

## پاسخ بیوشیمیایی و عملکردی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) به محلول پاشی سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه نیتروژنی

عادل پشت‌دار<sup>۱\*</sup>، علیرضا ابدالی مشهدی<sup>۲</sup>، فواد مرادی<sup>۳</sup>، سیدعظااله سیادت<sup>۴</sup> و عبدالمهدی بخشنده<sup>۴</sup>

\*۱- نویسنده مسئول، دکترای تخصصی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

پست الکترونیک: Adelposhtdar@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه فیزیولوژی مولکولی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

### چکیده

روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی استفاده می‌شود، از جمله آنها افزودن الیسیتورها به گیاهان است. سالیسیلیک اسید اثر مثبتی در رشد و عملکرد گیاهان با اثر بر جذب عناصر معدنی دارد. برای بررسی پاسخ نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) به کاربرد سالیسیلیک اسید در سطوح مختلف نیتروژن، آزمایش زراعی دوساله، در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ و ۹۴-۱۳۹۳ اجرا گردید. آزمایش به صورت اسپلیت پلات بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل مقدار کود (۰، ۷۰، ۱۴۰، ۲۱۰ و ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به عنوان عامل اول و غلظت سالیسیلیک اسید (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) به عنوان عامل فرعی بود. نتایج نشان داد که در دو سال، بیشترین میزان فعالیت نترات ردوکتاز در ریشه با کاربرد غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. فعالیت این آنزیم در برگ تنها تحت تأثیر نیتروژن قرار گرفت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در برگ (در سال اول و دوم به ترتیب ۲/۸۷ و ۲/۸۲ میکرومولار نیتريت در گرم وزن تازه بر ساعت) با مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. در هر دو سال محتوی نیتروژن و اسید آمینه آزاد در برگ با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، همزمان با افزایش مقدار کود افزایش یافت. هر دو سال محتوی نترات، فنول کل و کربوهیدرات محلول برگ با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید و مقدار کود کاهش یافت. در سال اول و دوم بیشترین عملکرد تر (به ترتیب ۳۳۱۶/۲ و ۳۴۸۰/۷ گرم در مترمربع)، خشک (به ترتیب ۸۱۱/۷ و ۸۵۵/۶ گرم در مترمربع) و اسانس (به ترتیب ۱۳/۰۱ و ۱۵/۲ میلی‌لیتر در مترمربع) با مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بدست آمد. در مجموع مصرف ۲۱۰ تا ۲۸۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن همراه با کاربرد غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید برای دستیابی به عملکرد کمی و کیفی مطلوب توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسیدی، اسانس، اسید آمینه آزاد، ریشه، فنول، نترات ردوکتاز.

## مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بستر مناسبی را برای حفاظت از سلامت ایجاد می‌کند (Farzana et al., 2014). از جمله گیاهان دارویی که به دلیل اثرات دارویی و استفاده غذایی از دیرباز مورد توجه محققان بوده، نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) است. برگ و اسانس نعنای فلفلی از دیرباز به عنوان دارو استفاده می‌شود (Balakrishnan, 2015). نعنای فلفلی گیاهی علفی از رده دولپه‌ای‌ها، زیر رده پیوسته گلبرگان، راسته لامیاسه، پایا و دارای ساقه‌های چهارگوش، ساقه‌های خزنده و زیرزمینی، برگ‌های متقابل، دنداندار و پوشیده از کرک می‌باشد. برگ تازه گیاه نعنای فلفلی دارای تانن و حدود ۳/۵٪ اسانس است. اسانس در ابتدای رشد، در سلول‌های مولد اسانس هشت واحدی زیر کوتیکول ساخته شده، سپس درون حفره‌های زیر کوتیکول انباشته می‌شود (Croteau et al., 2005). کاربرد صحیح و مناسب عناصر و مواد غذایی در طول مراحل کاشت، داشت و برداشت گیاهان دارویی، نه تنها نقش عمده‌ای در افزایش عملکرد دارد، بلکه در کمیت و کیفیت مواد مؤثره آنها نیز مؤثر است (Zeinali et al., 2014). نعنای فلفلی از جمله گیاهانی است که در طول رشد و تولید مواد مؤثره به مقدار زیادی مواد و عناصر غذایی نیاز دارد (Omidbaigi, 2009).

در مناطق خشک و نیمه‌خشک نخستین عنصری که گیاهان با کمبود آن مواجه هستند، نیتروژن است. زیرا خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک مشابه خاک‌های ایران از لحاظ میزان مواد آلی و نیتروژن به دلایلی از جمله بارندگی کم، پوشش گیاهی ناچیز و عدم مصرف فضولات حیوانی فقیر هستند (Raun et al., 1999). به همین دلیل واکنش بیشتر گیاهان نسبت به مصرف نیتروژن در مقایسه با سایر عناصر غذایی بیشتر است (Malakouti, 2004). زیست‌توده زیاد و عملکرد اسانس بالای نعنای فلفلی نیز در شرایطی بدست آمده

است که نیتروژن زیاد مصرف شود (Poshtdar et al., 2016). البته به نظر می‌رسد شرکت نیتروژن در ساختار مولکول‌های بزرگ مانند پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک دلیل تأثیر آن بر این گیاه باشد (Zhao, 2006). همچنین نیتروژن باعث تداوم رشد رویشی، توسعه برگ‌ها و در نتیجه افزایش تولید اسانس می‌شود (Brown, 2003). در این راستا Izadi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که با افزایش سطح برگ، درصد اسانس برگ به صورت خطی افزایش یافت. به طوری که به ازاء افزایش هر سانتی متر مربع سطح برگ، درصد اسانس برگ حدود ۰/۰۰۸٪ بیشتر بود.

استفاده از البیسیتورها از جمله روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی است (Esmailzadeh Bahabadi & Sharifi, 2013). البیسیتورها عوامل فیزیکی، شیمیایی و یا حتی زیستی هستند (Mohammadi Farsani & Ghasemi Pirbalouti, 2014). از جمله آنها، اسید سالیسیلیک است که قابلیت فوق‌العاده‌ای در نقش یک البیسیتور دارد (Raskin, 1992). سالیسیلیک اسید به گروه متنوع فنول‌های گیاهی تعلق دارد و اثرات کلیدی در گیاهان از جمله اثر بر جذب عناصر معدنی، تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک مانند پایداری غشاء، بسته‌شدن روزنه‌ها، جذب عناصر، سنتز کلروفیل و پروتئین‌ها، تعرق و فتوسنتز بازدارندگی سنتز اتیلن، بهبود رشد و عملکرد دارد (Padash et al., 2016). سالیسیلیک اسید موجب افزایش محتوای کربوهیدرات‌های گیاه می‌شود، زیرا مسیر فنولیک اسید به عنوان پیشرو متابولیسم تولید کربوهیدرات‌ها است (Ghasemzadeh & Jaafar, 2012). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک با اثر بر سنتز هورمون‌هایی مانند آبسزیک، جیبرلین، متیل جاسمونات و اتیلن و همچنین با القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش جذب مواد مغذی بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و رشد گیاهان را تنظیم می‌کند، در نتیجه باعث سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود (Bideshki & Arvin, 2010).

نیترژن موجود در خاک آن، بسیار ضروریست. در مورد نعنای فلفلی نیز مطالعات کافی در این دشت انجام نشده است، از این رو تعیین سطح بهینه کود نیترژن برای کشت نعنای فلفلی در این دشت ضروریست. همچنین بررسی ترکیبها و متابولیت‌های ثانویه مؤثر بر تغییرات متابولیت‌های نعنای فلفلی، لزوم بررسی بیشتر وضعیت بیوشیمی این گیاه را ایجاب می‌کند. این امر به ویژه پس از کاربرد الیستورها که احتمالاً بر سنتز متابولیت‌ها و بیوشیمی گیاه نیز مؤثر هستند ضرورت بیشتری دارد. از این رو، برای بررسی سطوح مختلف نیترژن و تأثیر غلظت‌های سالیسیلیک اسید بر خصوصیات بیوشیمیایی و عملکردی این گیاه دارویی در دشت خوزستان، این تحقیق طراحی و اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی پاسخ بیوشیمیایی و عملکردی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) به کاربرد سالیسیلیک اسید در سطوح مختلف نیترژن، آزمایش زراعی دوساله، در سال‌های زراعی ۹۳-۱۳۹۲ و ۹۴-۱۳۹۳ طراحی و اجرا گردید. محل اجرای آزمایش در بخش گیاهان دارویی مزرعه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، با عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۳۵ دقیقه و ۳۳ ثانیه شمالی و طول ۴۸ درجه و ۵۳ دقیقه و ۳۲ ثانیه شرقی و با ارتفاع ۲۰ متر از سطح دریا بود برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. آزمایش به صورت اسپلیت پلات بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح نیترژن (۰، ۷۰، ۱۴۰، ۲۱۰ و ۲۸۰ کیلوگرم نیترژن در هکتار از منبع کود اوره) در کرت‌های اصلی و سالیسیلیک اسید (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) در کرت‌های فرعی اعمال شد. عملیات آماده‌سازی زمین شامل آبیاری اولیه، دیسک عمیق و بعد دوبار دیسک عمود برهم برای خرد کردن کلوخه‌ها بود و

Gharib (۲۰۰۷) نیز گزارش کرد که غلظت‌های ۱۰-۵ و ۱۰-۳ مولار سالیسیلیک اسید سبب بهبود خصوصیات رشدی (ارتفاع بوته، تعداد انشعاب، گره و برگ در گیاه و سطح برگ) گیاه ریحان و مرزنگوش شد. همچنین معتقد است که این الیستور می‌تواند سبب بهبود فعالیت فتوسنتزی گیاه گردد. Figueroa Perez و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه واکنش نعنای فلفلی به محلول‌پاشی الیستورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن گزارش کردند که به دلیل القاء پروفایل فنلی ناشی از محلول‌پاشی برگ‌های نعنای فلفلی با غلظت‌های سالیسیلیک اسید، فنل کل در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به ترتیب ۶۵، ۳۵ و ۳۱ درصد و محتوای فلاونوئید به ترتیب ۹۳، ۱۰۰ و ۵۶ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین ترکیب‌های اصلی و عمده نعنای فلفلی مانند فنولیک اسید، فلاوان-۳-أل، فلاونول و فلاونون‌ها تحت تأثیر محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید به ویژه غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش یافتند. از طرفی نارنجین و سیناپیک اسید در برگ‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید مشاهده شد، اما در برگ‌های تیمار کنترل موردی یافت نشد. این ترکیب‌ها می‌توانند سبب تحریک آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز شوند. بنابراین سالیسیلیک اسید به عنوان یک الیستور شیمیایی می‌تواند نقش مهمی در افزایش تولید ترکیب‌های فنولی، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه در نعنای فلفلی داشته باشد که انعکاس این فرایند در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ظاهر می‌شود (Figueroa Perez et al., 2014). Bagherifard و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تأثیر سطوح سالیسیلیک (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بر آرتیشو نشان دادند که بیشترین میزان فنل کل و فلاونوئید کل (به ترتیب ۲/۸۴ و ۰/۰۸۹ میلی‌گرم در گرم) در سطح ۱ میلی‌مولار و کمترین میزان (۲/۱۹ و ۰/۰۵۱ میلی‌گرم در گرم) در شاهد (بدون سالیسیلیک اسید) بدست آمد. مطالعات کودی برای اغلب گیاهان در دشت خوزستان به دلیل کم بودن میزان ماده آلی و

و بقیه در چهار مرحله (هر سه هفته یکبار) به همراه آب آبیاری داده شد. برای محلول پاشی سالیسیلیک اسید، غلظت‌های مورد نظر با حل کردن مقادیر محاسبه شده سالیسیلیک اسید در آب تهیه گردید. محلول پاشی گیاهان از مرحله ۷۰٪ سطح سبز در هر واحد آزمایشی و در دو نوبت به فاصله هر ۱۵ روز یکبار با سم پاش پستی انجام شد. به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری ترکیب‌های مختلف محلول پاشی بر روی بوته‌ها نیز از مویان توین ۲۰ با نسبت ۰/۵٪ حجمی استفاده شد.

توزیع کود فسفر با توجه به آزمون خاک و چندساله بودن گیاه به میزان ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار قبل از کاشت به خاک داده شد. هر کرت چهار مترمربع و شامل شش خط کاشت بود. با آماده شدن زمین کشت ریزوم‌های نعنای فلفلی به صورت دستی و با فواصل ۳۰ و عمق شش سانتی‌متری خاک در اواسط اسفندماه هر سال انجام شد. در طول فصل رشد مبارزه با علف‌های هرز که عمدتاً اویار سلام (*Cyperus rotundus*) و پیچک صحرايي (*Convolvulus arvensis*) بود، به صورت دستی انجام شد و از مصرف هر گونه علفکش خودداری گردید. در هر تیمار کودی، ۲۰ درصد کود پس از استقرار گیاه

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

عمق خاک	بافت خاک	pH	کربن آلی (%)	هدایت الکتریکی (ds/m)	نیترژن کل (%)	پتاسیم در دسترس (mg/kg)	فسفر در دسترس (mg/kg)
۰-۳۰	سیلتی-رسی	۷/۵	۰/۷۱	۲/۲۳	۰/۰۷۹	۶/۲۷	۳/۰۷

اسید سولفوریک به مدت دو ساعت هضم شد. محصول بدست آمده  $\text{NH}_4^+$  بوده که به وسیله سود در دستگاه میکروکج‌دال اتوماتیک تقطیر گردید. محصول بدست آمده  $\text{NH}_3$  (گاز) بود که با اسید بوریک خنثی و با اسید سولفوریک تیترو و درصد نیترژن در دستگاه کج‌دال محاسبه و یادداشت شد (Kjeldahl, 1883).

برای اندازه‌گیری اسید آمینه آزاد کل، مقدار ۰/۱ گرم از بافت خشک شده برگ با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ در هاون چینی له شد. سپس عصاره در میکروتیوب ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفیوژ گردید. به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر محلول ناین هیدرین اضافه گردید. میکروتیوب‌ها در بن‌ماری قرار داده شدند و ۲ میلی‌لیتر الکل ۵٪ به آنها اضافه شد. محلول خنک شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت گردید. برای تهیه محلول استاندارد از

## اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه

گیاهان تا مرحله ابتدای غنچه‌دهی نگهداری و بعد از ریشه و برگ تازه برای سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ و ریشه به روش رنگ‌سنجی نمونه‌برداری انجام شد. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه در محلول بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار، pH=۷/۵)، حاوی پروبانول ۴٪، کلرامفنیل و نیترات پتاسیم قرار داده شده و به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی اولتراسونیک شد. یک میلی‌لیتر محلول نفتیل اتیلن دی‌آمید (۰/۰۲٪) افزوده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر یادداشت شد. برای تهیه محلول استاندارد از نیتريت سدیم استفاده و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز براساس میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت محاسبه گردید (Jaworski, 1971).

برای اندازه‌گیری نیترژن کل برگ و ساقه، ابتدا ۰/۵ گرم نمونه آسیاب شده همراه با قرص کاتالیزور و ۷ میلی‌لیتر

۱۰ دقیقه سانتیفیوژ شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره، یک میلی‌لیتر محلول فنول ۵٪ (محلول در آب)، ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه و محلول پس از ۱۰ دقیقه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام بن‌ماری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جذب نمونه‌ها نیز در طول موج ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد و با استفاده از استاندارد گلوکز میزان کربوهیدرات محلول بر حسب میلی‌گرم گلوکز بر گرم وزن خشک محاسبه گردید (Dubios et al., 1956).

برداشت گیاهان در اوایل غنچه‌دهی (Zeinali et al., 2014) با حذف حاشیه از یک مترمربع در اواسط تیرماه هر سال انجام شد. تعیین عملکرد تر در مزرعه انجام و پس از سایه‌خشک کردن نمونه‌ها، عملکرد ماده خشک اندازه‌گیری شد. اسانس‌گیری به روش کلونجر و درصد اسانس براساس وزن خشک نمونه محاسبه گردید (Mir-Hosseini, 2007).

قبل از انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا آزمون نرمال بودن داده‌ها انجام و بعد عمل تجزیه واریانس صورت گرفت. میانگین‌های بدست آمده با آزمون دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

### نتایج

#### فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه در دو سال اجرای آزمایش، تحت تأثیر اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید قرار داشت (جدول‌های ۲ و ۳). در سال اول و دوم کمترین میزان فعالیت آنزیم با محلول پاشی ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بدون مصرف نیتروژن (به ترتیب با ۱/۲ و ۱/۱۳ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بر ساعت) مشاهده شد (جدول ۴). در هر دو سال با افزایش میزان نیتروژن و غلظت سالیسیلیک اسید بر میزان

گلايسين و اسيد استيك استفاده و ميزان اسيد آمينه آزاد كل براساس ميلي‌گرم در گرم وزن خشك بافت محاسبه گردید (Ravindranth, 1981).

برای اندازه‌گیری نیترات برگ، مقدار ۰/۱ گرم برگ خشک پودر شده به مدت ۶۰ دقیقه با ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در ثانیه سانتی‌فیوژ گردید. مقدار ۲۰۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی با ۸۰۰ میکرولیتر سالیسیلیک اسید ۵٪ (محلول در اسید سولفوریک غلیظ) مخلوط شد. سپس محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن ۱۹ میلی‌لیتر سود ۲ نرمال اضافه شد تا pH آن به ۱۲ رسید. پس از رسیدن دمای محلول به دمای محیط، قرائت در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد. برای تهیه منحنی استاندارد نیز از نیترات پتاسیم استفاده و میزان نیترات براساس میلی‌گرم در گرم وزن خشک تعیین شد (Cataldo et al., 1975).

میزان فنول کل براساس روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. برای عصاره‌گیری ۰/۲ گرم وزن خشک اندام در اتانول خالص ۹۶٪ عصاره‌گیری گردید. به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی یا محلول‌های استاندارد (گالیک اسید) ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو رقیق (۷/۱۰ v/v) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، با افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم، حجم محلول واکنش با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده و بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر تعیین گردید. مقدار فنول کل نیز از روی منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Maizura et al., 2011).

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در برگ، ابتدا مقدار ۰/۱ گرم بافت با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی له شده و عصاره در ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت

### کربوهیدرات‌های محلول برگ

نتایج دوساله (جدول‌های ۲ و ۳) نشان داد در سال اول تنها اثر نیتروژن و در سال دوم اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید بر کربوهیدرات محلول معنی‌دار بود. در سال اول با مصرف کود نیتروژن تا ۷۰ کیلوگرم در هکتار، بیشترین میزان کربوهیدرات محلول (۱۰/۹ میلی‌گرم در گرم برگ خشک) تولید شد ولی با افزایش میزان کود کربوهیدرات محلول کاهش یافت (شکل ۱). در سال دوم آزمایش، بیشترین میزان کربوهیدرات محلول (۹/۹۹ میلی‌گرم در گرم برگ خشک) در تیمار کاربرد ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و کمترین میزان آن (۶/۸ میلی‌گرم در گرم برگ خشک) در تیمار مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد (شکل ۱). در واقع محتوای کربوهیدرات‌های محلول بیشتر تحت تأثیر نیتروژن قرار داشت، به طوری که غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در مقادیر پایین و بالای کود رفتار عکس نشان داد.

فعالیت آنزیم افزوده شد، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم با محلول پاشی ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار همراه با مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (به ترتیب با ۵/۳۹ و ۵/۳۹ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بر ساعت در سال اول و ۵/۰۶ و ۵/۰۴ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بر ساعت در سال دوم) بدست آمد.

### فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ

نتایج تجزیه واریانس (جدول‌های ۲ و ۳) نشان داد که فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ‌های نعنای فلفلی تنها تحت تأثیر کاربرد نیتروژن قرار گرفت. کمترین میزان فعالیت آنزیم در سال اول و دوم آزمایش (به ترتیب با ۰/۷ و ۰/۷۸ میکرومولار نیتريت در گرم بر ساعت) در شرایط عدم کاربرد کود شیمیایی مشاهده شد که با افزایش مصرف کود نیتروژنی تا ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار میزان فعالیت آنزیم در سال اول و دوم آزمایش به ترتیب به ۲/۸۷ و ۲/۸۲ میکرومولار نیتريت در گرم بر ساعت افزایش یافت (شکل ۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح نیتروژن و سالیسیلیک اسید بر پارامترهای گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲

میانگین مربعات											
منابع تغییر	درجه آزادی	نیترات ریدوکتاز ریشه	نیترات ریدوکتاز برگ	محتوای نیتروژن برگ	نیترات برگ	اسید آمینه آزاد برگ	فنول کل برگ	کربوهیدرات محلول برگ	عملکرد تر	عملکرد خشک	عملکرد اسانس
بلوک	۲	۴/۴***	۰/۲۶***	۲/۰۵***	۲/۷۹***	۲/۳۵***	۷۹۱/۶۴***	۳۴/۲۷***	۶۹۰۲۱۹۵***	۴۶۸۶۰۹***	۱۲۸/۹۸***
سطوح نیتروژن	۴	۲۷/۱***	۹/۹۷***	۳/۵۴***	۹/۵۳***	۴۱/۶۵***	۱۲۱۸/۸۱***	۳۲/۱۳***	۱۰۶۷۳۲۳۵***	۵۵۲۹۷۵/۸***	۲۰۱/۴۵***
اشتباه اصلی	۸	۰/۶۷	۰/۲	۰/۰۶	۰/۶۶	۰/۵۶	۱۲۹/۹۶	۴/۴۶	۲۹۵۱۶۵/۹	۲۳۹۱۵/۶	۱۶/۱۳
سالیسیلیک اسید	۳	۰/۱۴ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۶۵*	۰/۲۴ ns	۰/۲۶ ns	۶/۳ ns	۰/۵۵ ns	۱۵۵۰۹۳/۵ ns	۳۰۶۲/۰۲ ns	۲/۹۸ ns
سطوح نیتروژن × سالیسیلیک اسید	۱۲	۰/۴۸***	۰/۰۶۹ ns	۰/۰۵***	۰/۴۲*	۰/۷۵***	۶۷/۷۸*	۱/۹۲ ns	۸۶۲۴۵/۵ ns	۵۰۱۱/۳ ns	۱/۷۷ ns
اشتباه فرعی	۳۰	۰/۱	۰/۰۴	۰/۰۱۶	۰/۱۶	۰/۲۳	۲۶/۸۴	۱/۰۱۶	۱۳۲۵۱۹/۹	۷۴۲۸/۴	۲/۹۹
ضریب تغییرات (%)	-	۹/۸	۱۲/۳	۶/۶۵	۱۲/۲۶	۱۵/۶	۱۲/۹۹	۱۲/۲۵	۱۳/۶۳	۱۳/۹۹	۲۰/۴

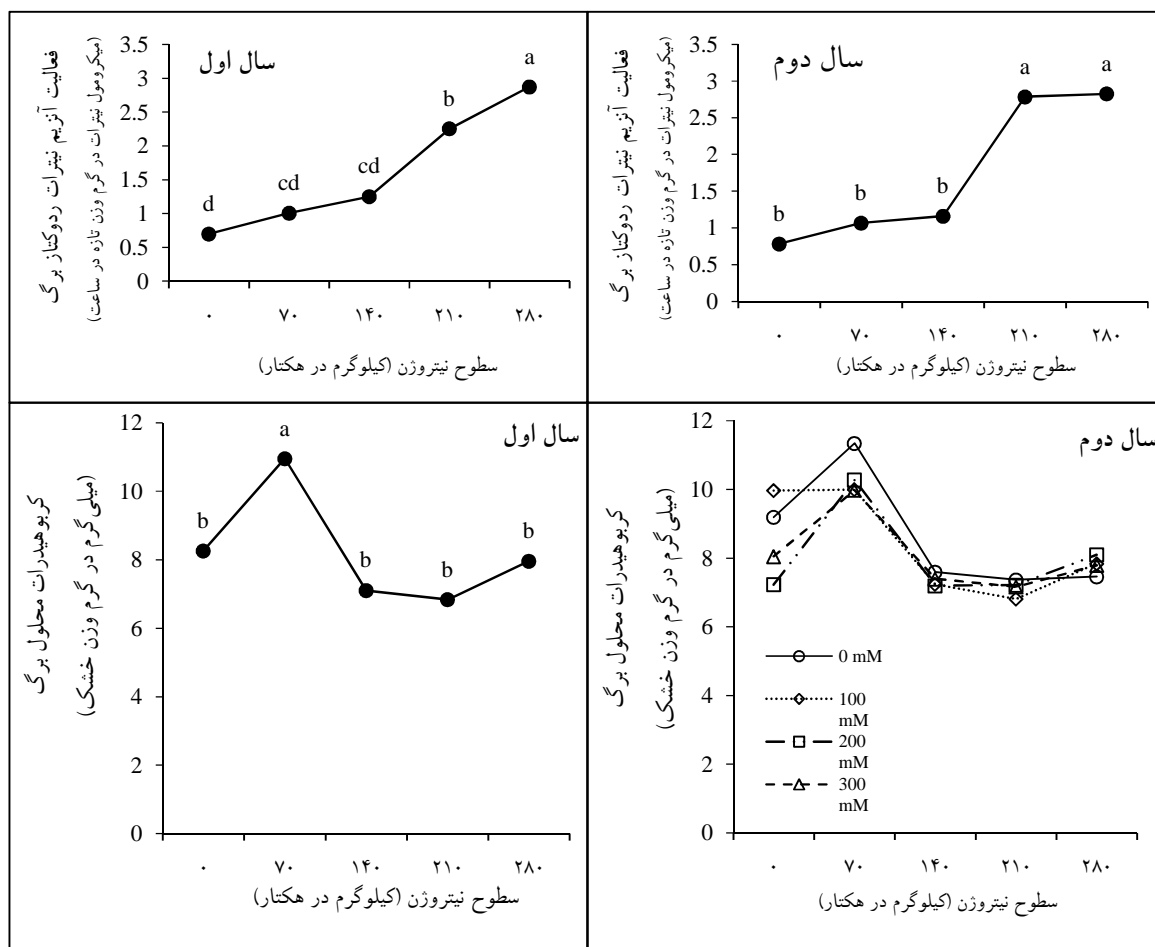
ns، \* و \*\* به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح اعتماد ۹۵٪ و ۹۹٪

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر سطوح نیتروژن و سالیسیلیک اسید بر پارامترهای گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳

میانگین مربعات											
منابع تغییر	درجه آزادی	نیترات ردوکتاز ریشه	نیترات ردوکتاز برگ	محتوای نیتروژن برگ	نیترات برگ	اسید آمینه آزاد برگ	فنول کل برگ	کربوهیدرات محلول برگ	عملکرد تر	عملکرد خشک	عملکرد اسانس
بلوک	۲	۱/۷۳***	۰/۰۱۶ns	۰/۳۲***	۲/۵***	۱/۵۷***	۲۷۶/۴۹***	۱۱/۶۶***	۸۵۸۵۴۷***	۶۴۵۵۵/۶۶***	۲۱/۸***
سطوح نیتروژن	۴	۲۸/۱۳***	۱۱/۹۳***	۳/۲۳***	۱۰/۱۳***	۴۵/۳۹***	۹۹۵/۷۶***	۲۰/۹۱***	۱۳۰۶۱۷۵۷***	۸۹۴۹۲۷/۶***	۲۴۲/۵***
اشتباه اصلی	۸	۰/۲۶۵	۰/۲۵	۰/۰۲۶	۰/۰۹	۰/۳۵	۲۳/۰۵	۰/۸۷	۴۴۴۸۱۰/۶	۲۷۰۴۴/۰۸	۸/۷۸۵۶۷۳
سالیسیلیک اسید	۳	۰/۲۲*	۰/۰۷۳ ns	۰/۰۰۴ ns	۰/۳۷***	۰/۷*	۲۶/۰۸*	۱/۱۱ ns	۱۳۴۸۲۴/۴ns	۸۴۵۲/۱۸ ns	۴/۰۳*
سطوح نیتروژن × سالیسیلیک اسید	۱۲	۰/۳۹***	۰/۱۳ ns	۰/۰۳***	۰/۱۴*	۰/۹۳***	۴۴/۱۲***	۱/۲۵***	۱۹۳۸۲۴/۸ ns	۱۱۵۳۰/۰۱ ns	۲/۶۵*
اشتباه فرعی	۳۰	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۷	۰/۲۵	۸/۷	۰/۳۹	۱۲۳۸۳۱/۸	۷۵۱۵/۳۸	۱/۰۴
ضریب تغییرات (%)	-	۶/۷	۱۴/۹۹	۴/۷۶	۸/۲۹	۱۵/۴	۷/۳۳	۷/۵۴	۱۲/۹	۱۳/۰۸	۱۱/۹۲

ns، \* و \*\* به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح اعتماد ۹۵٪ و ۹۹٪





شکل ۱- فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و کربوهیدرات محلول برگ در سطوح نیتروژن و الیسیتور شیمیایی در دو سال آزمایش

افزایش میزان کود نیتروژن و غلظت سالیسیلیک اسید افزایش یافت، به طوری که بیشترین مقدار آن در سال اول و دوم آزمایش (به ترتیب با ۲/۷۷٪ و ۲/۵۲٪) در تیمار ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن و محلول پاشی ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

#### نیترات برگ

بیشترین تجمع نیترات در سال اول و دوم آزمایش (به ترتیب با ۴/۹ و ۴/۴۸ میلی گرم نیترات در گرم وزن

#### محتوای نیتروژن برگ

اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید در هر دو سال بر محتوای نیتروژن برگ نفع فلفلی معنی دار بود (جدول های ۲ و ۳). کمترین محتوای نیتروژن برگ در سال اول و دوم آزمایش (به ترتیب با ۱/۰۳٪ و ۱/۰۸٪) در شرایط عدم مصرف کود نیتروژن مشاهده شد. در این سطح نیتروژن، کاربرد و عدم کاربرد سالیسیلیک اسید در هر دو سال تفاوت معنی داری بر محتوای نیتروژن برگ نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴). نیتروژن برگ با

مصرف نیتروژن، با غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار میزان اسید آمینه آزاد بیشتری در برگ‌های نعنای فلفلی تولید شد.

#### فنول کل برگ

بیشترین محتوای فنول کل برگ (۶۱/۲) و ۵۷/۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به ترتیب در سال اول و دوم) در تیمار عدم محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید و مصرف ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بدست آمد. با افزایش مقدار کود تا ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مقدار فنول کل برگ کاهش یافت و به کمترین مقدار (۲۷/۹ و ۲۸/۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به ترتیب در سال اول و دوم) در شرایط عدم محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید رسید. البته محلول‌پاشی غلظت‌های بالای الیستور در این سطح از نیتروژن، تأثیر معنی‌داری بر محتوای فنول کل برگ نعنای فلفلی نشان نداد (جدول ۴).

#### عملکرد تر کل

تجزیه واریانس داده در دو سال نشان داد که عملکرد تر نعنای فلفلی تنها تحت تأثیر مقدار کود نیتروژن قرار گرفت (جدول‌های ۲ و ۳). در هر دو سال با افزودن کود نیتروژن به خاک عملکرد تر نعنای فلفلی افزایش یافت (شکل ۲). زمانی که کود نیتروژن مصرف نشد، کمترین عملکرد تر نعنای فلفلی در سال اول و دوم آزمایش به ترتیب ۱۳۷۸/۷ و ۱۳۰۵/۶ گرم در مترمربع بود. با افزایش مقدار کود به ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، بیشترین عملکرد تر نعنای فلفلی (۳۳۱۶/۲ و ۳۴۸۰/۷ گرم در مترمربع به ترتیب در سال اول و دوم) تولید شد (شکل ۲).

خشک) به ترتیب در شرایط مصرف ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و عدم کاربرد آن مشاهده شد. اما با افزایش مقدار کود و غلظت سالیسیلیک اسید، تجمع نترات برگ به شدت کاهش یافت و کمترین تجمع نترات در سال اول (۲/۲۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و در سال دوم (۱/۸۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) همانند سال اول با مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار اما با کاربرد غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. البته در هر دو سال در سطح ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار تفاوت آماری بین کاربرد ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید وجود نداشت (جدول ۴).

#### اسید آمینه آزاد برگ

بررسی برهم‌کنش تیمارها نشان داد زمانی که کود نیتروژنی مصرف نشود و غلظت سالیسیلیک اسید تا ۳۰۰ میکرومولار افزایش یابد، پایین‌ترین مقدار اسید آمینه آزاد (۰/۶ و ۰/۵۲ میلی‌گرم در گرم به ترتیب در سال اول و دوم) در نعنای فلفلی تولید می‌شود. در این شرایط، کاهش غلظت سالیسیلیک اسید به ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار و همچنین عدم کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به تولید بیشتر اسید آمینه آزاد گردید (جدول ۴). حداکثر مقدار اسید آمینه آزاد برگ (۵/۹۹ و ۵/۶۳ میلی‌گرم در گرم به ترتیب در سال اول و دوم) با مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد (جدول ۴). در مجموع در مقادیر پایین کود نیتروژن، با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و در مقادیر بالاتر

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین ترکیب تیمارهای تراکم و تاریخ کاشت بر خصوصیات نعنای فلفلی در دو سال زراعی

فنول کل برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		اسید آمینه برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		نیترات برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		محتوای نیتروژن برگ (%)		فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه (میکرومول نیترات در گرم وزن تازه در ساعت)		تیمارهای آزمایش
سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	
۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۰
۵۰/۱ab	۴۶/۰۲abcd	۱/۴۵gh	۱/۳۳e	۴/۴۷abc	۴/۰۵abcd	۱/۱۸hij	۱/۱۱ij	۱/۶۳de	۱/۵f	۰
۵۷/۹۸a	۴۵/۵۲abcd	۱/۵۴gh	۱/۱۹e	۴/۴۹ab	۳/۵abcde	۱/۳ghij	۱/۰۳j	۱/۸۱de	۱/۴f	۱۰۰
۴۴/۷۸abc	۴۷/۳۶abcd	۱/۲۷gh	۱/۳۴e	۳/۹۶abc	۴/۱abc	۱/۱۳ij	۱/۲۱ij	۱/۱۴e	۱/۲f	۲۰۰
۴۶/۸۹b	۵۳/۲۳abc	۰/۵۳h	۰/۶e	۳/۹۱bc	۴/۳۶ab	۱/۰۸j	۱/۲۵hij	۱/۲۷de	۱/۴f	۳۰۰
۵۷/۷۱a	۶۱/۱۸a	۱/۸g	۱/۹۱de	۴/۵۶a	۴/۸۶a	۱/۶۱۲efg	۱/۷۸efg	۲/۲۸d	۲/۳۹def	۰
۴۹/۲۸ab	۵۸/۹۸ab	۱/۳۱gh	۱/۵۷de	۴/۱۵abc	۴/۹۱a	۱/۴۵fghi	۱/۷۶efgh	۲/۱۲de	۲/۵۳cdef	۱۰۰
۴۸/۰۴b	۴۸/۳۷abcd	۰/۶۸gh	۰/۶۹e	۳/۸۷bc	۳/۹abcde	۱/۴۹fgh	۱/۵۶ghi	۱/۹۶de	۱/۹۷ef	۲۰۰
۴۷/۲۴b	۴۴/۸۸abcd	۱/۳۱gh	۱/۱۸e	۳/۸۵c	۳/۶۶abcde	۱/۵۲fg	۱/۵۱ghj	۱/۵۱de	۱/۴۱f	۳۰۰

اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید

ادامه جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین ...

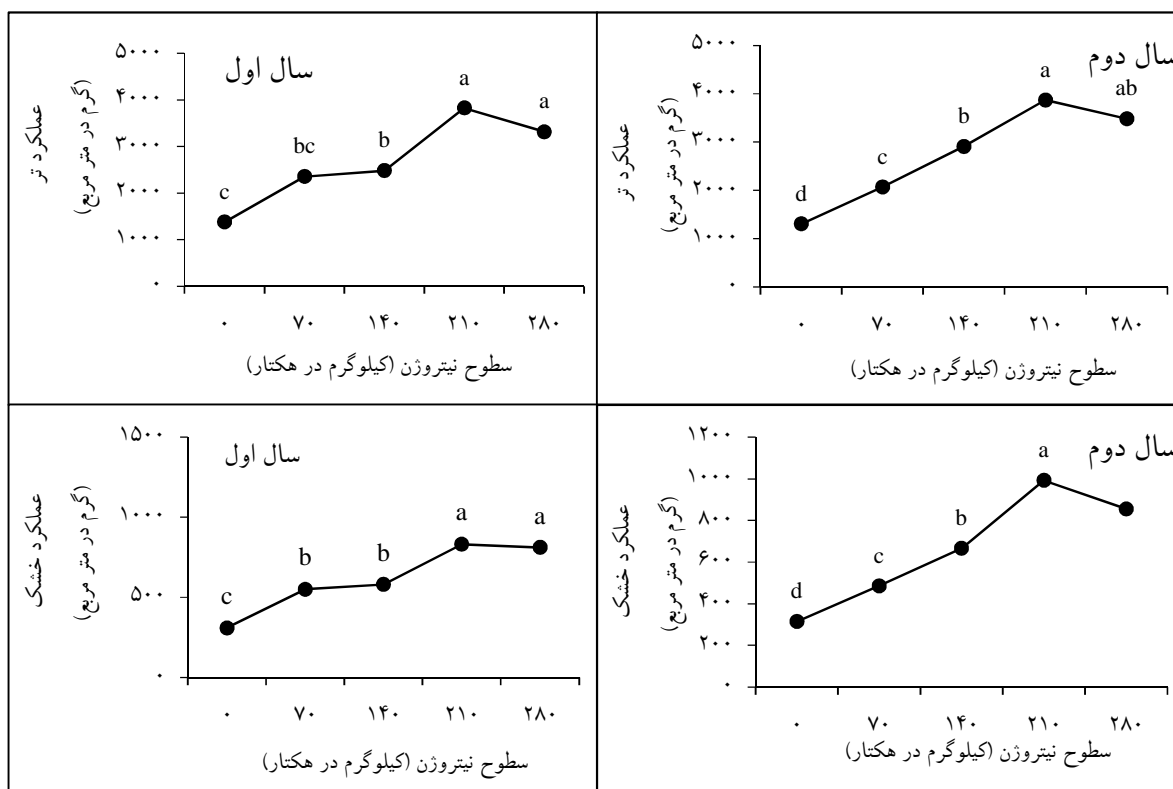
فنول کل برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		اسید آمینه برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		نیترات برگ (میلی گرم در گرم وزن خشک)		محتوای نیتروژن برگ (%)		فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه (میکرومول نیترات در گرم وزن تازه در ساعت)		تیمارهای آزمایش
سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	سال زراعی	
۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۱۳۹۴-۹۵	۱۳۹۳-۹۴	۰
۳۶/۰۷cd	۳۶/۳۴bcd	۳/۰۱f	۳/۰۲dc	۳/۱۵d	۳/۱۸bcde	۱/۶۳def	۱/۷۳fgh	۴/۰۴abc	۴/۰۷abc	۰
۳۵/۳۵cd	۳۲/۸۷cd	۳/۲۹ef	۳/۰۶dc	۳/۰۴de	۲/۸bcde	۱/۸۸cde	۱/۷۷efg	۳/۷۹bc	۳/۵۳bcde	۱۰۰
۳۴/۶۶d	۳۲/۵۷cd	۴/۱۲def	۳/۸۷bc	۳/۰۶de	۲/۸۷bcde	۲/۰۱bc	۱/۹defg	۴/۱۳abc	۳/۸۸abcd	۲۰۰
۳۴/۴۳d	۳۳/۵۳cd	۳/۳ef	۳/۰۹dc	۳/۲۷d	۳/۱bcde	۱/۹۹bcd	۱/۹cdefg	۴/۲۳abc	۴/۱۱abc	۳۰۰
۳۱/۸۹d	۳۰/۱۹cd	۴/۳۸cde	۴/۱۶bc	۲/۳۹fgh	۲/۲۶e	۲/۲۸ab	۲/۲bcdef	۴/۶abc	۴/۳۵ab	۰
۳۲/۹۷d	۳۱/۴۲cd	۴/۲۸cde	۴/۰۸bc	۲/۷۴def	۲/۶cde	۲/۲۸ab	۲/۲bcdef	۳/۵۹c	۳/۴۲bcde	۱۰۰
۳۶/۳۵cd	۳۰/۸۹cd	۶/۰۵a	۴/۵۱abc	۲/۶۸defg	۲/۴۵cde	۲/۲۹ab	۲/۴abc	۴/۸۹a	۴/۱۷abc	۲۰۰
۳۲/۸d	۳۲/۸cd	۵/۲۴abcd	۴/۸۵ab	۲/۴۴efgh	۲/۴۴cde	۲/۲۳ab	۲/۲abcde	۴/۱abc	۴/۱abc	۳۰۰
۲۸/۹۳d	۲۷/۹۲d	۴/۷۹bcd	۴/۶۴ab	۲/۴۸efg	۲/۶۹bcde	۲/۴۲a	۲/۳۷abcd	۴/۷۲ab	۴/۵۵ab	۰
۳۳/۵۷d	۳۲/۹۱cd	۵/۱۵abcd	۵/۰۵ab	۲/۱fgh	۲/۴de	۲/۳۹a	۲/۳۹abcd	۴/۹۱a	۴/۸۲ab	۱۰۰
۳۴/۶۷d	۳۵/۶۱bcd	۵/۶۳ab	۵/۹۹a	۱/۸h	۲/۲۸e	۲/۳۹a	۲/۶۱ab	۵/۰۶a	۵/۳۹۵a	۲۰۰
۳۲/۸۷d	۳۵/۲۳cd	۵/۴abc	۵/۷۸a	۲/۱gh	۲/۲۵e	۲/۵۲a	۲/۷۷a	۵/۰۴a	۵/۳۹a	۳۰۰

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمالی ۵٪ ندارند.

افزایش مصرف کود نیتروژنی بر مقدار ماده خشک اولیه افزوده شد و با مصرف ۲۱۰ کیلوگرم حداکثر به ۸۱۱/۷ و ۸۵۵/۵۶ گرم در مترمربع رسید (شکل ۲). در دو آزمایش اختلاف آماری معنی‌داری بین مصرف ۲۱۰ و ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در تولید زیست‌توده نعناع فلفلی مشاهده نشد (شکل ۲).

### عملکرد خشک کل

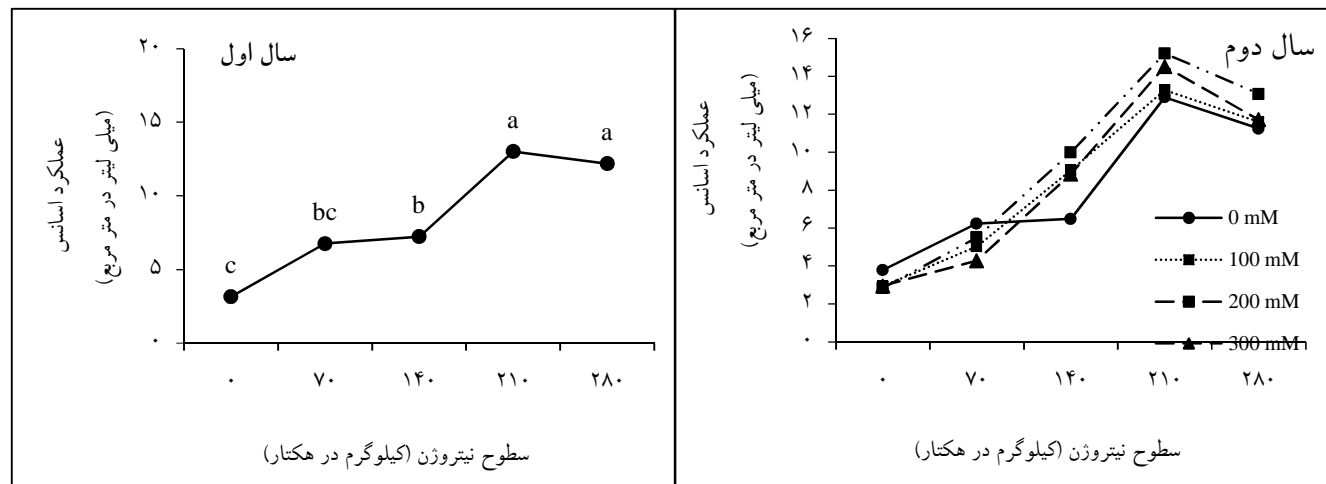
نتایج تجزیه واریانس (جدول‌های ۲ و ۳) نشان داد که عملکرد خشک نعناع فلفلی نیز تنها تحت تأثیر کود نیتروژن قرار دارد. در شرایطی که نعناع فلفلی کود شیمیایی نیتروژنی دریافت نکرد (۳۰۹ و ۳۱۴/۰۱ گرم در مترمربع عملکرد خشک به ترتیب در سال اول و دوم تولید شد). با



شکل ۲- عملکرد تر و خشک نعناع فلفلی در سطوح مختلف نیتروژن و الیستور شیمیایی در دو سال آزمایش عملکرد اسانس

کود حداکثر به ۱۳/۰۱ میلی‌لیتر در مترمربع در سال اول (با مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) و ۱۵/۲ میلی‌لیتر در مترمربع در سال دوم (در تیمار مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن به همراه کاربرد غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید) رسید (شکل ۳).

سطوح نیتروژن در سال اول آزمایش و برهم‌کنش نیتروژن در سالیسیلیک اسید در سال دوم بر عملکرد اسانس تأثیر معنی‌داری نشان دادند (جدول‌های ۲ و ۳). کمترین عملکرد اسانس در سال اول و دوم (به ترتیب ۳/۱۲ و ۳/۱۵ میلی‌لیتر در مترمربع) در تیمار عدم مصرف نیتروژن تولید و با مصرف



شکل ۳- عملکرد اسانس نعنای فلفلی در سطوح مختلف نیتروژن و الیسیتور شیمیایی در دو سال آزمایش

## بحث

متفاوت سالیسیلیک اسید سبب جذب نیتروژن و افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ‌ها و ریشه‌های ذرت شد، اگرچه ثابت شده است که غلظت‌های بالاتر از ۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید اثر بازدارنده‌ای بر گیاهان دارد (Jain & Srivastava, 1981). در این آزمایش نیز با مصرف مقادیر بالای نیتروژن و تولید زیست‌توده بیشتر، غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید سبب تشدید فعالیت نیترات ردوکتاز در سلول ریشه شده است.

با افزایش مقدار کود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ‌ها نیز افزایش یافت. در سلول‌های یگانه، نیترات تنها درون واکوئل‌ها ذخیره می‌شود. رها شدن نیترات به درون سیتوپلاسم برای احیاء، می‌تواند مرحله‌ای محدودکننده برای احیاء نیترات و به این ترتیب، برای مصرف نیتروژن نیتراسته در فرایندهای رشد باشد. بنابراین قطع مصرف نیتروژن برای ریشه‌ها به‌ویژه کودهای نیتراتی، ممکن است با وجود زیاد بودن نیترات در بخش هوایی، به کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز و میزان رشد منجر شود (Marschner, 1995). در این آزمایش، با افزایش مصرف کود نیتروژن و تولید برگ‌های جدید، سایه‌اندازی برگ‌ها منجر به ریزش برگ‌های مسن‌تر شد. در برگ‌های مسن‌تر چون برگ‌ها توسعه یافته‌اند و دیگر نیازی به منابع نیتروژنی برای رشد خود ندارند، بنابراین احتمالاً مقادیر بالای نیترات باقی‌مانده در برگ باعث کاهش و حتی توقف فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز شده است. به‌عبارت دیگر مقصد مصرف  $\text{NO}_3^-$  دیگر وجود نداشت.

مطالعات نشان داده است که وضعیت نیتروژن اثرات قابل‌توجهی بر مقدار کربوهیدرات دارد، به‌طوری‌که ارتباط منفی آشکاری بین درصد نیتروژن گیاهان و درصد کربوهیدرات وجود دارد (Matsuo et al., 1995). در این آزمایش با افزایش مقدار کود کربوهیدرات محلول در برگ‌ها کاهش یافت. نیتروژن به علت تثبیت اسیدهای آمینه، نیاز به برخی متابولیت‌های چرخه کربس دارد، ضمن اینکه احیاء

براساس نتایج سال اول و دوم آزمایش، در شرایط عدم کاربرد کود نیتروژنی، غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید موجب کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه گردید. اما با افزایش مقادیر کود، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید نیز باعث تشدید فعالیت آنزیم در ریشه شد. گیاهان رشد کرده در شرایط نبود نیتروژن، میزان دریافت نیترات کم و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز پایینی دارند. ولی پس از قرارگیری در معرض نیتروژن، سرعت فعالیت این فرایندها افزایش یافته تا به یک نقطه حداکثر رسیده، سپس به تدریج کاهش می‌یابد تا اینکه به یک میزان ثابت می‌رسد. اگرچه این الگو در میان بیشتر گیاهان عمومی است، ولی با توجه به گونه تفاوت‌هایی در زمان وقوع هر یک از مراحل فوق وجود دارد (Campbell, 1999). Hayat و همکاران (۲۰۱۲) نیز در بررسی تأثیر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  مولار) بر نخود گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا سطح  $10^{-5}$  مولار افزایش یافت و در غلظتی بیشتر از  $10^{-5}$  مولار، میزان آنها کاهش یافت. در آزمایشی دیگر بر روی گندم، غلظت ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید سبب افزایش ۳۶ درصدی در فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز شد (Hayat et al., 2007). در مجموع مصرف مقادیر بالای نیتروژن، همزمان با افزایش زیست‌توده، کاربرد برگی سالیسیلیک اسید در غلظت‌های بالاتر نیز نتیجه بهتری را به‌دنبال داشت. از آنجایی که آنزیم نیترات ردوکتاز در سلول‌های اپیدرمی پوست ریشه و سلول‌های مزوفیلی برگ واقع شده است (Fedorova et al., 1994) و سالیسیلیک اسید با توجه به غلظت، زمان و گیاه مورد استفاده دارای اثر دوگانه‌ای است، در غلظت‌های مناسب با کاهش تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل‌ها، افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول و سنتز پروتئین‌های جدید از دستگاه فتوسنتزی حمایت می‌کند (Popova et al., 2003). غلظت‌های

تأثیر سالیسیلیک اسید به دلیل تشدید فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بیشتر می‌شود.

طی دو سال اجرای آزمایش با افزایش مقدار کود، تجمع نیترات در برگ‌های نعنای فلفلی کاهش یافت. همچنین در برگ‌های کاملاً رشد کرده (برگ‌های نعنای فلفلی در شرایطی که مقادیر کمی نیتروژن دریافت کرده‌اند) بیشترین تجمع نیترات در برگ مشاهده گردید. نیترات در درون آوند آبکشی غیرمتحرک است و میزان زیاد نیترات در برگ‌های کاملاً رشد کرده از نظر سوخت و ساز نیتروژن گیاهان دارای استفاده محدود است (Lea & Miflin, 1980). به علاوه اینکه بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ هنگامی دیده می‌شود که میزان انبساط برگ در حداکثر باشد و پس از آن فعالیت به سرعت کاهش می‌یابد. به این ترتیب در برگ‌های کاملاً رشد کرده و مسن، میزان فعالیت نیترات ردوکتاز، معمولاً بسیار اندک است و به دنبال آن میزان نیترات در این برگ‌ها افزایش می‌یابد (Marschner, 1995). همچنین در این آزمایش افزایش مقدار غلظت سالیسیلیک اسید، تجمع نیترات را کاهش داد. این امر احتمالاً به نقش فیزیولوژیک سالیسیلیک اسید در فراهمی و انتقال مواد غذایی و افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بستگی دارد.

افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در شرایط عدم مصرف کود در هر دو سال، اسید آمینه آزاد برگ را کاهش داد اما این روند با افزودن نیتروژن به خاک تغییر کرد و بیشترین میزان اسید آمینه آزاد در شرایط کاربرد نیتروژن و سالیسیلیک اسید بیشتر مشاهده شد. نیتروژن در تغذیه گیاه یک عنصر بسیار مهم است، از جمله برای سنتز اسیدهای آمینه لازم است. اسیدهای آمینه در تشکیل پروتوپلاسم، تقسیم سلولی و رشد گیاه بکار می‌روند. از این رو در شرایطی که نیتروژن در دسترس کم باشد، کاهش اسیمیلاسیون نیتروژن سنتز اسیدهای آمینه آزاد را در برگ‌های نعنای فلفلی کاهش می‌دهد. با این کاهش، گیاه قادر به ساختن پروتئین برای فرایندهای

نیتريت و نیترات هم احتیاج به نیروی احیاءکننده حاصل از تنفس یا فتوسنتز دارد که اگر از طریق تنفس تأمین شود، هیدرات‌های کربن کم می‌شوند و اگر از راه فتوسنتز تأمین شوند، دی‌اکسید کربن کمتری احیاء و به هیدرات کربن تبدیل می‌شود. پس افزایش نیتروژن سبب کاهش هیدرات‌های کربن در گیاه می‌شود (Minotti et al., 1969). در این آزمایش همچنین محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در مقادیر کم کود سبب کاهش کربوهیدرات‌های محلول برگ گردید. غلظت‌های سالیسیلیک اسید برای تولید قندهای محلول برگ در زمانی که کود نیتروژنی کم مصرف شود، برای تعداد برگ‌های موجود بیش از نیاز بوده و سبب کاهش میزان قندهای محلول گیاه می‌شود. غلظت‌های سالیسیلیک اسید در این شرایط تغذیه‌ای، سیستم آنزیمی هیدرولیزکننده پلی‌ساکاریدها را مهار کرده و به عبارت دیگر سرعت تبدیل قندهای نامحلول به قندهای محلول را کاهش داده است (Khodary, 2004). در این آزمایش نیز افزایش مقدار کود نیتروژن احتمالاً با تولید تعداد زیادی برگ جدید و کوچک، قندهای محلول کمتری نسبت به مصرف مقادیر پایین نیتروژن (که برگ‌های مسن و بزرگتری را در پی داشت) تولید کرد.

