مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

اثر قارچ اندوفیت *سرندیپیتا ایندیکا* بر برخی از ویژگی‌های رشدی و متابولیت‌های ثانویه گیاه نعناع فلفلی تحت سمیت فلز سرب در خاک

صالح شهابی‌وند [۱،*]، الهام حسنپور [۱]، محمدرضا مرشدلو [۲]
[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه
[۲] گروه علوم و مهندسی باغبانی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۷/۰۸

چکیده

قارچ‌های آندوفیت ریشه، میکروارگانیسم‌های مفید خاک محسوب می‌شوند که با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در گیاهان میزبان، عملکرد آن‌ها را در رابطه با رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این پژوهش، تاثیر قارچ اندوفیت *Serendipita indica* (چهار سطح قارچ شامل تیمار فاقد قارچ، یک، دو و سه تکه از محیط کشت جامد قارچ به ابعاد ۰/۲×۱×۱ سانتی‌متر) بر درصد همزیستی، خصوصیات رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و نیز کمیت و کیفیت اسانس گیاه نعناع فلفلی تحت شرایط سمیت سرب در خاک (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار سرب باعث کاهش درصد همزیستی، ویژگی‌های رشدی، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و کمیت اسانس شد. کاربرد قارچ اثر مثبت بر صفات مورد بررسی داشت. با افزایش میزان قارچ در خاک، درصد همزیستی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی و کمیت اسانس (در برخی سطوح قارچ) به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. نتایج دستگاه GC-MS، ۲۸ ترکیب فیتوشیمیایی را نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات اسانس در تیمارهای مختلف شامل menthol (۴۸/۹۰- ۳۸/۰۱ درصد)، p-menth-l-en-9-ol (۱۷/۵۴- ۱۰/۶۸ درصد)، menthone (۸/۸۴- ۴/۸ درصد) و neomenthol (۷/۸۷- ۴/۱۷) بودند. حداکثر محتوای menthol و p-menth-l-en-9-ol در حضور قارچ *S. indica* (سه تکه از محیط جامد قارچ) و محیط فاقد سرب به دست آمد. با استفاده از این نتایج می‌توان گفت که قارچ *S. indica* باعث افزایش شاخص‌های رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و نیز تعدیل در میزان و ترکیبات اسانس گیاه نعناع فلفلی گردید و اثرات زیان‌بار سرب را در این گیاه به طور قابل توجهی کاهش داد.

واژگان کلیدی: اندوفیت ریشه، آلودگی سرب، نعناع فلفلی، متابولیت ثانویه

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک:shahabi70@yahoo.com

مقدمه:

نعناع فلفلی (*Menthe piperita* L.) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از گیاهان مهم دارویی و معطر می‌باشد. این گیاه گونه‌ای هیبرید است و از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* حاصل شده و بومی مناطق معتدله دنیا به‌ویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال آفریقا می‌باشد، اما امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود. ترکیبات این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، ضد اسپاسم، ضد سرطان، ضد حساسیت، ضد التهاب، ضد قارچ، ضد تهوع، ضد پراکسیداسیون لیپیدی و ضد سردرد می‌باشد (۱۹). اسانس نعناع فلفلی در صنایع آرایشی، بهداشتی، غذایی، نوشیدنی، فرآورده‌های دارویی و صنایع عطرسازی به‌مصرف می‌رسد. اسانس برگ‌های این گیاه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

منبع ارزشمندی از ترکیبات مهم مانند منتول و منتون است که دومین اسانس مهم پس از روغن‌های ضروری مرکبات بوده و سالانه حدود ۱۴۰۰۰ تن تولید و ۳۰۰ میلیون دلار درآمد دارد (۲۸).

امروزه استفاده از کودهای زیستی در جهت حرکت به‌سمت کشاورزی پایدار که سبب حفظ محیط‌زیست، منابع طبیعی، سلامت انسان و ارتقای کیفیت محصولات می‌گردد، امری اجتناب ناپذیر است (۲۰). قارچ سرندیپیتا ایندیکا (*Serendipita indica*) یک قارچ اندوفیت ریشه با نام قبلی *Piriformospora indica* می‌باشد که برای اولین بار از ریزوسفر درختچه‌های چوبی در صحرای تار راجستان هند جدا و شناسایی شد. این قارچ اندوفیت متعلق به شاخه‌ی Basidiomycota و رده‌ی Hymenomycetes و راسته‌ی Sebacinale می‌باشد (۲۳). تلقیح ریشه‌ی گیاهان مختلف با این قارچ باعث تحریک رشد و عملکرد شده و جذب عناصر غذایی را افزایش می‌دهد تا گیاه بتواند تحت شرایط تنش زنده بماند (۲۲). در آزمایشات مشاهده شده است که قارچ مذکور با افزایش مقدار کلروفیل و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی برگ و بهبود شاخص‌های فلورسانس، تحمل فلزات سنگین را در گیاهان تنباکو و آفتابگردان افزایش می‌دهد (۱۳). تلقیح این قارچ، گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی متحمل کرده و در نتیجه عملکرد زیست‌توده‌ی گیاهی را افزایش می‌دهد (۳۰).

آلودگی خاک توسط فلزات سنگین یکی از مشکلات اساسی زیست‌محیطی محسوب می‌شود و به‌دلیل ورود این عناصر به زنجیره غذایی، سلامتی انسان و سایر موجودات زنده را با مخاطرات فراوان مواجه می‌کند. منابع اصلی آلودگی خاک توسط فلزات سنگین شامل استخراج و ذوب فلزات، تولید انرژی و سوخت، فعالیت‌های صنعتی، دفع زباله جامد، کاربرد لجن، آبیاری توسط فاضلاب و اگزوز وسایل نقلیه هستند (۴). سرب (Pb) یکی از فراوان‌ترین فلزات سنگین سمی در خاک و یک عنصر غیرضروری برای موجودات زنده است که در همه‌جا پراکنده شده و اثر نامطلوبی بر مورفولوژی، رشد و فرآیندهای فتوسنتزی گیاهان دارد. همچنین سرب از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل، فعالیت آنزیم‌ها را در سطح سلولی مهار کرده و غلظت بالای آن باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان می‌شود که در نتیجه موجب ایجاد تنش اکسیداتیو خواهد شد (۲۴).

در تحقیقات قبلی ما تاثیر مثبت قارچ *S. indica* بر شاخص‌های رشدی مانند طول ریشه و اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی و شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلز سنگین مشخص شده است (۲۶ و ۲۷). همچنین اثر *S. indica* بر افزایش درصد اسانس و میزان برخی ترکیبات اسانس گیاه نعناع فلفلی گزارش شده است (۱۶).

