تغییرات میزان اسانس و اجزای اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در پاسخ به کاربرد نیتروژن

مهدی سیف سهندی[1]، حسنعلی نقدی‌بادی[1]، علی مهرآفرین[1*]، فرحناز خلیقی سیگارودی[1]، محسن شریفی[2]

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
صندوق‌پستی (مهرویلا): ۱۳۶۹-۳۱۳۷۵
تلفن: ۱۹-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: A.Mehrafarin@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۱ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۷/۱۸ doi: 10.29252/jmp.4.72.81

چکیده

مقدمه: نیتروژن مهم‌ترین عنصر غذایی مورد نیاز گیاهان است. فراهمی نیتروژن با تأثیر بر توسعه سطح برگ، تثبیت کربن، افزایش غدد ترشحی اسانس و افزایش میزان **ATP** و **NADPH** موجب افزایش بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی و تجمع اسانس می‌شود.

هدف: بررسی تغییرات کمی و کیفی میزان اسانس و اجزای آن تحت تأثیر سطوح مختلف کود نیتروژن و ارتباط آن با وضعیت آنتی اکسیدانی نعناع فلفلی از اهداف این تحقیق بود.

روش بررسی: این آزمایش مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در دو سال (۱۳۹۴-۱۳۹۳) به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل مصرف سه سطح کود نیتروژن به صورت اوره (۰، ۷۵ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) بودند. صفات مورد بررسی شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، درصد اسانس و اجزای تشکیل دهنده اسانس بودند.

نتایج: کاربرد کود اوره اثر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشت. مصرف اوره در هر دو سال آزمایش موجب افزایش میزان اسانس نعناع فلفلی شد. همچنین اثر متقابل کود نیتروژن و سال به غیر از میزان ***β*- Pinene**، **Myrcene**، **Limonene**، **1,8- Cineole**، ***Z*-*β*-Ocimene** و ***α*-Terpineol** بر سایر اجزای اسانس نعناع فلفلی تأثیر معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: کاربرد نیتروژن موجب افزایش میزان اسانس نعناع فلفلی شد. همچنین، کمبود نیتروژن موجب کاهش میزان پروتئین‌های محلول، درصد اسانس و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان **Pulegone** شد. مصرف ۷۵ کیلوگرم اوره در هکتار در زراعت نعناع فلفلی به دلیل افزایش میزان اسانس و کاهش میزان **Pulegone** و عدم تاثیر معنی‌داری بر میزان **Menthol**، **Menthone** و **Menthofuran** توصیه می‌شود.

گل‌واژگان: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اسانس، نیتروژن، نعناع فلفلی، **Menthol**، **Menthone**

مقدمه

نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بومی مناطق مدیترانه‌ای است و در تمام نقاط دنیا برای مصارف غذایی، دارویی، عطرسازی و درمانی کشت می‌شود [۱]. اسانس نعناع فلفلی به دلیل بهبود نارحتی‌های بخش‌های فوقانی دستگاه گوارش، سندورم روده تحریک پذیر، کولیک کودکان و قابلیت تسکین دردهای آرتریتی، روماتیسمی و دردهای مزمن در صنایع داروسازی نیز کاربرد فراوانی دارد [۲]. Menthol مهم ترین جزء اسانس نعناع فلفلی است که همراه با Menthone، iso-Menthone و دیگر ترکیبات، مسئول ایجاد طعم و عطر خنکی نعناع می‌باشند [۳]. علاوه بر Menthol، سایر مونوترپن‌های اصلی اسانس نعناع فلفلی شامل Menthone، Menthyl acetate، Limonene، Pulegone، Menthofuran، iso-Menthone و Carvone است [۶-۴]. کیفیت اسانس نعناع فلفلی بر اساس میزان غلظت Menthol، Menthone، Pulegone و Menthofuran تعیین می‌شود به طوری که هرچه درصد Menthol و Menthone بالاتر و غلظت‌های Pulegone و Menthofuran پایین‌تر باشد، اسانس دارای کیفیت بالاتری خواهد بود [۷]. تخمین زده می‌شود که مصرف جهانی Menthol بین ۳۰۰۰۰ الی ۳۲۰۰۰ تن در سال باشد بنابراین توسعه کشت نعناع فلفلی و به کارگیری روش‌های صحیح مدیریتی برای بهبود کیفیت اسانس آن اهمیت فراوانی دارد [۸، ۳].

نیتروژن مهم‌ترین عنصر غذایی پرمصرف می‌باشد که در ساختمان مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سیتوکروم‌ها نقش دارد [۹]. وجود نیتروژن برای اغلب فعالیت‌های متابولیکی گیاهان حیاتی است و یک نقش مهمی در رشد و فتوسنتز دارد [۱۰]. نیتروژن در گیاهان ذخیره کننده اسانس با تأثیر بر فتوسنتز و تثبیت CO_2، پیش ماده بیشتری برای بیوسنتز ترپنوئیدها فراهم می‌کند. مطالعات نشان دادند که همبستگی مثبتی میان محصولات فتوسنتزی مانند گلیسرآلدئید ۳- فسفات یا پیرووات با بیوسنتز ترپنوئیدها وجود دارد. علاوه بر این میان سطح برگ یا نیتروژن خاک با غلظت ترپنوئیدها هم همبستگی مثبتی گزارش شده است [۱۱]. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که بیشترین عملکرد اسانس در گیاه علف لیمو (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) با کاربرد ۴۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار به دست آمد [۱۲].

نیتروژن اگرچه در ساختمان مونوترپن‌ها وجود ندارد، اما کاربرد آن منجر به افزایش غدد ترشحی اسانس در برگ نعناع فلفلی می‌شود [۱۳]. مطالعات اخیر مشخص کردند که در گیاهان خانواده نعناع تعداد غدد ترشح کننده اسانس در برگ ثابت نبوده و با گسترش سطح برگ افزایش می‌یابند [۱۴]. همچنین، علت افزایش تعداد غدد ترشحی اسانس تحت تأثیر نیتروژن، تولید و مصرف قندهای ساده برای توسعه بیشتر سطح برگ گزارش شده است [۱۵]. غلامی و عزیزی (۱۳۸۵) بیان کردند که با افزایش میزان نیتروژن (تا ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) میزان کل اسانس و ترکیبات آلفا- توجون و کامازولن در گیاه افسنطین (*Artemisia absintinium* L.) افزایش یافت [۱۶]. نجات‌زاده (۱۳۹۴) نشان داد که مصرف نیتروژن موجب کاهش میزان Limonene و *trans*-Dihydro carvone و افزایش α–phellandrene و Dill ether در اسانس گیاه شوید (*Anethum graveolens*) شد در حالی که تأثیر معنی‌داری بر میزان Carvone نداشت. ایشان بیان داشت که مصرف کود نیتروژن به دلیل افزایش میزان ATP و NADPH موجب افزایش بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی می‌شود [۱۷]. مهربانی و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که کاربرد کود نیتروژن تا سطح ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار موجب افزایش درصد اسانس، میزان فنل تام، میزان α–phellandrene و γ-Terpinene در مرزه کوهستانی (*Satureja hortensis* L.) شد اما میزان *p*-Cymene، Thymol و Carvacrol را کاهش داد. این در حالی بود که کود نیتروژن تأثیر معنی‌داری بر میزان α-Pinene، β-Pinene، Myrcene، Limonene و 1,8-Cineole نداشت [۱۸].

کیفیت ماده مؤثره در زراعت گیاهان دارویی اهمیت بیشتری نسبت به کمیت محصول دارد، اما با توجه به اهمیت و نقش گیاهان دارویی در صنایع مختلف، امروزه رویکرد جهانی در تولید این گیاهان، بهبود کمیت و کیفیت ماده مؤثره می‌باشد [۱۹]. تحقیقات نشان دادند که یکی از فاکتورهای زراعی مؤثر

در رشد و عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی، تغذیه گیاهان می‌باشد [۲۰]. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف کود نیتروژن بر تغییرات کمی و کیفی میزان اسانس و اجزای آن بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت یک آزمایش مزرعه‌ای دو ساله (۱۳۹۳-۱۳۹۴) در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل مصرف سه سطح کود نیتروژن به صورت اوره (۰، ۷۵ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) بود که نیمی از آن در ابتدای فصل کشت سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ (۱۵ فروردین ماه) و نیمی دیگر در اواخر اردیبهشت ماه اعمال شد. جهت تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه، قبل از تهیه بستر کاشت از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری نمونه برداری انجام شد (جدول شماره ۱). سایر عناصر غذایی مورد نیاز نعناع فلفلی بر اساس آزمون خاک به صورت یکسان برای همه تیمارها اعمال شد.

