مجله پژوهش‌های به زراعی
جلد۱۶ ، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳

مجله پژوهش‌های به زراعی

مطالعه اثرات میکروارگانیسم‌های همزیست بر رشد، درصد و ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تنش خشکی

اولیا اسحاقی گرجی[1]، هرمز فلاح[1]*، یوسف نیک‌نژاد[1]، داوود براری تاری[1]

۱-گروه زراعت، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۶

چکیده

به منظور مطالعه اثرات کاربرد میکروارگانیسم‌های همزیست بر صفات رشدی، محتوای اسانس و ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تنش خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار طی سال ۱۴۰۰ اجرا گردید. تنش خشکی در دو سطح (۱۰۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به عنوان عامل اول و تلقیح بذر با میکروارگانیسم‌های همزیست در چهار سطح (بدون تلقیح، تلقیح با باکتری *Azospirillum brasilense*، تلقیح با قارچ *Glomus mosseae* و تلقیح با *A. brasilense+ G. mosseae*) به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب کاهش ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش درصد اسانس گردید. تلقیح میکروارگانیسم‌های همزیست در شرایط عدم تنش تغییر معنی‌داری در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی ایجاد نکرد در حالی‌که موجب بهبود ارتفاع و تعداد برگ در بوته گردید. کاربرد هر یک از میکروارگانیسم‌های همزیست به صورت جداگانه و یا ترکیبی موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش خشکی شد. به هر حال، تلقیح همزمان میکروارگانیسم‌های همزیست (باکتری + قارچ) موجب حصول بیشترین ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و درصد اسانس تحت هر دو شرایط تنش و عدم تنش گردید. با توجه به یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر، استفاده همزمان از باکتری محرک رشد و قارچ مایکوریزا می‌تواند به افزایش رشد، بهبود محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش درصد اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تنش خشکی کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: آزوسپیریلوم، اسانس، بادرنجبویه، تنش خشکی، مایکوریزا

* نگارنده مسئول (hormoz.fallah@iau.ac.ir)

مقدمه

کمبود آب از مهمترین عوامل محدود کننده تولید گیاهان زراعی در جهان به شمار می‌رود و این موضوع در مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران از اهمیت بیشتری برخوردار است (انجام و همکاران، ۱۴۰۲). تنش خشکی بسته به زمان، مدت و شدت تنش ممکن است خصوصیات رشدی و عملکردی گیاه را کاهش دهد (Ghodrat & Bahrani, 2022). مطالعات صورت گرفته روی گیاه دارویی بادرنجبویه نشان داد که تنش کم‌آبی بر صفات ارتفاع بوته، تعداد پنجه و طول میانگره، عملکرد اندام هوایی و همچنین عملکرد و بازده اسانس اثرات منفی گذاشت (Ardakani *et al.*, 2007).

استفاده از کودهای آلی از موثرترین شیوه‌های تغذیه گیاه در جهت افزایش عملکرد، هماهنگ با محیط زیست و نیل به اهداف کشاورزی اکولوژیک است (Fernandez *et al.*, 2016). ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های موجود در خاک هستند که اطراف و یا روی سطح ریشه گیاهان زندگی می‌کنند و بطور مستقیم و یا غیرمستقیم در تحریک رشد و نمو گیاه از طریق تولید و ترشح تنظیم کننده‌های شیمیایی در ریزوسفر موثرند. گروهی از پژوهشگران (Kloepper & Schroth, 1981). مستند نمودند که باکتری‌های محرک رشد از طریق تغییر اجتماع میکروبی ریزوسفر و تولید مواد مختلف موجب تحریک رشد گیاه می‌گردند. به طور کلی باکتری‌های محرک رشد، رشد گیاه را به طور مستقیم هم با همکاری در جذب عناصر غذایی (نیتروژن، فسفر ومواد معدنی ضروری) و هم با تعدیل سطوح هورمون‌های گیاهی و یا به طور غیر مستقیم به شکل عوامل کنترل‌کننده زیستی با کاهش اثرات مهاری پاتوژن‌های مختلف بر رشد و نمو گیاه، تسهیل می‌کنند (Glick, 2012). نیکبخت و همکاران (۱۴۰۲) با بررسی اثرات تنش خشکی و باکتری‌های ریزوسفری ارتقادهنده رشد گیاه بر خصوصیات اگرومرفولوژیک بادرنجبویه، گزارش دادند که اثر باکتری و تنش خشکی بر ارتفاع بوته، تعداد شاخه‌های اصلی، تعداد شاخه‌های فرعی، وزن خشک

برگ، وزن خشک ساقه، سطح برگ، درصد اسانس، عملکرد بیولوژیک و عملکرد اسانس معنی‌دار بود. افزایش شدت تنش منجر به کاهش در تمام صفات مورد بررسی شد، درحالیکه تلقیح گیاهان با باکتری‌ها نقش مهمی در افزایش این صفات نسبت به شاهد نشان داد و کمترین مقادیر در تیمارهای بدون تلقیح مشاهده شد. این محققان عنوان داشتند که به منظور بهبود خصوصیات آگرومورفولوژیک و عملکرد کمی و کیفی بادرنجبویه در شرایط آبیاری کامل و روشهای کم‌آبیاری، تلقیح گیاه با باکتری‌های *Bacillus amyloliquefaciens*، *Azospirillum lipoferum* و *Streptomyces rimosus* توصیه می‌شود.

