

## The effect of salicylic acid on some morpho-physiological parameters and gene expression in peppermint (*Mentha piperita* L.) under UV-B radiation

S. Elahi Karamdar<sup>1</sup>, S. Hosseini<sup>2</sup>, R. Darvishzadeh<sup>3\*</sup> and R. Jamei<sup>4</sup>

1. PhD graduated, Dept. Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

2. Assist. Prof., Dept. Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

3\* Corresponding author, Prof., Dept. Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

4. Prof., Dept. Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 05.05.2023

Accepted: 11.09.2023

### Extended Abstract

#### Background and objectives:

The thinning of the ozone layer due to nitrogen oxides and halogenated hydrocarbons has caused an increase in ultraviolet radiation on the planet. This radiation can affect many physiological and anatomical characteristics of plants. This study aimed to investigate the effect of UV-B radiation on the morphological, physiological, and molecular parameters of the peppermint plant (*Mentha piperita* L.) and the effect of salicylic acid (SA) on reducing the harmful effects of this radiation.

#### Methodology:

The eight treatments, including 0.0SA, 0.5mM SA, 1mM SA, 2mM SA, UV-B, SA0.5+UV-B, SA1+UV-B, and SA2+UV-B were evaluated using a completely randomized design with three replications. Treatments were applied four weeks after planting. Different concentrations of SA were applied as a foliar spray three times at an interval of 10 days. UV-B rays were applied for eight days (40 min each day). Different morpho-physiological parameters were measured. For the gene expression assay, leaf samplings were done one day after the UV treatment stop (named first stage; 18 days after SA spraying) and after recovery time (named second stage; 30 days after SA spraying).

#### Results:

Compared to the control plants, UV-B radiation caused a significant decrease in the roots' fresh and dry weight. The highest root fresh and dry weights were observed in the SA1mM and the lowest in the UV-B treatments. Under the influence of UV-B rays, the number of leaves significantly decreased in peppermint compared to the control. The highest number of leaves was observed in the SA0.5mM, and the lowest in the UV-B treatment. The amount of anthocyanin under UV-B rays increased significantly compared to control plants. The highest amount of anthocyanin was observed in SA1+UV-B and the lowest in control plants. The amount of soluble protein in shoots and roots significantly decreased under UV-B rays compared to the amount in the control plants. The highest amount of soluble protein was observed in the shoots in the SA2mM and the roots in the SA2+UV-B, and the lowest amount was observed in the shoots and roots under UV-B treatment. The amount of proline increased significantly in the shoots and roots under UV-B radiation compared to control plants. The highest amount of proline was observed in shoots and roots in the SA0.5+UV-B and the lowest amount was observed in the control plants. LS gene expression increased in recovery time compared to the first stage.

**Conclusion:**

The results showed that the application of UV-B rays to the peppermint plant caused a decrease in the fresh and dry weight of the root, the number of leaves, soluble protein, and LS gene expression and a significant increase in the amount of anthocyanin and proline. Treatment using salicylic acid reduced the damage caused by applying the UV-B rays to the plants.

**Keywords:** LS gene, Peppermint plant, Salicylic acid, UV-B.

## تأثیر سالیسیلیک اسید بر برخی پارامترهای مورفو-فیزیولوژیکی و بیان ژن در نعنای فلفلی (*Mentha piperita L.*) تحت اشعه UV-B

ثریا الهی کرمدار<sup>۱</sup>، سیاوش حسینی سرقین<sup>۲</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۳\*</sup> و رشید جامعی<sup>۴</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه. پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۰

### چکیده

سابقه و هدف: نازک شدن لایه ازن در نتیجه اکسیدهای نیتروژن و هیدروکربن‌های هالوژنه، سبب افزایش تابش پرتو فرابنفش بر کره زمین شده است. این پرتو می‌تواند بسیاری از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و آناتومیکی گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر اشعه UV-B بر پارامترهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیان ژن لیمون سینتاز (LS) در گیاه نعنای فلفلی (*Mentha piperita L.*) و تأثیر اسید سالیسیلیک (SA) در کاهش اثرهای مضر این پرتو بر گیاه است. ژن LS در ابتدای مسیر تولید منتول قرار داشته و نقش مهمی در تولید پیش‌ماده برای تولید منتول دارد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در شرایط گلخانه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با هشت گروه تیماری در سه تکرار روی گیاه نعنای فلفلی انجام شد. تیمارها شامل: (۱) گروه کنترل که هیچ ماده‌ای دریافت نکردند، (۲) SA0.5، (۳) SA1، (۴) SA2، (۵) UV-B، (۶) SA0.5+UV-B، (۷) SA1+UV-B و (۸) SA2+UV-B بودند. گیاهان کشت شده بعد از یک ماه به مرحله ۶ برگگی رسیدند و در این مرحله، تیمارها اعمال شد. تیمار سالیسیلیک اسید (SA) در غلظت‌های مختلف در طی سه مرحله و به فاصله ۱۰ روز به صورت محلول‌پاشی بر روی برگ‌ها اعمال گردید و یک روز بعد از محلول‌پاشی دوم، تیمار UV-B به مدت ۸ روز متوالی و هر روز ۴۰ دقیقه اعمال شد. سپس پارامترهای مختلف مورفو-فیزیولوژیکی بررسی شد. برای ارزیابی بیان ژن، نمونه‌برداری از برگ‌ها، یک روز بعد از اتمام تیمار UV (مرحله اول برداشت، ۱۸ روز بعد از اسپری SA) و بعد از زمان بازیابی (ریکاوری) (مرحله دوم برداشت، ۳۰ روز بعد از اسپری SA) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اشعه UV-B باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه در مقایسه با گروه کنترل شد. بیشترین وزن تر و خشک ریشه در گروه تیماری SA1mM و کمترین آن در تیمار UV-B مشاهده شد. تعداد برگ‌ها تحت تیمار UV-B نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار یافت. بیشترین تعداد برگ در تیمار SA0.5mM و کمترین آن در UV-B مشاهده شد. UV-B مقدار پروتئین محلول ریشه و اندام هوایی را به شکل معنی‌دار کاهش داد. حداکثر مقدار پروتئین محلول اندام هوایی در تیمار SA2mM در ریشه در تیمار SA2+UV-B و کمترین مقدار پروتئین محلول ریشه و اندام هوایی در تیمار UV-B مشاهده شد. تحت تیمار UV-B در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار در میزان آنتوسیانین مشاهده شد. بیشترین میزان آنتوسیانین در گروه تیماری SA1+UV-B و کمترین آن در گروه کنترل مشاهده گردید. افزایش معنی‌دار در میزان پرولین ریشه و اندام هوایی از دیگر اثرهای تابش UV-B بود. بیشترین مقدار پرولین در SA0.5+UV-B و کمترین آن در گروه کنترل مشاهده شد. میزان بیان ژن LS در مرحله دوم (مرحله بازیابی) نسبت به مرحله اول افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که اشعه UV-B باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه، تعداد برگ‌ها و پروتئین محلول و افزایش معنی‌دار میزان آنتوسیانین و پرولین نسبت به گروه کنترل شد. میزان بیان ژن LS در مرحله دوم (مرحله بازیابی) نسبت به مرحله اول افزایش یافت. نتایج نشان داد که تیمار با اسید سالیسیلیک موجب کاهش آسیب ناشی از اعمال اشعه UV-B در گیاه نعنای فلفلی شد.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، اشعه UV-B، ژن لیمون سینتاز، گیاه نعنای فلفلی

