اثر قارچ اندوفیت و نانوذره اکسید روی بر برخی شاخصهای رشدی و فیتوشیمیایی گیاه عروسک پشت‌پرده در شرایط درون‌شیشه

صالح شهابی‌وند * و نسترن حیدری

ایران، مراغه، دانشگاه مراغه دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۸

چکیده

قارچ اندوفیت ریشه *Serendipita indica* دارای خصوصیات مفید و منحصر به فردی جهت افزایش رشد، تولید محصول و مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. مطالعات اخیر نشان داده که رشد، فیزیولوژی و تولید مواد فیتوشیمیائی گیاه به‌طور قابل‌توجهی توسط نانو ذرات فلزی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیرات قارچ *S. indica* و نانوذرات اکسید روی بر میزان همزیستی، شاخص‌های رشدی و تولید برخی از مواد فیتوشیمیائی گیاه داروئی عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) در شرایط درون شیشه بود. تیمارها شامل دو سطح قارچ (وجود قارچ و فقدان قارچ) و پنج سطح نانوذره اکسیدروی (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. با افزایش غلظت نانوذره در محیط کشت، درصد همزیستی و شاخص‌های رشدی گیاه بطور معنی‌داری افزایش یافتند. کاربرد نانوذره در برخی از سطوح، باعث افزایش در میزان فلاونوئید کل، فنل کل، آنتوسیانین و ظرفیت آنتی‌اکسیدان برگ و ساقه نسبت به گیاهان شاهد شد. حضور قارچ اندوفیت، شاخص‌های رشدی، فلاونوئید ساقه، آنتوسیانین برگ و ساقه، فنل کل برگ و ظرفیت آنتی‌اکسیدان برگ و ساقه را بطور معنی‌دار افزایش داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانوذره اکسید روی، به خصوص در سطح ۲۰ میلی‌گرم، به عنوان الیسیتور غیرزیستی و قارچ اندوفیت *S. indica* به عنوان الیسیتور زیستی می‌توانند باعث افزایش رشد و تولید برخی مواد فیتوشیمیائی در گیاه داروئی عروسک پشت‌پرده شوند.

واژه های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، عملکرد، قارچ *S. indica*، نانوذره اکسید روی، گیاه داروئی عروسک پشت پرده

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۷۲۵۶۴۵۸ ، پست الکترونیکی: shahabi70@yahoo.com; shahabi@maragheh.ac.ir

مقدمه

قارچ آندوفیت *Serendipita indica* با ایجاد همزیستی با ریشه گیاهان مهم اقتصادی و داروئی، رشد گیاه را افزایش داده و می‌توان به‌عنوان کود زیستی از آن استفاده کرد (۷). *S. indica* از قارچ‌های بازیدیومیست متعلق به خانواده سباسیناسه (Sebacinaceae) بوده و در بیشتر خصوصیات مشابه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار است. این قارچ باعث ایجاد خصوصیات مهم عملکردی در گیاه مانند افزایش زیست‌توده (Biomass)، افزایش مقاومت در برابر تنش‌هایی مانند فلزات سنگین، افزایش دما، نمک و بیماری‌های قارچی شده و همچنین به عنوان کود زیستی، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و ابزاری برای تحقیقات پایه‌ای، مطرح است (۶). این قارچ متابولیت‌های ثانویه گیاهان مختلفی که دارای اهمیت اقتصادی هستند را تغییر داده و باعث افزایش رشد و تولید بذر در گیاهان می‌شود (۳۱).

مطالعات اخیر نشان داده است که رشد و فیزیولوژی گیاهان به‌طور قابل‌توجهی توسط نانو ذرات فلزی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۲۱). گیاهان نقش مهمی در جذب و ذخیره سازی نانوذرات در زنجیره‌های غذایی محیط زیست

دارند (۱۹). ویژگی‌های سطحی ذرات نانو آن‌ها را واجد خصوصیات فوق‌العاده و منحصربه‌فردی می‌کند به طوریکه با افزایش تعداد اتم‌ها در سطح، انرژی آزاد درمجموع افزایش می‌یابد و منجر به تغییر ویژگی‌های مواد می‌شود. . اخیراً در بیوتکنولوژی گیاهی از نانو ذرات به‌عنوان عامل مؤثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرده‌اند (۱۳).

عنصر روی یکی از عناصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاه بوده و نقش مهمی در ساختار ۲۰۰ نوع آنزیم و پروتئین دارد. یون روی به‌عنوان کوفاکتور در برخی آنزیم-ها مانند اکسیدازها، دهیدروژنازها و پراکسیدازها عمل می‌کند و نقش تنظیمی در سنتز اکسین، متابولیسم نیتروژن و تقسیم سلولی دارد (۳۳).

گیاه داروئی عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) از تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) است. اثرات درمانی *P. alkekengi* می‌تواند به دلیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باشد. موادی مانند استروئیدها، فلاونوئیدها، فنیل‌پروپانوئیدها و آلکالوئیدها از قسمت‌های مختلف گیاه جداشده‌اند (۲۰). این گیاه می‌تواند دفع اسید اوریک را افزایش دهد و برای بیماری‌های کلیوی و ادراری، نقرس و روماتیسم استفاده می‌شود. سایر خواص این گیاه عبارتند از: اثرات ضدالتهاب، ضد باکتری، ضد درد، ملین، دیورتیک و ضد مالاریا. علاوه بر این، تحقیقات پزشکی مدرن نشان داد که *P.alkekengi* بر روی سیستم ایمنی بدن، سلول‌های سرطانی، هورمون‌های تیروئید، آنزیم‌های کبدی و هورمون‌های جنسی و تولید مثل مؤثر است (۸).

