



به‌زرعی کشاورزی

دوره ۲۴ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۱

صفحه‌های ۵۶۱-۵۴۵

DOI: 10.22059/jci.2021.316022.2491

مقاله پژوهشی:

اثر تنش خشکی در مراحل مختلف نمو بر برخی پارامترهای رشدی و فیتوشیمیایی گیاه مفرح (*Nepeta crispa* L.)

محمد سیاری^{۱*}، منیره مرادی فرسا^۲، علی عزیزی^۳

۱. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۳. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۳/۲۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۵

چکیده

مرحله‌ای از رشد گیاه که تنش غیرزیستی بروز می‌کند در تعیین میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مؤثر می‌باشد. در این پژوهش اثر تنش خشکی در مراحل مختلف فنولوژی بر رشد و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه مفرح (*Nepeta crispa* L.) در قالب آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در دانشگاه بوعلی سینا طی سال ۱۳۹۸ بررسی شد. تیمار تنش خشکی در سه سطح تنش ملایم، تنش متوسط و تنش شدید به‌ترتیب با ۶۰، ۸۰ و ۴۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای در دو مرحله فنولوژیک گیاه مفرح (مرحله استقرار نشای شش‌برگی و مرحله قبل از گلدهی) در سه تکرار اعمال شد. نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد تنش خشکی اثر معنی‌داری بر کلیه صفات رشدی گیاه و نیز پارامترهای فیتوشیمیایی گیاه شامل میزان پرولین، محتوای نسبی آب، فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اسیدهای فنولیک داشته است. اعمال تنش خشکی در هر دو مرحله فنولوژیکی سبب کاهش میزان رشد و عملکرد گیاه و نیز کاهش کلروفیل و محتوای نسبی آب شد. با این حال، افزایش تولید ترکیبات فنلی و اسیدهای فنولیک (از قبیل اسیدهای رزمارینیک، کلروژنیک و کافنیک) و تجمع پرولین با اعمال تنش خشکی سبب کاهش آثار سوء تنش و افزایش خواص دارویی گیاه مفرح شد. همچنین اثر اعمال تنش خشکی در مرحله قبل از گلدهی بیش‌تر از اعمال آن در مرحله استقرار نشای شش‌برگی بود. براساس نتایج حاصل، اعمال تنش خشکی متوسط در مرحله قبل از گلدهی جهت افزایش بیوسنتز برخی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه مفرح پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اسیدهای فنولیک، پرولین، تانن‌ها، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

The Effect of Drought Stress at Different Developmental Stages on Growth and Some Phytochemical Parameters of *Nepeta crispa*

Mohammad Sayyari^{1*}, Monireh Moradifarsa², Ali Azizi³

1. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran.

2. Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran.

Received: December 25, 2020

Accepted: June 17, 2021

Abstract

The phenological stage in which the abiotic stress occurs is effective in determining the content of secondary metabolites in medicinal plants. This research deals with the effects of imposing drought stress at different phenological stages on growth and some physiological and phytochemical responses of *Nepeta crispa* L. as a split plot design in Bu-Ali Sina University during 2019. Drought stress at three levels, including mild, moderate, and severe stress (with 80%, 60%, and 40% of field capacity, respectively) has been applied at two phenological stages (seedling establishment stage with 6 true leaves and pre-flowering stages). Results from statistical analysis show that drought stress has had a significant effect on all evaluated growth traits and phytochemical parameters of the plant including proline content, relative water content (RWC) of leaves, total phenols, flavonoids, tannins, antioxidant activities, and phenolic acids. Imposing drought stress at both phenological stages reduce plant growth, decreasing chlorophyll content and RWC. However, production of phenolic compounds and phenolic acids (including rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids) at high level and accumulation of proline through imposing drought stress reduce the adverse effects of stress and increase the medicinal properties of the *Nepeta crispa*. Also, the effect of drought stress imposing at pre-flowering stage has been greater than its application in the seedling establishment stage. According to the results, it is recommended to impose moderate drought stress at pre-flowering stage to increase biosynthesis of some phytochemical compounds in *Nepeta crispa* medicinal plants.

Keywords: Antioxidant activity, phenolic Acids, phenolic compounds, proline, tannins.

۱. مقدمه

سبب تولید بیش‌تر متابولیت‌های ثانویه شود، که از آن‌ها به‌عنوان داروهای گیاهی استفاده شده و از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار هستند. تأثیر برخی تنش‌ها همانند اشعه فرابنفش بر میزان فلاونوئیدها تا حدودی مشخص شده (Liu et al., 2020) و در پژوهشی تنش خشکی بر قندهای محلول، پرولین، درصد و عملکرد اسانس نعناع فلفلی مؤثر بوده است (Saedi et al., 2020). با این‌حال، تأثیر اعمال تنش مدیریت‌شده در مراحل مختلف رشد گیاه کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است و تنش خشکی در گیاهان دارویی در مراحل مختلف رویشی بیش‌تر برای عملکرد اسانس اعمال شده است.

با وجود پژوهش‌های گسترده‌ای که تاکنون در مورد اثر تنش‌های محیطی بر رشدونمو گیاهان انجام شده، بررسی این موضوع با توجه به شرایط اقلیمی کشور ما همچنان دارای اهمیت است. با عنایت به این‌که در زمینه تغییرات مواد دارویی مفراح تحت شرایط خشکی به‌ویژه در مراحل مختلف رشد پژوهشی صورت نگرفته است و تنش خشکی ممکن است در مراحل مختلف رشد روی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه مفراح اثر متفاوتی داشته و گیاه مفراح مکانیسم‌های متفاوتی را نشان دهد، لذا در این پژوهش بررسی اثر تنش خشکی در مراحل مختلف رشد بر پارامترهای فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی از قبیل محتوای ترکیبات فنلی، اسیدهای فنولیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه دارویی مفراح مدنظر بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت طرح کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه بوعلی‌سینا طی سال ۱۳۹۹ به‌اجرا در آمد. مرحله فنولوژیکی (استقرار نشا و مرحله قبل از گلدهی) که تیمار تنش خشکی اعمال می‌شد به‌عنوان فاکتور اصلی و سه

جنس پونه‌سا (*Nepeta sp.*) به‌عنوان یکی از جنس‌های بزرگ خانواده نعناعیان، دارای گونه‌های دارویی اسانس‌دار و ارتفاع‌پسند بسیار ارزشمندی است که بالغ بر ۲۵۰ گونه در جهان و ۶۷ گونه در ایران گزارش شده است. مفراح با نام علمی *Nepeta crispa*، گیاهی چندساله از تیره نعناعیان، چندساقه‌ای با کرک‌های منشعب و برگ‌های تخم‌مرغی شکل است. این گیاه به‌دلیل مصارف دارویی، بهداشتی و غذایی دارای اهمیت است و در بیش‌تر مناطق معتدل و نیمه‌معتدل دنیا گسترش داشته و در ایران بومی استان همدان می‌باشد. در گویش محلی به آن مفراح گفته شده و در طب سنتی ایران به‌ویژه همدان بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است (Ahmadvand et al., 2015; Ghannadi et al., 2010; Sonboli et al., 2004).

گیاهان دارویی مانند گیاه مفراح در شرایط تنش می‌توانند ترکیبات فیتوشیمیایی بیش‌تری را تولید کرده و در نتیجه بازدهی اقتصادی بالایی داشته باشند. در بیش‌تر گیاهان دارویی، تنش خشکی باعث افزایش درصد مواد مؤثره آن‌ها می‌شود. هرچقدر مقدار این مواد مؤثره در واحد وزن گیاه بالاتر باشد دارای ارزش اقتصادی بیش‌تری است، بنابراین بهترین شرایط محیط کشت که بتواند منجر به تولید گیاهی با بیش‌ترین درصد متابولیت‌های ثانویه شود، از مهم‌ترین اهداف در پژوهش‌های مربوط به گیاهان دارویی می‌باشد (Alhathloul et al., 2020; Safikhani et al., 2007).