قارچ‌های میکوریزا در حدود ۴ الی ۲۰ درصد کربن تثبیت شده میزبان را مصرف می‌کنند و در عوض تا ۸۰ درصد فسفر و ۲۵ درصد نیتروژن مورد نیاز گیاه از طریق قارچ فراهم می‌شود (کوچکی و همکاران، ۱۳۸۴). قارچ‌های وزیکولار آربوسکولار میکوریزا اصلی‌ترین گروه قارچ‌های اندومیکوریزا هستند و عموماً در علفزارها وجود دارند و جزء لاینفک بسیاری از اکوسیستم‌ها به ویژه مناطق گرمسیری و جایی که غلظت مواد غذایی کم و متغیر است، می‌باشند. دارای دو نوع ساختار درون سلولی وزیکول و آربوسکول هستند. وزیکول‌ها معمولاً به شکل کروی یا متورم در انتهای هیف‌های درون ریشه‌ای ایجاد می‌شوند و دارای عملکرد ذخیره‌ای هستند (Sylvia *et al.*, 2005). از اثرات ویژه و مهم میکوریزا بر گیاه میزبان، جذب عناصر غذایی و به ویژه فسفر می‌باشد. سازوکار جذب از طریق افزایش حجم خاک قابل دسترس (سطح تماس) توسط هیف‌های قارچ، یا به عبارت دیگر از طریق افزایش طول مؤثر ریشه است. تحقیقات متعدد نشان داده است که فسفر، نیتروژن، پتاسیم، روی، مس، گوگرد، کلسیم و آهن توسط نظام میکوریزایی جذب شده و به گیاه منتقل می‌شوند (Cardoso & Kuyper, 2006). Marulanda *et al* (2007) بیان کردند که در گیاه اسطوخودوس میکوریزایی شده، سویه‌های بومی مقاوم به خشکی *Glomus mosseae*

و *G. intraradice* رشد ریشه را به ترتیب به میزان ۳۵ و ۱۰۰ درصد افزایش دادند. علی آبادی فراهانی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش کردند که کاربرد میکوریزا سبب افزایش معنی‌دار عملکرد و طول ریشه گشنیز شد. Sannazzaro *et al* (2006) گزارش کردند که تلقیح قارچ *G. intraradices* با شبدر نسبت بخش هوایی به ریشه را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داد. Sanchez-Blanco *et al* (2004) نیز اظهار داشتند که تحت شرایط خشکی، زیست‌توده ریشه و بخش‌های هوایی گیاه رزماری میکوریزایی شده در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزایی افزایش داشته است.

بنابراین تحقیق حاضر با هدف مطالعه اثرات کاربرد باکتری محرک رشد و قارچ مایکوریزا بر رشد، درصد اسانس و ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تنش خشکی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی طی سال ۱۴۰۰ اجرا شد. تنش خشکی در دو سطح (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به عنوان فاکتور اول و تلقیح بذر با میکروارگانیسم‌های همزیست در چهار سطح (بدون تلقیح، تلقیح با باکتری *Azospirillum brasilense*، تلقیح با قارچ *Glomus mosseae* و تلقیح با *A. brasilense*+ *G. mosseae*) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. در این تحقیق از باکتری *Azospirillum brasilense* سویه Sp245 به صورت خالص و با جمعیت 10^8 CFU/mL به عنوان باکتری محرک رشد استفاده گردید. مایه تلقیح قارچ آربوسکولار میکوریزا مورد استفاده از نوع *G. mosseae* با مقدار ۱۰۰ گرم برای هر گلدان بود. بذرهای گیاه بادرنجبویه (رقم لیمون) بعد از ضدعفونی و شست‌وشو با آب مقطر تحت تیمارهای مختلف تلقیح میکروبی قرار گرفتند.

در تیمار شاهد، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند و مایع تلقیح قارچ میکوریزا اتوکلاو شده به خاک آن‌ها اضافه شد. در تیمار باکتری محرک رشد، بذرها ۳۰ دقیقه در مایه تلقیح باکتری محرک رشد قرار گرفتند و مایع تلقیح قارچ میکوریزا اتوکلاو شده به خاک آن‌ها اضافه شد، در تیمار قارچ میکوریزا، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند و مایع تلقیح قارچ میکوریزا به خاک آن‌ها اضافه شد و در تیمار ترکیبی باکتری محرک رشد و قارچ میکوریزا، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در مایه تلقیح باکتری محرک رشد قرار گرفتند و مایع تلقیح قارچ میکوریزا به خاک آن‌ها اضافه شد. پس از کاشت بذر، گلدان‌ها به مدت ۳۰ روز در شرایط کنترل شده با دمای روز ۲۵ و شب ۲۲ درجه سانتی-گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شدند. در این مدت، آبیاری بر حسب معمول و نیاز گلدان‌ها و هفته‌ای یک بار با محلول هوگلند و غلظت ۱/۲ عناصر تغذیه شدند. بعد از مدت زمان ۳۰ روز، نصف گلدان‌های هر تیمار (تیمارهای حاصل از تلقیح میکروبی) تحت تیمار تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) با روش وزنی قرار گرفتند (Allen *et al.*, 2000). مدت ۳۰ روز بعد از اعمال تنش خشکی، نمونه‌برداری انجام و شمارش تعداد برگ‌ها و ارتفاع گیاه از روی شمارش و اندازه‌گیری ده بوته انجام شد. جهت اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه وزن و در هاون با پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی ساییده و سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها مطابق روش Lichtenthaler & Wellburn (1983) محاسبه گردید. جهت اندازه‌گیری اسانس، از هر تکرار مربوط به هر تیمار مقدار ۲۵ گرم از ماده خشک گیاهی الک‌شده با مش ۱۲۰۰ وزن شد. با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط گردید و سپس اسانس گیاه به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. اسانس به دست آمده با

استفاده از سولفات سدیم آبگیری شد. اسانس‌ها پس از آبگیری توسط سولفات سدیم بدون آب، توسط سرنگ به درون ویال شیشه-ای ریخته شد، برای خارج شدن ان هگزان از اسانس، از هوای خنک سشوار به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. اسانس تا زمان آنالیز در ویال شیشه‌ای قرار گرفت، درِ شیشه‌ها با پارافیلم پیچیده شد و سپس ویال‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برحسب وزن خشک گیاه، درصد اسانس محاسبه گردید. جهت جداسازی و شناسایی محتویات ترکیبات اسانس گیاه بادرنجبویه از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Hewlett-Packard-5890 دارای سیستم تله یونی استفاده گردید که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتیگراد برای تولید منبع یون تنظیم گردید. رقیق کردن نمونه‌ها به روش شکافت با نسبت ۱:۱۰۰ انجام گردید. ستون موئینه به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲ میلیمتر و ضخامت فیلم ۲۵ میکرومتر و ذرات از جنس متیل سیلیکون با اتصال عرضی بودند. اشکارساز از نوع انتخابگر جرمی mass-selective (HP-5970 detector-USA) بود. برنامه حرارتی از ۱۰۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با تغییرات ۴ درجه در دقیقه استفاده گردید. از هلیم فوق خالص با سرعت عبور ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد برای تولید منبع یون تنظیم گردید. شناسایی هر ترکیب براساس زمان بازداری و جرم ثبت شده آن‌ها انجام شد (Davies, 1990). برای ارزیابی مواد موثره از دستگاه GC-mass مدل Varian 3400, USA با ستون سیلیکاته DB-5 ۳۰ متر × ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر (J and W Scientific, Inc) استفاده شد. برای رقیق کردن اسانس از دی کلرومتان با نسبت ۱۰ به ۱ استفاده شد. هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. حجم تزریق و دمای انژکتور به ترتیب ۰/۲ میکرولیتر و ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. دمای ستون به مدت ۵ دقیقه