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر قارچ آندوفیت ریشه *S. indica* بر درصد همزیستی، صفات رشدی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت شرایط سمیت سرب در خاک در گیاه دارویی و معطر نعناع فلفلی بود. همچنین میزان و کیفیت اسانس اندام هوایی گیاه نعناع فلفلی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها:

طرح آزمایشی، اعمال تیمارها و شرایط کشت: آزمایش بصورت فاکتوریل (۲×۴) در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار در گلخانه پژوهشی دانشگاه مراغه اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل فلز سرب (Pb) در دو سطح (۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و تیمار قارچ در ۴ سطح یعنی فقدان قارچ (P0) و حضور قارچ در سه سطح مختلف (S1, S2, S3) بود. جهت تکثیر قارچ *S. indica* از محیط تغییر یافته آسپرژیلوس یعنی هیل و کافر (۱۲) استفاده شد. قطعه‌ای به ابعاد ۱×۱×۰/۲ سانتی‌متر از محیط جامد اولیه، که در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه مراغه موجود بود، جدا و به طور وارونه بر روی محیط جدید در پلیت ۸ سانتی‌متری قرارداده شد، پلیت‌ها به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۵ دور در دقیقه قرارگرفتند و وقتی میسلیوم‌های قارچ به صورت متحدالمرکز و یکنواخت رشد کردند از انکوباتور خارج و برای تیمار با گیاه آماده شد.

خاک مورد استفاده برای گلدان‌ها از خاک مزرعه دانشگاه مراغه تهیه شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک به صورت:

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

رس ۹٪، سیلت ۱۴٪، ماسه ۷۷٪، EC مساوی ۲/۱۳، pH برابر ۷/۴، ماده آلی ۱/۲٪، فسفر قابل جذب ۸۴/۴ mg/kg و پتاسیم قابل جذب ۲۹۲ mg/kg بود. ابتدا خاک ۳۲ گلدان هفت کیلویی به دو قسمت تقسیم شد و بر روی دو نایلون به صورت مجزا قرار داده شد. به یکی از نمونه‌های خاک سرب به صورت نیترات سرب ($PbNO_3$) در غلظت ۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک اضافه شد و خاک دیگر بدون اعمال تیمار سرب باقی ماند. به مدت چهار هفته، دو روز یکبار به خاک‌ها آب داده و بهم زده شد تا سرب در اجزای تشکیل دهنده خاک کاملا پخش شود. گلدان‌های آزمایشی ابتدا با آب شستشو داده شده و با محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد ضدعفونی شدند و سپس ۷ کیلوگرم خاک آزمایشی به گلدان‌ها اضافه شد و برای زه‌کشی بهتر دانه‌های درشت‌تر ماسه در ته گلدان‌ها قرار گرفتند.

نشاءهای نعناع فلفلی از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه مراغه تهیه شد. برای هر گلدان تعداد ۳ نشاء نعناع فلفلی با فاصله حدود ۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. در ۳ نقطه از سطح خاک گلدان و به عمق ۶ سانتی‌متر در زیر هر نشاء، بسته به میزان تلقیح قارچ، برای سطح اول (P0)، تعداد یک تکه از محیط کشت جامد قارچ به ابعاد ۱×۰/۲×۱ سانتی‌متر، برای سطح دوم (P2)، تعداد دو تکه از محیط کشت جامد قارچ به ابعاد ذکر شده و برای سطح سوم (P3)، تعداد سه تکه از محیط کشت جامد قارچ به ابعاد ذکر شده، قرار گرفت و برای نمونه شاهد (P0)، بدون اعمال تیمار با قارچ، عمل کاشت انجام شد. آبیاری دستی، در پای گلدان به صورت یک روز در میان مقدار ۴۰۰ سی‌سی بود و محلول نیم هوگلند در سه مرحله در فواصل منظم به مقدار ۴۰۰ سی‌سی به خاک اضافه شد. گلدان‌های آزمایشی در دمای روزانه و شبانه گلخانه به ترتیب ۲ ± ۲۵ و ۲ ± ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ الی ۷۵ درصد کشت شدند و پس از اینکه به رشد کافی رسیدند (۱۱۰ روز پس از کاشت)، نمونه‌برداری انجام شد. برای آنالیزهای بیوشیمیایی نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند. بعد از جدا کردن قسمت هوایی گیاه از ریشه، طول و وزن تر ریشه و اندام هوایی کلیه‌ی گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها درون پاکت کاغذی قرار داده شده و به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون قرار داده شدند و وزن خشک نمونه‌ها به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم تعیین گردید.

تعیین درصد کلونیزاسیون: برای تعیین میزان همزیستی، پس از تقسیم نمونه‌های ریشه به قطعات کوچک (۱ سانتی‌متری)، به مدت ۱۰ دقیقه در KOH ۱۰٪ قرار گرفته، سپس با HCl ۲٪ در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه اسیدی شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول با نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۰۵ درصد و لاکتوفنول جوشانده و رنگ آمیزی شدند. درصد کلونیزاسیون ریشه‌های همزیست با استفاده از روش خطوط مشبک پیشنهاد شده توسط Giovanettiو Mosse (۱۱) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای تعیین غلظت کلروفیل‌های a وb و کاروتنوئیدها، مقدار ۰/۲ گرم از برگ تر گیاه نعناع فلفلی با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی له شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه اضافه و همگن شد و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه شد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئیدها قرائت شد. غلظت کلروفیل‌های a وb و کاروتنوئیدها با استفاده از روابط آرنون بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد (۳).

استخراج اسانس از نمونه‌های گیاهی با استفاده از دستگاه کلونجر: استخراج اسانس در آزمایشگاه به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. اندام هوایی گیاه نعناع فلفلی پس از خشک شدن کامل در دمای محیط و در سایه، خرد و آسیاب شده، سپس حدود ۱۵ گرم گیاه آسیاب شده و ۴۰۰ میلی لیتر آب را داخل بالن دستگاه کلونجر ریخته و عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از جمع‌آوری اسانس با استفاده از سولفات‌سدیم بدون آب، آبگیری انجام و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف‌های شیشه‌ای که درب آن‌ها به کمک

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

پارافیلم و بدنه آن‌ها به کمک فویل (پوش برگ) آلومینیومی کاملا پوشانده شده بود، نگهداری گردید.

تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس نمونه‌های گیاهی: برای تعیین ترکیبات اسانس و درصد آنها، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مدل Agilent 5977A ساخت کشور آمریکا، با ستون HP-5 MS (۵ درصد فنیل متیل پلی‌سیلوکسان، به‌طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ماده جاذب ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. در برنامه‌ریزی دمایی آون، ابتدا دما در عرض ۵ دقیقه به ۶۰ درجه سانتی‌گراد رسید سپس به تدریج دما با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد برسد. بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه در این دما نگه‌داشته شد. از هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. محفظه تزریق در حالت تقسیم (نسبت تقسیم ۱:۳۰) تنظیم شده و محدوده جذب جرمی از ۴۰ تا ۴۰۰ m/z بود. به منظور محاسبه شاخص بازداری پیک‌ها، مخلوطی از هیدروکربن‌های آلیفاتیک (C8-C40) تحت شرایط تحلیلی بالا به داخل سیستم GC تزریق شد. محاسبه و شناسایی ترکیبات اسانس به کمک شاخص‌های بازداری خطی آن‌ها و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه‌ی کامپیوتری صورت گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به این پژوهش با برنامه Excel ثبت و با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT-C تجزیه شد، مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم شدند.