خشکی یکی از تنش‌های غیرزیستی و به‌عنوان محدودکننده‌ترین عوامل غیرزیستی از نظر کاهش محصولات گیاهی می‌باشد که در زمان بروز تنش میزان آب دریافتی گیاه کم‌تر از تلفات می‌شود (Gupta et al., 2009; Ozkur et al., 2020). اثر تنش خشکی در گیاهان دارویی می‌تواند علاوه بر کاهش شاخص‌های رشدی

مورد نیاز محاسبه و به آن اضافه شد. اعمال تیمار در طی دو مرحله استقرار نشای شش‌برگی و مرحله قبل از گلدهی انجام شد. از زمان شش‌برگی شدن نشاها تا مرحله گلدهی یک ماه زمان لازم بود.

بعد از پایان اعمال تنش خشکی و پس از به گل رفتن همه گیاهان، بوته‌ها از گلدان به همراه ریشه از گلدان خارج شدند. ابتدا ریشه‌ها با آب شسته شده و صفات رشدی از قبیل وزن خشک کل ریشه در هر بوته، طول ریشه اصلی، وزن خشک شاخساره در هر بوته، طول ساقه اصلی و همچنین سطح برگ گیاهان اندازه‌گیری و صفات فیتوشیمیایی محتوای نسبی آب برگ، کلروفیل a، b و کل، پرولین، فنل کل، فلاونوئیدکل، تانن کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کلروژنیک‌اسید، کافئیک‌اسید و رزمارینیک‌اسید مورد سنجش قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری وزن خشک شاخساره و ریشه از ترازوی دقیق با دقت ۰/۰۱ گرم و برای اندازه‌گیری طول ساقه و ریشه اصلی هم از خط‌کش دقیق استفاده شد. جهت اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی، نمونه‌ها از برگ‌های فوقانی، میانی و تحتانی شاخساره گرفته شده و پس از ترکیب با یکدیگر به‌عنوان یک نمونه واحد مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت تعیین محتوای آب نسبی (RWC)^۱ از برگ‌های فوقانی، میانی و تحتانی گیاه در مرحله گلدهی استفاده شد. ابتدا با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن شش دیسک برگ از هر نمونه انتخاب و جدا شد و بلافاصله نمونه‌ها در محیط آزمایشگاهی با ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شد تا وزن تر آن‌ها تعیین شود (FW)؛ سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاهی با دمای تقریبی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و در آب مقطر (به‌منظور آب‌گیری کامل) قرار گرفتند و پس از خشک‌شدن آب سطحی دوباره توزین شدند (TW). پس از آن دیسک‌ها به‌مدت

سطح از تیمار خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. در واقع سه سطح تیمار خشکی در دو مرحله رشدی گیاه اعمال شد که با در نظر گرفتن شش تیمار و سه تکرار، آزمایش دارای ۱۸ واحد آزمایشی بود. هر واحد آزمایشی شامل چهار گلدان و در مجموع ۷۲ گلدان در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. اعمال تیمارهای تنش خشکی بر اساس روش وزنی انجام شد. پس از وزن‌کردن هر کدام از گلدان‌های خالی، در کف هر کدام از گلدان‌ها به مقدار مساوی سنگ‌ریزه جهت انجام زهکشی ریخته شد و با استفاده از ترازو به‌صورت هم وزن از خاک مزرعه، کود حیوانی و ماسه به نسبت ۱-۱-۲ با وزن ۳/۸ کیلوگرم پر شدند. سپس با افزودن آب، خاک هر گلدان به درجه اشباع رسانده شد و به مدت ۴۸ ساعت روی سطح مشبک قرار داده شدند تا هر گلدان پس از زهکشی آب اضافی به ظرفیت مزرعه برسد. در این مرحله از هر گلدان که برای آزمایش خاک کنار گذاشته شده بود، یک نمونه برداشته شد و خاک آن در دمای ۱۰۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت کاملاً خشک شد. پس از مشخص‌شدن درصد وزنی رطوبت خاک در ظرفیت زراعی، میزان رطوبت موجود در خاک برای اعمال تیمارهای رطوبتی مختلف مشخص شد. برای کنترل وزن خشک بوته‌ها، هر تیمار رطوبتی دارای گلدان اضافی بود تا وزن خشک بوته‌ها به وزن خشک گلدان‌ها اضافه شده و مقدار صحیحی از آب در زمان اعمال تیمارهای رطوبتی به هر گلدان اختصاص یابد (Khorasaninejad et al., 2015). بعد از آماده‌سازی گلدان‌ها، تعداد دو عدد نشا دارای سه برگ حقیقی که از باغ گیاهان دارویی همدان خریداری شده بود داخل هر کدام از گلدان‌ها کاشته و آبیاری به مدت ۶۰ روز انجام شد. پس از استقرار نشاها و زمانی که دارای شش برگ حقیقی شدند هر گلدان روزانه وزن شده و مقدار آب

1. Relative Water Content (RWC)

جهت سنجش میزان کل فنل موجود از معرف فولین سیوکالتئو استفاده شد (Ainsworth & Gillespie, 2007). اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل نیز با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد (Li et al., 2006). بدین منظور، ۲۷۵ میکرولیتر از عصاره برگ با ۸۲۵ میکرولیتر آب مقطر به حجم ۱/۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر نیتريت سدیم ۵ درصد به محلول اضافه شد و پس از سپری شدن ۵ دقیقه ۰/۶ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از شش دقیقه ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (سود) ۱ مولار به‌همراه یک میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد و شدت جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قرائت شد. از آب مقطر به‌عنوان بلانک استفاده شد.

تانن کل به‌روش Taira & Ono (1996) انجام شد به این طریق که ۱۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره برگ اضافه شد سپس ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتئو ۱ نرمال به محلول اضافه شد پس از سپری شدن سه دقیقه ۰/۲۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع به محلول اضافه شد و به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و شیکر با دور گردش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت و شدت جذب محلول در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل براساس روش Kulkarni & Aradhya (2005) و از روی غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد شده توسط ماده ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)^۱ و بی‌رنگ کردن آن صورت پذیرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رابطه (۵) محاسبه شد:

$$AA = \left[1 - \frac{A_{517}(\text{Sample})}{A_{517}(\text{Control})} \right] \times 100 \quad (\text{رابطه ۵})$$

۴۸ ساعت و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون الکتریکی قرار داده شدند. پس از این مدت، نمونه‌ها توزین شدند تا وزن خشک (DW) به‌دست آید؛ سپس از رابطه (۱) محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد (Saydpour et al., 2015):

$$RWC = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل ابتدا ۰/۱ گرم بافت برگ‌گی تازه با استفاده از ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی کاملاً ساییده شد تا توده یکنواختی به‌دست آید. پس از سانتریفیوژ محلول، روش‌ناور حاصل برداشته شد و میزان جذب آن در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. مقدار کلروفیل a, b و مجموع (a+b) با استفاده از رابطه‌های (۲)، (۳) و (۴) محاسبه شد (Stevens et al., 2006):

$$\text{Chlorophyll a (mg/g F.W.)} = \quad (\text{رابطه ۲})$$

$$12.7(A663) - 2.69(A645)$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/g F.W.)} = \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$22.9(A645) - 4.68(A663)$$

$$\text{Chlorophyll a+b (mg/g F.W.)} = \quad (\text{رابطه ۴})$$

$$20.2(A645) + 8.02(A663)$$

جهت اندازه‌گیری پرولین ابتدا ۰/۵ گرم بافت تازه برگ با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک‌اسید ۳ درصد در داخل هاون به‌خوبی له شد تا مخلوط یکنواختی به‌دست آید. پس از سانتریفیوژ، ۲ میلی‌لیتر از محلول روش‌ناور به‌همراه ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلاسیسیال مخلوط و به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم گذاشته شد و پس از خارج کردن از حمام آب گرم، بلافاصله به‌منظور توقف واکنش، نمونه‌ها در یخ قرار داده شد. سپس با اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر تولوئن، مقدار جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Bates et al., 1973).

