



Determining the Salt Tolerance Threshold of *Mentha suaveolens* Ehrh. under Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Influence

Mohammad Reza Morshedloo^{*1,2}, Habib Farhadi¹, Hosein Ahmadi³, Filippo Maggi⁴

1. Corresponding author; Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. E-mail: morshedlooreza@gmail.com; morshedloo@maragheh.ac.ir
2. Center of International Scientific and Collaborations (CISSC), Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran.
3. Department of Horticulture Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. School of Pharmacy, Chemistry Interdisciplinary Project (ChIP), University of Camerino, Italy.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

2024; Vol 17, Issue 4

Article history:

Received: 09.09.2023

Revised: 29.11.2023

Accepted: 19.12.2023

Keywords:

Plant biomass,
Environmental stresses,
Functional characteristics,
Principal component analysis (PCA).

Abstract

Background and objectives: Salinity stress poses a significant challenge worldwide, particularly in arid and semi-arid regions, impacting the physiological processes and secondary metabolites of medicinal plants like *Mentha suaveolens* Ehrh. Distributed in humid rangelands, this species is notably affected by environmental salinity rise and excessive exploitation. Therefore, enhancing or preserving the quality and quantity of its metabolites under natural or cultivated conditions, including irrigation with unconventional saline waters, using modern methods, becomes imperative. Recently, gamma-aminobutyric acid (GABA), a biomolecule known to induce plant tolerance in various physiological processes, has been explored to optimize conditions and enhance plant performance under stress. This study aimed to model and evaluate the effects of GABA concentrations on the secondary metabolites and physiological characteristics of *Mentha suaveolens* under varying salinity levels.

Methodology: The influence of GABA concentrations ranging from 0 to 2.4 mM on secondary metabolites and physiological traits of apple mint species under salinity levels of 0 to 150 mM NaCl was assessed in a greenhouse at the Faculty of Agriculture, Maragheh University, during the year 1401. At the end of the trial period, parameters such as biomass performance, relative water content of aerial organs, and secondary metabolites including flavonoids, phenols, DPPH radical scavenging activity, proline, malondialdehyde (MDA), carotenoids, chlorophyll, and essential oil content were evaluated. Statistical analysis and Principal Component Analysis (PCA) were performed on the collected data.

Results: Salinity stress led to reductions in root and shoot dry weight, piperitone oxide content, relative water content, chlorophyll content, and PSII maximum quantum yield (Fv/Fm). Conversely, malondialdehyde (MDA), total flavonoids, and DPPH radical scavenging activity increased under salinity. Application of GABA mitigated the negative effects of salinity stress, with the most significant changes observed under higher salinity (150 mM) and GABA (2.4 mM) levels. PCA

analysis accounted for 90.58% of changes under different treatments. DPPH activity, piperitone oxide, and essential oil content showed the highest gradients, indicating their sensitivity to salinity levels and GABA application. Notably, NaCl(0)-GABA(0) and NaCl(0)-GABA(2.4) treatments exhibited the most significant combined effects on plant physiological characteristics. Salinity stress had varying effects on phenol and biomass content, while GABA application showed minimal to moderate effects on these parameters. Overall, severe salinity stress (>120 mM NaCl) adversely impacted plant performance and evaluated characteristics.

Conclusion: Salinity stress significantly altered functional characteristics of *Mentha suaveolens*, inducing metabolic changes to cope with or enhance tolerance to salinity stress. Modeling indicates that optimal GABA application could maintain or improve medicinal performance under moderate salt stress conditions. However, extreme salinity stress (120 to 150 mM) adversely affects plant performance, suggesting limited efficacy of GABA application in such conditions.

Cite this article: Morshedloo, M.R., H. Farhadi, H. Ahmadi, F. Maggi, 2024. Determining the Salt Tolerance Threshold of *Mentha suaveolens* Ehrh. under Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Influence. *Journal of Rangeland*, 17(4): 622-639.



© The Author(s).
Publisher: Iranian Society for Range Management

DOR: 20.1001.1.20080891.1402.17.4.8.3

تعیین آستانه تحمل شوری گونه *Mentha suaveolens* Ehrh. تحت کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA)

محمد رضا مرشدلو^{۱*}، حبیب فرهادی^۱، حسین احمدی^۲، فیلیپو مگی^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایان‌نامه: morshedlooreza@gmail.com;

morshedloo@maragheh.ac.ir

۲. مرکز همکاری‌های علمی و بین‌المللی (CISSC)، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران.

۳. گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. دانشکده داروسازی، پروژه میان‌رشته‌ای شیمی (ChIP)، دانشگاه کامریو، ایتالیا.

چکیده

اطلاعات مقاله

سابقه و هدف: تنش شوری همواره به‌عنوان یک مسئله جدی در سراسر جهان مخصوصاً در مناطق خشک و نیمه‌خشک، فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی را به‌شدت تحت تأثیر قرار داده است. گونه دارویی نعنای آناناسی (*Mentha suaveolens* Ehrh.) با پراکنش در مراتع مرطوب شدیداً تحت تأثیر افزایش شوری محیط و بهره‌برداری بی‌رویه قرار گرفته است. لذا بهبود یا حفظ کیفیت و کمیت متابولیت‌های آن تحت شرایط طبیعی یا کشت و آبیاری با آب‌های نامتعارف شور به کمک روش‌های مدرن مؤثر ضروری به نظر می‌رسد. امروزه کاربرد انواع اصلاحگرها و آمینواسیدها مانند گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) که یک مولکول زیستی نشانگر القاکننده تحمل در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه است، برای تعیین شرایط بهینه و بهبود عملکرد گیاهان تحت تنش معرفی شده است که مدل‌سازی و ارزیابی این اثرات نتایج دقیق‌تری را ارائه خواهد داد.

نوع مقاله:

مقاله کامل - پژوهشی

۱۴۰۲؛ جلد ۱۷، شماره ۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تأثیر غلظت‌های ۰ تا ۲/۴ میلی‌مولار GABA بر متابولیت‌های ثانویه و خصوصیات فیزیولوژیکی گونه نعنای آناناسی تحت سطوح شوری ۰ تا ۱۵۰ میلی‌مولار نمک طعام (NaCl) تحت شرایط گلخانه در دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه در سال ۱۴۰۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. در انتهای دوره آزمایش خصوصیات فیزیولوژیکی مانند عملکرد زی‌توده، رطوبت نسبی اندام‌های هوایی و متابولیت‌های ثانویه گیاه از جمله محتوای کل فلاونوئیدها، فنل‌ها، فعالیت مهار رادیکال DPPH، محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، کاروتنوئیدها، محتوای کلروفیل و مقدار اسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. برای داده‌های به‌دست‌آمده، آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد.

واژه‌های کلیدی:

زی‌توده گیاهی،

تنش‌های محیطی،

خصوصیات عملکردی،

تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی

(PCA).

نتایج: تنش شوری به‌طور اجتناب‌ناپذیری ویژگی‌هایی مانند وزن خشک ریشه و اندام هوایی، محتوای اکسید پیپریتنون، محتوای نسبی آب، محتوای رنگ‌دانه و حداکثر عملکرد کوانتومی PSII (Fv/Fm) را کاهش داد. اما محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و فلاونوئید کل و فعالیت مهار رادیکال DPPH تحت شوری افزایش یافت. از سویی کاربرد GABA تا حدودی اثرات منفی تنش شوری را کاهش داد. بیش‌ترین تغییرات تحت سطوح بالاتر شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) و GABA (۲/۴ میلی‌مولار) مشاهده شد. آنالیز PCA ۹۰/۵۸ درصد تغییرات را تحت

تأثیر سطوح مختلف تیمارها توجیه نمود. بر این اساس فعالیت DPPH، اکسید پیپریتون و محتوای اسانس به ترتیب با گرادیان ۰/۹۴۱، ۰/۹۰۱ و ۰/۸۵۰ به ترتیب بالاترین گرادیان را تحت تأثیر سطوح شوری و کاربرد GABA داشتند. همچنین تیمار NaCl(0)-GABA(0) و NaCl(0)-GABA(2.4) به ترتیب با طول گرادیان ۰/۷۵۴ و ۰/۷۶۱ مؤثرترین اثر ترکیبی را بر خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه داشتند. تنش شوری با ضرایب استاندارد شده ۰/۰۰۸ و ۰/۸۳- به ترتیب حداقل و حداکثر تأثیر را بر محتوای فنل و زی توده داشته‌اند. کاربرد GABA نیز به ترتیب با ضرایب ۰/۰۰۳ و ۰/۲۷۴ حداقل و حداکثر تأثیر را بر محتوای فنل و زی توده هوایی داشته‌اند. به طور کلی، تنش بسیار شدید NaCl (یعنی بیش از ۱۲۰ میلی مولار) بالاتر از تحمل گیاه نعنای اناناسی بوده که کاهش شدید در مقدار و عملکرد ویژگی‌های مورد ارزیابی را موجب شد.