با توجه به نتایج تحقیقات قبلی در ارتباط با اثرات مثبت قارچ *S. indica* در افزایش شاخص‌های رشدی (۷ و ۳۱) و برخی ترکیبات فیتوشیمیائی (۳ و ۳۳) و از طرف دیگر تاثیر تعدیل‌کنندگی نانوذره اکسید روی بر رشد (۱ و ۲) و ترکیبات شیمیایی (۳، ۱۰ و ۲۸) گیاهان مختلف، هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر میکروارگانیسم خاکزی *S. indica* بعنوان الیسیتور زیستی و نانوذرات اکسید روی بعنوان نانوالیسیتور غیرزیستی روی رشد و برخی مواد فیتوشیمیائی در گیاه دارویی عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) می‌باشد.

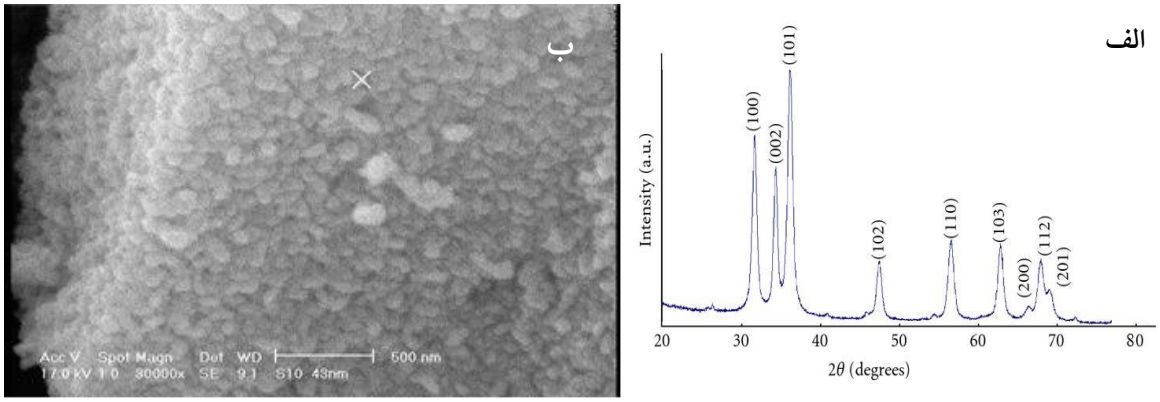
مواد و روشها

نمونه‌های بذر گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای ضدعفونی، بذرها ۵ دقیقه در محلول سفید کننده تجاری (هیپوکلریت سدیم) ۵٪ قرار گرفتند و سپس دو بار با آب مقطر شستشو شده و در نهایت به زیر هود انتقال یافتند و سه بار با آب مقطر اتوکلاو شده، شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی، بذرها به پلیت‌های استریل حاوی کاغذ صافی اتوکلاو شده، منتقل شدند. در هر پلیت شیشه‌ای، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد تا رطوبت موردنیاز بذر تأمین گردد. سپس پلیت‌ها درون دستگاه فیتوترون با دمای ۰/۵± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این تحقیق از کشت درون شیشه استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده جهت رشد گیاه عروسک پشت‌پرده محیط نیم هوگلند جامد (۱۸) بود که به میزان ۱۰ گرم بر لیتر آگار به محیط مایع هوگلند اضافه شد.

جهت تکثیر قارچ *S. indica* از محیط تغییر یافته آسپرژیلوس (۱۷) استفاده شد. این محیط دارای عناصر ماکرو، عناصر میکرو، پپتون، گلوکز، عصاره مخمر و ویتامین‌ها می‌باشد. پلیت‌ها پس از کشت در انکوباتور با دمای ۱±۲۹ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. در ادامه هر سه هفته یک‌بار قارچ‌ها واکشت شدند.

نانوذره اکسیدروی در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه مراغه سنتز شد. به طور خلاصه، استات روی و اسید سیتریک به نسبت مولی ۱:۱ مخلوط شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق آسیاب شدند. پودر آسیاب شده در دمای ۵۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت قرار گرفت تا نانوذرات

اکسید روی بدست آمد (۳۵). پراش اشعه ایکس تهیه نانوذرات روی را تایید کرده و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM دانه‌بندی کروی و اندازه نانوذره در حدود ۸۰ نانومتر را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی پراش اشعه ایکس (الف) و تصویر SEM نانوذره روی (ب)

تیمارها شامل دو سطح قارچ (وجود و فقدان قارچ) و پنج سطح نانوذره اکسید روی (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای اعمال تیمار قارچی، یک قطعه به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر از محیط کشت قارچ برداشته و در مرکز ظرف شیشه‌ای حاوی محیط کشت گیاه به‌صورت برعکس قرار داده شد. برای تهیه سطوح مختلف نانوذره روی، ابتدا برای تهیه محلول استوک (مادر)، ۲۰۰ میلی‌گرم از نانوذره به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسید. برای افزایش حلالیت نانوذره، محلول روی همزن مغناطیسی با حرارت ۱۰۰ درجه کاملاً حل شد. سپس برای تهیه غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره، ۲ میلی‌لیتر از محلول استوک، برای تهیه غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استوک، برای تهیه غلظت ۱۰ میلی‌گرم نانوذره، ۱ میلی‌لیتر از استوک و برای تهیه غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استوک به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید.