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

۳. نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس داده‌ها در مجموع نشان داد اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر کلیه صفات رشدی و فیتوشیمیایی مورد ارزیابی معنی‌دار بوده و زمان اعمال تنش نیز بر کلیه صفات رشدی به جز طول ساقه و صفات فیتوشیمیایی به غیر محتوای نسبی آب و میزان تاتن اثر معنی‌داری داشته است (جدول‌های ۱ و ۲). برهم‌کنش اثر سطوح تنش خشکی و زمان اعمال تنش نیز روی کلیه صفات رشدی معنی‌دار بود (جدول ۱) و از میان صفات فیتوشیمیایی ارزیابی شده برهم‌کنش دو فاکتور روی محتوای آب نسبی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، رزمارینیک اسید و کلروژنیک اسید در سطح ۱ درصد و بر میزان کلروفیل b، محتوای پرولین و اسید کافئیک در سطح ۵ درصد اثر معنی‌داری گذاشته است (جدول‌های ۱ و ۲).

جهت استخراج اسیدهای فنولیک کلروژنیک، کافئیک و رزمارینیک، ۰/۵ گرم از برگ‌های خشک و پودر شده گیاه مفرح با ۵ سی‌سی متانول ۸۵ درصد با گرید H در لوله آزمایش ریخته شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. پس از آن عصاره رویی را از کاغذ صافی عبور داده و به مدت دو دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول صاف‌شده برای آنالیز در دستگاه HPLC شد. ۴۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده به منظور شناسایی و تعیین ترکیبات فنولی به اینجکتور دستگاه HPLC (ساخت شرکت کنوئر آلمان مدل اسمارت لاین^۱ ۵۰ مجهز به دکتور UV و ستون C₁₈) تزریق شد و به منظور آنالیز کمی کروماتوگرام‌های حاصل از بارگذاری هر نمونه با کروماتوگرام‌های به دست آمده از استانداردهای مربوطه مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد. داده‌های حاصل از آزمایش پس از بررسی نرم‌الیتی، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه شد و

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تنش (T) و تنش خشکی (DS) بر برخی صفات رشدی و محتوای کلروفیل گیاه دارویی مفرح

منابع تغییر		درجه آزادی	وزن خشک اندام‌های هوایی	طول ساقه اصلی	وزن خشک ریشه	طول ریشه اصلی	سطح برگ تک‌بوته	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b
بلوک	۲	۰/۰۰۸ns	۱/۸۴۷ns	۰/۰۱۸ns	۱/۵۱۳*	۷/۲۹ns	۰/۰۳۰*	۰/۰۱۵*	۰/۰۰۰۲ns	
T	۱	۰/۳۴۴*	۰/۱۲۵ns	۱/۲۱۶**	۲۸۰/۰۵**	۲۸۳۰/۷۷**	۰/۱۰۴**	۰/۰۵۴**	۰/۰۰۸**	
خطا	۲	۰/۰۲۳	۰/۲۹۱	۰/۰۰۶	۰/۲۶	۱۶/۶۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۲	
DS	۲	۵/۱۰۸**	۷۳۲/۳۵**	۳/۱۲۷**	۲۹۴/۰۴**	۱۶۳۴۴/۲**	۰/۷۰۷**	۰/۴۱**	۰/۰۴۳**	
DS × T	۲	۰/۷۲۴**	۲۵۷/۲۹**	۰/۴۳۲**	۱۰/۷۲**	۷۱/۳۷**	۰/۰۰۸ ns	۰/۰۰۱۴ns	۰/۰۰۱۷*	
خطا	۸	۰/۰۴۴	۰/۸۱۹	۰/۰۱۲	۰/۲۶۳	۸/۱۹	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۳	
ضریب تغییرات (%)	-	۷/۵۱	۱/۷	۹/۸۹	۱/۶۲	۱/۴۹	۱۱/۳۳	۸/۱۸	۱۱/۱۷	

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تنش (T) و تنش خشکی (DS) بر برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه دارویی مفراح

میانگین مربعات										
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای نسبی	پروپن	فنل کل	فلاونوئید کل	تانن کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	زمارینیک اسید	کلروژنیک اسید	کافیک اسید
بلوک	۲	۰/۳۴۷ns	۰/۷۲۴**	۳۸۷/۷۳ns	۸۳۷/۷ns	۱۴۱۰ns	۵۷/۶۷ns	۰/۱۲۱*	۰/۰۰۲ns	۰/۰۰۰۰۲ns
T	۱	۱/۱۱۵ns	۵۱/۱۰**	۱۳۱۹۰۴**	۹۳۴۱۱**	۱۵۴۸ns	۱۳۷/۳۳*	۲/۸۸**	۰/۰۸۸**	۰/۰۰۰۸**
خطا	۲	۱/۱۲	۰/۵۷	۷۷۹/۷	۱۶۶۴/۹	۲۷۶۶	۲۷/۴۹	۰/۰۴۹	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۰۰۰۵
DS	۲	۱۷۷۲/۹**	۲۴۶/۲**	۳۰۷۸۰**	۲۹۴۰۲**	۴۲۰۳۴**	۲۲۵/۱**	۱۰/۷**	۰/۳۶**	۰/۰۱۰**
DS × T	۲	۲۹۸/۷۱**	۵/۵۸*	۲۱۵/۲ns	۲۱۳۶ns	۱۵۳/۷ns	۷۱/۴۱**	۰/۳۸**	۰/۰۵۷**	۰/۰۰۰۱*
خطا	۸	۱/۳۷	۱/۰۷۷	۸۹۳/۸	۳۳۱۱/۱۵	۱۰۴۷۵/۵	۲۵/۶	۰/۰۱۷۵	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۰۰۰۸
ضریب تغییرات (%)	-	۲/۲۸	۷/۰۹	۴/۶	۲۴/۶	۱۴/۸۴	۵/۸۸	۴/۸۱	۱۷/۹۳	۴/۶۸

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

۳.۱. پارامترهای رشدی

بالاترین وزن خشک ریشه با میانگین ۲/۳۷ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) در مرحله قبل از گلدهی و پایین‌ترین میزان با میانگین ۰/۴۰ گرم در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و در مرحله استقرار نشا به دست آمد که با همین سطح تنش در مرحله قبل از گلدهی و سطح تنش متوسط در مرحله استقرار نشا اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین بالاترین میزان خشک اندام هوایی با میانگین ۴/۱۸ گرم در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله اعمال تنش قبل از گلدهی و کم‌ترین میزان ۱/۶۵ گرم در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله قبل از گلدهی به دست آمد. بیش‌ترین میزان طول ریشه با میانگین ۴۴ سانتی‌متر در شرایط تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله قبل از گلدهی و کم‌ترین میزان طول ریشه با میانگین ۲۲ سانتی‌متر در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشا به دست آمد. بیش‌ترین میزان طول اندام هوایی با میانگین ۶۹/۳ سانتی‌متر در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت

زراعی) و مرحله قبل از گلدهی و کم‌ترین با میانگین ۳۵ سانتی‌متر در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله قبل از گلدهی به دست آمد. بالاترین سطح برگ نیز با میانگین ۲۶۳/۱ میلی‌متر مربع در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشا و کم‌ترین با میانگین ۱۳۷/۴ میلی‌متر مربع در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله قبل از گلدهی به دست آمد (جدول ۳).