نتایج دوساله اجرای پروژه نشان داد که محتوای نیتروژن برگ نعنای فلفلی با افزایش مقدار کود نیتروژن و غلظت سالیسیلیک اسید افزایش یافت. عدم کاربرد کود با محدود کردن فعالیت نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ نعنای فلفلی، اسیمیلاسیون نیترات را در گیاه کاهش داد (Marschner, 1995) و سبب کاهش محتوای نیتروژن شده است. محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه کودهای شیمیایی نیتروژنی سبب افزایش جذب عناصر غذایی نعنای فلفلی گردید (Abdou & Mohamed, 2014). بنابراین به نظر می‌رسد کاربرد سالیسیلیک اسید در این شرایط با افزایش دادن میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز محتوای نیتروژن برگ را افزایش داده است اما با افزایش مصرف کود نیتروژنی میزان



غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به ترتیب ۳۵، ۶۵ و ۳۱ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت.

اجرای این آزمایش طی دو سال نشان داد که سالیسیلیک اسید تأثیر معنی‌داری بر افزایش عملکرد تر داشت و تنها با افزایش مقدار کود تا ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، عملکرد تر افزایش یافت. افزایش کود نیتروژن سبب افزایش تعداد برگ نعنای فلفلی شده، زیرا نیاز گیاه را از لحاظ نیتروژن تأمین می‌کند و موجب افزایش فرآورده‌های فنوستزی و در نتیجه با افزایش رشد رویشی و در نهایت افزایش زیست‌توده گیاه می‌شود (Izadi et al., 2010). Zeinali و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کردند که دامنه تغییرات وزن تر اندام هوایی تحت سطوح مختلف نیتروژن از ۲/۶۸ کیلوگرم در مترمربع در سطح مصرف ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار تا ۳/۲۶ کیلوگرم در مترمربع در سطح مصرف ۳۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار متفاوت است و مصرف ۲۰۰ و ۳۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بر عملکرد تر نعنای فلفلی تفاوت معنی‌داری ندارد.

نتایج آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴ و ۱۳۹۴-۹۵ نشان داد که عملکرد خشک نعنای فلفلی تنها تحت تأثیر مصرف کود نیتروژن افزایش می‌یابد. اثر نیتروژن بر افزایش وزن تر و خشک را به شرکت این عنصر در ساختار مولکول‌های بزرگ مانند پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک نسبت داده‌اند (Zhao, 2006). نیتروژن علاوه بر اینکه میزان رشد گیاه را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد سبب ایجاد تغییرات آناتومیکی و مورفولوژیک زیادی در سطح مولکولی و در اندام‌های مختلف گیاه می‌شود، به گونه‌ای که نیتروژن اثر زیادی بر اندازه، ترکیب‌ها و کارکرد کلروپلاست دارد. از این رو، گیاهانی که در شرایط کمبود نیتروژن رشد کرده‌اند در مقایسه با تیمارهای شاهد کلروپلاست‌هایی کوچکتر و پهن‌تر و غشاهای تیلاکوئیدی نازک‌تری دارند (Heobald et al., 1998).

متابولیسمی، ساختاری و نگهداری سطح مطلوب رشد نیست (Barker & Pilbeam, 2006). همچنین سالیسیلیک اسید نیز به‌عنوان یک الیسیتور شیمیایی نقش مهمی در افزایش تولید ترکیب‌های فنولی، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه نعنای فلفلی دارد (Figueroa Perez et al., 2014).

در دو سال آزمایش، عدم مصرف نیتروژن نسبت به کاربرد ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، مقدار فنول کل کمتری تولید کرد. همچنین مصرف نیتروژن بیشتر از ۷۰ کیلوگرم در هکتار منجر به کاهش میزان فنول کل گردید. Gershenzon و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که سنتز منوترین‌ها تا ۲۱ روز از عمر برگ نعنای فلفلی به سرعت در حال افزایش هستند و پس از ۲۱ روز، تجمع منوترین‌ها با سرعت ثابت ادامه می‌یابد. از این رو برگ‌هایی که در حال توسعه هستند نسبت به برگ‌هایی که کاملاً رشد کرده‌اند، میزان منوترین‌های کمتری دارند. همچنین Nguyen و Niemeyer (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که نیتروژن تأثیر منفی معنی‌داری بر سطوح ترکیب‌های فنولی گیاه ریحان رقم اپال و جنوویس دارد، به طوری که بیشترین مقدار آن در ۰/۱ میلی‌مول نیتروژن مصرفی و کمترین آن در ۰/۵ میلی‌مول نیتروژن مصرفی بدست آمد. در این آزمایش نیز با افزایش مقدار کود، تولید برگ‌ها و سایه‌انداز گیاه بیشتر شد و ریزش برگ‌های مسن گیاه را به دنبال داشت. از یکسو ریزش برگ‌های مسن و از سویی توسعه برگ‌های جوانی که در حال ساخت متابولیت‌های اولیه هستند (و کمتر وارد مرحله تبدیل متابولیت‌های اولیه به ثانویه شده‌اند)، احتمالاً منجر به کاهش محتوای فنول کل در برگ نعنای فلفلی گردید. کاربرد سالیسیلیک اسید تنها در مقادیر بالای کود موجب افزایش غیرمعنی‌دار میزان فنول کل برگ در دو سال اجرای آزمایش گردید. Figueroa Perez و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه واکنش نعنای فلفلی به محلول‌یابی الیسیتورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن گزارش کردند که به دلیل القاء پروفایل فنولی، فنول کل در

مورد بررسی نشان داد. اما در زمان عدم مصرف کود، کاربرد غلظت بالای سالیسیلیک اسید (به عنوان یک الیسیتور) به نوعی با ایجاد تنش و کاهش فعالیت آنزیمی، محتوای نیتروژن و سایر خصوصیات گیاه نتیجه مطلوبی در پی نداشت. بنابراین در زراعت نعنای فلفلی در دشت خوزستان مصرف ۲۱۰ تا ۲۸۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن همراه با کاربرد غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید توصیه می‌شود.

### منابع مورد استفاده

- Abdou, M. and Mohamed, M.A.H., 2014. Effect of plant compost, salicylic and ascorbic acids on *Mentha piperita* L. plants. *Biological Agriculture and Horticulture*, 30(2): 131-143.
  - Bagherifard, A., Bagheri, A., Sabourifard, H., Bagherifard, G. and Najari, M., 2015. The effect of salicylic acid on some morphological and biochemistry parameters under salt stress in herb artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 10(10): 745-750.
  - Balakrishnan, A., 2015. Therapeutic uses of peppermint- a review. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 7(7): 474-476.
  - Barker, A.V. and Pilbeam, D.J., 2006. *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press, 196p.
  - Bideshki, A. and Arvin, M.J., 2010. Effect of salicylic acid (SA) and drought stress on growth, bulb yield and allicin content of garlic (*Allium sativum*) in field. *Plant Ecophysiology*, 2: 73-79.
  - Brown, B., 2003. Mint soil fertility research in the PNW. *West Nutrient Management*, 5(3): 54-60.
  - Campbell, W.H., 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the Gap between biochemistry and physiology. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50: 277-303.
  - Cataldo, D.A., Schrader, L.E. and Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6: 71-80.
  - Croteau, R.B., Ringer, K.L., Davis, E.M. and Wildung, M.R., 2005. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, 92: 562-577.
  - Dubios, M.K.A., Gilles, J.K., Hamilton, P.A., Rebers, A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for
- در این آزمایش‌ها طی دو سال با کاربرد نیتروژن عملکرد اسانس افزایش یافت. با اینکه نیتروژن در ساختار اسانس وجود ندارد اما کاربرد آن منجر به افزایش تراکم غدد ترشحی برگ نعنای فلفلی می‌شود (Marotti *et al.*, 2004). علت افزایش غدد ترشحی، تولید و مصرف قندهای ساده و در نتیجه توسعه بیشتر سطح برگ بوته و تولید ترکیب‌های اولیه بیشتر برای تولید اسانس است. Singh و همکاران (۲۰۰۳) نیز گزارش کردند که عملکرد اسانس در گونه‌های *M. arvensis*، *M. piperita* و *M. spicata* وقتی نیتروژن بیشتر از ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار مصرف شد، افزایش می‌یابد. در این آزمایش کاربرد سالیسیلیک اسید در سال دوم سبب بهبود عملکرد اسانس نعنای فلفلی گردید. در آزمایشی محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه کودهای شیمیایی نیتروژنی سبب افزایش وزن خشک گیاه، رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر غذایی نعنای شد که مجموع عوامل فوق سبب افزایش عملکرد اسانس نعنای فلفلی گردید (Abdou & Mohamed, 2014). Idrees و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که سالیسیلیک اسید، اسانس علف لیمو را از طریق تحریک پارامترهای رشد، افزایش جمعیت غده‌های ترشح اسانس و افزایش کربوهیدرات‌های گیاه افزایش می‌دهد.
- به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که برای دستیابی به بیشترین عملکرد کمی (عملکرد تر و خشک و اسانس) در منطقه مورد مطالعه، مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بهترین نتیجه را به دنبال دارد، زیرا به نوعی کمبود ماده آلی و به دنبال آن کمبود نیتروژن را در خاک جبران می‌کند. همچنین براساس نتایج دو ساله آزمایش، غلظت‌های سالیسیلیک اسید در شرایط مصرف و عدم مصرف نیتروژن اغلب واکنش کاملاً متضادی به دنبال داشت. به طوری که عمدتاً غلظت بالای سالیسیلیک اسید (مانند ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرومولار) تنها در زمان مصرف مقادیر بالای نیتروژن (مصرف ۲۱۰ تا ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) تأثیر چشمگیری بر اغلب صفات