در ۶۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد و سپس با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید و با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد رسید و در نهایت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا برنامه ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. با استفاده از سری آلکان C7-C26، شاخص‌های ماندگاری (RIs) ترکیبات اسانس تعیین شد. ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها با مقایسه طیف جرمی ترکیبات اسانس با طیف جرمی کتابخانه NIST11.0 و مقایسه IRهای منتشر شده در مقالات شناسایی شدند. در نهایت، تجزیه واریانس داده های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel ver. 2013 انجام گرفت.

نتایج و بحث

صفات رشدی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثرات اصلی تیمارهای تنش خشکی و تلقیح میکروبی بر صفات ارتفاع بوته و تعداد برگ در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، در حالیکه اثر متقابل بین تنش خشکی × تلقیح میکروبی بر صفات یاد شده معنی‌دار نشد (جدول ۱).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمارها نشان داد که تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار ارتفاع و تعداد برگ در بوته در مقایسه با گیاهان شاهد بدون تنش شد. با این وجود، تلقیح میکروبی (باکتری محرک رشد، قارچ میکوریزا و تلقیح همزمان باکتری و قارچ) به طور معنی‌داری باعث افزایش صفات رشدی در گیاهان شاهد بدون تنش و تحت تنش شد (شکل‌های ۱ و ۲). تنش خشکی موجب بسته شدن روزنه‌ها و کاهش متابولیت‌های فتوسنتزی، کاهش سرعت سوخت و ساز کربن و کاهش هدایت روزنه‌ای و جذب آب در اثر کاهش رشد ریشه، و در نتیجه موجب اختلال

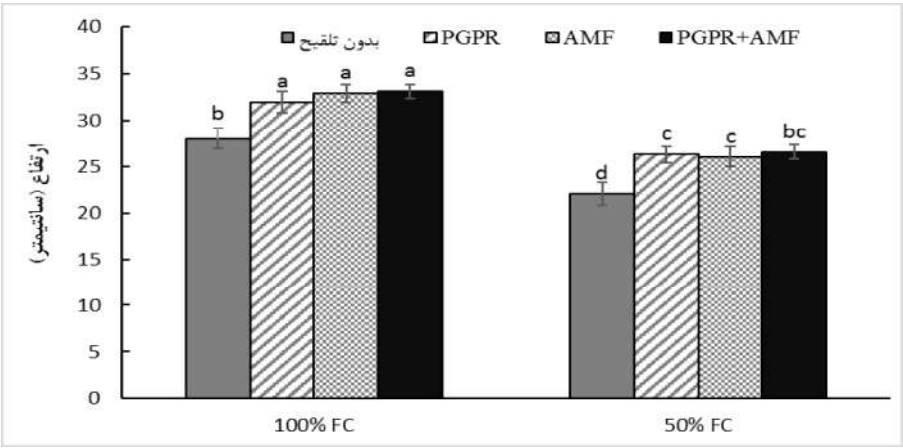
در رشد و کاهش ماده خشک تولیدی در هر دو بخش رویشی و زایشی گیاه می‌گردد (صارمی و همکاران، ۱۳۹۹). بررسی‌های به عمل آمده توسط سایر محققان نیز نشان داد که اعمال تنش خشکی منجر به کاهش رشد و تعداد برگ در بوته گیاه دارویی بادرنجبویه گردید (Idrees *et al.*, 2010; Saheri *et al.*, 2020). کاهش معنی‌دار رشد و عملکرد دو رقم لوبیا در نتایج سایر پژوهشگران گزارش شده است (Dolatkhah Dashtmian *et al.*, 2023). میکوریزا به واسطه افزایش جذب عناصر غذایی و بهبود فرآیند فتوسنتز، نقش مثبتی در افزایش رشد بوته دارد (ولی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۸). گزارش شده که استفاده از قارچ‌های میکوریزا موجب افزایش در صفات ارتفاع بوته، شاخص‌های رشد و عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی زیره سبز گردید که احتمالاً بخشی از ریسه‌ها وارد سیستم ریشه شده و سبب کاهش غلظت اسید آبسزیک و افزایش میزان سیتوکینین‌ها شده است که این امر موجب گسترش سیستم ریشه‌ای و افزایش جذب آب و مواد غذایی می‌شود (Haghir Ebrahimabadi *et al.*, 2018).

بررسی‌های به عمل آمده توسط Khandan-Mirkohi *et al* (2016) نیز نشان داد که تأثیر تلقیح مشترک باکتری‌های محرک رشد و قارچ ریشه (*Glomus mossea*) بر شاخص های رشدی گل استئوسپرموم معنی‌دار بود و موجب افزایش ارتفاع، شمار برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، سطح برگ، طول ریشه و حجم ریشه شد. در مطالعه دیگری، Khosravi *et al* (2018) گزارش دادند که ارتفاع بوته گیاه دارویی بادرشبو در تیمارهای تلقیحی باکتریایی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.