پس از اعمال تیمارها گیاهچه‌ها درون دستگاه فیتوترون با دمای ۰/۵± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ده هفته قرار گرفتند.

بررسی میزان همزیستی: جهت اطمینان از ایجاد همزیستی بین قارچ و گیاه و تعیین درصد همزیستی از روش خطوط متقاطع (۱۵) استفاده شد. ابتدا چندین قطعه‌ی نازک با طول مشخص از ریشه‌ی اصلی گیاه انتخاب و با آب شسته شد. رنگ‌آمیزی با روش فیلیپس و هیمن انجام شد (۲۴). نمونه-های ریشه به مدت ۵ دقیقه در KOH ۱۰٪ گرم شده (۵۰ درجه سانتی‌گراد) و در ادامه داخل محلول اسیدی رقیق HCl ۱٪ قرار داده شدند. در نهایت از رنگ تریپان بلو ۰/۲٪ از قبل گرم شده (۵۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۵ دقیقه استفاده شد؛ به این طریق فقط ریشه‌های دارای همزیستی میکوریزی رنگ گرفتند. ریشه‌ها در پلیتی که از قبل به مربع‌های ۰/۵ cm × ۰/۵ cm تقسیم‌شده بود، پخش شدند. سپس نقاطی از خطوط افقی و عمودی مربع‌ها که ریشه-های دارای همزیستی میکوریزی (با رنگ آبی) قطع کرده بودند، شمارش گردید. درصد همزیستی از تقسیم نقاطی که دارای همزیستی قارچی بودند بر تعداد کل نقاط، ضرب در ۱۰۰، محاسبه شد.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد: به‌طور تصادفی از هر پلیت آزمایشی یک گیاه برداشت گردید. ارتفاع گیاه و طول ریشه

و اندام هوایی با استفاده از خط‌کش تعیین و پس از جدا نمودن قسمت‌های ریشه و اندام هوایی، وزن‌تر برای کلیه تیمارها محاسبه گردید. سپس نمونه‌ها در درون پاکت کاغذی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون قرار داده شدند تا وزن خشک آن‌ها تعیین گردد. وزن تر و خشک به‌وسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ تعیین شد.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: محتوی فلاونوئید کل بر اساس روش چنگ و همکاران (۹) با استفاده از معرف آلومینیم کلراید اندازه‌گیری شد. مخلوط آزمایشی دارای ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۶۰۰ میکرولیتر متانول ۹۵ درصد اسیدی، ۴۰ میکرولیتر محلول کلراید آلومینیم ۱۰ درصد، ۴۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۱/۱۲۰میلی‌لیتر آب مقطر بود. جذب مخلوط ۴۰ دقیقه بعد از نگهداری در دمای اتاق، در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل شاهد توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV-1800) قرائت شد. شاهد محتوی تمام مواد بالا به‌جز عصاره گیاه بود و به همان میزانی که از عصاره گیاه برداشته شد، آب مقطر اضافه شد. از کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل "میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش گردید. اصول رنگ سنجی آلومینیوم کلراید ، تشکیل کمپلکس‌های اسیدی آلومینیوم کلراید با گروه کتون و یا هیدروکسیل فلاونوئیدها است که این ترکیبات بیشترین جذب را در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر دارند (۹).

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای سنجش میزان آنتوسیانین کل، مقدار ۰/۰۲گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی (متانول ۹۹ درصد به‌علاوه اسیدکلریدریک ۱ درصد به نسبت ۹۹ به ۱) در یک هاون چینی ساییده و محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول‌ها در طول‌موج ۵۳۰ و ۶۷۵ نانومتر نسبت به شاهد قرائت شد. از محلول متانول اسیدی به‌عنوان شاهد استفاده گردید. مقدار آنتوسیانین از فرمول روبه‌رو محاسبه گردید (۲۲): $C = A530 - (0.25 \times A675)$

اندازه‌گیری فنل کل: برای سنجش میزان فنل کل مقدار ۰/۰۲گرم از بافت گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی (متانول ۹۹ درصد به علاوه اسید کلریدریک ۱ درصد به نسبت ۹۹ به ۱) در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد، سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر نسبت به شاهد قرائت شد (۱۲). از محلول متانول اسیدی به عنوان شاهد استفاده گردید. از اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