نتایج:

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر اصلی سرب و قارچ بر درصد همزیستی و همه پارامترهای رشدی و نیز رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح احتمال ۱ درصد و اثر سرب بر درصد اسانس در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. اثر متقابل سرب×قارچ بر درصد همزیستی و وزن تر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد و بر سایر پارامترها شامل وزن تر اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئیدها و درصد اسانس در سطح یک درصد معنی‌دار شد.

نتایج نمودار ۱ نشان داد که اعمال تیمار سرب در محیط کشت باعث کاهش معنی‌دار درصد همزیستی شد و افزایش غلظت قارچ هم در محیط فاقد سرب و هم در محیط دارای سرب باعث افزایش در درصد همزیستی شد. بیشترین درصد همزیستی به سطح ۳ *S. indica* (P3) تعلق داشت.

داده‌های مربوط به نمودار ۲ (الف، ب، ج و د) نشان داد که تیمار سرب در خاک باعث کاهش معنی‌دار پارامترهای رشدی شامل وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی نعناع فلفلی شد. افزایش غلظت قارچ هم در محیط فاقد سرب و هم در محیط دارای سرب باعث افزایش در وزن تر اندام هوایی شده است. نتایج نشان داد که بیشترین وزن تر اندام هوایی (۲۵/۵۲ گرم)، وزن تر ریشه (۵۲/۷۸ گرم)، وزن خشک ریشه (۱۲/۴۵ گرم) و وزن خشک اندام هوایی (۷/۲۷ گرم) در تیمار با سطح ۳ قارچ *S. indica* (P3) و بدون تیمار سرب مشاهده شد. کم‌ترین وزن تر اندام هوایی (۸/۸۵ گرم)، وزن تر ریشه (۲۰/۴۵ گرم)، وزن خشک ریشه (۴/۱۷ گرم) و وزن خشک اندام هوایی (۲/۴۵ گرم) نعناع فلفلی مربوط به تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم سرب با سطح صفر قارچ *S. indica* (P0) تعلق داشت (نمودار ۲- الف، ب، ج و د).

نتایج نمودار ۳ (الف، ب و ج) نشان داد که کاربرد سرب در محیط باعث کاهش معنی‌دار در غلظت کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئیدها شده است و افزایش سطح قارچ هم در محیط فاقد سرب و هم در محیط دارای سرب باعث افزایش در غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه نعناع فلفلی شده است. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت کلروفیل *a* (۱/۷۷ میلی‌گرم)، کلروفیل *b* (۰/۶۹ میلی‌گرم) و کارتنوئیدها (۱/۳۹ میلی‌گرم) گیاه نعناع فلفلی در سطح ۳ قارچ *S. indica* (P3) و بدون تیمار سرب و کم‌ترین غلظت کلروفیل *a* (۰/۸۲ میلی‌گرم) کلروفیل *b* (۰/۳۱ میلی‌گرم) و کاروتنوئیدها (۰/۵۹

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

میلی‌گرم) در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم سرب با سطح صفر قارچ (P0) بدست آمد (شکل ۳).

نتایج نمودار ۴ مشخص کرد که کاربرد سرب در خاک باعث کاهش معنی‌دار در درصد اسانس در همه سطوح قارچ شد. از طرف دیگر، با افزایش سطح قارچ در خاک بدون سرب، درصد اسانس هم افزایش یافت (نمودار ۴). در محیط دارای سرب افزایش معنی‌دار در درصد اسانس در سطح اول قارچ (P1) نسبت به سطح صفر (P0) مشاهده شد، در حالی که در سطح دوم (P2) کاهش معنی‌دار در درصد اسانس مشاهده شد. در سطح سوم (P3) اندکی افزایش در درصد اسانس وجود داشت هر چند که این افزایش معنی‌دار نبود. بیشترین میزان درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی (۱/۸۷ درصد) در سطح ۳ قارچ *S. indica* و بدون سرب بدست آمد و کم‌ترین میزان درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی (۰/۷۵ درصد) در تیمار سطح صفر قارچ و خاک بدون سرب مشاهده شد (نمودار ۴).

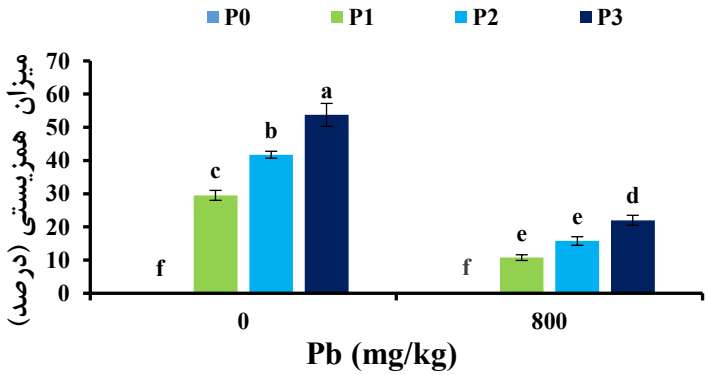
ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان نعناع فلفلی در سطوح مختلف قارچ تحت سمیت سرب در خاک در جدول ۲ ارائه شده است. آنالیزهای انجام شده با دستگاه GC-MS حضور ۲۷ ترکیب را در اسانس گیاهان تمامی تیمارها نشان داد. ترکیبات اصلی شامل: menthol (۴۸/۹۰- ۳۸/۰۱ درصد)، p-menth-l-en-9-ol (۱۷/۵۴- ۱۰/۶۸درصد)، menthone (۸/۸۴- ۴/۸ درصد)، neo-menthol (۷/۸۷- ۴/۱۷ درصد)، 1,8-cineole (۷/۴۷- ۲/۶۸ درصد) بودند. حداکثر محتوای menthol و p-menth-l-en-9-ol با استفاده از تلقیح سطح ۳ قارچ *S. indica* (P3) و خاک بدون تیمار سرب به‌دست آمد. علاوه بر این، بالاترین محتوای *neo*-menthol در تلقیح قارچ در سطح دو (P2) و خاک بدون سرب مشاهده شد .همچنین، بیشترین مقدار 1,8-Cineole با تلقیح قارچ در سطح اول *S. indica* (P1) و محیط بدون سرب حاصل شد (جدول ۲).

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI: 10.22034/jpr.2024.8378.3331

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر همزیستی قارچ *S. indica* بر درصد همزیستی و خصوصیات رشدی و درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی تحت تنش سرب

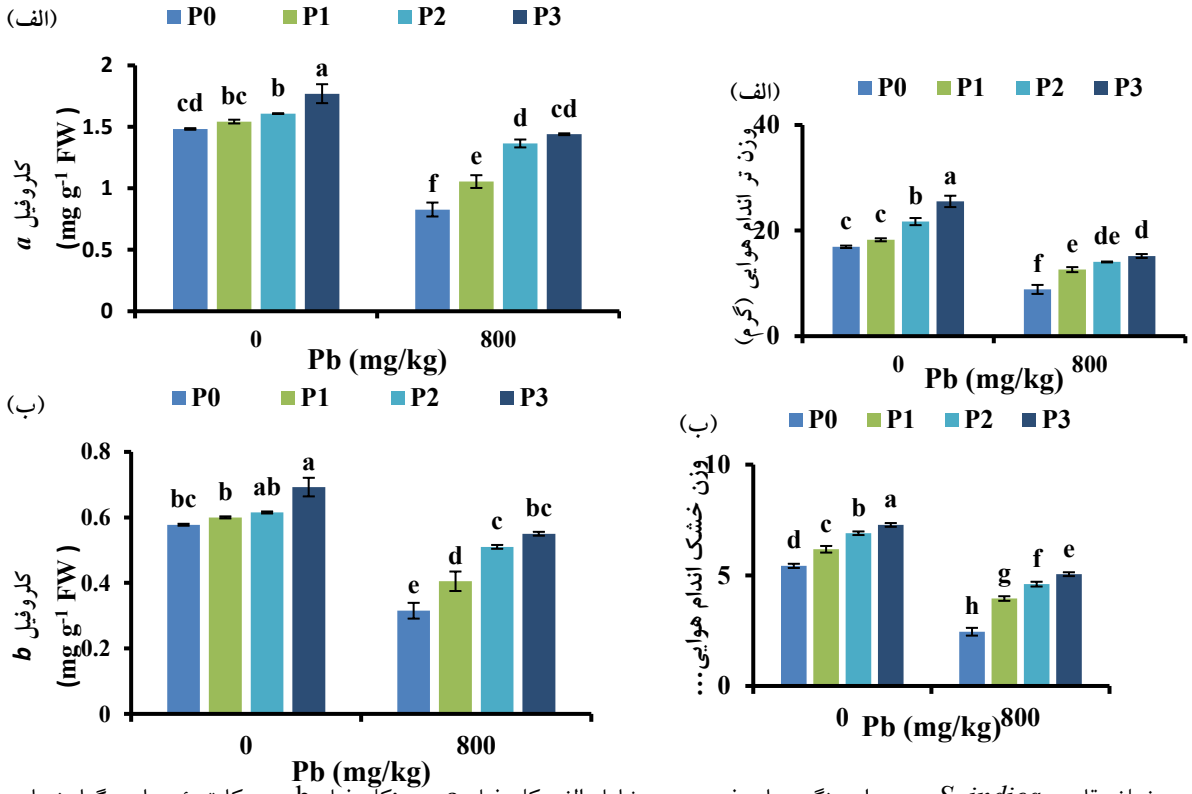
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		درصد همزیستی	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کارتنوئید	درصد اسانس
سرب	۱	۳۰۶/۲۸**	۵۰۳/۲**	۲۰۷۲/۱**	۴۷/۲۹**	۱۳۰/۰۱**	۱/۴۷۱**	۰/۲۴۹*	۱/۰۸۰**	۰/۲۰۳*
قارچ	۳	۳۲۸۵/۰۳**	۸۲/۲۶**	۳۳۷/۱**	۷/۵۶۹**	۱۹/۸۴**	۰/۳۱۷**	۰/۰۴۶**	۰/۲۱۲**	۰/۳۳۸**
سرب×قارچ	۳	۴۸/۱۱*	۷/۴۳**	۱۹/۹۷*	۰/۲۶۵**	۴/۶۷۴**	۰/۰۶۶**	۰/۰۰۹**	۰/۰۲۴**	۱/۳۱۴**
خطا	۲۴	۹/۹۴	۱/۴۲۰	۴/۲۳	۰/۰۵۳	۰/۲۳۰	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۵۸
ضریب تغییرات	-	۱۰/۵۴	۷/۱۶	۵/۹۷	۴/۴۰	۶/۵۴	۵/۱۴	۶/۱۳		۷/۵۱

**معنی‌دار درسطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار درسطح احتمال پنج درصد، ns از لحاظ آماری غیر معنی‌دار

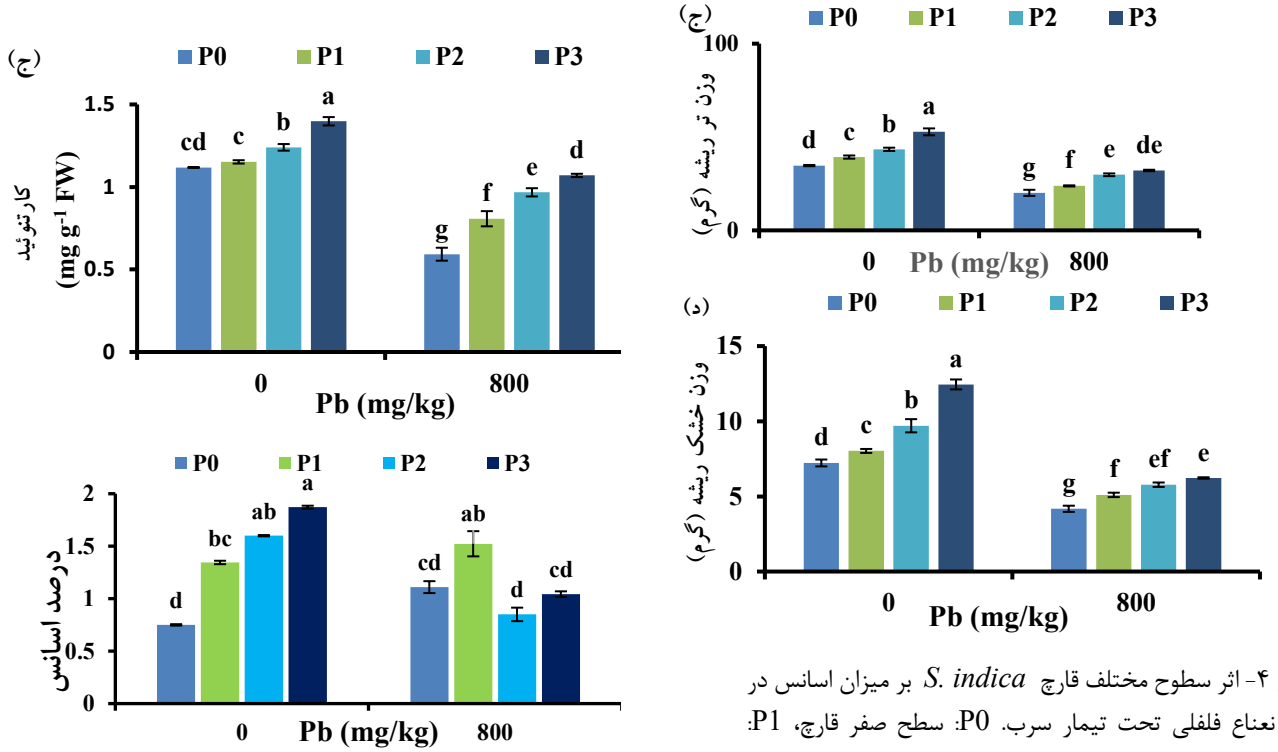


شکل ۱- اثر سطوح مختلف قارچ *S. indica* بر درصد همزیستی گیاه نعناع فلفلی تحت تیمار سرب. P0: سطح صفر قارچ، P1: سطح اول قارچ، P2: سطح دوم قارچ، P3: سطح سوم قارچ. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361



