepeta Racemosa* on α-Amylase and α-Glucosidase. Iranian South Medical Journal, 22(2): 90-105.
- Zhang, X., Ervin, E.H., Evanylo, G.K. and Haering, K.C., 2009. Impact of biosolids on hormone metabolism in drought-stressed tall fescue. Crop Science, 49(5): 1893-1901.
- Sheyhakinia, S., Bamary, Z., Einali, A. and Valizadeh, J., 2020. The induction of salt stress tolerance by jasmonic acid treatment in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seedlings through enhancing antioxidant enzymes activity and metabolic changes. Biologia, 75(5): 681-692.
- Sindi, H.A., Marshall, L.J. and Morgan, M.R.A., 2014. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. Food Chemistry, 164: 23-29.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smith, B.N., 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of plant physiology, 121(5): 453-461.
- Wright, C.I., Van-Buren, L., Kroner, C.I. and Koning, M.M.G., 2007. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. Journal of ethnopharmacology, 114(1): 1-31.
- Yadegari, M., 2022. Effects of NPK, botamisol, and humic acid on morphophysiological traits and essential oil of three Satureja species under drought stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic