Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 3, Autumn 2018 (715-727)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.238562.1291

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۷ (ص ۷۲۷-۷۱۵)

تأثیر تنش کم‌آبی بر خصوصیات عملکردی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های نعناع‌فلفلی (*Mentha piperita* L.)

غلامرضا عبدی[۱]، مجید شکرپور[۲*]، سید علیرضا سلامی[۳] و سینزیا مارگاریتا برتائه[٤]
۱، ۲ و۳. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٤. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تورین، ایتالیا
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٥/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٦/۱٥)

چکیده

گیاهان دارویی منابع ارزشمند آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل برخی ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی هستند و دارای پتانسیل بالا به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشند. دمنوش نعناع‌فلفلی (*Mentha piperita*) یکی از غنی‌ترین منابع آنتی‌اکسیدان در دنیا به‌شمار می‌آید. با استفاده از کم‌آبی می‌توان خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه را تغییر داد. در این پژوهش، گیاهان نعناع‌فلفلی به‌مدت چهار ماه در معرض سه سطح آبیاری (شاهد، تنش ملایم و شدید به‌ترتیب۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت‌زارعی) قرار گرفتند. هر دو سطح تنش کم‌آبی، باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع بوته، وزن تر و خشک برگ و طول و عرض برگ شد. همچنین در اثر تنش کم‌آبی، مقدار ترکیب‌های فنولیک، میزان متابولیت‌های ثانویه (فنل کل و فلاونوئید کل) و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نعناع‌فلفلی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در بین دو سطح تنش مورد استفاده، تنش شدید تأثیر بیشتری را نشان داد. برخی از ترکیب‌های فنولیک مانند کوئرستین، کومارین و لوتئولین فقط در شرایط تنش کم‌آبی شناسایی گردیدند. همچنین تنش کم‌آبی تغییر مقادیر برخی اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب غیراشباع را به‌دنبال داشت. درکل تنش کم‌آبی منجر به افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و برخی ترکیب‌های فعال زیستی نعناع‌فلفلی گردید.

واژه‌های کلیدی: **ارزش زیستی، عصاره آبی، ترکیب‌های فنولیک، فلاونوئید، رزمارینیک اسید.**

Effect of water deficit stress on yield characteristics, antioxidant capacity and metabolite profile of peppermint (*Mentha piperita* L.)

Gholamreza Abdi[1], Majid Shokrpour[2*], Seyed Alireza Salami[3] and Cinzia M. Bertea[4]
1, 2, 3. Former Ph. D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Professor, Plant Physiology Unit, Department of Plant Biology, University of Turin, Innovation Centre, Via Quarello 11/A 10135 Turin, Italy
(Received: Jul. 25, 2017 - Accepted: Sep. 6, 2017)

ABSTRACT

Medicinal Plants are almost reach sources of natural antioxidants such as terpenoids and phenolic compounds and have great potential as an alternative for synthetic antioxidants against oxidative stresses. Peppermint (*Mentha piperita*) infusion is a valuable worldwide source of antioxidants. The antioxidant property can be enhanced by inducing abiotic stresses. This experiment was conducted to evaluate prolong (4 months) water deficit stress (no stress, mild stress and severe stress as 100, 75 and 50% of field capacity, respectively) on cultivated peppermint on plant growth, secondary metabolite profile and antioxidant capacity of peppermint infusions. Both water deficit stress treatment decresed plant height, leaf wet and dry weight and leaf size significantly. Also, water deficit stress increased antioxidant capacity, total phenolic and flavonoid contents significantly. Some phenolic compounds such as quercetin, coumaric acid and luteolin were detected only in water-deficit conditions. Also, the amount of some identified amino acids and unsaturated fatty acids were changed under water deficit stress. Therefore, inducing water stress can enhance the biological value of peppermint and improve bioactive compounds and the antioxidant capacity of peppermint extract.

Keywords: Biological value, Flavonoid, Infusion, Phenolic compounds, Rosmarinic acid.

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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استفاده از دمنوش‌های گیاهی در جهان به‌دلیل استفاده از ترکیبات فنلی آنها رواج بسیاری دارد. این ترکیبات به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در غذای انسان‌ها به‌شمار می‌آیند و به‌دلیل سودمندی این ترکیبات برای سلامتی انسان‌ها، مصرف مداوم آنها در جیره غذایی روزانه توصیه می‌گردد. یکی از معروف‌ترین دمنوش‌های گیاهی در دنیا دمنوش نعناع‌فلفلی است. نعناع‌فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. و نام عمومی Peppermint از تیره Lamiaceae ازجمله گیاهان دارویی و معطر علفی چندساله است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی دارد. از جمله ترکیب‌های موجود در اسانس نعناع‌فلفلی می‌توان منتول، منتون، سینئول، اوسمین، کاریوفیلن، پیپرتون، ایزومنتول، منتیل استات، پولگون و منتفوران اشاره نمود (Hussain *et al*., 2010; Mimica-Dukic *et al*., 2003). از دیگر ترکیبات مهم نعناع‌فلفلی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن است. به‌طور متوسط ۱۹-۲۳٪ وزن خشک برگ نعناع‌فلفلی را ترکیبات فنولی و ۱۲٪ آن را ترکیبات فلاونوئیدی مانند اریوسیترین، رزمارینیک‌اسید، هیسپریدین و لوتئولین تشکیل می‌دهند (Makeyand Blumberg, 2006) و تقریباً ۷۵٪ این ترکیبات در طول آماده‌سازی دمنوش نعناع‌فلفلی می‌توانند استخراج شوند. بسیاری از این ترکیبات استخراج‌شده نعناع‌فلفلی دارای خواص ضدسرطانی، ضدالرژی، ایمنی‌بخشی، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی هستند (Moshtag *et al*., 2013; Lv *et al*., 2012; Makey & Blumberg, 2006). مطالعات متعددی اثرات مثبت دمنوش نعناع‌فلفلی بر کاهش سطوح گلوکز خون، کلسترول کل، تری‌گلیسریدها، لیپوپروتئین‌های کم‌چگالی (LDL)، لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم (VLDL) و بسیاری از شاخص‌های مرتبط با دیابت را نشان می‌دهند (Barbalho *et al*., 2011; Mani *et al*., 2011). با استفاده از تنش کم‌آبی می‌توان میزان این ترکیبات مؤثر در برگ نعناع‌فلفلی را تغییر داد و در واقع می‌توان از تنش کم‌آبی با عنوان استراتژی قبل از برداشت جهت تغییر میزان ترکیبات مؤثره دارویی بهره برد. در گستره وسیعی از گیاهان دارویی تنش کم‌آبی سنتز بسیاری از ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فنولیک‌اسیدها، تانن‌ها و فلاونوئیدها را افزایش داده و در واقع افزایش آنها به‌نوعی به‌عنوان یکی از مکانیزم‌های پاسخ به تنش می‌باشد (Zingaratti *et al*., 2013). همچنین تنش باعث افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در قسمت‌های مختلف سلول شده و منجر به فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شده (Cruz, 2008) و میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در گیاه بالا می‌برد. استفاده از تنش کم‌آبی به‌عنوان یکی از راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی و حتی به‌عنوان استراتژی قبل از برداشت، جهت افزایش خواص فیتوشیمیایی نعناع‌فلفلی، باید با دقت مورد مطالعه قرار بگیرد. تنش‌ها می‌توانند مسیرهای متابولیک سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آن‌ها را افزایش یا کاهش دهند. مواد مؤثره، اگرچه اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، ولی کمیت وکیفّیت آن‌ها به‌طور بارزی تحت تأثیرعوامل محیطی قرار می‌گیرند، به طوری‌که، عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد و نمو گیاهان دارویی و نیز کمیت وکیفّیت مواد مؤثره آن‌ها می‌شود. با توجه به جایگاه ویژه گیاه نعناع‌فلفلی به‌عنوان یک گیاه دارویی و دمنوش ارزشمند در جهان و لزوم ارزیابی تأثیر تنش کم‌آبی بر رشد و نمو گیاه نعناع‌فلفلی و نیز کمیت وکیفّیت مواد مؤثره آن، این مطالعه به‌منظور بررسی تغییرات ترکیبات فنولیک، ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات با وزن مولکولی پایین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نعناع‌فلفلی در شرایط تنش کم‌آبی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۵ در آزمایشگاه بخش زیست‌شناسی گیاهی و مرکز نوآوری دانشگاه تورین واقع در شهر تورین کشور ایتالیا اجرا گردید. قطعات ریزوم نعناع‌فلفلی رقم بلک میچام[1] از مرکز

1. Black Micham

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیقات گیاهان دارویی واقع در باغ گیاه‌شناسی دانشگاه تورین تهیه و به گلخانه منتقل گردید. ریزوم‌ها به قطعات مساوی از نظر طول و قطر تقسیم و به گلدان‌های (قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر به ظرفیت ۱ کیلوگرم خاک) حاوی خاک باغچه، کوکوپیت و خاکبرگ به نسبت ۲:۱:۱ منتقل گردید. گلدان‌ها به‌صورت وزنی و یکسان با محیط کشت مورد نظر پر شدند. قبل از شروع تیمار تنش، همه گیاهان به‌طور منظم در حد ظرفیت مزرعه‌ای آبیاری شدند. گیاهان موردنظر پس از سرزنی اولیه، برای هماهنگی رشد جهت انجام تیمار تنش کم‌آبی تا رسیدن به مرحله رشدی مورد نظر، به‌طور منظم آبیاری شدند. همچنین در طول دوره رشدی اولیه، تیمار کوددهی شامل کلسیم‌نیترات (۱/۱۲ گرم)، منیزیم سولفات (۰/۴۵ گرم)، نیترات‌پتاسیم (۰/۳۵ گرم)، مونوبازیک‌پتاسیم‌فسفات (۰/۳گرم)، کلات‌آهن (۰/۶ گرم) و سولفات‌منگنز (۰/۰۱ گرم) در لیتر برای گیاهان هر ۴ هفته یکبار انجام شد. سطوح تنش کم‌آبی بر حسب ظرفیت‌زراعی شامل۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی(به ترتیب شاهد، تنش ملایم و متوسط) بود. برای محاسبه میزان آب مورد نیاز هر گلدان از روش توزین گلدان‌ها و تعیین میانگین آن، به‌عنوان آب مصرفی تیمارها استفاده گردید. در طول دوره رشد، کلیه گلدان‌ها به‌صورت روزانه با ترازوی حساس توزین و هر گلدان در وزن تیمار مربوطه ثابت نگه داشته شد؛ به‌طوری‌که رطوبت گلدان‌های حاوی تیمار تنش، در حد رطوبت مورد نظر برای هر سطح تنش در طول آزمایش حفظ شد. درصد رطوبت در گلدان‌های بدون تنش در حد ظرفیت‌مزرعه (۱۰۰٪) اعمال گردید. جهت محاسبه میزان آب لازم برای رسیدن به حد ظرفیت‌مزرعه‌ای از رابطه زیر استفاده گردید (Yadav *et al.*, 2014):

$$FC\ (100\%) = \frac{(\text{وزن خاک خشک‌شده در آون} - \text{وزن خاک در حالت ظرفیت‌مزرعه‌ای})}{\text{وزن خاک خشک‌شده در آون}} \times ۱۰۰$$

نحوه محاسبه

ابتدا گلدان‌ها تا حد اشباع آبیاری و بعد از ۲۴ ساعت توزین گردیدند. جهت خارج‌کردن اثر افزایشی وزن گیاه و به حداقل‌رساندن خطا در محاسبه میزان آب مورد نیاز و اطمینان از تنظیم رطوبت گلدان‌ها به‌روش وزنی، از گلدان‌های فاقد گیاه و هم‌وزن با گلدان‌های آزمایشی استفاده گردید. همچنین آب اضافی و مواد غذایی خارج‌شده از گلدان‌ها در یک ظرف زیرگلدانی جمع‌آوری و به گلدان‌ها برگردانده شد. جهت مانیتورینگ، میزان آب محیط کشت، از تانسیومتر استفاده گردید. رطوبت نسبی محیط کشت گیاهان ۶۰ تا ۷۰ درصد و دما بین ۲۰ تا ۲۵ درجه و شرایط نوری ۱۶ ساعت به‌همراه هشت ساعت تاریکی در شبانه‌روز بود. پس از پایان دوره چهار ماهه تنش‌آبی، گیاهان را به‌همراه ریشه‌ها، به‌دقت از گلدان خارج کرده و صفات مورد نظر اندازه‌گیری و محاسبه گردید. صفات مورفولوژیک نظیر ارتفاع بوته، وزن تر و خشک برگ و طول و عرض برگ اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ارتفاع بوته (n=۷) توسط خط‌کش آزمایشگاهی، وزن تر و وزن خشک برگ توسط ترازوی حساس و طول و عرض برگ (n=۱۵) توسط کولیس دیجیتال انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، ابتدا برگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین گردیدند. سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Singleton & Rossi (1965) و فلاونوئیدهای کل با روش اندازه‌گیری آلومینیوم‌کلراید کالریمتری Liu *et al.* (2002) انجام شد.

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال ABTS

در این روش ابتدا رادیکال ABTS (2,2′-azinobis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) تهیه شد. برای تهیه رادیکال ABTS، ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی‌مول تهیه شد. به این محلول ABTS، پتاسیم‌پرسولفات اضافه شد، تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی‌مول در محلول برسد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به‌مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. دراین مدت از مولکول ABTS، رادیکال کاتیون ABTS تولید شد. سپس محلول ABTS با اضافه‌کردن بافرفسفات ۵ میلی‌مولار (pH:7.4) رقیق و سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر و در زمانهای ۷ دقیقه بعد از مخلوط‌کردن (مخلوط حاوی ۱۰ میکرولیتر

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه و ۱ میلی‌لیتر محلول ABTS رقیق‌شده) قرائت گردید (Re *et al*., 1999).

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH

اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است. غلظت‌های مختلف عصاره، با ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴٪ DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مخلوط گردید. محلول کنترل شامل ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول است. محلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شد (Brand-Williams *et al*., 1995).

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید

جهت اندازه‌گیری ظرفیت به دام‌اندازی (scavenging) رادیکال نیتریک‌اکساید از روش Marcocci & Parker (1994) با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا سدیم نیتروپروساید به غلظت ۵ میلی‌مول به‌همراه بافرفسفات به نمونه در غلظت‌های مختلف اضافه شد تا حجم نهایی آن به ۳ میلی‌لیتر برسد. محلول حاصل در شرایط دمای ۲۷ درجه به‌مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از نمونه اینکیوبه شده به ۱/۵ میلی‌لیتر از ترکیب گریس (Greiss reagent) اضافه گردید و سپس جذب آن در ۵۴۶ نانومتر قرائت گردید.

روش تهیه عصاره آبی (دمنوش)

بعد از اتمام آزمایش، برگ‌ها جمع‌آوری و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه خشک و سپس آسیاب شدند. سپس به‌مقدار ۱ گرم از برگ پودر شده به آب جوش اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه با صافی فیلتر گردید.

شناسایی و آنالیز ترکیب‌های فنلی

آنالیز ترکیب‌های فنلی توسط دستگاه (LC/MS) Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) واقع در بخش آنالیز دستگاهی دانشگاه تورین ایتالیا (Unito) انجام شد. دستگاه دارای ستون موئینه Zorbax octadecylsilane (ODS-C18), 15 × 4.6 mm) بود. در کل به‌میزان ۱۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه تزریق گردید. گرادیانت خطی برای رقیق‌کردن نمونه‌ها با استفاده از دو نمونه حلال A و B انجام گردید. حلال A به نسبت ۲ به ۹۸ استیک‌اسید و آب و حلال B شامل استیک اسید/ استونیتریل/ آب به نسبت ۶۸/۳۰/۲ بود. نسبت فاز متحرک شامل ۹۰ درصد حلال A و ۱۰ درصد حلال B در زمان صفر و ۱۰۰ درصد حلال B و صفر درصد حلال A در زمان ۳۰ دقیقه بود. جذب دستگاه بر روی λmax ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ درجه تنظیم گردید. طیف‌سنج جرمی متصل نیز شامل تنظیمات زیر بود. ولتاژ موبینه: ۴۰۰۰ وات، دمای گاز: ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان گاز: ۱۰ لیتر در دقیقه، ولتاژ اسکیمر: ۵۰ وات، فشار نبولایزر: ۴۰ پوند بر اینچ مربع، و ولتاژ فراگمنتور ۱۳۰ وات بود. محدوده اسکن طیف‌ها از ۵۰ تا ۱۰۰۰ m/z تنظیم شد. شناسایی کمی با استفاده از استانداردهای فنلی و فلاونوئیدی کوماریک، اریوسیترین، روتین، وانیلین، کوئرستین، رزمارینیک‌اسید، لوتئولین، سیناپیک، نارنجنین، کافئیک و هسپریدین (Sigma Aldrich) انجام شد.

آماده‌سازی و شناسایی ترکیبات با وزن مولکولی پایین

برای شناسایی ترکیبات با وزن مولکولی پایین نمونه ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیوفیلیزه‌شده اتانولی تهیه و توسط گاز نیتروژن تغلیظ گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر BSTFA (N,O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) به‌همراه یک درصد TMCS (Trimethylchlorosilane) به آن اضافه و به‌مدت دو دقیقه در دمای اتاق ورتکس گردید. در نهایت مقدار یک میکرولیتر از این محلول تهیه‌شده به دستگاهAgilent GC تزریق گردید؛ ستون HP-5MS به‌طول ۳۰ متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر بود. ولتاژ یونیزاسیون

Archive of SID

www.SID.ir

۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن طیف‌ها از ۵۰ تا ۷۰۰ m/z تنظیم شد. دمای ابتدایی آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به‌مدت یک دقیقه، پس از ۶ دقیقه افزایش دما به ۲۲۰ درجه برای یک دقیقه و سپس افزایش دما تا ۳۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه ۴۰، سپس ۷/۵ دقیقه توقف در این دما انجام شد. از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید.

تجزیه آماری داده‌ها

در این مطالعه برای هر تیمار در بررسی صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی سه تکرار در نظر گرفته شد و داده‌های حاصل به‌صورت طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم‌افزار Minitab مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵ درصد و با آزمون توکی صورت گرفت.

نتایج و بحث

صفات رویشی

جدول ۱ تأثیر سطوح مختلف تنش کم‌آبی بر برخی صفات مورفولوژیک، فنل کل و فلاونوئید کل را نشان می‌دهد. هر دو سطح تنش ملایم و شدید طول و عرض برگ و ارتفاع بوته را کاهش داد. روند مشابهی نیز در مورد وزن تر برگ و وزن خشک برگ مشاهده گردید. با افزایش سطح رژیم رطوبتی از شرایط ۱۰۰٪ ظرفیت‌زراعی به ۷۵٪ و ۵۰٪ شدت کاهش مقادیر صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده افزایش پیدا کرد. بالاترین مقدار طول شاخساره در تیمار آبیاری (کنترل) مشاهده گردید (۵۸/۱). با اعمال تنش کم‌آبی ملایم ارتفاع گیاه کاهش و به ۴۶/۹ سانتی‌متر رسید. اعمال تنش کم‌آبی شدید منجر به کاهش بیشتر ارتفاع شاخساره گردید و به ۲۹/۶ سانتی‌متر رسید. وزن تر برگ و وزن خشک برگ با اعمال تنش کم‌آبی ملایم به‌ترتیب از ۱۶۱/۵ و ۴۸/۸ میلی‌گرم در شرایط رژیم رطوبتی کنترل به ۱۳۴ و ۴۲/۲ میلی‌گرم کاهش یافتند. اعمال تنش کم‌آبی شدید وزن تر برگ را به ۱۲۵/۲ و وزن خشک برگ را به ۳۹/۱ کاهش داد. در کل اختلاف معنی‌داری در صفات رویشی مورد مطالعه بین تیمارهای به‌کار برده شده در این آزمایش مشاهده گردید. طول و عرض برگ نیز همانند سایر صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه با اعمال تنش کم‌آبی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت و کمترین مقدار طول و عرض برگ در شرایط تنش کم‌آبی شدید مشاهده گردید. مطالعات متعددی در مورد تأثیر تنش کم‌آبی و خشکی بر رشد و نمو گیاهان دارویی انجام شده است. بیشتر آزمایش‌های انجام‌شده حاکی از تأثیر منفی تنش کم‌آبی بر رشد و نمو گیاهان دارویی است. تنش کم‌آبی در طول رشد رویشی باعث کاهش رشد، گیاهان کوتاه‌تر و کاهش سطح برگ در نعناع (*Mentha arvensis*) (Abbasszadeh *et al.*, 2011)، بومادران (*Achillea millefolium*) (*Ashorabadi et al.*, 2006) و کاسنی (*Cichorium intybus*) گردید (Rahmani *et al.*, 2008). همچنین کاهش ارتفاع گیاهانی مانند همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) توسط Rahmani *et al.* (2008) و کاهش وزن خشک بوته در بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) (Farahani *et al.*, 2009a) گزارش شده است. محتوای روغن‌های فرّار و همچنین رشد رازیانه (*Foeniculum vulgare*) به‌شدت تحت تأثیر تنش آبیاری قرار گرفت (Patel *et al.*, 2000). Letchemo *et al.* (1995) کاهش میزان نسبی رشد و وزن خشک را در آویشن باغی (Thymus vulgaris) و Alishah *et al.* (1995) کاهش ارتفاع گیاه، کاهش قطر ساقه، کاهش سطح برگ و تعداد برگ را در ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*) در اثر کاهش رطوبت خاک گزارش کردند. Khorsandinejad *et al.* (2011) نیز کاهش شدید پارامترهای رشدی را در نعناع‌فلفلی در اثر تنش خشکی گزارش کردند. تنش نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیک است که از تأثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود. تنش آبی یکی از مهمترین تنش‌های غیرزنده است که بر تولید بسیاری از گیاهان تأثیر منفی دارد.

میزان ترکیبات فنل کل و فلاونوئید کل

میزان ترکیبات فنل کل و فلاونوئید کل در این

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهش به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف تنش قرار گرفت. گیاهان نعناع‌فلفلی در شرایط تنش به‌ترتیب افزایش ۳۴/۸٪ و ۸۱/۶٪ در میزان فنل کل و ۴۳/۶٪ و ۹۶/۴۸٪ در میزان فلاونوئید کل به‌ترتیب در شرایط تنش ملایم و شدید نشان دادند. افزایش به‌میزان ۱۰ و ۱۷٪ فنل کل در کولتیوارهای مختلف گیاه چای (*Camellia sinensis*) بعد از قرارگیری در شرایط تنش خشکی بعد از ۴ و ۸ روز نسبت به شاهد گزارش شده است. درحالی‌که این میزان بعد از ۱۲ روز قرارگیری در معرض تنش خشکی، کاهشی ۷۵٪ نشان داد (Chakrabort & Chakaborty, 2002). فنل‌ها و فلاونوئیدها از مهمترین ترکیبات ثانویه به‌شمار می‌روند. نبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث فعال‌شدن و انباشته‌شدن این ترکیبات می‌شود و همچنین این ترکیبات در شرایط فقر غذایی، تنش‌های زنده، آسیب‌های مکانیکی و یا تنش‌های حاصل از فلزات سنگین افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابند (Agati *et al.*, 2012). آنها به‌عنوان جاروب‌کننده ROSها قبل از صدمه به سلول شناخته می‌شوند (Løvdal *et al.*, 2010). بررسی تأثیر تنش خشکی بر رشد و گلیکوزید فنولیک کل گیاه *Populus nigra* نشان داد که همبستگی معنی‌دار و منفی بین آنها وجود دارد (Hale *et al.*, 2005). گزارش شده است که ترکیبات فنلی با دادن الکترون به آنزیم‌های تیپ پراکسیداز و سم‌زدایی آب‌اکسیژنه تولیدشده، می‌توانند در سلول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (Sakihama *et al.*, 2002).

اجزای ترکیبات فنولیک

در این پژوهش، مهمترین ترکیب‌های فنولیک شناسایی‌شده شامل ترکیبات فنلیک‌اسید، فلاوانولی، فلاوان-۳-ال بود (جدول ۲). بیشتر ترکیبات شناسایی‌شده حاصل از گیاهان تحت تنش به‌طور معنی‌داری نسبت به دمنوش حاصل از گیاهان شاهد افزایش نشان دادند. میزان این افزایش در گیاهان تحت تنش متوسط از سایر تیمارهای آبیاری بالاتر بود. در بین ترکیبات شناسایی‌شده، رزمارینیک‌اسید و هسپریدین، بیشترین مقدار افزایش را نشان دادند که به‌دلیل اهمیت این ترکیبات در سلامتی انسان، افزایش این ترکیبات حائز اهمیت می‌باشد. ترکیبات کوماریک‌اسید، لوتئولین، کوئرستین، نارینجنین و وانیلین در دمنوش حاصل از گیاهان پرورش‌یافته در شرایط عدم تنش شناسایی نگردید؛ درحالی‌که در دمنوش حاصل از گیاهان در شرایط تنش ملایم و متوسط لوتئولین و در شرایط تنش متوسط کوئرستین، نارینجنین و وانیلین شناسایی گردیدند. نتایج مشابهی توسط Marley *et al.* (2014) ارائه شده است. آنها دریافتند که در دمنوش حاصل از گیاهان تحت شرایط تنش، میزان رزمارینیک‌اسید و سایر ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد و برخی ترکیبات مانند کوماریک‌اسید، لوتئولین، کوئرستین، نارینجنین و وانیلین در شرایط عدم تنش شناسایی نمی‌گردد. حتی کاربرد برخی محرک‌های زیستی مانند سالیسیلیک‌اسید و هیدروژن‌پراکسید نیز بر شناسایی این ترکیبات تأثیری نداشت ولی در آزمایشی دیگر، کاربرد سالسیلیک‌اسید در گیاه زنجبیل باعث شناسایی فرولیک و وانیلیک‌اسید گردید (Ghasemzadeh & Jafar, 2012). علت شناسایی این مواد در شرایط تنش می‌تواند به‌دلیل تأثیر تنش در بیان برخی از ژن‌های مرتبط با مسیرهای متابولیک این ترکیبات و تأثیرگذاری تنش کم‌آبی بر تولید آنها باشد.

به‌نظر می‌رسد ترکیبات فنولیک یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که با سازوکارهای متعددی نظیر جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد و قطع‌کردن واکنش‌های زنجیروار اکسایشی، دادن هیدروژن، خاموش‌کردن اکسیژن یکتایی، کلات‌کردن یون‌های فلزی یا قرارگرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کند. افزایش ترکیبات فنلی در شرایط تنش، مربوط به ساختار ژنتیکی و محیط رشد گیاهان است. در واقع، تنش غیرزیستی باعث تجمع ترکیبات فنلی در گیاه می‌شود. این ترکیبات قدرت رقابت دارند و در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان شرکت می‌کنند (Tian & Lei, 2006).

جدول ۳ ترکیبات قطبی با وزن مولکولی پایین شناسایی‌شده را در این آزمایش نشان می‌دهد. سطوح مختلف تنش کم‌آبی افزایش یا کاهش میزان اسیدهای آمینه مختلف را به‌دنبال داشت. مقدار اسیدآمینه آلانین، لوسین و ایزولوسین در شرایط تنش ملایم کاهش یافت و

Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط تنش شدید نیز روند کاهش تشدید پیدا کرد، به‌طوری‌که مقدار آلانین و لوسین به کمتر از حد تشخیص دستگاه تقلیل پیدا کرد. برخی از اسیدهای آمینه مانند سرین، ترئونین، فنیل‌آلانین، سرین، ۴ آمینوبوتریک اسید، ۵-اکسو ال پرولین، ال‌آسپاراژین، تایروزین و تریپتوفان فقط در شرایط عدم تنش مشاهده گردید. نتایج مشابهی در مورد کاهش ۴۰ تا ۷۰ درصدی اسیدهای آمینه آسپاراژین، گلوتامین، سرین و گلایسین و همچنین کاهش میزان نیترات شاخساره در اثر تنش خشکی در *Nicotiiana tobacum* ارائه شده است (Ferrio-Mery *et al*., 1998). کاهش میزان جذب نیترات از طریق ریشه، به‌دلیل تأثیر تنش کم‌آبی بر میزان تبخیر و تعرق و فشار تورگر گیاه و کاهش میزان نیترات در شاخساره نعناع‌فلفلی می‌تواند دلیل کاهش میزان و عدم شناسایی برخی ار اسیدهای آمینه در شرایط تنش باشد (Ferrio-Mery *et al*., 1998).

جدول ۱. تأثیر تنش کم‌آبی بر ویژگی‌های اندازگیری‌شده در نعناع‌فلفلی

Table 1. Effect of water deficit stress levels on the measured traits in peppermint

Treatments	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Shoot length (cm)	Fresh weight (mg leaf^{-1})	Dry weight (mg leaf^{-1})	Total Phenolic Contents (µg GAE/ml)	Flavonoid Contents (µg CAE/ml)
100% FC (Control)	3.1±0.1 a*	5.4±0.2a	58.1±1.8a	161.5±5.1a	48.8±0.1a	22.4± 1.8c	8.11 ± 0.3c
75% FC	2.5±0.0b	4.6±0.1b	46.9±0.1b	134.8±7b	42.2±1.6b	30.2±3.23b	10.21±1.6b
50% FC	2.1±0.1c	3.9±0.2c	29.4±0.5c	125.2±6b	39.1±0.1c	40.7±1.79a	13.97±1.1a

نتایج به‌صورت میانگین ±انحراف معیارآمده است و داده‌های با حروف لاتین متفاوت در هر ستون با هم اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵، آزمون توکی).

* Results are the average of three independent determinations ± SE. Different letters in each column indicate significant differences (p<0.05, Tukey's test).

جدول ۲. پروفایل کروماتوگرافی ترکیبات فنلی عصاره آبی برگ نعناع فلفلی در تیمارهای مختلف تنش کم آبی.

Table 2. Chromatographic profile of phenolic compounds of peppermint leaves extract grown at different water deficit levels

Compound	RT (min)	Control	75% FC	50%FC
Caffeic acid	12.71	0.31± 0.02c	0.51± 0.0b	0.81± 0.0a
Coumaric acid	16.59	LDL*	1.11± 0.01b	1.42± 0.2a
Luteolin	17.43	`LDL	1.52± 0.0	LDL
Eriocitrin	19.43	0.28± 0.0c	8.3± 0.0a	5.63± 0.1b
Rutin	20.38	14.4± 1.1d	55.2± 0.6a	31.5± 0.8b
Sinapic acid	21.25	0.2± 0.0b	2.1± 0.01b	3.3± 0.1a
Rosmarinic acid	22.45	42. 6± 2.8c	58. 6 ± 2.3b	88.3± 1.5a
Hesperedin	23.21	27.7±3.2c	35.1± 2.1b	74.1± 3.5a
Quercetin	28.44	LDL	LDL	0.51± 0.0
Naringenin	31.81	LDL	LDL	0.8± 0.0
Vanillin	33.49	LDL	LDL	0.52± 0.1

نتایج (ng/µL) به‌صورت میانگین ± انحراف معیارآمده است و داده‌های با حروف لاتین متفاوت در هر ستون با هم اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵، آزمون توکی) LDL: کمتر از حد تشخیص دستگاه.

* Results are expressed as ng/µL and reflect average ± SE. Different letters indicate significant statistical differences for each treatment ($p < 0.05$; Tukey's test). [b]LDL = lower than the detection limit.

جدول ۳. متابولیت‌های با وزن مولکولی پایین (قندها و آمینواسیدها) در عصاره آبی برگ نعناع‌فلفلی در تیمارهای مختلف رطوبتی

Table 3. Low-Molecular-Weight Metabolites (Amino Acids and Carbohydrate) of Infusions Prepared from Peppermint leaves grown at different levels of water deficit

Proposed compound and their nature	RT (min)	Control	75% FC	50% FC
L-alanine (AA) [b]	4.31	0.67	0.48	LDL[c]
L-leucine (AA)	6.83	2.47	0.33	LDL
Isoleucine (AA)	7.28	3.01	0.89	0.37
L-proline (AA)	7.3	2.31	4.84	8.92
L-serine (AA)	8.59	1.88	LDL	LDL
Threonine (AA)	9.11	0.93	LDL	LDL
4-aminobutiric acid (AA)	11.66	0.88	LDL	LDL
5-oxo-L-proline (AA)	11.6	9.98	LDL	LDL
Glutamine(AA)	13.45	0.02	0.04	0.05
Phenylalanine (AA)	13.53	0.9	LDL	LDL
L-asparagine (AA)	14.42	0.01	LDL	LDL
L-tyrosine (AA)	19.06	0.05	LDL	LDL
Tryptophan (AA)	23.5	0.04	LDL	LDL
Arabinose (C)	18.78	1.75	2.79	5.91
D-glucose (C)	20.1	0.07	5.2	10.15

* نتایج به‌صورت درصد بیان شده است. [b] ماهیت ترکیبات: (AA): آمینواسید، (C): کربوهیدرات. [c]LDL: کمتر از حد تشخیص دستگاه.

* Results are expressed as a percentage of the total area. [b] Nature of compound: Amino Acid (AA), Carbohydrate (C) [c]LDL = lower than the detection limit.

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش مقدار اسیدهای آمینه در شرایط تنش خشکی، ممکن است به‌علت کاهش سنتز پروتئین‌ها و تحریک بیوسنتز اسیدهای آمینه (Barnett *et al*., 1966) و پروتئولیز پروتئین‌ها (Karamanos, 1995) باشد. افزایش در محتوای اسیدهای آمینه آسپاراژین و گلوتامین در برگ گندم (Drossopoulos, *et al*., 1985) و آسپاراتیک‌اسید در برگ جو (Singh, 1973) در شرایط تنش گزارش شده است. Ahmad *et al*. (2013) بیان نمودند که در شرایط تنش خشکی در جو، محتوای تمام اسیدهای آمینه (به‌جز متیونین) در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری از خود نشان می‌دهند و این افزایش در ارقام متحمل بیشتر می‌باشد. Good & Zaplachinski (1994) بیان کردند که غلظت اسیدهای آمینه ایزولوسین، لوسین وآسپارتیک‌اسید در شرایط تنش خشکی ۵ برابر افزایش یافتند و این افزایش در سایر اسیدهای آمینه کمتر بود (جدول ۳).

در این تحقیق بعضی از اسیدهای آمینه در شرایط تنش افزایش یافته، ولی بعضی دیگر از اسیدهای آمینه در شرایط تنش کاهش یافته‌اند. شاید یکی از علل آن این باشد که در شدت‌های پایین تنش، همه اسیدهای آمینه افزایش نمی‌یابند و برای افزایش غلظت آنها شدت‌های بالای تنش مورد نیاز است. همچنین یکی از دلایل کم‌شدن اسیدهای آمینه می‌تواند به‌کار رفتن آنها در سنتز متابولیت‌های ثانویه قلاونوئیدی باشد. تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان پیش‌نیاز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند. همچنین تفاوت نقش اسیدآمینه ها در گیاه می‌تواند سبب این پدیده شود.

تنظیم اسمزی به‌عنوان یک مکانیسم مهم تحمل به تنش خشکی در گیاهان عمل می‌کند. تجمع اسمولیت‌ها به حفظ تورژسانس سلولی و فرایندهای وابسته به آن کمک می‌کند و رشد، عملکرد و زنده‌مانی گیاهان در خاک‌های خشک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از اولین ترکیبات مورد مطالعه در حفظ پتانسیل اسمزی سلول، اسیدآمینه پرولین است. تجمع پرولین تحت تنش‌های غیرزیستی در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی، هم‌بستگی بالایی با تحمل به این تنش‌ها داشته و نقش فعالی را در تنظیم اسمزی سلول دارد (Kuznetsov & Shevyakova, 1999). مقدار پرولین در این آزمایش در اثر تنش کم‌آبی افزایش پیدا کرد. افزایش میزان پرولین در اثر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است در میان اسیدهای آمینه مختلف، پرولین منبع انرژی، کربن و نیتروژن است (Monreal *et al*., 2007; Hare *et al*., 1998; Munns, 2005; Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2002; Naidu *et al*., 1991; Bassi & Sharma, 1993; Schat *et al*., 1997; Sharma & Dietz, 2006). مقدار کم پرولین در عصاره آبی حاصل از گیاهان نعناع‌فلفلی در شرایط عدم تنش می‌تواند در نتیجه ترکیب اکسیژن با آن و تبدیل به گلوتامیک‌اسید و دیگر ترکیبات در شرایط بدون تنش باشد (Stewart *et al*., 1977; Sarker *et al*., 1999). تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی به‌واسطه سنتز پرولین و غیرفعال شدن تخریب آن است. پرولین در گیاهان از مسیر احتمالی اسیدگلوتامیک یا اورنیتین ساخته می‌شود. در شرایط تنش اسمزی و محدودیت نیتروژن مسیر اسید گلوتامیک و در شرایط نیتروژن فراوان مسیر اورنتین فعال می‌شود. آربینوز و D-گلوگز در این آزمایش هم در دمنوش حاصل از گیاهان در شرایط استرس کم‌آبی و هم در گیاهان حاصل از شرایط بدون تنش آبی شناسایی گردید و در گیاهان تحت تنش افزایش پیدا کردند. اسیدهای آلی و بیشتر اسیدهای چرب نیز در این آزمایش روندی افزایشی با توجه به شدت تنش اعمال‌شده نشان دادند و بیشتر آنها هم درشرایط آبیاری کنترل و هم تنش شناسایی گردیدند. ولی برخی از این ترکیبات مانند سیتریک‌اسید و اولئیک‌اسید فقط در دمنوش حاصل از گیاهان تحت شرایط استرس شناسایی گردیدند. این ترکیبات به‌عنوان متابولیت گیاهی اولیه در بیشتر گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و برخی از این ترکیبات همانند فنولیک‌اسیدها می‌توانند نقش حفاظتی به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش اکسیداتیو حاصل از تنش کم‌آبی را در گیاه بازی کنند (Oliveira *et al*., 2008) مانند سیتریک‌اسید که توانایی عمل‌کردن به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

OH و گونه‌های مختلف اکسیژن یکتایی را دارد (Polumbryk *et al.*, 2013). ترکیباتی مانند پانتوتنیک‌اسید، لینولئیک‌اسید و آلفا لینولئیک‌اسید فقط در شرایط کنترل مشاهده گردید (جدول ۴) که نشان‌دهنده کاهش مقدار این ترکیبات در شرایط تنش کم‌آبی می‌باشد. همچنین برخی از این ترکیبات فقط در شرایط تنش مشاهده گردیدند. کاهش میزان لینولئیک و لینولنیک‌اسید در اثر تنش خشکی در برگ شلغم (*Brassica napus*) گزارش شده است (Benhassaine-Kesri *et al.* 2002). در کل تغییر ترکیب اسیدهای چرب دیواره سلولی یکی از مکانیزم‌های پاسخ به تنش‌های محیطی در بیشتر گونه‌های گیاهی می‌باشد (Gigon *et al.*, 2004). Gigon *et al.* (2004) کاهش تقریباً ۳ برابری لیپید کل در گیاه *Arabidopsis thaliana* قرار گرفته در معرض تنش خشکی به‌مدت ۱۴ روز را گزارش کردند.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی یکی از متداول‌ترین موضوعات مورد بررسی در سال‌های اخیر بوده است (Barja, 2014; Park *et al.*, 2011; Canistro *et al.*, 2014). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به مجموعه‌ای از ترکیبات مربوط می‌شود که توانایی حفظ سیستم‌های بیولوژیک در برابر اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن هستند. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و جلوگیری از تشکیل آنها ایفا می‌کنند. جدول ۵ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دمنوش حاصل از نعناع‌فلفلی در شرایط مختلف رطوبتی و با روش‌های مختلف ارزیابی No، DPPH و ABTS را به‌صورت IC_{50} نشان می‌دهد.

جدول ۴. متابولیت‌های با وزن مولکولی پایین در عصاره آبی برگ نعناع‌فلفلی در تیمارهای مختلف رطوبتی

Table 4. Low-Molecular-Weight Metabolites (Organic and Fatty Acids) of Infusions Prepared from Peppermint leaves grown at different levels of water deficit

Proposed compound and their nature	RT (min)	Control	75% FC	50% FC
Lactic acid (OA)[a]	3.66	1.68[b]	5.66	10.11
Glycolic acid (OA)	3.79	1.15	3.81	8.44
Malonic acid (OA)	5.58	0.93	1.18	0.54
Succinic acid (OA)	7.52	3.41	2.51	1.05
2,3-hidroxipropionic acid (OA)	7.8	1.28	5.24	3.94
Fumaric acid (OA)	8.23	0.68	0.54	1.05
Malic acid (OA)	11.0	5.31	2.2	0.83
Threonic acid (OA)	12.33	0.33	0.51	LDL
Lauric acid (OA)	13.87	0.01	1.11	LDL
Tartaric acid (OA)	14.06	0.02	0.37	0.73
Citric acid (OA)	17.27	LDL	LDL	2.11
Myristic acid (OA)	17.31	0.01	LDL	1.44
Pantothenic acid (OA)	19.08	0.01	LDL	LDL
Palmitic acid (FA)	20.51	0.11	11.91	5.43
Linoleic acid (FA)	23.02	0.01	LDL	LDL
Oleic acid (FA)	23.04	LDL	1.33	3.87
Stearic acid (FA)	24.78	1.03	3.68	1.58
α-linolenic acid (FA)	23.64	0.05	LDL	LDL

* نتایج به‌صورت درصد بیان شده است. [a] ماهیت ترکیبات: (OA): اسید آلی، (FA): اسید چرب [b]LDL: کمتر از حد تشخیص دستگاه.

* Results are expressed as a percentage of the total area. [a] Nature of compound: Organic Acid(OA), Fatty Acid (FA). [b] LDL = lower than the detection limit.

جدول ۵. میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی برگ نعناع‌فلفلی در سطوح مختلف تنش کم‌آبی

Table 5. Antioxidant capacity by infusions prepared from Peppermint leaves grown at different levels of water deficit stress

Treatment	IC_{50} $DPPH^{\bullet}$	IC_{50} $ABTS^{+}$	IC_{50} $NO^{\bullet}$
100% FC (Control)	60.4± 1.2a	16.5± 0.3a	56.2± 2.8a
75% FC	34.2± 3.1b	11.2± 0.4b	41.3± 1.3b
50% FC	21.2± 2.1c	8.4± 0.2c	30.3± 1.7c

* نتایج (µg/mL) به‌صورت میانگین ±انحراف معیارآمده است. حروف لاتین متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (p<۰/۰۵، آزمون توکی).

* Results are expressed as µg/mL and reflect average ± SE. Different letters indicate significant statistical differences for each treatment (p<0.05; Tukey's test).

Archive of SID

www.SID.ir

در هر سه روش مورد مطالعه در آزمایش حاضر کاهش معنی‌دار IC_{50} را نشان داد و میزان این کاهش در سطح تنش شدید از سایر تیمارهای مورد مطالعه بالاتر بود. به‌طوری‌که اعمال تنش مقادیر IC_{50} را در روش‌های مختلف ارزیابی No، DPPH و ABTS به‌ترتیب از ۵۶/۲، ۱۶/۵ و ۶۰/۴ در شرایط کنترل به ۳۰/۳، ۸/۴ و ۲۱/۲ در شرایط تنش متوسط رساند. در کل اختلاف معنی‌داری بین هر سه سطح آبیاری به‌کار برده‌شده مشاهده گردید. مطالعات گسترده‌ای نشان داده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان خانواده نعناع وابسته به حضور ترکیبات فنلی مانند فلاوونوئیدهای موجود در این گیاهان می‌باشد. این ترکیبات به‌عنوان جمع‌آوری‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد و نیز مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده‌اند (Singh *et al.*, 2011). افزایش میزان ظرفیت فنلی در محتوای دمنوش حاصل از گیاهان تحت تنش کم‌آبی افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی دمنوش را به‌دنبال داشت. ارتباط خطی معناداری بین میزان ظرفیت فنلی تام و قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی ثابت شده است (Khaki *et al.*, 2006) و به‌نظر می‌رسد قدرت احیاکنندگی بالاتر در دمنوش نعناع‌فلفلی از گیاهان تحت تنش، نسبت به دمنوش حاصل از گیاهان کنترل (بدون تنش) به‌دلیل بیشتربودن ظرفیت فنلی تام در این عصاره در این آزمایش باشد. تنش کم‌آبی سبب اختلال در تعادل رداکس از طریق افزایش تولید ROSها یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردند که به‌همین سبب تنش آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد. در واکنش به افزایش ROS، بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های دخیل در طیف وسیعی از فرآیندهای امداد سلولی نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر این، ROS از یک سری نقش‌های پیام‌دهی، غیر از نقش‌هایی که در شرایط تنش آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند، برخوردار است. نتایج تحقیقات نشان داده که با محدودشدن مقدار آب درون خاک، رشد ریشه و در نتیجه آن وزن ریشه کاهش می‌یابد. گیاه در برابر خشکی، ترجیح می‌دهد بیشتر تولید فتوسنتز خود را به تجمع ماده خشک در ریشه اختصاص دهد تا این ماده را در ساقه و اندام‌های هوایی ذخیره کند، زیرا با این کار توانایی خود را برای جذب مقدار بیشتری از آب موجود در خاک حفظ خواهد کرد (Gregory *et al.*, 1991; Asseng *et al.*, 1998). تنش خشکی از فتوسنتز گیاه ممانعت نموده، باعث تغییر در محتوای کلروفیل و صدمه به ساختارهای فتوسنتزی می‌شود. یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مثل خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مکانیسم‌های دفاعی برطرف‌کننده این رادیکال‌هاست که به تجمع ROS و القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، به‌هم‌زدن تعادل تورگر سلولی و اختلال در باز و بسته‌شدن روزنه‌ها، لیپیدهای غشا و سایر اندامک‌های سلولی مانند کلروپلاست‌ها منجر می‌گردد (Fu & Huang, 2001). تنش اکسیداتیو ایجادشده در اثر تجمع ROSها در سلول سبب بروز آسیب به سلول از طریق به‌هم‌زدن تعادل تورگر سلولی و اختلال در باز و بسته‌شدن روزنه‌ها و تحت تأثیر قرار گرفتن رشد سلول و در نهایت کاهش زیست‌توده را به‌دنبال دارد (Yordanov *et al.*, 2003; Blum, 2011). علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر کمبود آب در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسیداتیو نیز از عوامل مهم محدودکننده رشد و تولیدات گیاهی است که در اثر نبود شرایط مناسب ایجاد می‌شود. یکی از آسیب‌های جدی تنش خشکی خسارت به غشا و رهاسازی یون‌ها از سلول به فضای بین‌سلولی است (Halliwel & Gutteridge, 1984). مجموع این عوامل می‌تواند توجیه‌کننده کاهش میزان رشد گیاه نعناع‌فلفلی در آزمایش حاضر باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش کم‌آبی بر افزایش میزان فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی نعناع‌فلفلی مؤثر بوده و همین امر باعث افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی یا دمنوش حاصل از آن می‌گردد. از بین سطوح مختلف تنش کم‌آبی، تنش شدید بیشترین میزان تأثیر را نشان داد. همچنین تنش موجب کاهش صفات مورفولوژیک، برخی متابولیت‌ها مانند اسیدهای‌چرب و برخی اسیدهای آمینه گردید. مطالعه بیشتر در مورد اثرات بیولوژیکی تأثیر تنش کم‌آبی بر نعناع‌فلفلی و دمنوش حاصل از آن توصیه می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1. Abbaszadeh, B., Sharifi, A. E., Ardakani, M. R., Lebaschi, M. H., Safikhani, F. & Naderi, H. B. M. (2006). Effect of application methods of nitrogen fertilizer on essential oil content and composition of balm (*Melissa officinalis* L.) under field condition. *Iran Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 22, 124-131
2. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
3. Ahmed, I. M., Cao, F., Han, Y., Nadira, U. A., Zhang, G. & Wu, F. (2013). Differential changes in grain ultrastructure, amylase, protein and amino acid profiles between Tibetan wild and cultivated barleys under drought and salinity alone and combined stress. *Food Chemistry*, *141*(3), 2743-2750.
4. Alishah, H., Heidari, R., Hassani, A. & Asadi Dizaji, A. (2006). Effect of water stress on some morphological and biochemical characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Biological Sciences*, *6*(4), 763-767.
5. Ashraf, M. & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany, 59*(2), 206-216.
6. Barbalho, S. M., Machado, F. M. V. F., Oshiiwa, M., Abreu, M., Guiger, E. L., Tomazela, P. & Goulart, R. A. (2011). Investigation of the effects of peppermint (*Mentha piperita*) on the biochemical and anthropometric profile of university students. *Food Science and Technology (Campinas), 31*(3), 584-588.
7. Barja, G. (2014). The mitochondrial free radical theory of aging. In: *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 127, pp. 1-27). Academic Press.
8. Bassi, R. & Sharma, S. S. (1993). Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry*, *33*(6), 1339-1342.
9. Barnett, N. M. & Naylor, A. W. (1966). Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*, *41*(7), 1222-1230.
10. Benhassaine-Kesri, G., Aid, F., Demandre, C., Kader, J. C. & Mazliak, P. (2002). Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. *Physiologia Plantarum*, *115*(2), 221-227.
11. Blum, A. (2011). Drought resistance and its improvement. In: *Plant Breeding for Water-Limited Environments* (pp. 53-152). Springer New York.
12. Bohnert, H. J. & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, *14*(3), 89-97.
13. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30.
14. Chakraborty, U., Dutta, S. & Chakraborty, B. N. (2002). Response of tea plants to water stress. *Biologia Plantarum*, *45*(4), 557-562.
15. Canistro, D., Boccia, C., Falconi, R., Bonamassa, B., Valgimigli, L., Vivarelli, F., ... & Zaccanti, F. (2014). Redox-based flagging of the global network of oxidative stress greatly promotes longevity. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, *70*(8), 936-943.
16. Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(3), 156-165.
17. Drossopoulos, J. B., Karamanos, A. J. & Niavis, C. A. (1985). Changes in free amino compounds during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress. *Annals of Botany*, *56*(3), 291-305.
18. Farahani, H. A., Lebaschi, M. H. & Hamidi, A. (2008). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus and water stress on quantity and quality characteristics of coriander. *Advances in Natural and Applied Sciences*, *2*(2), 55-60.
19. Fecka, I. & Turek, S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, Melissa, and sage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 10908-10917.
20. Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceutics. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 152-166). Springer US.
21. Ferrario-Méry, S., Valadier, M. H. & Foyer, C. H. (1998). Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology*, *117*(1), 293-302.
22. Ghasemzadeh, A. & Jaafar, H. Z. (2012). Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(5), 790-795.
23. Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, *94*(3), 345-351.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Good, A. G. & Zaplachinski, S. T. (1994). The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in Brassica napus. *Physiologia Plantarum*, *90*(1), 9-14.
25. Hale, B. K., Herms, D. A., Hansen, R. C., Clausen, T. P. & Arnold, D. (2005). Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. *Journal of Chemical Ecology*, *31*(11), 2601-2620.
26. Hare, P. D., Cress, W. A. & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, *21*(6), 535-553.
27. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M. & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(11), 1827-1836.
28. Khaki, A., Jamshidi, M., Ahmadi Ashtiani, H., Rezazadeh, SH., Fathi Azad, F. & Mazandarani, M. (2005). Evaluation and comparing the antioxidant activity and phenol content of some Mazandaran indigenous plant species. *Medicinal Plant Magazine*, 34, 177-183. (in Farsi)
29. Karamanos, A. J. (1995). The involvement of proline and some metabolites in water stress and their importance as drought resistance indicators. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, *21*(2-3), 98-110.
30. 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.
31. Kuznetsov, V. V. & Shevyakova, N. I. (1999). Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, *46*(2), 274-287.
32. Letchamo, W., Xu, H. L. & Gosselin, A. (1995). Photosynthetic potential of Thymus vulgaris selections under two light regimes and three soil water levels. *Scientia Horticulturae*, *62*(1), 89-101.
33. Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J. & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 2926-2930.
34. Løvdal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M. & Lillo, C. (2010). Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, *71*(5), 605-613.
35. Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M. T., Sekaki, A. & Gardès-Albert, M. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods in Enzymology*, *234*, 462-475.
36. Merely, P. G. F., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G. & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, *156*, 273-278.
37. 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.
38. Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B. & Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. *Planta Medica*, *69*(05), 413-419.
39. Monreal, J. A., Jimenez, E. T., Remesal, E., Morillo-Velarde, R., García-Mauriño, S. & Echevarría, C. (2007). Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, *60*(2), 257-267.
40. Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, *167*(3), 645-663.
41. Naidu, B. P., Paleg, L. G., Aspinall, D., Jennings, A. C. & Jones, G. P. (1991). Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry*, *30*(2), 407-409.
42. Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M. & Silva, B. M. (2008). Organic acids composition of Cydonia oblonga Miller leaf. *Food Chemistry*, *111*(2), 393-399.
43. Patel, B. S., Patel, K. P., Patel, I. D. & Patel, M. I. (2000). Response of fennel (*Foeniculum vulgare*) to irrigation, nitrogen and phosphorus. *Indian Journal of Agronomy*, *45*(2), 429-432.
44. Polumbryk, M., Ivanov, S. & Polumbryk, O. (2013). Antioxidants in food systems. Mechanism of action. *Ukrain Journal of Food Science*, 1, 15-40.
45. Rahmani, N., Aliabadi, F. H. &Valadabadi S. A. R. (2008). Effects of nitrogen on oil yield and its component of calendula (*Calendula officinalis* L.) in drought stress conditions. Abstracts Book of the *World Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, South Africa, p 364.
46. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9), 1231-1237.
47. Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. & Rich, P. J. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. In *Salinity: Environment-plants-molecules* (pp. 181-204). Springer Netherlands.
48. Sarker, A. M., Rahman, M. S. & Paul, N. K. (1999). Effect of soil moisture on relative leaf water content, chlorophyll, proline and sugar accumulation in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *183*(4), 225-229.