در این پژوهش با افزایش شدت تنش خشکی شاخص‌های رشد کاهش یافت که همین انتظار هم از اثر خشکی می‌توان داشت. اعمال تنش در مرحله استقرار نشا شاخص‌های رشد را بیش‌تر از اعمال آن در مرحله قبل از گلدهی تحت تأثیر قرار داد. نکته قابل توجه در بررسی صفات رشدی تأثیر بیش‌تر تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) بر طول ریشه در هر دو مرحله اعمال تنش بود که می‌تواند نکته قابل توجهی بوده و در تأمین نیازهای آبی گیاه و بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات فیتوشیمیایی مؤثر باشد.

جدول ۳. اثر تنش خشکی و زمان اعمال تنش بر برخی ویژگی‌های رشدی گیاه دارویی مفراح

صفات رشدی					مرحله اعمال تنش	سطوح تنش خشکی
سطح برگ تکبوته (cm ²)	طول ریشه اصلی (cm)	وزن خشک ریشه (گرم در پوته)	طول ساقه اصلی (cm)	وزن خشک اندام هوایی (گرم در پوته)		
۲۶۳/۱a	۲۲/۰e	۰/۴۷d	۵۵c	۳/۲۷b	استقرار نشا	۸۰ درصد ظرفیت زراعی (ملایم)
۲۳۳/۷b	۲۷/۳d	۰/۴d	۶۹/۳a	۴/۱۸a	قبل از گلدهی	
۱۹۴/۱c	۳۳/۳۳c	۰/۷۴c	۵۷/۳۳b	۲/۵۷c	استقرار نشا	۶۰ درصد ظرفیت زراعی (متوسط)
۱۶۵/۵d	۴۴a	۱/۳۸b	۵۵c	۲/۹۶bc	قبل از گلدهی	
۱۵۴/۶e	۲۷/۶۶d	۱/۳۸b	۴۶/۵۰d	۲/۱۱d	استقرار نشا	۴۰ درصد ظرفیت زراعی (شدید)
۱۳۷/۴f	۳۵/۳۳b	۲/۳۷a	۳۵e	۱/۶۵e	قبل از گلدهی	

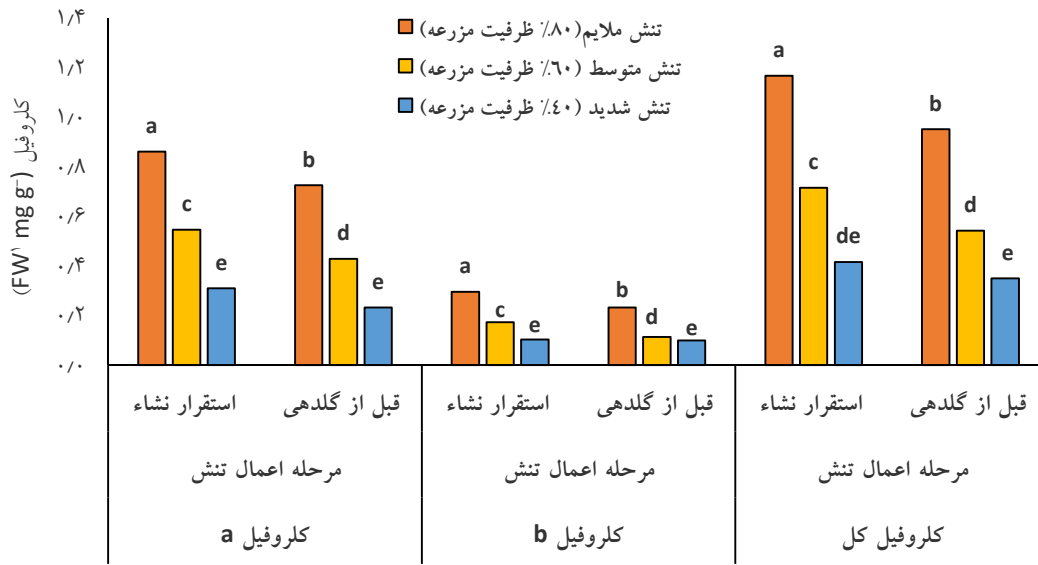
حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد.

۳.۲. محتوای کلروفیل

با افزایش شدت تنش خشکی میزان کلروفیل کل، a و b کاهش یافت، به طوری که بالاترین میزان کلروفیل کل با میانگین ۱/۱۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با میانگین ۰/۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که بالاترین میزان کلروفیل با میانگین ۰/۷۶ در مرحله استقرار نشاء و پایین‌ترین میزان آن با میانگین ۰/۶۱ در مرحله رویشی به دست آمد. همین وضعیت را کلروفیل a و b داشتند (شکل ۱).

در این بررسی میزان کلروفیل a و b و کل با افزایش تنش در هر دو مرحله اعمال تنش نسبت به شاهد روند کاهشی داشت. در گزارشی‌های جداگانه‌ای تنش آب همانند نتایج این آزمایش باعث کاهش رشد و کلروفیل گیاه بادرشبویه و آویشن شد (Bahreininejad et al.,

2007; Safikhani et al., 2013). اعمال تنش خشکی روی دو جمعیت از گیاه *Populus cathayana* به مدت ۱۲ هفته و در شرایط گلخانه هم نشان داد که دلیل کاهش کلروفیل در شرایط تنش شدید، کندی سرعت سنتز و یا تجزیه سریع کلروفیل است (Xiao et al., 2008). کاهش میزان کلروفیل، فتوسنتز و کاهش شدید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن و آلفاتوکوفرول در پژوهشی که روی ارتباط خشکی و تنش اکسیداتیو ناشی از آن با پیری برگ در گیاه دارویی مریم‌گلی صورت گرفته است، نیز گزارش شده است. کاهش عملکرد گیاه در شرایط تنش خشکی می‌تواند به دلیل کاهش سطح فتوسنتزکننده، کاهش تولید کلروفیل، افزایش انرژی مصرفی گیاه جهت بالابردن غلظت شیره سلولی باشد. با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل برگ کاهش، ولی نسبت کلروفیل a به کلروفیل b افزایش می‌یابد افزایش این نسبت سبب تیره شدن برگ‌ها خواهد شد (Munné-Bosch & Alegre, 2000).



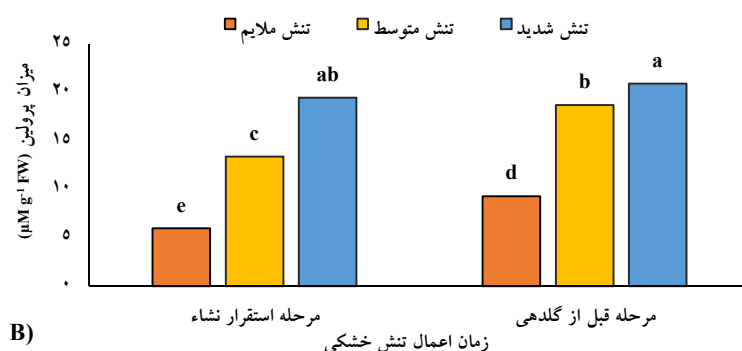
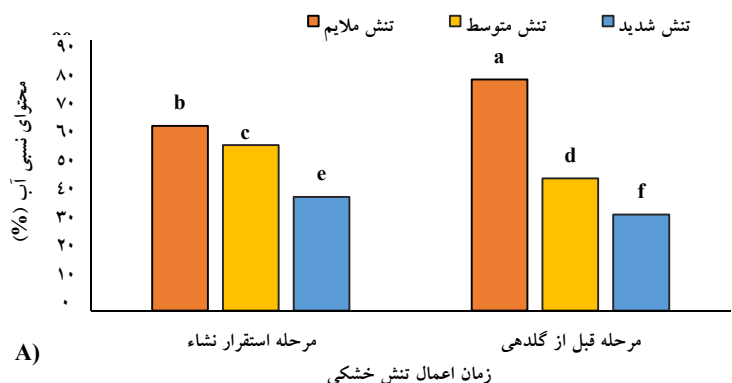
شکل ۱. اثر اعمال تنش خشکی (ملايم ، متوسط و شديد) در دو مرحله فنولوژیک روی کرونیل a، b و کل گیاه مفراح. (حروف مشابه در هر صفت نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد احتمال می باشد.)

