تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک/ جلد پنجم، شماره سوم، زمستان ۱۴۰۲، ص ۶۵۳-۶۳۵

مقاله پژوهشی

# ارزیابی اثر همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا بر ویژگی‌های رشدی و فیتوشیمیایی استبرق (*Calotropis procera* Aiton)

**مرضیه نوری[۱]، محمود سلوکی[۲]، عبدالرحمن رحیمیان بوگر[۳*]، مهدی آران[۳]، زینب محکمی[۴]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۴- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: a.rahimian@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱ /۱۲/۲۰ **DOI: 10.22034/CSRAR.2023.379437.1309**

**چکیده**

استبرق گیاهی دارویی و مؤثر در درمان سوء هاضمه، سرطان و تشنج است. در بررسی حاضر اثر همزیستی سه گونه مختلف قارچ میکوریزا با استبرق بر فیتوشیمی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جذب برخی کاتیون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار تلقیح با گونه‌های *Glomus intraradicese*، *G. fasiculatum* و*G. mosseae* و عدم تلقیح (شاهد) در ۳ تکرار و بصورت گلدانی انجام شد. شاخص‌های ارزیابی شده شامل؛ کلروفیل a، b و کارتنوئید، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پروتئین و محتوای پتاسیم، فسفر و سدیم در شاخساره بود. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که همزیستی با گونه‌های قارچ میکوریزا تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0.01$) بر شاخص‌های ارزیابی شده داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل a و کارتنوئید در همزیستی استبرق با گونه قارچ *G. mossae*، و بیشترین مقدار کلروفیل b در همزیستی با گونه‌های قارچ *G. fasiculatum* و *G. intraradicese* بدست آمد. گونه *G. fasiculatum* بیشترین تأثیر را در افزایش فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت. بالاترین مقدار فلاونوئید در شرایط همزیستی با *G. fasiculatum* و *G. intraradicese*، و بیشترین مقدار پروتئین در شرایط همزیستی با *G. fasiculatum* و *G. mossae* بدست آمد. همزیستی با گونه *G. intraradicese* بطور معنی‌داری باعث افزایش تجمع پتاسیم و فسفر در اندام رویشی استبرق شد، درحالی‌که همزیستی با گونه *G. mossae* باعث افزایش معنی‌دار سدیم شده است. بطور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همزیستی استرق با گونه‌های *G. fasiculatum* و *G. intraradicese* کارآمدتر از همزیستی با قارچ *G. mossae* بود.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس، آنتی‌اکسیدان، تلقیح، عملکرد، متابولیت ثانویه

## مقدمه

استبرق با نام علمی *Calotropis procera* Ait از خانواده *Asclepiadaceae*، از گیاهان چندساله، بیابانی و همیشه سبز می‌باشد که در نواحی جنوبی ایران به ویژه سواحل خلیج فارس و دریای عمان شامل مناطق خشک و بیابانی سیستان و بلوچستان، خوزستان، بوشهر، هرمزگان گسترش دارد (Salarpouri *et al*., 2019). امروزه با توجه به ارزش دارویی و اقتصادی ویژه استبرق، کشت آن با هدف ترمیم و گسترش رویشگاه‌های مناطق خشک و بیابانی انجام می‌شود (Hindi, 2013). اندام‌های گیاه استبرق به ویژه دانه‌ها و شیرابه اغلب سمی بوده (Little *et al*., 1974) و دارای آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای متنوعی هستند که تعداد زیادی از آن‌ها در داروسازی و به عنوان حشره‌کش استفاده می‌شوند (Farrar *et al*., 2014). عصاره این گیاه دارای کاربرد درمانی ضد نفخ، سوء هاضمه، ضد سرطان، ضد تشنج دارد (Tahir *et al*., 2011). پوست ریشه استبرق در درمان تب، جذام و نیش زدگی مالاریا و مارگزیدگی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Parrotta, 2001). هم‌چنین عصاره این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است و می‌تواند از رشد سلولی جلوگیری نماید. خواص حفاظت کبدی و آنتی‌اکسیدانی گیاه را به فلاونوئیدهای موجود در گل نسبت داده‌اند (Qureshi *et al*., 2007). شیرابه گیاه استبرق منبع مهمی از ترکیبات جدید مانند فلاونوئید کوئرستین، گلیکوزیدهای فلاونوئیدی، آنتوسیانین، رزین، آنزیم‌های هضم کننده پروتئین در شیرابه، تانن، استرول،

ساپونین و تری ترپنوئیدها می‌باشد (Khasawneh *et al*., 2011; Sharma *et al*., 2011).

بیشتر گیاهان زراعی و باغی رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزا دارند که این همزیستی افزون بر تأثیر بر افزایش جذب آب و عناصر غذایی باعث افزایش بقا و قدرت ازدیاد گیاهان می‌شود (Smith and Read, 2008). به طور کلی، توسعه و تکامل همزیستی میکوریزا نقش مهمی بر حاصلخیزی خاک در ناحیه اقتصادی ریشه[1] دارد که می‌تواند به‌طور تئوریک و فیزیکی به فهم پیچیدگی اقتصاد ریشه کمک نماید (Yan *et al*., 2022). قارچ میکوریز آربسکولار[2] دارای رایج‌ترین همزیستی با گیاهان است که تقریباً در تمامی رویشگاه‌های طبیعی تا زمین‌های کشاورزی حضور پررنگ و گسترده‌ای دارد. ریشه‌های این قارچ دارای مسیر همزیستی داخل سلولی است و تأثیر زیادی بر نحوه تکامل سیستم ریشه‌ای گیاهان دارد (Brundrett, 2002; Tedersoo *et al*., 2020). در محل تبادل عناصر غذایی بین دو گونه همزیست، قارچ اندام ویژه‌ای به نام آربسکول و وزیکول در پوست و ریشه گیاه میزبان به وجود می‌آورد که در ذخیره سازی و کلونیزاسیون گیاه میزبان نقش دارد (Rasouli Sedghiani *et al*., 2011). همزیست شدن گونه‌های مختلف گیاهان دارویی و معطر با قارچ‌های میکوریزا باعث افزایش و بهبود رشد آن‌ها شده است (Gupta *et al*., 2002).

بررسی همزیستی قارچ‌های میکوریزا با گیاه پروانش نشان داد که محتوی کلروفیل a، b و کربوهیدرات به طور چشم‌گیری تحت تأثیر همزیستی با قارچ‌های میکوریزا واقع شده است (Ramakrishnan and Bhuvaneswari, 2014). همزیستی قارچ میکوریزا با گیاهان زراعی باعث بهبود جذب عناصر غذایی، هدایت روزنه‌ای، پتانسیل آب برگ و فتوسنتز می‌شود (Li *et al*., 2014; Yang *et al*., 2014). هم‌چنین این رابطه همزیستی می‌تواند باعث تولید هورمون‌های محرک رشد، آنزیم‌های ضد اکسیداتیو شود باعث افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش خشکی گردید (Mathimaran *et al*., 2017). بررسی تلقیح جداگانه سه گونه قارچ *Rhizophagus aggreatus*، *Claroideoglomus etunicatum* و *Funneliformis mosseae* با گیاه ذرت نشان داد که همزیستی میکوریزا به طور قابل توجهی قدرت ریشه ذرت را به ویژه برای گیاهان تلقیح شده با *F. mosseae* بهبود بخشید، هم‌چنین این بررسی نشان داد که همزیستی با هر سه گونه قارچ میکوریزا به‌طور قابل توجهی تجمع N، P و K را افزایش داد (Ma *et al*., 2022). تلقیح گیاهان گوجه فرنگی، ذرت و شبدر با قارچ‌های میکوریزا به ویژه با قارچ *Rhizophagus intraradices* باعث افزایش تحمل این گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین گردید (Upadhyay *et al*., 2012). تلقیح با دو نوع قارچ *G. macrocrpum* و *G. fasiculatum* سبب افزایش تعداد چتر در بوته، عملکرد کل، زیست‌توده و عملکرد اسانس در گیاه رازیانه شدند (Kapoor *et al*., 2004). بررسی دیگری نشان داد که قارچ‌های *Funneliformis caledonius*، *F. mosseae*، *Septoglomus deserticola* و *S. constrictum* دارای همزیستی با گونه دارویی استبرق در شرایط طبیعی رویشگاه ریگان از رویشگاه‌های طبیعی استان کرمان هستند (Hatami *et al*., 2020).

اگرچه همزیستی قارچ‌های میکوریزا آربسکولار اختصاصی میزبان خاصی نیست، اما این قارچ‌ها ترجیح میزبان را نشان می دهند (Mathimaran *et al*., 2017). گیاه استبرق خواص دارویی فراوانی داشته و از ریشه، ساقه، برگ و گل‌های آن در طب سنتی استفاده می‌شوند. ارزش دارویی این گیاه برای داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی متنوعی مانند فلاونوئیدها، ترکیبات پلی فنلی، آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، هیدروکربن‌ها و پروتئین‌ها است. متاسفانه، به دلیل جوانه‌زنی ضعیف بذر و استقرار نامناسب گیاهچه استبرق پراکندگی کمی در رویشگاه‌های طبیعی دارد. استفاده از قابلیت همزیستی قارچ میکوریزا با این گیاه می‌تواند باعث بهبود استقرار گیاه و ویژگی‌های رشد و نموی آن گردد. از این‌رو هدف بررسی حاضر، ارزیابی تأثیر همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا بر برخی صفات فیتوشیمیایی گیاه استبرق و جذب عناصر پتاس، فسفر و سدیم توسط این گیاه بوده است.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار شامل تلقیح با سه گونه قارچ مایکوریزا *G. intraradicese*، *G.*

[1] Root economics space

[2] Arbuscular Mycorrhizal Fungus

*fasiculatum* و *G. mossae* و عدم تلقیح (شاهد) در سه تکرار به صورت گلدانی در سال ۱۴۰۱ ـ۱۴۰۰ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل انجام شد. بذرهای استبرق از کلکسیون گیاهان داروئی پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل تهیه و به منظور تولید نشاء بذرها بصورت تکی در گلدان‌های کوچک کشت و پس از چهاربرگی شدن دانهال به گلدان‌های ۵ کیلوگرمی حاوی بستر خاک انتقال یافتند. ویژگی‌های خاک قبل از آزمایش اندازه‌گیری گردید (جدول۱). قارچ‌های مایکوریزا از شرکت تعاونی زیست فناور توران سمنان واقع در شهرستان شاهرود تهیه گردید. عملیات تلقیح با قارچ مایکوریزا حین کاشت بذر در مرحله تولید نشاء انجام شد. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای در دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل با میانگین دمای روزانه ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت به مدت ۴ ماه انجام شد.

**جدول ۱- ویژگی‌های خاک بستر کشت قبل از انجام آزمایش**

**Table 1- Indices of the soil of the culture bed before carry out the experiment**

| شن Sand (%) | رس Clay (%) | سیلت Silt (%) | پتاسیم Potassium ($mg/kg^{-1}$) | فسفر Phosphorous ($mg/kg^{-1}$) | نیتروژن Nitrogen (%) | اسیدیته pH | هدایت الکتریکی EC (ds/m) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | 80 | 11 | 649 | 12 | 0.12 | 7.51 | 4.23 |

## شاخص‌های رشد و نموی

به منظور اندازه‌گیری وزن تر شاخساره و ریشه، نمونه‌های شاخساره استبرق پس از برداشت با آب مقطر شست و شو داده شد و رطوبت اضافی آنها بوسیله قرار دادن روی دستمال کاغذی گرفته شد و سپس بوسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند، ریشه‌های گیاه پس از پاک‌سازی خاک اطراف آنها به کمک جریان آب ملایم با آب مقطر آبکشی شدند و پس از خشک نمودن رطوبت سطحی آنها وزن شدند. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها درون پاکت کاغذی گذاشته شدند و در آون در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت خشک شدند و وزن خشک آنها بوسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

## شاخص‌های فیتوشیمیایی

### رنگیزه‌های کلروفیل و کارتنوئید

رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل به روش آرنون (Arnon, 1949) اندازه‌گیری شدند. به این منظور، مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه جدا شده گیاه استبرق توزین و در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع خرد و به خوبی له شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه شد با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه تفکیک و عصاره جدا شده بالایی حاصل از سانتریفیوژ به بالن شیشه‌ای انتقال داده شد. مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت اسپکتروفتومتر ریخته و سپس به طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل *a*، و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل *b* و کارتنوئید به روش (Šaponjac *et al.*, 2021) اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان کلروفیل a (۱)، b (۲) و کاروتنوئیدها (۳) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر عصاره نمونه به‌دست آمد.

$$\text{Chl. a} = 12.7\ (A663) - 2.69\ (A645) \quad (۱)$$

$$\text{Chl. b} = 22.9\ (A645) - 4.68\ (A663) \quad (۲)$$

$$\text{Car.} = 0.216A663 - 1.22A645 - 0.304A505 + 0.452A453 \quad (۳)$$

### سنجش مقدار کل فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی

به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی برای سنجش محتوی کل فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدان در گیاه استبرق برگ‌های خشک شده به وسیله آسیاب برقی پودر شد. عصاره متانولی از پودر برگ با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱۰:۱ (V/W ماده خشک گیاهی) و حلال متانول ۷۰ درصد تهیه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون حلال و روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm در دمای اتاق خیسانده شد. پس از آن با کاغذ صافی واتمن (شماره ۱۰) صاف و برای تغلیظ به دستگاه روتاری با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت و پس از تغلیظ عصاره به زیر هود انتقال یافته تا مابقی حلال به تدریج تبخیر گردد (Firouzkoohi *et al.*, 2018).

برای سنجش محتوی فنل کل از معرف فولین-سیو کالتیو استفاده شد (Slinkard and Singleton, 1977). میزان ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین-سیو کالتیو ۰/۲ نرمال به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برگ به اضافه شد و پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات کلسیم (۷۵ گرم بر لیتر) به آن اضافه شد، در نهایت جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر (مدل UV-2100 ساخت آلمان) خوانده شد. گالیک اسید برای رسم نمودار کالیبراسیون به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

فلاونوئید کل با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد (Chang *et al.*, 2002). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برگ با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آلومینیوم‌کلراید (محلول ۱۰ درصد اتانول)، ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم (۱ مولار)، و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نهایت این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. برای رسم نمودار کالیبراسیون از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شد.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با روش پاکسازی رادیکال DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام شد. اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رایکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تغییر رنگ می‌دهد که شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه‌گیری است. رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از آنتی اکسیدان عمل می‌کند در نتیجه آن DPPH به DPPH2 تبدیل می‌شود و در نتیجه رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تغییر می‌یابد، بنابراین شدت جذب در ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد و از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی اکسیدانی آن پی برد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۷۵۰ میکرولیتر از DPPH ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای لتاق نگهداری شد. سپس جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Singh *et al.*, 2002; Braca *et al.*, 2001). محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای مهار رادیکال‌های آزاد انجام شد (۴):

$$AA\% = \left[\frac{A0-A1}{A0}\right] \times 100 \qquad (۴)$$

AA% درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، A0 جذب کنترل منفی، و A1 جذب عصاره است.

## سنجش پروتئین کل

به این منظور، برگ‌های فریز شده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس با ۲ سی‌سی فسفات پتاسیم درون هاون خرد و له شدند، میکروتیوب مخلوط بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره رویی برای ارزیابی پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش پروتئین مقدار ۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده درون لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر معرف رنگی بیوره اضافه گردید. بعد از همگن کردن مخلوط بوسیله ورتکس محتویات لوله به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و غلظت پروتئینی بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (Bradford, 1976).

## سنجش میزان تجمع پتاسیم، فسفر و سدیم در اندام رویشی گیاه

برای تهیه عصاره جهت اندازه‌گیری میزان تجمع عناصر فسفر، پتاسیم و سدیم در اندام رویشی گیاه استبرق مقدار ۱ گرم از اندام هوایی خشک شده گیاه توزین و درون بوته چینی به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۵۰ درجه سلسیوس داخل کوره سوزانده شد. بعد از این زمان، و پس از سرد شدن بوته چینی در دمای لتاق مقدار ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن اضافه شد و به منظور انجام عمل هضم روی دستگاه گرمایی قرار داده شد. سپس مخلوط با کاغذ صافی واتمن صاف و به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتر انتقال یافت و با آب مقطر به حجم رسانده شد. غلظت فسفر در اندام هوایی گیاه پس از هضم نمونه‌ها با اسید سولفو سالیسیلیک با استفاده از معرف آمونیوم مولیبدات به علاوه آمونیوم وانادات به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-2100 ساخت آلمان) در طول موج

۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Watanabe and Olsen, 1965). پتاسیم و سدیم با استفاده از روش فلم فتومتری (Williams and Twine,1960) اندازه‌گیری شدند.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری JMP و مقایسه میانگین به روش آزمون LSD در سطح ۱ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

## نتایج و بحث

تحلیل میانگین مربعات برای شاخص وزن تر و خشک شاخساره و ریشه گیاه نشان داد که همزیستی بین گونه‌های قارچ میکوریزا با گیاه استبرق بطور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۱$) بر شاخص‌های وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه این گیاه اثر گذار است (جدول ۲).

**جدول ۲- تحلیل میانگین مربعات صفات وزن تر و خشک شاخساره و ریشه استبرق تحت شرایط همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

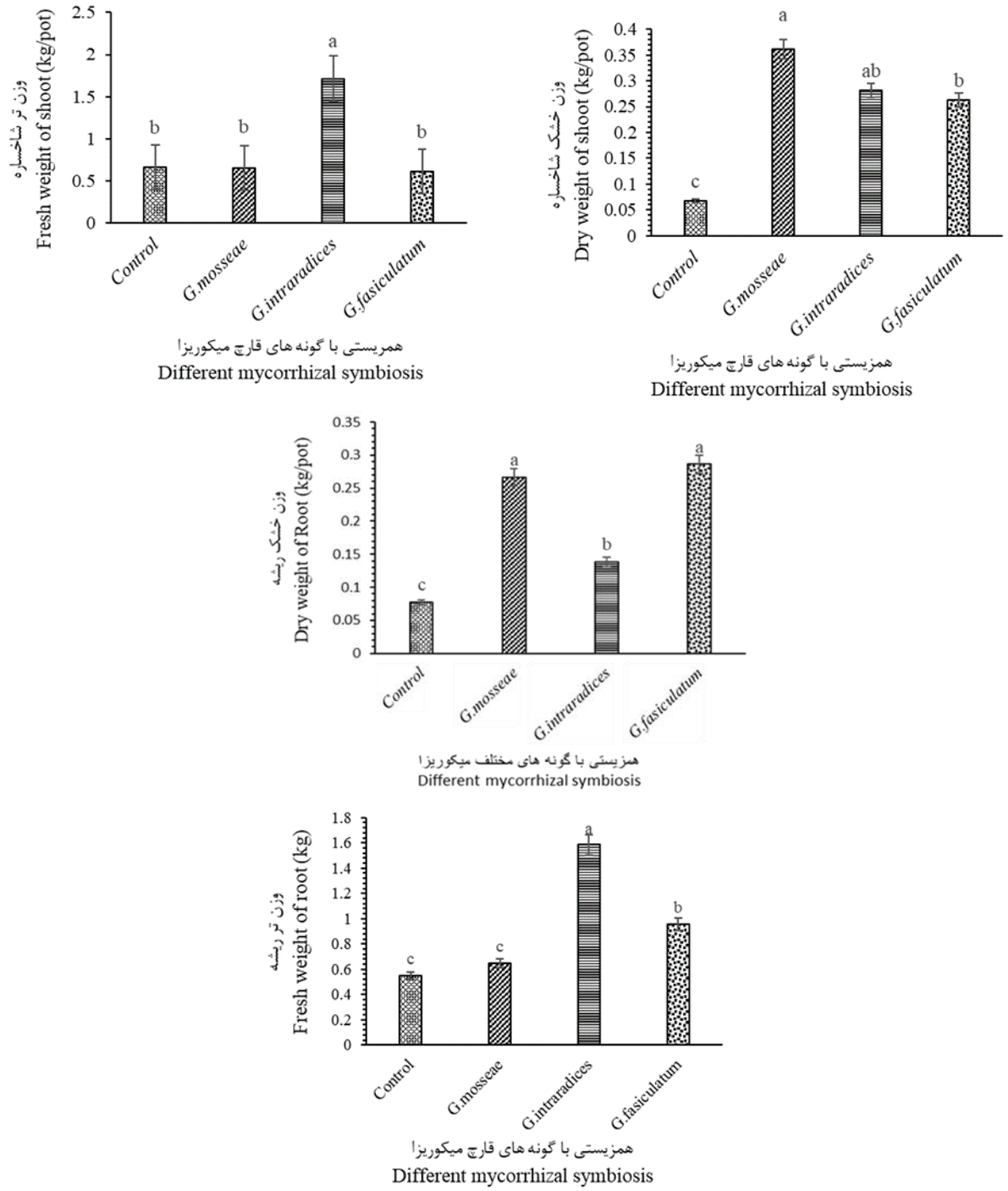
**Table 2- ANOVA analysis of fresh and dry weight of shoot and root of *Calotropis procera* Ait under symbiosis with different species of mycorrhiza**

| منبع تغییرات Source of Variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean square | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | وزن تر شاخساره Fresh weight of shoot | وزن تر ریشه Fresh weight of root | وزن خشک شاخساره Dry weight of shoot | وزن خشک ریشه Dry weight of shoot |
| تیمار میکوریزا Mycorrhizae treatments | 3 | 0.86** | 0.65** | 0.043** | 0.030** |
| خطای آزمایش Experimental error | 8 | 0.01 | 0.003 | 0.001 | 0.0003 |
| C.V. | | 14.331 | 6.360 | 14.547 | 9.217 |

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

** significant at 1% probability level

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا با استبرق منجر به افزایش وزن تر و خشک شاخساره و ریشه این گیاه شده است. بیشترین مقدار وزن تر شاخساره در شرایط همزیستی با قارچ *G. intraradicese* با ۱۵۹ درصد افزایش نسبت به شاهد بدست آمد، هم‌چنین بیشترین وزن تر ریشه تحت تأثیر همزیستی این گونه قارچ دارای افزایش ۱۸۷ درصدی نسبت به تیمار عدم همزیستی با میکوریزا بود (شکل ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها برای گونه‌های قارچ *G. mossae* و *G. fasiculatum* نشان داد که وزن تر شاخساره استبرق تحت همزیستی با این دو گونه قارچ تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (عدم همزیستی) نداشت، و وزن تر ریشه تحت همزیستی *G. fasiculatum* دارای ۷۲ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد بود درحالی‌که بین تأثیر *G. mossae* و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نیست (شکل ۱). افزون بر این وزن خشک شاخساره و ریشه استبرق تحت تأثیر همزیستی با گونه‌های مختلف میکوریزا دارای اختلاف معنی‌داری بود. بیشترین مقدار وزن خشک شاخساره در شرایط همزیستی *G. mossae* با ۱۲۵ درصد افزایش نسبت به شاهد بدست آمد. هم‌چنین بین تأثیر گونه‌های *G. intraradicese* و *G. fasiculatum* نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و همزیستی این دو گونه به ترتیب منجر به ۷۵ و ۶۲ درصد افزایش وزن خشک شاخساره نسبت به شاهد شدند (شکل ۱). همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا تأثیر مثبتی در افزایش وزن خشک ریشه استبرق نسبت به شاهد داشتند و دو گونه *G. fasiculatum* و *G. mossae* به ترتیب با ۳۰۰ و ۲۷۱ درصد افزایش نسبت به شاهد بیشترین تأثیر را بر افزایش وزن خشک ریشه استبرق داشتند، بین تأثیر این دو گونه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. هم‌چنین گونه *G. intraradicese* منجر به افزایش ۸۵ درصد وزن خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۱).




**شکل ۱- مقایسه میانگین وزن تر و خشک شاخساره و ریشه استبرق تحت همزیستی با گونه‌های مختلف میکوریزا**

**Figure 1- Means comparison of dry and fresh weight of shoot and root of *Calotropis procera* Ait under symbiosis with different species of mycorrhiza**

یافته‌های این پژوهش هم‌سو با نتایج ارزیابی تأثیر میکوریزا بر شاخص‌های رشد و نموی گیاه جعفری آفریقایی (Alizadeh Ajirlo and Farrokhpor, 2014)، آلوئه‌ورا (Pouraali *et al.*, 2015)، سورگوم علوفه‌ای (Bagheri Dehabadi *et al.*, 2017) است. هم‌چنین پژوهش‌های دیگری نشان داده‌اند که افزایش شدت کلونیزاسیون با قارچ میکوریزا آربسکولار منجر به افزایش میانگین قطر ریشه گونه‌های گیاهی می‌شود (Bergmann *et al.*, 2020; Wambsganss *et al.*, 2021). در این راستا بررسی دیگری با ارزیابی گیاهان میکوریزایی و غیر میکوریزایی دو رقم سیب‌زمینی پرورش یافته تحت تنش

آبی نشان داد که ریشه گیاهان دارای همزیستی میکوریزایی از هدایت هیدرولیکی بیشتری نسبت به گیاهان غیرهمزیست برخوردار بود بطوری‌که همزیستی منجر به افزایش ۲۰۰ تا ۳۰۰ درصدی هدایت آبی در واحد طول ریشه این گیاهان شد و دلیل آن را تأثیر همزیستی میکوریزا بر افزایش طول و سطح ریشه بیان کردند (Khaninejad *et al*., 2013). در این راستا، سایر بررسی‌ها نشان داده‌اند که همزیستی گیاهان با میکوریزا منجر به افزایش جذب و انتقال آب و عناصر غذایی در گیاهان شده و در نتیجه بطور غیره مستقیم بر افزایش رشد و نمو و عملکرد گیاه مؤثر است (Diedhiou *et al*., 2016; Bowles *et al*., 2016; Mitra *et al*., 2021).

نتایج تحلیل میانگین مربعات برای شاخص‌های فیتوشیمیایی نشان داد که همزیستی بین گونه‌های قارچ میکوریزا با گیاه استبرق بطور معنی‌داری بر شاخص‌های فیتوشیمیایی این گیاه اثر گذار است ($p \leq ۰/۰۱$). بنابراین، محتوی کلروفیل a و b، کارتنوئید، فلاونوئید، فنل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پروتئین کل در این گیاه تحت تأثیر استفاده از گونه‌های مختلف میکوریزا متغیر بود (جدول ۳).

**جدول ۳- تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی گیاه استبرق تحت شرایط همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

**Table 3- ANOVA analysis of phytochemical characteristics of *Calotropis procera* Ait under symbiosis with different species of mycorrhiza**

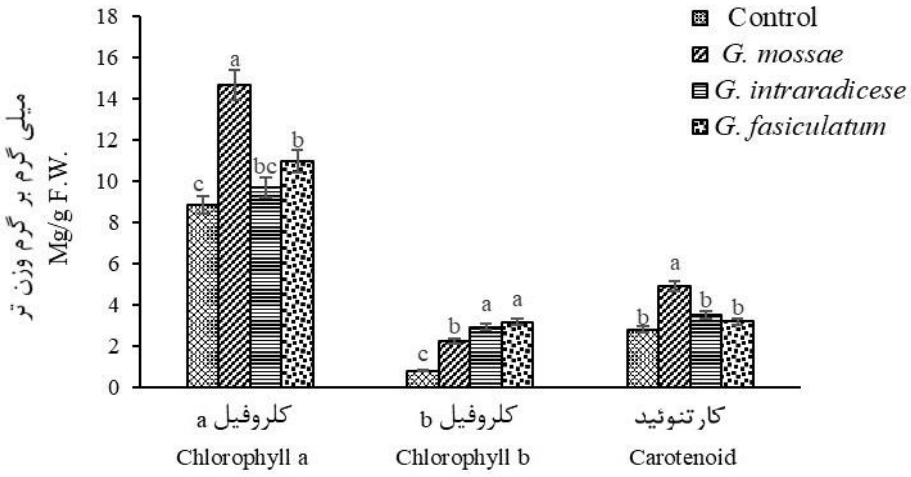
| منبع تغییرات Source of Variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean square | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | کلروفیل a Chlorophyll *a* | کلروفیل b Chlorophyll *b* | کارتنوئید Carotenoid | فلاونوئید Flavonoid | فنل Phenol | فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity | پروتئین Protein |
| تیمار میکوریزا Mycorrhiza treatments | 3 | 19.55** | 3.39** | 2.53** | 5222.3** | 23.72** | 28.05 | 86663.5** |
| خطای آزمایش Experimental error | 8 | 0.105 | 0.039 | 0.11 | 86.48 | 1.07 | 3.00 | 1932.5 |
| C.V. | | 2.93 | 8.63 | 9.21 | 12.00 | 0.06 | 3.12 | 18.01 |

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

** significant at 1% probability level

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین تأثیر همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا بر محتوی کلروفیل برگ گیاه استبرق اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار کلروفیل a در شرایط همزیستی گیاه استبرق و قارچ *G. mossae* با ۶۵ درصد افزایش نسبت به شرایط عدم همزیستی، و بیشترین مقدار کلروفیل b در شرایط همزیستی با قارچ *G. fasiculatum* با افزایش ۳ برابری نسبت به شاهد بدست آمد. مطابق نتایج این بررسی اختلاف معنی‌داری بین تأثیر *G. fasiculatum* و *G. intraradicese* وجود نداشت، درحالی‌که میزان افزایش کلروفیل b در شرایط همزیستی با *G. intraradicese* نسبت به شاهد ۲/۶ برابر بود (شکل ۲). هم‌چنین محتوی کارتنوئید برگ برای گیاه استبرق در شرایط همزیستی با گونه‌های مختلف قارچ دارای اختلاف معنی‌داری بود، همزیستی با قارچ *G. mossae* با افزایش ۷۵ درصدی کارتنوئید نسبت به تیمار شاهد بیشترین تأثیر را بر محتوی کارتنوئید داشت. برای کارتنوئید بین تأثیر همزیستی با دو گونه قارچ *G. intraradicese* و *G. fasiculatum* و تیمار عدم همزیستی (شاهد) اختلاف آماری وجود ندارد (شکل ۲). بررسی حاضر نشان داد که همزیستی قارچ میکوریزا با گیاه استبرق تأثیر معنی‌داری در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ شامل کلروفیل a و b، و کارتنوئید داشت. این نتایج هم‌سو با یافته‌های پیشین مبنی تأثیر همزیستی میکوریزا بر افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاه گشنیز (Bahadori *et al*., 2015) و آفتابگردان (Shahabivand *et al*., 2018, 2017) است. افزون بر این برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تلقیح ریشه گیاهان برنج و توتون با قارچ میکوریزا منجر به کاهش اثرهای منفی تنش‌ها بر

رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کارتنوئید کاهش داده و موجب افزایش غلظت کلروفیل و کارتنوئید شده است (Shahabivand *et al*., 2012; Hui *et al*., 2015).




محتوی کلروفیل برگ استبرق تحت همزیستی با گونه های مختلف میکوریزا
Chlorophyll content in leaf of *Calotropis procera* under symbiosis with different mycorrhiza

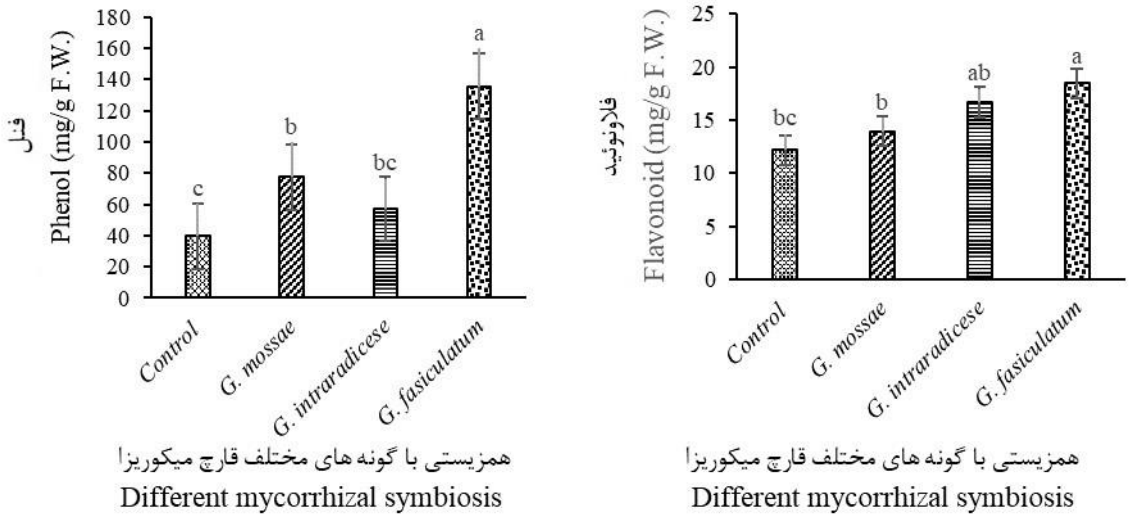
**شکل ۲- مقایسه میانگین کلروفیل a، b و کارتنوییید استبرق تحت همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

**Figure 2- Means comparison of Chlorophyll a, b, and Carotenoid of *Calotropis procera* Ait under symbiosis with different species of mycorrhiza**

افزایش محتوای کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا ممکن است به دلیل رابطه مثبت بین جذب عناصر سودمند و مقدار کلروفیل باشد (Zarea *et al*., 2012). در راستا مشخص شده است که همزیستی میکوریزایی منجر به افزایش جذب آب، و بهبود جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن و منیزیم بوسیله گیاه می‌شود و از این طریق باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در سنتز کلروفیل شده و در نتیجه منجر به افزایش محتوای کلروفیل و فتوسنتز می‌شود (Giri and Mukerji, 2004). هم‌چنین در شرایط تنش، تلقیح گیاه با قارچ میکوریزا بر فعالیت آنتی اکسیدانی آن اثرگذار خواهد بود و منجر سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که در نهایت از تخریب کلروفیل جلوگیری می‌نماید (Kapoor *et al*., 2008).

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای فلاونوئید نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تأثیر همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا بر میزان فلاونوئید در گیاه استبرق وجود دارد. بیشترین مقدار فلاونوئید با افزایش ۵۲ درصدی نسبت به شاهد، در شرایط همزیستی این گیاه با قارچ *G. fasiculatum* بدست آمد. درحالی‌که بین تأثیر سایر گونه‌های میکوریزا نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳). بیشترین مقدار فنل کل با افزایش ۲۴۲ درصدی نسبت به شاهد در شرایط همزیستی استبرق با قارچ *G. fasiculatum* بدست آمد و در شرایط همزیستی با قارچ *G. mossae* مقدار فنل کل دارای افزایش ۹۵ درصدی نسبت به شاهد بود، درحالی‌که بین تأثیر *G. intraradicese* و شرایط عدم همزیستی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که همزیستی گیاه با قارچ میکوریزا به دلیل بهبود جذب عناصر غذایی توسط میزبان (Zimare *et al*., 2013)، فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی (Zhang *et al*., 2013) و تغییر در فعالیت برخی آنزیم‌ها (Chandrasekaran and Paramasivan, 2022) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثراست. هم‌سو با یافته‌های قبلی، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همزیستی گیاه استبرق با گونه‌های مختلف میکوریزا

منجر به افزایش تولید فنل و فلاونوئید در اندام رویشی این گیاه شده است. این نتایج با تأثیر دو گونه قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* بر افزایش ترکیبات ثانویه فنولیک و فلاونوئید کل در ریشه گیاه شیرین‌بیان و بهبود ویژگی‌های کیفی این گونه دارویی هم‌سویی دارد (Orujei *et al*., 2013). هم‌راستا با پژوهش حاضر، بررسی دیگری با ارزیابی اثر سه گونه قارچ میکوریزا بر فعالیت‌های فتوسنتزی، رشد و نموی و ترکیب‌های ثانویه در گیاه نیلوفر پیچ[1] نشان داد که قارچ *R. Intraradices* بیشترین تأثیر را در افزایش محتوای فنل در این گیاه داشت و بیشترین مقدار فلاونوئید در شرایط همزیستی این گیاه با گونه قارچ *F. mosseae* بدست آمد (Rashidi *et al*., 2021). بنابراین، همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریزا منجر به تحریک سیستم دفاعی گیاه و افزایش تولید پیش‌ماده سنتز فلاونوئیدها می‌شود (Perner *et al*., 2008).




**شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص‌های فنل و فلاونوئید تحت همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

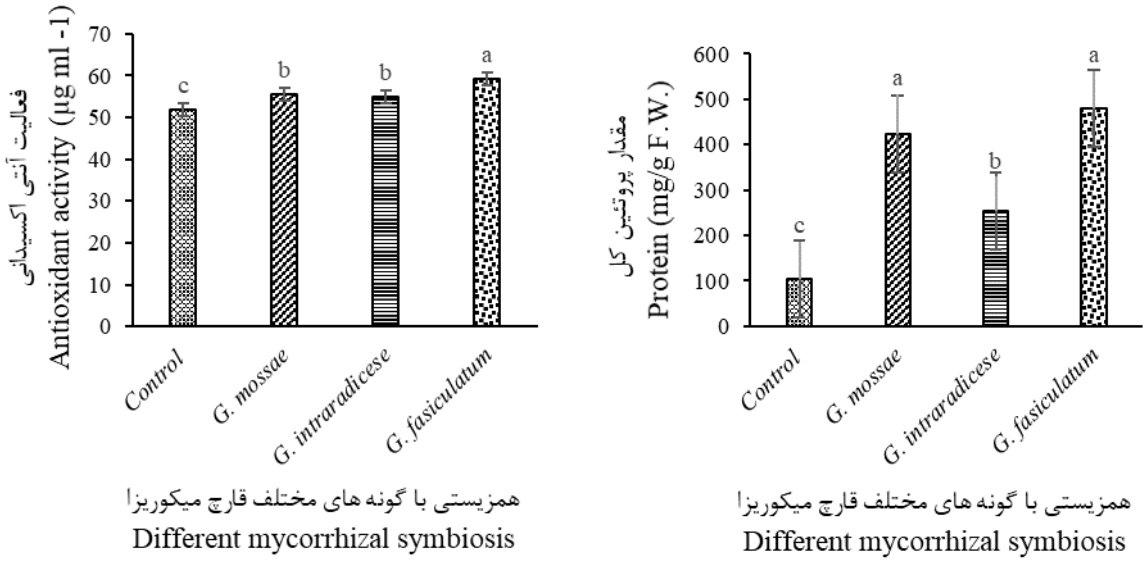
**Figure 3- Means comparison of phenol and flavonoid characteristics under symbiosis with different species of mycorrhiza**

فعالیت آنتی‌اکسیدانی شاخص دیگری است که در بررسی حاضر تحت تأثیر همزیستی با گونه‌های مختلف قارچ میکوریزا افزایش داشت و نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استبرق برای تیمارهای مختلف میکوریزا نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار دارد. در این راستا، گونه *G. fasiculatum* بیشترین تأثیر را بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی داشت که منجر به افزایش ۱۴/۳۱ درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۴). در این راستا پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که همزیستی با قارچ میکوریزا منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه ریحان (Hristozkova *et al*., 2017)، ذرت (Zhu *et al*., 2010)، و نیلوفر پیچ (Rashidi *et al*., 2021) شده است. بررسی ضریب همبستگی بین ویژگی‌های فیتوشیمیایی نیلوفر پیچ در شرایط همزیستی با گونه‌های مختلف قارچ میکوریزا نشان داد که خاصیت آنتی اکسیدانی دارای همبستگی مثبت و معنی داری با محتوای فنل، فلاونوئید و ترپنوئید است (Rashidi *et al*., 2021)، بنابراین همزیستی میکوریزایی منجر به بهبود سنتز متابولیت‌های ثانویه شده و در نتیجه باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد.

بررسی پروتئین کل در اندام رویشی استبرق نشان داد که همزیستی با گونه‌های میکوریزا تأثیر مثبتی بر غلظت پروتیئن کل داشت. بیشترین مقدار پروتئین در شرایط همزیستی با گونه‌های قارچ *G. fasiculatum* و *G. mossae* به ترتیب (۴۷۹/۲۶) و (۴۲۲/۹۶)، و کمترین مقدار مربوط به شرایط عدم همزیستی (۱۰۴/۸۱) میلی‌گرم بر گرم وزن تر است (شکل ۴)؛ بنابراین همزیستی استبرق با گونه‌های قارچ *G. fasiculatum*

[1] *Ipomoea purpurea* L.

و *G. mossae* به ترتیب باعث افزایش ۳۵۷/۲۶ و ۲۹۸/۷۳ درصدی پروتین نسبت به شرایط عدم تلقیح با میکوریزا شد. در این راستا، بررسی همزیستی میکوریزایی با گیاه کنجد نشان داد که کاربرد قارچ میکوریزا منجر به افزایش ۳۱ درصدی پروتئین در دانه‌های کنجد نسبت به شرایط عدم همزیستی با قارچ میکوریزا شد (Gholinezhad, 2017). بررسی دیگری نشان داد که کاربرد قارچ میکوریزا آربسکولار همزمان با مصرف فسفات بارور۱ باعث افزایش ۱۷/۴ درصدی در پروتئین دانه کتان روغنی نسبت به شرایط عدم استفاده از کود زیستی میکوریزا شد (Shojaeian kishi *et al*., 2019).

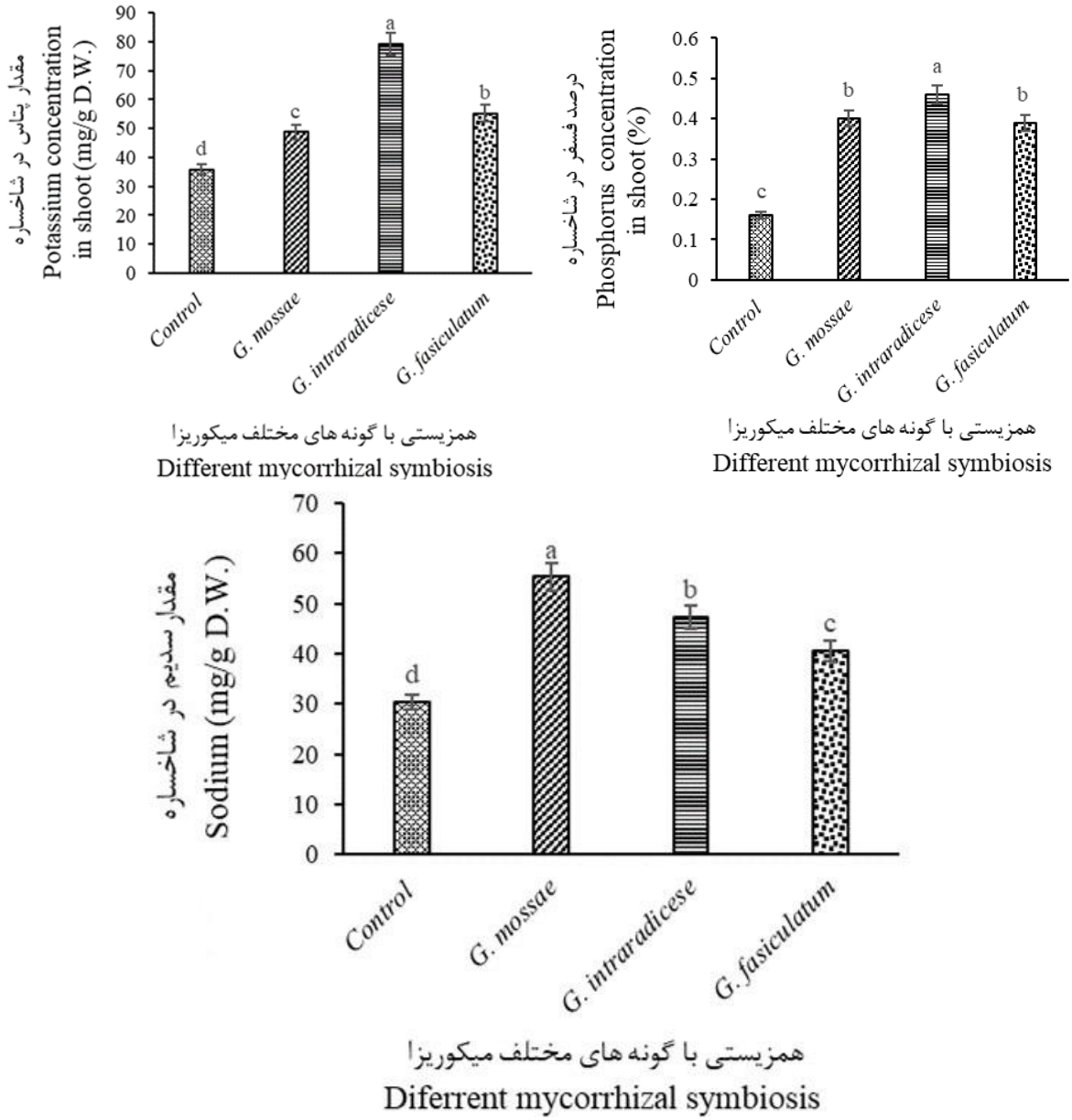



**شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پروتئین استبرق تحت همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

**Figure 4- Means comparison of antioxidant activity and protein of *Calotropis procera* Ait under symbiosis with different species of mycorrhiza**

تحلیل میانگین مربعات برای داده‌های عناصر فسفر، پتاس و سدیم نشان داد که همزیستی میکوریزایی به‌طور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۱$) بر تجمع این عناصر در اندام رویشی گیاه استبرق تأثیر گذار است (جدول ۴). از طرفی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین تأثیر همزیستی با گونه‌های مختلف میکوریزا نسبت به شرایط عدم همزیستی (شاهد) بر محتوی عناصر فسفر، پتاس و سدیم در اندام رویشی گیاه استبرق اختلاف وجود دارد. بیشترین مقدار فسفر و پتاس در شرایط همزیستی گیاه با قارچ *G. intraradices* به ترتیب با ۱۸۷ و ۱۲۰ درصد افزایش نسبت به شاهد بدست آمد (شکل ۵). هم‌چنین بین تأثیر همزیستی دیگر گونه‌های بررسی شده قارچ میکوریزا در پژوهش حاضر بر جذب عناصر فسفر و پتاس نسبت به شاهد اختلاف وجود دارد، به‌طوری‌که همزیستی با *G. mossae* و *G. fasiculatum* به ترتیب منجر به افزایش ۱۵۰ و ۱۴۳ درصدی فسفر در شاخساره استبرق نسبت به شاهد شدند (شکل ۵) و میزان تجمع پتاس در اندام هوایی استبرق در شرایط همزیستی *G. fasiculatum* و *G. mossae* به ترتیب ۱۵۴ و ۱۳۶ افزایش نسبت به شاهد داشته است (شکل ۵). افزون بر این، بین تأثیر همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا بر تجمع سدیم در اندام هوایی استبرق نسبت به شرایط عدم همزیستی تفاوت وجود داشت و بیشترین مقدار تجمع سدیم در شرایط همزیستی *G. mossae* با ۸۱ درصد افزایش نسبت به شاهد وجود داشت (شکل ۵). نتایج بررسی حاضر نشان داد که جذب سه عنصر فسفر، پتاس و سدیم بطور معنی‌داری تحت تأثیر همزیستی ریشه گیاه استبرق با سه گونه مختلف قارچ نسبت به شرایط عدم همزیستی افزایش داشته است. این یافته‌ها، هم‌راستا با نتایج پژوهش‌های قبلی بر روی گیاهان مختلفی مانند سویا (Andrade *et al*., 2004)، کاهو (Baslam *et al*., 2013)، چمن (Fall *et al*., 2015) و گوجه‌فرنگی (Bowles *et al*., 2018) است. همزیستی گیاهان با قارچ میکوریزا باعث افزایش انشعاب‌ها و طول ریشه آن‌ها می‌شود و در نتیجه ریشه این گیاهان تماس بیشتری با خاک پیدا می‌کنند و مقدار جذب آب

و عناصر غذایی از خاک افزایش می‌یابد (Pirzad *et al*., 2014). هم‌چنین در شرایط تنش شوری قارچ میکوریزا با جذب سدیم در اندام‌های خود مانع جذب آن توسط گیاه شده و منجر به افزایش نسبت جذب پتاسیم به سدیم می‌شود، در نتیجه اثر سمیت سدیم روی سنتز کلروفیل در شرایط همزیستی گیاهان با میکوریزا کاهش می‌یابد (Fatahi *et al*., 2014).




**شکل ۵- مقایسه میانگین عناصر فسفر، پتاس و سدیم در اندام رویشی استبرق تحت همزیستی با گونه‌های میکوریزا**

**under symbiosis with Figure 5- Means comparison of phosphorus, potassium and sodium content in shoots of *Calotropis procera* Ait different species of mycorrhizae**

**جدول ۴- تجزیه واریانس مقدار فسفر، پتاس و سدیم در اندام رویشی استبرق تحت شرایط همزیستی میکوریزا**

**under symbiosis with Table 4- ANOVA analysis of phosphorus, potassium and sodium content in shoots of *Calotropis Procera* Ait mycorrhizae**

| منبع تغییرات Source of variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean square | | |
|---|---|---|---|---|
| | | فسفر Phosphorus | پتاس Potassium | سدیم Sodium |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| تیمارهای میکوریزا<br>Mycorrhizae treatments | 3 | 0.053** | 988.89** | 332.91** |
| خطای آزمایش<br>Experimental error | 8 | 0.0001 | 0.41 | 0.41 |
| C.V. | | 0.02 | 1.17 | 1.48 |

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

** significant at 1% probability level

## نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی نتایج بررسی حاضر نشان داد که همزیستی گیاه استبرق با قارچ میکوریزا دارای تأثیر معنی‌دار و مثبتی بر رشد و نمو و ترکیبات فیتوشیمیایی این گیاه است. هم‌چنین این نتایج تأیید می‌کند بین تأثیر گونه‌های مختلف قارچ میکوریزا بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، و فعالیت‌های فیتوشیمیایی استبرق اختلاف وجود دارد و همزیستی با گونه *G. fasiculatum* بیشترین اثر را در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه داشت. هم‌چنین همزیستی با گونه‌های مختلف میکوریزا بر تجمع عناصر غذایی در اندام رویشی تأثیر معنی‌داری دارد و در بررسی حاضر همزیستی با گونه *G. intraradicese* بیشترین نقش را در افزایش میزان فسفر و پتاس در اندام هوایی استبرق داشت. همزیستی گونه‌های مختلف میکوریزا از طریق افزایش وزن ریشه و شاخساره منجر به افزایش عملکرد اندام‌های رویشی قابل کاربرد استبرق در طب سنتی می‌شوند، از طرفی افزایش عملکرد رویشی و هم‌چنین بهبود فعالیت‌های فیتوشیمیایی موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه قابل استحصال از این گونه دارویی خواهد شد که افزون بر افزایش بهره‌وری کاربردی منجر به ارزش افزوده اقتصادی برای کشاورزان و تولیدکنندگان این محصول می‌شود.

## سپاسگزاری

از دانشگاه زابل برای حمایت مالی پژوهش حاضر تحت پژوهانه IR-UOZ-GR-8952 تقدیر و تشکر می‌گردد.

## References

Alizadeh Ajirlo, S. and Farrokhpor, S. 2014. Effects of three mycorrhizal fungi on growth and development, colonization rate and phosphorus concentration in roots of marigold (*Tagetes erecta*). *Water and Soil Science*, *24*(4), pp.129-138. [In Persian].

Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., Abred, M.N. and Silveria, A.D.D. 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and rhizobium symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology*, *26*, pp.123-137. **doi: 10.1016/j.apsoil.2003.11.002**

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenolexidase in beta vulgaris. Plant Physiology, *24*, pp. 1–15

Bagheri Dehabadi, M., Moghadam, H., Chaichi, M.R. and Zilouie, N. 2017. The mycorrhiza and iron and zinc foliar application on quantitative and qualitative characteristics of forage sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Crops Improvement*, *19*(3), pp.799-815. [In Persian].

Baslam M., Garmendia I. and Goicoechea N. 2013. The arbuscular mycorrhizal symbiosis can overcome reductions in yield and nutritional quality in greenhouse-lettuces cultivated at inappropriate growing seasons. *Scientia Horticulturae*, *164*, pp.145-154. **doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.021**

Bergmann, J., Weigelt, A., van der Plas, F., Laughlin, D.C., Kuyper, T.W., Guerrero-Ramirez, N., Valverde-Barrantes, O.J., Bruelheide, H., Freschet, G.T., Iversen, C.M., Kattge, J., McCormack, M.L., Meier, I.C., Rillig, M.C., Roumet, C., Semchenko, M., Sweeney, C.J., van Ruijven, J., York, L.M. and Mommer, L.

2020. The fungal collaboration gradient dominates the root economics space in plants. *Science Advances*, *6*(27): eaba3756. **doi: 10.1126/sciadv.aba3756**

Bowles, T.M., Jackson, L.E. and Cavagnaro, T.R. 2018. Mycorrhizal fungi enhance plant nutrient acquisition and modulate nitrogen loss with variable water regimes. *Global Change Biology*, *4*(1), pp.171-182. **doi: 10.1111/gcb.13884**

Bowles, T.M., Barrios-Masias, F.H., Carlisle, E.A., Cavagnaro, T.R. and Jackson, L.E. 2016. Effects of arbuscular mycorrhizae on tomato yield, nutrient uptake, water relations, and soil carbon dynamics under deficit irrigation in field conditions. *Science of the Total Environment*, *566*, pp.1223-1234. **doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.178**

Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M. and Morelli, I. 2001. Antioxidant principles from Bauhinia terapotensis. *Journal of Natural Products*, *64*, pp.892-895. **doi: 10.1021/np0100845**

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, pp.248-254.

Bahadori, F., Sharifi Ashorabadi, A., Mirza, M., Matinizadeh, M. and Abdousi, V. 2015. The effects of plant growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on N, P and K uptake and yield of *Thymus daenensis* Clak. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *31*(3), pp.527-538. [In Persian]. **doi: 10.22092/ijmapr.2015.101925**

Brundrett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, *154*, pp.275-304. **doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x**

Chandrasekaran, M., Paramasivan, M. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi and antioxidant enzymes in ameliorating drought stress: a meta-analysis. *Plant Soil 480*, pp.295–303. **doi: 10.1007/s11104-022-05582-3**

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

Diedhiou, A.G., Mbaye, F.K., Mbodj, D., Faye, M.N., Pignoly, S., Ndoye, I., Djaman, K., Gaye, S., Kane, A. and Laplaze, L. 2016. Field trials reveal ecotype-specific responses to mycorrhizal inoculation in rice. *PloS One*, *11*(12): e0167014. **doi: 10.1371/journal.pone.0167014**

Farrar, N., Farsi, M.J., Asgari, H., Zamani, A.A. and Golestaneh, S.R. 2014. Insecticidal and deterrence effects of ethanol extract from *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) leaves against *Tribolium castaneum*, *T. confusum* (Col.: Tenebrionidae) and *Thiacidas postica* (Lep.: Noctuidae). *Agricultural Pest Management*, *1*(1), pp.23-35.

Fall, F., Diouf, D., Fall, D., Ndoye, I., Ndiaye, Ch., Kane, A. and Mustapha Bâ, A. 2015. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on growth, and nutrient uptake of the two grass species, *Leptochloa fusca* (L.) Stapf and *Sporobolus robustus* Kunth, under greenhouse conditions. *African Journal of Biotechnology*, *14*(39), pp.2770-2776.

Fatahi, M., Shamshiri, M.H. and Esmaelezadh, M. 2014. Evaluation of the physiological responses and leaves morphology of three inoculated pistachio rootstocks with arbuscular mycorrhizal fungi to salinity stress.

*Journal of Horticultural Science and Technology*, *15*, pp.469-482. [In Persian].

Firouzkoohi, F., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Mohkami, Z. and Yosefzaei, F. 2018. The effect of different solvents on total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of different organs of *Momordica charantia* L. cultured in Sistan region. *Ecophytochemistry Journal of Medicinal Plants*, *5*(4), pp.74-86. [In Persian].

Gholinezhad, E. 2017. Effect of two species mycorrhizal fungi on quantitative and qualitative yield of sesame (*Sesamum indicum* L.) landraces in different levels of drought stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *15*(1), pp.150-167. [In Persian]. **doi: 10.22067/gsc.v15i1.49403**

Giri, B. and Mukerji, G.K. 2004. Mycorrhiza inoculate alleviates salt stress in *Sesbania aegyptica* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, *14*, pp.307-312. **doi: 10.1007/s00572-003-0274-1**

Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S. 2002. Effect of the vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology*, *81*(1), pp.77-79. **doi: 10.1016/s0960-8524(01)00109-2**

Bazgir, E., Hatami, N., Sedaghati, E. and Darvishnia, M. 2020. Isolation and study of morphology and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi coexisting with the roots of some medicinal plants in Kerman province. *Agricultural Biotechnology Journal*, *12*(1), pp.23-44. [In Persian]. **doi: 10.22103/jab.2020.15110.1189**

Hindi, S.S. 2013. Calotropis procera: The miracle shrub in the Arabian peninsula. *International Journal Science and Engineering of Investment*, *2*(16), pp.48-57.

Hristozkova, M., Gigova, L., Geneva, M., Stancheva, I., Vasileva, I., Sichanova, M. and Mincheva, J. 2017. Mycorrhizal fungi and microalgae modulate antioxidant capacity of basil plants. Journal of Plant Protection Research, *57*(4), pp.417-426. **doi: 10.1515/jppr-2017-0057**

Hui, F., Liu, J., Gao, Q. and Lou, B. 2015. *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Environmental Sciences, 37*, pp.184-191. **doi: 10.1016/j.jes.2015.06.005**

Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in (*Foeniculum vulgare* mill.) on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology*, *93*, pp.307-311. **doi: 10.1016/j.biortech.2003.10.028**

Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A.K. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulture*, *116*, pp.227-239. **doi: 10.1016/j.scienta.2008.02.002**

Khaninejad, S., Khazaie, H.R., Nabati, J. and Kafi, M. 2013. Effect of three species of mycorrhiza inoculation on yield and some physiological properties of two potato cultivars under drought stress in controlled conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *14*(4), pp.558-574. [In Persian]. **doi: 10.22067/gsc.v14i4.21993**

Khasawneh, M., Elwy, H., Fawzi, N., Hamza, A., Chevidenka, A.R. and Hassan, A.H. 2011. Antioxidant activity, lipoxygenase inhibitory effect and polyphenolic compounds from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Research Journal of Phytochemistry*, *5*(2), pp.80-88. **doi: 10.3923/rjphyto.2011.80.88**

Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S. and Chen, B. 2014 – Relative importance of an arbuscular

mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*, *24*, pp.595-602. **doi: 10.1007/s00572-014-0578-3**

Little, E.L., Woodbury, R.O. and Wadsworth, F.H. 1974. Trees of Puerto Rico and the Virgin islands, vol. 2. Agriculture handbook 449. U.S. Department of agriculture, Forest Service, Washington, pp.1024.

Ma, J., Wang, W., Yang, J., Qin, S., Yang, Y., Sun, C., Pei, G., Zeeshan, M., Liao, H., Liu, L. and Huang, J. 2022. Mycorrhizal symbiosis promotes the nutrient content accumulation and affects the root exudates in maize. *BMC Plant Biology*, *22*, pp.64. **doi: 10.1186/s12870-021-03370-2**

Mathimaran, N., Mahaveer, P.S., Mohan, R.B. and Bagyaraj, D.J. 2017. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and drought tolerance in crop plants. *Mycosphere*, *8*(3), pp.361-376.

Mitra, D., Guerra Sierra B.E., Khoshru, B., Villalobos, S.D.L.S., Belz, C., Chaudhary, P., Noroozi Shahri, F., Djebaili, R., Adeyemi, N.O., El-Ballat, E.M., El-Esawi, M.A., Moradi, S., Mondal, R., Senapati, A., Panneerselvam, P. and Das Mohapatra, P.K. 2021. Impacts of arbuscular mycorrhizal fungi on rice growth, development, and stress management with a particular emphasis on strigolactone effects on root development. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *52*(14), pp.1591-1621. **doi: 10.1080/00103624.2021.1892728**

Orujei, Y., Shabani, L., Sharifi Tehrani, M., Aghababaei, F. and Enteshari, S. 2013. Dual effects of two mycorrhizal fungi on production of glycyrrhizin total phenolic and total flavonoids compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, *5*(17), pp.75-88. [In Persian].

Parrotta, J.A. 2001. Healing plants of Peninsular India. CAB International, Wallingford, UK and New York. 944 p.

Perner, H., Rohn, S., Driemel, G., Batt, N., Schwarz, D., Kroh, L.W. and George, E. 2008. Effect of nitrogen species supply and mycorrhizal colonization on organosulfur and phenolic compounds in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, pp.3538-3545. **doi: 10.1021/jf073337u**

Pirzad, A.R., Habibzadeh, Y. and Jalilian, J. 2014. Seed yield variations mungbean (*Vigna radiate* L.) at mycorrhizal symbiosis under water stress. *Research in Field Crops*, *2*(2), pp.33-43. [In Persian].

Pouraali, S., Hatamzadeh, A. and Ehteshami, S.M.R. 2015. Investigation of mycorrhizal and growth promoting bacteria symbiosis on quantitative and qualitative indices of *Aloe vera*. *Iranian Journal of Seed Science and Research*, *2*(2), pp.61-70. [In Persian].

Qureshi, A.A., Prakash, T., Patil, T., Viswanath Swamy, A.H.M., Veeran Gouda, A., Prabhu, K. and Ramachandra Setty, S. 2007. Hepatoprotective and antioxidant activities of flowers of *Calotropis procera* (Ait) R.Br. in CCl4 induced hepatic damage. *Indian Journal of Experimental Biology*, *45*(3), pp.304-310.

Ramakrishnan, K. and Bhuvaneswari, G. 2014. Effect of inoculation of am fungi and beneficial microorganisms on growth and nutrient uptake of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. (Finger millet). *International Letters of Natural Sciences*, *13*, pp.59-69. **doi: 10.18052/www.scipress.com/ilns.13.59**

Rashidi, S., Yousefi, A.R., Pour Yousef, M. and Goicoechea, N. 2021. Effect of three species of mycorrhizal fungus on photosynthesis, growth and secondary metabolites content of (*Ipomoea purpurea* L.). *Iranian*

*Journal of Weed Science*, *16*(2), pp.99-114. [In Persian]. **doi: 10.22092/ijws.2020.127905.1352**

Rasouli Sedghiani, M.H., Gharemalek, T., Besharati, H. and Tavassoli, A. 2011. Effects of PGPR and AM fungi on growth and Zn uptake by corn plant in a Zn- contaminated soil. *Water and Soil Science*, *21*(2), pp.135-147. [In Persian].

Salarpouri, A., Hajeb Nowdezh, R., Behzadi, S. and Darvishi, M. 2019. Studying the uses and economic potentials of *Calotropis procera*. *Ecology of Water Resource Journal*, *2*(1), pp.11-17. [In Persian].

Šaponjac, V.T., Kovačević, S., Šeregelj, V., Šovljanski, O., Mandić, A., Cetković, G., Vulić, J., Podunavac-Kuzmanović, S. and Jasna Canadanović-Brunet, J. 2021. Improvement of Carrot Accelerated Solvent Extraction Efficacy Using Experimental Design and Chemometric Techniques. *Processes, 9*(9), 1652; **doi.org/10.3390/pr9091652**

Sharma, A.K., Kharb, R. and Kaur, R. 2011. Pharmacognostical aspects of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *2*(3), pp.480-488.

Shahabivand, S., Parvaneh, A. and Aliloo, A.A. 2018. The cadmium toxicity in *Helianthus annuus* can be modulated by endosymbiotic fungus (Piriformospora indica). *Journal of Genetic Resources*, *4*(1), pp.44-55. **doi: 10.22080/jgr.2018.14168.1102**

Shahabivand, S., Parvaneh, A. and Aliloo, A.A. 2017. Root endophytic fungus Piriformospora indica affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *145*, pp.496-502. **doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.064**

Shahabivand, S., Zare-Maivan, H., Goltapeh, E.M., Sharifi, M. and Aliloo, A.A. 2012. The Effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *60*, pp.53-58. **doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.018**

Shojaeian kishi, F., Yadavi, A., Salehi, A. and Movahhedi Dehnavi, M. 2019. Assessment of agronomical traits and photosynthesis pigments of linseed (*Linum usitatissimum* L. cv. Norman) under irrigation cut-off condition and application of mycorrhiza fungi and phosphate bio fertilizer in Yasouj. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *29*(4), pp.65-81. [In Persian].

Singh, R.P., Murthy, K.N.C. and Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, pp.81-86. **doi: 10.1021/jf010865b**

Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, *28*, pp.49-55. **doi: 10.5344/ajev.1974.28.1.49**

Smith, S.E. and Read, D. 2008. Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition). pp.611-636.

Tahir, S.M., Victor, K. and Abdolkadir, S. 2011. The effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2,) concentration on callus induction in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, *19*(2), pp.213-217.

Tedersoo, L., Bahram, M. and Zobel, M. 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and

community biology. *Science*, *367*: eaba1223. **doi: 10.1126/science.aba1223**

Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Saxena, A.K. and Singh, D.P. 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, *14*, pp.605-611. **doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00533.x**

Wambsganss, J., Freschet, G.T., Beyer, F., Goldmann, K., Prada-Salcedo, L.D., Scherer-Lorenzen, M. and Bauhus, J. 2021. Tree species mixing causes a shift in fine-root soil exploitation strategies across European forests. *Functional Ecology*, *35*, pp.1886-1902. **doi: 10.1111/1365-2435.13856**

Watanabe, F.S. and Olsen, S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO3 extracts from soil. *Soil Science Society of America Proceeding*, *29*, pp.677-678. **doi: 10.2136/sssaj1965.03615995002900060025x**

Williams, V. and Twine, S. 1960. Flame Photometric Method for Sodium, Potassium and Calcium. In: Peach, K. and Tracey, M.V., Eds., Modem Methods of Plant Analysis, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 5, 3-5.

Yan, H., Freschet, G.T., Wang, H., Hogan, J.A., Li, S., Valverde-Barrantes, O, J., Fu, X., Wang, R., Dai, X., Jiang, L., Meng, S., Yang, F., Zhang, M. and Kou, L. 2022. Mycorrhizal symbiosis pathway and edaphic fertility frame root economics space among tree species. *New Phytologist*, *234*(5), pp.1639-1653. **doi: 10.1111/nph.18066**

Yang, Y., Tang, M., Sulpice, R., Chen, H., Tian, S. and Ban, Y. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi alter fractal dimension characteristics of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings through regulating plant growth, leaf water status, photosynthesis, and nutrient concentration under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*, pp.612-625. **doi: 10.1007/s00344-013-9410-0**

Zarea, M.J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F. and Varma, A. 2012. Effect of Piriformospora indica and Azospirillum strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry*, *45*, pp.139-146. **doi: 10.1016/j.soilbio.2011.11.006**

Zimare, S.B., Borde, M.Y., Jite, P.K. and Malpathak, N.P. 2013. Effect of AM Fungi (Gf, Gm) on Biomass and Gymnemic Acid Content of *Gymnema Sylvestre* (Retz.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B. Biological Sciences*, *83*(3), pp.439-445. **doi: 10.1007/s40011-013-0159-9**

Zhang, R.Q., Zhu, H.H., Zhao, H.Q. and Yao, Q. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways. *Journal of Plant Physiology*, *170*(1), pp.74-79. **doi: 10.1016/j.jplph.2012.08.022**

Zhu, X., Song, F. and Xu, H. 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of maize plants under temperature stress. *Mycorrhiza*, *20*(5), pp.325-332. **doi: 10.1007/s00572-009-0285-7**

**Journal of Crop Science Research in Arid Regions/ Volume 5, Issue 3, Winter 2023, P. 635-653**

# Investigation of symbiosis effect of different species of mycorrhiza on growth and phytochemical indices of *Calotropis procera* Ait.

**Marziyeh Nouri[1], Mahmood Soluki[2], Abdolrahman Rahimian Boogar[3*], Mehdi Aran[3], Zinab Mohkami[4]**

[1] Graduate Student, Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
[2] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
[3] Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
[4] Department of Agronomy, Institute of Zabol, Zabol, Iran
[*]Corresponding Author: a.rahimian@uoz.ac.ir

Received: 4 January 2023 Accepted: 11 march 2023 **DOI: 10.22034/CSRAR.2023.379437.1309**

## Abstract

**Introduction:** The Calotropis procera Aiton plant is a valuable and effective medicinal species used to treat various diseases, including as an anti-carminative and for indigestion, as well as for anticancer and anticonvulsant treatments. This species naturally inhabits fragmented habitats in southern Iran, particularly near the coasts of the Persian Gulf and the Oman Sea, in the arid and semi-arid regions of Sistan and Baluchistan, Khuzestan, Bushehr, and Hormozgan. On the other hand, due to the discovery of adverse effects caused by chemical drugs, people have turned their attention towards using medicinal plants. The health of agricultural products, especially medicinal plants, has special importance. The symbiosis of plants with mycorrhiza can be lead to improve of the root development and will affect on the absorption of water and nutrients. Aim of this study was investigate the effects of symbiosis between *C. procera* Aiton. with three different species of mycorrhizal on some phytochemical and antioxidant activity, and content of potassium, phosphorus, and sodium in shoots of *C. procera* Aiton.

**Materials and Methods:** This research was conducted in the greenhouse of the Horticultural Science Department, University of Zabol, Zabol, Iran. Transplants were cultured in the soil medium in pot condition. This experiment was carried out in a completely randomized design with four treatments include inoculation with three different mycorrhizal fungi (*Glomus intraradicese, Glomus fasiculatum*, and *Glomus mosseae*) and control (without inoculation) and three replicate. Meusered indices were assessed 8 weeks after transplanting. Measured parameters include; growth indices such as fresh and dry weight of root and shoot, and phytochemical indices are chlorophyll a and b, Carotenoid, phenol, flavonoid, antioxidant activity, protein, and concentration of potassium, phosphorus, and sodium in shoots. Data were analyzed by ANOVA test using JMP, and means were compared using the LSD test at $P<0.01$.

**Results and Discussion:** The results of variance analysis were shown significant effects of mycorrhizal symbiosis on all investigated indices ($P \leq 0.01$). Also, means comparison shows a significant difference between the effects of different mycorrhiza species. The highest content of chlorophyll a and carotenoid was obtained in symbiosis with *G. mossae*, and the highest content of chlorophyll b existed in symbiosis with *G. fasiculatum* and *G. intraradicese*. In this regard, it has been found that mycorrhizal symbiosis leads to an increase in water absorption, and an improvement in the absorption of nutrients by the plant, thereby leading to an increase in chlorophyll synthesis enzymes activity. symbiosis of *G. fasiculatum* had the highest effects on increasing phenol and antioxidant activity. increase in antioxidant activity leading to strong suppression of reactive oxygen species, which ultimately increases the remedial capability of *C. procera* Aiton. The highest amount of flavonoid was observed in the condition of symbiosis with G. intraradicese and *G. fasiculatum*, and the highest content of protein was observed in condition of symbiosis with *G. fasiculatum* and *G.*

*mossae*. Symbiosis with the *G. intraradicese* significantly increased the concentration of potassium and phosphorus in shoots of *C. procera* Aiton, while symbiosis with G. mossae causes to a significant increase in sodium concentration. Generally, the results of the current study were shown that symbiosis with G. fasiculatum and G. intraradicese are more useful than symbiosis with G. mossae. The symbiosis of plants with mycorrhiza fungi increases the volume and length of their roots, as a result of which the roots have more contact with the soil, and the amount of water and nutrient absorption from the soil increases.

**Conclusion:** results of the current study demonstrate that the phytochemical, antioxidant activity, and concentration of potassium and phosphorus and sodium have differed among extract and shoots related to symbiosis of *C. procera* Aiton and species of fungi. And symbiosis with *G. fasiculatum* had the greatest effect in increasing the production of secondary metabolites.

**Keywords:** Antioxidant, Essential oil, Inoculation, Secondary metabolite, Yield