نتیجه گیری: تنش شوری کلیه خصوصیات عملکردی گونه نعنای اناناسی را تغییر داد. در واقع تنش اسمزی ایجاد شده تحت تنش اعمال شده موجب تغییر در فرایندهای متابولیسمی گیاه شده که به منظور دفع اثر تنش و یا افزایش تحمل خود در مقابل تنش شوری، موجب تغییرات شده است. بر اساس مدل سازی صورت گرفته و با توجه به جنبه ارزش دارویی متابولیت‌های ثانویه گیاه نعنای اناناسی می‌توان با اعمال نمودن مقدار بهینه GABA در تنش‌های نه‌چندان شدید موجب حفظ و یا بهبود عملکرد دارویی گیاه شد. تحت تنش شدید شوری در (۱۲۰ تا ۱۵۰ میلی مولار) حفظ و یا بهبود عملکرد گیاه از طریق کاربرد GABA نتایج مطلوبی را خواهد داشت.

استناد: مرشدلو، م.، ح. فرهادی، ح. احمدی، ف. مگی، ۱۴۰۲. تعیین آستانه تحمل شوری گونه *Mentha suaveolens* Ehrh. تحت کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA). مرتع، ۱۷(۴): ۶۲۲-۶۳۹.



DOR: 20.1001.1.20080891.1402.17.4.8.3

© نویسندگان

ناشر: انجمن علمی مرتعداری ایران

مقدمه

جنس نعناع (*Mentha*) از تیره Lamiaceae شامل بیش از ۶۰ گونه است که به‌طور گسترده در مناطق معتدل و نیمه معتدل جهان پراکنده شده‌اند (۱). گونه‌های جنس نعناع به‌عنوان گونه‌های دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس از مهم‌ترین ترکیبات تولیدشده در این جنس هستند که از نظر اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند.

در بین گونه‌های نعناع، گونه نعناع آناناسی با نام علمی *Mentha suaveolens* Ehrh. یکی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس است که دارای برگ‌های انبوه و کرکی با حاشیه سفید است (۲). نعناع آناناسی عمدتاً در مراتع مرطوب رشد می‌کند و همچنین به‌عنوان یک گیاه زینتی معطر در زمین (مزرعه) و گاهی در سبدهای آویزان کاشته می‌شود. این گیاه دارویی عمدتاً به‌عنوان چاشنی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در طب سنتی برای طیف وسیعی از اثرات دارویی استفاده می‌شود. اسانس نعناع آناناسی منبعی غنی از اکسید پیپریتنون، یک مونوترپن اکسیژن‌دار با طیف گسترده‌ای از اثرات مفید مانند ضد درد، ضد میکروبی و دافع حشرات است (۳). این گونه به‌دلیل ارزشمندی دارویی در برخی از رویشگاه‌های اصلی به شدت مورد بهره‌برداری و حتی در معرض انقراض و نابودی قرار دارد (۴). از سویی با بحران کمبود آب و افزایش شوری منابع آب‌وخاک، عملکرد اولیه و ثانویه گیاه تحت شرایط کشت نیز دچار تغییر و تحول شده است.

متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های دارویی مختلف به‌طور قابل توجهی تحت تنش‌های محیطی متعددی کنترل، افزایش یا کاهش می‌یابند (۵ و ۶). جنبه معکوس این پدیده یکی از موانع اولیه تولید گیاهان دارویی با بازده بالا است (۷). بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه توسط عوامل مختلف مانند بیان ژن، آنزیم‌ها و انواع مختلف تنش‌های غیرزیستی تنظیم می‌شود که در نهایت یک مکانیسم دفاعی پیچیده را از طریق طیف گسترده‌ای از مولکول‌های سیگنال برای زنده ماندن در شرایط نامساعد ایجاد می‌کند که عملکرد گیاه را شدیداً تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶ و ۸).

عموماً از بین تنش‌های غیرزیستی، شوری محیط چه به صورت طبیعی و چه به شکل یک فرآیند غیرطبیعی به یک بحران نگران‌کننده تبدیل شده که می‌تواند رشد گیاه را از طریق عدم تعادل یونی شدید، سمیت یونی (مقدار بیش‌ازحد سدیم و کلر)، انفجار اکسیداتیو، تخریب رنگ‌دانه‌ها، محدود کردن جذب دی‌اکسیدکربن، و مهار جذب K^+ به عنوان یک عنصر ضروری برای رشد گیاه تحت تأثیر قرار دهد (۹ و ۱۰). به همین دلیل تنش شوری شدیداً عملکرد گونه‌هایی مانند نعناع را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴).

تنش‌های محیطی ساختار و کارایی فتوسنتز را از بین می‌برد و موجب کاهش شدید در حداکثر بازده و عملکرد گیاهان یا موجب تغییر آن می‌شود (۹). از سویی متابولیت‌های ثانویه گیاهان نیز ممکن است تحت تنش افزایش یابند (۷ و ۱۰). با این حال امروزه به‌منظور کاهش خسارت ناشی از شوری از طریق محلول‌پاشی اسیدهای آمینه به روشی سریع و جایگزین برای جلوگیری از صدمات اسمزی از طریق تأمین کربن و نیتروژن کافی در هنگام مشکلات تغذیه‌ای گیاهان و همچنین با فعال کردن سیگنالینگ تبدیل‌شده است. مسیره‌ها، انتقال یون و متابولیسم مربوطه اقدام شده است (۱۱).

گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA)، یک اسید آمینه غیر پروتئین‌زا بوده که دو مسیر متابولیکی اولیه کربن و نیتروژن را به هم مرتبط می‌کند و اعتقاد بر این است که به‌عنوان یک مولکول زیستی سیگنالینگ القاکننده تحمل در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف عمل می‌کند (۱۲). کاربرد GABA تأثیرات فیزیوشیمیایی متعددی را در گیاهان موجب می‌شود (۱۳) که مقاومت گیاهان در برابر انواعی از تنش‌های محیطی را موجب می‌شود (۱۴). اثرات مثبت این آمینواسید برای افزایش مقاومت برخی گیاهان در مقابل تنش شوری تا حدودی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵).

بر اساس تحقیقات صورت گرفته بهبود تحمل تنش در گیاهان با کاربرد GABA معمولاً با فعالیت بیشتر سیستم آنتی‌اکسیدانی، تجمع پرولین بالاتر به دلیل پیرولین، کربوکسیلات سنتتاز بالاتر و فعالیت کمتر پرولین

۱۸/۷ درصد، ۵۰/۷۰، ۴۲/۷۱، ۳۵/۲۴ میلی گرم بر کیلوگرم و ۲۵/۶۲ درصد بود.

اعمال تیمارهای آزمایش

یک ماه پس از کاشت، گیاهان در معرض ۵ سطح مختلف تنش شوری شامل شاهد (آب خالص)، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. برای این منظور نمک طعام با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد (MERK) استفاده شد. برای جلوگیری از شوک اسمزی، تیمار NaCl با محلول ۲۰ میلی مولار NaCl آغاز شد و سپس غلظت‌ها به تدریج (هر دو روز) افزایش یافت تا به حداکثر مقادیر رسید. آبیاری گلدان‌ها با محلول هر ۳ روز یکبار انجام شد. شرایط گلخانه دارای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶ ساعت و رطوبت نسبی ۸۰ درصد بود.

مقدار موردنیاز GABA از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. محلول پاشی پنج روز قبل از تیمارهای شوری شروع شد و در مجموع پنج غلظت مختلف (شاهد، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶ و ۲/۴ میلی مولار) اعمال شد. اعمال تیمارها به این شکل بود که هر یک از سطوح GABA با تمام سطوح شوری تلفیق شد که نهایتاً ۳۰ نمونه به دست آمد. تیمارهای شاهد تحت محلول پاشی آب مقطر قرار گرفتند. هر گلدان در هفته با ۰/۵ لیتر آب خالص (مقطر) آبیاری شد تا از تجمع بیش از حد مواد معدنی نمک جلوگیری شود. این امر به منظور جلوگیری از خطا، برای تمام نمونه‌ها انجام شد. برای جلوگیری از کمبود مواد مغذی، تمام گیاهان درون گلدان‌ها با محلول هوگلند با قدرت یک‌چهارم هر دو هفته یکبار و در طول فصل رشد تغذیه شدند (۱۷). در نهایت، اجزای گیاهی موردنیاز در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای آنالیزهای بیوشیمیایی بعدی نگهداری شدند و مواد گیاهی باقیمانده برای ارزیابی اسانس و پلی فنل کل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند.

ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه محتوای نسبی آب و وزن خشک

در مرحله رشد کامل (زمان گل‌دهی)، تمام قسمت‌های گیاه به‌طور کامل برداشت شد. اجزای ریشه و اندام هوایی به‌صورت مجزا خشک و وزن شدند. برای

دهیدروژناز و تجمع بیشتر ترکیبات فنلی به دلیل نسبت فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاک-لیاز/پلی‌فنل‌اکسیداز بالاتر همراه بوده است (۹ و ۱۶).

