Effect of biofertilizers of Azotobarvar-2 and Phosphatebarvar-2 on the amount and compositions of *Thymus daenensis* Celak. essential oil in the full flowering stage

Fatemeh Nejadhabibvash[1*], Behruz Shokri[2], Abdolbaset Mahmudi[3]
[1.] Department Of Biology, Urmia University, Urmia, Iran
[2.] Department of Medicinal plants, Higher Education Center of Shahid Bakeri of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran
[3.] Department of Medicinal Plants. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

One of the main pillars in sustainable agriculture and cultivation of medicinal plants is the use of biofertilizers in agricultural ecosystems with the aim of eliminating or reducing the consumption of chemical inputs. For this purpose, the experiment was performed in the form of a randomized complete block design with three replications in the spring of 2018 in a research greenhouse located in the city of Urmia. First, the soil sample was analyzed and its physical and chemical properties were measured. *Thymus daenensis* Celak seeds were prepared and cultivated to produce seedlings. Seedlings were transferred to pots after inoculation with Azotobarvar-2 and Phosphatebarvar-2 biofertilizers. Each pot contained 4 plants. The flowering branches of the plants were harvested at the full flowering stage. After drying in the shade, essential oils extracted by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus. Essential oil components were analyzed and identified using GC and GC-MS devices. The constituents of the essential oils were identified by mass spectrum, their retention index (RI) and compared with the retention indices reported in reliable sources. The essential oils yield related to control samples and treatments of Azotobarvar-2 and Phosphatebarvar-2 was 2, 2.5 and 5 percent, respectively. In total, 29 compounds from the essential oil of this plant were identified, which included the range of 94.98-97.22, and the main constituents of the essential oil, including thymol (65.29, 72.65 and 48.99%), caryophyllene (4.27, 4.29 and 11.92%), eucalyptol (4.95, 3.16 and 8.51%) and borneol (3.66, 3.83 and 4.64%) respectively were for the control sample, Azotobarvar-2 and Phosphatebarvar-2. According to the results, treatment with the Phosphatebarvar-2 fertilizer increased the essential oil yield and its main compounds in *Thymus daenensis* Celak. while the quantitative and qualitative increase of essential oil under Azotobarvar-2 fertilizer treatment was not significant compared to the control.

Keywords: Biofertilizers, Essential Oil Compounds, Sustainable Agriculture, *Thymus daenensis* Celak., GC-MS
* Corresponding Author: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
DOI. 10.22108/IJPB.2021.122978.1213
DOR. 20.1001.1.20088264.1400.13.1.2.6

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال سیزدهم، شمارهٔ چهل و هفتم، بهار ۱۴۰۰، صفحهٔ ۳۶-۱۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۳/۱۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۱/۲۹
مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بر مقدار و ترکیبات اسانس آویشن دنایی *Thymus daenensis* Celak. در مرحله گلدهی کامل

فاطمه نژاد حبیب وش[۱*]، بهروز شکری[۲]، عبدالباسط محمودی[۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۳] گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
یکی از ارکان‌های اصلی در کشاورزی پایدار و کشت گیاهان دارویی استفاده از کودهای زیستی در اکو سیستم‌های زراعی با هدف حذف یا کاهش مصرف نهاده‌های شیمیایی است. بدین‌منظور آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در بهار سال ۱۳۹۷ در گلخانه پژوهشی واقع در شهر ارومیه انجام شد. ابتدا نمونه خاک مورد استفاده تجزیه گردید و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن اندازه‌گیری شد. برای تولید نشاء، بذر گیاه آویشن دنایی *Thymus daenensis* تهیه و در سینی‌های کشتکاشته شد. نشاءهای تولیدشده پس از تلقیح با کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ به گلدان انتقال داده شدند. در هر گلدان ۴ بوته قرار گرفت. سر شاخه گلدار گیاهان در مرحله گلدهی کامل برداشت گردید و پس از خشک‌کردن در سایه توسط دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند و اجزای اسانس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC-MS آنالیز و شناسایی شدند. شناسایی ترکیات تشکیل‌دهنده اسانس به‌کمک طیف جرمی، شاخص بازداری آنها و مقایسه با شاخص‌های بازداری گزارش شده در منابع معتبر صورت گرفت. بازدهی اسانس نمونه‌های شاهد و تیمار کودهای ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ به ترتیب ۲، ۲/۵ و ۵ درصد به دست آمد. به‌طورکلی، ۲۹ ترکیب از اسانس این گیاه شناسایی گردید که گستره ۹۴/۹۸-۹۷/۲۲ درصد را شامل می شدند و ترکیبات اصلی اسانس شامل تیمول (۶۵/۲۹، ۷۲/۶۵ و ۴۸/۹۹ درصد)، کاریوفیلن (۴/۲۷، ۴/۲۹ و ۱۱/۲۹ درصد)، اکالیپتول (۴/۵۹، ۳/۱۶ و ۸/۵۱ درصد) و بورنئول (۳/۶۶، ۳/۸۳ و ۴/۶۴ درصد) به‌ترتیب مربوط به نمونه شاهد و تیمارهای کودی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بود. باتوجه‌به نتایج این تحقیق، کاربرد کود فسفاته بارور-۲ باعث افزایش معنی‌دار محتوای اسانس و ترکیبات اصلی آن در گیاه آویشن دنایی شد. درحالی‌که افزایش کمی و کیفی اسانس تحت تیمار کودی ازتوبارور-۲ نسبت به شاهد معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی: کودهای زیستی، ترکیبات اسانس، کشاورزی پایدار، آویشن دنایی، GC-MS

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir، شمارهٔ تماس: 04445265800

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

کشاورزی پایدار یک نظام تلفیقی مبتنی بر اصول بوم شناختی است. در این نظام به‌جای استفاده از نهاده‌های خارجی نظیر کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها از بقایای گیاهی، کودهای دامی، کودهای آلی و زیستی استفاده می‌شود تا ضمن ذخیره مواد غذایی در خاک، علف‌های هرز و آفات کنترل شده و همچنین تنوع زیستی در مزارع حفظ گردد (Saaeidnezhad *et al*., 2012). تمایل به تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای محصولات طبیعی به‌ویژه در شرایط کشت بوم‌شناختی در جهان رو به افزایش است. حاصلخیزی خاک، تغذیه و کشت بوم‌شناختی گیاهان دارویی، کیفیت آنها را تضمین کرده و احتمال آثار منفی روی کیفیت دارویی و عملکرد را نیز کاهش می‌دهد و به‌علاوه نقش مهمی در بهبود عملکرد کمّی و کیفی گیاهان دارویی دارد (Khoram Del *et al*., 2007; Griffe *et al*., 2003). ساخت مواد مؤثره در گیاهان دارویی تحت تأثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی است. مدیریت کود یک عامل اصلی در کشت موفقیت‌آمیز این گیاهان است (Griffe *et al*., 2003). خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد (به‌غیر از مناطق قطب شمال و جنوب) و دارای حدود ۲۰۰ جنس و بالغ بر چهار هزار گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌های کوتاه است (Zarezadeh *et al*., 2007). اغلب نعناعیان تولیدکننده ترپن‌ها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات را (به‌طور عمده) در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند (Bghalyan and Naghdibadi, 2000). درباره گونه‌های آویشن گزارش‌های متفاوتی وجود دارد، اما با در نظر گرفتن کمترین مقدار تنوع ریخت‌شناسی، ۲۱۵ گونه از این جنس توسط مورالس گزارش شده است (Morales, 2002). آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak. از گیاهان دارویی تیره نعناعیان است. این گیاه ساقه‌ای کوتاه دارد که در پایین کاملاً چوبی است. ارتفاع ساقه گل‌دهنده بیشینه ۳۰ سانتی‌متر است. طول برگ از ۵/۹ تا ۱۶ و عرض برگ از ۴ تا ۴/۲ میلی‌متر متغیر است. برگ ها ممکن است به‌شکل هم‌پوش یا کوتاه‌تر از میان گره‌ها باشند (Rechinger *et al*., 1982). این گیاه دارای ویژگی‌هایی مانند نیرودهنده، هضم‌کننده، ضداسپاسم، بادشکن، ضدقارچ، ضدباکتریایی، ضدعفونی‌کننده، ضدتشنج، ضدکرم، ضدرماتیسم، خلط‌آور و آنتی‌اکسیدان بوده و حاوی ترکیبات تانن، فلاونوئید، گلیکوزید، کافئیک و رزمارینیک اسید است (Ghasemi *et al*., 2013). عصاره گیاه آویشن دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی است که علاوه بر کاهش چربی خون می‌تواند در مهار اکسیداسیون LDL نقش داشته باشد (Seung-Joo and Katumi., 2005). به‌علاوه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در اسانس آویشن دنایی علت کاهش میزان تری‌گلیسرید خون است (Nazari *et al*., 2014). اصطلاح کودهای زیستی منحصراً به مواد آلی حاصل از کودهای دامی، بقایای گیاهی، کود سبز و غیره اطلاق نمی گردد، بلکه ریزموجودات باکتریایی، قارچی و مواد حاصل از

فعالیت آنها در رابطه با تثبیت نیتروژن، فراهمی فسفر و سایر عناصر غذایی از جمله مهمترین کودهای زیستی محسوب می‌شوند. کودهای زیستی در حقیقت ترکیبی شامل انواع مختلف ریزموجودات باکتریایی و قارچی به‌ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) و مواد حاصل از فعالیت آنها است (Vessey., 2003). گروهی از این گونه‌های باکتریایی که دارای قابلیت همیاری با گیاه هستند، متعلق به جنس ازتوباکتر می‌باشند (Tilak *et al*., 2005). ازت از جمله موادی است که در تمام دوره های رشد و نمو گیاهان مورد نیاز است. کودهای ازته تأثیر عمده‌ای در ساقه‌زایی، برگ‌زایی و جوانه‌زنی گیاهان دارند و به‌طورکلی رشد رویشی گیاهان را سرعت می‌بخشند (Omid-Beigi, 2010). کود زیستی ازتوبارور-۲ (حاوی باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن از جنس ازتوباکتر) از تثبیت‌کننده‌های اختیاری نیتروژن مولکولی است که در محیط ریشه گیاه توانایی ساخت و ترشح مقداری مواد زیستی فعال مانند اسید نیکوتینیک، اسید نپتوتنیک، بیوتین، ویتامین‌های گروه B، اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و غیره را دارد که در توسعه سیستم ریشه‌ای نقش مفید و مؤثری داشته و با بهبود جذب آب و عناصر غذایی و تثبیت زیستی نیتروژن، عملکرد گیاهان زراعی و همچنین ویژگی‌های خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Akbari *et al*., 2019). کودهای زیستی فسفاته بارور-۲، حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفاته (Phosphate Solubilizing Bacteria) از گونه های *باسیلوس لنتوس* (*Bacillus lentus*) و *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) هستند که به‌شکل ساپروفیت در ریزوسفر فعالیت نموده و با مصرف ترشحات ریشه، ترشح اسیدهای آلی (مالیک، سوکسینیک، پیروپیونیک، لاکتیک، سیتریک و کتوگلونیک اسید) و آنزیم فسفاتاز قادرند فسفر نامحلول خاک (به‌ویژه در مناطقی که کلسیم خاک بالا باشد) را به فرم محلول قابل‌جذب گیاه تبدیل کنند. همچنین، با افزایش دوام سطح برگ (Leaf Area Duration) سبب استفاده بهینه از انرژی خورشیدی و فتوسنتز و در نتیجه به عملکرد بالاتر گیاه منجر می شوند و همچنین، به‌علت توسعه سیستم ریشه‌ای و بهبود جذب آب در مقابله با شرایط تنش کم‌آبی نیز نقش مؤثری دارند (Alijani *et al*., 2011; Aser, 2008). بررسی صورت‌گرفته نشان داده است که اسانس‌ها ترکیبات ترپنوئیدی هستند و واحدهای سازنده آنها نیاز ضروری به عناصری نظیر نیتروژن و فسفر دارند، ازاین‌رو باکتری‌های افزاینده رشد گیاه با تأثیر بر جذب نیتروژن و فسفر باعث افزایش درصد عملکرد اسانس می‌شوند (Rezaeenezhad, 2001). در مطالعه Salehi (۲۰۰۰)، کاربرد کودهای زیستی ازتوباکتر، آزوسپریلیوم و باسیلوس باعث افزایش عملکرد دانه و میزان اسانس در گیاه دارویی رازیانه گردید. در بابونه آلمانی (*Matricaia chamomilla* L.) مشاهده شده است که مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص، بهترین نتیجه را از نظر تولید اسانس در بر دارد (Amir-Aghaei *et al*., 2007). در آزمایشی که کیفیت اسانس گیاه دارویی علف‌لیمو تحت تأثیر یک گونه باکتری حل‌کننده فسفات مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که درصد ژرانیول در اسانس به طرز چشمگیری نسبت

به شاهد افزایش یافته است (Ratti *et al*., 2001). نتایج به دست آمده از پژوهش دیگری نیز حاکی از آن بود که تیمار باکتری حل‌کننده فسفات اثر معنی‌داری بر صفات کمّی (تعداد شاخه اصلی، تعداد گل‌آذین در بوته، قطر گل، عملکرد گل تر، عملکرد گل خشک، عملکرد بذر) و کیفی (عملکرد اسانس و عملکرد کامازولن) در بابونه داشت (Falahi *et al*., 2010). در مطالعه Sepehri و Karami (۲۰۱۲)، بیشترین تعداد ساقه‌های فرعی، ارتفاع، عملکرد سرشاخه گل‌دار و عملکرد موسیلاژ و اسانس در گاوزبان در شرایط بدون تنش با مصرف کودهای شیمیایی و زیستی به نسبت ۱:۱ (مخلوط ازتوباکتر و بیوفسفر) گزارش شد. در حال حاضر، اکثر مطالعات انجام‌شده در رابطه با بررسی اثرات کودهای زیستی بر ویژگی‌های کمّی و کیفی گیاهان، عمدتاً در رابطه با غلات و دیگر گیاهان زراعی بوده است و پژوهش‌های مربوط به گیاهان دارویی بسیار اندک است. به‌علاوه باتوجه‌به اهمیت این گیاه، در پژوهش حاضر، اثر کودهای زیستی بر محتوا و ترکیبات اسانس گیاه دارویی آویشن دنایی در مرحله گل‌دهی کامل مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه حاضر، در ارتباط با تأثیر کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بر میزان و کیفیت اسانس آویشن دنایی در راستای مطالعات پیشین است.

مواد و روش‌ها

برای ارزیابی تأثیر باکتری‌های زیستی اعم از ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بر مقدار و ترکیبات اسانس آویشن دنایی *Thymus daenensis* Celak. بذر آن از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و بذرها برای تولید نشاء در سینی کشت حاوی ترکیبی از خاک، ماسه و پیت‌ماس کشت شدند. نشاءهای تولیدشده پس از تلقیح با ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ به گلدان انتقال داده شدند. در هر گلدان ۴ بوته آویشن دنایی قرار گرفت. این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در بهار سال ۱۳۹۷ در گلخانه پژوهشی واقع در شهر ارومیه انجام شد. ابتدا نمونه خاک مورد نظر در آزمایشگاه آب و خاک دانشگاه ارومیه تجزیه شد و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن از جمله اندازه‌گیری بافت خاک، بر پایه قانون استوکی و به روش هیدرومتری انجام شد (Gee and Bauder, 1986). اسیدیته خاک، در عصاره ۱:۵ خاک به آب، به کمک دستگاه pH متر مدل ۸۲۷ (Tomas, 1996) و رسانایی الکتریکی در عصاره ۱:۵ خاک به آب، به کمک دستگاه هدایت‌سنج در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، اندازه‌گیری شد (Rhoades *et al*., 1989). نیتروژن کل، به روش کجلدال، با استفاده از دستگاه کجلدال اتوماتیک (مدل B-324، شرکت BÜCHI، کشور سازنده سوئیس) و پتاسیم فراهم به روش استات آمونیوم اندازه‌گیری شد. فسفر به کمک عصاره‌گیری بی‌کربنات سدیم نیم‌مولار و اسیدیته ۸/۵، به روش Olson و Dreier (۱۹۵۶) جداسازی و به روش اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری کربن آلی خاک به روش اکسیداسیون تر انجام گرفت (Nelson and Sommers, 1996). اندازه‌گیری مقدار مس، روی و آهن موجود در خاک به روش Al-Lahham و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. مشخصات فیزیکو شیمیایی خاک استفاده شده در این آزمایش در جدول شماره (۱) آمده است. برداشت در زمان

گل‌دهی کامل گیاهان انجام شد و گیاهان برداشت‌شده پس از انتقال به آزمایشگاه به‌مدت تقریبی یک هفته در سایه خشک شدند.

استخراج اسانس

سرشاخه‌های گل‌دار در مرحله گل‌دهی کامل از هر یک از تیمارها در مجاورت هوای آزاد و در سایه خشک و سپس نمونه‌های به دست‌آمده پودر شدند و سپس ۱۰۰ گرم از هر نمونه گیاهی به‌روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر) به‌مدت سه ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس‌های حاصل پس از جداسازی از سطح آب توسط سدیم سولفات بدون‌آب، رطوبت‌زدایی گردید و آنگاه توزین و سپس بازده تولید اسانس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Jaimand and Rezaee, 2006):

۱۰۰× وزن خشک سرشاخه گل‌دار در مرحله گل‌دهی کامل/ وزن اسانس = درصد اسانس

اسانس‌ها پس از آب‌گیری تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی و گازکروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال در ظروف شیشه‌ای در بسته نگهداری شدند.

مشخصات دستگاه GC

در این پژوهش، از دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل Scion، شرکت Brucker، کشور آلمان) استفاده شد. گاز حامل هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹٪ با فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون به‌این‌ترتیب بود: دمای اولیه از ۶۰ درجه سانتیگراد شروع شد و به دمای نهایی ۲۱۰ درجه سانتیگراد رسید که در هر دقیقه ۳ درجه به آن افزوده شد و پس از دمای ۲۱۰- ۲۴۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰ درجه در دقیقه و توقف در این دما به‌مدت ۸/۵ دقیقه صورت گرفت. دمای قسمت تزریق و آشکارساز به‌ترتیب ۳۰۰ و ۲۸۰ درجه سانتیگراد بود.

مشخصات دستگاه GC-MS

گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) (مدل Thermo Finning، شرکت Thermo، کشور انگلستان) از نوع تله یونی مجهز به ستون DB- 5 به‌طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بوده است. برنامه‌ریزی حرارتی ستون مشابه با برنامه‌ریزی ستون در GC بوده است. دمای محفظه تزریق ۱۰ درجه بیشتر از دمای نهایی ستون تنظیم شد. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ۳۱/۵ سانتی‌متر بر ثانیه در طول ستون حرکت کرده است. زمان اسکن برابر یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۴۰ تا ۳۴۰ بوده است.

شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس

پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگرافی موجود در آزمایشگاه و یافتن مناسب‌ترین برنامه‌ریزی ستون، برای دستیابی به بهترین جداسازی، اسانس‌های به دست آمده با دی‌کلرومتان رقیق شد و به دستگاه کروماتوگرافی متصل‌شده به طیف‌سنج جرمی تزریق گردید. طیف‌های جرمی و کروماتوگرافی‌های مربوطه با استفاده از زمان بازداری، شاخص Kovats Index، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در نرم‌افزار Saturn بررسی شد و ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها مورد شناسایی کمّی و کیفی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. پس از محاسبه بازده اسانس و ترکیبات موجود در اسانس، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه و مقایسه میانگین‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در جدول (۱) نشان داده شده است. خاک مورد استفاده با میزان پتاسیم بالا، فسفر متوسط و ازت پایین ارزیابی شد.

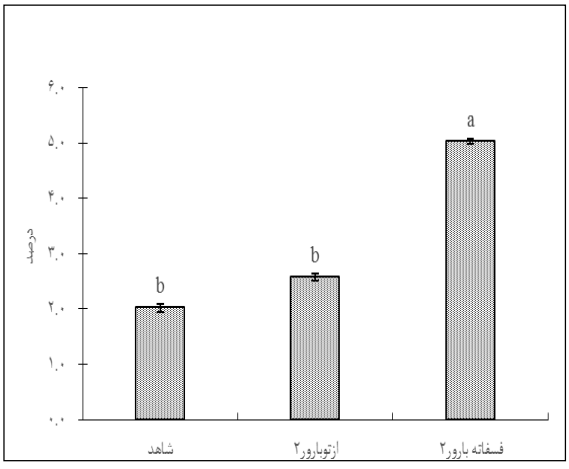
جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Physicochemical properties of soil used in this research

پتاسیم قابل‌جذب (ppm)	فسفر قابل‌جذب (ppm)	درصد مواد آلی	ازت کل (درصد)	هدایت الکتریکی ($ds.m^{-1}$)	اسیدیته	رس	سیلت	شن	بافت خاک
۳۹۰	۱۴	۱/۳	۰/۱۳	۰/۷۵	۷/۲	۴۰	۳۵	۱۵	رسی

با توجه به نتایج مقایسه میانگین مربوط به محتوای اسانس، نمونه شاهد در این مطالعه حاوی ۲٪ اسانس بود، درحالی‌که مقدار اسانس در تیمار کودی ازتوبارور-۲ به ۲/۵٪ بدون داشتن اختلاف معنی‌دار آماری افزایش یافت. محتوای اسانس مربوط به نمونه تیمارشده با کود زیستی فسفاته بارور-۲ با افزایشی ۲/۵ برابری نسبت به شاهد به ۰/۵٪ رسید که این مقدار با دو نمونه شاهد و تیمارشده با کود ازتوبارور-۲ اختلاف معنی‌دار آماری داشت (شکل ۱). به‌علاوه بر اساس نتایج شناسایی ترکیبات اسانس گیاه مورد مطالعه، در اسانس این گیاه ۲۹ ترکیب فرار شناسایی گردید که گستره ۹۷/۲۲- ۹۴/۹۸ درصد از کل اسانس را شامل شد (جدول ۲). در این رابطه ترکیبات اصلی و شاخص که درصد بالایی از اسانس را به خود اختصاص داده‌اند، ۵ ترکیب بودند. بیشترین درصد در بین کل ترکیبات، مربوط به ترکیب تیمول، (۶۵/۲۹، ۷۲/۶۵ و ۴۸/۹۹ درصد) به‌ترتیب در نمونه‌های شاهد، ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ مشاهده شد. همان‌طورکه مشاهده می شود، گیاهان تیمارشده با کود زیستی ازتوبارور-۲ دارای بیشترین مقدار از این ترکیب بودند که نسبت به نمونه شاهد و تیمار فسفاته بارور-۲ به‌ترتیب (۱۱/۳٪ و ۴۸/۳٪) افزایش نشان داد، که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با نمونه شاهد بود و با تیمار کودی فسفاته بارور-۲ نیز اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). دومین ترکیب شاخص در اسانس گیاه *T. daenensis* Celak. ترکیب کاریوفیلن است که به‌ترتیب در نمونه‌های شاهد و گیاهان تیمارشده با ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ مشاهده شد (۴/۲۷، ۴/۲۹ و ۱۱/۲۹ درصد). در این رابطه گیاهان دریافت‌کننده کود فسفاته بارور-۲ دارای بیشترین مقدار از این ترکیب بودند که اختلاف معنی‌دار آماری با دو تیمار دیگر داشتند. تیمار کودی فسفاته

بارور-۲ باعث افزایش تقریبا ۱۶۴٪ نسبت به دو نمونه دیگر گردید. ترکیب اکالیپتول سومین ترکیب اصلی در اسانس بود. مقدار این ترکیب به‌ترتیب ۴/۵۹، ۳/۱۶ و ۸/۵۱ درصد مربوط به نمونه های شاهد و گیاهان دریافت‌کننده ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بود. در تیمار فسفاته بارور-۲ این ترکیب که بیشترین مقدار را داشت و همانند ترکیب دوم (کاریوفیلن) با دو نمونه دیگر دارای اختلاف معنی‌دار بود. اما مقایسه درصد این ترکیب بین اسانس نمونه شاهد و تیمار ازتوبارور-۲ اختلاف معنی‌داری نداشت. تیمار کودی فسفاته بارور-۲ نسبت به شاهد ۸۵٪ و نسبت به تیمار ازتوبارور-۲، ۱۶۹٪ افزایش پیدا کرد. مقادیر ۲/۹، ۱/۹۵ و ۵/۱۱ درصد مربوط به ترکیب بیفورمن به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های شاهد و گیاهان تیمارشده با ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بود. باتوجه‌به در صد این ترکیب، تیمار فسفاته بارور-۲ دارای بیشترین مقدار و اختلاف معنی‌دار با شاهد و تیمار ازتوبارور-۲ بود، همچنین بین دو تیمار شاهد و ازتوبارور-۲ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ مشاهده شد. دراین‌بین، تیمار کودی فسفاته بارور-۲ به‌ترتیب ۷۶٪ و ۱۶۹٪ افزایش نسبت به شاهد و تیمار کودی ازتوبارور-۲ نشان داد. ترکیب بورنئول با مقدار ۳/۶۶، ۳/۸۳ و ۴/۶۴ درصد به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تیمارشده ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ بوده که تیمار کود زیستی فسفاته بارور-۲ همانند اکثر ترکیبات گفته شده در بالا دارای بیشترین مقدار نسبت به شاهد و تیمار ازتوبارور-۲ بود که با توجه به مقادیر این ترکیب تیمار کودی فسفاته بارور-۲ نسبت به دو تیمار دیگر حدوداً ۲۰٪ افزایش نشان داده بود. تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵٪ در دو تیمار کودی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ مشاهده گردید. (جدول ۲). باتوجه‌به نتایج جدول (۳)، بیشترین مقدار از ترکیبات شناسایی‌شده جزو ترکیبات مونوترپن بود که دراین‌میان، تیمار ازتوبارور-۲ با ۸۷/۷۷ درصد دارای بیشترین مقدار از این ترکیبات نسبت به دو نمونه دیگر بود. ترکیبات سسکوئی‌ترپن در اسانس گیاه مورد مطالعه در دسته دوم از نظر درصد قرار داشتند. دراین‌میان، تیمار کود زیستی فسفاته بارور-۲ با ۱۶/۱۹ درصد بیشترین مقدار از این دسته را بین تیمارها شامل می‌شود که حدوداً دو برابر نسبت به گیاهان شاهد و تیمارشده ازتوبارور-۲ بیشتر بود. به‌علاوه، در اسانس این گیاه یک ترکیب دی‌ترپن مشاهده شد که تیمار فسفاته بارور-۲ با ۵/۱۱ درصد دارای بیشترین مقدار از این ترکیب بود (جدول ۳).



شکل ۱- مقایسه محتوای اسانس تحت تیمارهای کودهای زیستی مختلف

Figure 1- The comparison of essential oil yield under different treatment of biofertilizers

جدول ۲- مقایسه میانگین‌ها، مقدار و ترکیبات اسانس در گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با ازتو بارور-۲ و فسفاته بارور-۲

Table 2- The comparison of means, amount and composition of essential oils in control plants and plants treated with azetobarvar-2 and phosphatebarvar-2

صفات مورد بررسی			درصد ترکیبات	
ردیف	نوع ترکیبات اسانس	RI	شاهد	ازتوبارور-۲	فسفاته بارور-۲
۱	α-Thujene	۹۳۱	۰/۰۴^{a}±۰/۱۷	۰/۱۷^{a}±۰/۲۶	۰/۰۵^{a}±۰/۲۶
۲	α-Pinene	۹۳۴	۰/۰۴^{a}±۰/۱۷	۰/۰۴^{a}±۰/۲۱	۰/۱۵^{a}±۰/۳۸
۳	α-Myrcene	۹۹۱	۰/۰۲^{a}±۰/۱۶	۰/۰۳^{a}±۰/۱۵	۰/۰۲^{a}±۰/۱۴
۴	α-Phellandrene	۱۰۳۲	۰/۰۴^{a}±۰/۱۷	۰/۱۲^{a}±۰/۲۴	۰/۰۷^{a}±۰/۱۹
۵	Eucalyptol	۱۰۳۳	۰/۷۹^{b}±۴/۵۹	۱/۵۴^{b}±۳/۱۶	۰/۷۱^{a}±۸/۵۱
۶	γ-Terpinene	۱۰۵۹	۰/۰۸^{c}±۰/۱۹	۰/۱۸^{b}±۰/۶۸	۰/۱۳^{a}±۰/۹۹
۷	*cis*-Sabinene	۱۰۶۹	۰/۰۴^{a}±۰/۲۰	۰/۱۷^{a}±۰/۳۰	۰/۰۵^{a}±۰/۱۷
۸	m-Cymene	۱۰۸۲	۰/۴۳^{a}±۱/۷۲	۰/۲۱^{a}±۰/۹۲	۲/۶۸^{a}±۳/۰۵
۹	Terpinolene	۱۰۸۸	۰/۰۴^{a}±۰/۳۱	۰/۲۱^{a}±۰/۷۱	۰/۲۸^{a}±۰/۷۱
۱۰	Linalool	۱۰۹۸	۰/۰۶^{b}±۰/۳۴	۰/۰۸^{a}±۰/۸۶	۰/۱۳^{a}±۰/۷۴
۱۱	*trans*-Thujene	۱۱۰۷	۰/۰۳^{b}±۰/۱۴	۰/۰۸^{a}±۰/۴	۰/۰۲^{a}±/۳۱
۱۲	Sabinene- hydrate	۱۱۱۶	۰/۱۲^{a}±۰/۸۸	۰/۲۷^{a}±۰/۵۹	۰/۲۱^{a}±۱/۱۱
۱۳	Isopinocarveol	۱۱۵۲	۰/۰۹^{a}±۰/۲	۰/۳۲^{a}±۰/۴۹	۰/۲۳^{a}±۰/۲۹
۱۴	Borneol	۱۱۶۵	۰/۴۳^{b}±۳/۴۶	۱/۳۱^{ab}±۳/۸۳	۱/۰۱^{a}±۴/۶۴
۱۵	α-Terpineol	۱۱۸۹	۰/۰۸^{a}±۰/۴۲	۰/۰۷^{a}±۰/۳۱	۰/۰۷^{a}±۰/۳۱
۱۶	Thymol methyl ether	۱۲۱۵	۰/۰۷^{a}±۰/۶۴	۰/۳۹^{a}±۰/۴۴	۰/۱۲^{a}±۰/۳
۱۷	Isothymol methyl ether	۱۲۴۴	۱/۳۲^{a}±۳/۷	۰/۳۲^{a}±۰/۷۳	۱/۷۶^{a}±۳/۴۴
۱۸	Thymoquinone	۱۲۴۹	۰/۰۹^{a}±۰/۳۶	۰/۲۷^{a}±۰/۵۴	۰/۲۰^{a}±۰/۷۵
۱۹	Bornyl acetate	۱۲۷۳	۰/۰۸^{a}±۰/۴۶	۰/۲۲^{a}±۰/۳	۰/۰۴^{a}±۰/۱۶
۲۰	Thymol	۱۲۹۰	۶/۵۸^{ab}±۶۵/۲۹	۹/۸۷^{a}±۷۲/۶۵	۳/۲۱^{b}±۴۸/۹۹
۲۱	Azulene	۱۲۹۹	۰/۰۹^{a}±۰/۳۷	۰/۰۸^{a}±۰/۲۵	۰/۰۴^{a}±۰/۳۹
۲۲	β-Elemene	۱۳۷۵	۰/۲۰^{a}±۰/۳۲	۰/۱۳^{a}±۰/۴۶	۰/۳۹^{a}±۰/۳۶
۲۳	(-)-α-Cedrene	۱۴۰۹	۰/۳۶^{a}±۰/۴۳	۰/۰۸^{a}±۰/۶۳	۰/۰۸^{a}±۰/۶۳
۲۴	α-Gurjunene	۱۴۰۹	۰/۲۰^{a}±۰/۸۱	۰/۳۱^{a}±۰/۴۹	۰/۱۵^{a}±۰/۷۳
۲۵	Caryophyllene	۱۴۱۸	۰/۸۶^{b}±۴/۲۷	۰/۲۷^{b}±۴/۲۹	۰/۸۱^{a}±۱۱/۲۹
۲۶	(-)-Aromadendrene	۱۴۳۹	۰/۰۳^{b}±۰/۱۴	۰/۱۱^{a}±۰/۳۶	۰/۰۷^{a}±۰/۴۹
۲۷	α-Caryophyllene	۱۴۴۴	۰/۱۷^{b}±۰/۷۰	۰/۱۸^{ab}±۰/۸۶	۰/۱۳^{a}±۱/۰۶
۲۸	Isoaromadendrene epoxide	۱۵۹۰	۱/۶۵^{a}±۱/۴۷	۰/۰۷^{a}±۰/۱۶	۰/۱۹^{a}±۰/۷۴
۲۹	Biformene	۱۹۷۹	۱/۲۰^{ab}±۲/۹۰	۰/۷۹^{b}±۱/۹۵	۲/۳۵^{a}±۵/۱۱
جمع کل (درصد)	–	–	۹۴/۹۸	۹۷/۲۲	۹۵/۹۷

RI: شـــاخص بازداری؛ در هر ســـتون، میانگین‌هایی که دارای حرف مشـــترک هســـتند، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد)

RI: Kovats Index; in each column, there is no significant difference between the means with same letter (Duncan's Multiple Range at the level of 5% probability)

جدول ۳- نوع، تعداد و درصد گروه‌های موجود در اسانس گیاه .*Thymus daenensis* Celak تحت تأثیر کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ و گیاهان شاهد.

Table 3- The type, number and percentage of groups in essential oil of *Thymus daenensis* Celak. under effect of Azetobarvar-2, Phosphatebarvar-2 biofertilizers and control plants.

نمونه / نوع ترکیب		مونوترپن	سسکوئی‌ترپن	دی‌ترپن	کل
شاهد	تعداد	۲۰	۸	۱	۲۹
	درصد	۸۳/۵۷	۸/۵۱	۲/۹	۹۴/۹۸
ازتوبارور-۲	تعداد	۲۰	۸	۱	۲۹
	درصد	۸۷/۷۷	۷/۵	۱/۹۵	۹۷/۲۲
فسفاته بارور-۲	تعداد	۲۰	۸	۱	۲۹
	درصد	۷۵/۴۴	۱۶/۱۹	۵/۱۱	۹۵/۹۷

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس با استفاده از رویه GLM ترکیبات موجود در اسانس آویشن دنایی تحت تیمار کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲

Table 4- The results of analysis of variance by GLM of compounds in *Thymus daenensis* Celak. essential oil treated with azotobaror-2 and barvar-2 phosphate fertilizers

صفات مورد بررسی	منبع تغییرات	df	میانگین مربعات
مقدار اسانس	تیمار	۲	۰/۱۸ ^{n}
	بلوک	۲	۱۷/۶۴*
	خطا	۴	۰/۳۳
α-Thujene	تیمار	۲	۰/۰۱ ^{n}
	بلوک	۲	۰/۰۱ ^{n}
	خطا	۴	۰/۰۴
α-Pinene	تیمار	۲	۰/۰۰ ^{n}
	بلوک	۲	۰/۰۷*
	خطا	۴	۰/۰۴
α–Myrcene	تیمار	۲	۰/۰۰ ^{n}
	بلوک	۲	۰/۰۰ ^{n}
	خطا	۴	۰/۰۰
α-Phellandrene	تیمار	۲	۰/۰۱*
	بلوک	۲	۰/۰۰ ^{n}
	خطا	۴	۰/۰۲
Eucalyptol	تیمار	۲	۱/۸۰ ^{n}
	بلوک	۲	۸۶/۳۱*
	خطا	۴	۵/۲۲
γ-Terpinene	تیمار	۲	۰/۰۷*
	بلوک	۲	۰/۹۶*
	خطا	۴	۰/۰۳

	تیمار	۲	۰/۰۴^{e}
cis-Sabinene	بلوک	۲	۰/۰۲^{e}
	خطا	۴	۰/۰۲
	تیمار	۲	۴/۷۸^{c}
m-Cymene	بلوک	۲	۷/۲۳^{a}
	خطا	۴	۱۰/۰۷
	تیمار	۲	۰/۲۴^{e}
Terpinolene	بلوک	۲	۰/۳۲^{e}
	خطا	۴	۰/۰۷
	تیمار	۲	۰/۰۴^{e}
Linalool	بلوک	۲	۰/۴۴^{e}
	خطا	۴	۰/۰۱
	تیمار	۲	۰/۰۰^{n}
trans-Thujene	بلوک	۲	۰/۱۰^{e}
	خطا	۴	۰/۰۱
	تیمار	۲	۰/۰۱^{n}
Sabinene-hydrate	بلوک	۲	۰/۴۱^{e}
	خطا	۴	۰/۲۵
	تیمار	۲	۰/۲۴^{e}
Isopinocarveol	بلوک	۲	۰/۱۳^{e}
	خطا	۴	۰/۰۹
	تیمار	۲	۴/۵۵^{c}
Borneol	بلوک	۲	۱۰/۰۷^{a}
	خطا	۴	۱/۳۲
	تیمار	۲	۰/۰۰^{n}
α-Terpineol	بلوک	۲	۰/۰۲^{e}
	خطا	۴	۰/۰۲
	تیمار	۲	۰/۱۲^{e}
Thymol methyl ether	بلوک	۲	۰/۱۸^{e}
	خطا	۴	۰/۲۲
	تیمار	۲	۴/۱۸^{c}
Isothymol methyl ether	بلوک	۲	۱۳/۲۳^{a}
	خطا	۴	۵/۷۵
	تیمار	۲	۰/۰۵^{n}
Thymoquinone	بلوک	۲	۰/۲۳^{e}
	خطا	۴	۰/۱۹
	تیمار	۲	۰/۰۲^{n}
Bornyl acetate	بلوک	۲	۰/۱۳^{e}
	خطا	۴	۰/۰۲

Thymol	تیمار	۲	۱۲۷/۶۶*
	بلوک	۲	۹۴۳/۸۶*
	خطا	۴	۱۷۴/۹۷
Azulene	تیمار	۲	۰/۰۰ n
	بلوک	۲	۰/۰۳*
	خطا	۴	۰/۰۲
β-Elemene	تیمار	۲	۰/۰۲ n
	بلوک	۲	۰/۳۴*
	خطا	۴	۰/۳۹
α-Cedrene	بلوک	۲	۰/۰۸*
	خطا	۴	۰/۱۴
α-Gurjunene	تیمار	۲	۰/۰۰ n
	تیمار	۲	۰/۰۸ n
	بلوک	۲	۰/۰۳ n
	خطا	۴	۰/۲۳
Caryophyllene	تیمار	۲	۰/۵۵ n
	بلوک	۲	۱۳۴/۲۹*
	خطا	۴	۲/۴۴
Aromadendrene	تیمار	۲	۰/۰۰ n
	بلوک	۲	۰/۲۱*
	خطا	۴	۰/۰۳
α-Caryophyllene	تیمار	۲	۰/۱۲*
	بلوک	۲	۰/۱۹*
	خطا	۴	۰/۰۳
Isoaromadendrene epoxide	تیمار	۲	۲/۱۵*
	بلوک	۲	۲/۵۷*
	خطا	۴	۳/۳۹
Biformene	تیمار	۲	۹/۲۵*
	بلوک	۲	۳۰/۰۸*
	خطا	۴	۵/۹۶

* و n: به ترتیب، معنی دار بودن و عدم تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد را نشان می دهد.

بحث

همان‌طورکه نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد، مقدار اسانس تحت تیمارهای کود زیستی افزایش درخور توجهی داشته است. افزایش در صد اسانس در تیمار کودی ازتوبارور-۲ به ۲/۵٪ نسبت به شاهد، مقدار بیشتری را نشان داد، هرچندکه با شاهد تفاوت معنی‌دار آماری نداشت. افزایش ۲/۵ برابری مقدار اسانس در تیمار کودی فسفاته بارور-۲ نسبت به شاهد مشاهده شد، به‌گونه‌ای‌که مقدار اسانس به ۵٪ رسید و تفاوت معنی‌داری از نظر آماری با نمونه شاهد داشت. نتایج مربوط به تأثیر کودهای زیستی بر مقدار اسانس مؤید این مطلب است که به‌علت

اینکه متابولیت‌های ثانویه از تولیدات جانبی فتو سنتز هستند و باتوجه‌به فراهمی مناسب و متناسب منبع کود زیستی فسفر، مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه بالا رفته است و توانسته در بیشترین مقدار نسبت به نمونه شاهد و تیمار ازتوبارور-۲ قرار گیرد. این افزایش مقدار اسانس در تیمار کودی فسفاته بارور-۲ به احتمال زیاد باتوجه‌به فراهم بودن کود زیستی فسفر که سبزینگی متناسبی را در گیاه به دنبال دارد، اتفاق افتاده است. این نتایج در راستای نتایج Praszna و Bernath (۱۹۹۳) روی نعناع همسو است. همزیستی ریشه گیاه آویشن کوهی با قارچ مایکوریزا آربوسکولار تأثیر مثبتی بر افزایش مقدار اسانس و ماده خشک گیاه داشته است (Ramak *et al*., 2016). به‌علاوه باتوجه به نقش کلیدی عنصر فسفر در مرحله زایشی گیاه، حضور مداوم این عنصر به احتمال زیاد باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در صفات کیفی (اسانس و ترکیبات مؤثره) گیاه دارویی مورد نظر می‌گردد (Alijani *et al*., 2011). همچنین، کاربرد کودهای زیستی نیتروکارا و فسفاته بارور-۲ در گیاه به‌لیمو (*Lippia cirriodora*) درصد اسانس را نسبت به شاهد افزایش داده است (Mohammadi *et al*., 2013). به‌علاوه مصرف کود زیستی فسفاته بارور-۲ در گیاه دارویی سرخارگل باعث افزایش مقدار اسانس شده است (Farzanian and Yarnia, 2014). مطالعه Moradi-Marjaneh و همکاران (۲۰۱۸) بر اثر کودهای زیستی ازتوبارور-۲ و فسفاته بارور-۲ روی درصد اسانس گیاه دارویی رزماری نشان داد که درصد اسانس در تیمار کودی ازتوبارور نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است و به‌علاوه نسبت به تیمار کودی فسفاته بارور-۲ بیشتر بوده ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. تلقیح ریشه گیاه نعناع‌فلفلی با قارچ *Piriformospora indica* عملکرد اسانس را افزایش داده و باعث کاهش آثار تنشی بر میزان عناصر غذایی مانند فسفر و پتاس شده است (Khalvandi *et al*., 2017). باتوجه‌به نتایج مطالعه حاضر می‌توان افزایش درصد اسانس را در تیمار کودی ازوبارور-۲ نسبت به شاهد مشاهده کرد، هرچند که این افزایش اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نداشته است، اما افزایش درخور ملاحظه‌ی درصد اسانس تحت تیمار کودی فسفاته بارور-۲، برخلاف نتایج مطالعه Moradi-Marjaneh و همکاران (۲۰۱۸) بود. در مطالعه‌ای، تحت تأثیر کود زیستی ازتوبارور-۱ مقدار اسانس زیره سبز نسبت به شاهد (۲/۴۳٪) افزایش معنی‌داری (۲/۸۶٪) نشان داد، البته کود فسفاته بارور-۲ نیز در همین مطالعه باعث ایجاد این افزایش بر درصد اسانس شد (Rezaei-Chiyaneh *et al*., 2015). تیمار ازتوبارور-۲ با تسهیل جذب نیتروژن توسط باکتری‌های تثبیت‌کننده موجود و نقش نیتروژن در مسیر ساخت اسانس سبب افزایش مقدار اسانس گیاه *Marrubium vulgare* L. نسبت به شاهد شده است (EL-Leithy *et al*., 2013). پژوهشگران گزارش کردند باکتری های تثبیت‌کننده نیتروژن مانند ازتوباکتر نه تنها توانایی تثبیت نیتروژن، بلکه انتشار هورمون‌های گیاهی مشابه اسید جیبرلیک و ایندول استیک اسید را دارند که می‌توانند موجب تحریک رشد گیاه، جذب مواد مغذی، فتوسنتز و سپس بهبود عملکرد و میزان اسانس گیاهان دارویی شوند (Mahfuz and Sharaf-Eldin., 2007).

باتوجه‌به اینکه اسانس‌ها ترکیبات ترپنوئیدی هستند، واحدهای سازنده آنها نیاز ضروری به عناصری نظیر نیتروژن و فسفر دارند. بنابراین، افزایش جذب این عناصر در گیاه باعث افزایش درصد و ترکیبات اسانس می‌گردد (Rezaeenezhad, 2001). در این مطالعه ترکیب تیمول، جزو ترکیبات اصلی اسانس این گیاه بود که در تیمار ازتوبارور-۲ مقدار بیشتری نسبت به شاهد داشت ولی در تیمار فسفاته بارور-۲ مقدار آن نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده بود. در مطالعه Falahi و همکاران (۲۰۱۰) مقدار ترکیب کامازولن در اسانس گیاه بابونه آلمانی تحت تیمار کود زیستی نیتروکسین نسبت به شاهد افزایش نشان داد و این تیمار بیشترین مقدار این ترکیب را بین تمام تیمارها دارا بود. به‌علاوه ترکیب پولگون در اسانس گیاه نعناع‌فلفلی تحت تیمار ازتوباکتر با مقدار (۵/۵۵٪) نسبت به شاهد (۴/۳۶٪) افزایش نشان داد و در تیمار با باکتری سودوموناس به ۴/۰٪ کاهش یافت. همچنین، ترکیب منتول در اسانس نمونه شاهد ۴۲/۳٪ بود که در تیمار با باکتری باسیلوس مقدار آن به ۳۰/۳٪ کاهش پیدا کرد (Mahmoudzadeh *et al*., 2016). از ترکیبات اصلی دیگر در اسانس گیاه آویشن دنایی می‌توان به اکالیپتول، بورنئول، کاریوفیلن و بیوفورمن اشاره کرد. تمامی این ترکیبات در اسانس تحت تیمار کود زیستی فسفاته بارور-۲ نسبت به شاهد و تیمار کودی ازتوبارور-۲ مقدار بالاتری را دارا بودند. در تیمار ازتوبارور-۲ بسته به نوع ترکیب تفاوت اندکی بین این تیمار با نمونه شاهد وجود داشت و غالباً این تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۲). در مطالعه Alijani و همکاران (۲۰۱۱) بر اثر متقابل کود شیمیایی فسفاته و کود زیستی فسفاته بارور-۲ بر مقدار ترکیب کامازولن در اسانس گیاه بابونه آلمانی نشان داده شد که بیشترین مقدار این ترکیب (۱۵/۸٪) در تلفیق ۴۰ کیلوگرم فسفر خالص از منبع P_2O_5 همراه با تلقیح با کود فسفاته بارور-۲ به دست آمده است. ترکیب منتون در اسانس گیاه نعناع‌فلفلی تحت تیمار باکتری سودوموناس که از باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفاته بارور-۲ است، از ۱۵/۴٪ به ۱۸/۶٪ به‌ترتیب از شاهد به نمونه تیمارشده افزایش یافت. به‌علاوه ترکیب ایزومنتون نیز در شاهد ۷/۷٪ بود که در تیمار با باکتری سودوموناس به ۱۱/۰٪ رسید (Mahmoudzadeh *et al*., 2016). ترکیبات مونوترپن در این مطالعه در تیمار کود زیستی ازتوبارور-۲ نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده ولی در تیمار کودی فسفاته بارور-۲ این مقدار کاهش یافت و کمترین مقدار را دارا بود. همانند این مطالعه، میزان ترکیبات مونوترپن در اسانس نعناع‌فلفلی تحت تیمار ازتوباکتر نسبت به شاهد افزایش نشان داد ولی برخلاف این مطالعه مقدار این ترکیبات تحت تیمار سودوموناس همانند ازتوباکتر افزایش داشت. درصد ترکیبات سسکوئی‌ترپن در این مطالعه تحت تیمار کود زیستی فسفاته بارور-۲ تقریباً دو برابر نمونه شاهد و تیمار ازتوبارور-۲ بود. اما برخلاف این مطالعه این نوع ترکیبات در اسانس نعناع‌فلفلی در تیمار ازتوباکتر بیشترین مقدار بود و در تیمار باکتری سودوموناس مقدار کمتری داشت (Mahmoudzadeh *et al*., 2016).

بر این اساس که ترکیبات ترپنوئیدی از واحدهای اصلی سازنده اسانس‌های گیاهی هستند و واحدهای سازنده آنها (ایزوپرونوئید ها) مانند

ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) و دی متیل آلیل پیروفسفات (DMAPP) هستند، در نتیجه نیاز مبرم به ATP و NADPH دارند. باتوجه‌به این موضوع که حضور عناصری مانند نیتروژن و فسفر برای تشکیل ترکیبات اخیر ضروری است، بنابراین، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده نیتروژن در کودهای زیستی باعث تسهیل جذب این عناصر شده و در نتیجه میزان اسانس و ترکیبات آن افزایش پیدا می‌کنند (Rezaei-Chiyaneh *et al*., 2015; Kapoor *et al*., 2002). کودهای زیستی مانند قارچ مایکوریزا و ازتوباکتر باعث کاهش اثرات اکسیداتیو با افزایش سطح آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز می‌گردند. در نتیجه به شیوه‌ای بهتر فرایند های فتوسنتزی حفظ می‌شود که باعث فعالیت بهتر گیاه شده و در نتیجه بر کمیّت و کیفیت اسانس مؤثر واقع می‌شود (Rahimi *et al*., 2020; Mohammadi *et al*., 2019). همچنین، این باکتری‌های ریزوسفری علاوه بر تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات‌ها باعث اکسیداسیون سولفور، تولید اکسین، جیبرلین، اتیلن، سایتوکینین و افزایش رشد و توسعه ریشه شده و باعث جذب آب، مواد غذایی و در نتیجه تغییر در ترکیبات شیمیایی می‌شوند (McKay and Blumberg., 2006; Prasad *et al*., 2011; Santoro *et al*., 2011).

References

Akbari, P., Ghalavand, A. and Modarres Sanavi, S. A. M. (2019) Effects of different nutrition systems (organic, chemical and integrated) and biofertilizer on yield and other growth traits of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Sustainable Agricultural Science 19(1): 85-96 (in Persian).

Alijani, M., Dehaghi, M. A., Malboobi, M. A., Zahedi, M. and Sanavi, S. M. (2011) The effect of different levels of phosphorus fertilizer together with phosphate bio-fertilizer (Barvar 2) on yield, essential oil amount and chamazulene percentage of *Matricaria recutita* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27(3): 450-459 (in Persian).

Al-Lahham, O., Assi, N. M. and Fayyad, M. (2007) Translocation of heavy metals to tomato (*Solanum lycopersicon* L.) fruit irrigated with treated wastewater. Scientia Horticulturae 113: 250-254.

Amir-Aghaei, M. A., Zehtab-Salmasi, S., Raee, Y. and Nasrollazadeh, S. (2007) Effect of planting date and nitrogen amount on flower production and yield of german chamomile essential oil. Proceedings of the 10th Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding. Seed and Plant Breeding Research Institute, Karaj.

Aser, G. K. (2008) Bio fertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.). Bioresource Technology 97(60): 98-109.

Bghalyan, K. and Naghdibadi, H. (2000) Volatile oil crops; their biology, biochemistry, and production. 1st edition, Andarz Publications, Tehran (in Persian).

EL-Leithy, A. S., EL-Hanafy, S. H., Omer, E. A. and Omer, A. A. A. (2013) Effect of nitrogen and potassium biofertilization on growth, yield and essential oil production of white

horehound, *Marrubium vulgare* L. plant. Journal of Horticulture Science and Ornamental Plants 5(1): 46-59.

Falahi, J., Koocheki, A. and Rezvani Moghaddam, P. (2010) Effects of biofertilizers on quantitative and qualitative yield of chamomile (*Matricaria recutita* L.) as a medicinal plant. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya, Turkey.

Farzanian, M. and Yarnia, M. (2014) Effects of microelement fertilizers and phosphate biofertilizer on some morphological, physiological traits, yield and essence of purple coneflower in water stress conditions. Journal of Crop Production 7(3): 145-161 (in Persian).

Gee, G. W. and Bauder, J. W. (1986) Particle size analisis. In: Methods of soil analysis (Ed. Klute, A.) 383-411. Soil Science Society of America, New York.

Ghasemi, P. A., Momeni, M. and Bahmani, M. (2013) Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 10(2): 368-385.

Griffe, P., Metha, S. and Shankar, D. (2003) Organic production of medicinal, aromatic and dye-yielding plants (MADPs), Forward, Preface and Introduction, FAO.

Jaimand, K. and Rezaee, M. B. (2006) Essential oil, distillation devices, test methods and retention indices in essential oil analysis. Community Medicinal Plant of Iran Press, Tehran. (in Persian).

Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K. G. (2002) Glomus macrocarpum: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). World Journal of Microbiology and Biotechnology 18(5): 459-463.

Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H., Baradaran, M. and Gholami, A. (2017) Effects of *Piriformospora indica* fungi symbiotic on the quantity of essential oil and some physiological parameters of peppermint in saline conditions. Iranian Journal of Plant Biology 9(32): 1-20. (in Persian)

Khoram-Del, S., Koochaki A., Nassiri Mahalati, M. and Ghorbani, R. (2007) Application effects of biofertilizers on the growth indices of black cumin (*Nigella sativa* L.). Iranian Journal of Field Crop Research 2(6): 285-294 (in Persian).

Mahfuz, S. A. and Sharaf-Eldin, M. A. (2007) Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). International Agrophysics 21: 361-366.

Mahmoudzadeh, M., Sadaghiani, M. R., Lajayer, H. A. and Sefidkon, F. (2016) Biochemical changes in terpenoids, essential oil content and yield in peppermint (*Mentha piperita* L.) under bacterial and fungal treatments under greenhouse conditions. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 7(26): 151-160 (in Persian).

McKay, D. L. and Blumberg, J. B. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytotherapy Research 20(8): 619-633.

Mohammadi, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Pirdashti, H., Zand, B. and Tahmasebi-Sarvestani, Z. (2019) Arbuscular mycorrhizae alleviate water deficit stress and improve antioxidant response, more than nitrogen fixing bacteria or chemical fertilizer in the evening primrose. Rhizosphere 9: 76-89.

Mohammadi, M., Tobeh, A., Vahidipour, H. R. and Fakhari, R. (2013) Effects of biological fertilizers on essential oil components and quantitative and qualitative yield of lemon verbena (*Lippia citriodora*). International Journal of Agriculture and Crop Science 5(12): 1374-1380.

Moradi-Marjaneh, E., Ramroudi, M. and Solouki, M. (2018) Investigating of some quantitative and physiological characteristics in rosemary as affected by biological and chemical fertilizers at different cuts. Journal of Crops Improvement 19(4): 1061-1076 (in Persian).

Morales, R. (2002) The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In: Thyme, The Genus Thymus (Eds, Stahl-Biskup, E. and Saez, F) 15-57 Taylor and Francis Group, London.

Nazari M, Monji R, Ghasmi Pirbloti A, Jafaryan Dehkordi M. and Reyahi Dehkordi, M. (2014) Effect of Diana and Bakhtiari Thyme essences on plasma lipoproteins in highly fattened rats. Herbal Medicines 3(4): 243-48 (in Persian).

Nelson, D. W. and Sommers, L. E. (1996) Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods. (Eds, Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H., Soltanpour, P. N., Tabatabai, M. A., Johnston, C. T. and Sumner, M. E.), Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, 5: 961-1010.

Olson, R. A. and Dreier, A. F. (1956) Fertilizer placement for small grains in relation to crop stand and nutrient efficiency in Nebraska. Soil Science Society of America Journal 20(1): 19-24.

Omid-Beigi, R. (2010) Production and processing of medicinal plants. Astane-Ghods Razavi Press, Tehran (in Persian).

Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A. and Pandey, A. (2011) Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Biology and Fertility of Soil 47(8): 853-861.

Praszna, L. and Bernath, J. (1993) Correlation between the limited level of nutrition and the essential oil production of peppermint. Acta Horticulture 307: 278-283.

Rahimi, A., Dovlati, B., Amirnia, R. and Heydarzade, S. (2020) Effect of application of mycorrhizal fungus and Azotobacter on physiological characteristics of *Trigonella foenum-graecum* L. under water stress conditions. Iranian Journal of Plant Biology 11(42): 1-18 (in Persian).

Ramak, P., Torkashvand, S. and Razavizadeh, R. (2016) Arbuscular mycorrhizal symbiosis of *Thymus kotchyamus* Boiss. & Hohen. in relation with soil elements during spring and autumn in Noujian Watershed (Lorestan province). Iranian Journal of Plant Biology 28: 31-46 (in Persian).

Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N. and Gautam, S. P. (2001) Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. motia by rhizobacteria, AMF and Azospirillum

inoculation. Microbiological Research 156: 145-149.

Rechinger, K. H., Browicz, K., Persson, K. and Wendelbo, P. (1982) Flora Iranica, Akademische Druck-U. Verlagsanstalt, Graz 150(2): 108-216.

Rezaeenezhad, Y. (2001) The effect of organic material on chemical chetacteristic of soil element absorbing by *Zea mays* and yield. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 4: 19-21.

Rezaei-Chiyaneh, E., Pirzad, A. and Farjam, A. (2015) Effect of nitrogen, phosphorus and sulfur supplier bacteria on seed yield and essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 24(4): 73-83 (in Persian).

Rhoades, J. D., Manteghi, N. A., Shouse, P. J. and Alves, W. J. (1989) Soil electrical conductivity and soil salinity: new formulations and calibrations. Soil Science Society of America Journal 53(2): 433-439.

Saaeid-Nezhad, A. H., Reazvai-Moghadam, P. and Nasiri-Mohalati, M. (2012) Effect of organics, biofertilizers and chemical fertilizers on protein digestibility and protein content of forage sorghum Spefied cultivar. Iranian Journal of Field Crops Research 9(4): 623-630.

Salehi, A. (2000) Effect of biofertilizer and organic fertilizer on yield (flower) amount and yield of German chamomile essential oil. Proceedings of the Eleventh Ecology Congress of Agriculture and Plant Breeding, Shahid Beheshti University 1406-1408.

Santoro, M. V., Zygadlo, J., Giordano, W. and Banchio, E. (2011) Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita* L.). Plant Physiology and Biochemistry 49: 1177-1182.

Sepehri, A. and Karami, S. (2012) Integrative applications of chemical fertilizers and biofertilizers on grain yield and oil of *Borago officinalis* L. under water deficit stress. Iranian Journal of Field Crop Reasearch 43(4): 691-699.

Seung-Joo, L. and Katumi, U. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry 91(1): 131-137.

Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S. and Johri, B. N. (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science 89: 136-150.

Tomas, C. R. (1996) Identifying marine diatoms and dinoflagel-lates. Academic Press, San Diego, CA.

Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.

Zarezadeh, A., Rezaei, M. B., Mirhosseini, A. and Shamszadeh, M. (2007) Ecological investigation of some aromatic plants from Lamiaceae family in Yazd province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 23(3): 432-442 (in Persian).