تأثیر تفاله چغندرقند بر خصوصیات بیوشیمیایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در شرایط تنش خشکی

کاظم حکم‌آبادی[۱]، سعید نوریان بیگدلی[۱]، رسول نریمانی[۱] و محمد مقدم[۱*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱)

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ نعناع فلفلی، آزمایشی گلدانی در سال ۱۳۹۴ در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشگاه فردوسی انجام شد. آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار تنش خشکی (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ درصد ظرفیت زراعی) و سه سطح کاربرد خاکی تفاله چغندرقند (صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد حجمی) در سه تکرار اجرا شد. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان کلروفیل a، شاخص کلروفیل، نسبت کلروفیل a/b، کاروتنوئید و محتوای نسبی آب برگ در تنش ٪۹۰ ظرفیت زراعی و کاربرد ٪۲۰ حجمی تفاله چغندرقند به‌دست آمد، که با افزایش تنش، میزان آن‌ها کاهش یافت. همچنین، کاربرد تفاله تغییرات چشمگیری در صفات فوق به‌وجود آورد. بیشترین میزان کلروفیل b، کلروفیل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نشت یونی در شرایط تنش٪۳۰ ظرفیت زراعی و بدون کاربرد تفاله چغندرقند به‌دست آمد که به ترتیب برابر با ۴۷/۱۹ و ۴۹/۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر، ۹۱/۲ درصد و ۷۵/۹۳ درصد بودند. کاربرد تفاله چغندرقند در این سطح تنش باعث کاهش معنی‌دار این صفات شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، مشخص می‌شود که کاربرد تفاله چغندرقند در بستر کشت، به علت جذب و نگهداری مقدار زیاد آب، باعث بهبود صفات بیوشیمیایی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در نعناع فلفلی می‌شود.

کلمات کلیدی: بستر کشت، تنش اکسیداتیو، کلروفیل، جذب آب

مقدمه

در بین گیاهان دارویی، گونه‌های موجود در گیاهان تیره نعناع (Lamiaceae) به دلیل داشتن اسانس‌های روغنی و انواع ترپنوئیدها در اسانس، از اهمیت زیادی برخوردار هستند. جنس نعناع (Mentha) از مهم‌ترین گیاهان دارویی معطر و چندساله متعلق به خانواده نعناع بوده و دارای توزیع وسیعی در هر پنج قاره، به‌استثنای آمریکای جنوبی، است (۱۹ و ۲۱). گونه‌های متعلق به این جنس به دلیل دارا بودن خواص ادویه‌ای – دارویی، اهمیت ویژه‌ای داشته و از زمان مصر باستان مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۱۷). برگ، ساقه و گل گیاهان متعلق به این جنس منابع مهم و غنی اسانس بوده که در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی کاربرد وسیعی دارند. خواص

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.moghadam@um.ac.ir

دارویی این گیاهان بـه میـزان تولیـد اسـانس و ترکیبـات قابـل استخراج آن‌ها بستگی دارد و اسانس ایـن گیـاه نیـز ضـد نفـخ، معطر، نیروبخش و اشتهاآور است (۱۸ و ۳۱). امروزه، توجه بـه نعناع و ترکیبات آن، به دلیل سالم و طبیعی بودن، تقاضای زیـاد مصرف‌کنندگان و قابلیـت اسـتفاده چنـدمنظوره از آن‌هـا رو بـه افزایش است.

در بین گونه‌های نعناع، گونـه نعنـاع فلفلـی (*M. piperita*) بیشترین کـاربرد تجـاری ازنظـر تولیـد اسـانس را دارد. میـزان اسانس گیاه برحسب ژنوتیپ و مکـان رشـد متغیـر اسـت و در منـابع بـین ۰/۳ تـا ۳ درصـد گـزارش شـده اسـت (۲۹ و ۴۱). ترکیبات اصلی اسانس گیاه شامل منتول (۱۹/۷۶ درصد)، منتـان (۱۹/۳۱ درصد)، ایزومنتون (۹/۱۲ درصد)، همراه بـا سـینئول و منتول استات (مجموعاً حدود ۱۵٪) مـی‌باشـد (۲۳). از طرفـی، نظر بر این است که تولید متابولیت های ثانویه بـرای سـازگاری گیاه نسبت به عوامـل نامسـاعد و تـنش‌هـای محیطـی صـورت گرفته و به‌منزله به‌کار افتادن یک نوع جریـان دفـاعی در جهـت استمرار حیات بـه‌حسـاب مـی‌آیـد (۱). گیاهـان در تـنش‌هـای محیطـی از قبیـل خشـکی، شـوری و گرمـا، بـا ذخیـره مـواد تنظیم‌کننـده اسـمزی، بـا ایـن تـنش‌هـا مقابلـه مـی‌کننـد. مـواد تنظیم کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسید های آمینـه، قنـدها و برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها هستند (۸). ایـن تنش‌ها باعث کاهش فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، بیوماس، رشد و در نهایت عملکرد گیـاه مـی‌شـوند (۱۲، ۱۸، ۲۰ و ۳۲). اولـین بخش از سلول که در برابر تنش خشکی آسیب می بیند، غشـای سلول است، که از بین رفتن یکپـارچگی آن منجـر بـه افـزایش نشت الکترولیت می‌شود (۱۵).