با توجه به اینکه تجزیه تحلیل ارتباط بین عملکرد گیاهان و خصوصیات محیطی برای تعیین شرایط بهینه رویش گیاه در انتخاب محیط مناسب و بهبود عملکرد گیاهی مؤثر است (۸)، لذا روش‌های آماری مختلفی برای کاهش روابط اکولوژیکی و دسته‌بندی عوامل محیطی مؤثر بر عملکرد گیاهان می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. به همین منظور در مطالعه حاضر، تأثیر غلظت‌های ۰ تا ۲/۴ میلی مولار GABA بر متابولیت‌های ثانویه و خصوصیات فیزیولوژیکی گونه نعناع آنااسی تحت سطوح شوری ۰ (آب خالص)، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl برای تعیین آستانه‌ها و شرایط بهینه رشد تحت تنش به کمک یکی از مدل‌های رسته‌بندی محدود مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش آزمایش

مطالعه حاضر تحت شرایط گلخانه در دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه انجام شد. برای انجام آزمایش از طریق تکثیر رویشی به‌عنوان اولین مرحله برای تضمین یکنواختی ژنتیکی مواد گیاهی اقدام شد. برای این منظور ریزوم گونه نعناع در سینی تکثیر حاوی محیط کوکوپیت-پرلیت ۵۰:۵۰ (۷/۷) کشت داده شدند. با توجه به ماهیت این مطالعه و آنالیز به روش رسته‌بندی، لذا تکرار تیمارها متغیر بوده که مجموعاً ۳۰ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. به عبارتی متناظر برای هریک از سطوح شوری، سطح مشخص شده از GABA مورد استفاده قرار گرفت که شش گلدان را شامل می‌شد. به همین ترتیب زمانی که نشاءها رشد مستقل نموده و به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر رسیدند، به ۳۰ گلدان ۱۰ لیتری حاوی خاک، ماسه و کودبرگ به نسبت‌های ۲، ۱ و ۱، منتقل شدند. با توجه به درصد اجزای خاک، بافت نهایی خاک در گلدان‌ها لوم شنی تعیین گردید. همچنین مقادیر pH، کربن آلی، نیتروژن، پتاسیم، فسفر و کربنات کلسیم خاک گلدان‌ها به ترتیب معادل ۷/۵،

محتوای کل فنل‌ها و فلاونوئیدها

۰/۲ گرم از برگ‌های خشک پودر شده را با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط کرد. پروتکل با تکان دادن نمونه‌ها در ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ ساعت تکمیل شد. پس از سانتریفیوژ، مواد رویی جدا شدند و سپس باقیمانده‌ها برای بار دوم به مدت ۲۴ ساعت مجدداً استخراج شدند. محتوای کل پلی فنل با استفاده از معرف ۱۰ برابر رقیق شده Folin-Ciocalteu و محلول ۳ درصد NaHCO_3 اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت شد. محتوای کل پلی‌فنل در میلی‌گرم معادل اسید گالیک (GAE) به ازای هر گرم وزن خشک‌شده بیان شد (۲۱). محتوای کل فلاونوئیدها با استفاده از واکنش AlCl_3 و با خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر ادامه یافت. کل فلاونوئیدهای نمونه‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون رسم شده کوئرتستین در نهایت اندازه‌گیری شدند.

فعالیت مهار رادیکال DPPH

تعیین فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) عصاره‌های هیدروالکلی با استفاده از روش Morshedloo و همکاران (۲۲). در این سنجش آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌ها با محلول متانولی ۰/۳ میلی مولار DPPH به مدت ۳۰ دقیقه در یک اتاق تاریک مخلوط شدند. جذب نمونه‌های موردبررسی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. مقادیر تجربی برحسب درصد مهار رادیکال‌های DPPH محاسبه شد.

محتوای اسانس

قسمت‌های هوایی گل‌دار هر گیاه تحت فرآیند استخراج اسانس قرار گرفت. بدین منظور ۵۰ گرم از مخلوط خشک‌شده گل و برگ با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت با آب تقطیر شد. آب اضافی از نمونه‌های اسانس با استفاده از سولفات سدیم بی‌آب حذف شد. آنالیز GC-MS با استفاده از کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنج جرمی مطابق روش‌های پیشین انجام شد (۲۳). کروماتوگراف گازی با یک ستون مویین HP-5 MS درصد فنیل متیل پلی سیلوکسان، ۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۰/۱ میکرومتر ضخامت (flm) مجهز شد. دمای آون به

اندازه‌گیری تغییرات محتوای نسبی آب برگ (RWC) در پاسخ به تیمارهای تنش شوری، وزن تازه و وزن خشک نمونه اندام گیاهان که به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند محاسبه و محتوای نسبی آب تعیین شد. با توجه به اینکه ماهیت آزمایش به شکل رسته‌بندی و شامل اثرات ترکیبی سطوح صفر تا سطوح حداکثر تیمارها بود، لذا ارزیابی برای تمام ۳۰ نمونه انجام شد.

محتوای پرولین و مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

محتوای پرولین برگ‌های تازه با استفاده از یک معرف نین‌هیدرین برآورد شد. به دنبال این روش، محتوای پرولین کل از فاز تولوئن استخراج و برای اندازه‌گیری‌های اسپکتروفوتومتری (مدل UV/Vis1800) در صفحه کوارتز ۹۶ چاهی آماده شد (۱۸). در نهایت اندازه‌گیری‌ها توسط صفحه خوان در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد. محتوای کل پرولین به صورت میکرومول پرولین در ۱ گرم وزن تازه بیان شد. همچنین محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص یکپارچگی غشاء در برگ‌های تازه بر اساس روش پیشنهادی پیشین تعیین شد. بر این اساس، از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) برای جذب ترکیب اضافی MDA-TBA در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر استفاده شد (۱۹).

محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها، فلئورسانس کلروفیل

مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید کل به روش Porra صورت گرفت (۲۰). برای این منظور، ۰/۲ گرم نمونه برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول استون ۸۰ درصد ساییده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. طیف جذبی عصاره‌های رنگ‌دانه در ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر ثبت شد و محتویات کل با استفاده از معادلات مربوطه محاسبه شدند. همچنین فلئورسانس کلروفیل (Fv/Fm، Fv، Fm، F0) با استفاده از دستگاه فلئورسانس سنج کلروفیل قابل حمل (Pam 2500-Walz، آلمان) بین ساعت ۹ تا ۱۱ صبح ثبت شد.

خصوصیات مورد ارزیابی تحت تیمارهای NaCl و GABA انجام شد.

نتایج

ارزیابی خصوصیات فیزیولوژی گونه نعنای تحت تأثیر کاربرد سطوح GABA و تنش شوری نشان داد که تقریباً تمام فاکتورهای مورد ارزیابی تغییرات معناداری را داشته‌اند. در اغلب موارد اثر شوری (سطوح مختلف شوری و سطح GABA) بیشتر از اثرات GABA خصوصیات مورد ارزیابی از جمله محتوای کلروفیل a و b را به شکل معناداری دچار تغییر نموده است ($P < 0.05$). اثرات ترکیبی سطوح تیمارهای مورد استفاده بر برخی خصوصیات از جمله کاروتنوئیدها و نسبت Fv/Fm علی‌رغم تفاوت اما معنادار نبود. در جدول ۱، با در نظر گرفتن سطوح صفر تیمارهای مورد استفاده، و نیز اثرات سطوح مختلف (غیر صفر) ترکیبی GABA و تنش شوری، تغییرات ویژگی‌های مورد ارزیابی نشان داده شده است.

صورت زیر برنامه‌ریزی شد: ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، متعاقباً دما با نرخ ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرد و سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد توقف داشت. همچنین دمای آنزکتور و خط انتقال به ترتیب ۲۳۰ و ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل با نرخ ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف‌ها در محدوده جذب جرمی ۴۰-۴۰۰ m/z اسکن شد. کمی کردن ترکیب اسانس با استفاده از نرمال‌سازی سطح پیک و بدون استفاده از ضرایب اصلاح انجام شد (۲۴).

آنالیز داده‌ها

ابتدا آزمون کلموگروف-اسمیرنوف برای بررسی نرمال بودن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. پس از تأیید همگنی واریانس داده‌ها، آنالیز واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) در SPSS انجام شد. همچنین به‌منظور رسته‌بندی داده‌ها، طول گرادیان به روش DCA کمتر از ۳ به دست آمد، لذا تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های رسته‌بندی برای خلاصه‌سازی ارتباطات

جدول ۱: تجزیه واریانس (میانگین مربعات و آماره F) صفات مورد بررسی با کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید تحت سطوح تنش شوری