## مقدمه

گیاهان دارویی یکی از ذخایر مهم تولید دارو هستند که روز به روز بر اهمیت آنها افزوده می‌شود و انسان‌ها از زمان‌های قدیم از منابع گیاهی استفاده کرده‌اند. داروهای گیاهی دارای خواص متعدد و عوارض کمتر بوده و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Shamsi-Fard *et al.*, 2014). از جمله گیاهان دارویی مهم، گیاهان تیره نعناعیان (Lamiaceae) هستند. از مهمترین گونه‌های این خانواده، گونه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) است. منتول، منتون، کاروون، لیمونن و ۱ و ۸- سینئول ترکیبات عمده این گیاه هستند که دارای خواص مختلف دارویی از جمله ضد اسپاسم، ضد نفخ، رفع سوء هاضمه، ضدالتهابی و ضد میکروبی هستند (Vesna and Bilijana, 2015; Figuera *et al.*, 2014).

اشعه UV-B بخش کوچکی از تابش خورشیدی است که به زمین می‌رسد و تأثیر زیادی بر فیزیولوژی گیاهان دارد و سبب القای پاسخ‌های ریخت‌شناسی، مولکولی، بیوشیمیایی و رشدی در گیاهان می‌شود (Ballare *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2013; Paul and Gwynn-Jones, 2003). اشعه ماوراءبنفش که حدود ۸ تا ۹ درصد اشعه خورشیدی را تشکیل می‌دهد، از لحاظ طول‌موج به سه ناحیه تقسیم می‌شود: UV-C (۲۲۰ تا ۲۸۰ نانومتر)، UV-B (۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر) و UV-A (۳۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر) (Wu *et al.*, 2019). سیستم‌های زیستی به طول‌موج‌های بین ۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر حساس هستند. تغییرات ایجاد شده در ریخت‌شناسی گیاهان توسط اشعه UV شامل تغییرات در شکل برگ، ازدیاد شاخه‌های جانبی، کاهش وزن تر و خشک، کاهش میان‌گره‌ها، کاهش تعداد برگ و کاهش ارتفاع گیاه (طول ریشه و طول اندام هوایی) هستند (Hori *et al.*, 2007). افزایش میزان پرتو UV-B می‌تواند سرعت رشد ساقه را کاهش داده و این موضوع سبب ایجاد میان‌گره‌های کوتاه‌تر می‌شود. کاهش سطح برگ تحت تابش پرتو UV-B سبب کاهش وزن تر و خشک برگ در گیاهان می‌شود. اشعه UV بر روی DNA تأثیر دارد. شکستن

DNA و حذف جفت بازها می‌تواند به‌وسیله اشعه UV القا شود. آسیب در سطح مولکولی ناشی از UV عبارت است از دایمریزه شدن<sup>۱</sup> گروه‌های بازی در DNA، که سبب اختلال در نسخه‌برداری می‌شود. اشعه VU علاوه بر نسخه‌برداری، از مضاعف‌سازی DNA هم جلوگیری می‌کند، بنابراین می‌تواند سبب ایجاد جهش شود (Kafi and Damghani, 1997).

اسید سالیسیلیک نقش محوری در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف مانند جوانه‌زنی، رشد و نمو گیاه، جذب یون‌ها، فتوسنتز، پاسخ‌های دفاعی و رسیدگی ایفا می‌کند (Miura and Tada, 2014). اسید سالیسیلیک در تحمل گیاهان به تنش‌های زنده مانند حمله حشرات و قارچ‌ها و تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، سرما، گرما، فلزات سنگین (Saidi *et al.*, 2013)، شوری (Gunes *et al.*, 2007) و UV (Pourakbar and Abedzadeh, 2014) نقش دارد. در تنش‌های غیرزیستی، اسید سالیسیلیک از طریق تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان، باعث کاهش اثرهای نامطلوب تنش و عوارض جانبی آن شده و منجر به مقاومت گیاه در برابر تنش می‌گردد (Hashempour *et al.*, 2014). در واقع اسید سالیسیلیک شرایط تنشی را در گیاه القا کرده و به‌عنوان سیگنال درونی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده عمل کرده و سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود و بدین ترتیب بخشی از راهکار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب می‌گردد (Samadi *et al.*, 2015).

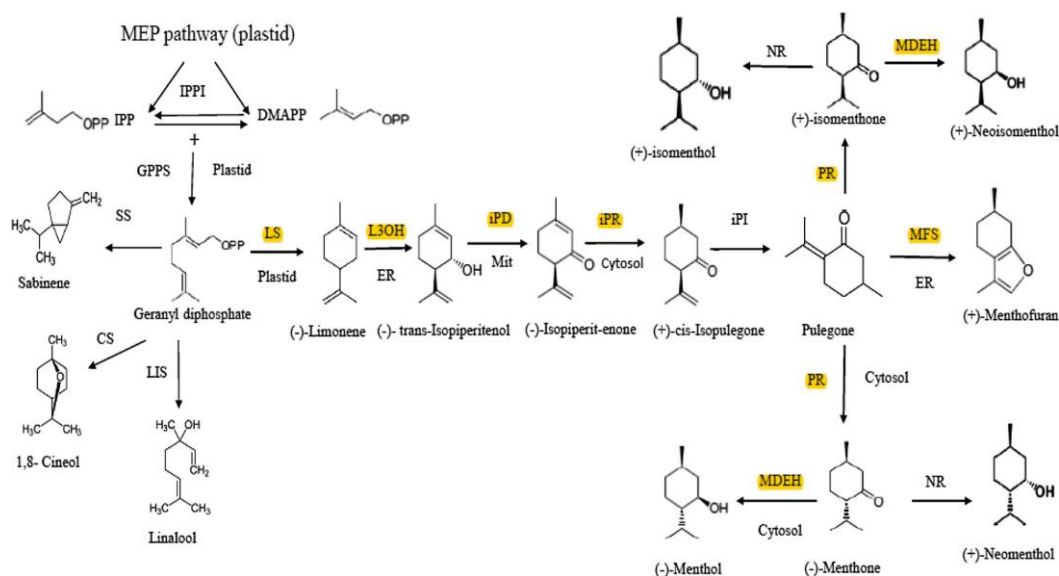
منتول از مهمترین مواد مؤثره گیاه نعناع فلفلی است. مراحل ساخت منتول در شکل ۱ ارائه شده است. به طور خلاصه، ابتدا ایزوپنتیل دی فسفات و دی متیل الیل دی فسفات به‌وسیله آنزیم ژرانیل دی فسفات سینتاز در پلاستیدها به ژرانیل دی فسفات تبدیل شده و این ماده توسط آنزیم لیمونن سینتاز حلقوی شده و به لیمونن تبدیل می‌شود. لیمونن هم طی یک مجموعه واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و ایزومریزاسیون به منتون و نهایتاً توسط

<sup>1</sup>Dimerization

وابسته به انسان بر اهمیت تحقیق روی اثرهای متنوع UV-B می‌افزاید. برخی مولکول‌ها و تنظیم‌کننده‌های زیستی مانند هورمون‌های گیاهی می‌توانند تا حدودی سبب تخفیف مضرات اشعه UV شوند. در این تحقیق اثرهای اشعه UV-B و سالیسیلیک اسید بر روی پارامترهای مختلف مورفوفیزیولوژیکی و بیان ژن LS در گیاه نعناع فلفلی بررسی شده است. علت انتخاب ژن LS این بود که طبق شکل ۱ این ژن در ابتدای مسیر تولید منتول قرار داشته و نقش مهمی در تولید پیش‌ماده برای تولید منتول دارد؛ از این رو، تصور می‌شود بررسی میزان بیان این ژن، در بررسی تأثیر UV-B و سالیسیلیک اسید بر روی گیاه مهم باشد.