شکل ۳- اثر سطوح مختلف قارچ *S. indica* بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل الف: کلروفیل a، ب: ;کلروفیل b و ج: کارتنوئیدها در گیاه نعناع فلفلی تحت تیمار سرب. P0: سطح صفر قارچ، P1: سطح اول قارچ، P2: سطح دوم قارچ، P3: سطح سوم قارچ. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۴- اثر سطوح مختلف قارچ *S. indica* بر میزان اسانس در گیاه نعناع فلفلی تحت تیمار سرب. P0: سطح صفر قارچ، P1: سطح اول قارچ، P2: سطح دوم قارچ، P3: سطح سوم قارچ. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

جدول ۴-۷- ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه نعناع فلفلی تحت تاثیر تلقیح قارچ *S. indica* و سرب

شماره	ترکیبات	(RI)	P_0L_0	P_1L_0	P_2L_0	P_3L_0	P_0L_1	P_1L_1	P_2L_1	P_3L_1
۱	α-pinene	۹۳۱	۰/۴۸۵	۰/۵۷۵	۰/۲۸۲	۰/۲۷۰	۰/۴۱۶	۰/۴۱۶	۰/۲۵۶	۰/۳۹۱
۲	Subinene	۹۷۰	۰/۴۲۶	۰/۲۷۸	۰/۲۲۲	۰/۲۱۰	۰/۳۵۱	۰/۳۰۵	۰/۲۴۲	۰/۳۲۰
۳	β-pinene	۹۷۵	۰/۷۶۴	۰/۴۲۸	۰/۴۱۶	۰/۳۸۴	۰/۶۰۰	۰/۶۰۸	۰/۴۰۶	۰/۵۹۸
۴	Myrcene	۹۸۸	۰/۱۹۷	۰/۱۹۴	۰/۱۲۷	۰/۱۲۱	۰/۱۶۶	۰/۱۲۵	۰/۱۲۳	۰/۱۴۴
۵	3-octanol	۱۰۰۰	۰/۰۸۴	۰/۲۹۳	۰/۳۰۶	۰/۰۵۰	۰/۰۶۲	۰/۰۷۱	۰/۱۰۷	۰/۰۸۹
۶	α-terpinene	۱۰۱۷	۰/۰۸۰	۰/۱۰۵	۰/۳۰۴	۰/۱۷۰	۰/۱۷۵	۰/۱۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۱۳
۷	**Limonene**	**۱۰۲۶**	**۱/۴۳**	**۱/۹۵**	**۰/۸۸**	**۰/۸۹**	**۱/۲۷**	**۱/۳۲**	**۰/۹۸**	**۱/۱۸**
۸	**1,8-Cineole**	**۱۰۲۹**	**۴/۷۱**	**۷/۴۷**	**۲/۷۳**	**۲/۶۸**	**۳/۲۹**	**۳/۵۷**	**۲/۶۹**	**۳/۵۵**
۹	**γ-terpinene**	**۱۰۵۸**	**۲/۷۴**	**۲/۸۳**	**۲/۳۸**	**۲/۰۲**	**۱/۰۴**	**۱/۷۵**	**۱/۷۵**	**۱/۶۹**
۱۰	***cis*-sabinene hydrate**	**۱۰۶۶**	**۱/۴۸**	**۰/۴۹**	**۱/۸۸**	**۱/۹۶**	**۱/۹۲**	**۱/۰۸**	**۲/۰۱**	**۱/۸۴**
۱۱	Linalol	۱۱۰۳	۰/۱۳۷	۰/۴۷۵	۰/۱۱۰	۰/۱۵۶	۰/۱۱۹	۰/۰۹۸	۰/۱۲۳	۰/۰۹۴
۱۲	**menthone**	**۲۰۵۲**	**۸/۲۳**	**۸/۸۴**	**۶/۲۹**	**۴/۸۰**	**۷/۴۰**	**۶/۶۵۵**	**۷/۲۵۴**	**۵/۲۷۷**
۱۳	**Menthofuran**	**۱۱۶۱**	**۱۲/۵۵**	**۱/۸۸**	**۵/۶۱**	**۷/۹۳**	**۱۱/۵۲**	**۷/۴۹۱**	**۴/۹۴۷**	**۱۱/۴۶**
۱۴	***neo*-menthol**	**۱۱۶۳**	**۴/۷۸**	**۴/۱۷**	**۷/۸۷**	**۵/۵۴**	**۵/۰۲۸**	**۴/۸۵**	**۵/۲۳**	**۵/۴۱**
۱۵	**Menthol**	**۱۱۷۵**	**۳۸/۰۱**	**۳۵/۰۶**	**۴۷/۴۲**	**۴۸/۹۰**	**۳۹/۹۰**	**۴۱/۰۳۹**	**۴۶/۴۷۰**	**۴۳/۴۵**
۱۶	Terpinene-4-ol	۱۱۷۷	۰/۳۷۹	۰/۶۸۰	۰/۳۰۰	۰/۳۱۶	۰/۴۰۶	۰/۳۵۹	۰/۸۰۰	۰/۱۸۶
۱۷	***neo*-iso-menthol**	**۱۱۸۴**	**۱/۲۱**	**۱/۲۹**	**۰/۸۸**	**۱/۳۹**	**۱/۲۱**	**۱/۱۸**	**۱/۲۶**	**۱/۴۷**
۱۸	Pulegone	۱۲۳۶	۰/۴۲۱	۰/۵۵۶	۰/۳۱۶	۰/۳۹۷	۰/۴۲۴	۰/۵۲۰	۰/۳۶۰	۰/۳۱۶
۱۹	Piperitone	۱۲۵۲	۰/۳۰۲	۰/۳۳۳	۰/۳۰۲	۰/۲۹۳	۰/۳۴۷	۰/۲۶۳	۰/۳۲۳	۰/۳۰۷
۲۰	*neo*-menthy acetate	۱۲۷۳	۰/۹۰۳	۰/۸۵۷	۰/۸۶۶	۰/۸۸۹	۱/۰۴۲	۰/۹۸۴	۰/۸۲۹	۰/۸۹۱
۲۱	***p*-Menth-l-en-9-ol**	**۱۲۲۹**	**۱۵/۰۹**	**۱۰/۶۸**	**۱۴/۱۱**	**۱۷/۵۴**	**۱۷/۳۳**	**۱۶/۷۵**	**۱۷/۲۱**	**۱۶/۳۴**
۲۲	*iso*-Menthyl acetate	۱۳۰۷	۰/۶۹۶	۰/۶۴۷	۰/۶۳۰	۰/۵۰۴	۰/۶۶۵	۰/۶۷۲	۰/۶۳۰	۰/۳۱۷
۲۳	(*E*)-caryophylene	۱۴۱۶	۰/۴۵۱	۰/۲۷۶	۰/۵۴۰	۰/۴۹۷	۰/۸۴۰	۰/۴۴۷	۰/۴۵۵	۰/۷۵۰
۲۴	(*E*)-β-farnesene	۱۴۵۷	۰/۱۵۴	۰/۱۶۶	۰/۲۱۰	۰/۲۳۲	۰/۵۲۱	۰/۱۲۸	۰/۱۸۳	۰/۲۴۰
۲۵	Germacrene D	۱۴۷۹	۰/۶۷۶	۰/۲۷۳	۰/۸۴۸	۰/۵۲۵	۱/۶۲۹	۰/۳۲۳	۰/۷۲۴	۱/۱۷۲
۲۶	Elixene	۱۴۹۴	۰/۲۹۷	۰/۳۶۳	۰/۱۶۲	۰/۷۶۴	۰/۳۲۱	۰/۴۲۳	۰/۱۳۶	۰/۱۱۴
۲۷	Viridiflorol	۱۵۸۹	۰/۱۱۳	۰/۹۵۵	۰/۴۸۴	۰/۳۵۹	۰/۳۴۸	۰/۲۷۵	۰/۳۲۰	۰/۳۴۸
	مجموع ترکیبات		**۹۶/۷۹**	**۸۲/۱۲**	**۹۶/۴۷**	**۹۹/۷۶**	**۹۸/۳۴**	**۹۱/۷۹**	**۹۵/۹۱**	**۹۷/۹۹**