- Izadi, Z., Ahmadvand, G., Asna Ashri, M. and Piri, J., 2010. Effect of nitrogen and plant density on some growth characteristic, yield and essence in peppermint. Iranian Journal of Field Crops Research, 41: 824-836.
- Jain, A. and Srivastava, H.S., 1981. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. Physiology of Plant, 51: 339-342.
- Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications, 43(6): 1274-1279.
- Khodary, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plant. International Journal of Biology, 6: 5-8.
- Kjeldahl, J., 1883. "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern" (New method for the determination of nitrogen in organic substances). Zeitschrift für Analytische Chemie, 22(1): 366-383.
- Lea, P.J. and Mifflin, B.J., 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plants: 567-607. In: Mifflin, B.J., (Ed.). The Biochemistry of Plants (Vol. 5). Academic Press, New York, 670p.
- Malakouti, M.J., 2004. Fertilizer Use by Crops in Iran. Report Prepared for FAO. Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Crout, W., Craufutd, K. and Deans, S., 2004. Effect of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. Flavor and Fragrance Journal, 9(3): 125-129.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, 889p.
- Maizura, M., Aminah, A. and Wan Aida, W.M., 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. International Food Research Journal, 18(2): 529-534.
- Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R. Ishihara, K. and Hirata, H., 1995. Science of the Rice Plant. Vol. 2. Physiology. Food and Agricultural Policy Research Center, Tokyo, 248p.
- Mir-Hosseini, M., 2007. Effective extraction methods and devices, pharmaceutical and food industries, Zahedan Branch, Islamic Azad University Press, 170p.
- Minotti, P.L., Williams, D.C. and Jackson, W.A., 1969. Nitrate uptake by wheat as Influence by ammonium and other cations. Crop Science, 9: 9-14.
- determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- Esmailzadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M., 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell & Tissue, 4(2): 119-128.
- Farzana, M.U.Z.N., Tharique, I. and Al-sultana, A., 2014. A review of ethnomedicine, phytochemical and pharmacological activities of *Acacia nilotica* wild. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(1): 84-90.
- Fedorova, E., Greenwood, J. and Oaks, S.A., 1994. In-situ localization of nitrate reductase in maize roots. Planta, 194: 279-286.
- Figueroa Perez, M.G., Rocha-Guzman, N.E., Mercado-Silva, E., Loarca-Pina, G. and 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.
- Gershenzon, J., McConkey, M.E. and Croteau, R.B., 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. Plant Physiology, 122: 205-213.
- Gharib, F.A., 2007. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. International Journal of Agriculture and Biology, 9: 294-301.
- Ghazemzadeh, A. and Jaafar, H., 2012. Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Journal of Medicinal Plants Research, 6: 790-795.
- Hayat, S., Ali, B. and Ahmad, A., 2007. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. A Plant Hormone, 1-14.
- Hayat, Q., Hayat, S., Alyemeni, M. and Ahmad, N., 2012. Salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. Plant Soil Environment, 58(9): 417-423.
- Heobald, J.C., Mitchell, R.A.C., Parry, M.A.J. and Lawlor, D.W., 1998. Estimating the excess investment in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of spring wheat grown under elevated CO<sub>2</sub>. Plant Physiology, 118: 945-955.
- Idrees, M., Khan, M.M.A., Aftab, T., Naeem, M. and Hashmi, N., 2010. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. Journal of Plant Interaction, 5: 293-303.

- source and rate of nitrogen fertilizer on yield and water and nitrogen use efficiency of peppermint (*Mentha piperita* L.). Iranian Journal of Crop Sciences, 18(1): 14-31.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 439-463.
  - Ravindranth, M.H., 1981. Manual Research Method for Crustacean Biochemistry and Physiology. Special Publication, 172p.
  - Raun, W.R. and Johnson, G.V., 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agronomy Journal, 91: 357-363.
  - Singh, V.P., Chatterjee, B.N. and Singh, P., 2003. Response of mint species to nitrogen fertilization. Journal of Agriculture Science, 113(2): 267-271.
  - Zeinali, H., Hosseini, H. and Shirzadi, M.H., 2014. Effects of nitrogen fertilizer and harvest time on agronomy, essential oil and menthol of *Mentha piperita* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(3): 486-495.
  - Zhao, J., 2006. The effect of nitrogen fertilization on spearmint. Journal of Essential Oil Research, 18: 452-455.
  - Mohammadi Farsani, M. and Ghasemi Pirbalouti, A., 2014. Using elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell and organ suspension cultures. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs), 5(3): 113-120.
  - Nguyen, P.M. and Niemeyer, E.D., 2008. Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 8685-8691.
  - Omidbaigi, R., 2009. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 2). Astan Quds Razavi, 438p.
  - Padash, A., Ghanbari, A. and Asgharipour, M.R., 2016. Effect of salicylic acid on concentration of nutrients, protein and antioxidant enzymes of basil under lead stress. Iranian Journal of Plant Biology, 8(27): 17-32.
  - Popova, L., Ananieva, V., Hristova, V., Christov, K., Geovgieva, K., Alexieva, V. and Stoinova, Z., 2003. Salicylic acid and methyl jasmonate- induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology (Special Issue), 133-152.
  - Poshtdar, A., Abdali Mashhadie, A.R., Moradi, F., Siadat. S.A. and Bakhshandeh, A., 2016. Effect of

## Effects of salicylic acid and nitrogen application on biochemistry, qualitative and quantitative yield of peppermint (*Mentha piperita* L.)

A. Poshtdar<sup>1\*</sup>, A.R. Abdali Mashhadi<sup>2</sup>, F. Moradi<sup>3</sup>, S.A. Siadat<sup>2</sup> and A. Bakhshandeh<sup>2</sup>

1\*- Corresponding author, Ph.D. of Agronomy, Department of Agronomy, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran, E-mail: adelposhtdar@gmail.com

2- Department of Agronomy, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

3- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj Branch, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: November 2017

Revised: February 2018

Accepted: February 2018

### Abstract

A range of methods are applied to enhance secondary metabolism in medicinal plants. Treatment of the plants with elicitors is one of these approaches. Salicylic acid (SA) exerts a positive impact on plant growth and yield. The present study, as a biannual field experiment, investigates the response of peppermint (*Mentha piperita* L.) to different rates of SA under different regimes of nitrogen nutrition during years of 2014-2015. The experiment was made as a random complete block design based on split-plot with three replicates. The treatments included nitrogen fertilization rate as the main factor (0, 70, 140, 210, and 280 kg N ha<sup>-1</sup> applied as urea) and salicylic acid, as the sub factor, was sprayed at different concentrations (0, 100, 200, and 300 µM). In both years, the highest nitrate reductase activity was found in the roots of the plants treated with 200 µM SA and fertilized with 280 kg N ha<sup>-1</sup>. Interestingly, the foliar activity of the enzyme was influenced only by nitrogen, whereas the highest rate of activity was determined using 280 kg N ha<sup>-1</sup> (2.87 and 2.82 µM nitrite g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup>, respectively in the first and second year). Higher concentration of SA caused to increased content of nitrogen and free amino acid in the plants fertilized with higher rates of nitrogen. Nitrate, total phenol, and soluble carbohydrates content of leaf was reduced in both years as the result of high rate of nitrogen and high concentration of SA applied. In the first and the second year, the highest fresh yields (3316.2 and 3480.7 g m<sup>-2</sup>, respectively), the highest dry yields (811.7 and 855.6 g m<sup>-2</sup>, respectively) and essence (13.01 and 15.2 mL m<sup>-2</sup>, respectively) were obtained through annual application of 210 kg N ha<sup>-1</sup>. Collectively, the application of 210 kg N ha<sup>-1</sup> together with SA (200 µM) is recommended to achieve desired quantitative and qualitative yield.

**Keywords:** Essential oil, free amino acids, root, phenol, nitrate reductase.