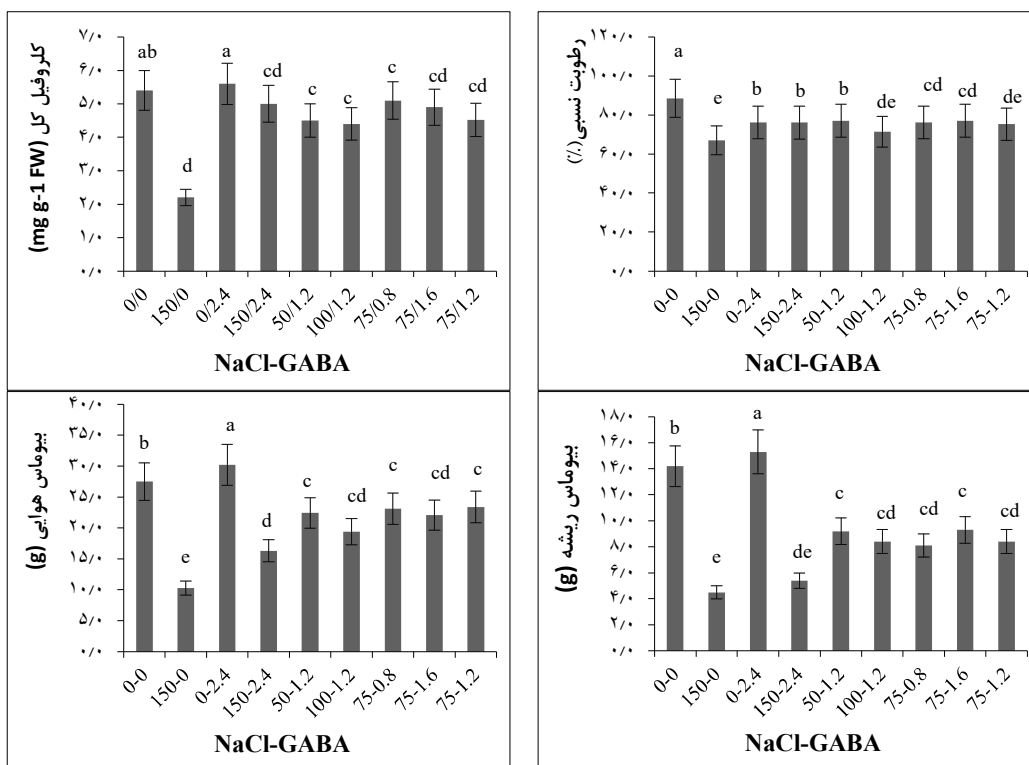
منبع تغییر	GABA*NaCl		GABA		NaCl	
	F	Mean squares	F	Mean squares	F	Mean squares
محتوای کل فلاونوئیدها (mg GAE g ⁻¹ DW)	۶/۴*	۳۳/۴۱۴	۹/۲۸**	۱۴۳/۳۴۲	۱۱/۲۸**	۳۴۶/۴۳۵
محتوای کل فنل‌ها (mg QE g ⁻¹ DW)	۶/۱*	۷۵۲/۴۲۵	۷/۱۲**	۱۳۷۴/۵۷۲	۸/۲۴**	۱۴۵۸/۱۲۵
فعالیت مهار رادیکال DPPH (%)	۷/۲*	۳۶۶/۷۳۴	۸/۴۵**	۴۸۸/۴۳۲	۸/۶۸**	۵۸۵/۲۱۳
محتوای پرولین (mg g ⁻¹ FW)	۱/۴ ^{ns}	۳/۱۰۲	۴/۲۰*	۱۶/۳۲۶	۵/۱۰*	۱۹/۴۰۴
محتوای مالون‌دی‌آلدنید (MDA) (mg g ⁻¹ FW)	۵/۱۵*	۷۸/۸۱۴	۶/۷۵**	۱۳۲/۴۱۱	۷/۱۱**	۱۳۸/۲۰۵
کاروتنوئیدها (mg g ⁻¹ FW)	۰/۷۸ ^{ns}	۰/۱۲۲	۱/۱ ^{ns}	۰/۰۲۱	۵/۷۴*	۰/۲۲۴
محتوای کلروفیل a (mg g ⁻¹ FW)	۵/۱۳*	۶/۲۲۴	۶/۴۴*	۹/۲۷۱	**۱۲/۱۲	۱۶/۱۱۱
محتوای کلروفیل b (mg g ⁻¹ FW)	۵/۱۳*	۵/۰۳۱	۵/۸۸*	۸/۳۴۲	**۱۰/۴۴	۱۱/۱۳۲
نسبت Fv/Fm	۰/۴۸ ^{ns}	۰/۲۳۳	۰/۸۳ ^{ns}	۰/۱۱۱	۵/۲۱*	۰/۵۳۶
محتوای اسانس (%)	۴/۳۲*	۰/۲۲۲	**۸/۸۵	۰/۳۴۴**	**۱۱/۰۲	۰/۷۵۴
محتوای اکسید پیپریتون (%)	۴/۴۵*	۴۱/۳۴۲	**۷/۷۶	۷۷/۳۵۲**	۵/۳۰*	۱۵۵/۴۳۲
محتوای نسبی آب برگ (RWC) (%)	۱/۱۱ ^{ns}	۱۴۳/۲۲۱	۵/۴۲*	۸۵۲/۳۵۲*	۵/۱۲*	۱۸۵۱/۱۳۲
وزن خشک اندام هوایی (g)	۸/۴۲**	۳۰/۱۱۳۴	**۱۶/۲۴	۲۸۵/۴۴۵**	**۱۸/۴۱	۴۲۵/۱۴۵
وزن خشک اندام ریشه (g)	۹/۱۲**	۱۰۵/۴۲۲	**۱۳/۷۴	۱۴۵/۲۳۴**	**۱۷/۴۲	۲۸۵/۴۳۵

** وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪، * وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪، ns عدم معنی‌داری

محتوای کلروفیل، رطوبت نسبی و زی توده

سطوح تنش شوری به شدت موجب تغییر و کاهش میزان کلروفیل (a و b) در گیاه نعناع شد. این تغییرات در حدود ۶۰ درصد ارزیابی شد. از طرفی اثر GABA بر گیاه تحت تنش تا حدودی موجب بهبود عملکرد و افزایش کلروفیل برگ‌ها شده است. از سویی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که محتوای نسبی آب اندام‌های هوایی گیاه تحت تنش شوری کاهش یافت. که روند تغییر این صفات را تحت تنش شوری همراه با کاربرد GABA نشان می‌دهد. به‌طور کلی اثرات کاربرد GABA بر محتوای نسبی آب گیاه ناچیز ارزیابی شد. همچنین میانگین وزن خشک اندام

هوایی و ریشه نیز نشان می‌دهد که اثر GABA و تنش شوری در سطح ۱ درصد برای وزن خشک اندام هوایی معنی‌دار بود، درحالی‌که تنها تنش شوری به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) بر زی توده گیاه تأثیر گذاشت. تنش شوری در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار وزن اندام هوایی و خشک ریشه را به ترتیب ۱۷۰ و ۲۲۰ درصد در مقایسه با شاهد کاهش شدیدی داد. مطابق نتایج، بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی (1.56 ± 0.33 گرم) و ریشه (2.60 ± 1.45 گرم) تحت غلظت ۲/۴ میلی‌مولار GABA بدون کاربرد نمک طعام به دست آمد (شکل ۱).



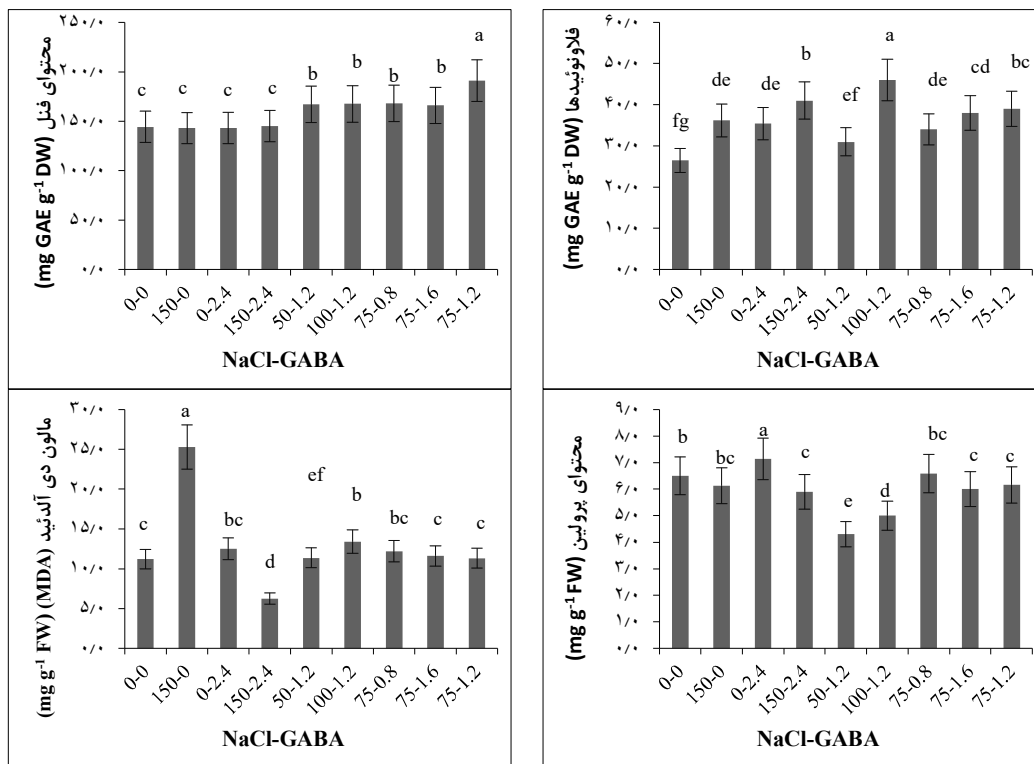
شکل ۱: تغییر زی توده، محتوای کلروفیل و رطوبت نسبی اندام گیاه با کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید تحت سطوح تنش شوری

شوری کاهش یافته است ($P < 0.01$). در مقایسه با شاهد، تنش ۱۵۰ میلی‌مولار به‌طور قابل توجهی محتوای فنل‌ها و فلاونوئیدها، مالون‌دی‌آلدئید و پرولین ۷۶، ۱۴، ۱۱۵ و ۲۳ درصد تغییر نموده است. محتوای MDA تحت یک تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl به بالاترین مقدار (۲۵/۳۷) در

محتوای فنل‌ها و فلاونوئیدها، مالون‌دی‌آلدئید و پرولین مقادیر به‌دست آمده برای محتوای پلی فنل کل، محتوای فلاونوئید کل، مالون‌دی‌آلدئید و پرولین تحت تأثیر کاربرد GABA و تنش شوری هر دو اثر ساده در سطح ۱ درصد خطا معنی‌دار بودند. محتوای پرولین با افزایش غلظت

MDA را در بالاترین مقدار خود (۲/۴ میلی مولار) تحت شدیدترین سطح تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار) نشان داد.

