بررسی تغییرات بیوشیمیایی میزان ترپنوئیدها، مقدار و عملکرد اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) تحت تأثیر تیمارهای باکتریایی و قارچی در شرایط گلخانه‌ای

مهدی محمودزاده[۱]، میرحسن رسولی صدقیانی[۱]، حمایت عسگری لجایر[۲*] و فاطمه سفیدکن[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۱)

چکیده

در این تحقیق، اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر درصد، عملکرد و ترکیب شیمیایی اسانس اندام هوایی گیاه دارویی نعناع فلفلی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در سال ۱۳۸۹ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه بررسی شد. تلقیح با سه گونه باکتریایی از گروه باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (ازتوباکتر، باسیلوس و سودوموناس)، سه گونه قارچ میکوریزی (گلوموس موسه، گلوموس اینترارادیسز و گلوموس فسیکولاتوم) و تیمار بدون تلقیح باکتریایی و قارچی (شاهد) تیمارهای آزمایشی بودند. نتایج حاکی از این بود که بیشترین درصد حجمی اسانس (۲/۷۷ درصد) و عملکرد (۰/۲۵۹ میلی‌لیتر در گلدان) به ترتیب به تیمار گلوموس فسیکولاتوم و سودوموناس تعلق گرفت. آنالیز شیمیایی اسانس نشان داد که در تمامی تیمارها ترکیب‌های غالب اسانس منتول، منتون، ایزومنتون، ۸،۱- سینئول، پولگون و منتوفوران بودند. بیشترین مقدار منتول (۴۲/۲۷ درصد)، منتون (۱۹/۳۳ درصد)، ایزومنتون (۱۶/۷۷ درصد)، ۸،۱- سینئول (۱۰/۱۶ درصد)، پولگون (۷/۳۴ درصد) و منتوفوران (۶/۶۱ درصد) به ترتیب در تیمارهای شاهد، گلوموس موسه، باسیلوس، ازتوباکتر، گلوموس اینترارادیسز و سودوموناس به‌دست آمد. همچنین، مقایسه ترکیبات ترپنی نشان داد که مقدار مونوترپن‌های اکسیژنه با کاربرد تیمارهای گلوموس موسه، گلوموس فسیکولاتوم، باسیلوس و سودوموناس و مونوترپن‌های هیدروکربنه با کاربرد تیمارهای گلوموس فسیکولاتوم، گلوموس اینترارادیسز و ازتوباکتر افزایش یافت. مقدار کلی مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه در تمام تیمارها افزایش نشان داد. به‌طور کلی، نتایج بیانگر آن است که تیمارهای قارچی و باکتریایی مختلف، اثرهای متفاوتی بر ترکیبات شیمیایی اسانس نعناع فلفلی دارند. بنابراین، با توجه به نیاز صنایع مختلف به اسانس نعناع فلفلی با ترکیب شیمیایی مشخص، می‌توان پیشنهاد نمود که تلقیح این گیاه با تیمارهای باکتریایی و قارچی برای به‌دست آوردن ترکیب شیمیایی مورد نظر انجام شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، باکتری محرک رشد، قارچ میکوریز آربوسکولار، ترپنوئید، نعناع فلفلی

مقدمه

امروزه، مشخص شدن عوارض جانبی داروهای شیمیایی و روند تدریجی و همه جانبه به سمت استفاده از داروهای گیاهی، سبب ترغیب و توجه به کشت و تولید گیاهان دارویی در سطح کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه مانند ایران گردیده است (۲). در بین گیاهان دارویی، گونه‌های موجود در خانواده نعناع به سبب انعطاف اکولوژیک بسیار زیاد آنها به اقلیم‌های متنوع، مصارف تغذیه‌ای- دارویی و به‌واسطه وجود ترکیبات معطر قابل کاربرد در صنایع آرایشی و بهداشتی، از اهمیت زیادی برخوردارند (۱). یکی از گیاهان بسیار مهم دارویی، که به‌طور

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳. بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران
*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h-asgari@tabrizu.ac.ir

گسترده در صنایع دارویی، غذایی، بهداشتی و به شکل‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته، نعناع فلفلی است (۵). نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) و به عنوان سبزی، ادویه و گیاه دارویی کشت و استفاده می‌شود. از برگ‌های خشک شده این گیاه برای تهیه دمکرده و جوشانده‌های گیاهی، از اندام‌های رویشی تازه برای استفاده به عنوان سبزی و از اسانس آن به عنوان ماده افزودنی در تولید آدامس‌های نعنایی، صنایع بهداشتی مانند خمیر دندان و دهان‌شویه و در محصولات مختلف صنایع داروسازی و آروماتراپی استفاده می‌شود (۲۳). ایالت متحده آمریکا و هندوستان بزرگترین تولید کننده‌های اسانس نعناع هستند و میزان تولید اسانس نعناع فقط در کشور آمریکا ۳۱۰۰ تن در سال ۲۰۰۷ و ۲۵۰۰ تن در سال ۲۰۰۸ بوده است (۳۳).

اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که اگرچه تحت تأثیر فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما ساخت آنها به‌طور آشکاری تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (۱۸). از مهم‌ترین عوامل محیطی که تأثیر بسیار عمده‌ای بر رشد گیاهان دارویی و کمیت و کیفیت مواد مؤثره آنها می‌گذارد، می‌توان به شرایط رشدی، اقلیم و عناصر غذایی اشاره نمود (۳۱). رویکرد جهانی در تغذیه متعادل و تولید گیاهان دارویی، به سمت استفاده از نظام‌های کشاورزی پایدار و به‌کارگیری روش‌های مدیریتی آنان، نظیر کاربرد کودهای زیستی، به‌منظور ارتقا عملکرد کمی و کیفی این گیاهان می‌باشد (۳ و ۲۹). در بحث تولید گیاهان دارویی، ارزش واقعی به کیفیت محصول و پایداری تولید داده شده و کمیت محصول در درجه دوم اهمیت قرار می‌گیرد. برای این منظور، در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در باره تأثیر کودهای زیستی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاهان دارویی انجام گردیده است (۱۴ و ۲۰). کودهای زیستی شامل مواد نگهدارنده‌ای با جمعیت متراکم یک یا چند موجود مفید خاک‌زی و یا به‌صورت فرآورده متابولیک این موجودات می‌باشد (۳۲). از جمله ریزجانداران مورد استفاده در کودهای زیستی می‌توان به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و ریزجانداران حل کننده فسفات اشاره نمود که هر کدام برای منظور خاصی مثل تثبیت نیتروژن، رهاسازی یون‌های فسفات، پتاسیم و آهن از ترکیبات نامحلول آنها استفاده می‌شوند (۱۶). در رابطه با نقش کودهای زیستی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاهان دارویی، بهارتی و همکاران (۱۰) نشان دادند که تلقیح گیاه دارویی نعناع (*Mentha arvensis* L.) با چهار گونه قارچ میکوریزی (گلوموس موسه، گلوموس اینترارادیسز، گلوموس فسیکولاتوم و گلوموس اگراگاتوم) سبب افزایش بارز کمیت و کیفیت اسانس نعناع (درصد و عملکرد اسانس و درصد منتول) در شرایط غیر شور، در مقایسه با شاهد، شد، به نحوی که بیشترین افزایش به ترتیب در گلوموس موسه، گلوموس اینترارادیسز، گلوموس فسیکولاتوم و گلوموس اگراگاتوم مشاهده گردید. در پژوهش دیگری، مشخص شد که همزیستی گیاه دارویی گشنیز با دو گونه از قارچ میکوریزی به‌طور معنی‌داری موجب بهبود میزان اسانس و کیفیت آن می‌شود، به نحوی که مقدار اجزای مهمی مانند ژرانیول و لینالول در ترکیب اسانس به‌طور چشمگیری افزایش، ولی میزان آنتول و بتا- المن در مقایسه با شاهد کاهش داشت (۱۹). بانچیو و همکاران (۹) اثر باکتری‌های محرک رشد (سودوموناس فلورسنس، باسیلوس سابتیلیس، سینوریزوبیوم ملیلوتی و برادی ریزوبیوم) بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana* L.) را بررسی و گزارش کردند که فقط سودوموناس فلورسنس و برادی ریزوبیوم موجب افزایش معنی‌دار عملکرد اسانس و ترکیب غالب اسانس (ترانس سابینن هیدرات و تربینن-۴- اول) نسبت به شاهد و دیگر تیمارهای باکتریایی گردید. با توجه به تأثیر احتمالی قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی و همچنین با در نظر گرفتن اهمیت گسترش کشت گیاهان دارویی، به ویژه به روش ارگانیک، این تحقیق به اجرا در آمد.

جدول ۱. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلخانه‌ای

بافت خاک	pH	EC (dS/m)	$CaCO_3$ (٪)	ماده آلی (mg/kg)	فسفر (mg/kg)	پتاسیم (mg/kg)	روی (mg/kg)	آهن (mg/kg)	مس (mg/kg)
لوم شنی	۷/۲	۰/۴۵	۷/۲	۱۳	۹/۶۵	۱۶۵	۰/۸	۱/۸۰	۱/۱

مواد و روش‌ها

کشت گلخانه‌ای

آزمایش به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در سال ۹۰-۱۳۸۹ انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل سه گونه میکوریز [گلوموس موسه (Gm) *Glomus mosseae*، گلوموس فسیکولاتوم (Gf) *Glomus fasciculatum* و گلوموس اینترارادیسز (Gi) *Glomus intraradices*] و سه گونه باکتریایی [ازتوباکتر (A) Azotobacter، باسیلوس (B) Bacillus و سودوموناس (P) Pseudomonas] و شاهد (بدون تلقیح) (C) بودند. برای انجام این آزمایش، در ابتدا مخلوطی از خاک با بافت سنگین (محتوی رس زیاد) و ماسه به نسبت ۲ به ۱ تهیه شد. خصوصیات خاک مورد استفاده (غیر استریل) در کشت گلدانی در جدول ۱ نشان داده شده است (۴). سپس، ریزوم‌های نعناع فلفلی از گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه و برای اطمینان از یکسان بودن شرایط گیاه اولیه، همه ریزوم‌ها از یک گیاه مادری جدا شدند. برای کشت، ریزوم‌ها شست‌شو داده شده و در عمق ۳ تا ۴ سانتی‌متری سطح خاک و به تعداد دو عدد در هر گلدان (گلدان‌ها از جنس پلی‌اتیلن با قطر ۱۲ و ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر) قرار داده شد. برای تلقیح با مایکوریز، حدود ۵۰ گرم مایه تلقیح گونه‌های میکوریزی با تعداد اسپور یکسان به هر گلدان در اطراف ریزوم‌ها به هنگام کاشت اضافه شد و سپس حدود ۱۵ سانتی‌متر روی ریزوم‌ها خاک ریخته و پس از اتمام کار آبیاری شدند. سوسپانسیون باکتریایی نیز با غلظت نهایی 10^9 CFU ml^{-1} تهیه گردیده و ۴۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی برای هر گلدان و در اطراف ریشهٔ اصلی گیاه استفاده گردید. در تیمارهای شاهد نیز کشت گیاه در خاک استریل و بدون تلقیح میکروبی انجام گرفت. آبیاری تا پایان آزمایش به‌وسیله آب مقطر و با توزین روزانه گلدان‌ها انجام شد. مقدار مناسب آب برای هر گلدان تا رسیدن رطوبت به دامنه ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت زراعی محاسبه و اضافه گردید. همچنین، تمامی اقدامات زراعی از قبیل نیاز غذایی، نور و دما در شرایط بهینه تنظیم گردید. تا پایان آزمایش، گلدان‌ها هر هفته به‌طور تصادفی روی سینک گلخانه جابه‌جا شدند. آزمایش به مدت ۴ ماه ادامه یافت و پس از رسیدن به مرحله گل‌دهی کامل، صفات رویشی اندازه‌گیری شده و گیاهان از محل طوقه قطع گردیدند.

تهیه اسانس

پس از برداشت گیاهان و به منظور حفظ کمیت و کیفیت اسانس، گیاهان در سایه و دمای محیط خشک شدند و اسانس‌ها با استفاده از روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر در مدت ۲ ساعت استخراج شدند. پس از اتمام اسانس‌گیری، جمع‌آوری اسانس از ستون کلونجر به‌وسیله پیپت پاستور انجام شد. بازده اسانس (درصد) نیز پس از رطوبت‌زدایی آب آن توسط سولفات سدیم خشک نسبت به وزن خشک گیاه محاسبه گردید و تا زمان آنالیز اسانس‌ها در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. عملکرد اسانس در واحد گلدان بر اساس عملکرد زیست‌توده و درصد اسانس محاسبه گردید (۱۷).

جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس

نمونه‌های اسانس در بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور،

آنالیز گردید. به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس، از دستگاه کروماتوگراف گازی (GC) و کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. شناسایی طیف‌ها به کمک محاسبه شاخص بازداری آنها، با تزریق هیدروکربن‌های نرمال ($C_{۷}$-$C_{۲۵}$) در شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها، همچنین مقایسه آنها با منابع مختلف (۷)، استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS انجام شد.

مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده

کروماتوگراف گازی (GC)

دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شده مدل ShimadzuGC-۹A مجهز به آشکارساز FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) و داده‌پرداز Chromatopac C-R۳A، با ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌لیتر، ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون، با گاز حامل هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹ درصد و با فشار ورودی ۳ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع در ابتدای ستون استفاده گردید. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۶۰ درجه سلسیوس شروع شده، به تدریج با سرعت ۳ درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش یافته، تا به ۲۱۰ درجه سلسیوس رسید. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود.

کروماتوگراف گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)

دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی مدل Varian 3400 ساخت کشور آمریکا، دارای ستون یکسان با دستگاه کروماتوگرافی گازی و انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۶۰ درجه سلسیوس شروع شده، به تدریج با سرعت ۳ درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش یافته، تا به ۲۵۰ درجه سلسیوس رسید. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای آماری SAS و Mstat-c استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

درصد و عملکرد اسانس

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) بیانگر آن بود که اثر تیمارهای باکتریایی و قارچی بر درصد و عملکرد اسانس اندام هوایی در سطح احتمال ۱٪ ($P \leq ۰/۰۱$) معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌های تیمارها (جدول ۳) نشان داد که بین تیمار شاهد با تیمارهای تلقیح باکتریایی و قارچی (به غیر از تأثیر تیمار گلوموس موسه بر عملکرد اسانس) از نظر تأثیر بر درصد و عملکرد اسانس اختلاف معنی‌داری وجود داشت، هر چند این اختلاف، به استثنای تأثیر گلوموس موسه بر عملکرد اسانس، بین تیمارهای باکتریایی با قارچی مشاهده نشد. بیشترین درصد (۲/۷۷ درصد) و عملکرد اسانس (۰/۲۵۹ میلی لیتر بر گلدان) به ترتیب در تیمارهای گلوموس فسیکولاتوم و سودوموناس و کمترین آنها به ترتیب به میزان ۲/۱۱ درصد و ۰/۱۷۳ میلی‌لیتر بر گلدان در تیمار شاهد مشاهده شد. در تفسیر نتایج حاصل از بهبود درصد و عملکرد اسانس در اثر تلقیح تیمارهای باکتریایی و قارچی می‌توان اظهار داشت که تولید اسانس حاصل مجموعه فرآیندهای فیزیولوژیک و مورفولوژیک می‌باشد. در این رابطه، عوامل محیطی تأثیر به‌سزایی در تولید اسانس دارند. از جمله عوامل محیطی می‌توان به عناصر غذایی اشاره نمود، به‌طوری که تیمارهای قارچ میکوریز از طریق گسترش هیف و توسعه سیستم ریشه، سطح جذب آب بیشتری برای گیاه فراهم و به‌دنبال جذب آب بیشتر، مواد غذایی بیشتری نیز

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس تأثیر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر درصد اسانس و عملکرد اسانس نعناع فلفلی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد اسانس	عملکرد اسانس
تیمار	۶	۰/۱۵۶۲**	۰/۰۰۳۰**
اشتباه آزمایشی	۱۴	۰/۰۳۳۸	۰/۰۰۰۵
ضریب تغییرات		۷/۱۱	۱۰/۶۹

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۳. نتایج مقایسه میانگین‌های تأثیر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر درصد و عملکرد اسانس نعناع فلفلی

صفت / تیمار	C	Gm	Gi	Gf	A	P	B
درصد حجمی اسانس	۲/۱۱ b	۲/۷۳ a	۲/۵۸ a	۲/۷۷ a	۲/۵۳ a	۲/۷۵ a	۲/۶۰ a
عملکرد اسانس (میلی لیتر در گلدان)	۰/۱۷۳ c	۰/۱۸۶ bc	۰/۲۲۱ab	۰/۲۳۴ a	۰/۲۵۰ a	۰/۲۵۹ a	۰/۲۳۳ a

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن ندارند.

جذب شده (۸) و تیمارهای باکتری‌های محرک رشد نیز از طریق سازوکارهای مختلفی از جمله تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، تولید سیدروفور، افزایش جذب فسفر توسط گیاه، تثبیت نیتروژن و افزایش جذب عناصر کم‌مصرف (۶ و ۹) باعث افزایش فعالیت فتوسنتزی و توسعه پوشش گیاهی می‌شوند. افزایش فعالیت فتوسنتزی با افزایش جذب عناصر غذایی را می‌توان مرتبط با مهم‌ترین بخش فتوسنتز کننده در گیاه، یعنی برگ‌ها، دانست، به‌طوری که با افزایش فراهمی عناصر غذایی، سطح برگ افزایش و با افزایش سطح برگ، تعداد روزنه به عنوان محل ورودی اکسید کربن و گلوکز به‌عنوان پیش‌ماده مناسب در سنتز اسانس‌ها، به‌عنوان نتیجه فرآیند فتوسنتز، زیاد شده و در نتیجه سوبسترای لازم برای سنتز اسانس در گیاه فراهم می‌گردد (۱۳، ۲۲ و ۳۰). همچنین، عملکرد اسانس تابعی از درصد اسانس و عملکرد وزن خشک اندام هوایی می‌باشد. بنابراین، با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی، درصد اسانس و وزن خشک اندام هوایی (داده‌ها گزارش نشده) افزایش و متعاقباً عملکرد اسانس نیز افزایش خواهد داشت. نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش درصد و عملکرد با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی با نتایج درزی و همکاران (۳)، گوپتا و همکاران (۱۵)، بانچیو و همکاران (۹) و کاپور و همکاران (۲۰) مطابقت دارد.

تغییرات میزان ترکیبات اسانس

در کشت و کار گیاهان دارویی و معطر، علاوه بر کمیت (درصد و عملکرد اسانس) کیفیت (نوع و مقدار ترکیبات تشکیل دهنده) اسانس نیز اهمیت دارد. با آنالیز اسانس شاخساره گیاه دارویی نعناع فلفلی در تیمارهای مختلف، بین ۱۹ تا ۲۳ ترکیب شناسایی شدند که در جدول ۴ آورده شده‌اند. در تمامی تیمارهای باکتریایی و قارچی، ترکیبات منتول (۴۲/۲۷-۲۹/۳درصد)، منتون (۱۹/۳۳- ۱۵/۴۱ درصد)، ایزومنتون (۱۶/۷۷-۷/۷۰ درصد)، ۸,۱- سینئول (۱۰/۱۶-۳۵/ درصد ۸)، پولگون (۷/۳۴-۴/۰۷ درصد) و منتوفوران (۶/۶۱- ۳/۸۴ درصد) ترکیبات غالب اسانس بودند. ولی ترتیب ترکیب غالب در برخی تیمارهای اعمال شده متفاوت از تیمار شاهد بود. در مجموع، این ترکیبات غالب در

جدول ۴. ترکیبات شناسایی شده در اسانس حاصل از تیمارهای مختلف باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در نعناع فلفلی

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	T۱	T۲	T۳	T۴	T۵	T۶	T۷
۱	α- thujene	۹۳۰	-	-	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۳	-	۰/۱۴
۲	α- pinene	۹۳۷	۰/۸۱	۰/۶۳	۰/۹۷	۰/۸۶	۱/۱۶	۰/۶۳	۰/۷۸
۳	Sabinene	۹۷۵	۰/۷۲	۰/۶۲	۰/۸۱	۰/۸۰	۰/۹۲	۰/۵۷	۰/۷۰
۴	β- pinene	۹۷۹	۱/۵۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۷۰	۲/۱۸	۱/۳۷	۱/۶۰
۵	Myrcene	۹۹۱	۰/۵۰	۰/۳۹	۰/۶۲	۰/۵۱	۰/۶۲	۰/۴۳	۰/۴۳
۶	α- phellandrene	۱۰۰۳	-	۰/۱۷	۰/۵۰	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۱۲	۰/۲۶
۷	Limonene	۱۰۲۷	۱/۹۹	۱/۱۴	۱/۵۵	۱/۹۲	۱/۷۴	۱/۲۷	۱/۳۰
۸	1,8- cineole	۱۰۳۰	۸/۳۵	۸/۸۳	۹/۹۹	۹/۱۹	۱۰/۱۶	۸/۴۶	۸/۹۰
۹	γ- terpinene	۱۰۶۰	-	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۲۱	۰/۲۴
۱۰	P-mentha –3 , 8-diene	۱۰۷۳	۱/۶۴	۱/۸۰	۲/۰۴	۲/۲۶	۲/۲۵	۱/۷۴	۱/۹۸
۱۱	Trans sabinene hydrate	۱۰۹۵	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۳۸	۰/۳۱	۰/۴۱
۱۲	Menthone	۱۱۵۲	۱۵/۴۱	۱۹/۳۳	۱۷/۶۲	۱۶/۱۳	۱۷/۳۱	۱۷/۸۳	۱۸/۶۲
۱۳	Isomenthone	۱۱۶۳	۷/۷۰	۱۶/۳۷	۱۶/۲۳	۱۶/۴۳	۱۵/۱۰	۱۶/۷۷	۱۰/۹۵
۱۴	Menthofuran	۱۱۶۴	۵/۴۸	۵/۵۴	۵/۸۷	۳/۸۴	۴/۹۲	۵/۵۶	۶/۶۱
۱۵	Neo menthol	۱۱۶۶	۲/۳۵	۱/۵۱	۱/۵۵	۱/۶۳	۱/۷۶	۱/۴۸	۱/۹۱
۱۶	Menthol	۱۱۷۱	۴۲/۲۷	۳۰/۱۸	۲۹/۳۰	۲۹/۷۵	۳۰/۲۹	۳۰/۲۹	۳۶/۰۶
۱۷	Isomenthol	۱۱۸۲	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۳	۰/۲۲	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۲۹
۱۸	Pulegone	۱۲۳۶	۴/۳۶	۶/۷۲	۶/۶۰	۷/۳۴	۵/۵۵	۷/۰۰	۴/۰۷
۱۹	Piperitone	۱۲۵۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۹	۰/۲۹	۰/۲۶	۰/۲۳	۰/۱۷
۲۰	Menthyl acetate	۱۲۹۵	۰/۶۲	۰/۷۹	۰/۵۴	۱/۶۲	۰/۹۵	۱/۲۳	۱/۰۰
۲۱	E- caryophyllene	۱۴۱۸	۰/۸۱	۱/۱۶	۱/۱۹	۱/۵۴	۱/۳۹	۱/۶۰	۰/۹۷
۲۲	α- humulene	۱۴۵۵	-	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۲۱	۰/۲۷	۰/۱۵
۲۳	γ- muurolene	۱۴۸۰	۰/۵۰	۰/۶۷	۰/۶۹	۱/۰۳	۰/۸۱	۱/۰۹	۰/۴۸

به علت محدودیت در استفاده از دستگاه، آنالیزها با یک تکرار انجام شده‌اند. مشخصات تیمارها به صورت T1 (شاهد و بدون تلقیح)، T2 (گلوموس موسه)، T3 (گلوموس فسیکولاتوم)، T4 (گلوموس اینترادایسز)، T5 (ازتوباکتر)، T6 (باسیلوس) و T7 (سودوموناس).

تیمارهای مختلف، ۸۳ تا ۸۸ درصد از کل ترکیبات اسانس را به خود اختصاص دادند. در تمامی تیمارها، غالب‌ترین ترکیب شیمیایی اسانس، منتول بود که با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی کاهش چشمگیری نسبت به شاهد داشت. بیشترین میزان منتول (۴۲/۲۷ درصد) در تیمار شاهد و کمترین میزان آن (۲۹/۳ درصد) در تیمار گلوموس فسیکولاتوم به‌دست آمد. منتون، ایزومنتون و ۸،۱- سینئول ترکیبات غالب بعدی گیاه نعناع فلفلی بودند که برعکس منتول، این هر سه ترکیب با کاربرد تمامی تیمارهای باکتریایی و قارچی نسبت به شاهد افزایش داشتند. بیشترین میزان منتون، ایزومنتون و ۸،۱- سینئول به‌ترتیب در تیمارهای گلوموس موسه، باسیلوس و ازتوباکتر به دست آمد، به‌طوری‌که تیمارهای مذکور باعث افزایش ۲۵/۴۳، ۱۱۷/۷۹ و

۲۱/۶۷ درصدی به ترتیب در ترکیبات منتون، ایزومنتون و ۸,۱- سینئول گردیدند. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، میزان ترکیبات پولگون به استثنای تیمار سودوموناس و منتوفوران به استثنای تیمار گلوموس اینترارادیسز و ازتوباکتر نسبت به شاهد افزایش داشت. بیشترین میزان پولگون و منتوفوران به‌ترتیب در تیمار گلوموس اینترارادیسز و سودوموناس و کمترین میزان آنها به ترتیب در تیمار سودوموناس و گلوموس اینترارادیسز حاصل شد. ترکیبات لیمونن، نئومنتول، ای- کاریوفیلن و پی- منتا-۳, ۸- دینن از دیگر ترکیبات بیشتر از یک درصد در اسانس نعناع فلفلی بودند که با کاربرد تمامی تیمارهای باکتریایی و قارچی نسبت به شاهد، میزان لیمونن و نئومنتول کاهش و ای- کاریوفیلن و پی- منتا-۳, ۸- دینن افزایش داشت. همچنین، ترکیبات آلفا- توجن، آلفا- فلاندرن، آلفا- هومولن و گاما- ترپینن در تیمار شاهد وجود نداشتند و با اعمال تیمارهای باکتریایی و قارچی در اسانس مشاهده گردیدند. به‌طور کلی، در رابطه با ترکیبات غالب اسانس این گیاه می‌توان بیان نمود که گونه‌های جنس نعناع از لحاظ ترکیبات اسانس به سه نوع کموتایپ یعنی غنی از منتول، غنی از کارون و غنی از پولگون یا پیپریتون تقسیم‌بندی می‌شوند. بارزترین گونه در بین جنس نعناع دارای اسانس غنی از منتول، گونه نعناع فلفلی است (۲۱). مک‌کی و بلومبرگ (۲۴) گزارش دادند که معمولاً اسانس نعناع فلفلی (بر حسب درصد) محتوی منتول (۶۰-۳۳)، منتون (۳۲-۱۵)، ایزومنتون (۸-۲)، ۸,۱- سینئول (۱۳-۵)، متیل استات (۱۱-۲)، منتوفوران (۱۱-۱)، لیمونن (۷-۱)، بتا- سیمن (۱/۷-۰/۱)، بتا کاریوفیلن (۴-۲)، پولگون (۱/۶-۰/۵) و کارون (۱) می‌باشد. بنابراین، با توضیحات ذکر شده، مقدار ترکیبات غالب اسانس به‌دست آمده در محدوده مقادیر گزارش شده به وسیله مک‌کی و بلومبرگ (۲۴) قرار دارند. همچنین، در تفسیر نتایج تغییرات این ترکیبات تحت تأثیر تیمارهای باکتریایی و قارچی نیز می‌توان بیان داشت که در مجموع، تغییر شرایط محیطی مانند عناصر غذایی، دما، رطوبت و روش استخراج می‌تواند تغییراتی در نوع و مقدار ترکیبات اسانس به‌وجود آورد (۱۲ و ۲۱). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش تثبیت نیتروژن، تولید اکسین، جیبرلین، سیتوکینین و اتیلن، انحلال فسفات‌ها، اکسیداسیون سولفور، افزایش قابلیت دسترسی نیترات، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش رشد و توسعه ریشه و در نتیجه جذب آب و مواد غذایی باعث تغییر شرایط محیطی و در نتیجه تغییر در ترکیبات شیمیایی اسانس می‌گردند (۲۴، ۲۶ و ۲۸). مطالعات زیادی پیرامون تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد بر ترکیبات اسانس گیاهان دارویی انجام گردیده است. ولی در رابطه با گیاه دارویی نعناع فلفلی گزارش‌های آنچنانی وجود ندارد. بهارتی و همکاران (۱۰) با بررسی تأثیر چهار گونه قارچ میکوریزی (گلوموس موسه، گلوموس اینترارادیسز، گلوموس فسیکولاتوم و گلوموس اگراگاتوم) بر گیاه نعناع (*Mentha arvensis* L.) گزارش کردند که گلوموس موسه و گلوموس اینترارادیسز باعث افزایش درصد منتول و گلوموس فسیکولاتوم باعث افزایش منتون نسبت به شاهد شدند. همچنین، تأثیر هیچ‌کدام از قارچ‌ها بر ترکیبات نئومنتول و ایزومنتون معنی‌دار نگردید. سانتورو و همکاران (۲۸) تأثیر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه را بر زیست‌ساختی ترکیبات عمده اسانس گیاه نعناع فلفلی بررسی و گزارش کردند که تیمار سودوموناس فلورسنس باعث افزایش زیست‌ساختی ترکیب غالب اسانس (پولگون و منتون) گردید. در حالی که آزوسپریلیوم برازیلنس باعث کاهش منتول (یکی از ترکیبات غالب اسانس) شد. کاپلاری و همکاران (۱۱) تأثیر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (آزوسپریلیوم برازیلنس، سودوموناس فلورنس و آزوسپریلیوم برازیلنس+ سودوموناس فلورنس) را بر ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه جعفری معطر (*Tagetes minuta*) بررسی و گزارش کردند که لینالول و هومولن تحت تأثیر هیچ‌کدام از تیمارها قرار نگرفتند. آزوسپریلیوم برازیلنس باعث افزایش ای- اوسیمنون (غالب‌ترین ترکیب اسانس) و ای- تاقتون به‌ترتیب به میزان ۷۱ و ۶۶ درصد گردید. سودوموناس فلورسنس هم باعث افزایش ترکیبات ای- اوسیمنن، زد- اوسیمنن، ای- تاقتون و

جدول ۵. درصد مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها در اسانس نعناع فلفلی تحت تأثیر تیمارهای مختلف باکتری‌های محرک رشد گیاه و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

تقسیم بندی ترکیبات اسانس	تیمارها*						
	T۱	T۲	T۳	T۴	T۵	T۶	T۷
Hydrocarbonate Monoterpenes	۷/۱۶	۶/۳۱	۸/۴۳	۸/۶۷	۹/۵۶	۶/۳۴	۷/۲۹
Oxygenate Monoterpenes	۸۷/۵۵	۹۰/۲۷	۸۸/۵۸	۸۶/۸۸	۸۷/۰۳	۸۹/۴۸	۸۸/۹۹
Total Monoterpenes	۹۴/۷۱	۹۶/۵۸	۹۷/۰۱	۹۵/۵۵	۹۶/۵۹	۹۵/۸۲	۹۶/۲۸
Hydrocarbonate Sesquiterpenes	۱/۳۱	۱/۹۲	۲/۱	۲/۸۲	۲/۴۱	۲/۹۶	۱/۶
Oxygenate Sesquiterpenes	–	–	–	–	–	–	–
Total Sesquiterpenes	۱/۳۱	۱/۹۲	۲/۱	۲/۸۲	۲/۴۱	۲/۹۶	۱/۶
Total Identified	۹۶/۰۲	۹۸/۵	۹۹/۱۱	۹۸/۳۷	۹۹	۹۸/۷۸	۹۷/۸۸

*T_1 (شاهد و بدون تلقیح)، T_2 (گلوموس موسه)، T_3 (گلوموس فسیکولاتوم)، T_4 (گلوموس اینترادایسز)، T_5 (ازتوباکتر)، T_6 (باسیلوس) و **T7** (سودوموناس)

لیمونن شد و تیمار ترکیبی آنها نیز باعث بیشترین افزایش در ترکیبات مذکور گردید. به عنوان جمع‌بندی، با توجه به اینکه منتول، از ترکیبات اسانس نعناع فلفلی، بیشتر جنبه اقتصادی و تجارتی و استفاده در صنایع مختلف دارد و اگر هدف از کشت نعناع فلفلی استخراج منتول از اسانس آن باشد با توجه به نتایج به‌دست آمده و کاهش درصد منتول، کاربرد هیچ‌کدام از تیمارهای باکتریایی و قارچی قابل توصیه نیست. ولی در صورت نیاز به دیگر ترکیبات غالب اسانس، می‌توان با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی مشخص، باعث بهبود میزان این ترکیبات شد.

تغییرات میزان ترپن‌های موجود در اسانس

مقایسه میزان ترکیبات ترپنی موجود در اسانس نعناع فلفلی در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچی در جدول ۵ ارائه شده است. میزان مونوترپن‌های هیدروکربنه، به استثنای تیمار گلوموس موسه و باسیلوس، و مونوترپن‌های اکسیژنه، به استثنای تیمار گلوموس اینترارادیسز و ازتوباکتر، نسبت به شاهد افزایش داشت. این در حالی است که مقدار کل مونوترپن‌ها با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی نسبت به شاهد افزایش داشته است. مقدار سزکوئی‌ترپن‌ها نیز در پاسخ به تیمارهای باکتریایی و قارچی تغییراتی داشتند. به‌طوری که سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه در تمامی تیمارهای باکتریایی و قارچی افزایش نشان داده است و سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژنه در اسانس تشخیص داده نشدند. در رابطه با تغییرات مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها می‌توان بیان داشت که تحریک تولید این ترپنوئیدها با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی، ممکن است در نتیجه تحریک مقاومت سیستماتیک گیاه به عوامل خارجی باشد. تحریک مقاومت سیستماتیک باعث افزایش مقاومت دیواره سلول‌های گیاهی، تغییر فیزیولوژی گیاهان و پاسخ‌های متابولیک و افزایش سنتز مواد شیمیایی دفاعی در شرایط تنش غیر زنده می‌شود (۲۷). ترپن‌ها نقش مهمی در سیستم‌های دفاعی گیاه دارند. همچنین، زیست‌ساخت ترپنوئیدها وابسته به متابولیسم اولیه گیاه مانند فتوسنتز و فراهمی انرژی است (۲۸). بنابراین، تغییرات زیست‌ساخت ترکیبات ترپنوئیدی، از جمله مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها، ممکن است به‌دلیل تغییرات بیوانرژتیک سلول‌های گیاهی در پاسخ به تیمارهای باکتریایی و قارچی باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، از نتایج این آزمایش استنتاج می‌شود که در گیاه

نعناع فلفلی، با کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی، بر تولید اسانس (درصد و عملکرد اسانس) افزوده می‌شود. بنابراین، با کاربرد کودهای زیستی محتوی میکروارگانیسم‌های باکتریایی و قارچی می‌توان از مصرف کودهای شیمیایی برای دسترسی به مقدار اسانس بیشتر در نعناع فلفلی اجتناب نمود و در راستای کشاورزی پایدار گام برداشت. همچنین، کاربرد تیمارهای باکتریایی و قارچی باعث افزایش اکثر ترکیبات غالب اسانس، بجز منتول، گردید. بنابراین، به منظور تولید اسانس نعناع فلفلی با درصد ترکیبات غالب منتون، ایزومنتون و ۸,۱- سینئول می‌توان از تلقیح این گیاه با تیمارهای باکتریایی و قارچی استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

۱. امیدبیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد ۱، چاپ پنجم، انتشارات آستان قدس رضوی، ۳۴۷ صفحه.

۲. جعفری، ف.، ا. گلچین و س. شفیعی. ۱۳۹۳. تأثیر کاربرد نیتروژن و محلول‌پاشی آمینوکلات آهن بر عملکرد و شاخص‌های رشد گیاه دارویی شوید (*Anethum graveolans* L.). علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای ۵(۱۷): ۱-۱۲.

۳. درزی، م. ت.، ا. قلاوند، ف. سفیدکن و ف. رجالی. ۱۳۸۷. تأثیر کاربرد مایکوریزا، ورمی‌کمپوست و کود فسفات زیستی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه رازیانه. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۴(۴): ۳۹۶-۴۱۳.

۴. علی احیایی، م. و ع. ا. بهبهانی‌زاده. ۱۳۷۲. روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. نشریه شماره ۸۹۳ مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ۱۳۲ صفحه.

۵. میرمصطفایی، س.، م. عزیزی، م. بحرینی، ح. آروئی و ف. عروجعلیان. ۱۳۹۲. تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر سرعت کاهش وزن، میزان اسانس و بار میکروبی نعناع فلفلی. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۰(۴): ۱۳۳-۱۴۷.

6. Abou El-Yazeid, A., H.A. Abou-Aly, M.A. Mady and S.A.M. Moussa. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio-phosphor) combined with boron foliar spray. Res. J. Agric. Biol. Sci. 3(4): 274-286.
7. Adams, R.P. 2005. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Carol Stream, IL.,USA.
8. Auge, R.M. 2001. Water relation, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. J. Mycorrhiza 11: 3-42.
9. Banchio, E., P.C. Bogino, J. Zygadlo and W. Giordano. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochem. Sys. Ecol. 30: 766-771.
10. Bharti, N., S. Baghel, D. Barnawal, A. Yadav and A. Karla. 2013. The greater effectiveness of *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices* in improving productivity, oil content and tolerance of salt-stressed menthol mint (*Mentha arvensis* L.). J. Sci. Food Agric. 93: 2154-2161.
11. Cappellari, L.D.R., M.V. Santoro, F. Nievas, W. Giordano and E. Banchio. 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. Appl. Soil Ecol. 70: 16-22.
12. Chauhan, R.S., M.K. Kaul, A.K. Shahi, A. Kumar, G. Ram and A. Tawa. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. Accession [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. Ind. Crop Prod. 29: 654-656.
13. El-Sawi, S. and M. Mohamed. 2002. Cumin herb as a new source of essential oils and its response to foliar spray with some micro-elements. Food Chem. 77(1): 75-80.
14. Freitas, M.S.M., M.A. Martins and E.I.J.C. Vieira. 2004. Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 39(9): 887-894.
15. Gupta, M.L., A. Prasad, M. Ram and S. Kumar. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasiculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresour. Technol. 81: 77-79.
16. Gupta, M., S.H. Kiran, A. Gulati, B. Singh and R. Tewari. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. Microbiol. Res. 167: 358-363.
17. Hadian, J., S. Nejad Ebrahimi and P. Salehi. 2010. Variability of morphological and phytochemical characteristics

among *Satureja hortensis* L. accessions of Iran. Ind. Crop Prod. 32: 62-69.
18. Heywood, V.H. 2002. The conservation of genetic and chemical diversity in medicinal and aromatic plants. PP. 13-22. *In:* Sener, B. (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
19. Kapoor, R., B. Giri and K.G. Mukerji. 2002. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to enhance the concentration and quality of essential oil. J. Sci. Food Agric. 82(4): 339-342.
20. Kapoor, R., B. Giri and K.G. Mukerji. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresour. Technol. 93: 307-311.
21. Kumar, P., S. Mishra, A. Malik and S. Satya. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. Ind. Crop Prod. 34: 802-817.
22. Kumar, V. and K.P. Singh. 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing microorganisms. Bioresour. Technol. 76(2): 173-175.
23. Lawrence, B.M. 2007. Mint: The Genus Mentha. Medicinal and Aromatic Plants. Industrial Profiles Series, CRC Press, Boca Raton, FL.
24. McKay, D.L. and J.B. Blumberg. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytother. Res. 20(8): 619-633.
25. Niranjan, R.S., H.S. Shetty, M.S. Reddy. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity. PP. 197-216. *In:* Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Springer, The Netherlands.
26. Prasad, A., S. Kumar, A. Khaliq and A. Pandey. 2011. Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Biol. Fert. Soils 47: 853-861.
27. Ramomoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plant against pests and diseases. Crop Prot. 20: 1-11.
28. Santoro, M.V., J. Zygadlo, W. Giordano and E. Banchio. 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita* L.). Plant Physiol. Biochem. 49: 1177-1182.
29. Sharma, A.K., 2002. Biofertilizers for Sustainable Agriculture. Agrobios, India, 300 p.
30. Sifola, M. and G. Barbieri. 2006. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. Sci. Hort. 108(4): 408-413.
31. Street, R.A. 2012. Heavy metals in medicinal plant products- An African perspective. South Afr. J. Bot. 82: 67-74.
32. Yasari, E., A.M. Patwardhan, V.S. Ghole, O. Ghasemi Chapi and A. Asgarzadeh. 2007. Biofertilizers impact on canola (*Brassica napus* L.) seed yield and quality. Asian J. Microbiol. 9(3): 701-707.
33. Zheljazkov, V.D and T. Astatkie. 2012. Distillation waste water can modify peppermint (*Mentha piperita* L.) oil composition. Ind. Crop Prod. 36: 420-426.