آنزیم منتون ردوکتاز به منتول تبدیل می‌شود (Croteau and Gershenzon, 1994).

از میان ژن‌های دخیل در بیوسنتز منتول، ژن LS (لیمونن سینتاز) است. استفاده از تیمارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی می‌تواند بیان یک ژن یا مجموعه‌ای از ژن‌ها را در یک سیستم گیاهی تغییر دهد. از این رو، بررسی بیان ژن و مقایسه نتایج حاصل از بیان ژن در شرایط مختلف، می‌تواند اطلاعاتی را در ارتباط با میزان تولید ترکیبات ثانویه در گیاهان مورد بررسی ارائه نماید (Mohammadi and Khorsandnia, 2021). با صنعتی شدن جهان و افزایش آلاینده‌های جوی، تنش UV-B اجتناب‌ناپذیر است. خسارت وارده بر گیاهان و کاهش بازده محصولات گیاهی



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی منتول در گیاه نعناع فلفلی

Figure 1- Menthol biosynthesis pathway in peppermint plant

قطر ۲۰ cm برای کشت انتخاب شده و با مخلوط خاک، ماسه و پیت‌ماس با نسبت‌های ۲:۱:۱ پُر شدند. در هر گلدان تعداد چهار ریزوم کاشته شد. دمای اتاق کشت حدود  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تعداد ساعات روشنایی و تاریکی اتاق کشت به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت با شدت نور ۱۵۰ میکرومول بر

## مواد و روش‌ها

کشت گیاه و اعمال تیمار و برداشت نمونه

ریزوم‌های گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha L. piperita*) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی (ارومیه) تهیه شد. گلدان‌های پلاستیکی به

استفاده شد. برای این منظور، ابتدا ۰/۲ گرم بافت تازه از ریشه و اندام هوایی وزن و به لوله‌های آزمایش منتقل گردید. سپس به آنها چهار میلی‌لیتر بافرتریس - کلریدریک اسید با pH=۸ (تریس ۰/۲ نرمال، ۱۷/۲ گرم ساکارز و ۰/۱ گرم آسکوربیک اسید) اضافه شد و در نهایت حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بعد به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. از فاز رویی که حاوی پروتئین‌های محلول بود، یک میلی‌لیتر برداشته شده و چهار میلی‌لیتر از محلول C که به شرح زیر تهیه گردید به آن اضافه شد.

- برای تهیه محلول A، دو گرم  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ، ۰/۴ گرم NaOH و ۰/۰۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد.
- برای تهیه محلول B، ۰/۵ گرم  $\text{CuSO}_4$ ،  $\text{H}_2\text{O}$  در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد.
- برای تهیه محلول C پنج میلی‌لیتر از محلول A و یک میلی‌لیتر از محلول B بلافاصله قبل از مصرف باهم مخلوط شدند.

پس از ۱۰ دقیقه ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده فولین سیوکالتو (که قبلاً به نسبت ۹:۱ با آب مقطر رقیق شده بود) به نمونه‌ها اضافه گردید، سپس به مدت ۰/۵ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در پایان کمپلکس آبی‌رنگی ایجاد گردید که به نسبت یک‌به‌یک رقیق شد. سپس جذب آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد (شاهد آب مقطر بود). با استفاده از منحنی استاندارد مربوط به غلظت‌های معلوم آلومین، میزان پروتئین تعیین گردید. میزان پروتئین در قسمت‌های مختلف گیاهان شاهد و تیمار شده طبق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد.

#### استخراج RNA و ساخت cDNA

نمونه‌های گیاهی در هاون استریل شده عاری از RNAase حاوی نیتروژن مایع کوبیده شد تا به خوبی پودر شوند. این عمل

مترمربع در ثانیه تنظیم شد. گلدان‌ها در دو هفته اول رشد به صورت یک روز در میان آبیاری شدند و بعد آبیاری روزانه برای بقیه روزها، به طوری که خاک گلدان در حد ظرفیت زراعی باشد، انجام گردید. پس از یک هفته جوانه‌های نعناع فلفلی ظاهر شدند و پس از رسیدن گیاهان به مرحله شش‌برگی، تیمارها (۱: گروه شاهد که هیچ ماده‌ای دریافت نکردند، ۲: SA0.5، ۳: SA1، ۴: SA2، ۵: UV-B، ۶: SA0.5+UV-B، ۷: SA1+UV-B، ۸: SA2+UV-B) اعمال شدند. تیمار سالیسیلیک اسید (SA) در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار (Marely *et al.*, 2014) در طی سه مرحله و به فاصله ۱۰ روز به صورت محلول‌پاشی بر روی برگ‌ها اعمال شد و یک روز بعد از محلول‌پاشی دوم، تیمار UV-B به مدت هشت روز متوالی و هر روز ۴۰ دقیقه (Sarikhani, 2014) اعمال شد. اشعه مورد نیاز برای تیمار UV-B توسط دو لامپ ۱۵ واتی (15WLF- 215M,  $\lambda=312\text{nm}$ , 40 min) تأمین گردید (Hosseini Sarghein *et al.*, 2008). مرحله اول نمونه‌برداری برای انجام آزمایش‌های مولکولی بعد از اتمام اعمال UV-B و مرحله دوم نمونه‌برداری برای انجام آزمایش‌های مولکولی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بعد از پایان سومین محلول‌پاشی SA انجام شد. برای انجام کارهای مولکولی و فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

#### اندازه‌گیری صفات

پس از برداشت، تمام برگ‌های گلدان‌ها شمارش شد. سپس ریشه گیاهان مربوط به یک گلدان، جداسازی و با آب شستشو داده شد و پس از خشک کردن نمونه‌ها وزن تر آنها با استفاده از ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آن ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از مدت زمان ذکر شده وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری آنتوسیانین برگ از روش Wang و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. برای تعیین میزان پروتئین محلول از روش Lowty و همکاران (۱۹۵۱)

میکرولیتر Master mix (۶/۲۵) میکرولیتر سایبرگرین، چهار میکرولیتر آب و ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها) و ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA انجام شد (جدول ۱). شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ده دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دمای واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود.

برای از بین بردن دیواره سلولی و غشای پلاسمایی نمونه‌ها انجام می‌شود تا استخراج RNA کل آنها قابل انجام باشد. استخراج RNA از نمونه‌های برگ با کیت TRIZOL انجام شد. ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت سینا کلون و با کیت SinaClon First Strand cDNA Synthesis انجام گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time RT-PCR)

PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۱/۲۵

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در Real time PCR  
Table 1: Characteristics of primers used in Real time PCR.