مقایسه با شاهد (۱۱/۲۷) رسید. در شرایط عادی، محلول پاشی GABA در ۲/۴ میلی مولار تأثیر معنی داری بر محتوای MDA نداشت. کاربرد GABA کمترین مقدار



شکل ۲: تغییرات محتوای فلاونوئیدها، فنل، پروتئین و مالون دی آلدئید با کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید تحت سطوح تنش شوری

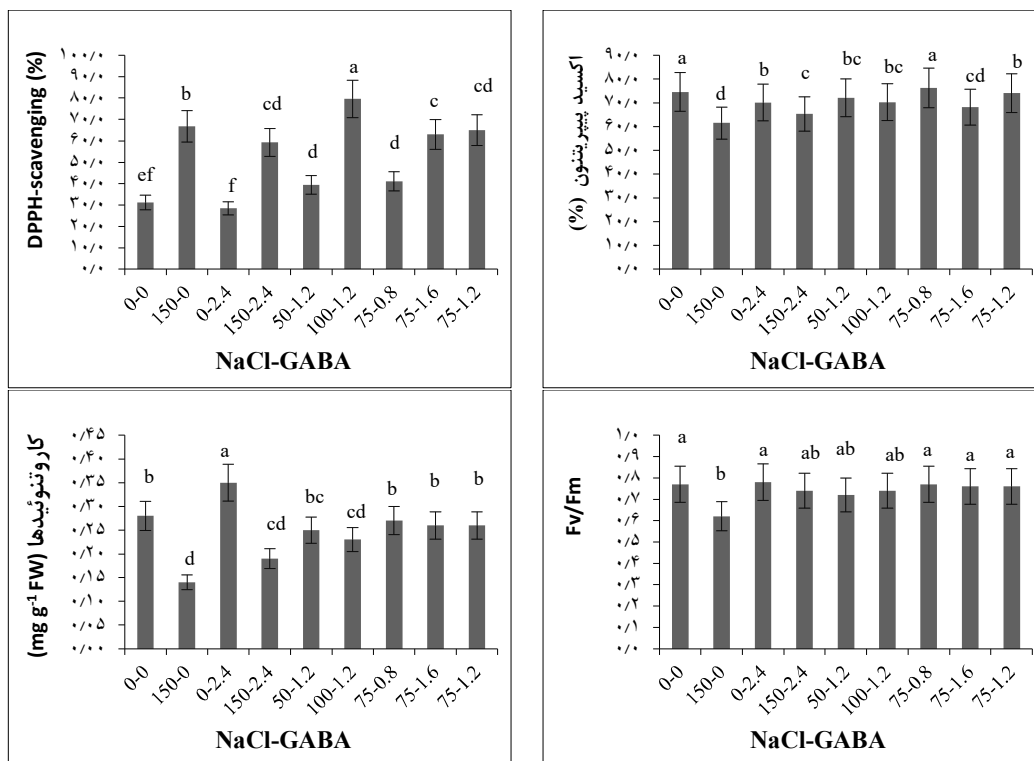
از شاهد (۰/۰۶) بود. در تنش شدید شوری (۱۵۰ میلی مولار) کمترین محتوای پیپریتنون یعنی ۲۰ درصد کاهش (۳/۷ ± ۶۱/۱۷ درصد) را در مقایسه با شاهد به همراه داشت. محلول پاشی GABA باعث تولید اسانس و جزء اصلی آن (یعنی اکسید پیپریتنون) شد. تحت تنش ۷۵ میلی مولار NaCl، کاربرد GABA در ۰/۸ میلی مولار بالاترین مقدار اکسید اسانس و پیپریتنون را به همراه داشت. داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری محتوای کاروتنوئیدها و حداکثر بازده کوانتومی PSII (نسبت Fv/Fm) اثرات معنادار تنش شوری و تأثیر کاربرد GABA را نشان داد. شدیدترین تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار) مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و حداکثر بازده

محتوای پیپریتنون، کاروتنوئیدها، فعالیت مهار رادیکال Fv/Fm, DPPH

بر اساس نتایج NaCl و GABA به طور قابل توجهی بر متغیر اکسید پیپریتنون ($P < 0.01$) تأثیر گذاشت (شکل ۳). بر اساس نتایج محتوای اکسید پیپریتنون تحت تنش‌های شدید شوری (تحت غلظت‌های بیش از ۱۲۰ میلی مولار NaCl) به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که اعمال GABA (تا ۰/۸ میلی مولار) تحت تنش‌های شوری متوسط (۶۰ تا ۹۰ میلی مولار) می‌تواند محتوای اکسید پیپریتنون بالایی داشته باشد. تحت تنش ۱۵۰ میلی مولار NaCl مقدار اسانس (۰/۱۸) سه برابر بیشتر

مقادیر این صفات با اعمال ۲/۴ میلی مولار GABA در شرایط بدون تنش به دست آمد (شکل ۳).

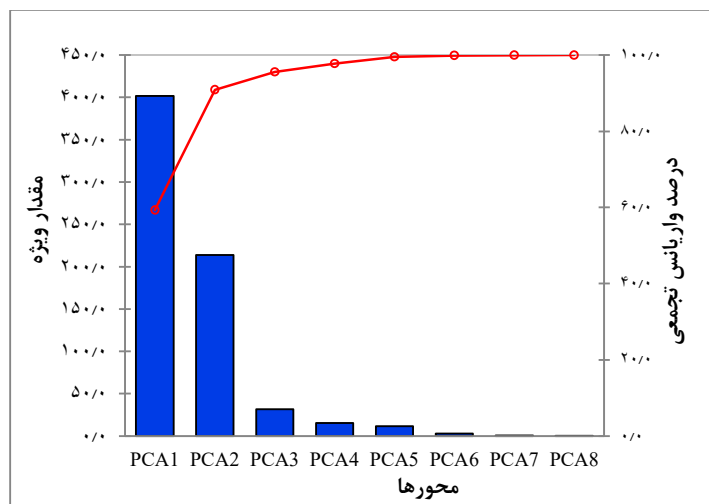
کوانتومی PSII را به ترتیب حدود ۶۴، ۵۰، ۵۷ و ۲۰ درصد کاهش داد. بدون در نظر گرفتن تیمار شاهد، بیشترین



شکل ۳: تغییرات محتوای اکسید پیریتون، مهار DPPH، کاروتنوئیدها و نسبت Fv/Fm با کاربرد گاما آمینو بوتیریک اسید تحت سطوح تنش شوری

می‌کند) مربوط به محور اول و دوم حاصل از آنالیز PCA مشاهده شد (شکل ۴). خصوصیات قرارگرفته در دو محور اول به همراه طول گرادینان مربوطه در جدول ۲ در ادامه ارائه شده است.

ارزیابی و مدل‌سازی پارامترهای فیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه گیاه تحت تأثیر تنش شوری و با کاربرد سطوح مختلف نشان داد که تغییرات اتفاق افتاده دارای ارتباط ویژه با تیمارها بوده به طوریکه بیشترین مقدار واریانس تجمعی (بیش از ۹۰ درصد تغییرت را توجیه



شکل ۴: مقادیر ویژه و درصد واریانس تجمعی برای محورهای اصل از آنالیز PCA در رابطه با فاکتورهای مورد ارزیابی

جدول زیر مقادیر ویژه صفات مورد بررسی تحت شرایط سطوح تنش شوری و گاما آمینو بوتیریک اسید در آنالیز PCA در محورهای مربوطه نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن مقدار ویژه ۰/۶ به عنوان مینا، خصوصیتی از قبیل کل فلاونوئیدها، کل فنلها، فعالیت DPPH، محتوای کلروفیل b، محتوای کل کلروفیل، محتوای اسانس و محتوای رطوبت برگ به ترتیب با ضریب ۰/۷۶۲، ۰/۶۴۵، ۰/۹۴۱، ۰/۶۱۲، ۰/۶۱۳، ۰/۸۵۰، و ۰/۶۴۲ دارای بیشترین گرادیان در محور ۱ هستند. همچنین تنش شوری ۰ - GABA و نیز شوری ۰ GABA-۲/۴ با ضرایب ۰/۷۵۴ و ۰/۷۶۵ بالاترین گرادیان در محور اول را دارند. به همین ترتیب برخی خصوصیات و تیمارها در محور دوم گرادیان بالاتری را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر ویژه صفات مورد بررسی تحت شرایط سطوح تنش شوری و گاما آمینو بوتیریک اسید در آنالیز PCA

