دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.115896.2167
جلد ۳۴، شماره ۲، صفحه ۳۲۹-۳۰۹ (۱۳۹۷)

پاسخ بیوشیمیایی و عملکردی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) به محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه نیتروژنی

عادل پشت‌دار[۱*]، علیرضا ابدالی مشهدی[۲]، فواد مرادی[۳]، سیدعطاالله سیادت[۴] و عبدالمهدی بخشنده[۴]

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 دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

روش‌های مختلفی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی استفاده می‌شود، ازجمله 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 نعناع 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 به‌صورت 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) به‌عنوان عامل اول و غلظت سالیسیلیک اسید (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) به‌عنوان عامل فرعی بود. نتایج نشان داد که در دو سال، بیشترین میزان فعالیت نیترات 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 به‌ترتیب ۲/۸۷ و ۲/۸۲ میکرومولار نیتریت 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 محتوای نیترات، فنول کل و کربوهیدرات محلول برگ با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید و مقدار کود کاهش یافت. در سال اول و دوم بیشترین عملکرد تر (به‌ترتیب ۳۳۱۶/۲ و ۳۴۸۰/۷ گرم در مترمربع)، خشک (به‌ترتیب ۸۱۱/۷ و ۸۵۵/۶ گرم در مترمربع) و اسانس (به‌ترتیب 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 کمّی و کیفی مطلوب توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اسید آمینه آزاد، ریشه، فنول، نیترات 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 *el al.*, 2014). ازجمله گیاهان دارویی که به‌دلیل اثرات دارویی و استفاده غذایی از دیرباز مورد توجه محققان بوده، نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) است. برگ و اسانس نعناع فلفلی از دیرباز به‌عنوان دارو استفاده می‌شود (Balakrishnan, 2015). نعناع فلفلی گیاهی علفی از رده دولپه‌ای‌ها، زیر رده پیوسته گلبرگان، راسته لامیاسه، پایا و دارای ساقه‌های چهارگوش، ساقه‌های خزنده و زیرزمینی، برگ‌های متقابل، دندانه‌دار و پوشیده از کرک می‌باشد. برگ تازه گیاه نعناع 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 کمّیت و کیفیت مواد مؤثره آنها نیز مؤثر است (Zeinali *et al.*, 2014). نعناع فلفلی ازجمله 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 به‌دلایلی ازجمله بارندگی کم، پوشش گیاهی ناچیز و عدم مصرف فضولات حیوانی فقیر هستند (Raun *et al.*, 1999)، به‌همین دلیل واکنش بیشتر گیاهان نسبت به مصرف نیتروژن در مقایسه با سایر عناصر غذایی بیشتر است (Malakouti, 2004). زیست‌توده زیاد و عملکرد اسانس بالای نعناع 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 به‌صورت خطی افزایش یافت. به‌طوری که به‌ازاء افزایش هر سانتی‌مترمربع سطح برگ، درصد اسانس برگ حدود ۰/۰۰۰۸٪ بیشتر بود.

استفاده از الیسیتورها ازجمله روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی است (Esmaeilzadeh & Bahabadi, 2013). الیسیتورها عوامل فیزیکی، شیمیایی و یا حتی زیستی هستند (Mohammadi Farsani & Ghasemi Pirbalouti, 2014). ازجمله آنها، اسید سالیسیلیک است که قابلیت فوق‌العاده‌ای در نقش یک الیسیتور دارد (Raskin, 1992). سالیسیلیک اسید به گروه متنوع فنول‌های گیاهی تعلق دارد و اثرات کلیدی در گیاهان ازجمله 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 به‌عنوان پیشرو متابولیسم تولید کربوهیدرات‌ها است (Ghasemzadeh & Jaafar, 2012). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک با اثر بر سنتز هورمون‌هایی مانند آبسیزیک، 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).