مواد آلی به صورت عامل چسباننده، ذرات خاک را به هـم پیوند داده و خاک را نرم و متخلخل مـی‌کنـد و باعـث تهویـه مطلوب می شود. اما در صورت فقـدان مـواد آلـی، در اثـر پـر شدن فضاهای کوچک از آب، تهویه به‌خوبی انجام نمـی‌گیـرد (۹ و ۲۴).

کمپوست زباله شهری که حاصل تجزیه و تخمیر زباله‌هـای خانگی و شهری اسـت (۲)، سرشـار از مـواد آلـی و هومـوس اسـت. عـلاوه بـر کودهـای معمـول، اسـتفاده از پسـماندهای کارخانه‌های صنایع غذایی به‌عنوان مواد آلی می‌توانـد بـه حفـظ محیط‌زیسـت کمـک کنـد (۷). یکـی از ایـن پسـماندها، تفالـه چغندرقند است، که در این تحقیق قابلیت استفاده از آن به‌عنوان ماده آلی در بستر کشت مورد بررسی قرار گرفته است. امـروزه، به محصولات جانبی کارخانه‌های قند و شکر نـه‌تنهـا بـه‌عنـوان ضایعات نگریسته نمی‌شود، بلکه آن‌ها به‌عنوان مواد ارزشـمندی هستند که می‌توانند در صنایع مختلف مورداستفاده قرار گیرند و بازیافت آن‌ها علاوه بر حفـظ محـیط‌زیسـت و ایجـاد درآمـدی جانبی برای کارخانه‌های قند، ماده اولیه بسیاری از صنایع وابسته خواهند شد (۶). آنچه پس از استخراج قند از چغندرقنـد بـاقی می‌ماند، تفاله نامیده می‌شود. باگـاس نیشـکر تـازه، ماننـد تفالـه چغندرقند، نیز پسماند صنایع غذایی است. سمیعی و همکـاران (۴) از باگاس در آگلونما به‌عنوان بستر کشت استفاده کردند. اما به دلیل تجزیه سریع تفاله نیشکر، بستر کشت مناسبی برای رشد آگلونما گزارش نشد (۴، ۶ و ۷). برای افزایش مواد آلـی خـاک لازم است از تمام منابع آلی مانند ضایعات کشاورزی (مثلاً تفاله چغندرقند)، فاضلاب‌ها و زباله شهری جهت توسعه کشـاورزی پایدار استفاده شود. مطالعات حاکی از این است که افزودن مواد آلی سبب تثبیت نیتروژن اتمسفری، افزایش دسترسی یـا جـذب عناصر می‌شوند (۳۰). از این‌رو، هدف از ایـن تحقیـق، بررسـی اثر استفاده از تفاله چغندرقند به‌عنوان یـک مـاده آلـی در بسـتر کشت و تـأثیر آن بـر خصوصـیات بیوشـیمیایی و رنگیـزه‌هـای فتوسنتزی در نعناع فلفلی تحت تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، اثر تنش خشـکی و تفالـه چغندرقنـد بـر میـزان کلروفیل، نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب (RWC)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ و شاخص کلروفیـل (عـدد SPAD) نعناع فلفلی به‌صورت آزمایش فاکتوریـل بـر پایـه طـرح کـاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهـای مـورد

آزمایش شامل چهار سطح تنش خشکی (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی) و سه سطح کاربرد خاکی تفاله چغندرقند (صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد حجمی) بود. آزمایش به‌صورت گلدانی در بهار و تابستان سال ۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. به این منظور، ریزوم‌های گیاه دارویی نعناع فلفلی از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و به تعداد ۵ ریزوم در گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متر کشت شدند. اندازه ریزوم‌ها یکسان و حدود ۵ سانتی‌متر بود. پس از کشت، آبیاری انجام شد و گلدان‌ها تا زمان اعمال تیمارها به‌صورت یکسان آبیاری شدند. برای تعیین ظرفیت زراعی خاک، ابتدا ۹ گلدان کاملاً مشابه با گلدان‌های آزمایشی (برای هر بستر کشت ۳ تکرار) تا حد اشباع آبیاری و پس از گذشت ۴۸ ساعت، گلدان‌ها هر ۲ ساعت یک‌بار وزن شدند. در زمان ثابت شدن وزن گلدان‌ها، از هر گلدان یک نمونه خاک تهیه، وزن و برای تعیین وزن خشک به آون با دمای ۱۰۳ درجه سلسیوس منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن قرار گرفتند. درصد آب خاک در حالت ظرفیت زراعی از معادله زیر تعیین شد:

$$FC=[(Md-Ms)/Ms]*100 \qquad [۱]$$

Md : جرم خاک Ms: جرم خاک خشک

جدول ۱ مشخصات خاک مورد استفاده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

سپس، میانگین وزن اولیه گلدان‌ها (وزن خاک خشک اولیه) محاسبه گردید و با اندازه‌گیری ظرفیت زراعی هر تکرار، میانگین آن‌ها محاسبه شد (درصد رطوبت جرمی). با محاسبه مقدار آب موجود در ۱۰۰ گرم خاک و گرفتن تناسب، مقدار آب موجود در خاک گلدان‌ها محاسبه گردید (مقدار آب در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪). مقدار آب در تنش (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد) با توجه به میزان آب در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و گرفتن تناسب به دست آمد. سپس، با اضافه کردن وزن آب به‌دست‌آمده در تنش‌های مذکور به میانگین وزن خاک خشک اولیه، وزن گلدان‌ها محاسبه گردید.

