E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/
Vol. 37, No.3. (2024) Autumn, 11-22
https://doi.org/10.22051/jab.2024.43026.1557

Paper Type: Original Article

The Effect of Mycorrhizal Inoculation on Growth Characteristics, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Nepeta Binaludensis* Jamzad

Ali Ganjeali*[1], Nasrin Rajabi[2], Faezah Bayat[1]

[1]*Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran;*(Professor: Corresponding author: ganjeali@um.ac.ir).*

[2]*Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.*

Citation:

Ganjali, A., Rajabi, N. & Bayat, F. (2024). The effect of mycorrhizal inoculation on growth characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Nepeta Binaludensis* Jamzad. *The quarterly scientific journal of applied biology, Volume* 37 (Issue No. 3), PP. 11-22

Received: 2023.04.06 Accepted: 2024.10.28

Abstract

Introduction: *Nepeta Binaludensis* Jamzad is a perennial and herbaceous species of the *Laminasea* family. Limited distribution, indiscriminate harvesting and destruction of natural habitats have put this plant in danger of extinction. In this research, the effect of different species of mycorrhiza fungi including: *Glomus hoi*, *Glomus interaradis* and *Glomus mossea* on the morphological and biochemical characteristics of *N. binaludensis* were investigated.

Methods: In this experiment, 1 Kg pots containing garden soil were considered as experimental units. *Mycorrhiza* species were added to three cm above the soil. The plants were grown for 20 weeks at 25° C and with a photoperiod of 16 / 8 hours of light/darkness.

Results: The results showed that fungal species, especially *G. intraradices*, had considerably effect on most morphological characteristics. The highest content of total phenol, flavonoids and antioxidant capacity were recorded in plants inoculated with *G. intraradices*. Also, the accumulation of nutrients such as calcium, potassium, iron, magnesium and phosphorus in mycorrhizal plants was significantly higher than the control plants.

Conclusion: The results of this study confirmed that the use of mycorrhizal fungi as biological and environmentally friendly fertilizers can be a suitable alternative for chemical fertilizers.

Keywords: *Nepeta Binaludensis*, Morphological traits, Total phenol, Mycorrhiza fungi weight

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۷، شماره ۳، پیاپی ۸۱، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۲۲-۱۱
https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2024.43026.1557

نوع مقاله: پژوهشی

تاثیر گونه‌های مختلف میکوریز بر خصوصیات رشدی، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta Binaludensis*)

علی گنجعلی*[1]، نسرین رجبی[2]، فائزه بیات[2]

[1]استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
(*نویسنده مسئول: *ganjeali@um.ac.ir*)
[2]کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

چکیده

مقدمه: گیاه پونه‌سای بینالودی با نام علمی (*Nepeta Binaludensis*) گونه‌ای چندساله و علفی از خانواده نعنائیان می‌باشد. این گیاه به دلیل وجود ترکیبات موثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد اما از سویی به دلیل افزایش برداشت گیاه از عرصه، در خطر انقراض قرار گرفته است پس باید راه‌کار مناسبی جهت افزایش زیست توده گیاه در عین حفظ این گونه گیاهی در نظر گرفته شود.

روش‌ها: در این پژوهش تاثیر گونه‌های مختلف قارچ میکوریز شامل *Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea* بر خصوصیات رویشی و میزان ترکیبات شیمیایی پونه‌سا بینالودی مورد بررسی قرار گرفت. گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی خاک باغچه به عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شدند. گیاهان در شرایط فیتوترون با دوره نوری ۱۶ و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی و تاریکی به مدت ۲۰ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رشد کردند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میکوریز و بویژه گونه *G. intraradices* تاثیر معنی داری بر اغلب صفات مورفولوژیکی گیاه داشت. در این مطالعه بیشترین میزان فنل کل (۲۹۶/۹۱ mg/100 g DW)، فلاونوئیدکل (۳۳/۵ mg/100 g DW) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به گیاهان تلقیح شده با گونه *G. intraradices* مربوط بود. همچنین انباشت عناصر غذایی مانند کلسیم، پتاسیم، آهن، منیزیم و فسفر در گیاهان میکوریزی به صورت معنی داری بیشتر از گیاهان شاهد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی موید آن است که استفاده از قارچهای میکوریز به عنوان کودهای بیولوژیک و سازگار با محیط زیست می‌تواند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی باشند.

کلیدواژه‌ها: پونه‌سا بینالودی، صفات مورفولوژیکی، فنل کل، قارچ میکوریز

مقدمه

پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis* Jamzad) گیاهی است چند ساله، دولپه و متعلق به خانواده نعنائیان (*Laminasea*) می‌باشد. در طب سنتی از این گیاه در درمان ناراحتی‌های تنفسی، آسم، سرماخوردگی و ناراحتی قلبی استفاده می‌شود [1]. در سال‌های اخیر برداشت بی‌رویه توسط افراد بومی، چرای مفرط دام و تخریب رویشگاه‌های طبیعی خطر انقراض این گیاه را به دنبال داشته است. یکی از روش‌های بهبود زیست توده گیاهان و نیز حفظ سیستم حیاتی خاک، استفاده از کودهای زیستی و سازگار با محیط زیست می‌باشد [2].

قارچ‌های میکوریزای آربسکولار از جمله میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشند که قادر به ایجاد رابطه همزیستی با ریشه گیاهان بوده و روی رشد غالب گیاهان اثرگذار است [3]. نتایج برخی تحقیقات حاکی از آن است که تقریبا ۹۰ درصد گیاهان خشکی‌زی قادر به ایجاد رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزی هستند که از نظر تکاملی برای گیاهان، جهت مقابله با بسیاری از چالش‌های محیطی مهم تلقی می‌شوند [4]. این قارچ‌ها به عنوان یکی از ریزجانداران مفید خاک نقش مهمی در تولید کودهای بیولوژیک دارند، همچنین از طریق ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و اکولوژیکی در گیاه میزبان خود عملکرد آن را افزایش داده و امکان توسعه و کاشت گیاهان در خاک‌هایی با شرایط نامساعد را فراهم می‌نمایند [5]. به طور مثال نقش فعال هیف در انتقال آب در رابطه همزیستی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با گیاهان مناطق خشک انکارناپذیر است [6].