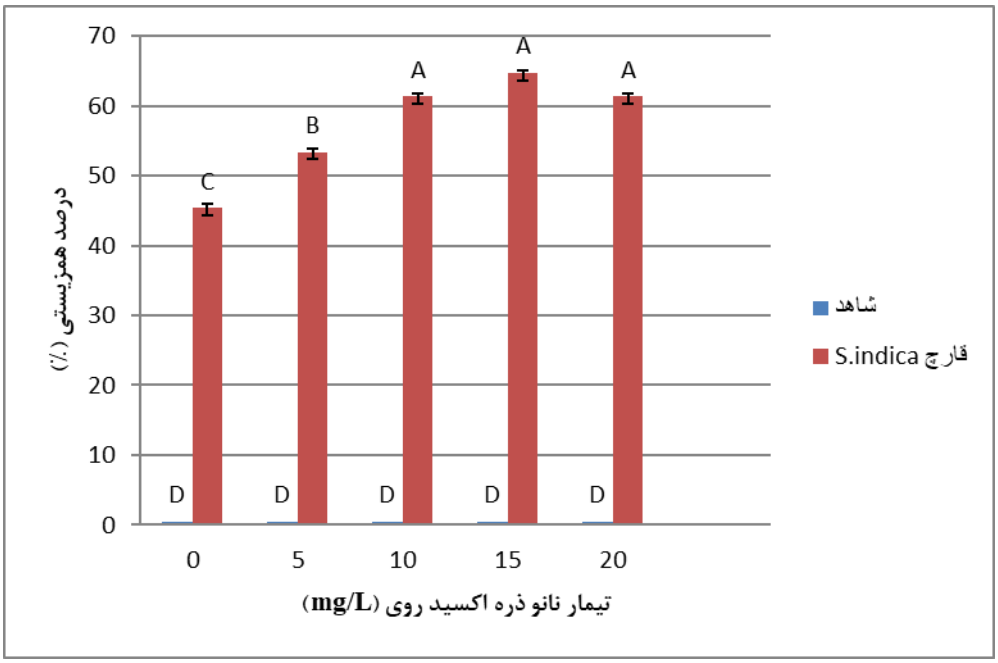
اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی (درصد مهار پراکسید هیدروژن): محلول پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی-مولار در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH:۷/۴) تهیه شد. ۱/۶ میلی‌لیتر از نمونه با ۰/۶ میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن مخلوط شده و پس از ده دقیقه، میزان جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر در برابر بلانک (بافر فسفات) قرائت شد (۱۶). درصد مهار پراکسید هیدروژن با فرمول روبه‌رو محاسبه شد: $(\%) = (A_{max} - A_t/A_{max}) \times 100$

A_{max}=جذب ماکزیمم و At=جذب نمونه. جذب ماکزیمم برای محلولی است که حاوی پراکسید هیدروژن بوده اما فاقد عصاره یا نمونه مورد نظر است.

آنالیز آماری: داده‌های این مقاله بصورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملا تصادفی با سه تکرار بررسی شده و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

بررسی همزیستی گیاه عروسک پشت‌پرده با قارچ *S. indica*: نتایج نمودار ۱ نشان داد که در گیاهان تیمار شده با قارچ اندوفیت همزیستی بین گیاه و قارچ انجام گرفت. با افزایش مقدار نانوذره در محیط کشت، میزان همزیستی بیشتر شد، هرچند که در بالاترین سطح نانوذره درصد همزیستی اندکی نسبت به سطح قبلی کاهش یافت ولی این کاهش معنی‌دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر سطوح مختلف تیمار نانوذره اکسید روی بر میزان همزیستی (٪) ریشه گیاه عروسک پشت پرده. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

تاثیر تیمارها بر پارامترهای رشدی گیاه عروسک پشت پرده: طبق جدول ۱، تیمار نانوذره اکسید روی اثر مثبت بر شاخص‌های رشدی گیاه ترەتیزک داشت، بطوریکه با افزایش غلظت نانوذره در محیط کشت، طول اندام هوایی و ریشه و نیز وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. البته در برخی سطوح نانوذره، این افزایش نسبت به سطح صفر نانوذره (شاهد) و نسبت به سطح قبلی، معنی‌دار نبود (جدول ۱). بیشترین مقدار مربوط به شاخص‌های طول اندام هوایی و ریشه و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در سطح ۲۰ میلی‌گرم نانوذره دیده شد.

بر طبق جدول ۲، قارچ *S. indica* اثر مثبت بر پارامترهای رشدی گیاه *P. alkekengi* داشت بطوریکه باعث افزایش معنی‌دار در کلیه پارامترهای رشدی گیاه یعنی طول اندام هوایی و ریشه و نیز وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه شد.

طبق جدول ۳، تیمار نانوذره روی با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم، نسبت به شاهد، تغییر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید برگ گیاه *P. alkekengi* نداشت ولی مقدار ۲۰ میلی‌گرم نانوذره تغییر مثبت معنی‌دار داشت. همچنین تمام مقادیر نانوذره باعث افزایش مقدار فلاونوئید ساقه، نسبت به شاهد شدند که در این میان مقادیر ۱۰ و ۱۵میلی‌گرم، تاثیر معنی‌دار داشته‌اند. براساس جدول ۳، غلظت‌های ۵ و ۲۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید روی، نسبت به شاهد، بر میزان آنتوسیانین برگ اثر معنی‌دار افزایشی داشت و مقدار۲۰ میلی‌گرم نانوذره بیشترین تاثیر را داشت.