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 الیسیتور می‌تواند سبب بهبود فعالیت فتوسنتزی گیاه گردد. Figueroa Perez و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه واکنش نعناع فلفلی به محلول‌پاشی الیسیتورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن گزارش کردند که به‌دلیل القاء پروفایل فنلی ناشی از محلول‌پاشی برگ‌های نعناع فلفلی با غلظت‌های سالیسیلیک اسید، فنل کل در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به‌ترتیب ۶۵، ۳۵ و ۳۱ درصد و محتوای فلاونوئید به‌ترتیب ۹۳، ۱۰۰ و ۵۶ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین ترکیب‌های اصلی و عمده نعناع فلفلی مانند فنولیک اسید، فلاوان-۳-اُل، فلاونول و فلاونون‌ها تحت تأثیر محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید به‌ویژه غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش یافتند. از طرفی نارنجین و سیناپیک اسید در برگ‌های تیمار شده با سلیسیلیک اسید مشاهده شد، اما در برگ‌های تیمار کنترل موردی یافت نشد. این ترکیب‌ها می‌توانند سبب تحریک آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شوند. بنابراین سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک الیسیتور شیمیایی می‌تواند نقش مهمی در افزایش تولید ترکیب‌های فنولی، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه در نعناع 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 (به‌ترتیب 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 به‌دلیل کم بودن میزان ماده آلی و نیتروژن موجود در خاک آن، بسیار ضروریست. در مورد نعناع فلفلی نیز مطالعات کافی در این دشت انجام نشده است، از این‌رو تعیین سطح بهینه کود نیتروژن برای کشت نعناع فلفلی در این دشت ضروریست. همچنین بررسی ترکیب‌ها و متابولیت‌های ثانویه مؤثر بر تغییرات متابولیت‌های نعناع فلفلی، لزوم بررسی بیشتر وضعیت بیوشیمی این گیاه را ایجاب می‌کند. این امر به‌ویژه پس از کاربرد الیسیتورها که احتمالاً بر سنتز متابولیت‌ها و بیوشیمی گیاه نیز مؤثر هستند ضرورت بیشتری دارد. از این‌رو، برای بررسی سطوح مختلف نیتروژن 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

به‌منظور بررسی پاسخ بیوشیمیایی و عملکردی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) به کاربرد سالیسیلیک اسید در سطوح مختلف نیتروژن، 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 شده‌است. آزمایش به‌صورت اسپلیت پلات بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح نیتروژن (۰، ۷۰، ۱۴۰، ۲۱۰ و ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن 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

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 نعناع فلفلی به‌صورت 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 صحرایی (*Convolvulus arvensis*) بود، به‌صورت دستی انجام شد و از مصرف هر گونه علف‌کش خودداری گردید. در هر تیمار کودی، ۲۰ درصد کود پس از استقرار گیاه و بقیه در چهار مرحله (هر سه هفته یک‌بار) به همراه آب آبیاری داده شد. برای محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید، غلظت‌های مورد نظر با حل کردن مقادیر محاسبه شده سالیسیلیک اسید در آب تهیه گردید. محلول‌پاشی گیاهان از مرحله ۷۰٪ سطح سبز در هر واحد آزمایشی و در دو نوبت به فاصله هر ۱۵ روز یک‌بار با سم‌پاش پشتی انجام شد. به‌منظور افزایش مدت زمان ماندگاری ترکیب‌های مختلف محلول‌پاشی بر روی بوته‌ها نیز از مویان توین ۲۰ با نسبت ۰/۵٪ حجمی استفاده شد.

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

عمق خاک	بافت خاک	pH	کربن‌آلی (٪)	هدایت الکتریکی (ds/m)	نیتروژن 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

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 پروپانول ۴٪، کلرامفنیل و نیترات پتاسیم قرار داده شده و به‌مدت 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 نیتریت سدیم استفاده و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز براساس میکرومول نیتریت در گرم وزن تازه بافت در ساعت محاسبه گردید (Jaworski, 1971).

برای اندازه‌گیری نیتروژن کل برگ و ساقه، ابتدا ۰/۵ گرم نمونه آسیاب شده همراه با قرص کاتالیزور و ۷ میلی‌لیتر اسید سولفوریک به مدت دو ساعت هضم شد. محصول بدست آمده NH_4^+ بوده که به‌وسیله سود در دستگاه میکروکجلدال اتوماتیک تقطیر گردید. محصول بدست آمده NH_3 (گاز) بود که با اسید بوریک خنثی و با اسید سولفوریک تیتر و درصد نیتروژن در دستگاه کجلدال 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 به‌مدت 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

گلایسین و اسید استیک استفاده و میزان اسید آمینه آزاد کل براساس میلی‌گرم در گرم وزن خشک 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفیوژ 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 (۱:۱۰ 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 ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ 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 گلوگز 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 تجزیه‌وتحلیل 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 قرارگرفتند. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