Archive of SID

www.SID.ir

49. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, *177*(1), 67-80.
50. Sangavan, N. E. E. L. A. M., Abad Farooqi, A. H. & Singh Sangwan, R. (1994). Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New Phytologist*, *128*(1), 173-179.
51. Schat, H., Sharma, S. S. & Vooijs, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris. *Physiologia Plantarum*, *101*(3), 477-482.
52. Sharma, S. S. & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, *57*(4), 711-726.
53. Singh, T. N., Paleg, I. G. & Aspinall, D. (1973). Stress metabolism I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Australian Journal of Biological Sciences*, *26*(1), 45-56.
54. Singh, R., Shushni, M. A. & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*, *8*(3), 322-328.
55. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
56. Stewart, C. R., Boggess, S. F., Aspinall, D. & Paleg, L. G. (1977). Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiology*, *59*(5), 930-932.
57. Taheri, A. M., Daneshian, J., Valadabadi, S. A. R. & Aliabadi, F. H. (2008). Effects of water deficit and plant density on morphological characteristics of chicory (*Cichorium intybus* L.). Abstracts Book of *5th International crop science congress and exhibition*, p 26.
58. Tian, X. & Lei, Y. (2006). Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, *50*(4), 775-778.
59. Yadav, R. K., Sangwan, R. S., Sabir, F., Srivastava, A. K. & Sangwan, N. S. (2014). Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in Artemisia annua L. *Plant Physiology and Biochemistry, 74*, 70-83.
60. Yordanov, I., Velikova, V. & Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 187-206.
61. Zingaretti, S. M., Inácio, M. C., de Matos Pereira, L., Paz, T. A. & de Castro França, S. (2013). Water stress and agriculture. In: *Responses of Organisms to Water Stress*. InTech.

Archive of SID

www.SID.ir