در بررسی‌های دیگر نقش کلیدی قارچ میکوریزی در افزایش جذب عناصر غذایی به خصوص فسفر به دلیل افزایش حجم خاک قابل دسترس گیاه توسط ریسه‌های قارچ و افزایش جذب عناصر غذایی و در رشد گیاه متعاقب آن تایید شده است [7]. همچنین مطالعات قبلی تایید می‌کنند که میکوریزها می‌توانند از طریق سنتز آنزیم فسفاتاز امکان دسترسی به منابع فسفر را بهبود دهند، علاوه بر این برخی از انواع میکوریزها اسیدهای کلات کننده تولید می‌کنند و از این طریق حلالیت فسفر را برای جذب افزایش می‌دهند [8].

افزایش ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید [9]، فنل و فلاونوئید در گیاهان دارای رابطه همزیستی با قارچ میکوریز گزارش شده است [10]، [11]، [12]. از سویی دیگر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مترشحه از گیاه در القای جوانه زنی اسپورهای قارچ، رشد میسلیوم‌ها و کلونیزاسیون ریشه توسط میکوریز نقش کلیدی ایفا می‌نمایند [13]. علاوه بر این ترشح ترکیبات فلاونوئید از ریشه گیاه به ریزوسفر در محافظت گیاه در برابر حمله آفات نقش مهمی داشته و عملکرد ریشه را تنظیم می‌کند [10].

گیاهان میکوریزی اغلب سرعت فتوسنتز خود را به روش‌های مختلف از قبیل افزایش سطح برگ، افزایش مقدار تثبیت دی‌اکسیدکربن به ازای واحد وزن برگ و تغییر روابط آبی و هورمونی افزایش می‌دهند تا نیازهای همزیست خود را تامین نمایند [14].

به طور کلی موفقیت‌های متعددی در همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریزی حاصل شده است که از آن جمله می‌توان به بهبود جذب عناصر غذایی مهم مانند: فسفر و نیتروژن [15]، سنتز متابولیت‌های ثانویه [16]، احیای پوشش گیاهی [17] و همچنین بهبود تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اشاره کرد [18]، [19]، [20]، [21]. کاهش اثرات تنش زیستی توسط AMF از طریق تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی همچون تغییردر اندازه گیاه، فنولوژی و تغذیه در گیاه عمل می‌کند [22].

تلقیح گیاه ذرت با میکوریز گونه‌های *G. intraradices* و *G. mosseae* به طور قابل توجهی جذب فسفر و نیتروژن بافت گیاه را افزایش داد [23]. گزارش‌هایی از تاثیر *G. intraradis* بر گیاه جو در افزایش غلظت فسفر و پتاسیم ارایه شده است [24]. از سویی این همزیستی اثرات قابل توجهی بر صفات موفولوژیکی گیاه داشته است، مثلا در تلقیح *G. intradices* با گیاه شبدر نسبت اندام هوایی به ریشه در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است [25]. همچنین در بررسی دیگر تلقیح گیاه زیتون و خارگوزن (*Rhamnus* sp.) با *G. intraradises* به صورت معنی‌داری سرعت فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و غلظت فسفر برگ را در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد افزایش داد [26].

در پژوهشی دیگر گیاهان میکوریزی رزماری تحت شرایط تنش خشکی، از زیست تودهٔ ریشه و اندام‌های هوایی بیشتری در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزایی برخوردار بودند [27]. شواهد زیادی مبنی بر افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاهان میکوریزایی نسبت به گیاهان شاهد ارایه شده است، بطور مثال در همزیستی گیاه تنباکو با قارچ‌های میکوریزی محتوای نیتروژن، کلروفیل و پروتئین برگ به صورت معنی‌داری افزایش یافت [28].

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد قارچ‌های میکوریز در نتیجه ایجاد یک رابطه همزیستی با گیاهان میزبان، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر تلقیح قارچ‌های Vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) بر خصوصیات ریخت‌شناسی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاه پونه‌سای بینالودی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تاثیر کاربرد ۳ نوع قارچ *Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea* و شاهد (بدون کاربرد قارچ) بر خصوصیات رشدی و ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه پونه‌سای بینالودی در یک دوره ۲۰ هفته‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. گلدان‌های یک کیلوگرمی که با نسبت ۱:۲ (ماسه نرم و خاک باغچه) پر شدند ، به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شدند. به ازای هر یک کیلوگرم خاک، ۱۰۰ گرم پودر قارچ، حاوی ۱۰ تا۱۵ هزار اسپور (شرکت کود بیولوژیک میکوریزا) به سه سانتی متری سطح بالایی خاک افزوده شد.

بذرهای پونه‌سای بینالودی بعد از جمع آوری از عرصه و شستشو با آب جاری در شش قسمت گلدان در عمق یک سانتی متری کشت شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. رطوبت گلدان‌ها در سراسر دوره رشد حدود ۸۰ الی ۹۰ درصد ظرفیت زراعی تنظیم شد قبل از کاشت، آزمون خاک جهت سنجش برخی از عناصر موجود در خاک شامل کلسیم، فسفر، سدیم و پتاسیم انجام شد (**جدول ۱**).