Gene	Sequence (5' -3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
LS	F: TGGCTGATAGCAGAGGTGTG R: TTGCGGTCATTTGTTGATGT	178	60	Rahimi et al. (2017)
Actin	F:CTACGAAGGCTACGCACTCC R:GCAATGTAGGCCAGCTTCTC	165	60	Rahimi et al., 2017

LS: لیمون سینتاز، Actin: اکتین

ریشه تحت تیمارهای SA0.5+ UV-B و SA1+ UV-B در مقایسه با تیمار UV-B به طور معنی‌دار افزایش یافت. مقدار افزایش تحت تیمار SA2+UV-B معنی‌دار نبود. همچنین وزن تر ریشه تحت تیمارهای SA0.5 mM و SA1 افزایش معنی‌دار یافت. اما این افزایش تحت تیمار SA2mM در مقایسه با مقدار آن در گیاهان شاهد معنی‌دار نبود. بیشترین وزن تر ریشه در تیمار SA1mM و کمترین آن در تیمار UV-B مشاهده شد. وزن خشک ریشه در اثر تابش پرتو UV-B در مقایسه با مقدار آن در نمونه‌های شاهد به طور معنی‌دار کاهش یافت. در مقابل، در تیمارهای SA0.5+ UV-B و SA1+ UV-B مقدار آن به طور معنی‌دار نسبت به مقدار آن در گیاهانی که UV-B دریافت کرده بودند، افزایش نشان داد. در تیمار SA2+ UV-B افزایش وزن خشک ریشه معنی‌دار نبود. همچنین وزن خشک ریشه در تیمارهای

تجزیه‌های آماری

تجزیه واریانس در قالب مدل آماری طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و مقایسات میانگین با آزمون SNK، در سطح احتمال آماری  $P \leq 0.01$  انجام شد. برای رسم نمودارها و منحنی‌های استاندارد از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده شد.

## نتایج

### صفات مورفولوژیک

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیکی (جدول ۲) نشان داد که اثر تابش پرتو UV-B بر صفات وزن تر و خشک ریشه و تعداد برگ در سطح یک درصد ( $P \leq 0.01$ ) معنی‌دار بود. تابش پرتو UV-B در مقایسه با گیاهان شاهد موجب کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه شد. در مقابل، وزن تر

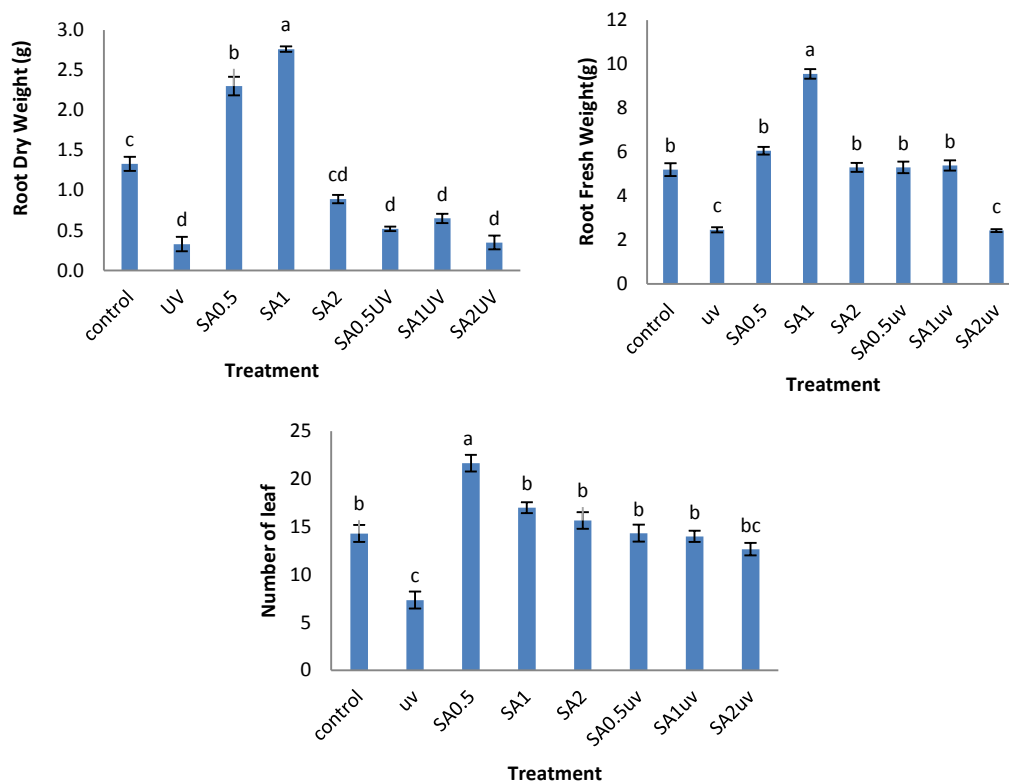
وزن خشک ریشه در تیمار SA1mM و کمترین آن در تیمار UV-B مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۲).  
 SA1 و SA0.5 mM در مقایسه با مقدار آن در گیاهان گروه شاهد به طور معنی‌دار افزایش یافت، اما مقدار آن تحت تیمار SA2 به طور معنی‌دار کاهش یافت. بیشترین

جدول ۲- تجزیه واریانس پارامترهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاه *Mentha piperita* تحت تیمار UV-B و SA

Table 2: Analysis of variance for physiological and anatomical parameters in peppermint under UVB and SA.

Sources	df	Mean Squares (MS)							
		Shoot prolin	Root prolin	Shoot protein	Root protein	Anthocyanin content	Number of leaf	Root Fresh weight	Root Dry weight
Treatment	7	26.46**	548.08**	2.69**	2.44**	2969.83**	48.80**	14.99**	2.55**
Error	16	2.31	21.16	0.0840	0.1392	31.57	1.87	0.12	0.01
CV (%)	-	18.73	15.32	11.66	12.31	8.38	9.36	6.90	11.25

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد  $P \leq 0.01$



شکل ۲- تأثیر UV-B و اسید سالیسیلیک بر وزن تر و وزن خشک ریشه و تعداد برگ در نعناع فلفلی

بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد بوده و میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشد بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 2: Effect of UV-B and SA on root dry and, fresh weight and number of leaf in peppermint. Vertical bars represent standard errors. Means of column with the same letters are not significantly different based on SNK test; ( $P \leq 0.01$ ).



نشان داد، درحالی‌که در تیمارهای SA1mM و SA2 در میزان پروتئین محلول ریشه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین پروتئین محلول ریشه نسبت به گروه شاهد در تیمار SA0.5mM نیز افزایش معنی‌داری نشان داد. به‌نحوی‌که بیشترین مقدار پروتئین محلول در اندام هوایی در تیمار SA2mM و در ریشه در تیمار SA2+ UV-B و کمترین مقدار آن در اندام هوایی و در ریشه در تیمار UV-B مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۳).

میزان پرولین در اندام هوایی و ریشه گیاهان نعناع فلفلی تحت تأثیر پرتو UV-B به طور معنی‌دار در قیاس با مقدار آن در تیمار کنترل (شاهد) افزایش یافت. میزان پرولین در تیمارهای SA0.5+ UV-B، SA1+ UV-B و SA2+ UV-B هم در اندام هوایی و هم در ریشه در مقایسه با مقدار آن در تیمار UV-B تغییر معنی‌دار نشان نداد. همچنین مقدار پرولین در اندام هوایی و ریشه در تیمارهای SA0.5mM، SA1 و SA2 نسبت به گروه گیاهان شاهد تغییر معنی‌دار نشان نداد. بیشترین مقدار پرولین در اندام هوایی و ریشه در تیمار SA0.5+ UV-B و کمترین مقدار آن در گروه شاهد مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۳).

