ارزیابی مقایسه‌ای تاثیرات همزیستی میکوریزی با سه گونه قارچی بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia officinalis* L.)

سارا زینالی* و جلیل خارا
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه
نویسنده مسئول: sarazeinaly74@gmail.com

چکیده

مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) یک گیاه دارویی متداول است که به طور گسترده‌ای در منابع غذایی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بررسی تاثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر رشد و فیزیولوژی گیاه دارویی مریم گلی آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه انجام گردید. تیمارهای آزمایشی شامل سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار (*Glomus versiforme*، *G. etunicatum* و *G. intraradices*) و گیاهان شاهد است. گیاهان در دو گروه میکوریزی و غیرمیکوریزی در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای محیطی ۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. گیاهان تلقیح شده با درصد بالایی همزیست شدند. همزیستی میکوریزی رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای پرولین را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان شاخص تخریب غشایی در گیاهان تلقیح یافته با میکوریز کمتر از گیاهان شاهد بوده است. به علاوه، مشاهده شد که تاثیرات مثبت همزیستی در حضور گونه *G.versiforme* از دو گونه دیگر بیشتر بود. به طور کلی نتایج نشان دادند که همزیستی میکوریزی سبب افزایش رشد و بهبود خصوصیات فیزیولوژیک گیاه دارویی مریم گلی می‌شود.

کلمات کلیدی : سالویا، گلوموس، تلقیح میکوریزی، پرولین، مالون دی‌آلدئید

مقدمه

مریم گلی گیاهی است گلدار، نهاندانه، دولپه‌ای و پیوسته گلبرگ، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه‌پسند، تیره نعناع (Laminaceae) و جنس سالویا (*Salvia*). آنها گیاهانی علفی، پایا یا به صورت درختچه‌های کوچک هستند. از این جنس در ایران ۵۸ گونه علفی یکساله یا چند ساله وجود دارد. برخی از آن ها علف‌های هرز مزارع به شمار می‌روند. گونه *S. hydrangea* به صورت درختچه‌ای در ارتفاعات البرز رویش دارد و برخی مانند *S. officinalis* دارویی بوده و گونه *S. splendens* با گل‌های قرمز زینتی بوده و در حاشیه باغچه‌ها کاشته می‌شود (صداقت حور، ۱۳۸۸). یکی از گونه‌های این خانواده مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) است. مریم گلی یک گیاه دارویی علفی و چند ساله است. ارتفاع آن به ۴۰ تا ۸۰ سانتی متر می‌رسد، دارای ساقه‌های چهارگوش بوده، قسمت‌های مختلف این گیاه دارای کرک‌های خاکستری رنگ است و برگ‌های این گونه بر خلاف گونه‌های دیگر بلند و به طول ۴ تا ۱۰ سانتی‌متر و به پهنای ۲ تا ۵ سانتی‌متر ، تیره‌ای شکل و به رنگ سبز متمایل به خاکستری، هر دو طرف برگ پوشیده از کرک‌های بسیار کوتاه است. در تمام طول ساقه برگ دارد (امید بیگی، ۱۳۹۰). امروزه گیاه مریم گلی در کشورهای مختلف برای بدست آوردن برگ‌های خشک به عنوان ماده اولیه در منابع غذایی، دارویی و عطرسازی کاشته می‌شود (*santcs-Gomes et al., 2002*). همچنین برای معالجه یبوست، وبا، سرماخوردگی، انواع تب‌ها، اختلالات کبدی، صرع و فلج استفاده کرده، این گیاه را مقوی و مولد خون تازه می‌دانستند و برای تقویت عضلات و آرام کردن اعصاب تجویز می‌شده است. در واقع یک داروی ضد تشنج محسوب می‌شود. مردم در گذشته از این گیاه به عنوان ماده‌ای مدر، عامل انعقاد خون و نیز داروی ضد تعرق استفاده می کرده‌اند (بردبار،۱۳۸۰).