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی

پس از پایان دوره آزمایش (۲۰ هفته)، گیاهان از گلدان خارج شده و به دو قسمت اندام هوایی و ریشه تقسیم شدند. صفات ریخت‌شناسی شامل ارتفاع بخش هوایی، وزن خشک بخش هوایی، سطح برگ و صفات مربوط به ریشه شامل طول، قطر و سطح ریشه بعد از تمیز شدن و خارج کردن آب سطح ریشه با استفاده از دستگاه اسکنر متصل به کامپیوتر (Delta-T Scan انگلستان) اسکن و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Root Edge اندازه گیری شد. به منظور تعیین وزن خشک بخش هوایی و ریشه، نمونه به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و سپس با ترازو وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

تهیه عصاره متانولی

به منظور تهیه عصاره متانولی مقدار ۰/۲۵ گرم نمونه‌های خشک شده گیاه با ۲۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (وزنی/حجمی) به مدت نیم ساعت در دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری شد. سپس لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ و در نهایت پس از صاف شدن، زیر هود شیمیایی به منظور تبخیر حلال قرار داده شدند. عصاره خشک حاصل جمع‌آوری، توزین و تا زمان سنجش‌های بیوشیمیایی در فریزر و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند [29].

تعیین محتوی فنل کل اندام هوایی

جهت اندازه‌گیری مقدار فنل کل میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچیو (۱۰درصد) و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر ترکیب و در نهایت میزان ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد (وزنی/حجمی) اضافه و به مدت ۲ ساعت در تاریکی و دمای محیط قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر UV-120-02 (Shimadzu، ژاپن) ثبت گردید و میزان فنل کل بر اساس منحنی استاندارد گالیک‌اسید محاسبه شد [30].

سنجش محتوای فلاونوئید کل اندام هوایی

جهت انجام این سنجش میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره گیاهی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار آبی افزوده و در نهایت حجم محلول با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای محیط قرار گرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر ثبت شد محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌ها با کمک منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد [31].

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی بر اساس مهار رادیکال DPPH

در ابتدا یک محلول پایه از عصاره، با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس برای تهیه غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره، مقادیر ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول پایه برداشته شد و با متانول خالص به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. در این آزمایش از آسکوربات به عنوان کنترل مثبت استفاده شد بنابراین تمامی این غلظت‌ها (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای آسکوربات نیز تهیه شد. غلظت DPPH مورد نیاز جهت این بررسی ۰/۰۰۸ درصد (وزنی/حجمی) بود. آزمون DPPH به روش Deng و همکاران (۲۰۱۱) [32] در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای انجام شد به این ترتیب که در هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های حاصل از عصاره یا آسکوربات تهیه شده ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH به آن اضافه شد. از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص به عنوان بلانک و از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر متانول خالص و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH به عنوان شاهد استفاده شد. ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای محیط قرار گرفت پس از گذشت این مدت زمان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (Statfax-2100) خوانده شد.

شاخص آنتی اکسیدانی بر اساس این فرمول محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \{1 - \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب بلانک}}{\text{جذب کنترل}}\} \times 100$$

سنجش عناصر غذایی در بخش هوایی

برای بررسی میزان انباشتگی عناصر پتاسیم، کلسیم، فسفر و آهن در بخش هوایی، خاکستر تر گیاهی تهیه شد [33] و از اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) برای تعیین غلظت عناصر غذایی بافت استفاده شد (SPECTROARCOS, 76004555).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-24 انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ($p<0/05$) انجام گردید و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

نتایج تعیین غلظت برخی از عناصر ریز مغذی موجود در خاک گلدان های مورد استفاده در آزمایش، در **جدول ۱** نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج آزمون خاک