#### بررسی بیان ژن

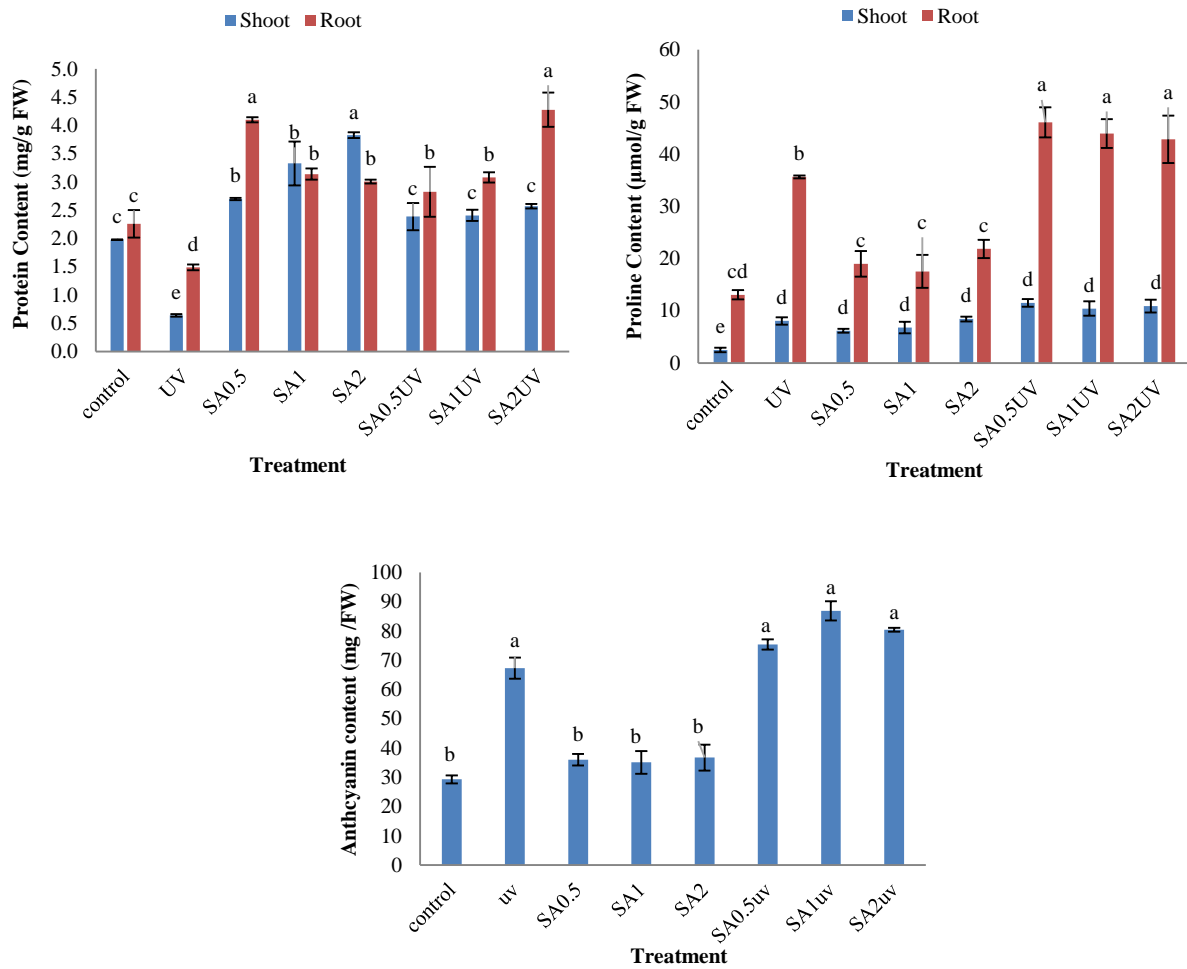
بیان ژن LS که اولین ژن دخیل در مسیر بیوسنتز منتول به‌عنوان مهمترین ماده مؤثره در گیاه نعناع فلفلی است؛ در دو مرحله مختلف بررسی شد. اولین مرحله، یک روز بعد از اعمال اشعه UV-B (روز نوزدهم از شروع اعمال تیمارها) و مرحله دوم روز سی‌ام از شروع اعمال تیمارها بود. نتایج نشان داد که در مرحله دوم که مرحله بازیابی (ریکاوری) بود، بیان ژن LS در گروه‌های تیماری SA0.5، SA1 و SA2 و گروه تیماری SA1+UV-B نسبت به مرحله اول افزایش معنی‌دار یافته است. این افزایش در تیمار SA0.5+UV-B معنی‌دار نبود. در تیمار SA2+UV-B کاهش بیان ژن در مرحله دوم نسبت به مرحله اول مشاهده شد (جدول ۳، شکل ۴).

بررسی نتایج نشان داد که تحت تأثیر پرتو UV-B تعداد برگ‌ها در نعناع فلفلی در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌دار کاهش یافت. کاربرد اسید سالیسیلیک باعث تعدیل اثر تنش شد. تعداد برگ‌ها تحت تیمارهای SA0.5+ UV-B، SA2+ UV-B، SA1+ UV-B و UV-B به طور معنی‌دار نسبت به تعداد آن در گیاهانی که تیمار UV-B دریافت کرده بودند، افزایش یافت. تعداد برگ تحت تیمارهای SA1 mM و SA2 نسبت به گروه شاهد افزایش اما این افزایش معنی‌دار نبود. بیشترین تعداد برگ در تیمار SA0.5mM و کمترین آن در تیمار UV-B با تعداد ۹ برگ مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۳).

#### صفات فیزیولوژیک

میزان آنتوسیانین تحت تأثیر اشعه UV-B به طور معنی‌دار نسبت به گیاهان شاهد در برگ‌ها افزایش یافت. میزان آنتوسیانین تحت تیمارهای SA0.5+ UV-B، SA1+UV-B، SA2+ UV-B در مقایسه با مقدار آن در تیمار UV-B افزایش نشان داد؛ ولی این افزایش تحت تیمار SA0.5+ UV-B معنی‌دار نبود. در همه گروه‌های تیماری افزایش معنی‌داری در میزان آنتوسیانین در مقایسه با گیاهان گروه شاهد مشاهده شد. افزایش میزان آنتوسیانین در تیمارهای SA0.5، SA1، SA2mM نسبت به مقدار آن در گروه شاهد معنی‌دار نبود. بیشترین میزان آنتوسیانین در تیمار توأم SA1+ UV-B و کمترین میزان آن در گیاهان گروه شاهد مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۳).