نشاءهای نعناع فلفلی از کلکسیون پژوهشکده گیاهان دارویی جمع‌آوری شده و سپس با فاصله ۲۰ سانتی‌متر از یکدیگر روی ردیف‌های کشت (با فاصله ۴۰ سانتی‌متر از یکدیگر) در دوم اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ کشت شدند. عملیات آبیاری در سال ۱۳۹۲ به صورت جوی و پشته انجام شد و از سال ۱۳۹۳ به بعد (شروع اعمال تیمارها) سیستم آبیاری قطره‌ای ایجاد شد. کودهای نیتروژن برای هر کرت (۶ مترمربع) درون شیارهایی در کنار ردیف کاشت ریخته شد. نمونه برداری از کرت‌های آزمایش در ابتدای مرحله گلدهی (۱۰ تیرماه) با در نظر گرفتن اثر حاشیه به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده تحت شرایط سایه در دمای اتاق خشک شدند.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول از روش برادفور (۱۹۷۶) استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۵ گرم از بافت فریز شده گیاه با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (دارای EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، پلی‌وینیل پیرولیدین ۲ درصد) (pH=7) کاملاً هموژنیزه شد و مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی به عنوان عصاره استخراج شده، جدا شد. مخلوط واکنش شامل عصاره استخراج شده و معرف برادفورد (۵ میلی‌گرم کوماسی بلو بریلیانت در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شده و پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۸۵ درصد، با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) بود. میزان جذب پروتئین‌های محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. غلظت پروتئین‌های محلول با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد و بر حسب میلی‌گرم پروتئین بر گرم برگ تازه بیان شد [۲۱].

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Malik and Singh (۱۹۸۰) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۲۵ میلی‌لیتر آنزیم خام، ۰/۲۵ میلی‌لیتر از گویاکول ۲۰ میلی‌مولار (۲۴۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= ۶/۸) بود. افزایش جذب ۳ دقیقه پس از افزودن ۰/۲۵ میلی‌لیتر H_2O_2 با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار بوسیله اسپکتوفتومتر با طول موج ۴۷۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تتراگوایاکول (ε= 26.6 mM^{-1} cm^{-1}) در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۲۲].

جدول شماره ۱- خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک مزرعه تحقیقاتی

Texture			K (ppm)	P (ppm)	N (%)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	pH	شوری (ds/m)
Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)									
۱۶	۲۲	۶۲	۱۷۷/۴	۹/۲	۰/۰۷۵	۴/۸۱	۴/۹	۰/۶	۰/۷	۷/۲	۱/۲

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Foyer و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مول، H_2O_2 یک میلی‌مول و EDTA یک میلی‌مول و آنزیم استخراجی در حجم کلی ۳ میلی‌لیتر بود. واکنش با افزودن H_2O_2 آغاز شد و میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با فواصل زمانی هر۲۰ ثانیه ثانیه به مدت ۳ دقیقه قرائت شد. فعالیت آنزیم به صورت میکرومول آسکوربات (ε= 2.8 mM^{-1} cm^{-1}) در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۲۳].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Cakmak and Horst (۱۹۹۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH= 6.8، پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی به مقدار مناسب بود. تجزیه آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با فواصل زمانی هر ۱۰ ثانیه یکبار اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میکرومول H_2O_2 (ε= 43.6 mM^{-1} cm^{-1}) در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۲۴].

روش استخراج اسانس

مقدار ۱۰۰ گرم از اندام هوایی تر نعناع فلفلی به‌طور دقیق توزین و داخل بالن دو لیتری ریخته شد و سپس آب مقطر به میزان دو سوم حجم کل بالن اضافه شد. پس از نصب دستگاه کلونجر بر روی بالن، دمای هیتر در ابتدا به گونه‌ای تنظیم شد که آب درون بالن به نقطه جوش برسد. سپس درجه هیتر به اندازه‌ای پایین آمد که محتویات درون بالن بواسطه فشار بخار زیاد ایجاد شده به درون کلونجر نفوذ نکند. از لحظه شروع به جوش آمدن آب درون بالن، اسانس‌گیری به مدت ۳ تا ۴ ساعت ادامه یافت. اسانس جمع‌آوری شده تا زمان انجام آنالیزهای کروماتوگرافی درون ویال‌های شیشه‌ای و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مشخصات دستگاه GC/Mass

دستگاه گازکروماتوگرافی از نوع Agilent 6890 مجهز به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5973 بود. ستون استفاده شده از نوع BPX5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر بود. برای شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه که توسط n– هگزان رقیق‌شده بود به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق شد. برنامه دمایی ستون شامل دمای ابتدایی آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت دو دقیقه، افزایش دما تا ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد با گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه بود. سپس دما با سرعت پنج درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه به ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت سه دقیقه در این دما متوقف شد. دمای اتاقک تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) یک میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. نسبت اسپیلت یک به ۱۰ بود. کل زمان آنالیز GC/MS به ازای هر تزریق ۵۵ دقیقه بود. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن مس‌ها از ۴۰ تا ۴۶۵ تنظیم شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت [۶۵، ۲۵].

تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل واریانس مرکب پس از بررسی تجانس واریانس داده‌های دو سال آزمایش (آزمون بارتلت) انجام شد. همچنین نرمال بودن خطای داده‌ها نیز بر اساس آزمون کلموگروف–اسمیرونوف تعیین شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 انجام شد و برای مقایسه میانگین اثرات ساده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و برای مقایسه میانگین اثرات متقابل از آزمون Lsmeans استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر سال تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین محلول ($P \leq ۰/۰۱$) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ($P \leq ۰/۰۱$) داشت. کاربرد کود اوره اثر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشت. همچنین اثر متقابل سال در اوره نیز تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز ($P \leq ۰/۰۱$) و آسکوربات پراکسیداز ($P \leq ۰/۰۱$) داشت (جدول شماره ۲).

میزان پروتئین محلول در هر دو سال آزمایش تحت تأثیر اوره ۷۵ کیلوگرم در هکتار (۸۶/۲ میلی‌گرم در سال ۱۳۹۴ و ۷۱/۵ در سال ۱۳۹۳) نسبت به تیمار شاهد (۶۷/۴ میلی‌گرم در سال ۱۳۹۴ و ۵۸/۷ میلی‌گرم در سال ۱۳۹۳) افزایش یافت اما در تیمار اوره ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار به طور معنی‌داری کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار شاهد سال ۱۳۹۳ بیشتر از تیمار شاهد در سال ۱۳۹۴ بود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با فراهمی نیتروژن کاهش یافت به طوری که با افزایش میزان اوره، فعالیت این آنزیم‌ها بیشتر کاهش یافت. بنابراین بیشترین فعالیت این آنزیم‌ها در هر دو سال آزمایش در تیمار شاهد و کمترین فعالیت آنها در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره مشاهده شد (جدول شماره ۳).

میزان اسانس در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ تفاوت معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) با یگدیگر داشت (جدول شماره ۴) به طوری که در سال ۱۳۹۴ میزان اسانس (۱۹ درصد) بیشتر بود. کاربرد اوره در هر دو سال آزمایش موجب افزایش میزان اسانس شد. بیشترین میزان اسانس در سال ۱۳۹۳ با مصرف ۷۵ کیلوگرم در هکتار (۰/۸۱ درصد) مشاهده شد و در سال ۱۳۹۴ بیشترین درصد اسانس با کاربرد ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره (۰/۹ درصد) به دست آمد (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۲– تجزیه واریانس اثر متقابل اوره و سال بر میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

	Df	پروتئین	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
سال	۱	۶۸۵ **	۱۰۲/۵	۴/۸۶	۱۶۴۳۲ **
خطای سال	۶	۶/۵۲	۱۸/۳	۱/۵۴	۱۶۳/۲
اوره	۲	۱۵۵۹ **	۵۷۱ **	۲/۰۹ **	۳۲۵۰۹ **
اوره × سال	۲	۲۴/۲۴	۱۵۴ **	۰/۰۳۲	۲۲۱۳ **
خطا	۱۲	۱۱/۸۱	۱/۵۷	۰/۰۱۶	۱۶۲/۶
CV		۵/۳۴	۶/۱	۵/۹	۸/۳۸

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول شماره ۳– مقایسه میانگین اثر سطوح متفاوت نیتروژن بر اجزای اسانس نعناع فلفلی

سال	۱۳۹۳			۱۳۹۴		
میزان اوره	۰	۷۵	۱۵۰	۰	۷۵	۱۵۰
پروتئین	۵۸/۷ b	۷۱/۵ a	۴۶/۷ c	۶۷/۴ b	۸۶/۲ a	۵۵/۳ c
کاتالاز ($\mu M\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	۳۷/۷ a	۱۶/۱ b	۱۴/۹ b	۲۲/۹ a	۱۶ b	۱۵/۸ b
پراکسیداز ($\mu M\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	۳/۳ a	۲/۴ b	۲ c	۲/۱۷ a	۱/۷ b	۱/۳ c
آسکوربات پراکسیداز ($\mu M\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	۲۴۱ a	۱۷۶ b	۱۱۷ c	۲۰۶ a	۸۵/۷ b	۸۶ b

میانگین‌های هر سال که دارای حروف مشابه در هر ردیف بودند، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد نداشتند.

