

پاسخ‌های فیتوشیمیایی و مورفولوژیکی گیاه دارویی شاییزک (*Atropa belladonna* L.) به باکتری‌های محرک رشد در شرایط گلخانه‌ای

محمد اینانلو^۱، مصطفی حیدری^۲، حسنعلی نقدی‌بادی^{۳*}، مجید تولیت ابوالحسنی^۴، حسن مکاریان^۲،
محمد رضا عامریان^۲

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۴- جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران

*آدرس مکاتبه: کرج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی

صندوق پستی (مهرویل): ۳۱۳۷۵-۱۳۶۹

تلفن: ۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)

پست الکترونیک: naghdibadi@yahoo.com

doi: 10.29252/jmp.4.72.228

تاریخ تصویب: ۹۷/۱۲/۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۲

چکیده

مقدمه: آتروپین و اسکوپولامین از آلکالوئیدهای مهم گیاه شاییزک هستند که در صنایع دارویی کاربرد فراوان دارند.

هدف: تعیین اثرات باکتری‌های محرک رشد بر خصوصیات فیتوشیمیایی و مورفولوژیکی گیاه شاییزک در شرایط گلخانه‌ای.

روش بررسی: این آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل باکتری‌های محرک رشد شامل عدم تلقیح، سودوموناس، ازتوباکتر، سودوموناس + ازتوباکتر، تیوباسیلوس + گوگرد به عنوان عامل اول و کود شیمیایی در سه سطح عدم مصرف کود شیمیایی یا شاهد، ۵۰ درصد کود توصیه شده و ۱۰۰ درصد کود توصیه شده به عنوان عامل دوم بودند.

نتایج: باکتری‌های محرک رشد و کود شیمیایی و اثر متقابل آنها بر صفات مورفوفیزیولوژیک و فیتوشیمیایی مورد مطالعه تأثیر معنی داری ($P < 0/01$) داشتند. بیشترین مقادیر حجم ریشه، قطر ریشه و وزن خشک ریشه در تیمار ازتوباکتر با ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده به دست آمد. بیشترین میزان آتروپین و اسکوپلامین در برگ (به ترتیب ۱۹/۵۸ و ۷/۷۷ میلی گرم بر گرم ماده خشک) در تیمار عدم تلقیح باکتری با ۵۰ درصد کود توصیه شده حاصل شد. بیشترین میزان آتروپین ریشه (۷/۶۹ میلی گرم بر گرم ماده خشک) مربوط به تیمار تیوباسیلوس + گوگرد با ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده بود و بیشترین میزان اسکوپولامین ریشه (۵/۶۹ میلی گرم بر گرم ماده خشک) در تیمار عدم تلقیح با ۵۰ درصد کود توصیه شده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که باکتری‌های محرک رشد سبب بهبود عملکرد کمی و کیفی گیاه شاییزک شده‌اند.

کل واژگان: *Atropa belladonna* L.، آتروپین، آلکالوئید، اسکوپولامین، باکتری‌های محرک رشد



مقدمه

رویکرد، میزان استفاده و مصرف داروهای گیاهی و گیاهان دارویی در سراسر جهان روز به روز در حال افزایش است [۱]. در حال حاضر یک سوم داروهای مورد استفاده بشر را داروهایی با منشأ گیاهی تشکیل می‌دهند. نیاز روزافزون کارخانه‌های داروسازی و لزوم حفظ منابع طبیعی گیاهی، اهمیت مطالعه روی کشت و تولید گیاهان دارویی و معطر را دو چندان نموده است [۲] و علاقه برای تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای محصولات طبیعی به طور مداوم در جهان رو به افزایش است [۳].

گیاه دارویی شایبک (*Atropa belladonna* L.) از تیره‌ی سیب‌زمینی و خانواده سولاناسه و جنس آتروپا است [۴]. گیاهی است پایا و به ارتفاع ۱ تا ۱/۵ متر و ساقه‌های آن استوانه‌ای، پوشیده از تار و در انتها دارای تقسیمات دوتایی یا سه تایی است. دارای ریشه‌هایی دراز، منشعب، ضخیم، گوشتدار و به رنگ حنایی است [۵]. این گیاه متعلق به ناحیه خزری است و در حاشیه جنگل‌ها و زیر درختان می‌روید. پراکندگی جغرافیایی این گونه در اروپا، ترکیه و شمال ایران است [۶]. محل رویش آن در ایران مناطق شمالی از جمله طوالش، اسالم، اسالم به خلخال و اطراف آستارا است [۷].

آلکالوئیدهای گیاهی، یکی از بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و صنعتی هستند که در بسیاری از گیاهان بررسی شده‌اند. تعدادی از گیاهان خانواده سیب‌زمینی، از جمله شایبک (*Atropa belladonna*) بنگ دانه (*Hyoscyamus niger*)، تاتوره (*Datura stramonium*) و مهرگیاه (*Mandragora officinarum*) نیز در ایران به حالت خودرو می‌رویند که به دلیل داشتن آلکالوئیدهای با ارزش دارای خاصیت دارویی هستند [۸]. شایبک بر روی سلسله اعصاب تأثیر کرده و اثرات آرام‌کننده و ضد تشنج دارد. از شایبک در درمان بیماری‌های مختلف مانند آسم، سیاه سرفه، سرع، دفع غیرعادی ادرار، سرعت انزال، دردهای معدی، یبوست‌های مقاوم، دردهای آپاندیسیت، دریا گرفتگی (به علت دارا بودن آتروپین)، سرگیجه، قولنج‌های کبدی و کلیوی، ترشح فراوان عرق، عرق شبانه مسلولین و در بسیاری موارد دیگر استفاده به

عمل می‌آید. هیوسامین قادر است انقباضاتی را که در اثر به کار بردن گلوکوزیدهای ملین در روده‌ها ایجاد می‌شود بدون کم کردن اثر مسهلی آنها برطرف نماید. اثر اسکوپولامین مشابه هیوسامین است ولی روی مراکز عصبی مؤثرتر می‌باشد [۹]. برخی از سولاناسه‌ها را "میدریاتیک" گویند، زیرا دارای آلکالوئیدهایی مانند اسکوپولامین و آتروپین هستند که بازکننده‌ی مردمک چشم است [۱۰].