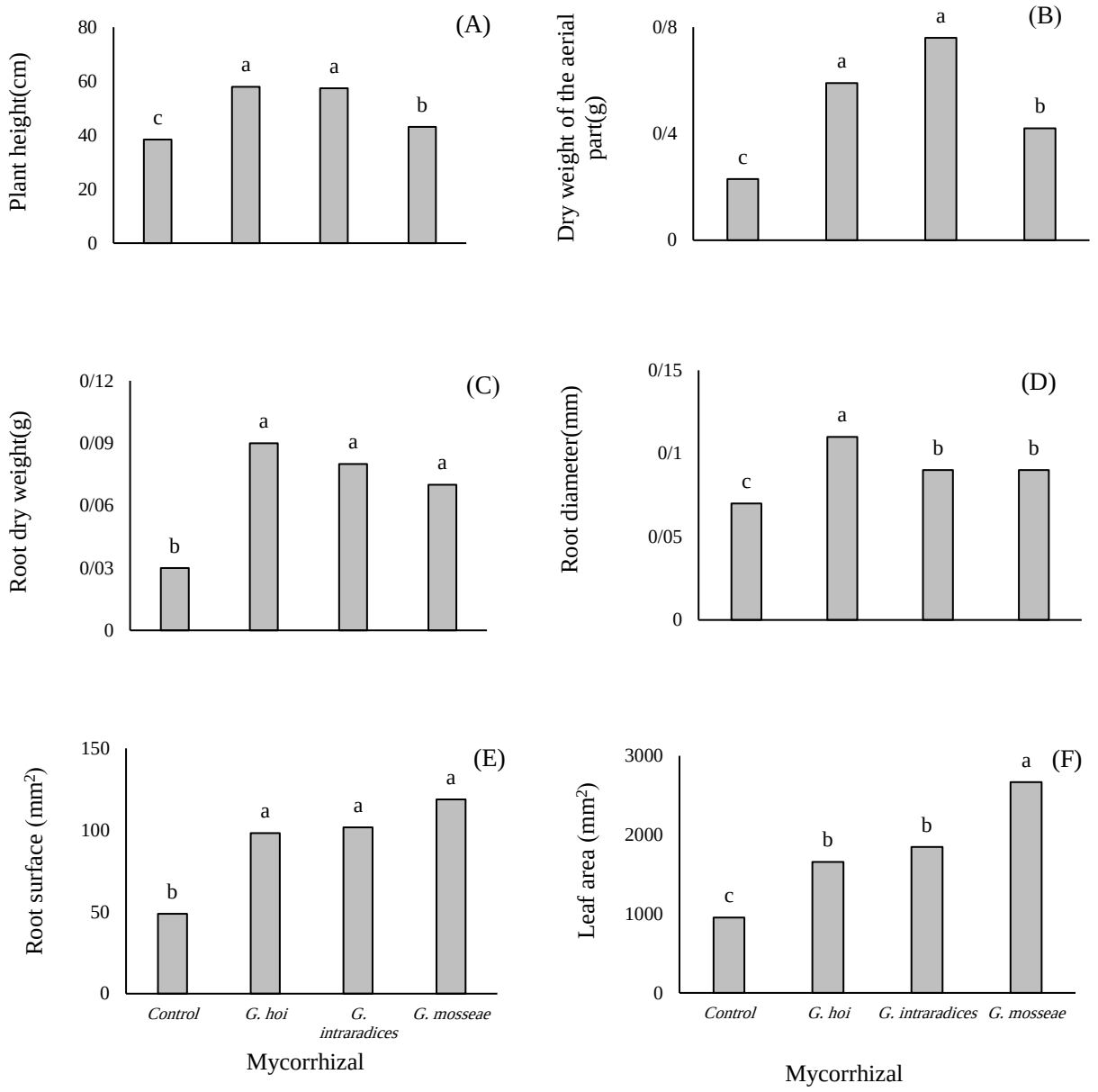
Table 1- Soil test results

K	Na	P	Ca
106.622 ppm	445.465 ppm	309.712 ppm	340.825 ppm

صفات مورفولوژیکی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین ارتفاع گیاه (۵۷/۳۲ cm) و وزن خشک بخش هوایی (۰/۷۶ g) به تیمار با قارچ گونه *G. intraradices* مربوط بود اگر چه تفاوت آن با گونه *G. hoi* معنی دار نبود. همچنین تاثیر تلقیح هر سه گونه قارچی هم از نظر افزایش ارتفاع گیاه و هم از نظر افزایش وزن خشک بخش هوایی نسبت به گیاهان غیر میکوریزی معنی دار بود (**شکل ۱- A ،B**).

در این مطالعه هر سه گونه میکوریز تاثیر معنی داری بر افزایش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد داشتند ولی تفاوت معنی داری بین گونه‌های میکوریز از این حیث وجود نداشت. بیشترین افزایش قطر ریشه (۰/۰۹ mm) به کاربرد میکوریز گونه *G. hoi* مربوط بود که با سایر گونه‌های میکوریز و تیمار شاهد تفاوت معنیداری داشت. همچنین بیشترین سطح ریشه (۱۱۸/۸۳ mm^2) و نیز سطح برگ (۲۶۶۵/۹۲ mm^2) به تیمار کاربرد میکوریز گونه *G. mosseae* مربوط می‌باشد (**شکل ۱**).



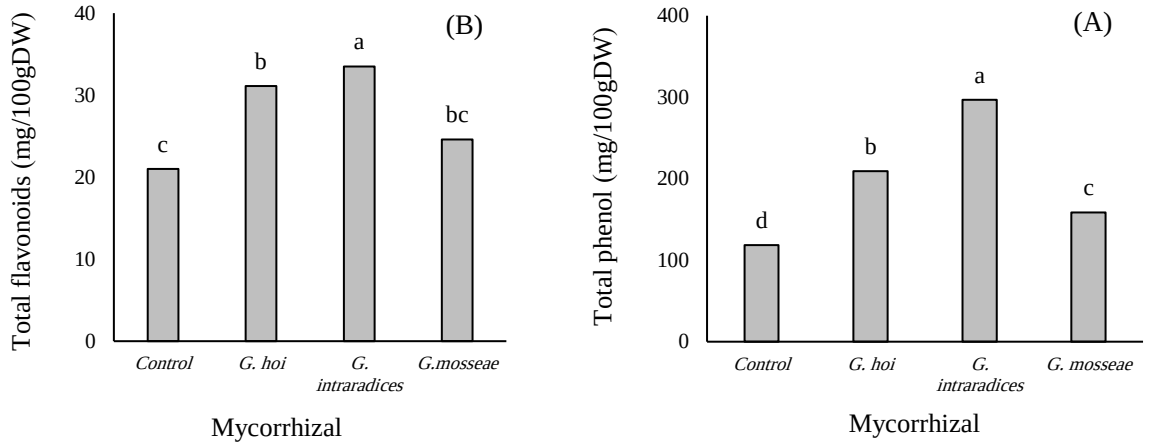
شکل ۱- تاثیر تلقیح گونه‌های مختلف میکوریز (*Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea*) و شاهد (بدون کاربرد قارچ) بر صفات مورفولوژیکی: (A) ارتفاع گیاه؛ (B) وزن خشک بخش هوایی؛ (C) وزن خشک ریشه؛ (D) قطر ریشه؛ (E) سطح ریشه؛ (F) سطح برگ. ستون‌های دارای حرف (حروف) مشترک، در سطح احتمال (p<0.05) دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند

Figure 1- The effect of inoculation of different species of mycorrhiza fungus (*Glomus mossea*, *Glomus interaradis* and *Glomus hoi*) on morphological traits of *Nepeta Binaludensis*: (A) Plant height; (B) Dry weight of the aerial part of the plant; (C) Root dry weight; (D) Root diameter; (E) Root surface; (F) Leaf area. Column with the same letter(s) does not have a significant different (p<0. 05)

به نظر می رسد افزایش تحرک فسفر در خاک، افزایش دسترسی و انتقال آن به محل های مصرف از جمله دلایل اصلی بهبود صفات مورفولوژیکی در تیمار های مورد بررسی می‌باشد. از طرف دیگر گسترش میسیلیوم ها روی سطح ریشه و داخل خاک، افزایش سطح جذب و بهبود انتقال آب و عناصر غذایی از جمله دلایل برتری گیاهان میکوریزی از نظر صفات مورد بررسی می باشد [34]. گزارش‌های مشابه‌ای در این زمینه ارائه شده است از جمله در تحقیقی بر روی چهار گیاه *Capsicum annum* L.، *Lycopersicum esculentum* L.، *Solanum melongena* L. و *Abelmoschus esculentus* L. مشخص شد که تلقیح گیاه با گونه قارچ Glomus fasciculatum باعث افزایش مقدار بیوماس، ارتفاع گیاه، سطح برگ و طول ریشه در هر چهار گیاه شده است [35]. همچنین در گیاهچه‌های تنباکو تلقیح شده با Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)، به طور قابل توجهی اثرات منفی تنش خشکی کاهش یافت و در نتیجه رشد گیاه افزایش پیدا کرد [36].

ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد که میکوریز تاثیر معنی‌داری بر افزایش محتوای فنل کل در بخش هوایی گیاه ($P<0.005$) داشت. بیشترین محتوای فنل کل (۲۹۶/۹۱ mg/100 g DW)، در گیاهان تلقیح شده با گونه *G. intraradices* دیده شد که تفاوت آن با گیاهان غیر میکوریزی و گیاهان تلقیح شده با گونه‌های *G. hoi* و *G. mosseae* معنی‌دار بود. گیاهان تلقیح شده با گونه *G. hoi* از نظر محتوی ترکیبات فنلی برتر از گیاهان تلقیح شده با گونه *G. mosseae* بودند. بطور کلی گیاهان میکوریزی از نظر محتوی ترکیبات فنلی تفاوت معنی‌داری با گیاهان غیر میکوریزی داشتند. نتایج مقایسه میانگین مشاهدات مربوط به محتوای فلاونوئید کل حاکی از افزایش محتوای آن در گیاهان تلقیح شده با گونه *G. intraradices* بود که تفاوت آن با گیاهان تلقیح شده با گونه‌های *G. hoi*، *G. mosseae* و گیاهان غیر میکوریزی معنی‌دار بود. گیاهان تلقیح شده با گونه‌های *G. hoi* و *G. mosseae* از حیث محتوای فلاونوئید کل تفاوت معنی‌داری نداشتند (**شکل ۲**).



شکل ۲- تاثیر تلقیح گونه‌های مختلف قارچ میکوریز (*Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea*) و شاهد (بدون کاربرد قارچ) بر میزان فنل و فلاونوئید کل در بخش هوایی گیاه پونه سا بینالودی (A) محتوای فنل کل؛ (B) محتوای فلاونوئید کل. ستون‌های دارای حرف (حروف) مشترک، در سطح احتمال ($p<0.05$) دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند

Figure 2- The effect of inoculation with different species of mycorrhiza fungus (*Glomus mossea*, *Glomus interaradis* and *Glomus hoi*) on total phenol (A) and flavonoids (B) *Nepeta Binaludensis*. Column with the same letter(s) does not have a significant different ($p<0.05$)

افزایش ترکیبات فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی می‌تواند به جذب بالاتر و کارامدتر ترکیبات نیتروژن در گیاهان میکوریزی به دنبال توسعه سیستم ریشه‌ای گسترده‌تر در این گیاهان مربوط باشد. واضح است به دنبال بهبود محتوای ترکیبات نیتروژنه، میزان تولید اسید آمینه‌های تیروزین و فنیل آلانین که از پیش‌سازهای مهم ترکیبات فنولی هستند افزایش می‌یابد. همچنین در پژوهشی سنتز بالای آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئیدها (فنیل‌آلانین آمونیالیاز) را در گیاهان میکوریزی گزارش دادند. فعالیت این آنزیم ارتباط مستقیمی با محتوای ترکیبات فنلی گیاهان دارد [37]. همچنین مسیرهای بیوسنتزی فلاونوئیدها به شدت توسط میزان ساکارز

تنظیم می‌شود. این قندها که توسط کلونیزاسیون AMF تنظیم می‌شوند به عنوان مولکول‌های علامت‌رسان عمل می‌کنند که مسیرهای انتقال علامت آن‌ها ممکن است منجر به فعال شدن یا غیرفعال شدن بیان ژن در بیوسنتز فنل شود [38].

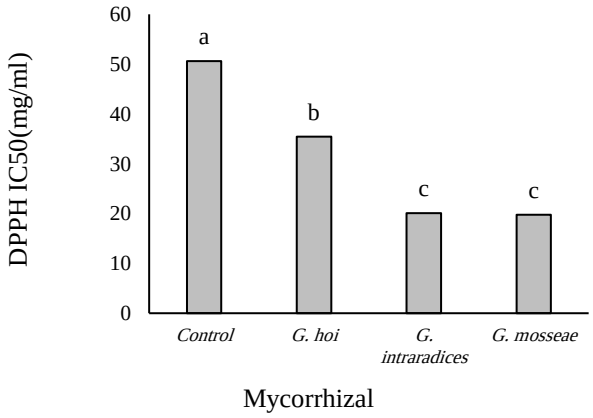
در مطالعه ای بر روی برگ و ریشه گیاه *Ziziphus xylopyrus* تیمار شده با ۶ گونه قارچ میکوریز مشخص شد علاوه بر افزایش معنی دار ترکیبات فنلی در تمامی تیمارهای قارچی، همبستگی مثبتی میان انباشت فنل کل و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در این گونه گیاهی مشاهده شد. محققان این آزمایش معتقدند قارچ‌های VAM از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های متفاوت از جمله آنزیم PAL (فنیل آلانین آمونیالیاز)، تغییرات فیزیولوژیکی را در گیاه سبب می‌شوند که نتیجه آن افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است [39].

علاوه بر این Toussaint و همکاران (۲۰۰۷) [40] گزارش دادند که *Ocimum basilicum* L. که توسط AMF کلون شده بود، در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزی، غلظت بیشتری از فنل‌ها را در شاخساره‌های خود داشت.

ظرفیت آنتی اکسیدانی

با توجه به اینکه هر چه مقدار IC50 کوچکتر باشد خاصیت آنتی اکسیدانی و محتوای ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتر خواهد بود، نتایج حاصل از آزمون DPPH نشان داد که همزیستی میکوریزایی ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه را بصورت معنی‌داری افزایش می‌دهد. گیاهان تلقیح شده با گونه‌های *G.mosseae* و *G. intraradices* از این حیث برتر از گیاهان غیر میکوریزی و گیاهان تلقیح شده با گونه *G. hoi* بودند (**شکل ۳**).

در این بررسی میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه‌ی مستقیم داشتند. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش محتوی ترکیبات فنلی نیز در بررسی‌های دیگر نیز تایید شده است [41]. در مطالعات انجام یافته روی عصاره متانولی چند گیاه بومی متعلق به استان مازندران (*Marrubium vulgar, Mentha spicata, Mentha aquatic, Melissa officinalis, Marrubium vulgar, Stachys byzantine, Pimpinella affinis, Eryngium campestre* و *Rosmarinus officinallis*)، نتایج مشابهی گزارش شده است [42].

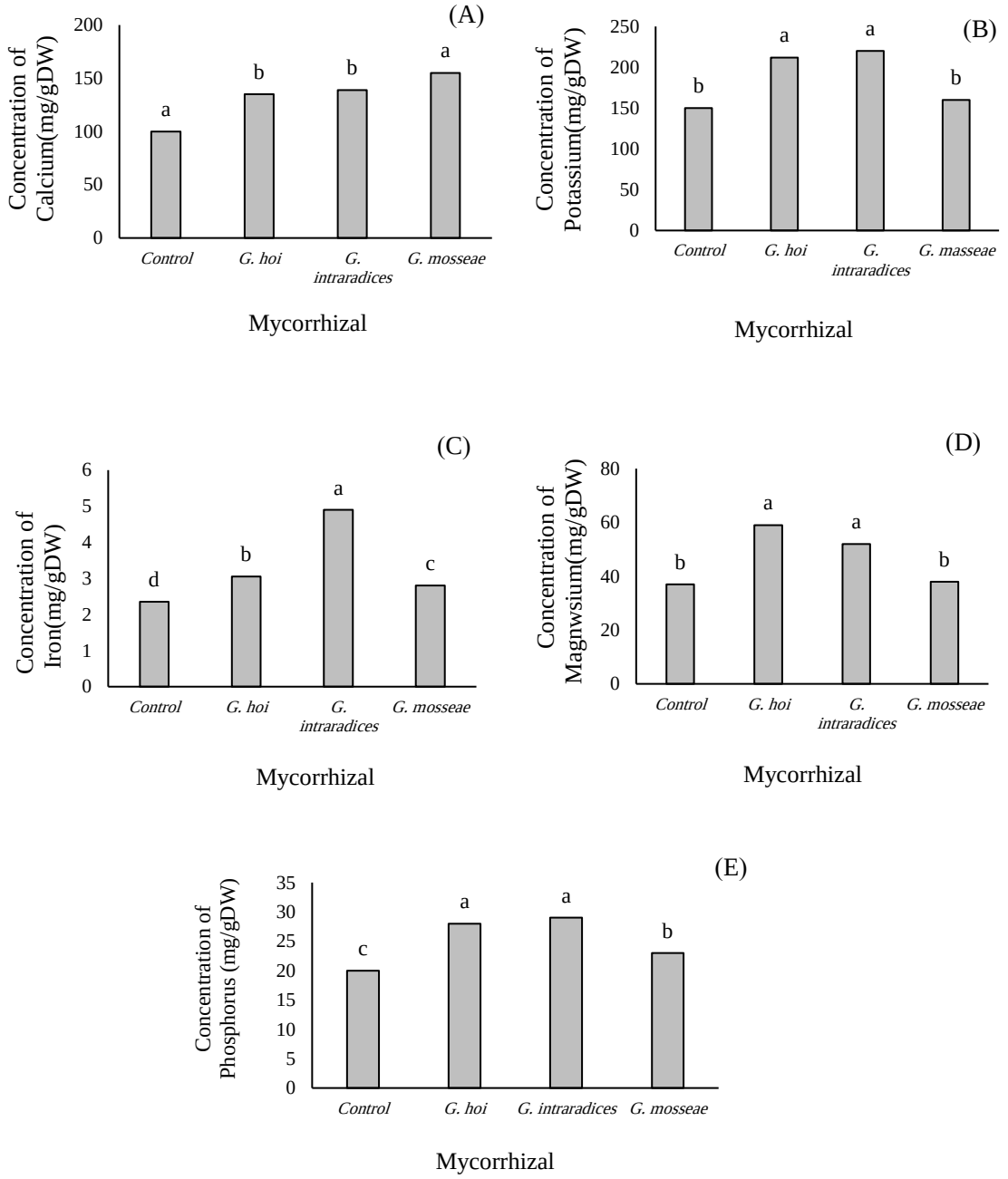


شکل ۳- تاثیر تلقیح گونه‌های مختلف میکوریز (*Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea*) و شاهد (بدون کاربرد قارچ) بر ظرفیت آنتی اکسیدانی در گیاه پونه‌سا بینالودی. ستون‌های دارای حرف (حروف) مشترک، در سطح احتمال (p<0.05) دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند

Figure 3- The effect of inoculation with different species of mycorrhiza fungus (*Glomus mossea*, *Glomus interaradis* and *Glomus hoi*) on antioxidant activity of *Nepeta Binaludensis*. Column with the same letter(s) does not have a significant different (p<0. 05)

جذب عناصر غذایی

بر اساس داده‌ها، بیشترین مقدار منیزیم، پتاسیم و فسفر به گیاهان تلقیح شده با گونه‌های *G.intradices* و *G. hoi* تعلق دارند. بیشترین مقدار آهن (۴/۹ mg Fe/DW) در گیاهان تلقیح شده با گونه *G. intradices* و کمترین آن در گیاهان غیر میکوریزی دیده شد. نتایج مقایسه میانگین محتوی کلسیم حاکی از آن بود که بیشترین محتوی این عنصر (۱۵۵ mg Ca/DW) به گیاهان تلقیح شده با گونه *G. mosseae* تعلق دارد (**شکل ۴**).