جدول ۱- اثر تیمار نانوذره اکسید روی بر صفات رشدی گیاه عروسک پشت پرده

تیمار نانوذره اکسید روی (mg/L)	رشد طولی (cm)		وزن تر (g)		وزن خشک (g)	
	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه
شاهد (۰)	۱۰/۵۰B	۵/۰۸C	۰/۳۸B	۰/۳۷B	۰/۰۴۶AB	۰/۰۲۳B
۵	۱۱/۶۳AB	۵/۴۵C	۰/۳۹B	۰/۵۰A	۰/۰۴۱AB	۰/۰۳۱A
۱۰	۱۱/۹۳A	۵/۹۶BC	۰/۴۳B	۰/۵۱A	۰/۰۳۶B	۰/۰۳۵A
۱۵	۱۲/۵۵A	۶/۸۳AB	۰/۴۹A	۰/۵۴A	۰/۰۴۹AB	۰/۰۳۹A
۲۰	۱۲/۶۸A	۷/۲۰A	۰/۵۳A	۰/۵۶A	۰/۰۵۴A	۰/۰۳۹A

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است: مقایسه میانگین‌ها حاصل از آزمون چند دامنه دانکن می باشند.

جدول ۲- اثر قارچ *S.indica* بر صفات رشدی عروسک پشت‌پرده

تیمار قارچ *S.indica*	طول (cm)		وزن تر (g)		وزن خشک (g)	
	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه
فقدان قارچ	۱۱/۴۸B	۵/۷۸B	۰/۳۸B	۰/۴۶B	۰/۰۳۹B	۰/۰۳۲B
حضور قارچ	۱۲/۲۴A	۶/۴۲A	۰/۵۰A	۰/۵۲A	۰/۰۵۲A	۰/۰۳۴A

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است: مقایسه میانگین‌ها حاصل از آزمون چند دامنه دانکن می باشند.

در مورد میزان آنتوسیانین ساقه، فقط سطح ۱۵ میلی‌گرم نانوذره باعث افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد شد (جدول ۳). در مورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ، هر چند که در تمام سطوح نانوذره افزایش میزان این پارامتر نسبت به شاهد، دیده شد ولی در سطح ۱۰ میلی‌گرم نانوذره، این افزایش معنی‌دار بود (جدول ۳). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ساقه تنها در سطح ۲۰ میلی‌گرم نسبت به شاهد افزایش داشت که این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۳- اثر تیمار نانوذره اکسید روی بر ویژگیهای فیتوشیمیایی گیاه تره‌تیزک.

تیماراکسیدروی (mg/L)	فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین درگرم عصاره)		آنتوسیانین (میلی‌گرم درگرم وزن ترگیاه)		فنل کل (میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک گیاه)		ظرفیت آنتی اکسیدانی (درصد مهار پراکسید هیدروژن)	
	برگ	ساقه	برگ	ساقه	برگ	ساقه	برگ	ساقه
شاهد(۰)	۲/۹۲B	۱/۸۶۲B	۰/۲۳۷AB	۰/۵۵۳B	۱۰۹/۰۹A	۵۲/۰۴AB	۴۸/۸۸B	۵۳/۴۸A
۵	۲/۹۲B	۲/۱۴۸AB	۰/۳۴۹A	۰/۶۳۳AB	۱۰۱/۴۲AB	۴۹/۵۴B	۵۰/۱۱B	۵۱/۶۱AB
۱۰	۳/۰۱B	۲/۲۵۸A	۰/۲۰B	۰/۵۵۳B	۸۹/۸۶AB	۵۳/۲۸AB	۵۷/۲۰A	۴۹/۸۹AB
۱۵	۳/۹۱AB	۲/۱۸۵A	۰/۲۹AB	۰/۶۶۳A	۱۱۴/۳۱A	۵۲/۴۱AB	۵۲/۸۱AB	۴۵/۹۹B
۲۰	۴/۴۵A	۲/۰۳۸AB	۰/۳۷A	۰/۵۲۷B	۷۶/۲۰B	۵۸/۵۸A	۵۲/۱۶AB	۵۴/۵۳A

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است: مقایسه میانگین‌ها حاصل از آزمون چند دامنه دانکن می باشند.

برطبق جدول ۴، حضور قارچ *S. indica* بر میزان فلاونوئید برگ نسبت به شاهد اثر معنی‌دار کاهشی داشت ولی در ساقه گیاه *P. alkekengi* باعث افزایش میزان فلاونوئید در مقایسه با گیاهان شاهد شد. در مورد آنتوسیانین هم در

برگ و هم در ساقه حضور قارچ *S. indica* باعث افزایش میزان آنتوسیانین نسبت به گیاهان شاهد شد. اثر اصلی قارچ *S. indica* بر میزان فنل کل در ساقه گیاه *P. alkekengi* تاثیر معنی‌داری نداشته است ولی باعث افزایش میزان آن در برگ شده است. بر طبق جدول ۴، حضور قارچ *S. indica* باعث افزایش میزان ظرفیت‌آنتی اکسیدانی (درصد مهار پراکسید هیدروژن) در برگ و ساقه گیاه عروسک پشت‌پرده نسبت به نمونه‌های شاهد بدون قارچ شد.

بحث

نتایج نشان داد (نمودار ۱) که در گیاهان تلقیح نشده با قارچ، کلونیزه شدن ریشه مشاهده نشد. گیاهان تلقیح شده با قارچ همزیستی موثری با *S. indica* نشان دادند و افزودن نانوذره اکسید روی باعث افزایش میزان همزیستی قارچ *S. indica* با ریشه گیاه *P. alkekengi* شد. سینگال و همکاران (۲۷) نشان دادند که نانولوله‌های اکسید روی تا غلظت ۵۰۰ppm بر لیتر باعث افزایش رشد *S. indica* می‌شود.

جدول ۴- اثر قارچ *S. indica* بر ویژگیهای فیتوشیمیایی گیاه تره‌تیزک.

تیمار قارچ *S.indica*	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)		آنتوسیانین (میلی‌گرم در گرم وزن تر گیاه)		فنل کل (میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک گیاه)		ظرفیت آنتی اکسیدانی (درصد مهار پراکسید هیدروژن)	
	برگ	ساقه	برگ	ساقه	برگ	ساقه	برگ	ساقه
فقدان قارچ	۳/۷۷A	۱/۹۷B	۰/۲۶۷B	۰/۵۳B	۸۹/۳۰۷B	۵۳/۳۵A	۳۷/۰۱B	۴۶/۵۱B
حضور قارچ	۳/۱۲B	۲/۲۰A	۰/۳۱۵A	۰/۶۴۱A	۱۰۴/۷۰۴A	۵۳B	۵۷/۰۱A	۵۵/۶۹A

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است: مقایسه میانگین‌ها حاصل از آزمون چند دامنه دانکن می باشند.

وارما و همکاران (۳۰) در پژوهشی که در مورد تاثیر نانوذره‌های مختلف بر روی رشد قارچ *S. indica* انجام دادند مشاهده نمودند که نانوذره اکسید روی بیشتر از نانوذره‌های اکسید تیتانیوم (TiO_2)، نانولوله کربن (CNT) و نانوذره نقره بر روی رشد قارچ *S. indica* موثر است. همچنین افزودن نانوذره اکسید روی به محیط کشت باعث افزایش بیومس قارچ *S. indica* می‌گردد. با توجه به نتایج ذکر شده و پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره اکسید روی، احتمالاً با توجه به ضروری بودن عنصر روی در رشد و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم‌های مختلف متابولیسمی قارچ اندوفیت، باعث افزایش رشد قارچ و لذا افزایش میزان همزیستی قارچ *S. indica* با ریشه گیاه *P. alkekengi* می‌شود.

همچنین پژوهش حاضر نشان داد که نانوذرات اکسید روی بر پارامترهای رشدی گیاه عروسک پشت‌پرده تاثیر مثبت معنی‌داری می‌گذارند. پاسخ گیاهان به نانوذرات بر اساس نوع گونه، مرحلهٔ رویشی، سن و ماهیت نانوذرات متفاوت است (۳۶). یون روی بعنوان کوفاکتور برخی آنزیم‌ها مانند اکسیدازها، دهیدروژنازها و پراکسیدازها عمل می‌کند و نقش تنظیمی در سنتز اکسین، متابولیسم نیتروژن و تقسیم سلولی دارد (۳۳). مشخص گردیده که تیمار نانوذرات اکسید روی، همه پارامترهای اندازه‌گیری شده در گیاه لوبیای سبز که شامل وزن خشک ریشه و ساقه و نیز طول ریشه و ساقه در گلدان را نسبت به تیمارهای اکسید روی معمولی بهبود می‌بخشد (۲). در تحقیقی دیگر، گیاه کرچک با نانواکسیدروی با غلظت‌های صفر، ۱۰،۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تیمار شد و نتایج حاصل نشان داد که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم سبب افزایش درصد و سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شد و در غلظت‌های بالاتر احتمالاً تنش اکسیداتیو ناشی از

سمیت فلز روی، تاثیر منفی بر رشد داشت (۱). از آن جا که روی در تولید اکسین نقش دارد، افزایش رشد گیاه به دلیل گسترش طول گره‌های داخلی را به افزایش اکسین نسبت داده‌اند (۲۶). البته سازوکار مشخصی در خصوص تاثیر عنصر روی بر انتقال اکسین در پیکره گیاه هنوز ارائه نشده‌است. به نظر می‌رسد غلظت اکسین تابعی از غلظت عنصر روی در گیاه باشد. نسبت دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در ریشه بیش از بخش هوایی است که این افزایش نسبت اکسین در ریشه می‌تواند عامل اصلی افزایش وزن خشک و طول ریشه باشد (۳۴). هر چند که در غلظت‌های بالاتر عنصر روی، سمیت روی می‌تواند اثر معکوس در شاخص‌های رشدی گیاه داشته باشد.

فلاونوئیدها که به عنوان ترکیبات فنلی و گروه بزرگی از ترکیبات ثانویه گیاهی مطرح هستند و در تحقیق حاضر نیز میزان آنها در اثر کاربرد نانوذره روی افزایش یافت، با تغییر دادن لیپیدهای غشاء سیالیت آن را کاهش داده، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده و در نتیجه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش حفاظتی دارند (۶، ۲۳ و ۲۵). در گیاه بادرنجبویه با افزایش غلظت نانوذره اکسید مس، محتوی فلاونوئید کل افزایش یافت (۴). در پژوهشی دیگر García-López و همکاران (۱۴) نشان دادند که محلول پاشی نانوذره اکسید روی بر گیاه *Capsicum annuum*باعث افزایش فلاونوئیدکل می‌شود. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که افزایش میزان فلاونوئیدهای گیاه عروسک پشت پرده یک نوع پاسخ دفاعی گیاه در برابر افزایش میزان فلز روی باشد.