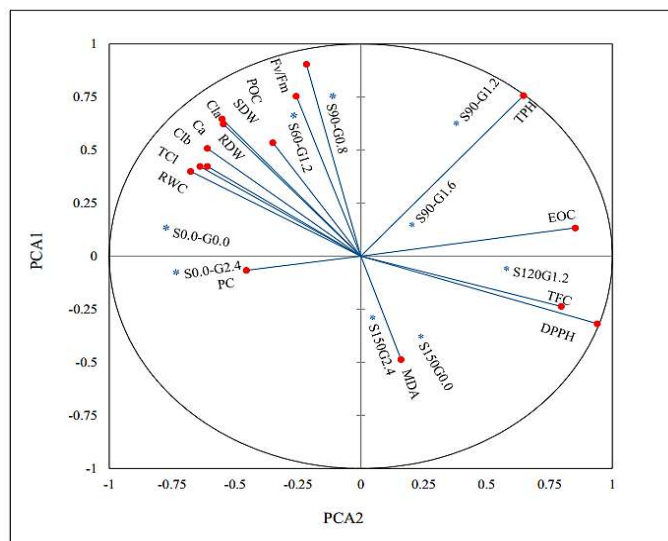
PCA3	PCA2	PCA1	اختصار	متغیر	PCA3	PCA2	PCA1	اختصار	متغیر
-۰/۱۳۱	۰/۹۰۱۱	-۰/۲۱۱	POC	اکسید پیریتنون	-۰/۳۵۲	-۰/۲۳۴	۰/۷۶۲	TFC	کل فلاونوئیدها
-۰/۴۰۱	۰/۴۲۵	-۰/۶۴۲	RWC	آب نسبی برگ	۰/۰۷۹	۰/۷۵۷	۰/۶۴۵	TPh	کل فنلها
-۰/۳۷۱	۰/۶۷۱	-۰/۵۵۲	ShDW	وزن خشک ساقه	۰/۹۳۱	-۰/۳۱۸	۰/۹۴۱	DPPH	فعالیت DPPH
-۰/۲۳۵	۰/۱۳۲	-۰/۷۵۴	S0 G0	شوری -۰ GABA	-۰/۰۸۶	-۰/۱۶۷	-۰/۴۵۵	PC	محتوای پرولین
۰/۳۵۲	-۰/۲۴۵	۰/۲۴۱	S150 G0	شوری -۰ GABA	۰/۷۴۲	-۰/۴۸۱	۰/۱۹۵	MDA	مالوندی‌آلدئید
۰/۲۱۴	-۰/۰۷۵	-۰/۷۶۵	S0 G2.4	شوری -۰ GABA ۲/۴	-۰/۴۱۲	۰/۵۲۱	-۰/۴۱۲	Ca	کاروتنوئیدها
۰/۴۵۱	-۰/۲۶۱	۰/۰۱۵	S150 G2.4	شوری -۱۵۰ GABA ۲/۴	-۰/۷۳۴	۰/۵۳۴	-۰/۴۱۲	Cl _a	محتوای کلروفیل a
۰/۳۱۲	۰/۶۴۲	-۰/۲۶۱	S60 G1.2	شوری -۶۰ GABA ۱/۲	-۰/۶۴۵	۰/۴۲۱	-۰/۶۱۲	Cl _b	محتوای کلروفیل b
۰/۴۱۲	-۰/۰۲۴	۰/۵۵۱	S120 G1.2	شوری -۱۲۰ GABA ۱/۲	-۰/۴۰۵	۰/۵۰۲	-۰/۶۱۲	TCl	محتوای کل کلروفیل
-۰/۱۲۴	۰/۶۳۱	-۰/۴۸۱	S90 G0.8	شوری -۹۰ GABA ۰/۸	-۰/۵۶۳۶	۰/۷۲۲	-۰/۲۵۴	Fv/Fm	نسبت Fv/Fm
۰/۲۴۵	۰/۲۲۱	۰/۲۳۱	S90 G1.6	شوری -۹۰ GABA ۱/۶	-۰/۲۹۱	۰/۶۰۳	-۰/۴۸۴	RDW	وزن خشک ریشه
۰/۳۵۶	۰/۶۶۲	۰/۲۸۱	S90 G1.2	شوری -۹۰ GABA ۱/۲	-۰/۳۹۲	۰/۱۳۲	۰/۸۵۰	EOC	محتوای اسانس

شکل (۴) نمودار دوبعدی PCA فاکتورهای مورد ارزیابی و متابولیت‌های ثانویه گیاه نعنای آناسی را در ارتباط با سطوح مورد استفاده GABA و تنش شوری نشان می‌دهد. بر اساس نتایج تغییر برخی از فاکتورهای مورد

ارتباط با سطوح مورد استفاده GABA و تنش شوری نشان می‌دهد. بر اساس نتایج تغییر برخی از فاکتورهای مورد

محتوای فنل (TPH) با شوری ۹۰ میلی مولار-GABA ۱/۲ در یک گروه قرار می گیرند.

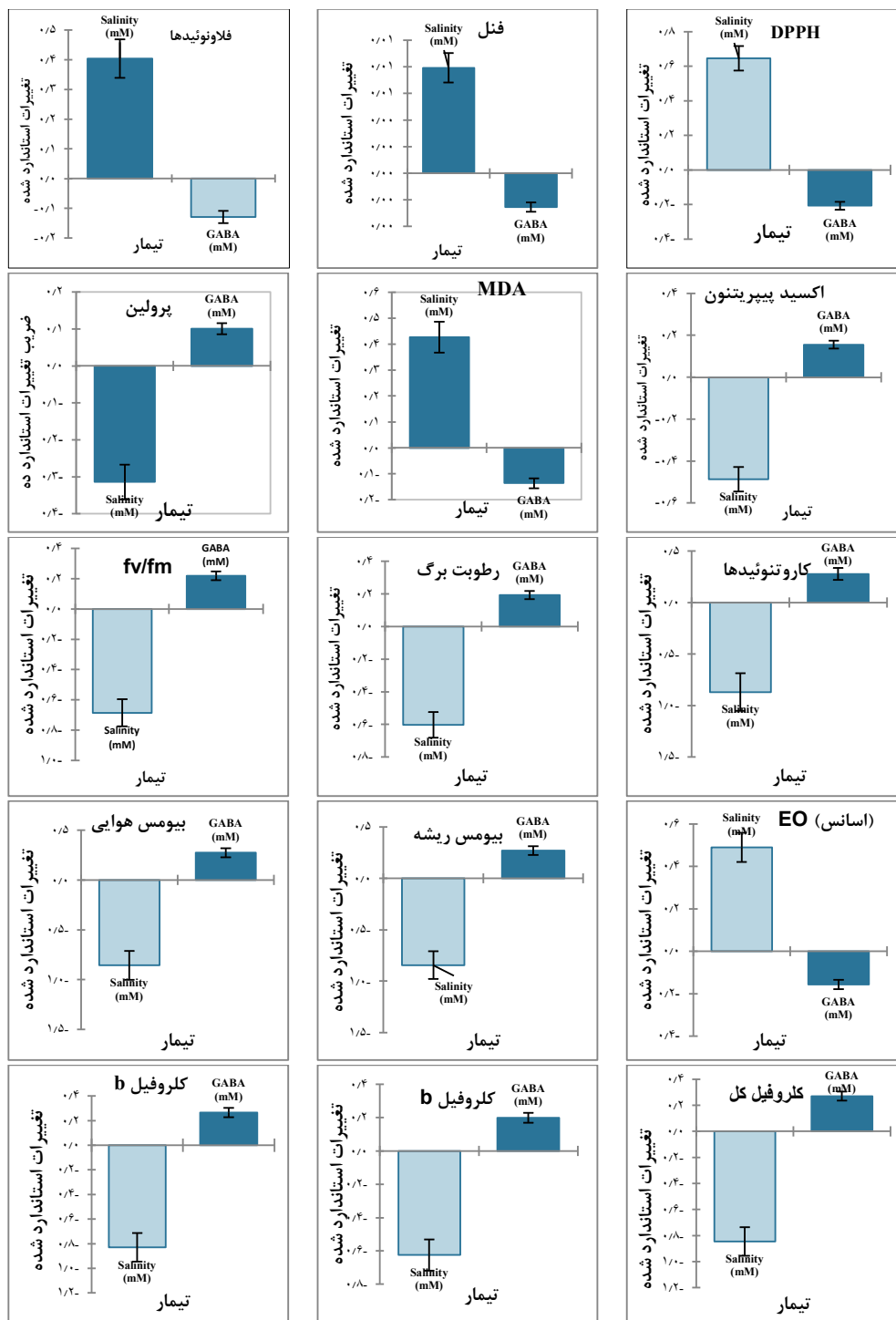
ارزیابی با تیمارهای مورد استفاده دارای ارتباط بوده به طوری که برای مثال طول گرادیان و مختصات فضایی کل



شکل ۴: توزیع فضایی فاکتورهای فیزیولوژیکی گیاه در ارتباط با سطوح مورد استفاده گاما آمینو بوتیریک اسید و تنش شوری

TFC= Total flavonoids content, TPH= Total phenols content, DPPH= DPH-scavenging, P= Proline, RWC= Relative water)
MDA, Cla= Chlorophyll a content, Clb= Chlorophyll b content, Ca= Carotenoids, Fv/Fm ratio, SDW= Shoot dry weight, content,
RDW= Root dry weight, EOC= Essential oils content, POC= Piperitenone oxide content, TCI= Total Chlorophyll).