۳.۳. محتوای نسبی آب (RWC) و میزان پرولین

با افزایش شدت تنش میزان محتوای نسبی آب کاهش یافت، به طوری که بالاترین میزان RWC با میانگین ۷۶/۹ درصد در شرایط تنش ملايم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین میزان آن با میانگین ۳۱/۹ درصد در شرایط تنش شديد (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد. اثر متقابل تنش خشکی و زمان اعمال تنش در سطح ۱ درصد آماری معنی دار شد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بالاترین میزان RWC با میانگین ۷۳/۲۷ در شرایط تنش ملايم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی و کمترین میزان با میانگین ۳۱/۹۶ در شرایط تنش ملايم (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی به دست آمد (شکل ۲-A). با افزایش شدت تنش میزان پرولین نیز افزایش یافت، به طوری که بالاترین میزان پرولین با میانگین ۲۰/۹ میکرومولار در گرم تر در شرایط تنش شديد (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین میزان

آن با میانگین ۵/۹ در شرایط تنش ملايم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد (شکل ۲-B). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها اثر ساده زمان اعمال تنش نشان داد که بالاترین میزان پرولین با میانگین ۱۶/۳۱ میکرومولار در گرم تر در مرحله رویشی و پایینترین میزان آن با میانگین ۱۲/۹۴ در مرحله استقرار نشاء به دست آمد. در بررسی اثر متقابل دو فاکتور مورد بررسی نیز مشخص شد که بالاترین میزان پرولین با میانگین ۲۰/۹۳ میکرومولار در گرم تر در شرایط تنش شديد (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی که با تنش شديد (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در مرحله استقرار نشاء و شرایط تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) در مرحله رویشی اختلاف معنی داری نداشت و کمترین میزان با میانگین ۵/۷۶ میکرومولار در گرم تر در شرایط تنش ملايم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشاء به دست آمد (شکل ۲-B).

اثر تنش خشکی در مراحل مختلف نموی بر برخی پارامترهای رشدی و فیتوشیمیایی گیاه مفرح (*Nepeta crispa* L.)



شکل ۲. اثر تنش خشکی (ملایم، متوسط و شدید) در دو مرحله فنولوژیک روی محتوای آب نسبی (A) و میزان پرولین (B) گیاه مفرح. (حروف مشابه در هر شکل نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد).

گلایکول و به موازات آن افزایش تنش خشکی، کاهش معنی‌داری در RWC ایجاد شد (Mohammadi *et al.*, 2015). به‌طورکلی، کاهش محتوای نسبی آب نتیجه کم‌شدن آب در محیط رشد و مشکل‌شدن جذب آب توسط ریشه می‌باشد. حفظ پتانسیل آب به توانایی گیاه برای جذب آب از خاک و ظرفیت آن برای محدودکردن تعریق مربوط می‌شود.

تنش خشکی از طریق افزایش سنتز آنزیم‌هایی که تولید پرولین را تحریک می‌کنند و ممانعت از عمل آنزیم‌هایی که پرولین را تخریب می‌کنند، سبب افزایش میزان پرولین می‌شود. تجمع پرولین در تعداد زیادی از گیاهان در ارتباط با تحمل تنش بوده و در گیاهان مقاوم

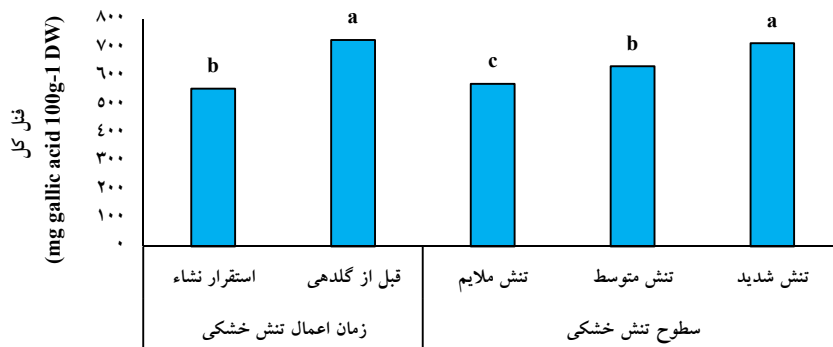
کاهش محتوای نسبی آب و پتانسیل آبی برگ، یکی از شاخص‌های پاسخ به تنش خشکی در گیاهان است. کاهش محتوای نسبی آب به‌عنوان سازوکاری معرفی شده که شیب پتانسیل آب را بین خاک و گیاه فراهم کرده و منجر به جذب آب از خاک می‌شود. زمانی که گیاهان تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند، به‌سرعت محتوای نسبی آب، پتانسیل آبی و پتانسیل اسمزی کاهش پیدا می‌کند (Zegaoui *et al.*, 2017). با کاهش محتوای نسبی آب روزنه‌ها بسته شده و فتوسنتز کاهش می‌یابد. در گیاه بادرشبو با افزایش شدت کمبود آب، RWC کاهش یافت (Rahbarian *et al.*, 2010). اثر تنش خشکی بر محتوای نسبی آب در به‌لیمو نشان داد، با افزایش سطوح پلی اتیلن

میانگین ۵۷۳/۷۵ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین میزان فنل با میانگین ۷۲۴/۴۳ در مرحله رویشی و پایین‌ترین میزان آن با میانگین ۵۵۶/۲۲ در مرحله استقرار نشا به دست آمد (شکل ۳). بالاترین میزان فلاونوئید نیز با میانگین ۳۰۹/۳۱ (میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با میانگین ۱۷۱/۱۱ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد که نسبت به تنش متوسط اختلاف معنی‌داری نداشت نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین میزان فلاونوئید با میانگین ۳۰۵/۷۸ در مرحله رویشی و پایین‌ترین میزان آن با میانگین ۱۶۱/۷۰ در مرحله استقرار نشا به دست آمد (شکل ۴). هم‌چنین بالاترین میزان تانن با میانگین ۲۹۰/۸۳ در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با میانگین ۱۲۳/۷۸ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد (شکل ۵). اثر زمان اعمال تنش و اثر متقابل تنش خشکی و زمان اعمال تنش بر میزان این صفت از نظر آماری معنی‌دار نشد (جدول ۲).

به تنش مقدار آن بالاتر از گیاهان حساس است (Salehi *et al.*, 2016). پرولین به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان منجر به تعدیل اعمال میتوکندریایی شده، روی تکثیر، مرگ سلولی و بیان ژن‌های خاصی اثر گذاشته و این می‌تواند برای بهبود گیاه تحت تنش ضروری باشد. مطالعات مختلف در تعدادی از گیاهان نشان داده است که معمولاً تنش خشکی سبب افزایش پرولین می‌شود. علت این موضوع تحریک فعالیت آنزیم بیوستتزی پرولین اورنتین امگا-آمینوترانسفراز و مهار آنزیم کاتابولیکی پرولین دهیدروژناز پیشنهاد شده است (Lum *et al.*, 2014; Per *et al.*, 2017).