میزان پروتئین محلول اندام هوایی و ریشه تحت تأثیر اشعه UV-B به طور معنی‌دار در مقایسه با میزان آن در گیاهان گروه شاهد کاهش یافت. میزان پروتئین محلول در اندام هوایی و ریشه در تیمارهای SA0.5+ UV-B، SA1+ UV-B و SA2+ UV-B نسبت به مقدار آن در تیمار UV-B افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین میزان پروتئین محلول در اندام هوایی نسبت به گروه شاهد در تیمارهای SA0.5 mM، SA1 و SA2 افزایش معنی‌دار



شکل ۳- تأثیر UV-B و اسید سالیسیلیک بر صفات میزان آنتوسیانین، میزان پروتئین محلول اندام هوایی و ریشه و میزان پرولین اندام هوایی و ریشه در گیاه نعناع فلفلی

ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد بوده و در هر ستون میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ به تفکیک ریشه و ساقه با استفاده از آزمون SNK هستند.

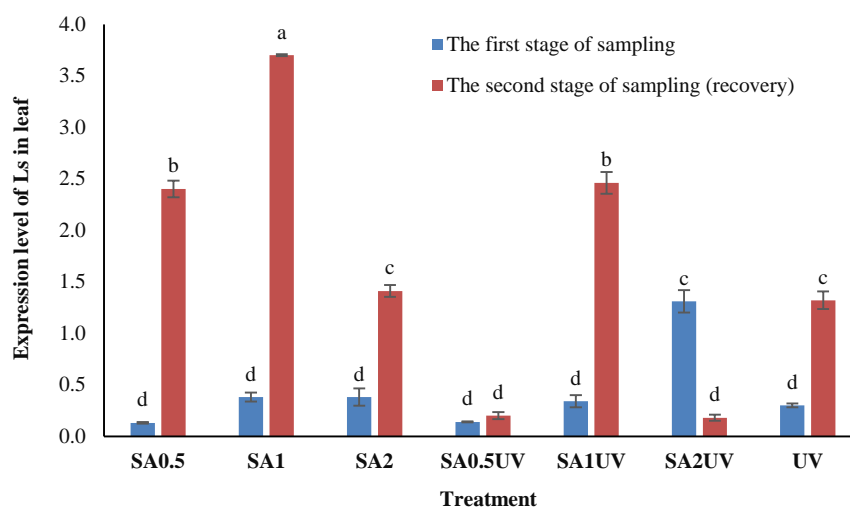
**Figure 3: Physiological effect of UV-B and SA on leaf number, anthocyanin, proline and protein content in peppermint. Vertical bars represent standard errors. Means of the column with the same letters are not significantly different for root and shoot based on SNK test; ( $P \leq 0.01$ ).**

جدول ۳- تجزیه واریانس کلی بررسی میزان بیان ژن LS در گیاه نعناع فلفلی تحت تیمار UV و SA

**Table 3: Analysis of variance for expression rate of LS gene in peppermint under UVB and SA.**

Source of variation	df	MS
Conditions (C)	1	16.40**
Treatment (T)	6	2.16**
C × T	6	3.40**
Error	28	0.01
CV (%)		10.27

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0.01$  Significant at  $P \leq 0.01$



شکل ۴- تأثیر UV-B و اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن LS در گیاه نعناع فلفلی

ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد بوده و در هر ستون میانگین‌های دارای حروف متفاوت تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ با استفاده از آزمون SNK دارند.

**Figure 4: Expression profiling of LS gene in peppermint. The columns represent the average of three repetitions. The vertical bars indicate the standard deviation, and in each column, the averages with different letters have a significant difference at the 0.01 level using the SNK test.**

## بحث

های مختلف سبب افزایش معنی‌دار در وزن تر و خشک ریشه گیاه نعناع فلفلی در مقایسه با گروه کنترل شده است. عامل اصلی این افزایش می‌تواند مربوط به توان آن در افزایش ظرفیت فتوسنتزی باشد. SA با افزایش تعداد برگ‌ها، افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو، افزایش سطح برگ و افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی و افزایش رشد و وزن گیاهی می‌شود. طبق گزارش‌های قبلی، اسید سالیسیلیک وزن خشک ریشه گیاه گندم را افزایش داده است (Kaydan *et al.*, 2007). همچنین افزایش وزن خشک در گیاهان ذرت و سویا تحت تأثیر اسید سالیسیلیک گزارش شده است (Khan *et al.*, 2003). نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک بر روی وزن خشک ریشه اثر افزایشی نداشته، در نتیجه این غلظت به‌عنوان تنش عمل کرده است. آنتوسیانین‌ها از جمله ترکیبات جاذب هستند که موجب جذب اشعه UV می‌شوند (Hoque and Remus, 1999). آنتوسیانین‌ها از ترکیبات فنولی در گیاهان می‌باشند که هم در برگ‌های بالغ و هم در برگ‌های جوان وجود دارند و از

نتایج نشان داد که وزن تر و خشک ریشه تحت پرتو UV-B نسبت به گروه گیاهان شاهد کاهش معنی‌دار یافته است. کاهش در این پارامترها به احتمال زیاد به دلیل کاهش رشد طولی القا شده به‌وسیله اشعه UV باشد. کاهش سطح برگ در اثر تابش UV-B دلیل دیگر این کاهش می‌باشد (Balouchi *et al.*, 2009). کاهش وزن تر و خشک کل گیاه بیانگر تولید بیوماس در تیمارهای فرابنفش است و این یک پاسخ عمومی در بسیاری از گونه‌های گیاهیست. یکی از دلایل کاهش وزن در تیمارهای فرابنفش، کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو و کاهش فتوسنتز است (Hassan *et al.*, 2012). نتایج بیانگر این است که استعمال اسید سالیسیلیک توأم با UV-B در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار، اثرهای منفی تنش را به طور معنی‌دار بهبود بخشیده است. البته بهبود در کاهش وزن تر و خشک ریشه در تیماری که در ترکیب آن غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید استفاده شده بود نسبت به نمونه‌هایی که UV-B دریافت کرده بودند معنی‌دار نبود. بنابراین کاربرد سالیسیلیک اسید در غلظت-

محتوی پروتئین محلول تحت تأثیر پرتو UV-B کاهش یافت. کاربرد غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک منجر به افزایش در محتوی پروتئین محلول ریشه و اندام هوایی نسبت به گیاهان شاهد گردید. بنابراین کاربرد اسید سالیسیلیک سبب جبران اثر کاهشی در پروتئین‌های محلول تحت تیمار UV-B شد. واکنش گیاهان به تنش UV اغلب منجر به تغییر در متابولیسم پروتئین‌ها می‌شود. شواهد حکایت از آن دارد که میزان پروتئین‌ها به طور مستقیم و غیرمستقیم تحت تأثیر پرتوتابی قرار می‌گیرند و باعث افزایش یا کاهش سنتز آنها می‌شود. اختلال در فعالیت پروتئین‌ها و احیای دوباره آنها بخشی از واکنش گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی است (Kiong *et al.*, 2008). مطالعات نشان داده است که پرتو فرابنفش در شدت کم، سبب افزایش تولید پروتئین‌های دفاعی در برابر تنش در گیاه می‌شود؛ اما شدت بالای آن باعث از بین رفتن پروتئین‌های سلول، از جمله پروتئین‌های اسکلت سلولی می‌شود. پرتو UV علاوه بر آثار تخریب‌کنندگی، در مسیر سنتز آنها نیز اختلال ایجاد کرده و سنتز آنها را کاهش می‌دهد (Ulm and Nagy, 2005). تحقیقات نشان داده که اشعه فرابنفش سبب تولید بیشتر گونه‌های رادیکال اکسیژن فعال (ROS) شده و ایجاد تنش اکسایشی می‌کند. رادیکال‌های آزاد تولید شده تحت تنش‌های محیطی به علت میل ترکیبی بالایی که با پروتئین‌ها و لیپیدها دارند، موجب تخریب پروتئین‌های سلول می‌شوند. کاهش محتوای پروتئین در فلفل قلمی (*Capsicum annum*) تحت تأثیر پرتو فرابنفش توسط Mahdavian و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است. سنتز پروتئین از طریق صدمه دیدن مولکول‌های RNA نیز مختل می‌شود (Moosavi *et al.*, 2009). برخلاف UV-B، اسید سالیسیلیک از اکسیدشدن و تخریب ساختار پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. اسید سالیسیلیک بر تشکیل پروتئین کینازها، پروتئین‌های دفاعی و روبیسکو اثر می‌گذارد و سنتز پروتئین‌های مهارکننده پروتئازها و پروتئین‌های عامل مقاومت را القا می‌کند (Senaratna *et al.*, 2002). این پژوهش افزایش معنی‌دار میزان پروتئین تحت تأثیر