نتایج

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه

تجزیه‌وتحلیل 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 محلول‌پاشی ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بدون مصرف نیتروژن (به‌ترتیب با ۱/۲ و ۱/۱۳ میکرومول نیتریت در گرم وزن تازه بر ساعت) مشاهده شد (جدول ۴). در هر دو سال با افزایش میزان نیتروژن و غلظت سالیسیلیک اسید بر میزان

فعالیت آنزیم افزوده شد، به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم با محلول‌پاشی ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار همراه با مصرف ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (به‌ترتیب با ۵/۳۹ و ۵/۳۹ میکرومول نیتریت در گرم وزن تازه بر ساعت در سال اول و ۵/۰۶ و ۵/۰۴ میکرومول نیتریت 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 نعناع فلفلی تنها تحت تأثیر کاربرد نیتروژن قرار گرفت. کمترین میزان فعالیت آنزیم در سال اول و دوم آزمایش (به‌ترتیب با ۰/۷ و ۰/۷۸ میکرومولار نیتریت 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 به‌ترتیب به ۲/۸۷ و ۲/۸۲ میکرومولار نیتریت در برگ بر ساعت افزایش یافت (شکل ۱).

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، به‌طوری که غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در مقادیر پایین و بالای کود رفتار عکس نشان داد.

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

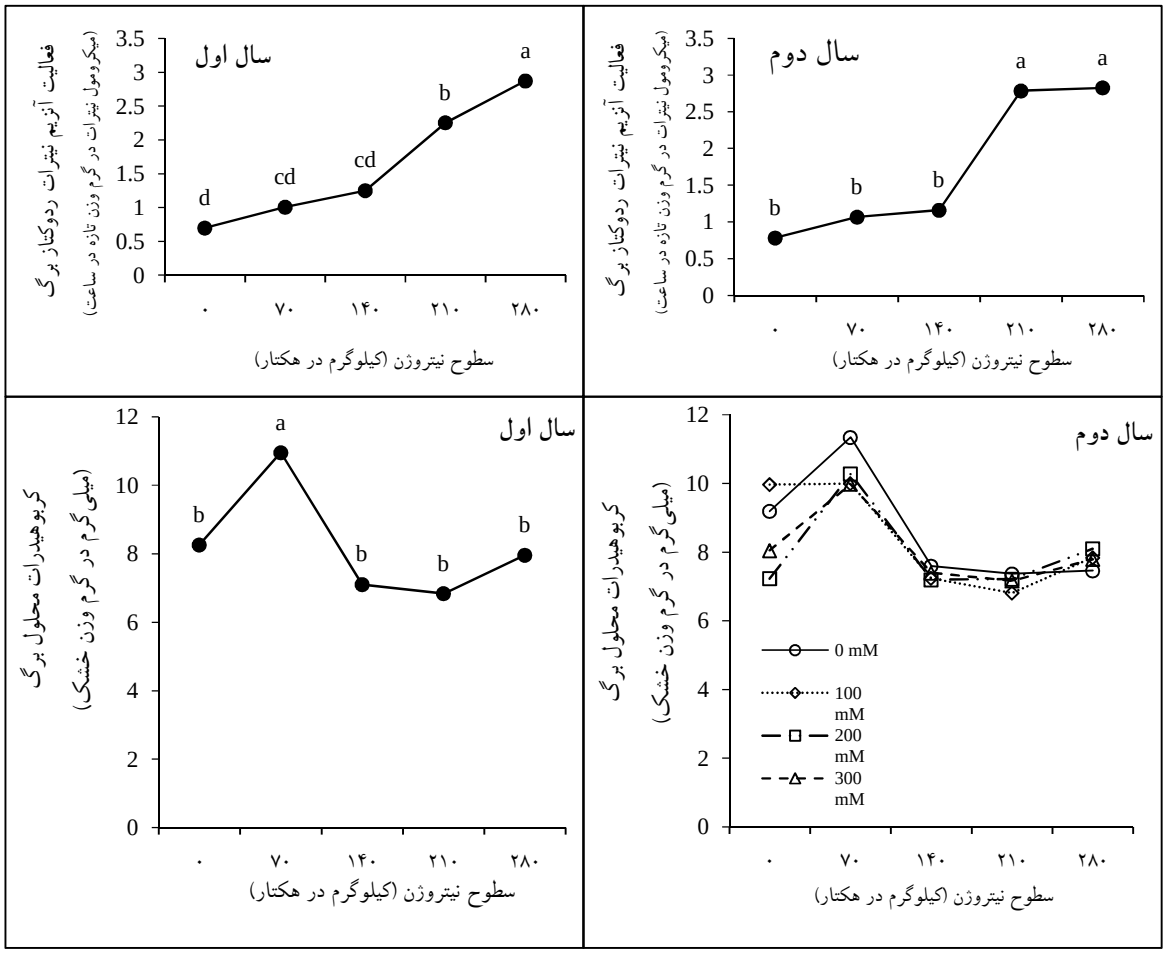
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		نیترات ردوکتاز ریشه	نیترات ردوکتاز برگ	محتوای نیتروژن برگ	نیترات برگ	اسید آمینه آزاد برگ	فنول کل برگ	کربوهیدرات محلول برگ	عملکرد تر	عملکرد خشک	عملکرد اسانس
بلوک	۲	۴/۴**	۰/۲۶**	۲/۰۵**	۲/۷۹**	۲/۳۵**	۷۹۱/۶۴**	۳۴/۲۷**	۶۹۰۲۱۹۵**	۴۶۸۶۰۹**	۱۲۸/۹۸**
سطوح نیتروژن	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	۰/۲۶ns	۶/۳ ns	۰/۵۵ ns	۱۵۵۰۹۳/۵ns	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 **: به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری 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