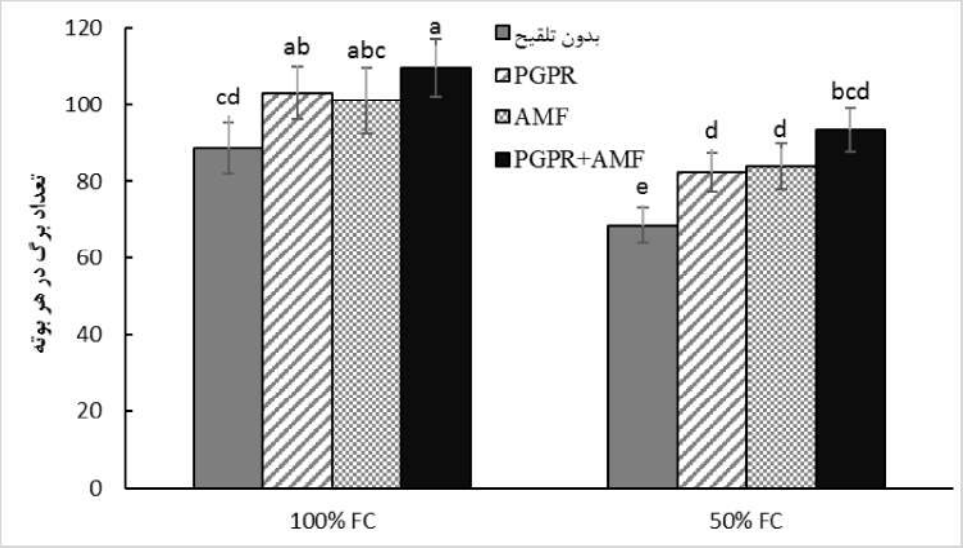
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تیمارهای تنش خشکی و تلقیح میکروبی

منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع	تعداد برگ در بوته	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید
تنش خشکی	۱	۲۳۶**	۲۰۵۳**	۱/۶**	۰/۳۱**	۰/۳**
تلقیح میکروبی	۳	۲۹**	۵۳۴**	۰/۰۵*	۰/۰۲*	۰/۰۰۹*
تنش × تلقیح	۳	۰/۵ns	۷ns	۰/۰۹**	۰/۰۱ns	۰/۰۰۸*
خطا	۱۶	۱/۰۱	۴۲	۰/۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۹	۸/۱	۶/۹	۹/۲	۸/۴

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد، ns عدم اختلاف معنی‌دار



شکل ۱- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر ارتفاع بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)



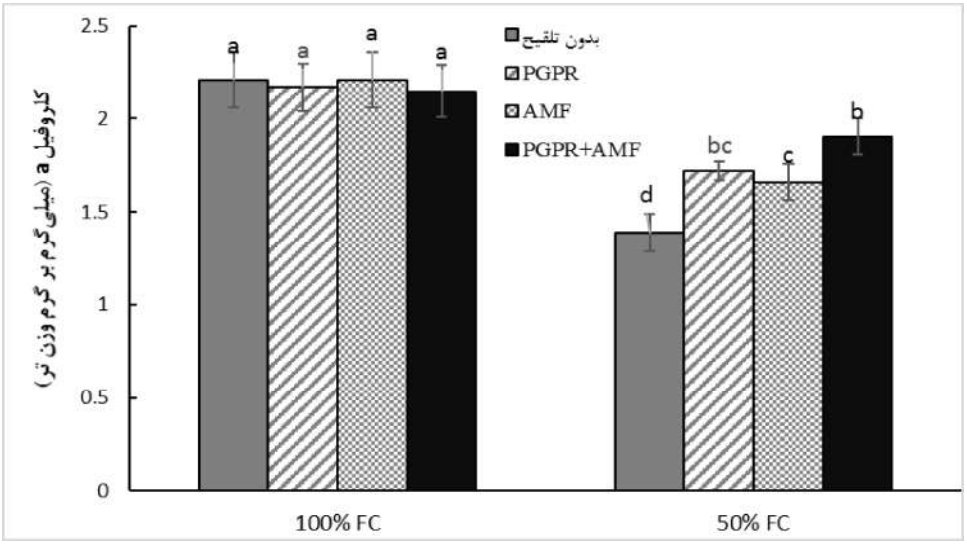
شکل ۲- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر تعداد برگ بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

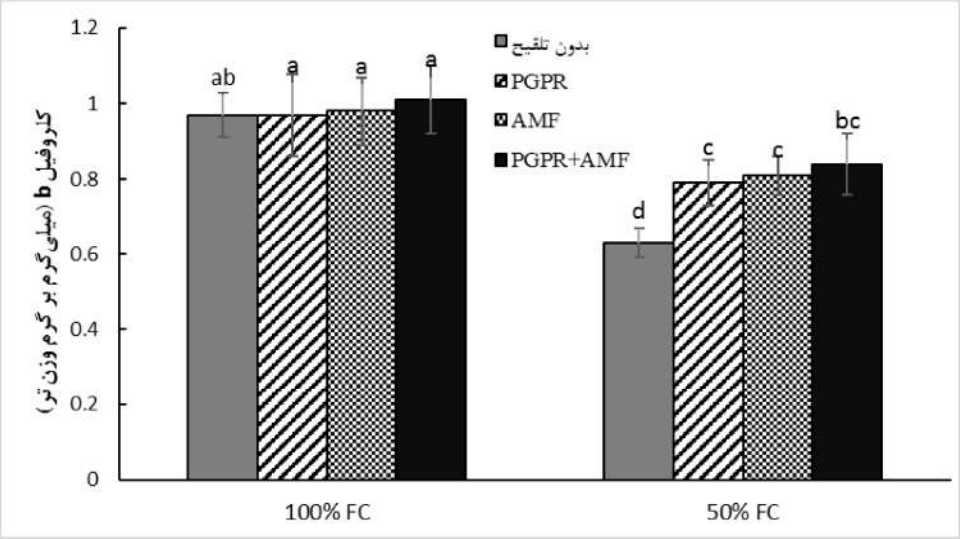
مطابق نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید تحت تنش خشکی ($P<0.01$) و تلقیح میکروبی ($P<0.05$) معنی‌دار گردید. همچنین اثر متقابل بین تنش خشکی × تلقیح میکروبی برای محتوای کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد و برای محتوای کاروتنوئید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. محتوای کلروفیل b تحت برهمکنش بین تنش و تلقیح قرار نگرفت.

