زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هجدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۸۱-۹۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۶/۲۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۹/۰۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۱۳

سنجش میزان ترکیبات فنولیک و اسانس در ژنوتیپ‌های میکوریزی نعنا

معصومه احمدی خویی [۱]، لیلا شبانی [۱]* و سمانه باقری [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران ۳۶۹۷ – ۱۹۳۹۵، تهران، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، محتوای ترکیبات فنولیک کل و اسانس در شش ژنوتیپ نعنا سبز (اصفهان، بجنورد، کاشان، کرمانشاه، میبد و یزد) پس از تلقیح با دو قارچ میکوریز آربوسکولار، گونه‌های *Glomus etunicatum* و *G. mosseae* بررسی شد. همچنین، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و تعداد کُرک (محل اصلی بیوسنتز اسانس) در برگ‌های تازه گیاهچه‌های تلقیح شده اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای ترکیبات فنولیک و اسانس در گیاهچه‌های تلقیح شده در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد بالاتر بود. این پاسخ در ژنوتیپ‌های مختلف تنوع معنی‌داری نشان داد. همچنین، ارتباط مثبت میان تجمع ترکیبات فنولیک کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در برگ‌های گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ مایکوریز آربوسکولار مشاهده شد. نتایج نشان داد که میزان درصد اسانس همراه با افزایش میزان بیوماس و تعداد کُرک برگ به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، نشان داده شد که تحریک مسیرهای بیوسنتزی اسانس و فنل‌ها از طریق تلقیح قارچی میسر بوده، ژنوتیپ‌های مختلف گیاه نعنا نیز در پاسخ به این تحریک، پتانسیل‌های مختلفی را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، کُرک غده‌ای، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، ترکیبات فنولیک، نعنا

مقدمه

نعناع سبز (*Mentha spicata*) یکی از ۲۵ تا ۳۰ گونه جنس *Mentha* و متعلق به تیره Lamiaceae است. بخش‌های هوایی گیاه به ویژه برگ‌ها و سرشاخه‌های گل‌دار آن معطر بوده، مصارف صنعتی و دارویی فراوان دارند (Diaaz-Maroto *et al*., 2003). از جمله ویژگی‌های این گیاه: خواص ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد میکروبی، حشره‌کشی، آنتی‌اکسیدانی، آلرژی‌زایی، ادرار آوری و محرک بودن آن است؛ همچنین، می‌توان از آن برای درمان بیماری‌های تب، برونشیت، سرماخوردگی، گرفتگی عضلات، ورم معده، سردرد، سوء هاضمه و تهوع استفاده کرد. همه این

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: shabani-l@sci.sku.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۸۱۴۴۲۴۴۰۵

ویژگی‌ها به ترکیبات ثانویه این گیاه نسبت داده می‌شود، ترکیباتی که جزو مواد شیمیایی مهم گیاهی محسوب می‌شوند و نخستین سد دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهند (Khan *et al*., 2005).

مهم‌ترین ترکیبات مؤثر نعناع سبز روغن‌های فرار هستند که از محصولات مهم اقتصادی محسوب می‌شوند (Clark and Menary, 1980). از ۵۶ تُن اسانس تولیدی از ۲۰ گیاه دارای اسانس در سراسر دنیا، ۷/۵ تُن آن از گیاه *M. spicata* به دست می‌آید (Lawrence, 1993). اسانس نعنا ترکیبی از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌هاست که در کُرک‌های غده‌ای گیاه موجود است (Croteau *et al*., 1972). تولید و میزان ترکیبات مؤثر گیاهان دارویی به عنوان یک متغیر، تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی قرار می‌گیرد. نعناع نیز به علت اهمیّت اقتصادی و دارویی آن توجه بیشتر پژوهشگران را به خود جلب نموده است تا از طریق شناخت عوامل مؤثر بر کمیّت و کیفیّت میزان اسانس این گیاه دارویی را افزایش دهند (Zargari, 1995).

محرک‌های زیستی و غیرزیستی نظیر: تعادل تغذیه کربنی، ژنوتیپ و آنتوژنی گیاه، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنولیک در گیاهان را کنترل و تنظیم می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد که محصولات ثانویه نقش مهمی را در برهمکنش‌های مختلف میان گیاهان و محیط طبیعی ایفا می‌کنند. در این راستا مشخص شده است که فنول‌ها مهم‌ترین ترکیب در برهمکنش‌های پاتوژنی میان گیاه و قارچ هستند (Dixon *et al*., 1994). به منظور تثبیت این نوع همزیستی میان گیاهان و قارچ‌های میکوریز ضروری است که هر دو شریک همزیستی یکدیگر را از طریق تغییر در بیان ژن و تولید ترکیبات سیگنال شناسایی کنند. در این گیاهان، بیان تغییر یافته ژن در حضور میکوریز می‌تواند بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار باشد.

نخستین واکنش در بیوسنتز ترکیبات حاصل از مسیر فنیل پروپانوئید که ترکیبات فنولیک هستند، حذف گروه آمونیوم از L- فنیل‌آلانین و تشکیل ترکیب ترانس سینامیک اسید است. این واکنش توسط آنزیم PAL و در گیاهان عالی کاتالیز می‌شود. فعالیت این آنزیم در پاسخ به هجوم انگل‌ها یا آسیب‌های بافتی القا می‌شود. آنزیم PAL در بیوسنتز ترکیبات ضد میکروبی یا فیتوآلکسین‌ها و ترکیباتی که دارای اسکلت فنیل پروپانوئید هستند، درگیر است (Ronald and Soderhall, 1985).

همچنین، امروزه زیان‌های اقتصادی و زیست محیطی ناشی از استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی در سطح جهان شناخته شده و بدیهی است که باید جایگزین مناسبی برای این نوع کودها در نظر گرفته شود. استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی برای افزایش عملکرد محصولات گیاهی بیشتر شده است. مشخص شده است که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار نقش مهمی در تغذیه و رشد گیاهان در بسیاری از سیستم‌های کشاورزی بر مبنای تولید ایفا می‌کنند، با وجود این، درباره تأثیر بالقوه آنها بر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و معطر اطلاعات اندکی موجود است (Copetta *et al*., 2006؛ Khaosaad *et al*., 2006؛ Kapoor et al., 2007). اگرچه در زمینه تأثیر قارچ‌های میکوریز بر تولید اسانس و یا ترکیبات فنولیک در برخی گونه‌های مهم دارویی تیره نعنا مطالعاتی صورت گرفته است (Karagiannidis

Gupta *et al*., 2002؛ *et al*., 2011)، با وجود این، تاکنون مطالعاتی در مقیاس بررسی ژنوتیپ‌ها برای مقایسه آنها صورت نگرفته و این گونه اطلاعات در خصوص گیاه نعنای خوراکی که حایز اهمیّت دارویی و اقتصادی زیاد است، وجود ندارد. بنابراین، در این پژوهش اهداف زیر دنبال شد:

الف) مقایسه آثار دو گونه قارچ میکوریز *Glomus etunicatum* و *G. mosseae* بر تولید اسانس و ترکیبات فنولی کل در شش ژنوتیپ نعنا و ب) مقایسه آثار میکوریزی دو گونه قارچ بر تراکم کُرک برگ‌ها در شش ژنوتیپ نعنا، زیرا کُرک‌های غده‌ای روی برگ‌ها محل تجمع اسانس‌ها قرار دارند.

مواد و روش‌ها

کشت ریزوم

شش ژنوتیپ از نعناع که متعلق به گونه *M. spicata* از شش استان اصفهان، بجنورد، کاشان، کرمانشاه، میبد و یزد از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شد. خاک استفاده شده برای انجام کشت ریزوم‌ها در گلدان، از مخلوطی از خاک رس (خاک سنگین) و ماسه (خاک سبک) به نسبت ۱ به ۲ تهیه شد. ریزوم‌های ژنوتیپ‌های نعنا برای کاشت در گلدان (به قطر ۲۵ سانتی‌متر) به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند. گلدان‌ها با خاک تهیه شده پُر شد و ریزوم‌ها در عمق ۳ تا ۴ سانتی‌متری سطح خاک و به طور متوسط در هر گلدان ۴ عدد ریزوم قرار داده شد. گلدان‌های کشت شده در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. آبیاری نمونه‌ها به صورت یک روز در میان و با آب مقطر انجام شد. پس از گذشت یک هفته از کشت نمونه‌ها نخستین نشانه‌های جوانه‌زنی در گلدان‌ها ظاهر شد و پس آن با گذشت ۳ تا ۴ ماه (بسته به ژنوتیپ نعنا) گیاهچه‌ها وارد مرحله زایشی شدند. به منظور تلقیح گیاهچه‌های کشت داده شده با قارچ میکوریزی از ساقه‌های این گیاهان استفاده شد.

تلقیح قارچی

پس از ورود گیاهچه‌ها به مرحله زایشی، ساقه‌های گیاهان از حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر بالای ساقه جدا و به قطعات سه میانگره‌ای تقسیم شد. ساقه‌های بریده شده که هر کدام به طور متوسط دارای سه میانگره بودند، ابتدا به مدت چند ساعت در آب و سپس در میان دستمال نخی تمیز و مرطوب نگهداری شدند. پس از حدود یک هفته ساقه‌ها وارد مرحله جوانه‌زنی و پس از گذشت حدود دو هفته ساقه‌ها ریزوم‌دار شدند.

برای حذف همه اسپورها و یا پروپاگول‌های قارچی در خاک نمونه آزمایش و همچنین حذف پاتوژن‌های احتمالی و سایر عوامل تلقیح کننده گیاه، نخست خاک در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۲۰ اتمسفر توسط بخار آب به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل شد و پس از آن به منظور جلوگیری از آلوده شدن خاک‌های اتوکلاو شده توسط ریز جانداران هوا، نمونه‌های خاک در کیسه‌های نایلونی ریخته و درب آن به طور محکم بسته شد. برای انجام تلقیح با قارچ مایکوریزی، حدود ۲۵ گرم از مایه تلقیح (تهیه شده از شرکت زیست‌فناور توران، سمنان) دو گونه قارچ *Glomus etunicatum* و *G. mosseae* در خاک استریل موجود در هر گلدان ریخته شد و تعداد ۳ عدد از ساقه‌های ریزوم‌دار به شکل افقی بر سطح خاک قرار داده شد. پس از استقرار ساقه‌ها روی آنها به میزان حدود ۳ سانتی‌متر خاک

ریخته شد و گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. به همین ترتیب، گلدان‌ها یک روز در میان آبیاری و پس از جوانه‌زنی گیاهچه‌ها یک‌بار در ماه تحت تیمار محلول غذایی هوگلند با فسفر ۵۰ درصد قرار داده شدند.

پس از گذشت یک دوره رشدی سه ماهه گیاهچه‌هایی که وارد مرحله گلدهی شده بودند، برای تعیین شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از برداشت گل‌آذین‌ها، گل‌ها در سایه تا رطوبت ۱۲ درصد خشک شدند. استخراج اسانس گلبا روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه اسانس‌گیر کلونجر (با بالن پیرکس، ساخت آلمان) انجام شد. روش کار به این ترتیب بود که از گل‌های خشک شده نعنا یک نمونه ۳۰ گرمی انتخاب و پس از خرد کردن نسبی در آسیاب دستی، ۳۰ گرم آن را به همراه ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در درون بالن قرار گرفت و به مدت ۴ ساعت حرارت داده شد. بر اثر حرارت و افزایش فشار بخار آب، غده‌های حاوی اسانس شکسته شد و اسانس همراه با بخار آب وارد سردکن شد. در سردکن پس از انجام میعان، قطرات اسانس به علت سبک‌تر بودن نسبت به آب، روی آب تجمع یافتند و آب اضافی از طریق لوله رابط به بالن بازگشت. در لوله مدرّج امکان اندازه‌گیری اسانس با روش حجمی وجود دارد. پس از خارج نمودن اسانس از مایع درصد اسانس تعیین شد (Hornok, 1992).

شمارش کُرک‌های غده‌ای

سه گیاه از هر تیمار برای شمارش کُرک‌های غده‌ای در قسمت پشت برگ استفاده شد. از هر گیاه دو برگ هم‌سن و دارای یک موقعیت (پنجمین گره از سطح خاک) برداشت شد و تراکم کُرک‌ها در واحد سطح برگ (یک سانتی‌متر مربع) با قرار دادن یک پانچ از سطح برگ در آب مقطر و عکس‌برداری از سطح آن بدون رنگ‌آمیزی و سپس شمارش کُرک‌ها پس از بزرگ نمایی و کالیبره کردن تصویر در کامپیوتر با نرم‌افزار Image J نسخه ۱/۴۷ انجام شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک کل

میزان ترکیبات فنولیک کل اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها با روش Singleton و Rossi (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ و ریشه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده شد و سپس در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات فنولیک کل موجود در عصاره‌های تهیه شده، ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها به همراه ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم و ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو ترکیب و در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنولیک کل در ریشه‌ها با منحنی استاندارد گالیک اسید (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمد.

سنجش آنتوسیانین

۰/۱ گرم از برگ‌های تازه گیاهچه‌ها را در ۲ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۰/۱ نرمال ساییده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. عصاره‌های حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و جذب مایع رویی در طول موج ۵۱۱ نانومتر خوانده شد. میزان آنتوسیانین بر اساس ضریب خاموشی مولی رافانوزین (۳۱۷۶۰ میکرومول بر سانتی‌متر) محاسبه شد (Ishikura and Hayashi, 1963).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

مقدار ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها در بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۶) همراه با پلی وینیل پیرولیدین (PVP) (۰/۵ درصد روی یخ ساییده شد و سپس، در دور g ۲۵۲۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. تعیین فعالیت آنزیم مطابق با روش Abell و Shen (۱۹۸۷) انجام شد. در نمونه‌های مجهول مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۲ میلی‌مولار فنیل‌آلانین به عنوان گوهرمایه در لوله آزمایش ریخته شد. در سری دوم، از لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۵) فاقد فنیل‌آلانین به عنوان نمونه‌های شاهد تهیه شد. در هر دو سری از نمونه‌ها افزایش در جذب به واسطه فعالیت آنزیم پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم با منحنی استاندارد سینامیک اسید تعیین شد.

تحلیل داده‌ها

طرح آزمایشی به کار رفته در پژوهش حاضر، طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار به ازای هر تیمار بود. میانگین داده‌ها با نرم‌افزار SAS و تجزیه واریانس یک‌طرفه با آزمون دانکن تحلیل شد. ارتباط بین شاخص‌ها با تعیین ضریب همبستگی پیرسون تحلیل شد.

نتایج

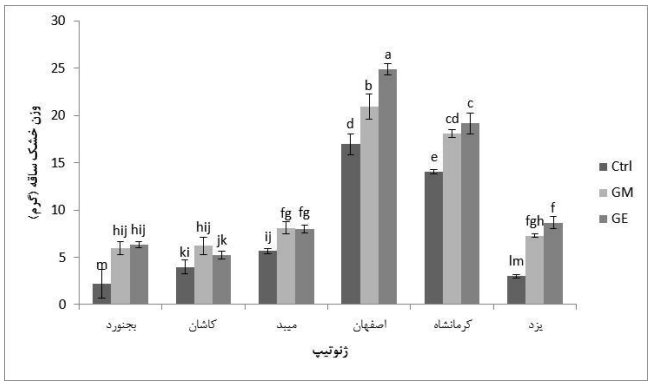
تأثیر متقابل میان ژنوتیپ‌ها و قارچ‌های به کار رفته در پژوهش حاضر برای شاخص‌های وزن خشک ساقه، ترکیبات فنولیک کل اندام هوایی و ریشه، میزان آنتوسیانین اندام هوایی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز معنی‌دار بود. در همه ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ کاشان، گیاهچه‌های تلقیح شده با هر دو گونه قارچی وزن خشک بیشتری را نسبت به شاهد تولید کردند (شکل ۱). در همه ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ یزد گیاهان تلقیح شده با *G. etunicatum* بالاترین میزان ترکیبات فنولیک اندام هوایی را نسبت به شاهد و تلقیح قارچی با *G. mosseae* تولید کردند. در ژنوتیپ یزد بیشینه میزان ترکیبات فنولیک اندام هوایی در گیاهچه‌های تلقیح شده با *G. mosseae* حاصل شد و در حالی که در ژنوتیپ‌های بجنورد و میبد بیشینه میزان ترکیبات فنولیک اندام هوایی در تلقیح با *G. etunicatum* به دست آمد، با وجود این، اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۲).

مشابه با میزان ترکیبات فنولیک اندام هوایی، بالاترین میزان این ترکیبات در ریشه در همه ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ یزد در نمونه‌های تلقیح شده با *G. etunicatum* حاصل شد، البته در ژنوتیپ‌های بجنورد و میبد تفاوتی در میزان ترکیبات فنولیک بین نمونه‌های قارچی مشاهده نشد (شکل ۳).

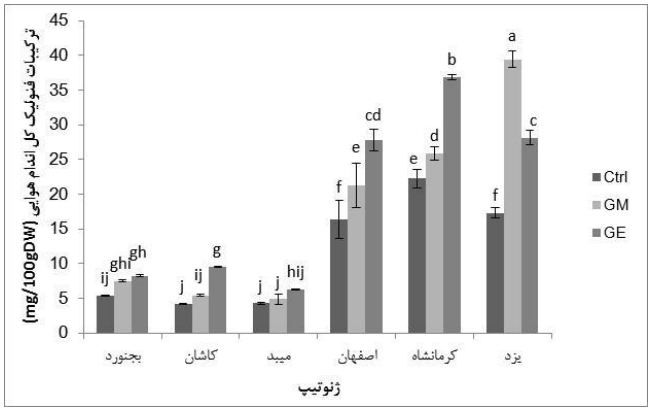
کلونیزاسیون قارچی به افزایش غلظت آنتوسیانین در اندام هوایی در مقایسه با گیاهان غیر مایکوریزی منجر شد. افزایش میزان آنتوسیانین در تمام ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ کرمانشاه در گیاهچه‌های تلقیح شده با *G. etunicatum* مشاهده شد و در ژنوتیپ بجنورد افزایش میزان آنتوسیانین بین دو گونه قارچی معنی‌دار نبود (شکل ۴).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (میزان سینامیک اسید) در اندام هوایی ژنوتیپ‌های نعنا نشان داد که فعالیت این آنزیم در

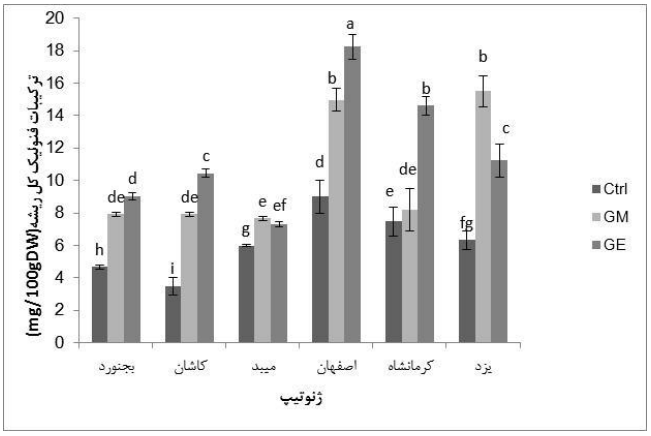
همه ژنوتیپ‌های تلقیح شده با *G. etunicatum* نسبت به شاهد و تلقیح قارچی با *G. mosseae* افزایش یافته است (شکل ۵). با توجه به الگوی تغییرات در غلظت ترکیبات فنولیک و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در برگ‌های تازه در بین ژنوتیپ‌های کاشان، اصفهان و کرمانشاه، گیاهچه‌های با غلظت بیشتر ترکیبات فنولیک ساقه فعالیت آنزیمی بیشتری در برگ‌های خود نشان دادند. در ژنوتیپ یزد الگوی تغییرات غلظت ترکیبات فنولیک و فعالیت آنزیم همبستگی منفی را نشان داد و در دو ژنوتیپ بجنورد و میبد علیرغم افزایش فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های تلقیح شده با هر دو قارچ، غلظت ترکیبات فنولیک اندام هوایی از لحاظ آماری بین نمونه‌های تلقیح شده و شاهد معنی‌دار نبود. تأثیر متقابل بین ژنوتیپ و قارچ برای غلظت اسانس و تعداد کُرک معنی‌دار بود. نتایج آماری نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ کرمانشاه تعداد کُرک در یک سانتی‌متر مربع از پشت برگ افزایش یافته است (شکل ۶). غلظت اسانس به طور معنی‌داری در همه ژنوتیپ‌ها در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۷). به طور کلی، بالاترین میزان درصد اسانس نسبت به شاهد در گیاهچه‌های تلقیح شده با *G. etunicatum* در جمعیت میبد (۲۱۸ درصد) به دست آمد.