آبیاری گیاهان تا زمان رسیدن ارتفاع آن ها به ۲۰ سانتی‌متر ادامه یافت و پس از آن تیمارهای تنش خشکی اعمال گردید. گلدان‌ها به‌صورت روزانه وزن و در صورت کاهش وزن در هر تیمار، مقدار آب مورد نیاز تأمین شد. شروع اندازه‌گیری صفات مورد بررسی بعد از ظاهر شدن تفاوت‌های مورفولوژیک (دو هفته بعد از اعمال تنش) بود.

جهت بررسی وضعیت آب گیاه و برای اندازه‌گیری میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) از روش سانچز (۳۵) استفاده گردید. برای این منظور، پس از تهیه نمونه‌های برگی از گیاه، ابتدا وزن‌تر (FW) آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، وزن آماس (TW) نمونه‌ها، که به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در آب مقطر غوطه‌ور شدند، محاسبه گردید. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس در آون قرار داده شدند و وزن خشک (DW) آن‌ها اندازه گرفته شد. برای تعیین میزان محتوای آب نسبی برگ، از فرمول زیر استفاده شد:

$$RWC\% = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 100 \qquad [۲]$$

برای تعیین پایداری غشای سلول‌های برگی، از شاخص نشت الکترولیت (EL) استفاده گردید. در این روش، ابتدا قطعات برگی با اندازه ۲ سانتی‌متر تهیه شد. این قطعات پس از شستشو، همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، در داخل شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری، به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در این مرحله، میزان نشت اولیه (EC1) به‌وسیله دستگاه هدایت‌سنج (ECمتر) اندازه‌گیری شد. سپس، شیشه‌ها جهت کشته شدن سلول‌های برگی به اتوکلاو با دمای۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند. پس از سرد شدن محتویات داخل بطری‌ها، میزان نشت ثانویه (EC2) اندازه‌گیری شد. در نهایت، نشت الکترولیت از طریق رابطه زیر محاسبه گردید (۲۷).

$$EL = (EC1/EC2) \times 100 \qquad [۳]$$

برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید، ۰/۲ گرم برگ تازه از برگ‌های جوان کاملاً توسعه یافته را جدا کرده و آن را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹٪ برای استخراج

جدول ۱. برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک محل آزمایش

هدایت الکتریکی (dS/m)	اسیدیته کل اشباع (pH)	شن (٪)	سیلت (٪)	رس (٪)	بافت خاک
۱/۲	۷/۹	۲۹	۳۰	۴۱	لوم رسی

رنگ دانه ها ساییده، سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. سپس، عصاره استخراج شده را برداشته و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول‌موج‌های ۶۵۳، ۴۷۰ و۶۶۶ نانومتر قرائت گردید (۲۸). در نهایت، مقدار کلروفیل با استفاده از روابط زیر به دست آمد:

$$Chla = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \quad [۴]$$

$$Chlb = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \quad [۵]$$

$$C_{x+c} = 1000A_{470} - 2.86Chla - 129.2Chlb \quad [۶]$$

$$Chlt = Chla + Chlb + C_{x+c} \quad [۷]$$

که *Chla* میزان کلروفیل a، *Chlb* میزان کلروفیل b، C_{X+C} کاروتن کل و *Chlt* کلروفیل کل است.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ با ایجاد کمی تغییرات از طریق غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد شده توسط ماده DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazul) صورت پذیرفت. ابتدا ۲ گرم نمونه برگ تازه با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸) هموژنیزه شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ، و عصاره نمونه جمع‌آوری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره نمونه با ۹۰۰ میکرولیتر از بافر Tric-HCl (۱۰۰ میلی‌مولار، pH=۷/۴) مخلوط شده و یک میلی‌لیتر DPPH (۵۰۰ میکرومولار) به آن اضافه گردید (۳۰). محلول حاصل کاملاً مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها شد. جذب محلول در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تصحیح داده‌های به‌دست آمده، جذب محلول هر نمونه بدون اضافه کردن DPPH اندازه‌گیری و از میزان جذب محلول دارای DPPH کسر شد. نمونه شاهد در واقع دارای کل محتویات به‌جز عصاره نمونه بود که بجای آن از آب مقطر استفاده شد. درصد بازداری از DPPH با مقایسه نمونه‌های عصاره و نمونه شاهد و استفاده از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$AA(\%) = 1 - \frac{A_{517}(sample)}{A_{517}(control)} \times 100 \quad [۸]$$