نظر ساختمانی وابسته به فلاونوئیدها هستند. تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که آلکیل‌شدن آنتوسیانین‌ها و اسیدهای آلی آروماتیک باعث افزایش جذب آنها در محدوده ۳۱۰-۳۲۰ nm می‌شود (Hosseini Sarghein *et al.*, 2008). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تجمع آنتوسیانین‌ها توسط گیاه، سازوکاری حفاظتی را در برابر تابش UV ایجاد می‌کند. آنزیم PAL (فنیل‌آلانین آمونیا لیا ز) به‌عنوان اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید موجب تبدیل فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید می‌شود که این اسید، در تولید فلاونوئیدها، از جمله پیش‌ماده‌های فعال است. آنتوسیانین‌ها در آخرین مرحله از سنتز فلاونوئیدها ساخته می‌شوند که خاصیت فیلترکردن پرتوهای UV را دارند (Senaratna *et al.*, 2002). نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه‌های تیماری (UV-B، SA0.5+UVB، SA1+UV-، SA2+UV-B، B) میزان آنتوسیانین نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار یافته است. در تحقیقات قبلی گزارش شده است که فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر پرتو UV-B افزایش می‌یابد. بنابراین افزایش میزان آنتوسیانین‌ها احتمالاً می‌تواند مربوط به افزایش فعالیت این آنزیم باشد. علت افزایش مقدار و عملکرد آنزیم PAL تحت تنش UV را می‌توان به افزایش بیان ژن دخیل در ساخت این آنزیم نسبت داد. محققان دیگری، افزایش محتوای آنتوسیانین در گیاه فلفل قلمی (*Capsicum Longum*) را تحت تیمار UV گزارش کرده‌اند (Hosseini Sarghein *et al.*, 2008). اسید سالیسیلیک نیز بیان ژن و عملکرد این آنزیم را تحریک می‌کند. تیمار SA تحت تأثیر اشعه UV-B باعث القای شدید ژن مسئول سنتز آنزیم‌های کالکون سنتتاز، کالکون ایزومراز و فنیل‌آلانین آمونیا لیا ز (PAL) می‌شود که در نهایت منجر به افزایش بیوسنتز ترکیبات جاذب می‌گردد. ترکیبات جاذب در اپیدرم و در واکوئل سلول‌ها انباشته شده و بافت‌های گیاهی را از آسیب پرتوهای فرابنفش حفظ می‌کنند (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). طبق نتایج به‌دست‌آمده تیمار توأم UV-B با اسید سالیسیلیک باعث افزایش محتوای آنتوسیانین در گیاهان تحت این تیمار شد.

کردند. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، بعد از مدت زمان بازیابی (۱۱ روز بعد از اتمام پرتوتابی) بیان ژن LS بشدت افزایش یافت. مطالعات قبلی بر روی *Mentha piperita* نشان داد که بیان ژن LS با اعمال متیل جاسمونات (۲۴-۴۸ ساعت بعد از تیمار) و جیبرلیک اسید (بعد از ۲۴-۷۲ ساعت) به صورت منفی تنظیم شد (Afkar *et al.*, 2013; Soleymani and Taheri, 2015). تنظیم منفی بیان ژن LS در مطالعه‌ای بر روی نعنای فلفلی کشت شده در مزرعه و تحت تأثیر اشعه فرابنفش B گزارش شده است (Dolzhenko *et al.*, 2010). در تیمار توأم SA2+UV-B بعد از بازیابی، بیان ژن LS شدیداً کاهش نشان داد. بنابراین، می‌توان گفت که غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به عنوان تنش عمل کرده و مانع بهبود اثرهای مخرب اشعه UV شده است.

جمع‌بندی نتایج نشان داد که اعمال اشعه UV-B به گیاه نعنای فلفلی باعث کاهش وزن تر و خشک ریشه، تعداد برگ‌ها و پروتئین محلول و افزایش معنی‌دار میزان آنتوسیانین و پرولین شد. تیمار با اسید سالیسیلیک موجب کاهش آسیب ناشی از اعمال اشعه UV-B در گیاه شد. بنابراین می‌توان از اسید سالیسیلیک به عنوان الیستور در کاهش اثرهای مضر تنش استفاده کرد.

### منابع مورد استفاده

- Afkar, S., Karimzadeh, G., Jalali-Javaran, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., 2013. Influence of methyl jasmonate on menthol production and gene expression in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-Products*, 1:75-82.
- Ballare, CL., Caldwell, MM., Flint, SD., Robinson, SA., Bornman, JF., 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10: 226-241.
- Balouchi, H. R., Sanavy, S. A. M., Emam, Y. and Dolatabadian, A., 2009. UV radiation, elevated CO<sub>2</sub> and water stress effect on growth and photosynthetic characteristics in durum wheat. *Plant Soil and Environment*, 55: 443-453.

اشعه UV را نشان می‌دهد. پرولین به دلیل دارا بودن خواص پاد اکسایشی، اثرهای حفاظتی غیرمستقیم دارد و توانایی ثبات بخشیدن به ماکرومولکول‌ها و لایه‌های هیدراسیون آنها را دارد. علت افزایش پرولین تحت تأثیر اشعه UV، تحریک سنتز پرولین در ارتباط با غلظت اسید آسبزیک، جلوگیری از اکسیداسیون پرولین و مهار سنتز پروتئین‌ها بیان شده است. کاربرد SA در اندام هوایی سبب افزایش میزان پرولین نسبت به گروه شاهد شد. اسید سالیسیلیک احتمالاً از طریق القای سنتز ترکیبات حد واسط مثل اسید آسبزیک واکنش محافظت را ایجاد کرده و آسیب ناشی از تنش را در گیاه کاهش می‌دهد (Shakirova *et al.*, 2003). تیمار سالیسیلیک اسید با افزایش پرولین و تولید شیب اسمزی در گیاه باعث مقاومت در برابر کاهش آب برگ و افزایش رشد سریع گیاه در شرایط تنش می‌شود (Tasgin *et al.*, 2006). در گیاهان تحت تنش، پرولین در تنظیم اسمزی، حفظ ساختارهای زیر سلولی، تثبیت واکنش‌های فتوسنتزی، سنتز ATP و فعال‌سازی آنزیم‌ها نقش دارد (Chen *et al.*, 2007). افزایش تجمع پرولین تحت تنش می‌تواند به چهار دلیل زیر باشد: تحریک سنتز آن از گلوتامیک اسید، جلوگیری از اکسیداسیون آن در زمان تنش، کاهش انتقال آن از طریق آوند آبکش و تخریب و اختلال در فرایند سنتز پروتئین (Lamas, 2001). تجمع پرولین در گیاه باعث کاهش آسیب به غشا و پروتئین‌ها شده و پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی در تنظیم pH سلول و تنظیم اکسیداسیون و احیا نیز شرکت می‌کند.