جدول شماره ۴– تجزیه واریانس اثر متقابل اوره و سال بر میزان اسانس و اجزای اسانس گیاه نعناع فلفلی

منابع تغییرات	Df	درصد اسانس	α- Pinene	Sabinene	β- Pinene	Myrcene	3- Octanol	α- Terpinene	p- Cymene	Limonene	1,8- Cineole	Z-β- Ocimene
سال	۱	۰/۱۰۱ **	۰/۱۷۲ **	۰/۱۳ **	۰/۶۸ **	۰/۰۰۰۴ **	۰/۰۰۶۶ **	۰/۸۴۷ **	۰/۰۰۰۰۲	۱۷/۸۱ **	۲/۱۷ *	۰/۰۱۲۹ **
خطای سال	۶	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۶۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳۷	۰/۰۰۶۵	۰/۰۰۰۲۲	۰/۰۵۵	۰/۱۴۳	۰/۰۰۰۰۲
اوره	۲	۰/۰۴۸ **	۰/۰۰۰۷	۰/۰۱۲ **	۰/۰۰۴۸	۰/۰۰۰۸۶	۰/۰۰۷۵ **	۰/۰۷۹ **	۰/۰۰۰۲ *	۰/۳۱ **	۰/۵۱ **	۰/۰۰۴۴ **
اوره × سال	۲	۰/۰۴۶ **	۰/۰۲۴۵ **	۰/۰۰۴ **	۰/۰۰۷۶	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۴۲ **	۰/۲۳۷ **	۰/۰۰۰۷ **	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۰۰۴۲
خطا	۱۲	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۰۵۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۲۷	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰۱۵
CV		۵/۴۶	۲/۸۸	۲/۸۸	۴/۰۱	۴/۸۲	۸/۳	۱/۳۸	۵/۶۹	۲/۵۱	۱/۷۴	۵/۳۷

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ادامه جدول شماره ۴–

منابع تغییرات	Df	cis- Sabinene hydrate	Terpinolene	Linalool	trans- Sabinene hydrate	Isopulegol	iso- Menthone	neo- Menthol	iso- Menthol	α- Terpineol	Pulegone	Piperitone
سال	۱	۲/۹۶ **	۰/۰۰۳	۰/۰۲۸ **	۰/۰۵۶ **	۰/۰۰۰۲	۱۷۵ **	۰/۰۱۷ **	۱/۷۵ **	۰/۲۸ **	۳۹/۴ **	۰/۳۲ **
خطای سال	۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۶	۰/۲۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۵۸	۰/۰۰۰۲
اوره	۲	۰/۵۵ **	۰/۰۰۰۲ **	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۴ **	۰/۰۰۰۱	۰/۴۸ **	۰/۰۲ **	۰/۰۰۱	۰/۰۱ **	۳/۷۹ **	۰/۰۰۳ **
اوره × سال	۲	۰/۸۸ **	۰/۰۰۷۱ **	۰/۰۳ **	۰/۰۰۰۴ **	۰/۰۰۲ **	۰/۳۵ **	۰/۰۱ **	۰/۱۱ **	۰/۰۰۱	۳/۹۶ **	۰/۰۰۹ **
خطا	۱۲	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۱۷	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۷۱	۰/۰۰۰۲
CV		۳/۰۴	۳/۳۵	۶/۵۲	۶/۸۹	۹/۳۸	۳/۱	۶/۹۲	۳/۷۸	۳/۶۶	۱۴/۳۱	۲/۸۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ادامه جدول شماره ۴-

منابع تغییرات	Df	Menthol	Menthone	neo- Menthyl acetate	Menthyl acetate	iso- Menthyl acetate	Menthofuran	Carvacrol	α- Humulene	β- Bourbonene	β- Elemene
سال	۱	۴۶۳ **	۱۸۷۶ **	۰/۰۵۲ **	۲۱/۹ **	۰/۰۰۵۴ **	۱۰۹۷ **	۰/۳ **	۱/۲۳ **	۰/۳۷ **	۰/۰۰۳ **
خطای سال	۶	۷/۵۸	۱/۹۷	۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۰۰۰۱	۰/۱۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۲
اوره	۲	۱/۷	۱/۷۸	۰/۰۱ **	۲/۲۶ **	۰/۰۰۸ **	۶/۸۹ **	۰/۰۱۶ **	۰/۰۰۹۶ **	۰/۰۰۴۷ **	۰/۰۲ **
اوره × سال	۲	۸/۸۸ **	۸۴/۵ **	۰/۰۶ **	۹/۰۲ **	۰/۰۰۰۶ **	۵/۱۷ **	۰/۰۱۲ **	۰/۰۱ **	۰/۰۲ **	۰/۰۴۹ **
خطا	۱۲	۰/۹۱	۲/۵۸	۰/۰۰۰۹	۰/۰۳	۰/۰۰۰۰۳	۰/۲۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
CV		۲/۷۳	۸/۰۱	۱۲/۶	۵/۰۴	۵/۱۴	۷/۹۱	۹/۸۸	۹/۰۷	۳/۵۱	۸/۷۶

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ادامه جدول شماره ۴-

منابع تغییرات	Df	trans- Caryophyllene	Z-β- Farnesene	Germacrene D	Bicyclo germacrene	Viridiflorol	Monoterpene Hydrocarbons	Oxygenated Monoterpenes	Sesquiterpene Hydrocarbons
سال	۱	۱۶/۳ **	۴/۱ **	۲۷/۸ **	۰/۶۸ **	۰/۲۵ **	۱۱۶۰ **	۲۳۰۱ **	۱۴۷ **
خطای سال	۶	۰/۰۳	۰/۰۰۱۸	۰/۰۷	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۵	۰/۵۱	۰/۱۷	۰/۲۹
اوره	۲	۰/۲۴ **	۰/۰۱ **	۰/۳۶ **	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۱۸	۷/۹۵	۸/۳ *	۱/۴ **
اوره × سال	۲	۰/۱۱ **	۰/۰۱ **	۰/۲۳ **	۰/۰۲ **	۰/۰۰۲ **	۴۲ **	۵۰ **	۱/۶ **
خطا	۱۲	۰/۰۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۷	۵/۸۱	۰/۵۹	۰/۰۳
CV		۳/۵۴	۰/۸	۲/۰۱	۷/۱	۳/۶۷	۳/۶۴	۳/۳	۲/۳

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

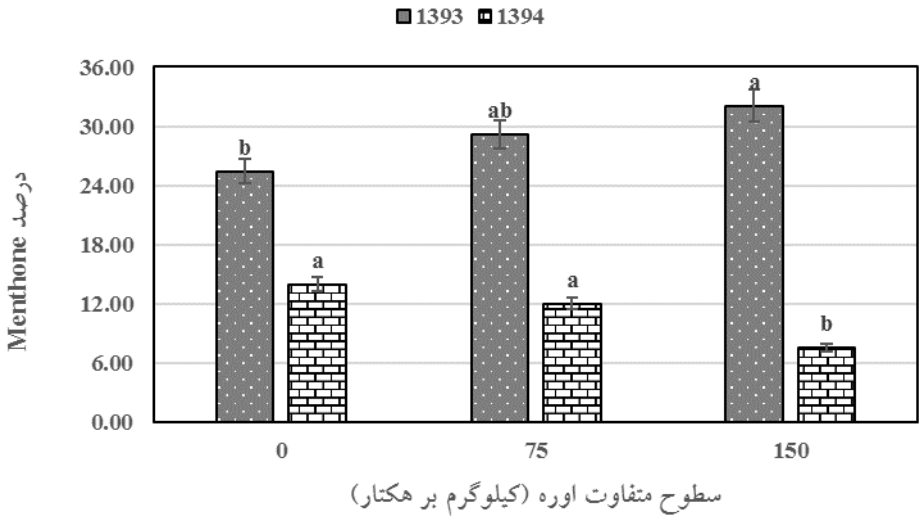
نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین سطوح متفاوت اوره (کیلوگرم بر هکتار) بر میزان اسانس در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴

در سال ۱۳۹۳، سی و سه ترکیب ترپنوئیدی در اسانس نعناع فلفلی شناسایی شد در حالی که در سال ۱۳۹۴ تعداد ۳۴ ترکیب ترپنوئیدی شناسایی شد. ترکیبات Menthofuran، Carvacrol و α-Humulene در اسانس به دست آمده از گیاهان کشت شده در سال ۱۳۹۳ و ترکیبات *trans*-Sabinene hydrate و Z-β-Farnesene در اسانس حاصل از گیاهان کشت شده در سال ۱۳۹۴ شناسایی نشد. مهم‌ترین اجزای اسانس در هر دو سال آزمایش شامل Menthol، Menthone، β-Pinene، Limonene، 1,8-Cineole، iso-Menthone، iso-Menthol، Pulegone، *trans*-Caryopyllene، Germacrene D، Menthyl acetate بود. Menthofuran نیز یکی از اجزای اصلی اسانس در سال ۱۳۹۴ بود.