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار JMP8 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

طبق نتایج تجزیه واریانس، اثرهای ساده تنش خشکی و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، شاخص کلروفیل، نسبت کلروفیل a/b، کاروتنوئید، نشت یونی و محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. اثر متقابل تیمارها بر کاروتنوئید و شاخص کلروفیل در سطح احتمال ۵٪ و بر بقیه صفات در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد، ولی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است (۲۵). در این بررسی، در اثر تنش خشکی، میزان کلروفیل a به‌شدت کاهش و کلروفیل b افزایش یافت. به نظر می‌رسد که کاهش میزان کلروفیل a در اثر تنش خشکی، به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد، که این رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون و در نتیجه کاهش این رنگیزه می‌گردند (۳۶). کلروفیل a نسبت به کلروفیل b دارای حساسیت زیادی می‌باشد (۳۷ و ۳۹). قابل ذکر است که

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در گیاه نعناع فلفلی تحت شرایط تنش خشکی و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		فعالیت آنتی‌اکسیدانی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a/b	کاروتنوئید	نشت یونی	شاخص کلروفیل	محتوای نسبی آب برگ
تفاله	۲	۱۲۱۸/۶۷**	۴۲۴/۳۵**	۷/۱۴**	/۵۹** ۱۸۰۶	۱۰۹/۸۰**	/۶۵** ۲۸۵۲	۷۶۳/۵۹**	/۳۵** ۲۸۵۲	۷۶۳/۵۹**
تنش	۳	۸۶۱/۰۲**	۷۹/۹**	۴/۲۵**	/۵۷** ۱۵۵۹	۱۵۸/۴۴**	/۲۵۲** ۸۰	/۲۴** ۳۰۶۶	/۸۰** ۲۵۲۹	۳۰۶۶/۲۴**
تفاله×تنش	۶	ns۱۵۲/۵۵	۳۱۵/۶۱**	۱/۵۳*	۱۲/۷۵**	۷۲/۸۲**	۴۲/۸۷*	۹۵/۱۴**	۴۲/۸۷*	۹۵/۱۴**
خطا	۲۴	۳/۰۱	۳/۸۲	۲/۲۳	۱/۶۷	۱/۷۳	۹/۹	۴/۲۷	۹/۹	۴/۲۷
CV (%)		۱۰/۶۵	۴/۴۷	۵/۲۳	۶/۱۹	۳/۴۳	۱۸/۵	۱۷/۳۷	۸/۱۴	۹/۱۳

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱٪ و ۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار

برخی محققین، افزایش نسبت کلروفیل a/b را موجب تیره شدن برگ‌ها و افزایش عدد کلروفیل‌متر می‌دانند (۵ و ۲۲). کاهش مقدار کلروفیل دیده شده در این تحقیق احتمالاً می‌تواند به دلیل تأثیر تنش بر بیوسنتز پیش‌سازهای کلروفیل (از جمله ۵- آمینولوولونیک اسید) یا تخریب کلروفیل موجود در اثر افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد (۴۰). در این پژوهش، کلروفیل a در اثر تنش به‌شدت کاهش می‌یابد و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند باعث افزایش معنی‌دار آن در سطح ۱٪ می‌شود، به صورتی که کاربرد تفاله چغندرقند به میزان ۲۰٪ در تمامی سطوح تنش باعث افزایش، ولی کاربرد تفاله چغندرقند به میزان ۱۰٪ و در سطح تنش ۳۰٪ ظرفیت زراعی باعث کاهش کلروفیل a و در سطح ۵۰٪ ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌داری با شاهد (بدون کاربرد تفاله چغندرقند) نداشت؛ ولی در سطوح دیگر باعث افزایش معنی‌دار آن شد (جدول ۳). میزان کلروفیل b در اثر تنش خشکی افزایش یافت، درصورتی‌که کاربرد خاکی تفاله چغندر باعث کاهش معنی‌دار آن در سطح یک درصد شد. فقط کاربرد تفاله چغندر به میزان ۱۰٪ و در سطح آبیاری ۹۰٪ ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌داری با کاربرد تفاله ۲۰٪ نداشت (جدول ۳). میزان کلروفیل کل در تنش ۳۰٪ ظرفیت زراعی بیشترین حد خود را داشت و در تنش ۵۰ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کاربرد خاکی تفاله چغندر به میزان ۲۰٪ در سطوح تنش ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل کل نسبت به گیاهان شاهد (بدون کاربرد تفاله چغندرقند) شد و کاربرد تفاله چغندرقند به میزان ۱۰٪ تفاوت معنی‌داری نداشت. حتی در سطح تنش ۷۰٪ ظرفیت زراعی باعث کاهش میزان کلروفیل نسبت به گیاهان شاهد گردید (جدول ۳).