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		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
ضریب‌تغییرات (٪)	–	۶/۷	۱۴/۹۹	۴/۷۶	۸/۲۹	۱۵/۴	۷/۳۳	۷/۵۴	۱۲/۹	۱۳/۰۸	۱۱/۹۲

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری 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

محتوای نیتروژن برگ

اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید در هر دو سال بر محتوای نیتروژن برگ نعناع فلفلی معنی‌دار بود (جدول‌های ۲ و ۳). کمترین محتوای نیتروژن برگ در سال اول و دوم آزمایش (به‌ترتیب 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 معنی‌داری بر محتوای نیتروژن برگ نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴). نیتروژن برگ با افزایش میزان کود نیتروژن و غلظت سالیسیلیک اسید افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین مقدار آن در سال اول و دوم آزمایش (به‌ترتیب با ۲/۷۷٪ و ۲/۵۲٪) در تیمار ۲۸۰ کیلوگرم نیتروژن و محلول‌پاشی ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

نیترات برگ

بیشترین تجمع نیترات در سال اول و دوم آزمایش (به‌ترتیب با ۴/۹ و ۴/۴۸ میلی‌گرم نیترات در گرم وزن

خشک) به‌ترتیب در شرایط مصرف ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و عدم کاربرد آن مشاهده شد. اما با افزایش مقدار کود و غلظت سالیسیلیک اسید، تجمع نیترات برگ به‌شدت کاهش یافت و کمترین تجمع نیترات 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 به‌ترتیب در سال اول و دوم) در نعناع 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 به‌ترتیب 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 مصرف نیتروژن، با غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار میزان اسید آمینه آزاد بیشتری در برگ‌های نعناع فلفلی تولید شد.

فنول کل برگ

بیشترین محتوای فنول کل برگ (۶۱/۲ و ۵۷/۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به‌ترتیب 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 به‌کمترین مقدار (۲۷/۹ و ۲۸/۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به‌ترتیب در سال اول و دوم) در شرایط عدم محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید رسید. البته محلول‌پاشی غلظت‌های بالای الیسیتور در این سطح از نیتروژن، تأثیر معنی‌داری بر محتوای فنول کل برگ نعناع فلفلی نشان نداد (جدول ۴).

عملکرد تر کل

تجزیه واریانس داده در دو سال نشان داد که عملکرد تر نعناع 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 نعناع فلفلی افزایش یافت (شکل ۲). زمانی که کود نیتروژن مصرف نشد، کمترین عملکرد تر نعناع فلفلی در سال اول و دوم آزمایش به‌ترتیب ۱۳۷۸/۷ و ۱۳۰۵/۶ گرم در مترمربع بود. با افزایش مقدار کود به ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، بیشترین عملکرد تر نعناع فلفلی (۳۳۱۶/۲ و ۳۴۸۰/۷ گرم در مترمربع به‌ترتیب در سال اول و دوم) تولید شد (شکل ۲).