نتایج این تحقیق، کاهش میزان بیان ژن LS بعد از اعمال تیمار ۸ روز UV-B را نشان می‌دهد. Rahimi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تنش آب (تنش خشکی) بر روی بیان برخی از ژن‌های دخیل در بیوسنتز نعنای فلفلی تأثیر دارد. نتایج آنان نشان داد که بیان ژن LS به طور معنی‌داری بعد از اعمال تنش خشکی (25%FC) در مقایسه با شرایط کنترل کاهش نشان می‌دهد که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. Rahimi و همکاران (۲۰۱۷) شدت و مدت زمان اعمال تنش را در تغییر میزان ترکیبات اسانس مهم بیان

- of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi*, 13: 114-119.
- Khan, W., Prithiviraj, B., Smith, D. L., 2003. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Plant Physiology*, 160:485-492.
- Kiong, A., Lai, A., Hussein, S. and Harun, AR., 2008. Physiological responses staminius plantlets to gamma irradiation. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2: 135-149.
- Lamas, A., Ullrich, C.I. and Sanz, A., 2001. Cadmium Effects on Transmembrane Electrical Potential Difference, Respiration and Membrane Permeability of Rice (*Oryza sativa*) Roots. *Plant and Soil*, 219: 21-28.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193: 265–276.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M. and Kalantari, M. K., 2008. The effects of ultraviolet radiation on contents of chlorophyll, flavonoid anthocyanin and proline in *Capsicum annum* L. *Turkish Journal of Botany*, 32: 25-33.
- Marely G. Figueroa Pérez, Nuria Elizabeth Rocha-Guzmán, Edmundo Mercado-Silva, Guadalupe Loarca-Piña, Rosalía Reynoso-Camacho, 2014. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, 156: 273-278.
- Miura, K. and Tada, Y., 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Plant Science*, 5: 410.
- Mohammadi Y. and Khorsandnia Z., 2021. The effects of drought, salinity, and temperature stresses on the expression of menthone menthol reductase gene in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 29(2): 196-206. In Persian
- Moosavi, S. M., Khara, J. and Heidari, R., 2009. Effects of salicylic acid on photosynthetic pigment content in *Ocimum basilicum* L. under UV radiation stress. *International Journal of Biological Sciences*, 1: 57-60.
- Morales, L.O., Brosché, M., Vainonen, J., Jenkins, G.I, Wargent, J.J., Sipari, N., Strid, Å., Lindfors, A.V., Tegelberg, R. and Aphalo, P.J., 2013. Multiple roles for UV resistance locus8 in regulating gene expression and metabolite accumulation in *Arabidopsis* under solar ultraviolet radiation. *Plant Physiology*, 161: 744–759.
- Paul, N. D., and Gwynn-jones, D. 2003. Ecological
- Bates, L.S., Walderon, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Chen, J., Cheng, Z. and Zhong, S., 2007. Effect of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. *Journal of Environmental Sciences*, 19:44- 49.
- Croteau, R. and Gershenzon, J., 1994. Genetic control of monoterpen biosynthesis in mint (*Mentha Lamiaceae*). In *Genetic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 193-229). Springer US.
- Dolzhenko, Y., Berteau, M., Occhipinti, A., Bossi, S., Maffei, E., 2010. UVB modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(2):67–75.
- Figuerera, P., Marely, G., Rocha, N.E. and Reynosa, R. (2014) Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusion. *Food Chemistry*, 156: 273 -278.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri Bagci, E. and Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164: 728-736.
- Hashempour, A., Ghasemzhade, M., Fotouhi, G. and Sohani, M.M., 2014. The physiological and biochemical response to freezing stress olive plants treated with salicylic acid. *Russian Journal Plant Physiology*, 61(4): 443-450.
- Hassan, I. A., Basahi, J. M. and Kadi, M. W., 2012. Physiological and biochemical impairment in bean plants due to supplementary ultraviolet radiation and water stress: possible protective roles of secondary metabolites. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6: 552-563.
- Hoque, E. and Remus, G., 1999. Natural UV screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) needles. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 69(2): 405-619.
- Horii, A., Mccup, P. and Shetty, K., 2007. Enhancement of seed vigour following insecticide and phenolic elicitor treatment. *Bioresource Technology*, 98(3): 623-632.
- Hosseini sarghein, S., Carapetia, J. and Khara, J., 2008. Effects of UV radiation on photosynthetic pigments and UV-absorbing compounds in *Capsicum longum* L. *International Journal of Botany*, 4:486-490.
- Kafi and Damghani M., 1997. Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Ferdowsi University of Mashhad Press.Iran, 467 p.
- Kaydan, D., Yagmur, M. and Okut, N., 2007. Effects

- M.VF. and Shakirova, M. 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. *Plant Physiology*, 314-319.
- Shamsi-Fard, M.H., Mirzaghaderi, G. and Majdi, M. 2014. Transcript expression analysis of geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22(2): 143-155. In Persian
- Soleymani, F., Taheri, H., 2015. Effects of Gibberellic on gene expression of menthol biosynthesis pathway in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences* 2(2): 2349-1515.
- Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B., 2006. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41: 231-236.
- Ulm, R. and Nagy, F., 2005. Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 477-482.
- Vesna, K. and Bauer, B. 2015. Antifungal activity of the essential oil of wild -growing *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. from the Mariovo region, republic Macedonia. *Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*: 22 - 25. Apr 2015, Antalya, Turkey.
- Wang, H., Feng, T., Peng, X., Yan, M. and Tang, X. 2009. Up -regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1354 - 1362.
- Wu, L., Liu, B., Zhang, J. and Han, B. 2019. A novel UV -emitting Ce<sup>3+</sup>-doped chloroborate Ba<sub>2</sub>GaB<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Cl phosphor. *Optik*, 184: 241-246.
- roles of solar ultraviolet radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 48-55.
- Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. 2014. Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. *Iranian Journal of Plant Biology*, 6(21): 23-34. In Persian
- Rahimi, Y., Taleei, A. and Ranjbar, M. 2017. Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39:203.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3321–3338.
- Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourous, Y., Chaibi, W. and Djebali, W., 2013. Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: Protective role of salicylic acid. *South African Journal of Botany*, 85: 32-38.
- Samadi, S., Ghasemnejad, A. and Alizadeh, M., 2015. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, 21(4): 135-148.
- Sarikhani, H., 2014. Effect of UV-A Radiation on Growth and Some Physiological Properties of Peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Production Technology*, 5(2): 35-44.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. and Dixon, K., 2002. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce tolerance in bean and tomato plant. *Plant Growth Regulation*, 30:157–161.
- Shakirova, A.R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova,