

تأثیر تنش خشکی بر روی تغییرات بیوشیمیایی گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)یوسف رحیمی^۱، علیرضا طالعی^{۲*} و مجتبی رنجبر^۳

۱، ۲، به ترتیب، دانشجوی دکتری و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی - دانشگاه تهران

۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی میکروبی - دانشکده بیوتکنولوژی - دانشگاه تکنولوژی های خاص مدرن آمل.

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۱)

چکیده

کشت گیاهان دارویی مانند نعناعیان به طور چشمگیری در جهان در حال افزایش است. یکی از گیاهان مهم این خانواده، نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بوده، که دلیل اهمیت این گیاه وجود ترکیب منتول در اسانس آن است. در این پژوهش، پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نعناع فلفلی در سطوح مختلف آبیاری شامل: نرمال، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (FC) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۲ بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که آبیاری اثر معنی داری روی غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون دی آلدئید (MDA)، محتوای پروتئین محلول، آنزیم های آنتی اکسیدانی گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سطح احتمال یک درصد داشت؛ در حالی که اثر تیمار آبیاری بر محتوای قندهای محلول معنی دار نبود. بیشترین میزان قند محلول و پروتئین محلول به ترتیب در تیمارهای ۵۰ و ۷۵ درصد FC مشاهده شد. بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون چربی بر حسب MDA در تیمار ۲۵ درصد FC به ترتیب با میزان ۵۹/۶۳ میکرومول بر گرم و ۱۶/۲۵ میکرومول بر گرم مشاهده شد، که تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان APX، CAT، GPX و در سطح ۵۰ درصد FC و با افزایش تنش خشکی کاهش معنی داری پیدا کرد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش تنش افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان آن در آبیاری ۲۵ درصد FC مشاهده گردید. براساس نتایج این پژوهش می توان بیان داشت که نعناع فلفلی به تنش خشکی حساس بوده و پتانسیل لازم جهت افزایش ظرفیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را در تنش های شدید دارا نیست.

واژه های کلیدی: تنش خشکی، نعناع فلفلی، قند محلول، پراکسیداسیون چربی، آنزیم های آنتی اکسیدان.

Effect of water stress on Biochemical changes in *Mentha piperita* L.Yousef Rahimi¹, Alireza Taleei^{2*} and Mojtaba Ranjbar³

1 and 2. PhD student and Professor in Department of Agronomy, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.

3. Assistant Professor of Microbial Biotechnology Department, College of Biotechnology, Special Modern Technological University of Amol, Amol

(Received: October 28, 2017 - Accepted: May 22, 2018)

ABSTRACT

The Cultivation of medicinal plants such as Lamiaceae family has been increasing throughout the world, considerably. Peppermint known as an important species in this family which it's important is due to menthol in the essential oil. In current study the physiological and biochemical responses of peppermint investigated under different levels of irrigation including 100 (as control), 75, 50 and 25 % field capacity (FC) in CRD design with three replications in research greenhouse of Agronomy Department of University of Tehran in 2013 year. The results indicated that, irrigation levels had a high significant effect on hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) ($P \leq 0.01$). While, the effect of irrigation levels was not considerable on soluble sugar content. The highest content of soluble sugar and soluble protein observed at 50 and 75 % FC, respectively. The highest H_2O_2 and MDA (59.63 and 16.25 $\mu\text{mol/g}$) recorded at 25% FC with significant difference in respect to the other treatments. The highest activity of antioxidant enzymes CAT, APX and GPX detected at 50 % FC, then reduced with increasing of drought stress up to 25 % FC. The activity of SOD increased with increasing of the drought stress and peaked at 25 % FC. These results suggest that peppermint is a drought sensitive plant which is unable to increase its enzymatic antioxidant capacity in intense drought stress conditions.

Keywords: Peppermint, Soluble sugar, Lipid peroxidation, Antioxidant enzymes, water stress.

* Corresponding author E-mail: ataleei@ut.ac.ir

مقدمه

نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) با نام رایج Peppermint یکی از گیاهان مهم دارویی است (McKay & Blumberg, 2006). این گیاه بومی اروپا بوده و کشت آن در سرتاسر جهان گسترش پیدا کرده است (Clark & Menary, 1980). این گیاه به عنوان طعم‌دهنده در آدامس‌سازی، صنایع آرایشی، صنایع دارویی و ... استفاده می‌شود (Çoban & Baydar, 2016; De Sousa Guedes et al., 2016). براساس مطالعات انجام‌شده، ماده موثره اصلی گونه *Mentha piperita* منتول (۵۵-۳۰ درصد) می‌باشد. از سایر ترکیبات، می‌توان به متیل‌استات (۱۷/۴ درصد) و منتون (۱۲/۷ درصد) پلی‌گن، منتوفوران، لیمونن و لیمون اشاره کرد (Croteau et al., 2005). در بین متابولیت‌های ثانویه تولیدشده در این گیاه، ترپن‌ها سهم عمده‌ای را به خود اختصاص داده‌اند (Hasani et al., 2015; Çoban & Baydar, 2017; Rahimi et al., 2017). ترپن‌ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل می‌شوند که در آب غیرمحلول بوده و کلیه آنها از واحدهای ۵ کربنی ایزوپرن (۲ و ۵ بوتادی‌ان) مشتق می‌شوند (Breitmaier, 2006). میزان متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر بافت‌های مختلف یک گیاه، مراحل مختلف رشدی، پایه ژنتیکی (کموتایپ)، فصل برداشت، حاصلخیزی و pH خاک، شرایط خشک‌کردن، روش استخراج و شرایط آب و هوایی، تنش خشکی و ... می‌باشد (Razmjoo et al., 2008; Khorasaninejad et al., 2011; Çoban & Baydar, 2016). تنش خشکی در گیاهان باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. برآورد شده است که تقریباً یک درصد از اکسیژن مصرفی در گیاه صرف تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در قسمت‌های مختلف سلول می‌گردد (Cruz et al., 2012; de Carvalho, 2008; Sharma et al., 2012). فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در سلول‌های گیاهی غالباً در مواجهه با تنش‌های محیطی افزایش یافته و از این طریق گیاهان قادرند از خسارت ROS‌های ایجادشده بکاهند (Rasool et al., 2013). از جمله

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیدازها، کاتالاز و آنزیم‌های چرخه گلوتاتیون‌آسکوربات شامل آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز، مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز و آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز اشاره کرد، که نقش اساسی در متابولیسم ROS و جلوگیری از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو به عهده دارند (Foyer & Noctor, 2013). مطالعات قبلی نشان داده است که میزان اسانس گیاهان دارویی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها بسته به شرایط محیطی متغیر است.

در پژوهشی که توسط Hassanpour & Niknam (2014) بر روی پونه (*Mentha pulegium* L.) انجام شد، مشخص گردید که پروتئین محلول برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تنش شدید خشکی کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، قندهای محلول، رنگرزه‌های فتوسنتزی و اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در واکنش به محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و تنش منگنز را در سه زمان ۱، ۳ و ۵ روز بعد از محلول‌پاشی را مورد بررسی قرار دادند، که نتایج نشان داد که تنش منگنز اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و محتوای پرولین برگ‌های گیاه نعناع فلفلی داشته است (Rasouli et al., 2016). در پژوهشی دیگر اثر نوری LED بر عملکرد بوته، اسانس و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سه کلون اصفهان، طبرس و قزوین نعناع فلفلی بررسی شد، نتایج نشان داد که بالاترین وزن تر گیاه در ترکیب نور قرمز و آبی برای کلون اصفهان به دست آمد. تحت تاثیر نور قرمز، درصد اسانس در کلون اصفهان بیش از ۴ برابر شرایط مزرعه بود.

نور آبی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز را در گیاه نعناع به طور معنی‌داری نسبت به سایر محیط‌های رشد افزایش داد (Heidarizadeh et al., 2014). در پژوهشی اثر چهار تیمار آبیاری ۱۰۰، ۸۵، ۷۰، ۶۰ و ۴۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (FC) بر خصوصیات رشدی و عملکرد

اندازه گیری قندهای محلول

سنجش میزان قند محلول با استفاده از روش Irriogyen *et al.* (1992) انجام شد. بدین صورت که ۰/۲ میلی لیتر از عصاره تهیه شده با اتانول به ۳ میلی-لیتر محلول آترونی اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار گرفته و پس از سرد شدن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر سنجیده شد. به منظور تعیین غلظت قند محلول هر نمونه از معادله رگرسیونی رسم شده با استاندارد شامل غلظت‌های مختلف گلوکز استفاده گردید.

سنجش پراکسیداسیون لیپید

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. ۰/۱ گرم بافت تر برگ در ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن شده سپس عصاره حاصل به فالدکون انتقال یافته و به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به یک میلی لیتر از محلول رویی ۴ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود اضافه شد. سپس مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن ماری (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، انکوبه شد. مخلوط حاصل بلافاصله در حمام یخ سرد و بعد از آن با سرعت $6000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین و جذب ناویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از ضریب تصحیح ($\mu \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ۰/۱۵۵ محاسبه و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu \text{mol g}^{-1} \text{FW}$) بیان شد (Health & Packer, 1968).

سنجش میزان پراکسید هیدروژن

استخراج H_2O_2 و سنجش آن بر اساس روش d & Loreto Velikova (2001) صورت گرفت. بدین ترتیب که ۰/۳۵ گرم نمونه‌های گیاهی تازه با نیتروژن مایع در هاون خرد شده تا به صورت پودر در آمدند. پودر

اسانس نعنای فلفلی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان صفات مورفولوژیک و عملکرد اسانس در ابیاری نرمال (۱۰۰ درصد FC) مشاهده شد، بیشترین میزان منتول در سطح ۷۰ درصد FC و بیشترین میزان منتون و منتوفوران در تیمار نرمال مشاهده گردید (Khorasaninejad *et al.*, 2011). با توجه به نتایج حاصل از مطالعات قبلی، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نعنای فلفلی بسته به شرایط محیطی بسیار متغیر بوده و لازم است مطالعات کاملی در جهت تعیین اثرات این عوامل بر ویژگی‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گیرد؛ بنابراین در پژوهش حاضر اثر تنش خشکی به عنوان عامل محدود کننده رشد و تولیدات گیاهی بر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نعنای فلفلی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان

این پژوهش در سال ۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام شد. نشاهای نعنای فلفلی از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (ACECR) تهیه و در بهار ۱۳۹۲ کشت شدند. خاک مورد نظر براساس تحقیقات قبلی لومی-شنی (sandy-loam) بود.

ظرفیت زراعی (FC) خاک مورد نظر برای اعمال سطوح مختلف تنش در آزمایشگاه خاک‌شناسی گروه مهندسی علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تعیین شد و برابر با ۲۴ درصد بود. آزمایش مورد نظر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح آبیاری شامل ۱۰۰ درصد (به عنوان شاهد)، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه در سه تکرار اجرا گردید.

اعمال تیمارها دو هفته بعد از کاشت و استقرار نشاها صورت گرفت، بدین صورت که گلدان‌ها هر روز دوبار وزن شده و مقدار آب لازم جهت رسیدن به ظرفیت زراعی تعیین شده اضافه می‌شد. اعمال تیمارها تا اوایل گلدهی، به مدت دو ماه ادامه پیدا کرد و در این زمان نمونه‌گیری از برگ انجام گرفت.

آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) استفاده شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها

از دستگاه پلیتریدر برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین استفاده شد. برای این منظور یک میلی‌لیتر محلول بردفورد داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی ریخته شد و سپس ۵۰ میکرولیتر به آن عصاره اضافه و پس از ۲۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین غلظت پروتئین نمونه‌های مختلف، از منحنی استاندارد رسم شده با غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتر و به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم از دستگاه اسپکتروفوتومتر ساخت کشور ژاپن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده گردید. محلول‌ها و مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز همانند آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به روش & Chance Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. دستگاه اسپکتروفوتومتر روی ۴۷۰ نانومتر تنظیم و با محلول شاهد که شامل همه مواد ذکر شده به‌استثنای عصاره آنزیم بود، کالیبره شد. فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه و

تهیه‌شده به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرواستیک یک درصد (محلول در حمام یخ قرار داده شد) به تیوب اضافه گردید. تیوب حاوی نمونه هموژنیزه‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شناور رویی، به یک تیوب جدید حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدیدپتاسیم اضافه شده و درب تیوب را بسته و با چندین مرتبه سر و ته کردن، محتوای تیوب، هموژن گردید. مقدار جذب هر نمونه را در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) بیان شد.

استخراج پروتئین کل

استخراج پروتئین کل شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنجش آنها بر اساس روش Vanacker *et al.* (1998)، Giannopolitis & Ries (1977) صورت گرفت. کلیه مراحل استخراج به روی یخ انجام شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها در داخل هاون چینی، مقداری نیتروژن مایع روی آنها ریخته شده و نمونه‌ها توسط هاون به خوبی سائیده و به حالت پودر درآمد. فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری برحسب نمونه‌ها علامت‌گذاری شده و در داخل نیتروژن مایع قرار داده شدند. ۰/۲۵ گرم از پودر حاصل با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شده و به فالكون‌ها منتقل شد، سپس به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج^۱ (بافر فسفات، pH=7.8) افزوده شد. پس از دو دقیقه ورتکس^۲ پودر نمونه‌ها و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه با $g \times 13000$ سانتریفیوژ شدند. در نهایت سوپرناتانت^۳ به دست آمده در داخل تیوب‌های جداگانه ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و داخل نیتروژن مایع فریز شدند. استخراج همه نمونه‌ها در مدت کوتاهی انجام و همواره از بافر تازه استفاده شد. از عصاره به دست آمده برای قرائت مقدار پروتئین کل و سنجش کمی فعالیت

1. Extraction buffer
2. Vortex
3. Supernatant

در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم با روش Ranieri *et al.* (2003) سنجیده شد. در اثر واکنش بین آسکوربات پراکسیداز و اسید آسکوربیک و H_2O_2 دهیدروآسکوربات تولید می‌شود که در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت می‌گردد. محیط واکنش حاوی ۶۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی-مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی-مولار (pH=۷)، ۴۰۰ میکرولیتر اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی-مولار، ۴۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم در طول ۷ دقیقه با فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز طبق روش Dhindsa *et al.* (1981) انجام گرفت. فعالیت این آنزیم به صورت فوتومتریک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷/۸) ۱۰۰ میلی-مولار، متیونین ۱۲ میلی-مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵

میکرومولار، EDTA ۱۰۰ میکرومولار و تریتون ایکس-۱۰۰ ۰/۰۲۵ درصد بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس از بافر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار به میزان ۵ میکرولیتر به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه پلیتریتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ممانعت از این واکنش بررسی می‌شود.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، صفات اندازه‌گیری شده (جدول ۱)، آبیاری، اثر معنی‌داری بر محتوی پراکسید هیدروژن، مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین‌های محلول، آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد داشت. همان‌طور که از جدول ۱ مشخص است، اثر تیمار آبیاری بر محتوی قندهای محلول معنی‌دار نبود.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده در نعنای فلفلی

Table 1. Analysis of variance for physiological traits in peppermint

S.O.V	df	Total Soluble Sugar	H_2O_2	MDA	Total Protein	CAT	APX	GPX	SOD
Irrigation	3	1.53 ^{ns}	0.95 ^{**}	3.25 ^{**}	46.47 ^{**}	28.81 ^{**}	18.39 ^{**}	61.72 ^{**}	46.41 ^{**}
Error	8	0.0054	0.087	0.75	0.965	0.00000204	0.00000307	0.00000134	0.00000041
C.V	-	4.5	5.68	10.15	6.38	18.87	17.16	11.76	12

ns، ** و * به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیر معنی‌دار بودن است.

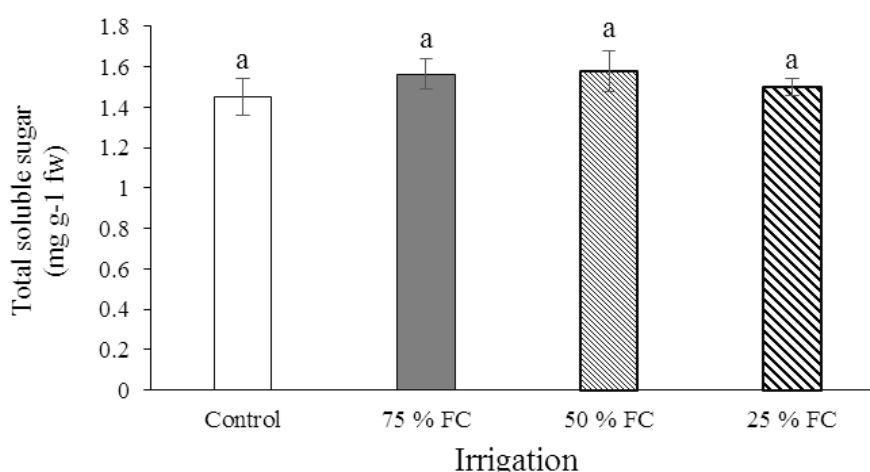
قندهای محلول

تنش خشکی باعث تغییر معنی‌داری در میزان قندهای محلول برگ نعنای فلفلی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها نشد (جدول ۱). بیشترین و کمترین میزان قند محلول به ترتیب در تیمار ۵۰ درصد FC و شاهد مشاهده گردید (شکل ۱). قندها جز ترکیبات محافظت‌کننده اسمزی محسوب می‌شوند که نقش آنها در تنظیم اسمزی و تسهیل جذب آب و حفظ غشاهای سلولی پررنگ می‌باشد. بر اساس نتایج Rhizopoulou & Diamantogolou (1991) کمبود

آب باعث افزایش تجمع قند محلول در برگ‌های مرزنگوش (*Origanum majorana* L.) شد. در واقع می‌توان گفت تجمع بیشتر قند محلول در برگ‌های گیاه باعث سازگاری بیشتر نسبت به تنش خشکی می‌گردد. هرچند که در این پژوهش تنش خشکی به‌طور جزئی باعث افزایش محتوی قند محلول برگ نعنای فلفلی شد اما این افزایش معنی‌دار نبود. در پژوهشی که روی دو رقم ذرت صورت گرفت، مشخص گردید که این گیاه در مواجهه با تنش خشکی میزان قند محلول و پرولین خود را به‌طوری معنی‌داری

فروکتوز به‌عنوان عوامل سازگارکننده در تنش‌های شدید باشد. دلیل اصلی این مساله را می‌توان در کاهش کارایی فتوسنتز و در نتیجه کاهش عرضه قندهای محلول در بافت برگ بیان نمود. با این وجود، تغییر غلظت قندهای محلول در مواجهه با شرایط محیطی از الگوی یکسانی تبعیت نمی‌کند و بسته به ژنوتیپ و شرایط محیط تغییرات خاصی را نشان می‌دهد (Rosa *et al.*, 2009 a; Rosa *et al.*, 2009 b; Sami *et al.*, 2016). به‌عبارت دیگر تمام قندهای محلول نقش یکسانی در متابولیسم سلولی در شرایط تنش ایفا نمی‌کنند (Morsy *et al.*, 2007). به‌عنوان مثال سوکروز و گلوکز به‌عنوان پیش‌ماده‌ای برای تنفس سلولی و همچنین به‌عنوان ترکیبات سازگارکننده جهت حفظ همئوستازی سلول عمل می‌کنند (Gupta & Kaur, 2005). در حالی که به‌نظر می‌رسد فروکتوز کمتر به‌عنوان سازگارکننده عمل کرده و بیشتر در سنتز متابولیت‌های ثانویه نقش داشته باشد، به‌طوری که نشان داده شده است، فروکتوز در سنتز اریتروز-۴-فسفات که پیش‌ماده تولید لیگنین و سایر ترکیبات فنلی است دارای نقش است (Hilal *et al.*, 2004; Gupta & Kaur, 2005).

نسبت به شاهد افزایش می‌دهد (Mohammadkhani & Heidari, 2008). به‌طور کلی نتایج حاصل پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که وقتی تنش خشکی به‌طور تدریجی افزایش پیدا کند، گیاه به‌منظور مقابله با آن، میزان تولید و تجمع متابولیت‌های سازگارکننده از جمله قندهای محلول در اندام‌های مختلف گیاهی افزایش می‌دهد، این فرآیند موجب افزایش پتانسیل اسمزی بافت ریشه و افزایش جذب آب از خاک می‌گردد (Lisar *et al.*, 2012; Lipiec *et al.*, 2013). اما این افزایش در محتوی ترکیبات سازگارکننده در گیاهان مختلف متفاوت بوده و بسته به زمینه ژنتیکی و پتانسیل گیاه متفاوت خواهد بود (Savi *et al.*, 2016). در مقابل مطالعات دیگری نشان داده‌اند که تغییر در عوامل محیطی مانند نور، آب در دسترس، دما و ... باعث کاهش معنی‌داری در میزان قندهای محلول می‌شود (Strand *et al.*, 1999; Gill *et al.*, 2001; Almodares *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009). همان‌طور که از روند تغییرات قندهای محلول در این پژوهش نیز مشخص است، میزان این ترکیبات با افزایش شدت خشکی، افزایش نسبی داشته است که در ادامه با بیشتر شدن تنش، کاهش یافته است. به‌نظر می‌رسد گیاه نعنای فلفلی فاقد پتانسیل بالا جهت افزایش غلظت ترکیباتی مانند سوکروز، گلوکز و



شکل ۱- تغییر در میزان قند محلول برگ‌های نعنای فلفلی تحت چهار تیمار آبیاری

Figure 1. Change in the soluble sugar amount of peppermint leaves under four irrigation treatments

پراکسید هیدروژن

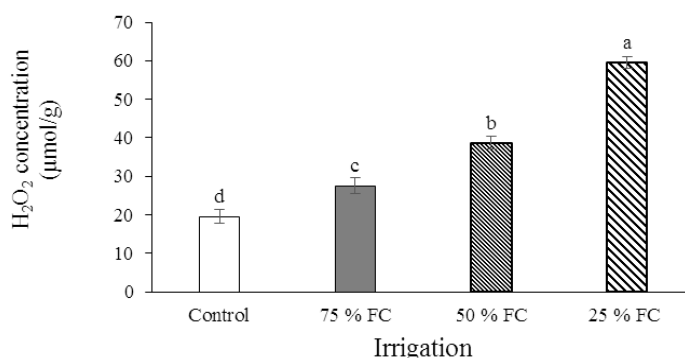
براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۵ درصد FC با میزان $59/63 \mu\text{mol/g}$ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها نشان داد (شکل ۲).

روند تغییرات پراکسید هیدروژن نشان می‌دهد با افزایش سطح تنش خشکی، میزان تولید این ترکیب افزایش یافته است. تغییر در شرایط درون یا برون سلولی باعث افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژنی همانند رادیکال سوپراکسید، H_2O_2 ، رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن سینگل، هیدروپروکسید چربی‌ها و دیگر گونه‌های فعال مرتبط با آنها می‌شود (Cruz et al., 2008). با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون سلول، میزان فعالیت آنزیم‌های NADPH اکسیداز متصل به غشاء پلاسمایی، پراکسیدازهای متصل به دیواره سلولی و آمینو اکسیدازها در آپوپلاست افزایش می‌یابد (Anjum et al., 2011).

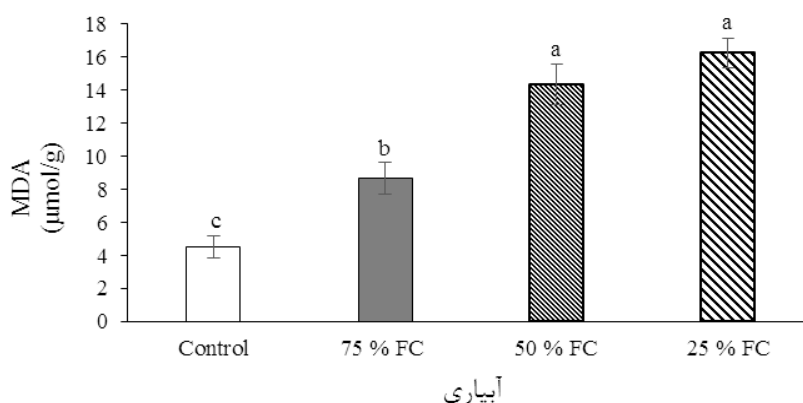
تولید رادیکال سوپراکسید در قسمت‌های مختلف سلول مانند کلروپلاست، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و نقاط دیگر سلول صورت می‌گیرد. احیا یک ظرفیتی سوپر اکسید باعث تولید H_2O_2 می‌شود که به آن واکنش دیسموتاسیون گفته می‌شود. بنابراین افزایش تولید رادیکال سوپراکسید به نوبه خود باعث افزایش تولید H_2O_2 می‌گردد (Miller et al., 2010; Anjum et al., 2011).

مالون دی‌آلدئید

میزان پراکسیداسیون چربی غشا براساس محتوی مالون دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد، نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده اثر معنی‌دار تیمار آبیاری بر پراکسیداسیون چربی در گونه نعناع‌فلغلی بود (جدول ۱). به طوری که با افزایش سطح تنش خشکی میزان تولید این ماده نیز افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید در سطح تنش ۲۵ درصد FC یا تنش شدید مشاهده گردید. هرچند که تفاوت معنی‌داری بین سطح ۵۰ و ۲۵ درصد FC یافت نشد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و آسیب به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلولی می‌گردد (Nath et al., 2017). آسیب‌دیدگی غشای سلولی براساس میزان تولید مالون دی‌آلدئید اندازه‌گیری می‌شود. تحقیقات مختلف نشان داده که تولید مالون دی‌آلدئید در گیاهان حساس و متحمل به تنش خشکی متفاوت است (Fazeli et al., 2007; Svetleva et al., 2012). افزایش میزان این ترکیب در تیمار ۷۵ درصد FC حدود دو برابر بوده است، بنابراین می‌توان گفت سیستم پاک‌سازی ROS‌های تولید شده در تنش ملایم و جلوگیری از خسارات آنها به غشای سلولی در نعناع‌فلغلی به‌طور موثری صورت نگرفته است. البته میزان خسارت در تنش‌های ۵۰ و ۲۵ درصد FC به مراتب بیشتر و میزان تولید این ترکیب نیز بیشتر بوده است.



شکل ۲- تغییر در میزان پراکسید هیدروژن برگ‌های نعناع‌فلغلی تحت چهار تیمار آبیاری
Figure 2. Change in the H_2O_2 amount of peppermint leaves under four irrigation treatments



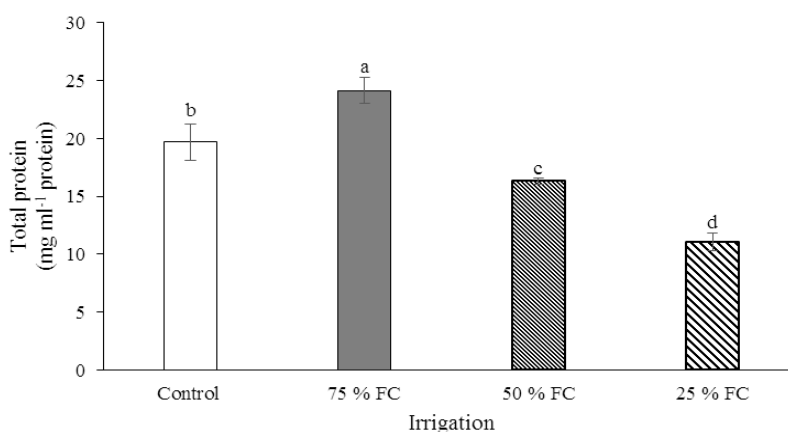
شکل ۳- تغییر در میزان پراکسید هیدروژن برگ‌های نعناع‌فلغلی تحت چهار تیمار آبیاری

Figure 3. Changes in the MDA content of peppermint leaves exposure four irrigation treatments

انرژی سلول در ساخت دسته کوچکی از پروتئین‌های مخصوص مقابله با تنش می‌باشد (Lascano *et al.*, 2001; Ghorbanli *et al.*, 2013). تنش خشکی یکی از عوامل محیطی بوده که منجر به کاهش رشد و تولیدات گیاهی می‌شود، چگونگی ایجاد سازش در گیاهان در مقابله با این تنش دارای پیچیدگی‌های فراوان بوده و این مساله تحت تأثیر پارامترهای درونی و بیرونی گیاه قرار دارد (Todaka *et al.*, 2015).

پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با افزایش شدت تنش در ابتدا افزایش و سپس روند نزولی داشت؛ به طوری که بیشترین میزان محتوای پروتئین کل در تنش ۷۵ درصد FC و کمترین آن در تیمار ۲۵ درصد FC مشاهده گردید (شکل ۴). به طور معمول غلظت پروتئین کل گیاهان در مواجهه با انواع تنش‌ها دچار تغییرات خاصی می‌شود، که این تغییرات ناشی از تجزیه و یا مهار سنتز برخی از پروتئین‌ها و به‌کارگیری



شکل ۴- تغییر در میزان پروتئین کل برگ‌های نعناع‌فلغلی تحت چهار تیمار آبیاری

Figure 4. Change in the total protein amount of peppermint leaves under four irrigation treatments

افزایش محتوای پروتئین کل می‌تواند ناشی از افزایش بیوسنتز پروتئین برای سازش با شرایط جدید و تحمل تنش باشد، کاهش پروتئین طی تنش‌های شدیدتر نیز می‌تواند ناشی از کاهش سنتز

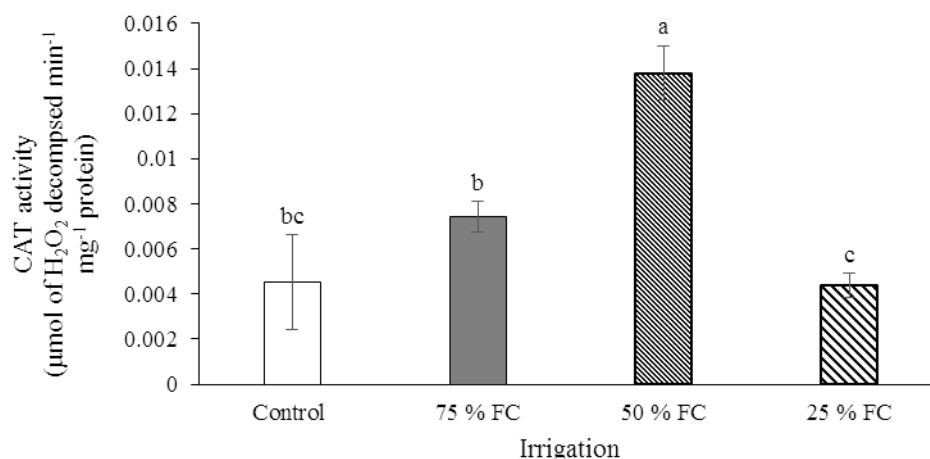
افزایش محتوای پروتئین کل در تنش شوری ۱۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار در گیاه *Aeluropus lagopoides* مشاهده شد و با افزایش سطح شوری در ۷۵۰ میلی‌مولار محتوای پروتئین کل کاهش یافت (Sobhanian

میزان فعالیت آن در سطح ۲۵ درصد FC بود. در واقع کاتالاز یک آنزیم تترامر دارای چهار اتم آهن بوده که عمل تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب را کاتالیز می‌کند. افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان یک ویژگی سازشی بوده که با کاهش میزان هیدروژن پراکسید حاصل از متابولیسم سلولی از آسیب‌رسیدن به بافت جلوگیری می‌کند (Sekmen *et al.*, 2014). فعالیت این آنزیم در گیاه پونه در مرحله رویشی با افزایش سطح تنش خشکی افزایش یافته و در تنش شدید به بیشترین حد فعالیت خود رسید (Hassanpour *et al.*, 2012). کاهش فعالیت این آنزیم در تنش‌های شدید خشکی ممکن است ناشی از غیر-فعال‌سازی نوری، تجزیه آنزیم به وسیله برخی پروتئازها و یا پیشگیری از سنتز این رخ دهد (Luna *et al.*, 2005). از طرف دیگر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه پونه معطر تحت تنش شوری (با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار) و تیمار با پینکونازول گزارش شده است (Merati *et al.*, 2014).

پروتئین، کاهش دسترسی به آمینواسیدها و تغییر شکل ساختمان آنزیم‌ها طی سنتز پروتئین‌ها باشد (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007;) (Rollins *et al.*, 2013). کاهش پروتئین کل در تنش شدید خشکی در گیاهانی نظیر پونه (Hassanpour & Niknam, 2014)، ذرت (Mohammadkhani & Hu (2008)، علف دوروا (*Bermuda grass*) (Heidari, 2010) و نخود (Mafakheri, 2011) نیز مشاهده شده است.

آنزیم کاتالاز

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر چهار تیمار آبیاری تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۱)، روند فعالیت آنزیم ابتدا به صورت افزایشی و سپس کاهش بود، به طوری که با افزایش سطح تنش تا ۵۰ درصد FC، روند همچنان افزایشی و با افزایش تنش به حد ۲۵ درصد FC میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت (شکل ۵). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۵۰ درصد FC و کمترین



شکل ۵- تغییر در فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های نعناع‌فلغلی تحت چهار تیمار آبیاری

Figure 5. Change in the cat activity of peppermint leaves under four irrigation treatments

پراکسیداز همانند آنزیم کاتالاز با افزایش شدت تنش خشکی، افزایش پیدا کرد، به طوری که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۵۰ درصد FC مزرعه بود (شکل ۶). اما با بیشتر شدن تنش و رسیدن به سطح

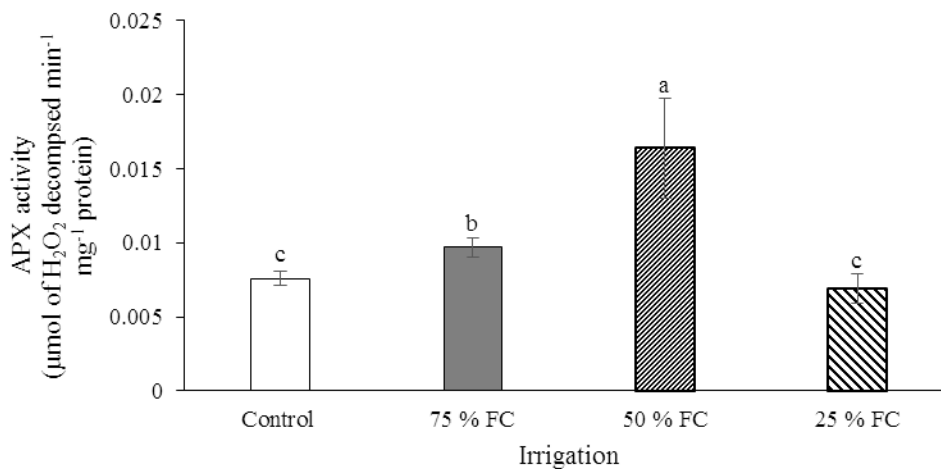
آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر چهار سطح آبیاری تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۱). فعالیت آنزیم آسکوربات

هیدروژن را بر عهده دارند، اما تمایل آسکوربات پراکسیداز برای پراکسید هیدروژن نسبت به سایر پراکسیدازها بالاتر بوده و می‌تواند نقش ویژه‌ای را در تنظیم میزان ROS در شرایط تنش داشته باشد (Yang *et al.*, 2008; Maruta *et al.*, 2016). افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مرحله زایشی نسبت به مرحله رویشی در گیاه نخود (Cicer *arietinum*) تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Mafakheri, 2011). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر (Mentha *pulegium* L.) تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Hassanpour & Niknam, 2014). همچنین افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه پونه معطر تحت تنش شوری (با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار) و تیمار با پینکونازول گزارش شده است (Merati *et al.*, 2014).

۲۵ درصد FC، میزان فعالیت این آنزیم نیز کاهش پیدا کرد و کمترین میزان فعالیت را در این سطح از تنش نشان داد. افزایش فعالیت APX باعث تجزیه بیشتر H_2O_2 و تحمل بیشتر گیاه در برابر صدمات اکسایشی القا شده به وسیله تنش می‌شود. ژن‌های APX که پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی از قبیل خشکی و سرما می‌باشد، نقش مهمی در حفاظت اجزای سلولی در برابر تنش اکسایشی ایفا می‌کند و می‌توان از طریق افزایش بیان ژن APX تحمل گیاهان را نسبت به تنش‌های اکسایشی افزایش داد (Jin *et al.*, 2006).

از طرف دیگر محصول واکنش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یعنی H_2O_2 سوپسترای فعالیت این آنزیم می‌باشد. بنابراین H_2O_2 می‌تواند نقش سیگنال را برای القای APX ایفا کند (Faize *et al.*, 2011). به‌طور کلی آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نقش جارو کردن پراکسید



شکل ۶- تغییر در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های نعناع‌فلفلی تحت چهار تیمار آبیاری
Figure 6. Change in the APX activity of peppermint leaves under four irrigation treatments

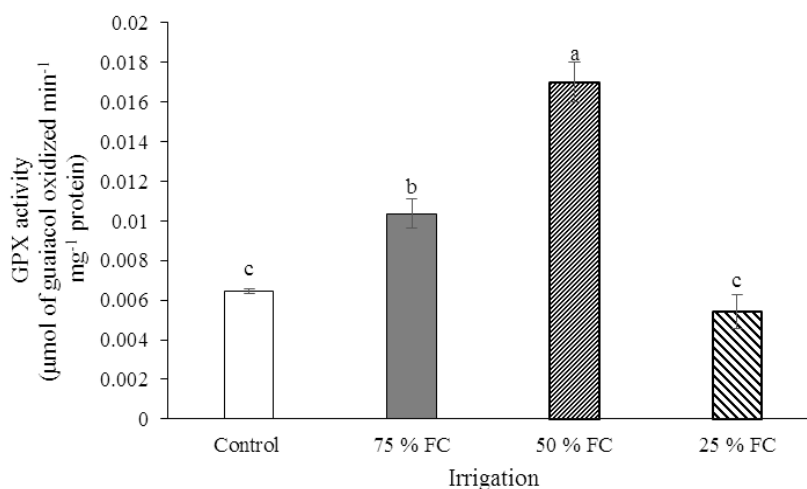
کرد، به‌طوری که فاقد اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد بود و کمترین میزان فعالیت در این سطح از تنش مشاهده گردید (شکل ۷). پراکسیدازها از جمله آنزیم GPX که در سیتوپلاسم سلولی و آپوپلاسم یافت می‌شوند در دامنه وسیعی از فرآیندهای مرتبط با رشد و توسعه گیاه نقش دارند (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2012). افزایش فعالیت آنزیم‌های APX، GPX و

آنزیم گایاکول پراکسیداز

براساس نتایج به‌دست آمده، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش شدت تنش خشکی، افزایش پیدا کرد، به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم همانند سایر آنزیم‌ها در سطح ۵۰ درصد FC مشاهده شد، اما با بیشتر شدن تنش و رسیدن به سطح ۲۵ درصد FC، میزان فعالیت این آنزیم نیز کاهش پیدا

2011). همچنین افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اندام‌های ریشه و برگ گیاه پونه معطر تحت تنش شوری (با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار) مشاهده شد (Oueslati *et al.*, 2010). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و همچنین محتوی آسکوربات، کلروفیل و کاروتنوئید تحت شرایط کمبود Mn^{+2} در گیاه نعنای فلفلی به طور معنی داری نسبت به شاهد پایین تر بود (Candan & Tarhan, 2011).

PPO تحت تنش نشان دهنده این است که این آنزیم‌ها نقش کلیدی در حذف گونه‌های فعال اکسیژن دارند. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه نعنای فلفلی تحت شرایط کمبود مس نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد، همچنین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت مس، افزایش یافت و این درحالی بود که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز دارای روند نزولی بود (Candan & Tarhan, 2011).



شکل ۷- تغییر در فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌های نعنای فلفلی تحت چهار تیمار آبیاری
Figure 7. Change in the GPX activity of peppermint leaves under four irrigation treatments

تنش خشکی (نرمال، ۰/۷۵، ۰/۵۰، ۰/۲۵ ظرفیت زراعی) منجر به افزایش فعالیت این آنزیم در دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر شد و سطح فعالیت این آنزیم در اندام ریشه بیشتر از برگ بود (Niknam & Hassanpour 2014). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی در گیاه گندم نیز مشاهده شده است (Türkan *et al.*, 2005) سطح فعالیت این آنزیم در مرحله رویشی گیاه پونه معطر در شرایط تنش شدید خشکی تا ۹۶ درصد در برگ‌ها افزایش نشان داد (Hassanpour *et al.*, 2012). میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه پونه معطر تحت شرایط غرقابی نسبت به شاهد کمتر بوده است (Candan & Tarhan, 2011). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز همچنین محتوی آسکوربات، کلروفیل و کاروتنوئید تحت شرایط کمبود Mn^{+2} در

سوپراکسید دیسموتاز

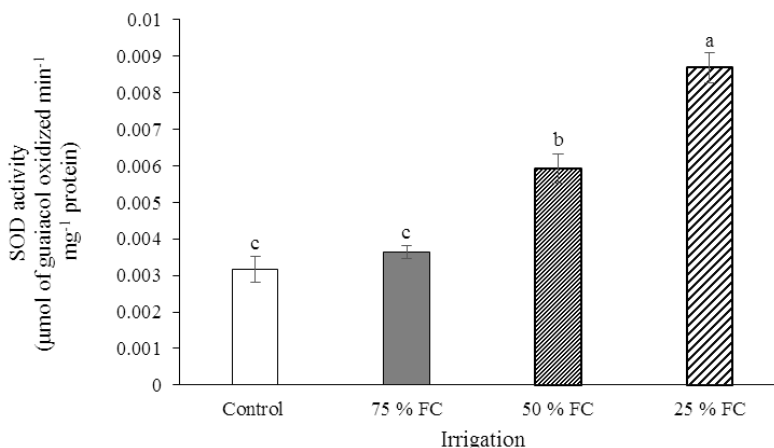
میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تأثیر چهار سطح آبیاری تفاوت معنی داری را در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۱). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش شدت تنش، افزایش پیدا کرده، به طوری که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ۲۵ درصد FC مشاهده شد. بر خلاف سایر آنزیم‌های اندازه‌گیری شده میزان فعالیت این آنزیم با افزایش شدت تنش کاهش پیدا نکرد (شکل ۸).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی سیستم آنتی‌اکسیدانی در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن فعال شده و باعث تبدیل رادیکال O_2^0 به H_2O_2 می‌شود، در ادامه H_2O_2 ایجاد شده به مولکول آب و اکسیژن تجزیه می‌گردد که این عمل توسط آنزیم کاتالاز انجام می‌شود (Gratao *et al.* 2005).

که فعالیت سایر آنزیم‌ها روندی نزولی و یا ثابت داشت (Candan & Tarhan, 2012).

افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه پونه معطر تحت تنش شوری (با غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار) و حضور پنتکونازول نیز گزارش شده است (Merati et al., 2014).

گیاه نعناع‌فلغلی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد پایین‌تر بود (Candan & Tarhan, 2011). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه نعناع-فلغلی تحت شرایط کمبود مس نسبت به شاهد مشاهده شده است، همچنین میزان فعالیت این آنزیم با افزایش غلظت مس، افزایش پیدا کرده است درحالی



شکل ۸- تغییر در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های نعناع‌فلغلی تحت چهار تیمار آبیاری
Figure 8. Change in SOD activity of Peppermint Leaves under Four Irrigation Treatments

بالایی را با غلظت پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید نشان داد (به ترتیب $r=0.992^{**}$ و $r=0.925^*$). در واقع آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال سوپراکسید تولید شده در اثر تنش را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. لذا افزایش فعالیت این آنزیم حتی در سطوح شدید خشکی، افزایش تولید پراکسید هیدروژن را به دنبال داشته است، هر چند که بخشی زیادی از پراکسید هیدروژن به‌عنوان پیامد مستقیم تنش بعد از ورود یون کلسیم به درون سیتوپلاسم تولید می‌گردد (Foyer & Noctor, 2009). پراکسید هیدروژن تولید شده در سیتوپلاسم به‌دلیل غلظت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بلافاصله تجزیه می‌شود، اما بخشی از آن وارد فضای آپوپلاستی شده و به‌دلیل کم‌بودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این بخش، غلظت آن به مراتب بیشتر از سیتوپلاسم خواهد شد (Foyer & Noctor, 2009). در پژوهشی بر روی *Agropyron desertorum* در شرایط خشکی، ثابت شد که همبستگی مثبت و بالایی بین افزایش سطح گونه‌های

همبستگی

نتایج همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که بیشترین میزان همبستگی مثبت و معنی‌دار بین فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بوده است ($r=0.997^{**}$)، با این وجود آنزیم گایاکول پراکسیداز همبستگی مثبت و بالایی با آنزیم‌های کاتالاز ($r=0.994^{**}$) و همچنین آسکوربات پراکسیداز ($r=0.99^{**}$) نشان داد (جدول ۲). همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است، افزایش غلظت H_2O_2 باعث افزایش سطح خسارت به غشای سلولی و افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید شده است. از طرف دیگر افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن و خسارت به غشای سلولی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را به‌همراه داشته است. اما با این وجود می‌توان گفت پایداری و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تنش خشکی به مراتب از سایر آنزیم‌ها بیشتر بوده، به‌طوری که همبستگی

مرحله اول و سپس آنزیم سوپراکسید دیسموتاز همراه خواهد شد (Demidchik, 2015). بنابراین می‌توان گفت، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سیتوپلاسم و فضای آپوپلاستی، فعالیت همزمان آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیدازها را در پی خواهد داشت.

همچنین بخشی از پراکسید هیدروژن تولید شده با تاثیر بروی گیرنده‌هایی مانند فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی، باعث انتقال پیام تنش خواهد شد (Miller & Mittler, 2006; Ohama et al., 2017).

فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز وجود دارد (Tatari et al., 2012). همچنین نتایج Hosseini et al. (2015) نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط تنش خشکی وجود دارد.

مطالعات قبلی نشان داده است، افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در سیتوپلاسم و فضای آپوپلاستی که ناشی از بروز تنش و افزایش ورود یون کلسیم به درون سلول است، با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در

جدول ۲- ضریب‌های همبستگی بین صفات بیوشیمیایی نعناع‌فللی

Table 2. Correlation coefficient of biochemical parameters in peppermint

Traits	Total Soluble Sugar	H ₂ O ₂	MDA	Protein	CAT	APX	GPX	SOD
Total Soluble Sugar	1							
H ₂ O ₂	0.149	1						
MDA	0.467	0.927*	1					
Protein	0.192	-0.861	-0.758	1				
CAT	0.092	0.483	0.329	0.460	1			
APX	0.770	-0.064	0.309	0.071	0.997**	1		
GPX	0.826	-0.125	0.255	0.187	0.994**	0.990**	1	
SOD	0.103	0.992**	0.925*	-0.915*	-0.007	-0.029	-0.105	1

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد است.

۲/۷۵ برابری نسبت به شاهد نشان داد. لذا می‌توان گفت این آنزیم نقش مهمی را در تحمل خشکی در گیاه نعناع‌فللی ایفا می‌کند. همچنین در سطوح مختلف تنش خشکی، میزان قندهای محلول افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت؛ بنابراین به‌طور کلی می‌توان گفت این گیاه به تنش خشکی حساس بوده و کشت آن در مناطق با میزان آب کافی، راندمان بهتری از نظر تولید در واحد سطح و همچنین بهبود وضعیت بیوشیمیایی آن در پی خواهد داشت.

نتیجه‌گیری کلی

براساس یافته‌های این پژوهش، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نعناع‌فللی تا سطح تنش ۵۰ درصد ظرفیت‌زراعی افزایش پیدا کرد، اما در تنش شدیدتر میزان تولیدات پروتئینی آن تا حد زیادی کاهش یافت. از طرف دیگر با افزایش شدت تنش، میزان تولید H₂O₂ افزایش و پراکسیداسیون چربی‌های غشا نیز افزایش معنی‌داری پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بود، که در شرایط ۲۵ درصد ظرفیت‌زراعی افزایش

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Almodares, A., Hadi, M. R. & Dosti, B. (2008). The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. *Research Journal of Environmental Sciences*, 2(4), 298-304.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C. & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural*

- Research*, 6(9), 2026-2032.
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
 5. Breitmaier, E. (2006). Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, 1-9.
 6. Candan, N. & Tarhan, L. (2011). Influence of manganese deficiency on metal ion uptake, antioxidant defense mechanism and lipid peroxidation levels in *Mentha piperita* leaves. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 53(1), 20-25.
 7. Candan, N. & Tarhan, L. (2012). Alterations of the antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation levels, chlorophyll and carotenoid contents along the peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves exposed to copper deficiency and excess stress conditions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83(2), 103-109.
 8. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology*, 2, 764-775.
 9. Clark, R. J. & Menary, R. C. (1980). Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Effect of day length, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. *Functional Plant Biology*, 7(6), 685-692.
 10. Çoban, Ö. & Baydar, N. G. (2016). Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. *Industrial Crops and Products*, 86, 251-258.
 11. Çoban, Ö. & Baydar, N. G. (2017). Brassinosteroid Modifies Growth and Essential Oil Production in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 43-49.
 12. Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L. & Wildung, M. R. (2005). Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, 92(12), 562-577.
 13. Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
 14. Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
 15. De Sousa Guedes, J. P., da Costa Medeiros, J. A., e Silva, R. S. D. S., de Sousa, J. M. B., da Conceição, M. L. & de Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *Mentha piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183-192.
 16. Dhindsa, RS., Plumb-Dhindsa, P. & Thorpe, TA. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
 17. Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G. & Hernandez, J. A. (2011). Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of experimental botany*, 32(2): 231-238.
 18. Fazeli, F., Ghorbanli, M. & Niknam, V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, 51(1), 98-103.
 19. Foyer, C. H. & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 861-905.
 20. Foyer, C. H. & Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16): 2087-2090.
 21. Gupta, A. K. & Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of biosciences*, 30(5), 761-776.
 22. Ghorbanli, M., Gafarabad, M., Amirkian, T. & Mamaghani, B. A. (2013). Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 3, 651-658.
 23. Giannopolitis, C. N. & Ries., S.K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
 24. Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P. & Bhullar, S. S. (2001). Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27(1-2), 72-84.
 25. Gratao, P., Polle, A., Lea, P. & Azevedo, R. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32: 481-494.
 26. Hasani, M., Nouri, M., Hakimzadeh, V. & Maleki, M. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Mentha piperita* endemic in Khorasan-

- Iran. *BioTechnology: An Indian Journal*, 11(5), 197-200.
27. Hassanpour, H. & Niknam, V. (2014). Investigation of drought stress effect on growth and antioxidant enzymes activity in *Mentha pulegium* L. *Journal of plant process and function*. Vol. 3. (8), 25-34. (In Farsi)
 28. Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta physiologiae plantarum*, 34(4), 1537-1549.
 29. Heath, R.L. & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
 30. Heidarizadeh, P., Zahedi, M. & Sabzalian, M.R. (2014). Effect of LED light on plant yield, essential oil percentage and antioxidant enzymes activity in *Mentha piperita* L. *Journal of plant process and function*. 3 (3):13-24. (In Farsi)
 31. Hilal, M., Parrado, M. F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E. M. & Prado, F. E. (2004). Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in Response to UV-B Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 79(2), 205-210.
 32. Hosseini, S. M., Hasanloo, T. & Mohammadi, S. (2015). Physiological characteristics, antioxidant enzyme activities, and gene expression in 2 spring canola (*Brassica napus* L.) cultivars under drought stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(3), 413-420. Chicago
 33. Hu, L., Wang, Z., Du, H. & Huang, B. (2010). Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common Bermuda grass genotypes differing in drought tolerance. *Journal of plant physiology*, 167(2), 103-109.
 34. Irriogyen, J.H., Emerich, D.W. & Sanchez Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plant. *Physiologia plantarum*. 84: 55-66.
 35. Jin, J., Shan, N., Ma, N., Bai, J., & Gau, J. (2006). Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. *Postharvest biology and technology*, 40(3): 236-242.
 36. Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K. & Khalighi, A. (2011). The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5360-5365.
 37. Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gómez, L. D., Racca, R. W. & Casano, L. M. (2001). Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Functional Plant Biology*, 28(11), 1095-1102.
 38. Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. & Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*, 27(4), 463-477.
 39. Lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M. & Rahman, I. M. (2012). Water stress in plants: causes, effects and responses. *In Water Stress in Tech*. pp. 1-14.
 40. Loreto, F. & Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127(4): 1781-1787.
 41. Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. & Foyer, C. H. (2005). Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of experimental botany*, 56(411), 417-423.
 42. Mafakheri, A. (2011). Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1255-1260.
 43. Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. & Ishikawa, T. (2016). Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: More than just a classical antioxidant enzyme? *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1377-1386.
 44. McKay, D. L. & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.
 45. Merati, M. J., Hassanpour, H., Niknam, V. & Mirmasoumi, M. (2014). Exogenous application of penconazole regulates plant growth and antioxidative responses in salt-stressed *Mentha pulegium* L. *Journal of plant interactions*, 9(1), 791-801.
 46. Miller, G. A. D. & Mittler, R. O. N. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. *Annals of Botany*, 98(2), 279-288.
 47. Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-yilmaz, S., & Mittler, R. O. N. (2010). Reactive oxygen species

- homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
48. Mohammadkhani, N. & Heidari, R. (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 448-453.
 49. Morsy, M. R., Jouve, L., Hausman, J. F., Hoffmann, L. & Stewart, J. M. (2007). Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of plant physiology*, 164(2), 157-167.
 50. Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R. & Tuteja, N. (2017). *Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism and Signaling in Plant-Mycorrhizal Association under Biotic and Abiotic Stress Conditions*. In *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials* (pp. 223-232). Springer, Cham.
 51. Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science*, 22(1), 53-65.
 52. Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R. & Lachaal, M. (2010). Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(2), 289-296.
 53. Rahimi, Y., Taleei, A. & Ranjbar, M. (2017). Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 203.
 54. Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. & Soldatini, G. F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2529-2540.
 55. Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T. O. & Ahmad, P. (2013). Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 1039-1050.
 56. Rasouli, D., Solouki, M., Fakheri, B. & Esmaelzadeh, B. S. (2016). Evaluation of antioxidant enzymes activities, proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and essential oils of *Mentha piperita* L. in response to foliar application of salicylic acid and manganese stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32:(1), 71-82. (In Farsi)
 57. Razmjoo, K. H., Heydarizadeh, P. & Sabzalian, M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 10(4), 451-454.
 58. Rhizopoulou, S., & Diamantoglou, S. (1991). Water stress-induced diurnal variations in leaf water relations, stomatal conductance, soluble sugars, lipids and essential oil content of *Origanum majorana* L. *Journal of Horticultural Science*, 66(1), 119-125.
 59. Rollins, J. A., Habte, E., Templer, S. E., Colby, T., Schmidt, J. & Von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany*, 64(11), 3201-3212.
 60. Rosa, M., Hilal, M., González, J. A. & Prado, F. E. (2009 a). Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose–starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), 300-307.
 61. Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M. & Prado, F. E. (2009 b). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling & behavior*, 4(5), 388-393.
 62. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A. & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54-61.
 63. Savi, T., Casolo, V., Luglio, J., Bertuzzi, S., Gullo, M. A. L. & Nardini, A. (2016). Species-specific reversal of stem xylem embolism after a prolonged drought correlates to endpoint concentration of soluble sugars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 198-207.
 64. Sekmen, A. H., Ozgur, R., Uzilday, B. & Turkan, I. (2014). Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and experimental botany*, 99, 141-149.
 65. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012. Article ID 217037, 26 pages, 2012.
 66. Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
 67. Sobhanian, H., Motamed, N., Jazii, F. R., Nakamura, T. & Komatsu, S. (2010). Salt stress induced

- differential proteome and metabolome response in the shoots of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae), a halophyte C4 plant. *Journal of proteome research*, 9(6), 2882-2897.
68. Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P. & Stitt, M. (1999). Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119(4), 1387-1398.
69. Svetleva, D., Krastev, V., Dimova, D., Mitrovska, Z., Miteva, D., Parvanova, P. & Chankova, S. (2012). Drought tolerance of Bulgarian common bean genotypes, characterized by some biochemical markers for oxidative stress. *Journal of Central European Agriculture*, 18: 13(2), 349-361.
70. Tatari, M., Fotouhi-Ghazvini, R., Etemadi, N. A., Ahadi, A. M. & Mousavi, A. (2012). Analysis of antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation and proline content of *Agropyron desertorum* under drought stress. *South Western Journal of Horticulture. Biology and Environment*, 3(1), 9-24.
71. Tayefi-Nasrabadi, N. H., Oushani, A. K. & Enferadi, M. H. N. (2012). Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 38(2): 413-419.
72. Todaka, D., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in plant science*, 6. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6: 84.
73. Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
74. Vanacker, H., Carver, T. L. & Foyer, C. H. (1998). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, 117(3), 1103-1114.
75. Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. & Wang, J. (2008). Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 433-440.