شکل ۴- تاثیر تلقیح گونه‌های مختلف میکوریز (*Glomus hoi*، *Glomus interaradis* و *Glomus mossea*) و شاهد (بدون کاربرد قارچ) بر مقدار برخی عناصر معدنی بخش هوایی در گیاه پونه‌سا بینالودی (A) مقدار کلسیم بخش هوایی؛ (B) مقدار پتاسیم بخش هوایی؛ (C) مقدار آهن بخش هوایی؛ (D) مقدار منیزیم بخش هوایی؛ (E) مقدار فسفر بخش هوایی. ستون‌های دارای حرف (حروف) مشترک، در سطح احتمال (p<0.05) دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند

Figure 4- The effect of inoculation of different species of mycorrhizal fungus (Glomus mossea, Glomus interaradis and Glomus hoi) on concentration of Calcium (A), Potassium (B), Iron (C), Magnesium (D) and Phosphorus (E) in Nepeta binaludensis. Column with joint letters at the probability level (p<0. 05) does not have a significant different

افزایش جذب این عناصر به این دلیل است که قارچ‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌ها از جمله آنزیم فسفاتاز در ریشه‌های کلونیزه شده و تولید هورمون‌های گیاهی (اکسین و سیتوکنین) می‌توانند رشد گیاه و رشد ریشه را تشدید کنند، در نتیجه ظرفیت جذب عناصر غذایی را بالا برده و در نهایت تحمل گیاه را در اجتناب از تنش‌هایی همچون تنش خشکی افزایش دهند [43]. از سویی این افزایش جذب عناصر غذایی در گیاهان میکوریزی باعث می‌شود میزان فتوسنتز افزایش یابد و میزان تولید ماده خشک توسط گیاه بیشتر شود [44]. در تایید نتایج فوق در بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد و قارچ میکوریز بر روی گیاه یونجه نشان داد که تیمار گیاه با این میکروارگانیسم‌ها به تنهایی و به صورت مضاعف باعث افزایش میزان سدیم، پتاسیم و فسفر در گیاه می‌شود [45].

نتیجه گیری

بطور کلی قارچ‌های میکوریزی در یک سیستم همزیستی (سودبری دو جانبه) اغلب صفات ریخت‌شناسی گیاه از جمله ارتفاع، وزن خشک بخش هوایی، ریشه، مجموع سطح ریشه و سطح برگ گیاه را به صورت معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد (غیر میکوریزی) افزایش داد. در این بررسی گونه *G.intradices* از حیث بهبود صفات مورفولوژیکی موثرتر از سایر گونه‌های قارچ میکوریزی بود. در این آزمایش نتایج بررسی صفات بیوشیمیایی نشان داد که گونه‌های مختلف میکوریز، محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در گیاهان میزبان به صورت قابل توجهی افزایش دادند. گونه‌های مختلف میکوریز نیز از نظر تاثیر بر محتوی ترکیبات فوق تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند، بیشترین افزایش در محتوی ترکیبات فوق به کاربرد قارچ میکوریز گونه *G.intradices* تعلق داشت. نتایج حاصل از بررسی میزان محتوی عناصر غذایی موجود در بافت برگ بیانگر آن است که کاربرد قارچ‌های میکوریز از طریق توسعه سیستم ریشه‌ای و احتمالا تسهیل در انتقال آن‌ها به استوانه آوندی، جذب عناصر غذایی و به دنبال آن محتوی عناصر غذایی مانند کلسیم، پتاسیم، آهن، منیزیم و فسفر در بافت‌های گیاه افزایش داده است.

اعلام تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نگارندگان بیان نشده است.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می دانند تا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین هزینه های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با کد طرح به شماره ۳/۴۰۴۱۸) تشکر و قدر دانی نمایند.

منابع

[1] Nadjafi, F., Koocheki, A., Honermeier, B. & Asili, J. (2009). Autecology, Ethnomedicinal and phytochemical studies of *Nepeta binaloudensis* Jamzad a highly endangered medicinal plant of Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plant, 12*, 37-41.

[2] Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1994). Applications of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. Soil biota: management in sustainable farming systems, Pankburst, C.E., Double, B.M., Gupta, V.V.S.R., & Grace, P.R., eds. CSIRO, Pub. East Melbourne, Australia. 23-31.

[3] Khan, A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18* (4), 355-364.

[4] Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science, 10*, 1068.

[5] Varma, A. (1999). Functions and application of arbuscular mycorrhizal fungi in arid and semi-arid soils. *In Mycorrhizal. Springer, Berlin, Heidelberg*, 521-556.

[6] Auge, R. M. (2001). Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and Function*, 201-237.

[7] Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment, 116* (1-2), 72-84.

[8] Allen, E.B. & Allen, M.F. (1986). Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytologist, 104*, 559-571.

[9] Blilou, I., Ocampo, J.A., & Garcia-Garrido, J.M. (2000). Induction of LTP (Lipid transfer protein) and PAL (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of experimental botany, 51* (353), 1969-1977.

[10] Chen, M., Yang, G., Sheng, Y., Li, P., Qiu, H., Zhou, X., Huang, L., & Chao, Z. (2017). Glomus mosseae inoculation improves the root system architecture, photosynthetic efficiency and flavonoids accumulation of liquorice under nutrient stress. *Frontiers in Plant Science, 8*, 931.

[11] Pedonee-Bonfim, M. V. L., da Silva, F. S. B., & Maia, L. C. (2015). Production of secondary metabolites by mycorrhizal plants with medicinal or nutritional potential. *Acta Physiologiae Plantarum, 37*, 1-12.

[12] Jurkiewicz, A., Ryszka, P., Anielska, T., Waligorski, P., Bialonska, D., Goralska, K., Tsimilli-Michael, M., & Turnau, K. (2010). Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. *Mycorrhiza, 20* (5), 293-306.

[13] Soares, A. C. F., Martins, M. A., Mathias, L., & Freitas, M. S. M. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. *Scientia Agricola, 62*, 331-336.

[14] Valentine, A. J., Mortimer, P. E., Lintnaar, M., & Borge, R. (2006). Drought responses of arbuscular mycorrhizal grapevines. *Symbiosis, 41* (3), 127-133.

[15] Xie, K., Ren, Y., Chen, A., Yang, C., Zheng, Q., Chen, J., Wang, D., Li, Y., Hu, S., & Xu, G. (2022). Plant nitrogen nutrition: The roles of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology, 269*, 153591.

[16] Nell, M., Voetsch, M., Vierheilig, H., Steinkellner, S., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., & Novak, J. (2009). Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture, 89* (6), 1090-1096.

[17] Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., & Andrew-Smith, F. (2010). Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil, 326* (1), 3-20.

[18] Franken, P. (2012). The plant strengthening root endophyte Piriformospora indica: potential application and the biology behind. *Applied Microbiology and Biotechnology, 96* (6), 1455-1464.

[19] Saha, H., Kaloterakis, N., Harvey, J. A., Van der Putten, W. H., & Biere, A. (2022). Effects of light quality on colonization of tomato roots by AMF and implications for growth and defense. *Plants, 11* (7): 861.

[20] Adeyemi, N. O., Atayese, M. O., Sakariyawo, O. S., Azeez, J. O., Olubode, A. A., Ridwan, M., Adebiyi, O., Oni, O., & Ibrahim, I. (2021). Influence of different arbuscular mycorrhizal fungi isolates in enhancing growth, phosphorus uptake and grain yield of soybean in a phosphorus deficient soil under field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis, 52* (10), 1171-1183.

[21] Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications, 1* (1), 48.

[22] Wu, C., Qu, J., Liu, L., Kang, H., Sun, H., Zhang, Y., Ghorbani, A., & Pehlivan, N. (2021). Que vadis: signaling molecules and small secreted proteins from mycorrhizal fungi at the early stage of mycorrhiza formation. *Symbiosis, 85*, 123-143.

[23] Ansori, A., & Gholami, A. (2015). Improved nutrient uptake and growth of maize in response to inoculation with *Thiobacillus* and mycorrhiza on an alkaline soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis, 46* (17), 2111-2126.

[24] Mohammad, M. J., Malkawi, H. I., & Shibli, R. (2003). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soils with different levels of salts. *Journal of Plant Nutrition, 26* (1), 125-137.

[25] Sannazzaro, A. I., Ruiz, O. A., Alberto, E. O., & Menéndez, A. B. (2006). Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. *Plant and Soil, 285* (1), 279-287.

[26] Caravaca, F., Diaz, E., Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., & Roldan, A. (2003). Photosynthetic and transpiration rates of *Olea europaea* subsp. *sylvestris* and *Rhamnus lycioides* as affected by water deficit and mycorrhiza. *Biologia Plantarum, 46* (4), 637-639.

[27] Sanchez-Bianco, M.J., Ferrandez, T., Morales, M.A., Morte, A. & Alarcon, J.J. (2004). Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticolaunder* drought conditions. *Journal of Plant Physiology, 161*, 675-682.

[28] Thakur, A. K., & Panwar, J. D. S. (1997). Response of Rhizobium-vesicular arbuscular mycorrhizal symbionts on photosynthesis, nitrogen metabolism and sucrose translocation in greengram (*Phaseolus radiatus*). *The Indian Journal of Agricultural Sciences, 67* (6), 245-248.

[29] Ozkan, S. B., Wu, G. A., Chodera, J. D., & Dill, K. A. (2007). Protein folding by zipping and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 104* (29), 11987-11992.

[30] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Meethods in Enzymology, 299*, 152-178.

[31] Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis, 10* (3).

[32] Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry, 125* (4), 1430-1435.

[33] Klara, A. (1998). Essential nutrients in mature leaf tissues generalized as deficient, sufficient or excessive for various plant species. *Journal of the Environmental and Nutritional Sciences. 24* (11), 25-27.

[34] James, B., Rodel, D., Lorettu, U., Reynaldo, E., & Tariq, H. (2008). Effect of vesicular arboscular mycorrhiza (VAM) fungi inoculation on coppicing ability and drought resistance of *Senna Spectabilis*. *Pakistan Journal of Botany. 40* (5), 2217-2224.

[35] Lenin, M., Selvakumar, G., Thamizhiniyan, P., & Rajendiran, R. (2010). Growth and biochemical changes of vegetable seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Experimental Sciences, 1* (4).

[36] Liu, L., Li, D., Ma, Y., Shen, H., Zhao, S., & Wang, Y. (2021). Combined application of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous melatonin alleviates drought stress and improves plant growth in tobacco seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation, 40*, 1074-1087.

[37] Toussaint, J. P., St-Arnaud, M., & Charest, C. (2004). Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology, 50*, 251-260.

[38] Mota-Fernandez, S., Alvarez-Solis, J. D., Abud-Archila, M., Dendooven, L., & Gutierrez-Miceli, A. F. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus concentration on plant growth and phenols in micro propagated *Aloe vera* L. plantlets. *Journal of Medicinal Plants Research, 5*, 6260-6266.

[39] Mathur, N., & Vyas, A. (1995). Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *Journal of plant physiology, 147* (3-4), 328-330.

[40] Tussiant, J. P., Smith, F. A., & Smith, S. E. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza. 17*, 291-297.

[41] Soobrattee, M. A., Bahorun, T., Neergheen, V. S., Googoolye, K., & Aruoma, O. I. (2008). Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the *Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae* and S*terculaceae* families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in vitro, 22* (1), 45-56.

[42] Jamshidi, M., Ahmadi, H. R., Rezazadeh, S., Fathi, F., Mazandarani, M., & Khaki, A. (2010). Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran Province. *Journal of Medicinal Plants*.

[43] Barea, J. M., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. *Springer, Berlin, Heidelberg*. 195-212.

[44] Abbott, L. K., & Robson, A. D. (1985). Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhiza al fungi. *New Phytologist. 99* (2), 245-255.

[45] Younesi, O., & Moradi, A. (2015). The effects of growth promoting bacteria (GPB) and mycorrhizal fungi on seedling emergence, early establishment and growth of alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress condition. *Journal of Plant Production Research. 22* (1), 105-125.