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

تیمارهای آزمایش			فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه (میکرومول نیترات در گرم وزن تازه در ساعت)		محتوای نیتروژن برگ (٪)		نیترات برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)		اسید آمینه برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)		فنول کل برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)	
			سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵
اثر متقابل نیتروژن و سالیسیلیک اسید	۰	۰	۱/۵f	۱/۶۳de	۱/۱۱ij	۱/۱۸hij	۴/۰۵abcd	۴/۴۷abc	۱/۳۳e	۱/۴۵gh	۴۶/۰۲abcd	۵۰/۱ab
		۱۰۰	۱/۴f	۱/۸۱de	۱/۰۳j	۱/۳ghij	۳/۵abcde	۴/۴۹ab	۱/۱۹e	۱/۵۴gh	۴۵/۵۲abcd	۵۷/۹۸a
		۲۰۰	۱/۲f	۱/۱۴e	۱/۲۱ij	۱/۱۳ij	۴/۱abc	۳/۹۶abc	۱/۳۴e	۱/۲۷gh	۴۷/۳۶abcd	۴۴/۷۸bc
		۳۰۰	۱/۴f	۱/۲۷de	۱/۲۵hij	۱/۰۸j	۴/۳۶ab	۳/۹۱bc	۰/۶e	۰/۵۳h	۵۳/۲۳abc	۴۶/۸۹b
	۷۰	۰	۲/۳۹def	۲/۲۸d	۱/۷۸efg	۱/۶۱۲efg	۴/۸۶a	۴/۵۶a	۱/۹۱de	۱/۸g	۶۱/۱۸a	۵۷/۷۱a
		۱۰۰	۲/۵۳cdef	۲/۱۲de	۱/۷۶efgh	۱/۴۵fghi	۴/۹۱a	۴/۱۵abc	۱/۵۷de	۱/۳۱gh	۵۸/۹۸ab	۴۹/۲۸ab
		۲۰۰	۱/۹۷ef	۱/۹۶de	۱/۵۶ghi	۱/۴۹fgh	۳/۹abcde	۳/۸۷bc	۰/۶۹e	۰/۶۸gh	۴۸/۳۷abcd	۴۸/۰۴b
		۳۰۰	۱/۴۱f	۱/۵۱de	۱/۵ighj	۱/۵۲fg	۳/۶۶abcde	۳/۸۵c	۱/۱۸e	۱/۳۱gh	۴۴/۸۸abcd	۴۷/۲۴b

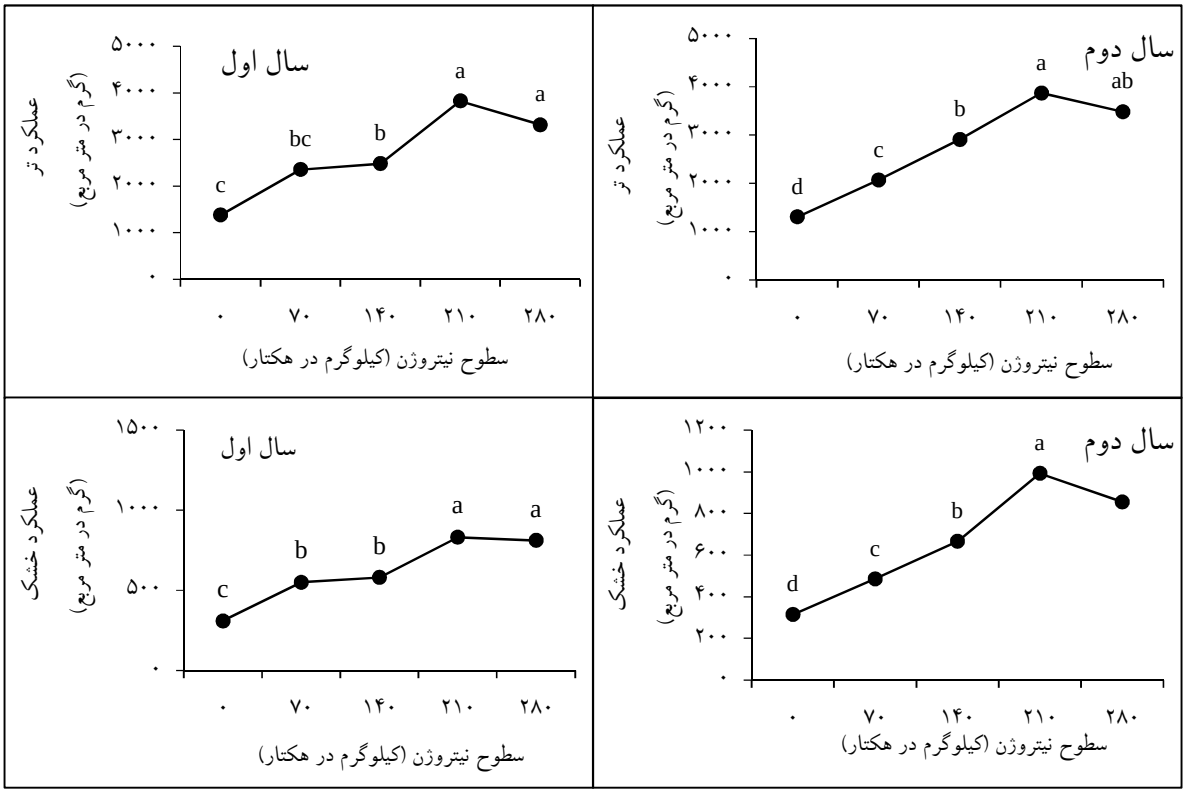
ادامه جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین ...