کاروتنوئیدها گروه بزرگی از موکول های ایزوپروتنوئید هستند که توسط تمامی اندام‌های غیرفتوسنتزی ساخته می‌شوند (۱۶) و قادرند انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یکتایی را به سه‌تایی تبدیل کنند و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا نمایند (۳۸). میزان کاروتن کل نیز در اثر تنش خشکی کاهش معنی‌داری در سطح ۱٪ داشت. با افزایش میزان تفاله چغندر در خاک، میزان کاروتنوئید برگ به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ افزایش یافت (جدول ۳).

شاخص سبزینگی (عدد اسپد) با افزایش تنش، کاهش معنی‌داری داشت و استفاده از تفاله باعث افزایش شاخص

جدول ۳. مقایسه میانگین سطوح مختلف خشکی و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه نعناع فلفلی

تنش (٪)	تفاله (٪)	کلروفیل a (mg/kgFW)	کلروفیل b (mg/kgFW)	کلروفیل کل (mg/kgFW)	نسبت کلروفیل a/b	کاروتنوئید (mg/kgFW)
۳۰	۰	۲/۲۹hi	۴۷/۱۹a	۴۹/۴۸a	۰/۰۴۹jk	۱/۰۵f
	۱۰	۰/۸۹i	۲۰/۸۶c	۲۱/۷۵d	۰/۰۴۳j	۱/۳f
	۲۰	۹/۱۸f	۹/۸۴e	۱۹/۰۲de	۰/۹۳۳ef	۲/۱۸cd
۵۰	۰	۴/۱۱gh	۳۱/۷۵b	۳۵/۸۶b	۰/۱۲۹i	۱/۴۳ef
	۱۰	۳/۹gh	۱۶/۶d	۲۰/۵de	۰/۲۳۵h	۱/۹۶de
	۲۰	۱۳/۴d	۷/۸ef	۲۱/۲de	۱/۷۱۸c	۲/۳۱cd
۷۰	۰	۵/۵۸g	۱۶/۱۲d	۲۱/۷d	۰/۳۴۶g	۱/۵۵ef
	۱۰	۸/۸۷f	۹/۱۲e	۱۷/۹۹e	۰/۹۷۳e	۲/۵۱cd
	۲۰	۲۴/۲۴b	۵/۱۳fg	۲۹/۳۷c	۴/۷۲۵b	۳/۱۹b
۹۰	۰	۱۱/۴۲e	۹/۳۲e	۲۰/۷۴de	۱/۲۲۵cd	۲/۳۱cd
	۱۰	۱۶/۵۶c	۳/۴۳g	۱۹/۹۸de	۴/۸۲۸b	۲/۶۰c
	۲۰	۳۱/۳۲a	۲/۸۸g	۳۴/۲b	۱۰/۸۷a	۴/۵۶a

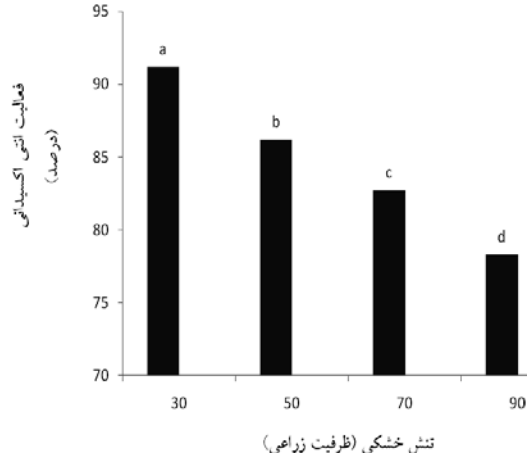
کلروفیل به طور معنی‌دار در سطح ۵٪ گردید. کاربرد تفاله چغندرقند به میزان ۱۰ و ۲۰ درصد حجمی در سطوح تنش ۵۰ و ۹۰ درصد تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۴).

امروزه، استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثر آن‌ها به‌عنوان منابع طبیعی، که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول‌ها (نظیر پروتئین، آمینواسید و DNA) جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب به سلول‌ها می‌شوند (۳۸ و۳۴). رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک رادیکال آزاد است که به‌طور وسیع برای آزمایش پاک کردن رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق، اثر عصاره نعناع فلفلی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش حاکی از این بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تنش خشکی افزایش یافت و کاربرد خاکی تفاله چغندرقند باعث کاهش معنی‌دار آن شد؛ ولی اثر متقابل تفاله چغندر و تنش معنی‌دار نشد (شکل‌های ۱ و ۲). اوسلاتی و همکاران (۳۳) نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه پونه در شرایط تنش شوری بیشتر است. همچنین، با افزایش سطوح تنش شوری، میزان فنل کل نیز افزایش یافت. قدرت از بین بردن رادیکال DPPH در ریشه‌چه گیاه برنج، با تنش سرمایی کاهش و با شوک گرمایی افزایش یافت (۲۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن ذرت تحت تنش خشکی کاهش یافت. ارزیابی ترکیبات بیواکتیو آنتی اکسیدان در روغن نشان داد که قدرت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH بیشترین همبستگی را با فنل کل و محتوای کاروتنوئید داشت (۱۴).