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار قادرند جذب فسفر، ریزمغذی‌ها و نیتروژن را از خاک افزایش دهند و به این ترتیب عناصر ضروری برای رشد گیاه را از خاک فراهم کنند. همچنین قادر به افزایش جذب آب بوده و اثرات مهار کننده‌ای را در مقابل تعدادی از عوامل بیماری زا نشان داده‌اند. این قارچ‌ها در مقاومت به خشکی، مقاومت به فلزات سنگین و بهبود ساختار

IrHC2019

خاکدانه‌ای هم ایفای نقش می‌کنند. البته افزایش جذب فسفر که همواره به عنوان مهم‌ترین فایده قارچ ذکر می‌شود، منجر به افزایش رشد و محصول در میزبان آن می‌شود (Gosling *et al.*, 2006). واژه میکوریز به معنی قارچ - ریشه به طور کلی به همزیستی بین ریشه گیاهان میسلیوم‌های قارچی اطلاق می‌شود. آلودگی میکوریزی برای رشد و فعالیت گیاهان مفید بوده و یکی از فواید آن افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول فسفر و برخی عناصر کم‌مصرف خاک است. امروزه تلقیح با قارچ‌های میکوریز به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های مفید دامنه فعالیت خود را در منابع مختلف گسترش داده است. سعی می‌شود از طریق تلقیح گیاهان با میکوریز، قابلیت جذب مواد غذایی گیاهان زراعی را افزایش داده شود. تحقیقات انجام شده نشان داده که گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان بدون میکوریز آب بیشتری جذب می کنند و رطوبت خاک را بهتر تخلیه می‌نمایند (اوگ ۲۰۰۴). هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار (*Glomus versiforme*، *G. etunicatum* و *G. intraradices*) بر روی برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه دارویی مریم گلی می‌باشد تا بهترین گونه برای تلقیح با این گیاه دارویی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

بذرهای اصلاح شده گیاه مریم گلی در گلدان‌های ۱ کیلویی در گلخانه تحقیقاتی گروه زیست شناسی در شرایط محیطی کنترل شده با میانگین دمای شب و روز ۲۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد در گلخانه به مدت ۳ ماه کشت شدند. خاک بستر گیاه حاوی مخلوط رس و ماسه به نسبت ۱ به ۳ بود. جهت تلقیح میکوریزی از مایه تلقیح سه گونه قارچی *Glomus versiforme*، *G. etunicatum* و *G. intraradices* که به تازگی تهیه شده بودند استفاده شد. از محلول غذایی *Rorison* برای مساعد ساختن همزیستی میکوریزی و تغذیه گیاهان استفاده شد.

تعیین درصد همزیستی میکوریزی

برای تعیین درصد همزیستی میکوریزی از روش موسوم به Gridline intersect method استفاده شد. در این روش از رنگ آمیزی ریشه ها با تریپان بلو و محاسبه نقاط رنگ شده و ریشه‌های غیرهمزیست استفاده می‌شود. به این ترتیب که تعداد نقاطی از ریشه که با خطوط عمودی و افقی کاغذ شطرنجی برخورد کرده بودند، شمارش شدند. مناطقی که آبی پررنگ بودند (نشانگر وجود اندام‌های قارچی) نیز شمارش شدند و در نهایت از تقسیم این عدد بر تعداد کل برخوردها، درصد آغشتگی ریشه‌ها با قارچ، محاسبه شد.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌ها ۰/۱گرم از وزن تر برگ به همراه ۱۰ میلی استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس جذب فاز بالایی هر یک از نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۲ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه از فرمول‌های زیر استفاده می شود.

$Chla = 11.75A_{662} - 2.350A_{645}$

$Chla = 18.61A_{645} - 3.960A_{662}$

$CX+c = 1000A_{470} - 2.270chla - 81.4\ chlb/227$

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری MDA ۰/۲ گرم از بافت تر گیاهی در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید یک درصد ساییده شد و هموژنات به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. روی یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر از محلول محتوی TCA ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه گذاشته شد. نمونه‌ها در آب یخ سرد شده و به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان MDA از ضریب خاموشی ۱۵۵ $Mm^{-1}cm^{-1}$ و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$MDA\ (\mu mol/gFW) = [A_{532} - A_{600}/155] * 1000$