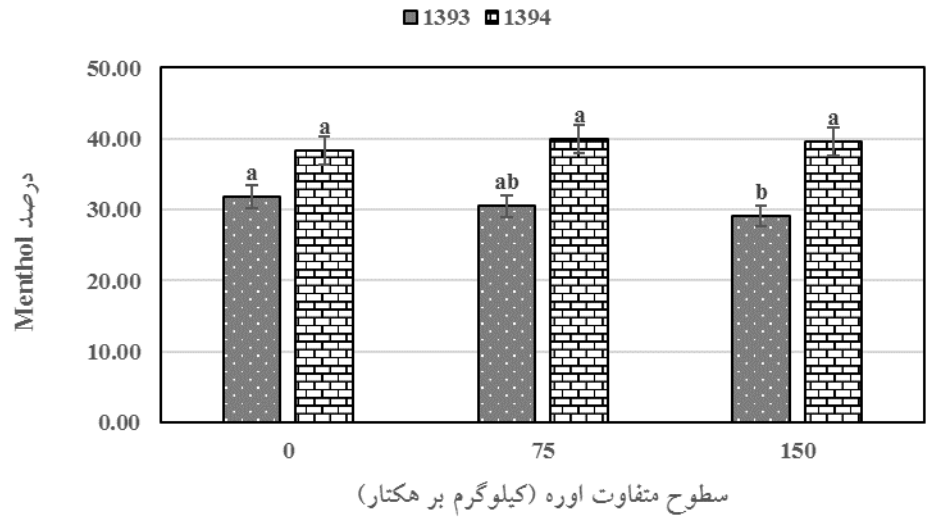
نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر سال بر اغلب اجزای اسانس به غیر از p-Cymene، Terpinolene و Isopulegol تأثیر معنی‌داری داشت. مصرف کود نیتروژن اگرچه تأثیر معنی‌داری بر بیشتر اجزای اسانس نعناع فلفلی داشت اما بر میزان α-Pinene، β-Pinene، Myrcene، Linalool، Isopulegol، iso-Menthol، Menthol، Menthone و Viridiflorol تأثیر معنی‌داری نداشت. همچنین اثر متقابل مصرف کود اوره در سال‌های متفاوت نیز تأثیر معنی‌داری بر اغلب اجزای اسانس به جزء β-Pinene، Myrcene، Limonene، 1,8-Cineole، Z-β-Ocimene و α-Terpineol داشت (جدول شماره ۴). میزان Menthone در سال ۱۳۹۳ (۲۸/۸ درصد) بیشتر از سال ۱۳۹۴ (۱۱/۲ درصد) بود و برعکس میزان Menthol در سال ۱۳۹۴ (۳۹/۳ درصد) ۸/۸ واحد بیشتر از سال ۱۳۹۳ (۳۰/۵ درصد) بود. میزان Menthone در تیمار ۷۵ کیلوگرم اوره در هکتار در هر دو سال آزمایش تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت و مصرف اوره ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در سال ۱۳۹۳ موجب افزایش میزان Menthone و در سال ۱۳۹۴ موجب کاهش میزان Menthone نسبت به تیمار شاهد شد (نمودار شماره ۲). استفاده از کود نیتروژن در سال ۱۳۹۴ تأثیر معنی‌داری بر میزان Menthol نداشت اما در سال ۱۳۹۳ مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره (۲۹/۱ درصد) موجب کاهش معنی‌دار میزان Menthol در مقایسه با تیمار شاهد (۳۱/۹ درصد) شد (نمودار شماره ۳).

میزان Limonene، 1,8-Cineole و Z-β-Ocimene تحت تأثیر مصرف سطوح متفاوت اوره نسبت به تیمار شاهد کاهش یافتند به طوری که با افزایش مصرف اوره میزان این ترکیبات نیز بیشتر کاهش یافت و بیشترین میزان آنها در تیمار شاهد (به ترتیب ۳/۵۱ درصد، ۶/۹۱ درصد و ۰/۵۷ درصد)

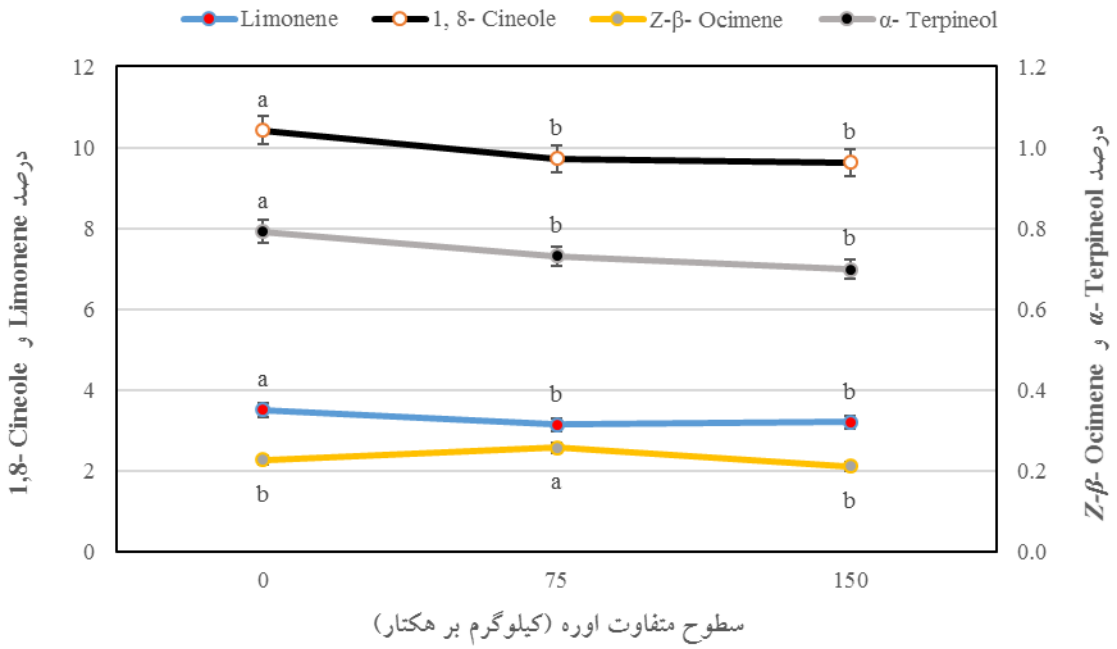
حاصل شد. میزان α-Terpineol با مصرف ۷۵ کیلوگرم در هکتار اوره (۰/۲۶ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد (۰/۲۳ درصد) به طور معنی‌داری افزایش یافت و میزان آن تحت تأثیر ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره (۰/۲۱ درصد) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین سطوح متفاوت اوره بر میزان Menthone در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین سطوح متفاوت اوره بر میزان Menthol در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین سطوح متفاوت اوره بر میزان Limonene، 1,8- Cineole، α- Terpineol و Z-β- Ocimene

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که میزان *cis*-Sabinene hydrate در سال ۱۳۹۳ به طور معنی‌داری بیشتر از سال ۱۳۹۴ بود. مصرف اوره در سال ۱۳۹۳ موجب کاهش میزان *cis*-Sabinene hydrate و در سال ۱۳۹۴ موجب افزایش آن در مقایسه با تیمار شاهد شد. همچنین میزان Menthyl acetate در سال ۱۳۹۴ بیشتر از سال ۱۳۹۳ بود و مصرف اوره در سال ۱۳۹۳ موجب کاهش میزان Menthyl acetate و در سال ۱۳۹۴ موجب افزایش میزان این مونوترپن در مقایسه با تیمار شاهد شد. درصد Pulegone در سال ۱۳۹۴ بیشتر از سال ۱۳۹۳ بود. میزان Pulegone تحت تأثیر مصرف سطوح متفاوت کود اوره در سال ۱۳۹۳ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۰/۵۶ درصد) نداشت اما در سال ۱۳۹۴ میزان آن با مصرف اوره کاهش یافت. Menthofuran در سال ۱۳۹۳ شناسایی نشد و میزان آن در سال ۱۳۹۴ تحت تأثیر ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره ۲۰ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (جدول شماره ۵).

مقدار iso-Menthone در سال ۱۳۹۴ نسبت به سال ۱۳۹۳ کمتر بود. تغییرات iso-Menthone در سال ۱۳۹۳به مقدار اوره مصرفی بستگی داشت به طوری که تحت تأثیر اوره ۷۵ کیلوگرم در هکتار (۷/۴ درصد) میزان آن نسبت به تیمار شاهد (۷ درصد) افزایش یافت اما با مصرف ۱۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار (۶/۵ درصد) مقدار آن کاهش یافت. مقدار iso-Menthol تحت شرایط اقلیمی سال ۱۳۹۴ بیشتر از سال ۱۳۹۳ افزایش نشان داد. استفاده از کود اوره در سال ۱۳۹۳ موجب کاهش میزان iso-Menthol نسبت به تیمار شاهد (۰/۷۳ درصد) شد اما در سال ۱۳۹۴، استفاده از کود اوره موجب افزایش میزان iso-Menthol شد. میزان Germacrene D و *trans*-Caryopyllene تحت تأثیر استفاده از ۱۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار نسبت به تیمار شاهد کاهش یافتند. میزان Germacrene D در سال ۱۳۹۳ تحت تأثیر مصرف کود اوره کاهش یافت اما میزان *trans*-Caryopyllene تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. *Z-β*-Farnesene در سال ۱۳۹۴ شناسایی نشد و مقدار آن در سال ۱۳۹۳ تحت تأثیر سطوح متفاوت کود اوره نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (جدول شماره ۵).