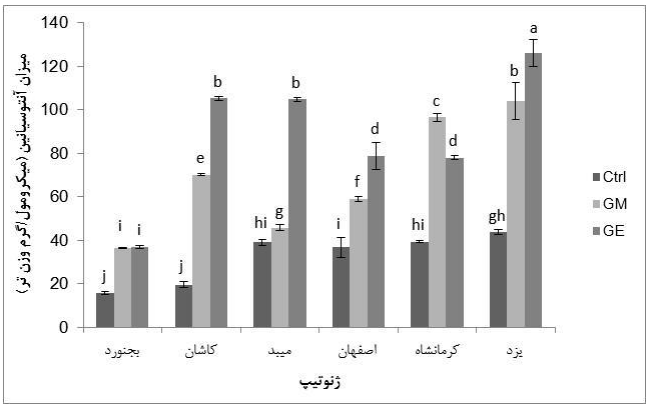
شکل ۱- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان وزن خشک ساقه ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



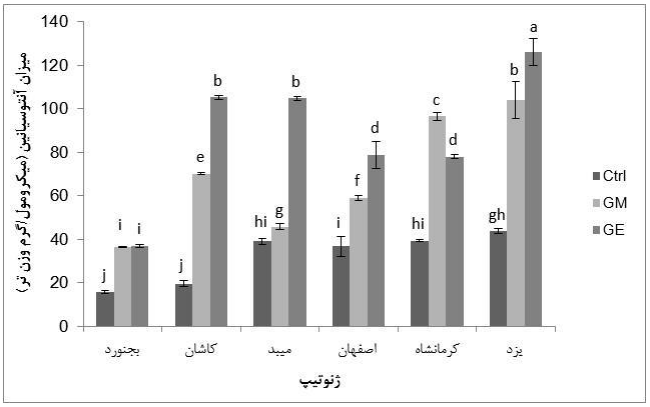
شکل ۲- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان ترکیبات فنولیک کل (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) در اندام هوایی ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



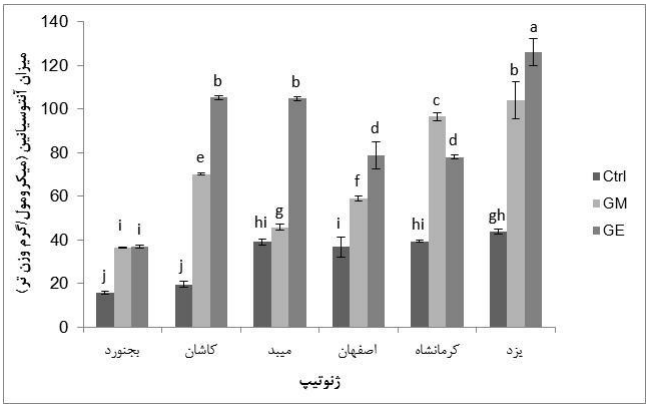
شکل ۳- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان ترکیبات فنولیک کل (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) در ریشه ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



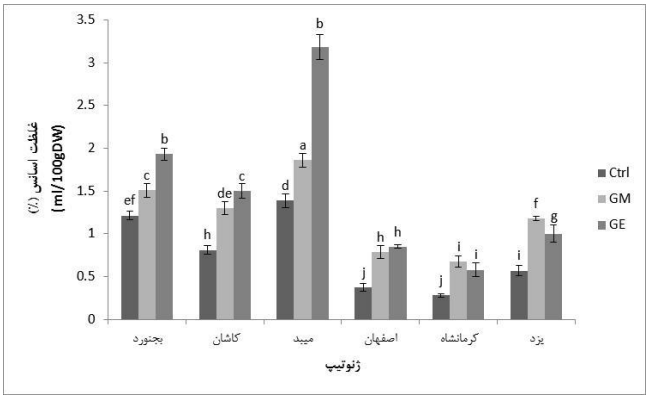
شکل ۴- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر) در اندام هوایی ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



شکل ۵- تأثیر تلقیح قارچی بر فعالیت آنزیم PAL در اندام هوایی ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



شکل ۶- تأثیر تلقیح قارچی بر تراکم کُرک‌های غده‌ای در برگ ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.



شکل ۷- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان اسانس (میلی‌لیتر بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) در اندام هوایی ژنوتیپ‌های نعنا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است. Ctrl: گیاهچه‌های شاهد، GM: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. mosseae*، GE: گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum*.

بحث

قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار در رابطه‌ای سازگار با گیاهان میزبان به تحریک تجمع متابولیت‌های ثانویه با ویژگی‌های دارویی مانند ترکیبات فنولیک و روغن‌های فرار (اسانس) گیاه میزبان منجر می‌شوند (Rojas-Andrade *et al.*, 2003). تجمع متابولیت‌های ثانویه از جمله پلی‌فنل‌ها در ریشه گیاهان مایکوریزی توسط پژوهشگران متعددی گزارش شده است. در ریشه‌های مایکوریزی یونجه افزایش فعالیت چرخه کربس و افزایش در مقادیر کاروتنوئید و آمینواسیدهایی نظیر تیروزین یا فنیل‌آلانین که پیش ماده اصلی پلی‌فنل‌های گیاهی هستند، گزارش شده است (Lohse *et al.*, 2005). Ceccarelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ترکیبات فنولیک کل در برگ‌ها و سَرگل‌های گیاهان *Cynara cardunculus* تلقیح شده با گونه‌های قارچی *G. mosseae* و *G. intraradices* افزایش آشکاری را در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. همچنین، مطالعات Eftekhari و *G. mosseae* کوئرستین کل در چهار واریته از *Vitis vinifera* تلقیح شده با سه گونه از قارچ مایکوریز افزایش معنی‌داری دارد که نتیجه حاصل به

