اثر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در شرایط شوری ناشی از نمک Nacl بر برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و رشد گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

ناصر سادات [۱] و علیرضا لادن‌مقدم [۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، n.sadat_86@yahoo.com ایران،

۲*- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران، dr.ladan91@yahoo.com

*نویسنده مسئول: علیرضا لادن‌مقدم

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

Effect of Salicylic Acid Foliar Application on Control of Nacl Salt Salinity on Some Morphological, Physiological Traits and Growth of Peppermint Mint(*Mentha piperita*)

Naser Sadat[1] and Ali Reza Ladan Moghadam[2*]

1- MS.c student, Department of Horticulture, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran, n.sadat_86@yahoo.com

2*- Associate Professor, Department of Horticulture, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran, dr.ladan91@yahoo.com

*Corresponding author: Ali Reza Ladan Moghadam

Received: December 2018 Accepted: January 2019

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی اثرات محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در شرایط شوری بر رشد و برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک گیاه نعناع فلفلی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار، سه تکرار و هر تکرار حاوی پنج گیاه، در مجموع ۱۳۵ گیاه انجام شد. کلرید سدیم با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اسیدسالیسیلیک در سه سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، بکار رفت. در این آزمایش، گیاهان محلول‌پاشی شده با آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک و آبیاری خاکی با محلول کلرید سدیم (۲۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان) از مرحله چهار تا شش برگی به مدت سه هفته متوالی و دو مرتبه در هفته انجام شد. صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک گیاه مانند وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، میزان کلروفیل کل برگ، میزان پرولین، میزان پروتئین، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، کلروفیل کل برگ، **میزان** پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها در تیمار شاهد و کمترین در تیمار کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین بیشترین میزان پرولین در تیمار کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین تیمار شاهد بود. همبستگی بین صفات ارزیابی شده نیز نشان داد که بین میزان پرولین با وزن تر اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، میزان پروتئین، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز، همبستگی منفی معنی‌دار در سطح ۱٪ و با میزان کلروفیل کل برگ، همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح ۵٪ وجود دارد. همچنین ارتفاع گیاه با میزان پروتئین و کلروفیل کل برگ با فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و آنزیم پراکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵٪ نشان داد. بین سایر صفات مورد ارزیابی نیز با هم همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱٪ مشاهده شد.

کلمات کلیدی: اسیدسالیسیلیک، تنش شوری، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، نعناع فلفلی.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۳، صص ۴۳-۳۱

Abstract

In order to investigate the effect of salicylic acid foliar application on control of Nacl salt salinity on some morphological, physiological traits and growth of Peppermint Mint(*Mentha piperita*), experiment in a completely randomized design with 9 treatments, 3 replication and each replication with 5 plant, were done. NaCl with two levels of 50 and 100 mg/l and salicylic acid with tree levels of 50, 100 and 150 mg/l, were used. Distilat water uses as a control. Sprying with salicylic acid and irigation with NaCl solution (200mg for each pots) on 4 to 6 leavs for 3 week and two days in week, were done. Morphological, physiological traits of plant such as root and air fresh and dry weight, total chlorophyll, proline, protein, superoxide dismutase and peroxidase activity were evaluated. The results showed that had the highest morphological, physiological traits and enzymatic activity in control treatment and the lowest in NaCl 100ppm. Also the highest amount of proline in NaCl 100ppm treatment and the lowest in Control treatment.

Keywords: Peppermint Mint, Peroxidase, Salcylic acid, Salt stress, Superoxide dismutase.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۳، صص ۴۳-۳۱

مقدمه و کلیات

نعناع فلفلی نام علمی *Mentha piperita* و نام انگلیسی Peppermint از جمله گیاهان دارویی و خوراکی مهم، گیاهان تیره نعنائیان (Lamiaceae) و متعلق به راسته Lamiales بوده که دارای ۱۶۰ جنس و بیش از ۳۰۰۰ گونه است. این گیاه، علفی و ریزوم‌دار با ارتفاع بین ۳۰ تا ۹۰ سانتیمتر است. ساقه آن صاف و با مقطع مربعی، ریزوم‌ها گوشتی و ریشه‌های فیبری هستند. برگ‌های آن پهن، کرکدار، سبز تیره، با رگبرگ‌های قرمز، نوک تیز و در حاشیه دندانه‌دار هستند. گل‌ها بنفش و در گل‌آذین‌های خوشه‌ای مارپیچی دیده می‌شوند. فصل گلدهی از اواسط تا اواخر تابستان است. قسمت‌های مورد استفاده این گیاه گل‌ها و برگ‌ها هستند که با شروع باز شدن گل‌ها برداشت انجام می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷۶). نعناع فلفلی مصارف گسترده‌ای در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی دارد. در واقع عاملی که کاربرد یک گیاه دارویی را مشخص می‌کند، نوع ترکیب شیمیایی موجود در اسانس آن گیاه است. براساس مطالعات انجام شده، ماده مؤثره اصلی گونه *Mentha piperita*، منتول (۵۵-۳۰ درصد) است و از سایر ترکیبات هم می‌توان به متیل استات (۱۷/۴ درصد) و منتون (۱۲/۷ درصد) پلی گن، منتوفوران، لیمونن و لیمون اشاره نمود (Scavroni *et al.*, 2005). شوری به معنی اضافه شدن نمک به آب یا خاک است که در طول گذر زمان موجب افزایش شوری می‌شود. بر اساس تعریف ارائه شده، خاک‌های شور به خاک‌هایی گفته می‌شود که هدایت الکتریکی در آنها بیشتر از چهار میلی‌موس بر سانتیمتر بوده و درصد سدیم قابل تبادل آنها کمتر از ۱۵ درصد باشد. بطورکلی افزایش شوری در خاک موجب کاهش رشد و میزان عملکرد اقتصادی می‌گردد. شوری بر تمام فرآیندهای اصلی مانند رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین، متابولیسم لیپید و تولید انرژی تاثیرگذار است. در نتیجه تمام مراحل زندگی گیاه از جوانه‌زنی تا تولید بیوماس و دانه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با افزایش تنش شوری در خاک بازده گیاهان کم شده و پروسه‌هایی مثل فتوسنتز، تنفس، کارایی مصرف آب و غشای پلاستیکی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Min *et al.*, 2011). اسیدسالیسیلیک یا ارتوهیدروکسی بنزوئیک یک ترکیب فنلی است که در طبیعت وجود داشته و در برخی بافت‌های گیاهی هم به فراوانی یافت می‌شود. این ترکیب معمولاً در آب و حلال‌های قطبی آلی به صورت محلول هستند. اسیدسالیسیلیک نقش کلیدی در تنظیم رشد گیاهی، توسعه و نمو، واکنش با سایر موجودات و نیز واکنش با سایر تنش‌های محیطی، جوانه‌زنی بذور، عملکرد میوه، گلیکولیز، گلدهی، جذب و انتقال یون‌ها، فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و تعرق دارد (Hayat and Ahmad, 2007).

نجفیان و همکاران در سال ۱۳۸۸، آزمایشی به منظور بررسی واکنش گیاه بابونه کبیر به کاربرد اسیدسالیسیلیک به صورت محلول‌پاشی در غلظت‌های (۴۵۰ppm، ۳۰۰، ۱۵۰، صفر) روی قسمت‌های هوایی گیاه، انجام دادند. نتایج نشان داد که اسیدسالیسیلیک ارتفاع گیاه، ارتفاع ساقه گلدهنده، تعداد پاجوش‌ها، تعداد گل، قطر گل، سطح برگ، میزان کلروفیل، وزن تر و خشک گیاه و همچنین میزان اسانس را افزایش داد. در مرحله تمام گل اندام‌های هوایی گیاه پس از خشک کردن در دمای محیط (در سایه) به روش تقطیر با آب و با بکارگیری دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد. بازده اسانس در

تیمار ppm۳۰۰ اسیدسالیسیلیک ۰/۶۶٪ بدست آمد که نسبت به سایر تیمارها افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. ترکیب‌های متشکله اسانس بوسیله دستگاه‌های GC و GC/MS مورد بررسی قرارگرفت که از بین ترکیب‌های شناسایی شده در تمامی تیمارها کامفور (۶۹/۵۶-۳/۵۲٪)، کریزانتنیل استات (۵۵/۲۹٪-۳۸/۲۴)، کامفن (۷/۰۸٪-۷/۶)، پی- سیمن (۲/۵٪-۸/۳) و آلفا-پینن (۷۳/۱٪-۴/۱) بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. همچنین به منظور بررسی تأثیر آبیاری با آب شور و تیمار اسیدسالیسیلیک بر خصوصیات رشدی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه نعناع فلفلی، یک آزمایش گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار و چهار تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح شوری آب دریا (صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) و سه غلظت اسیدسالیسیلیک (صفر، ۷۵/۰ و ۵/۱ میلی‌مولار) بودند. نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری پارامترهای رشدی (ارتفاع بوته، قطر ساقه، طول میانگره، سطح برگ و عملکرد ماده‌تر و خشک در گلدان)، میزان نسبی آب برگ، مقادیر کلروفیل، غلظت عناصر پتاسیم، کلسیم و منیزیم و عملکرد اسانس کاهش یافت در حالیکه دمای برگ، میزان انباشت پرولین و قندهای محلول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، محتوی فنول کل، غلظت عناصر سدیم و کلر و درصد اسانس افزایش پیدا کرد. کاربرد اسیدسالیسیلیک نیز موجب افزایش پارامترهای رشدی، میزان کلروفیل، میزان انباشت پرولین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، محتوی فنول کل و درصد و عملکرد اسانس و کاهش میزان انباشت قندهای محلول و غلظت کلر گردید. نتایج آنالیز اسانس نشان داد که منتول، ۸،۱- سینئول و منتون اجزاء غالب اسانس بودند. اگرچه میزان تغییرات منتول تحت تأثیر شوری روند مشخصی نداشت، اما محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک موجب افزایش مختصری در مقدار منتول گردید. در مجموع یافته‌های این تحقیق نشان داد که اثرات زیان آور تنش شوری بر رشد نعناع فلفلی می‌تواند با محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک کاهش داده شود (مظفری و همکاران، ۱۳۹۰). دلاوری پاریزی و همکاران در سال ۱۳۹۱ نیز در تحقیقی اثر اسیدسالیسیلیک بر پراکسیداسیون لیپیدها، قندها، عناصر سدیم و پتاسیم در برگ و ریشه گیاه ریحان سبز تحت تنش شوری بررسی نمودند. گیاهان مورد آزمایش پس از کاشت در گلدان و رسیدن به مرحله ۴ برگی با اسیدسالیسیلیک (صفر، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار) به مدت ۵ روز و شوری کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۵ روز، تیمار شدند. مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء برگ و ریشه در تیمار با اسیدسالیسیلیک و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری داشت. در تیمار با شوری ۲۰۰ میلی‌مولار مقدار مالون دی آلدئید ریشه، افزایش معنی‌داری داشت و با افزایش میزان تنش شوری، مقدار قند نیز در برگ افزایش معنی‌داری نشان داد. تیمار همزمان شوری و اسیدسالیسیلیک موجب کاهش معنی‌دار میزان سدیم و پتاسیم برگ و ریشه گیاه ریحان شد که نشان دهنده بهبود اثر تنش شوری در حضور اسیدسالیسیلیک است. خراسانی‌نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۲ به منظور بررسی اثر شوری بر رشد، عملکرد و ترکیب اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) که یکی از مهمترین گیاهان دارویی حاوی اسانس، آزمایشی گلدانی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تیمار و سه

تکرار انجام دادند. سطوح شوری اعمال شده شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم (NaCl) بودند. نتایج بدست آمده نشان داد با افزایش شوری، طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، طول میانگره‌ها، طول استولون‌ها، بیومس، درصد و عملکرد اسانس کاهش یافت. بیشترین درصد اسانس و عملکرد اسانس در شوری صفر میلی‌مولار به دست آمد. مهم‌ترین مواد در ترکیب اسانس نعناع فلفلی، منتون و منتول می‌باشند که بیشترین میزان این مواد به ترتیب تحت شرایط ۱۰۰ و صفر میلی‌مولار بدست آمد. لازم به ذکر است بوته‌هایی از نعناع فلفلی که تحت تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl قرارداشتند به دلیل عدم تحمل تنش شوری، پس از دو ماه از بین رفتند. همچنین افشار و لادن‌مقدم در سال ۱۳۹۴ پژوهشی به منظور بررسی اثرات محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در مهار تنش شوری در رشد و عملکرد گیاه ریحان، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار، ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ گیاه، انجام دادند. کلرید سدیم با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و همچنین اسیدسالیسیلیک در دو سطح ۱ و ۲ میلی‌مولار بکاررفت. آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک و آبیاری خاکی با محلول کلرید پتاسیم (۲۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان) به مدت یک هفته هر دو روز یک‌بار انجام شد. صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه مانند وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، کلروفیل کل برگ، ویتامین ث، پرولین و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیمار اسیدسالیسیلیک ۲ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را در بهبود صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی داشت و نتایج در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند. مطالعه‌ای دیگر به منظور بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک در کنترل تنش شوری ناشی از نمک Nacl، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار شامل دو سطح کلرید سدیم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسیدسالیسیلیک در دو سطح ۱ و ۲ میلی‌مولار و همچنین اثر متقابل آنها در ۳ تکرار انجام گردید. بذر جعفری پس از کشت در بستر مناسب، حدود ۳ هفته زمان برای جوانه‌زنی نیاز دارد. سپس در هفته پنجم پس از کشت، آبیاری خاکی با محلول کلرید سدیم به مدت یک هفته هر دو روز یک‌بار انجام گردید. محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک (۲۰۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان) نیز به مدت یک هفته هر دو روز یک‌بار انجام شد. گلدان بدون آبیاری با کلرید سدیم و محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک به عنوان شاهد استفاده شد. صفات کمی و کیفی گیاه مانند وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، کلروفیل کل برگ، ویتامین ث، پرولین و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیمار اسیدسالیسیلیک ۲ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را کنترل عوارض ناشی از تنش شوری داشت و نتایج در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند. همچنین همبستگی بین تمام صفات مورد ارزیابی در سطح ۱٪ از نظر آماری، معنی‌دار شد (عرب و دانائی، ۱۳۹۵).

فرآیند پژوهش

نشاهای گیاه نعناع فلفلی از مرکز معتبر کشاورزی خریداری و سپس در گلدان‌های حاوی بستر کشت مناسب (پیت‌ماس، ماسه بادی و خاک رس به نسبت ۱:۱:۱) کشت گردید. این آزمایش در تابستان سال ۱۳۹۷ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار، ۳

تکرار و هر تکرار حاوی ۵ گیاه در مجموع ۱۳۵ گیاه، در گلخانه انجام شد. کلرید سدیم با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و همچنین اسیدسالیسیلیک در سه سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، بکار رفت. آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک و آبیاری خاکی با محلول کلرید سدیم (۲۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان) از مرحله ۴ تا ۶ برگی به مدت سه هفته متوالی و دو مرتبه در هفته انجام شد. سپس در مرحله مناسب برداشت، نمونه‌برداری و ارزیابی صفات مورد نظر انجام شد.

وزن تر اندام هوایی و ریشه: وزن تر اندام هوایی و ریشه در روز معین توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ توزین شد (Clickle and Reid, 2002).

وزن خشک اندام هوایی و ریشه: وزن خشک اندام هوایی و ریشه در روز معین پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در دمای ۶۰ درجه‌سانتیگراد، توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ توزین شد (Clickle 2002 and Reid,).

کلروفیل کل برگ: برای سنجش کلروفیل از روش Arnon در سال ۱۹۴۹ استفاده گردید. ابتدا قطعات ۰/۳ گرمی از برگ را جدا و در حلال استون ۸۰ درصد در داخل هاون چینی سائیده و ترکیب حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌سانتیگراد قرارداده شد. سپس جذب در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ قرائت گردید و برای محاسبه محتوای کلروفیل از فرمول زیر انجام و در نهایت بصورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بیان گردید.

کلروفیل کل= 20/2(A645 nm)+8/02 (A645 nm)

A: میزان جذب نور V: حجم استون نهایی

پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش (Bates *et al.*, 1973) استفاده گردید. برای آماده‌سازی محلول اسیدفسفریک ۶ مولار: ۴۱/۱۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۸۵٪ با دانسیته ۱/۶۸ کیلوگرم در لیتر به آب مقطر اضافه شد و سپس به حجم ۱۰۰ میلی-لیتر رسانده شد. اسیدسولفوسالیسیلیک ۳٪: ۳ گرم پودر اسیدسولفوسالیسیلیک در آب مقطر حل شد و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱/۲۵ گرم پودر اسید ناین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلایسال حل شد و سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۶ مولار آماده شده و به آن اضافه گردید. استاندارد ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پرولین: به ترتیب ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر از استانداردهای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پرولین برداشته شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رسانده شد. ۰/۵ گرم ماده گیاهی با هاون خرد و در درون لوله آزمایش ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک ۳٪ آماده شده و به لوله‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در یخ گذاشته شدند. نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد سانترفیوژ شدند تا مواد اضافه از محلول جدا شوند. مقدار دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده درون تیوپ جدید ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به آن افزوده و خوب مخلوط شد. همزمان مقدار دو میلی‌لیتر از محلول استاندارد صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر پرولین درون تیوپ‌های جدید ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداسیتک گلاسیال به آن-ها افوده و سپس خوب مخلوط شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت یک ساعت حرارت داده شد و سپس درون حمام یخ قرار داده شد. مقدار چهار

میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه شدو به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد. استانداردهای پرولین محلول در فاز تولوئن را به اندازه لازم در کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و مقدار پرولین را در صول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت کرده و منحنی استاندارد رسم شد. سپس میزان جذب در نمونه‌های گیاهی را قرائت کرده و با قرار دادن در معادله خط مقدار پرولین بدست آمد.

پروتئین: اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معین پروتئین استفاده شد. برای استخراج عصاره پروتئینی ۰/۰۵ گرم از ماده خشک گیاهی وزن و cc ۴ از بافر تریس اسیدکلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی جدا گردید که حاوی پروتئین کل است. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد به cc ۰/۱ عصاره پروتئینی از هر نمونه، cc ۵ محلول برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: ابتدا عصاره آنزیم بر اساس روش Ezhilmathi و همکاران در سال ۲۰۰۷ از یک گرم برگ تهیه شد و سپس فعالیت این آنزیم بر اساس باز داشتن احیاء فتوشیمیایی Nitro-blue tetrazolium (NBT) به روش Bayer and Fridovich در سال ۱۹۸۷ اندازه‌گیری شد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از محلول محتوی، 50 mM از (pH K-phosphate buffer (7.8 و 9.9 mM از L-methionine و ۵۷µM از NBT و (v/v) 0.025% Triton X-100 به یک تیوب شیشه‌ایی کوچک اضافه شد و ۲۰µL از نمونه اضافه گردید. واکنش با اضافه کردن ۱۰ µL riboflavin solution (4.4 mg 100 ml) و قراردادن تیوب‌ها در جعبه حاوی ۲ لامپ فلورسنت برای ۷ دقیقه انجام شد. نمونه موازی شاهد با استفاده از بافر به جای نمونه اجرا شد و سپس جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد و نمونه شاهد به عنوان بلانک استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس واحد آنزیم بر گرم وزن تر برگ بیان شد. یک واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تعریف می‌شود به مقداری از آنزیم که نیاز است ۵۰٪ بازدارندگی احیاء NBT را در طول موج ۵۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر انجام دهد.

آنزیم پراکسیداز: عصاره آنزیم بر اساس روش Ezhilmathi و همکاران در سال ۲۰۰۷ از یک گرم برگ تهیه شد. بافر استخراج شامل بافر فسفات ۰/۱M(۱۰۰mM) با pH7.5 و 0.5mM Na_2-EDTA و اسیدآسکوربیک ۵۰ mM است. ابتدا ۱ گرم بافت تر با بافر استخراج در هاون روی یخ سائیده شده و سپس عمل سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه در (g) ۱۲۰۰۰ صورت گرفت و روشناور جمع‌آوری و در لوله‌های اپندورف توزیع شد. عصاره‌های آنزیمی در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم نیز مخلوط واکنش شامل ml دو بافر استات (۰/۲ M ،pH ۴/۸) + µl ۲۰۰ H_2O_2 ۳٪ + µl ۲۰۰ بنزیدین (۰/۰۴ M محلول در متانول ۵۰٪) بود. سپس μl ۵۰ عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده شده و تغییرات جذب نمونه‌ها در ۵۳۰nm در دقیقه توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد و در نهایت فعالیت آنزیم برحسب تغییرات

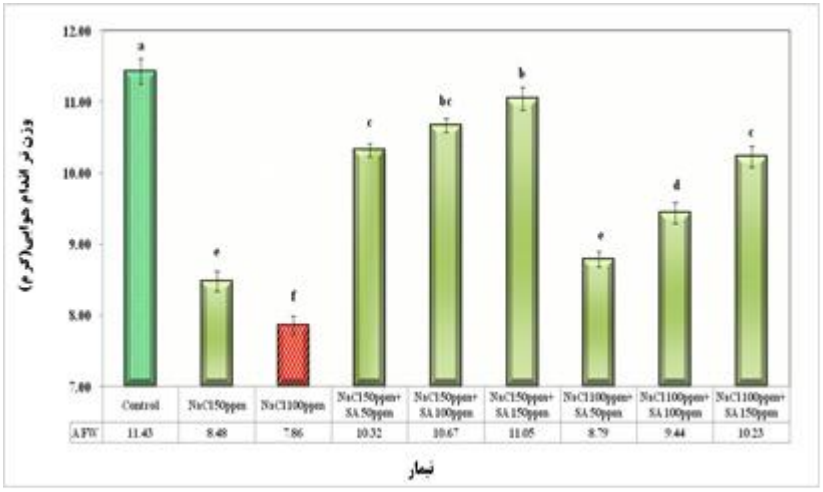
جذب نمونه‌ها در ۵۳۰nm در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر گزارش گردید (Putter, 1974).

اطلاعات مورد نظر (داده‌های آزمایش) پس از اندازه‌گیری وارد نرم‌افزار Excel شد و توسط نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز داده‌ها انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ و ۵٪ ارزیابی شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

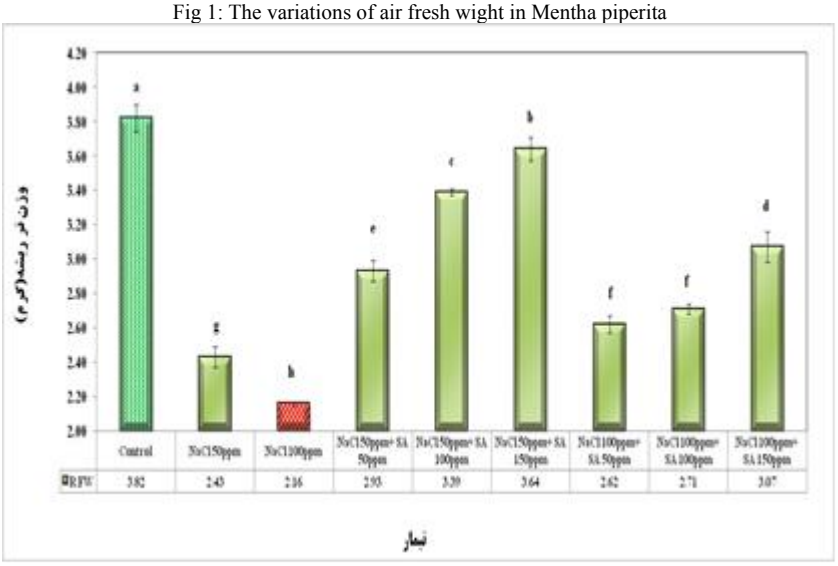
نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که اثر تیمار بر وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، میزان پروتئین، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در غلظت‌های مختلف تیماری در سطح ۱٪ و بر میزان کلروفیل کل برگ و پرولین در غلظت‌های مختلف تیماری در سطح ۵٪، معنی‌دار شد.

وزن تر اندام هوایی و ریشه: نمودار ۱ و ۲ نشان می‌دهند که تیمار Control با ۱۱/۴۳ گرم، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۷/۸۶ گرم، کمترین وزن تر اندام هوایی و تیمار Control با ۳/۸۲ گرم، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۲/۱۶ گرم، کمترین وزن تر ریشه را دارند.



نمودار ۱: تغییرات وزن تر اندام هوایی

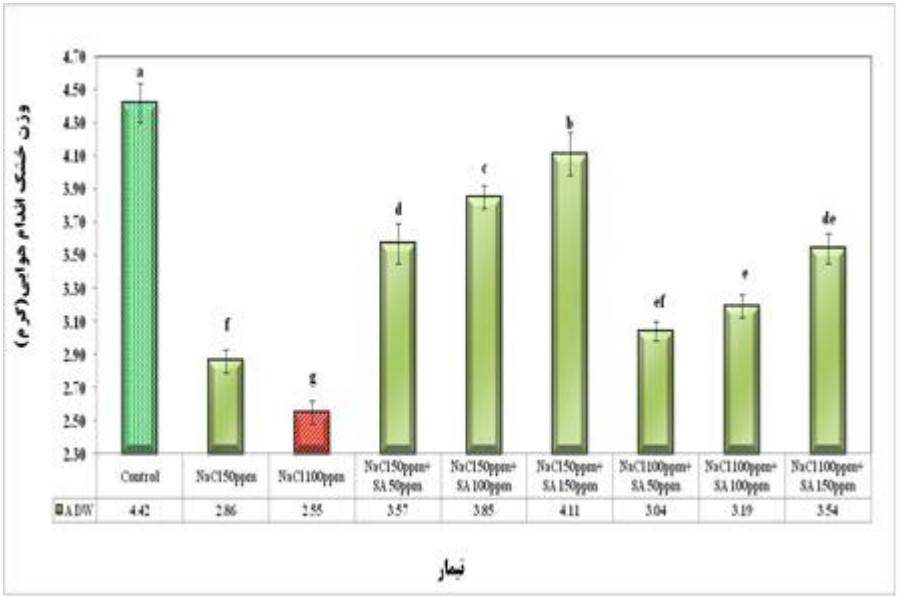
Fig 1: The variations of air fresh wight in Mentha piperita



نمودار ۲: تغییرات وزن تر ریشه

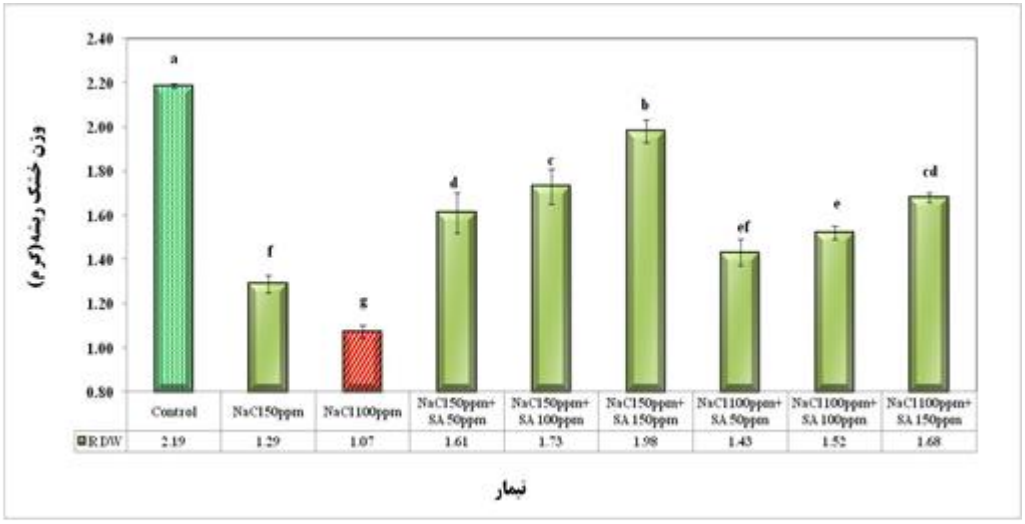
Fig 2: The variations of root fresh wight in Mentha piperita

وزن خشک اندام هوایی و ریشه: نمودار ۳ و ۴ نشان می‌دهند که تیمار Control با ۴/۴۲ گرم، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۲/۵۵ گرم، کمترین وزن خشک اندام هوایی و تیمار Control با ۲/۱۹ گرم، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۱/۰۷ گرم، کمترین وزن خشک ریشه را دارند.



نمودار ۳: تغییرات وزن خشک اندام هوایی

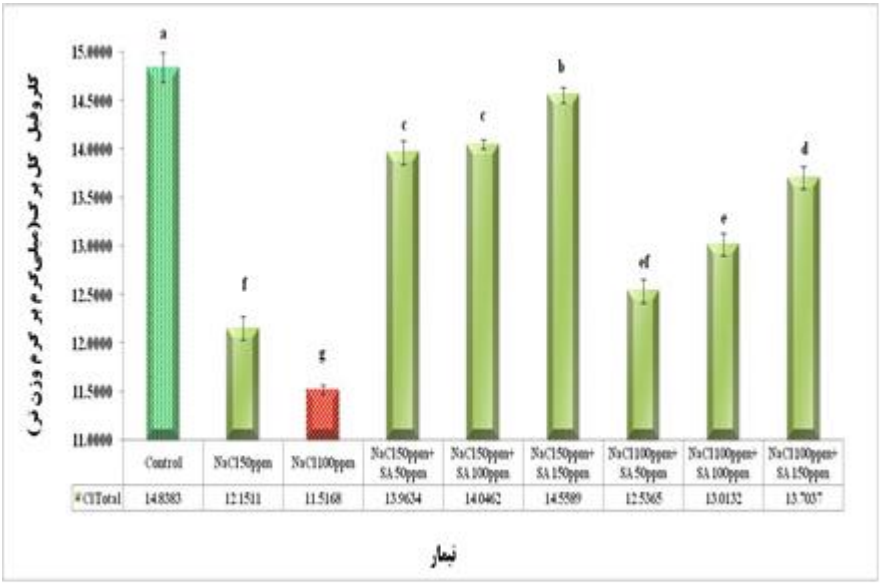
Fig 3: The variations of air dry wight in Mentha piperita



نمودار ۴: تغییرات وزن خشک ریشه

Fig 4: The variations of root dry wight in Mentha piperita

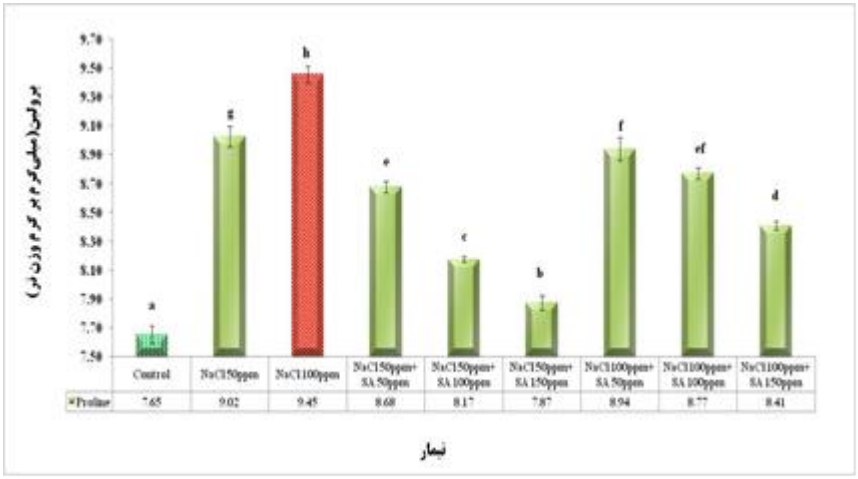
کلروفیل کل برگ: همانطور که نمودار ۵ نشان می‌دهد، افزایش غلظت SA موجب کنترل کاهش میزان کلروفیل کل با افزایش غلظت Nacl شده است. تیمار Control با ۱۴/۸۳۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۱۱/۵۱۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، کمترین میزان کلروفیل کل را دارند.



نمودار ۵: تغییرات کلروفیل کل برگ

Fig 5: The variations of leaf total chlorophyll in Mentha piperita

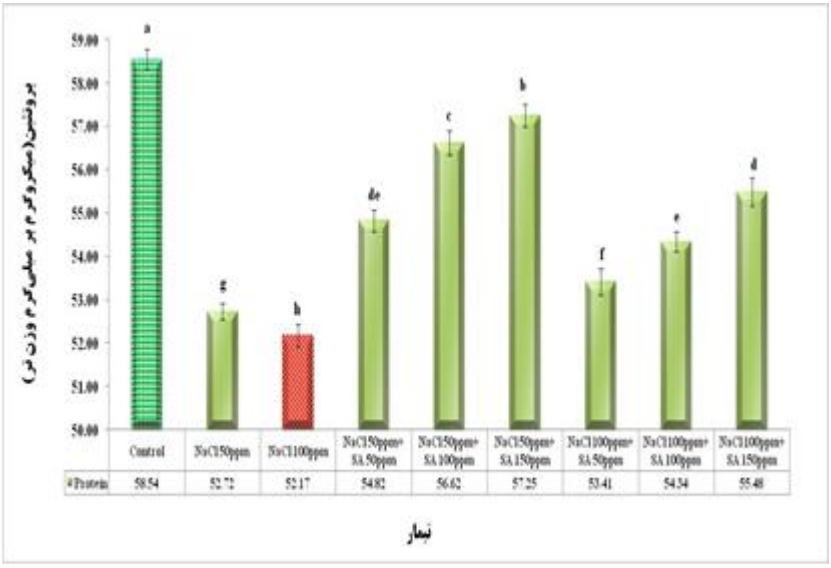
پرولین: نمودار ۶ نشان می‌دهد، افزایش غلظت SA موجب کنترل افزایش میزان پرولین با افزایش غلظت Nacl شده است. تیمار Control با ۷/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، کمترین و تیمار Nacl 100ppm با ۹/۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، بیشترین میزان پرولین را دارند.



نمودار ۶: تغییرات پرولین

Fig 6: The variations of proline in Mentha piperita

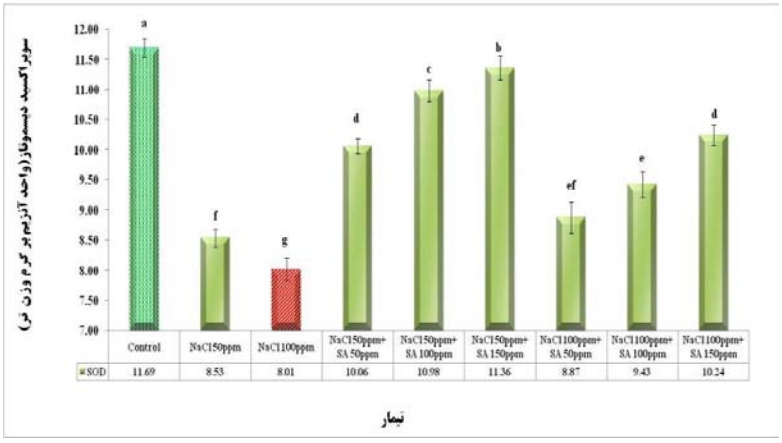
پروتئین: همانطور که نمودار ۷ نشان می‌دهد، افزایش غلظت SA موجب کنترل کاهش میزان پروتئین با افزایش غلظت Nacl شده است. تیمار Control با ۵۸/۵۴ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۵۲/۱۷ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر، کمترین میزان پروتئین را دارند.



نمودار ۷: تغییرات پروتئین

Fig 7: The variations of protein in Mentha piperita

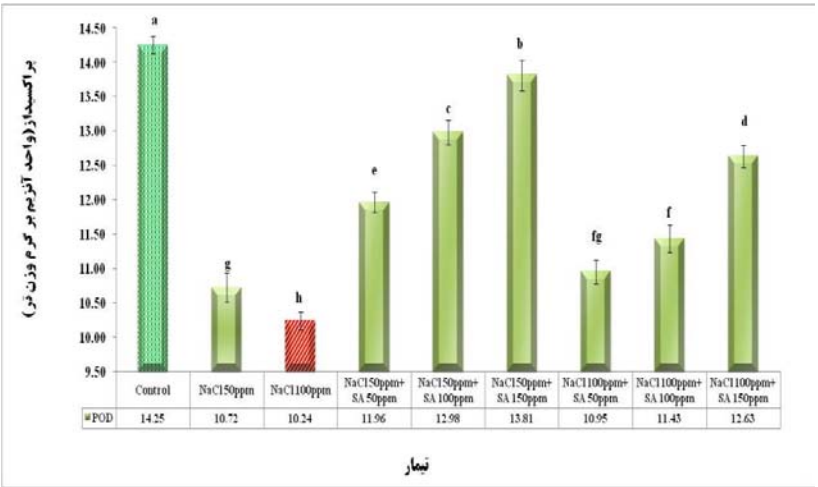
آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: نمودار ۸ نشان می‌دهد، افزایش غلظت SA موجب کنترل کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت Nacl شده است. تیمار Control با ۱۱/۶۹ واحد آنزیم بر گرم وزن تر، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۸/۰۱ واحد آنزیم بر گرم وزن تر، کمترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را دارند.



نمودار ۸: تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

Fig 8: The variations of superoxide dismutase activity in Mentha piperita

آنزیم پراکسیداز: همانطور که نمودار ۹ نشان می‌دهد، افزایش غلظت SA موجب کنترل کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش غلظت Nacl شده است. تیمار Control با ۱۴/۲۵ واحد آنزیم بر گرم وزن تر، بیشترین و تیمار Nacl 100ppm با ۱۰/۲۴ واحد آنزیم بر گرم وزن تر، کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز را دارند.



نمودار ۹: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

Fig 9: The variations of peroxidase activity in Mentha piperita

شوری خاک یعنی غلظت نمک‌های محلول ۴ds/m یا بیشتر یک از فاکتورهای مهم و مؤثر در کاهش تولید محصولات کشاورزی است. بطورکلی عمده‌ترین اثر شوری بر گیاهان، کاهش رشد و عملکرد می‌باشد و از سایر موارد می‌توان تاثیرات منفی بر فرآیندهای مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه را نام برد. همچنین شوری، انرژی لازم برای حفظ شرایط طبیعی سلول را افزایش داده و در نتیجه مقدار انرژی کمتری برای رشد باقی می‌ماند که این امر موجب تولید گیاهان ضعیف‌تر با برگ‌های کوچکتری نسبت به گیاه معمولی می‌شود. کاهش سطح برگ در اثر شوری یا در نتیجه کاهش تعداد برگ نیز موجب کاهش فتوسنتز، ساخت و ذخیره مواد غذایی لازم جهت توسعه رشد و نمو گیاه می‌گردد. علاوه بر این سمیت ناشی از یون‌ها و تنش اسمزی سبب عدم تعادل مواد غذایی در گیاهان می‌شود. بنابراین در چنین شرایطی وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع گیاه کاهش می‌یابد. با افزایش تنش شوری میزان کلروفیل کاهش می‌یابد که این گاهی به دلیل اکسید شدن آنها توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها است. در شرایط تنش شوری، میزان سنتز اسید آمینه پرولین نیز افزایش می‌یابد. همچنین افزایش تنش شوری موجب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه افزایش فعالیت آنتی اکسیدانت‌ها و در نتیجه جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد سمی می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). نتایج حاصل از پژوهش با یافته‌های اکبرزاده و همکاران (۱۳۹۳) پیرامون بررسی اثر شوری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر گیاه نعناع فلفلی و موسوی و همکاران (۱۳۹۳) پیرامون بررسی اثر تنش شوری ناشی از کلریدسدیم بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، مطابقت داشت. اسیدسالیسیلیک به عنوان یک ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی موجب کاهش اثرات سوء تنش شوری در گیاهان و افزایش مقاومت سلول‌های گیاهی می‌گردد. بطورکلی اسیدسالیسیلیک اثرات کلیدی بر طیف گسترده‌ای از واکنش‌های متابولیک و فیزیولوژیک در گیاهان و همچنین نقش‌های متعدد تنظیم‌کننده‌گی در متابولیسم گیاهی دارد. کاربرد اسیدسالیسیلیک در برخی شرایط موجب افزایش میزان اسیدهای آلی ترشح شده در گیاهان و بهبود دسترسی گیاهان به مواد غذایی و در نتیجه بهبود وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع

گیاهان می‌گردد. همچنین اسیدسالیسیلیک از طریق کاهش pH آپوپلاستی موجب استفاده بهینه آهن در گیاهان و افزایش کلروفیل برگ و بهبود میزان فتوسنتز و رشد گیاهان می‌شود. استفاده از اسیدسالیسیلیک منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. سازگاری و غلبه بر تنش‌های اکسایشی و ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد مستلزم تنظیم و تعدیل سنتز و احیای مجدد پروتئین‌ها و ارتقای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز موجب افزایش حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های اکسایشی و پیری و مرگ سلول‌ها می‌شود (Ananieva *et al.*, 2004). نتایج حاصل از پژوهش با یافته‌های افشار و لادن‌مقدم (۱۳۹۴) پیرامون بررسی اثرات محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در مهار تنش شوری در رشد و عملکرد گیاه ریحان و گرانپایه و همکاران (۱۳۹۳) پیرامون بررسی تأثیر سطوح مختلف شوری بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک شاهی، مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری کلی

- تیمار Control بیشترین میزان وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه، کلروفیل کل برگ، پروتئین، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را داشت.

- تیمار Nacl 100ppm و Control به ترتیب بیشترین و کمترین میزان پرولین را داشتند.

منابع

۱) افشار، م و. ع ر، لادن‌مقدم. ۱۳۹۴. تأثیر اسیدسالیسیلیک بر برخی صفات کمی، کیفی و رشد گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت تنش شوری. فصلنامه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گیاهی، دوره ۱۰، ش ۲-۱، ص ۴۴-۳۵.

۲) اکبرزاده، م. حسین افشاری، ح و. ا ت، حسینی. ۱۳۹۳. بررسی اثرات تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درگیاه نعنا ع فلفلی(*Mentha piperita*). اولین کنگره سراسری الکترونیکی فناوری‌های نوین ایران با هدف دستیابی به توسعه پایدار.

۳) امیدبیگی، ر. ۱۳۷۶. رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات طراحان نشر، جلد دوم، صفحات ۳۰۵-۳۰۰.

۱-۱-۱ ۴) خراسانی‌نژاد، س. همتی، خ و. ح، سلطانلو. ۱۳۹۲. اثر تنش شوری روی رشد، کمیت و کیفیت اسانس در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.). اولین همایش ملی علوم کشاورزی با تاکید بر تنش‌های غیرزیستی.

۵) دلاوری‌پاریزی، م. باقی‌زاده، ا. انتشاری، ش و. خ، منوچهری‌کلانتری. ۱۳۹۱. مطالعه تأثیر اسیدسالیسیلیک بر مقاومت و القای تنش اکسیداتیو در گیاه ریحان تحت تنش شوری. زیست‌شناسی گیاهی. سال چهارم. شماره دوازدهم. صفحه ۳۶-۲۵.

۶) عرب، م و. ا، دانائی. ۱۳۹۵. اثر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک بر کنترل اثرات شوری ناشی از نمک Nacl بر برخی صفات کمی، کیفی و رشد گیاه جعفری (*Petroselinum hortense* Hoffm.). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار.

۷) کافی، م. برزوئی، ا. صالحی، م. کمندی، ع. معصومی، ع و. ج، نباتی. ۱۳۸۸. فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، چاپ اول.

۸) گرانپایه، ع. عزیزپور، ک. وجودی، ل و. ر، ولیزاده‌کامران. ۱۳۹۳. تأثیر تنش شوری بر تعدادی از متغیرهای فیزیولوژیک گیاه شاهی. دومین همایش ملی پژوهش‌های کاربردی در علوم کشاورزی.

۹) مظفری، م. سفیدکن، ف. حسنی، ع و. م ح، رسولی‌صدقیانی. ۱۳۹۰. تأثیر آبیاری با آب شور و تیمار اسیدسالیسیلیک بر برخی صفات رویشی و فیزیولوژیک نعناع فلفلی(*Mentha piperita* L.). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد دانشگاه ارومیه.

۱۰) موسوی، س ف. سلیمانی، ع. رضایی‌نژاد، ع ا و. ع ا، خیری. ۱۳۹۳. واکنش گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha*

piperita L.) به تنش شوری کلرید سدیم. اولین همایش ملی ایده‌های نوین در کشاورزی پایدار.

۱۱) نجفیان، ش. نگهبان، م. تراکمه، آ و. سم، قاسمیان. ۱۳۸۸. مشخصات نویسندگان مقاله بررسی اثر اسیدسالیسیلیک بر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زینتی- دارویی بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.). ششمین کنگره علوم باغبانی ایران.

12) Ananieva, E. A, Christov, K. N and L. P, Popova. 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. Plant physiol. 161: 319-328.

13) Arnon, DI., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in vulgaris. Plant Physiol., 24(1):1–15.

14) Bates, L S. Waldren, R P. Teare, I D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. Volume 39, pp 205–207.

15) Bayer, W.F and I. Fridovich.1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in condition. Annals Biochem. 161:559–566.

16) Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

17) Celicel, F.G and M.S. 2002. Postharvest handling of stock(*Matthiola incana*). Hort. Sci. 37: 144-147.

18) Ezhilmathi, K., V.P. Singh, A. Arora and R.K. Sairam.2007. Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of *Gladiolus* cut flowers. Plant growth regul. 51:99-108.

19) Hayat, A. and Ahmad, teds. 2007. Salicylic Acid. A plant Hormon, Salicylic acid: biosynthesis, metabolisms and physiological role in plants.

20) Min, B. L and Feng, Liu. 2011. Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga Ulva prolifera. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 409(1): 223-228.