میزان مونوترپن‌های اکسیژن دار در سال ۱۳۹۴ بیشتر از سال ۱۳۹۳ بود و برعکس میزان موترپن‌های هیدروکربنه در سال ۱۳۹۳ بیشتر از سال ۱۳۹۴ بود. میزان مونوترپن‌های هیدروکربنه تحت تأثیر مصرف کود اوره در سال ۱۳۹۳ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت اما میزان مونوترپن‌های اکسیژن

دار کاهش یافت و کمترین میزان آن در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار (۱۱/۸ درصد) مشاهده شد. همچنین بر عکس سال ۱۳۹۳، میزان مونوترپن‌های هیدروکربنه در سال ۱۳۹۴ تحت تأثیر کود اوره در مقایسه با تیمار شاهد کاهش و میزان مونوترپن‌های اکسیژن‌دار افزایش یافت. در سال ۱۳۹۴، بیشترین میزان مونوترپن‌های اکسیژن‌دار در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار (۳۷/۱ درصد) به دست آمد و بیشترین میزان مونوترپن‌های هیدروکربنه در تیمار شاهد (۶۰/۷ درصد) و مصرف ۱۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار (۶۰/۹ درصد) حاصل شد (جدول شماره ۵).

همبستگی مثبت و معنی‌داری میان میزان پروتئین محلول با میزان Menthone، Menthol، مونوترپن هیدروکربن و مونوترپن اکسیژن‌دار مشاهده شد. همچنین میزان Menthofuran همبستگی منفی و معنی‌داری با میزان پروتئین ($P \leq ۰/۰۱$، $r = -۰/۹۵$) داشت. درصد اسانس همبستگی منفی و معنی‌داری با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشت اگرچه تنها همبستگی میان درصد اسانس با فعالیت آنزیم کاتالاز ($P \leq ۰/۰۱$، $r = -۰/۹۵$) معنی‌دار بود. میزان Limonene، 1,8-Cineole، Germacrene D و سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربن همبستگی منفی و معنی‌داری با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشتند. میزان Pulegone همبستگی منفی و معنی‌داری با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشت اما تنها همبستگی میان Pulegone با فعالیت آنزیم کاتالاز ($p \leq ۰/۰۱$، $r = -۰/۹$) معنی‌دار بود (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۵– مقایسه میانگین اثر سطوح متفاوت نیتروژن بر اجزای اسانس نعناع فلفلی

سال	۱۳۹۳			۱۳۹۴		
میزان اوره	۰	۷۵	۱۵۰	۰	۷۵	۱۵۰
α-Pinene	۰/۷۶ ±۰/۰۶ a	۰/۶۹ ±۰/۰۲ b	۰/۶۶ ±۰/۰۱ b	۰/۸ ±۰/۰۲ b	۰/۹۱ ±۰/۰۳ a	۰/۹۱ ±۰/۰۲ a
Sabinene	۰/۶۵ ±۰ /۰۳ a	۰/۶ ±۰/۰۲ b	۰/۵۳ ±۰/۰۲ c	۰/۷۵ ±۰/۰۲ a	۰/۷۵ ±۰/۰۰۶ a	۰/۷۲ ±۰/۰۲ a
β-Pinene	۱/۱۴ ±۰/۰۵ a	۱/۱ ±۰/۰۳ a	۱/۰۳ ±۰/۱۱ a	۱/۴ ±۰/۰۲ a	۱/۴۵ ±۰/۰۳ a	۱/۴۳ ±۰/۰۲ a
Myrcene	۰/۳۲ ±۰/۰۲ a	۰/۳۱ ±۰/۰۱ ab	۰/۲۸ ±۰/۰۳ b	۰/۳۳ ±۰/۰۱ a	۰/۳۴ ±۰/۰۱ a	۰/۳۳ ±۰/۰۲ a
3-Octanol	۰/۲ ±۰/۰۱ a	۰/۱۸ ±۰/۰۲ a	۰/۱۷ ±۰/۰۲ a	۰/۲۶ ±۰/۰۱۵ a	۰/۱۶ ±۰/۰۴ b	۰/۲۳ ±۰/۰۰۶ a
α-Terpinene	۰/۸۶ ±۰/۰۶ c	۰/۹۳ ±۰/۰۶ b	۱/۳۶ ±۰/۰۷ a	۰/۷۱ ±۰/۰۶ a	۰/۷۳ ±۰/۰۵ a	۰/۵۹ ±۰/۰۴ b
p-Cymene	۰/۱۱ ±۰/۰۱ a	۰/۱ ±۰/۰۱ ab	۰/۰۹ ±۰/۰۲ b	۰/۱ ±۰/۰۱۵ b	۰/۰۹ ±۰/۰۰۵ b	۰/۱۱ ±۰/۰۰۶ a
cis-Sabinene hydrate	۱/۷۳ ±۰/۰۷ a	۱/۲۵ ±۰/۰۶ b	۰/۵۵ ±۰/۰۴ c	۰/۳۸ ±۰/۰۵ b	۰/۵۱ ±۰/۰۲ a	۰/۵۳ ±۰/۰۳ a
Terpinolene	۰/۱۵ ±۰/۰۲ b	۰/۱۶ ±۰/۰۲ b	۰/۲۳ ±۰/۰۳ a	۰/۱۸ ±۰/۰۲ a	۰/۱۵ ±۰/۰۱ b	۰/۱۴ ±۰/۰۰۵ b
Linalool	۰/۵۳ ±۰/۰۲ a	۰/۴۳ ±۰/۰۴ b	۰/۵۱ ±۰/۰۳ a	۰/۳۹ ±۰/۰۲ b	۰/۵۳ ±۰/۰۷ a	۰/۳۶ ±۰/۰۲ b
trans-Sabinene hydrate	۰/۱۱ ±۰/۰۱ a	۰/۱ ±۰/۰۱ b	۰/۰۸ ±۰/۰۱ c	–	–	–
Isopulegol	۰/۱۵ ±۰/۰۲ a	۰/۱ ±۰/۰۱ b	۰/۱۲ ±۰/۰۰۵ b	۰/۱ ±۰/۰۱ b	۰/۱۲ ±۰/۰۰۶ a	۰/۱۱ ±۰/۰۰۵ a
iso-Menthone	۷ ±۰/۴۷ b	۷/۴ ±۰/۶۷ a	۶/۵ ±۰/۲۲ c	۱/۶۴ ±۰/۳۱ a	۱/۵۵ ±۰/۲۷ a	۱/۴۹ ±۰/۲۴ a
neo-Menthol	۰/۴۶ ±۰/۰۳ a	۰/۲۹ ±۰/۰۶ b	۰/۴۳ ±۰/۰۱ a	۰/۴۶ ±۰/۰۲ a	۰/۴۳ ±۰/۰۲ a	۰/۴۵ ±۰/۰۵ a
iso-Menthol	۰/۷۳ ±۰/۰۴ a	۰/۵۴ ±۰/۰۶ b	۰/۵۲ ±۰/۰۴ b	۱ ±۰/۰۲ b	۱/۱۷ ±۰/۰۵ a	۱/۲۴ ±۰/۰۶ a
Pulegone	۰/۵۶ ±۰/۰۳ a	۰/۵۸ ±۰/۰۲ a	۰/۶ ±۰/۰۳ a	۴/۶۷ ±۰/۷۴ a	۱/۶۵ ±۰/۱۷ c	۲/۸۱ ±۰/۱۵ b
Piperitone	۰/۶۴ ±۰/۰۰۵ a	۰/۵۹ ±۰/۰۲ b	۰/۶۳ ±۰/۰۱ a	۰/۴۱ ±۰/۰۲ a	۰/۴۲ ±۰/۰۲ a	۰/۳۳ ±۰/۰۳ b
neo-Menthyl acetate	۰/۲۱ ±۰/۰۱ ab	۰/۲۴ ±۰/۰۲ a	۰/۱۲ ±۰/۰۲ b	۰/۱۶ ±۰/۰۲ c	۰/۲۸ ±۰/۰۴ b	۰/۴۱ ±۰/۰۵ a
Menthyl acetate	۲/۴۲ ±۰/۰۶ a	۲/۸۱ ±۰/۰۶ a	۱/۷۶ ±۰/۱۷ b	۲/۸۴ ±۰/۲۸ c	۴/۳۲ ±۰/۱۹ b	۵/۹۷ ±۰/۲۲ a
iso-Menthyl acetate	۰/۱۴ ±۰/۰۰۱ a	۰/۱۳ ±۰/۰۰۲ a	۰/۰۹ ±۰/۰۰۱ b	۰/۱۳ ±۰/۰۱ a	۰/۰۹ ±۰/۰۰۶ b	۰/۰۵ ±۰/۰۰۶ c
Menthofuran	–	–	–	۱۳ ±۰/۶۴ b	۱۲ ±۱/۱۳ b	۱۵/۶ ±۰/۶۶ a
Carvacrol	–	–	–	۰/۱۲ ±۰/۰۱ b	۰/۲۸ ±۰/۰۳ a	۰/۲۷ ±۰/۰۲ a