P_0L_0 (بدون قارچ+ بدون سرب)، **P_1L_0** (سطح ۱ قارچ+ سرب صفر)، **P_2L_0** (سطح ۲ قارچ+ سرب صفر)، **P_3L_0** (سطح ۳ قارچ+ سرب صفر)، **P_0L_1** (بدون قارچ+ سرب)، **P_1L_1** (سطح ۱ قارچ+ سرب)، **P_2L_1** (سطح ۲ قارچ+ سرب) و **P_3L_1** (سطح ۳ قارچ+ سرب).

بحث: داده‌های نمودار ۱ نشان داد که قارچ اندوفیت با موفقیت باعث کلونیزه شدن ریشه گیاه نعناع فلفلی در حضور سرب (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) شده است، هرچند که در حضور سرب میزان همزیستی بطور معنی‌دار نسبت به عدم حضور سرب کاهش یافته است. افزایش سطح قارچ در خاک باعث افزایش درصد همزیستی شده است (نمودار ۱). در تحقیقات قبلی در گلرنگ و آفتابگردان یافته‌های مشابه در مورد کاهش کلونیزاسیون ریشه تحت تنش فلزات سنگین گزارش شده است (۲۴ و ۲۷) .این کاهش در کلونیزه شدن ریشه در حضور عناصر سنگین در خاک ممکن است به دلیل اثرات منفی فلز سمی بر سرعت جوانه‌زنی هاگ و یا رشد هیف قارچ باشد. همانطور که انتظار می‌رفت در تیمارهای تلقیح نشده نعناع فلفلی با قارچ، هیچگونه کلونیزه شدن با قارچ مذکور مشاهده نگردید (نمودار ۱).

نتایج نمودار ۲ مشخص کرد که کاربرد سرب در غلظت بالا (۸۰۰ میلی‌گرم) باعث کاهش معنی‌دار در شاخص‌های رشدی

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

نعناع فلفلی شده است. تاثیر منفی تیمار سرب در رشد گیاهان مختلف به اثبات رسیده است، بطوریکه در آزمایش قبلی ما افزایش میزان سرب در خاک باعث کاهش معنی‌دار در طول و وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه گلرنگ شد (۲۷). همچنین اثر منفی سرب در تولید بیومس گیاهان گشنیز و شنبلیله مشاهده شده است (۱ و ۲). سطوح بالای سرب می‌تواند رشد گیاه و تولید بیومس گیاهی را با اختلال در فرآیندهای متابولیسمی، هموستازی مواد غذایی و فعالیت‌های آنزیمی (نظیر آنزیم‌های چرخه کالوین)، مهار کند (۱۷). از طرف دیگر، حضور قارچ اندوفیت موجب افزایش در شاخص‌های رشدی (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی) در گیاهان تحت تنش و بدون تنش سرب شد (نمودار ۲). در این راستا، به نظر می‌رسد که این قارچ نیز همانند قارچ میکوریز از طریق گسترش هیف و توسعه سیستم ریشه‌ای، سطح جذب آب بیشتری برای گیاه فراهم کرده و به دنبال جذب آب بیشتر، مواد غذایی بیشتری نیز جذب شده که منجر به تولید و تجمع ماده خشک بیشتر در مقایسه با تیمار بدون قارچ می‌گردد (۱۸). این قارچ از طریق تحریک تولید ریشه و افزایش تعداد آن و بالا بردن قدرت جذب مواد غذایی، رشد گیاه را افزایش می‌دهد (۷). وارما و همکاران (۲۹) نتیجه گرفتند که این اندوفیت باعث مقاومت به یون‌های فلزات سنگین، سموم و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردد و از این طریق می‌تواند در افزایش تحمل به تنش و در نتیجه بهبود رشد گیاه نقش داشته باشد.