شکل زیر بیشینه اثر مثبت یا منفی سطوح مورد استفاده GABA و تنش شوری را بر عاملهای فیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه گیاه نشان می دهد. تنش شوری با ضرایب ۰/۰۰۸ و ۰/۸۳- به ترتیب حداقل و حداکثر تأثیر را بر محتوای فنل و زی توده ریشه داشته اند. کاربرد GABA نیز به ترتیب با ضرایب ۰/۰۰۳ و ۰/۲۷۴ حداقل و حداکثر تأثیر را بر محتوای فنل و زی توده هوایی داشته اند. به طور کلی تأثیرات گاما آمینو بوتیریک اسید و تنش شوری کاملاً معکوس یکدیگر بوده است (شکل ۵).



شکل ۵: میزان تغییرات خصوصیات مورد ارزیابی در ارتباط با سطوح مورد استفاده گاما آمینو بوتیریک اسید و تنش شوری

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج و کاهش شدید عملکرد زی توده هوایی و ریشه، تنش بسیار شدید شوری (یعنی بیش از ۹۰ میلی‌مولار) فراتر از آستانه تحمل شوری نعیان بود. با این حال، در شرایط شوری متوسط (یعنی ۳۰ تا ۹۰ میلی‌مولار)، اکثر شاخص‌های مرتبط با تنش (کل پلی‌فنل‌ها، کل فلاونوئید، مهار رادیکال DPPH، محتوای نسبی آب، محتوای پرولین، محتوای رنگ‌دانه‌ها و حداکثر بازده کوانتومی PSII) به مقدار قابل توجهی تغییر نمودند. همچنین اثرات تنش شوری با استفاده هم‌زمان از سطوح میانی GABA (یعنی ۱/۶-۰/۸ میلی‌مولار) کاهش یافت. تجزیه و تحلیل بهینه‌سازی پیش‌بینی کرد که در زیر ۱۲۰ میلی‌مولار یا سطوح پایین‌تر تنش NaCl، استفاده از محلول رقیق GABA (یعنی ۰/۲-۰/۱ میلی‌مولار) تأثیر مثبتی بر وزن خشک شاخه، محتوای اسانس و مقدار اکسید پیپریتون برای به دست آوردن بالاترین مقدار دارد.

پروولین تحت تنش تغییرات معنی‌داری را نشان داد. پروولین یک ایمینواسید سازگار است و به عنوان یک مخزن نیتروژن در سلول‌های گیاهی تحت تنش‌های محیطی عمل می‌کند (۲۵). در واقع پروولین انباشته شده تحت شوری به بازیابی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از استرس از طریق خاموش کردن کارآمد ROS و تنظیم ردوکس کمک می‌کند (۲۶، ۲۵). این تغییر پروولین در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (۱۴).

کلروفیل یک پیش‌نیاز برای فرایندهای فتوسنتزی است و کاهش تولید رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و کاهش ظرفیت آن‌ها یک عامل تعیین‌کننده برای کاهش رشد گیاه در هنگام قرار گرفتن در معرض تنش‌های محیطی است (۲۷). محتوای کلروفیل بیشتر گیاهان را قادر می‌سازد تا تحت منبع محدود نور ظرفیت فتوسنتزی را بهبود بخشند (۱۱). بنابراین کاربرد GABA می‌تواند کاهش سطح کلروفیل را تحت تنش NaCl به تأخیر بیندازد. در مقابل، تحقیقات دیگری نشان داد که تحت شرایط نرمال بدون تنش، کاربرد GABA تغییر شکل از کلروفیل a به کلروفیل b را محدود می‌کند که این امر منجر به تغییر در نسبت

محتوای این دو کلروفیل شده و نهایتاً فتوسنتز را متحول می‌کند (۹).

از سویی محتوای کلروفیل به شدت تحت تنش شوری-قلیایی کاهش می‌یابد، درحالی‌که پیش تیمار GABA این روند را معکوس کرد و الگوهای بیان ژن مرتبط را کاهش می‌دهد و تجمع بیش‌ازحد کلروفیل و پیش سازهای آن تحت تنش شوری ممکن است باعث آسیب اکسیداسیون نوری شود که در نهایت می‌تواند باعث آسیب غشاء شود (۹). تحت تنش شوری، پروتئین‌های فتوسیستم دنا توره می‌شوند، زنجیره انتقال الکترون مختل می‌شود و بنابراین عدم تعادل ردوکس را می‌توان به وفور یافت (۲۸). چنین می‌تواند استنباط کرد که با افزایش ارزش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی Fv/Fm مقدار بیشتری از زی توده تولید می‌شود. این یافته‌ها با نتایج گزارش شده پیشین مطابقت کامل دارد چنانچه سلامت سیستم‌های فتوسنتزی، به‌ویژه واحدهای دریافت‌کننده نور PSII، برای تولید زیست‌توده بالاتر بسیار مهم است (۲۹).

تغییر مسیر متابولیک همراه با افزایش مقادیر محصولات مرتبط با استرس (به‌عنوان مثال ترکیبات اسانس و پلی‌فنل‌ها) ممکن است به سازوکار افزایش تحمل گیاه کمک کند (۵). در تأیید یافته‌های این تحقیق ما، GABA بیان ژن و مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها را در گیاه چای را دچار تغییر نموده است (۳۰)، و این امر می‌تواند به شدت از تأثیرات منفی گیاهان در برابر تنش NaCl محافظت کند (۱۱). به‌رحال مقاومت گیاه در برابر شوری به شبکه ژنی تنظیمی پیچیده، عوامل رونویسی، آنزیم‌ها و فیزیولوژی گیاه بستگی دارد (۶). تغییرات متابولیت‌های ثانویه این مطالعه نشان داد که این تغییر به دلیل نیاز گیاه به مولکول‌های دفاع‌کننده برای کمک به بقای آن‌ها در شرایط نامطلوب است. از طرفی آسیب‌های اسمزی و شوک‌های اکسیداتیو ناشی از NaCl متابولیسم طبیعی سلول‌های گیاهی را مختل می‌کند و رشد گیاه و عملکرد زی توده را محدود می‌کند (۱۵). در واقع شوری شدید می‌تواند باعث تحریک فرایندهای اکسیداسیون و باعث تشدید آسیب‌های فتوسنتزی و کاهش فعالیت فتوسنتز شود که GABA این اثرات را تا حدودی خنثی می‌کند (۳۱).

به‌طور مشابه محتوای افزایش‌یافته پرولین و فلاونوئید و اسیدهای فنولیک تحت شوری در گونه *Thymus vulgaris* گزارش شده است (۷). در مطالعه قبلی نیز روند افزایشی فلاونوئیدها تحت تنش اسمزی به‌دست آمده است به‌طوری‌که استفاده از انواع اسیدآمین‌ها مانند سیتروپین در ۲ میلی‌مولار و در شرایط کمبود شدید آب می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی فعالیت مهار DPPH را افزایش دهد که به‌عنوان یک املاح سازگار و پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد با تسکین تنش کم‌آبی عمل می‌کنند (۲۲). در بیشتر تحقیقات انجام‌شده، افزایش مقادیر پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها تحت کاربرد GABA یا سایر اسیدهای آمینه عمدتاً به افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمینولیز (PAL) و همچنین به کاهش بیان و فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) نسبت داده می‌شود (۱۹، ۳۲).

علاوه بر این، پرولین، فنل، و فعالیت مهار رادیکال DPPH بر خلاف وزن خشک ریشه/ساقه، محتوای رنگ‌دانه، Fv/Fm، محتوای پرولین و غلظت MDA تغییر داشتند که مشابه تغییرات مرتبط با آنتی‌اکسیدان و محتوای اسانس بود. مطالعات اخیر نیز تأیید نموده که تنش‌های محیطی به‌طور اجتناب‌ناپذیری می‌توانند از سطح راندمان سنتزی گرم (Fv/Fm ratio) پایین بیابند (۸، ۲۷). بنابراین کاربرد GABA می‌تواند از کاهش پارامترهای فتوسنتزی و محتوای رنگ‌دانه‌ها جلوگیری کند، چه به‌تنهایی یا همراه با شوری و استرس اسمزی استفاده شود (۳۳).