سنجش محتوای پرولین

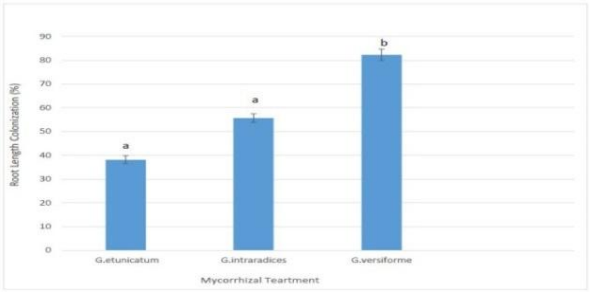
IrHC2019

برای تعیین میزان پرولین ۰/۱ بافت تر برگی در ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ له گردید. مخلوط توسط صافی واتمن صاف شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن ماری جوشان قرار داده شدند تا رنگ آجری نمایان شده و ثابت بماند. پس از تثبیت رنگ آجری، لوله‌ها داخل آب یخ قرار داده شدند و ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آنها اضافه گردید. لوله‌ها خوب به هم زده شدند تا دو فاز تشکیل شود. جذب فاز رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

کلونیزاسیون ریشه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

در این تحقیق مشخص شد که گیاه مریم گلی قادر به همزیستی با قارچ میکوریز است. آنالیز آماری داده ها نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین سه گونه قارچ بر حسب درصد همزیستی وجود دارد و گیاهان تلقیح شده با *G.versiforme* بیشترین درصد همزیستی (۸۲ درصد) را به خود اختصاص داده‌اند. (شکل ۱). Kumar و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده‌اند که میزان کلونیزاسیون قارچ‌های وزیکولار آربوسکولار *G. mosseae* و *Acaulospora laevis* پس از ۴۵ روز با مریم گلی به ترتیب ۳۹ و ۴۶ درصد بوده است. آنها با همین گیاه پس از ۹۰ روز به ترتیب ۴۲ و ۵۱ درصد همزیستی داشته‌اند.

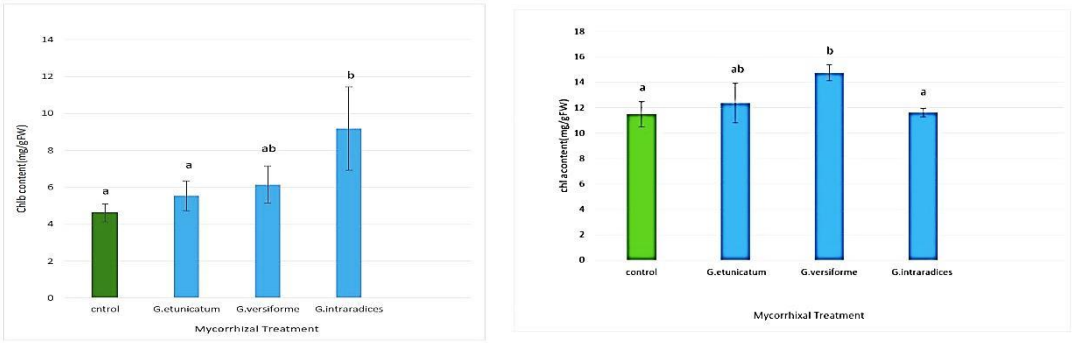


شکل ۱- درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهان مریم گلی تلقیح شده با سه گونه قارچ میکوریزآربوسکولار (حروف متفاوت بالای ستون‌ها نمایانگر معنی‌دار بودن میانگین‌هاست).

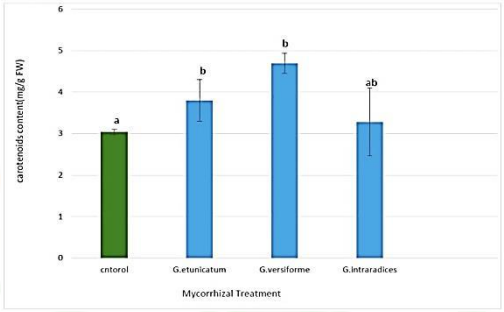
میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

با آنالیز آماری داده‌های مربوط به محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها اختلاف معنی‌داری درسطح $p<0.05$ بین برخی گروه‌ها دیده شد؛ به نحوی که گیاهان تلقیح شده یا مقادیر بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند و یا اختلاف معنی‌داری با آن نداشتند. این نشان دهنده موثر بودن تیمار قارچی بر میزان آنهاست. گیاهان همزیست با *G.versiforme* بیشترین مقدار کلروفیل a و کاروتنوئیدها را نشان دادند. بیشترین مقدار کلروفیل b نیز در گیاهان همزیست با *G.intraradices* دیده شد (شکل‌های ۲ و ۳). در فلفل تلقیح شده با قارچ *G.intraradices* ، کلروفیل a و کلروفیل b به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان بدون میکوریز افزایش یافته است (Demir, 2004). بالا بودن سطح کلروفیل در نمونه‌های میکوریزی را می‌توان به بالا بودن جذب فسفر به عنوان یک حامل انرژی در طی فرآیند فتوسنتز نسبت داد. محتوای کلروفیل در گیاهان میکوریزی به علت بهبود جذب فسفر افزایش می‌یابد.

IrHC2019



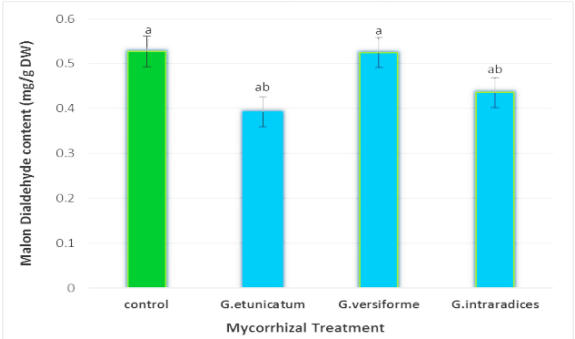
شکل ۲- محتوای کلروفیل a (سمت راست) و کلروفیل (سمت چپ) گیاهان مریم گلی شاهد و همزیست با قارچ های میکوریز (حروف متفاوت بالای ستون‌ها نمایانگر معنی‌دار بودن میانگین‌هاست).



شکل ۳ - تغییرات میزان کاروتنوئیدکل در گیاه مریم گلی در نمونه های شاهد و همزیست با قارچ های میکوریز (حروف متفاوت بالای ستون‌ها نمایانگر معنی‌دار بودن میانگین‌هاست).

میزان مالون دی‌آلدئید (MDA)

محتوای MDA به عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بررسی داده‌های مربوط نشان داد که همزیستی با گونه‌های *G.etunicatum* و *G.intraradices* منجر به کاهش محتوای MDA شده به این معنی که این گیاهان همزیست دچار آسیب غشایی کمتری شده‌اند (شکل ۴). رحمت زاده و خارا (۱۳۸۷) نشان داده‌اند که محتوای MDA در گیاهان گندم میکوریزی پایین‌تر از نمونه‌های شاهد بدون میکوریز بوده است. کاهش سطح مالون دی‌آلدئید در این گیاهان احتمالا مربوط به افزایش فعالیت انتقال الکترون در فتوسیستم II و همچنین بالا بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت اثر قارچ‌های میکوریز می‌باشد.

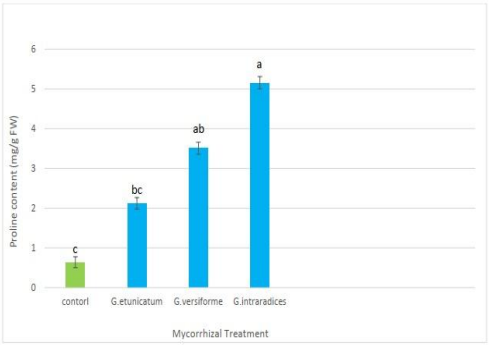


شکل ۴ - محتوای مالون دی‌آلدئید در برگ گیاهان مریم گلی در نمونه‌های شاهد و همزیست با قارچ‌های میکوریز

میزان پرولین

IrHC2019

آنالیز آماری نشان داد همزیستی با هر سه گونه به طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) محتوای پرولین گیاهان را بالا برده است. گیاهان همزیست با *G.intraradices* بیشترین مقدار پرولین را دارا بودند و تلقیح با *G.versiforme* و *G.etunicatum* به ترتیب منجر به تولید مقادیر کمتری شده است (شکل ۵). مهمترین عملکرد پرولین در گیاهان این است که با دارا بودن خاصیت اسمولیت باعث تعادل وضعیت آبی بافت می‌شود. پرولین دارای توانایی حفظ و موازنه پروتئین‌ها و پایداری DNA و غشاء نیز می‌باشد (Amutha *et al.*, 2007). همچنین، پرولین نقش حفاظتی دربرابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند (Tatar and Gerrek, 2008).