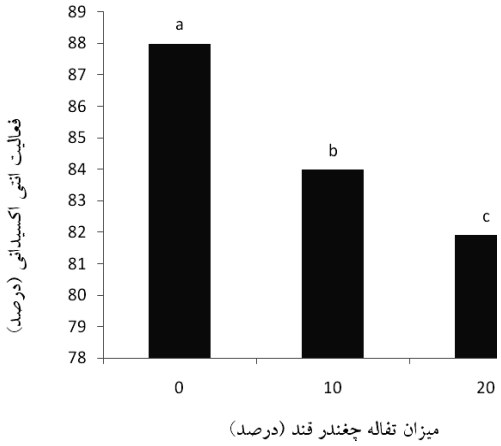
محققین، یکی از مهم‌ترین عوامل حفظ بقا در شرایط تنش را قدرت گیاه در حفظ آب سلولی می‌دانند. سانچز- رودریگز و همکاران (۳۶) گزارش کردند که مقایسه محتوای نسبی آب در ارقام گوجه‌فرنگی از بهترین شاخص‌ها برای تمایز ارقام حساس و غیرحساس بوده و این پارامتر همبستگی خوبی با سایر پارامترهای فیزیولوژیک، نظیر آنتی اکسیدان‌ها و شاخص‌های رشدی، داشته است. هر عامل فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف خشکی و کاربرد خاکی تفاله چغندر بر محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی و شاخص سبزینگی گیاه نعناع فلفلی

تنش (٪)	تفاله (٪)	نشت یونی (٪)	شاخص سبزینگی	محتوای نسبی آب (٪)
	۰	۷۵/۹۳a	۲۹/۲g	۳۵/۹۱g
۳۰	۱۰	۶۵/۵۱c	۴۵/۵۶e	۵۰/۹f
	۲۰	۵۴/۲۱e	۵۸/۴۳d	۵۹/۰۶e
	۰	۶۷/۸۸b	۳۴/۹۳f	۴۸/۳۸f
۵۰	۱۰	۵۱/۴۲f	۶۵/۴c	۶۹/۴۳d
	۲۰	۴۲/۳۰h	۶۶/۷۳c	۶۹/۴d
	۰	۶۰/۸۹d	۵۵/۷d	۷۷/۰۳c
۷۰	۱۰	۴۲/۸۷h	۷۹/۶b	۷۴/۷۳c
	۲۰	۳۲/۵۹i	۸۹a	۸۶/۴۷b
	۰	۴۵/۱۳g	۶۶c	۸۵/۸۳b
۹۰	۱۰	۳۴/۲۴i	۸۶/۵a	۸۸/۳b
	۲۰	۲۲/۹۰g	۸۹/۱۳a	۹۶/۲۷a



شکل ۱. اثر ساده تنش خشکی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ نعناع فلفلی



شکل ۲. اثر ساده کاربرد خاکی تفاله چغندرقند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ نعناع فلفلی

گیاهان که در حفظ آب گیاه نقش داشته باشد، می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در معرفی رقم متحمل باشد. بسیاری از محققین در رابطه با انواع گیاهان گزارش کرده‌اند که ارقام مقاوم دارای محتوای نسبی آب بیشتری نسبت به ارقام حساس بوده‌اند (۱۱ و۲۰ و ۲۴). حفظ تمامیت غشاء سلولی طی شرایط تنش، نشانه‌ای از وجود مکانیزم‌های کنترلی در تحمل به پسابیدگی است. تنش خشکی یک‌سری تغییرات را در فسفولیپیدهای غشا ایجاد می‌کند. این تغییرات، مشابه تنش سرما، در دنباله‌های اسید چرب ایجاد می‌شود و در اثر این تنش، اسیدهای چرب غیراشباع افزایش می‌یابند (۳۴).