در راستای افزایش میزان فلاونوئیدهای ساقه و برگ گیاه عروسک پشت پرده در اثر تیمار با قارچ اندوفیت در مطالعه حاضر، در تحقیقی مشابه که در مورد اثر قارچ *S. indica* بر روی گیاه نعناع فلفلی بود نشان داده شد که تلقیح با قارچ باعث افزایش میزان فلاونوئید کل در گیاه می‌شود (۳). افزایش ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها در مواجهه با قارچ به چند عامل بستگی دارد: واکنش سیستم دفاعی گیاه به کلونیزه شدن قارچ در ریشه و افزایش جذب مواد غذایی معدنی از ریشه بعلت گسترش هیف‌های قارچی در ریشه گیاه (۲۸).

در تحقیق حاضر نانوذره روی در برخی سطوح باعث افزایش میزان آنتوسیانین برگ و ساقه شد که می‌تواند ناشی از نقش آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین‌ها به عنوان گروهی از فلاونوئیدهای گیاهی در جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی در اثر غلظت بالای فلز روی باشد (۳۲) . در پژوهشی که برروی گیاه تنباکو و تیمار آن با نانوذرات اکسید روی انجام شد نتایج به‌دست آمده نشان داد که نانوذرات اکسید روی باعث افزایش میزان آنتوسیانین گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد شدند (۱۰). آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب بوده و افزایش آنتوسیانین‌ها نشان دهنده افزایش مسیر اصلی تولید فلاونوئید است که در یک نقطه پایانی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها سنتز می‌شوند. آنتوسیانین‌ها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی از گیاه در برابر واکنش‌های فتودینامیک آسیب رساننده، با سرکوب کردن گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند (۳۲).

در پژوهش حاضر نشان داده شد که قارچ *S. indica* بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه عروسک پشت پرده اثر افزایشی معنی‌داری دارد که می‌تواند ناشی از فعال کردن سیستم دفاعی گیاه تحت شرایط تنش فلز باشد. وهبی و همکاران (۲۹) در پژوهشی نشان‌دادند که قارچ *S.indica* باعث کاهش تولید H_2O_2 در گیاه *Arabidopsis thaliana* پس از مواجهه با آلودگی *Alternaria brassicae* می‌شود. این نتایج نشان‌دهنده اثر محافظت‌کنندگی قارچ *S. indica* در برابر استرس‌های اکسیداتیو از طریق افزایش انواع آنتی‌اکسیدان‌ها و در نتیجه جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن و بخصوص پراکسید هیدروژن است. همچنین در این تحقیق تیمار نانوذره روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ در همه سطوح نانودره و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ساقه در برخی سطوح نانوذره شد (جدول

۳). در آزمایش مشابه کاربرد نانوذره اکسید روی باعث افزایش آنتی‌اکسیدان کل و برخی آنتی‌اکسیدانهای غیر آنزیمی مانند فنل و فلاونوئید در گیاه *Brassica napus* شد (۳۳). گیاهان از طریق سیستم آنتی‌اکسیدان، سمیت رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش فلزاتی مانند روی را کاهش می‌دهند (۵). همچنین این امر مهم است که در نظر بگیریم که برخی از نانوذرات ممکن است اثر محافظت زیستی در برابر آسیب گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد کنند (۱۰).

منابع

۱-اسپرهم، ا، سعیدی سار، س، محمودزاده آخرت، ه، هادی، م (۱۳۹۶). تاثیر نانو ذرات اکسید روی (ZnO) بر ویژگی‌های جوانه زنی، بیوشیمیایی و فراساختار سلولی گیاه کرچک (*Ricinus communis* L.). *مجله سلول و بافت* ۸(۲) ،۱۶۴-۱۵۱.

۲-پنام، ز، آستارایی، ا ، لکزیان، ا (۱۳۹۵). تاثیر اکسید روی (نانو و معمولی) و قارچ *Glomus intraradices* بر اجزای عملکرد و غلظت عناصر کم مصرف در گیاه لوبیا سبز. *علوم و فنون کشت-های گلخانه‌ای* ،۷(۲۶)، ۸۲-۷۱.

۳-خالوندی، م، عامریان، م، پیردشتی، ه، برادران فیروزآبادی، م، غلامی ا (۱۳۹۶). برهمکنش قارچ *Piriformospora indica* با گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر کمیت و کیفیت اسانس و برخی پارامترهای فیزیولوژیک تحت تنش شوری. *مجله فرآیند و کارکرد گیاهی* ،۶(۲۱) ،۱۸۴-۱۶۹.

۴-ریاحی مدوار، ع، نصیری بزنجانی، م، رضائی، ف، باقی‌زاده، ا (۱۳۹۷). تجمع رزمارینیک اسید و بیان ژن آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز در گیاهچه‌های بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) تیمار شده بانانو ذره اکسید مس. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*، ۳۱(۱)، ۴۵-۳۶.

۵-فتحی رضایی، پ (۱۳۹۹). ارزیابی اثر الیسیتور غیرزیستی بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه سیر. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*، ۳۳(۳)، ۴۱۹-۴۰۵.

6-Arora, A., Sairam, R. K.and Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82(10), 1227- 1235.

7-Bagde, U. S., Prasad, R., & Varma, A. (2010). Interaction of mycobiont: *Piriformospora indica* with medicinal plants and plants of economic importance. *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9214-9226.

8-Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Naghdi, N., Nejad, A. S. M., & Afsordeh, O. (2016). *Physalis alkekengi*: A review of its therapeutic effects. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 1472-1485.

9-Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.

10-Chayaprasert, W & Sompornpailin,K. (2019). Effects of Modulated Concentration of ZnO Nanoparticles on enhancing Biosynthesis of Metabolites and Protecting Plant Membrane. *CMUJ NS Special Issue on Food and Applied Bioscience to Innovation and Technology*, 18(2), 167-177.

11-Chen, J., Patil, S., Seal, S., and McGinnis, J. F. (2006). Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature Nanotechnology*, 1, 142–150.

12-Csepregi, K., Kocsis, M., & Hideg, É. (2013). On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4), 500-509.

13-Fakruddin, M., Hossain, Z., & Afroz, H. (2012). Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 31.

14-García-López, J., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N., ... & Niño-Medina, G. (2018). Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annuum* L. during Germination. *Agronomy*, 8(10), 215.

15-Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, 84(3), 489-500.

16-Gülçin, İ., Sat, I. G., Beydemir, S., & Küfrevioglu, Ö. I. (2004). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of broccoli extracts (*Brassica oleracea* L.). *Italian Journal of Food Science*, 16(1)., 17-30.

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

18-Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. *California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit).

19-Kumari, M., S.S. Khan, S. Pakrashi, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2011."Cytogenetic and Genotoxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Root Cells of *Allium cepa*." *Journal of Hazardous Materials* 190, 613-621.

20-Li, A. L., Chen, B. J., Li, G. H., Zhou, M. X., Li, Y. R., Ren, D. M., & Shen, T. (2018). *Physalis alkekengi* L. var. franchetii (Mast.) Makino: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 210, 260-274.

21-Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in Plant Science*, 8, 832.

22-Mita, S., Murano, N., Akaike, M., & Nakamura, K. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4), 841-851.

23-Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009). Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, 180-191.

24-Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158-161.

25-Pourcel L, Routaboul J.M.,Cheynier V.,Lepiniec L, Debeaujon I.(2006). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological Functions. *Trends in Plant Science*.12, 1.

26-Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., ... & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905-927.

27-Singhal, U., Khanuja, M., Prasad, R., & Varma, A. (2017). Impact of synergistic association of ZnO-nanorods and symbiotic fungus *Piriformospora indica* DSM 11827 on *Brassica oleracea* var. botrytis (Broccoli). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1909.

28-Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., Novák, O., Strnad, M., Ludwig-Müller, J. and Oelmüller, R. (2008). The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 21, 1371–1383.

29-Vahabi, K., Dorcheh, S. K., Monajembashi, S., Westermann, M., Reichelt, M., Falkenberg, D., ... & Oelmüller, R. (2016). Stress promotes *Arabidopsis-Piriformospora indica* interaction. *Plant Signaling & Behavior*, 11(5), e1136763.

30-Varma, A., & Khanuja, M. (2017). Role of nanoparticles on plant growth with special emphasis on *Piriformospora indica*: a review. *In Nanoscience and Plant–Soil Systems*, 387-403. Springer, Cham.

31-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.

32-Wang, S.Y., Bowman, L., Ding, D. (2008). Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp*.) and promotes anti proliferation and promotes anti proliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*.107, 1261-1269.

33-Zafar, H., Ali, A., Ali, J. S., Haq, I. U., & Zia, M. (2016). Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 535.

34-Zand, B., Sorooshzadeh, A., Ghanati, F., Moradi, F. (2014). Effect of zinc (Zn) and auxin (IBA) foliar application on phytohormonal variation and growth of corn (*Zea mays* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 6(22), 63-76

35-Zandi, S., Kameli, P., Salamati, H., Ahmadvand, H., Hakimi, M. (2011). Microstructure and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by a simple method. *Physica B*, 406, 3215–3218.

36-Zhang, L., Hong, F., Lu, S. and Liu, C. (2005) Effects of nano-TiO_2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research* 105, 83-91.

Effect of endophyte fungus and zinc oxide nanoparticles on growth parameters and some phytochemicals in *Physalis alkekengi* under *in vitro* condition

Shahabivand S.* and Heidari N.

Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

The root endophytic fungus *Serendipita indica* has useful and unique features to enhance growth, yield and resistance of plants against biotic and abiotic stresses. The recent studies have shown that plant growth, physiology and production of phytochemicals are significantly affected by nanoparticles. The purpose of this study was to investigate the effects of *S. indica* and zinc oxide nanoparticles on the symbiosis amount, growth parameters and the production of some phytochemicals in pharmaceutical plant *Physalis alkekengi* under *in vitro* conditions. The treatments were two fungus level (presence of fungus and absence of fungus), and five concentrations of zinc oxide nanoparticles (0, 5, 10, 15 and 20 mg/L). By increasing zinc nanoparticles in media, symbiosis percentage and the growth parameters were significantly increased. Application of nanoparticle in some levels, increased total flavonoid, total phenol, anthocyanins and antioxidant capacity of leaf and stem, in compare to control. Presence of *S. indica* significantly increased growth parameters, stem flavonoids, leaf and stem anthocyanins, leaf total phenol and antioxidant capacity of the stem and leaf. The results from this study showed that zinc nanoparticles, especially at 20 mg/L, as abiotic elicitor and *S. indica* as biotic elicitor can increase the growth and production of some phytochemicals in pharmaceutical plant *Physalis alkekengi*.

Key words: Antioxidant, Yield, Fungus *Serendipita indica*, Zinc oxide nanoparticle, Pharmaceutical plant, *Physalis alkekengi*