ژنوتیپ گیاه میزبان بستگی داشت. در مطالعه‌ای توسط Zotou و Frangi (۲۰۰۸) تأثیر مایکوریز بر میزان فلاونوئیدهای انگورمشخص شد که عوامل ژنتیکی گیاه و شرایط محیطی آن نیز بر میزان این ترکیبات مؤثر است. بنابراین، درباره گیاهان نعناع تلقیح شده در پژوهش حاضر نیز می‌توان چنین استنباط کرد که نوع ژنوتیپ گیاه و گونه قارچی نیز از عوامل تأثیر گذار بر میزان محتوای ترکیبات فنولیک است، به نحوی که در ژنوتیپ‌های اصفهان، کاشان و کرمانشاه گونه *G. etunicatum*، در ژنوتیپ یزد گونه *G. mosseae* و در ژنوتیپ‌های بجنورد و میبد هر دو گونه قارچی باعث افزایش در میزان ترکیبات فنولیک کل در اندام هوایی و ریشه‌ها شده‌اند. تشکیل همزیستی ریشه‌های گیاهان عالی با اجتماعات مایکوریزی علاوه بر افزایش مقاومت گیاه در برابر حمله پاتوژن یا تنش به فراهم کردن مواد غذایی معدنی و آب برای گیاه و کربوهیدرات برای قارچ منجر می‌شود (Varma and Hock, 1995). بنابراین، افزایش ترکیبات فنولیک در گیاهان نعناع تلقیح شده در این پژوهش نیز ممکن است به عنوان پاسخ دفاعی در برهمکنش پاتوژنی گیاه و قارچ باشد.

مطابق با نتایج حاصل در این پژوهش، تلقیح قارچ‌های مایکوریز به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) در ژنوتیپ‌های بررسی شده گیاه نعناع منجر شده است. در نتیجه همزیستی مایکوریزی تغییرات مهمی در فعالیت‌های آنزیمی و مکانیسم‌های فیزیولوژی گیاه میزبان نیز ایجاد شده و به تجمع متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ترکیبات فنولیک در این گیاهان منجر می‌شود. مطالعات معدودی در زمینه مقایسه فعالیت این آنزیم در گیاهان مایکوریزی با گیاهان شاهد انجام شده است. Volpin و همکاران (۱۹۹۴) افزایش تجمع فلاونوئید و فعالیت PAL را در ریشه‌های گیاه یونجه تلقیح شده با قارچ مایکوریز گزارش کردند، همچنین آنها اظهار داشتند که در سوسپانسیون‌های سلولی این گیاهان در پاسخ به الیسیتورهای قارچی آنزیم‌هایی از مسیر فنیل پروپانوئید فعال شده و محصول آنها افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که افزایش انباشتگی ترکیبات فنولیک در گیاهان نعناع تیمار شده با قارچ می‌تواند در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز این ترکیبات باشد، به نحوی که تلقیح مایکوریزی به افزایش فعالیت این آنزیم‌ها و در نتیجه افزایش میزان ترکیبات فنولیک منجر شده است.

مطابق نتایج پژوهش حاضر (شکل ۴) تلقیح قارچ‌های مایکوریز به افزایش میزان آنتوسیانین در بافت برگ گیاهچه‌های نعناع منجر شده است. آنتوسیانین‌ها از جمله مهم‌ترین ترکیبات فنولیک موجود در گیاهان بوده که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نیز هستند. این ترکیبات ممکن است توسط تعدادی از عوامل محیطی از جمله همزیستی گیاهان با قارچ‌های مایکوریز القا شوند. Baslam و Goicoechea (۲۰۱۲) نشان دادند که گیاهان کاهوی همزیست با دو گونه قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* دارای میزان بیشتری ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین در مقایسه با گیاهان شاهد هستند. همچنین، Lee و Scagel (۲۰۰۹) افزایش ۳۵ درصدی غلظت آنتوسیانین را در برگ‌های گیاه ریحان تلقیح شده با *G. intraradices* گزارش کردند.

نتایج همزیستی هر کدام از دو گونه قارچ مایکوریز به افزایش معنی‌داری در غلظت اسانس گیاهچه‌های نعناع در مقایسه با شاهد منجر شد. روغن‌های فرار