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها، اعمال تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گردید. بین تیمارهای تلقیح میکروبی اختلاف معنی‌داری از نظر محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید تحت شرایط آبیاری با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده نشد در حالیکه در شرایط اعمال تنش خشکی (آبیاری با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، کاربرد جداگانه هر یک از باکتری‌های محرک رشد یا قارچ و به‌خصوص کاربرد همزمان باکتری و قارچ

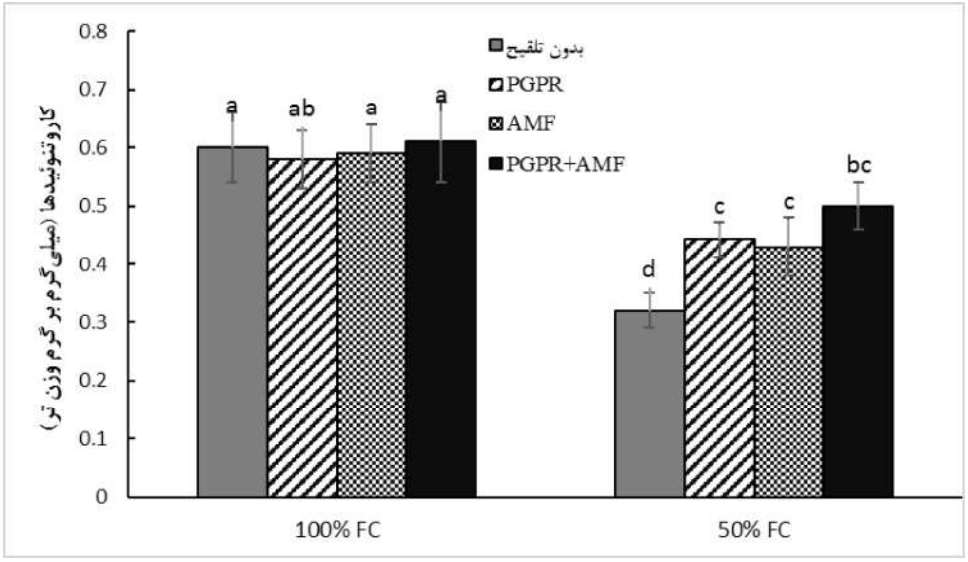
موجب بهبود معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). کمبود میزان آب بافت‌ها در تنش‌های طولانی مدت موجب افزایش فرآیند اکسیداتیو و متعاقب آن زوال ساختار کلروپلاست و کاهش کلروفیل و در نتیجه کاهش فعالیت فتوسنتز می‌شود (صارمی و همکاران، ۱۳۹۹). تنش خشکی به واسطه خسارت کلروفیل در نتیجه رادیکال‌های آزاد موجب کاهش محتوای کلروفیل می‌گردد (Mafakheri *et al.*, 2010). مطالعات قبلی نشان داد که افزایش غلظت کلروفیل می‌تواند ناشی از بهبود جذب عناصر غذایی نظیر نیتروژن و منیزیم به واسطه کاربرد قارچ مایکوریزا باشد (Munoz *et al.*, 2011). باکتری‌های محرک رشد گیاه به واسطه بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو می‌توانند به حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی کمک نمایند (Batool *et al.*, 2020).



شکل ۳- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر محتوای کلروفیل a گیاه دارویی بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)



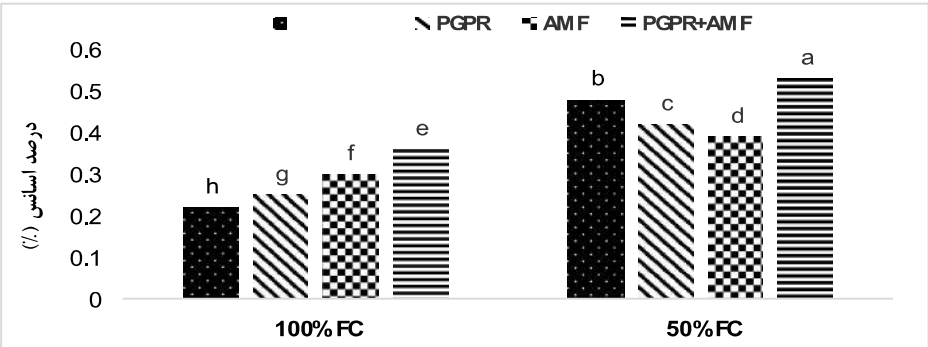
شکل ۴- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر محتوای کلروفیل b گیاه دارویی بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)



شکل ۵- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر محتوای کاروتنوئید گیاه دارویی بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی).

محتوای اسانس

نتایج نشان داد که درصد اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تنش خشکی در تمامی سطوح تلقیح میکروبی به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار آبیاری با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود. بیشترین درصد اسانس در هر دو شرایط تنش (۰/۵۳ درصد) و بدون تنش (۰/۳۶ درصد) با کاربرد ترکیبی باکتری + قارچ حاضل گردید که به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای تلقیح جداگانه باکتری و قارچ و همچنین شاهد بدون تلقیح بود (شکل ۶). مطالعات قبلی نشان داد که اعمال تنش متوسط خشکی موجب افزایش ۳۵/۵ درصدی محتوای اسانس گیاه گشنیز گردید (Afshari *et al.*, 2023). افزایش مشابهی در محتوای اسانس گیاهان دارویی نظیر *Cuminum cyminum* (Alinian *et al.*, 2016) و *Pelargonium odoratissimum* (Khalid *et al.*, 2010) تحت تنش خشکی گزارش شده است، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. بررسی‌های به عمل آمده توسط ذاکریان و همکاران (Zakerian *et al.*, 2020) و Bidgoli *et al* (2019) نشان داد که تلقیح باکتری محرک رشد و قارچ میکوریزا می‌تواند اثرات مثبتی بر محتوای اسانس گیاهان دارویی داشته باشد، که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۶- اثر تلقیح باکتری محرک رشد (PGPR) و میکوریزا (AMF) بر محتوای اسانس برگ بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی).