شکل ۵ - تغییرات میزان پرولین در برگ گیاه مریم گلی در نمونه های شاهد و همزیست با قارچ های میکوریز

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از گونه‌های مختلف قارچ میکوریز اثرات مثبت معنی‌داری بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک مریم گلی دارد. قارچ‌های میکوریز به عنوان کود زیستی از طریق افزایش جذب مواد مغذی (مانند فسفر، نیتروژن و ریزمغذی‌ها) و آب، مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی (خشکسالی، شوری و غیره) رشد و پایداری گیاهان میزبان را در سیستم‌های کشاورزی بهبود می‌بخشند. بنابراین می‌توان از قارچ‌های میکوریز به عنوان جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی برای بهبود شد گیاهان مریم گلی استفاده کرد. در این تحقیق قارچ میکوریز آربوسکولار *Glomus versiforme* بیشتر از دو گونه دیگر روی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان همزیست تاثیر مثبت داشته است.

منابع

امید بیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فراوری گیاهان دارویی، جلد اول و دوم ، ناشر: استان قدس رضوی.

رحمت زاده، س. و خارا، ج. ۱۳۸۷. تاثیر پرتو UV-C بر روی رشد و برخی از فاکتورهای ریخت شناسی و فیزیولوژیک در گیاهان گندم همزیست با سه گونه از قارچهای میکوریز. مجله زیست شناسی ایران. ۲۱(۱): ۶۳ـ ۵۲ .

صداقت حور، ش. ۱۳۸۸. گیاهشناسی، سیستماتیک. موسسه فرهنگی هنری دیباگران تهران ۲۹۰ صفحه

Amutha, R., Muthlaksmi, S., Baby Rani, W., Indira, K. and Mareeswari, P. 2007. Studies on biochemical basis of heat tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Research Journal of Agricultural and Biological Sciences, 3(4): 234-238.

Auge, R.M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relation. Canadian Journal of Soil Science, 84: 373-381.

Demir, S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological, growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology, 28: 85-90.

Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G. and Bending, G.D., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems and Environment, 113(1-4): 17-35.

IrHC2019

Kumar, A., Aggarwal, A. and Kaushish, S. 2009. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride* on growth performance of *Salvia officinalis* Linn. Journal of Applied and Natural Science, 1(1): 13-17.

Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B. and Fernandes-Ferreira, M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) Plant Science, 162: 981-987.

Tatar, O. and Gevrek, M.N. 2008. Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. Asian Journal of Plant Sciences, 7(4): 409-412.

Comparative evaluation of mycorrhizal symbiosis effects on some physiological parameters of garden sage (*Salvia officinalis* L.) colonized by three mycorrhizal fungi species

Sara Zeinaly and Jalil Khara
Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: sarazeinaly@gmail.com

Abstract
Garden sage (*Salvia officinalis* L.) is a common medicinal plant which is used extensively in food and drug industry. The present greenhouse study was carried out as completely randomized design in department of biology, Urmia University in order to investigate effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on growth and physiology of sage plants. Experimental treatments include three species of AMF (*Glomus versiforme*, *G. etunicatum* and *G. intraradices*) and the control plants. Both mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were grown in 16:8 photoperiod and 25-27 °C ambient temperature. Inoculated plants were colonized properly with high percentage. Mycorrhizal symbiosis raised photosynthetic pigments and proline content, significantly. Also, statistical analysis of data showed that level of Malone dialdehyde as an indicator of membrane damage was lower in inoculated plants than that of the control. Furthermore, it seems that positive effects of symbiosis were more dramatic in colonized plants with *G. versiforme* than two other species. Overall, results suggest that mycorrhizal symbiosis causes improved growth and physiological parameters in medicinal plant sage.

Keywords: *Glomus*, Malone diahdehyde, Mycorrhizal inoculation, Proline, *Salvia officinalis*.

IrHC2019