ترکیباتی طبیعی، پیچیده و دارای رایحه‌ای معطر بوده که به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان آروماتیک تولید می‌شوند. قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار معمولاً به عنوان یک تلقیح‌گر زیستی برای بهبود غلظت روغن‌های فرار تعدادی از گیاهان دارویی استفاده و بهره‌برداری می‌شوند. در گزارش Freitas و همکاران (۲۰۰۴) آمده است که کلونیزاسیون مایکوریزی ریشه‌های نعنا گونه *M. arvensis* به افزایش تجمع روغن‌های فرار در این گیاه منجر می‌شود. Chaudhary و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که تلقیح قارچ‌های مایکوریز در گیاهان *Artemisia* به تغییر غلظت و ترکیبات روغن‌های فرار این گیاه منجر شد. علت‌های مختلفی درباره مکانیسم افزایش اسانس در پدیده همزیستی مایکوریزی وجود دارد. در پژوهش حاضر، در همه جمعیت‌های نعناع به غیر از جمعیت کاشان ارتباط بسیار بالایی بین میزان بیوماس اندام هوایی و اسانس (r^2 ژنوتیپ اصفهان = ۰/۸۵، r^2 ژنوتیپ بجنورد = ۰/۷۲، r^2 ژنوتیپ کاشان = ۰/۵۴، r^2 ژنوتیپ کرمانشاه = ۰/۸۱۹، r^2 ژنوتیپ میبد = ۱ و r^2 ژنوتیپ یزد = ۰/۷۵) مشاهده شد. ژنوتیپ‌های گیاهی با میزان بیوماس بیشتر (وزن خشک اندام هوایی) دارای اسانس بیشتری در برگ‌هایشان بودند. به بیان دیگر، ارتباط میان وزن خشک اندام هوایی و میزان اسانس معنی‌دار بود. از آن جا که بیوسنتز ترپنوئیدها به متابولیسم اولیه گیاه مانند فتوسنتز و مسیرهای اکسیداتیو برای ذخیره انرژی و کربن وابسته است، مطابق با نتایج Giri و همکاران (۲۰۰۳) فتوسنتز خالص گیاهان مایکوریزی به عنوان نتیجه‌ای از بهبود وضعیت غذایی گیاه افزایش می‌یابد. عواملی که تولید ماده خشک را افزایش می‌دهند ممکن است بر تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه تأثیر گذارد و به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه منجر شوند (Shukla *et al.*, 1992). بنابراین، به نظر می‌رسد که بهبود معنی‌دار در بیوماس گیاه به در دسترس بودن گوهرمایه برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه منجر شده است. همچنین، افزایش غلظت فنولیک و اسانس در نعناع می‌تواند به واسطه بهبود وضعیت تغذیه گیاه باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه با افزایش انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که محصولات فرعی تنش‌های زیستی و غیر زیستی هستند، همراه است. تجمع ROSها در ریشه‌های مایکوریزی گیاهان یونجه، ذرت و تنباکو گزارش شده است (Fester and Hause, 2005). افزایش مشاهده شده در غلظت ترکیبات فنولیک و اسانس ممکن است به عنوان پاسخ دفاعی به کلونیزاسیون قارچی باشد. متغیر بودن غلظت ترکیبات فنولیک در اندام هوایی و ریشه و غلظت اسانس موجود در اجتماعات قارچ-ژنوتیپ مشاهده شده در این پژوهش، تنوع عملکردی که بین جدایه‌های قارچی وجود دارد را نشان می‌دهد. اسانس ترکیبی از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌هاست که در کُرک‌های غده‌ای گیاه وجود دارد (Croteau *et al.*, 1972). افزایش در غلظت اسانس در گیاهان میکوریزی با افزایش در تراکم کُرک‌های غده‌ای ارتباط دارد. در پژوهش حاضر، ارتباط مثبت بالایی میان تراکم کُرک‌های غده‌ای و غلظت اسانس در جمعیت‌های اصفهان، کاشان، میبد و یزد مشاهده شد (r^2 ژنوتیپ اصفهان = ۰/۹۱، r^2 ژنوتیپ کاشان = ۰/۹۹، r^2 ژنوتیپ میبد = ۰/۹۳، و r^2 ژنوتیپ یزد = ۰/۷۸). تعداد بیشتر کُرک‌های غده‌ای در گیاهان مایکوریز در مقایسه با

گیاهان غیر میکوریزی در گونه‌های گیاهی دیگر نظیر آرتمیزیا (Chaudhary *et al*., 2008) و ریحان (Copetta *et al*., 2006) گزارش شده است. تعداد بیشتر غده‌ها ممکن است مرتبط با تغییر در محتوای هورمونی گیاهان به واسطه مقادیر زیاد اکسین، سیتوکینین و جیبرلین‌ها در گیاهان مایکوریزی باشد (Torelli *et al*., 2000). همچنین، تراکم بیشتر غده‌ها در برگ‌های میکوریزی ممکن است مرتبط با افزایش ظرفیت دفاعی باشد که گیاه در رابطه همزیستی کسب کرده است.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلوده‌سازی ژنوتیپ‌های مختلف گیاه نعنا با قارچ مایکوریز باعث تقویت شارش متابولیکی در مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. جمعیت‌های مختلف مطالعه شده، مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را در پاسخ به آلودگی قارچی فعال نمودند و این نتایج با شواهد مختلفی حمایت شده‌اند که احتمال وجود تنوعات ژنتیکی شایان توجهی را در میان جمعیت‌های مطالعه شده نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر، تداخل میان تولید ترپنوئید و ترکیبات فنولیک در پاسخ به تحریک قارچی از طریق افزایش محتوای اسانس در جمعیت‌های بجنورد، کاشان و میبد (که میزان ترکیبات فنولیک کمتری را نشان دادند) و کاهش محتوای اسانس در جمعیت‌های اصفهان، کرمانشاه و یزد (که میزان ترکیبات فنولیک بیشتری را نشان دادند) نشان داده شد. بررسی‌های بیشتر در زمینه تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های مختلف این گونه برای تعیین منشأ ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی پاسخ‌های مشاهده شده مفید به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

Chaudhary, V., Kapoor, R. and Bhatnagar, A. (2008) Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L.. Applied Soil Ecology 40: 174-181.

Clark, R. and Menary, R. (1980) Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. effect of daylength, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. Functional Plant Biology 7: 685-692.

Copetta, A., Lingua, G. and Berta, G. (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. Mycorrhiza 16: 485-494.

Abell, C. W. and Shen, R. S. (1987) Phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. Methods in Enzymology 142: 242-253.

Baslam, M. and Goicoechea, N. (2012) Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. Mycorrhiza 22: 347-359.

Ceccarelli, N., Curadi, M., Martelloni, L., Sbrana, C., Picciarelli, P. and Giovannetti, M. (2010) Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. Plant and Soil 335: 311-323.

Croteau, R., Burbott, A. J. and Loomis, W. D. (1972) Apparent energy deficiency in mono-and sesqui-terpene biosynthesis in peppermint. Phytochemistry 11: 2937-2948.

Diaaz-Maroto, M. C., Perez-Coello, M. S., Gonzaalez-Vinas, M. A. and Dolores-Cabezudo, M. (2003) Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1265-1269.

Dixon, R. A., Harrison, M. J. and Lamb, C. J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopathology 32: 479-501.

Eftekhari, M., Alizadeh, M. and Ebrahimi, P. (2012) Evaluation of the total phenolics and quercetin content of foliage in mycorrhizal grape (*Vitis vinifera* L.) varieties and effect of postharvest drying on quercetin yield. Industrial Crops and Products 38: 160-165.

Fester, T. and Hause, G. (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. Mycorrhiza 15: 373-379.

Freitas, M. S. M., Martins, M. A. and Vieira, I. J. C. (2004) Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 39: 887-894.

Giri, B., Kapoor, R. and Mukerji, K. (2003) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. Biology and Fertility of Soils 38: 170-175.

Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M., Kumar, S. (2002) Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology 81: 77-79.

Hornok, L. (1992) Cultivation and processing of medicinal plants. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Ishikura, N. and Hayashi, K. (1963) Chromatographic separation and characterization of the component anthocyanins in radish root. Botanical Magazine 76: 6-13.

Kapoor, R., Chaudhary, V. and Bhatnagar, A. (2007) Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L.. Mycorrhiza 17: 581-587.

Karagiannidis, N., Thomidis, T., Lazari, D., Panou-Filotheou, E. and Karagiannidou, C. (2011) Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. Scientia Horticulturae 129: 329-334.

Khan, N. I., Tisserat, B., Berhow, M. and Vaughn, S. F. (2005) Influence of autoclaved fungal materials on spearmint (*Mentha spicata* L.) growth, morphogenesis, and secondary metabolism. Journal of Chemical Ecology 31: 1579-1593.

Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K. and Novak, J. (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). Mycorrhiza 16: 443-446.

Lawrence, B. M. (1993) A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries. In: New crops (Eds. Janick, J. and Simon, J. E.) 620-627. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Lee, J. and Scagel, C. F. (2009) Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chemistry 115: 650-656.

Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D. and Fester, T. (2005) Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. Plant Physiology 139: 329-340.

Rojas-Andrade, R., Cerda-Garcia-Rojas, C. M., Frias-Hernandez, J. T., Dendooven, L., Olalde-Portugal, V. and Ramos-Valdivia, A. C. (2003) Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant

(*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. Mycorrhiza 13: 49-52.

Ronald, P. and Soderhall, K. (1985) Phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in mycorrhizal and nonmycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus sylvestris* L.. New Phytologist 101: 487-494.

Shukla, A., Abad Farooqi, A., Shukla, Y. and Sharma, S. (1992) Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L.. Plant Growth Regulation 11: 165-171.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Torelli, A., Trotta, A., Acerbi, L., Arcidiacono, G., Berta, G. and Branca, C. (2000) IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.), as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. Plant and Soil 226: 29-35.

Varma, A. and Hock, B. (1995) Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer - Verlag, Heidelbergy.

Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y. and Kapulnik, Y. (1994) A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. Plant Physiology 104: 683-689.

Zargari, A. (1990) Medicinal plants. 5th edition, Tehran University Press, Tehran (in Persian).

Zotou, A. and Frangi, E. (2008) Development and validation of an SPE-LC method for the simultaneous determination of trans-resveratrol and selected flavonoids in wine. Chromatographia 67: 789-793.

Assay of phenolic compounds and essential oils in mycorrhizal mint genotypes

Masoumeh Ahmadi-Khoei [1], Leila Shabani [1]* and Samaneh Bagheri [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
[2] Biotechnology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

Abstract

In this study, total phenolic compounds and essential oils content of six mint genotypes (Bojnoord, Esfahan, Kashan, Kermanshah, Mybod and Yazd) were investigated following inoculation with two arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) strains (*Glomus etunicatum* and *G. mosseae*). Moreover, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity and trichome (main sites of essential oil synthesis) number of fresh leaves were studied. The results revealed that mint plants inoculated with AMF (*Glomus* sp.) made higher phenolic and essential oils content than nonmycorrhizal mint plants. However, the response was found to be dependent on the genotype. Also, it was found that there was a positive correlation between total phenolic accumulation and PAL enzyme activity in leaves of inoculated plants with AMF. Increased oil yield was associated with significant biomass content and the number of glandular trichome. Result of this study showed that inducing biosynthesis pathway of essential oils and phenolic compound was possible through infection by mycorrhizal fungi, and that the different genotypes of mint showed different potentials in responding to this induction.

Key words: Essential oil, Glandular hair, Phenylalanine ammonia-lyase, Phenolic compounds, Mint

* Corresponding Author: shabani-l@sci.sku.ac.ir