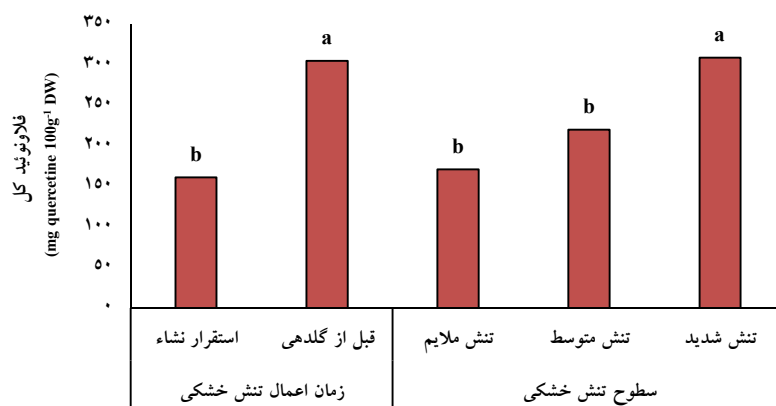
۳. ۴. میزان فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل

به‌طور کلی با افزایش شدت تنش محتویات فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل افزایش یافت، اما فقط میزان فنل و فلاونوئید تحت تأثیر زمان اعمال تنش خشکی قرار گرفت و تانن تحت تأثیر آن قرار نگرفت (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). بالاترین میزان فنل با میانگین ۷۱۶/۵۴ (میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با

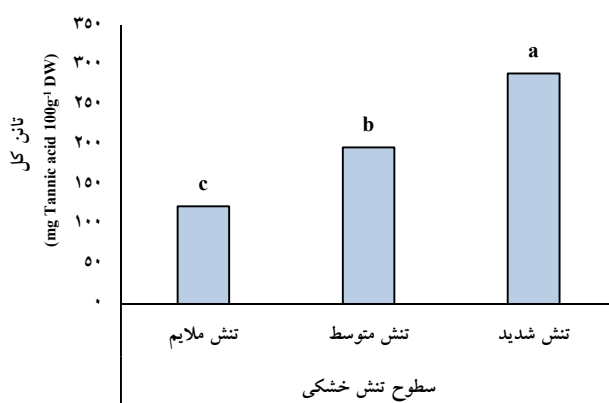


شکل ۳. اثر ساده تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و زمان اعمال تنش روی محتوای فنل کل گیاه مفراج. (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد).

اثر تنش خشکی در مراحل مختلف نمو بر برخی پارامترهای رشدی و فیتوشیمیایی گیاه مفرح (*Nepeta crispa* L.)



شکل ۴. اثر ساده تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و زمان اعمال تنش روی محتوای فلاونوئید کل گیاه مفرح. (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد.)



شکل ۵. اثر ساده تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) روی محتوای تانن کل گیاه مفرح. (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد.)

تنش خشکی افزایش معنی‌داری یافت و بیش‌ترین محتوای فنلی در تنش ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. به نظر می‌رسد که گیاه در زمان تنش خشکی به‌علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیب‌های فنلی را افزایش داده تا بتواند واکنش‌های دفاعی مناسبی را در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در پیش گیرد (Sarker & Oba,

افزایش سطوح ترکیبات فنلی، ازجمله مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش خشکی است، چراکه این‌گونه ترکیبات به‌عنوان پالاینده‌های گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (Turumtay *et al.*, 2014). در این مطالعه مقدار ترکیبات فنلی تحت تأثیر

خشکی و زمان اعمال تنش نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میانگین ۹۲/۲۰ در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی و کم‌ترین میزان با میانگین ۸۴/۸۶ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشاء به‌دست آمد (شکل ۶). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان اساساً به‌دلیل حضور ترکیبات فنلی بوده و در بسیاری موارد ارتباط مستقیمی میان محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد، به‌طوری‌که بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه نعنای فلفلی^۱ با میزان فنل کل بالا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان داد (Farnad et al., 2014). درحالی‌که در گیاه *Capparis ovata* با میزان فنل کل پایین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایینی نشان داد (Ozkur et al., 2009). هم‌چنین در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زیره سیاه مشخص شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره مربوط به ترکیبات فنلی موجود در آن است. در گیاه مورد بررسی نیز ظهور خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکال‌های آزاد نیز به‌طور یقین به‌دلیل فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در این گیاهان می‌باشد (Mariod et al., 2009).

۶.۳. اسیدهای فنولیک

سطوح مختلف تنش و نیز زمان اعمال تنش اثر معنی‌داری بر میزان اسیدهای فنولیک اندازه‌گیری شده برگ‌ها در سطح ۱ درصد آماری داشتند (جدول ۲). بالاترین میزان رزمارینیک‌اسید با میانگین ۴/۵ در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با میانگین ۱/۳۷ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌دست آمد (شکل A-۷).

(2018b). در پژوهشی روی گیاه زنیان مشاهده کردند. بررسی‌ها روی سرخارگل نشان داد که تنش خشکی بر میزان فنل اثر معنی‌داری داشت و با افزایش تنش میزان فنل ریشه افزایش یافت و بیش‌ترین میزان آن در خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی اتفاق افتاد (Alizadeh Ahmadabadi & Khorasaninejad, 2017).

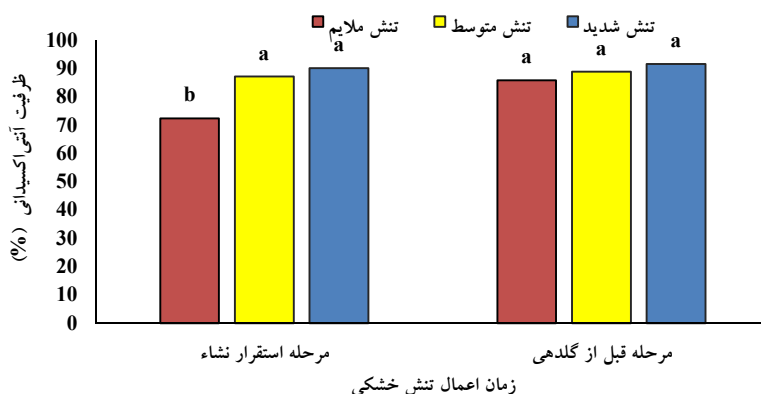
فلاونوئیدها جزو ترکیبات فنلی می‌باشند که می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، خاموش‌کننده و حذف‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان عمل کنند. نتایج پژوهش حاضر بیانگر افزایش محتوای فلاونوئید در پاسخ به تنش خشکی بود. نتایج مشابهی روی گیاه گندم (Ma et al., 2014) و تاج‌خروس (Sarker & Oba, 2018a) به‌دست آمده که فلاونوئیدها در تنش خشکی که یک تنش اکسیداتیو است، وارد عمل شده و میزان آن زیاد می‌شود. زمانی که کلزا را تحت تنش آبی قرار دادند به بررسی میزان فلاونوئید این گیاه پرداختند و مشاهده کردند که در اثر تنش تأثیر قرار دادن گیاه در تنش خشکی مقدار فلاونوئید آن به‌عنوان متابولیت ثانویه افزایش یافت. فلاونوئیدها توانایی پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن را دارند (Nikravesht et al., 2016).