تیمارهای آزمایش		فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه (میکرومول نیترات در گرم وزن تازه در ساعت)		محتوای نیتروژن برگ (٪)		نیترات برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)		اسید آمینه برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)		فنول کل برگ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)	
		سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵	سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴	سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵
۱۴۰	۰	۴/۰۷abc	۴/۰۴abc	۱/۷۳fgh	۱/۶۳def	۳/۱۸bcde	۳/۱۵d	۳/۰۳dc	۳/۰۱f	۳۶/۳۴bcd	۳۶/۰۷cd
	۱۰۰	۳/۵۳bcde	۳/۷۹bc	۱/۷۷efg	۱/۸۸cde	۲/۸bcde	۳/۰۴de	۳/۰۶dc	۳/۲۹ef	۳۲/۸۷cd	۳۵/۳۵cd
	۲۰۰	۳/۸۸abcd	۴/۱۳abc	۱/۹defg	۲/۰۱bc	۲/۸۷bcde	۳/۰۶de	۳/۸۷bc	۴/۱۲def	۳۲/۵۷cd	۳۴/۶۶d
	۳۰۰	۴/۱۱abc	۴/۲۳abc	۱/۹cdefg	۱/۹۹bcd	۳/۱bcde	۳/۲۷d	۳/۰۹dc	۳/۳ef	۳۳/۵۳cd	۳۴/۴۳d
۲۱۰	۰	۴/۳۵ab	۴/۶abc	۲/۲bcdef	۲/۲۸ab	۲/۲۶e	۲/۳۹fgh	۴/۱۶bc	۴/۳۸cde	۳۰/۱۹cd	۳۱/۸۹d
	۱۰۰	۳/۴۲bcde	۳/۵۹c	۲/۲bcdef	۲/۲۸ab	۲/۶cde	۲/۷۴def	۴/۰۸bc	۴/۲۸cde	۳۱/۴۲cd	۳۲/۹۷d
	۲۰۰	۴/۱۷abc	۴/۸۹a	۲/۴abc	۲/۲۹ab	۲/۴۵cde	۲/۶۸defg	۴/۵۱abc	۶/۰۵a	۳۰/۸۹cd	۳۶/۳۵cd
	۳۰۰	۴/۱abc	۴/۱abc	۲/۲abcde	۲/۲۳ab	۲/۴۴cde	۲/۴۴efgh	۴/۸۵ab	۵/۲۴abcd	۳۲/۸cd	۳۲/۸d
۲۸۰	۰	۴/۵۵ab	۴/۷۲ab	۲/۳۷abcd	۲/۴۲a	۲/۶۹bcde	۲/۴۸efg	۴/۶۴ab	۴/۷۹bcd	۲۷/۹۲d	۲۸/۹۳d
	۱۰۰	۴/۸۲ab	۴/۹۱a	۲/۳۹abcd	۲/۳۹a	۲/۴de	۲/۱fgh	۵/۰۵ab	۵/۱۵abcd	۳۲/۹۱cd	۳۳/۵۷d
	۲۰۰	۵/۳۹۵a	۵/۰۶a	۲/۶۱ab	۲/۳۹a	۲/۲۸e	۱/۸h	۵/۹۹a	۵/۶۳ab	۳۵/۶۱bcd	۳۴/۶۷d
	۳۰۰	۵/۳۹a	۵/۰۴a	۲/۷۷a	۲/۵۲a	۲/۲۵e	۲/۱gh	۵/۷۸a	۵/۴abc	۳۵/۲۳cd	۳۲/۸۷d