ادامه جدول شماره ۵–

سال	۱۳۹۳			۱۳۹۴		
میزان اوره	۰	۷۵	۱۵۰	۰	۷۵	۱۵۰
α-Humulene	–	–	–	۰/۵۳ ±۰/۰۵ a	۰/۴۴ ±۰/۰۳ b	۰/۳۹ ±۰/۰۲ b
β-Bourbonene	۰/۴۶ ±۰/۰۱ a	۰/۴۲ ±۰/۰۳ b	۰/۴۲ ±۰/۰۲ b	۰/۱ ±۰/۰۱۵ c	۰/۲۱ ±۰/۰۰۶ b	۰/۲۴ ±۰/۰۲ a
β-Elemene	۰/۰۶ ±۰/۰۱ b	۰/۰۴ ±۰/۰۱ b	۰/۲۷ ±۰/۰۲ a	۰/۱۹ ±۰/۰۱۵ a	۰/۱۴ ±۰/۰۰۶ b	۰/۱۱ ±۰/۰۰۶ b
trans-Caryophyllene	۳/۴۷ ±۰/۲۴ a	۳/۵۳ ±۰/۱۳ a	۳/۵۹ ±۰/۱۶ a	۲/۲۱ ±۰/۱۲ a	۲/۰۳ ±۰/۱۷ ab	۱/۶۷ ±۰/۱۵ b
Z-*β*-Farnesene	۰/۹ ±۰/۰۵ a	۰/۸ ±۰/۰۴ b	۰/۷۹ ±۰/۰۴ c	–	–	–
Germacrene D	۴/۱۳ ±۰/۲۲ a	۳/۸۴ ±۰/۲۷ b	۳/۹۴ ±۰/۳۲ b	۲/۰۷ ±۰/۱ a	۱/۹۷ ±۰/۰۸ a	۱/۴۱ ±۰/۰۷ b
Bicyclo germacrene	۰/۶۸ ±۰/۰۳ a	۰/۵۵ ±۰/۰۴ b	۰/۶۸ ±۰/۰۶ a	۰/۳۳ ±۰/۰۳ a	۰/۳۳ ±۰/۰۲۵ a	۰/۲۴ ±۰/۰۲ b
Viridiflorol	۰/۸۶ ±۰/۰۱ ab	۰/۸۱ ±۰/۰۱ b	۰/۸۸ ±۰/۰۲ a	۰/۶۴ ±۰/۰۲۵ ab	۰/۷۲ ±۰/۰۷ a	۰/۵۹ ±۰/۰۳ b
MH %	۷۰/۸ ±۲/۲ a	۷۳/۵ ±۲/۵ a	۷۴/۸ ±۱/۳ a	۶۰/۷ ±۱/۲ a	۶۰/۹ ±۰/۲ a	۵۵/۸ ±۳/۳ b
MO %	۱۵/۲ ±۰/۱۸ a	۱۳/۷ ±۰/۳۵ b	۱۱/۸ ±۰/۶۱ c	۳۱/۱۱ ±۰/۲۲ b	۳۱/۱ ±۰/۵۸ b	۳۷/۱ ±۱/۸ a
SH %	۱۰/۸ ±۰/۵۵ a	۱۰ ±۰/۴۲ b	۱۰/۶ ±۰/۶۴ a	۶/۰۷ ±۰/۳۲ a	۵/۸۲ ±۰/۰۲ a	۴/۶۵ ±۰/۲۶ b

میانگین‌های هر سال که دارای حروف مشابه در هر ردیف بودند، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد نداشتند. MH: مونوترپن هیدروکربن، MO: مونوترپن اکسیژن‌دار، SH: سزکوئی‌ترپن هیدروکربن

جدول شماره ۶– ضرایب همبستگی پیرسون میان برخی از صفات مورد بررسی

	اسانس	Menthone	Menthol	1,8-Cineole	Limonene	PL	MF	Car	GD	MH	MO	SH
پروتئین	۰/۵۸	۰/۸۷*	۰/۸۹*	۰/۲۵	– ۰/۲۳	– ۰/۴۶	– ۰/۹۵**	۰/۶۴	۰/۴۸	۰/۹۸ **	۰/۹۹**	۰/۲۷
کاتالاز	– ۰/۸۴*	– ۰/۵۲	۰/۴۲	۰/۹۶**	۰/۹۸**	۰/۹*	– ۰/۲۹	۰/۷۵	۰/۸۶*	– ۰/۲۵	۰/۰۰۱	۰/۹۵**
پراکسیداز	– ۰/۶۱	– ۰/۲۲	۰/۶۹	۰/۹۹**	۰/۸۷*	۰/۷۲	– ۰/۵۹	۰/۹۳**	۰/۹۸**	۰/۰۸	– ۰/۳۳	۰/۹۹**
آسکوربات پراکسیداز	– ۰/۷۲	– ۰/۳۵	۰/۵۹	۰/۹۹**	۰/۹۳**	۰/۸۱	– ۰/۴۷	۰/۸۶*	۰/۹۴**	– ۰/۰۶	– ۰/۱۹	۰/۹۹**

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. PL: Pulegone، MF: Menthofuran، Car: trans- Caryopyllene، GD: Germacrene D، MH: مونوترپن هیدروکربن، MO: مونوترپن اکسیژنه، SH: سزکوئی‌ترپن هیدروکربن

بحث

نتایج نشان داد که غلظت‌های مناسب اوره موجب افزایش میزان پروتئین محلول شد که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد [۳۰–۲۷]. نیتروژن بیش از نیاز گیاهان به صورت توده‌های پروتئینی یا نیتروژن معدنی در واکوئل ذخیره می‌شود [۳۱]. بنابراین افزایش میزان پروتئین تحت تأثیر کودهای نیتروژن به نقش مستقیم آن در تشکیل پروتئین‌ها مربوط می‌شود. همچنین نیتروژن بر ساختار ریبوزوم‌ها و بیوسنتز برخی هورمون‌ها مانند جیبرلین‌ها، اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها که در بیوسنتز پروتئین دخالت دارند، تأثیر می‌گذارد [۳۲]. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر سطوح متفاوت اوره در هر دو سال آزمایش کاهش یافت که با نتایج مطالعات دیگر تطابق داشت [۳۵–۳۳]. کمبود نیتروژن موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جهت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شود [۳۶]. گزارش شده است که افزایش مصرف کود نیتروژن موجب کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در گیاه جو می‌شود [۳۷]. همچنین مشخص شده است که کمبود نیتروژن موجب افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند لوتئین، کاروتن در گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* Mill.) و میزان ترکیبات فنلی در گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill.) می‌شود [۳۹، ۳۸]. بنابراین، افزایش مصرف کود اوره به سبب فراهمی بیشتر

نیتروژن و جلوگیری از تنش کمبود نیتروژن، موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه نعناع فلفلی شده است.