۵.۳. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

با افزایش شدت تنش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان افزایش یافت به‌طوری‌که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان با میانگین ۹۱/۷۲ در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان آن با میانگین ۸۶/۲۳ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌دست آمد (شکل ۶). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میانگین ۹۰/۲۸ در مرحله رویشی و پایین‌ترین میزان آن با میانگین ۸۸/۳۸ در مرحله استقرار نشاء به‌دست آمد. اثر متقابل تنش

1. *Mentha piperita*

اثر تنش خشکی در مراحل مختلف نموی بر برخی پارامترهای رشدی و فیتوشیمیایی گیاه مفراج (*Nepeta crispa* L.)

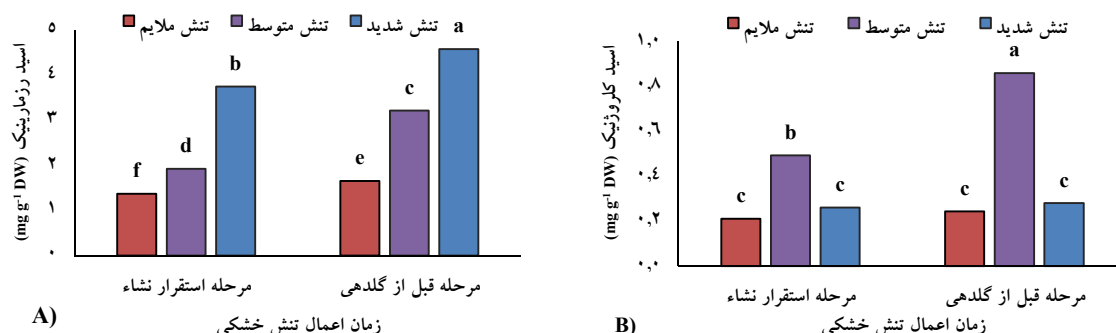


شکل ۶. اثر اعمال تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در دو مرحله روی ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه مفراج. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد احتمال می باشد.

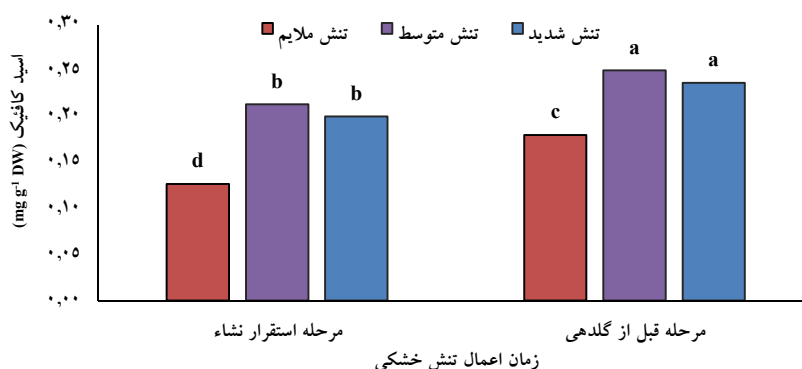
تنش سبب شد بالاترین میزان فعالیت کلروژنیک اسید با میانگین ۰/۸۶ در شرایط تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی و کمترین میزان با میانگین ۰/۲۱ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی به دست آید (شکل B-V).

بالاترین میزان کافئیک اسید نیز با میانگین ۰/۲۴ در شرایط تنش ملایم (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین میزان آن با میانگین ۰/۱۵ (میلی گرم در گرم وزن خشک) در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد (شکل ۸). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین میزان کافئیک اسید با میانگین ۰/۲۲ در مرحله رویشی و پایینترین میزان آن با میانگین ۰/۱۸ در مرحله استقرار نشاء به دست آمد. اثر متقابل تنش خشکی و زمان اعمال تنش نیز باعث گردید بالاترین میزان کافئیک اسید با میانگین ۰/۲۵ در شرایط تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی و کمترین میزان با میانگین ۰/۱۲ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشاء در برگ‌ها تجمع یابد (شکل ۸).

همچنین بالاترین میزان اسید رزمارینیک با میانگین ۳/۱۳ در مرحله رویشی و پایینترین میزان آن با میانگین ۲/۲۵ در مرحله استقرار نشاء به دست آمد. اثر متقابل تنش خشکی و زمان اعمال تنش سبب شد بالاترین میزان رزمارینیک اسید با میانگین ۴/۵۵ در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله رویشی و کمترین میزان با میانگین ۱/۳۷ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و مرحله استقرار نشاء به دست آید (شکل A-V). با افزایش شدت تنش میزان کلروژنیک اسید افزایش یافت. سپس با شدت یافتن تنش از میزان آن کاسته شد هرچند نسبت به شاهد روند افزایشی را نشان داد، به طوری که بالاترین میزان فعالیت کلروژنیک اسید با میانگین ۰/۶۶ در شرایط تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین میزان آن با میانگین ۰/۲۳ در شرایط تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین میزان کلروژنیک اسید با میانگین ۰/۴۴ در مرحله رویشی و پایینترین میزان آن با میانگین ۰/۳۳ در مرحله استقرار نشاء به دست آمد. اثر متقابل تنش خشکی و زمان اعمال



شکل ۷. اثر اعمال تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشدی روی اسیدهای فنولیک رزمارینیک (A) و کلروژنیک (B) گیاه مفراح. (حروف مشابه در هر صفت نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد).



شکل ۸. اثر اعمال تنش خشکی ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی)، متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشدی روی کافئیک اسید گیاه مفراح. (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال می‌باشد).

نمودند. در این پژوهش به‌غیر از رزمارینیک اسید سطح سایر مواد تشکیل‌دهنده فعال به‌طور قابل‌توجهی تحت تنش خشکی افزایش یافت. مقدار رزمارینیک اسید ۲۱ درصد در تنش ملایم و ۸ درصد در تنش شدید گزارش شد. مقدار سالویونیک اسید در تنش ملایم ۵ درصد و در تنش شدید ۱۳ درصد افزایش را نشان داد. گیاه به‌منظور مقابله با آثار ناشی از تنش خشکی، تولید متابولیت‌های ثانویه خود از جمله اسیدهای فنولیک را افزایش داده و بنابراین بیان ژن‌های رزمارینیک اسید که از مهم‌ترین

مطالعات حاکی از افزایش محتوای اسید رزمارینیک در گیاه نعنای فلفلی تحت تیمار خشکی بود که افزایش چشم‌گیر محتوای رزمارینیک اسید تحت اعمال تنش خشکی مشاهده شده است (Figuroa-Pérez et al., 2014). نتایج پژوهش‌ها نشان داد که تنش شوری و خشکی اثر معنی‌داری در میزان تیمول و سایر ترکیبات فنلی از جمله رزمارینیک اسید در گیاه آویشن باغی دارند (Liu et al., 2011). (Trócsányi et al., 2015). اثر تنش خشکی را بر رشد و ترکیبات مؤثره مریم‌گلی بررسی

گلدھی نسبت به مرحله استقرار نشا جدا از این که صفات رویشی را کاهش داد سبب افزایش ماده مؤثره و انباشت بیش تر اسمولیت‌ها در گیاه مفرح شد و از لحاظ کیفی نسبت به مرحله استقرار نشا مرحله مناسب‌تری برای اعمال تنش خشکی است.

۵. تشکر و قدردانی

از دانشگاه بوعلی سینا بابت تامین اعتبار لازم و فراهم نمودن شرایط پژوهش، تقدیر و تشکر می‌گردد.

۶. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۷. منابع

- Ahmadvand, H., Amiri, H., & Dalvand, H. (2015). Antioxidant properties of hydro-alcoholic extract and extract of *nepeta crispa* in Lorestan province. *Hormozgan Medical Journal*, 19(3), 172-179. (In Persian)
- Ainsworth, E.A., & Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Alhathloul, H. A., Soliman, M. H., Ameta, K. L., El-Esawi, M. A., & Elkelish, A. (2020). Changes in Ecophysiology, Osmolytes, and Secondary Metabolites of the Medicinal Plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* Subjected to Drought and Heat Stress. *Biomolecules*, 10(1), 43.
- Alizadeh Ahmadabadi, A., & Khorasaninejad, S. (2017). The Effect of Humic acid Pretreatment on Germination of purple cornflower (*Echinacea purpurea*) plant under Drought and Salinity Conditions. *Arid Biome Scientific and Research Journal*, 6(2), 97-107. (In Persian)
- Bahreinejad, B., Razmjou, J., & Mirza, M. (2013). Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. *International Journal of Plant production*, 7(1), 151-166.
- Bates, L. S., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.

اسیدهای فنلی به‌شمار می‌رود نیز افزایش یافته است. تأثیر تنش خشکی بر همه این ترکیب‌ها یکسان نیست، بنابراین کیفیت مواد مؤثره نیز تحت تنش قرار می‌گیرد. براساس بررسی‌های به‌عمل آمده تاکنون درخصوص اسیدهای فنولیک و هم‌چنین واکنش گیاه مفرح در برابر تنش خشکی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و وجود فنیل پروپانویدهای رزمارینیک‌اسید، کلروژنیک‌اسید و کافئیک‌اسید و خاصیت ضددیابتی این اسیدهای فنولیک که موجب کاهش رهاسازی گلوکز در جریان خون بعد از غذا می‌شوند (Johnston *et al.*, 2003)، می‌توان برای گیاه مفرح خاصیت ضددیابتی نیز متصور شد که در آینده به احتمال زیاد از این پتانسیل مفرح برای ساخت داروهای ضددیابت بهره خواهند برد.

۸. نتیجه‌گیری

به‌طور کلی افزایش سطوح تنش خشکی باعث کاهش غلظت کلروفیل و محتوای نسبی آب برگ شد. با افزایش شدت تنش خشکی در مرحله رویشی پرولین برگ نیز افزایش یافت. هم‌چنین با افزایش سطوح تنش در هر دو مرحله اعمال تنش افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. بیش‌ترین مقادیر به‌دست‌آمده برای صفات فیتوشیمیایی مربوط تنش اعمال‌شده در قبل از گلدھی بود. سه ترکیب رزمارینیک‌اسید، کلروژنیک‌اسید و کافئیک‌اسید در اثر تنش خشکی افزایش پیدا کردند، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان اسید رزمارینیک در تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و کافئیک‌اسید و کلروژنیک‌اسید در تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و در مرحله اعمال تنش قبل از گلدھی مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن بود که اعمال تنش در مرحله قبل از

- Farnad, N., Heidari, R., & Aslanipour, B. (2014). Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 113-121 .
- Figuroa-Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Pérez-Ramírez, I. F., Mercado-Silva, E., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (*Mentha piperita*) grown under drought stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(49), 12027-12033 .
- Ghannadi, A., Aghazari, F., Mehrabani, M., Mohagheghzadeh, A., & Mehregan, I. (2010). Quantity and composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (2), 103-105 . (In Persian)
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266-269 .
- Johnston, K. L., Clifford, M. N., & Morgan, L. M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(4), 728-733 .
- Khorasaninejad, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S., Hadian, J., & Atashi, S. (2015). The effect of drought stress on the growth, essential oil yield and chemical composition of Lavender. *Journal of Crops Improvement*, 17(4), 979-988. <https://doi.org/10.22059/jci.2015.55145>
- Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food chemistry*, 93(2), 319-324 .
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*, 96(2), 254-260 .
- Liu, H., Wang, X., Wang, D., Zou, Z., & Liang, Z. (2011). Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 84-88 .
- Liu, Y., Liu, J., Wang, H.-Z., Wu, K.-X., Guo, X.-R., Mu, L.-Q., & Tang, Z.-H. (2020). Comparison of the global metabolic responses to UV-B radiation between two medicinal *Astragalus* species: an integrated metabolomics strategy. *Environmental and Experimental Botany*, 104094 .
- Lum, M., Hanafi, M., Rafii, Y., & Akmar, A. (2014). Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(5), 1487-1493 .
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y., & Guo, T. (2014). Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 80, 60-66 .
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food chemistry*, 116(1), 306-312 .
- Mohammadi, A., Ebrahimzadeh, H., Hadian, J., & Mirmasoumi, M. (2015). Study of the effect of drought stress on some biochemical and physiological parameters of *Lippia citriodora* HBK. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 28(3), 617-628. (In Persian)
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925-931.
- Nikraves, M., Kholdebarin, B., Nejadstari, T., & Najafi, F. (2016). Effect of sodium nitroprusside (SNP) on some physiological parameters in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings under drought stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(3), 644-658. (In Persian)
- Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M., & Turkan, I. (2009). Physicochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 487-492 .
- Per, T. S., Khan, N. A., Reddy, P. S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M. I. R., & Anjum, N. A. (2017). Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant physiology and biochemistry*, 115, 126-140 .
- Rahbarian, P., Afsharmanesh, G., & Shirzadi, M. (2010). Effects of drought stress and manure on relative water content and cell membrane stability in dragonhead (*Dracocephalum moldavica*).
- Saedi, F., Sirousmehr, A., & Javadi, T. (2020). Effect of nano-potassium fertilizer on some morpho-physiological characters of peppermint (*Mentha piperita* L.) under drought stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 33(1), 35-45.

- Safikhani, F., Heydari Sharifabad, H., Syadat, A., Sharifi Ashorabadi, A., Syednedjad, M., & Abbaszadeh, B. (2007). The effect of drought stress on percentage and yield of essential oil and physiological characteristics of *Dracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 23(35), 86-99. (In Persian)
- Salehi, A., Tasdighi, H., & Gholamhoseini, M. (2016). Evaluation of proline, chlorophyll, soluble sugar content and uptake of nutrients in the German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under drought stress and organic fertilizer treatments. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 886-891 .
- Sarker, U., & Oba, S. (2018a). Drought stress effects on growth, ROS markers, compatible solutes, phenolics, flavonoids, and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(4), 999-1016 .
- Sarker, U., & Oba, S. (2018b). Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus leafy vegetable*. *BMC Plant biology*, 18(1), 258 .
- Saydpour, F., Sayyari, M., & Ghanbari, F. (2015). Effect of glycine betaine on chilling tolerance of cucumber seedlings. *Journal of Crops Improvement*, 17(1), 53-67. <https://doi.org/10.22059/jci.2015.54788> (In Persian)
- Sonboli, A., Salehi, P., & Yousefzadi, M. (2004) . Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(9-10), 653-656 .
- Stevens, J., Senaratna, T., & Sivasithamparam, K. (2006). Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regulation*, 49(1), 77-83 .
- Taira, S., & Ono, M. (1996). Reduction of astringency in persimmon caused by adhesion of tannins to cell wall fragments. I International Persimmon Symposium 436 ,
- Trócsányi, E., György, Z., Inotai, K., Szabó, K., Pluhár, Z., Radácsi, P., Malekzadeh, M., & Németh-Zámboriné, E. (2015). Enhanced rosmarinic acid accumulation and rosmarinic acid synthase gene expression under drought stress in thyme (*Thymus vulgaris*). *Planta Medica*, 81(16), PM_246 .
- Turumtay, E. A., İslamoğlu, F., Çavuş, D., Şahin, H., Turumtay, H., & Vanholme, B. (2014). Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. caucasicus var. caucasicus). *Industrial Crops and Products*, 52, 687-694 .
- Xiao, X., Xu, X., & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42(5), 705-719 .
- Zegaoui, Z., Planchais, S., Cabassa, C., Djebbar, R., Belbachir, O. A., & Carol, P. (2017). Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. *Journal of plant physiology*, 218, 26-34 .