ترکیبات شیمیایی اسانس

نتایج حاصل نشان داد که سی و هشت ترکیب در اسانس برگ بادرنجبویه شناسایی شد که در چهار گروه اصلی شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار، هیدروکربن‌های سزکوئی‌ترپن و هیدروکربن‌های مونوترپن تعلق داشتند. گروه مونوترپن‌های اکسیژن‌دار کلاس غالب اسانس بادرنجبویه در تمام تیمارها بود. تنش خشکی و هر سه تیمار تلقیح میکروبی شامل تلقیح PGPR، AMF و PGPR + AMF موجب افزایش ترکیبات گروه هیدروکربن‌های سزکوئی‌ترپن و هیدروکربن‌های مونوترپن در مقایسه با گیاهان غیرتلقیح شده آبیاری شده با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی شد. با این حال، غلظت ترکیبات مونوترپن اکسیژن‌دار تحت تنش خشکی و سه تیمار تلقیح میکروبی نسبت به گیاهان غیرتلقیح شده تحت تیمار آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت (جدول ۲). نتایج نشان داد که آلفا سیترال (۴۰/۴۶ درصد)، نرال (۲۸/۰۲ درصد) و سیترونلال (۸/۸۷ درصد) به عنوان ترکیبات فعال بیولوژیکی در اسانس برگ بادرنجبویه، فراوان‌ترین ترکیبات در گیاهان شاهد بودند. تنش خشکی ترکیبات آلفا سیترال (۳۶/۱۸ درصد)، نرال (۲۵/۴۴ درصد) و سیترونلال (۷/۰۱ درصد) را نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد. در گیاهان بدون تلقیح تیمار شده با آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، تیمارهای تلقیح میکروبی سیترونلال را افزایش داد و α-سیترال و نرال را کاهش داد. در گیاهان غیرتلقیح شده تحت تیمار تنش خشکی، تیمارهای تلقیح میکروبی موجب افزایش سیترونل و کاهش نرال شدند. با این حال، کلونیزاسیون PGPR و AMF محتوای سیترال را افزایش داد و کلونیزاسیون مشترک میکروبی موجب کاهش محتوای سیترال در گیاهان غیرتلقیح شده تحت تیمار تنش خشکی گردید.

جدول ۲- اثر باکتری محرک رشد (PGPR)، میکوریزا (AMF) و تلقیح توام (PGPR+AMF) بر ترکیبات اسانس برگ بادرنجبویه تحت شرایط بدون تنش و تنش خشکی

Compounds	RI	Treatment							
		شاهد	PGPR	AMF	PGPR + AMF	تنش خشکی	تنش خشکی + PGPR	تنش خشکی + AMF	تنش خشکی + PGPR+AMF
Monoterpenes Hydrocarbons (%)									
α-pinene	936	0.33	0.25	0.31	0.38	0.35	0.32	0.35	0.38
Sabinene	976	0.04	0.09	0.04	0.09	0.12	0.08	0.09	0.13
β-pinene	979	0.18	0.22	0.16	0.15	0.15	0.21	0.26	0.17
Myrcene	991	4.04	5.02	5.33	5.22	5.39	5.63	5.35	5.42
α-phellandrene	1005	-	0.15	0.21	0.21	0.27	0.34	0.35	0.33
δ-3-carene	1011	0.08	-	0.05	0.05	0.05	-	-	-
p-cymene	1027	-	0.02	-	0.06	0.17	0.03	0.05	0.11
o-cymene	1027	0.19	0.14	0.09	0.05	0.27	0.13	0.07	0.21
Limonene	1031	-	-	-	-	0.07	-	0.04	0.16
β-phellandrene	1031	0.21	0.11	0.12	0.21	0.37	0.21	0.15	0.12
γ-terpinene	1033	0.47	0.35	0.39	0.22	0.41	0.21	0.29	0.32
Terpinolene	1100	-	0.88	0.75	1.13	0.61	1.06	0.92	1.04
Oxygenated Monoterpenes (%)									
Linalool	1104	1.11	0.51	0.68	0.42	0.58	0.42	0.36	0.41
Trans-thujone	1147	1.12	0.27	0.55	0.22	0.39	0.53	0.46	0.45
Cis-verbenol	1147	0.21	0.45	0.41	0.64	1.23	1.13	1.08	1.38
Camphor	1148	0.48	0.65	0.61	0.68	0.63	0.61	0.61	0.61
Isopulegol	1155	-	1.25	0.92	1.32	1.09	1.38	1.44	1.62
Citronellal	1167	8.87	11.08	11.53	13.12	7.01	8.25	9.21	9.63
Lavandulol	1169	-	0.25	0.35	0.44	0.41	0.39	0.45	0.63
Methylchavicol	1180	0.34	0.08	-	0.11	0.16	0.25	0.31	0.72
Estragol	1184	-	-	0.11	0.05	0.08	0.07	0.08	0.07
Citronellol	1198	2.39	1.95	1.68	2.05	2.11	1.54	1.55	2.36
Nerol	1198	-	0.36	0.29	0.07	0.61	0.21	0.15	0.32
Pulegone	119	1.25	1.54	1.57	1.84	1.75	1.62	1.58	1.67

Neral	8 1230	28.02	23.05	22.02	22.51	25.44	20.02	20.09	19.38
Chavicol	1243	1.52	-	0.22	0.38	1.12	0.45	0.46	0.74
Geraniol	1247	-	1.82	1.61	2.17	2.15	1.82	1.95	2.38
α-citral	1276	40.46	35.92	37.33	36.11	36.18	36.58	37.19	36.08
Neryl acetate	1385	-	-	-	-	2.28	2.15	1.87	2.09
Geranyl acetate	1390	-	1.13	1.19	1.82	0.81	1.68	1.59	2.08
Sesquiterpenes Hydrocarbons (%)									
Trans-caryophyllene	**1413**	2.01	3.04	3.01	3.41	2.41	3.54	3.55	3.55
Aromadendrene	**1452**	-	-	-	0.22	-	0.19	0.09	0.36
α-curcumene	**1484**	-	0.36	0.32	-	0.24	0.42	0.49	0.34
α-amorphene	**1494**	0.18	0.18	0.29	0.43	0.28	0.21	0.33	0.45
δ-cadinene	**1672**	0.41	0.21	0.32	0.37	0.52	0.14	0.14	0.29
Oxygenated sesquiterpenes (%)									
Tumerol	**1705**	0.09	0.11	0.09	0.16	0.08	0.07	0.09	0.23
Caryophyllene-oxide	**2108**	2.12	1.45	1.82	2.34	2.24	2.39	1.92	2.39
Tumerone-dihydro	**2109**	0.28	0.59	0.46	0.52	0.29	0.52	0.35	0.41
Total identified (%)		96.4	93.48	94.83	99.17	98.32	94.8	95.31	99.03
Groups of compounds (%)									
Monoterpenes Hydrocarbons		5.54	7.23	7.45	7.77	8.23	8.22	7.92	8.39
Oxygenated Monoterpenes		85.77	80.31	81.07	83.95	84.03	79.1	80.43	82.62
Sesquiterpenes Hydrocarbons		2.6	3.79	3.94	4.43	3.45	4.5	4.6	4.99
Oxygenated Sesquiterpenes		2.49	2.15	2.37	3.02	2.61	2.98	2.36	3.03

PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria, AMF: arbuscular mycorrhizal fungi

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که اعمال تنش خشکی موجب کاهش ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نظیر کلروفیل a، b و کاروتنوئید شد در حالیکه درصد اسانس در شرایط تنش خشکی افزایش یافت. استفاده از میکروارگانیسم‌های همزیست به صورت جداگانه و به‌خصوص ترکیبی در هر دو شرایط تنش و عدم تنش موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع و تعداد برگ در بوته گردید. همچنین، تلقیح میکروبی به هر دو صورت کاربرد جداگانه باکتری و قارچ یا ترکیب آن‌ها تغییر معنی‌داری در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در مقایسه با گیاهان شاهد تحت شرایط عدم تنش ایجاد نکرد در حالیکه موجب افزایش معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش شد و بیشترین میزان افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تلقیح همزمان باکتری محرک رشد + قارچ مایکوریزا حاصل شد. بیشترین درصد اسانس تحت هر دو شرایط تنش و عدم تنش با کاربرد تلفیقی باکتری + قارچ مشاهده گردید، اگرچه حداکثر درصد اسانس تحت تنش خشکی با تلقیح همزمان باکتری + قارچ به‌دست آمد.

منابع

انجام، ح.، م. حسینی فرهی، و م. عبدی پور. ۱۴۰۲. کاربرد قارچ میکوریزا و پوتریسین بر ویژگی‌های رویشی، عملکرد بذر و اسانس گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum*) تحت تنش خشکی. پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار، ۳ (۳): ۴۷-۲۸.

صارمی، س.، م. قلی‌پور، ح. عباسدخت، ح. نقدی بادی، ع. مهرآفرین، و ح.ز. اصغری. ۱۳۹۹. پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک گیاه عروسک پشت پرده به محلول‌پاشی اسیدهای آمینه تحت شرایط تنش خشکی. نشریه علمی تغذیه گیاهان باغی، ۳(۲): ۸۶-۷۱.

علی آبادی فراهانی، ح.، م.ح. لباسچی، ا.ح. شیرانی‌راد، ع. ولدآبادی، آ. حمیدی، ج. دانشیان، ب. عباس‌زاده، و ع. علیزاده سهرابی. ۱۳۸۶. تأثیر کاربرد قارچ میکوریزآربوسکولار (*Glomus hoi*) سطوح مختلف فسفروتنش خشکی به تعدادی از صفات گشنیز (*Coriandrium sativum*). خلاصه مقالات دومین همایش ملی کشاورزی و بوم شناختی ایران، ۲۵ و ۲۶ مهر ماه ۱۳۸۶، گرگان. ص ۸۳.

کوچکی، ع.، ا. زند، م. بنایان، پ. رضوانی، ع. مهدوی دامغانی، م. جامی الاحمدی، و س.ر. وصال. ۱۳۸۴. اکوفیزیولوژی گیاهی (ترجمه)، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۴۴۵ ص.

نیکبخت، ن.، ع. دانش شهرکی، و م. کوهی دهکردی. ۱۴۰۱. اثر تنش خشکی و باکتری‌های ریزوسفری ارتقادهنده رشد گیاه بر خصوصیات اگرومرفولوژیک بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L). تنش‌های محیطی در علوم زراعی، ۱۵ (۲): ۳۹۳-۴۰۵.

ولی‌نژاد، ز.، ع. قلی‌زاده ، م. نعیمی، ا. غلامعلی‌پور علمداری، و م. زارعی. ۱۳۹۸. تأثیر ورمی‌کمپوست و قارچ میکوریزا بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی استویا

Batool, T., S. Ali, M.F. Seleiman, N.H. Naveed, A. Ali, K. Ahmed, M. Abid, M. Rizwan, M.R. Shahid, M. Alotaibi, I. Al-Ashkar, and M. Mubushar. 2020. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. Sci. Rep, 10: 16975.

Begum, N., M.A. Ahanger, Y. Su, Y. Lei, N.S.A. Mustafa, P. Ahmad, and L. Zhang. 2019. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. Plants (Basel), 8(12): 579.

Bidgoli, R.D., N. Azarnezhad, M. Akhbari, and M. Ghorbani. 2019. Salinity stress and PGPR effects on essential oil changes in *Rosmarinus officinalis* L. Agric. Food Secur., 8: 2.
Cardoso, I., and M.T.W. Kuyper. 2006. Mycorrhiza and tropical soil fertility. Agric. Ecosyst. Environ, 116: 72- 84.

Davies, N.W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. J. Chromato, 503: 1-24.

Dolatkhah Dashtmian, A., Hosseini Mazinani, and A. Pazoki. 2023. نشریه (*Stevia rebaudiana* Bertoni). علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۵ (۳): ۴۸۴-۵۰۰.

Afshari, M., A. Pazoki, and O. Sadeghipour. 2023. Biochemical changes of coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants under drought stress and foliar application of salicylic acid and silicon nanoparticles**.** J. Medicin. Plants By-prod., 3: 197-207.

Alinian, S., J. Razmjoo, and H. Zeinali. 2016 Flavonoids, anthocynins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum* L.) accessions under different irrigation regimes. Ind. Crops Prod, 81: 49-55.

Allen, R.G., L.S. Pereira, D. Raes, and M. Smith. 2000. Crop evapotranspiration. FAO irrigation and drainage paper, no. 56. FAO, Roma, 1–300.