یافته‌های پژوهش حاضر (نمودار ۳) نشان داد که حضور سرب هم در محیط فاقد قارچ و هم در محیط دارای قارچ باعث کاهش در رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئیدهای نعناع فلفلی شده است. غلظت بالای سرب در برگ‌ها اثرات مضر متعددی دارد، از جمله مهار پارامترهای مورفولوژیکی برگ، تغییر در فراساختار کلروپلاست و کاهش سرعت خالص فتوسنتزی (۱۴). همچنین تأثیر مثبت تلقیح با قارچ بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط بدون تنش و نیز تحت تنش سرب مشاهده شد (نمودار ۳) که این وضعیت می‌تواند آثار مخرب تنش بر میزان فتوسنتز را تا حدی کاهش دهد و تولید وزن خشک را حفظ نماید. افزایش غلظت کلروفیل‌ها در حضور *S. indica* می‌تواند با افزایش جذب مواد معدنی مرتبط باشد به طوریکه در گیاهان جو، افزایش در میزان منیزیم، به عنوان یک بخش مهم ساختار کلروفیل، در حضور این اندوفیت گزارش شده است (۹). قارچ با افزایش میزان کارتنوئیدها از آسیب به دستگاه فتوسنتزی توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن (تولید شده در شرایط سمیت سرب) جلوگیری کرده و به پایداری غشاء کمک می‌کند (۱۵). مکانیسم چگونگی تأثیرگذاری قارچ بر افزایش محتوای کاروتنوئیدها هنوز مشخص نیست و درک آن نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

در این پژوهش کاربرد سرب در خاک باعث کاهش در میزان اسانس (روغن‌های ضروری) نعناع فلفلی شد (نمودار ۴). در مطابقت با نتایج این آزمایش، تنش سرب بطور معنی‌دار باعث کاهش روغنهای ضروری در گیاه رزماری شد که دلیل این امر می‌تواند کاهش در فتوسنتز، کاهش در وزن اندام‌های هوایی تر و نیز کاهش در بیوسنتز روغن‌های ضروری (زیرا سنتز روغن در کرکهای اپیدرمی وابسته به فراهمی کربن فتوسنتزی است) باشد (۱۰). البته کاربرد سرب باعث افزایش درصد اسانس در تیمار بدون قارچ و سطح اول قارچ (P0) نسبت به تیمار بدون سرب در خاک شد هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود (نمودار ۴). در گیاه فلفل پروئی (*Schinus molle*)، سرب باعث افزایش مجاری ترشحی در برگ و تولید اسانس بیشتر در مقایسه با گیاهان شاهد شد (۲۵). این محققان نتیجه‌گیری کردند که از آنجایی که اسانس‌ها با اثرات ضد میکروبی و آللوپاتیک مرتبط هستند، افزایش تولید اسانس ممکن است به دفاع بالاتر گیاهان *S. molle* در برابر تنش ثانویه مرتبط بوده و سرمایه‌گذاری گیاه در تولید اسانس ممکن است از رقابت با گیاهان دیگر یا عفونت توسط عوامل بیماری‌زا جلوگیری کند و به یک مکانیسم تحمل جالب توجه تبدیل شود. در تحقیق حاضر افزایش سطح قارچ *S. indica* باعث افزایش تولید اسانس در گیاهان بدون تنش سرب و نیز تحت تنش سرب در سطح اول قارچ (P1) نسبت به گیاهان شاهد شد (نمودار ۴). بر طبق مشاهدات خالوندی و همکاران، بیشترین محتوای اسانس در همزیستی با قارچ*S. indica* در گیاه نعناع فلفلی تحت تنش شوری و نیز شرایط بدون تنش

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

مشاهده شد (۱۶). به نظر می‌رسد میکروارگانیسم‌های اندوفیت با تولید اکسین، سیتوکینین و آنزیم‌های فسفاتاز، جذب مواد غذایی معدنی به ویژه فسفر را افزایش می‌دهند تا NADPH و ATP را برای بیوسنتز ترپنوئیدها فراهم کنند (۱۶).

تغییرات در ترکیب یا کیفیت اسانس در گیاه بسته به عواملی مانند روش استخراج، شرایط اکولوژیکی، مبدأ جغرافیایی، تفاوت‌های ژنتیکی و مرحله نموی اندام مربوطه می‌تواند تحت تاثیر قرار گیرد. همچنین بیوسنتز هر یک از ترکیبات اسانس بسیار پیچیده است زیرا چندین آنزیم با سنتز هر ترکیب مرتبط هستند، همانطور که در مورد بیوسنتز منتول توسط تیواری (۲۸) نشان داده شده است. در بین ترکیبات اسانس در این تحقیق درصد منتول از همه ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی بیشتر بود (جدول ۲). منتول دارای بو و طعم خنک کننده‌ای است که مقادیر بالای منتول و ایزومرهای آن (ایزومنتول، نئومنتول و نئوآیزومنتول) در نمونه‌های گیاهی، آنها را از نظر اقتصادی مهم می‌کند، بطوریکه اسانس نعناع فلفلی با غلظت بالای منتول در بازرگانی، صنایع و همچنین تجارت بین‌الملل ارزشمند است. در این مطالعه بیشترین میزان menthol و p-menth-l-en-9-ol، به عنوان دو ترکیب اصلی، در تیمار سطح سه قارچ (P3) و بدون سرب و بیشترین میزان menthone و 1,8-cineole در تیمار سطح یک قارچ و بدون سرب مشاهد شد (جدول ۲). اسماعیل زاده و همکاران (۸) گزارش کردند که تلقیح برخی میکروارگانیسم‌های مفید (سویه‌های استرپتومایسس) باعث افزایش در مقدار menthol و menthone در نعناع فلفلی شد. همچنین طبق مشاهدات خالوندی و همکاران (۱۶) حضور قارچ اندوفیت *P. indica* و تیمار متیل جاسمونات موجب افزایش در درصد ترکیبات menthol، menthone و 1,8-cineole در نعناع فلفلی شد. با توجه به خواص قارچ‌کش برخی از ترپنوئیدها مانند menthol، menthone و 1,8-cineole (۶)، تغییرات مشاهده شده در سنتز اسانس‌ها تحت همزیستی قارچ *S. indica* در این مطالعه و تحقیقات قبلی را می‌توان به عنوان یک واکنش دفاعی در نظر گرفت. افزایش سنتز این ترپن‌ها در گیاه تحت همزیستی قارچ، اثر ضد میکروبی بر کلونیزاسیون قارچ دارد بعبارتی همزیستی قارچ می‌تواند بیوسنتز این ترکیبات را در گیاه افزایش دهد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد سرب اثر منفی بر پارامترهای رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی داشت اما حضور قارچ *S. indica* اثرات زیانبار سرب را بطور قابل توجهی کاهش داد. بیشترین درصد همزیستی، پارامترهای رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و درصد اسانس در بین سطوح مختلف قارچ به سطح سوم *S. indica* و کمترین آن به تیمار بدون قارچ تعلق داشت. همچنین همزیستی ریشه گیاه با اندوفیت باعث افزایش در میزان دو متابولیت اصلی گیاه یعنی menthol و p-menth-l-en-9-ol بخصوص در بیشترین مقدار قارچ در محیط یا سطح سوم آن (P3) شد. لذا این یافته‌ها تاثیر قارچ *S. indica* به عنوان الیسیتور زیستی بر گیاه دارویی و معطر نعناع فلفلی را تایید می‌کند و نشان‌دهنده اثر مفید قارچ بر رشد و متابولیت‌های این گونه ارزشمند است.