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

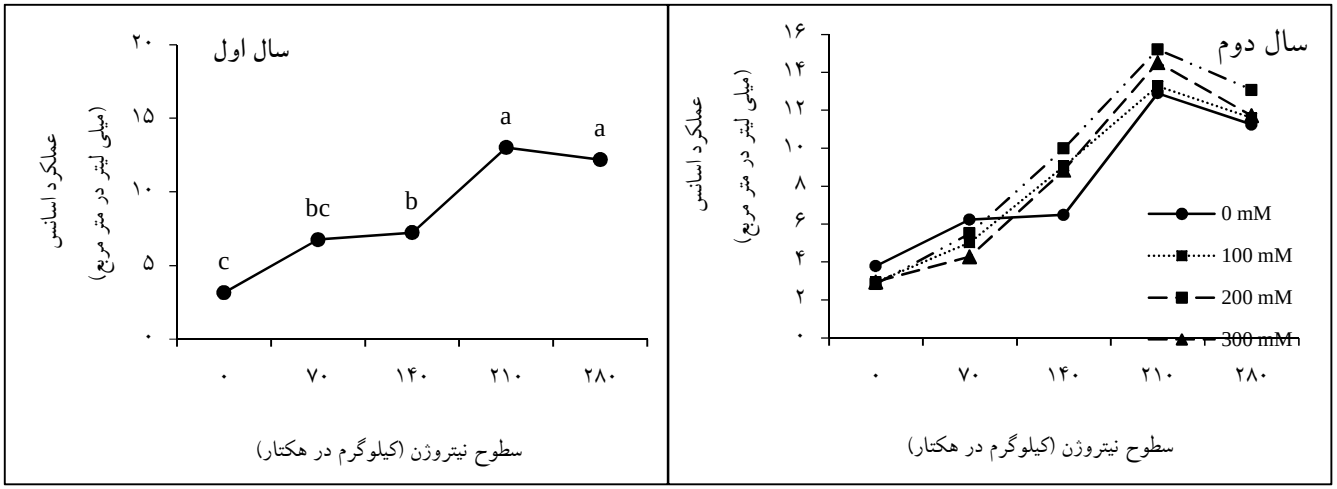
عملکرد خشک کل

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 به‌ترتیب در سال اول و دوم تولید شد). با 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).



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

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 (به‌ترتیب ۳/۱۵ و ۳/۱۲ میلی‌لیتر در مترمربع) در تیمار عدم مصرف نیتروژن تولید و با مصرف 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).



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

بحث

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 به‌تدریج 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 هریک از مراحل فوق وجود دارد (Campbell, 1999). Hayat و همکاران (۲۰۱۲) نیز در بررسی تأثیر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید ($۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ مولار) بر نخود گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا سطح $۱۰^{-۵}$ مولار افزایش یافت و در غلظتی بیشتر از $۱۰^{-۵}$ 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 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 نیتراته 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 NO_3^- دیگر وجود نداشت.

مطالعات نشان داده است که وضعیت نیتروژن اثرات قابل‌توجهی بر مقدار کربوهیدرات دارد، به‌طوری که 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

نیتریت 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 به‌عبارت‌دیگر 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 درپی داشت) تولید کرد.

نتایج دوساله اجرای پروژه نشان داد که محتوای نیتروژن برگ نعناع 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 نعناع فلفلی، اسیمیلاسیون نیترات را در گیاه کاهش داده (Marschner, 1995) و سبب کاهش محتوای نیتروژن شده است. محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه کودهای شیمیایی نیتروژنی سبب افزایش جذب عناصر غذایی نعناع 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 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 نعناع فلفلی کاهش یافت. همچنین در برگ‌های کاملاً رشد کرده (برگ‌های نعناع 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). به‌علاوه 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 به‌دنبال 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، ازجمله برای سنتز اسیدهای آمینه لازم است. اسیدهای آمینه در تشکیل پروتوپلاسم، تقسیم سلولی و رشد گیاه بکار می‌روند. از این‌رو در شرایطی که نیتروژن در دسترس کم باشد، کاهش اسیمیلاسیون نیتروژن سنتز اسیدهای آمینه آزاد را در برگ‌های نعناع فلفلی کاهش می‌دهد. با این کاهش، گیاه قادر به ساختن پروتئین برای فرایندهای