Ardakani, M.R., B. Abaszade, A. Ashurabadi, M.H. Lebaschi, and F. Paknezhad. 2007. The effect of water shortages on the quantity and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). J. Medic. Arom. Plant Res, 23(2): 251-261.

yield components, and essntial oil constituents in *Cuminum cyminum* L. J. Medicin. Plants, 17(66): 74-90.

Idrees, M., M.M.A. Khan, T. Aftab, M. Naeem, and N. Hashmi. 2010. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. J. Plant Interact, 5(4): 293-303.

Khalid, K.A., J.A. Teixeira da Silva, and W. Caic. 2010. Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* L. Sci. Hortic, 125: 159-166.

Khandan-Mirkohi, A., M.R. Taheri, F. ZafarFarrokhi, and F. Rejali. 2016. EFfects of arbuscular mycorrhizal fungus and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) under drought stress on growth of ornamental osteospermum (*Osteospermum hybrida* 'Passion Mix'). Iranian J. Horti. Sci, 47(2): 177-192.

Khosravi, M., A. Danesh Shahraki, M. Ghobadi Nia, and K. Saidii. 2018. The effect of biological seed treatments Exogenous chitosan nanoparticles modulated drought stress through changing yield, biochemical attributes, and fatty acid profile of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) cultivars. Gesunde Pflanzen, 75(6): 1-14.

Fernandez, A.L., C.C. Sheaffer, D.L. Wyse, C. Staley, T.J. Gould, and M.J. Sadowsky. 2016. Associations between soil bacterial community structure and nutrient cycling functions in long-term organic farm soils following cover crop and organic fertilizer amendment. Sci. Total Environ, 566: 949-959.

Ghodrat, V. and A. Bahrani. 2022. Drought tolerance indices in cotton genotypes as affected by different irrigation regimes. Egyptian J. Agric. Res, 100: 204-213.

Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica (Cairo), 963401.

Haghir Ebrahimabadi, A., M. Hatami, K. Karimzadeh Asl, and M. Ghorbanpour. 2018. Effect of mycorrhizal fungi and biophosphor fertilizer on growth features, yield and

Munoz, I.E., R. Garcia de Salamone, J.M. Aroca, R. Ruiz Lozano, and R. Azcón. 2011. *Azospirillum* and *arbuscular* mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. J. Plant Physiol, 168: 1031-1037.

Saheri, F., G. Barzin, L. Pishkar, M. Mashhadi Akbar Boojar, and L. Babaeekhou. 2020. Foliar spray of salicylic acid induces physiological and biochemical changes in purslane (*Portulaca oleracea* L.) under drought stress. Biologia, 75: 2189-2200.

Sanchez-Blanco, M.J., T. Ferrandez, M.A. Morales, A. Morte, and J.J. Alarcon. 2004. Variations in water status, gas exchange, and growth in Rosmarinus officinalis plants infected with Glomus deserticola under drought conditions. J. Plant Physiol, 161: 675-682.

Sannazzaro, A.L., O.A. Ruiz, E.O. Alberto, and A.B. Menendez. 2006. Alleviation of salt stress in Lotus glaberby *Glomus* intraradices. Plant Soil, 285: 279-287.

Sylvia, D.M., J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer. 2005. Principles and applications of soil on morphological characteristics of *Dracocephalum moldavica* L. under drought stress. Environ. Stress. Crop Sci, 11: 353-363.

Kloepper, J.W., and M.N. Schroth. 1981. Relationship of in vitroantibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. Phytopathol, 71: 1020-1024.

Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Society Transact, 11: 591-592.

Mafakheri, A., A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P.C. Struik, and E. Sohrabi. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. Australian J. Crop Sci, 4(8): 580-585.

Marulanda, A., R. Porcel, J.M. Barea, and R. Azcon. 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* Species. Microb. Ecol, 54: 543-552.

microbiology. 2nd ed. Pearson. Prentice Hall, New Jersey. 640 p. ISBN: 0130941174.

Zakerian, F., F. Sefidkon, B. Abbaszadeh, and S. Kalate Jari. 2020. Effects of water stress and mycorrhizal fungi on essential oil content and composition of Satureja sahendica Bornm. J. Agric. Sci. Tech, 22(3): 789-799.

Study the effects of symbiotic microorganisms on growth, percentage and chemical composition of essential oil of Lemon balm *(Melissa officinalis* L.) under drought stress

Olia Eshaghi Gorji[1], Hormoz Fallah[1*], Yousof Niknejad[1], Davood Barari Tari[1]

1. Department of Agronomy, Am.C., Islamic Azad University, Amol, Iran.

Recived: 2024.12.12 Accepted: 2025.3.6

Abstract

In order to study the effects of the use of symbiotic microorganisms on growth traits, essential oil content and chemical compositions of the essential oil of lemon balm (*Mellisa officinalis* L.) under drought stress, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications during 2021. Drought stress at two levels (100% field capacity (FC) and 50% FC) as the first factor and seed inoculation with symbiotic microorganisms at four levels (no inoculation, inoculation with *Azospirillum brasilense*, inoculation with *Glomus mosseae* and inoculation with *A. brasilense* + *G. mosseae*) were considered as the second factor. The results showed that drought stress reduced plant height, number of leaves per plant, concentration of photosynthetic pigments and enhanced the essential oil percentage. Inoculation of symbiotic microorganisms under non-stress conditions did not cause significant changes in the content of photosynthetic pigments, whereas it improved the height and number of leaves per plant. The application of each of the symbiotic microorganisms individually or in combination significantly increased plant height, number of leaves per plant, and photosynthetic pigment content in plants under drought stress. However, simultaneous inoculation of symbiotic microorganisms (bacteria + fungus) resulted in the highest plant height, number of leaves per plant, photosynthetic pigment content, and essential oil percentage under both stress and non-stress conditions. According to the findings of the present study, simultaneous application of plant growth-promoting bacteria and mycorrhizal fungi can help increase growth, improve photosynthetic pigment content, and enhance essential oil percentage of lemon balm under drought stress.

Keywords: *Azospirillum*, Drought stress, Essential oil, lemon balm, *Mycorrhiza*

[*] Corresponding author (hormoz.fallah@iau.ac.ir)