در تنش‌های شدید، بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دولایه‌ای غشا حالت هگزاگونال (شش‌وجهی) گرفته و ساختار غشا به ساختار منفذدار تبدیل شده و نشت مواد رخ می‌دهد. به‌طور کلی، تنش خشکی باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نهایت کاهش شاخص پایداری غشای سلول در گیاهان مختلف می‌شود (۱۰و۱۸). خزاعی (۳) گزارش کرد که میزان صدمه به غشاهای سلولی بر اثر تنش خشکی ممکن است از طریق اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از سلول سنجیده شود که در شرایط تنش رطوبتی، پایداری غشای سلولی جزو اصلی تحمل به تنش خشکی در گندم است. در بررسی اثر تنش خشکی بر چهار رقم سورگوم، میزان پایداری غشای پلاسمایی در بین ارقام مختلف متفاوت بود و با افزایش تنش آب، کاهش یافت. همچنین، پایداری غشای سیتوپلاسمی تحت تأثیر میزان موم اپی‌کوتیکولی، ضخامت کوتیکول و پتانسیل آب برگ‌ها قرار گرفت (۲۲). در این آزمایش، میزان نشت یونی با افزایش سطح تنش خشکی افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوری که در تنش ۳۰٪ ظرفیت زراعی به بیشترین مقدار خود (۷۵/۹۳ درصد) رسید. کاربرد خاکی تفاله چغندرقند باعث کاهش معنی‌دار آن در سطح احتمال ۱٪ در تمامی سطوح گردید (جدول ۴). محتوای نسبی آب در رطوبت ۹۰٪ ظرفیت زراعی بیشترین مقدار خود (۹۶/۲۷ درصد) را دارا بود که تحت تنش خشکی به‌شدت کاهش یافت. کاربرد تفاله چغندرقند به میزان ۱۰٪ حجمی تنها در سطوح تنش ۳۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش معنی‌دار در محتوای نسبی آب برگ نسبت به گیاهان شاهد شد. همچنین، محتوای نسبی آب برگ در سطح تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی با کاربرد خاکی تفاله چغندرقند به میزان ۱۰ و ۲۰ درصد حجمی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۴).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، از نتایج این آزمایش استنتاج می‌شود که در گیاه نعناع فلفلی، با افزایش تنش خشکی، خصوصیات بیوشیمیایی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی دچار اختلال می‌شوند. ضمن اینکه کاربرد تفاله چغندرقند و افزایش نسبت حجمی کاربرد آن در خاک و در سطوح مختلف رژیم آبیاری (تنش خشکی)، صفات مورد اندازه‌گیری از قبیل کاروتنوئید، نسبت کلروفیل a/b، شاخص کلروفیل، نشت یونی و محتوای نسبی آب برگ در نعناع فلفلی بهبود می‌یابد. تفاله چغندرقند به دلیل تخلخل زیاد و نگهداری آب به میزان دو برابر وزن خود، می‌تواند به رشد و نمو نعناع فلفلی کمک کند. در سطوح مختلف تنش، با کاربرد تفاله، احتمالاً به دلیل رشد بهتر برگ‌ها و کاهش تراکم رنگیزه‌های فتوسنتزی، تأثیر تفاله بر این صفت مشهود نبود. ولی همان‌طور که در شرایط آبیاری معمولی (۹۰٪) مشاهده می‌شود، تفاله باعث بهبود وضعیت رنگیزه‌ها گردیده است. افزودن تفاله چغندرقند به خاک باعث بهبود ساختار خاک، افزایش مقدار مواد آلی و جذب و نگهداری زیاد آب شده و راهکار مناسبی در جهت حفظ کشاورزی پایدار در جهت کمک به تولید نعناع فلفلی، که نیاز آبی نسبتاً زیادی دارد، در شرایط تنش می‌باشد.

منابع مورد استفاده

۱. امیدبیگی، ر. ۱۳۷۶. رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات طراحان نشر تهران، تهران، ۲۸۳ صفحه.

۲. پیوست، غ. ۱۳۸۵. سبزی‌کاری. انتشارات دانش‌پذیر، گیلان، ۴۷۷ صفحه.

۳. خزاعی، ح. ۱۳۸۱. اثر تنش خشکی بر عملکرد و خصوصیات فیزیولوژیک ارقام مقاوم و حساس گندم و معرفی مناسب‌ترین شاخص‌های مقاومت به خشکی. پایان‌نامه دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۴. سمیعی، ل.، ا. خلیقی، م. کافی، س. سماوات و م. ارغوانی. ۱۳۸۴. بررسی امکان بهره‌گیری از ضایعات سلولزی به‌عنوان جایگزین

پیت‌ماس در بستر کشت گیاه برگ زینتی آگلونما (Aglaonema commutatum Cv. Silver Queen). مجله علوم کشاورزی ایران ۳۶(۲): ۵۰۳-۵۱۰.

۵. صالحی، م.، ع. کوچکی و م. نصیری محلاتی. ۱۳۸۲. میزان نیتروژن و کلروفیل برگ به‌عنوان شاخصی از تنش خشکی در گندم. پژوهش‌های زراعی ایران ۱(۲): ۱۹۹-۲۰۵.

۶. عباسی، ز. ۱۳۸۵. روش‌های نوین بازیافت و کاربردهای جدید کارخانه‌های قند و شکر. شانزدهمین کنگره ملی صنایع غذایی ایران، گرگان.

۷. قجاوند، ا. ۱۳۸۹. کاربرد کودهای بیولوژیک در تولید محصولات سالم در سیستم‌های کشاورزی پایدار: چالش‌ها و فرصت‌ها. اولین همایش ملی کشاورزی پایدار و تولید محصول سالم، اصفهان.

۸. مجید هروان، ا. ۱۳۷۲. مکانیزم فیزیولوژیکی مقاومت به تنگناهای محیطی. چکیده مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تهران، صفحات ۱۲۳-۱۳۴.

۹. ملکوتی، م. ج. و م. طهرانی. ۱۳۷۸. نقش ریزمغزی‌ها در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی (عناصر خرد با تأثیر کلان). دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۱۰. میرجلیلی، ع. ۱۳۸۴. گیاهان در محیط‌های تنش‌زا. انتشارات نوربخش، ۲۳۰ صفحه.