همچنین محتوای MDA با افزایش تدریجی غلظت NaCl افزایش یافت و کاربرد GABA موجب تحلیل اثرات منفی تنش شوری شد. محتوای MDA به‌عنوان یک شاخص مهم از شدت آسیب اکسیداتیو به غشاهای بیولوژیکی در نظر گرفته می‌شود (۲۵). کاربرد GABA می‌تواند آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن را مهار کند و سطوح MDA را کاهش دهد، بنابراین یکپارچگی غشای سلولی را تحت تنش اسمزی ناشی از شوری افزایش می‌دهد. مشابه با این

یافته‌های کاربرد GABA تحت تنش شوری-قلیایی، محتوای MDA را از طریق تعدیل فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی و تعادل ردوکس در گونه *Zoysia japonica* کاهش داده است (۱۵). در واقع تجمع اسیدهای آمینه مانند GABA در برگ‌ها ممکن است باعث ایجاد آب با پیوند هیدروژنی قوی در اطراف پروتئین‌ها شود و در نتیجه از آرایش ذاتی پلیمرهای پروتئین‌زای غشاها محافظت کند تا مقدار MDA را کاهش دهد (۱۱). یک ناقل در میتوکندری، GABA را از سیتوزول به داخل میتوکندری می‌برد تا واکنش تبدیل آن به نیمه آلدئید سوکسینیک را از طریق آنزیم دیگری به نام GABA ترانس آمیناز کاتالیز کند. متعاقباً، نیمه آلدئید سوکسینیک به سوکسینات تبدیل می‌شود، که می‌تواند وارد چرخه TCA شود و الکترون را به زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی برای پشتیبانی از تولید کافی ATP و کاهش تجمع ROS هدایت کند (۳۱).

به‌طور کلی نتایج رسته‌بندی خصوصیات مورد ارزیابی تحت تیمارهای شوری به شکل معناداری متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاه نعنای آناناسی را تحت تأثیر قرارداد. کاربرد GABA موجب تقلیل تأثیر تنش شوری و بهبود عملکرد گیاه شد. با توجه به تنش‌های محیطی و اهمیت تولیدات گیاهان دارویی گیاه نعنای آناناسی مخصوصاً تحت تنش شوری می‌توان به کمک اصلاحگرهای بر پایه آمینواسید مانند GABA موجب حفظ و یا بهبود عملکرد این گونه ارزشمند شد. بنابراین، استفاده ایمن از GABA نه‌تنها اقتصادی به نظر می‌رسد، بلکه می‌تواند امکان تولید نعنای آناناسی را به‌عنوان یک گیاه دارویی اسانس دار در خاک‌های شور نیز فراهم کند.

سپاسگذاری: این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی و بین‌المللی (CISSC) وزارت علوم، تحقیقات و فناوری انجام شده است.

References

1. Benabdallah, A., M. Boumendjel, O. Aissi, C. Rahmoune, M. Boussaid & C. Messaoud, 2018. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. *South African Journal of Botany*, 116:131–9.
2. Baek, J.P., K.W. Park, L.E. Craker & H.M. Kang, 2016. Changes in growth and quality of three mint cultivars at different harvesting periods. *Hortic Environ Biotechnol*, 57:207–12.
3. De Souza, A.V.V., U.S. Dos Santos, J. R. de Sá Carvalho, B.D.R. Barbosa, K.M. Canuto & T.H.S. Rodrigues, 2018. Chemical composition of essential oil of leaves from *Lippia schaueriana* Mart. collected in the Caatinga area. *Molecules*, 23(10): 2480.
4. Kasrati, A., C.A. Jamali, K. Bekkouche, H. Wohlmuth, D. Leach & A. Abbad, 2014. Plant growth, mineral nutrition and volatile oil composition of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley cultivated under salt-stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 59: 80-84.
5. Selmar, D. & M. Kleinwächter, 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42: 558-566.
6. Li, Y., D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman & H. Wu, 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148: 80-89.
7. Bistgani, Z.E., M. Hashemi, M. DaCosta, L. Craker, F. Maggi & M.R. Morshedloo, 2019. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135: 311-320.
8. Morshedloo, M.R., L.E. Craker, A. Salami, V. Nazeri, H. Sang & F. Maggi, 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111: 119-128.
9. Jin, X., T. Liu, J. Xu, Z. Gao & X. Hu, 2019. Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. *BMC plant biology*, 19(1):1-15.
10. Kiumarzi, F., M.R. Morshedloo, S.M. Zahedi, H. Mumivand, F. Behtash, C. Hano & J. M. Lorenzo, 2022. Selenium nanoparticles (Se-NPs) alleviates salinity damages and improves phytochemical characteristics of pineapple mint (*Mentha suaveolens* Ehrh.). *Plants*, 11(10): 1384.
11. Wu, X., Q. Jia, S. Ji, B. Gong, J. Li, G. Lü & H. Gao, 2020. Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in Tomato by modulating Na⁺ uptake, the GAD gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism. *BMC Plant Biology*, 20: 1-21.
12. Zarei, A., G.Z. Chiu, G. Yu, C.P. Trobacher & B.J. Shelp, 2017. Salinity-regulated expression of genes involved in GABA metabolism and signaling. *Botany*, 95(6): 621-627.
13. Routray, W & K. Rayaguru, 2018. 2-Acetyl-1-pyrroline: A key aroma component of aromatic rice and other food products. *Food Reviews International*, 34(6): 539-565.
14. Xie, W., U. Ashraf, D. Zhong, R. Lin, P. Xian, T. Zhao & Z. Mo, 2019. Application of γ -aminobutyric acid (GABA) and nitrogen regulates aroma biochemistry in fragrant rice. *Food Science & Nutrition*, 7(11): 3784-3796.
15. Li, S., H. Jin & Q. Zhang, 2016. The effect of exogenous spermidine concentration on polyamine metabolism and salt tolerance in *Zoysiagrass* (*Zoysia japonica* Steud) subjected to short-term salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 7:1221.
16. Aghdam, M.S. & J.R. Fard, 2017. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria* × *anannasa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chemistry*, 221: 1650-1657.
17. Hoagland, D.R. & D.I. Arnon, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
18. Bates, L.S., R.A. Waldren & I.D. Teare, 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39: 205-207.

19. Heath, R.L. & L. Packer, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
20. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73: 149-156.
21. Ahmadi, H., M.R. Morshedloo, R. Emrahi, A. Javanmard, F. Rasouli, F. Maggi & J.M. Lorenzo, 2022. Introducing three new fruit-scented mints to farmlands: Insights on drug yield, oil essential quality, and antioxidant properties. *Antioxidants*, 11(5): 866.
22. Morshedloo, M.R., S. Fereydouni, H. Ahmadi, M.B. Hassanpouraghdam, A. Aghaee, L.V. Mehrabani & F. Maggi, 2022. Natural diversity in fatty acids profiles and antioxidant properties of sumac fruits (*Rhus coriaria* L.): Selection of preferable populations for food industries. *Food Chemistry*, 374: 131757.
23. Saadatfar, A., S. Hossein Jafari & I. Tavassolian, 2020. Effect of edaphic conditions on phytochemical latex yield of bitter asafetida (*Ferula assa-foetida* L.) medicinal plant in two natural habitats in Kerman province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 8(1): 1-15.
24. Adams, R.P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing.
25. Ahmadi, H., M. Babalar, M.A.A. Sarcheshmeh, M.R. Morshedloo & M. Shokrpour, 2020. Effects of exogenous application of citrulline on prolonged water stress damages in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): Antioxidant activity, biochemical indices, and essential oils profile. *Food Chemistry*, 333: 127433.
26. Mohammadi, H., M. Ghorbanpour & M. Brestic, 2018. Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Ind Crops Production*, 122:119–32.
27. Emrahi, R., M.R. Morshedloo, H. Ahmadi, A. Javanmard & F. Maggi, 2021. Intraspecific divergence in phytochemical characteristics and drought tolerance of two carvacrol-rich *Origanum vulgare* subspecies: Subsp. *hirtum* and subsp. *gracile*. *Industrial Crops and Products*, 168: 113557.
28. Kalamartzis, I., G. Menexes, P. Georgiou & C. Dordas, 2020. Effect of water stress on the physiological characteristics of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Agronomy*, 10(7):1029.
29. Baghbani-Arani, A., S.A.M. Modarres-Sanavy, M. Mashhadi-Akbar-Boojar & A. Mokhtassi-Bidgoli, 2017. Towards improving the agronomic performance, chlorophyll fluorescence parameters and pigments in fenugreek using zeolite and vermicompost under deficit water stress. *Ind Crops Production*, 109:346–57.
30. Liao, J., Q. Shen, R. Li, Y. Cao, Y. Li, Z. Zou, T. Ren, F. Li, W. Fang & X. Zhu, 2021. GABA shunt contribution to flavonoid biosynthesis and metabolism in tea plants (*Camellia sinensis*). *Plant Physiol Biochem*, 166:849–56.
31. Aghdam, M.S., R. Naderi, A. Jannatizadeh, M. Babalar, M.A.A. Sarcheshmeh & M.Z. Faradonbe, 2016. Impact of exogenous GABA treatments on endogenous GABA metabolism in anthurium cut flowers in response to postharvest chilling temperature. *Plant Physiol Biochem*, 106:11–5.
32. Shekari, A., R.N. Hassani & M.S. Aghdam, 2021. Exogenous application of GABA retards cap browning in *Agaricus bisporus* and its possible mechanism. *Postharvest Biology and Technology*, 174: 111434.
33. Sheteiwy, M.S., H. Shao, W. Qi, Y.A. Hamoud, H. Shaghaleh, N.U. Khan & B. Tang, 2019. GABA-alleviated oxidative injury induced by salinity, osmotic stress and their combination by regulating cellular and molecular signals in rice. *International journal of molecular sciences*, 20(22):5709.