امروزه به کارگیری جانداران مفید خاکزی تحت عنوان کودهای زیستی به عنوان طبیعی‌ترین و مطلوب‌ترین راه حل برای زنده و فعال نگه داشتن سیستم حیاتی خاک در اراضی کشاورزی مطرح می‌باشد. امروزه عقیده بر این است که روابط متقابل بین ریشه‌ی گیاه و ریز موجودات خاک توسط مداخلات انسان از طریق فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی تحت تأثیر قرار گرفته است [۱۱]. کیفیت خاک نه تنها به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن وابسته است بلکه ارتباط بسیار نزدیکی با خصوصیات بیولوژیکی آن دارد [۱۲]. کودهای معدنی پس از استفاده در ابتدای فصل زراعی، ممکن است فرم شیمیایی قابل استفاده عنصر برای گیاه به فرم‌های دیگر تبدیل شود و یا از طریق آبشویی از دسترس گیاه خارج شود [۱۳]. بنابراین جهت افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی، روش‌های مصرف کود باید به گونه‌ای تغییر کند که مواد غذایی مورد نیاز گیاه در طول یک مدت طولانی و بدون تلفات در اختیار گیاه قرار گیرد [۱۴]. استفاده از کودهای زیستی حل‌کننده فسفر و تثبیت‌کننده نیتروژن از جمله روش‌های عملیات زراعی بهینه است که می‌تواند این نقص را بر طرف نماید [۱۵]. تعدادی از کودهای زیستی از باکتری‌های مفیدی تشکیل شده‌اند که هر یک از آنها به منظور خاصی مانند کمک به حلالیت و دسترسی بیشتر فسفر و رهاسازی یون‌های فسفات، پتاسیم و آهن از ترکیبات نامحلول تولید می‌شوند. این باکتری‌ها معمولاً در اطراف ریشه‌ی گیاه مستقر شده و گیاه را در جذب عناصر همیاری می‌کنند [۱۸ - ۱۶]. مسلم است این باکتری‌ها بیش از یک نقش دارند، یعنی علاوه بر کمک به جذب عنصری خاص باعث موارد دیگری نظیر: جذب سایر عناصر، کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک، تحریک بیشتر رشد گیاه و افزایش کمی و کیفی



مورفولوژیکی گیاه دارویی شایبیک به باکتری‌های محرک رشد در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۵ در گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در کرج انجام شد. قبل از انجام آزمایش، از خاک نمونه‌برداری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین شد و بافت خاک مورد استفاده لومی سیلتی با میزان 0.071 درصد نیتروژن، $48/9 \text{ mg.kg}^{-1}$ فسفر، $33/6 \text{ mg.kg}^{-1}$ پتاسیم، EC برابر 0.95 dSm^{-1} و pH برابر $8/3$ بود.

این آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل باکتری‌های محرک رشد: عدم تلقیح (N)، سودوموناس (*Pseudomonas putida* strain Ps; S)، ازتوباکتر (*Azotobacter vinelandii* strain O4; A) + سودوموناس + ازتوباکتر (SA)، تیوباسیلوس (*Thiobacillus* spp.) + گوگرد (T) به عنوان عامل اول و تیمار کود شیمیایی در سه سطح: عدم مصرف کود شیمیایی «شاهد» (F_1)، ۵۰ درصد کود توصیه شده (F_2) و ۱۰۰ درصد کود توصیه شده (F_3) به عنوان عامل دوم بودند.

بذر گیاه شایبیک در تاریخ ۱۳۹۵/۰۸/۰۴ در بستر گلخانه کشت و در تاریخ ۱۳۹۵/۱۰/۱۵ نشاء‌ها به گلدان‌ها جهت اعمال تیمارها منتقل شدند. جهت اجرای طرح از گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و قطر دهانه ۲۲ سانتی‌متر استفاده شد. در سطح هر گلدان ۲ نشاء کاشته شد و در نهایت در مرحله گلدهی، گیاهان از سطح هر گلدان برداشت شدند. اعمال تیمار کودی مرحله اول در تاریخ ۱۳۹۵/۰۸/۰۴ و اعمال تیمار کودی مرحله دوم در تاریخ ۱۳۹۵/۱۰/۱۵ صورت پذیرفت. در این آزمایش، سایر عملیات زراعی برحسب نیاز انجام شد. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات نیز با به گل رفتن گیاه در خرداد ۱۳۹۶ آغاز شد. صفات مورد اندازه‌گیری شامل حجم ریشه، قطر ریشه، طول ریشه اصلی، وزن خشک ریشه بوته، وزن خشک اندام هوایی بوته، نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه، میزان آتروپین و اسکوپولامین گیاه بودند.

محصول می‌شوند. بدین لحاظ از نظر علمی به این باکتری‌ها، باکتری‌های محرک رشد گیاه گویند. این کودها، آلودگی زیست محیطی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی را کاهش داده و نیز موجب احیا و حفظ محیط زیست می‌شوند [۱۹، ۲۰].

به هرحال کودهای زیستی به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای کودهای شیمیایی، به منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات در کشاورزی پایدار مطرح شده‌اند [۲۱] و در این راستا تحقیقات متعددی روی گیاهان مختلف انجام شده است. کاربرد سطوح مختلف کودهای شیمیایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم و کودهای زیستی شامل آزوسپیریوم، ازتوباکتر و باسیلوس روی گیاه رازیانه نشان داد که بالاترین رشد و زیست توده تر و خشک گیاه در تیمار تلفیق ۵۰ درصد کودهای شیمیایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم به هم راه آزوسپیریوم، ازتوباکتر و باسیلوس حاصل شد [۲۲]. کومار و همکاران [۲۳] گزارش نمودند کاربرد آزوسپیریوم همراه با ۹۳/۷۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و فسفر سبب افزایش رشد، زیست توده تر و خشک گیاه و عملکرد اسانس گیاه درمنه شده و کاربرد کودهای زیستی تأثیری بر اجزا اسانس گیاه نشان نداد. نتایج تحقیق یوسف و همکاران [۲۴] بر گیاه دارویی مریم گلی نشان داد که استفاده از کود زیستی حاوی آزوسپیریوم و ازتوباکتر، سبب افزایش ارتفاع بوته و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی گیاه در چین‌های اول و دوم در طی دو فصل شد. آراز و همکاران [۲۵] امکان استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی را در گیاه رازیانه بررسی کرده و نتیجه گرفتند که رشد رویشی، عملکرد و میزان اسانس گیاه رازیانه در تیمارهای کود زیستی افزایش یافت. کوچکی و همکاران [۲۶] گزارش کردند که کاربرد کودهای زیستی مانند نیتروکسین، سوپرنیتروپلاس و باکتری حل‌کننده فسفات (*Pseudomonas fluorescens*) نقش مفید و مؤثری در بهبود ویژگی‌های رشد، عملکرد اندام هوایی و خصوصیات کیفی و اسانس گیاه دارویی زوفا دارد.

با توجه به اهمیت دارویی گیاه شایبیک و مصارف گسترده آن در صنایع دارویی، این تحقیق در راستای تولید پایدار این گیاه با هدف حصول حداکثر عملکرد کمی و کیفی مطلوب انجام شده است که طی آن پاسخ‌های فیتوشیمیایی و



استخراج و جمع‌آوری شد. برای آگیری از محلول حاصل، به محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، سدیم سولفات انیدرید اضافه و سپس بوسیله کاغذ صافی صاف شد. سپس با دستگاه روتاری حلال آن کاملاً خارج شد و مواد باقیمانده با ۵ سی‌سی متانول ویژه HPLC جمع‌آوری شد. برای انحلال کامل رسوب در متانول، به مدت چند دقیقه در اولتراسونیک قرار داده شد. به این ترتیب نمونه‌ها برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

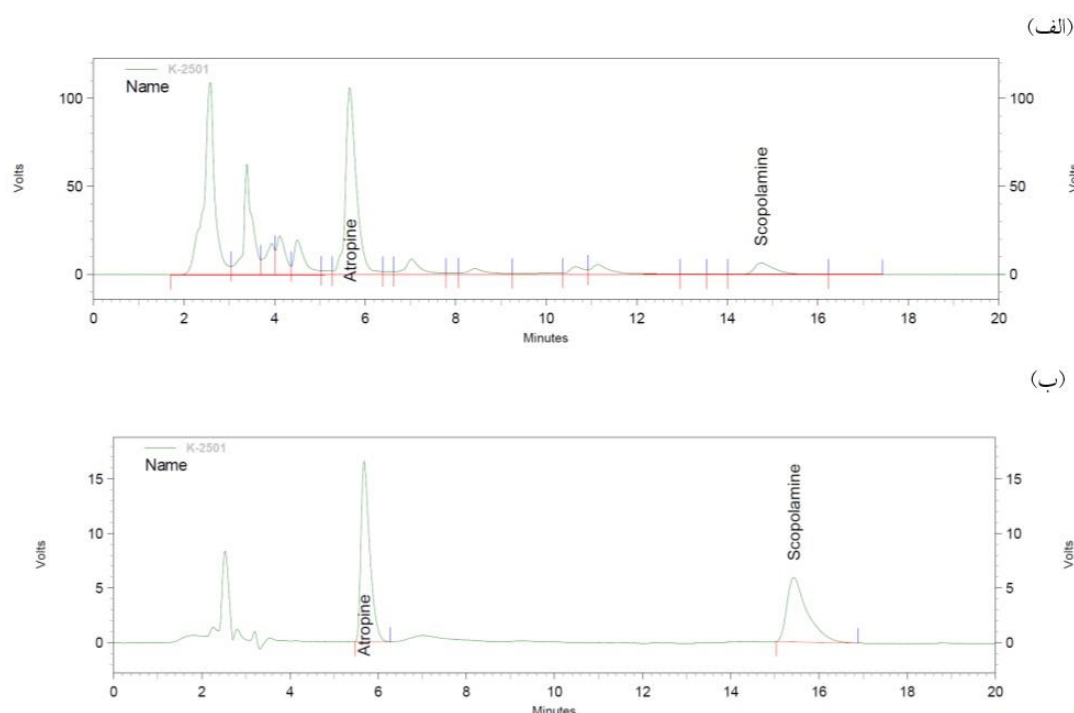
مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

روش کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار آتروپین و اسکوپولامین موجود در گیاه شایبک، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography) (HPLC) است. در بین روش‌های گوناگون آنالیز آلکالوئیدها، روش HPLC با ردياب ماورای بنفش، به دلیل گزینش‌پذیری مناسب و حساسیت بالا، بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. در این تحقیق برای آنالیز عصاره از دستگاه HPLC مدل Knauer با rate Flow، ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده، آمونیوم استات ۱۰۰ mM، دی‌اکسان، استونیتریل، به نسبت (۸۶۰:۵۰:۴۰) با استیک اسید pH= ۵/۶ و دکتور UV با طول موج ۲۵۴ nm ستون (4.9*250) CN 5 micrometer استفاده شد. حجم هر بار تزریق ۵۰ میکرولیتر بود. میزان دو آلکالوئید آتروپین و اسکوپولامین در نمونه‌های گیاه بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده (شکل شماره ۱) و با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه شد. منحنی استاندارد نیز بر اساس سطح زیرمنحنی دو ترکیب استاندارد (آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید) در ۴ غلظت ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترسیم شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد و آنالیز داده‌های این تحقیق توسط نرم‌افزار SAS انجام شد.

به منظور تعیین حجم ریشه از قانون ارشمیدس استفاده شد، بدین منظور با قراردادن ریشه‌ها در استوانه‌های مدرج و تعیین میزان تغییر سطح آب، حجم ریشه اندازه‌گیری شد. برای سنجش قطر ریشه از کولیس دیجیتال استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌متر گزارش شد. برای خشک کردن اندام‌های مختلف گیاه و نیز حفظ کیفیت، نمونه‌ها به صورت یکنواخت در قفسه‌ها پخش شده و در دمای اتاق خشک شد سپس نمونه‌ها توسط ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه آتروپین و اسکوپولامین برگ و ریشه نیز از روش عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش فاجینی و دلوکا [۲۷] با اندکی تغییر انجام شد [۲۷، ۲۸] بر اساس این روش، مقدار یک گرم از پودر شایبک را به ارلن ۲۵۰ سی‌سی انتقال داده و به آن ۵ سی‌سی آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ سی‌سی متانول و ۷۵ سی‌سی کلروفرم به آن اضافه شد و درب آن بسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک قرار نگهداری شد و بعد بوسیله کاغذ صافی و پنبه صاف شد و به کمک ۱۰ سی‌سی کلروفرم محتویات باقیمانده در ارلن نیز از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده، در یک بالن ۲۰۰ سی‌سی به دستگاه روتاری متصل شد تا حلال‌های آن تبخیر و خارج شود. به رسوب حاصل، ۲۵ سی‌سی کلروفرم و ۱۰ سی‌سی اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد. برای بهتر حل شدن رسوب میتوان از دستگاه اولتراسونیک برای مدت زمان کوتاهی استفاده کرد. محلول فوق را به یک دکانتور منتقل کرده و پس از ایجاد دو فاز مجزا، فاز پایینی که فاز کلروفرمی بود، از دکانتور خارج و فاز بالایی را که فاز آبی بود، نگه داشته شد. در صورت ایجاد اینترفاز (یک لایه بین دو فاز آبی و کلروفرمی) از چند میلی‌لیتر محلول آب نمک اشباع برای جداسازی بهتر دو فاز استفاده شد. با استفاده از چند قطره محلول آمونیاک pH محلول بین ۱۱ - ۱۰ تنظیم شد. ۲۵ سی‌سی کلروفرم عمل استخراج انجام شد، در این مرحله فاز کلروفرمی (فاز پایینی) در بالن‌های کوچکتر جمع‌آوری و فاز آبی مجدداً با ۱۰ سی‌سی کلروفرم





شکل شماره ۱- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین اندام گیاهی (الف) و محلول استاندارد (ب)

نتایج

صفات کمی

حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین و کمترین مقدار طول ریشه اصلی (به ترتیب ۵۴/۷۶ و ۲۱/۴۷ سانتی متر) به ترتیب در تیمار F_1T (تلقیح با باکتری تیوباسیلوس+گوگرد و عدم استفاده از کود شیمیایی) و F_1N (عدم تلقیح باکتری های محرک رشد و عدم استفاده از کود شیمیایی) حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین و کمترین وزن خشک اندام هوایی (به ترتیب ۲۲/۲۱ و ۸/۷۴ گرم) به ترتیب در تیمار F_3T (تلقیح با باکتری تیوباسیلوس+گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_1S (تلقیح با باکتری سودوموناس و عدم استفاده از کود شیمیایی) حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین و کمترین وزن خشک ریشه (به ترتیب ۴۴/۵۲ و ۱۵/۵۱ گرم) در تیمار F_2A (تلقیح با باکتری ازتوباکتر و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و تیمار F_1S (تلقیح با باکتری سودوموناس و عدم استفاده از کود شیمیایی) حاصل شد (جدول شماره ۲). نتایج و بررسی ها درخصوص نسبت وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه نیز بیانگر آن بود که بیشترین نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه (۰/۸۴)

نتایج نشان داد باکتری های محرک رشد و کود شیمیایی و همچنین تأثیر اثر متقابل آنها تأثیر معنی داری ($P \leq 0/01$) بر صفات کمی شامل حجم ریشه، قطر ریشه، طول ریشه اصلی، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و نسبت وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه داشت (جدول شماره ۱). بیشترین و کمترین مقادیر حجم ریشه (به ترتیب ۱۷۰۳۴/۷ و ۳۲۴۰/۳ سانتی متر مکعب) به ترتیب در تیمارهای F_2A (تیمار ازتوباکتر و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_1N (عدم تلقیح باکتری های محرک رشد و عدم استفاده از کود شیمیایی) حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین مقدار قطر ریشه در تیمارهای F_2A (تلقیح با باکتری ازتوباکتر و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_2N (عدم تلقیح باکتری های محرک رشد و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) با مقادیر به ترتیب ۲۲/۳۸ و ۲۱/۷۹ میلی متر مشاهده شد. همچنین کمترین مقدار قطر ریشه (۱۱/۰۰ میلی متر) در تیمار F_1N (عدم تلقیح باکتری های محرک رشد و عدم استفاده از کود شیمیایی)



جدول شماره ۱- تجزیه واریانس پاسخ‌های مورفولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه شاپورک به باکتری‌های محرک رشد و کودهای شیمیایی در شرایط گلخانه‌ای

منابع تغییرات (S.O.V)	مانگین مربعات (M.S)					درجه آزادی (D.F)	منابع تغییرات (S.O.V)
	نسبت وزن خشک اتلام	وزن خشک	وزن خشک	وزن خشک	طول ریشه اصلی		
تکرار (R)	۰/۰۰۶۳ ^{ns}	۰/۰۰۵۴ ^{ns}	۰/۰۰۸۶ ^{ns}	۰/۰۰۳۳ ^{ns}	۰/۰۳۳ ^{ns}	۲	تکرار (R)
باکتری محرک رشد (B)	۴/۰۶ ^{**}	۵/۱۸ ^{**}	۴/۸۳ ^{**}	۴/۸۳ ^{**}	۴۵/۸۳ ^{**}	۴	باکتری محرک رشد (B)
کود شیمیایی (F)	۸/۱۷ ^{**}	۱۴/۱۷ ^{**}	۱/۰۳ ^{**}	۱/۰۳ ^{**}	۹/۰۳ ^{**}	۲	کود شیمیایی (F)
اثر متقابل F × B	۴/۰۳ ^{**}	۱۵/۷۶ ^{**}	۱/۶۳ ^{**}	۱/۶۳ ^{**}	۵۱/۱۵ ^{**}	۸	اثر متقابل F × B
خطا (E)	۰/۰۲۳	۰/۰۶۲	۰/۰۸۹	۰/۰۸۹	۰/۰۲۹	۲۸	خطا (E)
ضرب تغییرات (C.V%)	۱۱/۶۵	۱۳/۵۲	۱۳/۱۵	۱۳/۴۱	۱۰/۸۱	---	ضرب تغییرات (C.V%)

ادامه جدول شماره ۱-

منابع تغییرات (S.O.V)	مانگین مربعات (M.S)					درجه آزادی (D.F)	منابع تغییرات (S.O.V)
	اسکوپولامین ریشه	اسکوپولامین برگ	اسکوپولامین ریشه	اسکوپولامین برگ	آتروپین برگ		
تکرار (R)	۰/۰۰۲۴ ^{ns}	۰/۰۲۵ ^{ns}	۰/۰۰۸۶ ^{ns}	۰/۰۰۳۳ ^{ns}	۰/۰۳۵ ^{ns}	۲	تکرار (R)
باکتری محرک رشد (B)	۴/۲۵ ^{**}	۲۸/۸۱ ^{**}	۱۵/۸۵ ^{**}	۱۵/۸۵ ^{**}	۳/۱۸ ^{**}	۴	باکتری محرک رشد (B)
کود شیمیایی (F)	۳/۵۱ ^{**}	۵/۳۳ ^{**}	۲/۵۳ ^{**}	۲/۵۳ ^{**}	۱/۱۴ ^{**}	۲	کود شیمیایی (F)
اثر متقابل F × B	۱/۴۸ ^{**}	۸/۸۸ ^{**}	۰/۷۳۳ ^{**}	۰/۷۳۳ ^{**}	۰/۸۳ ^{**}	۸	اثر متقابل F × B
خطا (E)	۰/۰۸۶	۰/۳۰۸	۰/۲۸۵	۰/۲۸۵	۰/۱۱	۲۸	خطا (E)
ضرب تغییرات (C.V%)	۱۴/۰۶	۱۵/۲۵	۱۵/۳۱	۱۲/۱۹	---	---	ضرب تغییرات (C.V%)

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌داری





جدول شماره ۲- اثر متقابل باکتری‌های محرک رشد و کودهای شیمیایی بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه دارویی شاپیرک در شرایط گلخانه‌ای

اسکوپولاین ریشه (mg/g)	اسکوپولاین برگ (mg/g)	اسکوپولاین برگ (mg/g)	آزوپین ریشه (mg/g)	آزوپین برگ (mg/g)	نسبت وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه	وزن خشک ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	طول ریشه (cm)	قطر ریشه (mm)	حجم ریشه (cm ³)	تیمار
۲/۵۰۰c	۳/۶۵j	۵/۳۳n	۱۶/۶۷c	۱۶/۶۷c	۰/۴۳g	۳۶/۸۴f	۱۰/۶۱k	۲۱/۴۷i	۱۷/۰۰g	۳۲۴/۳۴k	F ₁ N
۵/۶۵a	۷/۷۷a	۵/۸۲j	۱۹/۵۸a	۱۹/۵۸a	۰/۴۸f	۱۹/۰۱k	۹/۳۳j	۳۳/۶۶c	۲۱/۶۹a	۱۶۴۱۷b	F ₂ N
۰/۸۲j	۵/۳۳c	۴/۹۸o	۱۹/۶۶b	۱۹/۶۶b	۰/۵۵d	۲۱/۶۷j	۱۲/۸۸g	۳۰/۶۶g	۱۸/۴۱b	۹۱۷/۰۷e	F ₃ N
۰/۹۴k	۶/۴۸c	۵/۴۰m	۱۶/۴۹f	۱۶/۴۹f	۰/۵۵d	۱۵/۵۱l	۸/۷۴m	۲۸/۳۳h	۱۳/۵۲e	۲۹۵۲/۸hi	F ₁ S
۱/۹۹e	۳/۱۳k	۵/۴۷l	۱۶/۰۴g	۱۶/۰۴g	۰/۴۶g	۲۵/۶۰c	۱۱/۰۶j	۲۲/۶۶c	۱۸/۴۳b	۱۵۰۶۷۷c	F ₂ S
۱/۹۱f	۱/۶۷m	۷/۱۷d	۱۰/۸۵n	۱۰/۸۵n	۰/۵۳e	۲۰/۸۷j	۱۱/۶۳j	۳۳/۰۰f	۱۴/۵۱d	۴۱۷۴۷j	F ₃ S
۲/۱۹d	۶/۸۷b	۶/۴۷g	۱۱/۳۶m	۱۱/۳۶m	۰/۳۳j	۳۴/۵۵b	۱۲/۰۸h	۳۴/۳۷c	۱۲/۱۵f	۲۸۷۲/۷hi	F ₁ A
۱/۸۸g	۳/۱۴k	۶/۲۴b	۱۸/۷۵d	۱۸/۷۵d	۰/۴۰h	۴۴/۵۵a	۱۸/۹۷b	۴۱/۶۶d	۲۲/۳۸a	۱۷۰۳۴۷a	F ₂ A
۱/۷۹h	۲/۲۲i	۷/۰۰e	۱۴/۳۰j	۱۴/۳۰j	۰/۵۵d	۳۳/۹۴g	۱۴/۳۶f	۳۴/۰۰ef	۱۸/۶۹b	۱۰۲۱۶۳d	F ₃ A
۱/۹۷c	۲/۵۴l	۵/۷۶k	۱۴/۸۱i	۱۴/۸۱i	۰/۴۳g	۲۴/۲۰g	۱۰/۶۹k	۲۸/۸۳h	۱۶/۳۵c	۷۳۰۱f	F ₁ SA
۰/۹۷j	۴/۶۴h	۷/۵۶b	۱۵/۸۶h	۱۵/۸۶h	۰/۵۳e	۲۸/۹۷c	۱۵/۹۶d	۲۴/۸۳c	۱۲/۱۵f	۵۲۰۲۷h	F ₂ SA
۰/۸۸j	۴/۶۴g	۶/۰۵i	۱۴/۰۰k	۱۴/۰۰k	۰/۶۴b	۲۶/۳۰d	۱۷/۶۸c	۳۴/۳۳ef	۱۳/۶۵c	۶۲۴۰۳g	F ₃ SA
۱/۳۶j	۶/۳۸d	۷/۶۸c	۱۹/۰۹c	۱۹/۰۹c	۰/۶۱c	۲۴/۸۶f	۱۵/۶۹e	۵۴/۷۶a	۱۴/۲۵d	۱۰۴۴۱d	F ₁ T
۲/۷۸b	۴/۹۳f	۶/۸۴j	۵/۸۸o	۵/۸۸o	۰/۶۲bc	۲۳/۰۳h	۱۵/۲۹c	۵۱/۰۰b	۱۴/۳۷d	۹۰۵۵۷c	F ₂ T
۰/۶۴m	۰/۶۴m	۷/۶۹a	۱۲/۰۰l	۱۲/۰۰l	۰/۸۶a	۱۵/۰۳f	۲۲/۲۷a	۳۷/۶۶h	۱۳/۳۸c	۴۴۰۶۷j	F ₃ T

میانگین‌های دارای حروف مشترک مطابق آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار قرار دارند. N: عدم تلقیح باکتری، S: باکتری سودوموناس، A: باکتری آزوباکتری، T: باکتری نوزیبا سیوس، کوکوس، F₁: عدم استفاده از کود شیمیایی، F₂: تیمار ۵۰٪ کود شیمیایی توصیه شده، F₃: تیمار ۱۰۰٪ کود شیمیایی توصیه شده.

صفات مورد بررسی

ریشه (۵/۶۹ میلی گرم/گرم) در تیمار F₂N (عدم تلقیح باکتری های محرک رشد و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (۰/۶۱ میلی گرم/گرم) در تیمار F₃T (تلقیح باکتری تیوباسیلوس + گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل شد (جدول شماره ۲).

همبستگی بین پارامترها

نتایج نشان داد که میزان آتروپین برگ با آتروپین ریشه همبستگی منفی معنی‌داری داشت ولی با اسکوپولامین برگ، قطر ریشه و حجم ریشه رابطه‌ی مثبت معنی‌داری نشان داد. میزان آتروپین ریشه نیز با صفاتی نظیر طول ریشه اصلی، وزن خشک اندام هوایی و نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری بود. میزان اسکوپولامین برگ نیز با اسکوپولامین ریشه و طول ریشه اصلی به طور مثبت ولی با وزن خشک اندام هوایی به طور منفی همبستگی معنی‌داری داشت. میزان اسکوپولامین ریشه نیز با صفاتی نظیر قطر ریشه و حجم ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری ولی با وزن خشک اندام هوایی و نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. در بین صفات کمی قطر ریشه با طول ریشه اصلی و حجم ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. طول ریشه اصلی نیز با حجم ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. وزن خشک ریشه با وزن خشک اندام هوایی دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری بود (جدول شماره ۳).

مربوط به تیمار F₃T (تلقیح با باکتری تیوباسیلوس + گوگرد و درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین نسبت (۰/۳۳) نیز مربوط به تیمار F₁A (تلقیح با باکتری ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) می‌باشد (جدول شماره ۲).

صفات فیتوشیمیایی

نتایج آزمایش نشان داد که باکتری‌های محرک رشد و کود شیمیایی دارای تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر صفات فیتوشیمیایی شامل میزان آتروپین برگ، آتروپین ریشه، اسکوپولامین برگ و اسکوپولامین ریشه بودند (جدول شماره ۱). بیشترین میزان آتروپین برگ (۱۹/۵۸ میلی گرم/گرم) در تیمار F₂N (عدم تلقیح باکتری‌های محرک رشد و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (۵/۸ میلی گرم/گرم) در تیمار F₂T (تلقیح باکتری تیوباسیلوس + گوگرد و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین و کمترین میزان آتروپین ریشه (به ترتیب ۷/۶۹ و ۴/۹۸ میلی گرم/گرم) به ترتیب در تیمار F₃T (تلقیح باکتری - تیوباسیلوس + گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و تیمار F₃N (عدم تلقیح باکتری‌های محرک رشد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل شد (جدول شماره ۲). همچنین بیشترین میزان اسکوپولامین برگ (۷/۷۷ میلی گرم/گرم) در تیمار F₂N (عدم تلقیح باکتری‌های محرک رشد و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (۰/۶۴ میلی گرم/گرم) در تیمار F₃T (تلقیح باکتری تیوباسیلوس + گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل شد (جدول شماره ۲). بیشترین میزان اسکوپولامین





جدول شماره ۳- ضراب همبستگی ساده صفات مورد بررسی آزمایش گلخانه‌ای

صفات	آنزیمین برگ	آنزیمین ریشه	اسکوبولامین برگ	اسکوبولامین ریشه	قطر ریشه	طول ریشه	وزن خشک ریشه	نسبت وزن خشک	حجم ریشه
آنزیمین برگ	۱								
آنزیمین ریشه	-۰/۴۰۷**	۱							
اسکوبولامین برگ	۰/۳۰۷*	-۰/۲۳۹	۱						
اسکوبولامین ریشه	۰/۰۷۶	-۰/۱۹۰۲	۰/۳۹۱**	۱					
قطر ریشه	۰/۴۳۵**	-۰/۲۶۹	۰/۰۵۵	۰/۴۰۹**	۱				
طول ریشه اصلی	-۰/۰۰۲	۰/۳۷۴*	۰/۳۳۵*	۰/۳۴۸	۰/۳۰۸*	۱			
وزن خشک ریشه	۰/۵۰۹	۰/۱۷۱	-۰/۱۷۰۸	-۰/۱۲۳	۰/۳۰۷	۰/۲۰۴	۱		
وزن خشک اندام هوایی	-۰/۱۹۰۷	۰/۵۸۷**	-۰/۴۲۱**	-۰/۴۶۰۴**	-۰/۰۱۷	۰/۲۰۳	-۰/۵۱۳**	۱	
نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه	-۰/۲۳۰۹	۰/۴۴۲**	-۰/۲۵۱	-۰/۳۹۸**	-۰/۱۷۸	۰/۰۲۴	-۰/۳۶۷*	۰/۵۸۶**	۱
حجم ریشه	۰/۴۴۲**	-۰/۱۹۷	۰/۳۳۶	۰/۵۱۰۷**	-۰/۸۹۷**	۰/۵۸۴**	۰/۲۵۲	-۰/۱۰۹	-۰/۲۳۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

بحث

نتایج آزمایش بیانگر آن بود که حصول حداکثر مقادیر حجم ریشه، قطر ریشه و وزن خشک ریشه متأثر از تلقیح باکتری ازتوباکتر بوده و در تیمار F2A (تلقیح با باکتری ازتوباکتر و مصرف ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) (جدول شماره ۲) حاصل شده است. ویژگی‌های سیستم ریشه اثری بوده لیکن می‌تواند توسط فاکتورهای محیطی تحت تأثیر قرار گیرد [۲۹] و تغییر در مورفولوژی ریشه و رشد آن تا حدی به غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد بویژه اکسین، اتیلن و سیتوکنین بستگی دارد [۳۰]. اسچپرس و همکاران [۳۱] معتقدند بعضی از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه با تولید ریزوبیوتوکسین، تولید اتیلن را در گیاه کاهش می‌دهند و همچنین باعث افزایش رشد ریشه می‌شوند. تناسب صحیح و درست بین ازت و فسفر نه تنها سبب افزایش عملکرد ریشه می‌شود بلکه تأثیر مطلوبی بر رشد گیاه خواهد داشت [۳۲]. توانایی باکتری ازتوباکتر در افزایش حلالیت فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی به اثبات رسیده است که از جمله روش‌های افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی می‌باشد. بنابراین ممکن است ازتوباکتر تناسب صحیحی بین ازت و فسفر ایجاد نموده و یا با تولید هورمون‌های مناسب و یا از طریق کاهش اتیلن موجب افزایش رشد ریشه و گیاه شده باشد [۳۱، ۳۲]. بیشترین میزان عملکرد طول ریشه اصلی نیز از تیمار تلقیح باکتری تیوباسیلوس با گوگرد بدون استفاده از کود شیمیایی حاصل شد (جدول شماره ۲). گیاهان گوگرد را تنها به شکل یون سولفات می‌توانند جذب نمایند [۳۳]. اکسیداسیون گوگرد عنصری به طور عمده توسط گونه‌های شیمیوسنتز کننده تیوباسیلوس انجام می‌شود. علاوه بر گوگرد عنصری، سولفیدها، تیوسولفات و تتراتیونات نیز به سولفات اکسیده می‌شوند. تیوباسیلوس‌ها می‌توانند اثرات قابل ملاحظه‌ای بر pH محیط داشته باشند. به علت تولید اسید توسط تیوباسیلوس حلالیت عناصر غذایی افزایش یافته و قابلیت دسترسی آنها تسهیل شده و در نهایت باعث افزایش رشد ریشه و گیاه می‌شوند [۳۴]. حتی در صورت عدم استفاده از کودهای

شیمیایی، تیوباسیلوس‌ها می‌توانند با تولید اسید در خاک (کاهش pH)، دسترسی به عناصر غذایی موجود در خاک که گیاه به آن دسترسی نداشت را نیز فراهم سازند. بشارتی [۳۵] ضمن بررسی‌های خود تأثیر مثبت تلقیح باکتری‌های تیوباسیلوس بر افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی را گزارش کرده‌اند. بیشترین وزن خشک اندام هوایی (عملکرد بیولوژیک) و نسبت وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه نیز در تیمار تیوباسیلوس با گوگرد با ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده حاصل شد (جدول شماره ۲). یکی از نتایج فرآیند اکسیداسیون گوگرد، کاهش موضعی pH خاک در اطراف ریشه گیاهان می‌باشد که این امر به حلالیت عناصر تثبیت شده در خاک (از جمله فسفر، آهن، روی و منگنز) می‌انجامد [۳۶]. به علت سرعت پائین فرآیند اکسیداسیون گوگرد در خاک، تلقیح گوگرد عنصری با تیوباسیلوس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا با افزایش سرعت اکسیداسیون گوگرد و فراهم شدن شرایط اسیدی حاصل از اکسید شدن آن، می‌توان به حلالیت فسفر موجود در سنگ فسفات، فسفر بومی خاک و در نهایت، افزایش عملکرد گیاه کمک زیادی کرد [۳۷]. در پژوهشی دیگر ساکاری [۳۸] مشاهده کردند که مصرف گوگرد به همراه تیوباسیلوس سبب افزایش عملکرد کلزا شده است. آتروپین (هیوسامین) و اسکوپولامین (هیوسین) در ریشه‌های جوان ساخته می‌شوند. مقدار قابل توجهی از این ترکیبات پس از ساخته شدن در ریشه‌های جوان به بخش‌های هوایی گیاه منتقل و در آنجا ذخیره می‌شوند [۳۹]. لذا میزان آتروپین و اسکوپولامین برگ بیشتر از ریشه است. بیشترین میزان عملکرد آتروپین ریشه در تیمار تلقیح با باکتری تیوباسیلوس با گوگرد با ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده، به دست آمد (جدول شماره ۲). بنابراین باکتری‌های ریزوسفری می‌توانند بر سنتز تروپان آلکالوئیدها تأثیر داشته باشند و سبب تغییر در محتوی و عملکرد این آلکالوئیدها شوند [۴۰، ۴۱]. فلاح و همکاران [۳۲] علت این امر را به کاهش pH خاک و اسیدیته نمودن خاک توسط تیوباسیلوس عنوان نمودند که باعث حلالیت گوگرد و عناصر تثبیت شده در خاک شده و در نهایت سبب



نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه بیشترین عملکرد ماده خشک اندام هوایی با کاربرد باکتری محرک رشد تیوباسیلوس به همراه گوگرد و بیشترین عملکرد ماده خشک ریشه در تیمار ازتوباکتر حاصل شده است ولی بیشترین میزان آتروپین برگ، اسکوپولامین برگ و ریشه در تیمار عدم تلقیح با باکتری های محرک رشد به دست آمده است. به هر حال بین میزان رشد اندام های گیاه و تجمع متابولیت دارویی اسکوپولامین و آتروپین در اندام های ریشه و برگ رابطه معکوس مشاهده شده است. به هر حال بیشترین وزن خشک اندام هوایی، آتروپین ریشه و اسکوپولامین برگ در تیمار ۱۰۰ درصد کود شیمیایی به همراه تلقیح با باکتری تیوباسیلوس و همچنین در تیمار ۵۰ درصد کود شیمیایی به همراه تلقیح با باکتری تیوباسیلوس بیشترین میزان آتروپین برگ حاصل شد.

افزایش عملکرد و رشد ریشه گیاه می شود. بیشترین میزان اسکوپولامین ریشه نیز در تیمار عدم استفاده از کود زیستی با ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده به دست آمد. در مسیر بیوسنتز آتروپین و اسکوپولامین، ابتدا آتروپین سنتز شده و سپس اسکوپولامین سنتز می شود [۴۲]. لذا به نظر می رسد که افزایش آتروپین ریشه بواسطه افزایش حلالیت عناصر غذایی بواسطه تیوباسیلوس بوده و بیشترین میزان عملکرد نیز در تیمار تیوباسیلوس مشاهده می شود. سنتز اسکوپولامین بعد از سنتز آتروپین و بدون حضور تیوباسیلوس رخ داده و لذا بیشترین میزان عملکرد اسکوپولامین در تیمار بدون استفاده از باکتری های محرک رشد و فقط در حضور تیمار کود شیمیایی مشاهده می شود. بالطبع بیشترین میزان آتروپین و اسکوپولامین برگ نیز بایستی در تیمار بدون استفاده از کود زیستی و فقط در حضور تیمار کود شیمیایی باشد که نتایج آزمایش نیز بیانگر این موضوع هست.

منابع

1. Fallahi J, Koocheki A and Rezvani Moghaddam P. Effects of biofertilizers on quantitative and qualitative yield of chamomile (*Matricaria recutita* L.) as a medicinal plant. *Iranian Journal of Field Crops*. 2008; 7 (1): 127 - 35.
2. Baghalian K and Naghdi Badi H. Volatile oil crops; their biology, biochemistry, and production. Andarz Publications. 2000, pp: 162 - 34.
3. Carrubba A, La Torre R and Matranga A. Cultivation Trials of some Aromatic and Medicinal Plants in a Semi-arid Mediterranean Environment. Proceedings of an International Conference on MAP, *Acta Horticulture (ISHS)*. 2002; 21: 23 - 31.
4. Rothe G and Drager B. Tropane alkaloids-metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Science* 2002; 163: 979-985.
5. Genova. E, Komitska and G, Beeva Y. Study on the germination of *atropa bella-donna* l. Seeds. Institute of Botany, Acad. G. Bonchev Str., Bl. 23, 1113 Sofia, Bulgaria. 1997, pp: 61-66.
6. Ghahreman A. Flora's color of Iran. Research Institute of Forests and Rangeland Publications, volumes 1-20. 1979-2001.
7. Salehi Surmaghi MH, Medicinal Plants and Phytotherapy, vol. 2, Donyay Taghziah Press, Tehran, Iran, 2010, pp: 376.
8. Zargari, A. Medicinal plants. Vol 3. Tehran: Tehran University Publications. 1996, P: 930.
9. Oksman-Caldentey KM, Kivela O and Hiltunen R. Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Science* 1991; 78: 129-136.
10. Ghahreman A. Iran Chromophytes, Volume 3. Tehran University Publication center. 1994, P: 770.
11. Lynch J.M. Resilience of the Rhizosfer to anthropogenic disturbance. *Biodegradation* 2002; 13: 21-27.
12. Ebhin masto R., P.K Chhonkar., D Singh and A.K. Patra. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial



on a sub-tropical inceptisoil. *Soil Biology and Biochem.* 2006; 38: 1577-1582.

13. Cherr C.M., Scholberg J.M.S and Mcorley R. Green manure approaches to crop production: a synthesis. *J. Agron.* 2006; 98: 302-319.

14. Jagaeeswaran R., Murugappan V and Govindaswamy M. W. Effect of slow release NPK fertilizer sources on the nutrient use efficiency in turmeric (*Curcuma longa* L.). *J. Agri. Sci.* 2005; 1: 65-69.

15. Han H.S., Supanjani K. and Lee D. Effect of coinoculation with phosphate and pottasum solublizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber, *J. Agron.* 2004; 24: 169-176.

16. Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T and Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growthpromoting bacteria. *Plant Soil* 2006; 287: 15 – 21.

17. Dakora FD, Matiru V, King M and Phillips DA. Plant growth promotion in legumes and cereals by lumichrome, a rhizoidal signal metabolite. In: Finan TM, Obrian MR, Layzell DB, Vessey K, Newton WE, eds. Nitrogen fixation: global perspectives. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002, pp: 321 – 2.

18. Gull M, Hafee FY, Saleem M and Malik K. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co- inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and mixed rhizobial culture. *Australian J. Experimental Agriculture* 2004; 44: 623 - 8.

19. Leticia AF, Pablo Z, Gomez MA and Sagardoy MA. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils* 2007; 43: 805-809.

20. Han HS, Supanjani and Lee KD. Effect of coinoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth

of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ.* 2006; 52 (3): 130 - 6.

21. Wu S.C., Z H. Caob., Z.G Lib., K.C Cheunga and M.H Wong. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and Ksolubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 2005; 125: 155-166.

22. Mahfouz SA and Sharaf-Eldin MA. Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield, and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *International Agrophysics* 2007; 21: 361-366.

23. Kumar TS, Swaminathan V and Kumar S. Influence of nitrogen, phosphorus and biofertilizers on growth, yield and essential oil constituents in ratoon crop of davana (*Artemisia pallens* Wall.). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chem.* 2009; 8: 86-95.

24. Youssef AA, Edri AE and maa AM. A comparative study between some plant growth regulators and certain growth hormones producing microorganisms on growth and essential oil composition of *Salvia officinalis* L. *Plant Annals of Agricultural Science* 2004; 49: 299-311.

25. Azzaz NA, Hassan EA and Hamad EH. The Chemical Constituent and Vegetative and Yielding Characteristics of Fennel Plants Treated with Organic and Bio-fertilizer Instead of Mineral Fertilizer. *Australian Journal of Basic and Applied Sci.* 2009; 3 (2): 579 - 87.

26. Koochaki A, Tabrizi L and Ghorbani R. Effect of biofertilizers on agronomic and quality criteria of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *J. Iranian Field Crop. Res.* 1387; 1 (6): 588 - 91.

27. Facchini P J and De Luca V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell.* 1995; 7: 1811 - 21.

28. Frick S, Chitty J A, Kramell R, Schmidt J, Allen R S, Larkin P L and Kutchan T M. Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with antisense berberine bridge enzyme gene (anti-bbe) via somatic embryogenesis



results in an altered ratio of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Res.* 2004; 13: 607 – 13.

29. Russel R. Plant root systems (the function and interaction with the soil). Marcel. Dekter. USA. 1977, p: 298.

30. Casson SA and Lindsey K. Genes and ignalling in root development. *New Phytologist* 2003, pp: 11 - 38.

31. Schippers B, Bakker AW, Bakker PA and Vanpeer R. Benefical deleterious effects of HCNproduction *Pseudomonas* on rhizosphere interaction. *Plant Soil.* 1990; 129: 75 - 83.

32. Omidbaigi R. Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants. 1st ed. Tarrahan Nashr Press. Iran. 1998, p: 35.

33. Banerjee M.R., Yesmin L. and Vessey J.K. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *Handbook of Microbial Biofertilizers*, 2005, pp: 137-181.

34. Fallah A., Besharati H. and Khosravi H. *Soil Microbiology*. Ayizh puplications: Tehran, Iran. Second Edition, 2010, 136 p.

35. Besharati H. Effect of Sulphur and Thiobacillus Species on increase of absorption of Some Elements in Soil. M.Sc. Thesis of Soil Science in Agriculture Faculty, Tehran University, 1998, pp: 98-147.

36. Cifuentes F. R. and W. C. Lindemann. Organic matter stimulation of elemental sulfur oxidation in calcareous soil. *Soil Science Society of America J.* 1993; 57: 727-731.

37. Rosa M.C., J.J. Muchovej and J.V.H. Alvarez. Temporal relations of phosphorus fractions in an oxisol amended with rock phosphate and *Thiobacillus thiooxidans*, *Soil Science Society of America J.* 1989; 53:1096-1100.

38. Sakari A., M.R. Ardakani and K. Khavazi. Effect of *Azospirillum lipoferum* and *Thiobacillus thioparus* on Quantitative and Qualitative Characters of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Under Water Deficit Conditions. *Middle-East Journal of Scientific Res.* 2012; 11 (6): 819-827.

39. Hashimoto T., Nakajima K., Ongena G. and Yamada. Two tropinone reductases with distinct Stereospecificities from Cultured Roots of *Hyoscyamus niger*, *Plant Physiol.* 1992; 100: 836-845.

40. Ghorbanpour M, Hatami M and Khavazi K. Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turk. J. Biol.* 2013; 37: 350-360.

41. Ghorbanpour M, Majnoun Hoseini N, Rezazadeh Sh, Omidi M, Khavazi K and Hatami M. Variations of Root and Shoot Tropane Alkaloids Production of *Hyoscyamus niger* under Two Rhizobacteria Strains Inoculation and Water Deficit Stress. *JMP.* 2011; 4 (40): 160-170.

42. Toni, M. Kutchan. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants *The Plant Cell* 1995; Vol. 7: 1059-1070.



Phytochemical and Morphological Responses of *Atropa (Atropa belladonna L.)* to PGPR under Greenhouse Conditions

Inanloo Far M (Ph.D. Student)¹, Heidari M (Ph.D.)¹, Naghdi Badi H (Ph.D.)^{2*}, Tolyat Abulhassani SM (Ph.D.)³, Makarian H (Ph.D.)¹, Ameryan MR (Ph.D.)¹

1- Department of Agronomy, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

2- Medicinal Plants Research Centre, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

3- Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran

* Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, 55th Kilometer of Tehran-Qazvin Freeway, Karaj, P.O.Box: 31375-1369, Iran

Tel: +98-26-34764010-19, Fax: +98-26-34764021

E-mail: naghdiyadi@yahoo.com

Abstract

Background: Atropine and scopolamine are important alkaloids that are widely used in the pharmaceutical industry.

Objective: Determination of the effects of PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) on phytochemical and morpho-physiological traits of *Atropa belladonna* L. under greenhouse conditions.

Method: This study was done as a factorial experiment based on a randomized complete block design with 3 replications. PGPR in four levels including control or no inoculation, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* + *Azotobacter* and *Thiobacillus* + Sulfur as the first factor, and also chemical fertilizer at three levels including no fertilizer, 50% recommended fertilizer and 100% recommended fertilizer as second factor were used.

Results: The PGPR and chemical fertilizer and their interactions had significant effect ($P \leq 0.01$) on phytochemical and morpho-physiological traits. The highest values of root volume, root diameter and root dry weight were obtained from treatment of *Azotobacter* with 50% recommended fertilizer. The highest atropine and scopolamine levels of leaf (19.58 and 7.77 mg/g, respectively) were observed in no bacteria inoculation with 50% chemical fertilizer. The highest root atropine content was 7.69 mg/g which related to treatment of *Thiobacillus* + sulfur with 100% recommended fertilizer. The highest content of root scopolamine (5.69 mg/g) was observed in treatment of no bacteria inoculation with 50% recommended fertilizer.

Conclusion: Generally, the results showed that PGPRs (plant growth-promoting rhizobacteria) improved the quantitative and qualitative performance of *A. belladonna*.

Keywords: *Atropa belladonna* L., Alkaloids, Atropine, Plant growth-promoting rhizobacteria, Scopolamine