11. Abdalla, M.M. and N.H. El-Khoshiban. 2007. The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticium aestivum* cultivars. J. Appl. Sci. Res. 3: 2062-2074.
12. Abdul Jaleel, C., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, R. Somasundaram and R. Panneerselvam. 2009. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. Int. J. Agric. Biol. 11: 100-105.
13. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Method. Enzymol. 105: 121-126.
14. Ali, Q., M. Ashraf and F. Anwar. 2010. Seed composition and seed oil antioxidant activity of maize under water stress. J. Am. Oil Chem. Soc. 87: 1179-1187.
15. Antolin, M.C., J. Yoller and M. Sanchez-Diaz .1995. Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. Plant Sci. 107:159-165.
16. Ashraf, M.Y., A.R. Azmi, A.H. Khan and S.A. Ala. 1994. Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. Acta Physiol. Plant. 16: 185-191.
17. Ashurst, P.R. 1999. Food Flavorings. Aspen Publishers, Inc., Maryland, USA.
18. Bhatt, R.M. and N.K. Srinivasa Rao. 2005. Influence of pod load response of okra to water stress. Int. J. Plant Physiol. 10: 54-59.
19. Chambers, H. 1992. Mentha, genetic resources and the collection at USDA-ARSNCGR-Corvallis. Lamiales News Letter 1: 3-4.
20. Du, Y.C., A. Nose, K. Wasano and Y. Uchida. 1998. Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and the C4 pathway in sugarcane (*Saccharum* sp.) leaves. Funct. Plant Biol. 25: 253-260.
21. Dzamic, A.M., M.D. Sokovic, M.S. Ristic, M. Novakovic, S. Grujic-Jovanovic, V. Tesevic and P.D. Marin. 2010. Antifungal and antioxidant activity of Mentha *longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. Bot. Serbica 34: 57-61.
22. Estill, K., R.H. Delany, W.K. Smith and R.L. Ditterline. 1991. Water relations and productivity of alfalfa leaf chlorophyll variants. Crop Sci. 31: 1229-1233.
23. Moghaddam, M., M. Pourbaige, H. Kourosh Tabar, N. Farhadi and S.M. Ahmadi Hosseini. 2013. Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil from Iran. J. Essent. Oil Bear. Pl. 16(4): 506-512.
24. Huang, S.N. and J.C. Lin. 2001. Current status of organic materials recycling in southern Taiwan. Food and Fertilizer Technology Center, pp. 9-25.
25. Jiang, Y. and N. Huang. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Sci. 41: 436-442.
26. Kang, H.M. and M.E. Saltveit. 2002. Antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-

shocked Rice (*Oryza sativa* L.) seedling radicles. J. Agric .Food Chem. 50: 513-518.
27. Lutts, S.J., M. Kinet and J. Bouharmont. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 46: 1843-1852.
28. Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Ann. Bot. 78: 389-398.
29. Mirzaie-Nodoushan, H., M.B. Rezaie and K. Jaimand. 2001. Path analysis of the essential oil related characters in *Mentha* spp. Flavour Fragr. J. 16: 340-343.
30. Moon, J.H. and J. Terao. 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low density lipoprotein. J. Agric. Food Chem. 46: 5062-5065.
31. Moreno, L., R. Bello, E. Primo-Yufera and J. Esplugues. 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. Phytother. Res. 16: 10-13.
32. Ommen, O.E., A. Donnelly, S. Vanhoutvin, M.Vanoijen and R. Manderscheid. 1999. Chlorophyll content of spring wheat flag leaves grown under elevated CO2 concentration and other environmental stress within `ESPACE-Wheat` project. Eur. J. Agron. 10: 197-203.
33. Oueslati, S., N.J. Bouraoui, H. Attia, M. Rabhi, R. Ksouri and M. Lachaal. 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. Acta Physiol. Plant. 32: 289-296.
34. Sairam, R.K., K.V. Rao and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163: 1037-1046.
35. Sánchez, F.J., M. Manzanares, E.F. de Andres, J.L. Tenorio and L. Ayerbe. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crops Res. 59: 225-235.
36. Sanchez-Rodrıguez, E., M. Rubio-Wilhelmi, L.M. Cervilla, B. Blasco, J.J. Rios, M.A. Rosales, L. Romero and J.M. Ruiz. 2010. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. Plant Sci. 178: 30-40.
37. Schulz, H., M. Jobert and W.D. Hübner. 1998. The quantitative EEG as a screening instrument to identify sedative effects of single doses of plant extracts in comparison with diazepam. Phytomedicine 5: 449-458.
38. Shrififar, F., M.H. Moshafi and S.H. Mansouri. 2007. In vitro evolution of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control 18: 800-805.
39. Vorasoot, N., S. Songsri and A. Patanothai. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO_2 and water limitation. Environ. Pollut. 114: 187-194.
40. Wise, R.R. and A.W. Naylor. 1987. Chilling-enhanced photooxidation the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultra structure. Plant Physiol. 83: 272-277.
41. Zeinali, H., A. Arzani and K. Razmjoo. 2004. Morphological and essential oil content diversity of Iranian mints (*Mentha* spp.). Iran. J. Sci. Technol. A 28: 1-9.