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 نعناع 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 منوترپن‌ها تا ۲۱ روز از عمر برگ نعناع فلفلی به سرعت در حال افزایش هستند و پس از ۲۱ روز، تجمع منوترپن‌ها با سرعت ثابت ادامه می‌یابد. از این‌رو برگ‌هایی که در حال توسعه هستند نسبت به برگ‌هایی که کاملاً رشد کرده‌اند، میزان منوترپن‌های 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، به‌طوری 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 به‌دنبال 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 نعناع 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 نعناع فلفلی به محلول‌پاشی الیسیتورهای شیمیایی سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن گزارش کردند که به‌دلیل القاء پروفایل فنولی، فنول کل در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به‌ترتیب ۶۵، ۳۵ و ۳۱ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت.

اجرای این آزمایش طی دو سال نشان داد که سالیسیلیک اسید تأثیر معنی‌داری بر افزایش عمکلرد تر نداشت و تنها با افزایش مقدار کود تا ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، عملکرد تر افزایش یافت. افزایش کود نیتروژن سبب افزایش تعداد برگ نعناع فلفلی شده، زیرا نیاز گیاه را از لحاظ نیتروژن تأمین می‌کند و موجب افزایش فرآورده‌های فتوسنتزی 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 نعناع فلفلی تفاوت معنی‌داری ندارد.

نتایج آزمایش در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ و ۹۵-۱۳۹۴ نشان داد که عملکرد خشک نعناع 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 علاوه‌بر اینکه میزان رشد گیاه را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد سبب ایجاد تغییرات آناتومیک و مورفولوژیک زیادی در سطح مولکولی و در اندام‌های مختلف گیاه می‌شود، به‌گونه‌ای که نیتروژن اثر زیادی بر اندازه، ترکیب‌ها و کارکرد کلروپلاست دارد. از این‌رو، 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).

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 نعناع 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 نعناع فلفلی گردید. در آزمایشی محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در شرایط تغذیه کودهای شیمیایی نیتروزنی سبب افزایش وزن خشک گیاه، رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر غذایی نعناع شد که مجموع عوامل فوق سبب افزایش عملکرد اسانس نعناع 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.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که برای دستیابی به بیشترین عملکرد کمّی (عملکرد تر و خشک و اسانس) در منطقه مورد مطالعه، مصرف ۲۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بهترین نتیجه را به‌دنبال دارد، زیرا به نوعی کمبود ماده آلی و به‌دنبال آن کمبود نیتروژن را در خاک جبران می‌کند. همچنین براساس نتایج دوساله آزمایش، غلظت‌های سالیسیلیک اسید در شرایط مصرف و عدم مصرف نیتروژن اغلب واکنش کاملاً متضادی به‌دنبال داشت. به‌طوری 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 مورد بررسی نشان داد. اما در زمان عدم مصرف کود، کاربرد غلظت بالای سالیسیلیک اسید (به‌عنوان یک الیسیتور) به نوعی با ایجاد تنش و کاهش فعالیت آنزیمی، محتوای نیتروژن و سایر خصوصیات گیاه نتیجه مطلوبی درپی نداشت. بنابراین در زراعت نعناع 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 Najar, 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. Naturwissen Schaften, 92: 562-577.
- Dubios, M.K.A., Gilles, J.K., Hamilton, P.A., Rebers, A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for

- 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 Miflin, B.J., 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plants: 567-607. In: Miflin, 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.
- Esmaeilzadeh 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.
- Ghasemzadeh, 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_2. 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.

- 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 source and rate of nitogen 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.

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

A. Poshtdar[1*], A.R. Abdali Mashhadi[2], F. Moradi[3], S.A. Siadat[2] and A. Bakhshandeh[2]

1*- Corresponding author, Ph.D. of Agronomy, Department of Agronomy, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khouzestan, Ahvaz, Iran, E-mail: adelposhtdar@gmail.com
2- Department of Agronomy, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khouzestan, 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^{-1} applied as urea) and salicylic acid, as the sub factor, was spayed 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^{-1}. 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^{-1} (2.87 and 2.82 µM nitrite g^{-1} FW h^{-1}, 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^{-2}, respectively), the highest dry yields (811.7 and 855.6 g m^{-2}, respectively) and essence (13.01 and 15.2 mL m^{-2}, respectively) were obtained through annual application of 210 kg N ha^{-1}. Collectively, the application of 210 kg N ha^{-1} together with SA (200 µM) is recommended to achieve desired quantitative and qualitative yield.

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