تقدیر و تشکر: از دانشگاه مراغه بابت حمایت مالی از انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع:

۱. فاطمی، ح، اسماعیل‌پور، ب (۱۴۰۰). بررسی برهمکنش تیمارهای زیستی و غیر زیستی بر تغییرات آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*) تحت تنش سرب. مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۴(۳): ۶۸۶-۷۰۵.

۲. پاداش، ع، قنبری، ا، سیروس‌مهر، ع، اصغری‌پور، م (۱۳۹۷). تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقاومت گیاه ریحان نسبت به سمیت سرب. مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۱(۱): ۳۵-۴۴.

3. Arnon AN (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal 23(1): 112- 21.
4. Baran A, Antonkiewicz J (2017). Phytotoxicity and extractability of heavy metals from industrial wastes. Environment Protection Engineering 43(2): 143-155.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

5. Chance B, Maehly A (1955). Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 2: 764-775.

6. Çoban Ö, Göktürk Baydar N (2016). Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. Industrial Crops and Products 86: 251-258.

7. De Rocchis V, Jammer A, Camehl I, Franken P, Roitsch T (2022). Tomato growth promotion by the fungal endophytes *Serendipita indica* and *Serendipita herbamans* is associated with sucrose de-novo synthesis in roots and differential local and systemic effects on carbohydrate metabolisms and gene expression. Journal of Plant Physiology 276: 153755.

8. Esmaeil Zade NS, Sadeghi A, Moradi P (2019). Streptomyces strains alleviate water stress and increase peppermint (*Mentha piperita*) yield and essential oils. Plant Soil 434: 441–452.

9. Ghaffari MR, Ghabooli M, Khatabi B, Hajirezaei MR, Schweizer P, Salekdeh GH (2016). Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. Plant Molecular Biology 90: 699-713.

10. Gharib FAEL, Ahmed EZ (2023). *Spirulina platensis* improves growth, oil content, and antioxidant activitiy of rosemary plant under cadmium and lead stress. Scientific Reports 13: 8008.

11. Giovannetti M, Mosse B (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84: 489-500.

12. Hill TW, Kafer E (2001). Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Reports 48(1): 20-21.

13. Hui F, Liu J, Gao Q, Lou B (2015). *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum*. Journal of Environmental Sciences 37: 184-191.

14. Islam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, Mahmood Q, Tian S, Li J (2008). Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultranstructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. Journal of Hazardous Materials 154: 914-926.

15. Jogawat A, Meena MK, Kundu A, Varma M, Vadassery J (2020). Calcium channel CNGC19 mediates basal defense signaling to regulate colonization by *Piriformospora indica* in Arabidopsis roots. Journal of Experimental Botany 71: 2752–2768.

16. Khalvandi M, Amerian M, Pirdashti H, Keramati S, Hosseini J (2019). Essential oil of peppermint in symbiotic relationship with *Piriformospora indica* and methyl jasmonate application under saline condition. Industrial Crops & Products 127: 195–202.

17. Khan AR, Waqas M, Ullah I, et al. (2016). Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. Environmental and Experimental Botany 135: 126–135.

18. Kushwaha AS, Thakur RS, Patel DK, Kumar M (2022). Impact of arsenic on phosphate solubilization, acquisition and poly-phosphate accumulation in endophytic fungus *Serendipita indica*. Microbiological Research 259: 127014.

19. Loolaie M, Moasefi N, Rasouli H, Adibi H (2017). Peppermint and Its Functionality: A Review. ARCHIVES OF CLINICAL MICROBIOLOGY 8(4):54.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵ DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

20. Maitra S, Shankar T, Gaikwad D J, Palai JB, Saga L (2020). Organic Agriculture, Ecosystem Services and Sustainability: A Review. International Journal of Modern Agriculture 9(4): 370-378.

21. Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

22. Padash A, Ghanbari A, Sirousmehr A, Asgharipour MR (2018). Effect of salicylic acid on basil resistance against lead. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 31(1): 35-44.

23. Qiang X, Weiss M, Kogel KH, Schäfer P (2012). *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. Molecular plant pathology 13(5): 508-518.

24. Reddy AM, Kumar SG, Jyothsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). Chemosphere 60(1): 97-104.

25. Ribeiro VE, Pereira MP, de Castro EM, Correa FF, Cardoso G, Pereira FJ (2019). Enhanced essential oil and leaf anatomy of *Schinus molle* plants under lead contamination. Industrial Crops & Products 132: 92–98.

26. Shahabivand S, Parvaneh A, Aliloo AA (2017). Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. Ecotoxicology and environmental safety 145: 496-502.

27. Shahabivand S, Tayebnia V, Aliloo AA (2019). Impact of endophyte fungus *Serendipita indica* on fungus-assisted phyto-stabilization and performance of *Carthamus tinctorius* in a lead polluted soil. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 31(4): 838-851.

28. Tiwari P (2016). Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L. Ind. Crops Production 82: 141–148.

29. Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R (2012). *Piriformospora indica*: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural research 1(2): 117-131.

30. Varma A, Kost G, Oelmüller R (Eds.). (2013). *Piriformospora indica*: Sebacinales and their biotechnological applications (Vol. 33). Springer Science & Business Media.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۳۳-۱۴۵
DOI 10.22034/jpr.2024.8462.3361

Effect of Endophytic fungus *Serendipita indica* on some growth characteristics and secondary metabolites of *Mentha piperita* under lead toxicity in soil

Saleh Shahabivand [1, *], Elham Hassanpour[1], Mohammadreza Morshedloo[2]

[1.]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh

[2.]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh

[*]Corresponding Author Email: shahabi70@yahoo.com

Abstract: Root endophytic fungi are beneficial soil microorganisms that affect the growth and production of secondary metabolites by causing physiological changes in their host plants. In this study, the effects of *Serendipita indica* (four levels of fungus including without fungus treatment, and 1, 2 and 3 pieces of fungus solid medium with dimensions of 0.2×1×1 cm) on root colonization, growth parameters, photosynthetic pigments as well as the quantity and quality of peppermint essential oil were evaluated under without stress condition and lead stress (800 mg/kg soil). The results showed that lead reduced the percentage of colonization, growth parameters, the amount of pigmentation and the essential oil quantity. The use of endophyte fungus had positive effects on the parameters studied. By increasing the amount of fungus in the soil, the percentage of colonization, fresh and dry weight of root and shoot, the concentration of photosynthetic pigments were significantly increased. The results of the GC-MS showed 27 phytochemical compounds, which the most essential oil compounds in the different treatments were menthol (38.01-48.90%), (10.68-17.54%), menthone (4.8-8.84%) and neomenthol (4.17-7.87%). Maximum menthol and p-menth-1-9-ol contents was obtained using *S. indica* (3 pieces of fungus solid medium) without lead treatment. Using these results, it can be said that *S. indica* has increased growth indicators and photosynthetic pigments, as well as changes in peppermint essential oil, and significantly reduced the harmful effects of lead in medicinal plant peppermint.

Keywords: Root endophyte, Lead contamination, Peppermint, Secondary metabolite.