حدود سی و سه ترکیب ترپنوئیدی در اسانس نعناع فلفلی شناسایی شد که مهم‌ترین آنها شامل Menthol، Menthone، iso-Menthone، 1,8-Cineole، Limonene، *β*-Pinene، iso-Menthol، Pulegone، *trans*-Caryopyllene، Germacrene D، Menthyl acetate و Menthofuran بود. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده توسط سایر مولفین مطابقت داشت [۴۲-۴۰]. مصرف کود اوره موجب افزایش درصد اسانس نعناع فلفلی شد که با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشت [۴۵-۴۳]. نجات‌زاده (۱۳۹۴) بیان داشت که مصرف کود نیتروژن به دلیل افزایش میزان ATP و NADPH موجب افزایش بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی می‌شود [۱۷]. علاوه بر این گزارش شده است که فراهمی نیتروژن با تأثیر بر توسعه سطح برگ و افزایش جذب انرژی خورشید و تأثیر بر تثبیت کربن از طریق افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی، بهبود فعالیت آنزیم‌های چرخه کربس، افزایش میزان قندهای ساده، ایجاد تعادل هورمونی و تنظیم روابط منبع و مخزن و غیره موجب افزایش غدد ترشحی اسانس، افزایش بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی و افزایش قدرت نگهداری اسانس می‌شود [۴۶، ۱۵، ۱۱]. مقدار Menthol تحت تأثیر نیتروژن در سال ۱۳۹۳ کاهش یافت که با نتایج دیگر مطالعات تطابق داشت [۴۸، ۴۷]. Zheljazkov و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که درصد Menthol با کاربرد ۸۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن کاهش یافت اما افزایش عملکرد Menthol به دلیل افزایش ماده خشک مشاهده شد [۴۸]. تغییرات Menthone تحت تأثیر اوره در سال‌های متفاوت یکسان نبود به طوری که در سال ۱۳۹۳ میزان Menthone با افزایش مصرف اوره افزایش یافت اما بر عکس در سال ۱۳۹۴ کاهش یافت. سایر بررسی‌ها نیز نشان دهنده واکنش متفاوت Menthone به کاربرد کودهای نیتروژن است. Poshtdar و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند که مصرف ۲۱۰ کیلوگرم در هکتار از انواع کودهای نیتروژن موجب افزایش میزان Menthone شد [۴۷] در حالی که نتایج مطالعه دیگر نشان داد که میزان Menthone تحت تأثیر کود نیتروژن تفاوت معنی‌داری با تیمار بدون مصرف کود نیتروژن نداشت [۴۸]. همچنین میزان Menthone و Menthol در گیاه نعناع کانادایی (*Mentha canadensis* L.) تحت تأثیر سطوح متفاوت نیتروژن تفاوت معنی‌داری نداشت اما میزان Menthofuran افزایش یافت [۴۹]. Menthone پیش ماده Menthol است که طی فعالیت آنزیم Menthone ردوکتاز و احیاء مولکول $NADP^+$ به Menthol تبدیل می‌شود [۵۰]. در این مطالعه تغییرات میزان Menthone تقریباً برعکس تغییرات Menthol بود و همبستگی منفی و معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$، $r = -۰/۹۸$) نیز میان Menthone و Menthol به دست آمد. میزان Menthone در سال ۱۳۹۴ کمتر از سال ۱۳۹۳ بود و برعکس میزان Menthol بیشتر بود که نشان دهنده تأثیر عوامل محیطی بر فرآیند تبدیل این ترکیبات به یکدیگر است. گزارش شده است که درجه حرارت بالای محیط بر آنزیم Menthone ردوکتاز تأثیر منفی داشته و موجب تجمع Menthone و ممانعت از تبدیل آن به Menthol می‌شود [۵۱].

نتایج این مطالعه نشان دهنده کاهش میزان Pulegone و افزایش میزان Menthofuran تحت تأثیر کود اوره بود. همچنین همبستگی منفی و معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$، $r = -۰/۹۷$) میان میزان Menthofuran و میزان Menthone به دست آمد. این نتایج با بررسی‌های Rios-Estepa و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد که ایشان بیان داشتند افزایش انتقال Pulegone از میتوکندری به شبکه آندپلاسمی موجب تولید بیشتر Menthofuran شده و افزایش غلظت Menthofuran اثر رقابتی بر فعالیت آنزیم Pulegone ردوکتاز داشته و موجب کاهش میزان Menthone می‌شود [۷]. همچنین میزان سزکوئی‌ترپن‌ها مانند *trans*-Caryopyllene، Germacrene D و *Z*-*β*-Farnesene تحت تأثیر مصرف اوره کاهش یافت که با نتایج Poshtdar و همکاران (۲۰۱۶) و Said-Al Ahl و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت [۵۲، ۴۷]. کاهش میزان *trans*-Caryopyllene و Germacrene D تحت تأثیر فراهمی نیتروژن، ممکن است به دلیل کاهش فعالیت آنزیم فارنازیل دی فسفات سینتاز یا افزایش فعالیت آنزیم ژرانیل دی‌فسفات سینتاز باشد که بدین ترتیب ترکیبات ایزوپنتیل

دی‌فسفات یا دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات بیشتر از اینکه وارد مسیر بیوسنتز سزکوئی ترپن‌ها شوند، به ترکیبات مونوترپن‌ها تبدیل می‌شوند که این موضوع با همبستگی منفی و معنی‌دار میان سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه و مونوترپن‌های اکسیژن‌دار ($r = -۰/۹۹$ ،$P \leq ۰/۰۱$) تأیید شد. همچنین همبستگی مثبت میان Pulegone، Limonene، 1,8-Cineole و Germacrene D با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ممکن است نشان دهنده تأثیر تنش نیتروژن و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر افزایش میزان این ترکیبات باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی این تحقیق نشان داد که Menthol، Menthone، β-Pinene، Limonene، 1,8-Cineole، iso-Menthol، Menthone، Pulegone، *trans*-Caryopyllene، Germacrene D، Menthyl acetate و Menthofuran مهم‌ترین ترکیبات ترپنوئیدی شناسایی شده در اسانس نعناع فلفلی بودند. کاربرد نیتروژن بر میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان و اجزای اسانس گیاه نعناع فلفلی تأثیر داشت. کمترین میزان پروتئین‌های محلول، درصد اسانس و بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و Pulegone در تیمار عدم مصرف نیتروژن مشاهده شد. کاربرد سطوح مناسب نیتروژن تأثیر مثبتی بر کمیت اسانس نعناع فلفلی داشت. تغییرات اجزای اسانس نعناع فلفلی در این تحقیق به شدت تحت تاثیر شرایط اقلیمی و محیطی بود و تعیین اثر نیتروژن بر کیفیت اسانس نیازمند تحقیقات بیشتری است. هرچند مصرف ۷۵ کیلوگرم اوره در هکتار در زراعت نعناع فلفلی به دلیل افزایش میزان اسانس و کاهش میزان Pulegone و عدم تاثیر معنی‌داری بر میزان Menthol، Menthone و Menthofuran توصیه می‌شود.

منابع

1. McKay DL and Blumberg JB. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res*. 2006; 20: 619 - 33.

2. Adel M, Abedian Amiri A, Zorriehzahra J, Nematolahi A and Esteban MA. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita* L.) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015; 45 (2): 841 - 7.

3. Kamatou GPP, Vermaak I, Viljoen AM and Lawrence BM. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochem*. 2013; 96: 15 – 25.

4. Mucciarelli M, Camusso W, Bertea CM, Bossi S and Maffei M. Effect of (+)-pulegon and other oil components of *Mentha piperita* on cucumber respiration. *Phytochem*. 2001; 57: 91 - 8.

5. Alankar S. A review on peppermint oil. *AJPCR*. 2009; 2 (2): 27 - 33.

6. Rita P and Animesh DK. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). *IRJP*. 2011; 2 (8): 1 - 10.

7. Rios-Estepa R, Turner GW, Lee JM, Croteau RB and Lange BM. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpenoid essential oil composition in peppermint. *PNAS*. 2008; 105 (8): 2818 - 23.

8. Hay R and Waterman PG. Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production. Wiley-Blackwell. Longman. England. 1995, pp: 3 - 5.

9. Hasegawa T, Sawano S, Goto S, Konghakote P, Polthanee A, Ishigooka Y, Kuwagata T, Toritani H and Furuya J. A model driven by crop water use and nitrogen supply for simulating changes in the regional yield of rain-fed lowland rice in Northeast Thailand. *Paddy Water Environ*. 2008; 6: 73 - 82.

10. Koochekzadeh A, Fathi G, Gharineh M, Siadat S, Jafari S and Alami-Saeid K. Impacts of

rate and split application of N fertilizer on sugarcane quality. *Int. J. Agric. Res.* 2009; 4: 116-23.

11. Ormeno E and Fernandez C. Effect of Soil Nutrient on Production and Diversity of Volatile Terpenoids from Plants. *Curr Bioact Compd*. 2012; 8 (1): 71 - 9.

12. Singh M, Ganesha Rao RS and Prakasa Rao EVS. Effect of depth and method of irrigation and nitrogen application on herb and oil yields of Java ci tronella (*cymbopogon winterianus* Jowitt.) under semi- arid tropical conditions. *J. Agron. Crop Sci*. 2008; 177 (1): 61 - 4.

13. Marotti M, Piccaglia R, Crout W, Craufutd K and Deans S. Effect of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour Fragr. J*. 2004; 9 (3): 125 - 9.

14. Kokkini S, Karousou D and Vokou D. Pattern of geographic variation of Organum trichumes and essential oil content in sweet basil. *JEOR*. 2005; 28: 209 - 17.

15. Brown B, Hart JM, Wescott MP and Christensen NM. The critical role of nutrient management in mint production (Pacific North West). *Better Crops*. 2003; 87 (4): 9-11.

16. Gholami M and Azizi A. The effect of nitrogen fertilizer on total essential oil and the amounts of α-Thujone and Chamazulene in wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Agri. Biotech*. 2006; 6 (3): 83 - 93.

17. Nejatzadeh F. Effect of Biological and Chemical Nitrogen Fertilizers on Growth, Yield and Essential Oil Composition of Dill (*Anethum graveolens* L.). *NCMBJ*. 2015; 5 (19): 77 - 84

18. Mehrabani M, Mahdavi meimand Z, Khandani zadeh B and Hasan abadi, N. Effect of different levels of nitrogen fertilizer and harvest time on the quantity and quality of essential oil and total phenol content in the medicinal plant *Hortensis Satureja* L. in Kerman province. *EJMP*. 2014; 4 (8): 1 - 11.

19. Darzi MT, Ghalavand A, Rejali F and Sefidkon F. Effects of Biofertilizers Application on Yield and Yield Components in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2006; 22 (4), 277 - 92.

20. Davazdah Emami S and Majnoon Hosseini N. Cultivation and production of medicinal plants and spices. Tehran, Iran: Tehran University Press. 2008. Persian.

21. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu. Rev. Biochem*. 1976; 72: 248 - 54.

22. Malik CP and Singh MB. In: Plant Enzymology and Histoenzymology. Kalyani Publishers, New Delhi. 1980, p: 53.

23. Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JH and Scott IM. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling. *Plant Physiol*. 1997; 100: 241-54.

24. Cakmak I and Horst W. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). *Plant Physiol*. 1991; 83: 463-8.

25. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry (4th edition). Allured Publishing Corporation Carol Stream. 2007. 804 p.

26. McLafferty FW and Stauffer DB. The Wiley / Nbs registry of mass spectral data. New York: Wiley. 1989, 1064 p. ISBN: 978-0-471-62886-6

27. Jahani R, Hassani A and Samadi. Effect of foliar application of urea, aspartic acid and glutamic acid on growth, physiological and biochemical characteristics of Anise hyssop (*Agastache foeniculum*). *Winter and Spring*. 2018; 5 (2): 95 - 107

28. Bi JL, Toscano NC and Madore MA. Effect of Urea Fertilizer Application on Soluble Protein and Free Amino Acid Content of Cotton Petioles in Relation to Silverleaf Whitefly (*Bemisia argentifolii*) Populations. *J. Chem. Ecol*. 2003; 29: 747 - 61.

29. Khalid KA. Effect of NP and foliar spray on growth and chemical compositions of some medicinal Apiaceae plants grow in arid regions in Egypt. *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 2012; 12 (3): 617-32.

30. Vijay N, Kumar A and Bhoite A. Influence of Nitrogen, Phosphorus and Potassium Fertilizer on Biochemical Contents of Asparagus racemosus (Willd.) Root Tubers. *Int. Res. J. Environ. Sci*. 2009; 3: 285-91.

31. Beatty PH, Klein MS, Fischer JJ, Lewis IA, Muench DG and Good AG. Understanding Plant Nitrogen Metabolism through Metabolomics and Computational Approaches. *Plants* 2016; 5 (39): 1- 12.

32. Singh M, Masroor M Khan A and Naeem M. Effect of nitrogen on growth, nutrient assimilation essential oil content, yield and quality attributes in *Zingiber officinale* Rosc. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 2016; 15: 171–8.

33. Yanez-Mansilla E, Cartes P, Reyes-Diaz M, Ribera-Fonseca A, Rengel Z, Lobos W and Alberdi M. Leaf nitrogen thresholds ensuring high antioxidant features of Vaccinium corymbosum cultivars. *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 2015; 15 (3): 574-86.

34. Sheikh S and Che Ishak F. Effect of nitrogen fertilization on antioxidant activity of Mas cotek (*Ficus deltoidea* Jack). *J. Med. Plants Stud*. 2016; 4 (4): 208-14.

35. Kiran TV, Vijayalakshmi P, Rao YV, Swamy KN, Kondamudi R, Srikanth B, Subhakar Rao I, Prema Latha D, Suchandranath Babu M, Neeraja CN, Surekha K, Jaldhani V, Rao PR, Subrahmanyam D, Subbarao LV and Voleti SR. Effects of Nitrogen Limitation on Antioxidant Enzymes, Chlorophyll Content and Grain Yield of Rice Genotypes. *Asian Research Journal of Agriculture* 2016; 1 (2): 1 - 10.

36. Xue Z, Qiang L, Hongjun Y and Weijie J. Response of antioxidant enzyme system to nitrogen deficiency in cucumber seedling. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 2016; (32): 142 - 7.

37. Kovacik J, Klejdus B, Babula P and Jarosova M. Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient barley plants. *J. Plant Physiol*. 2014; 171 (3-4): 260 – 8.

38. Musa A and Ogbadoyi EO. Effect of Nitrogen fertilizer on the levels of some nutrients, anti-nutrients and toxic substances in *Hibiscus sabdariffa*. *Asian J. Crop Science* 2012; 4 (3): 103 - 12.

39. Biesiada A, Sokol-Letowska A and Kucharska A. The effect of nitrogen fertilization on yielding and antioxidant activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Acta Science Pol.hortorum cultus*. 2008; 7 (2): 33 - 40.

40. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M and Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. *J. Sci. Food Agric*. 2010; 90: 1827-36.

41. Behnam S. Farzaneh M, Ahmadzadeh M and Tehrani AS. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phyto pathogens. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*. 2006; 71 (3): 1321 - 6.

42. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M. AlipoorAstaneh SH and Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochem*. 2006; 67: 1249 - 55.

43. Zhao J. The effect of nitrogen fertilization on spearmint. *J. Essential Oil Res*. 2006; 18: 452 - 5.

44. Ashraf M, Ali Q, and Iqbal Z. Effect of nitrogen application rate on the content and composition of oil, essential oil and minerals in black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. *J. Sci. Food Agric*. 2006; 86: 871-6.

45. Said-Al Ahl HAH and Hussien MS. Effect of nitrogen and phosphorus application on herb and essential oil composition of *Satureja montana* L. 'carvacrol' chemotype. *J. Chem. Pharm. Res*. 2016; 8 (6): 119 - 28.

46. Leghari SJ, Wahocho NA, Laghari GM, Laghari AH, Bhabhan GM and Talpur KH. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Adv. Environ. Biol*. 2016; 10 (9): 209 - 18.

47. Poshtdar A, Abdali Mashhadi A, Moradi F, Siadat SA and Bakhshandeh A. Effects of different sources of nitrogen fertilizer and applied rates on essential oil content and composition of peppermints. *JHD*. 2016; 7 (1): 51 - 7.

48. Zheljazkov VD, Cerven V, Cantrel CL, Ebelhar WM and Horgan T. Effect of Nitrogen, Location, and Harvesting Stage on Peppermint Productivity, Oil Content, and Oil Composition. *HortScience* 2009; 44 (5): 1267 – 70.

49. Ardalani H, Hadipanah A, Pazoki A and Zolfaghar M. Phytochemical, Morphological and Yield Responses of Mentha canadensis to Organic and Nitrogen Fertilizers. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2017; 20 (3): 752 - 7.

50. Croteau RB, Davis EM, Ringer KL and Wildung MR. (−)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 2005; 92 (12): 562 – 77.

51. Telci I, Kacar O, Bayram E, Arabacı O, Demirtas I¸ özcan I, Sönmez C and Göksu E. The effect of ecological conditions on yield and quality traits of selected peppermint (*Mentha piperita* L.) clones. *Ind. Crops Prod*. 2011; 34: 1193 - 7.

52. Said-Al Ahl HAH, Hussein MS and Abd El-Kader AA. Effect of nitrogen fertilizer and/or some foliar application on growth, herb yield, essential oil and chemical composition of dragonhead. *J. Med. Food*. 2010; 2 (1): 12 - 28.

Changes in Essential Oil Content and Composition of Peppermint (*Mentha piperita* L.) in Responses to Nitrogen Application

Seif Sahandi M (Ph.D.)[1], Naghdi Badi H (Ph.D.)[1], Mehrafarin A (Ph.D.)[1]*, Khalighi-Sigaroodi F (Ph.D.)[1], Sharifi M (Ph.D.)[2]

1- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
2- Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375/1369, Karaj, Iran
Tel: +98-26-34764010, Fax: +98-26-34764021
Email: A.Mehrafarin@gmail.com

Abstract

Background: Nitrogen is the most important nutrient requirement for plants. Nitrogen supplying affected the leaf area, carbon fixation, glandular trichomes formation, ATP and NADPH content which resulted to the terpenoids biosynthesis enhancement and essential oils accumulation.

Objective: This study was aimed to evaluate changes of essential oil content and components by use different levels of Urea fertilizer and its relation with the antioxidant status of peppermint.

Method: The two field experiments were conducted on randomized complete block design at 2013 and 2014. The treatments consisted of three levels of nitrogen fertilizer (urea) (0, 75, and 150 kg ha^{-1}). The evaluated traits were included antioxidant enzymes, essential oil percentage and essential oil components.

Results: The urea fertilizer had a significant effect ($P \leq 0.01$) on the soluble protein amount and antioxidant enzymes activity. Urea consumption in the both years increased the peppermint essential oil content. The interaction of nitrogen fertilizer and year had a significant effect on most of the essential oil components excepted to β-pinene, myrcene, Limonene, 1,8- Cineole, Z-β-Ocimene, and α- Terpineol.

Conclusion: Using nitrogen fertilizer increased the peppermint essential oil content. Also, nitrogen deficiency reduced the soluble proteins and essential oil content and in contrast, it increased antioxidant enzymes activity and pulegone content. Therefore, consumption of 75 kg urea per hectare is recommended due to increasing essential oil content, decreasing pulegone rate, and no significant effect on menthol, menthone, and menthofuran contents.

Keywords: Antioxidant enzyme, Essential oil, Menthol, Menthone, Nitrogen, Peppemint